



Dynamique de repliement des protéines étudiées par dichroïsme circulaire résolu en temps.

Claire Niezborala

► To cite this version:

Claire Niezborala. Dynamique de repliement des protéines étudiées par dichroïsme circulaire résolu en temps.. Biophysique [physics.bio-ph]. Ecole Polytechnique X, 2008. Français. NNT : . pastel-00004435

HAL Id: pastel-00004435

<https://pastel.hal.science/pastel-00004435>

Submitted on 21 Jul 2010

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

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

Thèse présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE

par

Claire Niezborala

Une nouvelle technique de mesure du dichroïsme
circulaire : premiers pas vers l'étude du repliement de
polypeptides modèles

Soutenue le 26 septembre 2008 devant le jury composé de :

Anne ZEHNACKER-RENTIEN	Rapporteur
Chantal ANDRAUD	Rapporteur
Frank WIEN	Président
Martin VOLK	Examineur
Jean-Louis MARTIN	Examineur
François HACHE	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

C'est à la fois émue et angoissée que je me lance dans l'écriture de ces quelques lignes de remerciements puisque cette première page de mémoire de thèse sera probablement la plus lue. J'espère donc n'oublier personne...

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué au Laboratoire d'Optique et Biosciences de l'École Polytechnique. Je remercie Jean-Louis Martin de m'y avoir accueillie et de m'avoir permis de disposer de tous les moyens nécessaires au bon déroulement de cette thèse.

Un grand merci à mon directeur de thèse, François Hache, pour ses qualités scientifiques et sa grande disponibilité. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée en me laissant rapidement travailler de façon autonome. J'ai beaucoup appris à ses côtés, et lui suis infiniment reconnaissante de m'avoir permis de travailler sur un sujet aussi riche et ouvert.

Merci, également à Anne Zehancker-Rentien, Chantal Andraud, Frank Wien, Martin Volk et Jean-Louis Martin de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury. Je remercie plus particulièrement Anne Zehancker-Rentien et Chantal Andraud pour leur lecture attentive de ce mémoire ainsi que pour leurs précieuses remarques.

Je tiens à remercier Adeline Bonvalet et Guilhem Gallot pour leur gentillesse et la grande disponibilité dont ils ont toujours fait preuve lorsque nous partagions les sources laser. Merci mille fois pour vos conseils et votre aide précieuse. Merci également à Michel Négrerie et Byung-Kuk Yoo pour leurs études complémentaires du Dapoxyl.

Un grand merci à Xavier Solinas et Jean-Marc Sintès dont les compétences techniques ont été indispensables à la mise en œuvre de mes expériences. Vous avez toujours répondu présents et tenté de résoudre le plus rapidement possible les petits ou gros problèmes électroniques et mécaniques, auxquels j'ai été confrontée pendant cette thèse. Je vous suis pour cela infiniment reconnaissante.

Je remercie vivement Claude Hamel dont les talents d'opticienne ont permis de redonner une petite jeunesse à tous mes cristaux de BBO.

Merci à toute l'équipe de biologie pour m'avoir permis d'accéder à votre laboratoire et m'avoir toujours accueillie avec le sourire.

Enfin, un très grand merci à Christelle Français et Laure Lachapelle pour leur efficacité et leur dynamisme, qui sont pour beaucoup dans le bon fonctionnement du laboratoire.

I would also like to thank Martin Volk and his students, Renee Whynes and Chris

Bentley, for the time I have spent with them at the University of Liverpool. Thank you also to Tobias Schrader and Wolfgang Zinth from the University of Munich, who have involved us in the study of the beta-hairpin folding process. Vielen Dank! Merci enfin à Chantal Andraud, Yann Bretonnière et Florence Darbour pour l'intérêt qu'ils ont porté dès la première année de cette thèse à notre projet d'initiation du repliement de la polyalanine via l'excitation d'un chromophore.

Je tiens également à remercier Serge Fermandjian, qui m'a encadré en tant que tuteur lors de ma formation parallèle à l'Institut de Formation Supérieure Biomédicale. Je lui suis de plus très reconnaissante, ainsi qu'à Loussiné Zargarian, de m'avoir permis d'utiliser à plusieurs reprises leur spectrophotomètre pour mesurer les spectres de dichroïsme circulaire statique des molécules que j'ai étudiées au cours de cette thèse.

Je ne peux terminer sans remercier mes collègues de bureau Johanne, Didier, Jean-Baptiste, Taku, Kevin, Rajesh, Paul, qui, chacun à leur façon et à leur tour, ont contribué à rendre mon séjour au LOB inoubliable... Merci à tous les autres doctorants, post-doctorants et chercheurs pour leur accueil et la bonne ambiance qu'ils font régner au laboratoire. Et puis, un grand merci à Christelle, Laure, Isabelle, Latifa, Frédérique, Claude et Andreea pour tous les bons moments passés à table ou autour d'un café.

Enfin, merci à mes proches pour leur soutien constant.

TABLE DES MATIÈRES

1. Introduction	11
2. Le dichroïsme circulaire : concepts de base	15
2.1 Découverte de l'activité optique	15
2.2 Effets de l'activité optique sur une onde polarisée rectilignement	17
2.3 Mesures expérimentales de l'activité optique	19
2.3.1 Rotation optique	19
2.3.2 Dichroïsme circulaire	19
2.4 Origines microscopiques de l'activité optique	22
2.4.1 Chiralité	22
2.4.2 Exemple des acides aminés	22
2.4.3 Modèles microscopiques de l'activité optique	23
2.5 Application à la détermination de structures moléculaires	24
2.6 Rotation optique ou dichroïsme circulaire ?	25
2.6.1 Indice complexe	26
2.6.2 Choix du dichroïsme circulaire	27
2.7 Calcul du spectre de dichroïsme circulaire	27
2.7.1 Chromophores et transitions électroniques rentrant en jeu	27
2.7.2 Approche classique : modèle des oscillateurs couplés	28
2.7.3 Approche quantique : méthode matricielle	32
 <i>partie I Une nouvelle technique de mesure des variations temporelles du dichroïsme circulaire : principes et applications</i>	 35
3. Mesures du dichroïsme circulaire et de ses variations temporelles	37
3.1 Résolutions temporelles et échelles de temps	37
3.2 Une nouvelle technique de mesure	39
3.2.1 Le compensateur de Babinet-Soleil	39
3.2.2 Principe de la technique	41
3.2.3 Calculs à l'aide des matrices de Jones	43
3.2.4 Mise en œuvre expérimentale	47
3.3 Limites de la technique	51
3.3.1 Temps d'acquisition et mesure de η_0	51
3.3.2 Mesure de $\delta\eta$	52
3.3.3 Artéfacts induits par photosélection	53
3.4 Performances de la technique	57
3.4.1 Comparaison avec l'utilisation d'un modulateur électro-optique	57

3.4.2	Caractérisation de l'activité optique photoinduite	60
4.	Montage pompe/sonde accordable dans l'ultraviolet	63
4.1	Source laser infrarouge	63
4.2	Le faisceau sonde	65
4.2.1	Génération d'un continuum spectral	65
4.2.2	Amplification paramétrique optique en géométrie non colinéaire	66
4.2.3	Chemin optique de la sonde	68
4.3	Le faisceau pompe	70
4.4	Signal pompe/sonde	71
4.4.1	Retard pompe/sonde	71
4.4.2	Caractéristiques optiques des faisceaux pompe et sonde	72
4.4.3	Support de l'échantillon	74
4.4.4	Détection	75
5.	Application à l'étude de molécules biologiques et chimiques	77
5.1	La myoglobine : un exemple d'hémoprotéine	78
5.1.1	Relaxation de la myoglobine après photodissociation	78
5.1.2	Échantillons étudiés	80
5.1.3	Étude de l'absorption transitoire	81
5.1.4	Dichroïsme circulaire à 260 et 230 nm	83
5.1.5	Validation de la nouvelle technique	85
5.2	Étude de l'état excité du $[Ru(phen)_3]^{2+}$ dans l'ultraviolet	87
5.2.1	Échantillons étudiés	88
5.2.2	Mécanisme de transfert de charge	89
5.2.3	Détermination des modes normaux de l'état fondamental	90
5.2.4	Transitions de l'état excité	92
5.3	Variation de structure induite dans le $(R) - (+) - 1,1' - Binaphthol$	96
5.3.1	Caractérisation des échantillons étudiés	97
5.3.2	L'angle φ dans l'état fondamental	98
5.3.3	Absorption transitoire	99
5.3.4	Variation de l'angle φ	101
5.3.5	Étude de l'influence du solvant	103
partie II Étude des premières étapes du repliement de polypeptides modèles		107
6.	Repliement des protéines : modèles et expériences	109
6.1	Les différents modèles de repliement	111
6.2	Les principales techniques d'observation	114
6.3	Techniques d'initiation du repliement	115
6.4	Repliement et dépliement des hélices alpha	117
7.	Stabilisation d'une hélice alpha par photoexcitation d'un chromophore	119
7.1	Principe de l'expérience	119
7.2	Choix des chromophores	122
7.2.1	<i>Dapoxyl</i> TM	122

7.2.2	<i>RuTB</i>	123
7.2.3	7 – <i>nitrofluorene</i>	124
7.3	Premiers résultats avec le <i>Dapoxyl</i> TM	125
8.	<i>Initiation du dépliement par un « saut de température »</i>	129
8.1	Principe de l'expérience	129
8.2	Méthode indirecte	131
8.3	Perspectives	133
9.	<i>Conclusion</i>	135

1. INTRODUCTION

Un objet est dit chiral, lorsqu'il n'est pas superposable à son image dans un miroir. On prend très souvent l'exemple de la main pour définir la chiralité, car ce mot vient du grec *cheir* qui signifie « main ». Les acides aminés, qui contiennent un atome de carbone asymétrique ¹ sont également des modèles d'objets chiraux :

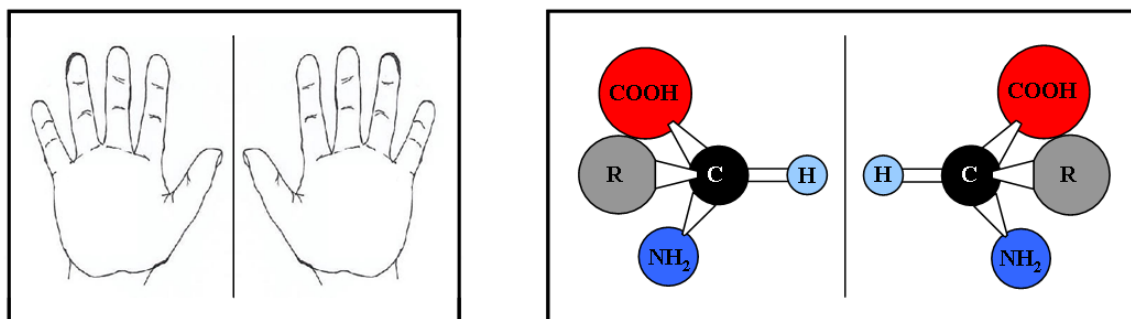


Fig. 1.1: Exemples d'objets chiraux : la main (à gauche) et les acides aminés (à droite).

Ces objets chiraux peuvent exister sous deux formes, images l'une de l'autre dans un miroir et que l'on appelle énantiomères. En chimie et biologie, ces deux formes, notées (L) pour levogyre et (D) pour dextrogyre, présentent souvent des activités différentes. C'est ainsi que A. Piutti remarqua, vers 1890, que la (L)-asparagine était insipide, tandis que la (D)-asparagine avait un goût sucré.

Un mélange équimoléculaire des énantiomères (L) et (D) est un mélange dit « racémique ». La plupart des médicaments sont commercialisés sous cette forme, sauf lorsque l'un des deux énantiomères influence défavorablement le rapport risque-bénéfice du mélange. Pourtant, l'efficacité du médicament vient souvent d'un seul énantiomère (l'autre étant inactif) et non de la synergie des actions des deux isomères optiques, ce qui permet d'ailleurs aux laboratoires pharmaceutiques de prolonger un mélange racémique arrivant en fin de brevet, par l'énantiomère possédant l'essentiel de l'activité biologique. Citons ainsi l'exemple de la *cétirizine*, un antihistaminique racémique commercialisé en France sous le nom de *Zyrtec®* et remplacé en 2003 par la *lévocétirizine*, son énantiomère levogyre aux effets cliniques parfaitement équivalents [1].

D'un point de vue physique, les molécules chirales ont la particularité de ne pas absorber de la même façon, les ondes polarisées circulairement droite $\odot$ et gauche $\ominus$. On parle alors de « dichroïsme circulaire ». Elles sont également capables de faire

¹ L'asymétrie vient du fait que le carbone est lié à quatre groupements d'atomes différents.

tourner le plan de polarisation d'une onde polarisée linéairement. Dans ce cas, on parle de « pouvoir rotatoire » ou de « rotation optique ». L'énantiomère levogyre (du latin *laevus* : gauche et *gyrare* : faire tourner) dévie ainsi le plan de polarisation vers la gauche, et l'énantiomère dextrogyre (du latin *dexter* : droite et *gyrare* : faire tourner) vers la droite. L'ensemble de ces propriétés caractérisent l'« activité optique » des molécules chirales.

Cette activité optique est très étroitement liée à la structure électronique des molécules. Différents modèles permettent d'expliquer son origine.

Dans le modèle classique à un électron, il est admis que l'activité optique provient du couplage de moments dipolaires électriques et magnétiques colinéaires. Un moment dipolaire électrique étant créé par un déplacement linéaire de charges et un moment dipolaire magnétique par un déplacement circulaire, les transitions optiquement actives des molécules chirales impliquent donc, dans ce modèle, un déplacement hélicoïdal de charges. Par définition, un déplacement suivant une hélice droite produit alors un signal de dichroïsme circulaire positif et un déplacement suivant une hélice gauche, un dichroïsme circulaire négatif [2]. Cette approche permet de traduire la chiralité intrinsèque de certains objets chiraux simples, comme le carbone asymétrique des acides aminés.

Dans le cas d'objets plus complexes, pour lesquels la chiralité peut parfois être créée par l'association de plusieurs chromophores intrinsèquement achiraux, le modèle des oscillateurs couplés est mieux adapté. Il considère l'activité optique comme issue du couplage électrostatique des moments dipolaires électriques localisés sur les différents chromophores. Cette dernière dépend donc très fortement des positions relatives de ces différents chromophores, et par conséquent donne de précieux renseignements sur la structure des molécules et par extension sur les modifications subies par cette structure au cours du temps.

Notons que le cas particulier du couplage excitonique entre les transitions dégénérées de chromophores identiques, s'applique parfaitement aux polypeptides hélicoïdaux [3]. Il permet en effet de prédire l'amplitude des deux bandes centrées sur 190 et 208 nm dans leur spectre de dichroïsme circulaire, ces dernières provenant du couplage des transitions électriques $\pi\pi^*$ des liaisons peptidiques.

L'association de ces deux bandes avec celle, centrée sur 222 nm et issue des transitions magnétiques $n\pi^*$ des liaisons peptidiques, caractérise le spectre de dichroïsme circulaire d'une structure secondaire bien particulière : l'hélice alpha. Les spectres des feuillets bêta, coudes et pelotes statistiques étant par ailleurs très différents, il est fréquent de mesurer le spectre de dichroïsme circulaire d'une protéine pour déterminer les proportions de ces différentes structures secondaires.

La formation de ces dernières représente une étape importante du processus de repliement des protéines, dont la compréhension reste encore aujourd'hui l'un des principaux enjeux de la recherche en biophysique. Il s'agit ainsi de mieux connaître les mécanismes permettant à une protéine, nouvellement synthétisée dans la cellule, de trouver le (ou les) bon(s) chemin(s) permettant de la mener vers sa forme native en quelques centaines de nanosecondes. C'est dans ce contexte que nous avons donc développé au cours de cette thèse, une nouvelle technique de mesure du dichroïsme

circulaire résolu temporellement, nous permettant de suivre les différentes étapes du repliement de polypeptides modèles (hélices alpha principalement).

On trouvera dans le premier chapitre de ce manuscrit, tous les concepts de base, nécessaires à la compréhension des travaux développés dans les deux parties qui suivent.

Le principe de la nouvelle technique de mesure du dichroïsme circulaire sera détaillé dans la première partie. Ses principales limites et performances seront également soulignées. Enfin, trois exemples d'applications seront étudiés. Ils nous permettront de mettre en évidence l'utilité du dichroïsme circulaire en tant que vecteur d'informations sur la structure des molécules, qu'elles soient d'intérêt chimique ou biologique :

- la myoglobine à travers l'analyse des modifications de structure induites par la dissociation d'un ligand *CO* initialement fixé sur son hème ;
- le $[Ru(phen)_3]^{2+}$ à travers l'étude de son état excité *MLCT* et la détermination des transitions électroniques responsables de la forme de son spectre de dichroïsme circulaire ;
- le $(R) - (+) - 1,1' - Binaphthol$ à travers l'étude des variations de l'angle diédral caractérisant sa structure.

L'étude du repliement de polypeptides modèles sera le sujet de la seconde partie du manuscrit, dont le premier chapitre nous permettra de placer nos travaux dans le fascinant contexte du repliement des protéines. Deux projets initiés au cours de cette thèse seront ensuite décrits : il s'agit de deux techniques permettant de déclencher différemment le repliement/dépliement des protéines et de donner des informations complémentaires sur les processus étudiés. Les premiers résultats obtenus à l'aide de la première technique seront présentés. De futurs projets seront enfin examinés.

2. LE DICHROÏSME CIRCULAIRE : CONCEPTS DE BASE

Le dichroïsme circulaire est une propriété physique, propre à certaines substances fluides ou solides, qui ont la particularité d'être chirales. Associé à la rotation optique, il permet une caractérisation complète de leur activité optique naturelle.

A travers une présentation des origines microscopiques et macroscopiques de l'activité optique ainsi que des principales techniques utilisées actuellement pour la mesurer et la modéliser, l'objectif de ce chapitre est d'introduire le dichroïsme circulaire en tant qu'outil d'étude de la structure globale de biomolécules et autres protéines, ainsi que de leurs changements de conformations.

Pour cela, nous nous intéresserons dans un premier temps, aux travaux de grands scientifiques du 19^{ème} siècle, ayant contribué à la découverte de l'activité optique puis à son interprétation. Nous montrerons ensuite, à partir de calculs simples, son effet sur une onde incidente polarisée rectilignement. Ces calculs nous permettront de mieux appréhender les notions de dichroïsme circulaire et de rotation optique, ainsi que les principes des techniques expérimentales utilisées couramment pour les mesurer.

Puis, une description des origines microscopiques de l'activité optique, nous permettra de mettre en évidence son utilité dans l'étude des changements de structure des biomolécules. Nous expliquerons également, pourquoi, dans le cadre de ces études, la mesure du dichroïsme circulaire est préférée à celle de la rotation optique.

Enfin, nous donnerons quelques éléments de calculs classiques puis quantiques, actuellement utilisés pour approcher le spectre de dichroïsme circulaire de protéines dont on souhaite déterminer la structure tridimensionnelle.

2.1 Découverte de l'activité optique

L'activité optique a été découverte au début du 19^{ème} siècle, à travers l'observation dans certaines substances, d'une *rotation optique*, également appelée *pouvoir rotatoire* ou encore *biréfringence circulaire*. Cette dernière a été mise en évidence pour la première fois en 1811 par F. Arago sur un cristal de quartz, puis en 1815 par J.B. Biot sur des échantillons liquides tels que l'essence de thérébenthine ($C_{10}H_{16}$) [4]. Ces observations lui ont d'ailleurs permis d'établir les lois de la polarisation rotatoire ou lois de Biot [5] :

- Certains corps isotropes transparents, traversés par une lumière monochromatique polarisée rectilignement, font tourner le plan de polarisation autour de la direction de propagation du faisceau. Il en va de même pour certains milieux anisotropes uniaxes, dont l'axe optique est parallèle à la direction moyenne du faisceau incident ;
- Il existe deux variétés de substances actives : les substances *lévogyres* qui font tour-

- ner le plan de polarisation vers la *gauche* d'un observateur vers lequel la lumière se propage, et les substances *dextrogyres* qui font tourner ce plan vers sa *droite* ;
- L'angle de rotation du plan de polarisation est proportionnel à l'épaisseur de la substance traversée ;
 - L'angle de rotation est inversement proportionnel au carré de la longueur d'onde de la lumière incidente (loi affinée par Drude en 1902) ;
 - Le sens de la rotation du plan de polarisation ne dépend pas du sens de propagation de la lumière dans le milieu.

Une interprétation satisfaisante de la rotation optique fut apportée par Fresnel en 1825. Ce dernier montra, en effet, qu'un milieu optiquement actif transmet sans déformation, mais avec des vitesses de propagation différentes (c'est à dire des indices de réfraction différents), des ondes polarisées circulairement gauche et droite ¹ présentant la même amplitude. A elle seule, cette explication permet de démontrer les résultats expérimentaux obtenus par Biot.

En effet, si l'on considère une onde polarisée rectilignement comme la superposition de deux ondes circulaires de même amplitude, l'une gauche et l'autre droite ; alors d'après l'hypothèse de Fresnel, les deux polarisations « rencontrent » des indices de réfraction différents en traversant l'échantillon optiquement actif. Elles se recomposent donc ensuite avec des retards différents, ce qui fait tourner la direction de l'onde rectiligne résultante, d'un angle égal à la moitié de la différence de phase entre les deux ondes circulaires (voir la section suivante pour le détail des calculs).

Il faudra ensuite attendre 1848 et les travaux de Haidinger [6] avant qu'une nouvelle caractéristique de l'activité optique soit mise en évidence dans des cristaux : la différence d'absorption entre une onde polarisée circulairement gauche et une onde polarisée circulairement droite. Le dichroïsme circulaire venait ainsi d'être découvert. Mais ce n'est qu'en 1895, que Cotton réalisa les premières mesures dans des liquides grâce à l'heureuse découverte du complexe de tartrate de chrome présentant un très fort signal de dichroïsme circulaire. Le principe de l'expérience consistait alors, à envoyer sur l'échantillon liquide des faisceaux lumineux polarisés circulairement gauche et droite, puis à comparer entre elles les intensités transmises dans un même plan d'observation. Le fort signal de dichroïsme circulaire mesuré ainsi par Cotton, prédominait largement sur tous les artéfacts potentiels liés à ce type d'expérience. Aussi, bien que d'autres techniques plus sophistiquées auraient pu être utilisées à cette époque, la simplicité de celle-ci rendit le résultat indiscutable.

En combinant les phénomènes de rotation optique et dichroïsme circulaire, définis précédemment, on peut désormais décrire simplement, l'effet de l'activité optique sur une polarisation rectiligne. Il suffit, en effet, de prolonger le raisonnement de Fresnel donné plus haut, et de supposer que les coefficients d'absorption des ondes polarisées circulairement gauche et droite sont également différents (définition du dichroïsme circulaire). Ainsi, après avoir traversé l'échantillon optiquement actif, les deux ondes polarisées circulairement gauche et droite (décomposition de la polarisation rectiligne), se recomposent avec des retards et des amplitudes différents. L'onde résultante est alors

¹ Une onde polarisée circulairement a son champ électrique qui décrit un cercle dans le plan orthogonal à la direction de propagation.

une onde elliptique, dont le grand axe est tourné d'un angle égal à l'angle de rotation optique par rapport à la direction de polarisation de l'onde rectiligne incidente.

Le calcul détaillé de ce phénomène est le sujet de la section suivante. Il est important de noter ici, qu'il s'agit également du point de départ du développement de la nouvelle technique de détection du dichroïsme circulaire, réalisée au cours de cette thèse, et qui sera décrite plus en détail dans la partie suivante.

2.2 Effets de l'activité optique sur une onde polarisée rectilignement

Considérons une onde incidente polarisée rectilignement suivant l'axe Ox et d'amplitude A . On sait qu'elle peut s'écrire comme la superposition de deux ondes circulaires de même amplitude, l'une gauche et l'autre droite ; ce qui peut s'écrire en notation de Jones :

$$\vec{E}_{incident} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} A = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 \\ i \end{pmatrix} A + \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 \\ -i \end{pmatrix} A = \vec{E}_{gauche} + \vec{E}_{droite} \quad (2.1)$$

En traversant l'échantillon optiquement actif, chaque polarisation va rencontrer un indice de réfraction (n_g , n_d) et un coefficient d'absorption linéaire (α_g , α_d) qui lui sont propres. Ce qui équivaut à dire que chacune d'entre elles va subir un déphasage et une absorption (proportionnels à l'épaisseur de la substance traversée). Par conséquent, le champ électrique de l'onde sortante s'écrira ² :

$$\vec{E}_{sortant} = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 \\ i \end{pmatrix} A e^{ik_g l} e^{-\frac{\alpha_g l}{2}} + \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 \\ -i \end{pmatrix} A e^{ik_d l} e^{-\frac{\alpha_d l}{2}} \quad (2.2)$$

où l est l'épaisseur de la substance traversée, $k_{g,d} = \frac{2\pi n_{g,d}}{\lambda}$ le vecteur d'onde et λ la longueur d'onde.

Pour simplifier la suite du calcul, définissons trois nouveaux paramètres. Il s'agit des amplitudes $A_g = A e^{-\frac{\alpha_g l}{2}}$ et $A_d = A e^{-\frac{\alpha_d l}{2}}$ et de l'angle de rotation optique θ relié aux vecteurs d'onde k_d et k_g par l'expression :

$$\theta = \frac{(k_d - k_g)l}{2} \quad (2.3)$$

Le champ électrique de l'onde sortante peut alors s'écrire :

$$\vec{E}_{sortant} = \frac{1}{2} \left\{ \begin{pmatrix} 1 \\ i \end{pmatrix} A_g e^{-i\theta} + \begin{pmatrix} 1 \\ -i \end{pmatrix} A_d e^{i\theta} \right\} e^{i \frac{(k_g + k_d)l}{2}} \quad (2.4)$$

$$= \frac{1}{2} \begin{pmatrix} A_g e^{-i\theta} + A_d e^{i\theta} \\ i(A_g e^{-i\theta} - A_d e^{i\theta}) \end{pmatrix} e^{i \frac{(k_g + k_d)l}{2}} \quad (2.5)$$

$$= \frac{1}{2} \begin{pmatrix} (A_g + A_d) \cos \theta + i(-A_g + A_d) \sin \theta \\ i(A_g - A_d) \cos \theta + (A_g + A_d) \sin \theta \end{pmatrix}_{(x,y)} e^{i \frac{(k_g + k_d)l}{2}} \quad (2.6)$$

$$= \frac{1}{2} \begin{pmatrix} A_g + A_d \\ i(A_g - A_d) \end{pmatrix}_{(x_\theta, y_\theta)} e^{i \frac{(k_g + k_d)l}{2}} \quad (2.7)$$

² Les coefficients d'absorption linéaire α_g et α_d sont définis en terme de puissance et non de champ électrique, ce qui explique le facteur 2 dans les parties réelles des fonctions exponentielles de l'équation 2.2.

Une illustration des calculs précédents est donnée dans la figure 2.1. La notation (x_θ, y_θ) qui apparaît dans l'équation 2.7 correspond au référentiel de l'ellipse, tourné d'un angle θ par rapport au référentiel de départ (x, y) .

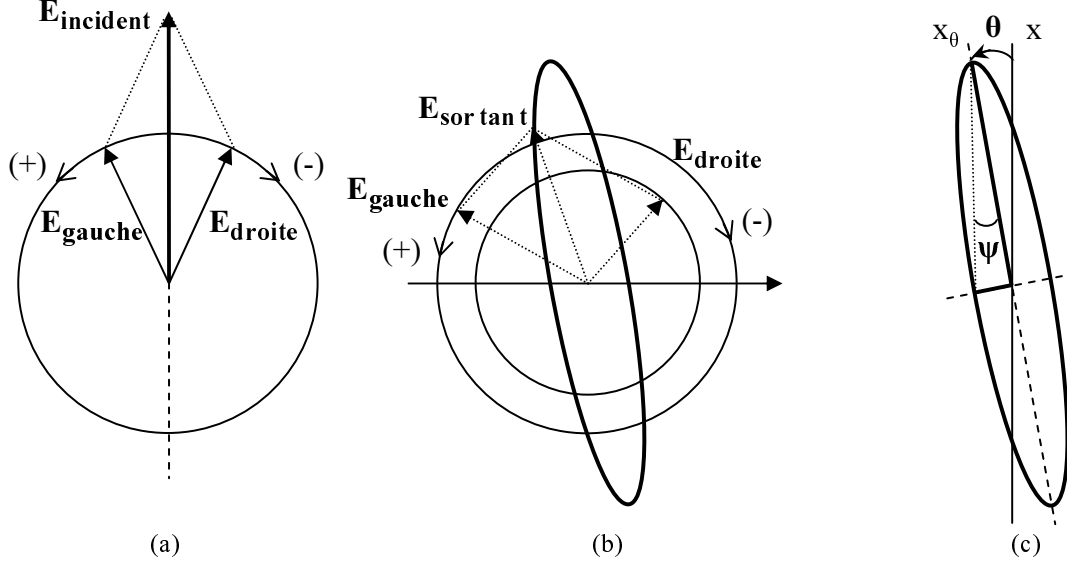


Fig. 2.1: Schémas représentant le parcours du champ électrique dans un plan orthogonal à la direction de propagation de l'onde, celle-ci allant vers l'observateur. (a) Décomposition de l'onde incidente polarisée rectilignement suivant l'axe Ox en deux ondes circulaires gauche (+) et droite (-) de même amplitude. (b) (+) et (-) sont déphasées et absorbées de façons différentes en traversant l'échantillon, et se recomposent à la sortie en une polarisation elliptique. (c) La direction du grand axe de cette polarisation elliptique est située à un angle θ de l'axe Ox défini par la polarisation incidente, c'est l'angle de rotation optique. L'ellipticité de cette polarisation est donnée par l'angle ψ .

Comme prévu dans la section précédente, l'onde résultante est une onde polarisée elliptiquement³ dont la direction du grand axe se trouve à un angle θ par rapport à la direction de la polarisation rectiligne incidente. On remarque ici, que si $n_d \geq n_g$ alors $\theta \geq 0$, ce qui veut dire que la rotation optique a lieu vers la gauche pour un observateur qui reçoit l'onde. Ainsi la rotation a lieu dans le sens de l'onde circulaire la plus rapide ($v = c/n$).

Pour finir, exprimons à l'aide de l'équation 2.7, l'ellipticité ψ de cette polarisation en fonction des amplitudes du champ électrique sortant, suivant les petit et grand axes :

$$\psi \cong \tan \psi = \frac{A_{\text{sortant, petit axe}}}{A_{\text{sortant, grand axe}}} = \frac{A_g - A_d}{A_g + A_d} = \frac{Ae^{-\frac{\alpha_g \cdot l}{2}} - Ae^{-\frac{\alpha_d \cdot l}{2}}}{Ae^{-\frac{\alpha_g \cdot l}{2}} + Ae^{-\frac{\alpha_d \cdot l}{2}}} \quad (2.8)$$

En général, $\alpha_{g,d} \cdot l \ll 1$, ainsi :

$$|\psi| \cong \frac{|\alpha_g - \alpha_d| \cdot l}{4} \quad (2.9)$$

³ Le sens de parcours de l'ellipse (gauche ou droite) dépend du signe de $(A_g - A_d)$.

La mesure de l'ellipticité ψ donne donc accès à la mesure du dichroïsme circulaire ⁴ de l'échantillon, qui est égal, nous le rappelons, à la différence d'absorption entre une onde polarisée circulaire gauche et une onde polarisée circulaire droite.

2.3 Mesures expérimentales de l'activité optique

Dans cette section, nous expliquerons comment sont mesurés, en pratique, la rotation optique et le dichroïsme circulaire. Nous indiquerons également les unités de mesure typiquement employées.

2.3.1 Rotation optique

Pour mesurer la rotation optique d'un échantillon, il suffit de le placer entre polariseur et analyseur croisés, puis de mesurer l'intensité transmise par l'ensemble du dispositif. La source lumineuse utilisée doit être monochromatique de polarisation quelconque, le polariseur servant à obtenir une polarisation incidente rectiligne de direction connue. Sans échantillon, il y a naturellement extinction du faisceau : l'intensité mesurée doit être nulle puisque l'analyseur et le polariseur sont en positions croisées.

Mais, en interposant un échantillon optiquement actif entre ces derniers, une intensité non nulle est détectée. L'extinction est alors retrouvée en tournant l'analyseur d'un angle θ égal à l'angle de rotation optique. Notons que cet angle peut être mesuré avec plus de précision, en utilisant un polarimètre ou un saccharimètre.

Puisque pour un solide ou liquide pur, l'angle de rotation θ du plan de polarisation est proportionnel à l'épaisseur l traversée par l'onde incidente (cf. lois de Biot, section 2.1), on exprime généralement la rotation optique, indépendamment de cette épaisseur, en degrés par millimètres :

$$\{\theta\}_{corpspur} = \frac{\theta}{l}$$

Pour une solution de concentration c , on définit de la même façon, la rotation optique spécifique en $^{\circ}.m^2.kg^{-1}$:

$$\{\theta\}_c = \frac{\theta}{l.c}$$

Une mesure de la rotation optique spécifique permet donc de vérifier la nature d'une substance si l'on connaît sa concentration ou inversement de déterminer la concentration d'une substance connue.

On utilise, par exemple, un saccharimètre pour mesurer la teneur en saccharose d'une solution sucrée, qu'il donne par lecture directe sur une échelle « saccharimétrique » (en grammes pour 100 g d'échantillon).

2.3.2 Dichroïsme circulaire

En pratique, le dichroïsme circulaire peut être mesuré suivant des techniques basées sur deux principes différents [6, 7]. Il s'agit, soit de générer des ondes polarisées

⁴ Cette valeur du dichroïsme circulaire est valable pour une longueur d'onde donnée : celle de l'onde incidente.

circulairement, soit de mesurer l'ellipticité induite sur une onde polarisée rectilignement.

La première technique est la plus fréquemment utilisée sur les spectrophotomètres. Elle repose sur le principe de l'expérience de Cotton réalisée en 1895 : avant de traverser l'échantillon, la polarisation rectiligne du faisceau lumineux incident est transformée et modulée entre une polarisation circulaire gauche et une polarisation circulaire droite, à l'aide d'un modulateur photoélastique ou électro-optique ⁵.

Remarques :

- *Un modulateur photoélastique* est composé d'un cristal piézo-électrique et d'une lame taillée dans un matériau isotrope. L'application d'une tension électrique alternative à une certaine fréquence f (typiquement 50 à 100 kHz) dans une direction donnée du cristal, lui impose alternativement des contractions et dilatations à la fréquence f . Ces vibrations sont transmises à la lame sous la forme d'une onde acoustique de fréquence f , qui crée une modulation de ses indices de réfraction, donc de la polarisation des ondes qui s'y propagent.
- *Un modulateur électro-optique* est composé le plus souvent d'un cristal de KDP et de deux électrodes placées de part et d'autre. L'application d'une tension entre les deux électrodes crée un champ électrique qui modifie les axes et indices principaux du cristal électro-optique ⁶. Ces modifications induisent une variation de la polarisation des ondes qui s'y propagent. En modulant le champ électrique, on peut donc moduler la polarisation de l'onde émergente.

Notons que l'on peut travailler à des fréquences de modulation bien plus faibles que dans le cas d'un modulateur photoélastique (typiquement quelques centaines de Hz), mais l'inconvénient est la valeur élevée de la tension devant être appliquée entre les électrodes pour générer le champ électrique ⁷ (quelques kV).

Le principe de la deuxième technique repose sur les calculs développés dans la section précédente. Ainsi, le dichroïsme circulaire est mesuré par l'intermédiaire de l'ellipticité induite sur une onde incidente polarisée rectilignement (cf. équation 2.9).

Pour mesurer cette ellipticité, on procède de la façon suivante : l'onde lumineuse incidente rencontre successivement un polariseur et une lame biréfringente qui vont la convertir respectivement en une onde polarisée linéairement puis elliptiquement. En passant ensuite à travers un échantillon optiquement actif, une variation de l'ellipticité est induite ⁸. Cette dernière peut alors être mesurée à l'aide d'un analyseur positionné suivant le petit axe de l'ellipse (dont la direction ne change pas avec le dichroïsme circulaire). En effet, d'après la figure 2.1 et l'équation 2.8, une variation de l'ellipticité induit une variation de la longueur de cet axe, donc de l'intensité transmise par l'analyseur. En mesurant ces variations obtenues successivement pour des polarisations elliptiques gauche et droite, et en les soustrayant, on peut alors facilement déterminer

⁵ Un retard de $\pm\lambda/4$ est imposé à ce système optique pour générer des ondes circulaires à partir d'une onde polarisée rectilignement à $\pm 45^\circ$ de ses axes principaux.

⁶ Lorsque ces variations d'indices sont proportionnelles au champ électrique appliqué, on parle d'effet Pockels.

⁷ Cette tension est d'autant plus élevée que la longueur d'onde de l'onde incidente est grande.

⁸ La polarisation elliptique se décompose en la somme d'une polarisation circulaire gauche et d'une polarisation circulaire droite d'amplitudes différentes, qui ne vont pas être absorbées de la même façon dans l'échantillon. cf. section 2.2

le signe et l'amplitude du dichroïsme circulaire. Il s'agit donc, ici aussi, d'une technique de modulation de la polarisation, le modulateur étant la lame biréfringente dont l'orientation est modifiée périodiquement de façon à générer successivement des polarisations elliptiques gauche et droite.

Deux unités sont couramment utilisées pour mesurer le dichroïsme circulaire (noté DC). Elles sont associées aux deux techniques de mesure décrites précédemment. Ainsi, pour des mesures en absorption à l'aide de la première technique, l'expression la plus courante est donnée en terme de coefficient d'extinction, ϵ en $M^{-1}.cm^{-1}$ ($mol^{-1}.L.cm^{-1}$), que l'on peut relier au coefficient d'absorption linéaire, $\alpha.l$, en utilisant la loi de Beer Lambert ⁹ via une autre grandeur, la densité optique DO :

$$\epsilon = \frac{1}{c.l}.DO = \frac{1}{c.l}.\frac{\alpha.l}{2,3} \quad (2.10)$$

avec $10^{-DO} = e^{-\alpha.l}$ donc $\ln(10).DO = \alpha.l$, c la concentration en $mol.L^{-1}$ et l l'épaisseur d'échantillon traversé (en cm).

Ainsi en $mol^{-1}.L.cm^{-1}$:

$$DC = \Delta\epsilon = \epsilon_{gauche} - \epsilon_{droite} \quad (2.11)$$

$$= \frac{1}{c.l}.(DO_{gauche} - DO_{droite}) \quad (2.12)$$

$$= \frac{1}{2,3.c} . (\alpha_{gauche} - \alpha_{droite}) \quad (2.13)$$

Si la mesure se fait suivant la seconde technique, alors on préférera quantifier le dichroïsme circulaire en terme d'ellipticité molaire, en $deg.mol^{-1}.L.m^{-1}$:

$$DC = [\psi] = 100.\frac{\psi}{c.l} \quad (2.14)$$

Notons que le passage d'une expression à l'autre du dichroïsme circulaire est directe. Pour le comprendre, nous allons partir de l'équation 2.9 reliant le dichroïsme circulaire, exprimé en coefficient d'absorption linéaire, à la valeur absolue de l'ellipticité ψ , introduite en radians dans la section précédente :

$$|\psi| = \frac{180}{\pi}.\frac{1}{4}.\Delta\alpha.l = \frac{180}{\pi}.\frac{2,3.c.l}{4}.\Delta\epsilon \text{ en degrés}$$

A l'aide de l'équation 2.14, on obtient alors la relation :

$$[\psi] = 3298.\Delta\epsilon \quad (2.15)$$

Ces deux expressions du dichroïsme circulaire présentent l'avantage d'être indépendantes de la concentration de l'échantillon ainsi que de l'épaisseur traversée. Elles permettent ainsi une comparaison rigoureuse des résultats obtenus sur des échantillons ayant des concentrations différentes.

⁹ $DO = \epsilon cl$.

2.4 Origines microscopiques de l'activité optique

Intéressons nous, dans cette section, à l'origine microscopique de l'activité optique afin de mieux comprendre le comportement macroscopique des substances actives.

2.4.1 Chiralité

À l'échelle microscopique, l'activité optique est attribuée à une absence de centre ou de plan de symétrie.

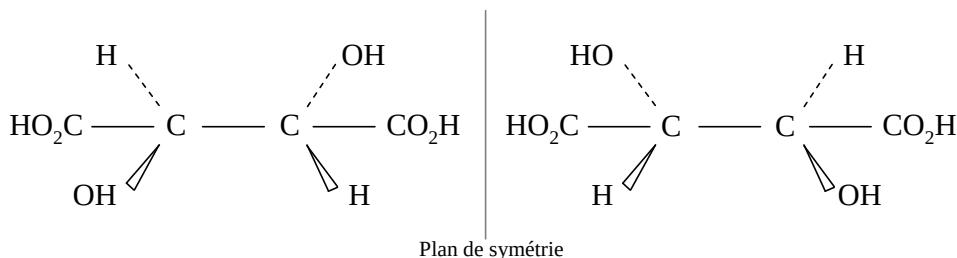


Fig. 2.2: À gauche : forme lévogyre de l'acide tartrique. À droite : forme dextrogyre de l'acide tartrique.

Dans les gaz ou liquides, cette dissymétrie trouve son origine dans la constitution de la molécule. C'est par exemple le cas des deux isomères de l'acide tartrique $(CH - OH - CO_2H)_2$ dont L. Pasteur découvrit l'activité optique en 1848. Comme l'illustre la figure 2.2, ces deux molécules n'ont ni centre, ni plan de symétrie, ne sont pas superposables, mais sont symétriques par rapport à un plan, ce qui implique des activités optiques inverses lorsqu'elles sont mises en solution. Cette propriété de non symétrie est appelée *chiralité* et les deux molécules symétriques par rapport à un plan sont des *énantiomères* : la forme *lévogyre* fait tourner le plan de polarisation vers la gauche et la forme *dextrogyre* le fait tourner vers la droite (cf. lois de Biot, section 2.1). Un mélange équi-moléculaire de ces deux formes est appelé mélange *racémique* ; il est inactif car les activités des deux énantiomères se compensent.

Dans tous les cas, une mesure de l'activité optique renseigne sur la structure stéréochimique d'une molécule et représente un outil de diagnostic précieux de la chiralité.

Notons que certains cristaux, tels que le quartz, perdent leur activité optique lorsqu'ils sont fondus ou dissous si les éléments qui les constituent ont une structure symétrique. De même, en solution, de grosses molécules ou protéines formées de sous-ensemble achi-raux peuvent présenter un arrangement global optiquement actif.

2.4.2 Exemple des acides aminés

À l'exception de la glycine ($R=H$), chacun des vingt acides aminés existant dans la nature est constitué d'un atome de carbone asymétrique lié à quatre groupements d'atomes différents, ils sont donc tous chiraux par définition. La figure 2.3 donne l'exemple de la forme lévogyre de l'alanine. Comme pour chaque acide aminé, un atome de carbone tétraédrique C_α est uni par covalence à un groupe carboxyle COO^- , un groupe amine primaire NH_3^+ , un atome d'hydrogène H et une chaîne latérale R égale

ici à CH_3 .

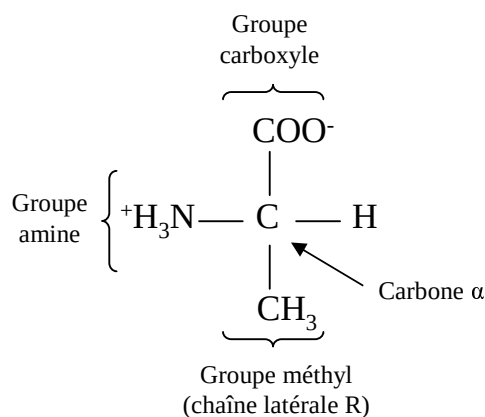


Fig. 2.3: (L)-alanine.

Il devrait donc exister pour tous les acides aminés (autres que la glycine), deux énantiomères, images l'un de l'autre dans un miroir. Les acides aminés des protéines de tous les êtres vivants connus appartiennent pourtant uniquement à la forme lévogyre. La raison de ce choix exclusif de la machinerie de synthèse protéique demeure encore aujourd'hui une énigme et le sujet de nombreuses controverses, c'est ce qu'on appelle le problème de l'homochiralité de la vie.

Bien qu'absents des protéines, les acides aminés de la forme dextrogyre sont néanmoins présents dans la nature et participent à d'importants processus biochimiques.

2.4.3 Modèles microscopiques de l'activité optique

Présentons brièvement les principes de deux approches classiques, à l'origine de nombreuses interprétations de l'activité optique à l'échelle microscopique : le modèle à un électron de Kauzman et le modèle des oscillateurs couplés [8]. Ils permettent de modéliser les caractéristiques intrinsèques ou globales de l'activité optique, que nous venons de décrire.

Le premier modèle est celui développé par Kauzman où la chiralité trouve son origine dans le couplage des transitions électriques et magnétiques d'un même chromophore ¹⁰, en présence du champ électrique créé par le reste de la molécule. On parle de chiralité intrinsèque. Dans ce cas, le dichroïsme circulaire ne dépend que du chromophore. Il ne donne aucune information sur la structure globale de la molécule. C'est par exemple le cas du carbone asymétrique des acides aminés.

Ce modèle met en évidence l'origine de la chiralité dans le couplage entre les moments dipolaire électrique $\vec{\mu}$, et magnétique $\vec{m}$, nécessairement colinéaires pour induire un mouvement chiral des électrons, c'est à dire hélicoïdal. Il nous permet d'introduire la force de rotation R qui donne une mesure de la « force » du dichroïsme circulaire répartie sur une bande d'absorption donnée, en DBM (magnéton de Bohr-Debye) et d'après

¹⁰ Un chromophore est un groupement d'atomes au sein de la molécule. Il est capable d'absorber l'énergie des photons dans une zone spectrale donnée.

l'équation de Rosenfeld :

$$R = \Im m(\vec{\mu} \cdot \vec{m}) \quad (2.16)$$

avec : $1 \text{ DBM} = 1 \text{ Debye} \times 1 \text{ Magneton de Bohr}$ sachant que : $1 \text{ Debye}^{11} = 3,3 \times 10^{-30} \text{ C.m}$ et $1 \text{ Magneton de Bohr}^{12} = 9,3 \times 10^{-24} \text{ J.T}^{-1}$.

Le deuxième modèle est celui des oscillateurs couplés où la chiralité résulte de l'interaction entre deux chromophores (ou plus) séparés spatialement. Chacun d'entre eux peut être achiral, leur arrangement spatial créant une activité optique globale. De plus, il n'y a pas d'échanges d'électrons entre ces chromophores. Leurs seules interactions sont dues au couplage entre leurs différents moments dipolaires électriques. Ce modèle permet de mesurer l'influence très forte de la position relative des chromophores sur l'activité optique. Il est à la base du calcul classique des spectres de dichroïsme circulaire que nous développerons plus en détail dans le paragraphe 2.7.2.

2.5 Application à la détermination de structures moléculaires

Les remarquables avancées de la biologie moléculaire au cours de la seconde moitié du $XX^{\text{ème}}$ siècle ont permis, notamment, de comprendre comment traduire la séquence des bases d'un gène en une chaîne d'acides aminés. Cependant, l'obtention d'une telle chaîne de structure primaire appropriée ne suffit pas à rendre une protéine active biologiquement. En effet, il faut, en plus, qu'elle adopte une conformation spatiale donnée, c'est à dire une structure tridimensionnelle très précisément définie où chacun des milliers d'atomes la constituant, est positionné par rapport aux autres à une fraction d'angström près. C'est cet arrangement spatial unique qui lui donne sa fonction biologique propre. L'étude des mécanismes accompagnant ce « repliement » est un sujet de recherche actuellement en pleine évolution. Il s'agit ainsi de déterminer l'enchaînement des événements qui mènent la protéine vers sa forme repliée et les vitesses avec lesquels ils se produisent, afin de mieux comprendre le lien unissant sa structure à sa fonction biologique [9].

Parallèlement, l'étude des changements de structure, induits par des processus chimiques ou optiques et se produisant dans certaines molécules biologiques, se trouve également au centre de nombreux travaux de recherche. Citons par exemple, l'effet allostérique de l'hémoglobine que l'on peut étudier à partir d'un cas simplifié : la fixation ou la dissociation d'un ligand dans la myoglobine [6].

Dans les deux cas, d'importants changements structuraux peuvent apparaître et ce, sur des échelles de temps pouvant s'étendre de la seconde à la fraction de picoseconde. De nombreuses techniques expérimentales ont donc été développées afin de pouvoir mesurer ces modifications. La plupart d'entre elles sont des techniques de spectroscopies résolues temporellement : spectroscopies d'émission, d'absorption, de dichroïsme circulaire et de rotation optique. Sans oublier celles, plus difficiles à mettre en œuvre, telles que la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la diffraction de rayons X dans les cristaux, qui ont des résolutions spatiales atomiques.

¹¹ Le Debye est l'unité du moment dipolaire électrique.

¹² Le Magnéton de Bohr est l'unité du moment dipolaire magnétique.

D'un point de vue dynamique, les spectroscopies d'émission et d'absorption sont capables de résoudre les mouvements locaux de chromophores particuliers qui absorbent la lumière incidente excitatrice ¹³, tandis que les spectroscopies de dichroïsme circulaire et de rotation optique ont une « mauvaise » résolution spatiale car elles ne sont sensibles qu'à des réarrangements globaux subis par les molécules. En effet, comme nous venons de le voir, l'activité optique est sensible à la disposition des chromophores dans l'espace (via le couplage de leurs transitions électroniques) ; ce n'est donc pas le changement de position d'un chromophore donné qui sera détecté mais plutôt la modification de son environnement, qu'il aura contribué à faire varier. On pourra, cependant, déterminer plus précisément le changement de position de ce chromophore, à l'aide de simulations basées sur les calculs qui seront développés dans la section 2.7.

Notons qu'en ce qui concerne la détermination des structures à l'état « statique », la découverte de structures secondaires chirales telles que les hélices alpha, feuillet bêta et pelotes statistiques, a permis de placer la spectroscopie de dichroïsme circulaire sur le premier plan de l'étude de l'ADN, de l'ARN, des protéines et de certaines biomolécules. En donnant une quantification directe des proportions de chacune de ces structures secondaires ¹⁴, elle apporte en effet de précieuses informations sur la structure globale des systèmes biologiques étudiés.

La spectroscopie de résonance magnétique est également très fréquemment employée pour déterminer la structure des protéines, mais elle se limite à de petites molécules (par exemple des protéines de moins de 110 acides aminés) placées dans des conditions moins proches des conditions physiologiques (concentration, pH, température...) que ne le permettent les mesures de dichroïsme circulaire [10].

