HAL
open science

Flexibilités et hétérogénéités structurelles de biomolécules impliquées dans la transcription inverse du virus de l'immunodéficience humaine

Thomas Gelot

To cite this version:

Thomas Gelot. Flexibilités et hétérogénéités structurelles de biomolécules impliquées dans la transcription inverse du virus de l'immunodéficience humaine. Sciences agricoles. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAE018 . tel-00815389

HAL Id: tel-00815389

https://theses.hal.science/tel-00815389v1

Submitted on 19 Apr 2013

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 de doctorat

Flexibilités et hétérogénéités structurelles de biomolécules impliquées dans la Transcription Inverse du Virus de l'Immunodéficience Humaine

Soutenue publiquement par

Thomas GELOT

Réalisée sous la direction de

Stefan HAACKE et Ludger WOESTE

JURY

Dimitra MARKOVITSI	Rapporteur externe
Jean-Pierre WOLF	Rapporteur externe
Yves MELY	Examinateur
Jérémy LEONARD	Membre invité
Stefan HAACKE	Directeur de thèse
Ludger WOESTE	Directeur de thèse

Institut de physique et chimie des matériaux de Strasbourg (IPCMS)
Département d'optique ultra rapide et nanophotonique

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier les membres de mon jury : Dimitra MARKOVITSI, Jean-Pierre WOLF, Yves MELY pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Ensuite, j'aimerais exprimer ma plus profonde gratitude envers Stefan HAACKE. Je lui suis reconnaissant pour avoir fait un jour le pari qu'un petit biologiste pourrait intégrer son équipe. C'est grâce à son soutient que j'ai pu entrevoir le monde de la recherche, et plus particulièrement celui de la physique. Il est à l'origine, directement et indirectement, de nombreux bouleversements dans la manière de concevoir les choses qui m'entourent. Malgré une activité scientifique incessante et toujours en progression, il sait toujours se montrer disponible pour les membres de son équipe, en ce sens, ses qualités de manager sont tout bonnement incroyables. Ce fut un plaisir et un exemple de te côtoyer.

Bien entendu, toute l'équipe de BIODYN n'est pas en reste, assurément. Je souhaite évidemment remercier Jérémy LEONARD, pour l'ensemble des tâches qu'il peut accomplir au sein de l'équipe, pour son efficacité, son inter-complémentarité, et aussi les nombreuses remarques instructives qu'il peut apporter lors de nos réunions. J'apprécie tout particulièrement la dynamique qu'il insuffle au sein de l'équipe. Un grand merci aux thésards et post-doctorants actuels de l'équipe : Thomas ROLAND, pour m'avoir fait le cadeau de sa précieuse amitié, pour m'avoir ouvert les yeux sur tout un pan de geekerie qui m'étaient inconnus jusqu'alors, Sacha MAILLOT, pour son humeur et sa gentillesse, Alexandre CHEMINAL pour son insatiable curiosité, Patricia TOURON TOUCEDA, avec qui j'ai pu partager toutes les joies d'un dur labeur sur la manip, et Julien NILLON pour son aide précieuse sur le manuscrit. Je souhaite également remercier les membres passés de l'équipe, Julien BRIAND, Nhan LECONG, Divya SHARMA, qui ont eu la patience de me former pendant mes premiers mois.

A la liste des personnes auxquelles j'exprime ma reconnaissance s'ajoute : Olivier CREGUT, indispensable à toute une génération de doctorants, pour son aide et ses précieux conseils en optique non-linéaire, Gauthier DEKYNDT et Jean-Pierre VOLA, pour leur contribution à l'ensemble des minutieux détails qui font que le setup est ce qu'il est, Virginie STORTZ pour son implication en tant qu'ACMO et sa prévenance en temps de crise, Estelle BRUNETTE pour sa disponibilité.

A Berlin, je souhaite bien évidemment remercier Ludgar WOESTE, pour m'avoir fait l'honneur de m'accepter au sein de son équipe. Outre l'opportunité scientifique de diversifier mes recherches, son équipe a été pour moi un quasi-foyer. Merci à Torsten SIEBERT, pour m'avoir encadré sur le projet NCp7, ce fut un plaisir de travailler avec une personne d'une si grande qualité scientifique. Merci à Oliver GAUSE pour toute sa disponibilité et son aide sur le spectromètre, à Franz HAGEMANN pour son extrême gentillesse, pour m'avoir supporté à la fois au sein du bureau et sur la manip, à Cristina STANCA CAPOSTA, ainsi qu'à Frau ODEH pour son extrême douceur.

Au cours de mes pérégrinations en Alsace et à Berlin, j'ai eu la chance de rencontrer des personnalités incroyables, souvent par l'entremise du travail, et qui par la suite se sont révélées des amis indéfectibles. Je leur suis reconnaissant d'avoir partagé durant ces années de thèse mes craintes, mes espoirs, mes idées, mes délires. Merci à Jean BESBAS, mon petit fenouil. Je te dois beaucoup, et je sais que tu peux facilement en témoigner. Merci à Bertrand YUMA, pour ta personnalité hors du commun. Merci à Thibaut BERDOT pour nos délires si particuliers. Merci à Alex SOLE pour ton singularisme et ton vécu. Merci à Aldo MIRABAL, pour m'avoir fait découvrir tant de choses de Berlin, merci à Walter NAKAEMA pour ta bonté. Il serait criminel d'oublier mes collègues et amis de bureaux, membres respectueux de l'Agence Tous Risque et des Quatre Fantastiques : Yannick HINSCHBERGER, Deborah PERSUY, Rafal JASIAK, ou encore Laureen MANGOT ainsi que Marc ZIEGLER. Votre présence va me manquer, mais ce n'est que partie remise.

Cette période de mouvements n'aurait pas pu se faire sans un soutient inconditionnel des personnes que je qualifie comme mes racines. Je remercie Armelle NGUYEN, Thomas JEANNE, Romain BOULIER, Christophe PIERRET, Julien REBUFFAUD, Essam SHERIF, Clément LAIGLE pour l'honneur de votre inaltérable amitié. Je n'oublie pas que c'était pour te voir, Thomas, que je suis monté la première fois sur Strasbourg.

A cet instant, mes pensées vont naturellement envers ma famille. Je remercie mes parents pour tout ce qu'ils m'ont apporté, sans eux je ne serais rien. En premier lieu ma mère, qui de toute sa bonté, prend si bien soin de nous. Je lui suis reconnaissant pour sa force de caractère et son amour infini. Je remercie mon père, ce modèle pour bien des hommes, pour avoir tenté de me transmettre une partie de ses connaissances et expériences. Je vous souhaite de tout mon coeur des jours meilleurs.

Enfin, je souhaite remercier et dédier ce travail à ma femme, Yana, qui m'a si bien soutenu et supporté, particulièrement en période de rédaction. C'est un bonheur indescriptible de partager ton existence au quotidien.

Table des matières

1 État de l'art du projet **1**

1.1 Contexte biologique . . . 2

1.1.1 La protéine de Nucléocapside 7 du virus HIV . . . 3

1.1.1.1 Structure de la NCp7 . . . 3

1.1.1.2 NCp7 : Une protéine chaperonne d'acides nucléiques . . . 5

1.1.1.3 Exemple de rôle : Implication de NCp7 dans le transfert de brin (+) de la transcription inverse . . . 7

1.2 Motivations de la thèse . . . 8

1.3 Approche A : Dynamique structurelle de Δ(-)PBS-2Ap(6, 8 et 10) . . . 10

1.3.1 Utilisation d'une sonde extrinsèque de fluorescence : la 2Ap . . . 10

1.3.2 Le quenching de fluorescence de la 2Ap . . . 10

1.3.3 Informations potentielles apportées par le quenching de fluorescence . . . 11

1.4 Approche B : CID - LID de NCp7 [35-50] sous forme libre ou repliée . . . 12

1.4.1 Quelle technique ? . . . 12

1.4.2 Intérêt d'une fragmentation en phase gazeuse . . . 14

1.4.3 Pourquoi NCp7 ? . . . 14

2 Approche A : Montage expérimental **15**

2.1 Choix du montage . . . 16

2.1.1 Motivation générale . . . 16

2.1.2 Conversion de fréquences . . . 19

2.2 Accord de phase en différence de fréquence . . . 20

2.2.1 Conditions d'accord de phase . . . 20

2.2.2 Expression de l'angle d'accord de phase en type II . . . 23

2.3 Acceptance spectrale . . . 25

2.3.1 Efficacité de conversion en DFG . . . 25

2.3.2 Effet des différents paramètres d'interaction sur l'acceptance spectrale . . . 26

2.4 Facteurs affectant la résolution temporelle . . . 27
2.4.1 Dispersion de vitesse de groupe (GVD) . . . 28
2.4.2 Désaccord de vitesse de groupe (GVM) . . . 29
2.4.3 Désaccord du front d'impulsion (PFM) . . . 31
2.5 Éléments du montage . . . 32
2.5.1 Source Laser . . . 32
2.5.2 Positionnement de l'échantillon et collection de la fluorescence . . . 34
2.6 Caractérisation du montage expérimental . . . 37
2.6.1 Protocole expérimental . . . 37
2.6.2 Performances . . . 38
2.6.3 Résultats et Discussion . . . 39
2.7 Conclusion . . . 44

3 Approche A : Résultats **45**
3.1 Concepts . . . 46
3.1.1 Temps de vie de fluorescence et rendement quantique . . . 46
3.1.2 Quenching statique et quenching dynamique . . . 47
3.1.3 Dynamique de quenching et informations structurelles . . . 50
3.2 Préparation & conditionnement des échantillons . . . 50
3.3 Résultats préliminaires . . . 52
3.4 Cinétiques de quenching . . . 55
3.5 Anisotropie de fluorescence . . . 63
3.5.1 Principe . . . 63
3.5.2 Mesure d'anisotropie résolue en temps . . . 64
3.5.3 Traitement des données . . . 65
3.5.4 Résultats . . . 65
3.5.4.1 2Ap libre . . . 65
3.5.4.2 2Ap incorporée dans Δ(-)PBS . . . 65
3.6 Δ(-)PBS et glycerol . . . 68
3.7 Conclusion . . . 72
3.8 Annexe au chapitre 3 . . . 74

4 Approche B **78**
4.1 Matériels et méthodes . . . 79
4.1.1 Principaux éléments d'une expérience en phase gazeuse . . . 79
4.1.1.1 La source ESI . . . 79
4.1.1.2 Le spectromètre de masse en tandem . . . 82

4.1.2 Caractéristiques du système laser 89
4.1.2.1 Le Système amplificateur 89
4.2 Fragmentation des peptides 90
4.3 Résultats 93
4.3.1 Spectre de masse Q_1 93
4.3.2 Spectres CID et LID de [(35-50) NCp7], $3H^+$ 93
4.3.2.1 Région de faible rapport m/z : de 100 à 300 m/z 95
4.3.2.2 Région de rapport m/z central : de 300 à 630 m/z (Fig.4.17 et 4.18) . . . 104
4.3.2.3 Région de rapport m/z élevé : de 650 à 1000 m/z (Fig.4.19) 107
4.3.3 Effet du Zinc sur les spectres CID et LID de [(35-50)NCp7], $3H^+$ 107
4.4 Résumé et perspectives 110

5 Conclusion **116**

Table des figures

1.1 Illustration du cycle viral 3
1.2 Les 8 principales étapes de la Transcription Inverse 4
1.3 Composition de la protéine de Nucléocapside 7 5
1.4 Structures secondaires des tiges-boucles (-)PBS et Δ(-)PBS 7
1.5 Comparaison des structures de Δ(-)PBS : (a) sous forme libre, (b) complexée avec (12-55) NCp7 8
1.6 Mécanismes proposés par Godet & Al. [1] pour l'appariement des structures (-)/(+)PBS . 9
1.7 Séquence du variant «simple doigt de Zinc» (35-50)NCp7 : 13

2.1 Courbes d'efficacité de transmission des éléments liés à la détection (a) Caméra CCD, *Princeton Instrument* (modèle : Spec 10, back illuminated, courbe verte en pointillés). (b) Réseau : *Jobin Yvon* (modèle : 510 18110) 21
2.2 Indices de réfraction ordinaire (noir) et extraordinaire (rouge) dans un cristal de BBO (uniaxe négatif) à la température de 20° pour $\theta = 29°$. 22
2.3 Définition des angles d'accord de phase. 24
2.4 Représentation vectorielle de l'accord de phase 24
2.5 Courbes d'accord de phase pour la DFG de type II dans un cristal de BBO en fonction de l'angle α pour un faisceau porte à 800 nm. 25
2.6 Efficacité de conversion relative pour différents angles d'accord de phase avec λ_G=800 nm, $\alpha = 4°$ et L=400 μm 28
2.7 Efficacité de conversion relative pour différentes épaisseurs de cristal avec $\lambda_G = 800$ nm, $\alpha = 4°$ et $\theta = 40°$. 28
2.8 Efficacité de conversion relative pour différents angles de non-colinéarité et à profondeur de modulation constante avec $\lambda_G = 800$ nm 28
2.9 Efficacité de conversion relative pour une gate à 800 ou 1300 nm et à profondeur de modulation constante. 28

2.10 Effet de la géométrie d'interaction sur l'efficacité de conversion relative dans un cristal de BBO type II. 28
2.11 GVD pour quelques matériaux optiques usuels (document Melles Griot). 29
2.12 Augmentation de la durée d'une impulsion de 40 fs au cours de sa propagation dans de la silice pour trois longueur d'onde différentes. 29
2.13 Effet de la GVD 29
2.14 Dégradation de la résolution temporelle sous l'effet de la GVM 30
2.15 Evolution temporelle des faisceaux fluorescence et gate 31
2.16 Représentation du désaccord du front d'impulsion en géométrie non-colinéaire. 31
2.17 Dispositif d'accord des fronts d'onde de gate et de fluorescence 32
2.18 Schéma Global de l'expérience de Fluorescence Ultra-rapide Résolue en Temps par Down-Conversion de Fréquences 33
2.19 Caractéristiques de l'impulsion délivrée par le NOPA 35
2.20 Positionnement de l'échantillon dans le portoir 36
2.21 Alignement des point focaux des paraboles 37
2.22 Superposition des caractéristiques spectrales du PPO avec celle du dispositif de DFG. . . 38
2.23 Performances du montage de down-conversion résumées autour d'une expérience faite avec du 2,5 Diphényloxazole. 40
2.24 Analyse qualitative des signaux DFG de la fluorescence émise par le PPO. 41
2.25 Cinétiques de fluorescence du PPO, mesurées à 370 nm. 42
2.26 Résultats obtenus à partir des paramètres énoncés dans le paragraphe 2.6 43

3.1 Formation d'un complexe non fluorescent entre le la 2Ap et le quencher à l'état fondamental 47
3.2 Photoexcitation de la 2AP : intermédiaire de Franck-Condon 49
3.3 Photoexcitation de la 2Ap : mécanisme de transfert de trou (oxydatif) 49
3.4 Photoexcitation de la 2AP : mécanisme de transfert d'électron (réducteur) 49
3.5 Rappel des différents composés biochimiques utilisés 51
3.6 Cinétique de déclin d'anisotropie de fluorescence pour la 2 Ap à l'état libre 66
3.7 Comparaison des cinétiques de déclin d'anisotropie de la 2AP libre et introduite au sein de Δ(-)PBS, en position 6 (rouge), 8 (bleue) et 10 (verte). 67
3.8 Résultats de la mesure d'anisotropie résolue en temps 69
3.9 Superposition des cinétiques de déclin des ODNs Δ(-)PBS-2Ap(8, 10) et de la 2Ap libre, en solutions dans de l'HEPEs et du glycerol 70
3.10 Histogrammes des couples (temps de vie de fluorescence / amplitudes) dans le glycerol . . 72
3.11 Éléments d'anisotropie fondamentale 74
3.12 Représentation de l'effet de photo-sélection par une excitation verticale et horizontale . . 76

4.1 Principaux éléments d'un appareil dédié à la spectroscopie MS/MS 80
4.2 A gauche : Photographie de la source ESI en action. A droite : Éléments de la source. . . 81
4.3 Mécanismes de formation d'espèces chargées par ESI 82
4.4 Potentiels électrostatiques ϕ utilisés pour le guidage des ions moléculaires : 84
4.5 Diagramme de stabilité dans le système de coordonnées (a_z, q_z) 85
4.6 Diagramme de stabilité dans le système de coordonnées (a_z, q_z) : 86
4.7 Diagramme de stabilité dans le système de coordonnées (a_z, q_z) : 87
4.8 Présentation du montage expérimental dans sa globalité : 88
4.9 Fonctionnement d'un piège ionique multipolaire : 89
4.10 Présentation des fragments les plus probables du squelette peptidique : 92
4.11 Analyse de la composition des solutions pulvérisées : 94
4.12 Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7)$^{3+}$: zoom sur la région de faible m/z : . 96
4.13 Mécanisme séquentiel de production de l'ion 129 m/z, d'après les étapes esquissées dans [2]. 99
4.14 Spectres CID de (35-50)NCp7 à différentes énergies cinétiques : 100
4.15 Un des nombreux mécanismes possibles permettant l'obtention des fragments 129, 159, 668 m/z : 101
4.16 Storage-scan des ions 129 et 146 m/z 105
4.17 Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7)$^{3+}$: zoom sur la région entre 300 et 600 m/z : 106
4.18 Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7)$^{3+}$: zoom sur la région autour de 600 m/z : 108
4.19 Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7)$^{3+}$: zoom sur la région de rapport m/z élevé : 109
4.20 Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7+Zn)^{3}+ : zoom sur la région de faible m/z : 112
4.21 Histogramme des fragments dérivés du tryptophane : 113
4.22 Histogramme des fragments dérivés des extrémités du squelette et de la lysine 113
4.23 Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7+Zn)$^{3+}$: zoom sur la région entre 300 et 600 m/z 114
4.24 Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7+Zn)$^{3+}$: zoom sur la région autour de 600 m/z 115
4.25 Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7+Zn)$^{3+}$: zoom sur la région de rapport m/z élevé 115

Liste des tableaux

2.1 Présentation des différents dispositifs de spectroscopie de fluorescence résolue en temps . 17

2.2 Polarisations des faisceaux pour l'accord de phase dans un cristal uniaxe. 23

3.1 Paramètres de fluorescence statique et résolue en temps pour 2Ap et Δ(-)PBS-2Ap(6, 8 et 10) 52

3.2 Paramètres de d'anisotropie fluorescence pour 2-Ap et Δ(-)PBS-2Ap(6, 8 et 10) 53

3.3 Dynamiques d'anisotropie pour la 2Ap libre et les ODN Δ(-)PBS-2Ap(6, 8 et 10) 69

4.1 Spectre de masse 4.11 : Comparaison entre les masses théoriques et les fragments assignés 95

4.2 Fragments b, y observés, issus du clivage des extrémités du peptide 95

4.3 Fragments spécifiques dérivant du Tryptophane 95

4.4 Principales voies de fragmentation de $TrpH^+$ par CID, d'après [3] 97

4.5 Description des canaux de dissociation du $TrpH^+$, en fonction du site de transfert de l'électron photo-induit par excitation de l'indole à 266 nm 103

Nomenclature

2Ap 2-Aminopurine (En anglais : 2-Aminopurine), 46

A Adénine (En anglais : Adenine), 49

ADN Acide DésoxyriboNucléique (en anglais : desoxyribonucleic acid), 1

AN Acide Nucléique (en anglais : Nucleic acid), 5

ARN Acide RiboNucléique (En anglais : RiboNucleic Acid), 1

ATP Adénosine Tri Phosphate, 6

BBO Béta borate de baryum (En anglais : Beta-barium BOrate), 20

C Cytosine (En anglais : Cytosine), 50

CCD Dispositif à transfert de charge (En anglais : Charge-Coupled Device), 17

CID Dissociation induite par collision (En anglais : Collision Induced Dissociation), 2

CPA Chirped Pulse Amplification, 90

CT Transfert de charge (En anglais : Charge Transfer), 10

DC Convertion vers les longueurs d'onde de faibles énergies (En anglais : Down-Convertion), 16

DFG Génération d'une différence de fréquences (En anglais : Difference Frequency Generation), 16

Désaccord de vitesse de group (En anglais : Group Velocity Mismatch)), 28

ESI Ionisation par électrospray (En anglais : ElectroSpray Ionisation), 2

ET Transfert d'électron (En anglais : Electron Transfer), 11

FWHM Largeur à mi-hauteur (En anglais : Full Width at Half Maximum), 27

G Guanine (En anglais : Guanine), 49

GVD Dispersion de vitesse de groupe (En anglais : Group Velocity Dispersion), 28

HEPES Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique, 51

HOMO Orbitale moléculaire haute occupée (En anglais : Highest Occupied Molecular Orbitals), 48

HT Transfert de trou (En anglais : Hole Transfer), 11

IR Lumière dont la longueur d'onde se situe dans l'Infra Rouge. (On considère l'Infra Rouge moyen comme étant compris entre 1.4 et 3 μm), 20

IRF Fonction de réponse instrumentale (En anglais : Instrument Response Function), 18

LID Dissociation induite par laser (En anglais : Laser Induced Dissociation), 2

LUMO Orbitale moléculaire basse vacante (En anglais : Lowest Unoccupied Molecular Orbitals), 48

m/z Ratio masse sur charge, 79

MALDI Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation, 2

MS/MS Spectrométrie de masse en tandem, 79

NCp7 Protéine de Nucleocapside 7 (En anglais : NucleoCapsid Protein 7), 2

NOPA Amplificateur paramétrique optique non-colinéaire (En anglais : Non collinear Optical Parametric Amplifier), 34

OD Densité optique (En anglais : Optical Density), 18

ODN Oligodésoxyribonucléotides (En anglais : OligoDesoxyrioNucleotides), 52

PBS Site de Liaison de l'amorce (En anglais : Primer Binding Site), 50

Phe Phénylalanine (En anglais : Phenylalanine), 7

PMT Tube photomultiplicateur (En anglais : PhotoMultiplier Tube), 17

PPO 2,5-Diphenyloxazol, 16

Q Quencher, 47

QY Rendement quantique (En anglais : Quantum Yield), 48

RMN Résonance Magnétique Nucléaire (En anglais : Magnetic Nuclear Resonnance), 52

RRKM Théorie de Rice Ramsperger Kassel Marcus, 90

RT Transcription inverse (En anglais : Reverse Transcription), 2

S/N Rapport Signal sur Bruit (En anglais : Signal to Noise ratio), 16

T Thymine (En anglais : Thymine), 50

T_m Température de fusion (En anglais : Melting Temperature), 52

TCSPC Time Correlated Single Photon Counting, 11

TRES Spectres d'émission résolus en temps (En anglais : Time Resolved Emission Spectra), 17

Trp Tryptophane (En anglais : Tryptophan), 7

$TrpH^+$ Tryptophane protonné, 97

UV Lumière dont la longueur d'onde se situe dans l'Ultra Violet. (On considère ici uniquement l'UV proche , de 200 à 380 nm), 16

VIH Virus de l'Immunodéficience Humaine (En anglais Human Immunodeficiency Virus), 2

Introduction Générale

Les molécules biologiques se composent d'un assemblage d'éléments plus ou moins réactifs chimiquement parlant. Il est de notoriété commune que ce qui fait la spécificité de ces «building blocks» réside dans l'adoption de structures secondaires et tertiaires, permettant, par exemple, l'émergence de sites actifs pour la reconnaissance d'éventuels substrats d'intérêts. Au modèle classique rigide de type «clé-serrure», introduit par Fisher en 1894 [4], s'est progressivement insinué des visions tenant compte d'une dynamique structurelle, comme la notion «d'ajustement induit», soulignée par Koshland en 1958 [5] ou par exemple l'allostérie. Les bio-molécules sont en effet flexibles et dans l'évolution de leur conformation réside une partie de la spécificité et de l'efficacité de la réaction chimique.

La problématique de la flexibilité des bio-molécules prend tout son sens lorsque l'on s'intéresse aux mécanismes d'interactions entre protéines et acides nucléiques. Ces derniers forment tout un pan de la biologie moléculaire car ils concernent, par exemple, des processus aussi importants que la réplication, la transcription ou le stockage de l'ADN dans les cellules, soit autant de phénomènes qui nécessitent à la fois une spécificité de reconnaissance, une liaison, une déstructuration, et une libération du substrat, le tout avec un parfait minutage. S'il est clair que la proximité des enzymes peut influer sur la conformation des oligonucléotides (ODNs) d'intérêt [6], la séquence intrinsèque de ces derniers joue également un rôle dans la manière dont les bases seront présentées à l'environnement [7]. Cela concerne bien entendu les nucléotides simples brins (ARN/ADNs) mais également doubles brins. De ce fait, on ne peut parfaitement appréhender une interaction proteine-ODN sans également envisager l'étude des caractéristiques structurales et dynamiques intrinsèques des différents protagonistes de la réaction. Parmi les outils à disposition de l'expérimentateur, la cristallographie aux rayons X ainsi que la spectroscopie RMN ont longtemps été des appareillages de choix pour étudier la structure des molécules. Cependant, la première ne fournit que peu d'informations sur la dynamique des composés examinés, alors que la seconde donne principalement accès à des informations locales, mais peine à définir des comportements globaux, telle la courbure des ODNs ou leurs mécanismes segmentaires.

Par flexibilité, nous entendons la capacité inhérente d'une molécule à posséder un paysage énergétique conformationnel complexe. On peut vouloir dès lors étudier le degré de population et / ou les cinétiques d'inter-conversion entre différents minimum locaux. Ce genre de tâche est confrontée à deux obstacles majeurs, à savoir l'échelle temporelle des mouvements moléculaires (pouvant s'étendre de la milliseconde jusqu'à la dizaine de picosecondes, rendant les techniques sus-mentionnées complètement obsolètes pour capter les phénomènes ultracourts) ainsi que la séparation entre les propriétés dues aux interactions intermoléculaires et celles issues des caractéristiques intrinsèques du sujet d'investigation.

Lorsque l'on peut se permettre de travailler en phase condensée, les spectroscopies d'absorption et de fluorescence résolues en temps se sont avérées de fantastiques outils pour capter les dynamiques

moléculaires les plus courtes [8, 9]. Dans ce genre d'expériences, un laser femtoseconde excite un chromophore fluorescent, soit naturellement présent au sein de la molécule, soit artificiellement incorporé. Les interactions entre ce dernier et son environnement local affectent la durée de vie de l'état excité du chromophore : si la macro-molécule au sein duquel est implémentée la sonde fluorescente est sujette à une hétérogénéité conformationnelle, alors le fluorophore va expérimenter des environnements locaux différents qui se traduiront par des cinétiques de relaxation de type multi-exponentielles [10]. Résoudre ces cinétiques de la manière la plus précise possible tout en attribuant les caractéristiques des déclins à des données de dynamiques structurelles représentent les enjeux principaux de ce type d'expériences [11, 12].

Lorsque l'on désire accéder uniquement aux propriétés propres de la molécule, parfois dans un but de prédiction, alors la spectroscopie en phase gazeuse apporte vraisemblablement les meilleures données, permettant une comparaison avec la théorie [13]. Le problème du transfert de protéines ou d'acides aminés de grandes tailles en phase gazeuse a été résolu avec l'implémentation de sources telles que l'électrospray (ESI [14]) ou le MALDI [15]. La principale méthode d'analyse utilisée en phase gazeuse est la fragmentation. L'activation peut se faire par chauffage vibrationnel, notamment sous la forme de collisions avec un gaz neutre, ou par excitation électronique, telle l'absorption d'un photon UV. En fonction de la longueur d'onde du faisceau, différentes transitions sont accessibles, allant des liaisons peptidiques en dessous de 200 nm, aux électrons contenus dans les cycles aromatiques dans le domaine UV-visible. Des molécules plus ou moins contraintes par des ions peuvent présenter spectres de photo-fragmentation relativement différents. Il a été invoqué que l'augmentation de la rigidité du système pouvait affecter la position et l'intersection des surfaces de potentiel des différents états électroniques, et donc les dynamiques de relaxation auxquelles sont sensibles ces méthodes [16].

Le travail faisant l'objet de ce manuscrit met en avant l'utilisation de ces deux méthodes dans un contexte biologique bien précis : celui de la rétro-transcription du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Le passage d'un ARN simple brin vers un ADN viral bicaténaire, prêt à être inséré dans le génome de la cellule hôte, fait intervenir des mécanismes d'interactions protéines-acides nucléiques à de nombreuses reprises. L'une d'elle, appelée second saut de brin, nécessite l'association d'une protéine à doigt de zinc appelée Nucleocapside 7 (NCp7) du VIH avec une séquence ADN de type tige-boucle nommée Primer Binding Site (PBS). D'un coté, une nouvelle expérience de fluorescence résolue en temps, en utilisant le principe de la génération de fréquence différence DFG, a été mise en place. Elle est adaptée à l'étude de cinétiques de déclin de composés biologiques, excités et émettant dans l'UV, et sera mise à contribution pour tenter de mieux caractériser, à l'échelle sub-picoseconde, les dynamiques locales de la boucle. D'un autre coté, nous utiliserons les techniques de Dissociations Induites par Collisions et Induites par Laser (CID et LID) en phase gazeuse, afin d'évaluer les effets que peuvent avoir le repliement de NCp7 sur les canaux de fragmentation de la molécule.

Le premier chapitre évoque un rappel sur le contexte biologique de la thèse, nécessaire afin de mieux

appréhender les problématiques du sujet. Un bref état de l'art sera ensuite proposé pour les deux approches. Le second chapitre est uniquement dédié à la présentation du montage de fluorescence résolue en temps de type down conversion. Sa mise en place ayant en compté pour une bonne partie de ce travail de thèse, son fonctionnement sera donc expliqué en détails. Le troisième chapitre reprend les résultats de fluorescence résolue en temps obtenus sur PBS. Enfin, le quatrième traite de manière indépendante de l'étude du repliement de NCp7 en phase gazeuse. Une description détaillée du montage sera établie dans un premier temps, suivie d'une analyse des spectres de fragmentation obtenus.

Chapitre 1

État de l'art du projet

Sommaire

1.1 Contexte biologique **2**

1.1.1 La protéine de Nucléocapside 7 du virus HIV 3

1.1.1.1 Structure de la NCp7 3

1.1.1.2 NCp7 : Une protéine chaperonne d'acides nucléiques 5

1.1.1.3 Exemple de rôle : Implication de NCp7 dans le transfert de brin (+) de la transcription inverse 7

1.2 Motivations de la thèse **8**

1.3 Approche A : Dynamique structurelle de Δ(-)PBS-2Ap(6, 8 et 10) **10**

1.3.1 Utilisation d'une sonde extrinsèque de fluorescence : la 2Ap 10

1.3.2 Le quenching de fluorescence de la 2Ap 10

1.3.3 Informations potentielles apportées par le quenching de fluorescence 11

1.4 Approche B : CID - LID de NCp7 [35-50] sous forme libre ou repliée . . . **12**

1.4.1 Quelle technique ? 12

1.4.2 Intérêt d'une fragmentation en phase gazeuse 14

1.4.3 Pourquoi NCp7 ? 14

Le but de ce chapitre introductif est triple. Dans un premier temps, il s'agit d'effectuer un tour d'horizon rapide du contexte biologique de la thèse. Le lecteur intéressé par plus de détails pourra s'orienter vers des ouvrages de références en microbiologie [17], ou spécialisés en virologie [18]. Un point de vue graduellement tourné vers le microscopique sera adopté : à partir d'une très brève description externe du virus, nous nous intéresserons à une étape particulière du cycle viral appelé transcription inverse (RT, pour ensuite se focaliser sur l'interaction de la protéine NCp7 avec la séquence PBS du brin d'ADN(-) au cours du second saut de brin de la RT. Nous tenterons ensuite d'aborder les problématiques relatives au travail de thèse pour finir par une description rapide des différentes approches mises en place.

1.1 Contexte biologique

Le VIH-1, ou Virus de l'Immunodéficience Humaine 1, appartient à la classe des Retroviridae, sous-famille des Orthoretrovirinae, et au genre des Lentivirus. Il possède donc une enveloppe, entourant un feuillet protéique que l'on appelle matrice, elle même contenant en son centre une capside protéique. A l'intérieur de cette dernière se situe son génome, composé d'ARN monocaténaire, diploïde et à polarité positive. Ce dernier est recouvert et protégé par environ 1500 à 2000 unités de protéines de nucléocapside (NCp7). On défini la nucléocapside comme étant l'ensemble formé par la capside et du génome viral. Elle renferme, entre autres, des enzymes virales indispensables à la réplication du virus, comme la rétrotranscriptase, la protéase et l'integrase, ainsi que des protéines et ARNt d'origines cellulaire.

En tant que virus, le VIH-1 a besoin d'une cellule hôte dont il utilise les constituants pour se multiplier. La figure 1.1 représente son cycle viral, à savoir les différents stades permettant, à partir d'une particule infectieuse et d'une cellule hôte, d'engendrer la production de nouveaux virions matures [19]. Cette stratégie implique à la fois la pénétration du virion dans le cytoplasme de la cellule, puis la synthèse d'un ADN complémentaire (ADNc) proviral à partir de la matrice d'ARN génomique (ARNg), au cours d'un processus appelé Transcription Inverse ou Rétrotranscription (RT). Le rétro-transcrit ADNc proviral sera ensuite intégré au sein de l'ADN cellulaire. La phase post-intégrative comprend à la fois la transcription de l'ADNc intégré en ARNm, la synthèse de protéines virales par la machinerie cellulaire, l'assemblage et le bourgeonnement de nouvelles particules virales.

Au coeur du cycle viral se situe donc la RT. C'est un processus complexe, segmenté en différents stades (cf Fig.1.2), catalysé par une enzyme appelée rétrotranscriptase (RTase) et facilité par la NCp7 [20]. La conversion de l'ARNg en ADNc proviral nécessite deux transferts de brins. Le contexte biologique de notre thèse s'articule essentiellement autour du second : afin de permettre l'élongation complète du brin d'ADN (+) et d'obtenir un ADNc proviral bicaténaire, les brins (-) et (+) doivent s'hybrider au niveau de leur séquence PBS respective. NCp7, de par son activité chaperonne d'acides nucléiques (ANs), est

sensée stimuler l'hybridation des deux séquences.