La technique de diffraction des rayons X, a quant à elle, permis la détermination de la structure cristalline de près de 40000 protéines, polypeptides et molécules biologiques (6000 par RMN), bien qu'elle nécessite l'obtention de cristaux. Cette technique a vu le jour dans les années 1950 avec la détermination de la structure de la myoglobine de cachalot par Max Perutz et Sir John Cowdery Kendrew (travail pour lequel, leur fut décerné le prix Nobel de chimie en 1962). Elle est aujourd'hui utilisée en routine pour déterminer, par exemple, comment de nouveaux médicaments interagissent avec leur protéine cible et comment améliorer cette interaction.

2.6 Rotation optique ou dichroïsme circulaire ?

D'un point de vue théorique, les mesures du dichroïsme circulaire et de la rotation optique sont étroitement liées et apportent les mêmes informations sur la structure des molécules. L'objectif de cette section est de démontrer cette relation et d'expliquer les raisons pour lesquelles la mesure du dichroïsme circulaire est préférée à celle de la rotation optique. Pour cela, nous allons nous intéresser aux propriétés macroscopiques du milieu chiral.

¹³ La diffraction de rayons X et la spectroscopie de RMN, n'ont pas encore d'aussi bonnes résolutions temporelles.

¹⁴ La structure secondaire décrit la forme tridimensionnelle générale de sous groupes d'une molécule biologique. Elle ne se rapporte pas aux positions spécifiques dans l'espace tridimensionnel, qui concerne la structure tertiaire. cf. deuxième partie de cette thèse.

2.6.1 Indice complexe

Considérons le champ électrique d'une onde lumineuse monochromatique, de longueur d'onde λ , se propageant le long de l'axe z dans un échantillon liquide, isotrope, d'épaisseur l et d'indice complexe n :

$$\vec{E}(z) = \vec{E}_0 e^{i \frac{2\pi}{\lambda} n l} \quad (2.17)$$

où $\vec{E}_0$ est un vecteur aux composantes complexes, contenues dans le plan xy .

En introduisant les parties réelle et imaginaire de l'indice n , il apparaît clairement qu'en se propageant dans ce milieu, l'onde subit, à la fois, un déphasage et une atténuation :

$$n = \Re(n) + i \Im(n) \quad (2.18)$$

$$\vec{E}(z) = \vec{E}_0 e^{i \frac{2\pi}{\lambda} \Re(n) l} e^{-\frac{2\pi}{\lambda} \Im(n) l} \quad (2.19)$$

Cette expression nous permet de définir :

- L'indice de réfraction n_0 du milieu, à partir du terme de déphasage $e^{i \frac{2\pi}{\lambda} \Re(n) l}$:

$$n_0 = \Re(n) \quad (2.20)$$

- Le coefficient d'extinction ϵ , à partir du terme d'atténuation $e^{-2 \times \frac{2\pi}{\lambda} \Im(n) l}$ (mis au carré pour donner un terme d'atténuation de l'intensité) et de la loi de Beer Lambert déjà vue dans l'équation 2.10 :

$$e^{-2 \times \frac{2\pi}{\lambda} \Im(n) l} = 10^{-DO} \quad (2.21)$$

$$= 10^{-\epsilon (1000 \frac{Z}{N_A}) l} \quad (2.22)$$

où N_A est le nombre d'Avogadro et Z le nombre de chromophores constituant la molécule active par unité de cm^3 [11].

On obtient ainsi une description des propriétés macroscopiques du milieu actif, via les expressions respectives de son indice de réfraction et de son coefficient d'extinction (pour une longueur d'onde donnée) :

$$n_0 = \Re(n) \quad (2.23)$$

$$\epsilon = \frac{2N_A}{2300.Z} \frac{2\pi}{\lambda} \Im(n) \quad (2.24)$$

Notons que ces derniers sont liés par les relations de Kramers-Kronig, et qu'il en va donc de même pour la rotation optique θ (cf. équation 2.3) et le dichroïsme circulaire DC (cf. équation 2.11) [11] :

$$\theta(\omega) = \frac{\omega l}{2c} [\Re(n_d(\omega)) - \Re(n_g(\omega))] \quad (2.25)$$

$$= \frac{2\omega^2}{\pi} \int_0^\infty \frac{DC(\omega')}{\omega'(\omega'^2 - \omega^2)} d\omega' \quad (2.26)$$

$$DC(\omega) = \frac{2N_A}{2300.Z} \frac{\omega}{c} [\Im(n_g(\omega)) - \Im(n_d(\omega))] \quad (2.27)$$

$$= -\frac{2\omega^3}{\pi} \int_0^\infty \frac{\theta(\omega')}{\omega'^2(\omega'^2 - \omega^2)} d\omega' \quad (2.28)$$

2.6.2 Choix du dichroïsme circulaire

Si les mesures du dichroïsme circulaire et de la rotation optique sont ainsi liées par les transformées de Kramers-Kronig, cela veut dire qu'elles sont capables d'apporter les mêmes informations sur la structure des molécules. Aussi, mieux vaut tenter de mesurer la grandeur la plus facilement accessible. C'est le cas du dichroïsme circulaire.

En effet, le dichroïsme circulaire étant très fortement lié aux propriétés d'absorption de la molécule ; il est non nul, uniquement dans les régions spectrales où la molécule possède une transition optique, et ne dépend que d'elle. Tandis que la rotation optique est une grandeur dispersive, ce qui implique une étude de la molécule sur tout son spectre d'absorption ; sachant qu'en plus, une mesure à une longueur d'onde donnée combine des informations sur plusieurs transitions électroniques.

Pour toutes ces raisons, on préférera mesurer le dichroïsme circulaire plutôt que la rotation optique d'une protéine dont on souhaite étudier la structure.

2.7 Calcul du spectre de dichroïsme circulaire

L'objectif de ce chapitre est de décrire brièvement les principes de deux méthodes utilisées couramment pour approcher le spectre de dichroïsme circulaire de protéines dont on veut déterminer la structure. Les calculs reposent, dans les deux cas, sur la caractérisation des moments de transitions électroniques des chromophores constituant une même protéine, ainsi que sur la forme de leurs interactions. C'est pourquoi nous commencerons par décrire les principales transitions électroniques rentrant en jeu.

La première méthode est basée sur le modèle classique des oscillateurs couplés, déjà évoqué au paragraphe 2.4.3. C'est le point de départ de tous les calculs théoriques réalisés au cours de cette thèse pour interpréter les résultats obtenus expérimentalement (cf. chapitre 5).

La deuxième, est une approche quantique appelée méthode matricielle, qui prolonge la première.

Pour plus de détails, on pourra se reporter aux publications de Woody [12], Applequist [13] et Schellman [14].

2.7.1 Chromophores et transitions électroniques rentrant en jeu

Comme nous l'avons déjà précisé, le dichroïsme circulaire (DC) est non nul uniquement là où il existe une bande d'absorption et chacune de ces bandes est associée à un chromophore particulier. En étudiant le dichroïsme circulaire dans différentes régions spectrales, on peut donc obtenir des informations complémentaires sur la structure globale de la protéine. On distingue ainsi les principaux chromophores contribuant aux signaux de dichroïsme circulaire [10] :

- La liaison peptidique dont la contribution prédomine aux longueurs d'onde inférieures à 240 nm ;
- Les chaînes latérales d'acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine, phénylalanine) qui absorbent principalement entre 260 et 320 nm ;
- Les ponts disulfure ¹⁵ qui présentent une large bande d'absorption à 260 nm ;

¹⁵ Un pont disulfure est un lien covalent fort qui réunit deux cystéines dans une séquence peptidique.

- Les chromophores extrinsèques, comme l'hème de la myoglobine qui absorbe principalement à 400 nm.

La liaison peptidique et les chaînes latérales n'ont pas d'activité optique intrinsèque car elles ont des symétries planes. Il en va de même pour la plupart des autres chromophores, à l'exception du pont disulfure qui est dissymétrique à cause de sa géométrie non plane.

La plupart des calculs de *DC* incluent les transitions électroniques de la liaison peptidique et, de plus en plus, celles des chaînes latérales [15], ce qui permet d'affiner les résultats et de se rapprocher des signaux expérimentaux. Les paramètres de ces transitions sont en général issus de calculs d'orbitales moléculaires combinés à des données expérimentales disponibles sur les orientations des moments de transitions dipolaires [16]. Ils peuvent aussi être obtenus par des calculs *ab initio*¹⁶ [17, 18].

Les deux principales transitions électroniques de la liaison peptidique sont représentées sur la figure 2.4 :

- **La transition électrique $\pi\pi^*$** . Elle est représentée par un moment de transition dipolaire électrique, et implique une translation de charge. Elle est complètement caractérisable expérimentalement. Elle crée deux pics centrés respectivement sur 190 et 208 nm dans le spectre de *DC* des protéines.
- **La transition magnétique (électriquement interdite) $n\pi^*$** . Elle est représentée par un moment de transition dipolaire magnétique et quadrupolaire électrique, et implique une rotation de charge. Ses caractéristiques s'obtiennent à partir de calculs de chimie quantique. Elle crée un pic centré sur 222 nm dans le spectre de *DC* des protéines.

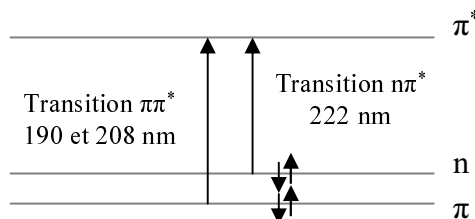


Fig. 2.4: Transitions électroniques de la liaison peptidique dans l'ultraviolet, impliquant l'orbitale liante π , l'orbitale anti-liante π^* et l'orbitale non liante n .

Évidemment, d'autres transitions électroniques de plus hautes énergies peuvent se coupler à ces deux dernières et influencer le spectre de *DC*.

2.7.2 Approche classique : modèle des oscillateurs couplés

Le principe de ce modèle repose sur le développement de DeVoe, repris ensuite par Applequist [13]. La protéine y est considérée comme un ensemble de N chromophores polarisables, fixés à des positions connues et présentant tous un certain nombre de

La molécule résultant ainsi de l'union de deux cystéines est appelée la cystine.

¹⁶ Des calculs *ab initio* reposent sur les lois de la physique fondamentale et sont établis sans postulats ou modèles particuliers.

transitions électroniques, contribuant à la polarisabilité totale. On ne prend pas en compte les transitions magnétiques et on néglige tout recouvrement ou échange électronique entre chromophores pour ne décrire que les interactions coulombiennes se créant entre ces oscillateurs.

Considérons ainsi un chromophore i présentant p_i transitions électroniques. En présence d'une onde lumineuse, chacune de ces transitions s se polarise suivant un vecteur $\vec{u}_{is,\alpha}$ avec α une des trois composantes cartésiennes de l'espace. On peut ainsi exprimer la polarisabilité totale $\alpha_{i,\alpha\beta}$ du chromophore i de la façon suivante :

$$\alpha_{i,\alpha\beta}(\nu) = \sum_{s=1}^{p_i} a_{is}(\nu) \vec{u}_{is,\alpha} \cdot \vec{u}_{is,\beta} \quad (2.29)$$

où a_{is} dépend de la fréquence d'excitation ν .

Dans le modèle de DeVoe, ces coefficients a_{is} sont obtenus de façon empirique pour chaque longueur d'onde étudiée. Dans celui d'Appelquist, on associe aux oscillateurs des bandes d'absorption de forme Lorentzienne, et on exprime les a_{is} comme des fonctions de la fréquence ν :

$$a_{is}(\nu) = \frac{c_{is}}{\nu_{is}^2 - \nu^2 - i\Gamma_{is}\nu} \quad (2.30)$$

où Γ_{is} correspond à la largeur à demi-hauteur de la bande d'absorption de l'oscillateur s du chromophore i , on l'appelle coefficient d'amortissement. Le terme c_{is} est une constante obtenue empiriquement qui est proportionnelle à la force d'oscillateur f_{is} de l'oscillateur s .

Parallèlement, on peut exprimer le moment dipolaire $\vec{\mu}_i$ induit sur le chromophore i comme la combinaison :

- d'un moment dipolaire induit par le champ électrique de l'onde lumineuse incidente : $\alpha_i \vec{E}_{incident}$
- et d'un moment dipolaire induit par l'environnement, c'est à dire par un champ électrique créé par les moments dipolaires des oscillateurs appartenant aux autres chromophores : $-\sum_{j \neq i} \alpha_i \bar{T}_{ij} \vec{\mu}_j$, où $\bar{T}_{ij}$ est le tenseur d'interaction dipolaire entre les oscillateurs i et j .

Considérons donc le vecteur colonne $\underline{\mu}$ dont les éléments s'écrivent (en sous-entendant, dans α , une sommation sur les trois coordonnées cartésiennes) :

$$\begin{aligned} \mu_{is} &= \vec{\mu}_{is,\alpha} \cdot \vec{u}_{is,\alpha} \\ \text{avec } \vec{\mu}_{is,\alpha} &= a_{is}(\vec{E}_{is,\alpha} \cdot \vec{u}_{is,\alpha}) \vec{u}_{is,\alpha} - \sum_{j \neq i} \sum_{t \neq s} a_{is}(\bar{T}_{ij} \mu_{jt,\beta}) \vec{u}_{is,\alpha} \end{aligned}$$

On obtient alors la relation matricielle $\underline{A} \underline{\mu} = \underline{E}$ où $\underline{E}$ est le vecteur colonne formé des termes $E_{is} = \vec{E}_{incident} \cdot \vec{u}_{is,\alpha}$ et $\underline{A}$ la matrice d'ordre $p = p_1 + p_2 + \dots + p_N$:

$$A_{is,jt} = \begin{cases} \frac{1}{a_{is}} & \text{si } i = j \\ \vec{u}_{is,\alpha} T_{ij,\alpha\beta} \vec{u}_{jt,\beta} & \text{sinon} \end{cases}$$

Une fois cette matrice $\underline{A}$ déterminée, il s'agit de l'inverser à l'aide des matrices $\underline{C}$ et $\underline{G}$ diagonales [13], et d'une famille de *modes normaux* définie par les vecteurs propres $\underline{t}_n$

et les valeurs propres ν_n^2 tels que :

$$\begin{aligned}\underline{\underline{A}} &= \underline{\underline{A_0}} - \nu^2 \underline{\underline{C}} + i\nu \underline{\underline{G}} \\ \underline{\underline{A}} \underline{\underline{t}}_n &= [(\nu_n^2 - \nu^2) \underline{\underline{C}} + i\nu \underline{\underline{G}}] \underline{\underline{t}}_n\end{aligned}$$

Ces modes normaux sont des modes d'oscillation virtuels de la molécule, bien que leurs fréquences d'oscillation libre ν_n , correspondent à de vrais bandes d'absorption. Ils nous permettent de définir la matrice $\underline{\underline{B}} = \underline{\underline{A}}^{-1}$, telle que :

$$\underline{\underline{\mu}} = \underline{\underline{B}} \underline{\underline{E}} \quad (2.31)$$

$$B_{is,jt} = \sum_n \frac{t_{is}^n t_{jt}^n}{\nu_n^2 - \nu^2 - i\Gamma_n \nu} \quad (2.32)$$

où t_{is}^n est l'élément du vecteur colonne propre $\underline{\underline{t}}^n$ correspondant à l'oscillateur is .

Avant de développer la suite des calculs, il est important d'effectuer, à ce niveau, un rapprochement entre les descriptions macroscopiques et microscopiques de la réponse d'une molécule excitée par un champ électrique :

- La réponse macroscopique se traduit en termes de polarisations macroscopiques électriques et magnétiques. En effet, la présence d'un champ électrique $\vec{E}$ excitateur, induit sur la molécule des polarisations électrique $\vec{P}$ et magnétique $\vec{M}$ données par les relations [19] :

$$\vec{P} = \bar{\alpha} \vec{E} + \bar{\beta} (\vec{\nabla} \times \vec{E}) \quad (2.33)$$

$$\vec{M} = \frac{\bar{\beta}}{c} \dot{\vec{E}} \quad (2.34)$$

où $\bar{\alpha}$ et $\bar{\beta}$ sont respectivement la polarisabilité moyenne et le paramètre de rotation (en supposant la molécule dans un milieu liquide et isotrope) et c est la vitesse de la lumière dans le vide ;

- A l'échelle microscopique, ces polarisations électrique et magnétique correspondent chacune, à la moyenne sur l'espace des moments dipolaires, respectivement électriques et magnétiques, induits sur les N chromophores formant la molécule [20] :

$$\vec{P}(z) = \sum_{is} \langle \vec{\mu}_{is} \rangle \quad (2.35)$$

$$\vec{M}(z) = \sum_{is} \langle \vec{m}_{is} \rangle \quad (2.36)$$

où $\vec{\mu}_{is}$ et $\vec{m}_{is}$ sont respectivement les moments dipolaire électrique et magnétique de l'oscillateur is , et $\langle \rangle$ signifient une moyenne sur l'espace.

Notons de plus, qu'il est indispensable de tenir compte de la non localité du champ électrique ¹⁷ pour pouvoir décrire l'activité optique :

$$E(r) = E(0) + \vec{r} \cdot \vec{grad} E(r) \quad (2.37)$$

¹⁷ En se restreignant au cas d'un champ local, on obtient une assez bonne interprétation de la plupart des propriétés optiques telles que la réfraction, l'absorption ou la diffusion Rayleigh [20].

Une fois ces remarques prises en compte, considérons à nouveau le vecteur colonne μ . Il s'agit du moment dipolaire électrique total de la molécule, induit par le champ incident $\underline{E}$. En prenant en compte la non localité de ce dernier, les éléments $\mu_{is} = \vec{\mu}_{is,\alpha} \cdot \vec{u}_{is,\alpha}$ du vecteur colonne, sont donc tels que :

$$\mu_{is,\alpha}^{\vec{}} = \sum_{jt \neq is} B_{is,jt} (\vec{E}_{jt}(0) \cdot \vec{u}_{jt,\beta}) \cdot \vec{u}_{is,\alpha} + \sum_{jt \neq is} B_{is,jt} \vec{r}_{jt,\beta} \cdot (\vec{\text{grad}} E_{jt}) \cdot \vec{u}_{is,\alpha}$$

Ainsi, en injectant ces vecteurs dans l'équation 2.35, on retrouve l'équation 2.33 (calculs détaillés par Applequist dans [19]) :

$$\vec{P}(z) = \bar{\alpha} \vec{E}(0) + \bar{\beta} (\vec{\nabla} \times \vec{E}) \quad (2.38)$$

$$\bar{\alpha} = \sum_{is,jt} B_{is,jt} \vec{u}_{is} \cdot \vec{u}_{jt} \quad (2.39)$$

$$\bar{\beta} = \frac{1}{12} \sum_{is,jt} B_{is,jt} \vec{r}_{ij} (\vec{u}_{is} \wedge \vec{u}_{jt}) \quad (2.40)$$

où $\vec{r}_{ij}$ est la position du chromophore j par rapport au chromophore i .

Sachant de plus, que [11] :

- les parties réelle et imaginaire de la polarisabilité $\bar{\alpha}$ donnent respectivement accès à l'indice de réfraction et au coefficient d'extinction ϵ ,
- les parties réelle et imaginaire du paramètre de rotation $\bar{\beta}$ donnent respectivement accès à la rotation optique et au dichroïsme circulaire,

alors on obtient les spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire [13], pour un milieu d'indice de réfraction proche de 1 :

$$\epsilon(\nu) = K_1 \sum_n f_n \frac{\nu^2 \Gamma_n}{(\nu_n^2 - \nu^2)^2 + \nu^2 \Gamma_n^2} \quad (2.41)$$

$$\Delta\epsilon(\nu) = K_2 \sum_n R_n \frac{\nu^3 \Gamma_n}{(\nu_n^2 - \nu^2)^2 + \nu^2 \Gamma_n^2} \quad (2.42)$$

où les constantes $K_{1,2}$ sont de la forme : $K_{1,2} = f_{1,2}(N_A, e, c, \epsilon_0, \hbar)$ ¹⁸ et où l'on définit les forces d'oscillateur f_n et de rotation R_n du mode n , par :

$$f_n = K_3 \sum_{is,jt} t_{is}^n t_{jt}^n \vec{u}_{is} \cdot \vec{u}_{jt} \quad (2.43)$$

$$R_n = K_4 \sum_{is,jt} t_{is}^n t_{jt}^n \vec{r}_{ij} (\vec{u}_{is} \wedge \vec{u}_{jt}) \quad (2.44)$$

où $K_3 = f_3(m, e)$ et $K_4 = f_4(\hbar)$.

Les résultats déduits de ces calculs sont très souvent en accord avec les spectres obtenus expérimentalement autour de 190 nm, c'est à dire vers la bande d'absorption des transitions électriques $\pi\pi^*$. Mais l'inconvénient principal de ce modèle, est qu'il ne prend pas en compte les transitions magnétiques $n\pi^*$ pourtant très importantes dans les protéines. C'est pourquoi les calculs de spectres de dichroïsme circulaire se font souvent à partir du modèle quantique que nous allons présenter dans le paragraphe suivant.

¹⁸ N_A constante d'Avogadro, e la charge de l'électron, m sa masse, c la vitesse de la lumière dans le vide, ϵ_0 la permittivité du vide et $\hbar$ la constante de Planck réduite.

2.7.3 Approche quantique : méthode matricielle

Cette approche quantique trouve, elle aussi, son origine dans le modèle des oscillateurs couplés mais elle étend la nature des interactions possibles entre chromophores au delà du couplage entre transitions électriques. On distingue ainsi trois mécanismes supplémentaires :

- Le mécanisme $\mu - m$: couplage d'une transition électrique $\pi\pi^*$ avec une transition magnétique $n\pi^*$ appartenant à un autre chromophore,
- Le mécanisme à un électron, dit de Kauzman (cf. paragraphe 2.4.3) : couplage des transitions électrique et magnétique d'un même chromophore dans le champ électrique crée par le reste de la molécule,
- le mécanisme d'interaction entre les transitions $n\pi^*$ de différents chromophores.

Comme dans l'approche classique, la protéine est considérée comme une association de N chromophores i auxquels on associe un nombre p_i de transitions électroniques is . On définit alors, la matrice hamiltonienne $\underline{\underline{H}}$ de la protéine, comme la matrice d'interaction entre ces transitions. C'est une matrice $p_N \times p_N$ avec $p_N = p_1 + \dots + p_N$ et dont les éléments sont [12] :

$$H_{is,jt} = \begin{cases} E_{is} & \text{si } i = j \\ V_{is,jt} & \text{sinon} \end{cases}$$

où E_{is} est l'énergie de l'état excité de la transition is du chromophore i , et $V_{is,jt}$ le potentiel d'interaction entre les transitions is et jt des chromophores i et j .

A chacune de ces transitions électroniques est associée, en général, une distribution de charges ponctuelles. En supposant que les interactions entre chromophore sont purement de nature électrostatique, on peut alors utiliser l'approximation monopole-monopole pour calculer les termes non diagonaux de la matrice H [19] :

$$V_{is,jt} = \sum_l \sum_m \frac{q_l^{is} q_m^{jt}}{r_{lm}} \quad (2.45)$$

où les indices m et n correspondent aux points de charge des transitions is et jt des chromophores i et j , et où r_{lm} est la distance entre ces derniers. Cette approximation monopole-monopole permet une bien meilleure modélisation de l'interaction coulombienne entre deux distributions de charges très proches, là où l'approximation dipolaire n'est plus totalement valable (distance caractéristique des interactions de Van de Waals).

L'étape suivante du calcul, passe par la transformation de la matrice $\underline{\underline{H}}$ en une matrice diagonale $\underline{\underline{H_d}}$ telle que $\underline{\underline{H_d}} = \underline{\underline{U}}^{-1} \underline{\underline{H}} \underline{\underline{U}}$ où $\underline{\underline{U}}$ est une matrice unitaire. On obtient alors, une description complète des états excités de la molécule en tant que système d'interaction des transitions électroniques localisées sur chaque chromophore :

- les éléments diagonaux de la matrice $\underline{\underline{H_d}}$ donnent les énergies des états excités de ce système d'interaction ;
- les éléments de la matrice $\underline{\underline{U}}$ traduisent l'interaction entre les transitions localisées.

On peut ensuite transformer de la même façon les matrices $\underline{\underline{\mu}}^{loc}$ et $\underline{\underline{m}}^{loc}$, dont les éléments sont les moments dipolaires électrique et magnétique des transitions localisées, pour

obtenir les matrices $\underline{\underline{\mu}}^{inter}$ et $\underline{\underline{m}}^{inter}$ des moments dipolaires électrique et magnétique du système d'interaction [14] :

$$\underline{\underline{\mu}}^{inter} = \underline{\underline{U}}^{-1} \underline{\underline{\mu}}^{loc} \underline{\underline{U}} \quad (2.46)$$

$$\underline{\underline{m}}^{inter} = \underline{\underline{U}}^{-1} \underline{\underline{m}} \underline{\underline{U}} \quad (2.47)$$

De ces expressions et à l'aide de l'équation de Rosenfeld 2.16, on déduit alors la matrice des forces de rotation du système d'interaction :

$$\underline{\underline{R}} = \Im m \left\{ \underline{\underline{\mu}}^{inter} : {}^T \underline{\underline{m}}^{inter} \right\} \quad (2.48)$$

où le signe T correspond à la transposée et $:$ signifie que des produits scalaires sont effectués élément par élément.

Le spectre de dichroïsme circulaire $\Delta\epsilon(\lambda)$, est finalement obtenu en centrant une bande d'absorption (de forme gaussienne ou lorentzienne) autour de chaque force de rotation, sachant que :

$$R \propto \int \frac{\Delta\epsilon(\lambda)}{\lambda} d\lambda \quad (2.49)$$

L'étape la plus difficile de cette méthode est l'évaluation des éléments de la matrice hamiltonienne et des moments dipolaires électrique et magnétique localisés. Comme nous l'avons déjà précisé, certains de ces éléments peuvent être déterminés expérimentalement, d'autres nécessitent des calculs *ab initio* ou semi-empiriques. Les actuels travaux de recherche sur ce sujet, reposent sur une meilleure détermination des distributions de charge, de l'orientation des transitions électroniques et sur la prise en compte des chaînes latérales contenues dans les protéines [15].

Première partie

UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE MESURE DES
VARIATIONS TEMPORELLES DU DICHROÏSME
CIRCULAIRE : PRINCIPES ET APPLICATIONS

3. MESURES DU DICHROÏSME CIRCULAIRE ET DE SES VARIATIONS TEMPORELLES

Nous avons vu dans le chapitre précédent, que la mesure du spectre de dichroïsme circulaire d'une molécule chimique ou biologique, donne des informations importantes sur sa structure globale, comme par exemple sa composition en structures secondaires s'il s'agit d'une protéine. En étudiant l'évolution de ce spectre au cours du temps, on peut donc suivre directement les changements de conformations moléculaires, et ainsi mieux comprendre certains mécanismes naturels, tels que le repliement des protéines.

Comme nous le verrons dans la première section de ce chapitre, il existe un certain nombre de techniques permettant de suivre les variations des spectres de dichroïsme circulaire sur différentes échelles de temps. Celle que nous avons développée au cours de cette thèse permet ainsi de mesurer des dynamiques se produisant sur plusieurs centaines de picosecondes, et ce avec une résolution sub-picoseconde.

Ce chapitre va nous permettre d'expliquer en détail le principe de cette dernière, son montage expérimental et sa mise en œuvre, puis ses limites. Nous soulignerons enfin ses avantages et performances, à travers, notamment, un exemple de résultat expérimental, que nous comparerons à celui obtenu dans les mêmes conditions, à l'aide d'une cellule de Pockels.

Le développement et l'étude des limites de cette nouvelle méthode, représentent la partie la plus importante de ce projet de thèse. Nous verrons dans le chapitre 5, qu'elle peut être appliquée à l'étude de divers mécanismes conformationnels, et qu'elle est en particulier bien adaptée pour l'étude du repliement des protéines, dont nous discuterons dans la seconde partie du manuscrit.

3.1 Résolutions temporelles et échelles de temps

L'étude de dynamiques « lentes », est tout à fait possible via des mesures régulières (tous les jours, heures, minutes) de spectres de dichroïsme circulaire obtenus à l'aide de spectrophotomètres commerciaux. Cependant, nous nous intéressons ici à des dynamiques ultra-rapides, de l'ordre de la milliseconde, nanoseconde ou picoseconde.

Dans ces conditions, il faut donc être capable de mesurer le dichroïsme circulaire avec la plus petite résolution temporelle possible, mais aussi d'initier ces dynamiques à l'aide de procédés ultra-rapides.

De la milliseconde...

Les mesures de dynamiques conformationnelles se produisant en quelques milli- ou microsecondes sont rendues possibles par l'utilisation de techniques d'initiation rapides :

mélange rapide ¹ (technique de *stopped flow*), photolyse ² à l'aide d'une lampe éclairant l'échantillon de façon quasi continue, élévation de température ou de pH... Ces techniques, couplées aux méthodes standards de mesure du dichroïsme circulaire (cf. section 2.3), permettent d'atteindre des résolutions temporelles limitées à quelques microsecondes.

...à la nanoseconde...

L'observation de dynamiques se produisant sur des échelles de temps de l'ordre de quelques nanosecondes, nécessite, quant à elle, l'emploi d'une technique d'initiation optique, appelée technique *pompe/sonde* : pompe étant le nom donné au faisceau lumineux exciteur, sonde celui du faisceau permettant de mesurer le dichroïsme circulaire après un retard variable.

On utilise par exemple une *pompe* issue d'un système laser impulsif, dont les impulsions de quelques nanosecondes servent à exciter un ou plusieurs chromophores de la molécule et ainsi provoquer des modifications de structure. Ces modifications se traduisent par des variations ultra-rapides des spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire, qui sont mesurées suivant une des techniques décrites dans la section 2.3 à l'aide d'un deuxième faisceau issu par exemple d'une lampe flash. Ce faisceau sonde est ensuite collecté par un photodétecteur (tube photomultiplicateur ou photodiode) relié à un oscilloscope électronique rapide, permettant d'atteindre une résolution nanoseconde. Le principal inconvénient d'une telle méthode optique est, bien sur, qu'elle se limite à l'étude de molécules contenant des chromophores photo-excitable.

...jusqu'à la picoseconde

Pour des dynamiques encore plus rapides, de l'ordre de la centaine de picosecondes ; il est préférable d'utiliser une pompe et une sonde issues d'un même système laser, délivrant idéalement des impulsions de quelques centaines de femtosecondes. Dans ce cas, les deux faisceaux qui n'ont pas nécessairement la même longueur d'onde, sont retardés l'un par rapport à l'autre, à l'aide d'une ligne à retard composée de miroirs mobiles servant à allonger (ou raccourcir) le chemin optique d'un des deux faisceaux. Avec une ligne de 15 cm, on peut ainsi obtenir un retard maximum $\Delta t = (2 \times 0.15)/3.10^8 = 1 \text{ ns}$ entre les deux faisceaux, focalisés dans une même région de l'échantillon. Le retard minimum est, quant à lui, principalement limité par la durée des impulsions dont on dispose.

C'est dans cette configuration que nous nous sommes placés au cours de cette thèse. Des informations sur la source laser et le montage expérimental seront données dans le chapitre 4.

¹ Mélange rapide de deux solutions, ou plus, pour étudier la cinétique de la réaction chimique ainsi induite. On parle de temps mort, pour le temps nécessaire à l'obtention du mélange. Il est typiquement de l'ordre de la demi milliseconde (50 microsecondes au mieux).

² Réaction chimique dans laquelle un composé chimique est décomposé par la lumière.

3.2 Une nouvelle technique de mesure

Dans cette section, nous expliquerons le principe d'une nouvelle méthode de détection du dichroïsme circulaire, basée sur la mesure de l'ellipticité induite par un milieu optiquement actif sur une onde polarisée rectilignement. Elle consiste, en pratique, à utiliser un polariseur et un analyseur croisés couplés à un compensateur de Babinet-Soleil, dont nous expliquerons le fonctionnement.

Nous détaillerons également les calculs permettant de déduire le dichroïsme circulaire des mesures expérimentales, et nous soulignerons la relative simplicité de mise en œuvre de cette nouvelle technique.

3.2.1 Le compensateur de Babinet-Soleil

On doit à Jacques Babinet (1794-1812), physicien français diplômé de l'Ecole Polytechnique, de nombreux travaux sur l'optique.

Jean-Baptiste-François Soleil (1798-1878), est, quand à lui, le fondateur de la maison Soleil, spécialisée dans la fabrication d'instruments d'optique commandés, à l'époque, par de grands scientifiques tels que Fresnel, Arago, Foucault et Babinet. Une des branches de cette entreprise, la maison Laurent, est aujourd'hui connue sous le nom de Jobin Yvon.

Le compensateur de Babinet-Soleil est un système optique permettant de compenser un retard de phase, provenant par exemple d'une lame cristalline biréfringente, en introduisant un autre retard facilement mesurable. C'est une variation du compensateur de Babinet.

Ce dernier est constitué de deux prismes en quartz de faible angle ξ et dont les axes optiques sont orthogonaux. L'un de ces deux prismes peut être translaté le long de l'autre à l'aide d'une vis micrométrique, comme l'illustre la figure 3.1a.

Le compensateur de Babinet-Soleil est un peu différent mais opère sur le même principe. Il est constitué également de deux prismes en quartz, dont l'un peut être translaté le long de l'autre, et d'une lame à faces parallèles (également en quartz). Cette lame est appelée lame de compensation, son axe optique est orthogonal à celui des prismes. Une illustration de ce compensateur est donnée sur la figure 3.1b.

La différence de phase introduite par un compensateur de Babinet-Soleil est :

$$\varphi_{BS} = \frac{2\pi}{\lambda}(n_O - n_E)(e_{1,fixe} - e_{2,var}) \quad (3.1)$$

où n_O et n_E sont respectivement les indices ordinaire et extraordinaire du système, $e_{1,fixe}$ est la distance fixe parcourue par la lumière dans la lame de quartz et $e_{2,var}$ la distance variable parcourue dans l'ensemble des deux prismes (figure 3.1b). Cette distance peut être modifiée en translatant le prisme de droite sur celui de gauche, mais elle est constante sur toute l'ouverture de l'appareil.

Par comparaison, la différence de phase introduite par un compensateur de Babinet est :

$$\varphi_B = \frac{2\pi}{\lambda}(n_O - n_E)(d_{1,h} - d_{2,h}) \quad (3.2)$$

où $d_{1,h}$ est la distance parcourue par la lumière dans le prisme de gauche et $d_{2,h}$ la distance parcourue dans celui de droite (figure 3.1b). Ces distances dépendent de la hauteur h , marquant la position du faisceau lumineux par rapport à l'ouverture totale de l'appareil. Pour une hauteur h donnée, on peut aussi faire varier $d_{2,h}$, en translatant le prisme de droite sur celui de gauche.

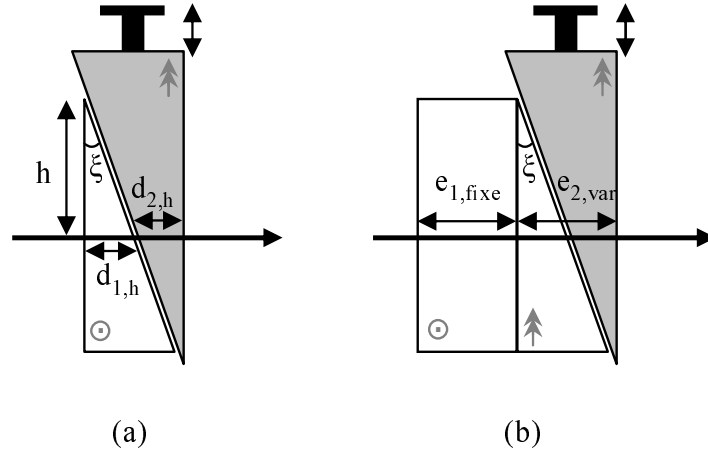


Fig. 3.1: (a) Compensateur de Babinet. (b) Compensateur de Babinet-Soleil.

L'avantage du compensateur de Babinet-Soleil est donc, de présenter un retard de phase constant sur toute son ouverture, pour une position donnée du prisme de droite. On peut ainsi travailler avec des faisceaux lumineux larges, sachant qu'ils seront uniformément retardés en passant dans un tel appareil optique.

Remarquons que sans la lame de compensation, on aurait également un déphasage uniforme sur toute l'ouverture, mais il serait de la forme $\varphi_{BS} = \frac{2\pi}{\lambda}(n_O - n_E)e_{2,var}$ où $e_{2,var}$ n'est jamais nulle. Cette lame est donc utile pour introduire des retards proches de zero.

La figure 3.2 illustre un compensateur de Babinet-Soleil réglé dans ses deux configurations extrêmes : celle pour laquelle le déphasage est nul et celle pour laquelle il est maximum.

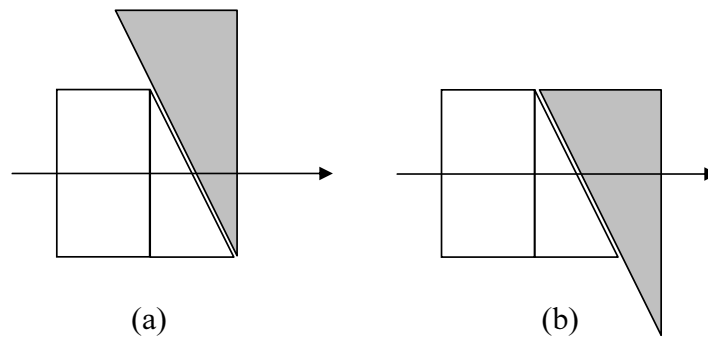


Fig. 3.2: Compensateur de Babinet-Soleil. (a) Déphasage nul. (b) Déphasage maximal.

3.2.2 Principe de la technique

On mesure souvent le dichroïsme circulaire et ses variations temporelles à l'aide d'un modulateur photo-élastique ou électro-optique (cf. section 2.3). Ce dernier doit toutefois être correctement aligné, pour générer des polarisations parfaitement circulaires, et que l'on puisse ainsi s'affranchir d'artéfacts très gênants tels que le dichroïsme linéaire induit par la pompe [21]. Outre cette difficulté, un tel modulateur a néanmoins l'avantage de permettre une mesure directe du dichroïsme circulaire via la détection de la différence d'absorption entre une onde polarisée circulaire gauche et une onde polarisée circulaire droite.

Mais en modulant la polarisation du faisceau sonde entre des ondes circulaires, comme ici, ou bien encore elliptiques, comme dans la technique de mesure de l'ellipticité; il devient difficile, en pratique, de moduler également l'amplitude de la pompe et ainsi espérer être peu sensible aux fluctuations du laser. Une modulation de la polarisation requiert donc des temps d'acquisitions très longs, afin de pouvoir mesurer des variations du dichroïsme circulaire, typiquement de l'ordre de $10^{-3}DO$ où DO est la densité optique de la molécule.

C'est donc dans l'objectif de travailler avec un meilleur rapport signal sur bruit, que nous avons développé une nouvelle technique de mesure du dichroïsme circulaire sans modulation de la polarisation. Son principe est le suivant :

1. Une onde excitatrice polarisée rectilignement, à l'aide d'un polariseur P_{pompe} , est focalisée à l'instant t_0 sur un échantillon chiral E . Il s'agit de la pompe.
Un hacheur (ou « chopper ») mécanique H (cf. figure 3.3(b)), tournant à la fréquence $f_{modulation}$, est placé sur son chemin, de manière à moduler son amplitude, en la bloquant et la laissant passer alternativement.
Comme nous l'avons expliqué précédemment, cette excitation optique perturbe le couplage des transitions électroniques des molécules contenues dans l'échantillon, induisant ainsi des variations des spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire dans certaines régions spectrales. Ces variations peuvent également être accompagnées de changements dans la structure spatiale des molécules ;
2. A l'instant $t = t_0 + \delta t$, un second faisceau est focalisé sur l'échantillon E . Il s'agit de la sonde, utilisée pour mesurer les variations du spectre de dichroïsme circulaire induites par la pompe.
Sa polarisation est rendue rectiligne, parallèle à celle de la pompe, en passant par le polariseur P_{sonde} parallèle à P_{pompe} .
Comme nous l'avons vu dans la section 2.2, cette polarisation rectiligne se décompose en une polarisation circulaire gauche et une polarisation circulaire droite, qui ne vont pas être absorbées de la même manière dans l'échantillon chiral. Elles se recomposent alors, à la sortie de l'échantillon, en une polarisation elliptique, dont l'ellipticité est directement liée au dichroïsme circulaire ;
3. Un compensateur de Babinet-Soleil, dont les lignes neutres sont situées à 45° (cf. figure 3.3(c)) de la direction du polariseur P_{sonde} , suivi d'un analyseur A_{sonde} croisé par rapport à P_{sonde} , sont ensuite utilisés pour « analyser » l'ellipticité de cette polarisation sortante (voir le paragraphe suivant pour plus de détails) ;
4. Un tube photomultiplicateur permet de détecter l'intensité du faisceau sonde

émergeant de l'ensemble de ces systèmes optiques ;

5. Cette intensité étant modulée à la fréquence $f_{modulation}$, un système de détection synchrone ³ permet d'accéder directement aux valeurs des variations d'absorption et de dichroïsme circulaire induites par l'excitation optique, et associées au retard δt de la sonde. Un intégrateur de type « boxcar » est également utilisé pour intégrer l'intensité détectée par le tube photomultiplicateur sur une fenêtre temporelle donnée ;
6. Ces mesures peuvent être obtenues pour des retards et longueurs d'onde différents.

Le montage comprenant tous les systèmes optiques, que nous venons de citer, est représenté sur la figure 3.3(a) :

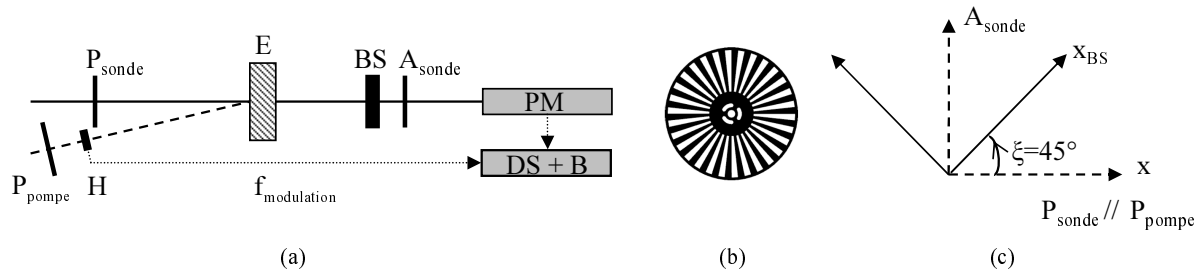


Fig. 3.3: (a) Le chemin parcouru par la pompe est représenté en pointillés, celui parcouru par la sonde en traits continus. Le montage optique comprend : les polariseurs P_{sonde} et P_{pompe} de directions parallèles, un hacheur H , l'échantillon chiral E , le compensateur de Babinet-Soleil BS , un analyseur A_{sonde} croisé par rapport à P_{sonde} , un tube photomultiplicateur PM relié à un système de détection synchrone DS (synchronisé sur la fréquence de rotation du hacheur) et à un Boxcar B . (b) Vue de face d'un hacheur mécanique. (c) Direction des axes propres du compensateur de Babinet-Soleil dans le référentiel du laboratoire (en pointillés).

Notons que les polariseurs et l'analyseur utilisés dans ce montage, sont des prismes de Glan conçus pour des applications lasers et présentant de très bons taux d'extinction (supérieurs à 10^5).

La fréquence de rotation du hacheur est fixée à 120 Hz , de façon à s'affranchir du bruit provenant du secteur (50 Hz et ses multiples) ou bien du système laser de fréquence 1 kHz .

Comme prévu, la modulation de l'amplitude du faisceau pompe permet d'augmenter grandement le rapport signal sur bruit des techniques de modulation de la polarisation. Les variations du dichroïsme circulaire sont ainsi beaucoup plus facilement et rapidement mesurables, d'autant plus que cette technique est relativement simple à mettre en œuvre.

La suite de cette section, explique en détail, comment le dichroïsme circulaire est effectivement mesuré à l'aide du compensateur de Babinet-Soleil et de l'analyseur.

³ La détection synchrone permet de sortir du bruit de très faibles signaux.

3.2.3 Calculs à l'aide des matrices de Jones

Pour rendre les calculs plus lisibles, nous utiliserons comme dans la section 2.2, le formalisme des matrices de Jones [22].

Une onde lumineuse incidente d'amplitude A qui sort du polariseur P_{sonde} (cf. figure 3.3(c)), est obligatoirement polarisée rectilignement suivant la direction horizontale Ox du repère (O,x,y) lié au laboratoire. Son champ électrique s'écrit donc, à l'aide des notations de Jones :

$$E_{incident} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} A$$

On peut également décrire, à l'aide de matrices de taille 2×2 , l'effet sur ce faisceau, de chaque système optique contenu dans le montage de la figure 3.3(a). L'amplitude et la polarisation du faisceau lumineux sortant peuvent alors être déterminées simplement par le produit suivant [23, 24] :

$$E_{sortant} = M_A \cdot M_{BS} \cdot M_E \cdot E_{incident} \quad (3.3)$$

où M_E est la matrice décrivant l'effet d'un échantillon chiral sur le faisceau incident, M_{BS} celle décrivant l'effet du compensateur de Babinet-Soleil, et M_A celle de l'analyseur.

Calculs des matrices M_A , M_{BS} et M_E

A_{sonde} est un polariseur de direction Oy , sa matrice peut donc s'écrire simplement dans le repère (O,x,y) :

$$M_A = \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (3.4)$$

Le compensateur de Babinet-Soleil applique un déphasage variable $\varphi_{BS} = 2X$ sur tout faisceau lumineux le traversant. Sachant, de plus, que ses lignes neutres se trouvent à 45° ⁴ des axes du repère (O,x,y) , on peut décomposer sa matrice en un produit de trois matrices élémentaires $M_{BS} = M_{-45} \cdot M_X \cdot M_{45}$ où les $M_{\pm 45}$ introduisent des rotations d'angle $\pm 45^\circ$ et M_X un déphasage X :

$$M_{BS} = \begin{pmatrix} \frac{\sqrt{2}}{2} & \frac{\sqrt{2}}{2} \\ -\frac{\sqrt{2}}{2} & \frac{\sqrt{2}}{2} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} e^{-iX} & 0 \\ 0 & e^{iX} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \frac{\sqrt{2}}{2} & -\frac{\sqrt{2}}{2} \\ \frac{\sqrt{2}}{2} & \frac{\sqrt{2}}{2} \end{pmatrix} \quad (3.5)$$

$$= \begin{pmatrix} \cos X & i \sin X \\ i \sin X & \cos X \end{pmatrix} \quad (3.6)$$

Pour simplifier l'écriture de la matrice M_E , définissons l'indice n et le coefficient d'absorption α moyens, et rappelons les définitions de la rotation optique θ et du dichroïsme circulaire η vues dans le premier chapitre :

$$\begin{cases} n = (n_g + n_d)/2 \\ \theta = \pi(n_d - n_g)l/\lambda \\ \alpha = (\alpha_g + \alpha_d)/2 \\ \eta = (\alpha_g - \alpha_d)l \end{cases} \quad (3.7)$$

⁴ Si cet angle vaut -45° , il faut faire attention à remplacer X par $-X$ dans tous les calculs qui suivent.

où l est l'épaisseur d'échantillon traversée, l'indice g signifie gauche et l'indice d signifie droite.

Comme dans la section 2.2, on peut décomposer la polarisation rectiligne de l'onde incidente en la somme d'une polarisation circulaire gauche et d'une polarisation circulaire droite, de même amplitude. Le champ électrique émergent $E_{\text{échantillon}}$, peut alors être exprimé à l'aide des termes que nous venons de définir :

$$\begin{aligned} E_{\text{échantillon}} &= \frac{A}{2} \begin{pmatrix} 1 \\ i \end{pmatrix} e^{i\frac{2\pi}{\lambda} n_g l} e^{-\frac{\alpha_g l}{2}} + \frac{A}{2} \begin{pmatrix} 1 \\ -i \end{pmatrix} e^{i\frac{2\pi}{\lambda} n_d l} e^{-\frac{\alpha_d l}{2}} \\ &= \frac{A}{2} e^{i\frac{2\pi}{\lambda} n l} e^{-\frac{\alpha l}{2}} \begin{pmatrix} e^{-i\theta} e^{-\frac{\eta}{4}} + e^{i\theta} e^{\frac{\eta}{4}} \\ i(e^{-i\theta} e^{-\frac{\eta}{4}} - e^{i\theta} e^{\frac{\eta}{4}}) \end{pmatrix} \\ &= A e^{i\frac{2\pi}{\lambda} n l} e^{-\frac{\alpha l}{2}} \begin{pmatrix} \cosh(\frac{\eta}{4} + i\theta) \\ -i \sinh(\frac{\eta}{4} + i\theta) \end{pmatrix} \end{aligned}$$

On peut ainsi définir la matrice M_E de l'échantillon chiral, telle que :

$$E_{\text{échantillon}} = M_E \left(\frac{A}{2} \begin{pmatrix} 1 \\ i \end{pmatrix} + \frac{A}{2} \begin{pmatrix} 1 \\ -i \end{pmatrix} \right) \quad (3.8)$$

$$M_E = e^{i\frac{2\pi}{\lambda} n l} e^{-\frac{\alpha l}{2}} \begin{pmatrix} \cosh(\frac{\eta}{4} + i\theta) & i \sinh(\frac{\eta}{4} + i\theta) \\ -i \sinh(\frac{\eta}{4} + i\theta) & \cosh(\frac{\eta}{4} + i\theta) \end{pmatrix} \quad (3.9)$$

Remarquons que cette matrice prend en compte simultanément les effets du dichroïsme circulaire et de la rotation optique.

Calcul du dichroïsme circulaire « statique »

Toutes les matrices ayant été définies, l'expression du champ électrique sortant de l'analyseur est obtenue simplement à partir de l'équation 3.3. En supposant que $\theta, \eta, X \ll 1$ et en ne gardant que les termes au premier ordre, on peut donc écrire :

$$\begin{aligned} E_{\text{sortant}} &= A e^{i\frac{2\pi}{\lambda} n l} e^{-\frac{\alpha l}{2}} \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & iX \\ iX & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & -\theta + i\frac{\eta}{4} \\ \theta - i\frac{\eta}{4} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \\ &= A e^{i\frac{2\pi}{\lambda} n l} e^{-\frac{\alpha l}{2}} \begin{pmatrix} 0 \\ \theta + i(X - \frac{\eta}{4}) \end{pmatrix} \end{aligned}$$

En prenant le module au carré de cette expression, on obtient finalement l'intensité lumineuse en sortie de l'analyseur :

$$I_{\text{sortant}} = |A|^2 e^{-\alpha l} \left[(\theta)^2 + \left(X - \frac{\eta}{4} \right)^2 \right] \quad (3.10)$$

Nous pouvons remarquer à partir de cette équation, qu'en absence d'échantillon entre le polariseur et le compensateur de Babinet-Soleil, ou si l'échantillon est non chiral, alors l'intensité est égale à zéro lorsque le déphasage X est nul ($\theta = \eta = 0$). Ce résultat est naturel puisque le polariseur et l'analyseur sont croisés et que les directions des lignes neutres du compensateur sont telles que pour un déphasage nul, ce dernier n'a aucun effet sur les faisceaux lumineux le traversant ⁵. Notons de plus, que dans ces conditions,

⁵ Le choix de l'orientation des lignes neutres du compensateur, à 45° des axes Ox et Oy, permet de maximiser la valeur de l'intensité I_{sortant} ainsi détectée.

et en faisant varier le déphasage X du compensateur, l'intensité détectée prend la forme d'une parabole centrée en zéro : $I_{\text{sortant}} \propto X^2$.

D'après cette même équation, la présence d'un échantillon chiral va donc modifier l'allure de la parabole, dont le nouveau minimum sera situé à une distance $X_{\text{min}} = \eta/4$ de zéro, où η est la valeur du dichroïsme circulaire « statique ».

Calcul des variations du dichroïsme circulaire induites par la pompe

Comme nous l'avons déjà précisé, la focalisation d'un faisceau pompe sur un échantillon chiral, induit des variations des spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire, qui peuvent être mesurées, dans un second temps, à l'aide d'un faisceau sonde retardé et accordé à une longueur d'onde appropriée.

Considérons ainsi les valeurs de l'absorption αl , et du dichroïsme circulaire η , mesurées par un faisceau sonde après excitation par une pompe :

$$\begin{cases} \alpha l = \alpha_0 l + \delta(\alpha l) \\ \eta = \eta_0 + \delta\eta \end{cases}$$

où $\alpha_0 l$ et η_0 sont les valeurs de l'absorption et du dichroïsme circulaire statiques associées à la longueur d'onde λ de la sonde et mesurées en absence de pompe ⁶.

En l'absence de cette pompe, l'intensité du faisceau sonde derrière l'analyseur est donnée par l'équation 3.10. Elle devient après excitation (en considérant la rotation optique et ses variations comme une constante K lorsque X varie) :

$$I_{\text{avec pompe}} = |A|^2 e^{-\alpha_0 l - \delta(\alpha l)} \left[\left(X - \frac{\eta_0}{4} - \frac{\delta\eta}{4} \right)^2 + K \right]$$

Pour simplifier cette équation, introduisons l'intensité $I_0 = |A|^2 e^{-\alpha_0 l}$ et la nouvelle variable $Y = X - \frac{\eta_0}{4}$. Notons que ce passage à la variable Y , revient à effectuer un changement de repère, et ainsi faire varier le déphasage du compensateur de Babinet-Soleil, autour du nouveau minimum de la parabole obtenue pour un échantillon chiral. Ainsi :

$$I_{\text{sans pompe}} = I_0 [Y^2 + K_1] \quad (3.11)$$

$$I_{\text{avec pompe}} = I_0 e^{-\delta(\alpha l)} \left[\left(Y - \frac{\delta\eta}{4} \right)^2 + K_2 \right] \quad (3.12)$$

Pour pouvoir détecter ces petites variations $\delta(\alpha l)$ et $\delta\eta$, un hacheur mécanique est placé sur le chemin de la pompe. Nous avons déjà vu, qu'il permet alternativement de la bloquer puis la laisser passer, et ce à une fréquence $f_{\text{modulation}}$ fixée. L'intensité du faisceau sonde est donc, elle aussi, modulée à cette fréquence.

Dans cette configuration, le tube photomultiplicateur, placé derrière l'analyseur, est relié à un intégrateur de type boxcar qui délivre une intensité moyenne du faisceau sonde,

⁶ Le dichroïsme circulaire statique peut être mesuré comme précisé plus haut, ou bien plus précisément à l'aide d'un spectrophotomètre de dichroïsme circulaire. L'absorption statique est mesurée simplement à l'aide d'un spectrophotomètre commercial.

notons PM ce signal. De son côté, un système de détection synchrone permet d'accéder à la partie modulée de cette intensité, notons LI le signal qu'il délivre. On a donc :

$$\begin{aligned} PM &= \frac{1}{2}(I_{\text{avec pompe}} + I_{\text{sans pompe}}) \\ LI &= I_{\text{avec pompe}} - I_{\text{sans pompe}} \end{aligned}$$

D'après les équations 3.11 et 3.12, les signaux PM et LI peuvent s'écrire plus précisément :

$$\begin{aligned} PM &= \frac{I_0}{2} \left[Y^2 (e^{-\delta(\alpha l)} + 1) - \frac{\delta\eta}{2} e^{-\delta(\alpha l)} Y + K_3 \right] \\ LI &= I_0 \left[Y^2 (e^{-\delta(\alpha l)} - 1) - \frac{\delta\eta}{2} e^{-\delta(\alpha l)} Y + K_4 \right] \end{aligned}$$

K_3 et K_4 sont des constantes par rapport à la variable Y , dans lesquelles on inclut les termes de rotation optique.

Il nous reste désormais à simplifier cette expression en définissant une nouvelle variable Z définie par :

$$Z = Y - \frac{\delta\eta e^{-\delta(\alpha l)}}{4(e^{-\delta(\alpha l)} + 1)}$$

Ici aussi, le passage de Y à Z consiste simplement à changer l'origine du repère. Les expressions de PM et LI en fonction de Z , donnent donc :

$$\begin{aligned} PM &= \frac{I_0}{2} [Z^2 (e^{-\delta(\alpha l)} + 1) + K_5] \\ LI &= I_0 \left[Z^2 (e^{-\delta(\alpha l)} - 1) + \frac{\delta\eta}{2} e^{-\delta(\alpha l)} \frac{e^{-\delta(\alpha l)} - 1}{e^{-\delta(\alpha l)} + 1} Z - \frac{\delta\eta}{2} e^{-\delta(\alpha l)} Z + K_6 \right] \end{aligned}$$

En normalisant chacune de ces deux équations par $\frac{I_0}{2} (e^{-\delta(\alpha l)} + 1)$ ⁷, et en supposant que $\delta(\alpha l) \ll 1$, on obtient finalement :

$$\begin{cases} PM(Z) = Z^2 + K_7 \\ LI(Z) = -\delta(\alpha l) Z^2 - \frac{\delta\eta}{2} Z + K_8 \end{cases} \quad (3.13)$$

En faisant varier Z autour de zéro, on obtient donc, ici aussi, des paraboles dont on peut comparer les ouvertures et les positions des minima.

Les deux changements de variables effectués dans ces calculs, nous ont permis d'obtenir une parabole $PM(Z)$ centrée en zéro et d'ouverture unitaire. De l'équation 3.13, on trouve alors que l'ouverture de la parabole $LI(Z)$ donne une mesure directe de la variation d'absorption $\delta(\alpha l)$ induite par la pompe, et que la position de son minimum est directement reliée à la variation du dichroïsme circulaire $\delta\eta$ induite par cette même pompe.

⁷ Les valeurs des signaux PM et LI sont connues, en pratique, à une même constante multiplicative près. Ce n'est donc que leurs valeurs relatives qui nous intéressent ici.

3.2.4 Mise en œuvre expérimentale

La détermination des couples $(\delta(\alpha l), \delta\eta)$, pour chaque retard de la sonde par rapport à la pompe, et pour chaque longueur d'onde de la sonde, implique donc les mesures des paraboles $PM(Z)$ et $LI(Z)$ correspondantes. L'objectif de ce paragraphe est de montrer, comment ces mesures peuvent être obtenues expérimentalement.

Intéressons nous, dans un premier temps, au déphasage φ_{BS} , introduit par le compensateur de Babinet-Soleil sur une onde lumineuse le traversant. Il peut être ajusté à l'aide d'une vis micrométrique, cette dernière servant à contrôler l'épaisseur $e_{2,var}$ formée par l'association des deux prismes (cf. paragraphe 3.2.1). Pour plus de facilité, nous l'avons reliée à un moteur, que nous pouvons commander informatiquement. C'est donc, en pratique, en terme de pas du moteur, que nous contrôlons directement la valeur de ce déphasage.

La correspondance entre un pas du moteur et le déphasage introduit en effectuant ce pas, est très simple à déterminer sans échantillon ni faisceau pompe. Il suffit ainsi de faire tourner le moteur d'une extrémité à l'autre de la vis micrométrique, et d'enregistrer les valeurs $PM(X)$ mesurées pour chaque valeur de $X = \varphi_{BS}/2$ correspondant à la position absolue du moteur, mesurée en terme de pas. En rassemblant toutes ces valeurs, on obtient finalement une courbe de forme sinusoïdale, comme celle montrée à gauche dans la figure 3.4.

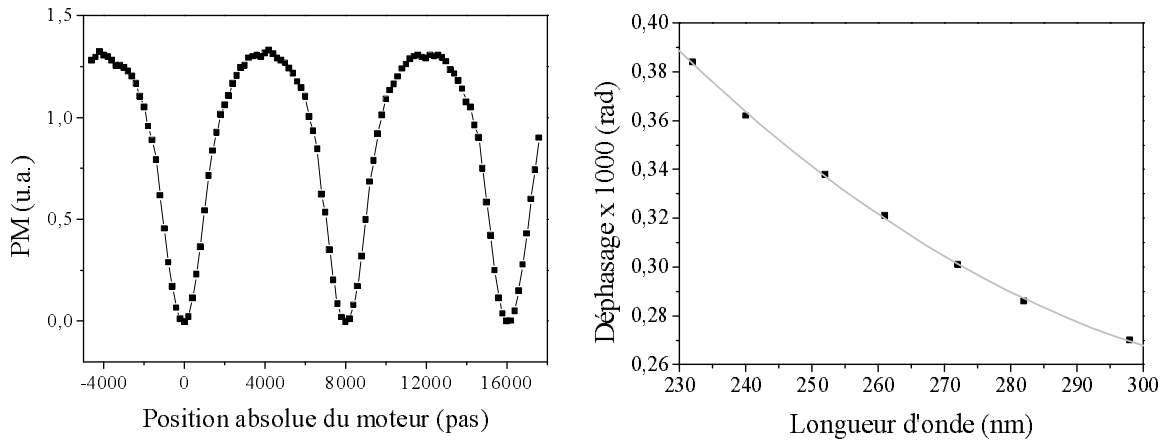


Fig. 3.4: *A gauche* : Courbe $PM = f(\varphi_{BS})$ obtenue, pour une longueur d'onde de sonde donnée, en faisant tourner le moteur d'une extrémité à l'autre de la vis micrométrique. Le déphasage φ_{BS} est exprimé en fonction de la position absolue de la vis (en nombre de pas du moteur). Le signal PM est donné en unité arbitraire. *A droite* : Déphasage X (en radians) introduit, en fonction de la longueur d'onde, par le compensateur de Babinet-Soleil, lorsque le moteur de la vis micrométrique avance d'un pas.

Cette forme se justifie simplement à l'aide des calculs développés au début du paragraphe 3.2.3. En appliquant le produit des matrices M_A et M_{BS} au champ incident polarisé rectilignement, mais en ne se restreignant plus aux cas des $X \ll 1$, on obtient en effet :

$$E_{sortant} = M_A \cdot M_{BS} \cdot E_{incident} \quad (3.14)$$

$$I_{sortant} \propto \sin^2(X) \quad (3.15)$$

Pour les plus grandes valeurs de X , on peut noter que la courbe expérimentale de la figure 3.4 n'a plus la forme d'un $\sin^2$. Cet écart est lié à une saturation du tube photomultiplicateur.

Une analyse de cette courbe obtenue pour une longueur d'onde λ_{sonde} fixée, nous permet de déterminer le nombre $N(\lambda_{sonde})$ de pas du moteur situés entre deux annulations successives du $\sin^2$. Or, sachant qu'en radians, deux annulations de ce $\sin^2$ sont séparées de π , alors le déphasage $X_{pas}(\lambda_{sonde})$ introduit lorsque le moteur avance d'un pas est égal à :

$$X_{pas}(\lambda_{sonde}) = \frac{\pi}{N(\lambda_{sonde})} \quad (3.16)$$

Notons de plus, que d'après l'équation 3.1, le déphasage introduit par le Babinet-Soleil dépend de la longueur d'onde du faisceau lumineux le traversant. Il en va d'ailleurs de même pour les indices ordinaire et extraordinaire du matériau dont il est constitué. Il est donc très important de connaître cette valeur de X_{pas} , pour chaque longueur d'onde de la sonde utilisée. La courbe expérimentale, donnée à droite dans la figure 3.4, illustre cette dépendance. Elle a permis de déterminer empiriquement l'équation suivante (avec λ en nm) :

$$X_{pas}(\lambda) = 0,00165 - 8,39146 \cdot 10^{-6} \lambda + 1,25807 \cdot 10^{-8} \lambda^2 \quad (3.17)$$

Reprenons maintenant les calculs du paragraphe 3.2.3, le déphasage φ_{BS} y apparaît successivement sous la forme des variables X , Y puis Z , chacune étant une translation de l'autre dans un nouveau repère. Elles ont été introduites de manière à rendre plus lisibles ces calculs, mais en pratique, la comparaison des paraboles $PM(Z)$ et $LI(Z)$ de l'équation 3.13 et celle des paraboles $PM(X)$ et $LI(X)$ (voir plus bas), permettent toutes les deux d'obtenir les mêmes valeurs du couple $(\delta(\alpha l), \delta\eta)$. La seule différence, est que dans le second cas, la parabole $PM(X)$ n'est pas centrée en zéro et a une ouverture différente de l'unité. Pour accéder aux variations de l'absorption et du dichroïsme circulaire induites par la pompe, on opère alors de la façon suivante :

1. On fixe un retard δt entre la focalisation de la sonde sur l'échantillon et celle de la pompe ;
2. On tourne la vis micrométrique de pas en pas ⁸ et de façon à faire varier le déphasage $X = \varphi_{BS}/2$ autour de zéro ;
3. Pour chaque valeur de X calculée en radians à l'aide de l'équation 3.17, on enregistre les valeurs $PM(X)$ et $LI(X)$ correspondantes ;
4. L'ensemble des $PM(X)$ et $LI(X)$ forment deux courbes qu'il est possible d'approcher mathématiquement par des fonctions polynomiales (sous *Origin*). On obtient ainsi les équations suivantes :

$$\begin{aligned} PM(X) &= A_{PM}X^2 + B_{PM}X + C_{PM} \\ LI(X) &= A_{LI}X^2 + B_{LI}X + C_{LI} \end{aligned}$$

⁸ Entre deux pas du moteur, le système de détection, formé du tube photomultiplicateur et de la détection synchrone, reçoit et moyenne un nombre donné d'impulsions sondes successives, chacune retardée du même δt par rapport aux impulsions de pompe.

5. D'après l'équation 3.13, la variation d'absorption induite par la pompe est obtenue en comparant les ouvertures de ces deux paraboles :

$$\delta(\alpha l) = -\frac{A_{LI}}{A_{PM}} \quad (3.18)$$

6. Et la variation du dichroïsme circulaire, en comparant la position des minimas :

$$\delta\eta = -2\frac{B_{LI} + 2A_{LI}X_{0,PM}}{A_{PM}} \quad (3.19)$$

où $X_{0,PM} = -B_{PM}/2A_{PM}$ est la position du minimum de la parabole $PM(X)$.

D'après l'équation 3.7, la variation du dichroïsme circulaire ainsi obtenue, s'exprime en terme de coefficient d'absorption : $\delta\eta = \delta(\Delta(\alpha l))$. Comme nous l'avons déjà précisé, il est plus rigoureux de convertir cette valeur en terme de coefficient d'extinction $\delta(\Delta\epsilon)$ en $M^{-1}.cm^{-1}$, et pour cela il faudra donc connaître précisément la concentration de l'échantillon étudié.

Notons que les courbes traçant les évolutions temporelles de ces variations induites par la pompe, sont ensuite construites point par point, en calculant pour chaque retard de la sonde par rapport à la pompe, les couples $(\delta(\alpha l), \delta\eta)$.

Les figures qui suivent, vont nous permettre d'illustrer le protocole expérimental que nous venons de décrire. Les résultats qui y sont présentés, ont été obtenus dans des sels de ruthénium-tris(phenanthroline), que l'on appellera *RuTP* dans la suite. On trouvera plus d'informations sur ces échantillons dans le chapitre 5.

Dans le cas de la figure 3.5, seule la sonde est focalisée sur l'échantillon. On se place donc dans le cas décrit par l'équation 3.10 et on représente (en unité arbitraire) les courbes $PM(X)$ en fonction du déphasage $X = \varphi_{BS}/2$ (en radians). Chaque point de ces courbes, correspond à l'intensité moyenne détectée par le photomultiplicateur, puis intégrée par le boxcar.

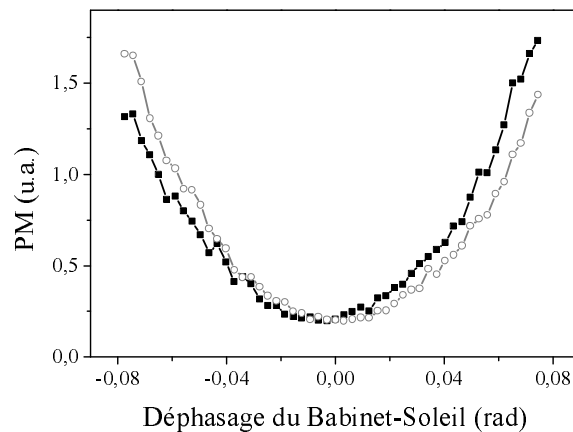


Fig. 3.5: Comparaison de deux paraboles $PM(X)$ exprimées en unité arbitraire. La parabole en ronds blancs correspond à un échantillon non chiral, celle en carrés noirs à un des deux énantiomères du *RuTP*.

On observe que la parabole en ronds blancs est centrée en zéro, elle a été obtenue dans

un échantillon non chiral constitué d'un mélange racémique des deux énantiomères du *RuTP*. La parabole en carrés noirs, en revanche, a été obtenue dans un des deux énantiomères, elle n'est pas centrée sur le même point. D'après l'équation 3.10, la mesure de ce petit décalage nous donne donc accès à la valeur du dichroïsme circulaire statique, associée à la longueur d'onde de la sonde. Dans ce cas précis, on trouve $\eta_0 = -2,6 \pm 0,6 \times 10^{-2}$ pour $\lambda = 260 \text{ nm}$.

Dans le cas de la figure 3.6, la pompe, accordée à 400 nm , est focalisée sur l'échantillon 50 ps avant la sonde. On se place donc dans le cas décrit par les équations 3.18 et 3.19, en comparant les courbes $PM(X)$ (en ronds blancs) et $LI(X)$ (en carrés noirs) pour chacun des trois échantillons : les deux énantiomères Δ et Λ du *RuTP*, et leur mélange racémique.

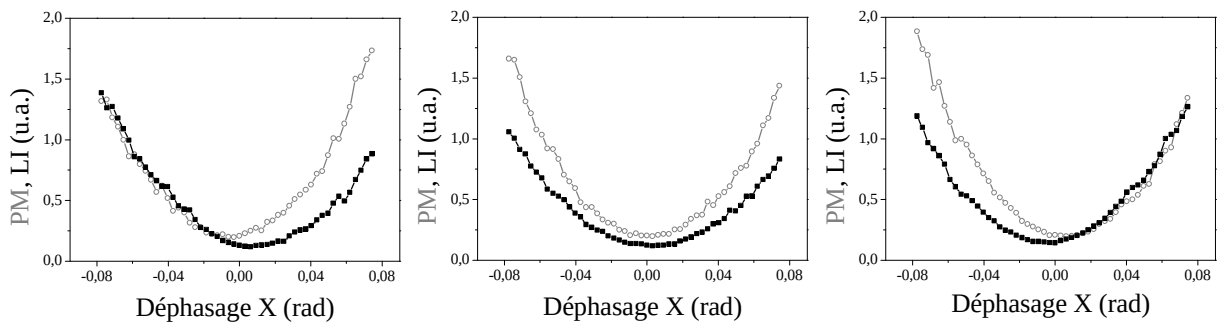


Fig. 3.6: Comparaison des courbes $PM(X)$ (en ronds blancs) et $LI(X)$ (en carrés noirs) obtenues dans trois formes différentes du *RuTP*. *A gauche* : énantiomère Λ . *Au milieu* : mélange racémique. *A droite* : énantiomère Δ .

Un coup d'œil rapide sur la figure du milieu, permet de constater que dans le cas du mélange racémique, les deux paraboles sont centrées en zéro ; il n'y a donc pas de variation du dichroïsme circulaire induite par la pompe, tout comme il n'y a pas de dichroïsme circulaire statique. Dans le cas des deux énantiomères, on remarque, par contre, que chacune des courbes $LI(X)$ est décalée par rapport à $PM(X)$, elle-même décalée par rapport à zéro. Notons que ces décalages ne s'effectuent pas dans le même sens pour les deux énantiomères, ce qui n'est pas surprenant puisque par définition de tels échantillons ont des activités optiques de signes opposés. Les ouvertures des paraboles $LI(X)$ sont, en revanche, exactement les mêmes pour les trois échantillons, car l'absorption induite par la pompe est un phénomène achiral.

En approchant mathématiquement chacune des courbes $PM(X)$ et $LI(X)$ par une parabole, on obtient les coefficients $A_{PM,LI}$ et $B_{PM,LI}$ définis précédemment et nous permettant d'accéder aux valeurs de $\delta(\alpha l)$ et $\delta\eta$ associées à la longueur d'onde de la sonde et à son retard par rapport à la pompe. Dans ce cas précis où $\lambda = 260 \text{ nm}$, on trouve : $\delta(\alpha l) = -3,3 \pm 0,1 \times 10^{-2}$, $\delta\eta_{\Delta} = 2,1 \pm 0,5 \times 10^{-3}$ et $\delta\eta_{\Lambda} = -1,6 \pm 0,5 \times 10^{-3}$.

Remarquons que l'incertitude sur la mesure de η est bien plus grande que celle concernant $\delta\eta$. Nous verrons dans la section suivante qu'elle est liée à l'imprécision sur la mesure de la position du minimum des paraboles $PM(X)$.

3.3 Limites de la technique

L'objectif de cette section, est de présenter les limites de cette nouvelle technique. Leur analyse nous permettra d'apporter les solutions permettant de s'en affranchir.

3.3.1 Temps d'acquisition et mesure de η_0

Nous avons vu dans la section 3.2, que les mesures du dichroïsme circulaire statique η et de ses variations induites par la pompe $\delta\eta$, sont accompagnées d'incertitudes que nous notons respectivement $\sigma(\eta)$ et $\sigma(\delta\eta)$.

$\sigma(\delta\eta)$ peut être bien inférieure à $\sigma(\eta)$ et nous verrons dans le prochain paragraphe, qu'elle est étroitement liée à la valeur de $\delta(\alpha l)$. $\sigma(\eta)$ dépend, quant à elle, uniquement de la précision avec laquelle il est possible de calculer la position du minimum d'une parabole $PM(X)$ lors de son approximation par une fonction polynomiale d'ordre 2. Elle est indépendante de l'échantillon étudié.

Dans les deux cas, nous avons pu mettre en évidence expérimentalement, trois principaux critères permettant d'améliorer la précision des mesures de η et $\delta\eta$:

- les courbes doivent contenir le plus grand nombre de points expérimentaux possible (dans la limite de saturation du tube photomultiplicateur) ;
- le nombre de pas du moteur, parcourus entre deux valeurs de X , doit être le plus petit possible ;
- plusieurs paraboles doivent être moyennées et le temps d'intégration de la détection synchrone doit être le plus grand possible, afin de s'affranchir au maximum du bruit lié aux fluctuations du laser ;

Si la prise en compte de ces trois conditions permet de diminuer grandement l'imprécision sur la mesure du dichroïsme circulaire, elle implique malheureusement une augmentation importante des temps d'acquisitions des paraboles $PM(X)$ et $LI(X)$. Augmentation qui peut être incompatible avec une étude précise de l'évolution temporelle du dichroïsme circulaire, si le laser est trop instable et si l'échantillon se dégrade trop vite.

Il a donc fallut trouver un compromis, et déterminer les meilleures conditions permettant d'obtenir la plus petite incertitude possible, pour des temps d'acquisitions raisonnables :

- acquisition de paraboles contenant environ 200 points centrés autour de $X=0$;
- le moteur avance de 5 pas (ou moins si possible) entre deux valeurs de X ;
- chaque parabole est en fait la moyenne d'un aller et d'un retour entre les valeurs minimum et maximum de X ;
- on choisit la plus grande valeur possible du temps d'intégration de la détection synchrone, mais elle doit être inférieure au temps d'attente du moteur avant qu'il n'avance à nouveau d'un pas.

Ces conditions permettent d'obtenir, dans le meilleur des cas, une incertitude minimum de ± 2 pas sur la position du minimum des paraboles $PM(X)$ et ce pour un temps d'acquisition moyen de 7 minutes par courbe (parabole aller et parabole retour). Une étude temporelle des variations du dichroïsme circulaire, sur une période de 400 ps après excitation par la pompe et avec une résolution de 10 ps, nécessite ainsi un temps d'acquisition d'environ 5 heures.

Dans le cas des figures 3.5 et 3.6, l'incertitude $\sigma_{PM}(X)$ sur la position du minimum des paraboles $PM(X)$ était de ± 5 pas, soit $\sigma_{PM}(X) = \pm 1,6 \times 10^{-3}$ pour $\lambda = 260 \text{ nm}$. En respectant les conditions expérimentales citées plus haut et en divisant cette incertitude par deux, on divise alors également par deux $\sigma(\eta)$ car d'après l'équation 3.10 :

$$\sigma(\eta) = 4 \times \sigma_{PM}(X) \quad (3.20)$$

Cependant, cette amélioration est souvent insuffisante pour déterminer précisément des dichroïsmes circulaires statiques de quelques 10^{-3} , $\sigma(\eta)$ étant en effet du même ordre de grandeur que η . On préférera donc les mesurer à l'aide d'un spectrophotomètre de dichroïsme circulaire.

En général, la position du minimum d'une parabole $LI(X)$ est plus difficile à déterminer précisément. Mais comme nous l'avons déjà écrit, l'incertitude sur la mesure de $\delta\eta$ dépend surtout de la valeur de $\delta(\alpha l)$. Cette dépendance est l'objet du paragraphe suivant.

3.3.2 Mesure de $\delta\eta$

Plaçons nous dans le cas où la parabole $PM(X)$ est normalisée et centrée en zéro, et rappelons son équation ainsi que celle de la parabole $LI(X)$:

$$\begin{aligned} PM(X) &= X^2 + K_1 \\ LI(X) &= -\delta(\alpha l)X^2 - \frac{\delta\eta}{2}X + K_2 \end{aligned}$$

D'après la deuxième équation, la position du minimum de la parabole $LI(X)$ est donnée par le rapport $-\delta\eta/4\delta(\alpha l)$. Ce qui nous autorise à écrire que :

$$\sigma(\delta\eta) = 4\delta(\alpha l)\sigma_{LI}(X) \quad (3.21)$$

où $\sigma_{LI}(X)$ est l'imprécision sur la position du minimum de la parabole $LI(X)$. En pratique, cette dernière est moins bonne que $\sigma_{PM}(X)$ car les signaux mesurés sont plus faibles et sensibles aux fluctuations du laser. Dans le cas de la figure 3.6, elle est de l'ordre de ± 12 pas, mais en respectant les conditions expérimentales décrites plus haut, elle peut être descendue en moyenne à ± 5 pas, soit $\sigma_{LI}(X) = \pm 1,6 \times 10^{-3}$. Ainsi, pour $\delta(\alpha l) = -3,3 \times 10^{-2}$, et d'après l'équation 3.21, on obtient une incertitude $\sigma(\delta\eta) = 0,2 \times 10^{-3}$ sur la mesure de $\delta\eta$, avec $\delta\eta = 2 \times 10^{-3}$.

On comprend alors que pour des plus petites variations d'absorption, typiquement de l'ordre de quelques 10^{-3} , l'incertitude sur les mesures de $\delta\eta$ peut être encore dix fois plus petite et ainsi atteindre des valeurs de quelques 10^{-5} . Il s'agit incontestablement du point fort de cette nouvelle technique mais également d'une de ses limites.

En effet, pour des valeurs de $\delta(\alpha l)$ supérieures à 10^{-1} , $\sigma(\delta\eta)$ et $\sigma(\eta)$ sont du même ordre de grandeur, ce qui implique des mesures de $\delta\eta$, en général, insuffisamment précises.

Notons qu'à l'inverse, c'est à dire pour des valeurs de $\delta(\alpha l)$ inférieures à 3×10^{-3} , les paraboles $LI(X)$ sont très peu ouvertes et souvent « perdues » dans le bruit. L'approche mathématique par une fonction polynomiale est donc très imprécise dans ce cas, et il en va nécessairement de même pour la mesure de $\delta\eta$. Cette technique de mesure n'est donc pas applicable à tous les échantillons et dans toutes les zones spectrales. Elle

semble néanmoins parfaitement adaptée à l'étude du repliement des protéines dans l'ultraviolet, région dans laquelle les $\delta(\alpha l)$ sont *a priori* faibles et où de fortes variations des spectres de dichroïsme circulaire sont attendues. L'application de cette technique à l'étude du repliement de polypeptides modèles est le sujet de la seconde partie de ce manuscrit.

Après avoir choisi les meilleures conditions expérimentales donnant la plus petite incertitude $\sigma(\delta\eta)$ pour l'échantillon étudié, et avant de commencer une acquisition, il est indispensable de vérifier l'alignement des polarisations des faisceaux pompe et sonde. Nous verrons, en effet, dans le paragraphe suivant, que si ces dernières ne sont pas parfaitement parallèles, des artéfacts de polarisation peuvent apparaître et grandement perturber les mesures de dichroïsme circulaire.

3.3.3 Artéfacts induits par photosélection

Un faisceau laser polarisé linéairement, excite préférentiellement les molécules dont les moments des transitions électroniques sont orientés le long de sa direction de polarisation. L'isotropie de l'échantillon est alors cassée. Il s'agit du processus de photosélection, qui dépend de la symétrie des transitions électroniques excitées, des caractéristiques optiques du faisceau lumineux, et des propriétés de relaxation de l'échantillon. Cette photosélection est parfois induite volontairement, afin d'obtenir l'orientation de molécules dans une direction donnée. Mais elle est très gênante dans le cadre de nos études, d'autant plus qu'elle peut donner lieu à de forts signaux de dichroïsme et biréfringence linéaires perturbant les mesures de dichroïsme circulaire.

Dans le cas d'échantillons liquides, l'isotropie revient néanmoins au delà d'un certain temps, nécessaire à la relaxation des mouvements de diffusion rotatoire induits par photoexcitation. Il en va donc de même pour le signal de dichroïsme circulaire [7] et pour celui des variations $\delta\eta(t)$ (et $\delta(\alpha l)$) induites par la pompe ⁹ :

$$\delta\eta(t) - \delta\eta(\infty) = (\delta\eta(0^+) - \delta\eta(\infty))e^{-6D_R t} \quad (3.22)$$

avec $\delta\eta(0^+)$ la variation du dichroïsme circulaire mesurée immédiatement après excitation (et photosélection) et $D_R = k_B T / (6\beta V)$ la constante de diffusion rotatoire d'une molécule isotrope, fonction de la viscosité β et du volume hydrodynamique V du soluté.

On peut donc s'affranchir des effets de la photosélection, en mesurant η et $\delta\eta$ uniquement après le retour de l'isotropie, c'est à dire après une centaine de picosecondes.

Mais si l'on s'intéresse à des variations du dichroïsme circulaire se produisant sur cette échelle de temps, il faut alors trouver une autre solution. La plus simple est de contrôler précisément les directions des polarisations des faisceaux pompe et sonde, car une sonde polarisée dans la même direction x que celle de la pompe, ne « voit » pas la biréfringence g et le dichroïsme linéaire β que cette dernière a pu induire dans

⁹ Pour une polarisation du faisceau sonde orientée à $54,7^\circ$ (angle magique) de celle de la pompe, les effets de la photosélection sur l'orientation des moments des transitions électroniques ne perturbent plus les mesures de $\delta(\alpha l)$, ni celles de $\delta\eta$ qui restent tout de même sensibles à la biréfringence et au dichroïsme linéaire photoinduits.

l'échantillon :

$$g = \pi(n_y - n_x)l/\lambda \quad (3.23)$$

$$\beta = (\alpha_x - \alpha_y)l \quad (3.24)$$

où α_x , α_y , n_x et n_y sont respectivement les coefficients d'extinction et indices de réfraction rencontrés par des faisceaux lumineux polarisés suivant les axes x et y du repère (x, y) ; sachant que l'échantillon présente un dichroïsme linéaire (resp. une biréfringence linéaire) photoinduit(e) si le coefficient d'absorption α_x (resp. l'indice de réfraction n_x) des molécules excitées dans la direction x est différent de celui des molécules non excitées.

Une illustration de ce résultat est donnée sur les courbes de la figure 3.7, obtenues dans un même échantillon de Dapoxyl¹⁰. Les points, représentés par des ronds noirs et triangles gris, correspondent aux valeurs $\delta\eta(t)$ calculées à partir des paraboles $LI_t(X)$ et $PM_t(X)$ mesurées pour chaque retard t de la sonde par rapport à la pompe.

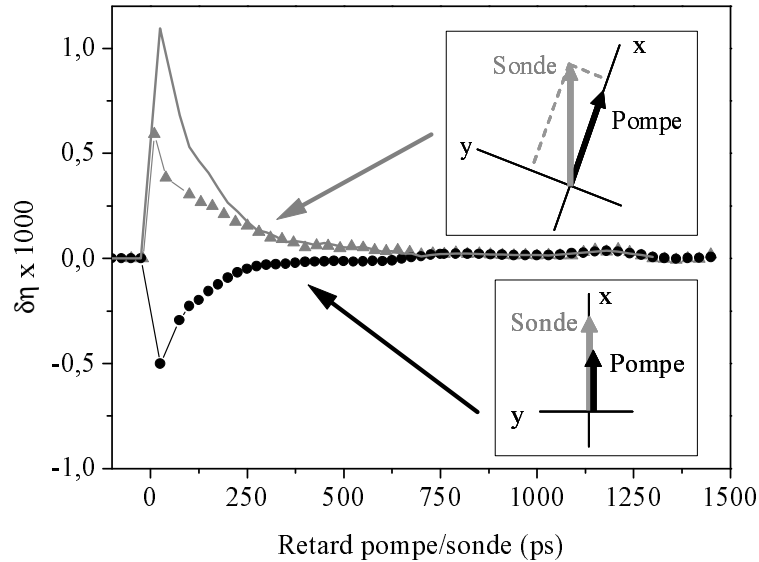


Fig. 3.7: Influence de la photosélection sur les mesures de $\delta\eta$ dans un échantillon de Dapoxyl.

Ronds noirs : Pompe et sonde parallèles. *Triangles gris* : Pompe et sonde non parallèles. *Trait gris continu* : Artéfacts seuls (temps de relaxation de 130 ps). *Encarts* : Orientations des faisceaux pompe et sonde.

Les allures et signes de ces courbes, montrent clairement l'influence des orientations relatives des polarisations pompe et sonde sur la mesure du dichroïsme circulaire :

- Lorsque pompe et sonde sont polarisées suivant des directions parallèles, le schéma de l'encart du bas montre que la sonde ne « voit » que l'indice n_x et le coefficient d'extinction ϵ_x . Tout se passe comme s'il n'y avait pas de dichroïsme linéaire ou de biréfringence et on obtient une courbe dont le signe est négatif et dont l'amplitude décroît exponentiellement avec le temps (ronds noirs) ;
- Lorsque ces polarisations ne sont plus parallèles, le schéma de l'encart du haut montre que la sonde « voit » les deux indices n_x et n_y ainsi que les deux coefficients

¹⁰ On trouvera plus de détails sur cet échantillon, au chapitre 7, partie II.

d'extinction ϵ_x et ϵ_y . A la mesure du dichroïsme circulaire, s'ajoutent donc les mesures de la biréfringence et du dichroïsme linéaire induits par la pompe. On obtient ainsi une courbe de même allure mais de signe opposé (triangles gris) ;

- Si on soustrait la deuxième courbe à la première, on obtient une mesure des seuls artéfacts induits par photosélection (trait continu gris). Comme le prédisait l'équation 3.22, ces derniers suivent bien une décroissance exponentielle de constante de temps égale, ici, à 130 ps.

Ces résultats expérimentaux, obtenus dans le Dapoxyl, montrent que les artéfacts de polarisation sont très gênants, et ne doivent absolument pas être négligés puisqu'ils donnent lieu à des signaux comparables, et parfois plus forts que ceux de dichroïsme circulaire que l'on souhaite justement mesurer. Il est donc important de bien comprendre comment le dichroïsme linéaire et la biréfringence apparaissent dans l'expression des signaux mesurés. Pour cela, nous allons reprendre les calculs développés au paragraphe 3.2.3 en prenant en compte les contributions de ces nouvelles propriétés de l'échantillon.

De la même façon que pour le dichroïsme circulaire, ces deux effets optiques induits par photosélection peuvent être représentés par des matrices de Jones. Notons cependant que les matrices associées à de tels effets linéaires ne commutent pas avec celle du dichroïsme circulaire et que l'on définit alors la matrice totale M_E de l'échantillon par [25] :

$$M_E = Ae^{i\frac{2\pi}{\lambda}nl - \frac{\alpha l}{2}} \begin{pmatrix} 1 - (ig + \frac{\beta}{4})\cos 2\zeta & i\frac{\eta}{4} - \theta - (ig + \frac{\beta}{4})\sin 2\zeta \\ -i\frac{\eta}{4} + \theta - (ig + \frac{\beta}{4})\sin 2\zeta & 1 + (ig + \frac{\beta}{4})\cos 2\zeta \end{pmatrix} \quad (3.25)$$

où n et α sont les indices et coefficients d'absorption moyens définis à l'équation 3.7, ζ est l'angle entre la direction de la polarisation de la pompe et celle de la sonde, et où l'on retrouve le dichroïsme circulaire η , la biréfringence g , la rotation optique θ et le dichroïsme linéaire β :

$$\begin{cases} \eta = (\alpha_g - \alpha_d)l \\ g = \pi(n_y - n_x)l/\lambda \\ \theta = \pi(n_d - n_g)l/\lambda \\ \beta = (\alpha_x - \alpha_y)l \end{cases} \quad (3.26)$$

Le champ E_{sortant} émergeant de l'analyseur, et que nous avons déjà défini au paragraphe 3.2.3 par l'équation 3.3, s'écrit donc ici :

$$\begin{aligned} E_{\text{sortant}} &= E_0 \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & iX \\ iX & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 - (ig + \frac{\beta}{4})\cos 2\zeta \\ -i\frac{\eta}{4} + \theta - (ig + \frac{\beta}{4})\sin 2\zeta \end{pmatrix} \\ &= E_0 \begin{pmatrix} 0 \\ [X(g\cos 2\zeta) + \theta - \frac{\beta}{4}\sin 2\zeta] + i[X(1 - \frac{\beta}{4}\cos 2\zeta) - \frac{\eta}{4} - g\sin 2\zeta] \end{pmatrix} \end{aligned}$$

En ne considérant que les termes du premier ordre en η , g , θ , β et X , on obtient alors l'intensité I_{sortant} :

$$I_{\text{sortant}} = I_0 \left[\left(\theta - \frac{\beta}{4}\sin 2\zeta \right)^2 + \left(X - \frac{\eta}{4} - g\sin 2\zeta \right)^2 \right] \quad (3.27)$$

En introduisant, de la même façon qu'au paragraphe 3.2.3, les petites variations $\delta\eta$ et $\delta(\alpha l)$ induites par la pompe, et en utilisant les mêmes changements de variables que ceux qui nous avaient permis d'obtenir les équations simplifiées 3.13, on trouve alors le nouveau couple de paraboles :

$$\begin{cases} PM(Z) = Z^2 + K_1 \\ LI(Z) = -\delta(\alpha l)Z^2 - \left(\frac{\delta\eta}{2} + 2g\sin 2\zeta\right)Z + K_2 \end{cases} \quad (3.28)$$

Il apparaît clairement dans cette nouvelle expression de la parabole $LI(Z)$, que si les polarisations des faisceaux pompe et sonde ne sont pas parallèles, et si l'on oublie de prendre en compte les artéfacts de polarisation induits par photosélection, alors ce que l'on croit être une mesure des variations du dichroïsme circulaire $\delta\eta$ induites par la pompe (et données normalement par les équations 3.13) est en fait une mesure m vérifiant :

$$m = \delta\eta + 4g\sin 2\zeta \quad (3.29)$$

où ζ est l'angle entre les directions des polarisations des faisceaux pompe et sonde, et où $g = \pi(n_y - n_x)l/\lambda$ est la biréfringence linéaire induite par photosélection.

Afin de vérifier cette dépendance en ζ donnée par l'équation 3.29, nous avons mesuré les valeurs de $\delta(\alpha l)$ et m induites par la pompe, pour différentes valeurs de cet angle (obtenues en tournant le polariseur P_{pompe} placé sur le chemin de la pompe, polarisée initialement linéairement mais dans une direction inconnue). Les mesures ainsi obtenues sont représentées sur la figure 3.8. Elles ont été réalisées dans un mélange racémique de ruthénium-tris(bipyridyl), pour lequel nous avons, par définition, $\eta_0 = \delta\eta = 0$. Le retard de la sonde par rapport à la pompe était fixé à 10 ps.

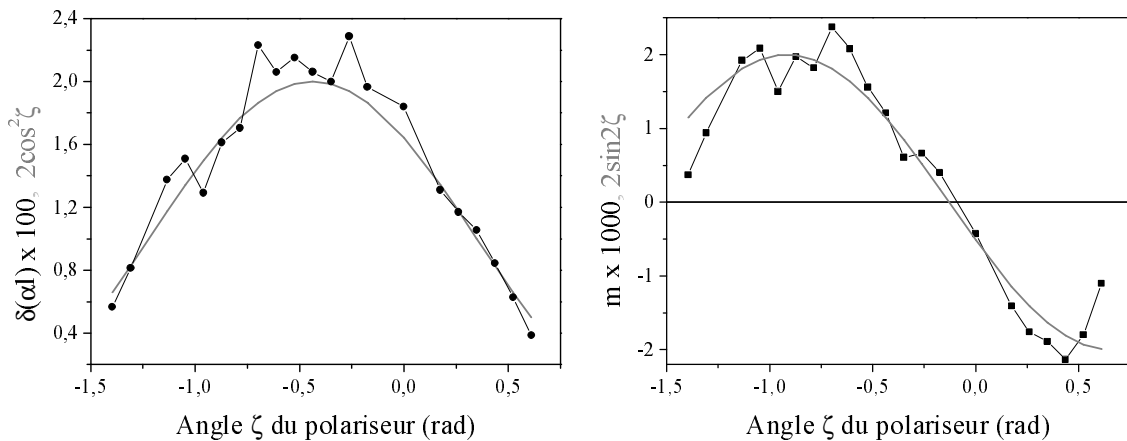


Fig. 3.8: Étude de l'influence de la biréfringence sur les mesures de $\delta\eta$ dans un mélange racémique du ruthénium-tris(bipyridyl). *A gauche* : évolution de $\delta(\alpha l)$ avec l'angle ζ (en noir) et loi de Malus (en gris). *A droite* : évolution de m avec l'angle ζ (en noir) et fonction en $2\sin 2\zeta$ (en gris).

L'analyse des deux courbes tracées ci-dessus, permet de faire deux remarques :

- La variation d'absorption $\delta(\alpha l)$ induite par la pompe suit la loi de Malus ($\cos^2\zeta$) lorsque l'on tourne l'angle du polariseur de part et d'autre de la direction de polarisation de la sonde (figure de gauche). L'angle pour lequel ce signal est maximum, correspond à la direction de la polarisation du faisceau pompe avant de traverser

le polariseur. Notons qu'aucun artéfact de polarisation ne peut perturber les $\delta(\alpha l)$, et que ces mesures permettent uniquement de normaliser celles des $m(\zeta)$, en se ramenant au cas d'une même intensité incidente du faisceau pompe pour chaque angle ζ ;

- La valeur de m induite par la pompe suit, globalement et en accord avec l'équation 3.29, une loi en $2\sin 2\zeta$ lorsque ζ varie (figure de droite).

Ces résultats montrent qu'il est indispensable d'annuler le signal de biréfringence induite, si l'on veut assurer une interprétation correcte des courbes $\delta\eta(t)$. Pour cela, on peut donc choisir de repérer expérimentalement l'angle $\zeta = 0^\circ$, en visualisant à l'œil la direction de polarisation de la sonde (via son extinction facile à repérer si l'on dispose d'un analyseur). Mais en pratique, cette mesure n'est pas assez précise et ne permet pas d'aligner rigoureusement les polarisations des faisceaux pompe et sonde. La solution la plus simple est alors de réaliser l'expérience illustrée à droite sur la figure 3.8 : c'est à dire de mesurer m dans un échantillon non chiral et pour plusieurs valeurs de ζ , afin de pouvoir repérer précisément l'angle recherché et pour lequel $m = 0$ d'après l'équation 3.29. Notons que l'écart entre les fonctions $m(\zeta)$ et $\sin 2\zeta$, observé sur la figure 3.8 pour les plus grandes valeurs de l'angle ζ , est probablement lié aux faibles valeurs de $\delta(\alpha l)$ correspondantes (cf. fin du paragraphe 3.3.2) mais peut-être aussi aux simplifications ayant permis d'obtenir la forme de l'équation 3.27.

Pour finir, nous pouvons préciser que toute imperfection, mauvais alignement ou contrainte mécanique est également susceptible de générer un signal parasite de biréfringence linéaire. Ces paramètres doivent donc être pris en compte lors du choix et de l'alignement des systèmes optiques constituant le montage.

Cette section nous a permis d'analyser les limites de notre nouvelle technique de mesure du dichroïsme circulaire et de définir un certain nombre de paramètres expérimentaux (échantillons, temps d'acquisition, longueurs d'onde, polarisations des faisceaux) assurant une détection précise des variations $\delta(\alpha l)$ et $\delta\eta$ induites par photoexcitation. Il nous reste, maintenant, à comparer ses performances à celles des autres techniques existantes.

3.4 Performances de la technique

Si l'on contrôle les directions des polarisations des faisceaux pompe et sonde, et que l'on choisit des échantillons et régions spectrales pour lesquelles les variations d'absorption, induites par la pompe, sont typiquement comprises entre 3×10^{-3} et 10^{-1} , alors nous verrons dans cette section que notre nouvelle méthode peut donner des mesures précises de $\delta\eta(t)$, beaucoup plus rapidement que ne le permettent les techniques standards de modulation de la polarisation.

Nous montrerons, qu'elle peut également être adaptée aux mesures de la rotation optique et de ses variations afin de caractériser complètement l'activité optique photoinduite.

3.4.1 Comparaison avec l'utilisation d'un modulateur électro-optique

Nous avons vu au cours de la section 2.3, que les techniques standards de mesure du dichroïsme circulaire et de ses variations induites par photoexcitation, reposent sur

l'utilisation de modulateurs électro-optiques ou photoélastiques. Ces derniers permettent d'accéder directement aux mesures de η_0 et $\delta\eta$, en transformant simplement une polarisation rectiligne en une polarisation circulaire alternativement gauche puis droite. Mais leur utilisation présente deux inconvénients majeurs que nous rappelons ici :

- Un modulateur mal aligné, génère des polarisations elliptiques gauche et droite non symétriques, qui peuvent donner lieu à des signaux parasites si l'échantillon présente du dichroïsme linéaire (induit par la pompe). Mais son alignement est beaucoup plus difficile à réaliser [21] que ne peut l'être un simple contrôle de parallélisme des polarisations pompe et sonde (cf. section précédente), d'autant plus qu'il est très peu stable dans le temps.
- En modulant la polarisation de la sonde, on rend difficile une éventuelle modulation de l'amplitude de la pompe à l'aide d'un hacheur mécanique, comme pour la nouvelle technique. Les mesures sont alors très sensibles aux fluctuations du laser et s'accompagnent d'un mauvais rapport signal sur bruit.

Ce deuxième point est particulièrement visible sur la figure 3.9 où l'on a représenté des résultats obtenus dans un échantillon de carboxymyoglobine, sur lequel on trouvera plus de détails au chapitre 5. Précisons seulement, qu'au retard 0, le faisceau pompe déclenche la photodissociation du ligand *CO* initialement fixé sur l'hème de la myoglobine et que les mesures du dichroïsme circulaire sont obtenues, ici, à l'aide d'un faisceau sonde passant à travers une cellule de Pockels.

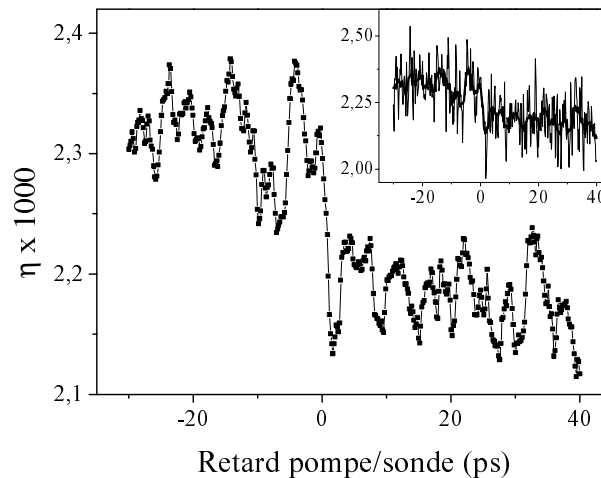


Fig. 3.9: Étude des variations du dichroïsme circulaire après photodissociation du *CO* dans *MbCO* pour $\lambda_{\text{sonde}} = 265 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{pompe}} = 400 \text{ nm}$. Moyenne lissée de dix séries de mesures obtenues à l'aide d'une cellule de Pockels. L'encart du haut correspond à cette moyenne non lissée.

La courbe, représentée sur cette figure, est la moyenne lissée de dix séries de mesures successives, enregistrées sur une durée totale de deux heures et demi. Au delà du retard nul, elle montre une nette variation du dichroïsme circulaire $\delta\eta \cong -1,5 \times 10^{-4}$, mais présente un bruit b du même ordre $b \cong 1 \times 10^{-4}$. La moyenne non lissée des dix courbes expérimentales est représentée sur l'encart du haut. Elle donne une idée du véritable bruit accompagnant les mesures brutes du dichroïsme circulaire.