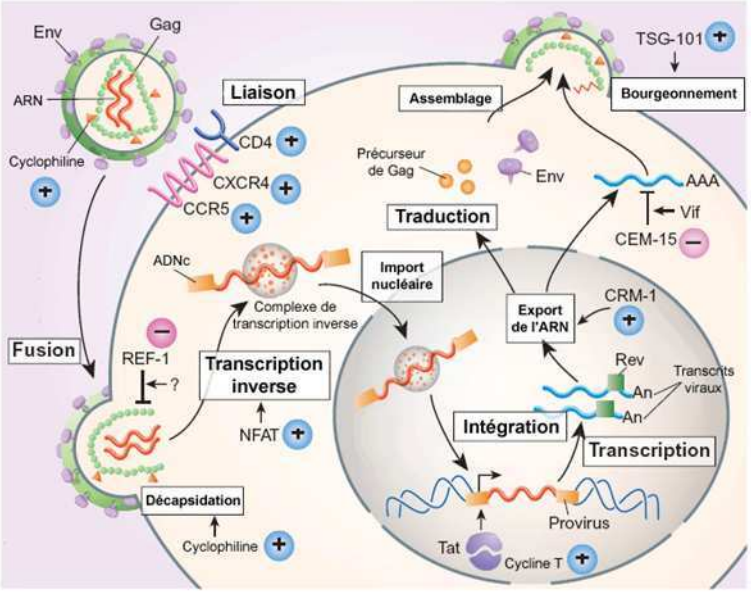


Figure 1.1 – Illustration du cycle viral

1.1.1 La protéine de Nucléocapside 7 du virus HIV

1.1.1.1 Structure de la NCp7

La NCp7 est issue de la maturation du précurseur polyprotéique Pr55 codé par le gène Gag [22]. Elle est composée de 55 acides aminés [23, 24]. NCp7 est une protéine dont les domaines N_{term} et C_{term} sont fortement basiques et est caractérisée par la présence de deux doigts de Zinc de séquence : -Cys-X_2-Cys-X_4-His-X_4-Cys- également appelés motifs CCHC (Fig.1.3). Ici, X signifie la présence d'autres acides aminés à l'exception de ceux déjà mentionnés dans la séquence. Cette structure permet de coordonner de façon tétraèdrique un atome de zinc (via les groupements thiols des cystéines et amino de l'histidine) avec une affinité élevée (10^{-13} M) [25, 26, 27], selon un mécanisme présentant plusieurs états intermédiaires [28]. La région "linker" entre les deux CCHC, de séquence RAPRKKG est également très basique. De manière paradoxale, le linker ainsi que les régions N_{term} et C_{term} sont supposés présenter un caractère désordonné [29], alors que la liaison avec le zinc engendre une conformation des doigts bien définie [30]. Linker et motifs CCHC sont très conservés au sein des NCs de différents rétrovirus [31, 32]. Lorsque l'on étudie ce motif en y ajoutant des mutations ponctuelles, notamment en remplaçant une histidine par une cystéine, l'affinité de NCp7 pour l'ARNg et pour l'ARN_t^{Lys3} s'en trouve grandement diminuée aboutissant à la formation de particules non infectieuses [33, 24]. Le résidu Pro^{31} au sein du "linker" semble jouer un rôle critique dans le rapprochement des deux doigts de zinc [34]. Ces derniers peuvent se replier de telle sorte qu'un plateau hydrophobe soit généré à la surface des deux doigts, impliquant les résidus Val^{13}, Phe^{16}, Thr^{24}, Ala^{25} pour le doigt proximal, et Trp^{37}, Gln^{45} et Met^{46} pour le doigt distal.

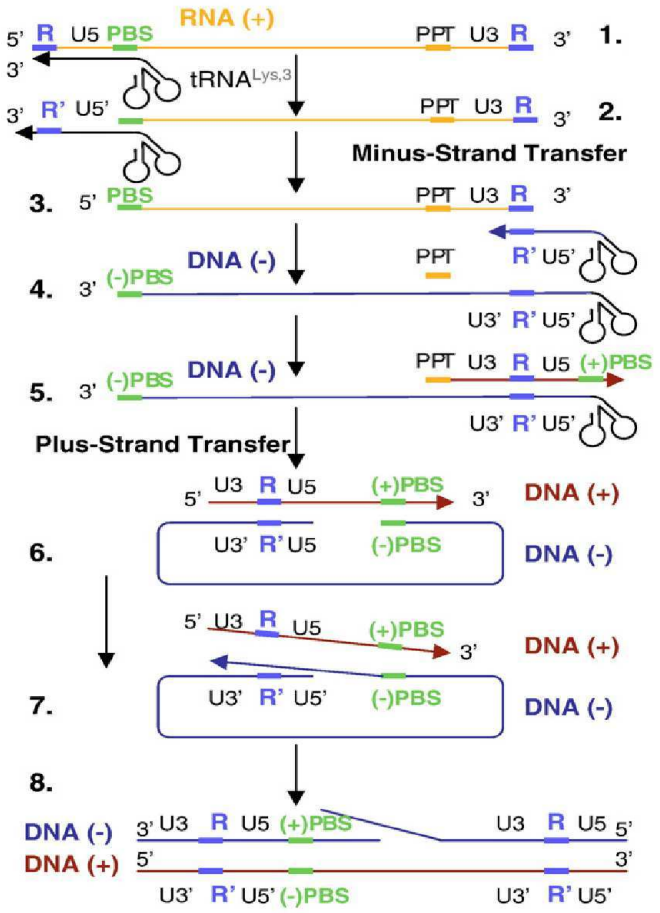


Figure 1.2 – Les 8 principales étapes de la Transcription Inverse - Schéma issu de [21].

1. Hybridation de la séquence PBS (Primer Binding Site) avec un ARNt^{Lys,3} d'origine cellulaire.

2. Association de la Retro-Transcriptase virale (RTase) au complexe ARN/ARN et initiation de la synthèse du brin (-) de l'ADN, depuis la séquence PBS jusqu'à l'extrémité 5'. Le brin d'ADN(-) rétro-transcrit est appelé ADN(-) strong stop ((-)ADN-ss). Dégradation de la matrice ARN correspondante par la RTase, grâce à son activité ribonucléase H (RNase H).

3. Transfert du brin d'ADN néo-synthétisé vers l'extrémité 3' du génome viral, nouvel appariement à l'ARN(+) via leur séquence R complémentaires. Cette étape est appelée premier saut de brin, ou transfert du brin (-).

4. Élongation du brin transféré et dégradation de la matrice ARN par la Rtase. A la fin de cette phase, la matrice ARN est complètement hydrolysée, à l'exception d'une région appelée PPT, riche en purines.

5. PPT sert d'amorce à la synthèse du brin ADN(+), contenant les codons (+)U3, R, (+)U5 et (+)PBS.

6. Hydrolyse de L'ARNt^{Lys,3}, ce qui permet un appariement de l'ADN(+) vers l'extrémité 3' de l'ADN(-) via la complémentarité de leur séquence PBS. Il s'agit du second saut de brin, ou transfert du brin (+).

7. Les deux séquences vont ensuite être complétées : de (-)PBS jusqu'à (-)U3 pour le brin (-) et de (+)PBS jusqu'à (+)U3 pour le brin (+).

8. Le résultat final est donc la présence d'un ADN bicaténaire, avec à chaque extrémité une séquence répétée type U5-R-U3 de 5' vers 3' pour l'ADN (-) et U3-R-U5 de 5' vers 3' pour l'ADN(+).

Parmi ces résidus, Phe[16] et Trp[37] peuvent interagir par interactions d'empilement avec des guanines (Gs) [35, 36]. Une mutation de ces résidus provoque la formation de particules virales non infectieuses [37].

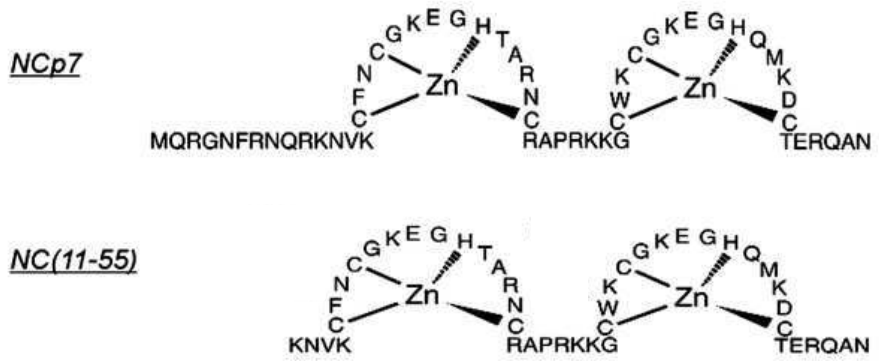


Figure 1.3 – Composition de la protéine de Nucléocapside 7

1.1.1.2 NCp7 : Une protéine chaperonne d'acides nucléiques

NCp7 appartient à la famille des protéines à activité chaperonne. Ces dernières possèdent la particularité de permettre à des systèmes possédant des configurations métastables de se réarranger pour atteindre les conformations thermodynamiquement les plus favorables [38]. De nombreux ANs, notamment les ARNs dits "fonctionnels", ont une activité biologique qui dépend de leur configuration secondaire voire tertiaire. En effet, du fait de leur structure monocaténaire, ces derniers peuvent se structurer spontanément par le biais d'hybridations intramoléculaires. La plupart du temps, ce repliement aboutit à la formation de configurations énergétiques intermédiaires, ie, des conformations alternatives proches de la structure native, mais dénuées de fonction biologique. Dans la nomenclature des paysages énergétiques, ce sont autant de minima locaux, véritables pièges énergétiques, nécessitant le franchissement d'une barrière cinétique pour se replier correctement [39, 40]. Concrètement, l'activité chaperonne d'ANs se traduit par la capacité de la molécule à se lier spécifiquement ou non à des structures d'ANs variées, à déstructurer les configurations liées aux minima locaux énergétiques, puis à faciliter l'hybridation de structures nativement complémentaires.

La liaison de NCp7 sur les ANs peut se faire de manière non-spécifique ou spécifique. La première est principalement assurée grâce aux domaines basiques de NCp7, via des liaisons électrostatiques avec les ANs, fortement dépendantes des conditions salines [41, 42]. En revanche, la seconde est principalement permise via les AAs Phe[16] et Trp[37] du plateau hydrophobe. Les motifs de liaisons site spécifiques sont la plupart du temps des séquences riches en UG, TG au sein de structures simple brins, ou bien riches en GXG au sein de boucles simple brins. [43, 44, 45, 46, 47, 48]. Dans la majorité des cas, le résidu Trp[37] semble avoir un rôle prépondérant en s'empilant préférentiellement avec les guanines des motifs [29].

L'activité de déstabilisation de NCp7 est portée par les doigts de zinc de la protéine [49]. Cette dernière, somme toute très modeste, est reliée à la stabilité intrinsèque des ANs cibles, puisque NCp7 déstructure principalement les séquences contenant des "bulges" où des mésappariements ([50, 51]) et relativement peu les états stables. Ceci à pour conséquences un lissage du paysage énergétique, ne contenant plus qu'un seul puits de potentiel affilié au repliement optimal. Le modèle de déstabilisation qui semble prévaloir actuellement est un modèle qui ne dépend pas de l'ATP. Il se baserait sur un mécanisme d'échange d'entropie [52] entre une protéine chaperonne initialement désordonnée et la molécule cible d'ARN , structurellement ordonnée, même sous une forme non-native. La liaison entre ces deux partenaires favoriserait un échange réciproque d'entropie aboutissant à une transition désordonnée → ordonnée pour la protéine AN chaperonne, et inversement pour la molécule d'ARN. Chaque cycle de liaison / libération de NCp7 permettrait à l'AN de se déplacer le long de son espace conformationnel et ainsi de s'approcher de son état structurel natif.

NCp7 (principalement via les acides aminés basiques de sa queue N_{term}) peut agréger de manière non spécifique les acides aminés préalablement déstructurés et favoriser leur appariement.

- La concentration des acides nucléiques est possible car NCp7 peut écranter efficacement les charges + portées par les phosphates des ANs et ainsi minimiser leur répulsion [53].
- L'hybridation des séquences complémentaires dépend de la concentration de NCp7 et est optimale à un degré d'occupation allant de (1 : 15 nt) à (1 :7 nt) [29]. Lorsque ce ratio est plus faible, NCp7 interagit avec les ANs de manière spécifique et ne présente pas d'activité d'hybridation. Lorsque NCp7 est très saturante (1 :5 à 1 :1 nt), elle entoure et compacte complètement les ANs, ce qui les protège et les fige. Dans ce cas, l'appariement de base est très limité [54].

L'activité chaperone d'acide nucléique se caractérise donc par la formation de complexes nucleo-protéiques de haut poids moléculaires à forte mobilité intrinsèque. Les cinétiques rapides de liaison/libération des complexes NCp7-ANs, ainsi que la modulation de la concentration des partenaires réactionnels sont autant de phénomènes pouvant faciliter les interactions natives d'hybridation [55, 56].

Via son activité chaperone, NCp7 occupe de nombreux rôles au sein du cycle cellulaire : elle participe notamment à la sélection, dimérisation puis à l'encapsidation du génome viral, et intervient au cours de la rétrotranscription à différentes étapes (initiation et appariement de l' ARNt^{Lys,3}, premier et second saut de brin, fin de la RT en intervenant sur la formation de l'ADN central flap) [57]. La multiplicité de ces rôles est à la fois liée à sa capacité d'interagir de manière spécifique ou non avec les séquences d'ANs, mais aussi à la nature et du repliement de ces dernières. Ce sont des paramètres intrinsèquement dynamiques qui font que les constantes d'affinités de NCp7 sont spécifiques du contexte dans laquelle elle

est employée, et peuvent varier de plusieurs degrés d'amplitude.

1.1.1.3 Exemple de rôle : Implication de NCp7 dans le transfert de brin (+) de la transcription inverse

Lors du second saut de brin de la RT (Cf : Fig.1.2, étape 6), l'hydrolyse de l'amorce ARNt^{Lys,3} déclenche l'appariement de (-)PBS à (+)PBS. Ce dernier est stimulé par l'activité chaperonne de NCp7, qui, comme nous l'avons vu précédemment, consiste préalablement à lier puis déstructurer l'AN. Il a été démontré que la liaison de NCp7 sur PBS est spécifique et que les changements de conformations induits par la chaperonne sont à l'origine d'un mode particulier d'hybridation entre les deux PBS.

La séquence PBS se compose de 18 acides aminés et présente, sous sa forme ARN ou ADN simple brin une structure secondaire en forme de tige-boucle accompagnée d'une extension simple brin en 3'. La tige contient 4 paires G-C, la boucle est formée par 5 nucléotides tandis que 4 constituent la queue 3' (Fig.1.4). Notre étude se focalise sur un variant de PBS appelé Δ(-)PBS (Fig.1.4). Ce dernier est identique à l'original, si ce n'est l'absence de la partie protubérante -GCCA- en 3'.

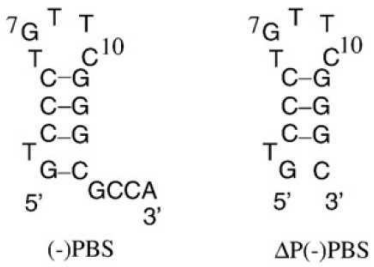


Figure 1.4 – Structures secondaires des tiges-boucles (-)PBS et Δ(-)PBS

In vitro, (+)PBS peut spontanément se lier à (-)PBS par l'intermédiaire de leur tiges respectives [38]. Simplement, NCp7 peut augmenter de près de 60 X le rendement d'association des deux séquences complémentaires [58]. Il a été montré que NCp7 chaperonne l'association des deux PBS au travers des boucles, sous la forme de «kissing-complexes» de type boucle-boucle. NCp7 possède deux sites de liaison sur Δ(-)PBS, l'un situé en 5' de la boucle, dans la partie haute de la tige, le second localisé au niveau 10-CGG-12 (contre 3 sites pour PBS, le dernier étant justement situé sur 5'-G(15)CCA(18)-3'). NCp7 interagit principalement avec le premier via deux acides aminés de son plateau hydrophobique, à savoir Phe^{16} et Trp37. La structure du complexe NCp7-Δ(-)PBS a été résolue par RMN [21], où il a été mis en évidence que les deux acides aminés précédemment mentionnés s'insèrent entre T6 et G7, dans une structure où G7 est fortement empilée avec Trp37. Cela aurait pour conséquences à la fois un retournement de T6 et G7 vers l'extérieur de la boucle, un étirement de cette dernière, une amélioration de l'accessibilité de

la séquence 8-TTC-10 et une déstabilisation de la paire de base 5C-G11 à proximité de la boucle (Fig.1.5).

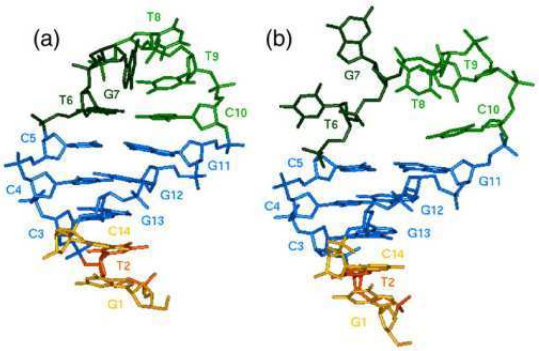


Figure 1.5 – Comparaison des structures de Δ(-)PBS : (a) sous forme libre, (b) complexée avec (12-55) NCp7 - Obtenues à partir d'expériences RMN-1H [21]. Les nucléotides représentatifs de la boucle sont colorés en vert, avec mise en valeur (vert foncé) des bases T6 et G7. Les paires de bases de la tige sont en bleu (de C3 à C5 et de G11 à G14) et en jaune (G1 et C14).

D'un point de vue dynamique, on constate une restriction drastique de la mobilité locale des bases au sein de la boucle [1]. De manière intéressante, la restriction de mobilité de la boucle dans une conformation déstructurée est complètement corrélées avec la capacité de NCp7 à orienter l'appariement via les boucles (Fig.1.6). Une mutation ponctuelle de NCp7 affectant l'intégrité du plateau hydrophobique empêchera l'appariement des deux PBSS par les boucles, mais NCp7 pourra tout de même accélérer l'appariement, mais de manière non spécifique, via les tiges [59] ; De façon surprenante, in vivo, cela conduit à la formation de particules virales non infectieuses [37]. La baisse de l'activité virale n'est pas liée à l'absence de synthèse d'ADN viral, mais plutôt à un mauvais contrôle du timing du processus de RT au sein du cycle viral, engendré par la perte de la spécificité de l'appariement des deux PBSs. NCp7 agit donc comme un alternateur de mécanismes, en empêchant la formation de dimères non spécifiques. La spécificité de l'appariement sous forme d'embrassement des boucles permet à la RT de se finir et d'aboutir à la synthèse d'un ADN bicaténaire viral valide, bien intégré dans le déroulement du cycle viral.

1.2 Motivations de la thèse

L'objectif de la thèse se place clairement dans le cadre expérimental énoncé dans le chapitre précédent. Il est certain que l'action déstructurante de NCp7 et la diminution de la dynamique de la boucle PBS se base avant tout sur des propriétés intrinsèques des deux participants. En se plaçant volontairement en amont de l'interaction NCp7-PBS, nous souhaitons aborder la thématique de l'étude de la flexibilité de ces deux structures, au travers de deux techniques d'analyse de pointe.

Ces techniques ont pour point commun un mécanisme similaire d'activation des molécules, l'absorp-

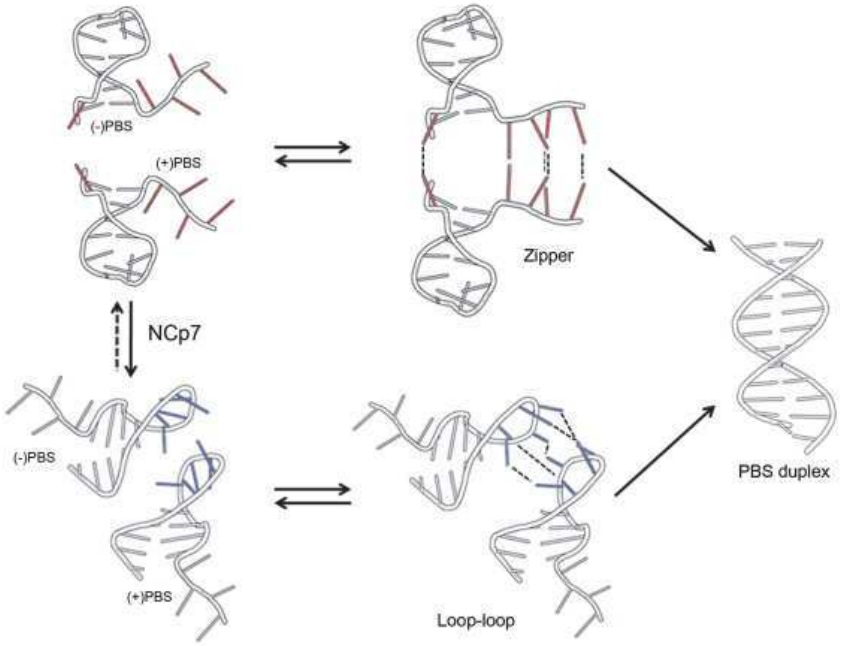


Figure 1.6 – Mécanismes proposés par Godet & Al. [1] pour l'appariement des structures (-)/(+)PBS - En l'absence de NCp7 (parcourt du haut), les bases azotées restent confinées à l'intérieur de la boucle et ne sont pas accessibles pour l'appariement. Ce dernier se fait probablement par l'intermédiaire de la tige, et notamment via les bases (en rouge) exposées (parties protubérantes) à la base de la tige. Par son activité chaperonne, NCp7 se lie à la boucle, déstabilise les bases, et contraint probablement la boucle dans cette conformation, ce qui est à l'origine du parcourt de type loop-loop kissing (en bas).

tion d'un photon UV, mais se différencient par l'étude des processus de relaxation des états excités. Elles nécessitent également l'utilisation de deux fluorophores. Idéalement, ces derniers sont natifs du système que l'on veut perturber, on parle alors de fluorophores intrinsèques. Lorsqu'ils sont greffés ou substitués dans la molécule d'intérêts, on parle de fluorophores extrinsèques.

Au sein de la première approche, nous utiliserons un fluorophore extrinsèque, nommé 2-aminopurine (2Ap), en tant que sonde locale, appliquée en position 6, 8 et 10 de la boucle de Δ(-)PBS. La fluorescence de 2Ap est fortement quenchée par les bases avoisinantes, et de ce fait, les cinétiques de déclins multi-exponentielles qui en résultent doivent permettre de mieux identifier les sous-états conformationnels possibles de la boucle. Appliquée à différentes positions, les données collectées doivent permettre de décrire globalement la flexibilité de la boucle. La nouveauté étant de pouvoir disposer d'un rapport signal à bruit et d'une résolution temporelle tels que l'intégralité des composantes de la dynamique de fluorescence puissent être résolues.

Au sein de la seconde approche, nous utiliserons les capacités de détection de la spectrométrie de masse, couplée à une méthode d'activation par collisions avec des atomes froids ou par absorption de photon UV pour interpréter les différences de fragmentations entre NCp7 libre ou repliée autour du Zinc. L'étude de cette protéine en phase gazeuse offre une excellente opportunité de comprendre l'effet du

repliement sur la répartition de l'énergie d'activation au sein d'un squelette peptidique, lorsque celui est contraint ou non.

1.3 Approche A : Dynamique structurelle de Δ(-)PBS-2Ap(6, 8 et 10)

1.3.1 Utilisation d'une sonde extrinsèque de fluorescence : la 2Ap

La 2-aminopurine (2Ap) est un analogue fluorescent de l'adénine (6-amino-purine). Elles diffèrent donc par la position de leur amine primaire respective. 2Ap pourrait de ce fait être qualifiée de sonde «semi-extrinsèque». A l'instar de son équivalent naturel, elle peut former deux liaisons hydrogènes avec la thymine, et s'empile donc très bien dans un duplexe d'ADN, en perturbant peu la structure initiale de ce dernier [60, 61]. La 2Ap peut être sélectivement excitée à 305 nm, ce qui correspond à une absorption décalée vers les longueurs d'onde rouges par rapport aux bases azotées naturelles (260 nm), et présente une émission centrée à 370 nm. Son rendement quantique de fluorescence est assez élevé (QY = 0.68 en solution) et varie en fonction son environnement proche. Ainsi, l'incorporation de la 2Ap au sein de duplexes d'ADN provoque une diminution de QY, selon un processus qualifié de «quenching» de fluorescence.

1.3.2 Le quenching de fluorescence de la 2Ap

Les causes de ce quenching ont rapidement été attribuées à un état empilement de la 2Ap avec ses bases voisines, ce qui a permis son utilisation en tant que sonde pour étudier la dynamique de fusion d'oligonucleotides [62]. Alors que la 2Ap seule présente un unique temps de vie de fluorescence de 10 ns en solution, son déclin devient fortement hétérogène une fois incorporée dans un environnement oligonucléotidique [63], hétérogénéité attribuée à divers degrés d'empilement.

Les possibilités remarquables de la 2Ap en tant que possible sonde structurelle locale ont donc engendrées un nombre conséquent d'études ayant pour but de caractériser les mécanismes de quenching de fluorescence entre la 2Ap et les bases avoisinantes. Étant donné l'impossibilité d'un transfert d'énergie entre la 2Ap excitée et les autres bases, le quenching de fluorescence a été attribué à un transfert de charge (CT). En se basant sur les potentiels d'oxydation des bases naturelles (G = 1.29 V < A = 1.42 V < C = 1.6 V < T 1.7 Volt par rapport à l'électrode à hydrogène normal (NHE)) [64] et de celle de la 2Ap (1.5 V vs NHE), un mécanisme de transfert de trou de la 2Ap* vers les guanines à premièrement été invoqué [65, 66]. Zewail et al. étudièrent de manière exhaustive la dépendance du mécanisme de CT sur la position de la 2Ap dans divers dinucléotides par spectroscopie d'absorption et de fluorescence transitoire femtoseconde (pompe-sonde et upconversion), pour suggérer une relaxation par transfert de trou lorsque la 2Ap est en contact avec des purines (A,G), et par transfert d'électron avec des pyrimidines (C,T) [67].

Cette assertion a peu après été en partie confirmée par des calculs théoriques TDDFT (Théorie de la Fonctionnelle de la Densité Dépendante du Temps) menés par Jean et Hall [68] sur des di-nucléotides empilés sous forme B (conformation naturelle des deux brins d'ADN), de séquences (5')-2Ap-X-(3') ou (5')-X-2Ap-(3') . Lorsque X correspond à une base pyrimidique, la transition verticale d'excitation se fait principalement vers un état S_2 de répartition électronique similaire à 2Ap*. Un état sombre usjacent S1 avec un fort caractère CT a également été mis en évidence. Le quenching s'effectuerait de manière dynamique, via conversion interne rapide de S_2 vers S_1. En revanche, lorsque X est une purine, les di-nucléotides présenteraient une délocalisation électronique partielle en S_0, à l'origine de transitions d'excitations à plus faibles forces d'oscillateur, typiquement rencontrées pour des processus de quenching statique. En étendant leur étude à une conformation type tri-nucléotides (5')-X-2Ap-X-(3'), ces derniers réaffirment finalement que ces deux processus ont lieu simultanément pour l'ensemble des séquences. La forme du CT (HT ou ET) dépendant des potentiels redox des bases avoisinantes [69].

3 ans plus tard, Wan et al. ont suggéré l'existence d'un nouveau canal de quenching, toujours par transfert de charge mais ayant lieu avant relaxation vers l'état vibrationnel le plus bas de l'état excité. Ils ont pour cela comparé les durées de vie ultracourtes de complexes covalents et non-covalents contenant la 2Ap et divers ODN (A, G, Deazaguanine) ou du tryptophane, dans des expériences d'absorption transitoire ou de fluorescence résolues en temps. En effet, la Up-conversion est uniquement sensible à la relaxation de l'état excité, alors que l'absorption transitoire permet en plus de mettre en évidence l'existence d'autres états sombres. Le fait que les cinétiques déconvoluées de la fonction de réponse instrumentale présentent à la fois une dépendance à ΔG ainsi qu'une intensité initiale plus faible que la 2Ap libre est à l'origine de leur conclusion sur le caractère «non-équilibré» du transfert. Pour finir, notons que les notions de CT et de quenching statique/dynamique seront abordées plus en détails au sein du Chapitre III.

1.3.3 Informations potentielles apportées par le quenching de fluorescence

La 2Ap a déjà été utilisée pour sonder la flexibilité de la boucle Δ(−)PBS, par mutations ponctuelles en position 6, 8 et 10 [1]. L'étude statique de la fluorescence a révélée une réduction du QY par rapport à la 2Ap libre en solution aqueuse, signalant un quenching de la 2Ap par les bases voisines. Ce dernier est site-spécifique et est plus prononcé pour PBS-2Ap(10), ce qui va de paire avec la proximité d'une guanine en G11, ie supposé le meilleur quencher [21]. L'orientation est telle que le mécanisme de quenching s'effectue de manière très efficace, ce qui n'est pas le cas en position 6 et 8, par rapport à G7. L'étude de la fluorescence résolue en temps, réalisée par TCSPC, a révélée des cinétiques de déclin hétérogènes, signatures de fluctuations de la boucle pendant le temps de vie de l'état excité, et probablement de CT intervenant dans des conformations restreintes. Entre 80 et 90% de l'information n'a pas été résolue, car se déroulant sur une échelle de temps inférieure à la résolution temporelle de l'appareil. Le problème

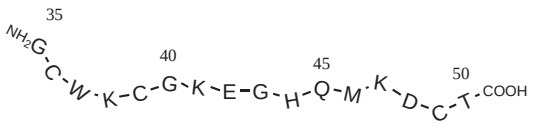
étant que ce sont ces populations non résolues qui contribuent à l'information site-spécifique dans la boucle. Autrement dit, on sait qu'il y a des variations locales, mais on ne sait pas combien d'états conformationnels évoluent sur cette dynamique ni leurs amplitudes respectives. La limite d'attribution du phénomène d'empilement est d'ailleurs très floue, comme la notion de degré de contrainte de la boucle. Seule une résolution complète des temps de vie ainsi que des amplitudes associées permettra d'avoir un avis précis le degré de structuration de la boucle . Il faut également pour cela être capable de délimiter le seuil cinétique au delà duquel un temps de vie sera attribué comme statique et un autre dynamique. Ce seuil peut être appréhendé en étudiant l'anisotropie locale des 2Aps au sein des boucles. Godet & Al. ont mesuré des cinétiques de déclin anisotropique également hétérogènes, signes que la 2Ap expérimente différents degrés de rotation (globale, segmentaire, locale). Notre résolution temporelle plus élevé et notre rapport S/N devrait pouvoir nous indiquer s'il existe d'autres dynamiques orientationnelles plus courtes ou non. Des projets similaires, mais sur d'autres molécules biologiques, ont déjà été menés par les groupes de Zewail et Xia [6, 70, 71, 7, 72], attestant de l'utilité et de la validité de transposer le projet précédemment décrit à l'échelle ultra-rapide.

1.4 Approche B : CID - LID de NCp7 [35-50] sous forme libre ou repliée

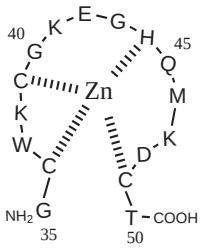
1.4.1 Quelle technique ?

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est un outil permettant à la fois la création, la sélection, l'activation et la détection d'ions moléculaires en phase gazeuse. Elle nécessite l'utilisation de deux analyseurs entre lesquels est disposé un piège ionique. Alors que le premier analyseur de masse permet de filtrer l'ion parent désiré, son activation énergétique s'effectue au sein du piège. Le résultat de ce processus est ensuite examiné par le second analyseur. Le développement de cette technique s'est effectué en parallèle à l'essor des méthodes d'ionisation dites douces comme la «désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI)»[73] ou «l'ionisation par électrospray (ESI)»[74], durant les années 80.

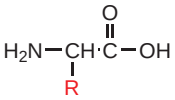
Collision Induced Dissociation et/ou Laser Induced Dissociation : Une fois pris au piège, l'excitation de l'ion précurseur peut être effectuée par divers mécanismes, entre autres en effectuant des collisions avec un gaz neutre (CID pour Collision Induced Dissociation) ou par des méthodes optiques (LID pour Light Induced Dissociation). La dernière méthode ayant pour avantage, à condition que le peptide dispose de structures entrant en résonance avec la longueur d'onde du laser, d'exciter une transition électronique avec une énergie quantifiée, et surtout d'induire une possible fragmentation localisée.



(35-50)NCp7



(35-50)NCp7 + Zn

Formule développée	Nom complet	Abréviation Xxx	Code
			

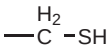
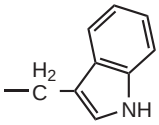
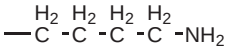
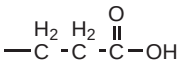
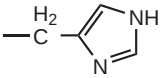
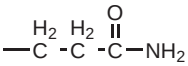
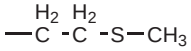
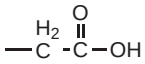
Où — R = —H	Glycine	Gly	G
	Cystéine	Cys	C
	Tryptophane	Trp	W
	Lysine	Lys	K
	Acide Glutamique	Glu	E
	Histidine	His	H
	Glutamine	Gln	Q
	Méthionine	Met	M
	Acide Aspartique	Asp	D

Figure 1.7 – Séquence du variant «simple doigt de Zinc» (35-50)NCp7 : Représentation schématique de la séquence du peptide NCp7, nue ou repliée autour du Zinc, grâce à la présence du motif CCHC. En bas : table résumant la nomenclature adoptée pour les acides aminés entrant dans la composition du peptide.