Comparons maintenant ce résultat avec celui représenté sur la figure 3.10 et obtenu à l'aide de notre nouvelle technique, en accordant les faisceaux pompe et sonde aux mêmes longueurs d'onde que précédemment. Les deux courbes tracées sur cette figure correspondent aux évolutions temporelles de $\delta(\alpha l)$ et $\delta\eta$ en fonction du retard de la pompe par rapport à la sonde. Rappelons que chacun des points de ces courbes est calculé à partir des paraboles $PM(X)$ et $LI(X)$ (cf. encarts de la figure) obtenues expérimentalement et approchées numériquement par des fonctions polynomiales.

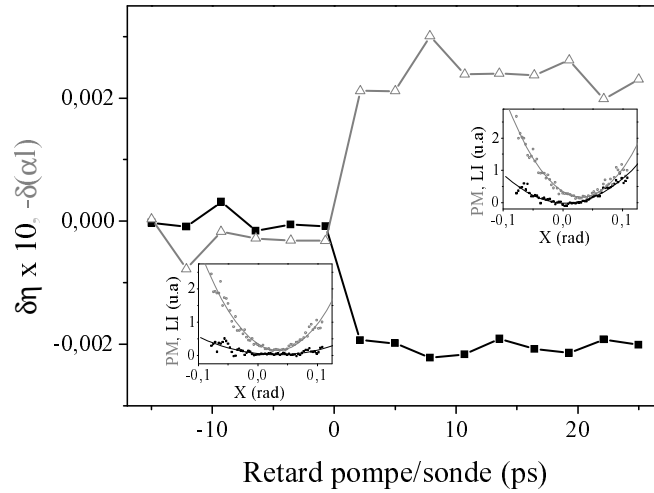


Fig. 3.10: Étude des variations du dichroïsme circulaire (carrés noirs) et de l'absorption (triangles blancs) après photodissociation du CO dans $MbCO$ pour $\lambda_{sonde} = 265 \text{ nm}$ et $\lambda_{pompe} = 400 \text{ nm}$. Mesures obtenues par la nouvelle technique. Les deux encarts correspondent aux paraboles $PM(X)$ (gris) et $LI(X)$ (noir) obtenues pour des retards pompe/sonde négatifs et positifs.

De même que sur la figure 3.9, une nette variation du dichroïsme circulaire (simultanément à celle de l'absorption) est détectée pour les retards positifs. Ces variations de $\delta(\alpha l)$ et $\delta\eta$ photoinduites sont d'ailleurs visibles sur les encarts montrant deux couples de paraboles obtenus pour des retards négatifs (c'est à dire avant l'excitation par la pompe) et positifs (c'est à dire après l'excitation par la pompe) :

- Avant excitation, la parabole $LI(X)$ est perdue dans le bruit ¹¹, ce qui correspond à des $\delta(\alpha l)$ et $\delta\eta$ nuls ;
- Après excitation, elle a une ouverture non nulle (avec $A_{LI} > 0$) et a son minimum décalé sur la gauche par rapport au minimum de $PM(X)$, ce qui correspond à des $\delta(\alpha l)$ et des $\delta\eta$ négatifs.

Il est important de remarquer que cette courbe, calculée après moins de trente minutes d'acquisitions, présente les mêmes résultats que ceux obtenus en deux heures et demi à l'aide d'une cellule de Pockels, mais avec un meilleur rapport signal sur bruit. On détecte ainsi des variations du dichroïsme circulaire $\delta\eta = -2 \times 10^{-4}$ avec un bruit $b = 0,2 \times 10^{-4}$ cinq fois plus faible que pour l'expérience de la figure 3.9. Il est donc préférable et plus facile (du point de vue de l'expérimentateur) d'utiliser cette nouvelle

¹¹ Ce bruit provient de la diffusion du faisceau pompe. Il peut être éliminé en plaçant un monochromateur devant le tube photomultiplicateur puisque $\lambda_{pompe} \neq \lambda_{sonde}$.

technique si l'on souhaite obtenir des valeurs précises des variations du dichroïsme circulaire.

Notons que le seul avantage de l'autre technique, est de présenter des incertitudes plus faibles sur les valeurs du dichroïsme circulaire statique, mais ces dernières peuvent être obtenues bien plus simplement à l'aide d'un spectrophotomètre commercial.

3.4.2 Caractérisation de l'activité optique photoinduite

Nous avons vu dans le premier chapitre de ce manuscrit, que la rotation optique θ et le dichroïsme circulaire η sont des manifestations de l'activité optique des molécules chirales. Liées mathématiquement par les relations de Kramers-Kronig (cf. section 2.6), elles peuvent *a priori* donner les mêmes informations sur les structures moléculaires. Mais les mesures du dichroïsme circulaire sont souvent préférées à celles de la rotation optique, plus difficiles à analyser du fait de son caractère dispersif.

Dans le cadre de l'étude de l'activité optique photoinduite, on peut néanmoins s'intéresser aux évolutions temporelles des variations $\delta\theta$ de la rotation optique induites parallèlement aux $\delta\eta$, et ce pour des longueurs d'onde données du faisceau sonde. Le montage représenté sur la figure 3.3 possède justement l'avantage de permettre la détection des $\delta\theta$ indépendamment des $\delta\eta$:

- $\delta\eta$ est mesurée en variant le déphasage introduit par le compensateur de Babinet-Soleil et en maintenant l'analyseur A_{sonde} en position croisée par rapport au polariseur P_{sonde} ;
- tandis que $\delta\theta$ est mesurée en fixant le déphasage introduit par le compensateur de Babinet Soleil (en choisissant idéalement $X = 0$) et en tournant l'angle ϕ fixant la direction de l'analyseur A_{sonde} par rapport à la position croisée, définie au point précédent.

Ce dispositif expérimental est très intéressant car il permet d'obtenir des mesures totalement indépendantes de $\delta\eta$ et $\delta\theta$, la deuxième ne perturbant pas la première, comme le fait par exemple la biréfringence induite (cf. section 3.3.3).

Pour mieux comprendre le caractère indépendant de ces deux mesures, nous allons reprendre les calculs de la section 3.2.3 et les étendre au cas de la détection des variations $\delta\theta$. Dans le cas où l'angle ϕ est non nul, la matrice M_A devient donc :

$$M_A = \begin{pmatrix} \sin^2\phi & \sin\phi\cos\phi \\ \sin\phi\cos\phi & \cos^2\phi \end{pmatrix} \quad (3.30)$$

Elle peut être simplifiée si l'on se restreint à de petits angles $\phi \ll 1$ et que l'on garde uniquement les termes du premier ordre :

$$M_A = \begin{pmatrix} 0 & \phi \\ \phi & 1 \end{pmatrix} \quad (3.31)$$

Pour $X = 0$ et sachant que la matrice M_E reste inchangée, le champ $E_{sortant}$ défini par

l'équation 3.3 s'écrit donc (en ne gardant que les termes du premier ordre en ϕ , θ et η) :

$$\begin{aligned} E_{\text{sortant}} &= Ae^{i\frac{2\pi}{\lambda}nl - \frac{\alpha l}{2}} \begin{pmatrix} 0 & \phi \\ \phi & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & -\theta + i\frac{\eta}{4} \\ \theta - i\frac{\eta}{4} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \\ &= Ae^{i\frac{2\pi}{\lambda}nl - \frac{\alpha l}{2}} \begin{pmatrix} 0 \\ \phi + \theta - i\frac{\eta}{4} \end{pmatrix} \end{aligned}$$

Et, dans ce cas, l'intensité lumineuse en sortie de l'analyseur, devient :

$$I_{\text{sortant}} = |A|^2 e^{-\alpha l} \left[(\phi + \theta)^2 + \left(\frac{\eta}{4}\right)^2 \right] \quad (3.32)$$

Le dichroïsme circulaire η peut être considéré comme une constante ne perturbant pas les mesures de θ lorsque l'angle ϕ de l'analyseur varie. En introduisant, de la même manière qu'à la section 3.2.3, les variations $\delta(\alpha l)$ et $\delta\theta$ induites par photoexcitation on obtient alors le couple de paraboles :

$$\begin{cases} PM(\phi') = \phi'^2 + K_1 \\ LI(\phi') = -\delta(\alpha l)\phi'^2 + (2\delta\theta)\phi' + K_2 \end{cases} \quad (3.33)$$

où ϕ' est l'angle ϕ translaté dans un autre repère et K_1 , K_2 sont des constantes par rapport à ϕ' .

Ces deux paraboles sont obtenues expérimentalement en suivant un protocole similaire à celui décrit dans la section 3.2.4. Elles sont ensuite approchées mathématiquement par deux fonctions polynomiales dont les coefficients permettent d'accéder aux valeurs des $\delta(\alpha l)$ et $\delta\theta$.

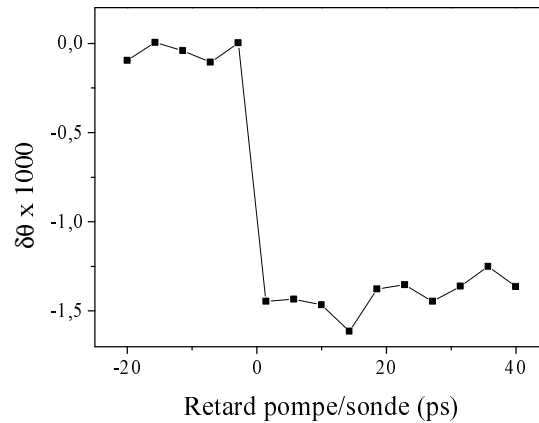


Fig. 3.11: Étude des variations de la rotation optique après photodissociation du CO dans MbCO pour $\lambda_{\text{sonde}} = 265 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{pompe}} = 400 \text{ nm}$.

Notons que la position du minimum de la parabole $LI(\phi')$ est donné ici par le rapport $\delta\theta/\delta(\alpha l)$. L'imprécision sur les mesures de $\delta\theta$ est donc quatre fois plus faible que celle sur les mesures des $\delta\eta$ pour une même imprécision sur la position du minimum des paraboles $LI(X)$ et $LI(\phi')$ (cf. section 3.3.2).

La courbe représentée sur la figure 3.11 est un exemple de mesure des variations temporelles de $\delta\theta$, obtenue dans le même échantillon de carboxymyoglobine que celui étudié dans la section précédente. Elle montre que l'excitation optique de cet échantillon induit une variation $\delta\theta = -1,4 \times 10^{-4}$, indépendamment de la variation $\delta\eta$ déjà vue sur la figure 3.10.

Il s'agit là d'un atout supplémentaire et singulier pour cette nouvelle technique de mesure, dont les performances et la facilité de mise en œuvre expérimentale ont été démontrées au cours de ce chapitre.

4. MONTAGE POMPE/SONDE ACCORDABLE DANS L'ULTRAVIOLET

Dans le cadre des travaux réalisés au cours de ces trois années de recherche, nous avons choisi de régler notre source laser dans le domaine de l'ultraviolet, région spectrale dans laquelle le dichroïsme circulaire est très sensible aux structures secondaires des protéines. Nous verrons ainsi que l'utilisation de faisceaux sonde accordés autour de 220 nm , nous a permis notamment de suivre le mouvement d'hélices alpha constituant la myoglobine et de réaliser quelques expériences préliminaires sur un échantillon de polyalanine lors de son repliement en hélice.

Les mouvements internes accompagnant les premières étapes de tels processus biochimiques se produisant sur des échelles de temps de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de picosecondes, l'utilisation de faisceaux pompe et sonde issus d'un laser impulsif femtoseconde semblait la plus appropriée (cf. section 3.1).

Une telle source laser n'existant cependant pas dans le commerce, nous avons dû utiliser un dispositif expérimental permettant de « transformer » les impulsions infrarouges émises par un système laser femtoseconde standard, en impulsions accordables dans l'ultraviolet et de durées sensiblement identiques.

Nous verrons donc dans ce chapitre, comment l'utilisation de quelques cristaux non linéaires, nous permet d'accéder à des longueurs d'onde situées entre 220 et 325 nm pour le faisceau sonde et à 400 nm , 267 nm ou autour de 320 nm pour le faisceau pompe. Nous donnerons également des informations sur les profils spatiaux et l'énergie des impulsions obtenues ainsi que sur le recouvrement des faisceaux pompe et sonde dans l'échantillon.

4.1 Source laser infrarouge

Le faisceau infrarouge utilisé comme source au cours de la première année de cette thèse, provenait d'un système laser complexe, développé par A. Bonvalet dans le cadre de ses travaux de recherche sur la diffraction des rayons X. Il s'agissait alors d'un faisceau accordé à 800 nm et dont les impulsions de $1,2\text{ mJ}$ (correspondant à 10% des 12 mJ générés), espacées de 1 ms , avaient une durée de 150 fs .

La source laser comprenait un système laser commercial (*Hurricane*) développé par Spectra-Physics et délivrant des impulsions étirées de 1 mJ à la cadence de 1 kHz et accordées à 800 nm , d'un amplificateur multi-passages nécessitant l'utilisation de trois lasers de pompe focalisés dans un même cristal refroidi par cryogénisation, suivi enfin d'un compresseur. Nous disposions ainsi d'un dispositif optique très complexe et contraignant, dont nous n'utilisions que 10% de ses capacités.

Au cours des deux années suivantes, nous avons pu utiliser une autre source laser dont les caractéristiques sont données sur la figure 4.1. Il s'agit d'un système commercial générant un faisceau infrarouge moins intense et bien plus stable que le premier. Aussi, bien que ce changement ait nécessité un déménagement complet du montage expérimental donné au paragraphe suivant, il nous a permis d'améliorer grandement la précision de nos mesures ainsi que la durée des acquisitions.

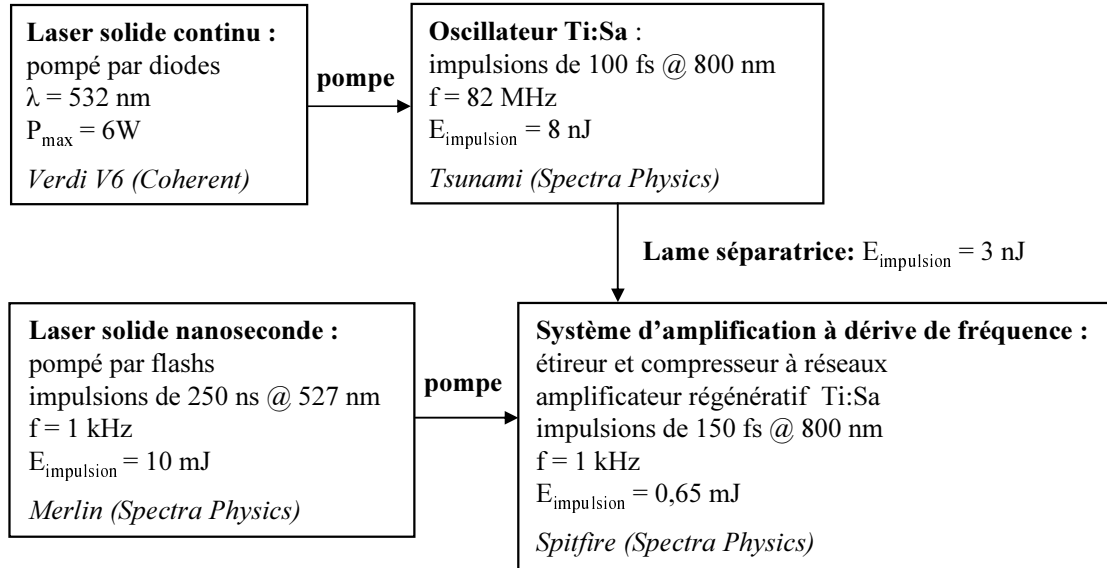


Fig. 4.1: Caractéristiques de la deuxième chaîne laser femtoseconde utilisée comme source.

Le principe de cette chaîne laser peut être décrit brièvement :

- Un cristal de saphir dopé au titane est situé dans la cavité d'un oscillateur. Il est pompé par un laser solide continu accordé à 532 nm et présente un large spectre d'émission centré autour de 800 nm . La cavité de l'oscillateur est conçue pour permettre l'oscillation de tous les modes longitudinaux inclus dans ce spectre et un dispositif de « verrouillage » [26, 27], basé sur le principe de l'effet Kerr optique, permet d'amplifier les modes synchronisés en phase. On obtient ainsi des impulsions de 100 fs à la fréquence de 82 MHz , accordables entre 700 et 950 nm ;
- Ces impulsions sont ensuite envoyées vers un système d'amplification à dérive de fréquence [28] constitué d'un étireur², d'une cavité résonnante contenant un cristal de saphir dopé au titane pompé par un laser solide nanoseconde de cadence 1 kHz , et d'un compresseur.

Ce dispositif nous permet ainsi de disposer d'impulsions de 150 fs , d'énergie égale à $0,65\text{ mJ}$ et de fréquence 1 kHz . Dans toute la suite, on considérera uniquement des impulsions accordées à 800 nm .

¹ Plus le spectre d'émission du cristal est large, plus il y a de modes longitudinaux oscillant en phase, et plus l'impulsion résultante est courte et intense.

² Il s'agit d'un ensemble de réseaux. Il sert à étirer temporellement chaque impulsion sortant de l'oscillateur, de manière à diminuer la puissance crête de ces dernières et de ne pas endommager les systèmes optiques constituant l'amplificateur.

4.2 Le faisceau sonde

Comme nous l'avons précisé au début de ce chapitre, il faut ensuite convertir ce faisceau accordé à 800 nm en un faisceau de longueur d'onde variable dans l'ultraviolet. Ce passage nécessite plusieurs étapes intermédiaires que nous décrirons dans cette section :

- génération d'un continuum spectral à partir du faisceau généré par la chaîne laser commerciale ;
- deux étages d'amplification paramétrique optique permettant d'amplifier les longueurs d'onde visibles du continuum ;
- doublage ou somme de fréquences pour atteindre le domaine de l'ultraviolet.

4.2.1 Génération d'un continuum spectral

La génération d'un continuum spectral par focalisation d'impulsions lumineuses courtes et de quelques μJ dans une lame de saphir, est un phénomène bien connu. Il fait intervenir des mécanismes complexes tels que l'effet Raman, l'effet Brillouin ou encore l'automodulation de phase, qui nous intéresse ici.

Une impulsion ultra-courte d'intensité $I(t)$ peut induire, par effet Kerr optique, une variation de l'indice de réfraction du milieu qu'elle traverse :

$$n(I) = n_0 + n_2 I \quad (4.1)$$

$$\text{avec } I(t) = I_0 \exp(-t^2/\tau^2) \quad (4.2)$$

où l'on suppose que l'impulsion a une forme gaussienne de demi-largeur à mi-hauteur τ et où n_0 est l'indice de réfraction linéaire du milieu et n_2 l'indice de réfraction non linéaire du second ordre.

La phase instantanée $\phi(t, z)$ du champ électrique de cette impulsion devient alors :

$$\phi(t, z) = -\omega_0 t + \frac{\omega_0}{c} n(I) z \quad (4.3)$$

où ω_0 est la fréquence centrale de l'impulsion et z la distance parcourue dans le milieu. Et de la même manière, on peut écrire la fréquence instantanée :

$$\omega(t, z) = -\frac{\partial \phi(t, z)}{\partial t} = \omega_0 - \frac{\omega_0}{c} n_2 \frac{\partial I(t, z)}{\partial t} z \quad (4.4)$$

De nouvelles fréquences sont donc créées et l'écart à la fréquence ω_0 de l'impulsion incidente est proportionnel à la dérivée temporelle de l'intensité du champ. Il s'agit du phénomène d'automodulation de phase à l'origine de la formation de continuums de spectres larges.

Notons que dans le cas d'une impulsion de profil gaussien, cette fréquence instantanée s'écrit :

$$\omega(t, z) = \omega_0 + \left[\frac{\omega_0}{c} \frac{2n_2 z}{\tau^2} I_0 \exp(-t^2/\tau^2) \right] t \quad (4.5)$$

Ces nouvelles fréquences sont donc retardées les unes par rapport aux autres : le front montant de l'impulsion est décalé vers les basses fréquences, le front descendant vers les hautes fréquences, et le sommet du pic reste centré en ω_0 . Il en résulte donc

un élargissement de la durée des impulsions et une dérive de fréquence (« chirp »). Cette dernière est intéressante car elle va nous permettre de sélectionner une à une les longueurs d'onde du continuum lors des processus d'amplifications paramétriques optiques (paragraphe suivant).

Dans notre cas, c'est une lame de saphir de 1 cm d'épaisseur qui est utilisée pour générer le continuum. Le spectre obtenu s'étend alors du domaine visible à celui de l'infrarouge. A l'œil, on observe une tache blanche entourée d'anneaux rouges, jaunes et verts.

Une densité optique permet de varier la fraction du faisceau infrarouge focalisée sur la lame de saphir. Elle nous permet de contrôler la stabilité du continuum, garante de la stabilité de l'ensemble des étages non linéaires situés en aval dans le montage expérimental.

4.2.2 Amplification paramétrique optique en géométrie non colinéaire

L'amplification paramétrique optique permet de sélectionner et amplifier les longueurs d'onde comprises dans le continuum. Il s'agit d'un phénomène non linéaire du deuxième ordre dont le principe est illustré sur la figure 4.2.

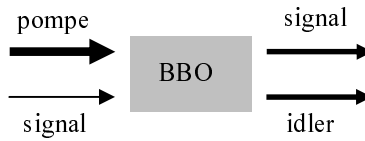


Fig. 4.2: Principe de l'amplification paramétrique optique.

La focalisation d'un faisceau « signal » de faible énergie et d'un faisceau « pompe » intense en un même point d'un cristal non linéaire correctement aligné, induit l'amplification du faisceau « signal » et la génération d'un faisceau dit « complémentaire » ou « idler ».

Soient ν_p , ν_s et ν_i les fréquences respectives des faisceaux pompe, signal et idler. En respectant la loi de conservation de l'énergie, on peut alors écrire :

$$\nu_p = \nu_s + \nu_i \quad (4.6)$$

L'amplification du faisceau signal est certes d'autant plus importante que le faisceau pompe est intense, mais elle dépend aussi beaucoup du cristal (matériau, longueur) et de son alignement qui doit d'ailleurs idéalement vérifier deux conditions importantes (la première étant obligatoire et la seconde souhaitable) :

- L'accord de phase : $\vec{k}_p = \vec{k}_s + \vec{k}_i$. Lorsqu'il est respecté, les ondes se propageant dans le cristal restent en phase et interfèrent constructivement ;
- L'accord des vitesses de groupe : $\vec{v}_{g,p} = \vec{v}_{g,s}$. Il impose aux faisceaux pompe et signal de se propager avec la même vitesse dans le cristal tout en restant superposés, de façon à pouvoir échanger leur énergie efficacement.

Notons que dans toute la suite nous utiliserons les notations p , s et i pour les indices ordinaires et extraordinaires, vecteurs d'onde, longueurs d'onde et vitesses de groupe des faisceaux pompe, signal et idler.

Dans notre cas, c'est un cristal de bêta borate de barium (BBO) pompé par un faisceau pompe accordé à 400 nm (deuxième harmonique du faisceau à 800 nm émis par la source commerciale) qui est utilisé pour amplifier les longueurs d'onde du continuum. On doit donc se placer dans le cas d'un accord de phase de type I, pour lequel la pompe et le signal sont polarisés respectivement suivant l'axe extraordinaire et ordinaire. Notons de plus que nos deux étages d'amplification paramétrique optique s'effectuent en géométrie non colinéaire, c'est à dire que les directions des faisceaux pompe et signal, de longueurs d'onde λ_p et λ_s , sont séparées d'un angle $\alpha(\lambda_p, \lambda_s)$.

Dans le cas particulier des plus faibles longueurs d'onde du continuum ($\lambda_s < 580$ nm), déterminons alors les angles $\alpha(\lambda_p, \lambda_s)$ permettant d'améliorer l'efficacité des étages d'amplification mis en place au cours de la thèse précédente [29]. Et pour cela, commençons par définir les angles représentés sur la figure 4.3 :

- l'angle d'accord de phase θ entre la direction du vecteur d'onde $\vec{k}_p$ de la pompe et celle de l'axe optique du cristal ;
- les indices ordinaire n_o et extraordinaire n_e du BBO, dont les valeurs pour chaque longueur d'onde sont disponibles dans [30] ;
- l'angle β entre la direction du faisceau complémentaire et celle de la pompe ;
- l'angle de walk-off ρ subi par le faisceau pompe et correspondant à l'angle entre la direction du vecteur d'onde $\vec{k}_p$ de la pompe et celle de son vecteur de Poynting. Son expression, fonction de θ , est la suivante :

$$\rho(\theta) = \text{Arctan} \left(\frac{n_{o,p}^2}{n_{e,p}^2} \tan \theta \right) - \theta \quad (4.7)$$

Lorsqu'il n'est pas compensé et dans le cas d'un accord de phase de type I, les faisceaux pompe et signal, de diamètre d , ne se superposent plus au delà d'une distance $L = d/\tan \rho$.

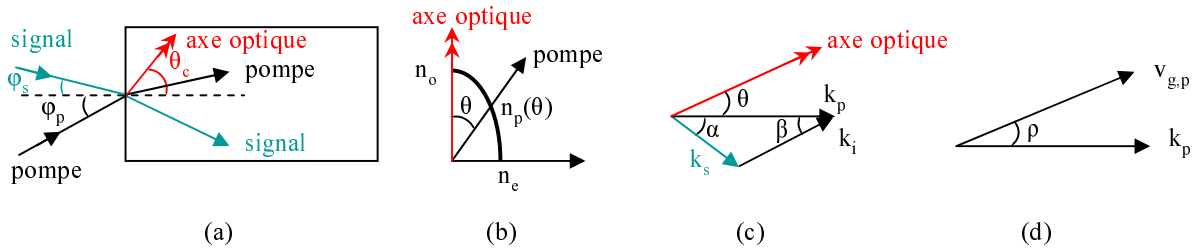


Fig. 4.3: Amplification paramétrique optique en géométrie non colinéaire. (a) Disposition des faisceaux pompe et signal par rapport à l'axe optique du cristal. (b) Ellipsoïde des indices. (c) Condition d'accord de phase. (d) Effet du walk-off sur la direction de la vitesse de groupe.

Les schémas de la figure 4.3 illustrent les caractéristiques géométriques de l'amplification paramétrique optique non colinéaire. Pour mieux comprendre le schéma de droite, il faut savoir que dans le cas d'un accord de phase de type I, la direction de la vitesse de groupe $\vec{v}_{g,p}$ est décalée de l'angle ρ par rapport à celle du vecteur $\vec{k}_p$ (onde extraordinaire), tandis que $\vec{v}_{g,s}$ est colinéaire à $\vec{k}_s$ (onde ordinaire).

Ces schémas peuvent nous aider à écrire le système d'équations suivant, sachant que

l'idler est également polarisé suivant l'axe ordinaire :

$$\frac{n_{o,s}}{\lambda_s} \sin \alpha = \frac{n_{o,i}}{\lambda_i} \sin \beta \quad (4.8)$$

$$\left(\frac{n_p(\theta)}{\lambda_p} \right)^2 = \left(\frac{n_{o,s}}{\lambda_s} \right)^2 + \left(\frac{n_{o,i}}{\lambda_i} \right)^2 + \frac{2n_{o,s}n_{o,i}}{\lambda_s\lambda_i} \cos(\alpha + \beta) \quad (4.9)$$

$$v_{g,s} \cos \alpha = v_{g,p} \cos(\rho(\theta)) \quad (4.10)$$

$$1 = \frac{n_p(\theta)^2 \sin^2 \theta}{n_{e,p}^2} + \frac{n_p(\theta)^2 \cos^2 \theta}{n_{o,p}^2} \quad (4.11)$$

où 4.8 et 4.9 sont les projections de la condition d'accord de phase suivant les axes horizontal et vertical, où 4.10 est la projection de la condition d'accord de vitesses de groupe sur l'axe horizontal et où 4.11 est l'expression de l'indice $n_p(\theta)$ de la pompe dans l'ellipsoïde des indices.

Remarquons qu'une telle géométrie non colinéaire permet de compenser les effets conjugués du walk-off et du désaccord de vitesses de groupe, en introduisant l'angle α dans l'équation 4.10.

Ce système d'équations se résout facilement sous *Matlab*. Il donne les valeurs des angles θ et α pour chaque longueur d'onde du continuum. Connaissant la valeur de l'angle θ_c entre l'axe optique du cristal et la normale aux faces polies (30° dans notre cas), on en déduit alors les angles d'incidence φ_s et φ_p des faisceaux signal et pompe sur le cristal :

$$\begin{aligned} \varphi_s &= \pm \text{Arcsin}(n_{o,s} \sin(\theta + \alpha - \theta_c)) \\ \varphi_p &= \pm \text{Arcsin}(n_{e,p} \sin(\theta_c - \theta)) \end{aligned}$$

où le signe + correspond aux cas $\theta < \theta_c$ et $\theta + \alpha > \theta_c$.

Ces calculs montrent en particulier que pour $\lambda_s < 580 \text{ nm}$, les conditions d'accord de phase et de vitesse de groupe ne peuvent être simultanément vérifiées dans le cristal de BBO. Mais l'amplification paramétrique optique peut toutefois être optimisée en choisissant les angles θ et α suivants :

- $\theta \cong 30^\circ (\pm 10^\circ)$: l'accord de phase est vérifié pour chaque longueur d'onde du continuum nous intéressant, et sur une bande suffisamment large pour permettre l'amplification d'impulsions de 150 fs ;
- $\alpha \cong 4^\circ$: l'angle de walk-off est compensé, ce qui assure une bonne superposition spatiale des faisceaux pompe et signal. L'amplification peut, de plus, être renforcée à l'aide d'un cristal épais (2 mm dans notre cas).

Notons que l'efficacité du recouvrement temporel des faisceaux pompe et signal n'est pas assurée ici. Elle conduit à un allongement des impulsions amplifiées, qui est peu gênant dans le cas des dynamiques moléculaires que nous étudions. C'est donc dans cette configuration géométrique que nous nous placerons dans la suite.

4.2.3 Chemin optique de la sonde

Le schéma de la figure 4.4 représente les différents étages d'optique non linéaire permettant d'atteindre le domaine de l'ultraviolet. Résumons rapidement le rôle de chacun de ces cristaux de BBO :

- BBO 1 permet de doubler la longueur d'onde du faisceau sortant de la chaîne laser femtoseconde ;
- BBO 2 est le premier étage d'amplification paramétrique optique en géométrie non colinéaire. On choisit la longueur d'onde du continuum que l'on souhaite amplifier, en allongeant ou diminuant (à l'aide de miroirs pouvant être translatés grâce à une vis micrométrique) le chemin optique parcouru avant BBO 2, par le faisceau à 400 nm émergeant de BBO 1. Seule la partie du continuum se recouvrant temporellement avec la pompe est ainsi amplifiée ;
- BBO 3 est le deuxième étage d'amplification paramétrique optique. Il met en jeu les mêmes faisceaux que le premier étage et permet d'augmenter l'énergie des longueurs d'onde visibles sélectionnées par ce dernier ;
- BBO 4 permet de doubler les longueurs d'onde visibles amplifiées par les deux étages d'amplification paramétrique optique, ou de les sommer avec un faisceau accordé à 400 nm et obtenu par doublage du 800 nm dans BBO 5.

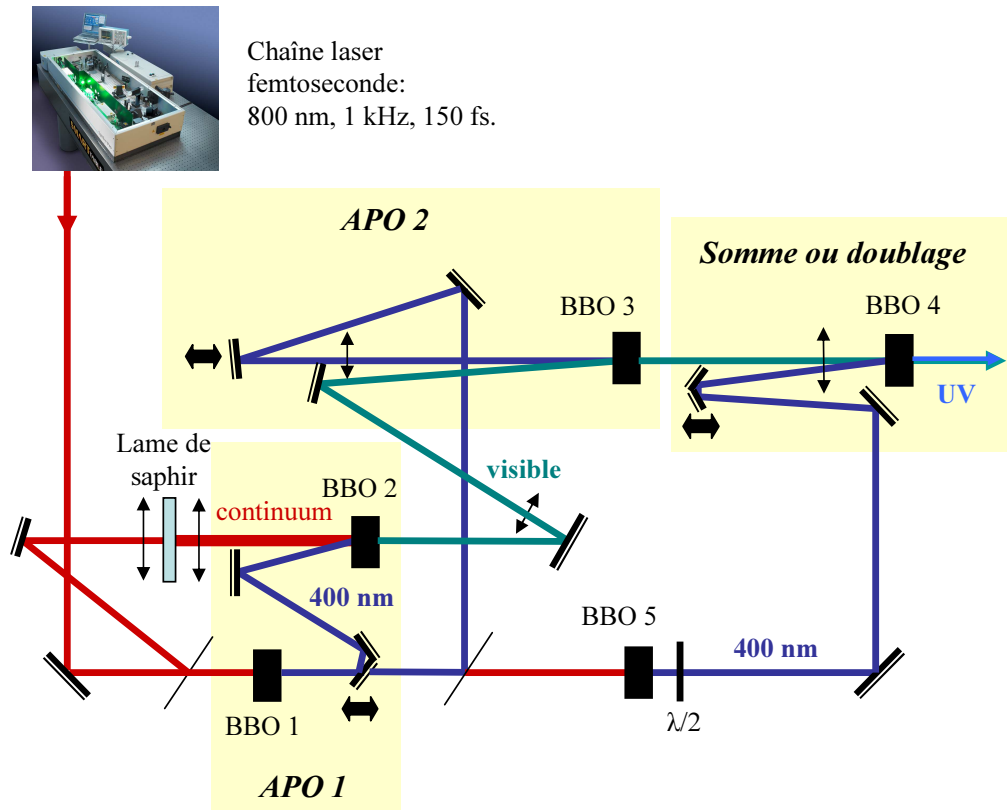


Fig. 4.4: Chemin optique du faisceau sonde (vue de dessus). Les cadres jaunes, notés *APO*, correspondent aux étages d'amplification paramétrique optique.

Les deux étages d'amplification paramétrique optique placés dans les configurations géométriques décrites au paragraphe précédent, permettent de sélectionner et amplifier des longueurs d'onde comprises entre 490 et 650 nm. Par doublage de fréquence, on obtient donc un faisceau sonde accordable entre 245 et 325 nm. Et par somme de fréquences entre 220 et 245 nm.

Appelons (o) l'axe ordinaire commun à tous les cristaux de BBO du montage et (e) l'axe extraordinaire. Le premier est orthogonal au plan de la figure 4.4 et le deuxième se trouve dans ce plan. Sachant que le faisceau émis par la chaîne commerciale est polarisé suivant l'axe ordinaire :

- L'accord de phase de type I réalisé dans BBO 1 vérifie : $2\vec{k}_{800}^{(o)} = \vec{k}_{400}^{(e)}$;
- Pour chacun des deux étages d'amplification paramétrique optique on a alors : $\vec{k}_{400}^{(e)} = \vec{k}_{visible}^{(o)} + \vec{k}_{idler}^{(o)}$;
- Le doublage de fréquence dans BBO 4 vérifie ensuite l'accord de phase de type I : $\vec{k}_{visible}^{(o)} + \vec{k}_{visible}^{(o)} = \vec{k}_{UV}^{(e)}$;
- Et la somme de fréquences dans BBO 4 vérifie l'accord de phase de type I : $\vec{k}_{400}^{(o)} + \vec{k}_{visible}^{(o)} = \vec{k}_{UV}^{(e)}$ où le faisceau à 400 nm est obtenu en doublant le 800 nm par un accord de phase de type I dans BBO 5 puis en tournant la polarisation à l'aide d'une lame $\lambda/2$.

Dans les deux cas, on obtient donc un faisceau sonde polarisé dans le plan de la figure.

4.3 Le faisceau pompe

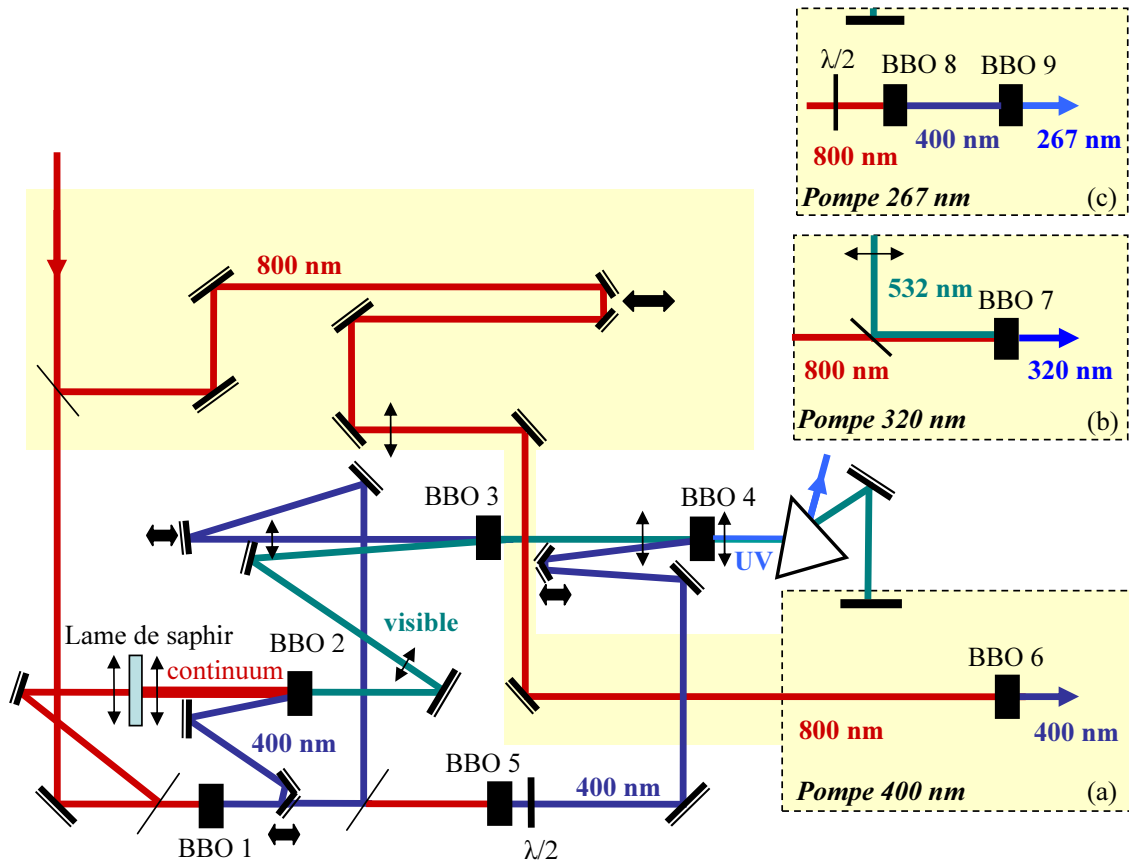


Fig. 4.5: Chemin optique du faisceau pompe (souligné en jaune). Les cadres jaunes situés sur la droite correspondent aux trois configurations possibles permettant d'accorder la pompe à : 400 nm (a), autour de 320 nm (b) ou à 267 nm (c).

Pour exciter efficacement certaines transitions électroniques, il est indispensable de pouvoir accorder le faisceau pompe sur des longueurs d'onde particulières. Ces dernières

se déterminent donc à partir des spectres d'absorption des molécules étudiées (cf. chapitre 5).

Au cours de cette thèse, nous avons ainsi travaillé à 400 nm, 320 nm et à 267 nm. Les cadres jaunes (a), (b) et (c) de la figure 4.5 montrent les différents montages que nous avons développés pour atteindre ces trois longueurs d'onde :

- Un simple cristal doubleur (BBO 6) suffit pour générer une pompe à 400 nm à partir du 800 nm sortant de la chaîne laser commerciale ;
- En sommant, dans BBO 7, le faisceau à 800 nm avec un résidu du faisceau visible amplifié par les deux étages d'amplification paramétrique optique, on obtient une pompe accordable entre 300 et 360 nm. Dans le cadre de l'étude du Dapoxyl (cf. partie II), nous nous sommes placés à 320 nm pour un faisceau visible accordé à 532 nm ;
- Deux cristaux (BBO 8 et BBO 9) doivent être utilisés pour générer une pompe à 267 nm. Il s'agit du troisième harmonique du 800 nm.

Appelons à nouveau (o) l'axe ordinaire commun à tous les cristaux du montage et (e) l'axe extraordinaire. Pour chacune des trois configurations possibles, on obtient :

- Une pompe à 400 nm polarisée suivant l'axe extraordinaire car l'accord de phase de type I dans le BBO 6 vérifie : $2\vec{k}_{800}^{(o)} = \vec{k}_{400}^{(e)}$;
- Une pompe à 320 nm polarisée suivant l'axe extraordinaire car l'accord de phase de type I dans le BBO 7 vérifie : $\vec{k}_{800}^{(o)} + \vec{k}_{532}^{(o)} = \vec{k}_{320}^{(e)}$;
- Une pompe à 267 nm polarisée suivant l'axe extraordinaire car la lame $\lambda/2$ et les accords de phase de type I des BBO 8 et 9 permettent de vérifier successivement : $\vec{k}_{800}^{(o)} \rightarrow \vec{k}_{800}^{(e)}$ puis $\vec{k}_{800}^{(e)} + \vec{k}_{800}^{(e)} = \vec{k}_{400}^{(o)}$ ³ puis $\vec{k}_{400}^{(o)} + \vec{k}_{400}^{(o)} = \vec{k}_{267}^{(e)}$.

Dans tous les cas, la pompe est donc polarisée dans le même plan que la sonde (plan horizontal).

Notons qu'il est nécessaire, pour les deux dernières configurations, de filtrer (densités, miroirs, diaphragmes...) les faisceaux résiduels à 532 nm et 800 nm également polarisés suivant l'axe extraordinaire, les molécules étudiées pouvant présenter des bandes d'absorption non nulles autour de ces longueurs d'onde.

4.4 Signal pompe/sonde

Les faisceaux pompe et sonde étant polarisés dans le même plan horizontal, il ne reste plus qu'à les focaliser en un même point de l'échantillon.

La figure 4.6 illustre cette dernière partie du montage expérimental, dans le cas d'un faisceau pompe accordé à 320 nm.

4.4.1 Retard pompe/sonde

Les mesures temporelles des variations $\delta\eta$ et $\delta(\alpha l)$ induites par photoexcitation, sont obtenues à l'aide d'une ligne à retard située sur le chemin du faisceau pompe. Celle-ci est constituée de miroirs pouvant être translatés sur une distance de 25 cm,

³ L'axe ordinaire (resp. extraordinaire) du BBO 8 correspond en fait à l'axe extraordinaire (resp. ordinaire) des autres BBO du montage car nous l'avons tourné pour placer son axe optique dans un plan vertical.

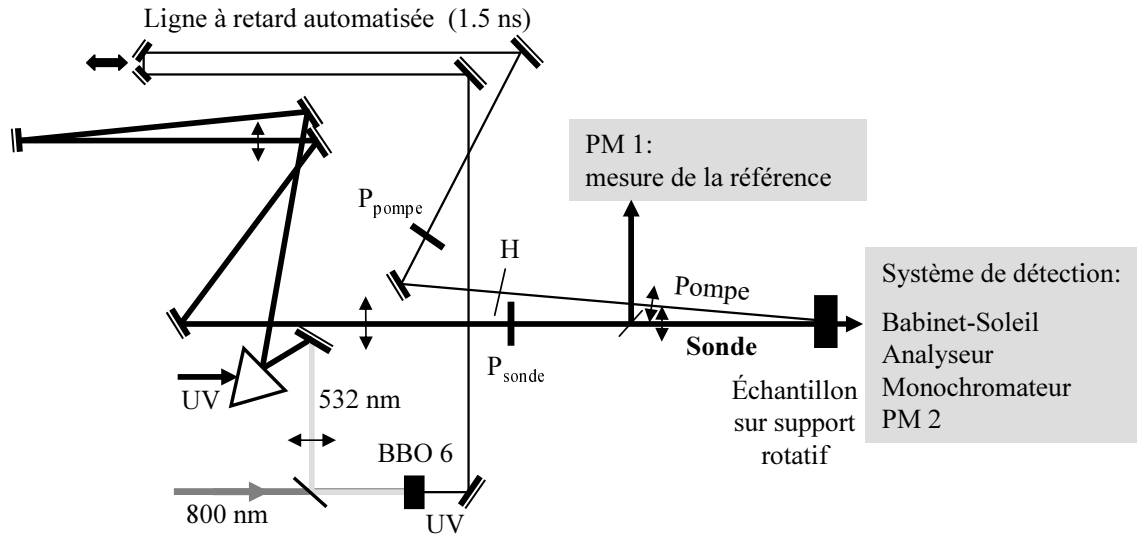


Fig. 4.6: Chemins optiques parcourus par les faisceaux pompe (trait fin) et sonde (trait épais) avant et après l'échantillon. P_{pompe} et P_{sonde} sont les polariseurs de directions parallèles, placés respectivement sur le chemin de la pompe et la sonde. H est le hacheur mécanique utilisé pour moduler l'amplitude du faisceau pompe.

et permet d'allonger ou raccourcir la distance optique parcourue par la pompe avant qu'elle n'excite l'échantillon. Dans le montage représenté sur la figure 4.6, la sonde est ainsi focalisée sur l'échantillon après la pompe, et avec un retard pouvant varier de 0 à 1 500 picosecondes.

Notons que pour des retards proches de 0, la courbe $\delta\eta(t)$ prend une forme très particulière que l'on peut voir sur la figure 4.7. Il s'agit de la corrélation croisée des impulsions pompe et sonde rencontrant simultanément l'échantillon. Elle ne correspond pas *a priori* à un vrai signal de dichroïsme circulaire mais plutôt à un artéfact causé par la superposition temporelle de ces deux impulsions. La largeur à mi-hauteur de ce pic, permet néanmoins de déterminer la résolution temporelle de notre montage, limitée par la durée des impulsions.

La résolution mesurée sur la courbe de la figure 4.7 est égale à 700 *fs*. Elle correspond à la largeur à mi-hauteur du pic approché par une fonction gaussienne. Elle est suffisante car nous ne nous intéressons pas aux dynamiques moléculaires se produisant sur moins d'une picoseconde. Elle montre néanmoins à quel point la traversée des cristaux non linéaires et celle du prisme, allongent la durée des impulsions (initialement égale à 150 *ps*).

4.4.2 Caractéristiques optiques des faisceaux pompe et sonde

Ces faisceaux pompe et sonde retardés, rencontrent ensuite les polariseurs P_{pompe} et P_{sonde} permettant, comme nous l'avons vu au chapitre précédent, d'aligner leurs polarisations suivant des directions parallèles. Puis ils sont focalisés en un même point de l'échantillon à l'aide de lentilles convergentes de focales 20 *cm*. L'angle entre les directions de propagation de ces deux faisceaux doit être le plus petit possible. Il est limité par l'encombrement des supports des deux lentilles, et vaut environ 5°.

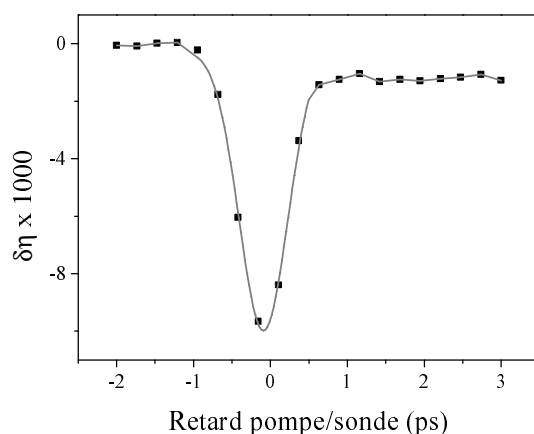


Fig. 4.7: Corrélation croisée des impulsions pompe et sonde.

Un capteur de front d'onde fonctionnant dans le domaine ultra-violet, nous a permis de déterminer les largeurs des profils spatiaux des impulsions pompe et sonde au point de focalisation de ces lentilles. Les « spot-diagrams » obtenus pour trois faisceaux différents, sont représentés sur la figure 4.8. Ils représentent la distribution d'intensité dans un plan vertical situé au niveau du point focal. En supposant que chacune de ces trois distributions est de forme gaussienne, les largeurs suivantes ont été mesurées :

Faisceau	Longueur d'onde (nm)	$\sigma(1/e^2)$ (μm)	Distance de Rayleigh (mm)
Pompe	400	100	7
Pompe	320	150	4
Sonde	230	120	7

Tab. 4.1: Caractéristiques des faisceaux pompe et sonde accordés à différentes longueurs d'onde, avec $\sigma(1/e^2)$ la largeur à I_0/e^2 du pic gaussien d'intensité maximum I_0 .

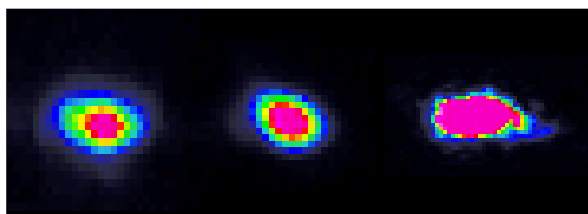


Fig. 4.8: Spot-diagrams au point focal des lentilles. *A gauche* : sonde à 230 nm. *Au centre* : pompe à 400 nm. *A droite* : pompe à 320 nm.

On remarquera notamment la différence importante entre les diamètres (et formes des spot-diagrams) des pompes à 400 et 320 nm. Ces derniers dépendent beaucoup de l'alignement des BBO 6 et 7, et de la collimation des faisceaux qui doit idéalement ne pas bouger lorsque les miroirs de la ligne à retard sont translatés d'un bout à l'autre de la platine. Ils peuvent d'ailleurs varier d'un jour à l'autre, pour des alignements sensiblement différents du continuum et des cristaux non linéaires. Idéalement, le profil

de la pompe doit être plus large que celui de la sonde, afin que cette dernière ne rencontre que des molécules excitées en traversant l'échantillon.

Notons que l'allure particulière du spot-diagram de la pompe à 320 nm provient essentiellement des aberrations subies par le faisceau visible lors de la traversée du prisme et du BBO 4.

Précisons maintenant pour les différentes longueurs d'onde des faisceaux pompe et sonde, les valeurs des énergies par impulsion arrivant sur l'échantillon.

Celle de la pompe accordée à 400 nm est mesurable directement à l'aide d'un calorimètre. Elle vaut 10,5 μJ au maximum mais induit un continuum dans l'échantillon pour des valeurs supérieures à 1 μJ . En pratique, nous avons donc utilisé un jeu de densités optiques nous permettant d'obtenir des énergies par impulsion comprises entre 200 et 600 nJ.

Les mesures sont moins directes pour les autres longueurs d'onde. Elles se font à l'aide d'un tube photomultiplicateur, dont on doit connaître précisément le gain et le rendement quantique. Celui dont nous disposons est conçu spécialement pour les longueurs d'onde comprises entre 110 et 360 nm (*Electron tubes 9402B*) et nous a ainsi permis de mesurer les énergies suivantes :

Faisceau	Longueur d'onde (nm)	Énergie par impulsion (nJ)
Pompe	267	1 000
Pompe	320	55
Sonde	230	40
Sonde	245	75

Tab. 4.2: Énergie des impulsions pompe et sonde accordées à différentes longueurs d'onde.