1.4.2 Intérêt d'une fragmentation en phase gazeuse

Identifier un peptide En biologie, la spectrométrie de masse est un outil sans pareil pour ce qui concerne l'identification d'un peptide inconnu. Deux approches existent : l'une qualifiée de *Bottom-Up*, consiste en fragmenter le protéine par digestion enzymatique et identifier la masse des peptides obtenus ; alors que l'approche type *Top-Down* utilise les capacités pleinement de fragmentation de n'importe quel spectromètre de masse tandem.

Le schéma de fragmentation est représentatif de la composition en acide aminé de la molécule, et de ce fait peut être utilisé en comparaison avec des spectres issus de banques de données où générés in-silico par des algorithmes prédictifs. Ces derniers, malheureusement, ont tendance à se baser uniquement sur la composition m/z des spectres et négligent fortement les données issues de l'intensité des pics, alors qu'ils peuvent apporter, en supplément de la composition de la molécule, des informations structurelles non négligeables [75].

Caractériser intrinsèquement un peptide : Lors d'un processus de dissociation, les constantes réactionnelles traduisant la faisabilité d'une fragmentation dépendent, en plus de l'énergie interne du système, à la fois de l'énergie critique d'activation du composé métastable, de la température du système, ainsi que du nombre de mode normaux vibrationnels et rotationnels de la molécule [76]. De ce fait, les expériences en phase gazeuse permettent d'étudier des mécanismes de redistribution d'énergie au sein d'une molécule et de s'affranchir de l'effet du solvant. Ce sont autant de données expérimentales appréciables en modélisation moléculaire.

1.4.3 Pourquoi NCp7 ?

Si ce n'est de par sa taille, qui en fait un challenge expérimental en lui même, le variant «simple doigt de zinc» [35-50] NCp7 (Fig.1.7) nous est apparu comme un modèle intéressant. En effet, outre son intérêt biologique indéniable, la diversité de son contenu en acide aminés, notamment basiques, permet amplement d'examiner les effets de déplacement de charges le long du squelette peptidique. Contenant un seul tryptophane en position 37, [35-50] NCp7 peut être sélectivement excitée à 266 nm par un faisceau laser, apportant une énergie supplémentaire au système. Cela peut révéler de nouveaux canaux de dissociation ou contrebalancer ceux issus de CID. Enfin, contenant un seul motif CCHC, il est possible de prendre en compte le repliement de la protéine autour du Zinc sur la fragmentation du peptide. Ainsi, par le biais de ce modèle, nous souhaitons alimenter la question de l'influence des interactions non covalentes structurantes sur la relaxation des peptides en phase gazeuse, et donc, naturellement, sur la formation des spectres de masse.

Chapitre 2

Approche A : Montage expérimental

Sommaire

2.1 Choix du montage **16**

2.1.1 Motivation générale 16

2.1.2 Conversion de fréquences 19

2.2 Accord de phase en différence de fréquence **20**

2.2.1 Conditions d'accord de phase 20

2.2.2 Expression de l'angle d'accord de phase en type II 23

2.3 Acceptance spectrale **25**

2.3.1 Efficacité de conversion en DFG 25

2.3.2 Effet des différents paramètres d'interaction sur l'acceptance spectrale 26

2.4 Facteurs affectant la résolution temporelle **27**

2.4.1 Dispersion de vitesse de groupe (GVD) 28

2.4.2 Désaccord de vitesse de groupe (GVM) 29

2.4.3 Désaccord du front d'impulsion (PFM) 31

2.5 Éléments du montage **32**

2.5.1 Source Laser 32

2.5.2 Positionnement de l'échantillon et collection de la fluorescence 34

2.6 Caractérisation du montage expérimental **37**

2.6.1 Protocole expérimental 37

2.6.2 Performances 38

2.6.3 Résultats et Discussion 39

2.7 Conclusion **44**

La conception, mise en place et validation du montage utilisé au sein de l'approche A (1.3) ayant compté pour une bonne partie de ce travail de thèse, il nous est apparu justifié de consacrer un chapitre entier à sa description. Nous présentons donc un nouveau procédé de spectroscopie ultra-rapide de fluorescence résolue en temps, basé sur la génération d'une différence de fréquence de type II (Type II DFG), permettant ainsi d'échantillonner temporellement une fluorescence moléculaire «down-convertie» (DC). Ce «setup» a fait l'objet d'une publication [77]. Il est le fruit d'une déjà longue tradition de dispositifs expérimentaux, mais adapté au contexte de l'étude de fluorophores biologiques. Nous détaillerons le point central du montage, à savoir les conditions d'accord de phase nécessaires pour obtenir une telle conversion, ainsi que les différents facteurs pouvant améliorer ou détériorer la forme du signal. Ce dernier ayant comme contrainte d'être le plus résolu d'un point de vu temporel et le plus large spectralement, toujours dans le cadre du matériel mis à disposition au sein du laboratoire. Puisque chaque design est propre à l'équipe qui le conçoit, nous détaillerons succinctement les différents éléments qui le composent et leur mise en oeuvre. Enfin, les performances du montage seront exposées dans le cadre d'une étude témoin sur le 2,5-Diphenyloxazole (PPO).

2.1 Choix du montage

2.1.1 Motivation générale

Nous avons introduit, au sein du chapitre 1.3.1, la problématique reliée à l'utilisation de la 2-Aminopurine (2Ap) en tant que sonde conformationnelle. La mise en place de notre montage a été motivée par le besoin d'y répondre de la manière la plus adaptée possible. Afin de pouvoir caractériser le plus finement possible la dynamique de quenching de fluorescence de composés biologiques, qui absorbent et émettent dans l'UV, l'appareil de mesure doit disposer d'une résolution temporelle sub-picoseconde tout en présentant un rapport signal sur bruit (S/N) intéressant, d'une détection polychromatique résolue en temps, et doit s'adapter le plus possible aux outils de détection déjà installés au sein du laboratoire.

Face à ce cahier des charges relativement précis, l'expérimentateur se trouve confronté à un nombre certain de techniques permettant de résoudre cette problématique [78]. Toutes ces techniques reposent sur le même principe, à savoir perturber le milieu par une impulsion ultra brève, définissant un temps 0 à partir duquel la fluorescence est formée, puis ensuite déterminer l'évolution temporelle de la fluorescence. C'est sur cette dernière étape que les distinctions majeures apparaissent. Il existe des méthodes qualifiées de « conventionnelles » pour lesquelles l'évolution temporelle de la fluorescence est définie par des moyens partiellement optiques et partiellement électroniques, et d'autres méthodes qualifiées de « tout optique ». Certes plus faciles à mettre en oeuvre, le défaut principal des techniques « conventionnelles » est leur résolution temporelle, au mieux avoisinant quelques ps [79], une résolution trop faible pour caractériser pleinement les phénomènes qui nous intéressent.

Il est possible d'affiner nos critères de choix en prenant en compte, au sein de chaque catégorie, si

la détection s'effectue de manière monochromatique (à l'aide de détecteurs PMT) ou polychromatique (utilisant une camera CCD). Il est à noter que dans les deux cas, des spectres d'émission résolus en temps (TRES) pourront être générés. Alors que l'utilisation de capteurs CCD offre la possibilité d'enregistrer des spectres de fluorescence au cours d'une seule expérience [80], impliquant un gain de temps évident, la détection monochromatique nécessite une reconstruction spectrale des cinétiques sur une gamme de longueurs d'ondes à considérer. Ces TRES sont alors basés sur une renormalisation à partir du spectre d'émission statique pris sur le même intervalle [81, 82]. Une très bonne synthèse sur le sujet a été présentée par Maroncelli & al. [79] dans un contexte relié à l'échantillonnage par effet Kerr Optique, et une version adaptée de la Table I de l'article est présentée si dessous :

Échantillonnage de la fluorescence	Appareils	Résolution temporelle	Détection multicanale de spectres transients	Systèmes représentatifs
Électronique / Optique	TCSPC	20-30 ps	non	[83], [84]
	Caméra à Balayage de fente	2-10 ps	oui	[85], [86]
Tout optique	Kerr Gating	100-400 fs	oui	[87], [79]
	Up-conversion	50-200 fs	oui (sous certaines conditions)	[88], [89], [77]

Table 2.1 – Présentation des différents dispositifs de spectroscopie de fluorescence résolue en temps - Adapté de [79]

Le lecteur intéressé par de plus amples détails inhérents à chaque techniques pourra se pencher sur les revues suivantes : [90] pour la partie « conventionnelle » et [91] en introduction sur les méthodes « tout optique ».

Il semble évident que seules les caractéristiques des méthodes « tout optique » s'ajustent le mieux à nos critères. Ces deux techniques utilisent une "porte optique" pour échantillonner temporellement la fluorescence, générée par une impulsion laser ultracourte. Cette dernière traverse un milieu non linéaire tout en se superposant spatialement et temporellement avec la fluorescence. L'effet de l'échantillonnage dépend de la technique considérée.

Dans le cas de l'effet Kerr optique [92], le milieu non-linéaire est placé entre deux polariseurs croisés de telle sorte que la fluorescence ne puisse traverser le second analyseur. La porte optique induit une biréfringence instantanée dans le milieu Kerr, ce qui rend le système « transparent » vis à vis de la fluorescence durant le temps du trajet de l'impulsion « porte » dans le milieu.

Le grand avantage de cette technique est que la fenêtre spectrale de fluorescence n'est théoriquement

limitée que par la transmittance du système - Polariseur - Milieu Kerr - Analyseur - et le degré de sensibilité du détecteur [87]. Ainsi, le choix du milieu Kerr est de prime importance, et dans l'idéal trois paramètres doivent être optimisés :

- Pour améliorer la fonction de réponse instrumentale (IRF) de l'appareil, la polarisation induite doit être à dominante électronique plutôt qu'orientationnelle (privilégier un cristal au lieu d'un liquide) et l'indice linéaire de réfraction doit être le plus faible possible (diminuer la dispersion des deux impulsions).
- Pour améliorer l'efficacité du processus Kerr, l'indice de réfraction non linéaire du milieu doit être le plus élevé possible.
- Le milieu doit être transparent pour la gamme de longueur d'onde correspondant au spectre de fluorescence qui nous intéresse (proche UV) et au processus à deux photons de la « porte » optique.

L'efficacité Kerr et la transparence du milieu étant de natures contraires [79] , le choix du matériau s'avère être une affaire de concessions. Cependant même parmi les meilleurs compromis, peu d'entre eux sont efficaces et réellement transparents dans l'UV. Maroncelli & Al. préconisent l'utilisation du benzène liquide [93]. Ce dernier présente l'intérêt de « moins » absorber dans l'UV (λ_{min} = 278 nm), définie comme étant la longueur d'onde pour laquelle la denstié optique (OD) n'excède pas l'unité dans 1 cm d'épaisseur). La IRF d'un tel montage avoisine tout de même 450 fs dans une cuvette de 1 mm d'épaisseur.

L'autre élément à prendre en compte est le coefficient d'extinction des polariseurs (noté ici $\epsilon = T_{\perp}/T_{\parallel}$). En effet, même correctement croisés, des photons de fluorescence passeront toujours au travers du système et participeront à un bruit de fond d'émission. Ce dernier est à la fois proportionnel au temps de vie de fluorescence et à ϵ. L'équation 2.1 nous montre qu'avec une extinction ϵ de 10^{-5}, une efficacité de transmission T_{open} de 10^{-1} (en mode «ouvert», tenant compte des pertes dues au passage au travers des polariseurs + milieu Kerr et d'une rotation de polarisation incomplète dans ce dernier), un temps de vie de fluorescence τ_F de 1 ns et un temps d'obturation τ_{op} de 100 fs, le ratio (R) entre le signal du au bruit d'émission et le vrai signal est de 1 [94].

$$R = \frac{\epsilon}{T_{open}} \cdot \frac{\int_0^{+\infty} e^{-t/\tau_F} dt}{\int_0^{+\infty} e^{-t/\tau_{op}} dt} \tag{2.1}$$

Un rapport S/N «acceptable» nécessite d'avoir un couple polariseur-analyseur performant pour étudier des composés avec une durée de vie supérieure à la nanoseconde. Or, afin d'éviter un surplus de dispersion temporelle avant d'atteindre le milieu Kerr, l'épaisseur du premier polariseur doit également être minimisée. On constate que ce paramètre difficilement concilient avec un ϵ faible.

Notons que l'objectif de la thèse est de pouvoir utiliser la dynamique de quenching de fluorescence

en tant que sonde structurelle. La qualité des informations que l'on obtient dépendent autant de la résolution temporelle du système que du rapport S/N. Il est clair que ce dernier devient excellent lorsque cette expérience traite de fluorophores à temps de vie courts. Dans notre cas, quand bien même le fond d'émission non polarisé peut être minimisé par un quenching efficace de nos composés, la faible transparence de milieux Kerr réellement efficaces dans l'UV seront une source de nuisance potentielle. La considération de l'ensemble de ces paramètres nous a conduit à envisager l'utilisation d'un échantillonnage de la fluorescence par conversion de fréquences.

2.1.2 Conversion de fréquences

La technique de Fluorescence Résolue en Temps par Conversion de Fréquences repose sur la séquence suivante (cf Fig.2.18). Une impulsion pompe ultracourte porte l'échantillon dans un état excité fluorescent. La fluorescence émise est collectée puis focalisée sur un cristal non linéaire. Une seconde impulsion « porte » intense est focalisée exactement à l'emplacement du spot de fluorescence dans le cristal. Ce dernier est orienté d'un angle approprié par rapport au faisceau pompe. Lorsque ces dernières se superposent temporellement et spatialement au sein du cristal et que les conditions d'accord de phase sont respectées, un processus non linéaire de génération fréquence « somme » ou « différence » s'effectue. L'intensité résultante est à une fréquence correspondant à une combinaison des fréquences des deux photons incidents, ici appelée $I_C(\lambda_C, \Delta t)$. Elle est fonction de la corrélation temporelle entre la fluorescence I_F et l'impulsion porte I_G, séparées par un délais relatif Δt.

$$I_C(\lambda_C, \Delta t) = \int_{-\infty}^{+\infty} I_F(\lambda_F, t) I_G(\lambda_G, t + \Delta t) dt \tag{2.2}$$

En changeant le délais Δt de l'impulsion porte, qui a une durée beaucoup plus courte ($\simeq$ 100 fs) que le temps de vie de fluorescence (τ_F), il est alors possible de « découper » la fluorescence en fonction du temps (si on assimile grossièrement l'impulsion porte à une fonction delta par rapport à τ_F) et de reconstruire une cinétique de déclin.

L'une des premières expériences physico-chimique utilisant la technique a été réalisée par Mahr et Hirsch [95]. Treize années plus tard, Shah [96] en donna une description très détaillée dans une revue faisant encore référence aujourd'hui. D'énormes efforts on été faits pour améliorer la bande passante de cette technique, soit en jouant sur l'épaisseur du cristal et l'angle solide de collection [97], soit en imprimant une rotation continue du cristal pendant la mesure pour un délai donné [88], permettant de réaliser l'ensemble des accords de phases nécessaires à la conversion du spectre entier de fluorescence.

Notons tout de même que malgré les centaines d'articles traitant du sujet, à notre connaissance, l'extrême majorité utilisent un accord de phase respectant les conditions d'une somme de fréquence. Il en

résulte que la lumière convertie se trouve fortement décalée vers les longueurs d'onde bleues. Rappelons que nous avons choisi l'utilisation de cette technique pour ses qualités de résolution temporelle ainsi que pour ses possibilités de travail en mode multicannal et dans l'UV, au vu de la transmission des cristaux non linéaires utilisés (le BBO présente une efficacité de transmission de 90% à 370 nm)[98].

Le seul inconvénient est la faible efficacité de réflexion du réseau de diffraction de notre spectromètre (Fig.2.1(b)) et la faible efficacité quantique de notre caméra CCD(Fig.2.1(b)), pour le domaine de l'UV lointain. Le rapport S/N risquant d'en être fortement affecté, il serait possible d'envisager plusieurs solutions, comme l'utilisation d'une pompe située dans l'IR moyen.

Toutefois, la méthode que nous avons retenue, à la fois la moins onéreuse et surtout la plus innovante, a été d'effectuer un accord de phase basé sur une différence de fréquence (DFG) [99]. Ainsi, le signal de nos molécules biologiques se trouve converti dans le visible, zone où l'efficacité quantique de notre détecteur est maximale.

Au coeur de l'échantillonnage, représenté par l'action du produit de corrélation 2.2, se trouve donc le processus de DFG. La section suivante fera un rappel succinct sur les notions nécessaires pour l'appréhender. En développant par la suite l'accord de phase dans un cristal de BBO, nous nous intéresserons aux conditions de mise en place de ce processus.

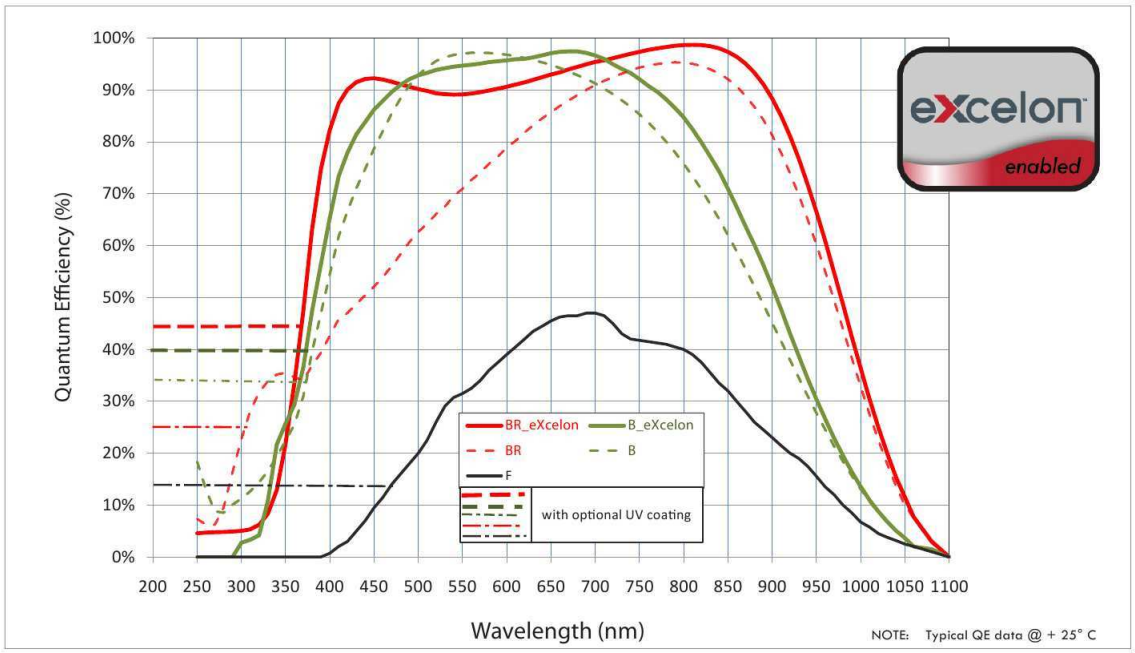
2.2 Accord de phase en différence de fréquence

2.2.1 Conditions d'accord de phase

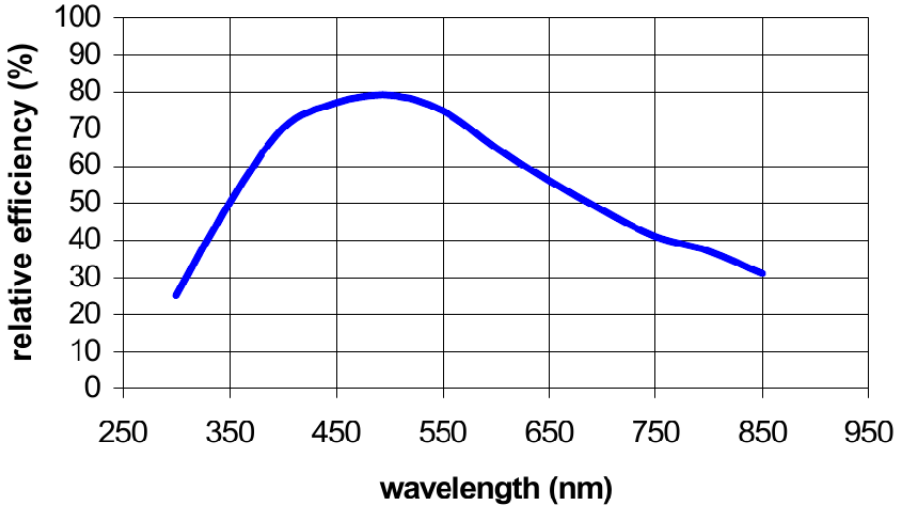
La génération de différence de fréquence (DFG) est un processus non-linéaire de mélange à trois ondes, au cours duquel deux ondes incidentes génèrent dans un milieu non-linéaire une nouvelle onde dont la fréquence est égale à la différence de leurs fréquences respectives. Nous considérerons ici l'interaction d'un faisceau de fluorescence F, d'un faisceau porte G et d'un faisceau différence DC telles que leurs fréquences respectives ϖ_f, ϖ_g et ϖ_{dc} respectent $\varpi_g < \varpi_{dc} < \varpi_f$. Comme pour tout processus paramétrique du second ordre, les faisceaux ne pourront interagir de manière efficace qu'à la condition de maintenir l'accord de phase entre les ondes en présence en chaque point du cristal, ce qui se traduit en pratique par la satisfaction des équations de conservation de l'énergie et de l'impulsion qui s'écrivent dans le cas particulier de la DFG :

$$\begin{cases} \mathbf{k}_f - \mathbf{k}_g - \mathbf{k}_{dc} & = 0 \\ \varpi_f - \varpi_g - \varpi_{dc} & = 0 \end{cases} \tag{2.3}$$

où $k_i = \dfrac{\varpi_i n_i(\varpi_i)}{c}\mathbf{e}_i$ est le vecteur d'onde associé au faisceau i se propageant dans la direction du vecteur unitaire $\mathbf{e_i}$ et $n_i(\varpi_i)$ est l'indice optique du milieu non-linéaire à la longueur d'onde considérée.



(a)



(b)

Figure 2.1 – Courbes d'efficacité de transmission des éléments liés à la détection (a) Caméra CCD, *Princeton Instrument* (modèle : Spec 10, back illuminated, courbe verte en pointillés). (b) Réseau : *Jobin Yvon* (modèle : 510 18110)

La première équation correspond à la condition d'accord de phase, que l'on peut réécrire sous la forme :

$$n_f \varpi_f \leq n_g \varpi_g + n_{dc} \varpi_{dc} \tag{2.4}$$

l'égalité des deux membres étant obtenue en géométrie colinéaire. Les pulsations étant fixées par la conservation de l'énergie, le seul paramètre accessible pour obtenir l'accord de phase est donc l'indice de réfraction du matériau vu par chacun des faisceaux. Nous avons vu que les pulsations des trois faisceaux sont telles que $\varpi_g < \varpi_{dc} < \varpi_f$, ce qui signifie que dans un milieu dispersif en régime de dispersion normale, les indices de réfraction vérifient la double inégalité $n_g < n_{dc} < n_f$. Il est donc impossible de satisfaire l'inégalité 2.4 dans un milieu isotrope en dispersion normale.

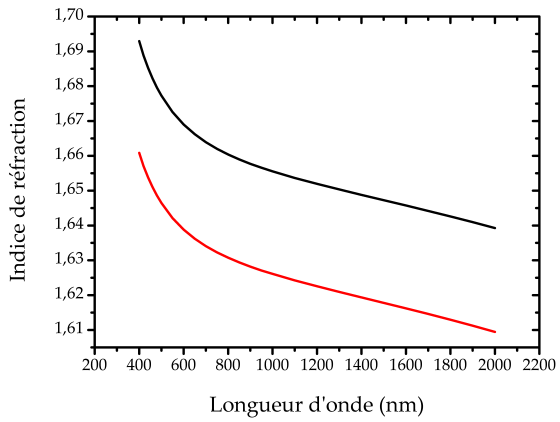


Figure 2.2 – Indices de réfraction ordinaire (noir) et extraordinaire (rouge) dans un cristal de BBO (uniaxe négatif) à la température de 20° pour $\theta = 29°$.

Parmi de nombreuses autres, une des méthodes les plus fréquemment usitées pour contourner cet obstacle consiste à exploiter la biréfringence de certains cristaux massifs, qui présentent un indice de réfraction dépendant de la polarisation du faisceau : en choisissant pour le faisceau de pompe l'axe de polarisation permettant de minimiser l'indice de réfraction, il devient éventuellement possible d'obtenir l'accord de phase.

Considérons par exemple le cas d'un cristal biréfringent uniaxe, le plus courant au laboratoire. La structure cristalline d'un tel milieu est telle qu'il existe une direction de propagation privilégiée, appelée *axe optique*, pour laquelle l'indice de réfraction vu par un faisceau sera indépendant de sa polarisation. L'axe optique et le vecteur d'onde du faisceau forment un plan nommé *plan principal* à partir duquel on définit deux axes de polarisation : l'*axe ordinaire* (o) qui est orthogonal à ce plan, et l'*axe extraordinaire* (e) contenu dans le plan. Une onde polarisée ordinairement ou extraordinairement verra respectivement un indice de réfraction n_o ou n_e (Fig. 2.2). Si $n_o < n_e$, on parle de cristal *uniaxe positif*, tandis que si $n_e < n_o$, le cristal est dit *uniaxe négatif*. Selon le type de cristal, il existe alors plusieurs combinaisons de polarisations pour les trois faisceaux en interaction permettant d'obtenir l'accord de phase (Tableau 2.2).

On les distingue selon que le signal et l'idler partagent la même polarisation (*type I*) ou bien sont polarisés orthogonalement l'un par rapport à l'autre (*type II*).

	Uniaxe positif	Uniaxe négatif
Type I	$n_{of}\varpi_f = n_{eg}\varpi_g + n_{edc}\varpi_{dc}$	$n_{ef}\varpi_f = n_{og}\varpi_g + n_{odc}\varpi_{dc}$
Type II	$n_{of}\varpi_f = n_{og}\varpi_g + n_{edc}\varpi_{dc}$ ou $n_{of}\varpi_f = n_{eg}\varpi_g + n_{odc}\varpi_{dc}$	$n_{ef}\varpi_f = n_{og}\varpi_g + n_{edc}\varpi_{dc}$ ou $n_{ef}\varpi_f = n_{eg}\varpi_g + n_{odc}\varpi_{dc}$

Table 2.2 – Polarisations des faisceaux pour l'accord de phase dans un cristal uniaxe.

Une fois les polarisations fixées, il est nécessaire d'ajuster très précisément les indices optiques vus par chacun des faisceaux pour satisfaire la condition d'accord de phase. L'indice ordinaire est constant quelle que soit la direction de propagation du faisceau, contrairement à l'indice extraordinaire. Cette propriété nous indique la méthode à mettre en oeuvre pour ajuster l'accord de phase : il est possible d'accorder la longueur d'onde amplifiée en modifiant l'orientation relative par rapport au cristal des faisceaux se propageant selon l'axe extraordinaire, ce que l'on réalise en pratique en ajustant l'*angle d'accord de phase* θ formé par le vecteur d'onde des faisceaux polarisés extraordinairement et l'axe optique du cristal (Fig. 2.3). La dépendance angulaire de l'indice extraordinaire s'exprime par l'équation de la surface des indices :

$$n_e(\theta) = n_o\sqrt{\frac{1+\tan^2(\theta)}{1+\frac{n_o}{n_e}\tan^2(\theta)}} \tag{2.5}$$

où $n_e = n_e\left(\theta = \frac{\pi}{2}\right)$ est l'indice extraordinaire principal. On remarquera que les valeurs de n_o et n_e à la longueur d'onde considérée sont tirées des formules de Sellmeier dont les coefficients propres au matériau choisi peuvent être trouvés dans la littérature.

2.2.2 Expression de l'angle d'accord de phase en type II

Nous décrirons ici le calcul de l'angle d'accord de phase dans le cadre d'une interaction de type II telle que $\mathbf{k}_{ef} = \mathbf{k}_{eg} + \mathbf{k}_{odc}$. L'usage du type II est intéressant d'un point de vue expérimental au vu de la possibilité de filtrer le signal de différence de fréquence par un simple polariseur.

Soit θ l'angle d'accord de phase défini comme l'angle séparant le vecteur d'onde fluorescence de l'axe optique, α l'angle de non-colinéarité tel que $\alpha = \theta_f - \theta_g$ et β l'angle sous lequel est émis le signal de différence tel que $\beta = \theta_{dc} - \theta_f$ (Fig. 2.4). En projetant l'équation de conservation de l'impulsion selon l'axe de propagation de la fluorescence, la condition d'accord de phase s'écrit sous la forme d'un système

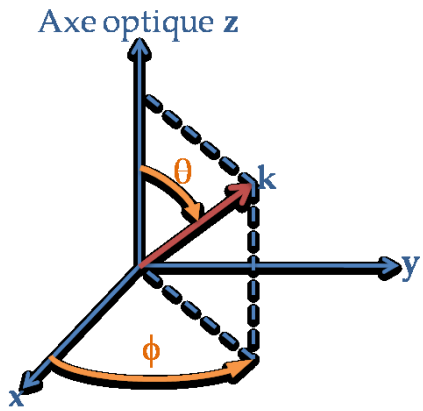


Figure 2.3 – Définition des angles d'accord de phase.

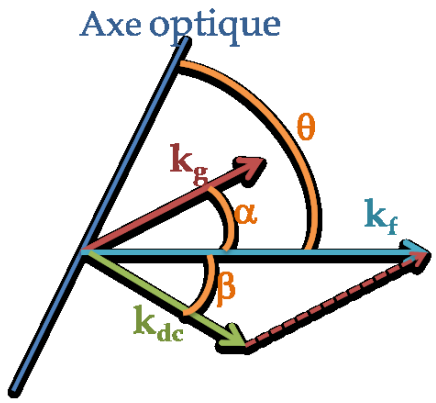


Figure 2.4 – Représentation vectorielle de l'accord de phase - Dans le cas de la DFG, selon les notations du texte.

de deux équations couplées :

$$\begin{cases} k_f &= k_g \cos\alpha + k_{dc}\cos\beta \\ 0 &= k_g \sin\alpha + k_{dc}\sin\beta \end{cases} \tag{2.6}$$

soit en tenant compte de la polarisation respective des faisceaux :

$$\begin{cases} \frac{n_e(\lambda_f,\theta)}{\lambda_f} &= \frac{n_e(\lambda_g,\theta-\alpha)}{\lambda_g}\cos\alpha + \frac{n_o(\lambda_{dc})}{\lambda_{dc}}\cos\beta \\ 0 &= \frac{n_e(\lambda_g,\theta-\alpha)}{\lambda_g}\sin\alpha + \frac{n_o(\lambda_{dc})}{\lambda_{dc}}\sin\beta \end{cases} \tag{2.7}$$

L'angle d'accord de phase peut alors être obtenu à partir de :

$$n_e(\lambda,\theta) = \frac{\lambda_f}{\lambda_g} n_e(\lambda_g,\theta-\alpha)\cos\alpha + \lambda_f\sqrt{\left(\frac{n_o(\lambda_{dc})}{\lambda_{dc}}\right)^2 - \left(\frac{n_e(\lambda_g,\theta-\alpha)}{\lambda_g}\right)^2 \sin^2\alpha} \tag{2.8}$$

Cette équation ne peut être résolue que de manière numérique, avec α fixé, et en utilisant les équations de Sellmeier du matériau non-linéaire considéré pour le calcul des indices ordinaires et extraordinaires.

L'évolution de la courbe d'accord de phase en fonction de l'angle de non-colinéarité α dans un cristal de BBO type II est présentée pour un faisceau porte centré à 800 nm Fig. 2.5. Les courbes d'accord de phase présentent toutes une structure pseudo-parabolique. En choisissant l'angle d'accord de phase de façon à accorder les longueurs d'onde proches du sommet de la parabole, on peut ainsi réaliser un accord de phase large bande. De plus, on remarque que la longueur d'onde de fluorescence correspondant au sommet de la parabole d'accord de phase se décale vers l'UV lorsque l'angle de non-colinéarité α augmente. Si l'on souhaite travailler systématiquement avec une acceptance spectrale maximale, c'est-à-dire à proximité du sommet de la parabole, alors il conviendra de choisir l'angle α approprié de façon à centrer la parabole d'accord de phase par rapport au spectre de fluorescence que l'on souhaite convertir. C'est donc l'ajustement de l'angle α qui permet l'accordabilité du convertisseur de fréquences, l'angle θ étant fixé par ailleurs par la nécessité d'un accord de phase large bande.

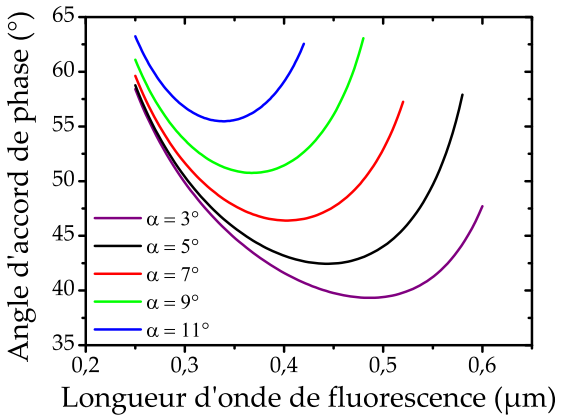


Figure 2.5 – Courbes d'accord de phase pour la DFG de type II dans un cristal de BBO en fonction de l'angle α pour un faisceau porte à 800 nm. - Les angles considérés sont internes au cristal.

2.3 Acceptance spectrale

2.3.1 Efficacité de conversion en DFG

Considérons trois ondes planes, monochromatiques, d'extension transverse infinie, polarisées rectilignement, se propageant non-colinéairement (dans la limite d'une interaction paraxiale, c'est-à-dire avec α petit) selon l'axe z dans un milieu non-linéaire d'ordre deux. Sous l'hypothèse que le temps de réponse de la susceptibilité non-linéaire est très rapide devant l'évolution temporelle de l'enveloppe des champs $A(z,t)$, et que ces mêmes enveloppes varient lentement sur une distance de propagation de l'ordre de la longueur d'onde, on peut alors déduire des équations de Maxwell un système de trois équations couplées

régissant l'évolution de l'enveloppe des champs en présence :

$$\begin{cases} \frac{dA_{dc}}{dz} = & -i\frac{\varpi_{dc}d_{eff}}{n_{dc}c}A_g^*A_f e^{-i\Delta kz} \\ \frac{dA_g}{dz} = & -i\frac{\varpi_g d_{eff}}{n_g c}A_{dc}^*A_f e^{-i\Delta kz} \\ \frac{dA_f}{dz} = & -i\frac{\varpi_f d_{eff}}{n_f c}A_{dc}A_g e^{i\Delta kz} \end{cases} \tag{2.9}$$

où $d_{eff} = \frac{1}{2}\mathbf{u}_f : \chi^{(2)} : \mathbf{u}_g : \mathbf{u}_{dc}$ est la susceptibilité non-linéaire effective décrivant l'efficacité du couplage entre les trois ondes. En appliquant les conditions aux limites appropriées (faible efficacité de conversion et intensité du faisceau différence de fréquence nulle à l'origine), on peut déduire du système précédent l'équation régissant l'évolution de l'intensité du faisceau différence de fréquence au cours de sa propagation dans le cristal :

$$I_{dc}(z) = \frac{1}{2}\frac{z^2\left|\chi^{(2)}\right|^2\varpi_{dc}^2}{2n_f n_g n_{dc}\varepsilon_0 c_0^3}\sin c^2\left(\frac{\Delta kz}{2}\right)I_f I_g \tag{2.10}$$

Si on note L l'épaisseur du cristal non-linéaire employé, on peut alors définir l'efficacité relative de l'interaction comme :

$$\eta \equiv \sin c^2\left(\frac{\Delta kL}{2}\right) \tag{2.11}$$

où l'on constate que le désaccord de phase Δk doit absolument être minimisé afin d'obtenir un processus de conversion efficace. L'expression du désaccord de phase peut être extraite de la projection des vecteurs d'ondes selon l'axe de propagation moyen choisi comme la direction du vecteur d'onde fluorescence (Equ. 2.6) :

$$\Delta k = k_f - k_g\cos\alpha - k_{dc}\cos\left[\arcsin\left(\frac{k_g\sin\alpha}{k_{dc}}\right)\right] \tag{2.12}$$

On peut ainsi calculer le rendement de conversion relatif (c'est-à-dire par rapport à un accord de phase parfait) en fonction de la longueur d'onde de fluorescence, ceci pour une géométrie d'interaction donnée donc avec les des paramètres α, θ et L fixés. La bande d'acceptance spectrale sera alors définie comme la largeur à mi-hauteur de la courbe d'efficacité de conversion relative.

2.3.2 Effet des différents paramètres d'interaction sur l'acceptance spectrale

Pour un angle gate-fluorescence α et une épaisseur de cristal L fixés, la courbe d'efficacité de conversion relative présente au voisinage du sommet d'une parabole d'accord de phase une structure typique à deux lobes symétriques, les deux sommets correspondant aux deux longueurs d'ondes parfaitement accordées en phase (Fig 2.6). En écartant l'angle d'accord de phase θ du sommet de la parabole d'accord de phase, on peut élargir substantiellement la bande spectrale convertie, en écartant les deux longueurs d'ondes accordées en phase, au détriment de l'efficacité de conversion pour les longueurs d'ondes comprises entre ces deux lobes. Lorsque θ est choisi trop grand, on abouti au cas limite où les deux lobes sont totalement séparés, par exemple pour $\theta > 47°$ dans le cas présenté Fig 2.6. Un compromis doit donc

être trouvé entre une relative homogénéité de l'efficacité de conversion sur toute la bande et la largeur de l'acceptance spectrale souhaitée. Dans les conditions de la Fig 2.6, l'acceptance spectrale demeure cependant relativement large dans tous les cas, passant de 160 nm FWHM pour $\theta = 40°$ à 260 nm pour $\theta = 44°$ avec une profondeur de modulation de 50%.

Pour une géométrie d'interaction donnée, c'est-à-dire α et θ fixés, augmenter l'épaisseur du cristal aura pour conséquence d'accroître l'efficacité de conversion absolue qui varie comme L^2 d'après l'équation 2.10, au détriment de l'acceptance spectrale comme le montre la Fig. 2.7. Dans les conditions de cette figure, on observe un fort rétrécissement du spectre de fluorescence converti lorsque l'épaisseur augmente, passant de 230 nm FWHM pour L=200 µm à 50 nm pour L=2mm. Ici encore, un compromis devra être fait entre le rendement de DFG et l'acceptance spectrale.

L'effet de l'angle α sur l'acceptance spectrale est plus délicat à estimer, attendu que la variation de α agit d'abord sur la longueur d'onde centrale accordée en phase, comme nous l'avons montré au paragraphe précédent. Étudier l'effet d'une variation de α nécessite donc de modifier simultanément l'angle d'accord de phase θ, avec L fixé, couplant ainsi deux effets. On peut cependant obtenir une bonne estimation de son impact en convenant de choisir θ tel que la profondeur de modulation de la courbe d'efficacité relative soit constante quelle que soit la valeur de α choisie. C'est ce que nous avons tenté de reproduire au sein de la Fig. 2.8, en choisissant arbitrairement de fixer la profondeur de modulation tolérable à 10%. On observe clairement que le décalage de la longueur d'onde centrale de la bande convertie vers l'UV s'accompagne d'une réduction de l'acceptance spectrale, qui passe de 240 nm FWHM pour $\lambda_{f0} = 500$ nm à 120 nm pour $\lambda_{f0} = 350$ nm.

Le dernier paramètre influant l'acceptance spectrale est la longueur d'onde du faisceau porte. La Fig 2.9 présente l'évolution de l'efficacité de conversion relative pour les longueurs d'onde de gate 800 et 1300 nm, dans la cas d'une longueur d'onde centrale de fluorescence fixée à 350 ou à 500 nm et en choisissant des conditions d'accord de phase comparables (profondeur de modulation de 10%). En changeant la longueur d'onde de porte de 800 nm à 1300 nm, l'acceptance spectrale passe de 120 nm FWHM à 140 nm pour $\lambda_{f0} = 350$ nm et de 240 nm à 280 nm pour $\lambda_{f0} = 500$ nm. Le gain reste donc relativement modeste dans l'UV mais on remarque une dissymétrie, l'élargissement étant plus sensible pour les longueurs d'onde de fluorescence situées du côté rouge du spectre.

2.4 Facteurs affectant la résolution temporelle

Les différents faisceaux en présence sont soumis à plusieurs effets parasites qui concourent à dégrader la résolution temporelle de l'expérience. L'un est intrinsèque à la propagation d'un faisceau ultra-bref

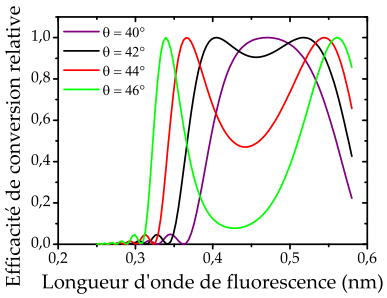


Figure 2.6 – Efficacité de conversion relative pour différents angles d'accord de phase avec λ_G=800 nm, $\alpha = 4°$ et L=400 μm

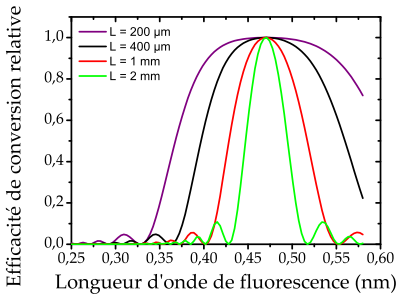


Figure 2.7 – Efficacité de conversion relative pour différentes épaisseurs de cristal avec $\lambda_G = 800$ nm, $\alpha = 4°$ et $\theta = 40°$.

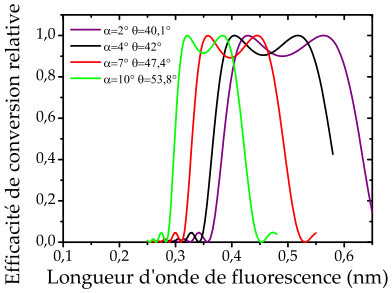


Figure 2.8 – Efficacité de conversion relative pour différents angles de non-colinéarité et à profondeur de modulation constante avec $\lambda_G = 800$ nm

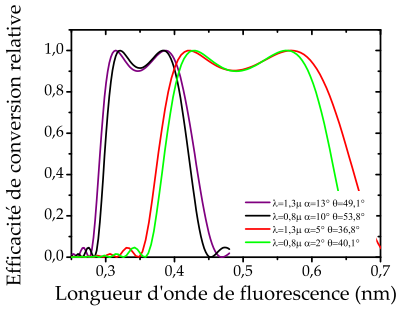


Figure 2.9 – Efficacité de conversion relative pour une gate à 800 ou 1300 nm et à profondeur de modulation constante.

Figure 2.10 – Effet de la géométrie d'interaction sur l'efficacité de conversion relative dans un cristal de BBO type II.

dans un milieu matériel, c'est la dispersion de vitesse de groupe (GVD), l'autre est lié au mélange de fréquence dans un cristal non-linéaire, c'est le cas du désaccord de vitesse de groupe (GVM,et le dernier est créé par la géométrie non-colinéaire de l'interaction, il s'agit du désaccord de front d'impulsion. Nous allons à présent nous attacher à décrire succinctement l'origine physique de ces effets, ainsi que les moyens d'en limiter l'impact lors du design de l'expérience.

2.4.1 Dispersion de vitesse de groupe (GVD)

Lors de sa propagation dans un milieu matériel dispersif, toute impulsion lumineuse ultra-brève, c'est-à-dire associée à un spectre large, va voir ses composantes spectrales dispersées du fait de la variation chromatique de l'indice optique du matériau. L'impulsion subira donc un allongement de sa durée, d'autant plus sévère que cette durée était originellement courte et que le matériau traversé est épais. Considérons une impulsion gaussienne de durée initiale limitée par transformée de Fourier τ_0 (FWHM). En développant autour de sa pulsation centrale la phase spectrale accumulée par l'impulsion au cours de sa propagation dans un milieu d'indice $n(\lambda)$ et de longueur , on peut montrer que la durée d'impulsion

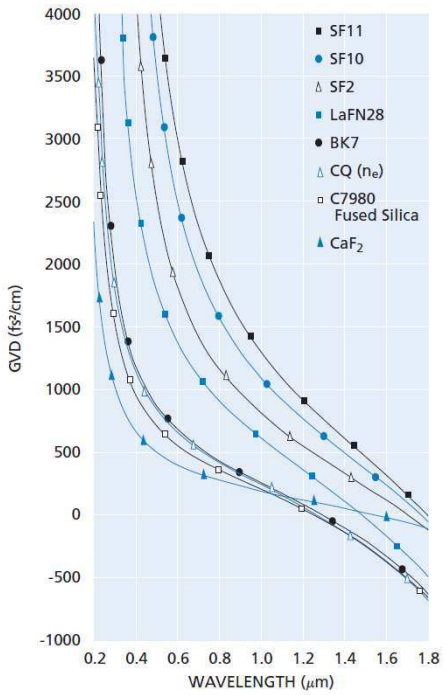


Figure 2.11 – GVD pour quelques matériaux optiques usuels (document Melles Griot).

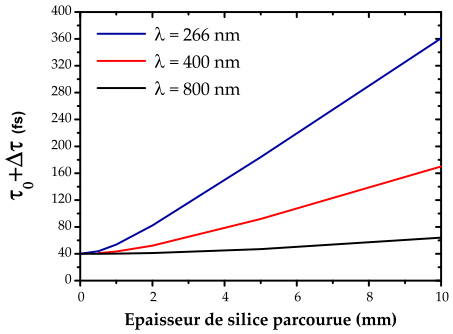


Figure 2.12 – Augmentation de la durée d'une impulsion de 40 fs au cours de sa propagation dans de la silice pour trois longueur d'onde différentes.

Figure 2.13 – Effet de la GVD

sera allongée de sorte que :

$$\tau(L) = \tau_0 \sqrt{1 + \left(\frac{4 \ln 2 L \beta''(\lambda)}{\tau_0^2}\right)^2} \tag{2.13}$$

où $\beta''(\lambda) = \dfrac{\lambda^3}{2\pi c^2} \dfrac{d^2 n}{d\lambda^2}$ est la dispersion de vitesse de groupe par centimètre de matériau traversé (Fig 2.11). Ainsi, pour une impulsion gaussienne à la longueur d'onde de 400 nm d'une durée initiale de 40 fs, la propagation dans un centimètre de silice engendre un élargissement temporel de 50 fs, alors qu'il est voisin de 20 fs pour un faisceau de durée identique mais centré à 800 nm (Fig 2.12). Il convient donc en pratique de limiter au maximum la propagation de faisceaux à travers tout matériau optique, notamment en préférant l'usage d'optiques réflectives plutôt que de lentilles pour la focalisation des faisceaux.

2.4.2 Désaccord de vitesse de groupe (GVM)

Les dispositifs de mélange à trois ondes font intervenir des faisceaux centrés à des longueurs d'onde différentes, et qui se propagent donc à des vitesses de groupe inégales au cours de leur interaction dans le cristal non-linéaire. Cette GVM introduit une séparation temporelle progressive des faisceaux au cours de leur propagation dans le cristal et donc une dégradation de la résolution temporelle du montage

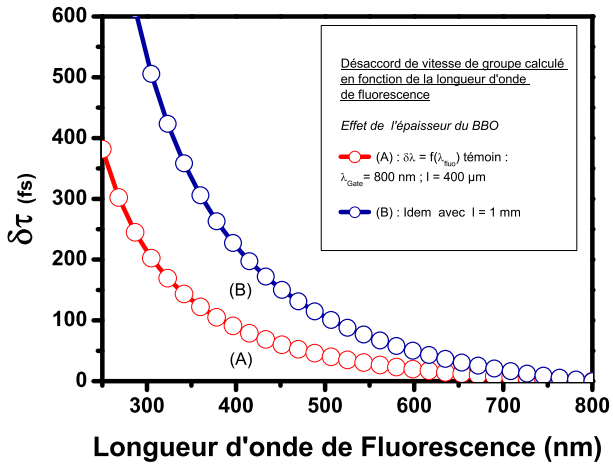


Figure 2.14 – Dégradation de la résolution temporelle sous l'effet de la GVM - Dans un cristal de BBO type II avec $\lambda_g = 800$ nm pour deux épaisseurs du cristal.

expérimental qui s'exprime dans le cas d'une propagation colinéaire par :

$$\Delta\tau = L\left(\frac{1}{v_{gf}} - \frac{1}{v_{gg}}\right) \tag{2.14}$$

où $v_{gi} = c/\left[n\left(\lambda_i\right) - \lambda_i \left.\frac{\partial n}{\partial \lambda}\right|_{\lambda=\lambda_i}\right]$ est la vitesse de groupe de l'onde à la longueur d'onde λ_i. La figure 2.14 montre l'effet de la GVM sur la dégradation de la résolution temporelle en fonction de l'épaisseur du cristal pour le cas particulier d'une interaction colinéaire. Si l'utilisation de cristaux fins permet de limiter la dégradation de la résolution temporelle et d'optimiser l'acceptance spectrale comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, elle implique en revanche une réduction du rendement de conversion.

L'effet de la GVM peut cependant être considérablement réduit en adoptant une géométrie non colinéaire [100], de manière similaire à ce qui a été montré dans les cas de l'amplification paramétrique large bande [101] [1]. Dans ce cas, c'est la projection des vitesses de groupe sur l'axe moyen de propagation qui compte (Fig 2.15), et on peut réécrire l'accroissement de la résolution temporelle comme :

$$\Delta\tau = L\left(\frac{1}{v_{gf}.\left(\mathbf{k_f}/k_f\right)} - \frac{1}{v_{gg}.\left(\mathbf{k_f}/k_f\right)}\right) = L\left(\frac{1}{v_{gf}.} - \frac{1}{v_{gg}\cos\alpha}\right) \tag{2.15}$$

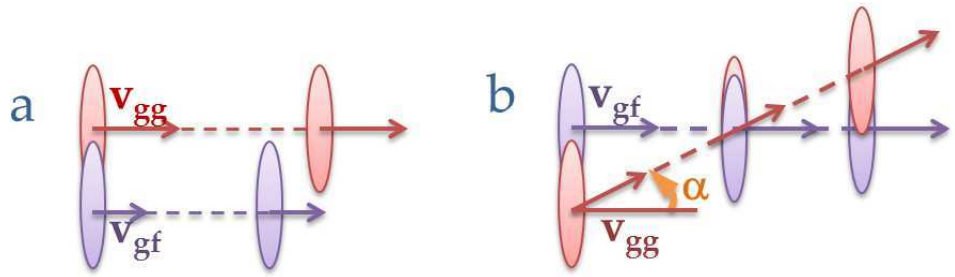


Figure 2.15 – Evolution temporelle des faisceaux fluorescence et gate - Cas d'une interaction colinéaire (a) et non-colinéaire (b)

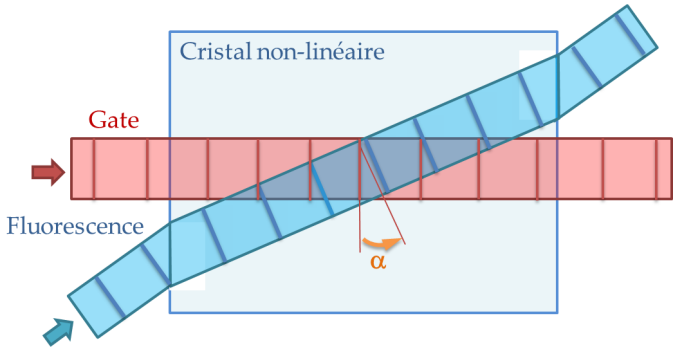


Figure 2.16 – Représentation du désaccord du front d'impulsion en géométrie non-colinéaire.

2.4.3 Désaccord du front d'impulsion (PFM)

En géométrie non-colinéaire, les faisceaux gate et fluorescence s'interceptent dans le cristal non-linéaire selon un angle interne α, impliquant que les fronts d'onde des deux impulsions ne peuvent pas pleinement se superposer [102, 103]. Le volume d'interaction correspondant se trouve incliné d'un angle α (Fig. 2.16). On est alors en présence d'un couplage spatio-temporel, et les différentes parties de chaque faisceau interagissent à des temps différents. La dégradation de la résolution temporelle résultante, soit le délais séparant les deux extrémités du profil spatial des faisceaux, s'exprime par :

$$\delta t = \frac{d \tan \gamma}{c} \tag{2.16}$$

où d est le diamètre du faisceau et γ est l'angle *externe* entre la gate et la fluorescence. Dans les conditions expérimentales de l'étude de la fluorescence du PPO, la taille du faisceau de fluorescence est de 500 µm dans le cristal de DFG, ce qui se traduit par une réduction de la résolution temporelle de 200 fs.

Pour réduire cet effet, la solution la plus simple serait de réduire la taille du faisceau, ce qui n'est pas forcément possible expérimentalement, ou bien de réduire l'angle α, ce qui n'est pas souhaitable compte tenu de son influence sur l'acceptance spectrale. On en revient donc à un compromis entre résolution

1. Il faut cependant noter que dans le cas de l'amplification paramétrique, le critère pertinent est la GVM entre le signal et l'idler. En spectroscopie de fluorescence résolue en temps, c'est en revanche la GVM entre les deux faisceaux incidents gate et fluorescence qui importe, puisque nous nous intéressons à limiter la cross-corrélation entre ces deux faisceaux sans nous préoccuper de la durée des impulsions générées par somme ou différence de fréquence.

temporelle et acceptance spectrale. Pour contourner cette difficulté, une technique d'accord des fronts d'onde a été proposée, consistant à incliner le front d'onde de la gate préalablement au mélange de fréquences de façon à l'ajuster exactement à l'inclinaison du front du faisceau de fluorescence. Les effets d'inclinaison du front d'onde et de dispersion angulaire étant similaires à ce qui se passe lors de la propagation d'un faisceau dans un prisme ou un réseau, le dispositif est basé sur l'insertion sur le trajet de la pompe d'un élément dispersif qui incline le front de la pompe, suivi d'un relais d'image inversant et multipliant l'angle d'inclinaison (Fig. 2.17). La conception de ce type de dispositif a été abondamment documentée, notamment dans le cas de l'amplification paramétrique [104] ou dans celui de la somme de fréquence [89].

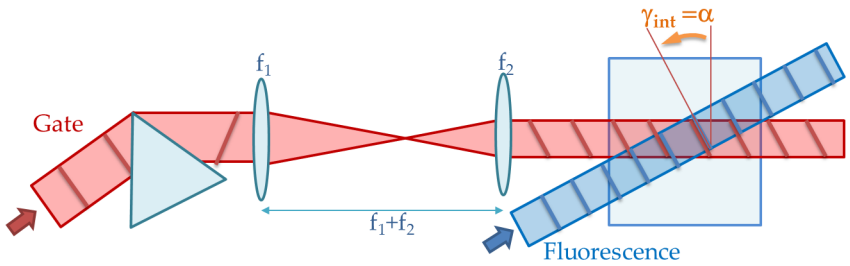


Figure 2.17 – Dispositif d'accord des fronts d'onde de gate et de fluorescence - Pour une DFG en géométrie non-colinéaire.

2.5 Éléments du montage

Cette partie est destinée à présenter les différents composants du montage de Down-conversion. Nous nous contenterons de les décrire en suivants l'ordre énoncé au sein de la figure suivante (2.18), qui présente une vue générale de l'appareil.

2.5.1 Source Laser (Fig.2.18.A et B)

A l'origine du montage se trouve un oscillateur femtoseconde Ti :Sapphire (*Pulsar*, Amplitude technologies), produisant des impulsions d'une durée de 20 fs, cadencées à une fréquence de 63 MHz, centrées sur 800 nm. L'énergie par impulsion en sortie est de 1.625 nJ. L'oscillateur est pompé à 532 nm par un laser Nd :YAG (*Opus 2W*, Laser Quantum Ltd) doublé en fréquence, de type DPSS (lui même pompé par un laser à diode, dans le proche IR).

Afin de pouvoir accéder aux effets non-linéaires mentionnés dans les précédents paragraphes, il est nécessaire de produire des impulsions d'intensité plus élevées, ce qui est le rôle du système amplificateur. Ce dernier est capable de produire des impulsions de 35-40 fs, à un taux de répétition de 5 kHz. L'énergie par impulsion finale est de l'ordre de 0.5 mJ. Ce système, également basé sur des milieux Ti :Sapphire,

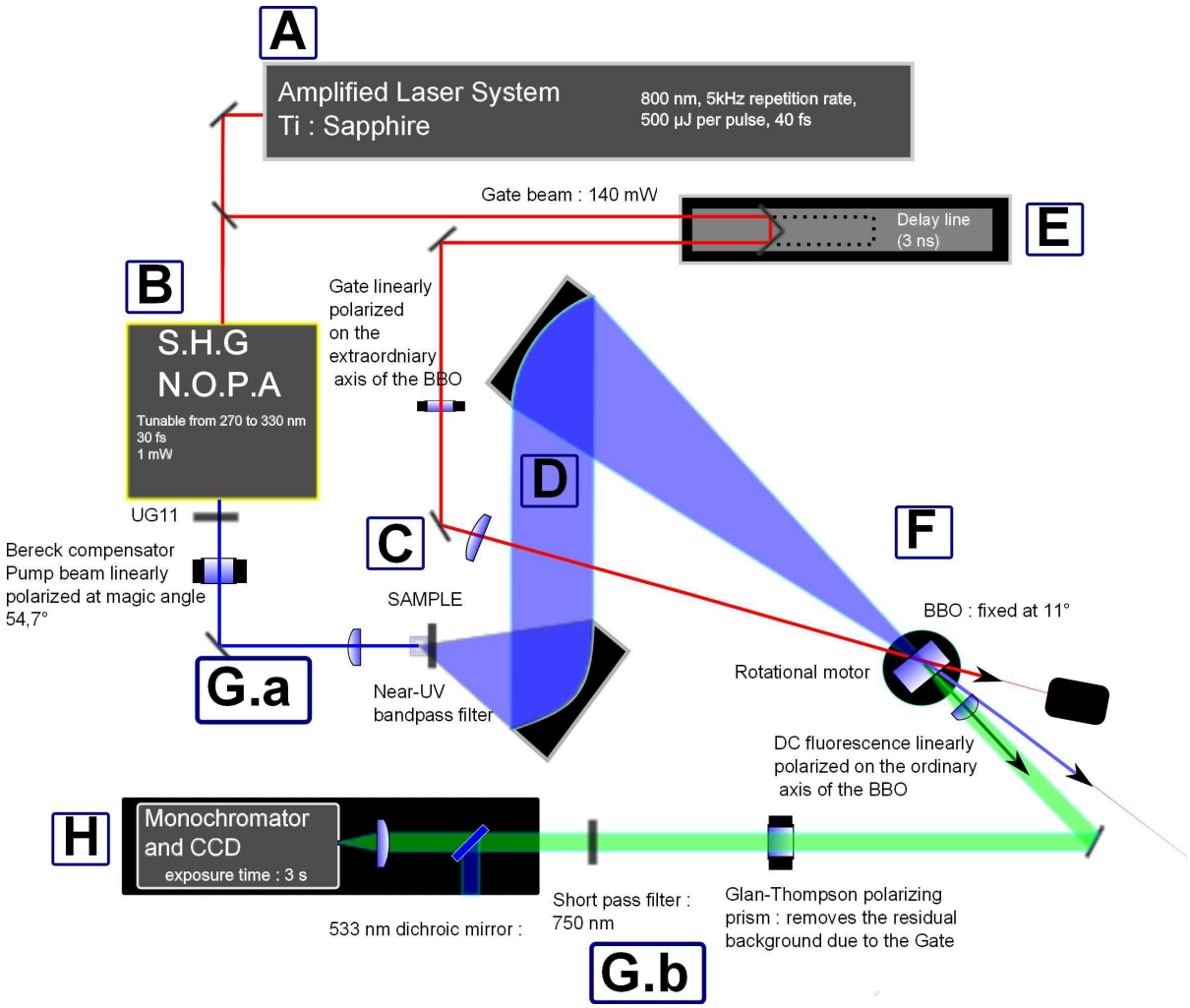


Figure 2.18 – Schéma Global de l'expérience de Fluorescence Ultra-rapide Résolue en Temps par Down-Conversion de Fréquences - Chaque lettre correspond à une partie quifera l'objet d'un développement dans les paragraphes suivants.

est appelé « Chirp Pulse Amplification » (CPA) [105]. Il se compose d'un réseau optique, [106], d'un amplificateur régénératif, [107], d'un amplificateur simple passage pompé par laser, et enfin d'un compresseur [108, 109].

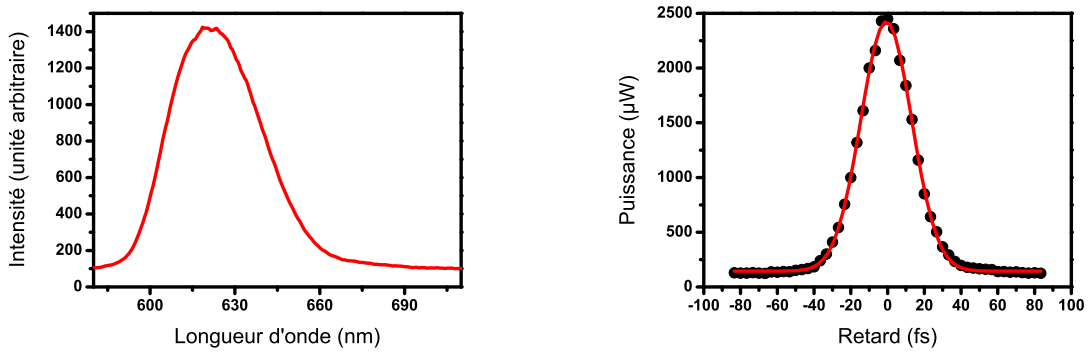
Les impulsions amplifiées sont ensuite accordées par le biais d'un NOPA doublé pour pouvoir exciter nos chromophores biologiques dans leurs gammes d'absorption. L'amplification paramétrique optique (OPA) se base sur le processus de génération paramétrique (OPG), effet non linéaire de deuxième ordre souvent qualifié « d'inverse de la fréquence somme ». En effet, au sein d'un milieu non-centrosymétrique (typiquement un cristal BBO), un photon pompe d'énergie $\hbar\omega_p$ peut spontanément donner naissance à deux photons d'énergies plus faibles : un photon signal $\hbar\omega_s$ et un photon idler $\hbar\omega_i$ tels que $\omega_s = \omega_p - \omega_i$, si les conditions d'accord de phase sont adéquates. Dans notre expérience, un faisceau pompe à 400 nm (issu du doublage du fondamental à 800 nm) va spontanément donner lieu à des photons visibles (signal) et infrarouge (idler). S'il se propage, en plus du faisceau pompe intense, un deuxième faisceau signal de faible intensité superposé temporellement et spatialement au faisceau pompe, le signal verra son intensité augmenter via l'interaction non linéaire avec le faisceau pompe. Pour de plus amples détails relatifs au mode opératoire de la technique (conditions d'accord de phase, de gain, design etc...), il est possible de se documenter au sein de revues existantes sur le sujet (Ex :[101].)

Dans la pratique, les faisceaux pompes et continuum sont obtenus en séparant l'impulsion délivrée par l'amplificateur. Une majeure partie de l'énergie est utilisée pour générer des impulsions pompe par doublage de fréquence dans un BBO de 1 mm d'épaisseur. L'autre partie du faisceau est focalisée dans un cristal de saphir pour générer un continuum de lumière blanche par auto-modulation de phase [110]. Pour compenser la GVD induite par la génération du continuum et par le passage au sein du BBO, un compresseur à prismes en silice fondue a été utilisé.

Notre NOPA est capable de délivrer des impulsions à 620 nm de 60 fs (Fig.2.19), à une puissance de l'ordre de 6 mW. Une fois doublée, nous obtenons un faisceau à 310 nm d'une puissance de l'ordre de 1 mW maximum.

2.5.2 Positionnement de l'échantillon et collection de la fluorescence (Fig.2.18.C et D)

L'échantillon fluorescent circule au moyen d'une pompe péristaltique dans un capillaire en quartz de section carrée de 0.5 mm de coté, ce dernier étant transparent dans l'UV. Le capillaire est fermement maintenu par un portoir fait maison, spécialement conçu pour l'expérience de down-conversion. Les critères de conception étaient de s'assurer du bon maintien du capillaire pendant le temps d'acquisition, et de volontairement limiter les degrés de liberté de ce dernier (notamment les axes de rotation), afin de s'assurer de la reproductibilité de l'expérience (Fig.2.20).



(a) (b)

Figure 2.19 – Caractéristiques de l'impulsion délivrée par le NOPA - (a) Contenu spectral de l'impulsion crée autour de 620 nm - (b) Autocorrélation en intensité obtenue. La courbe rouge correspond à un fit gaussien de FWHM égale à 60 fs

Une fois la fluorescence émise après excitation, cette dernière est collectée par une paire de réflecteurs paraboliques "hors-axe", en aluminium. Ainsi, on s'affranchit à la fois des aberrations chromatiques (que l'on aurait, par exemple, avec des dioptres sphériques), géométriques (puisque la parabole est la conique permettant de faire converger tous rayons parallèles en un point). L'utilisation de deux miroirs (contrairement à un seul miroir elliptique concave [111]) permet de disposer de focales objet et image potentiellement différentes, rendant leur intégration plus facile sur la table optique. Le stigmatisme des paraboles étant valable pour n'importe qu'elle section de paraboles, la caractéristique "hors-axe" de ces dernières permet de disposer de deux points focaux (source et BBO) situés à des endroits différents. A noter que d'autres setups peuvent se munir de réflecteurs type "objectif de Schwarzchild" [89]. Les deux paraboles (JANOS technology) ont un diamètre identique de 76.2 mm. La première parabole (*A8037-301*, f_1=5 cm, déviation de 90°) collecte, réfléchit et collimate la fluorescence vers la seconde parabole (*A8037-364*, JANOS technology, f_2 = 3 cm, déviation 30°) qui la focalise de nouveau sur le BBO, avec un angle solide d'environ 0.048 sr.

Il est alors nécessaire de placer l'échantillon et le cristal exactement sur les points focaux des deux paraboles (Fig.2.21). On remarque que l'accordabilité de la pompe signifie également la présence d'aberrations chromatiques qui peuvent longitudinalement faire dévier le focus de la pompe du point focal du premier miroir. Ce réglage est donc à effectuer pour chaque changement drastique de la longueur d'onde d'excitation. Cela est d'autant plus important qu'une fois le pinhole enlevé pour placer l'échantillon, seul le focus de la pompe permet de repérer le positionnement du point focal du premier miroir.