Si l'énergie de la pompe à 267 nm est bien plus importante que celle à 320 nm, c'est qu'elle est uniquement limitée par les efficacités des transferts d'énergie se produisant dans les BBO 8 et 9. C'est, en revanche, la faible énergie du résidu de faisceau visible, provenant des deux étages d'amplification paramétrique optique et du prisme, qui détermine celle de la pompe accordée à 320 nm.

De manière générale, ces faibles énergies par impulsion sont suffisantes pour exciter ou sonder les échantillons. Il est d'ailleurs préférable de filtrer au maximum ces faisceaux ultraviolet pour éviter une détérioration trop rapide des échantillons.

4.4.3 Support de l'échantillon

Pour toutes les expériences réalisées au cours de cette thèse, on considérera un échantillon liquide placé dans une cuve de quartz de 1 mm d'épaisseur. Comme indiqué sur le schéma de la figure 4.6, cette cuve est placée sur un support motorisé permettant de la faire tourner dans un plan orthogonal à la direction de propagation des faisceaux lumineux. Ce mouvement assure l'excitation de molécules différentes par chaque impulsion pompe, et prévient la dégradation de l'échantillon pouvant être induite par de trop forts échauffements.

Sachant que deux impulsions successives sont séparées d'une milliseconde et présentent

chacune, comme nous venons de le voir, un diamètre d'environ $100\ \mu m$, le renouvellement du volume d'échantillon excité doit donc être effectué à une vitesse égale (ou légèrement supérieure) à $100\ \mu m/ms$ soit $0,1\ m/s$. A l'échelle de la centaine de picosecondes, ce mouvement reste donc négligeable et l'impulsion sonde ne « rencontre » alors que les molécules excitées par l'impulsion pompe la précédant directement.

4.4.4 Détection

Le système de détection de la figure 4.6 est constitué d'un tube photomultiplicateur de référence et de l'ensemble des systèmes optiques et électroniques représentés sur la figure 3.3 du chapitre précédent.

Le tube photomultiplicateur de référence (PM 1) mesure l'intensité moyenne du faisceau sonde avant l'échantillon. Cette dernière reste constante lorsque le déphasage du compensateur de Babinet-Soleil varie ou que la pompe excite l'échantillon, mais dépend des fluctuations rapides du laser. Elle est donc utilisée pour normaliser les signaux $PM(X)$ définis précédemment et pouvant être perturbés par ces mêmes fluctuations.

Un monochromateur est placé entre l'analyseur croisé et le tube photomultiplicateur (PM 2) de la figure 3.3. Il permet de bloquer définitivement les photons provenant d'une éventuelle diffusion du faisceau pompe et pouvant être détectés par le tube photomultiplicateur.

5. APPLICATION À L'ÉTUDE DE MOLÉCULES BIOLOGIQUES ET CHIMIQUES

Pour devenir active, une protéine doit adopter une conformation spatiale donnée, c'est à dire une structure tri-dimensionnelle très précisément définie, lui permettant d'exprimer sa fonction biologique propre. Il s'agit du processus complexe de repliement, dont nous discuterons plus en détail dans la partie II.

Une protéine active présente donc une structure particulière, dans laquelle les atomes de ses acides aminés sont positionnés dans un arrangement relatif d'une extrême précision. Cette organisation spatiale permet notamment de former des sites spécifiques (sites catalytiques, sites de fixation, de liaison ou de reconnaissance...), d'assurer sa stabilité en solution ou encore d'éviter/faciliter les interactions avec certaines molécules. Elle n'est pas nécessairement figée et peut s'adapter à la présence d'une molécule particulière, se trouvant dans l'environnement proche de la protéine. Dans ce cas, ce n'est donc pas une structure donnée qui détermine sa fonction biologique, mais plutôt la dynamique suivant laquelle cette structure s'adapte aux variations de son environnement. Citons ainsi l'exemple des hémoprotéines, dont la région de l'hème peut subir d'importantes variations de structure avant et après la dissociation ou la fixation d'un ligand CO , O_2 ou NO . Le cas particulier de la myoglobine, et plus particulièrement des réarrangements structuraux liés la photodissociation rapide d'un ligand CO , est l'objet de la première section de ce chapitre. Il s'inscrit dans le cadre de l'étude du processus complexe de régulation allostérique, et a été le sujet de nombreux travaux expérimentaux depuis l'avènement des techniques de spectroscopie femtoseconde résolue temporellement.

Cette étude nous montrera que les modifications fonctionnelles et structurales de la myoglobine peuvent être particulièrement bien détectées via les mesures des variations du dichroïsme circulaire, dans des régions spectrales bien choisies. Il en va d'ailleurs de même pour de nombreuses autres molécules chirales, dont l'excitation optique peut engendrer des modifications de leur structure et/ou de leurs propriétés physiques ou chimiques. Nous verrons ainsi l'exemple du complexe métallique $[Ru(phen)_3]^{2+}$, représentatif d'une classe de molécules jouant un rôle central dans l'étude des processus de transferts photoinduits d'électrons; puis celui du 1,1' - *Binaphthol*, molécule très couramment employée en tant qu'auxiliaire chiral des synthèses organiques asymétriques.

Il s'agit dans ce chapitre, de présenter trois différents exemples d'application de notre nouvelle technique de mesure du dichroïsme circulaire. Outre l'intérêt physique porté à chacun des trois échantillons étudiés, ces travaux nous ont permis de tester et valider sa mise en œuvre expérimentale, mais aussi de mettre en évidence ses principales limites pour ensuite trouver les solutions permettant de s'en affranchir.

5.1 La myoglobine : un exemple d'hémoprotéine

La myoglobine est une petite protéine constituée d'un hème et de 153 acides aminés, organisés principalement en huit hélices alpha, notées de A à H (figure 5.1). Sa fonction principale consiste à transporter l'oxygène dans les tissus musculaires. Elle est aussi impliquée dans la dégradation du NO , molécule produite lors du processus de respiration oxydative.

Il s'agit d'un exemple simple d'hémoprotéine, très souvent utilisé pour chercher à mieux comprendre les dynamiques accompagnant les mécanismes de coopération moléculaire ligand/hème, tels que ceux intervenant dans la régulation allostérique de l'hémoglobine.

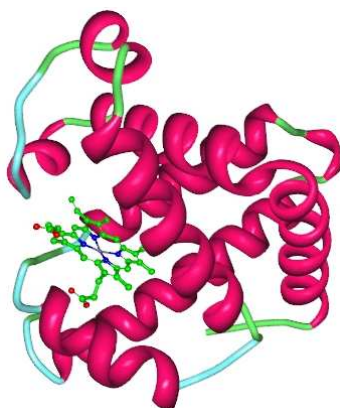


Fig. 5.1: Structure de la myoglobine (image issue de la *Protein Data Bank*). Les hélices alpha sont représentées en rose, et l'hème en vert et bleu (au centre gauche).

Au cours de ces trente dernières années, de nombreuses études expérimentales (résonance Raman, spectroscopie IR, absorption transitoire dans les domaines visible et ultraviolet...) ont permis de mettre en évidence les différents états intermédiaires et constantes de temps accompagnant la dynamique de relaxation de la myoglobine, suite à la photodissociation d'un ligand CO . Elles ont contribué à une meilleure compréhension des déformations subies par l'hème et ses acides aminés les plus proches afin d'empêcher ou faciliter la recombinaison d'un couple CO /hème. Ces déformations sont résumées dans le paragraphe 5.1.1.

Les mouvements des acides aminés aromatiques (phenylalanine, tyrosine et tryptophane) étant en revanche mal connus, nous avons décidé de nous placer à 260 nm où leurs contributions aux signaux de dichroïsme circulaire et d'absorption transitoires devraient être maximales. Les courbes expérimentales obtenues sur une échelle de 400 picosecondes seront analysées dans les paragraphes 5.1.3 et 5.1.4. Nous discuterons également des résultats obtenus à 230 nm .

5.1.1 Relaxation de la myoglobine après photodissociation

L'hème de la myoglobine, comme de toute autre hémoprotéine, est constitué d'un atome de fer $Fe(II)$ placé dans la cavité centrale d'une porphyrine. L'ion $Fe(II)$ est hexavalent, il forme quatre liaisons avec la porphyrine et une liaison covalente avec le squelette de la protéine, via l'histidine proximale. Les ligands CO , O_2 ou NO se fixent

sur l'hème en formant une liaison avec cet atome de fer. Notons que du côté de l'hème où se fixe le ligand, se trouve un autre acide aminé important : l'histidine distale qui est proche de l'atome de fer mais n'y est pas liée.

La dissociation d'un ligand CO du fer de l'hème a l'avantage d'être photoactivable. Elle a donc permis l'étude expérimentale des dynamiques de relaxation de la myoglobine et de recombinaison de couples $Fe(II)/CO$, dont nous résumons brièvement les étapes intermédiaires :

1. Un faisceau laser accordé autour de 400 nm , excite l'hème reliée à une molécule de CO ;
2. Le ligand se dissocie très rapidement de l'atome de $Fe(II)$;
3. Un premier état excité de l'hème se forme en 50 fs , l'atome de fer est alors légèrement décalé par rapport au plan de l'hème (vers l'histidine proximale) [31] ;
4. Il tend en 300 fs vers un second état excité et possède déjà sa structure finale sans ligand : il est alors « bombé » [31] et applique une contrainte sur l'histidine proximale [29] ;
5. L'hème retourne ensuite vers son état électronique fondamental en 3 ps [32] ;
6. Il se « refroidit » par diffusion thermique à travers le reste de la matrice protéique en 1 à 10 ps , et vers le solvant en moins de 22 ps [33] ;
7. Parallèlement, des mouvements globaux de la structure tertiaire de la protéine apparaissent lors des premières 30 ps suivant le départ du ligand [34]. Ils impliquent le déplacement des hélices F et H après le déplacement de l'atome de fer hors du plan de l'hème. Notons néanmoins que toute variation de structure se produisant au cours des premières 20 ps , est difficilement différenciable du processus de relaxation électronique de l'hème ;
8. Au bout de 300 ps [34], la relaxation de la protéine vers la forme Mb de l'échantillon (état électronique et structure) est terminée ;
9. Les résidus aromatiques et l'histidine distale jouent ensuite un rôle important dans le processus de recombinaison du couple hème/ CO puisqu'elles sont capables de se déplacer pour diriger le ligand d'un site d'amarrage à un autre (« docking site »). Elles facilitent donc la recombinaison de la liaison $Fe(II)/CO$ (l'atome de fer étant revenu dans son plan initial) et ce avec des temps de relaxation pouvant varier de 200 ns (pour les ligands situés dans la poche de l'hème) à $100\text{ }\mu\text{s}$ et jusqu'à 2 ms (pour les plus éloignés) [35].

Les expériences réalisées au cours de cette thèse, se situent dans la phase des mouvements globaux subis par la protéine suite au départ du ligand, c'est à dire lors des premières 300 ps . Une étude détaillée de ce phénomène avait déjà été réalisée au cours de la thèse précédente [29] pour des faisceaux sonde visibles. Les expériences présentées dans ce manuscrit ont donc permis de compléter ce travail, en sondant la protéine dans l'ultraviolet, et en s'intéressant plus particulièrement aux déplacements des hélices alpha ainsi que ceux des acides aminés aromatiques.

Nous verrons, en outre, au paragraphe 5.1.5, que ces expériences réalisées dans la myoglobine, nous ont permis de valider notre nouvelle technique de mesure du dichroïsme circulaire mise en place lors de la première année de ce projet de thèse.

5.1.2 Échantillons étudiés

Les échantillons de carboxymyoglobine ($MbCO$) utilisés au cours de cette thèse présentent des concentrations comprises entre 80 et 140 μM . Ils ont tous été préparés de la façon suivante [36] :

- Dissolution de quelques milligrammes d'une poudre de myoglobine de cœur de cheval dans de l'eau désionisée ;
- Réduction du fer de l'hème de $Fe(III)$ à $Fe(II)$ (la myoglobine passe de la forme $MetMb$ à la forme Mb) à l'aide de quelques μL d'une solution de dithionite de sodium de concentration 100 mM ;
- Injection de CO dans la solution (cuve nettoyée à l'Argon au préalable).

Des spectres d'absorption des échantillons ont été réalisés systématiquement avant et après les mesures expérimentales des $\delta\eta(t)$ et $\delta(\alpha l)(t)$ (voir la section 3.2.3 du chapitre 3, pour la définition de ces notations), afin de s'assurer du maintien du fer de l'hème dans sa forme réduite. L'un de ces spectres est donné sur la figure 5.2.

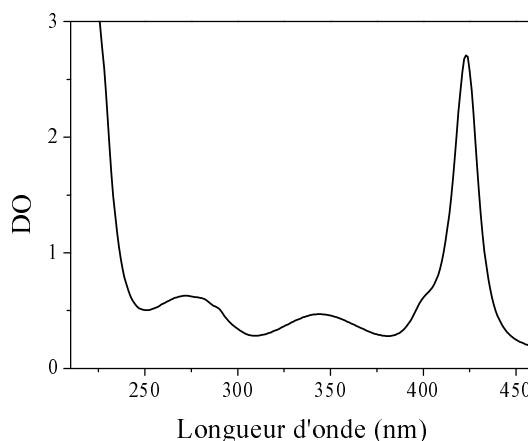


Fig. 5.2: Spectre d'absorption d'un échantillon de $MbCO$ placé dans une cuve de quartz de 1 mm d'épaisseur.

Notons que l'hème présente deux bandes d'absorption dans le proche ultraviolet [37] : la bande ϵ (ou L) centrée autour de 277 nm et la bande δ (ou N) autour de 320 nm . Elles proviennent du couplage des transitions $\pi\pi^*$ de la porphyrine. Leur interaction avec les transitions d'autres éléments inclus dans la chaîne peptidique et proches de l'hème, influence le spectre d'absorption de la myoglobine. Ces éléments sont les chaînes latérales des acides aminés aromatiques et les liaisons peptidiques [10, 38], qui absorbent dans les régions suivantes :

- tryptophane : pics d'absorption à 225 et 285 nm et structures fines ¹ entre 290 et 300 nm ;
- tyrosine : pics à 275 et 282 nm ;
- phenylalanine : pics entre 255 et 270 nm ;
- liaisons peptidiques : pics à 190 nm et 222 nm .

¹ Les structures fines proviennent de transitions vibroniques impliquant différents niveaux vibratoires des états excités.

La bande d'absorption observée autour de 200 nm dans la spectre de *MbCO* provient ainsi du couplage des transitions $\pi\pi^*$ des liaisons peptidiques avec les transitions électriques des chaînes latérales des acides aminés aromatiques, ainsi que celles de l'hème. La contribution de ce dernier est d'ailleurs significative puisqu'il a été montré qu'il est responsable de 25 et 50% de la valeur totale du pic [37].

5.1.3 Étude de l'absorption transitoire

Plusieurs séries de mesures ont été réalisées pour différentes longueurs d'onde du faisceau sonde accordé dans le proche ultraviolet. Elles nous ont permis d'étudier les variations temporelles de l'absorption $\delta(\alpha l)$ et du dichroïsme circulaire $\delta\eta$ induites par la photodissociation du ligand *CO*. Cette dernière est déclenchée lors de l'excitation de l'hème par un faisceau pompe de longueur d'onde $\lambda = 400$ nm (dans la bande de Soret) et d'énergie par impulsion $E \cong 250$ nJ, permettant d'obtenir un taux d'environ 15% de molécules excitées.

Intéressons nous dans un premier temps aux courbes $\delta(\alpha l)(t)$ mesurées par T. Dartigalongue dans la région spectrale s'étendant de 230 à 300 nm. Elles vont nous aider dans l'analyse des $\delta\eta(t)$ obtenues au cours de cette thèse, à l'aide de la nouvelle technique décrite précédemment.

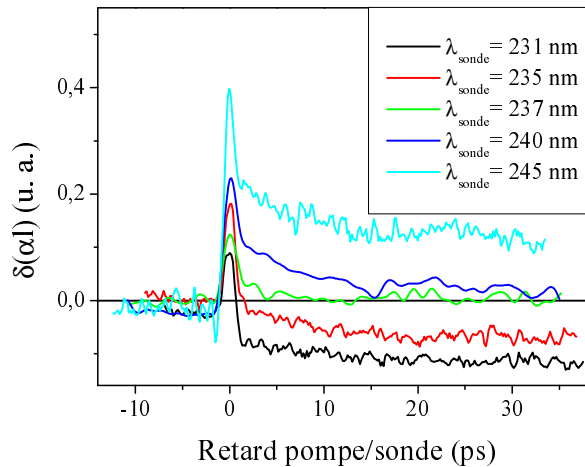


Fig. 5.3: Courbes $\delta(\alpha l)(t)$ mesurées pour différentes longueurs d'onde de sonde et exprimées en unité arbitraire.

Cinq de ces courbes sont données sur la figure 5.3. Chacune d'entre elles présente un pic au retard zéro. Ce dernier n'est cependant pas lié à l'échantillon de myoglobine car nous l'avons également obtenu dans de l'eau désionisée seule. Il est très probablement dû aux photons provenant des bandes d'absorption de l'eau dans l'ultraviolet lointain [39], ces dernières étant excitées lors de l'absorption simultanée des photons pompe et sonde. Notons qu'il s'agit du même artéfact que celui observé sur la figure 4.7 lors des mesures de $\delta\eta$ autour du retard zéro.

On observe, sur chacune des cinq courbes représentées sur cette figure, une dynamique d'environ 10 ps faisant tendre la courbe d'absorption transitoire vers un palier $\delta(\alpha l)_\tau$ stable sur plus d'une nanoseconde (seules les 35 premières picosecondes sont représentées ici). Cette dynamique de 10 ps a également été observée dans un

échantillon de myoglobine sans ligand CO (non montré ici). Elle est vraisemblablement liée aux effets de diffusion thermique se produisant lors de la relaxation de l'hème (voir plus haut, paragraphe 5.1.1).

En dehors des changements rapides liés à l'excitation et la relaxation de l'hème (sur environ 3 ps d'après le paragraphe 5.1.1) ainsi que ceux dus aux effets thermiques, aucune dynamique n'est donc observée sur les courbes d'absorption transitoire. Ces résultats ressemblent à ceux obtenus dans la bande de Soret [40]. Ils signifient que les états électroniques des acides aminés aromatiques et des liaisons peptidiques restent stables dès lors que l'hème atteint la configuration spatiale et l'état électronique associés à la forme Mb de l'échantillon. Rappelons néanmoins que les transitions de l'hème sont fortement couplées à celles des acides aminés aromatiques et des liaisons peptidiques des hélices les plus proches [38], et qu'il n'est donc pas impossible que les variations rapides de l'état électronique de l'hème aient un effet sur les bandes d'absorption de la myoglobine dans l'ultraviolet. Mais cet effet devrait être rapide et se produire parallèlement au processus de relaxation de l'hème, c'est à dire durant les trois premières picosecondes.

En ce qui concerne la région d'absorption des résidus aromatiques, cette affirmation se justifie en comparant les valeurs maximales des coefficients d'extinction des principales bandes d'absorption susceptibles d'influencer les mesures d'absorption transitoire [37, 41] :

Groupe/Bande	Coefficient d'extinction ($M^{-1}cm^{-1}$)
Hème/ ϵ	20 000
Hème/ δ	35 000
Tryptophane	4 500
Tyrosine	1 400
Phénylalanine	200

Tab. 5.1: Contributions des différents éléments entourant l'hème, dans le spectre d'absorption de la myoglobine.

Les données du tableau montrent que les bandes d'absorption de l'hème contribuent en grande partie aux signaux d'absorption transitoire et devraient être peu perturbées par la présence des chaînes latérales d'acides aminés aromatiques.

Pour finir, remarquons que toutes les valeurs des paliers $\delta(\alpha l)_\tau$ obtenues expérimentalement sont en parfait accord avec les différences $\delta(\alpha l)$ mesurées, à l'aide d'un spectromètre commercial, entre les spectres de $MbCO$ et Mb . Suivant la longueur de sonde utilisée, il s'agit soit d'une absorption induite ($\delta(\alpha l)_\tau > 0$), soit d'une saturation de l'absorption ($\delta(\alpha l)_\tau < 0$). La figure 5.4 illustre ce résultat. Au delà des dix premières picosecondes, les molécules excitées se trouvent donc déjà dans l'état électronique associé à la forme Mb . Cela signifie que pour les plus petites longueurs d'onde (celles données sur la figure 5.3), les variations des états électroniques des liaisons peptidiques (ou des chaînes latérales absorbant dans cette région) ne modifient pas significativement le spectre d'absorption des molécules, une fois la relaxation thermique de l'hème terminée.

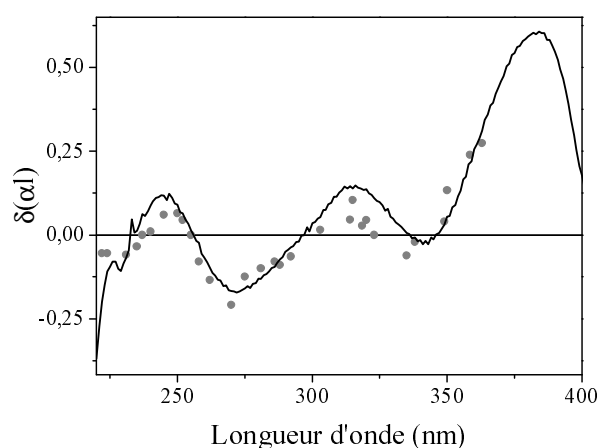


Fig. 5.4: Différence entre le spectre d'absorption de *MbCO* et celui de *Mb*. *Trait noir continu* : mesures réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre commercial. *Points gris* : mesures expérimentales normalisées pour se placer dans le cas où 100 % des molécules sont excitées, pour un retard pompe/sonde de 50 ps.

Étudions maintenant les courbes de dichroïsme circulaire obtenues expérimentalement à 230 et 260 nm. Elles vont nous renseigner sur les modifications de structure subies par les hélices alpha et résidus aromatiques de la myoglobine.

5.1.4 Dichroïsme circulaire à 260 et 230 nm

Les variations du spectre de dichroïsme circulaire apparaissant lors des premières picosecondes suivant le départ du ligand, ont été étudiées expérimentalement à 260 puis 230 nm. Ces deux longueurs d'onde caractérisent les deux régions représentées sur la figure 5.5.

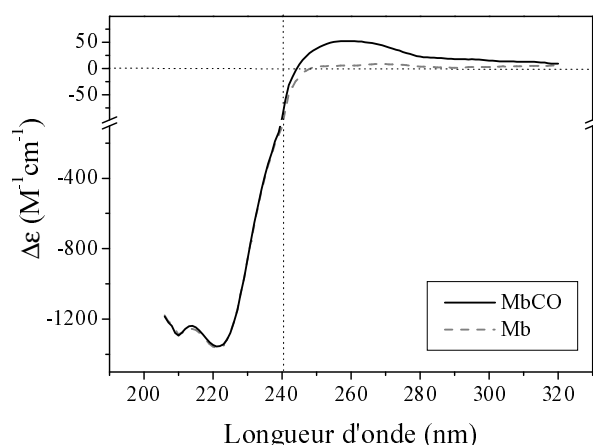


Fig. 5.5: Spectre de dichroïsme circulaire de *MbCO* (trait continu) et *Mb* (tirets) dans leur état fondamental. L'échelle verticale est multipliée par 3 pour les longueurs d'onde supérieures à 240 nm.

Dans la première, centrée autour de 260 nm, *MbCO* possède un pic de dichroïsme circulaire d'environ $50 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, qui est beaucoup plus faible dans *Mb*. Comme nous l'avons déjà expliqué précédemment, les chaînes latérales d'acides aminés aromatiques

contribuent au spectre d'absorption dans cette région. Aussi, tout déplacement des résidus aromatiques devrait pouvoir être détecté lors du passage du spectre de *MbCO* à celui de *Mb*.

Dans la deuxième, centrée autour de 220 nm, les deux spectres présentent une forme très particulière, caractéristique des hélices alpha. Toute variation $\delta\eta(t)$ détectée au cours de l'étape de transition devrait donc correspondre à des réarrangements de ces hélices alpha, constituant la structure secondaire de la myoglobine. Notons que ces variations devraient cependant être très faibles car les spectres des états *MbCO* et *Mb* sont très proches dans cette région spectrale (cf. figure 5.5) et qu'ils correspondent globalement aux mêmes hélices positionnées différemment dans l'espace. Le passage d'un spectre à l'autre devrait donc s'accompagner de très faibles changements structuraux.

Les courbes $\delta\eta(t)$ mesurées pour ces deux longueurs d'onde de sonde sont données sur la figure 5.6. Elles correspondent, toutes deux, aux variations induites par la photolyse de 20% des molécules de *MbCO* sondées.

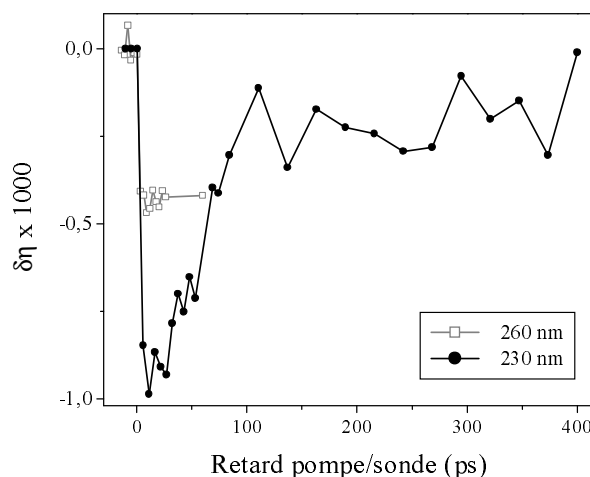


Fig. 5.6: Courbes $\delta\eta(t)$ obtenues à 260 (carrés blancs) et 230 nm (carrés noirs) pour un même nombre de molécules excitées par la pompe.

Intéressons nous dans un premier temps au résultat obtenu à 260 nm. Comme pour l'absorption transitoire, le dichroïsme circulaire varie rapidement, après le départ du ligand, d'une valeur égale à celle séparant les spectres de *MbCO* et *Mb* sur la figure 5.5, puis reste constant pendant plusieurs centaines de nanosecondes [42] (jusqu'à la recombinaison hème/*CO* au cours de laquelle les chaînes latérales jouent un rôle important, cf. paragraphe 5.1.1). Cette observation confirme donc l'analyse faite au paragraphe 5.1.3, supposant que la contribution de l'hème est prédominante à cette longueur d'onde. Ce résultat n'est d'ailleurs pas surprenant, puisque l'on sait que le pic observé à 260 nm sur les spectres de dichroïsme circulaire de *MbCO* et *Mb*, est présent sur d'autres hémoprotéines (hémoglobine, cytochrome c [37]) et disparaît lorsque l'hème est retiré de la séquence peptidique [36]. Les variations $\delta\eta$ observées à 260 nm autour du retard 0, seraient, par conséquent, uniquement liées à l'excitation et la relaxation des transitions électroniques de l'hème, passant d'une structure plane (avec ligand) à une structure bombée (sans ligand). Les déplacements locaux des chaînes latérales, se produisant éventuellement au cours des premières 100 ps, sont donc trop faibles pour

pouvoir être détectés directement à cette longueur d'onde ou même pour perturber significativement les transitions de l'hème dans l'ultraviolet.

Comme le montre la figure 5.6, le résultat obtenu à 230 nm est très différent. Suite à la dissociation du ligand, on observe, en effet, une variation $\delta\eta$ importante sur moins de 10 ps, correspondant à une augmentation du dichroïsme circulaire (négatif). Cette variation est ensuite suivie d'une relaxation vers la valeur du dichroïsme circulaire de la forme *Mb*. Cette dernière est obtenue 100 ps après le départ du ligand et reste stable sur au moins 1 ns. Notons de plus, que l'écart $\delta\eta$ mesuré expérimentalement entre les formes *MbCO* et *Mb* correspond à moins de 5% de la valeur du dichroïsme circulaire « statique ».

Cette dynamique correspond à celle obtenue précédemment dans la bande de Soret [29] en mesurant le dichroïsme circulaire à l'aide d'une cellule de Pockels. Ces mesures avaient permis de mettre en évidence ² la contrainte appliquée par le fer de l'hème sur l'histidine proximale au cours des dix premières picosecondes succédant le départ du ligand. Une relaxation vers le dichroïsme circulaire de la forme *Mb* avait également été observée sur moins de 100 ps. Sachant que le dichroïsme circulaire à 230 nm dépend essentiellement des structures secondaires de la protéine, c'est à dire de ses hélices alpha, alors on peut supposer que cette augmentation du signal de dichroïsme circulaire, mesurée à cette longueur d'onde, correspond à une variation locale de la structure de l'hélice liée à l'histidine proximale, elle même contrainte par le mouvement du fer de l'hème. Les constantes de temps mesurées ici, sont d'ailleurs en accord avec celles relevées dans la littérature et décrites précédemment : modifications de la structure peptidique sur moins de 30 ps puis relaxation vers la forme *Mb* en moins de 300 ps.

5.1.5 Validation de la nouvelle technique

Les dynamiques présentées dans le paragraphe précédent, ont été les premières obtenues à l'aide de la technique de mesure du dichroïsme circulaire développée au début de cette thèse. Pour valider définitivement le principe de cette nouvelle méthode, nous avons donc essayé de retrouver les résultats obtenus dans la bande de Soret à l'aide d'une cellule de Pockels. Et pour cela, nous avons installé notre système de détection (polariseur et analyseur croisés, compensateur de Babinet-Soleil) sur le montage développé au cours de la thèse précédente et permettant de disposer de longueurs d'onde de sonde accordables autour de 420 nm.

Comme le montre la figure 5.7, les spectres des états *MbCO* et *Mb* sont très différents dans la bande de Soret. Il a donc fallu se placer vers 430 nm, pour assurer une variation d'absorption $\delta(\alpha l)$ suffisamment faible pour satisfaire les conditions optimales de fonctionnement de la nouvelle technique (cf. section 3.3.2).

Un exemple de courbe $\delta\eta(t)$ obtenu pour une sonde accordée à 432 nm (la pompe étant toujours fixée à 400 nm) est donné sur la figure 5.8. En accord avec la résultats attendus, on observe :

- Une variation rapide du signal rapidement après la dissociation du ligand. Il s'agit de l'excitation et la relaxation électroniques de l'hème (sur environ 3 ps) ;

² Calculs basés sur la théorie des oscillateurs couplés, détaillée dans la section 2.7.2. Pour plus de détails, se reporter au manuscrit de thèse de T. Dartigalongue [29].

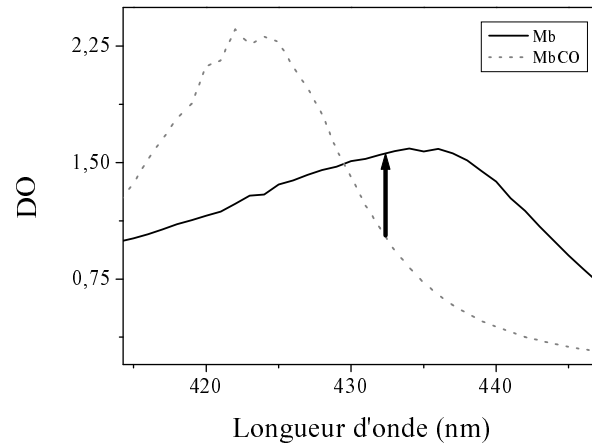


Fig. 5.7: Spectres d'absorption de MbCO et Mb dans la bande de Soret (en DO). La flèche situe la longueur d'onde $\lambda = 432 \text{ nm}$.

- Une décroissance exponentielle du signal, présentant une constante de temps de 7 ps . Elle est liée au mouvement de l'histidine contraint par le déplacement du fer de l'hème hors de son plan [29] ;
- Une relaxation vers la valeur du dichroïsme circulaire de l'état *Mb*. En l'approchant par une fonction exponentielle, on trouve une constante de temps de 30 ps , en accord avec les résultats obtenus avec la cellule de Pockels.

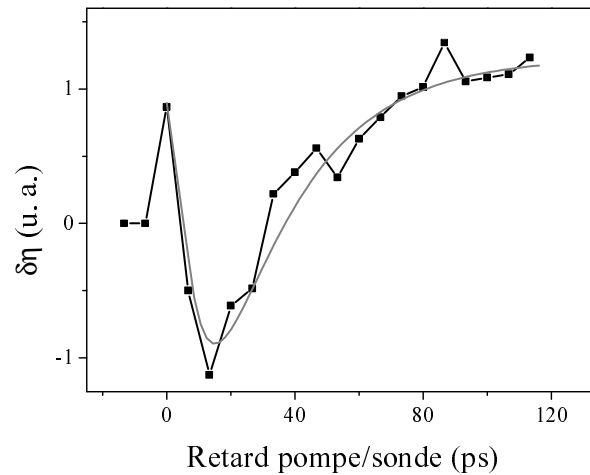


Fig. 5.8: Courbes $\delta\eta(t)$ obtenues à 432 nm à l'aide du Babinet-Soleil. Carrés noirs : mesures expérimentales. Trait gris continu : fonction biexponentielle (7 ps , 30 ps).

Les constantes de temps obtenues dans cette configuration, sont donc en parfait accord avec celles déjà observées à l'aide de la cellule de Pockels. De plus, en comparant les spectres de dichroïsme circulaire des états *MbCO* et *Mb*, on constate que la variation de dichroïsme circulaire, mesurée entre ces deux états, présente le bon signe (positif) [42]. Notons qu'il en va de même pour la variation $\delta(\alpha l)$ obtenue parallèlement à $\delta\eta$: signe positif en accord avec les spectres de la figure 5.7.

Ces expériences réalisées dans la myoglobine, nous ont donc permis de mettre en évidence le mouvement des hélices alpha, quelques dizaines de picosecondes après la dissociation d'un ligand CO ; et de souligner l'importante contribution des transitions électroniques de l'hème à 260 nm, empêchant la détection d'éventuels mouvements des chaînes latérales d'acides aminés sur ces courtes échelles de temps.

Elles nous ont également permis de mettre en pratique notre nouvelle technique de mesure du dichroïsme circulaire et de nous assurer de la fiabilité de ces résultats (notamment leurs signes). Voyons, maintenant, un autre exemple d'application de cette technique.

5.2 Étude de l'état excité du $[Ru(phen)_3]^{2+}$ dans l'ultraviolet

Les complexes du ruthénium, tels que $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ et son analogue $[Ru(phen)_3]^{2+}$ (représenté sur la figure 5.9) où $bpy=2,2'$ -bipyridine et $phen=1,1$ -phenanthroline, font partie d'une famille de molécules très largement étudiée pour ses implications dans de nombreux phénomènes physiques et chimiques [43] : photocatalyse, électrochimie, luminescence chimique et électrochimique, transferts de charges... Ils se trouvent d'ailleurs à la base de nombreuses avancées technologiques, dont les plus connues sont certainement celles liées à la conversion de l'énergie solaire (photosynthèse artificielle, cellules photovoltaïques) [44].

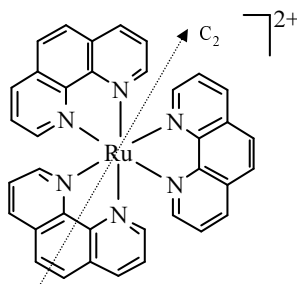


Fig. 5.9: $[Ru(phen)_3]^{2+}$ avec l'axe de symétrie C_2 d'un des trois ligands.

On les rencontre également dans le domaine de l'ingénierie biomoléculaire, car de récents travaux ont montré que leur fixation sur des oligonucléotides modifiés [45] pourrait permettre de développer de nouveaux outils à usage thérapeutique (inhibition de l'expression des fragments d'ADN ou ARN cibles) et dont les propriétés de luminescence pourraient servir à détecter certaines séquences d'acides nucléiques à l'intérieur des cellules. Leur incorporation dans des séquences d'acides aminés particulières, permettent, par ailleurs, d'initier le repliement de polypeptides modèles [46] (cf. partie II) ou d'étudier les processus de transfert d'électron se produisant sur les zones cibles de certaines protéines [47].

La plus grande partie de ces applications repose sur le processus de transfert d'électron se produisant entre le ruthénium et ses ligands suite à l'absorption d'un photon dans le domaine visible. Ce processus a été le sujet de nombreuses études, qui ont permis de caractériser les dynamiques [48] et structures électroniques fines [49] des états excités, tout comme les transitions de la bande *MLCT* (« Transfert de Charge du

Métal vers le Ligand ») déterminées à partir des spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire [50]. Peu d'informations sont en revanche disponibles sur les transitions des états excités dans les bandes d'absorption des ligands. Nous avons donc choisi d'utiliser notre nouvelle technique de mesure du dichroïsme circulaire pour tenter d'en savoir plus à ce sujet.

5.2.1 Échantillons étudiés

Le complexe $[Ru(phen)_3]^{2+}$ est composé d'un ion Ru^{2+} entouré de trois ligands phénanthroline. Dans son état fondamental, il présente une symétrie de type D_3 , dont l'axe principal est orthonormal au plan bissecteur des trois ligands. Chacun de ces ligands possède lui-même son propre axe de symétrie C_2 représenté sur la figure 5.9. Ils sont donc indifférenciables dans cet état.

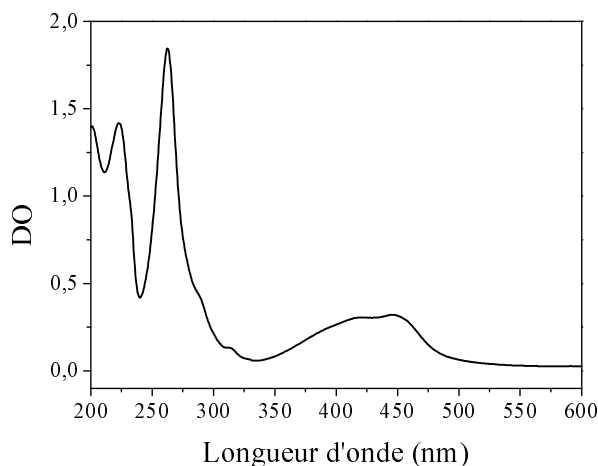


Fig. 5.10: Spectre d'absorption de l'énantiomère $\Lambda - [Ru(phen)_3]^{2+}$ dissous dans l'acétonitrile.

Les échantillons étudiés lors de cette thèse ont été synthétisés au Laboratoire de Chimie de l'ENS Lyon. Bien que nous disposions d'un mélange racémique et des deux énantiomères séparés (cf. section 3.2.4), nous ne nous intéresserons ici qu'à l'une de ces trois formes du complexe : l'énantiomère $\Lambda - [Ru(phen)_3]^{2+}$ (choix arbitraire puisque l'autre énantiomère aurait permis d'arriver aux mêmes interprétations en terme de transitions électroniques).

Le solvant choisi pour les expériences dans l'ultraviolet, est l'acétonitrile. Il a la particularité de peu absorber dans cette région spectrale.

La concentration des échantillons est en moyenne de $150 \mu M$, elle permet d'obtenir une absorption suffisante à $400 nm$ pour exciter près de 10% des molécules sondées de 230 à $300 nm$ (pour une énergie par impulsion de $250 nJ$ à $400 nm$), tout en s'assurant que l'absorption du faisceau sonde n'est pas trop forte (c'est à dire une densité optique typiquement inférieure à 2,2 pour que l'intensité du faisceau transmis par l'échantillon sorte du bruit lors de la détection par le tube photomultiplicateur).

Le spectre d'absorption de l'énantiomère $\Lambda - [Ru(phen)_3]^{2+}$ (*RuTP*) est représenté sur la figure 5.10. Notons que le passage des ligands phénanthroline aux ligands bipyridine pour former le complexe $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ (*RuTB*) plus fréquemment étudié, permet essentiellement de modifier la longueur d'onde d'émission de ce système luminescent,

mais les mécanismes photophysiques que nous décrirons par la suite sont les mêmes dans les deux complexes.

Il en va de même pour les spectres de dichroïsme circulaire de $RuTP$ (cf. figure 5.11) et $RuTB$ [51] présentant tous deux une structure excitonique centrée respectivement autour de 260 et 290 nm. Cette forme excitonique est bien connue, elle provient du couplage des transitions électriques dégénérées et localisées sur les trois ligands [2]. Nous discuterons plus précisément des caractéristiques de ce couplage au paragraphe 5.2.2.

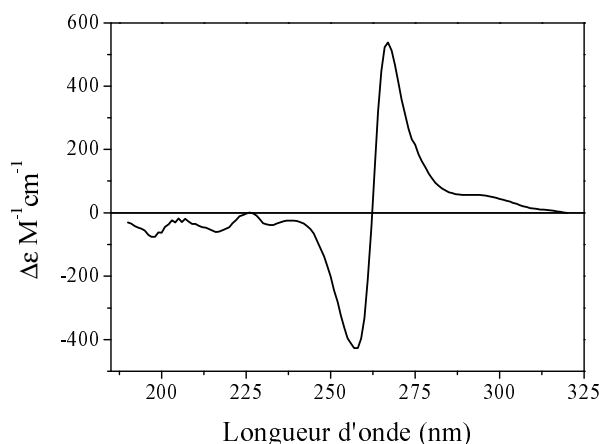


Fig. 5.11: Spectre de dichroïsme circulaire de l'énantiomère $\Lambda - [Ru(phen)_3]^{2+}$ dissous dans l'acétonitrile.

5.2.2 Mécanisme de transfert de charge

Le cycle énergétique accompagnant le mécanisme de transfert de charge du $RuTP$ est représenté sur la figure 5.12. Ce dernier peut être initié suite à l'absorption d'un photon ayant une longueur d'onde comprise dans la bande située entre 400 et 450 nm sur la figure 5.10.

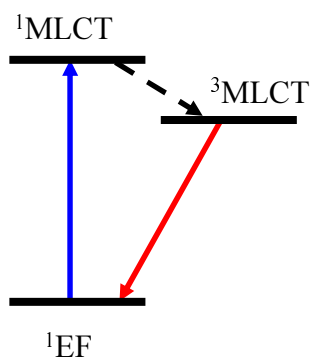
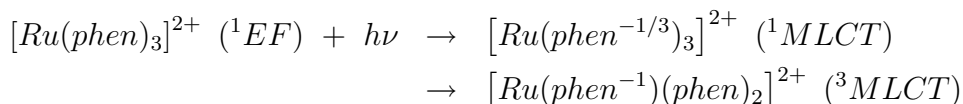


Fig. 5.12: Cycle énergétique accompagnant le mécanisme de transfert de charge du $RuTP$, avec l'état fondamental 1EF (singulet) et les états excités 1MLCT (singulet) et 3MLCT (triplet).

Ce photon doit avoir l'énergie suffisante pour permettre le transfert d'un électron de l'orbitale d de l'atome de ruthénium vers les orbitales π^* des ligands phenanthroline.

Il passe alors de l'état fondamental 1EF vers l'état excité 1MLCT dans lequel il se retrouve délocalisé sur les trois ligands. Ce premier état excité se forme en moins de 100 fs , c'est un état singulet et la symétrie moléculaire reste donc de type D_3 puisque les ligands sont indifférenciables. Mais l'électron va rapidement tendre (par croisement intersystème) vers un deuxième état excité 3MLCT dans lequel il se retrouve localisé sur l'un des trois ligands. Cet état est atteint en moins de 300 fs [48], c'est un état triplet de symétrie C_2 du fait de la levée de dégénérescence entre les transitions des trois ligands.

L'équation suivante résume le principe de ce mécanisme de transfert de charge :



L'état triplet 3MLCT du RuTP a un temps de vie d'environ 500 ns [52]. Sa relaxation vers l'état fondamental singulet 1EF s'accompagne de luminescence.

Notre montage expérimental ayant une résolution insuffisante (supérieure à 300 fs) pour permettre de suivre le processus de transfert d'électron du métal vers le ligand, et ne permettant de détecter les variations des états excités que sur moins de 1,5 ns , nous avons donc choisi de fixer notre retard pompe/sonde à +50 ps . La pompe étant accordée à 400 nm , nous avons alors mesuré les valeurs des absorption et dichroïsme circulaire transitoires $\delta(\alpha l)(\lambda)$ et $\delta\eta(\lambda)$ pour 32 longueurs d'onde situées dans la région $\lambda = [232, 303]$ nm . Ces mesures nous ont permis de déterminer les spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire de l'état triplet 3MLCT dans le proche ultraviolet. Nous verrons par ailleurs, comment à partir de calculs simples basés sur le modèle des oscillateurs couplés (cf. chapitre 2, section 2.7), nous avons pu identifier les transitions électroniques responsables de la forme de ces spectres expérimentaux.

A titre d'exemple, les courbes $\delta(\alpha l)(t)$ et $\delta\eta(t)$ obtenues pour une sonde à 276 nm sont données sur la figure 5.13. Comme nous venons de l'indiquer, aucune dynamique n'est détectée en dehors du passage de l'état fondamental 1EF (retards négatifs) vers l'état excité 3MLCT (retards positifs). Il suffit donc en effet de mesurer les deux valeurs $\delta(\alpha l)(50 ps)$ et $\delta\eta(50 ps)$ pour construire les spectres de l'état excité. L'origine du pic observé au retard 0 sur la courbe de droite a déjà été discutée, il s'agit d'un artefact de mesure.

Des $\delta\eta(50 ps)$ de quelques 10^{-5} à quelques 10^{-4} ont ainsi été mesurées pour chacune des 32 longueurs d'onde. Précisons que de si faibles variations du dichroïsme circulaire sont très difficiles à déterminer expérimentalement et que l'acquisition de l'ensemble du spectre de l'état excité a ainsi nécessité plus de trois mois de travail.

5.2.3 Détermination des modes normaux de l'état fondamental

L'interprétation des spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire transitoires obtenus expérimentalement dans l'ultraviolet, passe dans un premier temps par l'étude de l'état fondamental et plus particulièrement par la détermination des modes normaux (cf. chapitre 2, section 2.7.2). Ces modes proviennent du couplage dipôle/dipôle des trois transitions $\pi - \pi^*$ dégénérées et localisées sur chacun des trois ligands [53]. Ils

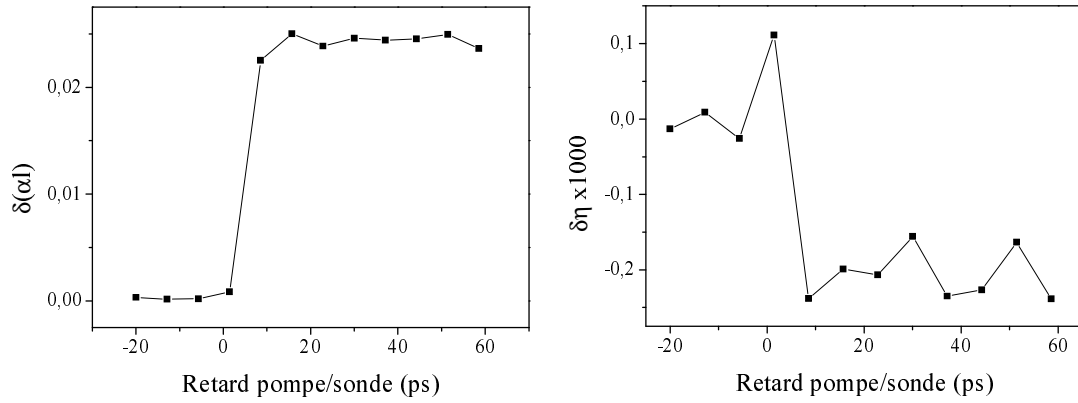


Fig. 5.13: Courbes $\delta(\alpha l)(t)$ et $\delta\eta(t)$ obtenues pour une sonde à 276 nm et une pompe à 400 nm.

correspondent aux trois transitions $\pi - \pi^*(E)$ ($\times 2$) et $\pi - \pi^*(A_2)$ [2], représentées sur la figure 5.14 et sont responsables de la forme particulière du couplage excitonique apparaissant dans le spectre de dichroïsme circulaire.

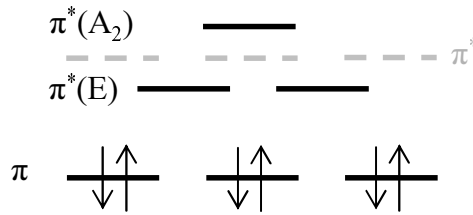


Fig. 5.14: Orbitales frontières des ligands couplés dans l'état fondamental.

Nous avons caractérisé ces trois modes à partir des calculs développés dans le chapitre 2 et formalisés à l'aide du logiciel *Mathematica*. Ainsi, connaissant la géométrie de la molécule, de même que l'énergie, la force d'oscillateur et les directions des moments dipolaires des trois transitions $\pi - \pi^*$; on calcule l'énergie, la force d'oscillateur et la force de rotation des trois modes normaux représentés sur la figure 5.14. Puis, à l'aide des équations 2.41 et 2.42 du chapitre 2, on obtient les spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire de la molécule, que l'on approche des mesures expérimentales en faisant varier le paramètre $\Gamma = \Gamma_{1,2,3}$, correspondant à la largeur de la bande d'absorption de chacun des trois modes (supposées identiques). Notons, qu'il est souvent nécessaire de réajuster les valeurs (prises dans la littérature) de l'énergie et des forces d'oscillateur des transitions pour pouvoir approcher au mieux les spectres expérimentaux, et que ce sont justement ces valeurs affinées dont nous aurons besoin pour analyser les spectres transitoires du paragraphe suivant.

Dans le cas du $\Lambda - RuTP$, les caractéristiques des transitions $\pi - \pi^*$ des trois ligands et des transitions excitoniques $\pi - \pi^*(E)$ et $\pi - \pi^*(A_2)$, sont données dans le tableau 5.2. Elles ont été obtenues en prenant une distance de 3 angströms [54] entre le centre de l'atome et celui de chacun des ligands, et une largeur $\Gamma = 0,28$ eV pour chacune des bandes d'absorption. On remarquera que la somme des forces de rotation des deux modes E est exactement opposée à celle du mode A_2 , on retrouve donc bien la structure caractéristique du couplage excitonique dans le spectre de dichroïsme

Transitions	Energie (eV)	Force d'oscillateur	Force de rotation (DBM)
$\pi - \pi^*$	4,64	0,6	
$\pi - \pi^*(A_2)$	4,72	1,20	-18,4
$\pi - \pi^*(E)$	4,60	0,30	+9,2

Tab. 5.2: Caractéristiques des transitions et modes normaux de l'état fondamental.

circulaire.

Les spectres calculés à l'aide de ces paramètres, sont représentés sur la figure 5.15. Précisons que ce sont les mêmes paramètres qui ont permis d'approcher parallèlement les spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire du RuTP dans l'état fondamental.