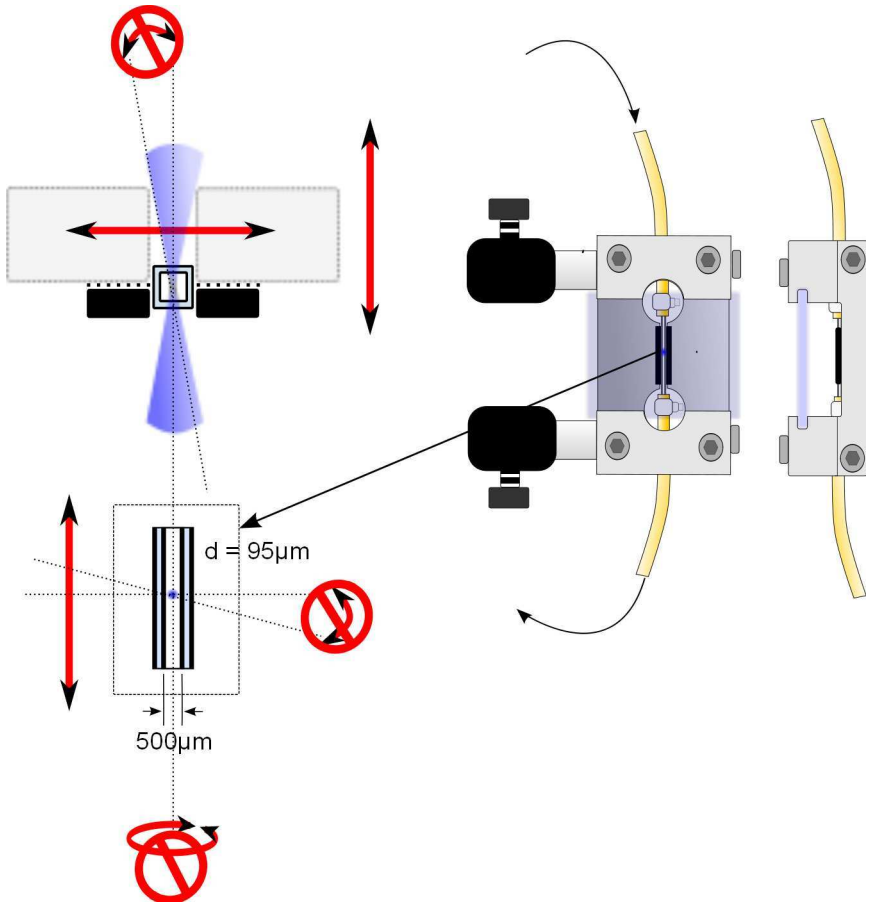


Figure 2.20 – Positionnement de l'échantillon dans le portoir- A gauche, axes de liberté tolérés. A droite, sens de circulation de l'échantillon. Le capillaire vient s'insérer dans une encoche permettant de le maintenir droit de telle sorte que ses faces avant et arrière soient toujours perpendiculaires au faisceau pompe. Afin d'éviter de multiples réflexions au sein du portoir, les faces internes de l'encoche ont été anodisées. Le portoir est relié à une platine micrométrique 3 axes (XYZ, *Optosigma*), dont un des axes est orienté le long de l'axe de propagation du faisceau pompe. Il est ainsi possible de déplacer le capillaire de haut en bas (le long de son axe principal) sans altérer la position du focus dans le capillaire, ce qui est utile pour changer la zone d'excitation et conserver la reproductibilité de l'expérience. La circulation de l'échantillon dans le capillaire se fait toujours du haut vers le bas. Le sens inverse engendre une pression négative dans les tubes et une entrée d'air, à même de créer des bulles. Ces dernières sont une importante source de bruit pouvant diffuser à la fois la pompe et la fluorescence. Le filtre optique laissant passer la fluorescence aux dépends de la pompe se place au moyen d'encoches directement après l'échantillon. Son positionnement induit un déplacement du point focal qu'il est nécessaire de corriger en déportant longitudinalement le capillaire.

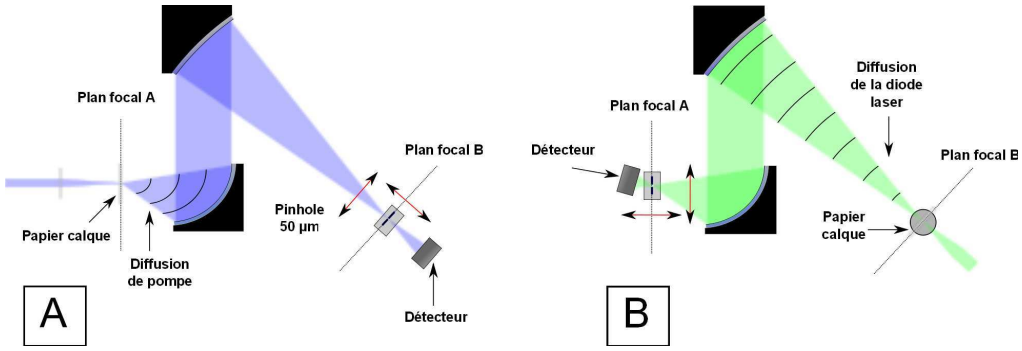


Figure 2.21 – Alignement des point focaux des paraboles : Quatre éléments sont alors nécessaires : une source de lumière cohérente (diode laser), du papier calque, utilisé pour diffuser cette lumière, un pinhole de 20 μm et une pointe métallique pour marquer précisément la position des différents point focaux.

La taille du spot de fluorescence à l'emplacement du BBO a été déterminée grâce à l'utilisation d'une webcam et de papier millimétré. Le diamètre est de 500 μm. Le grandissement des réflecteurs paraboliques étant de $f_2/f_1 \approx 6.43$, on peut estimer que le diamètre de la pompe focalisée dans l'échantillon avoisine les 85 μm.

2.6 Caractérisation du montage expérimental : [77]

Nous allons illustrer les capacités du montage à l'aide d'une molécule témoin relativement bien connue, le 2,5 Diphenyloxazol [112] plus communément appelée PPO. Sa composition chimique est présentée au sein de la figure 2.23.A, accompagnée d'une vue d'ensemble 3D des résultats pouvant être obtenus sur cette molécule.

Parmi les propriétés intéressantes de ce fluorophore, on notera :

- Son absorption dans l'UV (max : 302 nm) et son émission dans le proche UV-visible (max : 355 nm), plages de longueurs d'ondes correspondant bien à nos molécules d'intérêt. (Fig.2.22)
- Son coefficient d'extinction molaire ε_{302nm} de 35700 $M^{-1}cm^{-1}$ et son rendement quantique proche de l'unité, paramètres qui en font un excellent fluorophore.

2.6.1 Protocole expérimental

Les tests ont été réalisés avec une solution de PPO diluée dans de l'éthanol à une densité optique de 0.5. Cette dernière est excitée par un faisceau pompe ayant une densité d'énergie de 0.8 mJ/cm^2, centré à 302 nm. Bien que notre objectif soit de maximiser le rapport S/N, les conditions d'excitation de la fluorescence ainsi que l'intensité du faisceau porte (≤ 35 μJ) sont suffisamment faibles pour opérer à un régime linéaire de signal DFG. Cela permet de maintenir l'intégrité du BBO sur un usage à long terme. Son angle de phase matching a été fixé à 9°afin d'optimiser la conversion de la portion du spectre représenté dans la figure 2.23.B. L'épaisseur du cristal BBO utilisé pour la conversion de fréquence est de

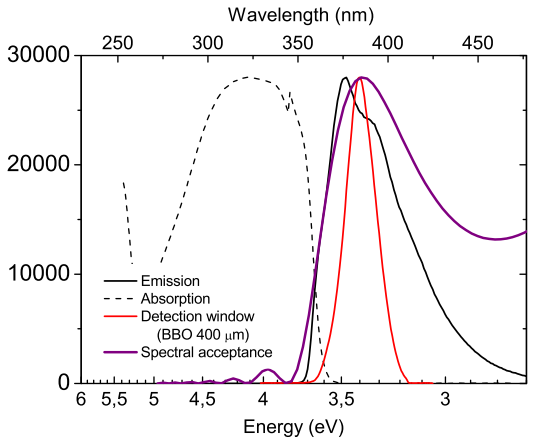


Figure 2.22 – Superposition des caractéristiques spectrales du PPO avec celle du dispositif de DFG.

400 μm. L'angle entre la gate et la fluorescence est de 7°, soit environ 4° internes. Le temps d'acquisition de la caméra a été fixé à 1 seconde pour chaque pas temporel, la ligne à retard se déplaçant jusqu'à un délais de 3 ns, sous la forme de 190 pas temporels échantillonnés selon une échelle logarithmique. Chaque mesure a été enregistrée deux fois.

2.6.2 Performances (Fig.2.23) :

- Le temps de mesure est de l'ordre de 20 minutes, parmi lesquelles 7 seulement sont allouées à l'acquisition, le reste étant nécessaire pour retrancher la diffusion de la gate à chaque déplacement de la ligne à retard.

- Les figures 2.22 et 2.23.B indiquent que la portion du spectre convertie entoure le maximum d'émission du PPO. Elle est centrée à 365 nm pour une largeur spectrale à mi-hauteur de 25 nm quand nos simulations indiquent une acceptance théorique beaucoup plus large, de l'ordre de 70 nm. Cette différence peut s'expliquer par la méthode retenue pour le calcul de l'acceptance. Nous avons en effet considéré uniquement les angles internes au cristal. Or, lorsque les faisceaux en jeu sont spectralement large, la réfraction à l'interface entre l'air et le cristal modifie très nettement les conditions d'accord de phase. En effet, même en conservant l'hypothèse d'une gate monochromatique, le faisceau de fluorescence contient un grand nombre de vecteurs d'onde de normes différentes correspondant à chaque longueur d'onde contenue dans le spectre de fluorescence. Lors de la réfraction à l'interface, ces vecteurs d'onde vont changer à la fois de norme et de direction, induisant un désaccord de phase supplémentaire non pris en compte dans le calcul simplifié exposé plus haut, ce qui réduit donc l'acceptance spectrale réelle [113, 114].

- Avec une épaisseur de cristal BBO de 0.4 mm, nous obtenons une résolution temporelle de l'ordre de 500 fs. Le déclin de fluorescence mesuré $I_\lambda(t)$ étant le produit de convolution entre la loi théorique d'émission de fluorescence de l'échantillon $i - \lambda(t)$ et de la Fonction de Réponse Instrumentale $\mathrm{IRF}_\lambda(t)$, cette dernière peut être estimée par déconvolution de l'ajustement avec une gaussienne (Fig.2.23.D). Il est également possible de la déterminer expérimentalement en résolvant temporellement le mélange de fréquences entre le faisceau pompe (diffusé par une solution de lait dilué) et le faisceau porte.

- Selon les conditions expérimentales précédemment énoncées, le rapport S/N équivaut à environ 1600 :1, comme on peut l'apercevoir sur la figure 2.23.D. Le niveau de bruit de fond est défini comme étant la RMS du signal mesuré aux temps négatifs. L'échelle dynamique mesurée est de 5130 coups, tout en sachant que chaque cinétique est produite à partir d'un seul canal CCD. Ce dernier correspond à un "binning" horizontal de 10 pixels, de telle sorte que chaque canal intègre environ 3.5 nm du signal DFG. Un plus large "binning" combiné à un nombre plus important de mesures conduirait à une échelle dynamique plus élevée.

2.6.3 Résultats et Discussion

La figure 2.24 présente un aperçu des résultats qualitatifs obtenus à partir des mesures réalisées avec du PPO. En (A) à gauche, les 300 premiers fs montrent un important shift spectral vers les longueurs d'onde bleues, du à une différence de vitesse de groupe (chirp) de la fluorescence, en raison des éléments dispersifs inclus dans le setup en amont du processus de DFG. Ensuite, le signal monte et se décale légèrement vers les rouges au cours des 5 premières ps (Fig.2.24.A, centre), ce qui est caractéristique des phénomènes de relaxation intramoléculaire ou de solvatation. Les traces cinétiques exposées en (B) ont été enregistrées sur une gamme allant de 580 à 720 nm (signaux DFG), mettant en évidence le décalage rouge graduel. De ce fait, les 5 à 10 premières ps apparaissent sous la forme d'un temps de montée pour les longueurs d'ondes supérieures à λ_{max} et d'un temps de déclin pour les longueurs d'ondes courtes. Cette étape initiale est suivie par une décroissance monotone, sans décalage significatif (Fig.2.24.A, à droite). En l'absence d'un parfait réglage de l'angle magique (cf annexe 3.8), on s'attend à ce que cette décroissance présente à la fois une composante anisotropique et une composante liée à la durée de vie de l'état excité.

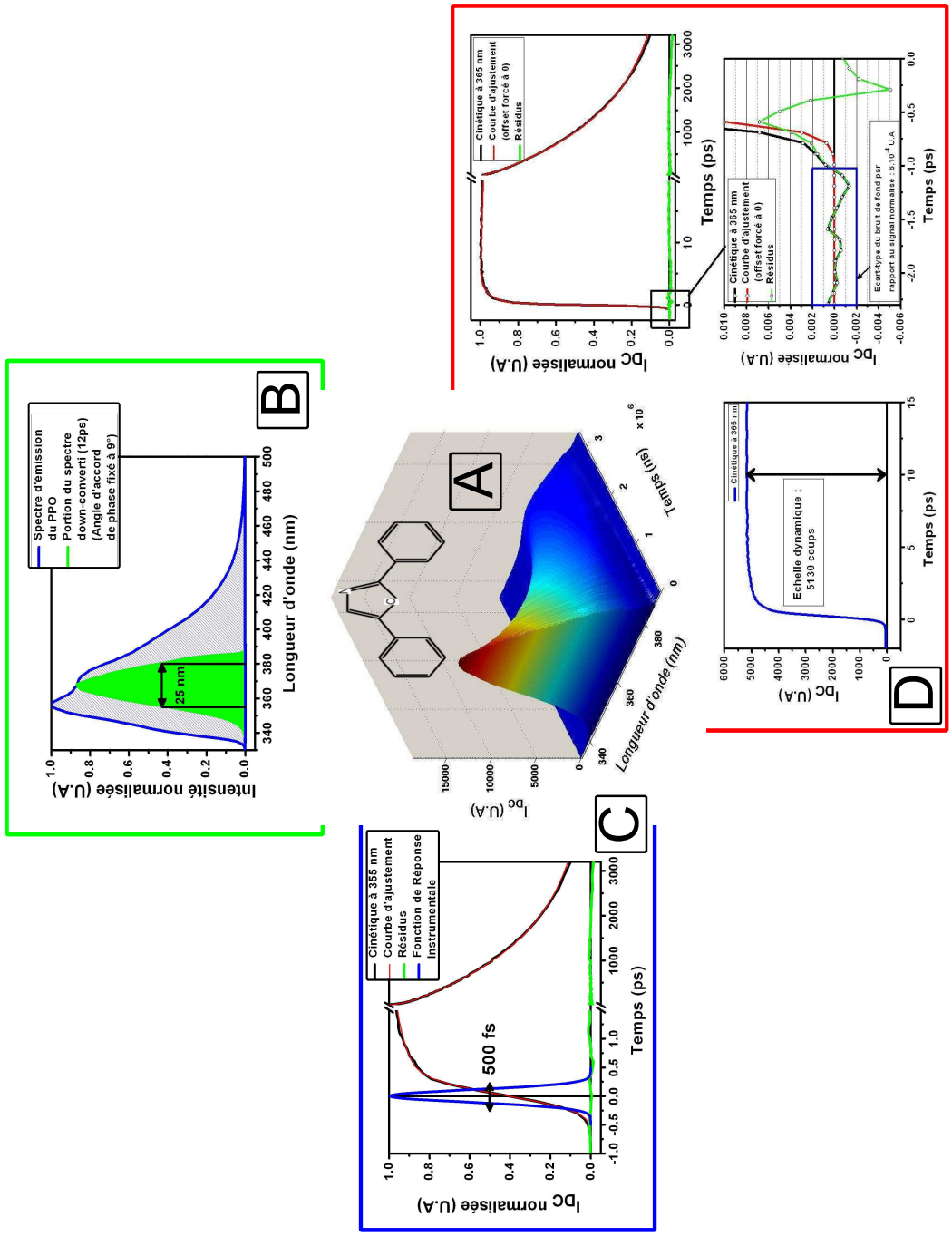


Figure 2.23 – Performances du montage de down-conversion résumées autour d'une expérience faite avec du 2,5 Diphényloxazole. A - Formule chimique du PPO et résumé de l'ensemble des données susceptibles d'être acquises au cours d'une expérimentation : $I_{fl} = f(\lambda, t)$. B - Superposition du spectre d'émission et de l'acceptance spectrale (25nm), obtenue pour un phase-matching tel que l'angle de la gate par rapport à la normale du cristal soit égal à 9°. C - Cinétique de déclin temporel de fluorescence pour une longueur d'onde de 355 nm, zoom sur le temps 0. La IRF de cette expérience est aux alentours de 500 fs, obtenue par déconvolution de l'ajustement (rouge) avec une gaussienne. En vert, sont représentés les résidus de l'ajustement. D - Zoom aux temps courts, présentation de certains paramètres qualitatifs de la mesure : rapport S/N de 1600 :1, pour une échelle dynamique de 5130 coups.

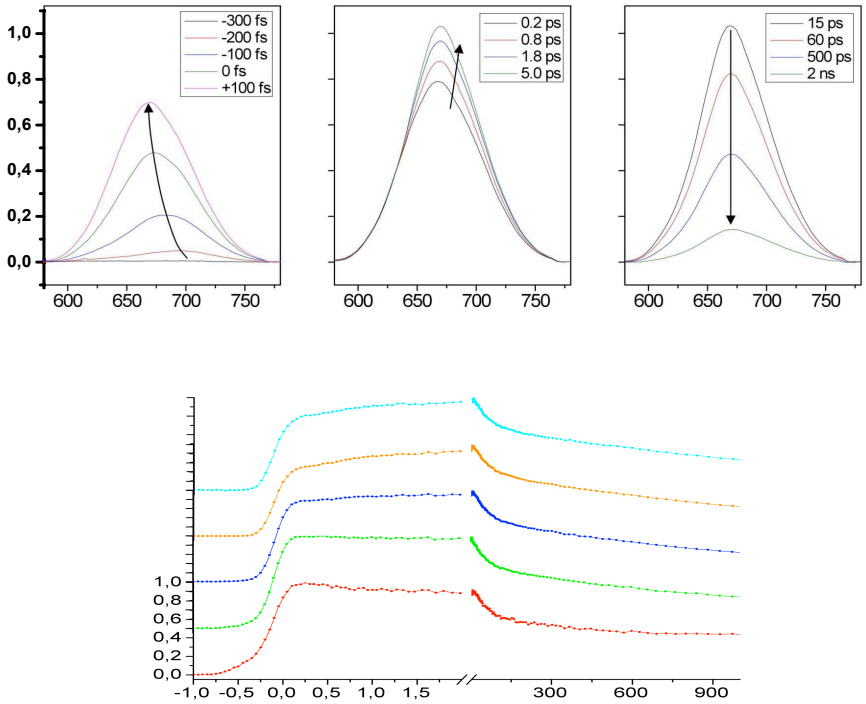


Figure 2.24 – Analyse qualitative des signaux DFG de la fluorescence émise par le PPO. A - Spectres DFG résolus en temps obtenus autour du maximum de fluorescence du PPO. Les 3 panneaux illustrent différentes fourchettes de déclins temporels, comme indiqué au sein des légendes. B - Sélections de traces cinétiques pour le PPO, les signaux DFG sont présentés à partir de 580 nm (rouge, soit équivalent à 336 nm après conversion) jusqu'à 720 nm (cyan, soit équivalent à 378 nm après conversion).

La figure 2.25 témoigne de la qualité des données recueillies, permettant une détermination très précise des temps de vie à partir d'un ajustement basé sur une somme discrète d'exponentielles. A gauche, on distingue une cinétique de fluorescence mesurée à 370 nm et ajustée par 3 exponentielles, dont deux temps de déclin et un seul temps de monté. Il est pourtant évident, au vu des résidus de l'ajustement, que ce temps de montée dévie du cas mono-exponentiel. La fidélité de l'ajustement est significativement améliorée (χ^2 réduit de 40 %, et résidus plus lisses) avec un ajustement incluant un second temps de montée (figure de droite). Le fait que la montée du signal soit réellement bi-exponentielle, indiquant vraisemblablement deux mécanismes de relaxation différents, ou simplement non-exponentielle est hors de propos ici. Ce dernier consiste plutôt à insister sur l'excellent rapport S/N des données de fluorescence résolues en temps, ainsi que la capacité de pouvoir raffiner une possible analyse quantitative jusqu'à inclure 4 constantes de temps.

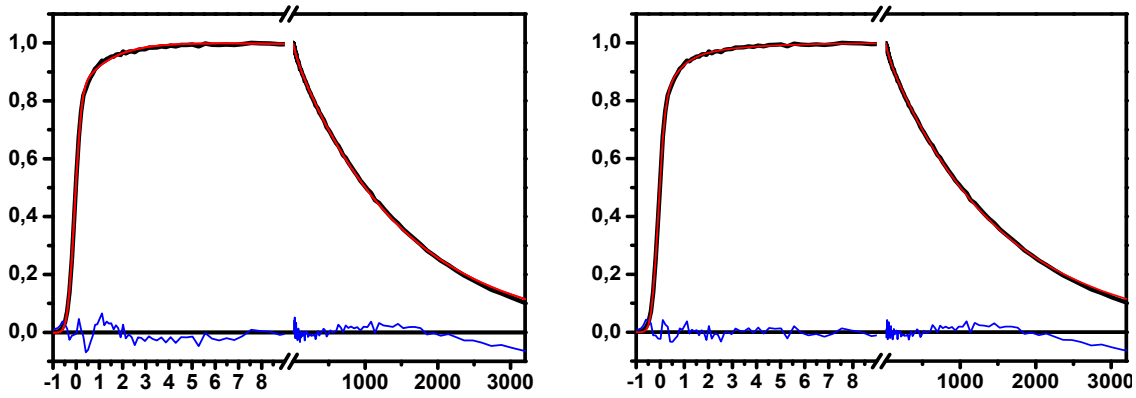


Figure 2.25 – Cinétiques de fluorescence du PPO, mesurées à 370 nm.. Ajustement avec une somme de 3 exponentielles (à gauche) ou 4 exponentielles (à droite). Les résidus (en bleus, lignes du bas) ont été agrandis 5 fois, par souci de visualisation.

Les résultats expérimentaux ont été extraits des cinétiques par un ajustement basé sur une somme de 3 exponentielles discrètes. Les informations pour 3 longueurs d'ondes (355, 370 et 380 nm) sont résumées au sein de la figure 2.26. Au centre, en A, se trouve un histogramme regroupant les temps de vie en fonction de leur amplitudes. Les encadrés B, C, D correspondent à un zoom sur les 3 temps discriminés, les barres d'erreurs étant celles données par l'ajustement. On distingue deux temps de vie de déclins différents. le premier, à 1.5 ns, correspond au temps de vie radiatif de 1.4 ± 0.2 ns du PPO, classiquement obtenu dans la littérature [115]. Le temps intermédiaire de 60 ps est attribué au temps de corrélation rotationnel du PPO. Les mesures n'ayant pas été effectuées à angle magique, il n'est pas surprenant d'observer une composante d'anisotropie dans ces gammes temporelles. Le temps le plus court, aux alentours de la ps, présente une amplitude négative dans les gammes montrées, mais cette dernière dépend fortement de la longueur d'onde. Le temps de montée visible dans l'UV se transforme en un temps de déclin ultracourt au fur et à mesure que l'on se dirige vers les longueurs d'onde rouges. Cela se traduit par un décalage spectral vers le rouge entre 0 et 5 ps probablement du à une relaxation vibrationnelle ou de solvatation du système [77].

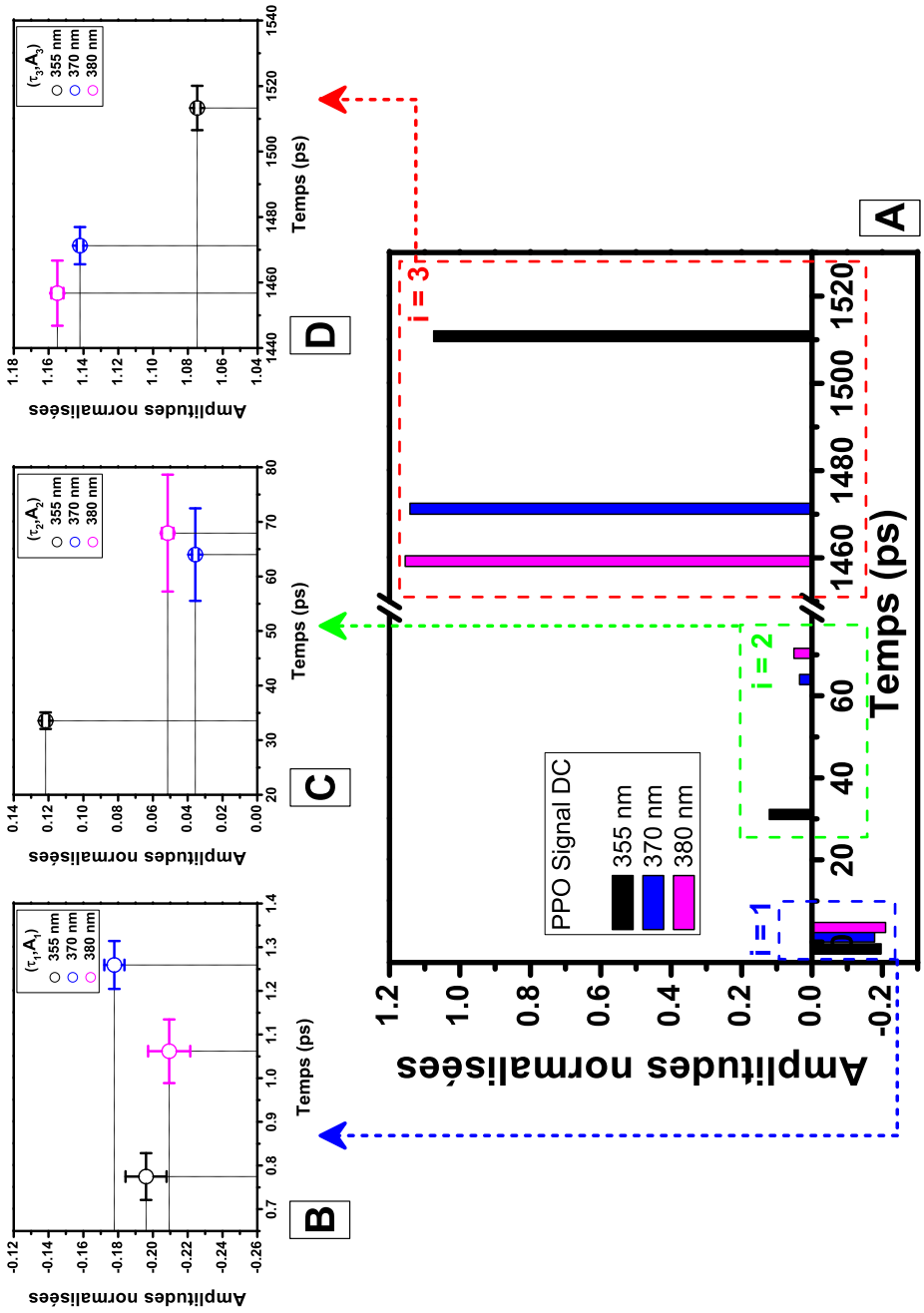


Figure 2.26 – Résultats obtenus à partir des paramètres énoncés dans le paragraphe 2.6

2.7 Conclusion

Nous avons mis en place un montage de fluorescence résolu en temps basé sur une différence de fréquence de type II. Il permet de réaliser une down-conversion de signaux émis par des chromophores biologiques, à savoir absorbant et émettant dans le proche UV. Les bénéfices obtenus par la down-conversion ont été mesurés sur une expérience utilisant le PPO. L'avantage de ce système est de pouvoir échantillonner les cinétiques de fluorescence dans le visible, zone où les efficacités quantiques de notre détecteur et réflectives du spectromètre sont maximales. Une DFG de type II non-colinéaire permet de mieux filtrer le signal à l'entrée du spectromètre. 0n obtient ainsi des niveaux S/N rarement atteints avec des montages de résolution temporelle similaire (350-500 fs). Augmenter le rapport S/N est avantageux, afin de mieux discriminer les temps de vie des cinétiques et surtout de limiter le temps d'exposition du fluorophore, en diminuant le nombre d'acquisitions à moyenner (25 minutes d'enregistrement pour nos expériences sur le PPO, à relativiser avec son très haut coefficient d'extinction molaire et son rendement quantique proche de l'unité). La bande passante spectrale du système est de 25 nm. Cela ne permet pas de couvrir l'ensemble du spectre d'émission de nos composés. Cependant, lorsque celle-ci est centrée autour du maximum d'émission, il est déjà possible d'observer des dynamiques de solvatation. De telles dynamiques ne sont pas l'objet de notre étude, aussi nous n'avons pas pris la peine d'imprimer une rotation du cristal pendant le temps d'acquisition, ce qui aurait permis d'obtenir des TRES plus larges. Bien que plus faible que celle des meilleurs montages, notre résolution temporelle reste toutefois suffisante pour discriminer des temps de vies allant du domaines sub-ps à la nanoseconde, ce qui semble à première vue suffisant pour les structures mesurées dans ce travail de thèse. L'inconvénient majeur d'utiliser une gate à 800 nm lorsque l'on down-convertit des photons UV vers le visible est que ces longueurs d'ondes se chevauchent. Même si un polariseur performant permet de filtrer efficacement es derniers sur la base de leur orientation, des diffuseurs ponctuels de la gate, non polarisés, se retrouvent tout de même en bout de course. Pour palier à ce problème, une gate décalée vers l'IR sera prochainement utilisée.

Chapitre 3

Approche A : Étude du quenching ultrarapide local de la 2-Aminopurine inclue au sein de Δ(-)PBS

Sommaire

3.1 Concepts **46**

3.1.1 Temps de vie de fluorescence et rendement quantique 46

3.1.2 Quenching statique et quenching dynamique 47

3.1.3 Dynamique de quenching et informations structurelles 50

3.2 Préparation & conditionnement des échantillons **50**

3.3 Résultats préliminaires **52**

3.4 Cinétiques de quenching **55**

3.5 Anisotropie de fluorescence **63**

3.5.1 Principe 63

3.5.2 Mesure d'anisotropie résolue en temps 64

3.5.3 Traitement des données 65

3.5.4 Résultats 65

3.5.4.1 2Ap libre 65

3.5.4.2 2Ap incorporée dans Δ(-)PBS 65

3.6 Δ(-)PBS et glycerol **68**

3.7 Conclusion **72**

3.8 Annexe au chapitre 3 . . . . . **74**

Au sein de ce chapitre, nous allons présenter les premiers résultats issus de l'application directe du montage de down-conversion. L'une des principales difficultés de ce type d'expérience est l'analyse et l'interprétation des cinétiques obtenues. Nous allons donc rapidement évoquer en quoi le quenching de fluorescence peut être informatif d'un point de vue de la dynamique structurelle des composés étudiés. Après une rapide description des conditions expérimentales, nous présenterons les données issues de la fluorescence résolue en temps de la 2Ap au sein de Δ(-)PBS en position 6, 8 et 10. L'analyse de l'attribution des différents temps de vie sera complétée par une étude de l'anisotropie de fluorescence de ces mêmes composés. Enfin, nous présenterons des cinétiques de déclins prises dans du glycerol, en se basant sur l'hypothèse initiale que l'augmentation de viscosité du milieu pourrait aider à identifier plus clairement les temps de vie issus d'un quenching statique de ceux provenant d'un quenching dynamique.

3.1 Concepts : Relations entre temps de vie de fluorescence et dynamique structurelle

Nous avions précédemment mentionné durant l'introduction que la fluorescence de la 2Ap pouvait être quenchée sans expliciter clairement ce que signifiait ce terme, ni expliquer en quoi l'étude de cette dernière pouvait nous permettre d'obtenir des données en terme de dynamique conformationnelle de l'ODN sondé. L'objectif de ce paragraphe est donc de palier à ce manque tout en faisant un rappel sur la nomenclature faisant référence à ces concepts, pouvant parfois être source de confusion.

3.1.1 Temps de vie de fluorescence et rendement quantique

D'un point de vue purement cinétique réactionnelle, on peut écrire que la 2Ap à l'état excité (*) peut relaxer vers son état fondamental 2Ap soit en émettant un photon de fluorescence hv_F, donc de manière radiative (suscrit r) :

$$2Ap^* \xrightarrow{k_r} 2Ap + hv_F \tag{3.1}$$

Où k_r représente le taux de dés-excitation radiatif de la molécule. De même, la 2Ap* peut relaxer vers l'état fondamental de manière non radiative, par exemple via conversion interne (suscrit nr) :

$$2Ap^* \xrightarrow{k_{nr}} 2Ap \tag{3.2}$$

L'évolution temporelle de l'état excité juste après l'excitation par une impulsion laser δ s'écrit :

$$\frac{2Ap^*}{dt} = -(k_r + k_{nr})[2Ap^*] \tag{3.3}$$

Et la concentration de molécules à l'état excité à un instant t est donnée par :

$$[2Ap^*](t) = [2Ap]_0 \cdot \exp[-(k_r + k_n r)t] \tag{3.4}$$

Avec $[2Ap]_0$ la concentration de 2Ap à l'état fondamental avant l'excitation laser. On peut ainsi définir un temps de vie en l'absence de quencher :

$$\tau_{nq} = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \tag{3.5}$$

ainsi qu'un rendement quantique de fluorescence en l'absence de quencher (égal à 0.68 dans notre cas !) :

$$QY_{nq} = k_r \tau_{nq} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \tag{3.6}$$

3.1.2 Quenching statique et quenching dynamique

On définit le phénomène de quenching comme étant tout processus affectant le temps de vie et/ou le rendement quantique de la fluorescence d'une molécule. Cette perturbation s'effectue en présence d'une autre molécule que l'on nomme quencher (Q). Ce quenching peut se produire de manière statique ou dynamique.

Dans le formalisme de la cinétique réactionnelle, le quenching statique pourrait se définir par la formation de complexes non fluorescent à l'état fondamental (Fig.3.1).

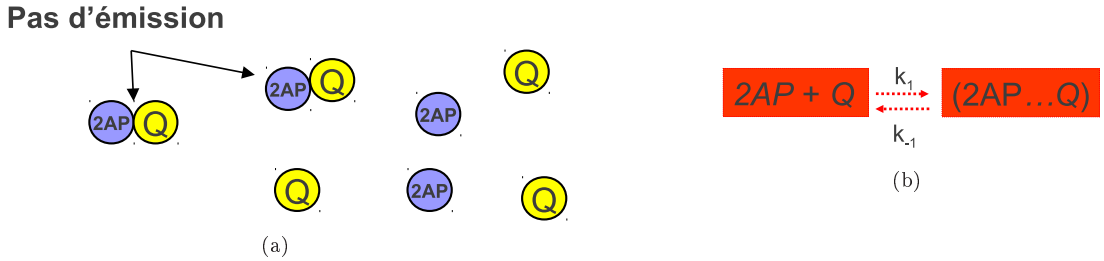


Figure 3.1 – Formation d'un complexe non fluorescent entre la 2Ap et le quencher à l'état fondamental -(a) Représentation schématique de l'état d'équilibre avant excitation. -(b) Équation d'équilibre statique avant excitation.

Après excitation par une impulsion laser δ, on se retrouve avec les mêmes processus de relaxation que 3.1 et 3.2, accompagnés de la formation non radiative du complexe non fluorescent :

$$\begin{cases} 2Ap^* \xrightarrow{k_r} 2Ap + h\nu_F \\ 2Ap^* \xrightarrow{k_{nr}} 2Ap \\ (2Ap \ldots Q) \end{cases} \tag{3.7}$$

Où $K_{eq} = \frac{[(2Ap \dots Q)]}{[2Ap][Q]}$ représente la constante d'équilibre de complexation. En tenant compte de la conservation des masses du système défini plus haut, on a :

$$[2Ap]_0 = [2Ap] + [(2Ap \dots Q)] \tag{3.8}$$

et comme l'intensité de fluorescence est proportionnelle aux concentrations, au sein d'un milieu dilué, le rapport entre les intensités en l'absence de quencher I_{nq} et quenchée $I_{q_{stat}}$ est de :

$$\frac{I_{nq}}{I_{q_{stat}}} = 1 + K_{eq}[Q] \tag{3.9}$$

Le quenching dynamique se caractérise par un mécanisme de relaxation non radiatif supplémentaire, entrant en compétition avec la relaxation seule de la 2Ap, pendant le temps de vie de son état excité. Ce qui fait qu'après excitation par une impulsion laser δ les équations de taux deviennent :

$$\begin{cases} 2Ap^* \xrightarrow{k_r} 2Ap + hv_F \\ 2Ap^* \xrightarrow{k_{nr}} 2Ap \\ 2Ap^* + Q \xrightarrow{k_q} 2Ap + Q^* \end{cases} \tag{3.10}$$

Le temps de vie moyen en présence de quencher ainsi que le rendement quantique QY_q se définissent respectivement par :

$$\tau_q = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_q[Q]} \qquad QY_q = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_q[Q]} = \frac{k_r \tau_{nq}}{1 + \tau_{nq} k_q[Q]} \tag{3.11}$$

et l'équation 3.9 devient :

$$\frac{I_{nq}}{I_{q_{dyn}}} = 1 + \tau_{nq} k_q[Q] \tag{3.12}$$

Encore appelée équation de Stern-Volmer.

Les mécanismes à l'origine du quenching dynamique peuvent être dus à :

- Un transfert de charge (réaction redox)
- Un transfert de protons (réction acide-base)
- Un transfert d'énergie
- Des collisions avec dissipation calorifique

Seul le premier cas nous intéresse réellement. Ainsi, lorsqu'un photon excite une molécule, un électron est promu d'une orbitale de l'état fondamental vers une orbitale d'énergie plus élevée, (Fig.3.2, en ne considérant que les orbitales frontières HOMO et LUMO du fluorophore avant et après excitation lumineuse).

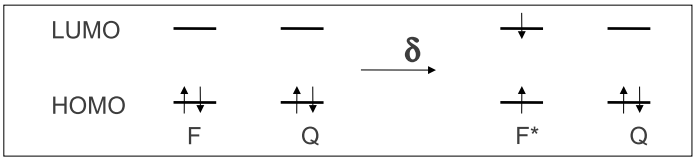


Figure 3.2 – Photoexcitation de la 2Ap : intermédiaire de Franck-Condon

Si la molécule photo-excitée se trouve être un fluorophore (F = 2Ap dans notre cas), et que cette dernière est positionnée suffisamment proche d'un quencher, un CT peut s'effectuer au travers de deux processus :

- Si Q est un donneur d'électrons par rapport à la 2Ap*, alors la photo-excitation peut être considérée comme un mécanisme créant un trou à l'état fondamental de la 2Ap, rempli par un électron de l'état fondamental de Q. Il s'agit d'un mécanisme de transfert de trou, processus gouverné par les orbitales HOMOs des deux espèces (Fig.3.3).

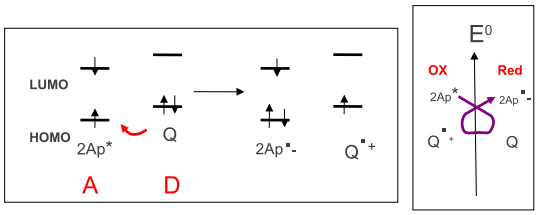


Figure 3.3 – Photoexcitation de la 2Ap : mécanisme de transfert de trou (oxydatif)

Remarquons que l'enthalpie libre réactionnelle ΔG^0 doit être négative, donc la force directrice du transfert ne peut se faire que pour des purines (G, A, Fig.3.5) dont le potentiel oxydo-réducteur est supposé plus faible que celui de la 2Ap (cf 1.3.2) :

$$\Delta G_r^0 \approx nF\left(E^0_{Q^{\bullet+}/Q^*} - E^0_{2AP^*/2AP^{\bullet-}}\right) \quad \text{ssi} \quad Q = G, A \tag{3.13}$$

- Si Q est un accepteur d'électrons par rapport à la 2Ap*, alors la photo-excitation peut être considérée comme un mécanisme injectant un électron LUMO de la 2Ap vers une orbitale LUMO de Q. Il s'agit d'un mécanisme de transfert d'électron, processus gouverné par les orbitales LUMOs des deux espèces (Fig.3.4).

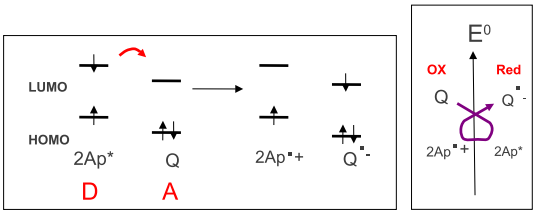


Figure 3.4 – Photoexcitation de la 2AP : mécanisme de transfert d'électron (réducteur)

L"enthalpie libre réactionnelle ΔG^0 est telle que la force directrice du transfert ne peut se faire que pour des pyrimidines (C, T, Fig.3.5) dont le potentiel oxydo-réducteur est supposé plus élevé que celui de la 2Ap (cf 1.3.2) :

$$\Delta G_r^0 \approx nF\left(E^0_{2AP^{\bullet+}/2AP^*} - E^0_{Q/Q^{\bullet-}}\right) \quad \text{ssi} \quad Q = C, T \tag{3.14}$$

3.1.3 Dynamique de quenching et informations structurelles

Pour qu'un CT efficace puisse avoir lieu, la distance $F-Q$ entre le fluorophore et le quencher doit être constante et surtout faible (2Å), ce qui est le cas, par exemple, d'un empilement de bases au sein d'ANs. Les bases empilées interagissent par la formation de complexes π-π à l'état fondamental, non fluorescents car ayant des taux de relaxation extrêmement rapides. Nous sommes dans le cas d'une configuration de quenching statique.

La distance $F-Q$ peut parfois être modulée pendant le temps de vie de l'état excité de la molécule, ce qui est le cas, par exemple, d'ANs ayant un faible degré de structuration. Cette diffusion des deux partenaires sur des temps de relaxation comparativement plus longs est caractéristique d'un quenching dynamique (également appelé collisionnel).

Ces deux mécanismes forment deux classes conformationnelles théoriques limites, et d'autres structures pourront évoluées entre ces deux bornes :

- Un quenching statique moins efficace, signe d'une géométrie statique au sein de laquelle le fluorophore et le quencher sont moins bien empilés.
- Des géométries plus ou moins contraintes, alternant entre quenching statique et collisionnel pendant le temps de vie de l'état excité (quenching dynamique ultra rapide).

Ainsi, le nombre de classes conformationnelles détectées, leurs cinétiques respectives, mais également la répartition des molécules au sein de chaque classe permet d'évaluer de manière précise la flexibilité locale de la macromolécule sondée.

3.2 Préparation & conditionnement des échantillons

Les oligonucléotides $\Delta(-)$ PBS marqués en position 6, 8 et 10 par la 2Ap sont présentés au sein du schéma 3.5 et seront dorénavant mentionnés sous le terme $\Delta(-)$PBS-2Ap(X), où X est l'emplacement du fluorophore. $\Delta(-)$PBS est un variant de $(-)$PBS au sein duquel la zone simple brin en 3' (composée des nucléotides 5'-GCCA-3') est manquante. Étant donné qu'il a été montré l'existence d'un site de liaison sur cette partie parmi 3 autres pour NCp7 [116], l'utilisation de $\Delta(-)$PBS permettra de diminuer

la taille des complexes formés au sein d'études futures. Les échantillons ont été commandés chez IBA GmbH et utilisés tels quels au moment de leur réception. Ils ont été dissouts dans une solution aqueuse contenant 50 mM de tampon acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES), et le pH a été maintenu de ce fait constant à 7.5. Les spectres d'absorption et de fluorescence statiques ont été effectués respectivement sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 900 et un spectrofluoromètre de type PTI QuantaMaster.

Pour la Down-Conversion, les échantillons ont été ajustés à une densité optique de 0.4 à 310 nm, pour une longueur de cuve de 0.5 mm, ce qui revient à une concentration de 1.3 mM. Les volumes minimaux d'échantillons préparés sont de l'ordre de 400 μL.

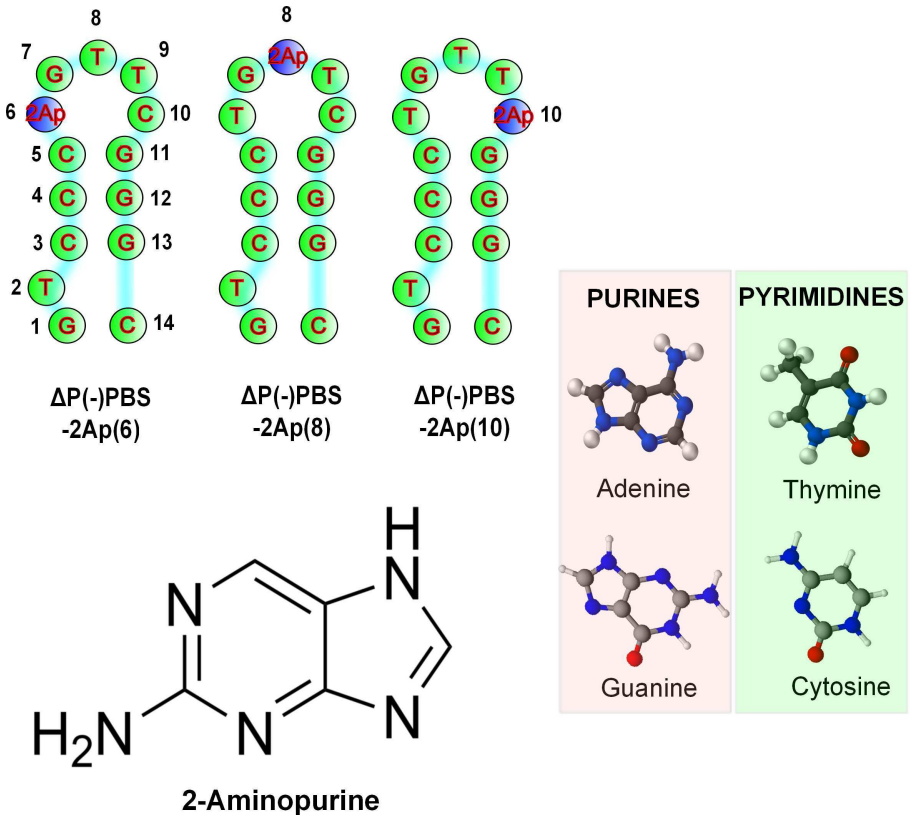


Figure 3.5 – Rappel des différents composés biochimiques utilisés - En haut à gauche, on distingue Δ(-)PBS, la 2Ap remplaçant une Thymine au sein de Δ(−)PBS-2Ap(6,8) et une cytosine pour Δ(−)PBS-2Ap(10), donc sondant trois environnements différents pour la même boucle. Remarquons les appariements entre les nucléotides 1-G-C-14, 3,4,5-C-G-13,12,11 constituant la «tige» de l'ensemble. Les nucléotides A,G,T,C sont formés à partir de bases azotées dont les structures et les noms sont représentés, pour plus de clarté, dans la figure de droite. Ces dernières sont séparées en deux classes, les purines (molécules azotées hétérocycliques constituées d'un cycle pyrimidine fusionné à un cycle imidazole) et les pyrimidines (hétérocycliques azotés et aromatiques comportant deux atomes d'azote). En bas, est présentée la structure chimique de la 2Ap pour une comparaison directe avec son analogue, ie, l'Adénine (également nommée 6-Aminopurine).

Température d'acquisition et stabilité de Δ(-)PBS : Les mesures effectuées au sein de notre laboratoire ont été réalisées à température ambiante (293K). Au vu de la structure de nos oligonucléotides

(ODNs), on peut légitimement s'interroger sur leurs stabilités vis à vis d'un tel conditionnement. Ces paramètres de stabilité thermodynamique peuvent être mesurés grâce à un thermocycleur couplé à un spectromètre d'absorption. En effet, l'augmentation graduelle de la température va dénaturer nos ODNs doubles brins, ce qui va se traduire par un effet hypsochrome, à savoir une augmentation de l'absorption des bases dans l'UV. Un comportement transitoire de type biphasique (sigmoïdal) est alors observé, dont l'ajustement permet de déterminer les constantes thermodynamiques du système [117]. On peut, par exemple, en déduire la température de fusion (T_m), définie comme étant la température pour laquelle 50 % des ODNs sont encore sous forme de duplexes. La T_m du variant (-)PBS a été déterminée par Egelé & al.[116] à la fois empiriquement (60°) et théoriquement (50°), à l'aide d'un algorythme de prédiction «unifié», *mfold*, basé sur la méthode du plus proche voisin [118]. C'est ce dernier qui nous permet d'extrapoler avec confiance une T_m de 50° pour Δ(-)PBS à partir de paramètres structuraux (probabilités d'appariement de bases) obtenus lors d'expériences RMN-^{1}H réalisées par Bourbigot & al. [21]. Outre l'appariement de type Watson-Crick entre les bases C3, C4, C5 et G13, G12, G11, à l'origine de la tige, l'absence de signaux pour les protons G1-imino et C14-amino suggère que cette dernière paire est instable, déséquilibre accentué par la protrusion de T2. De manière intéressante, en forçant l'appariement de G1-C14 dans le logiciel, ce dernier nous retourne une T_m de 18°, ce qui confirme la faible probabilité d'occurrence d'une telle structure.

3.3 Résultats préliminaires

Ce protocole expérimental avait déjà été mis en place au sein de l'équipe du Pr. Yves Mely (laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Université de Strasbourg), et les mesures de fluorescence résolues en temps effectuées par spectroscopie TCSPC [1]. Par souci de pragmatisme, seuls les déclins de fluorescence (Table 3.1) et d'anisotropie (Table 3.2) acquis sur Δ(−)PBS-2Ap(6, 8 et 10) sont exposés. Notons que l'article [1] propose également des mesures conduites en présence de NCp7 et de divers mutants, à un ratio de 3 protéines par molécule d'AN.

	QY	α_0	τ_1	α_1	τ_2	α_2	τ_3	α_3	τ_4	α_4	$\langle\tau\rangle$
2-Aminopurine	0.68	-	-	-	-	-	-	-	10.2	1.00	10.2
Δ(-)PBS-2Ap(6)	0.024	0.80	0.10	0.13	0.7	0.02	3.6	0.02	8	0.03	1.8
Δ(-)PBS-2Ap(8)	0.028	0.82	0.09	0.08	0.7	0.03	3.1	0.03	8.3	0.04	2.1
Δ(-)PBS-2Ap(10)	0.006	0.94	0.13	0.03	0.8	0.01	3.5	0.01	8.2	0.01	2.1

Table 3.1 – Paramètres de fluorescence statique et résolue en temps pour 2-Ap et Δ(-)PBS-2Ap(6, 8 et 10) - Les populations α_0 «non résolues» ont été estimées par : $1 - \tau_{2Ap}/(\langle\tau\rangle \cdot R_m)$, avec $R_m = QY_{2Ap}/QY_{PBS}$. Les temps de déclin τ_i sont en ns, les amplitudes sont notées α_i.

A partir de ces résultats, plusieurs remarques ont pu être conclues :

	Φ_1	β_1	Φ_2	β_2	Φ_3	β_3	S	θ_0
2-Aminopurine	0.08	1.00	-	-	-	-	0.00	90
Δ(-)PBS-2Ap(6)	0.17	0.38	0.7	0.34	2.2	0.28	0.79	32
Δ(-)PBS-2Ap(8)	0.22	0.36	0.7	0.11	2.1	0.53	0.79	31
Δ(-)PBS-2Ap(10)	0.18	0.46	0.9	0.27	2.6	0.27	0.73	36

Table 3.2 – Paramètres de d'anisotropie fluorescence pour 2-Ap et Δ(-)PBS-2Ap(6, 8 et 10) - ϕ_i (ns) sont les temps de corrélation rotationnels, β_i leurs amplitudes, S est le paramètre d'ordre généralisé et θ_i (en degré) est le cône de demi angle associé au mouvement local de la 2-Ap [1].

- Le rendement quantique de la 2Ap est 24 à 113 fois plus élevé sous forme libre qu'intégrée au sein de Δ(-)PBS. Ce quenching de la 2Ap avec les bases voisines est spécifique du site d'insertion, et est 4 à 5 fois plus important au sein de Δ(-)PBS-2Ap(10). Cette remarque est cohérente avec l'empilement de C10 et de G11 démontré par RMN [21].

- Jusqu'à 4 temps de vie de fluorescence ont été mesurés (Table 3.1), indiquant au moins 4 sous-états conformationnels, s'étendant de 0.1 à 9 ns. Le caractère ultrarapide du quenching est souligné par le fait que plus de 90 % du signal se situe dans les 100 premières ps, ce qui sous-entend probablement la présence d'un quenching statique de la 2Ap (via CT). Les fortes disparités entre les ratios de QY et de $\langle\tau\rangle$ de la 2Ap libre par rapport à Δ(-)PBS nous indiquent que les cinétiques n'ont pu être entièrement résolues.

- 3 temps de vie d'anisotropie ont été mesurés, le plus long (2.1 ns) a été attribué à la bascule de la macromolécule Δ(-)PBS, le temps moyen (700 à 900 ps) correspond aux mouvements segmentaires de la boucle, et le plus court (170 à 200 ps) pourrait être relié à rotation locale de la 2Ap dans Δ(-)PBS.

- Plusieurs indices sous entendent que la boucle PBS serait localement plus structurée que des équivalents d'ADNs simples brins : les QYs de Δ(-)PBS-2Ap(6 et 8) y sont 2 à 3 fois plus élevés, et les cônes de demi-angle de la 2Ap en moyenne inférieurs de 10°, ce qui pourrait se traduire par un quenching collisionnel plus faible dans les boucles que dans les ADNs monocaténaires de séquences similaires [46, 47].

Ainsi, lorsque la 2Ap est insérée dans une séquence nucléotidique, la fluorescence de cette dernière se trouve systématiquement quenchée. Cependant, il semblerait que la nature du quenching dépende fortement des bases avoisinantes (présence de G ou non) ainsi que de la structure de l'AN étudié. S'il est clair qu'elle entre en collision avec son environnement proche lorsque l'AN est monocaténaire, il semble qu'elle puisse également s'empiler avec les Gs alentours sous une forme de quenching plus statique [46, 47].

La dynamique de 2Ap est encore plus contrainte au sein de la boucle PBS, signe d'un encombrement stérique plus important. Afin d' identifier pleinement ce qui relève du quenching statique et du quenching dynamique, il est nécessaire de pouvoir résoudre complètement la dynamique de dés-excitation de 2Ap au sein de la boucle Δ(-)PBS. Nous allons montrer que notre montage DFG dispose de la résolution temporelle nécessaire pour nous apporter ce type de données.

3.4 Cinétiques de quenching ultrarapide de Δ(−)PBS-2Ap(X) en solution aqueuse

Les résultats de cette section ont été publiés au sein de l'article ci-joint : [10]. Le montage utilisé est décrit au sein du chapitre 4.1.1.2. Les aspects clefs des résultats expérimentaux peuvent être résumés de la manière suivante :

- Le bon accord entre les ratios $\tau_{2Ap}/\tau_{\Delta(-)PBS-2Ap(X)}$ obtenus au maximum d'émission (368 nm) (Cf : Table 1) et les facteurs de normalisation d'intensité des spectres d'émission statiques $I_{2Ap}/I_{\Delta(-)PBS-2Ap(X)}$ (Fig. 1-b) prouve que l'on a résolu l'intégralité des dynamiques de quenching des ODNs marqués.

- Les cinétiques de déclin de fluorescence de Δ(−)PBS-2Ap(X) sont fortement hétérogènes : 4 temps de vie ont été identifiés, ce qui représente au minimum 4 classes conformationnelles, réparties sur une gamme de 0.8-5 ps, 10-40 ps, 90-130 ps, et 2 à 3 ns (Cf : Table 1). Les composantes longues (τ_4) sont probablement dues à un quenching collisionnel de la 2Ap avec ses bases voisines dans des structures plus lâches. Les composantes courtes (τ_0, τ_1) sont attribuées à des structures statiques et contraintes, où le CT se fait de manière efficace via interactions d'empilement entre la 2Ap et les nucléotides voisins.

- Le caractère site-spécifique mis en évidence par Godet & Al. [1] est confirmé : 65 % des paramètres d'amplitudes de Δ(-)PBS-2Ap(6, 8) sont répartis sur les 40 premières ps, contre 96 % pour Δ(-)PBS-2Ap(10). Chez ce dernier, le temps le plus court, ie τ_0, concentre 80% de l'information structurelle, alors que celle-ci est répartie plus équitablement sur les deux premiers temps (τ_1 et τ_2) pour Δ(-)PBS-2Ap(6, 8), avec tout de même 40% d'amplitude sur τ_2. De manière générale, les boucles sont contraintes (les quenching statiques et dynamiques ultra-rapides dominent), et d'un point de vu local, les différences observées sont liées aux degrés d'empilement de la 2Ap avec les Gs voisines, bien plus efficaces en position 10 [21].

Même si les temps intermédiaires (τ_2 et τ_3) sont bien évalués, leur interprétation laisse libre cours à la spéculation. Il existe encore une ambiguïté au sujet du seuil cinétique à partir duquel on peut qualifier un quenching de «statique» ou de «dynamique». Les sections suivantes auront pour but de la lever.

THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY A

Article

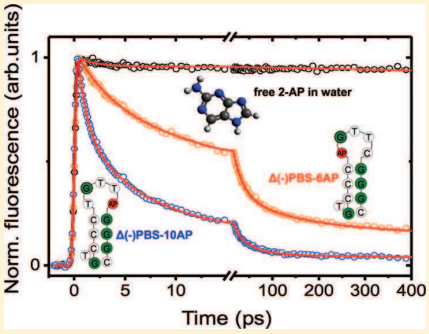
pubs.acs.org/JPCA

Ultrafast Site-Specific Fluorescence Quenching of 2-Aminopurine in a DNA Hairpin Studied by Femtosecond Down-Conversion

Thomas Gelot, Patricia Tourón-Touceda, Olivier Crégut, Jérémie Léonard, and Stefan Haacke*

Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg, Université de Strasbourg— CNRS, 67034 Strasbourg, France

ABSTRACT: The ΔP(-)PBS analog of the DNA primary binding sequence (PBS) of the HIV-1 genome labeled at different positions by 2-aminopurine (2-AP) is investigated by a novel femtosecond fluorescence down-conversion experiment with 0.3-ps time resolution. The high signal-to-noise ratio of the fluorescence kinetics makes it possible to reveal four distinct decay times ranging from 0.8 ps to 2−3 ns for all the three labeling positions. This suggests the existence of at least four different quenching conformations of 2-AP with its nearest neighbors, and underscores the structural heterogeneity of the loop region of ΔP(-)PBS. Sub-5-ps components are found and attributed to stacking interactions of 2-AP with the flanking guanine (G) side chains, consistent with the NMR structure of ΔP(-)PBS. The observation of a significant increase of their total amplitude when 2-AP is positioned close to the rigid 3′-half of the G-rich stem gives further support to this assignment. Only a minor portion of conformations involves slow nanosecond collisional quenching.



INTRODUCTION

Double and single stranded DNA's and RNA's are known to show a high degree of conformational flexibility that is required for a structural adaptability in the context of interactions and complex formations, e.g., with proteins and enzymes.[1] The flexibility leads to relatively large structural disorder even in thermodynamically equilibrated ensembles, prompting, on the one hand, to the use of single molecule investigations of biomolecular conformational heterogeneity and interactions.[2,3] On the other hand, because the time scales associated with the relevant molecular motions range from tens of picoseconds to milliseconds,[4,5] ultrafast fluorescence and transient absorption spectroscopies[6,7] prove to be very powerful for the studies of the fastest dynamics. In these experiments, a femtosecond laser excites a fluorescent chromophore naturally present in the biomolecule (e.g., tryptophan, Trp, in proteins) or artificially incorporated (e.g., 2-aminopurine, 2-AP, in oligonucleotides). The interaction with its local environment strongly affects the excited-state lifetime of the chromophore, and conformational heterogeneity leads to multiexponential excited-state decay. In water, unlike Trp, which already displays a nonexponential excited-state decay,[8−11] 2-AP has a single ≈10-ns excited-state lifetime. In addition, 2-AP can be selectively excited as its absorption spectrum at 305 nm is sufficiently offset from the dominant unstructured absorption spectrum of the oligonucleotide. When incorporated into a DNA sequence, 2-AP shows drastic excited-state quenching, with a distribution of excited-state lifetimes observed on a pico- to nanosecond time scale.[12−14] It is often assumed that the quenching process is a distance- and orientation-dependent charge transfer involving the nearest neighbor nucleotide. However, deducing the local structural properties from the excited-state, multiexponential, decay kinetics is not straightforward and requires an elaborate knowledge of the system, such as the possible existence of stacking interactions involving the 2-AP molecular probe. This is often provided, in most cases on a qualitative level though, by an analysis of the ground-state absorption or circular dichroism spectra, affected by dipole−dipole coupling of 2-AP with its nearest neighbors. A quantitative structure-predicting analysis of these spectra remains limited to systems with one or two pronounced and distinct structural conformations that would dominate the spectral signatures.

Similarly, ultrafast dynamics of 2-AP-labeled oligonucleotides are qualitatively described in terms of two limiting cases, which are static and dynamic quenching. Ultrafast quenching processes in the ≤10-ps range are attributed to static quenching occurring in preformed, relatively rigid, stacked conformations. 2-AP stacking with guanine (G) is one prominent example,[15] leading to the most efficient fluorescence quenching. Guanine being the most oxidizable among the natural DNA bases,[16] is the main argument in favor of an G → 2-AP electron transfer. However, whether or not the quenching mechanism is due to charge transfer[17] or relaxation into a low-lying nonemissive electronic state[18] is still an open question.[19,20] Besides, a 4-ps exciplex formation was recently reported to occur between two adjacent 2-AP's in a tripeptide.[21] On the contrary, slower excited-state decay times are assigned to dynamic collisional quenching involving local diffusional motion of 2-AP or its quenching partner. These "gating motions" are invoked for quenching processes slower than ∼100 ps,[17,22] but the frontier

Special Issue: Femto10: The Madrid Conference on Femtochemistry

Received: December 17, 2011
Revised: January 13, 2012
Published: January 30, 2012

ACS Publications © 2012 American Chemical Society

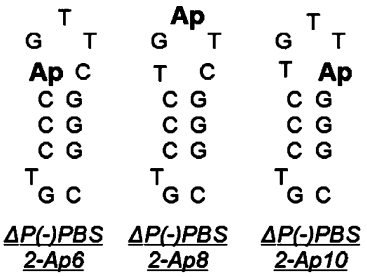
The Journal of Physical Chemistry A Article

between the two limiting cases is smooth, of course, and system-dependent.

Herein we study the ultrafast fluorescence kinetics of 2-AP incorporated in a short DNA hairpin termed ΔP(-)PBS. It is a structural analog of the 5′-end of the primary binding site sequence on the RNA of HIV-1, an important structural element involved in the obligatory second strand transfer required during the reverse transcription of the RNA. ΔP(-)PBS lacks the 3′-GCCA overhang of the full (-)PBS. The NMR structure of ΔP(-)PBS was determined,[23] highlighting the rigid stem with C-G base pairs and a loop region from T-6 to C-10 with their side chains being oriented loop-inward. The NMR structure information is a solid ground for identifying the site-dependent stacking interactions, and their impact on the fluorescence decay kinetics.

The sequences of ΔP(-)PBS labeled at position 6, 8, and 10 are shown in Scheme 1 and are hereafter referred to as PBS-6 to PBS-10. The 2-aminopurine replaces a thymine in PBS-6 and -8, and a cytosine in PBS-10. Site-selective fluorescence quenching was very recently reported using the time-correlated single photon counting technique with 100-ps time resolution,[24] pointing out the existence of multiexponential kinetics and thus most probably dynamic quenching processes on the subnanosecond to 10-ns time scale. However, the most dominant part of quenching was found to occur on the sub-100-ps time scale, prompting us to perform the present study with 200−300-fs time resolution. We aim at characterizing the times scales associated with these quenching processes so as to fully assess the structural heterogeneity encountered by 2-AP at the different labeling positions.

Scheme 1. Sequences and Schematic Structures of the 2-AP Labeled ΔP(-)PBS



To this end, we implemented a new fluorescence down-conversion setup to record broad-band, time-resolved spectra using a Peltier-cooled, low-noise CCD camera with optimum sensitivity in the 550−730-nm range.[25] Broad-band fluorescence has the advantage of recording of many kinetic traces in parallel and of recording time-resolved spectra.[26,27] Unlike the conventional sum frequency generation used in combination with UV-optimized single channel photomultipliers, we use type-II difference frequency generation (DFG) with an 800-nm gate pulse. The signal-to-noise-ratio of ∼100 enables us to reveal four distinct decay times ranging from 0.8 ps to 2−3 ns, for all three labeling positions. They result from a distribution of (at least four) conformations, different from those responsible for longer 2AP lifetimes,[28] and leading to faster static and dynamic quenching of 2-AP.

■ EXPERIMENTAL DETAILS

The 2-AP-labeled ΔP(-)PBS oligonucleotides were purchased from IBA GmbH and used as received. 2-AP was purchased from Sigma. They were dissolved in water buffered at pH = 7.5 with 50 mM HEPES. Absorption and fluorescence spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 900 spectrophotometer and a PTI QuantaMaster spectrofluorometer. For the down-conversion experiments, the sample concentrations were adjusted to an optical density of ≈0.4 at 310 nm for a 0.5-mm path length, corresponding to a concentration of 1.3 mM. All experiments were performed at room temperature.

The down-conversion setup has been described in ref 25. In brief, the samples are circulated through a quartz capillary of inner section 0.5 × 0.5 mm^2 using a peristaltic pump. The UV fluorescence is excited at 5-kHz, by sub-100-fs, 310-nm pump

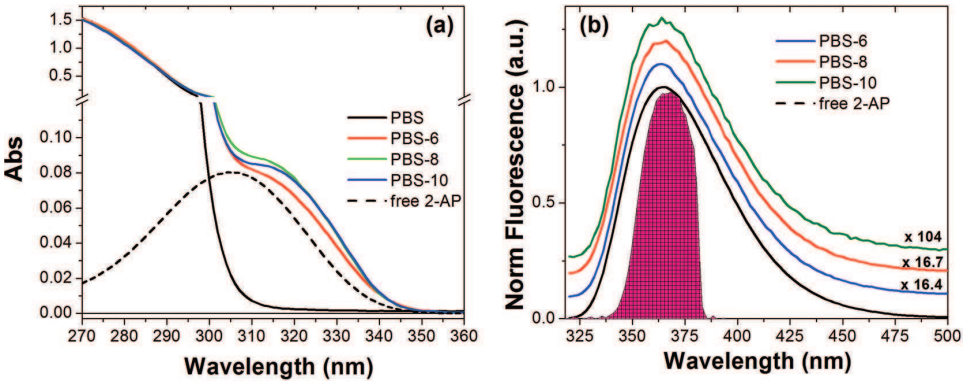


Figure 1. (a) Absorption spectra of unlabeled and labeled ΔP(-)PBS (solid lines) and of free 2-AP in HEPES buffer at pH = 7 (broken line). The spectra of the oligonucleotides are scaled at 270 nm, thus highlighting the additional absorption due to the 2-AP label in the 310−340-nm region. Absorption due to the other nucleotides is negligible for laser excitation at 310 nm. Dipole−dipole interactions between 2-AP and its nearest neighbors lead to a red shift of the absorption, which is most prominent for PBS-10. (b) Normalized steady-state fluorescence spectra of free 2-AP, and of 2-AP-labeled ΔP(-)PBS oligonucleotides, excited at 312 nm. The latter are shifted vertically for clarity. The normalization factors (16.4, 16.7, and 104 for PBS-6, PBS-8, and PBS-10, respectively) represent the inverse fluorescence yield relative to free 2-AP. The spectra are not corrected for the detector spectral sensitivity and thus show a maximum close to 365 nm, instead of the 368−370-nm literature values for free-2AP. The filled surface is the DFG spectrum of PBS-10 at 1-ps delay time, transposed into the near-UV, and obtained for a fixed phase-matching angle. The 30-nm spectral width is close to 50% of the total emission bandwidth.

pulses produced by second harmonic generation of the output of a home-built noncollinear optical parametric amplifier (NOPA). Samples are excited with an energy density of 1.3–1.5 mJ/cm^2 per pulse, which, given the relatively low molar extinction coefficient of 2-AP at 310 nm, corresponds to the linear regime of excitation, as checked experimentally by varying the excitation density.