5.2.4 Transitions de l'état excité

Suite à l'excitation du *RuTP* par un photon accordé à 400 nm, un électron est transféré du métal vers l'un des trois ligands phenanthroline qui se charge négativement, les deux autres restant inchangés. Le complexe $[Ru(phen^{-1})(phen)_2]^{2+}$ ainsi obtenu, se trouve donc dans l'état excité 3MLCT décrit plus haut. L'objectif de ce paragraphe est de tenter de déterminer la contribution des transitions électroniques responsables de la forme des spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire transitoires mesurés expérimentalement dans l'ultraviolet. Ces derniers sont représentés en bas de la figure 5.15, ils correspondent au cas où 100 % des molécules sondées sont excitées. On observe une forte saturation de l'absorption des ligands autour de 260 nm, entourée par deux bandes positives centrées respectivement sur 240 et 280 nm et correspondant à de l'absorption induite [55]. Le spectre de dichroïsme circulaire transitoire a la même forme que celui obtenu par Zhang et al. [51] dans le $\Delta - RuTB$, il traduit lui-aussi l'effet de la saturation de l'état fondamental à laquelle s'ajoute une bande vers 240 nm.

De la même manière que dans l'état fondamental, nous avons calculé à l'aide de *Mathematica* les modes normaux de l'état électronique 3MLCT . Pour cela, nous nous sommes basés sur les travaux de Hauser et al. [55], qui nous ont amené à considérer le couplage des cinq transitions suivantes :

- les trois transitions $\pi - \pi^*$ des ligands phenanthroline ;
- une transition notée *LMCT* et correspondant au transfert d'un électron du ligand perturbé ($phen^-$) vers le métal (LMCT) ;
- une transition $\pi^* - \pi^*$ subie par l'électron du ligand perturbé.

Les caractéristiques de ces transitions ainsi que celles des cinq modes normaux associés sont données dans le tableau 5.3. On notera que le *mode* 1 correspond à la transition $\pi^* - \pi^*$ du ligand excité $phen^-$, elle est centrée autour de 394 nm et avait déjà été observée par Schoonover et al. [56]. Le *mode* 2 correspond à la transition *LMTC* de transfert de charge du ligand vers le métal [55], le *mode* 5 à la transition $\pi - \pi^*$ du ligand excité et les *mode* 3 et *mode* 4 aux transitions $\pi - \pi^*$ dégénérées des ligands non perturbés. Précisons que la transition $\pi - \pi^*$ du ligand excité est décalée vers les plus basses longueurs d'onde par rapport à celles des autres ligands, suite aux modifications de structure induites par l'arrivée de l'électron [52]. Ajoutons enfin que :

- le moment dipolaire de la transition *LMTC* est orienté le long de l'axe rejoignant

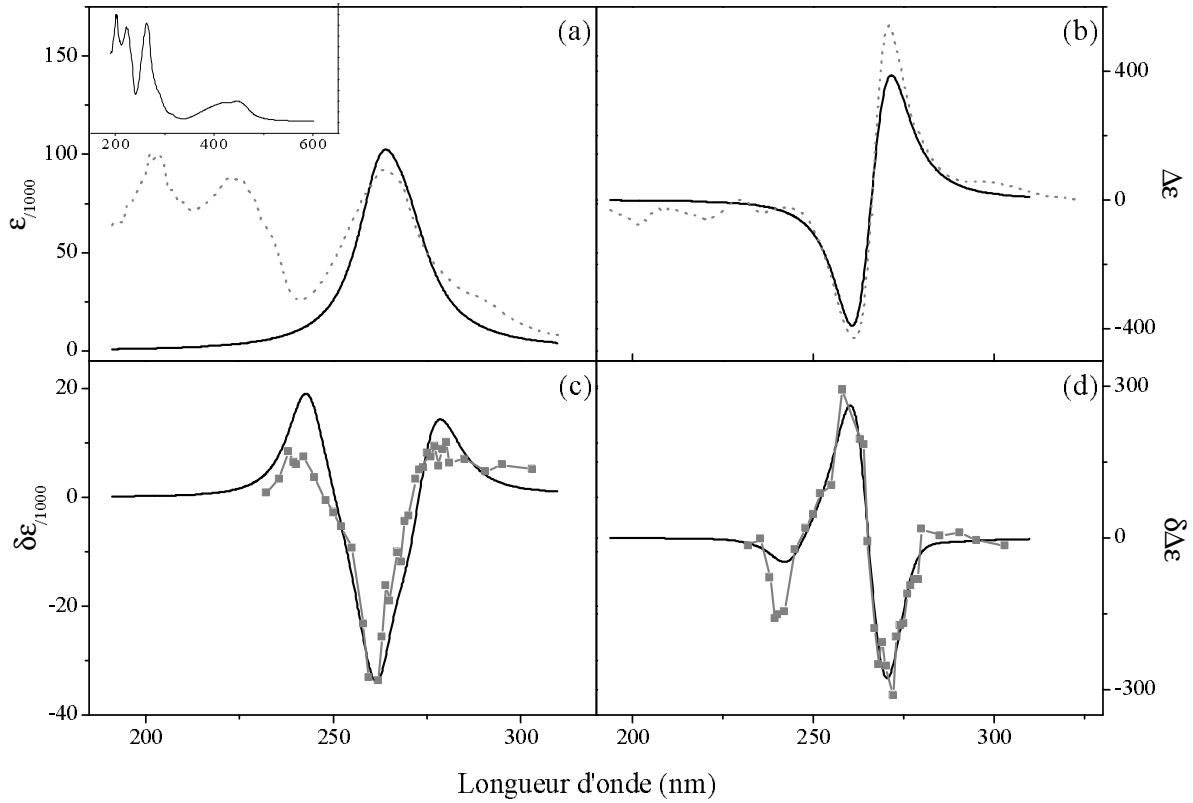


Fig. 5.15: (a) et (b) : Spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire de $\Lambda - RuTP$ autour de 260 nm. Les lignes continues correspondent aux résultats des calculs, les lignes pointillées aux mesures expérimentales. L'encart dans (a) est un rappel du spectre d'absorption représenté sur une plus grande région spectrale.

(c) et (d) : Spectres d'absorption et dichroïsme circulaire transitoires de $\Lambda - RuTP$ autour de 260 nm, pour 100 % de molécules excitées. Les lignes continues correspondent aux résultats des calculs, les carrés gris aux mesures expérimentales. Toutes les valeurs données en ordonnées sont exprimées en $M^{-1}cm^{-1}$.

Transitions	Energie (eV)	Force d'oscillateur	Force de rotation (DBM)
$\pi^* - \pi^* (phen^-)$	3,1	0,3	
$LMTC (phen^-)$	4,5	0,3	
$\pi - \pi^* (phen^-)$	5,1	0,3	
$\pi - \pi^* (phen_2)$	4,64	0,6	
mode 1	3,10	0,28	+0,5
mode 2	4,49	0,48	+3,8
mode 3	4,61	0,12	+5,4
mode 4	4,68	0,86	-8,1
mode 5	5,10	0,36	-1,6

Tab. 5.3: Caractéristiques des transitions et modes normaux de l'état excité 3MLCT .

- le centre du métal à celui du ligand $phen^-$;
- les forces d'oscillateur des transitions $\pi - \pi^*$ des ligands non perturbés sont

- deux fois plus grandes que celle de $phen^-$ car elles font intervenir deux fois plus d'électrons (cf. figure 5.16) ;
- les valeurs des énergies et forces d'oscillateur des transitions $\pi - \pi^*$ des ligands non perturbés sont issues des calculs effectués dans l'état fondamental (paragraphe précédent) ;
 - un unique paramètre $\Gamma = 0,28 \text{ eV}$ est choisi pour la largeur de chaque transition ;
 - comme pour l'état fondamental, les paramètres des transitions données dans le haut du tableau ($\pi^* - \pi^*$, $LMTC$ et $\pi - \pi^*$ des trois ligands) ont été ajustées pour approcher simultanément et le plus rigoureusement possible les deux spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire mesurés expérimentalement (ramenés à 100 % de molécules excitées [57]). Les spectres issus du calcul sont représentés en traits continus noirs sur la figure 5.15 (d).

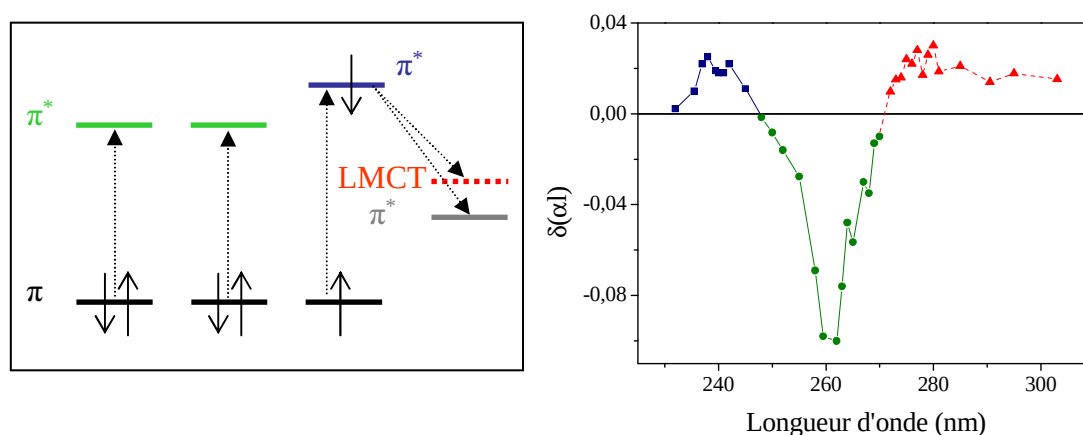


Fig. 5.16: *A gauche* : Transitions électroniques de l'état 3MLCT . *A droite* : Bandes d'absorption (B en bleu) centrée en 240 nm , (V en vert) centrée en 260 nm et (R en rouge) centrée en 280 nm , constituant le spectre d'absorption transitoire de $\Lambda - RuTP$.

Analysons plus précisément comment chacune de ces cinq transitions contribue aux spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire transitoires de la figure 5.15. Pour clarifier la discussion, nous avons représenté à gauche de la figure 5.16 les orbitales frontières intervenant dans ces cinq transitions. On retrouve ainsi, en vert les orbitales π^* des ligands non perturbés, en bleu l'orbitale π^* du ligand perturbé, en rouge celle à partir de laquelle se produit la transition $LMTC$ vers le métal, et en gris l'orbitale π^* vers laquelle tendent les électrons des transitions $\pi^* - \pi^*$.

Dans un premier temps, et en accord avec les résultats de Hauser [55], les calculs présentés plus haut nous permettent de décomposer le spectre d'absorption transitoire en trois bandes (B), (V) et (R). Ces bandes sont représentées à droite sur la figure 5.16. La bande (B) centrée en 240 nm (carrés bleus) est vraisemblablement liée à l'excitation de la transition $\pi - \pi^*$ du ligand perturbé, dont la structure est modifiée par la présence d'électrons. La bande (V) centrée en 260 nm (ronds verts), est associée à une saturation de l'absorption, elle provient de l'excitation des transitions $\pi - \pi^*$ dégénérées des deux ligands non perturbés. Enfin, la bande (R) centrée en 280 nm (triangles rouges), est due à la transition $LMTC$ de transfert d'électron du ligand excité vers le métal.

L'identification des composantes du spectre de dichroïsme circulaire transitoire a également été obtenue grâce aux calculs développés sous *Mathematica*. Elle nous permet

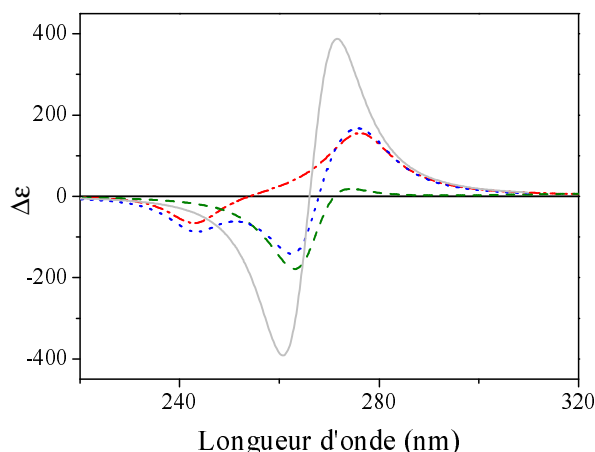


Fig. 5.17: Spectres de dichroïsme circulaire obtenus par calcul et exprimés en $M^{-1}cm^{-1}$. *Trait gris continu* : état fondamental. *Pointillés bleus* : état excité 3MLCT . *Tirets verts* : contributions des ligands non perturbés au spectre de l'état excité. *Tirets pointés rouges* : contribution du ligand $phen^-$ au spectre de l'état excité.

de distinguer trois contributions principales, représentées sur la figure 5.17 où sont aussi tracés les spectres de dichroïsme circulaire de l'état fondamental (trait continu gris) et de l'état 3MLCT (pointillés bleus), obtenu en sommant le spectre de dichroïsme circulaire transitoire avec celui de l'état fondamental, $\eta(^3MLCT) = \eta(fondamental) + \delta\eta$:

- La première est tracée en tirets verts, elle correspond au couplage des transitions dégénérées des ligands non perturbés. Elle a la forme du couplage excitonique obtenu dans l'état fondamental, mais présente un plus faible décalage spectral entre les maximums des deux pics devenus dissymétriques (le couplage de deux ligands au lieu de trois diminue les amplitudes des pics).
- Les deux autres sont issues du couplage des trois transitions non dégénérées du ligand excité. Ce couplage devrait former un spectre présentant trois pics centrés autour des longueurs d'onde associées à chacune des transitions, et d'amplitudes égales aux valeurs des forces d'oscillateur données dans le tableau 5.3. Mais seuls deux de ces pics contribuent au spectre de dichroïsme circulaire vers 260 nm, ils sont visibles sur la courbe en tirets pointés rouges. Le pic négatif correspond à la transition $\pi - \pi^*$ décalée vers les faibles longueurs d'onde, et le pic positif à la transition $LMTC$.

La forme du spectre de l'état excité 3MLCT obtenu vers 260 nm dépend donc du couplage excitonique des transitions des deux ligands non perturbés, ainsi que des transitions $\pi - \pi^*$ et $LMTC$ du troisième ligand. Notons que le fort couplage excitonique observé à l'état fondamental est essentiellement modifié par l'apparition de la transition $\pi - \pi^*$ du ligand $phen^-$.

Cette analyse spectroscopique du $RuTP$, constitue un deuxième exemple d'application de notre nouvelle technique de mesure du dichroïsme circulaire. La simplicité de sa mise en œuvre, ajoutée à la remarquable précision des mesures obtenues, ont grandement facilité la détermination expérimentale du spectre de dichroïsme circulaire de l'état 3MLCT . Ajoutons que cette étude aurait pris beaucoup plus de temps, s'il avait fallu utiliser une cellule de Pockels.

5.3 Variation de structure induite dans le (*R*) – (+) – 1,1' – *Binaphthol*

Le 1,1' – *Binaphthol* (*BINOL*) sert très souvent de matériel de départ dans la synthèse des dérivés du 1,1' – *Binaphthyl*. Liés à certains métaux de transition (ruthénium, rhodium, palladium, irridium...), ces molécules constituent la famille d'auxiliaires chiraux la plus utilisée dans les réactions asymétriques [58]. Ils servent notamment de contrôleurs chiraux pour l'introduction de centres asymétriques supplémentaires lors de la synthèse de composés complexes, que l'on souhaite produire sous la forme d'un des deux énantiomères. Précisons que la première synthèse asymétrique industrielle est très récente [59], elle a été réalisée chez Monsanto en 1975 par W.S. Knowles (prix Nobel 2001) et consistait à préparer le (L)-dopa commercialisé ensuite par la société Hoffmann-La-Roche comme médicament anti-Parkinson ³. Ce processus asymétrique est aujourd'hui fréquemment utilisé dans les laboratoires de recherche lors de l'élaboration de molécules complexes, mais aussi dans l'industrie pharmaceutique pour la préparation rapide des deux énantiomères d'un nouvel échantillon, dont il faut tester les activités biologiques.

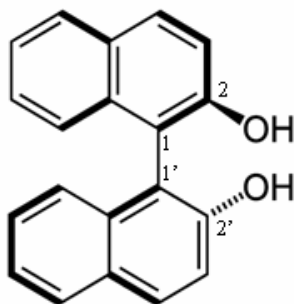


Fig. 5.18: 1,1' – *Bi* – 2 – *naphthol*

Comme le montre la figure 5.18, le *BINOL* est constitué de deux *β* – *naphthols* reliés par une simple liaison $C_1 - C_{1'}$. L'angle φ défini entre les plans contenant ces deux derniers (cf. figure 5.20), confère une structure tridimensionnelle particulière à cette molécule et la rend très sensible à son environnement, ce qui justifie d'ailleurs l'intérêt de son utilisation dans les processus de reconnaissances chirales. Il permet à lui seul de caractériser la structure du *BINOL* et dépend en outre fortement du couplage créé entre les transitions électroniques des deux *naphthols*.

Cette petite molécule peut donc servir de modèle simple pour l'étude des mécanismes de relaxations conformationnelles se produisant dans les systèmes plus complexes. De nombreux travaux se sont d'ailleurs concentrés sur la détermination de cet angle dans différentes conditions (environnement, état électronique). Les résultats présentés dans cette section, s'insèrent dans le cadre de ces études.

³ Dans ce cas, l'auxiliaire chiral était un complexe de rhodium ayant une diphosphine chirale (dipamp) comme ligand chélatant.

5.3.1 Caractérisation des échantillons étudiés

Les deux $\beta - \text{naphthols}$ formant le *BINOL*, sont deux naphthalènes possédant des groupements *OH* aux positions 2 et 2' repérables sur la figure 5.18. Ils sont reliés par une simple liaison $C_1 - C_{1'}$ entre les positions 1 et 1', ce qui explique la dénomination plus complète de $1,1' - \text{Bi} - 2 - \text{naphthol}$.

Cette petite molécule possède une chiralité axiale et ses deux énantiomères $(R) - (+)$ et $(S) - (-)$ sont facilement séparables et très stables. Précisons donc ici, que les expériences présentées dans cette section ont été réalisées sur l'énantiomère $(R) - (+)$, synthétisé par la société Sigma-Aldrich avec une pureté énantiomérique supérieure à 99%. Plusieurs solvants ont été utilisés pour dissoudre cet énantiomère. Nous discuterons dans la suite de leur influence sur la structure de la molécule. Notons que dans tous les cas, la concentration des échantillons liquides était de 0,2 mM.

Les trois principales bandes constituant le spectre d'absorption du *BINOL* dans l'ultraviolet, sont parfaitement identifiées. Elles proviennent du couplage des trois transitions 1B_b , 1L_a , 1L_b d'un premier naphthalène avec celles du second. Pour chaque naphthalène, ces transitions sont centrées respectivement en 220, 286 et 310 nm [60] et leurs moments dipolaires sont orientés comme sur l'encart de la figure 5.19. Dans ces conditions, le couplage se produisant entre les deux $\beta - \text{naphthols}$ du *BINOL* fait donc apparaître les trois bandes représentées sur la figure 5.19.

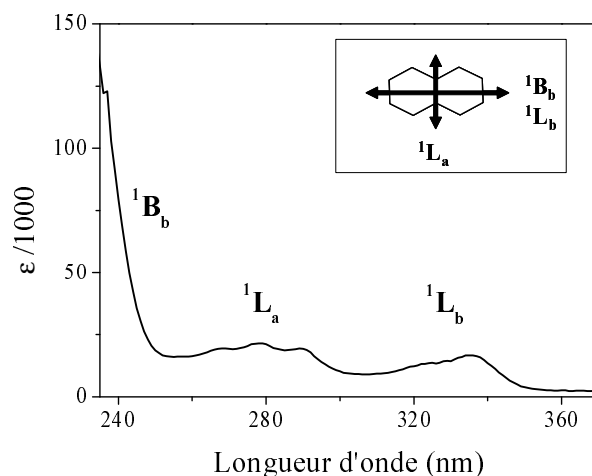


Fig. 5.19: Spectre d'absorption du *BINOL* dans l'ultraviolet (en $M^{-1}cm^{-1}$). Le schéma en haut à droite représente l'orientation des moments dipolaires des trois transitions de chaque naphthalène.

La bande située dans la région des plus faibles longueurs d'onde, provient ainsi du couplage des deux transitions $^1B_b(1)$ et $^1B_b(2)$ situées sur les deux $\beta - \text{naphthols}$, notés (1) et (2) dans la suite. C'est dans cette région que nous accorderons notre faisceau sonde pour toutes les expériences présentées dans cette section. Parmi les différentes configurations du chemin optique de la pompe (cf. chapitre 4), nous avons choisi celle permettant de travailler à 267 nm, longueur d'onde pour laquelle les électrons des orbitales π des transitions $^1B_b(1)$, $^1B_b(2)$, $^1L_a(1)$ et $^1L_a(2)$ sont excités. Dans ces conditions, nous estimons à 10-20 % le taux de molécules excitées, pour une énergie

par impulsion d'environ 300 nJ à 267 nm et en ne dépassant pas la valeur limite $DO = 2,2$ pour les densités optiques du *BINOL* aux longueurs d'onde de sonde nous intéressant ⁴. Une représentation des transitions excitées par la pompe est donnée sur le schéma du centre de la figure 5.20.

Comme nous l'avons déjà précisé en introduction, les plans contenant les deux β - *naphthols* sont séparés par un angle diédral variable, que nous noterons φ dans toute la suite de cette section. Ce dernier peut être repéré sur les schémas de gauche et de droite de la figure 5.20.

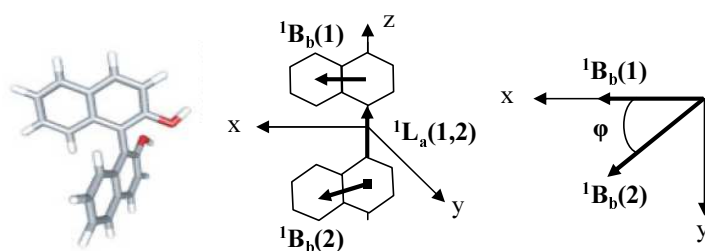


Fig. 5.20: *A gauche* : Schéma du *BINOL* dans l'espace.

Au milieu : Les transitions $^1L_a(1)$, $^1L_a(2)$, $^1B_b(1)$, $^1B_b(2)$ des deux β - *naphthols*.

A droite : Représentation de l'angle diédral φ .

Cette structure tridimensionnelle très particulière (schéma de gauche de la figure 5.20) s'explique par la formation d'un équilibre subtil entre deux types de déstabilisations : d'une part les forces de répulsion créées entre les atomes d'hydrogène, et d'autre part les interactions de type $\pi - \pi$ entre les électrons des orbitales frontières des deux β - *naphthols* [61]. La première déstabilisation pousse les deux anneaux de naphthalène à se positionner dans des plans orthogonaux, tandis que la deuxième tend à les maintenir dans un même plan. Un équilibre se crée donc entre ces deux effets opposés, et impose une valeur donnée à l'angle φ . Cet angle reste cependant très sensible à l'environnement de la molécule et en particulier aux modifications de son état électronique. On s'attend donc à ce que l'excitation des électrons des orbitales π ait pour effet de rapprocher les deux *naphthols* vers un même plan, donc à diminuer la valeur de l'angle φ [61].

L'étude des variations de φ induites par l'excitation des électrons des orbitales π des deux *naphthols*, représente donc un « cas d'école » pour la compréhension des mouvements intramoléculaires liés aux interactions de type $\pi - \pi$. Malheureusement peu de techniques expérimentales permettent de mesurer directement l'évolution de φ au cours du temps. C'est le cas de notre dispositif de mesure du dichroïsme circulaire qui, nous le rappelons, est très sensible au couplage des transitions électroniques des molécules chirales.

5.3.2 L'angle φ dans l'état fondamental

Le spectre de dichroïsme circulaire du *BINOL* présente, vers 220 nm , la forme particulière d'un couplage excitonique, créé entre les transitions $^1B_b(1)$ et $^1B_b(2)$ des deux

⁴ Comme dans le cas du *RuTP*, on ne peut pas augmenter la concentration de l'échantillon pour augmenter son absorption à 267 nm , sans risquer d'obtenir une absorption trop forte du faisceau sonde. Il faut donc augmenter la puissance du faisceau pompe en s'assurant qu'il ne détériore par l'échantillon.

anneaux de naphthalène. Il dépend donc fortement de la position relative des deux anneaux, c'est à dire de l'angle φ . Di Bari et al. [60] ont d'ailleurs mis en évidence un lien direct entre la valeur de cet angle et celle de l'écart spectral séparant les deux extrémums de la structure excitonique.

De la même manière que pour le *RuTP*, nous avons donc utilisé les calculs développés sous *Mathematica* et décrits en détail à la fin du chapitre 2, pour approcher les spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire de l'état fondamental du *BINOL* dans l'ultraviolet. En se basant sur les données géométriques de [60], nous avons donc pu caractériser les trois transitions électroniques 1B_b , 1L_a et 1L_b de chaque $\beta - \text{naphthol}$ et déterminer la valeur de l'angle φ que nous trouvons égale à 104° [62]. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 5.4, on y trouvera également les données concernant les six modes normaux déterminés par le calcul et résultant du couplage des six transitions (trois par *naphthol*). Les spectres expérimentaux et issus du calcul des modes normaux sont, quant à eux, tracés sur la figure 5.21.

Transitions/Modes	Energie (eV)	Force d'oscillateur	Force de rotation (DBM)
1B_b	5,41	1,7	
1L_a	4,54	0,16	
1L_b	3,73	0,11	
mode1	5,47	1,26	-24,03
mode2	5,40	2,06	25,44
mode3	4,60	0,03	-1,34
mode4	4,43	0,35	-0,11
mode5	3,73	0,08	-1,68
mode6	3,72	0,15	1,72

Tab. 5.4: Caractéristiques des transitions de chaque $\beta - \text{naphthol}$ (avec $\Gamma=0,4 \text{ eV}$ pour chaque bande) et des six modes normaux résultant de leur couplage.

Cette valeur de l'angle φ dans l'état fondamental, est en parfait accord avec les mesures effectuées par d'autres groupes [63, 64]. L'association de nos mesures expérimentales et des calculs basés sur le principe des oscillateurs couplés, permet donc *a priori* d'interpréter correctement la géométrie du *BINOL*.

5.3.3 Absorption transitoire

Avant de nous intéresser aux variations photoinduites du spectre de dichroïsme circulaire, voyons quelles informations peut nous apporter le spectre d'absorption transitoire dans l'ultraviolet. Ce dernier est représenté à gauche sur la figure 5.22. Il permet de mettre en évidence deux régions spectrales particulières :

- Celle des longueurs d'onde inférieures à 244 nm , pour laquelle on observe un phénomène de saturation de l'absorption ($\delta(DO) < 0$), ce qui signifie que l'on excite bien les électrons des transitions 1B_b ;
- Celle des longueurs d'onde supérieures à 244 nm , pour laquelle on observe un phénomène d'absorption induite ($\delta(DO) > 0$) des électrons des transitions 1B_b et/ou 1L_a .

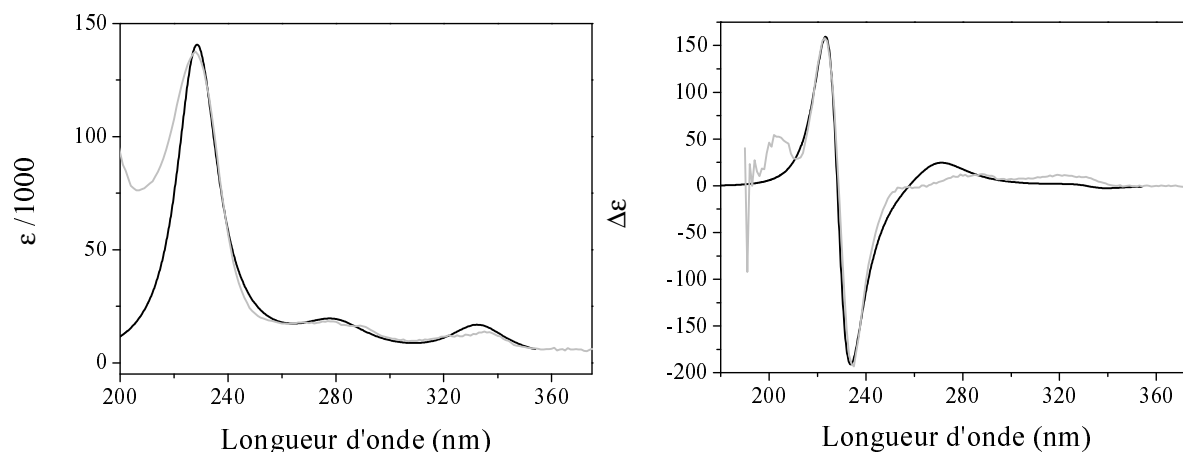


Fig. 5.21: Spectres expérimentaux (en gris) et issus du calcul des modes normaux (en noir). Le spectre d'absorption est à gauche, celui du dichroïsme circulaire à droite. Les deux sont exprimés en $M^{-1}cm^{-1}$

Notons que les valeurs obtenues sur la région $[235, 280]$ nm sont très faibles ($|\delta(DO)| < 5 \times 10^{-3}$), ce qui signifie que l'absorption induite et la saturation de l'absorption se compensent quasiment.

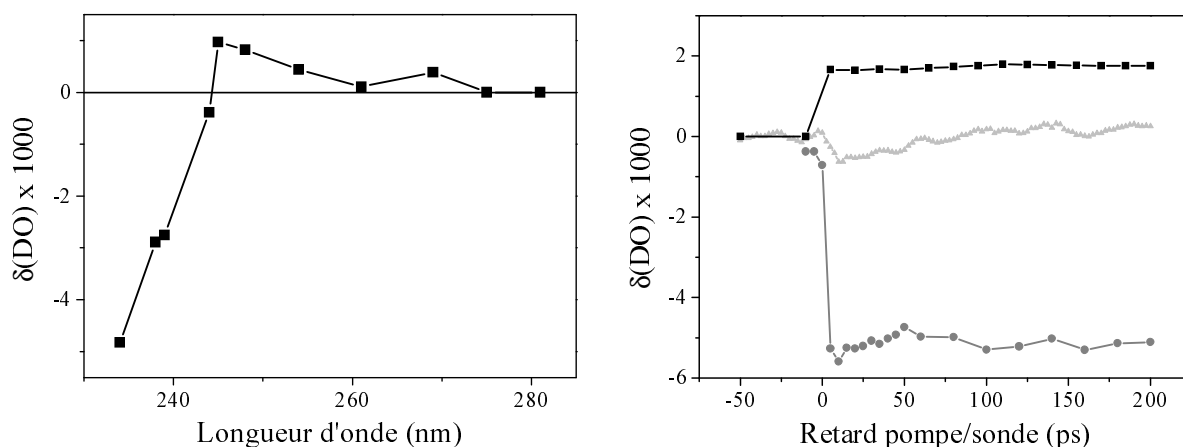


Fig. 5.22: A gauche : Spectre d'absorption transitoire (en DO) mesuré 100 ps après l'excitation du BINOL (solvant : ethanol) par la pompe accordée à 267 nm. A droite : Evolution de l'absorption transitoire en fonction du temps, pour différentes longueurs d'onde de sonde : 237 nm (ronds), 244 nm (triangles) et 245 nm (carrés).

Nous avons également représenté à droite de la figure 5.22, les évolutions temporelles de l'absorption transitoire, pour trois longueurs d'onde significatives. Aucune dynamique n'est observée pour deux de ces longueurs d'onde (237 nm : ronds et 245 nm : carrés), ce qui n'est pas étonnant à notre échelle temporelle puisque les processus de relaxation électronique et de transfert d'électron entre *naphthols* ont lieu lors des toutes premières picosecondes [65, 66] suivant l'excitation.

Une dynamique intéressante, semble singulièrement apparaître à 244 nm. Elle correspond à celle observée lors des mesures du dichroïsme circulaire transitoire à 237 nm, que

nous étudierons en détail dans le paragraphe suivant. Il s'agit vraisemblablement d'un petit décalage de la bande d'absorption se produisant parallèlement aux modifications de structure de la molécule. Précisons qu'elle est exceptionnellement visible à 244 nm, car les effets de saturation d'absorption et d'absorption induite qui la cachaient aux autres longueurs d'onde, se compensent ici parfaitement.

Il semble ainsi qu'aucune information sur la structure du *BINOL* ne puisse être déduite des mesures d'absorption transitoire présentées dans ce paragraphe. Ces dernières nous ont néanmoins permis de détecter la présence de deux régions spectrales particulières, dans lesquelles le dichroïsme circulaire pourrait ne pas évoluer de la même façon.

5.3.4 Variation de l'angle φ

Nous avons donc mesuré les variations temporelles $\delta\eta(t)$ du dichroïsme circulaire (où η s'exprime en terme de coefficient d'absorption) dans la zone de saturation de l'absorption ($\lambda = 237$ nm) puis dans celle de l'absorption induite ($\lambda = 245$ nm). Tous les résultats de ce paragraphe ont été obtenus en utilisant l'éthanol comme solvant du (R) – (+) – *BINOL*. Ils sont représentés sur la figure 5.23.

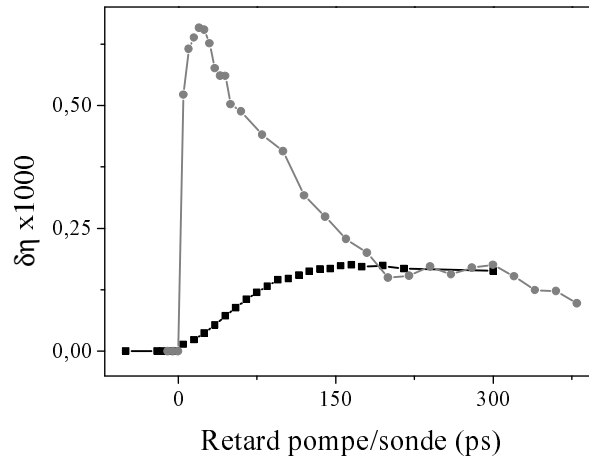


Fig. 5.23: Évolution du dichroïsme circulaire transitoire $\delta\eta(t)$ avec le retard t de la sonde par rapport à la pompe à : 237 nm (ronds gris) et 245 nm (carrés noirs).
Rappel : $\eta = (\alpha_g - \alpha_d)l$.

Analysons dans un premier temps, la courbe obtenue à 237 nm (ronds gris), dans la région où se produit le phénomène de saturation de l'absorption. Suite à l'excitation au retard 0 des transitions des deux *naphthols* par la pompe accordée à 267 nm, on observe une augmentation rapide du signal : $\delta\eta(\text{total}) = +6,6 \times 10^{-4}$. Mais précisons que cette augmentation correspond en fait à une diminution du signal de dichroïsme circulaire à 237 nm, qui est initialement négatif dans l'état fondamental (cf. figure 5.21). Cette diminution est *a priori* en accord avec l'évolution attendue dans une région de saturation de l'absorption. Le dichroïsme circulaire dépendant fortement du couplage entre les transitions électroniques des deux *naphthols*, il devrait cependant être aussi très sensible à ses variations liées à l'apparition de nouveaux états

excités. Ainsi, sachant que le dichroïsme circulaire de l'état fondamental à 237 nm vaut $\eta(237) = -8,2 \times 10^{-3}$ et en estimant le taux de molécules excitées par la pompe à 12%, alors la saturation de l'absorption devrait être responsable d'une variation du dichroïsme circulaire $\delta\eta(satur) = -0,12 \times (-8,2 \times 10^{-3}) = +9,8 \times 10^{-4}$ et la formation de nouveaux états électroniques d'une variation $\delta\eta(elec) = \delta\eta(total) - \delta\eta(satur)$, soit $\delta\eta(elec) = -3,2 \times 10^{-4}$ (ou encore $\delta(\Delta\epsilon(elec)) = -6 M^{-1}cm^{-1}$) pour 12% de molécules excitées. Cette dernière variation étant négative, elle signifie que l'excitation des électrons des orbitales π des deux *naphthols* tend à augmenter le signal de dichroïsme circulaire en valeur absolue. Notons par ailleurs que la saturation de l'absorption reste *a priori* constante quel que soit le retard entre la pompe et la sonde, et que les variations $\delta\eta$ observées à 237 nm sont par conséquent uniquement dues aux variations du dichroïsme circulaire du nouvel état excité.

Pour de plus longs retards, on observe que la courbe grise de la figure 5.23 décroît vers une valeur du dichroïsme circulaire plus proche de celle qu'elle avait dans l'état fondamental. Il s'agit donc ici d'une augmentation du signal de dichroïsme circulaire, qui est toujours négatif. Cette dynamique ne peut pas être due aux variations du couplage entre les transitions électroniques des *naphthols* puisqu'elle n'est pas visible sur la courbe d'absorption transitoire (ronds gris à droite sur la figure 5.22). Elle ne peut pas non plus être liée à un effet d'anisotropie qui serait visible sur les courbes d'absorption transitoire, ou encore à un effet de biréfringence induite puisque nous avons fait très attention lors de l'alignement des faisceaux pompe et sonde dont les directions des polarisations sont parallèles (cf. section 3.3.3). Elle est donc vraisemblablement liée à un changement de conformation de la molécule, donc nécessairement à une variation de l'angle diédral φ .

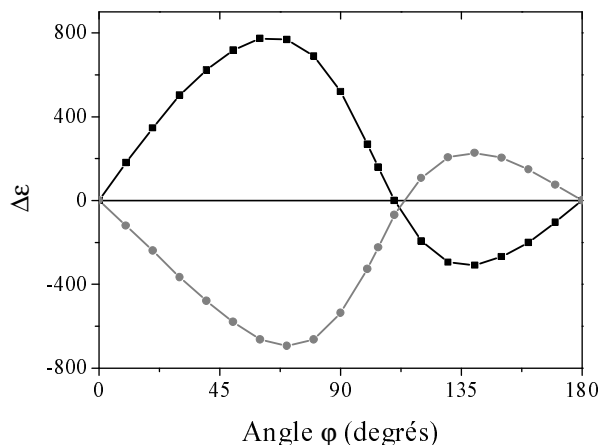


Fig. 5.24: Amplitudes (en $M^{-1}cm^{-1}$) des deux extrêmes du spectre de dichroïsme circulaire du R-(+)-BINOL en fonction de l'angle φ .

Une mesure précise de cette variation n'est malheureusement pas possible car elle nécessite de connaître les caractéristiques des transitions électroniques des états excités rentrant en jeu (longueurs d'onde centrales des bandes d'absorption et directions des moments dipolaires), informations dont nous ne disposons pas. Un ordre de grandeur peut néanmoins être obtenu à partir des courbes représentées sur la figure 5.24. Ces dernières montrent l'influence de l'angle φ sur les amplitudes des deux extrêmes

du spectre de dichroïsme circulaire de la molécule dans l'état fondamental. Elles ont été obtenues à l'aide des calculs développés sous *Mathematica* et à partir des données du tableau 5.4. Notons que quelle que soit la valeur de l'angle diédral, le spectre de dichroïsme circulaire conserve sa structure particulière liée au couplage excitonique, puisque les valeurs des amplitudes des deux extrêmes gardent des signes opposés.

Partons donc de l'angle $\varphi = 104^\circ$ déterminé à partir des spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire de l'état fondamental et intéressons nous, par exemple, à la courbe formée de carrés noirs. Pour cet angle, l'amplitude de l'extrémum associé à cette courbe est égale à $\Delta\epsilon = 160 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. D'après la figure 5.23 et en considérant $\delta\eta(\text{satur})$ constant (sachant que $\delta(\alpha l)$ est constant), le dichroïsme circulaire de l'état excité $\delta\eta(\text{elec})$ à 237 nm est multiplié par 3 en valeur absolue, lors des premières cent picosecondes. En terme de coefficient d'extinction et en supposant que l'excitation des transitions optiques ne modifie pas la géométrie du *BINOL* et que par conséquent la tendance de la courbe reste la même dans l'état excité, $\Delta\epsilon$ doit donc également être multiplié par 3 à 237 nm . Il en va de même pour toutes les longueurs d'onde de la région où se produit la saturation de l'absorption. D'après la figure 5.24, cette variation d'amplitude correspondrait alors à une diminution de 30° de l'angle φ . Ce résultat est en accord avec les mesures obtenues par spectroscopie Raman et diffraction des rayons X [63] montrant que le *BINOL* possède un angle φ égal à 103° dans l'état fondamental (S_0) et à 69° dans l'état excité (S_1).

Les choses sont très différentes dans la région où l'absorption induite prédomine. On observe en effet sur la figure 5.23, que la courbe $\delta\eta(t)$ à 245 nm (carrés noirs) ne subit pas de forte variation suite à l'excitation par la pompe et qu'elle tend vers un palier positif, parallèlement à la courbe obtenue à 237 nm . Cette dynamique ne peut être approchée par une simple fonction exponentielle, elle est donc difficile à interpréter et plusieurs phénomènes doivent rentrer en jeu à cette longueur d'onde. Ainsi, la courbe $\delta\eta(t)$ obtenue ici, résulte probablement de la superposition de deux effets : la variation de l'angle φ mesurée à 237 nm et la relaxation des états excités (dont les effets ont été observés à 244 nm via les mesures d'absorption transitoire).

5.3.5 Étude de l'influence du solvant

Étudions maintenant l'influence du solvant et de sa viscosité sur le phénomène de relaxation conformationnelle observé à 237 nm . Basons nous, pour cela, sur les résultats expérimentaux représentés sur la figure 5.25. Ils correspondent aux courbes $\delta\eta(t)$ mesurées à 237 nm pour trois solvants de viscosités différentes à 25°C [67] :

1. éthanol seul (triangles noirs) de viscosité $v_{\text{ethanol}} = 1,074 \text{ cP}$;
2. mélange éthylène glycol (3 %) - éthanol (97 %) (ronds gris clairs) de viscosité $v_{\text{mélange}} = 1,22 \text{ cP}$ calculée à partir de la loi empirique de Kendall et Monroe [68] :

$$v_{\text{mélange}}^{\frac{1}{3}} = 0,03 \times v_{\text{éthyl glycol}}^{\frac{1}{3}} + 0,97 \times v_{\text{éthanol}}^{\frac{1}{3}}$$

3. éthylène glycol seul (carrés gris foncés) de viscosité $v_{\text{éthyl glycol}} = 16,1 \text{ cP}$.

Ces courbes expérimentales ont été obtenues pour des échantillons de même concentration (ajustements réalisés en vérifiant la superposition de leurs spectres d'absorption sur la région $[235 - 280] \text{ nm}$), on a donc le même pourcentage de molécules excitées dans les trois cas. Notons cependant, que la bande 1B_b du spectre d'absorption du *BINOL* dépend fortement du solvant [60]. On peut notamment observer que cette dernière est centrée en 225 nm dans le cas de l'éthylène glycol seul, et en 220 nm pour les deux autres solvants. En revanche les spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire des trois solvants sont sensiblement identiques entre 235 et 280 nm . La comparaison directe de ces trois courbes est donc possible, d'autant plus que nous nous intéressons essentiellement à leur aspect cinétique.

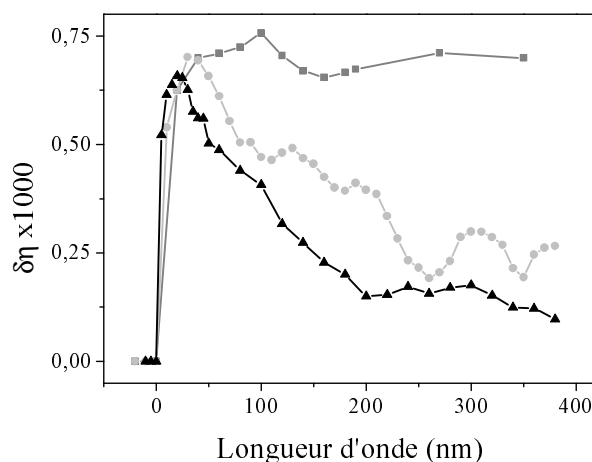


Fig. 5.25: Évolution temporelle du dichroïsme circulaire transitoire du *R* - (+) - *BINOL* à 237 nm . Les trois courbes correspondent à des solvants de viscosités différentes : éthanol seul (triangles noirs), éthylène glycol + éthanol (3 :97) (ronds gris clairs) et éthylène glycol seul (carrés gris foncés).

Sur la figure 5.25, on observe la même tendance dans le mélange éthylène glycol - éthanol que dans l'éthanol seul. Seule la constante de temps de cette relaxation conformationnelle varie. En approchant les courbes expérimentales par des fonctions exponentielles décroissantes, on trouve des constantes de temps qui passent de $100 \pm 10 \text{ ps}$ dans l'éthanol, à $130 \pm 20 \text{ ps}$ dans le mélange plus visqueux. Aucune dynamique n'est en revanche observée dans l'éthylène glycol seul, en tout cas pas sur l'échelle de temps de notre expérience. Il semblerait donc que le mouvement de la molécule engendré par l'excitation des électrons des transitions 1B_b et qui s'accompagne d'un rapprochement des deux plans *naphthols*, dépende fortement de la viscosité du solvant dans lequel elle se trouve.

Notons par ailleurs que puisque les courbes d'absorption transitoire sont au contraire identiquement plates pour les trois solvants, cette dynamique observée sur les courbes $\delta\eta(t)$ est assurément liée à une variation de l'angle φ et non à un phénomène de relaxation électronique. Ce mouvement est d'ailleurs d'autant plus facilité et rapide, que le solvant est peu visqueux, c'est à dire qu'il applique le moins de résistance possible au mouvement des deux *naphthols*. Ce résultat a déjà été observé dans le 1,1' - *Binaphthyl* et peut être modélisé à l'aide des équations de Kramers [69, 70].

Pour finir, remarquons que les constantes de temps obtenues à partir des courbes de la figure 5.25, sont dix fois plus longues que celles calculées/mesurées dans le $1,1' - \text{Binaphthyl}$ et apparaissant dans les deux références précédentes [69, 70]. Cette différence est certainement liée aux groupements OH présents dans le $1,1' - \text{Binaphthol}$ mais absents du $1,1' - \text{Binaphthyl}$, car ces derniers peuvent former des liaisons hydrogène avec les solvants polaires, tels que l'éthanol et l'éthylène glycol, et ainsi risquer de ralentir le mouvement de la molécule.

Les courbes $\delta\eta(t)$ représentées sur la figure 5.26, permettent de vérifier cette affirmation. Elles ont été obtenues à 245 nm dans le $R - (+) - \text{BINOL}$ dissous dans deux solvants de polarités différentes :

1. éthanol seul (carrés noirs) : solvant polaire de viscosité $1,074 \text{ cP}$ à 25°C ;
2. cyclohexane seul (ronds gris) : solvant non polaire de viscosité $0,894 \text{ cP}$ à 25°C .

Un rapport 2 est observé entre les constantes de temps des deux dynamiques tracées sur cette figure. De la même manière qu'à 237 nm , ces constantes de temps dépendent certainement des viscosités des solvants. On observe d'ailleurs une dynamique plus rapide dans le cyclohexane, qui possède une plus faible viscosité. Cependant, l'écart entre les viscosités de l'éthanol et du cyclohexane, ne peut pas être responsable à lui seul de ce rapport 2 observé entre les deux constantes de temps. On montre ainsi que des liaisons hydrogène se forment certainement entre le BINOL et son solvant polaire, et gênent le mouvement des plans *naphthols*.

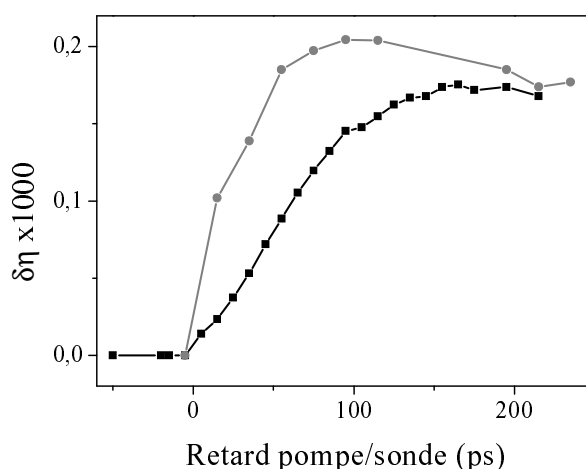


Fig. 5.26: Évolution temporelle du dichroïsme circulaire transitoire du $R - (+) - \text{BINOL}$ à 245 nm . Les deux courbes correspondent à des solvants de polarités différentes : éthanol (carrés noirs) et cyclohexane (ronds gris).

A travers l'étude de cette petite molécule modèle, nous avons donc pu relier le dichroïsme circulaire et ses variations à une réelle modification structurale. Ainsi, l'excitation des électrons des orbitales π des deux *naphthols* constituant le BINOL , par des photons accordés à 267 nm , perturbe de façon importante le couplage des transitions électroniques de ces derniers et entraîne une diminution de 30° de l'angle

φ les séparant. Et c'est parce que le dichroïsme circulaire est très sensible au couplage des transitions électroniques, qu'il permet de détecter directement cette variation de l'angle diédral.

Cette dernière section nous a donc permis de souligner le lien très fort qui existe entre dichroïsme circulaire et structure d'une molécule. Néanmoins, ce lien ne peut être exploité que si l'on dispose d'une technique de mesure du dichroïsme circulaire suffisamment précise et sensible aux faibles variations qui accompagnent les modifications de structure se produisant au sein des molécules.

Les études de la myoglobine, du *RuTP* et du *BINOL* présentées dans ce chapitre, ont justement prouvé que notre technique, basée sur l'utilisation d'un compensateur de Babinet-Soleil, était suffisamment sensible et facile à mettre en œuvre pour que ce lien puisse être exploité sans grande difficulté expérimentale. Forts de cette constatation, nous avons donc décidé de l'appliquer à l'étude du repliement de polypeptides modèles, sujet en pleine évolution depuis quelques années et dont nous allons présenter les premières expériences dans la partie suivante.

Deuxième partie

ÉTUDE DES PREMIÈRES ÉTAPES DU REPLIEMENT DE
POLYPEPTIDES MODÈLES

6. REPLIEMENT DES PROTÉINES : MODÈLES ET EXPÉRIENCES

Les protéines sont des macromolécules complexes, formées d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques. On les trouve dans toutes les cellules vivantes, où elles assurent différentes fonctions, principalement rassemblées dans le tableau suivant :

Fonctions	Exemples
Catalyse	Enzymes
Structure	Collagène, élastine
Transport	Hémoglobine, transferrine
Mobilité cellulaire	Kinésine, myosine
Stockage	Ferritine
Communication	Hormones
Reconnaissance	Anticorps
Régulation	Répresseurs de gènes

Tab. 6.1: Principales fonctions des protéines.