Two parabolic mirrors of 3-in. diameter, and focal lengths of 5 and 30 cm, collect and focus the fluorescence onto a 0.4-mm-thin BBO Crystal. Here, it is combined with the fundamental 800-nm beam of a regenerative Ti:Sapphire amplifier, adjusted to ≤35-μJ pulse energy. On the crystal, both fluorescence and gate beams are 0.5 mm in diameter. The gate beam is linearly polarized along the extraordinary crystal axis. Type II phase-matching condition produces the down-conversion signal with fluorescence that has the same polarization as the gate beam: $\vec{k}_D^{(o)} = \vec{k}_{fluo}^{(e)} - \vec{k}_{gate}^{(e)}$. Hence, the down-conversion process acts as an analyzer for the fluorescence. The 310-nm pump beam is then linearly polarized at magic angle with respect to the gate beam polarization, to eliminate effects due to fluorescence anisotropy decay. The time resolution is 0.3 ps, mainly limited by the wavefront tilt of fluorescence and gate beam forming a ≈10° angle on the crystal. A stepper motor is used to scan the time delay between the pump and gate pulses up to 3 ns. The DFG signal is accumulated over 1 s at each time step. Slow variations in the excitation power are monitored and corrected for at each time point, providing significant noise reduction. Five entire scans are averaged to form the present low-noise data sets.

Rotating the 46°-cut BBO crystal around its ordinary axis scans the spectral detection window fulfilling the phase matching condition. Figure 1b shows a typical difference frequency (DFG) spectrum detected in the visible range, and transposed into the near-UV range for comparison with the steady-state emission spectra of the samples studied. This spectrum is obtained at a fixed crystal angle in the case of PBS-10 at 1-ps delay time. The UV detection bandwidth is as large as 30 nm (fwhm), with a color filter cutting the long-wavelength part. Hence, the DFG signal covers half of the width of the emission spectrum, allowing for tracking of dynamic spectral shifts.[25] Within this detection window, more than 20 kinetic traces are recorded in parallel. They are fitted by a sum of decaying exponential functions with decay times τ_i and convolved by the instrument response function described by a Gaussian with standard deviation σ, centered at $t_0 = 0$:

$$S(t) \propto \exp\left(-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}\right) \otimes \sum_i A_i e^{-t/\tau_i} \quad (1)$$

Due to the 800-nm gate beam being scattered at the BBO surfaces, even though reduced by orders of magnitude by a Glan–Thompson polarizer, the region between 740 and 850 nm is not accessible for DFG detection.

RESULTS

The ground-state absorption spectra of the 2-AP-labeled oligonucleotides are displayed together with the one of free 2-AP in H_2O at pH = 7 in Figure 1a. The comparison with unlabeled ΔP(-)PBS shows that the low-energy shoulder in the 310–340-nm region is due to the 2-AP labels, significantly red-shifted by 5–8 nm with respect to the 305-nm maximum for free 2-AP. As already pointed out by others,[15] this is due to dipole–dipole interactions between 2-AP and its nearest neighbors, which amounts here to 30–40 meV. This static coupling is strongest for PBS-10, which shows the largest red-shift, suggesting that stacking interactions are most important there.

Site-Dependent Fluorescence Quenching. Steady-state fluorescence spectra of ΔP(-)PBS labeled at positions 6, 8, and 10 are almost the same as that of the isolated 2-AP in water (Figure 1b), with a slight blue shift of 1–2 nm for the emission maximum, and almost identical spectral widths. Compared to isolated 2-AP, the relative fluorescence yields η of the oligonucleotides are 6.1 ± 0.5% for label positions 6 and 8, and 1.0 ± 0.1% when labeled at position 10, as already reported.[24]

Figure 2 presents kinetic traces recorded for the peak emission wavelengths of three representative samples. For PBS-10, we plot the results obtained on two identical solutions prepared from two different PBS-10 batches. The corresponding kinetics perfectly overlay, attesting for a very high reproducibility. Isolated 2-AP exhibits a monoexponential decay with a lifetime much longer than the maximum achievable time delay, so that the fit value of 6.5 ns underestimates the 10-ns literature value. The oligonucleotides display a multiexponential decay that we fit with up to four time constants spanning 3 orders of magnitude from <1 ps to >1 ns (see Table 1 for details). We find average lifetimes of 550 ± 60, 590 ± 60, and 80 ± 20 ps for ΔP(-)PBS labeled respectively at positions 6, 8, and 10. The fluorescence quantum yields relative to free 2-AP calculated from these lifetimes relative to the 10-ns value of free 2-AP are slightly smaller, but in good agreement with those determined from the steady-state spectra, showing that the present 3-ns delay range is sufficient to capture the dominant fluorescence quenching time scales and processes. Slower, small amplitude decays were reported in ref 24 for the same molecules.

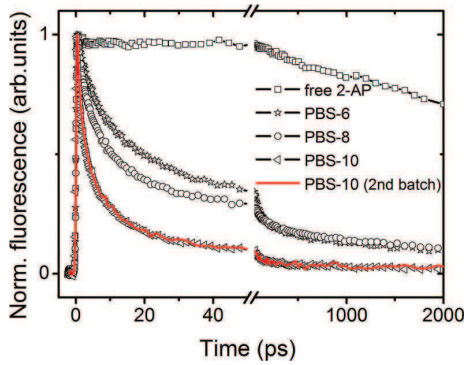


Figure 2. Normalized kinetic traces of free 2-aminopurine (squares), ΔP(-)PBS labeled at position 6 (stars), 8 (circles), and 10 (triangles), probed at the fluorescence maximum (368 nm). The excellent reproducibility is attested by plotting the kinetic trace obtained under identical conditions with PBS-10 produced by IBA GmbH in a separate batch (red solid line). All samples are measured at room temperature in pH = 7.5 aqueous solution after excitation at 310 nm. The left half is a zoom into the first 50 ps. Anisotropy decay dynamics are eliminated through magic-angle excitation.

Intra- and Intermolecular Excited-State Relaxation. It is well-known that intramolecular vibrational relaxation and solvation dynamics in polar solvents such as water can lead to ultrafast dynamic red shifts in fluorescence spectra, which is

The Journal of Physical Chemistry A Article

Table 1. Decay Times and Amplitudes Obtained by Fitting a Four-Exponential Decay Function to the 368-nm Kinetic Traces of the Three Labeled Samples, and the Resulting Average Lifetimes $\langle\tau\rangle$[a]

	τ_0 (ps)/A_1	τ_1 (ps)/A_1	τ_2 (ps)/A_2	τ_3 (ps)/A_3	τ_4 (ns)/A_4	$\langle\tau\rangle$ (ns)
ΔP(-)PBS-6		3.7 ± 0.2/0.26	22 ± 3/0.39	130 ± 20/0.17	3.1 ± 0.3/0.17	0.55
ΔP(-)PB-8		1.9 ± 0.1/0.27	11.1 ± 0.2/0.41	93 ± 9/0.13	3.0 ± 0.1/0.19	0.59
ΔP(-)PBS-10	0.8 ± 0.2/0.42	5.2 ± 0.5/0.38	37 ± 3/0.16		1.9 ± 0.5/0.04	0.08

[a]Error bars represent the limits of reproducibility deduced from consecutive experimental runs

reflected by a simultaneous, sub-10-ps decay in the short wavelengths and rise at long wavelengths. This is illustrated in Figure 3a, where we display the first 20 ps of the kinetic traces

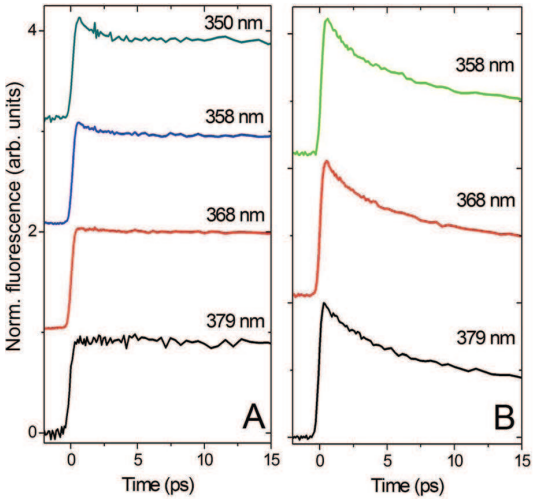


Figure 3. Early part of the fluorescence decay kinetics. (A) Isolated 2-AP in aqueous solution at pH = 7.5. (B) ΔP(-)PBS labeled at position 8, at the top of the loop.

of free 2-AP probed at different wavelengths, spanning the short-, center-, and long-wavelength part of the time-averaged fluorescence spectrum. A pronounced 1-ps-decay component is observed at 350 nm, which slows down at 358 nm, disappears for the 368-nm maximum emission wavelength, and turns into a rise time on the long-wavelength side (380 nm). This behavior mirrors the above intra- and intermolecular relaxation dynamics.

It is apparent from Figure 3b that the behavior is entirely different for the 2-AP labeled PBS-8 oligonucleotide, given as an example for the others. As compared to isolated 2-AP, the relative amplitude of the sub-10-ps decay component in PBS-8 is much larger and positive for all wavelengths probed, even and most importantly, on the low-energy side (379 nm). This indicates a fluorescence quenching process that reduces the entire excited-state population in contrast to spectral shifts induced by vibrational or solvent relaxation. Such a rapid excited-state depopulation is expected from the reduced fluorescence quantum yield (see above).

Multi Component Decay Kinetics. To characterize at best the nonexponential kinetics, Figure 4 compares fits with two, three, and four time constants for ΔP(-)PBS-10. Although the three-time fit residuals show relatively large systematic differences between the fit and the data at 10 and 30 ps, the four-time fit residuals are dominated by the instrumental noise, showing that four time components are required to fit the

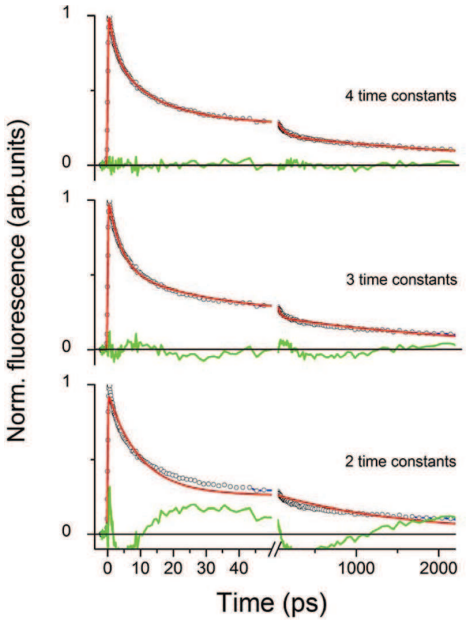


Figure 4. Kinetic trace of ΔP(-)PBS labeled at position 8 at 368 nm, analyzed with a two-, three-, and four-exponential fit (red solid lines). Green lines are the fit residuals, magnified 4 times. Although the three-time fit does not faithfully capture the decay behavior in the first 50 ps, the residuals are significantly reduced and almost evenly distribute around zero in the four-exponential fit. The parameters of this fit are reported in Table 1.

present data satisfactorily. The root mean square (rms) value of the residuals is 1.2% of the maximum signal (Figure 4), i.e., very close to the experimental precision given by the limits of reproducibility (Figure 2). The four distinct time constants differ by an order of magnitude, indicating that these time scales are truly afforded by the molecular dynamics. Table 1 summarizes the lifetimes and amplitudes found for kinetic traces recorded at the emission peak of free 2-AP and ΔP(-)PBS labeled at positions 6, 8, and 10. Four decay times were also identified recently for 2-AP in RNA trimers.[29] Besides the limitation due to signal-to-noise ratio, there is a priori no fundamental limit to the number of lifetimes one can identify. Let alone the general problem, that parameters in a multiexponential fit are heavily intercorrelated, future work should address the question whether the assumption of multiexponential decays is physically meaningful.

The site-dependent quenching dynamics of 2-AP is illustrated in Figure 5, which displays the fluorescence kinetics probed at different wavelengths and on different time ranges. The kinetic traces of PBS-6 and PBS-8 are very similar with ≈65% signal decay at 100 ps (long-wavelength traces). The kinetic traces at shorter wavelengths decay faster, most

The Journal of Physical Chemistry A Article

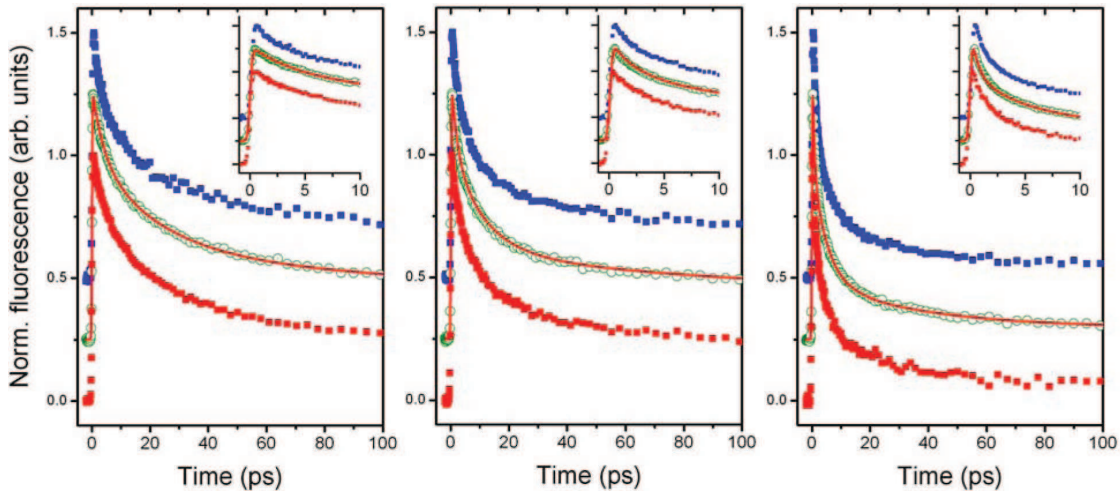


Figure 5. Kinetic traces of ΔP(-)PBS labeled at positions 6 (left), 8 (center), and 10 (right) after excitation at 310 nm, and detected at the short-, center-, and long-wavelength portions of the emission spectra, indicated by blue, green, and red symbols, respectively. Red lines are fits of the center 368-nm trace. Insets show zooms into the first 10 ps of fluorescence decay highlighting the <5-ps components. These components have significantly larger amplitude when 2-AP is labeled at position 10.

probably due to the intra- and intermolecular relaxation processes discussed for free 2-AP above.

The fluorescence decay is significantly stronger (90%) in PBS-10 during the first 100 ps, due to the subpicosecond decay component carrying almost 50% of the total decay amplitude. This is best shown by the insets in Figure 5 and by the fit results in Table 1. Remarkably, the four decay times and the relative amplitudes of PBS-6 and -8 are very similar. On the contrary, in PBS-10 a subpicosecond decay component τ_0 is observed with an amplitude A_0 almost twice as large as A_1 in the other oligonucleotides.

■ DISCUSSION

The key experimental results can be summarized as follows. Within the time range covered by the present experiments, the fluorescence kinetics of 2-AP-labeled ΔP(-)PBS are best described by four decay time constants: 0.8−5 ps, 10−40 ps, 90−130 ps, and 2−3 ns, with not more than 20% amplitude in the slowest nanosecond decay component. The site-dependent quenching reported in ref 24 is confirmed; i.e., the strongest quenching is observed for position 10, which is next to the G-rich 3′-side of the stem, and flanked by a thymine at position 9. In PBS-10, the total amplitude of the sub-5-ps components increases significantly, at the expense of the slower components τ_2 and τ_3. Note that τ_0 is smaller than the fastest 2-AP/G quenching times reported before. Subpicosecond 2-AP quenching was reported for stacking interactions with 7-deazaguanine only[6,14] or was attributed to intramolecular relaxation in a 2-AP oligonucleotide with a surprisingly red-shifted emission spectrum.[30]

Wan et al. have inferred an unresolved, <200-fs time constant, which they attribute to CT involving vibrationally unrelaxed 2-AP in the excited state.[6] However, in the present case, the good agreement between the average fluorescence lifetime and the relative fluorescence yield with respect to free 2-AP, shows that we determine all relevant decay times and that no unresolved, faster process needs to be invoked, in agreement with the same conclusion drawn for other systems.[30]

Different authors have related multiexponential decay characteristics to structural heterogeneity in ensemble experiments. When the quenching is due to distance- and orientation-dependent processes such as resonance energy transfer or photo-oxidation, each lifetime is generally attributed to a distinct class of molecular conformations, present in the ensemble of ground states and thermodynamically equilibrated before photoexcitation.[5,13,24,30−33] Note that even in a situation where one conformation has competing quenching channels, a single decay time will be observed for that conformation. The one-to-one correspondence between decay time and conformation is obvious in the limiting case of static quenching in which the intrinsic quenching time of individual conformations is much shorter than the time scale for interconversion into another class of conformations. Alternatively, the other limiting case of dynamic quenching is that of flexible conformations where the molecular movements modulate the relative orientation and distance of quenching partners on time scales shorter than the radiative lifetime. Then the fluorescence quenching time scale is given by their encounter rate, because these gating motions induce the otherwise improbable quenching process. In intermediate cases in which both the intrinsic quenching time scale and that of interconversion between classes of conformations are comparable, the observed fluorescence lifetime is determined by both processes.

Xia et al. have coarsely distinguished static quenching of 2-AP engaged in stacking interactions from collisional quenching. The intermediate time scale was discussed to be around 100 ps.[5] Faster fluorescence components observed for 2-AP in a few systems were then assigned to stacking-induced quenching only. Similar concepts are used for different quenching regimes of Trp in a protein environment.[7] We therefore conclude that the four time constants we extract from the fluorescence kinetics are representative of at least four distinct classes of local conformations of 2-AP with respect to its nearest neighbor oligonucleotides. The different classes presumably undergo different quenching processes spanning from purely static to collisional, including a range of intermediate situations, with

their relative abundance being naturally a function of the labeling position.

Following the above time scale arguments, the shortest τ_0 = 0.8 ps and τ_1 = 2−5 ps are assigned to stacking interactions. Dynamic or collisional quenching can be ruled out, because the molecular mobility is not expected to be sufficient to sustain such high collisional rates. The common feature in all three labeled samples is that 2-AP is next to a G, and the shortest τ_0 is observed when 2-AP is placed close to the GGG stem half (PBS-10), the rigidity of which is likely to enhance the stability of the stacked conformation. In addition, the thymine in position 9 could give additional conformational constraints, as it does for the native cytosine in wild-type ΔP(-)PBS.[23] This could explain the amplitude increase from 25% in PBS-6 and PBS-8 where a single G in position 7 is a potential stacking partner, to a total 80% in PBS-10. It is therefore very likely that the shortest τ_0 and τ_1 components are due to strong 2-AP/G interactions. This is consistent with the ground-state absorption spectrum of PBS-10 (Figure 1a), which shows stronger static interactions than PBS-6 and -8.

The 2−3-ns component is most probably due to collisional quenching of 2-AP with one of the next neighbor oligonucleotides. Given the limited time range measured, the error bar on the decay time is relatively large, so that we do not search for a mechanistic interpretation of the difference between the three labeled samples. This component most probably corresponds to relatively unrestricted 2-AP's with lower encounter rates. As the steady-state fluorescence is dominated by this long-lived component, and it shows only a 1−2-nm blue-shift (Figure 1), as opposed to larger 2-AP blue-shifts observed in low polarity solvents,[34] we conclude that this class of conformations involves water-exposed 2-AP moieties. It thus turns out that the steady-state fluorescence provides additional information for the long-lived dynamically quenched chromophores, whereas the ground-state absorption spectra is qualitatively in agreement with stacking interactions dominating the short-lived fluorescence components in PBS-10.

The attribution of the intermediate time ranges τ_2 and τ_3 is more speculative. It is possible that the 10−40-ps component (τ_2) represents another stacking interaction conformation of 2-AP and G, but with a less favorable intermolecular distance and orientation than the subpicosecond component. Hence, in all samples, up to ∼60% of the molecules would be in conformations corresponding to the two or three sub-40-ps stacking-mediated decay components. The 90−130-ps time scale (τ_3), interestingly observed only for PBS-6 and-8, presumably lies in the intermediate time scale where intrinsic quenching times of individual conformations are comparable to the interconversion time scale between conformations. Indeed, this is the typical time scale for restricted rotational motion of 2-AP in these oligonucleotides as observed by fluorescence anisotropy decay.[13,29,24]

Increasing fluorescence lifetimes observed upon addition of glycerol are usually taken as a signature of dynamical quenching hindered by higher solvent viscosity,[13,35] conveying the idea that this could allow differentiating static from dynamic quenching. In the present case, however, this approach is not valid. We find that 70% glycerol leads primarily to significant structural modifications, as it entirely suppresses the sub-5-ps decay components due to stacking interactions.

■ CONCLUSIONS

Fluorescence down-conversion experiments with 0.3-ps time resolution are reported for ΔP(-)PBS labeled at positions 6, 8, and 10 and for free 2-AP in H_2O buffered at pH = 7.5. The kinetic traces of the three ΔP(-)PBS mutants are dominated by ultrafast fluorescence quenching of 2-AP, and four decay times are identified, with the major part of quenching being completed in ≈100 ps. We attribute the lifetimes to qualitatively distinct classes of local conformations of 2-AP with respect to its nearest neighbor oligonucleotides. Changing the labeling position influences the decay times and has a major effect on their amplitudes. The shortest sub-5-ps decay times are most probably due to a ground-state stacking interaction of 2-AP with G, as their total amplitude more than doubles in PBS-10 with respect to PBS-6 and -8. Given its shortness, the 10−40-ps decay time is also tentatively attributed to static quenching, but with different less favorable intermolecular orientations than the shortest lifetimes. Although the longest nanosecond component is attributed to collisional quenching, the 90−150-ps time scale, only observed in PBS-6 and -8 seems to be an intermediate case that deserves further investigation. The present study sets the basis for further femtosecond spectroscopy studies to be conducted on ΔP(-)PBS bound to an structurally modified by NCp7, the nucleocapsid protein of HIV-1 known to promote the second strand transfer, and the formation of kissing complexes between the complementary sequences of (-)PBS and (+)PBS.[23,24,36]

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: haacke@unistra.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pr. Yves Mély (University of Strasbourg) for insightful discussions and advice. G. Dekyndt and J.-P. Vola provided expert technical assistance. The FEMTOSTACK project is funded by the Agence Nationale de la Recherche contract ANR-2010-BLAN-1529-01.

■ REFERENCES

(1) Boehr, D. D.; Nussinov, R.; Wright, P. E. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 789−796.
(2) Haustein, E.; Schwille, P. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 531−540.
(3) Schuler, B.; Eaton, W. A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 16−26.
(4) Al-Hashimi, H. M.; Walter, N. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 321−329.
(5) Xia, T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 604.
(6) Wan, C.; Xia, T.; Becker, H.-C.; Zewail, A. H. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *412*, 158.
(7) Qiu, W.; Li, T.; Zhang, L.; Yang, Y.; Kao, Y.-T.; Wang, L.; Zhong, D. *Chem. Phys.* **2008**, *350*, 154.
(8) Fleming, G. R.; Morris, J. M.; Robbins, R. J.; Woolfe, G. J.; Thistlethwaite, P. J.; Robinson, G. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 4652−4656.
(9) Szabo, A. G.; Rayner, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 554−563.
(10) Léonard, J.; Sharma, D.; Torgasin, K.; Szafarowicz, B.; Haacke, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 15744−15750.
(11) Sharma, D.; Léonard, J.; Haacke, S. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *489*, 99−102.

(12) Larsen, O. F. A.; van Stokkum, I. H. M.; Gobets, B.; van Grondelle, R.; van Amerongen, H. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1115−1126.
(13) Avilov, S. V.; Piemont, E.; Shvadchak, V.; de Rocquigny, H.; Mely, Y. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 885−896.
(14) Zhao, L.; Xia, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4118−4119.
(15) Johnson, N. P.; Baase, W. A.; von Hippel, P. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 3426−3431.
(16) Steenken, S.; Jovanovic, S. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 617−618.
(17) Wan, C.; Fiebig, T.; Schiemann, O.; Barton, J. K.; Zewail, A. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 14052−14055.
(18) Jean, J. M.; Hall, K. B. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 37−41.
(19) Larsen, O. F. A.; van Stokkum, I. H. M.; de Weerd, F. L.; Vengris, M.; Aravindakumar, C. T.; van Grondelle, R.; Geacintov, N. E.; van Amerongen, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 154−160.
(20) Larsen, O. F. A.; van Stokkum, I. H. M.; Groot, M.-L.; Kennis, J. T. M.; van Grondelle, R.; van Amerongen, H. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *371*, 157−163.
(21) Wang, Q.; Raytchev, M.; Fiebig, T. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 637−641.
(22) Fiebig, T.; Wan, C.; Zewail, A. H. *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 781−788.
(23) Bourbigot, S.; Ramalanjaona, N.; Boudier, C.; Salgado, G. F.; Roques, B. P.; Mely, Y.; Bouaziz, S.; Morellet, N. *J. Mol. Biol.* **2008**, *383*, 1112−1128.
(24) Godet, J.; Ramalanjaona, N.; Sharma, K. K.; Richert, L.; De Rocquigny, H.; Darlix, J. L.; Duportail, G.; Mély, Y. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 6633−6645.
(25) Léonard, J.; Gelot, T.; Torgasin, K.; Haacke, S. *J. Phys.: Conf. Ser.* **2011**, *277*, 012017−012021.
(26) Haacke, S.; Taylor, R. A.; Bar-Joseph, I.; Brasil, M. J. S. P.; Hartig, M.; Deveaud, B. *J. Opt. Soc. Am. B* **1998**, *15*, 1410−1417.
(27) Schanz, R.; Kovalenko, S. A.; Kharlanov, V.; Ernsting, N. P. *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *79*, 566−568.
(28) Godet, J.; de Rocquigny, H.; Raja, C.; Glasser, N.; Ficheux, D.; Darlix, J. L.; Mely, Y. *J. Mol. Biol.* **2006**, *356*, 1180−1192.
(29) Liu, J. D.; Zhao, L.; Xia, T. *Biochemistry* **2008**, *47*, 5962−5975.
(30) Manoj, P.; Min, C.-K.; Aravindakumar, C. T.; Joo, T. *Chem. Phys.* **2008**, *352*, 333−338.
(31) Xia, T.; Becker, H.-C.; Wan, C.; Frankel, A.; Roberts, R. W.; Zewail, A. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 8119−8123.
(32) Xia, T.; Wan, C.; Roberts, R. W.; Zewail, A. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 13013−13018.
(33) Bombarda, E.; Ababou, A.; Vuilleumier, C.; Gerard, D.; Roques, B. P.; Piemont, E.; Mely, Y. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1561−1570.
(34) Rachofsky, E. L.; Osman, R.; Ross, J. B. A. *Biochemistry* **2001**, *40*, 946−956.
(35) Jean, J. M.; Hall, K. B. *Biochemistry* **2004**, *43*, 10277−10284.
(36) Ramalanjaona, N.; de Rocquigny, H.; Millet, A.; Ficheux, D.; Darlix, J. L.; Mely, Y. *J. Mol. Biol.* **2007**, *374*, 1041−1053.

3.5 Anisotropie de fluorescence

L'objectif de cette partie est de confirmer, par le biais de l'étude de l'anisotropie de fluorescence de nos composés, l'attribution de nos temps de vie intermédiaires. Nous allons pour cela décrire brièvement le principe de l'anisotropie générale avant d'appliquer la technique sur nos échantillons.

3.5.1 Principe

Supposons que l'on excite une solution parfaitement homogène et isotrope de chromophores avec une lumière polarisée rectiligne. La probabilité d'excitation des fluorophores sera proportionnelle au cosinus carré de l'angle θ_A formé entre leur moment dipolaire de transition d'absorption $\boldsymbol{\mu_A}$ et le vecteur champ électrique **E** incident : il s'agit du phénomène de photo-sélection. La fluorescence est ensuite réémise selon la direction du moment dipolaire de transition d'émission $\boldsymbol{\mu_E}$ (Annexe 3.8).

L'anisotropie totale de notre système peut s'exprimer comme étant le produit de l'anisotropie fondamentale r_0 de l'échantillon et de ses facteurs de dépolarisation [119] :

$$r(t) = \underbrace{\frac{2}{5} \cdot \frac{3 < \cos^2 \alpha > -1}{2}}_{\text{Anisotropie fondamentale = r}_0} \cdot \underbrace{\prod_{i=2}^{n} \frac{3 < \cos^2 \omega_i(t) > -1}{2}}_{\text{Facteurs de dépolarisation}} = \text{A.f} \cdot \prod_{i=2}^{n} \text{F.d}_i \tag{3.15}$$

L'anisotropie fondamentale r_0 provient à la fois de la polarisation induite par l'orientation moyenne des molécules excitées à t_0 (photo-sélection), et de l'orientation respective de $\boldsymbol{\mu_A}$ par rapport $\boldsymbol{\mu_E}$. Ainsi, pour un fluorophore donné, l'angle α formé entre les deux moments dipolaires peut prendre une valeur fixe comprise entre 0°(r_0 = 0.4) et 90°(r_0 = -0.2) (Annexe 3.8).

Les causes liées à la dépolarisation sont nombreuses [119] et résident essentiellement dans le fait que les systèmes étudiés ne sont pas figés dans le temps. On peut, par exemple, prendre en compte les mouvements browniens d'une solution, impliquant une diffusion rotationnelle des molécules. Si les mouvements de la macromolécule sont de l'ordre de grandeur du temps de vie de l'état excité, la fluorescence émise sera totalement ou partiellement dépolarisée. Le premier cas correspondra à une rotation libre de la molécule aboutissant à une répartition aléatoire des molécules photo-sélectionnées pendant le temps de vie de fluorescence. Le second cas peut s'appliquer à des rotations non complétées, par exemple, à cause de contraintes stéariques, ou bien résultant d'une viscosité importante du milieu, ou encore d'un fluorophore inclus au sein d'une macromolécule de taille respectable. Dans la pratique, cet effet de rotation se caractérise par une valeur d'anisotropie qui s'inspire de 3.15 et donc de la règle de multiplication des facteurs de dépolarisation [119] :

$$r(t) = r_0 \cdot \frac{3 < \cos^2 \omega(t) > -1}{2} \tag{3.16}$$

Où le dernier terme représente la fonction d'autocorrélation d'orientation, c'est à dire la probabilité qu'une molécule ayant une certaine orientation pour $t = 0$ apparaisse au niveau de la coordonnée ω au temps t.

3.5.2 Mesure d'anisotropie résolue en temps

Une mesure d'anisotropie peut soit se réaliser en fixant le polariseur d'excitation et en imprimant une rotation au polariseur d'émission, soit en effectuant la réciproque. Les conditions d'accord de phase (Chapitre II, section 2.2.1) agissent déjà comme un élément polariseur d'émission ; la rotation de l'axe de polarisation de la pompe est permise par l'ajout d'un compensateur de Berek (*5540, New-Focus*), utilisé en tant que lame $\lambda/2$ optimisée à la longueur d'onde d'excitation. Les déclins d'anisotropie résolus en temps sont analysés selon l'équation suivante :

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_T(t)} = r_0 \cdot \sum_{i=1}^{N} \beta_i \cdot e^{\frac{-t}{\Phi_i}} \tag{3.17}$$

Au sein de notre montage, les dénominations «parallèles» ou «perpendiculaires» n'ont de sens qu'en fonction de l'axe extraordinaire du BBO. Ainsi, $I_{\parallel}(t)$ est observée lorsque l'axe de l'axe du polariseur d'émission est orienté parallèlement à l'axe extraordinaire du BBO, et $I_{\perp}(t)$ lorsque ce dernier est tourné de 90°. Afin de s'affranchir des éventuelles complications liées au trajet optique, l'axe du référentiel est obtenu empiriquement à partir de la recherche de «l'angle magique», angle de rotation du Berek où l'anisotropie est éteinte (Annexe 3.8) . Il suffit de tourner la lame $\lambda/2$ de 27.3 degrés dans un sens ou dans l'autre et d'observer l'amplitude maximum du signal, signe que l'on s'est positionné parallèlement à l'axe extraordinaire du BBO.

La loi d'additivité de l'anisotropie impose que l'anisotropie d'un mélange soit égale à la somme des anisotropies individuelles des composés du mélange, pondérées par leur fluorescence relative. La forme que prend le déclin $r(t)$ dépend à la fois de la mobilité, taille, forme et flexibilité des molécules, ce qui se traduit généralement par un déclin multi-exponentiel. Ainsi, des mouvements locaux (de la sonde vis à vis de la macromolécule à laquelle elle est liée) ou segmentaires ajoutent de nouvelles composantes au mouvement de bascule général (Annexe 3.8).