La spécificité fonctionnelle d'une protéine est liée à sa séquence primaire, c'est à dire à l'ordre exact dans lequel se succèdent les quelques centaines ou milliers d'acides aminés qui la constituent. Mais elle ne suffit pas à l'expression de sa fonction biologique. Il est, en effet, indispensable que la chaîne d'acides aminés adopte une structure tridimensionnelle très précisément définie. Cette structure est unique parmi toutes les conformations possibles. Elle est appelée structure « native ». On parle alors de « repliement » de la protéine, d'un état initialement déplié vers l'état natif.

Le processus de repliement permet de rapprocher des acides aminés, parfois éloignés dans la séquence primaire, afin de former des sites spécifiques, tels que les sites catalytiques, sites de reconnaissance, sites d'interaction protéines/molécules chimiques ou protéines/protéines... Il permet également d'organiser la structure tridimensionnelle de la protéine de façon à assurer sa solubilité, ou d'éviter les interactions illégitimes avec d'autres molécules.

La compréhension des mécanismes accompagnant ce phénomène de repliement représente actuellement l'un des principaux enjeux de la recherche en biologie. Dans l'avenir, la caractérisation complète de l'enchaînement des événements qui mènent la protéine vers sa forme repliée, devrait permettre de prédire la structure et la fonction d'une protéine directement à partir de sa séquence primaire, ou encore de mieux comprendre les maladies du repliement telles que les amyloses (Alzheimer) ou maladies à prion (Creutzfeldt-Jakob).

Au cours de ces cinquante dernières années, plusieurs modèles théoriques ou semi-empiriques ont d'ailleurs été proposés. Ils diffèrent notamment par leur description des mécanismes régissant les toutes premières étapes du repliement. Aussi, seule la confrontation de ces modèles à de nouvelles données expérimentales, obtenues grâce aux différentes techniques de détection et d'initiation ultrarapides que nous décrirons dans ce chapitre, devrait permettre de favoriser l'un d'entre eux. Notons par ailleurs, que dans la majorité de ces modèles, la formation de structures secondaires constitue une étape précoce du processus de repliement. De nombreux groupes de recherche se sont donc focalisés sur l'étude de petites hélices alpha ou feuillets bêta isolés ; ces derniers servant de modèles simples pour une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans le cas de protéines bien plus complexes.

C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'appliquer notre nouvelle technique de mesure du dichroïsme circulaire à l'étude des premières étapes du repliement des hélices alpha. Comme le montre la figure 6.1, le dichroïsme circulaire dans l'ultraviolet, est très sensible à cette forme de structure secondaire, qui présente un spectre bien particulier (α) et différentiable des feuillets bêta (β), coudes (T) ou pelotes statistiques (structures stables mais non périodiques et aléatoires) (R).

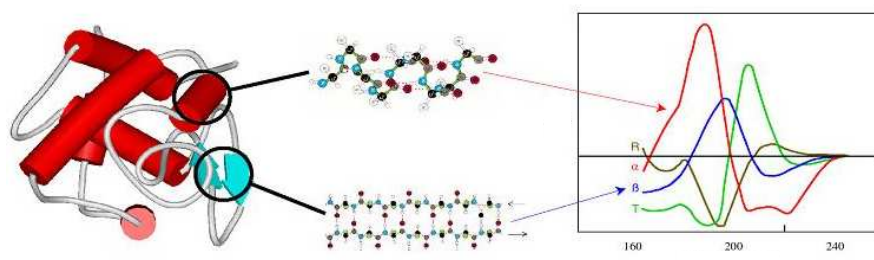


Fig. 6.1: Spectres de dichroïsme circulaire de structures secondaires isolées. *En rouge* : hélices alpha. *En bleu* : feuillets beta. *En vert* : coude. *En marron* : pelote statistique.
© www.srs.dl.ac.uk/VUV/CD/cdintro.html.

Le suivi des variations du dichroïsme circulaire de polypeptides modèles lors de leur repliement en hélices alpha, devrait donc nous permettre de déterminer les constantes de temps caractéristiques de ce processus (propagation, nucléation) ainsi que les champs de force responsables des interactions entre acides aminés d'un même polypeptide ou entre le polypeptide et le solvant. Ces données expérimentales complèteront celles obtenues sur les mêmes échantillons avec d'autres techniques de détection, comme par exemple la spectroscopie infrarouge dans la bande amide I. Mais elles permettront surtout d'aider les bioinformaticiens dans la paramétrisation de leurs modèles de dynamique moléculaire, outils puissants d'examen et de prédiction du repliement de protéines dont on ne connaît que la structure primaire [71].

L'objectif de ce chapitre est de placer nos expériences de dichroïsme circulaire résolues temporellement dans le contexte de l'étude des mécanismes de repliement des protéines. Nous présenterons ainsi les principaux modèles existants, les différentes techniques expérimentales permettant de suivre le repliement, ainsi que les moyens trouvés pour l'initier rapidement et pouvoir suivre ses toutes premières étapes. Ce chapitre nous

servira d'introduction aux toutes premières expériences réalisées au cours de cette thèse et présentées dans la suite de cette partie.

6.1 Les différents modèles de repliement

Les années 1960 marquèrent une étape fondamentale dans l'évolution des idées sur le repliement des protéines, et ce grâce à Afinsen et son postulat : « Toute l'information nécessaire à l'acquisition de la structure native d'une protéine, dans un environnement donné, est contenu dans sa séquence » [72]. Il fut alors admis que l'état natif était l'état thermodynamiquement le plus stable du système protéine/solvant, et que son acquisition consistait donc à rechercher la conformation de plus faible énergie.

Mais la possibilité d'une recherche « au hasard », fut exclue dès 1968 par le paradoxe de Levinthal [73] : en considérant une chaîne de 100 acides aminés et supposant que chacun ne peut adopter que deux conformations, alors on dénombre 2^{100} conformations possibles pour la chaîne entière, mais s'il faut 10^{-11} s pour passer de l'une à l'autre, alors une recherche au hasard de la conformation native nécessite 10^{11} années !

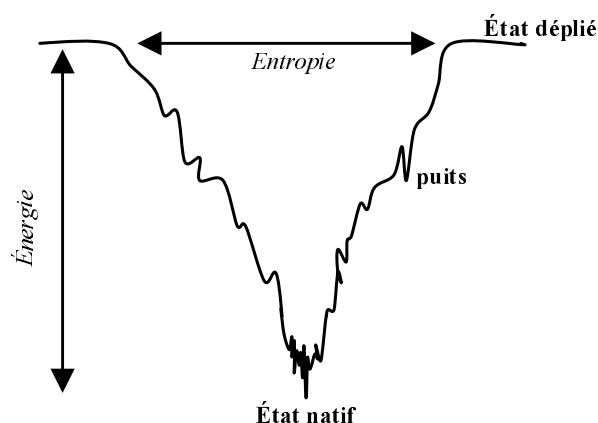


Fig. 6.2: L'entonnoir du repliement. La largeur de l'entonnoir représente l'entropie de la chaîne polypeptidique, et la hauteur son énergie.

La très grande rapidité des processus de repliement observés *in vivo* ou *in vitro* (quelques millisecondes et au plus quelques minutes) et l'impossibilité d'une recherche aléatoire, suggèrent donc l'existence de chemins jalonnés d'intermédiaires partiellement structurés. Le concept de repliement en entonnoir (« Folding funnel » en anglais), introduit en 1995 par Wolynes et al. [74], montre comment ces différents chemins et intermédiaires s'inscrivent dans un paysage énergétique en forme d'entonnoir. Dans cette « nouvelle vision », schématisée sur la figure 6.2 :

- le repliement des protéines consiste en l'organisation progressive de structures partiellement repliées et situées le long d'une multitude de chemins différents ;
- le paysage énergétique présente l'allure d'un entonnoir dont les défauts des parois font apparaître des minima énergétiques locaux (« puits ») susceptibles de piéger les espèces transitoires (d'où un retard dans le repliement ou au pire des cas une agrégation) ;
- le nombre de conformations possibles diminue depuis le sommet jusqu'au bas de l'entonnoir, en même temps que décroît l'entropie de la chaîne polypeptidique ;

- lorsque les parois de l'entonnoir sont lisses, le repliement s'effectue selon l'approximation des deux états (sans intermédiaires) ;

La caractérisation de ces espèces intermédiaires est essentielle à la compréhension des mécanismes de repliement des protéines. De nombreuses stratégies ont donc été déployées pour tenter de les caractériser expérimentalement, malgré leurs très courtes durées de vie.

Différents modèles de repliement ont été proposés à partir de ces observations expérimentales ou de considérations théoriques. La plupart d'entre eux sont rassemblés dans le tableau 6.2.

Modèles	Références	Caractéristiques
Séquentiel	Kim, Baldwin [75]	Hiérarchie : nucléation, formation de structures secondaires, puis superstructures secondaires, puis domaines, puis protéine active.
Modulaire	Chothia [76]	Repliement des sous-domaines qui s'assemblent pour donner la structure native de la protéine.
Diffusion-collision	Karplus, Weaver [77]	Formation de microstructures qui diffusent et s'associent et forment des sous-structures natives.
Charpente (Framework)	Ptitsyn [78]	Voir figure 6.3 (a)
Nucléation-condensation	Fersht [9]	Voir figure 6.3 (b)
Effondrement hydrophobe	Kauzmann, Dill [79]	Voir figure 6.3 (c)
<i>Jigsaw Puzzle</i>	Harrison, Durbin [80]	Assemblage en puzzle avec existence de plusieurs chemins menant vers la structure unique.

Tab. 6.2: Modèles de chemins de repliement.

Les modèles séquentiel, modulaire et de diffusion-collision sont très proches du modèle de la charpente représenté sur la figure 6.3 (a). Ils privilégient le rôle des interactions à courtes distances et font intervenir plusieurs structures intermédiaires. Dans le modèle de la charpente, des segments peptidiques adoptent leur structure secondaire native dans une étape précoce du repliement (cylindres du dessin), ces structures stables s'associent dans un deuxième temps pour former la structure tertiaire finale de la protéine. Notons que dans le modèle de diffusion-collision, ces structures secondaires sont au contraire initialement très instables et le restent jusqu'à ce qu'elles soient mises en contact les unes avec les autres.

Le modèle de nucléation-condensation est très différent car il ne fait pas intervenir

d'intermédiaire. Il est schématisé sur la figure 6.3 (b). Il s'applique aux petites protéines ou sous-domaines de protéines complexes, contenant une seule forme de structure secondaire et se repliant suivant un modèle cinétique à deux états. Il inclut une première étape de nucléation menant à la formation d'un petit noyau de structure native (cylindre du dessin), suivie par une deuxième étape rapide de propagation. L'étape de nucléation est la plus longue car elle nécessite une forte perte d'entropie. Ce modèle prend en compte la coopérativité du repliement et fait intervenir des interactions à longue distance.

Le modèle de l'effondrement hydrophobe, schématisé sur la figure 6.3 (c), s'oppose à celui de la charpente. Il considère en effet, que le premier événement du repliement consiste en la formation d'une espèce compacte, au cœur de laquelle se positionneraient très rapidement les résidus hydrophobes. Les structures secondaires et tertiaires ne se formeraient alors que dans un second temps et à partir de cet agrégat compact.

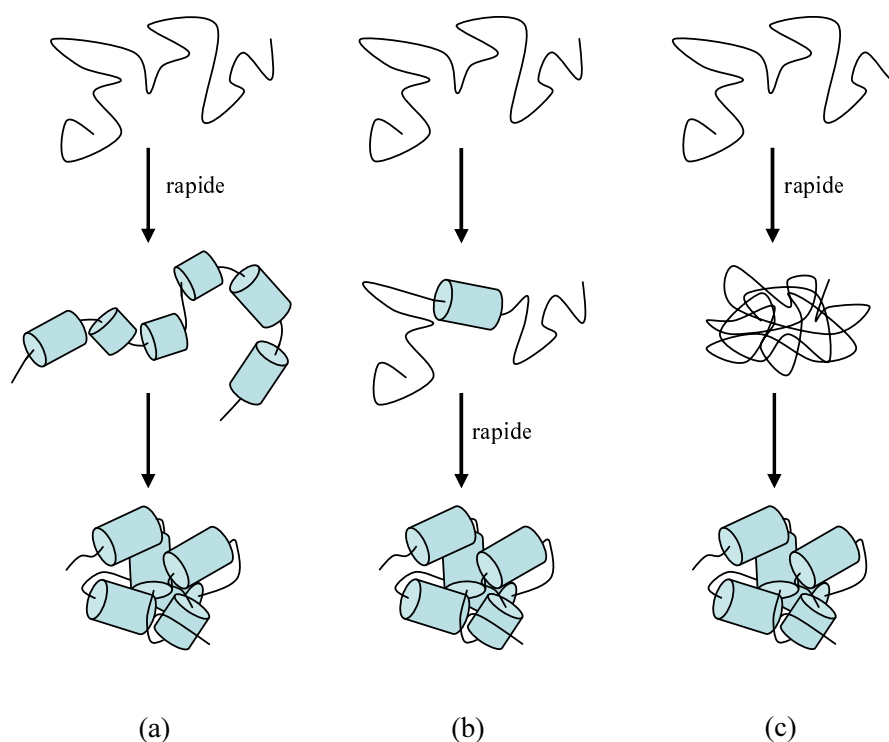


Fig. 6.3: Les trois principaux mécanismes de repliement. (a) modèle de la charpente. (b) modèle de nucléation-condensation. (c) modèle de l'effondrement hydrophobe.

De nombreux résultats expérimentaux ont permis de mettre en évidence la présence de populations hétérogènes sur les chemins du repliement, validant ainsi le modèle du *Jigsaw Puzzle*. Il semblerait de plus, que le repliement passe par la formation d'un équilibre variable de noyaux de structures natives et non natives, susceptibles de subir des réarrangements internes suivant le modèle de diffusion-collision [81]. Les noyaux repliés correctement s'associeraient ensuite pour former des microdomaines, diffusant à leur tour puis s'associant comme dans le modèle de la charpente et le modèle modulaire ou séquentiel.

Il reste néanmoins une incertitude sur les toutes premières étapes du repliement, puisqu'il est difficile de savoir si la formation des structures secondaires se produit

simultanément ou juste après l'effondrement hydrophobe.

Le suivi du processus de repliement de structures secondaires isolées, à l'aide de nouvelles techniques d'initiation ultra-rapides, devrait aider à résoudre ce problème, en rendant possible une confrontation des modèles théoriques, cités dans cette section, avec les mesures expérimentales (constantes de temps caractéristiques et variations avec la séquence primaire).

6.2 Les principales techniques d'observation

Il existe différentes techniques expérimentales permettant de suivre les premières étapes du repliement des protéines. Certaines d'entre elles permettent de sonder les déplacements locaux d'éléments particuliers d'une protéine, d'autres sont plus sensibles aux mouvements globaux de sa structure. Elles ont cependant toutes en commun, la capacité de détecter des phénomènes ultra-rapides, se produisant lors des premières picosecondes ou nanosecondes [82] du processus de repliement. Les principes des techniques les plus fréquemment utilisées sont détaillés dans le tableau 6.3 :

Techniques	Sondes locales/globales	Détails
Absorption	Locale	Le transfert d'un chromophore donné, de l'extérieur vers le cœur de la protéine, déplace sa bande d'absorption.
Fluorescence	Locale et globale	1. Fluorophore (intrinsèque ou extrinsèque) : son spectre d'émission varie avec l'environnement (solvant, cœur). 2. Système donneur/accepteur : la fluorescence informe sur les mouvements relatifs des groupes auxquels ils sont accrochés [83].
Absorption IR	Globale	Bande amide I vers 1650 cm^{-1} sensible aux variations des structures secondaires.
Dichroïsme Circulaire	Globale	Région $[190, 230]\text{ nm}$ sensible aux variations des structures secondaires.
Spectroscopie Raman dans l'UV	Locale et globale	Sensible aux différentes structures secondaires et à la conformation en pelote statistique [84].

Tab. 6.3: Principales techniques de détection.

Ces techniques sont complémentaires et permettent d'apporter différentes informations (locales et globales) sur le repliement d'une même protéine [85]. Leur confrontation est donc très intéressante, car elle mène indéniablement vers une meilleure compréhension des mécanismes étudiés.

Notons par ailleurs que les techniques de RMN et de diffraction des rayons X peuvent également être utilisées pour étudier le repliement de protéines particulières. Mais leur faible résolution temporelle ne permet pas de les appliquer à l'étude des mécanismes les plus rapides.

6.3 Techniques d'initiation du repliement

La phase d'initiation du repliement détermine en quelque sorte la résolution temporelle des mesures expérimentales, car une initiation trop « lente » empêche la détection des événements les plus précoces. Il est donc très important de savoir initier le repliement le plus rapidement possible. Pour cela, différentes techniques peuvent être utilisées. Elles sont résumées dans le tableau 6.4 :

Techniques	Échelles de temps	Détails
Mélange rapide	$> 40 \mu s$	Diminution rapide de la concentration d'un dénaturant (GuHCl, urée) ou variation rapide du pH vers une valeur plus favorable au maintien de la structure native. Grandes quantités de protéines nécessaires.
Méthodes photo-chimiques pour les hémoprotéines	Variable (ps à μs)	Photodissociation d'un ligand ou transfert d'électron initiant le repliement d'hémoprotéines en présence d'un dénaturant [85].
Saut de pH	$> 100 ps$	Libération photoinduite de protons.
Saut de température	ps à ns	Induction optique, directe ou indirecte, d'une augmentation de la température du milieu. Limitée au dépliement (chap. 8).
Inducteurs optiques artificiels	ps	Azobenzène isomérisable [86, 87], pont disulfure [88], chromophore photoexcitable (chap. 7).

Tab. 6.4: Principales techniques d'initiation.

La technique du saut de température permet de déplacer l'équilibre structural d'une protéine vers un état plus désordonné que l'état initial. Il s'agit donc de mesurer une dynamique de dépliement et non de repliement. En théorie, ces deux processus sont reliés car réversibles, mais en pratique certains mécanismes sont plus facilement détectables lors du repliement. Il est donc préférable de compléter les mesures obtenues à l'aide de la technique du saut de température par des mesures directes du repliement.

Ces mesures directes peuvent être obtenues à l'aide des trois types d'inducteurs optiques décrits dans le bas du tableau 6.3. Ils ont l'avantage de pouvoir initier le repliement en quelques picosecondes et s'adaptent particulièrement bien à l'étude des structures secondaires isolées nous intéressant.

Par exemple, la photo-isomérisation d'un azobenzène introduit dans la séquence primaire, permet au polypeptide maintenu déplié (dans la forme *cis* ou *trans* de l'azobenzène) de se replier vers sa forme native. Sa présence ne perturberait que très localement les acides aminés de la séquence peptidique, et ne modifierait donc pas la dynamique de repliement [86].

De façon équivalente, le clivage d'un pont disulfure reliant les deux extrémités d'une chaîne peptidique initialement maintenue dépliée [88], déclenche son repliement et permet ainsi de mesurer les constantes de temps caractéristiques des étapes les plus précoces. Mais la conception de tels ponts doit encore être optimisée pour retarder la recombinaison de leurs extrémités et éviter que ce processus ne rentre en compétition avec le repliement de la chaîne peptidique.

Enfin, la photo-excitation d'un chromophore attaché à l'extrémité d'une hélice partiellement repliée, permet de créer un couplage dipôle/dipôle entre le moment dipolaire du chromophore et le macrodipôle de l'hélice. Ce couplage stabilise cette dernière et initie le processus de « propagation » que nous introduirons dans la prochaine section.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés à la mise en place de ces techniques d'initiation ultra-rapides. Plusieurs expériences préliminaires ont ainsi pu être réalisées dans le cadre de différentes collaborations :

- **L'utilisation d'un chromophore photoexcitable** greffé à l'extrémité N-terminale d'une polyalanine. Nous détaillerons le principe de cette technique d'initiation dans le chapitre 7. Les premières expériences ont pu être réalisées au début de l'année 2008 sur un premier échantillon acheté dans le commerce. D'autres échantillons, conçus pendant cette thèse dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de Chantal Andraud du Laboratoire de Chimie de l'ENS Lyon, devraient enfin être testés au cours de l'été 2008 ;
- **La technique du saut de température** en collaboration avec le groupe de Martin Volk (University of Liverpool, GB), que j'ai rejoint lors d'une visite scientifique de deux mois en été 2007. Nous détaillerons dans le chapitre 8, le principe de cette technique, les travaux réalisés au cours de cette visite et les expériences prévues à court terme au Laboratoire d'Optique et Biosciences ;
- **L'utilisation d'un azobenzène isomérisable optiquement** pour l'étude d'un feuillet bêta modèle (β -hairpin ou « épingle à cheveux »). Des mesures de dichroïsme circulaire résolu temporellement ont été réalisées en octobre 2007 avec Tobias Schrader du groupe de Wolfgang Zinth (Ludwig Maximilians Universität,

Munich, Allemagne) au Laboratoire d'Optique et Biosciences. Ces mesures pourraient permettre de compléter leur étude des processus de repliement/dépliement de ce petit feuillet bêta, processus détectés par spectroscopie infrarouge [87]. Il semblerait malheureusement que notre faisceau sonde accordé dans l'ultraviolet ait détérioré le polypeptide lors de ces expériences. L'analyse des données expérimentales obtenues avant cette détérioration est toujours en cours et ne sera pas abordée dans ce manuscrit. Nous nous concentrerons uniquement sur l'étude du repliement d'hélices alpha modèles initiée par les deux autres techniques.

Afin de mieux comprendre le principe des expériences initiées et mises en place au cours de cette thèse, voyons rapidement de quelle façon le mécanisme de repliement des hélices alpha est actuellement compris et interprété par la communauté scientifique.

6.4 Repliement et dépliement des hélices alpha

La structure des hélices alpha est connue depuis 1951 grâce aux travaux de Pauling, Corey et Branson [89]. Elle est constituée de 3,6 résidus par tour. Elle permet l'établissement d'une liaison hydrogène entre l'oxygène du groupement CO d'un résidu i et l'hydrogène du groupement NH du résidu $i+4$, en allant de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Tous les atomes d'oxygène des groupements CO pointent vers l'extrémité C-terminale et tous les atomes d'hydrogène des groupements NH vers l'extrémité N-terminale. Les liaisons hydrogène formées entre ces groupements, sont presque droites et parallèles à l'axe de l'hélice. Leur accumulation permet de stabiliser fortement l'hélice alpha, en particulier au sein des régions hydrophobes des protéines. L'orientation des groupes peptidiques étant globalement la même le long de toute l'hélice, leurs moments dipolaires s'ajoutent et forment un moment dipolaire macroscopique [90] de $3,5 \times n$ unités Debye (dans le vide), où n est le nombre de résidus. L'extrémité N-terminale est donc chargée positivement et l'extrémité C-terminale négativement. Ces charges peuvent attirer des ligands possédant des charges opposées. L'ensemble pouvant alors être stabilisé par couplage dipôle/dipôle. Notons d'autre part que certains acides aminés tels que l'alanine, favorisent grandement la formation d'hélices alpha [91]. On trouve donc fréquemment l'alanine dans les séquences primaires des polypeptides conçus et synthétisés dans le cadre de l'étude du repliement de cette structure secondaire particulière.

Le mécanisme de repliement des hélices alpha se décompose en deux étapes fondamentales : la **nucléation** et la **propagation**. L'étape de nucléation peut se produire à n'importe quelle position dans la séquence peptidique, elle correspond à la formation du premier tour d'une hélice initialement dépliée. Elle est associée à une forte perte d'entropie, car tous les angles diédraux des liaisons peptidiques situées entre les résidus i et $i+4$ doivent adopter des valeurs précisément définies. L'étape de propagation correspond, quand à elle, à une élongation par stabilisations successives d'acides aminés situés aux extrémités de l'hélice naissante. Elle devrait être plus rapide que la phase de nucléation.

L'étude de la transition hélice $\rightarrow$ pelote statistique accompagnant le dépliement des hélices alpha suite à un saut de température, a donné lieu à de nombreux travaux

expérimentaux et simulations de dynamique moléculaire au cours de ces dix dernières années. Il est désormais admis que cette transition ne peut être réduite au simple cas d'un processus à deux états et s'accompagne plus précisément d'une cinétique de relaxation multi-exponentielle [92]. Cette cinétique contient notamment :

- Une phase rapide associée aux événements locaux de dépliement (rupture de liaisons hydrogène) se produisant aux extrémités de la chaîne peptidique. Elle est caractérisée par une décroissance exponentielle de constante de temps inférieure à 20 *ns* [93] ;
- Une phase plus lente présentant quant à elle une constante de temps typiquement comprise entre 150 et 200 *ns* (fonction de la température, des acides aminés et du solvant). Elle correspond vraisemblablement à la disparition progressive de la structure hélicoïdale et au franchissement de la « barrière » de nucléation.

Cette dernière étape de nucléation est malheureusement difficile à isoler puisqu'elle ne contribue pas significativement au processus de dépliement observé ici. En revanche, sa contribution prédomine lors de la transition pelote statistique $\rightarrow$ hélice. Il est donc intéressant de compléter ces résultats par ceux obtenus grâce aux simulations et autres techniques d'initiation directe du repliement. Mais ces derniers divergent à ce sujet puisque des mesures directes de dichroïsme circulaire suggèrent un temps de nucléation de l'ordre de 50 *ms* [94] là où diverses simulations donnent des valeurs de l'ordre de 100 *ps* à 1 *ns* [95]. Le développement de nouvelles techniques d'initiation telle que celle basée sur l'utilisation de ponts disulfure présente donc un très grand intérêt, puisqu'elles devraient permettre de déterminer expérimentalement la vitesse réelle de cette phase de nucléation. L'enjeu est important car il s'agit de savoir si cette toute première étape du repliement des hélices alpha se produit avant ou après l'effondrement hydrophobe.

Parallèlement, l'étape de propagation devrait se produire sur une échelle de quelques centaines de picosecondes [96]. Mais là aussi de nouvelles mesures sont attendues pour obtenir plus de précisions. Les expériences présentées dans le chapitre suivant s'inscrivent dans ce contexte.

7. STABILISATION D'UNE HÉLICE ALPHA PAR PHOTOEXCITATION D'UN CHROMOPHORE

Si la propagation d'une hélice alpha se produit effectivement sur quelques centaines de picosecondes, notre montage expérimental devrait nous permettre de suivre cette étape du repliement via les mesures de dichroïsme circulaire résolu temporellement. C'est ainsi que nous nous sommes concentrés sur l'étude du repliement d'un polypeptide constitué de 18 alanine (*A*) et 3 arginine (*R*). Sa séquence primaire est la suivante :

$$N - \text{AAAAAAAAARAAAARAAAARAA} - C$$

où *N* et *C* correspondent respectivement aux extrémités N- et C-terminale du polypeptide. Nous le nommerons *PolyA* dans toute la suite. Notons que ce dernier a déjà servi de modèle « type » pour de nombreuses études du repliement des hélices alpha [97, 98]. Il a l'avantage d'être majoritairement composé d'alanine, bien connue pour faciliter la formation de ces structures secondaires particulières, et de trois arginine permettant de le stabiliser en solution. Sa courte séquence peptidique (21 acides aminés donc 5 tours complets d'hélice) simplifie l'interprétation des données expérimentales, mais reste suffisamment longue pour que le signal de dichroïsme circulaire à 222 nm (caractéristique des hélices alpha) ne soit pas trop faible.

A température ambiante et en solution, ce polypeptide présente une proportion d'hélices alpha proche de 50% [46]. En initiant optiquement la propagation de ces hélices, on devrait donc être capable de suivre l'augmentation de cette proportion via les mesures de dichroïsme circulaire vers 220-230 nm.

Nous expliquerons dans ce chapitre les moyens techniques mis en place pour initier optiquement cette propagation. Quelques résultats préliminaires seront également présentés.

7.1 Principe de l'expérience

L'idée de cette expérience est issue des travaux de Huang et al. [46]. Il s'agit d'exciter, à l'aide du faisceau pompe, un chromophore greffé à l'extrémité N-terminale d'un polypeptide partiellement replié en hélice alpha. Dans l'état excité, ce chromophore présente un fort moment dipolaire susceptible de se coupler au macrodipôle de l'hélice et ainsi induire sa propagation. Bien entendu, l'état excité du chromophore doit avoir un temps de vie suffisamment long pour permettre l'observation du repliement sur plusieurs nanosecondes.

Les schémas (a), (b) et (c) de la figure 7.1 illustrent le principe de cette technique d'initiation. Comme le montre la figure (a), la structure de *PolyA* est initialement constituée à 50% d'hélices alpha (cylindre rouge), les acides aminés non im-

pliés dans ces hélices (rectangles noirs) se trouvant quant à eux dans une conformation de pelote statistique. Chaque hélice, partiellement repliée, présente un macrodipôle électrique (grosse flèche rose sur (b) et (c)), résultant du couplage des monodipôles (petites flèches rouges) de tous les acides aminés la constituant. Initialement, ces macrodipôles sont neutralisés par d'autres dipôles environnants, via par exemple des interactions électrostatiques avec le solvant [99]. Les structures des polypeptides sont ainsi stabilisées dans un équilibre électrostatique.

Au repos, le chromophore placé en N-terminale possède un dipôle électrique parallèle à l'axe de l'hélice et orienté vers son extrémité N-terminale (flèche verte sur (b) et (c)). L'équilibre électrostatique initial va être perturbé par l'excitation de ce chromophore, dont l'interaction avec l'hélice devrait devenir plus forte. Le nouveau macrodipôle résultant de cette interaction va alors interagir avec le monodipôle de l'acide aminé situé en position C-terminale (ou N-terminale) pour favoriser son orientation dans une conformation en hélice alpha plutôt qu'en feuillet bêta :

- après excitation, l'interaction du monodipôle de l'acide aminé en C-terminale (flèche noire) avec le macrodipôle de l'ensemble {hélice+chromophore} augmente ;
- cette nouvelle interaction dipôle/macrodipôle favorise la configuration en hélice alpha (b) qui est plus stable que celle en feuillet bêta (c) [90].

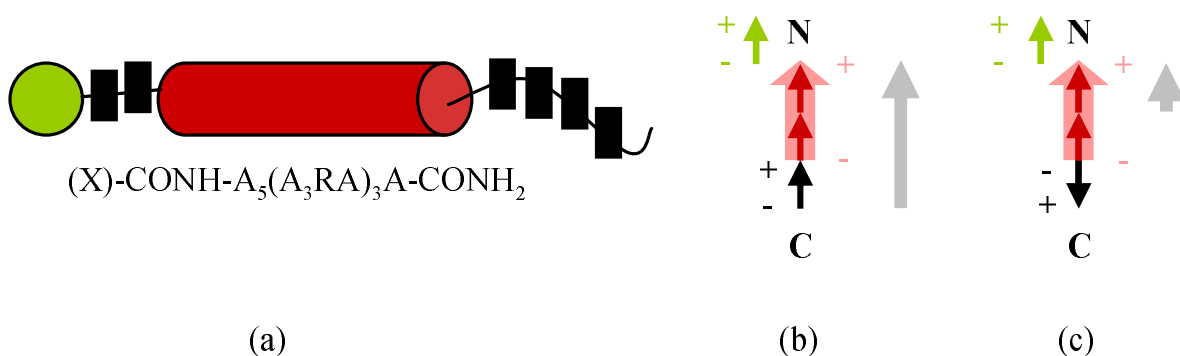


Fig. 7.1: (a) Schéma de l'ensemble : chromophore X (rond vert à l'extrémité N-terminale) + PolyA (la partie de la séquence repliée en hélice est représentée par un cylindre rouge et les acides aminés du reste de la séquence par des rectangles noirs).

(b) et (c) Les petites flèches rouges correspondent aux moments dipolaires de chaque acide aminé formant l'hélice. La flèche verte est le moment dipolaire du chromophore excité optiquement. La grosse flèche rose correspond au macrodipôle résultant du couplage de tous les dipôles et la petite flèche noire au moment dipolaire de l'acide aminé en position C-terminale de l'hélice alpha en train de se propager.

La flèche grise correspond au moment dipolaire total du peptide (hélice + résidu supplémentaire) : l'interaction monodipôle/macrodipôle est plus forte dans la configuration hélice alpha (b) pour laquelle le monodipôle de l'acide aminé en C-terminale est parallèle au macrodipôle de l'hélice, elle est moins forte dans le cas antiparallèle correspondant au feuillet bêta (c).

On assiste ainsi à la propagation de l'hélice qui se poursuit de proche en proche jusqu'à ce qu'un résidu de la séquence casse ce couplage macrodipôle/monodipôle favorable au repliement. Il peut s'agir d'un résidu chargé, de liaisons hydrogène avec le solvant...

Si le principe de cette technique d'initiation semble assez simple au premier abord, sa mise en place expérimentale s'accompagne néanmoins de nombreuses difficultés :

1. ce chromophore doit posséder un pic d'absorption vers 400, 267 ou 320 *nm*, en accord avec notre montage expérimental ;
2. il ne doit pas absorber à 222 *nm* (ou du moins suffisamment peu), pour ne pas perturber les mesures du dichroïsme circulaire des hélices alpha ;
3. la variation du moment dipolaire du chromophore, entre l'état fondamental et l'état excité, doit être suffisamment forte pour permettre la stabilisation de l'hélice ;
4. le moment dipolaire induit doit être orienté dans le bon sens, c'est à dire celui du macrodipôle de l'hélice (schéma (b) et (c) figure 7.1).

Ces deux derniers points appellent d'ailleurs de nombreuses questions, auxquelles il conviendra de répondre rapidement pour pouvoir interpréter convenablement les données expérimentales à venir :

- Comment modéliser cette interaction dipôle/dipôle favorable à l'élongation de l'hélice en terme de variation d'enthalpie des différentes alanine de la séquence peptidique [100, 97] ?
- Sachant que le bout d'hélice initialement repliée se trouve très probablement au centre de la séquence peptidique [101], de quelle valeur doit augmenter l'amplitude du moment dipolaire photoinduit pour interagir efficacement avec celui de l'hélice et que celle-ci s'allonge ? Une telle interaction à « longue » distance est-elle possible ? Le principe de cette technique ne peut-il fonctionner que dans le cas où l'hélice se trouve juxtaposée au chromophore, c'est à dire initialement située à l'extrémité N-terminale de la séquence peptidique ?
- Si le dipôle photoinduit du chromophore et celui de l'hélice sont orientés dans des sens contraires, que se passe-t-il ? La déstabilisation provoquée par cette situation induit-elle un dépliement de l'hélice ?

De nombreuses séries d'expériences seront nécessaires pour répondre à ces questions. Il s'agira alors d'utiliser différents chromophores et d'étudier leur influence sur les signaux de dichroïsme circulaire, en fonction de leurs positions dans la chaîne peptidique, de l'orientation et l'amplitude de leurs moments dipolaires photoinduits, des acides aminés de la séquence primaire du polypeptide [102], ou encore du pH et de la température du solvant. On pourra également comparer les dynamiques obtenues pour des chromophores greffés aux extrémités N- et C-terminale de la séquence peptidique, afin de voir si cette technique d'initiation permet de retrouver le résultat de Angela Pozo Ramajo et al. [103], à savoir que l'hélice alpha se replie plus rapidement à son extrémité C-terminale.

Dans la suite de ce chapitre nous présenterons les tous premiers résultats obtenus à l'aide de cette technique d'initiation. Malheureusement, et comme nous venons de le préciser, aucune interprétation ne pourra être donnée dans ce manuscrit. Il faudra pour cela, attendre de nouvelles séries de mesures qui devraient être réalisées très prochainement.

7.2 Choix des chromophores

Différents chromophores ont été envisagés pour réaliser ces expériences. Leurs spectres d'absorption sont donnés sur la figure 7.2. Il s'agit de l'acide sulfonique *Dapoxyl*TM, du *RuTB* utilisé par Huang et al. [46], et de deux 7 – *nitrofluorene* (*FD-Λ* et *JCM-C*) synthétisés par Yann Bretonnière et Florence Darbour du Laboratoire de Chimie de l'ENS Lyon.

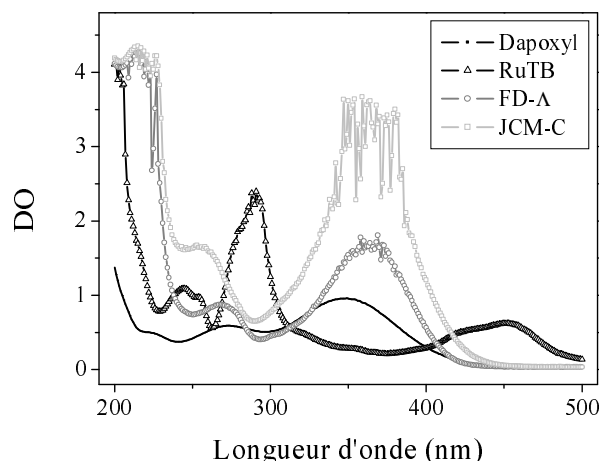


Fig. 7.2: Spectres d'absorption des différents chromophores choisis pour réaliser les expériences. Le *Dapoxyl*TM est dissout dans H_2O , *RuTB* dans l'éthanol et les deux 7 – *nitrofluorene* (*FD-Λ* et *JCM-C*) dans le chloroforme qui absorbe fortement vers 220 nm. L'allure du pic d'absorption de *JCM-C* centré sur 370 nm est liée à la mauvaise détection du spectrophotomètre pour un échantillon aussi concentré que celui utilisé lors de nos expériences.

7.2.1 *Dapoxyl*TM

Le *Dapoxyl*TM est une molécule à transfert de charge (« push-pull »). C'est à dire qu'elle est constituée d'un donneur et d'un accepteur d'électrons, entre lesquels se produit un transfert de charge intramoléculaire suivant un chemin donné, appelé chemin de conjugaison. Elle possède un moment dipolaire fondamental pouvant être perturbé suite à une excitation optique, créant ainsi une polarisation induite.

La structure chimique du *Dapoxyl*TM est donnée sur la figure 7.3. Son nom précis est 5 – (*N,N* – diméthylaminophenyl) – 2 – (*sulfo*phenyl)oxazole et sa masse molaire est égale à $M_{DAP} = 366,4 \text{ g/mol}$. Notons que le transfert de charge se produit du groupement *N,N* – diméthylaminophenyl vers le *sulfo*phenyl [104]. Son moment dipolaire est donc orienté de la droite vers la gauche, sur la figure ci-dessous.

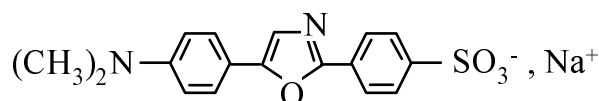


Fig. 7.3: Structure chimique du *Dapoxyl*TM.

Ce chromophore a été greffé à l'extrémité N-terminale de *PolyA* par la société *GENEPEP* (Montpellier). Nous avons par ailleurs étudié le *Dapoxyl*TM seul (*MolecularProbes*) pour mesurer le temps de vie de son état excité et détecter un éventuel signal de dichroïsme circulaire pouvant perturber celui de l'ensemble $\{PolyA + Dapoxyl^{TM}\}$.

Les spectres d'absorption de *PolyA* seul (gris), *Dapoxyl*TM seul (gris clair) et $\{PolyA + Dapoxyl^{TM}\}$ (noir) sont donnés sur la figure 7.4. Dans les trois cas, le solvant est l'eau. Le *Dapoxyl*TM possède un pic d'absorption à 350 nm, qui se trouve décalé vers 320 nm lorsqu'il est accroché à *PolyA*. Il peut donc être excité par notre faisceau pompe accordé à 320 nm. Notons par ailleurs, qu'il ne perturbe pas le spectre d'absorption du polypeptide dans la région de l'ultraviolet vers 220 nm.

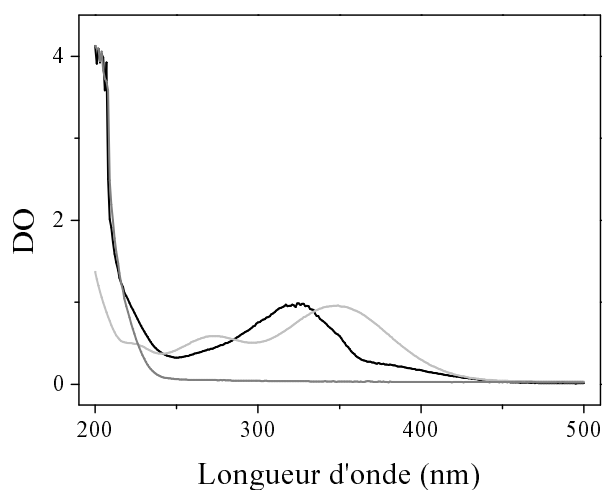


Fig. 7.4: Spectres d'absorption de *PolyA* (gris) seul, *Dapoxyl*TM (gris clair) seul et *PolyA + Dapoxyl*TM (noir). Dans les trois cas, le solvant est H_2O .

A titre indicatif, la concentration de ces échantillons obtenus après dissolution dans l'eau est égale à 600 μM .

7.2.2 *RuTB*

Le *RuTB*, ou plus précisément le $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ avec *bpy*=2,2'-bipyridine, est un analogue du *RuTP* étudié dans la section 5.2. Après excitation par un faisceau lumineux accordé dans le visible, les électrons localisés sur l'atome de ruthénium subissent un transfert de charge vers les ligands bipyridine. L'état excité *MLCT*, ainsi créé, a un temps de vie de 1 à 2 μs , qui devrait être suffisamment long pour nous permettre de suivre l'élongation des hélices alpha. Le passage de l'état fondamental à cet état excité, s'accompagne par ailleurs d'une forte variation du moment dipolaire de la molécule (5 à 9 *Debye* [46]).

Son spectre d'absorption (triangles blancs sur la figure 7.2), comporte un large pic centré sur 450 nm et correspondant à la transition de transfert de charge du ruthénium vers les ligands. Nous accorderons donc notre faisceau pompe à 400 nm pour atteindre l'état excité *MLCT*.

Précisons par ailleurs que des vérifications ont été effectuées dans un mélange de

{*PolyA*+*RuTB* racémique non fixé} pour s'assurer avant toute chose que la présence des bandes d'absorption du *RuTB* dans l'ultraviolet ne perturbent pas celles du polypeptide autour de 220 nm. Pour cela nous avons donc mesuré les valeurs du dichroïsme circulaire statique du mélange pour différents rapports N_{PA}/N_{RuTB} , où N_{PA} et N_{RuTB} sont respectivement le nombre de polypeptides *PolyA* et de molécules de *RuTB* présentes dans le mélange. Aucune variation significative du dichroïsme circulaire de *PolyA* n'avait alors été observée. Le *RuTB* semble donc être un excellent candidat pour initier et suivre l'élongation des hélices alpha. Sa forme racémique devrait être très prochainement insérée dans la séquence peptidique de *PolyA* par Gille Lemercier (ENS Lyon).

7.2.3 7 – nitrofluorene

Parallèlement, deux autres types de chromophores ont été synthétisés par Yann Bretonnière et Florence Darbour (ENS Lyon). Il s'agit des acides aminés artificiels suivants : le 2-amino-7-nitro-fluorene (*FD-Λ*) et son analogue avec l'atome de Soufre d'une (L)-cystéine en position 2 (*JCM-C*). Ils sont incorporés à l'extrémité N-terminale de la séquence de *PolyA* sur la figure 7.5.

Il s'agit de molécules organiques de type « push-pull », pour lesquelles le transfert de charge se fait le long des anneaux de benzène jusqu'au dioxyde d'azote NO_2 . Lorsqu'elles sont intégrées à l'extrémité N-terminale du polypeptide, le moment dipolaire photoinduit est donc orienté dans le sens opposé à celui du macrodipôle de l'hélice en formation.

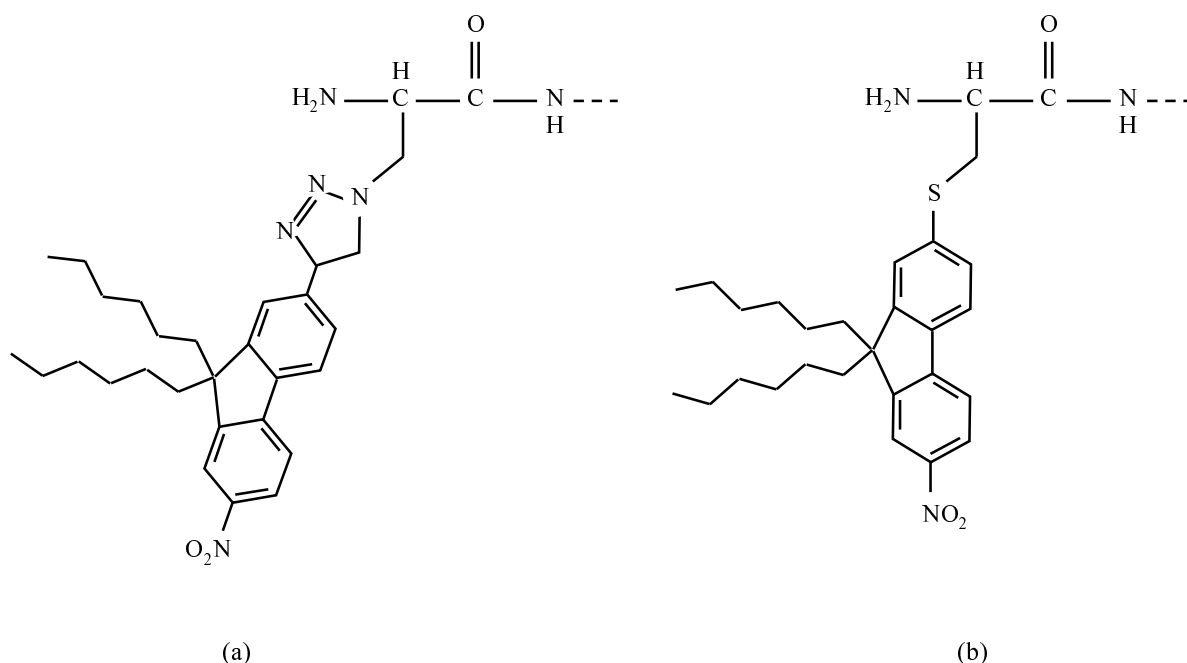


Fig. 7.5: Structures chimiques des acides aminés : *FD-Λ* (a) et *JCM-C* (b).

Dans un premier temps, nous avons étudié ces deux acides aminés seuls, leur fonction amine étant alors protégée par un groupe *Boc* (tertioButyloCarbonyle) et le carboxyle par un ester méthylique. Leurs spectres d'absorption obtenus dans le chloroforme (absorbant fortement vers 220 nm) sont donnés sur la figure 7.2 : le large pic centré vers

360 nm permet d'utiliser une pompe accordée à 400 nm pour atteindre l'état excité. L'étude de ces acides aminés protégés, nous a permis de constater leur stabilité face à l'éclairement de nos faisceaux lumineux ultraviolet pompe et sonde (pouvant être responsable d'une oxydation des donneurs de charge). Des mesures d'absorption transitoire à 260 nm ont également été effectuées afin de déterminer le temps de vie des états excités. Les résultats obtenus, pour une énergie des impulsions pompe égale à 300 nJ, sont donnés sur la figure 7.6. On observe que le processus de transfert de charge du donneur vers l'accepteur se produit en moins de 300 ps, puis que les deux molécules restent excitées pendant plus de 1,5 ns. *FD* – Λ et *JCM* – *C* semblent donc être d'excellents candidats pour initier et suivre le processus d'élongation des hélices alpha.

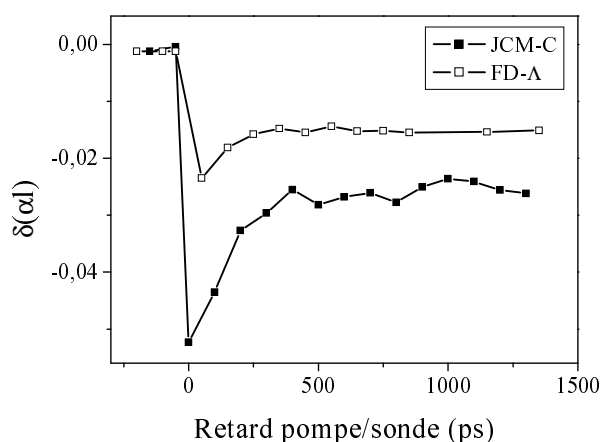


Fig. 7.6: Absorptions transitoires de *FD* – Λ et *JCM* – *C* suite à l'excitation par une pompe accordée à 400 nm.

Une fois ces tests préliminaires réalisés, la déprotection du carboxylate de chacun de ces deux acides aminés a été engagée. Ces derniers ont ensuite été incorporés à l'extrémité N-terminale de la séquence peptidique de *PolyA* par Damien Ficheux de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP) de l'Université Claude Bernard (Lyon). Les peptides ainsi obtenus seront étudiés très prochainement (été 2008). A plus long terme, il s'agira d'incorporer les chromophores à l'extrémité C-terminale pour pouvoir induire un moment dipolaire orienté dans le même sens que celui des hélices alpha et ainsi initier leur prolongation d'après le principe du schéma de la figure 7.1.

7.3 Premiers résultats avec le *Dapoxyl*TM

A ce jour, seules les expériences impliquant le *Dapoxyl*TM ont pu être réalisées. Nous disposons de peu d'informations en ce qui concerne la synthèse des échantillons $\{PolyA + Dapoxyl^{TM}\}$ et en particulier sur la façon dont est inséré ce chromophore dans la séquence. Étant donnée sa structure chimique (figure 7.3), on peut toutefois raisonnablement penser que c'est par l'intermédiaire de son groupement $(CH_3)_2N$, qu'il est inséré dans la séquence peptidique. Dans ce cas, le moment dipolaire photoinduit est orienté de l'extrémité N- vers C-terminale, ce qui devrait déstabiliser les hélices alpha.

Les spectres de dichroïsme circulaire de *PolyA* seul ainsi que de l'ensemble $\{PolyA+Dapoxyl^{TM}\}$ sont donnés sur la figure 7.7 pour $T=30^\circ\text{C}$. Le pic à 222 nm provient du couplage des transitions $n\pi^*$ des liaisons peptidiques, on le retrouve systématiquement en présence d'hélices alpha. Le pic à 208 nm traduit quant à lui la présence simultanée de pelotes statistiques (pic d'absorption à 200 nm) et d'hélices alpha (pics d'absorption à 222 et 208 nm). L'insertion du *Dapoxyl*TM semble ainsi augmenter la proportion d'hélices alpha de *PolyA* ($\times 2,5$) et diminuer la proportion de pelotes statistiques. Dans l'état fondamental, la charge de ce chromophore (cf. figure 7.3) permettrait donc de stabiliser les hélices alpha, en accord avec les observations de Lockhart et Kim [105].

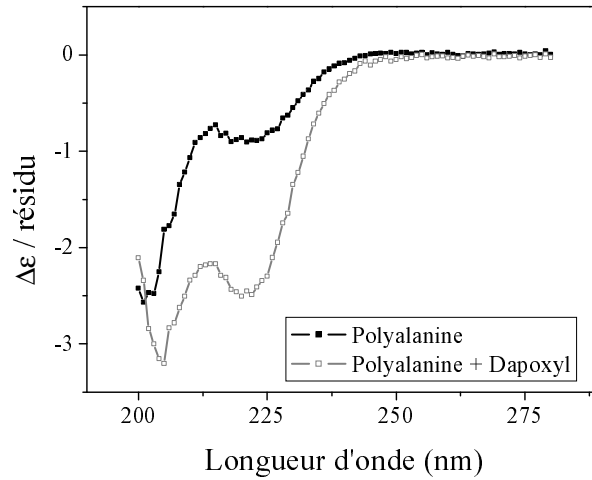


Fig. 7.7: Spectres de dichroïsme circulaire de *PolyA* et $\{PolyA+Dapoxyl^{TM}\}$ en $M^{-1}.cm^{-1}.residu^{-1}$ pour $T=30^\circ\text{C}$.

Les courbes de la figure 7.8 correspondent aux courbes d'absorption et dichroïsme circulaire transitoires obtenues dans les échantillons suivants : *Dapoxyl*TM seul (traits gris et ronds blancs) et $\{PolyA+Dapoxyl^{TM}\}$ (traits noirs et carrés noirs). La pompe était alors accordée à 320 nm et la sonde à 230 nm .

Sans pouvoir donner d'interprétation définitive à ces évolutions temporelles, plusieurs remarques peuvent néanmoins être faites :

- Dans le *Dapoxyl*TM seul, l'excitation par la pompe permet d'atteindre en moins d'une picoseconde un premier état excité qui se relaxe ensuite vers un deuxième état très proche de l'état fondamental ($\delta(\alpha l)$ de quelques 10^{-4}) : en approchant la courbe d'absorption transitoire (courbe grise à gauche sur la figure 7.8) par une fonction exponentielle, on trouve un temps de relaxation d'environ 350 ps entre ces deux états.
- Dans $\{PolyA+Dapoxyl^{TM}\}$, cette relaxation est plus rapide, elle est de l'ordre de 250 ps . Le second état excité présente, de plus, un signal d'absorption transitoire, à 230 nm , dix fois plus fort que dans le cas du *Dapoxyl*TM seul, on peut donc penser qu'il provient essentiellement du squelette peptidique.
- Étonnamment, le *Dapoxyl*TM seul, qui n'est *a priori* pas chiral, présente un signal de dichroïsme circulaire transitoire à 230 nm : la courbe $\delta\eta(t)$ obtenue expérimentalement (grise à droite sur la figure 7.8) peut être approchée par une

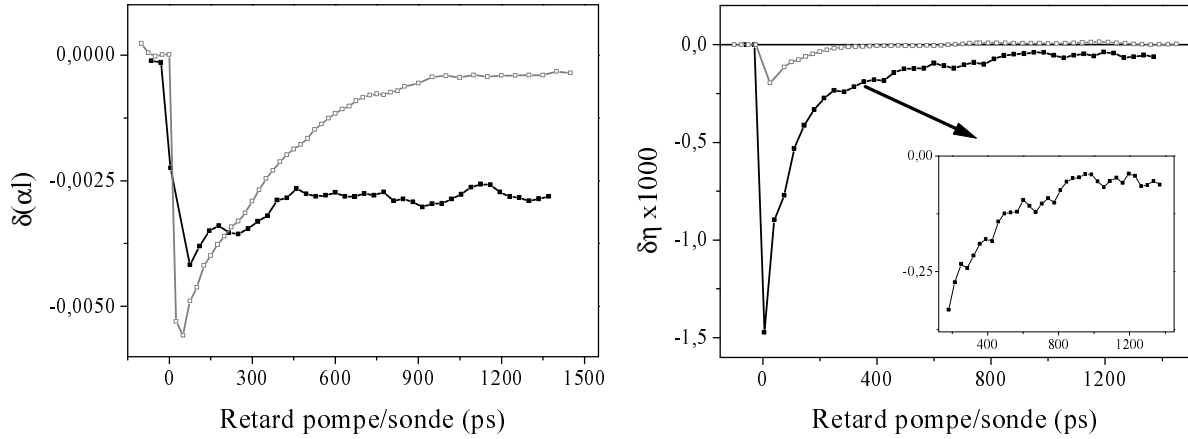


Fig. 7.8: Courbes d'absorption ($\delta(\alpha)$ à gauche) et dichroïsme circulaire ($\delta\eta$ à droite) transitoires obtenues dans *Dapoxyl*TM seul (traits gris et ronds blancs) et $\{PolyA+Dapoxyl^{TM}\}$ (traits noirs et carrés noirs).

exponentielle décroissante tendant vers zéro et de constante de temps égale à 120 ps. Étant donné la structure de cette molécule, il pourrait s'agir en fait d'un signal de biréfringence induite, la pompe et la sonde n'étant pas parfaitement polarisées parallèlement (ce réglage étant d'autant plus critique que la molécule a une structure alignée, comme dans ce cas).

- Dans ces conditions, on peut supposer que les hélices alpha placées dans le prolongement du *Dapoxyl*TM allongent cette structure linéaire et amplifient donc d'autant plus ce problème d'alignement. Le signal de dichroïsme circulaire observé dans $\{PolyA+Dapoxyl^{TM}\}$ pendant les premières 400 ps est donc difficilement interprétable. Il est probablement le résultat de plusieurs contributions : biréfringence induite, relaxation électronique du *Dapoxyl*TM et variations éventuelles de la structure des hélices alpha. On remarquera néanmoins qu'au delà de 400 ps, tout signal de biréfringence induite a disparu et, que d'après les courbes de gauche, l'absorption transitoire de l'ensemble $\{PolyA+Dapoxyl^{TM}\}$ a atteint un niveau stable : la courbe $\delta\eta(t)$ (encart à droite sur la figure 7.8) qui peut être approchée par une fonction exponentielle de constante de temps égale 320 ps pourrait donc correspondre à une réelle modification de structure.

Cette modification de structure étant associée à une diminution du signal de dichroïsme circulaire à 230 nm (car négatif), il s'agirait donc plutôt d'un dépliement des hélices déstabilisées par le moment dipolaire du chromophore, orienté de l'extrémité N-terminale vers C-terminale. Les expériences complémentaires réalisées à l'aide des différents chromophores présentés dans ce chapitre, devraient permettre de confirmer ou d'infirmer très prochainement cette hypothèse.

Notons que des mesures des $\delta(\alpha)(t)$ et $\delta\eta(t)$ pour des retards pompe/sonde plus longs que la nanoseconde sont également envisagées. Elles seront réalisées à l'aide d'un oscilloscope ultrarapide et d'une source UV continue.

8. INITIATION DU DÉPLIEMENT PAR UN « SAUT DE TEMPÉRATURE »

La technique expérimentale du « saut de température » est la plus couramment employée pour étudier le processus de repliement de polypeptides modèles. Son principe repose sur le fort lien existant entre la structure d'une protéine et la température de l'équilibre thermodynamique dans lequel elle se trouve.

Une collaboration sur ce sujet a été initiée en 2007, entre notre groupe et celui de Martin Volk du *Surface Science Research Centre* de l'Université de Liverpool (GB). Ce groupe anglais a une expertise de plusieurs années dans l'utilisation de cette méthode d'initiation du dépliement de polypeptides modèles, qu'ils suivent par spectroscopie infrarouge. L'objectif de cette collaboration est donc de profiter de leurs conseils avisés pour réussir à mettre en place la technique du « saut de température » dans notre laboratoire, puis de confronter nos mesures de dichroïsme circulaire dans l'ultraviolet avec leurs résultats obtenus par spectroscopie infrarouge dans la bande amide I'.

Dans ce chapitre, nous présenterons brièvement le principe de cette technique d'initiation. Nous discuterons également des difficultés liées à sa mise en œuvre expérimentale. Puis nous présenterons les projets expérimentaux, qui devraient être réalisés dans les prochains mois.

8.1 Principe de l'expérience

La plupart des protéines perdent leur structure native lorsque la température du milieu dans lequel elles se trouvent augmente. C'est le cas du polypeptide *PolyA* introduit dans le chapitre précédent. Les courbes de la figure 8.1 illustrent ce phénomène. Les spectres de dichroïsme circulaire de *PolyA* et de l'ensemble $\{PolyA + Dapoxyl^{TM}\}$, mesurés sur un spectrophotomètre commercial pour des températures comprises entre 5 et 80 °C, y sont représentés. L'origine des différents pics de dichroïsme circulaire observés dans la région 190-222 nm est rappelée dans le tableau 8.1.

Longueurs d'onde (nm)	Structures
222	hélices alpha
208	hélices alpha
200	pelotes statistiques
190	hélices alpha

Tab. 8.1: Structures associées aux différents pics de dichroïsme circulaire observables dans la région 190-222 nm.

On comprend ainsi que l'augmentation de la température de 5 à 80 °C provoque, pour

les deux échantillons, un dépliement des hélices alpha et une augmentation relative de la proportion de pelotes statistiques.

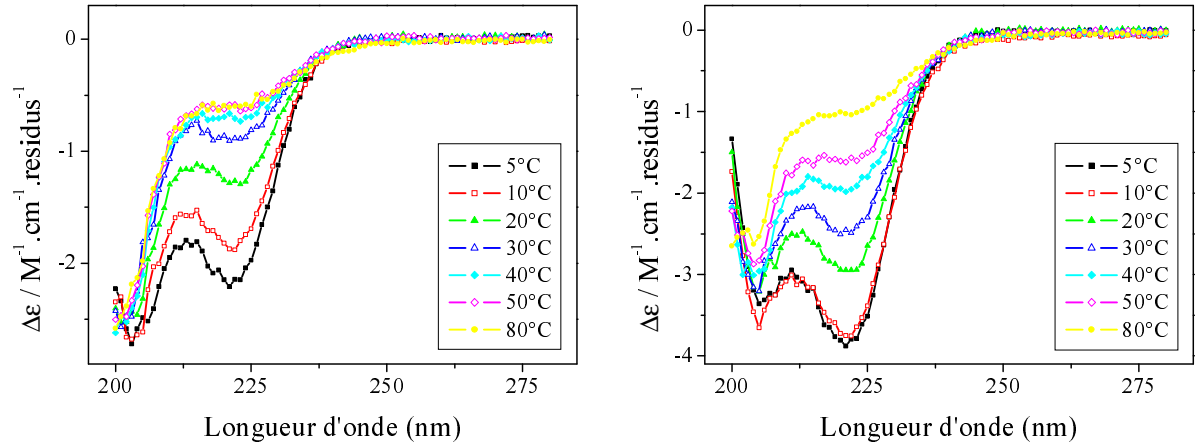


Fig. 8.1: Évolution des spectres de dichroïsme circulaire de *PolyA* et $\{PolyA+Dapoxyl^{TM}\}$ avec la température.

Considérons un équilibre thermodynamique donné, dans lequel coexistent des protéines dépliées, repliées et partiellement repliées. Une augmentation subite de la température du milieu, va déplacer cet équilibre et, d'après le paragraphe précédent, initier le dépliement des protéines vers des structures plus désordonnées. Si le temps nécessaire pour atteindre une température uniforme dans tout le milieu est plus court que celui accompagnant cette relaxation conformationnelle, il est alors possible d'observer directement ce dépliement des protéines. C'est le principe de la technique du « saut de température ».

Certaines protéines ont l'avantage de se replier suite à une augmentation de température. Mais elles sont peu nombreuses et dans la plupart des cas, c'est bien un processus de dépliement que l'on observe suite au saut de température. Il est toutefois admis que les études des mécanismes de dépliement ou de repliement sont équivalentes. En prenant l'exemple simplifié d'un modèle à deux états pour lequel la transition hélice $\rightarrow$ pelote statistique n'a pas d'intermédiaire de structure, on peut en effet calculer séparément les constantes de vitesse des processus de repliement k_r et de dépliement k_d à partir des équations suivantes [85] :

$$\tau_{relaxation} = \frac{1}{k_r + k_d} \quad (8.1)$$

$$K_{equilibre} = \frac{k_r}{k_d} \quad (8.2)$$

où $\tau_{relaxation}$ est la constante de temps du processus de relaxation et $K_{equilibre}$ la constante d'équilibre de cette transition. Bien entendu, le cas particulier d'une transition à deux états s'applique rarement et d'autres modèles plus sophistiqués sont requis pour analyser les dynamiques de dépliement/repliement faisant intervenir des intermédiaires partiellement repliés [96]. Mais en règle générale, l'étude du dépliement ou du repliement apportent les mêmes informations en terme de constantes de vitesse.

Pour être atteint le plus rapidement possible, le saut de température doit être initié par des impulsions laser ultra courtes. Deux configurations sont alors possibles (voir figure 8.2) :

- Excitation d'un colorant présent dans la solution à l'aide d'impulsions laser accordées dans le visible (figure de gauche) ;
- Excitation directe des bandes d'absorption du solvant H_2O à l'aide d'impulsions laser accordées à $1,5 \mu m$ (figure de droite).

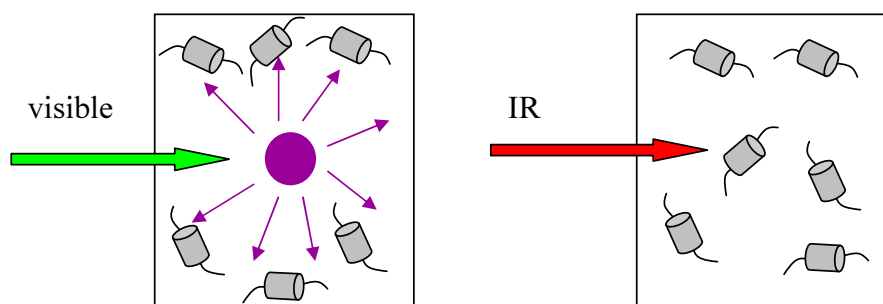


Fig. 8.2: Obtention d'un saut de température de façon indirecte (à gauche) et directe (à droite). Les cylindres gris correspondent aux polypeptides dans l'équilibre thermodynamique initial. Le colorant de la technique indirecte est représenté par le rond violet sur la figure de gauche.

Dans les deux cas, les impulsions laser sont absorbées par le colorant ou les molécules d'eau, qui s'excitent et provoquent l'élévation de la température du milieu par diffusion thermique, lors de la relaxation électronique des niveaux vibrationnels des états excités. La méthode de chauffage directe (sans colorant) est souvent préférée mais elle requiert un dispositif laser complexe pour pouvoir accorder les impulsions à $1,5 \mu m$. C'est pourquoi nous avons choisi de recourir à la méthode de chauffage indirecte. C'est sur cette dernière que j'ai travaillé lors de mon séjour à Liverpool, dans le groupe de M. Volk.

8.2 Méthode indirecte

Différents colorants peuvent servir à induire le saut de température. Il s'agit généralement de triphényl-méthanés, tels que le cristal violet (méthyl violet 10B) ou la fuchsine basique.

Lorsqu'ils sont excités par des impulsions laser de quelques nanosecondes, une température plus élevée et homogène peut être atteinte en $100 ps$ et rester stable plus de $1 ms$. Les étapes accompagnant ce processus sont décrites dans le tableau 8.2.

Étapes	Échelles de temps
Absorption des photons visibles	nanoseconde
Conversion interne	sub-picoseconde
Transfert d'énergie vers le solvant	picoseconde
Diffusion thermique	$< 100 ps$

Tab. 8.2: Processus accompagnant l'augmentation de température indirecte [85].

Il a été montré que la présence de tels colorants dans la solution ne perturbe pas le mécanisme de dépliement de polypeptides tels que *PolyA* [106]. Elle implique néanmoins plusieurs complications :

- ces colorants sont peu solubles dans l'eau (et dans D_2O) et forment des agrégats qui perturbent les mesures ;
- le blanchiment spectral du colorant est très rapide, il implique une diminution de l'absorption donc du saut de température ;
- apparition d'artéfacts liés au phénomène de cavitation acoustique [106] qui se crée suite à la formation de bulles de vapeur dans la solution. Le passage d'agrégats de colorant sur le chemin du faisceau laser initierait ce phénomène ;
- formation d'agrégats de colorant dans la solution, au point de focalisation du faisceau laser.

Le blanchiment spectral apparaissant moins rapidement dans la fuchsine basique que dans le cristal violet, c'est donc ce colorant que nous choisirons pour réaliser les expériences de saut de température. Son spectre d'absorption obtenu dans D_2O (pour les mesures de spectroscopie infrarouge réalisées à Liverpool ¹) ainsi que sa structure chimique sont données sur la figure 8.3.

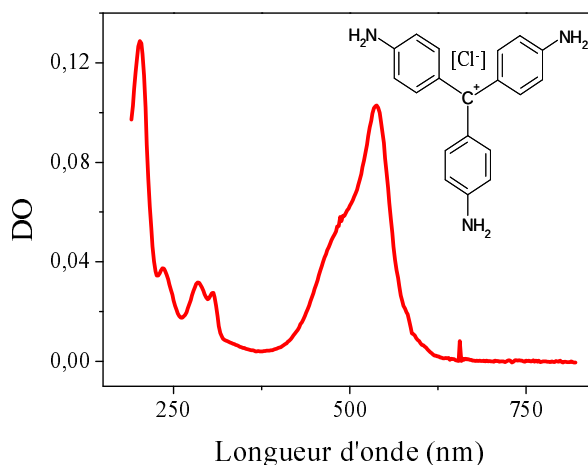


Fig. 8.3: Spectre d'absorption et structure chimique de la fuchsine basique dans D_2O . Densité optique de 0,1 à 540 nm pour une concentration de 0,6 mM, c'est à dire dix fois plus faible que les concentrations de peptides typiquement employées.

Pour contrer les problèmes liés au blanchiment du colorant et à la formation d'agrégats au point de focalisation du faisceau laser, l'installation d'un système de circulation continue de la solution peut être envisagé. Mais on facilite alors la circulation des agrégats liés à la mauvaise solubilité du colorant dans le solvant, et augmente ainsi la fréquence d'apparition des artéfacts liés à la cavitation acoustique.

Il faudra donc suivre un protocole équivalent à celui mis en place lors de ma visite dans le groupe de M. Volk :

1. illuminer l'échantillon et acquérir nos mesures de dichroïsme circulaire jusqu'à ce que le blanchiment du colorant provoque une diminution maximale de 5% du saut de température initial ;

¹ On trouvera plus de détails sur le montage expérimental dans [107].

2. bloquer l'illumination et faire circuler la solution pendant un court instant ;
3. répéter les étapes 1 et 2 jusqu'à ce que des agrégats de colorant se forment au point de focalisation ;
4. si ces agrégats sont accrochés aux fenêtres de la cuve, la déplacer puis recommencer le protocole.

Notons que la durée de chacune de ces étapes dépend de l'énergie et du taux de répétition des impulsions laser permettant d'induire le saut de température. Dans le cas du laser Nd :YAG de fréquence 10 Hz utilisé par M. Volk ($\lambda = 532 \text{ nm}$, $\Delta t_{impulsion} = 5 \text{ ns}$, $E = 2,7 \text{ mJ}$, diamètre du faisceau de l'ordre de $400 \text{ }\mu\text{m}$ dans l'échantillon, cuve de $50 \text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur, $C_{colorant} = 0,6 \text{ mM}$), l'étape 2 doit être réalisée toutes les 15 s et l'étape 4 toutes les 150 s . Pour des conditions expérimentales équivalentes et avec le laser Nd :YAG de fréquence 30 Hz dont nous disposons au Laboratoire d'Optique et Biosciences, les étapes 1 et 3 devraient donc être 3 fois plus courtes.

8.3 Perspectives

Si l'utilisation de la fuchsine basique limite trop fortement les expériences que nous souhaitons réaliser, deux solutions pourront être envisagées :

- chercher un autre colorant plus soluble dans H_2O et plus stable (blanchiment spectral moins rapide), ou un autre intermédiaire transducteur de chaleur ;
- recourir à la méthode de chauffage directe avec le développement d'un montage optique permettant d'atteindre la longueur d'onde de $1,5 \text{ }\mu\text{m}$ (OPO à cristal de PPLN²).

Une fois ces problèmes résolus, notre technique de mesure du dichroïsme circulaire pourra alors être utilisée dans les montages pompe/sonde suivants :

- laser de pompe (Nd :YAG) et laser de sonde (Ti : Sa), contrôlés et retardés électroniquement ;
- laser de pompe (Nd :YAG) et sonde continue (lampe deutérium), avec utilisation d'un oscilloscope de 500 MHz relié au tube photomultiplicateur pour suivre le dépliement des peptides sur plusieurs centaines de nanosecondes (cf. section 6.4).

Mais plusieurs difficultés risquent également d'être rencontrées lors de la mise en œuvre de ces deux montages : développement d'un système électronique capable de contrôler le retard entre le Nd :YAG et le Ti :Sa, mauvaise qualité du faisceau issu de la lampe deutérium (fortement divergent, diamètre large, mauvais rapport signal sur bruit) rendant très difficile sa focalisation dans l'échantillon en un point de quelques $100 \text{ }\mu\text{m}$ de diamètre.

² « Periodically Poled Lithium Niobate ».

9. CONCLUSION

La compréhension des mécanismes accompagnant le phénomène de repliement des protéines représente actuellement l'un des principaux enjeux de la recherche en biophysique. Il s'agit ainsi de déterminer l'enchaînement des événements qui mènent la protéine vers sa structure native, tout comme les champs de force régissant de telles dynamiques moléculaires. C'est dans ce contexte, que nous avons mis en place, au cours de cette thèse, une nouvelle technique de mesure du dichroïsme circulaire, nous permettant de suivre les premières étapes du repliement de polypeptides modèles, sur des échelles de temps s'étendant de la picoseconde à la nanoseconde.

Le dichroïsme circulaire est très fréquemment utilisé pour déterminer les différentes formes de structures secondaires chirales présentes dans la structure globale de protéines en solution. Il trouve son origine dans l'interaction des dipôles électriques des nombreux chromophores constituant une protéine donnée, ce qui le rend très sensible à la position et aux déplacements relatifs de chacun d'entre eux. En théorie, l'étude des variations temporelles du spectre de dichroïsme circulaire d'une protéine, représente donc un formidable outil d'analyse des modifications subies par sa structure lors de son repliement, ou encore de toute autre réaction chimique/biologique. Cette technique est pourtant rarement choisie par les expérimentateurs, car sa mise en œuvre représente un véritable challenge. Elle nécessite, généralement, l'utilisation de modulateurs électro-optiques ou photoélastiques, difficiles à aligner et responsables de nombreux artéfacts de mesure.

La nouvelle technique de détection des variations photoinduites du dichroïsme circulaire développée au cours de cette thèse et introduite dans la première partie de ce manuscrit, permet de s'affranchir d'un grand nombre de difficultés liées à ces modulateurs.

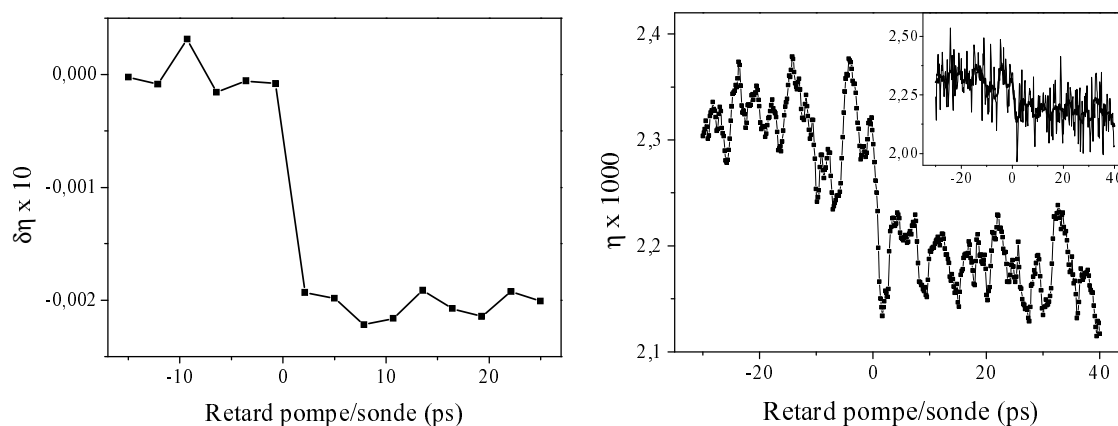


Fig. 9.1: Comparaison de la nouvelle technique de mesure du dichroïsme circulaire η (à gauche) avec celle consistant à utiliser un modulateur électro-optique (à droite).

Nous avons montré, dans cette première partie, que sa mise en œuvre expérimentale nécessite l'utilisation d'un montage simple, composé d'un compensateur de Babinet-Soleil, d'un polariseur et d'un analyseur croisé. Son alignement rigoureux permet, par ailleurs, d'obtenir de bien meilleurs rapports signal sur bruit que les techniques de mesure usuelles, comme en témoignent les résultats de la figure 9.1 obtenus dans la myoglobine et présentés dans le chapitre 3.4.

Une partie importante de ce travail de thèse a ainsi porté sur le développement de cette technique et la mise en évidence de ses limites, afin d'optimiser ses performances et caractériser ses meilleurs conditions d'application (échantillons et protocoles d'acquisition). La détermination complète de ces paramètres s'est faite progressivement, notamment grâce à l'étude des trois systèmes « modèles » présentés dans le chapitre 5 :

1. la myoglobine et l'analyse de ses modifications de structure faisant suite à la dissociation d'un ligand *CO* initialement fixé sur son hème ;
2. l'état excité *MLCT* du *RuTP* et la détermination, par le calcul, des transitions électroniques responsables de la forme de son spectre de dichroïsme circulaire ;
3. le *BINOL* et l'étude des variations de l'angle diédral caractérisant sa structure.

L'analyse des mesures expérimentales obtenues en appliquant notre nouvelle technique à l'étude de ces trois systèmes, a par ailleurs été réalisée à l'aide de calculs simples basés sur la théorie classique des oscillateurs couplés introduite dans le chapitre 2.7. Ces derniers nous ont permis d'interpréter les variations du dichroïsme circulaire en terme de dynamiques conformationnelles, et de souligner ainsi le fort lien existant entre le dichroïsme circulaire et la structure d'une molécule (ou protéine).

Parallèlement à ces travaux et dans le cadre de l'analyse des mécanismes de repliement des protéines développée dans la deuxième partie du manuscrit, nous nous sommes tout particulièrement intéressés à l'étude d'un polypeptide modèle (*PolyA*) constitué de 21 résidus dont 18 alanine. Ce dernier acide aminé est connu pour avoir une forte propension à former des hélices alpha. Or, le spectre de dichroïsme circulaire de cette structure secondaire est très particulier dans la région 190-222 nm. Il permet donc de la distinguer facilement des pelotes statistiques et feuilletts bêta, mais aussi de suivre sa formation au cours du processus de repliement, en renseignant par exemple sur les variations des proportions relatives pelotes statistiques/hélices alpha caractérisant la transition pelote $\rightarrow$ hélice.

Une première technique d'initiation du repliement, basée sur l'excitation optique d'un chromophore (*DapoxylTM*) inséré à l'extrémité N-terminale de la séquence peptidique de *PolyA*, nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans le chapitre 7. Ces derniers pourront être interprétés plus précisément, à la lumière de nouvelles expériences qui devraient être réalisées très prochainement à l'aide de deux nouveaux chromophores, synthétisés au Laboratoire de Chimie de l'ENS Lyon.

Une deuxième méthode, dont le principe, détaillé dans le chapitre 8, consiste à induire un saut de température dans le milieu contenant le polypeptide pour déstabiliser sa structure et déclencher son dépliement, devrait par ailleurs être mise en place à très court terme dans notre laboratoire et ce, grâce aux conseils avisés de M. Volk de l'Université de Liverpool.

L'étude du repliement de structures secondaires isolées dont on connaît parfaitement les séquences primaires, se trouve, depuis plus de cinquante ans, au cœur de nombreux travaux expérimentaux et modèles théoriques. Des polypeptides tels que *PolyA* peuvent, en effet, apporter de précieux renseignements sur les facteurs internes (interactions entre acides aminés, longueur de la séquence...) et externes (viscosité, température, pH du solvant...) gouvernant les mécanismes de repliement. Ils donnent également des informations claires sur le repliement intrinsèque des structures secondaires, puisqu'aucune autre sous-unité n'est là pour interagir avec elles et les perturber, comme c'est le cas dans la plupart des protéines.

Couplées à notre nouvelle technique de mesure du dichroïsme circulaire, les deux méthodes d'initiation citées précédemment devraient nous permettre d'observer directement les processus mis en jeu lors de l'élongation d'une hélice alpha en formation (chromophore photo-excitable), et plus globalement mais indirectement l'ensemble des étapes accompagnant le repliement de cette structure secondaire (saut de température). Dans ce contexte, il s'agira alors d'étudier l'influence des acides aminés, de la longueur de la chaîne peptidique et du solvant sur les dynamiques observées. Différentes positions du chromophore dans la séquence peptidique pourront également être envisagées, afin de mesurer plus précisément leur influence sur le mécanisme de propagation des hélices alpha.

Ces nouvelles expériences de dichroïsme circulaire devraient contribuer à une meilleure compréhension des phénomènes rentrant en jeu dans le repliement des hélices alpha, phénomènes jusque là rarement étudiés via cette technique expérimentale. Les résultats obtenus pourront, en effet, compléter ceux obtenus grâce à d'autres techniques de mesure (spectroscopie infrarouge dans la bande amide I', fluorescence...), afin de progresser dans l'analyse des mécanismes étudiés. Parallèlement à ces projets expérimentaux, de nouveaux modèles théoriques devront également être développés afin d'interpréter les variations des signaux de dichroïsme circulaire en terme de dynamiques moléculaires. Enfin, à plus long terme, l'étude de protéines plus complexes pourra être envisagée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] La Revue Prescrire. Commercialisation des isomères : un miroir aux alouettes. 295 :386–387, mai 2008.
- [2] B. Bosnich. Application of exciton theory to the determination of the absolute configurations of inorganic complexes. *Accounts of Chemical Research*, 2 :266–273, 1969.
- [3] G. Holzwarth and P. Doty. The ultraviolet circular dichroism of polypeptides. *Journal of the American Chemical Society*, 87 :218–228, 1965.
- [4] Laurence Barron. *Molecular Light Scattering and Optical Activity*. Cambridge University Press, Second edition, 2004.
- [5] José-Philippe Pérez. *Optique, fondements et applications*. Dunod, 6ème édition, 2000.
- [6] J. W. Lewis, R. A. Goldbeck, D. S. Kliger, X. Xie, R. C. Dunn, and J. D. Simon. Time-resolved circular dichroism spectroscopy : experiment, theory, and applications to biological systems. *Journal of Physical Chemistry*, 96(13) :5243–5254, 1992.
- [7] R. A. Goldbeck, D. B. Kim-Shapiro, and D. S. Kliger. Fast natural and magnetic circular dichroism spectroscopy. *Annual Review of Physical Chemistry*, 48 :453–479, 1997.
- [8] Hugues Mesnil. *Etude théorique et expérimentale des propriétés d’optique non linéaire dans une solution de molécules chirales : dichroïsme circulaire non linéaire*. PhD thesis, Université Paris-Sud XI, 2001.
- [9] Alan Fersht. *Structure and Mechanism in Protein Science : A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W.H. Freeman and Company, 1999.
- [10] S. M. Kelly, T. J. Jess, and N. C. Price. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751(2) :119–139, 2005.
- [11] Howard DeVoe. Optical properties of molecular aggregates. ii. classical theory of the refraction, absorption, and optical activity of solutions and crystals. *The Journal of Chemical Physics*, 43 :3199–3208, 1965.
- [12] N. Sreerama and R. W. Woody. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods in Enzymology*, 383 :318–351, 2004.
- [13] J. Applequist, K. R. Sundberg, M. L. Olson, and L. C. Weiss. A normal mode treatment of optical properties of a classical coupled dipole oscillator system with lorentzian band shapes. *The Journal of Chemical Physics*, 70(3) :1240–1246, 1979.
- [14] P. M. Bayley, E. B. Nielsen, and J. A. Schellman. Rotatory properties of molecules containing two peptide groups : theory. *Journal of Physical Chemistry*, 73(1) :228–243, 1969.

- [15] D. M. Rogers and J. D. Hirst. Calculations of protein circular dichroism from first principles. *Chirality*, 16 :234–243, 2004.
- [16] Leigh B. Clark. Polarization assignments in the vacuum uv spectra of the primary amide, carboxyl, and peptide groups. *Journal of the American Chemical Society*, 117(30) :7974–7986, 1995.
- [17] N. A. Besley and J. D. Hirst. Theoretical studies toward quantitative protein circular dichroism calculations. *Journal of the American Chemical Society*, 121(41) :9636–9644, 1999.
- [18] J. D. Hirst, K. Colella, and A. T. B. Gilbert. Electronic circular dichroism of proteins from first-principles calculations. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(42) :11813–11819, 2003.
- [19] J. Applequist. On the polarizability theory of optical rotation. *The Journal of Chemical Physics*, 58 :4251–4259, 1973.
- [20] P. Fischer and F. Hache. Nonlinear optical spectroscopy of chiral molecules. *Chirality*, 17 :1–17, 2005.
- [21] T. Dartigalongue and F. Hache. Precise alignment of a longitudinal Pockels cell for time-resolved circular dichroism experiments. *Journal of the Optical Society of America B Optical Physics*, 20 :1780–1787, August 2003.
- [22] X. Xie and J. D. Simon. Picosecond circular dichroism spectroscopy : a jones matrix analysis. *Journal of the Optical Society of America B*, 7(8) :1673–1684, 1990.
- [23] C. Niezborala and F. Hache. Measuring the dynamics of circular dichroism in a pump-probe experiment with a babinet-soleil compensator. *Journal of the Optical Society of America B*, 23(11) :2418–2424, 2006.
- [24] C. Niezborala and F. Hache. Measuring the dynamics of circular dichroism in a pump-probe experiment with a babinet-soleil compensator : erratum. *Journal of the Optical Society of America B*, 24(4) :1012, 2007.
- [25] Sofie C. Bjorling, Robert A. Goldbeck, Steven J. Milder, Cora E. Randall, James W. Lewis, and David S. Kliger. Analysis of optical artifacts in ellipsometric measurements of time-resolved circular dichroism. *Journal of Physical Chemistry*, 95 :4685–4694, 1991.
- [26] D. E. Spence, P. N. Kean, and W. Sibbett. 60-fsec pulse generation from a self-mode-locked ti :sapphire laser. *Optics Letters*, 16 :42, 1991.
- [27] D. E. Spence, J. M. Evans, W. E. Sleat, and W. Sibbett. Regeneratively initiated self-mode-locked ti :sapphire laser. *Optics Letters*, 16 :1762, 1991.
- [28] D. Strickland and G. Mourou. Compression of amplified chirped optical pulses. *Optics Communications*, 56 :219–221, 1985.
- [29] Thibault Dartigalongue. *Dynamique conformationnelle de la myoglobine suivie par dichroïsme circulaire résolu temporellement*. PhD thesis, Ecole Polytechnique, 2005.
- [30] Valentin G. Dmitriev, Gagik G. Gurzadyan, and David N. Nikogosyan. *Handbook of Nonlinear Optical Crystals*. Springer series in optical sciences, 3rd revised edition, 1999.

-
- [31] J. W. Petrich, C. Poyart, and J. L. Martin. Photophysics and reactivity of heme proteins : a femtosecond absorption study of hemoglobin, myoglobin, and protoheme. *Biochemistry*, 27 :4049–4060, 1988.
- [32] S. Franzen, L. Kiger, C. Poyart, and J. L. Martin. Heme photolysis occurs by ultrafast excited state metal-to-ring charge transfer. *Biophysical Journal*, 80 :2372–2385, 2001.
- [33] R. J. Dwayne Miller. Energetics and dynamics of deterministic protein motion. *Acc. Chem. Res.*, 27 :145–150, 1994.
- [34] X. Xie and J. D. Simon. Protein conformational relaxation following photodissociation of co from carbonmonoxymyoglobin : picosecond circular dichroism and absorption studies. *Biochemistry*, 30 :3682–3692, 1991.
- [35] E. Chen and D. S. Kliger. Time-resolved near uv circular dichroism and absorption studies of carbonmonoxymyoglobin photolysis intermediates. *Inorganica Chimica Acta*, 242 :149–158, 1996.
- [36] T. Dartigalongue, C. Niezborala, and F. Hache. Subpicosecond uv spectroscopy of carbonmonoxy-myoglobin : absorption and circular dichroism. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9 :1611–1615, 2007.
- [37] D. W. Urry. The heme chromophore in the ultraviolet. *The Journal of Biological Chemistry*, 242 :4441–4448, 1967.
- [38] M-C Hsu and R. W. Woody. The origin of the heme cotton effects inmyoglobin and hemoglobin. *Journal of the American Chemical Society*, 93 :3515–3525, 1971.
- [39] L. R. Painter, R.D. Birkhoff, and E. T. Arakawa. Optical measurements of liquid water in the vacuum ultraviolet. *The Journal of Chemical Physics*, 51 :243–251, 1969.
- [40] T. Dartigalongue and F. Hache. Observation of sub-100 ps conformational changes in photolyzed carbonmonoxy-myoglobin probed by time-resolved circular dichroism. *Chemical Physics Letters*, 415 :313–316, 2005.
- [41] R. W. Woody and A. K. Dunker. *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*, chapter : Aromatic and cystine sidechain circular dichroism in proteins. G. D. Fasman, 1996.
- [42] Milder S. J., S. C. Bjorling, I. D. Kuntz, and D. S. Kliger. Time-resolved circular dichroism and absorption studies of the photolysis reaction of (carbonmonoxy)myoglobin. *Biophysical Journal*, 53 :659–664, 1988.
- [43] V. Balzani and A. Juris. Photochemistry and photophysics of ru(ii)-polypyridine complexes in the bologna group. from early studies to recent developments. *Coordination Chemistry Reviews*, 211 :97–115, 2001.
- [44] J. K. McCusker. Femtosecond absorption spectroscopy of transition metal charge-transfer complexes. *Accounts of Chemical Research*, 36 :876–87, 2003.
- [45] O. Lentzen, J. F. Constant, E. Defrancq, M. Prévost, C. Schumm, S. and Moucheron, P. Dumy, and A Kirsch-De Mesmaeker. Photocrosslinking in ruthenium-labelled duplex oligonucleotides. *ChemBioChem*, 4 :195 – 202, 2003.
- [46] C.-Y. Huang, S. He, W.F. DeGrado, D.G. McCafferty, and F. Gai. Light-induced helix formation. *Journal of the American Chemical Society*, 124 :12674–12675, 2002.

- [47] K. J. Kise and B. E. Bowler. A ruthenium(ii) tris(bipyridyl) amino acid : Synthesis and direct incorporation into an alpha-helical peptide by solid-phase synthesis. *Inorganic Chemistry*, 41 :379–386, 2002.
- [48] N. H. Damrauer, G. Cerullo, A. Yeh, T. R. Boussie, C. V. Shank, and J. K. McCusker. Femtosecond dynamics of excited-state evolution in $[\text{ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. *Science*, 275 :54–57, 1997.
- [49] C. Daul, E. J. Baerends, and P. Vernooijs. A density functional study of the mlct states of $[\text{ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ in d3 symmetry. *Inorganic Chemistry*, 33 :3538–3543, 1994.
- [50] P. Belser, C. Daul, and A. Von Zelewsky. Comment on the assignment of the mlct transition in the $[\text{ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ complex ion. *Chemical Physics Letters*, 79 :596–598, 1981.
- [51] C. F. Zhang, J. W. Lewis, R. Cerpa, I. D. Kuntz, and D. S. Kliger. Nanosecond circular dichroism spectral measurements : extension to the far-ultraviolet region. *Journal of Physical Chemistry*, 97 :5499–5505, 1993.
- [52] K. Shinozaki and T. Shinoyama. Substituent effect on the nonradiative decay rates from 3mlct excited state of ruthenium(ii) complexes : A quantum chemical treatment. *Chemical Physics Letters*, 417 :111–115, 2006.
- [53] A. Rodger and B. Norden. *Circular Dichroism and Linear Dichroism*. Oxford University Press, 1997.
- [54] M. Buchs and C. Daul. Geometry optimization and excited states of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) using density functional theory. *Chimia*, 52 :163–166, 1998.
- [55] A. Hauser and E. Krausz. The excited-state absorption of $\text{ru}(\text{bpy})_2+3$ reexamined. *Chemical Physics Letters*, 138 :355–360, 1987.
- [56] J.R. Schoonover, K.M. Omberg, J.A. Moss, S. Bernhard, V.J. Malueg, W.H. Wooldruff, and T.J. Meyer. Interpretation of the time-resolved resonance raman spectrum of $[\text{ru}(\text{phen})_3]^{2+*}$. *Inorganic Chemistry*, 37 :2585–2587, 1998.
- [57] C. Niezborala and F. Hache. Excited-state absorption and circular dichroism of ruthenium(ii) tris(phenanthroline) in the ultraviolet region. *Journal of Physical Chemistry A*, 111 :7732–7735, 2007.
- [58] L. Pu. 1,1'-binaphthyl dimers, oligomers, and polymers : Molecular recognition, asymmetric catalysis, and new materials. *Chemical Reviews*, 98 :2405–2494, 1998.
- [59] H. Kagan. La synthèse asymétrique de composés biologiquement actifs. *L'Actualité Chimique*, 269-270 :10–14, 2003.
- [60] L. Di Bari, G. Pescitelli, and P. Salvadori. Conformational study of 2,2'-homosubstituted 1,1'-binaphthyls by means of uv and cd spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 121 :7998–8004, 1999.
- [61] Yuichiro Takei, Tetsuya Yamaguchi, Yoshihiro Osamura, Kiyokazu Fuke, and Koji Kaya. Electronic spectra and molecular structure of biphenyl and para-substituted biphenyls in a supersonic jet. *Journal of Physical Chemistry*, 92 :577–581, 1988.
- [62] Claire Niezborala and François Hache. Conformational changes in photoexcited (r)-(+)-1,1'-bi-2-naphthol studied by time-resolved circular dichroism. *Journal of the American Chemical Society*, 130 :12783–12786, 2008.

-
- [63] S. Fujiyoshi, S. Takeuchi, and T. Tahara. Time-resolved impulsive stimulated raman studies of 1,1'-binaphthyl in the excited state : Low-frequency vibrations and conformational relaxation. *Journal of Physical Chemistry A*, 108 :5938–5943, 2004.
- [64] I. Hanazaki and H. Akimoto. Optical rotatory power of 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaphthyl and related compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 94 :4102–4106, 1972.
- [65] F. Zhu, C. Galli, and R. M. Hochstrasser. The real-time intramolecular electronic excitation transfer dynamics of 9,9-bifluorene and 2,2-binaphthyl in solution. *The Journal of Chemical Physics*, 98 :1042–1057, 1993.
- [66] D. Mank, M. Raytchev, S. Amthor, C. Lambert, and T. Fiebig. Femtosecond probing of the excited state absorption and structural relaxation in biphenyl derivatives. *Chemical Physics Letters*, 376 :201–206, 2003.
- [67] D. R. Lide. *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, 84th edition, 2003-2004.
- [68] James Kendall and Kenneth Potter Monroe. The viscosity of liquids. ii. the viscosity-composition curve for ideal liquid mixtures. *Journal of the American Chemical Society*, 39 :1787–1802, 1917.
- [69] D. P. Millar and K. B. Eisenthal. Picosecond dynamics of barrier crossing in solution : A study of the conformational change of excited state 1,1-binaphthyl. *The Journal of Chemical Physics*, 83 :5076–5083, 1985.
- [70] R. M. Bowman and K. B. Eisenthal. Frictional effects on barrier crossing in solution : Comparison with the kramers' equation. *The Journal of Chemical Physics*, 89 :762–769, 1988.
- [71] Thomas Simonson. Le problème du repliement. peut-on prédire la structure des protéines? *Médecine/Sciences*, 21 :609–612, 2005.
- [72] Christian B. Anfinsen. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181 :223–230, 1973.
- [73] Cyrus Levinthal. Are there pathways for protein folding? *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 65 :44–45, 1968.
- [74] P. G. Wolynes, J. N. Onuchic, and D. Thirumalai. Navigating the folding routes. *Science*, 267 :1619–1620, 1995.
- [75] P. S. Kim and R. L. Baldwin. Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 59 :631–660, 1990.
- [76] C. Chothia. Principles that determine the structure of proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 53 :537–572, 1984.
- [77] M. Karplus and D. L. Weaver. Protein folding dynamics : The diffusion-collision model and experimental data. *Protein Science*, 3 :650–668, 1994.
- [78] O. B. Ptitsyn. How does protein synthesis give rise to the 3d-structure? *FEBS Letters*, 285 :176–181, 1991.
- [79] K. A. Dill. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29 :7133–7155, 1990.

- [80] S. C. Harrison and R. Durbin. Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain? *Proceedings of the National Academy of Science*, 82 :4028–4030, 1985.
- [81] R. L. Baldwin and G. D. Rose. Is protein folding hierarchic? i. local structure and peptide folding. *TIBS*, 24 :26–33, 1999.
- [82] O. Bieri and T. Kiefhaber. Elementary steps in protein folding. *Biol. Chem.*, 380 :923–929, 1999.
- [83] L. J. Lapidus, W. A. Eaton, and J. Hofrichter. Measuring dynamic flexibility of the coil state of a helix-forming peptide. *Journal of Molecular Biology*, 319 :19–25, 2002.
- [84] I.K. Lednev, A.S. Karnoup, M.C. Sparrow, and S.A. Asher. alpha-helix peptide folding and unfolding activation barriers : A nanosecond uv resonance raman study. *Journal of the American Chemical Society*, 121 :8074–8086, 1999.
- [85] Volk Martin. Fast initiation of peptide and protein folding processes. *Eur. J. Org. Chem.*, pages 2605–2621, 2001.
- [86] J. Bredenbeck, J. Helbing, J. R. Kumita, G. A. Woolley, and P. Hamm. alpha-helix formation in a photoswitchable peptide tracked from picoseconds to microseconds by time-resolved ir spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Science*, 102 :2379–2384, 2005.
- [87] T. E. Schrader, W. J. Schreier, T. Cordes, F. O. Koller, G. Babitzki, R. Denschlag, C. Renner, M. Loweneck, S.-L. Dong, L. Moroder, P. Tavan, and W. Zinth. Light-triggered beta-hairpin folding and unfolding. *Proceedings of the National Academy of Science*, 104 :15729–15734, 2007.
- [88] M. Volk, Y. Kholodenko, H.S.M. Lu, E.A. Gooding, W.F. DeGrado, and R.M. Hochstrasser. Peptide conformational dynamics and vibrational stark effects following photoinitiated disulfide cleavage. *Journal of Physical Chemistry B*, 101 :8607–8616, 1997.
- [89] L. Pauling, R. B. Corey, and H. R. Branson. The structure of proteins : Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Science*, 37 :205–211, 1951.
- [90] C. Park and W.A. Goddard. Stabilization of alpha-helices by dipole-dipole interactions within alpha-helices. *Journal of Physical Chemistry B*, 104 :7784–7789, 2000.
- [91] S. Marqusee, V. H. Robbins, and R. L. Baldwin. Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides. *Proceedings of the National Academy of Science*, 86 :5286–5290, 1989.
- [92] C.-Y. Huang, J.W. Klemke, Z. Getahun, W.F. DeGrado, and F. Gai. Temperature-dependent helix-coil transition of an alanine based peptide. *Journal of the American Chemical Society*, 123 :9235–9238, 2001.
- [93] P.A. Thompson, W.A. Eaton, and J. Hofrichter. Laser temperature jump study of the helix to coil kinetics of an alanine peptide interpreted with a kinetic zipper model. *Biochemistry*, 36 :9200–9210, 1997.

-
- [94] D. T. Clarke, A. J. Doig, B. J. Stapley, and G. R. Jones. The alpha-helix folds on the millisecond time scale. *Proceedings of the National Academy of Science*, 96 :7232–7237, 1999.
- [95] G. Hummer, A. E. García, and S. Garde. Helix nucleation kinetics from molecular simulations in explicit solvent. *Proteins*, 42 :77–84, 2001.
- [96] P.A. Thompson, V. Munoz, G.S. Jas, E.R. Henry, W.A. Eaton, and J. Hofrichter. The helix-coil kinetics of a heteropeptide. *Journal of Physical Chemistry B*, 104 :378–389, 2000.
- [97] A.N. Morozov and S.H. Lin. Modeling of folding and unfolding mechanisms in alanine-based alpha-helical polypeptides. *Journal of Physical Chemistry B*, 110 :20555–20561, 2006.
- [98] D. Sitkoff, D. J. Lockhart, K. A. Sharp, and B. Honig. Calculation of electrostatic effects at the amino terminus of an alpha helix. *Biophys J.*, 67 :2251–2260, 1994.
- [99] D. Sengupta, R. Behera, J. Smith, and G. Ullmann. The a helix dipole : Screened out ? *Structure*, 13 :849 – 855, 2005.
- [100] M. M. Lopez, D. Chin, R. L. Baldwin, and G. I. Makhatadze. The enthalpy of the alanine peptide helix measured by isothermal titration calorimetry using metal-binding to induce helix formation. *Proceedings of the National Academy of Science*, 99 :1298–1302, 2002.
- [101] S. M. Decatur. Ir spectroscopy of isotope-labeled helical peptides : probing the effect of n-acetylation on helix stability. *Biopolymers*, 54 :180–5, 2000.
- [102] E. A. Gooding, A. Pozo Ramajo, JW. Wang, C. Palmer, E. Fouts, and M. Volk. The effects of individual amino acids on the fast folding dynamics of alpha-helical peptides. *Chem. Commun.*, pages 5985 – 5987, 2005.
- [103] A. PozoRamajo, S.A. Petty, A. Starzyk, S.M. Decatur, and M. Volk. The alpha-helix folds more rapidly at the c-terminus than at the n-terminus. *Journal of the American Chemical Society*, 127 :13784–13785, 2005.
- [104] Z. Diwu, C. Zhang, D. H. Klaubert, and R. P. Haugland. Fluorescent molecular probes vi - the spectral properties and potential biological applications of water-soluble dapoxyltm sulfonic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 131 :95–100, 2000.
- [105] D. J. Lockhart and P. S. Kim. Electrostatic screening of charge and dipole interactions with the helix backbone. *Science*, 260 :198–202, 1993.
- [106] A. Pozo Ramajo, S. A. Petty, and M. Volk. Fast folding dynamics of alpha-helical peptides – effect of solvent additives and ph. *Chemical Physics*, 323 :11–20, 2006.
- [107] S. A. Petty and M. Volk. Fast folding dynamics of an alpha-helical peptide with bulky side chains. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6 :1022–1030, 2004.