Enfin, notons que les composantes d'intensités polarisées peuvent chacune être décrites indépendamment :

$$I_{\parallel}(t) = \frac{I_T(t)}{3}\left[1 + 2r(t)\right] \tag{3.18}$$

$$I_{\perp}(t) = \frac{I_T(t)}{3}\left[1 - r(t)\right] \tag{3.19}$$

3.5.3 Traitement des données

Pour chaque ODN ainsi que 2Ap libre, les courbes de déclins correspondant à $I_{\parallel}$ et $I_{\perp}$ ont été enregistrées durant deux pools de mesures distincts et successifs. Chaque pool est le résultat d'une moyenne de cinq scans, chaque pas temporel étant enregistré pendant un temps d'ouverture de la caméra de 1 seconde. Afin de s'affranchir des fluctuations de signal liées aux variations de la pompe, la puissance de cette dernière a été également mesurée pour chaque pas temporel. Chaque scan a d'abord été normalisé par sa puissance d'excitation respective, puis moyenné avec les quatre autres du pool pour former la cinétique correspondante. Ces courbes ont ensuite été ajustées par une somme d'exponentielles décroissantes convoluées avec la fonction de réponse, afin de déterminer avec précision l'emplacement du temps 0. Une fois ce paramètre connu, chaque courbe a ensuite éte extrapolée autour de ce point, afin de pouvoir recadrer chaque paire ($I_{\parallel}$,$I_{\perp}$) sur leur 0 respectif avant de les ré-échantillonner. Il devient ensuite possible d'appliquer 3.17 pour en extraire $r(t)$.

Notons que la totalité des cinétiques qui seront présentées par la suite proviennent du maximum d'émission : 368 nm.

3.5.4 Résultats

3.5.4.1 2Ap libre

Nous avons commencé par mesurer l'anisotropie de notre solution témoin, à savoir la 2Ap à l'état libre dans de l'eau tamponnée à pH 7.5. La cinétique résolue en temps est présentée au sein de la figure 3.6.

Cette dernière se caractérise par une décroissance mono-exponentielle rapide, complètement dépolarisée durant notre fenêtre temporelle d'acquisition. En assimilant notre molécule à une sphère (cf 3.31), son temps de corrélation rotationnel (Φ) est de 28.5 ps, pour une amplitude r_0 estimée à 0.3.

La valeur Φ mesurée est proche des 25 ps estimés par Gustavsson et Al. [120] pour l'Adénine. Holmén et Al. [121], en mesurant l'anisotropie de fluorescence d'excitation sur de la 2Ap prise dans des films de poly(vinyl alcohol) étendus à 310 nm, évoquent une r_0 de 0.37. En conséquence, les μ_A et μ_E de la 2Ap à cette longueur d'onde d'excitation devraient être quasi-colinéaires. Notre r_0 de 0.3 diffère sensiblement de cette valeur théorique, mais est en parfaite adéquation avec les paramètres mesurés par Larsen & Al. dans un environnement similaire au notre [66]. Ces derniers justifient cet écart par une relaxation liée au solvant.

3.5.4.2 2Ap incorporée dans Δ(-)PBS

La figure 3.7 superpose les cinétiques d'anisotropie de Δ(−)PBS-2Ap(6, 8 et 10), normalisées à t=0 afin d'amplifier les différences de déclins au temps courts. Comme prévu, le déclin total de l'anisotropie

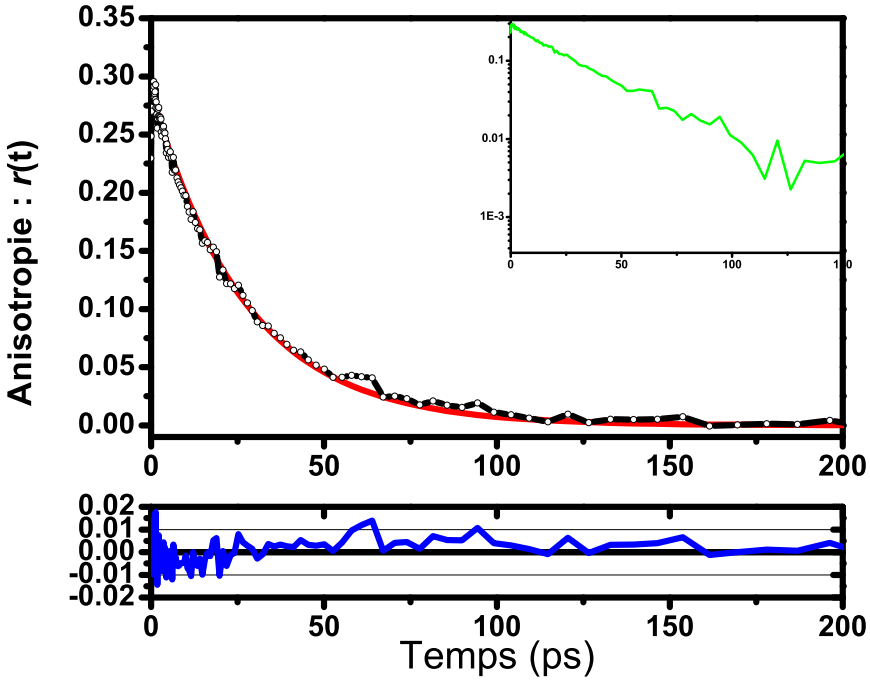


Figure 3.6 – Cinétique de déclin d'anisotropie de fluorescence pour la 2 Ap à l'état libre : Les données expérimentales sont représentées par la courbe noire, ajustée par une courbe mono-exponentielle décroissante (courbe rouge). Le temps de corrélation est de 28.5 ps pour une anisotropie fondamentale évaluée à 0.3. En bleu, sont représentés les résidus de l'ajustement. L'encadré montre le tracé exponentiel, mais avec une échelle logarithmique.

est bien plus lent que pour la 2Ap seule : au bout de 1 ns, les cinétiques ne redescendent pas complètement à l'origine. Notons que les courbes semblent très similaires les unes par rapport aux autres, suggérant des dynamiques orientationnelles proches.

La figure 3.8 présente séparément les cinétiques d'anisotropie de fluorescence pour chaque ODNs marqué. Elles ont été adéquatement ajustées par le modèle suivant :

$$r(t) = (r_0 - r_\infty) \cdot \sum_{i=1}^{2} \beta_i \cdot \exp\left(\frac{-t}{\Phi_i}\right) + r_\infty \tag{3.20}$$

Il s'agit d'un modèle contenant 2 exponentielles, mettant en évidence une dynamique orientationnelle s'étalant sur au moins deux échelles de temps. La faible quantité de signal aux alentours de la nanoseconde ainsi que notre ligne à retard limitée à 3 ns nous empêche de caractériser un éventuel troisième temps d'anisotropie, ce dernier est présenté sous la forme de l'offset $r_\infty = \beta_3 \cdot r_0$ (Table 3.3).

Sur nos ODNs marqués, la composante temporelle rapide (ϕ_1) est de 90-130 ps, et la composante

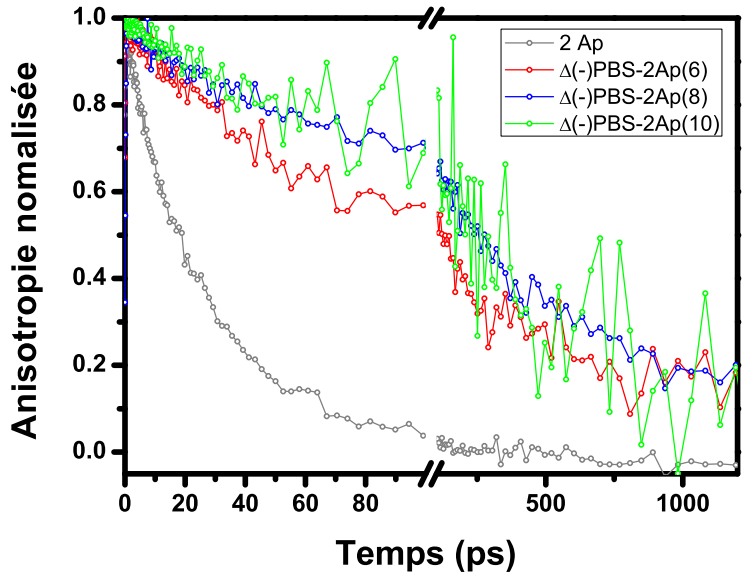


Figure 3.7 – Comparaison des cinétiques de déclin d'anisotropie de la 2AP libre et introduite au sein de Δ(-)PBS, en position 6 (rouge), 8 (bleue) et 10 (verte).

moyenne (Φ_2) comprise entre 0.7-0.8 ns. Les secondes sont en accord avec celles mesurés par Godet & Al. [1], alors que nos valeurs de Φ_1 sont en moyenne plus courtes de 42 % (± 15 %). On peut attribuer cet écart à une meilleure précision de mesure grâce à notre résolution temporelle plus élevée. En tenant compte de l'offset, nous mesurons donc bien 3 temps de déclin, dont les significations sont similaires à celles invoquées par Godet & Al (cf paragraphe 3.3 et [1]).

La précision de nos mesures aux temps courts permet de mettre en évidence le caractère site-spécifique de l'anisotropie. Les temps de corrélation associés aux rotations locales (Φ_1) sont plus courts en position 8 et 10 (90 et 100 ps) qu'en position 6 (130 ps), mais ceux associés aux mouvements segmentaires de la boucle (Φ_2) sont plus longs en position 8 (800 ps) qu'en position 6 et 10 (environ 700 ps). En complément, l'anisotropie fondamentale mesurée en position 6 et 10, égale à 0.37, est proche de celle estimée par Holmén et Al. [121], alors que la position 8 présente la même valeur de r_0 que la 2Ap libre dans notre solvant.

Ainsi :

- La 2Ap en position 6 est moins encombrée qu'en position 8 et 10, mais tout de même tournée vers l'intérieur de la boucle.

– La boucle en position 8 présente une flexibilité plus importante qu'en position 6 et 10 et est plus exposée au solvant.

– La position 10 est celle présentant les contraintes géométriques les plus importantes en termes d'encombrement et de flexibilité, ce qui va de paire avec un empilement plus important et enfoui au sein de la boucle.

Ces données semblent en accord avec les structures de Δ(-)PBS obtenues par Bourbigot & Al. [21] .

Environ 30 % à 45 % des amplitudes sont réparties sur Φ_1, le reste étant redistribué sur les deux autres temps. Pour les temps longs, les disparités d'amplitudes entre nos valeurs et celles de Godet & Al. peuvent être expliquées par le quenching très important de la 2Ap aux temps courts et l'incertitude de notre offset, ce qui empêche toute forme d'analyse pertinente.

Le dernier point important est que nos données confirment qu'il n'existe pas de temps de corrélation plus court que celui déjà évalué par Godet & Al. Le temps attribué à la rotation locale de la 2Ap au sein de PBS correspond donc au seuil cinétique en dessous duquel tout phénomène de quenching peut être qualifié de statique. De ce fait, en se référant aux résultats des cinétiques de quenching résolues en temps du paragraphe 3.3, le temps τ_2 ($<$ à 40 ps) correspond clairement à du quenching statique, au sein duquel la géométrie d'empilement est moins efficace, alors que le temps τ_3 (entre 90 et 130 ps) pourrait correspondre à des conformations intermédiaires, où l'empilement inter-converti avec une géométrie plus lâche (caractéristique d' un quenching dynamique) pendant le temps de vie de l'état excité.

3.6 Δ(-)PBS et glycerol

Seul le quenching collisionnel est réellement affecté par la viscosité du milieu. Ainsi, l'augmentation du QY de fluorescence due à l'addition de glycerol suggère que cette méthode peut servir de signature pour discriminer les structures empilées dans des conformations statiques (non affectées) des structures dynamiques. [46]

Au vu des similitudes observées entre Δ(-)PBS-2Ap(6 et 8), nous avons décidé de ne retenir que ce dernier pour le comparer avec son homologue en position 10. Les expériences ont été réalisées dans des conditions identiques d'expérimentation, à l'exception du solvant, maintenant composé de 70% de glycerol et 30% de solvant aqueux (HEPES).

La figure 3.9 superpose les cinétiques de déclin de la 2Ap libre et de Δ(-)PBS-2Ap(8 et 10) dans

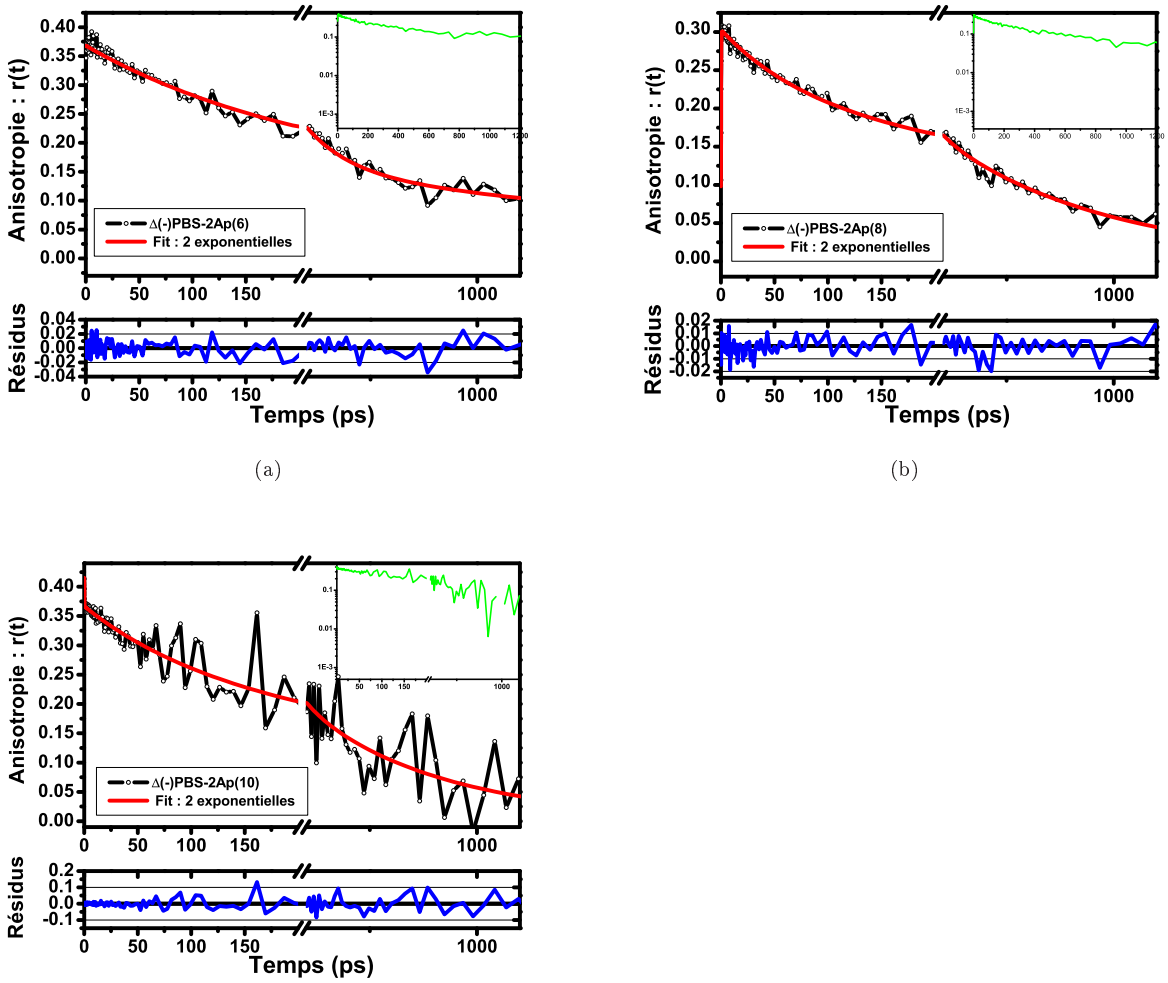


Figure 3.8 – Résultats de la mesure d'anisotropie résolue en temps-En (a)-(b)-(c), sont respectivement représentées les données pour Δ(-)PBS 2AP(6, 8 et 10). Les codes couleurs ainsi que les données illustrées sont identiques à celles de la figure 3.6.

	Φ_1	β_1	Φ_2	β_2	Φ_3	β_3	r_0
2-Aminopurine	0.028	1.00	-	-	-	-	0.3
	0.08	1.00	-	-	-	-	?
Δ(-)PBS-2Ap(6)	0.13	0.35	0.70	0.45	∞	0.2	0.375
)	0.17	0.38	0.70	0.34	2.2	0.28	?
Δ(-)PBS-2Ap(8)	0.09	0.30	0.80	0.60	∞	0.20	0.30
)	0.22	0.36	0.70	0.11	2.1	0.53	?
Δ(-)PBS-2Ap(10)	0.10	0.27	0.675	0.63	∞	0.1	0.365
)	0.18	0.46	0.90	0.27	2.6	0.27	?

Table 3.3 – Dynamiques d'anisotropie pour la 2Ap libre et les ODN Δ(-)PBS-2Ap(6, 8 et 10) - Paramètres extraits à partir de l'équation 3.20, les amplitudes sont normalisées. En rouge, données issues de [1], pour comparaison. Les temps de corrélation ϕ_i sont exprimés en ns.

l'HEPES avec leurs équivalents mis en solution dans du glycerol pour une émission à 368 nm. Les deux ODNs marqués dans le glycerol présentent des cinétiques complexes, visiblement multi-exponentielles. En revanche, la superposition quasi parfaite des deux cinétiques, en position 8 et 10, indique la présence d'un environnement de micro-solvatation identique dans les deux positions.

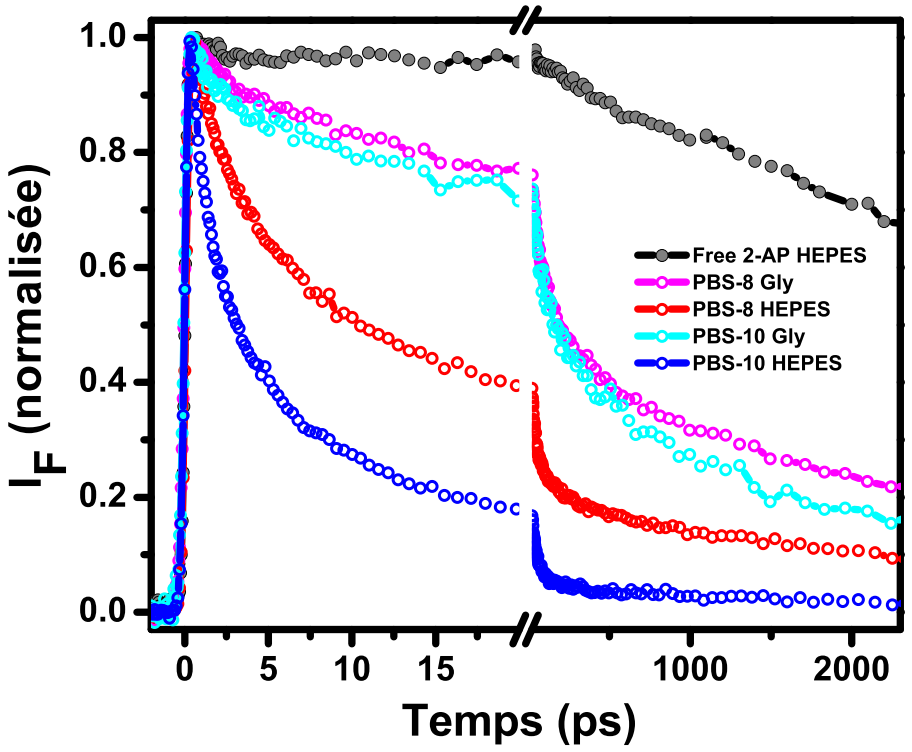


Figure 3.9 – Superposition des cinétiques de déclin des ODNs Δ(-)PBS-2Ap(8, 10) et de la 2Ap libre, en solutions dans de l'HEPES et du glycerol.

La figure 3.10(a) est un histogramme où les couples (τ_i,A_i) sont représentés pour Δ(-)PBS-2Ap(8), dans l'HEPES (hachures vertes) et le glycerol (barres violettes). Dans ce cas, et comme précédemment, 4 temps de vie ont pu être observés, également répartis sur quatre ordres de grandeurs. Les deux premiers temps ($\tau_1 = 1.3$ ps, $\tau_2 = 19.2$ ps) sont relativement similaires à ceux observés dans l'HEPES. En revanche, le troisième, celui dont ont prédisait une forte composante dynamique, se trouve décalé de 93 à 158.2 ps.

Malheureusement, nous ne disposons pas des spectres de fluorescence statique de nos composés dans le glycerol. Cet oubli nous empêche de confirmer que l'ensemble des temps de vie ont bien été résolus. Dans, l'hypothèse où ces derniers le seraient, ces données confirmeraient une origine statique pour les deux pre-

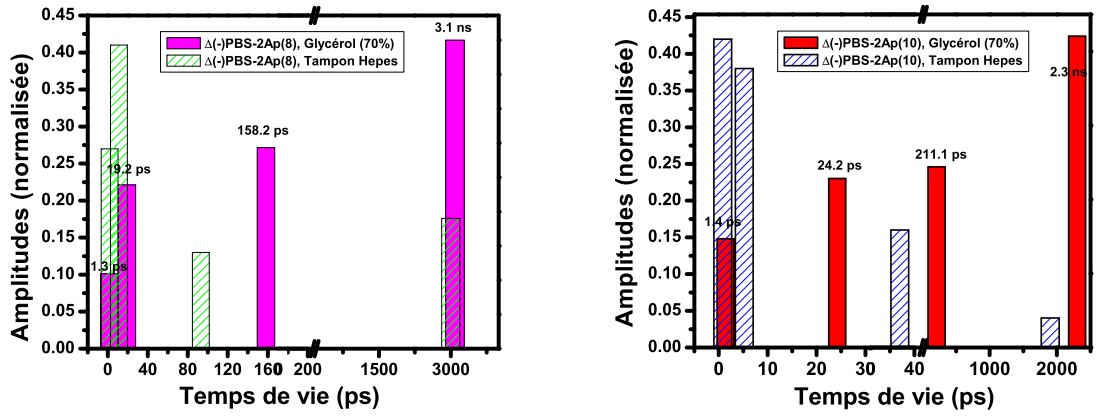
miers temps de vie mesurés (similaires à ceux observés dans l'HEPES) et un caractère dynamique pour τ_3.

τ_4 ne varie pas, ce qui est sans doute du à l'impossibilité de le résoudre entièrement avec notre montage.

Paradoxalement, et comme observé lors de la superposition des deux cinétiques, les temps observés pour Δ(-)PBS-2Ap-(10) au sein de la figure 3.10(b) sont similaires à la position 8, la 2Ap est donc contrainte de la même manière dans les deux cas, ce qui se traduit par une perte progressive de l'empilement caractéristique de PBS(10), au profit de conformations plus lâches.

L'effet le plus marquant correspond à la complète redistribution des amplitudes, répartitions relativement similaires sur les deux sites. Là où dans l'HEPES, entre 80 et 95 % des composantes se plaçaient avant les 100 premières ps, dans le glycerol, seules 40 % subsistent. On remarque que l'augmentation des amplitudes pour les temps longs est très prononcée pour $\tau 4$, caractéristique de conformations spatiales plus exposées au solvant.

En conclusion, notre expérience pourrait confirmer le caractère statique des deux premiers temps de vie observés dans l'HEPES. En revanche, ces derniers seraient fortement réduits en amplitude, alors que les sous-populations se référant à des structures à fort quenching collisionnel augmenteraient. Ceci n'est donc pas une conséquence liée à l'augmentation de la viscosité, mais très probablement liée à la capacité du glycerol à former des liaison H [117]. Le solvant perturberait la boucle, ce qui explique que cet effet soit identique quelque soit la localisation de 2Ap : cette dernière interagit en priorité avec le solvant plutôt qu'avec les bases avoisinantes.



(a) (b)

Figure 3.10 – Histogrammes des couples (temps de vie de fluorescence / amplitudes) dans le glycerol - En (a), Δ(-)PBS-2Ap(8) prise en exemple pour comparaison. En violet sont présentés les couples ensembles (τ_i, α_i) dans le glycerol (70%), en hachuré vert, dans l'HEPES. En (b), Δ(-)PBS-2Ap(10). En rouge, sont présentés les couples ensembles (τ_i, α_i) dans le glycerol (70%), en hachuré bleu, dans l'HEPES.

3.7 Conclusion

Trois expériences différentes ont été effectuées grâce au montage de Down-Conversion, ayant pour but de mieux définir les sous-états conformationnels de Δ(-)PBS-2Ap(X) qui n'avaient pas pu être résolus par Godet et al [1]. Lorsque la 2Ap est introduite au sein de nos ODNs, nous observons des cinétiques de déclins multi-exponentielles, caractéristiques d'une hétérogénéité structurale. Ces temps de vie s'étendent sur 4 ordres de grandeur différents, allant du domaine de la picoseconde (0.8 - 3.7 ps) à la nanoseconde (1.9 - 3.1 ns). La valeur de ces derniers ainsi que leur répartition en amplitudes est site-spécifique. Ces résultats sont en accord avec les variations de QY mesurées en fluorescence statique. Ils indiquent un quenching plus important de la 2Ap lorsque celle-ci est en position 10, par rapport aux position 6 et 8, ce qui va de paire avec un éventuel stacking avec G(11), confirmé par RMN-1H. [21]. Un des points essentiels de l'expérience est que nous résolvons la plupart des sous-états au sein de la boucle.

Les mesures d'anisotropie ont pu être ajustées par un modèle bi-exponentiel, reflétant des temps de corrélation liés à la rotation locale de la 2Ap au sein de la boucle (Φ_1, 90-130 ps) et au mouvement segmentaire de cette dernière (Φ_2, $\approx$ 750 ps). Des informations locales sur l'encombrement et la flexibilité de la boucle PBS ont pu être établies. Étant donné que le phénomène de quenching principal pour des interactions d'empilement est du à un CT, Φ_1 reflète la limite ultra-rapide naturelle de diffusion au delà de laquelle les bases ne présentent plus un alignement suffisant pour s'empiler de manière efficace. Ainsi, les temps de vie inférieurs à Φ_1 (à savoir τ_1 et τ_2) peuvent être attribués avec confiance à des géométries où les 2Aps interagissent uniquement par empilement, dans des structures ou la diffusion est restreinte voir nulle.

En changeant le solvant aqueux pour un environnement où la viscosité est plus élevée (glycerol 70%) nous espérions pouvoir confirmer la limite entre quenching limité par la diffusion et quenching statique apparent. Seulement, l'interaction par liaisons H entre le glycérol et la 2Ap écrante fortement le transfert de charge, ce qui explique la perte de spécificité liée au site, ainsi que les transitions d'amplitudes vers d'états conformationnels à temps de vie long, où l'interaction avec le solvant est plus prépondérante.

3.8 Annexe au chapitre 3

Anisotropie fondamentale et photo-sélection

Prenons le cas d'un ensemble de fluorophores orientés aléatoirement, immobiles et dont les moments dipolaires de transitions $\boldsymbol{\mu_A}$ et $\boldsymbol{\mu_E}$ sont disposés colinéairement. Donc $r(t) = \text{A.f} = r_0$. D'après les conventions illustrées par la figure 3.11-A et pour une molécule prise au hasard dans le volume d'excitation, les composantes polarisées parallèlement et perpendiculairement de l'intensité émise par le fluorophore s'écrivent :

$$I_{\parallel} \propto \cos^2(\theta_E) \tag{3.21}$$

$$I_{\perp} \propto \sin^2(\theta_E) \cdot \sin^2(\Phi_E) \tag{3.22}$$

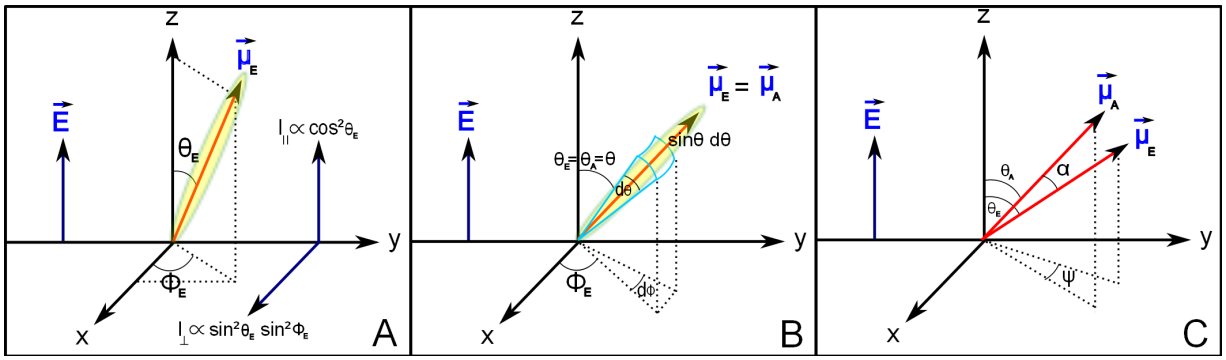


Figure 3.11 – Éléments d'anisotropie fondamentale- Figure introduisant les notations utilisées pour décrire les deux cas d'anisotropie fondamentale : A- Cas pour une molécule, orientée aléatoirement, de zénith θ_E et d'azimut Φ_E tels que $\boldsymbol{\mu_A}$ et $\boldsymbol{\mu_E}$ soient colinéaires. B- Cas identique mais pour une collection de fluorophores. La probabilité d'excitation correspond à une sphère de rayon $\boldsymbol{\mu_A}$. Introduction des éléments de surface $d\theta_E$ et $d\Phi_E$. C- Cas identique à A, mais où $\boldsymbol{\mu_A}$ et $\boldsymbol{\mu_E}$ sont non colinéaires, tels que $\theta_E = \theta_A + \alpha$ et $\psi =$ l'angle azimutal de différence entre les deux moments dipolaires.

Si on s'intéresse à la totalité des fluorophores contenus dans le volume d'excitation, il devient alors nécessaire de sommer l'ensemble des contributions de chaque molécule dans tout l'espace (Fig.3.11-B) :

$$I_{\parallel} \propto \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} f(\Phi_E, \theta_E) \cos^2(\theta_E) d\Phi_E d\theta_E = K \cdot < \cos^2 \theta_E > \tag{3.23}$$

$$I_{\perp} \propto \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} f(\Phi_E, \theta_E) \sin^2(\Phi_E) \sin^2(\theta_E) d\Phi_E d\theta_E \tag{3.24}$$

Où $K = \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} f(\phi_E, \theta_E) d\Phi_E d\theta_E$ est un facteur de normalisation. $f(\Phi_E, \theta_E)$ est la densité de probabilité d'orientation des molécules excitées par l'impulsion lumineuse. Cette dernière correspond au produit de deux termes (Fig.3.12) :

– La densité de probabilité d'orientation $O(\Phi_E, \theta_E)$ de l'ensemble des $\boldsymbol{\mu_A}$ d'une solution homogène

et isotrope de fluorophores. En tout point de l'espace, la réalisation de cette probabilité correspond à la surface d'une sphère de rayon μ_A. De ce fait, $O(\Phi_E, \theta_E) = \mu_A^2 \sin(\theta_E)$.

– La «photo-sélection» $P_{EL}(\Phi_E, \theta_E)$ de cette solution par une impulsion polarisée linéairement, qui est proportionnelle au carré du produit scalaire entre $\boldsymbol{\mu_A}$ et $\mathbf{E}$, ie, $P_{EL}(\phi_E, \theta_E) \propto \cos^2(\theta_E)$. Sous ces conditions d'illumination, les molécules ayant un $\boldsymbol{\mu_A}$ dont l'orientation est voisine de $\mathbf{E}$ seront préférentiellement excitées.

De ce fait, $f(\Phi_E, \theta_E)$ ne dépend que de θ_E et peut être reformulé par :

$$f(\phi_E, \theta_E) = O(\phi_E, \theta_E) \cdot P_{EL}(\phi_E, \theta_E) = \mu_A^2 \sin(\theta_E) \cos^2(\theta_E) = f(\theta_E) \tag{3.25}$$

ce qui permet d'exprimer 3.23, 3.24 sous cette forme :

$$I_{\parallel} \propto \int_0^{\pi} f(\theta_E) \cos^2(\theta_E) d\theta_E = K < \cos^2(\theta_E) > \tag{3.26}$$

$$I_{\perp} \propto \int_0^{2\pi} \sin^2(\Phi_E) d\Phi_E \cdot \int_0^{\pi} f(\theta_E) \sin^2(\theta_E) d\theta_E = \frac{K}{2} \left[1 - < \cos^2(\theta_E) >\right] \tag{3.27}$$

Réinjectées au sein de l'équation 3.17, on retrouve l'expression de l'anisotropie «fondamentale» :

$$r_0 = \frac{3 < \cos^2(\theta_E) > -1}{2} \tag{3.28}$$

A partir de là, plusieurs constatations découlent de cette expression :

– Il existe un angle θ particulier pour lequel l'anisotropie s'annule. Il satisfait l'équation $< \cos^2(\theta_E) >= \frac{1}{3}$ et vaut ainsi 54.7°. On le qualifie «d'angle magique».

– Lorsque l'on considère une collection de fluorophores, l'anisotropie dépend de $f(\theta_E)$, qui elle même subit l'effet de la photo-sélection. Cela se traduit par une valeur moyenne de $\cos^2(\theta_E)$ que l'on peut résoudre à partir de 3.25 et 3.26 :

$$< \cos^2(\theta_E) >= \frac{\int_0^{\pi} \cos^4(\theta_E) \sin(\theta_E) d\theta_E}{\int_0^{\pi} \cos^2(\theta_E) \sin(\theta_E) d\theta_E} = \frac{\frac{\left[\cos^5(\theta_E)\right]_0^{\pi/2}}{5}}{\frac{\left[\cos^3(\theta_E)\right]_0^{\pi/2}}{3}} = \frac{3}{5} \tag{3.29}$$

et par une valeur fixe de r_0 égale à 0.4. L'anisotropie fondamentale d'une solution de molécules fluorescentes est donc nettement plus faible que celle attendue pour un fluorophore isolé.

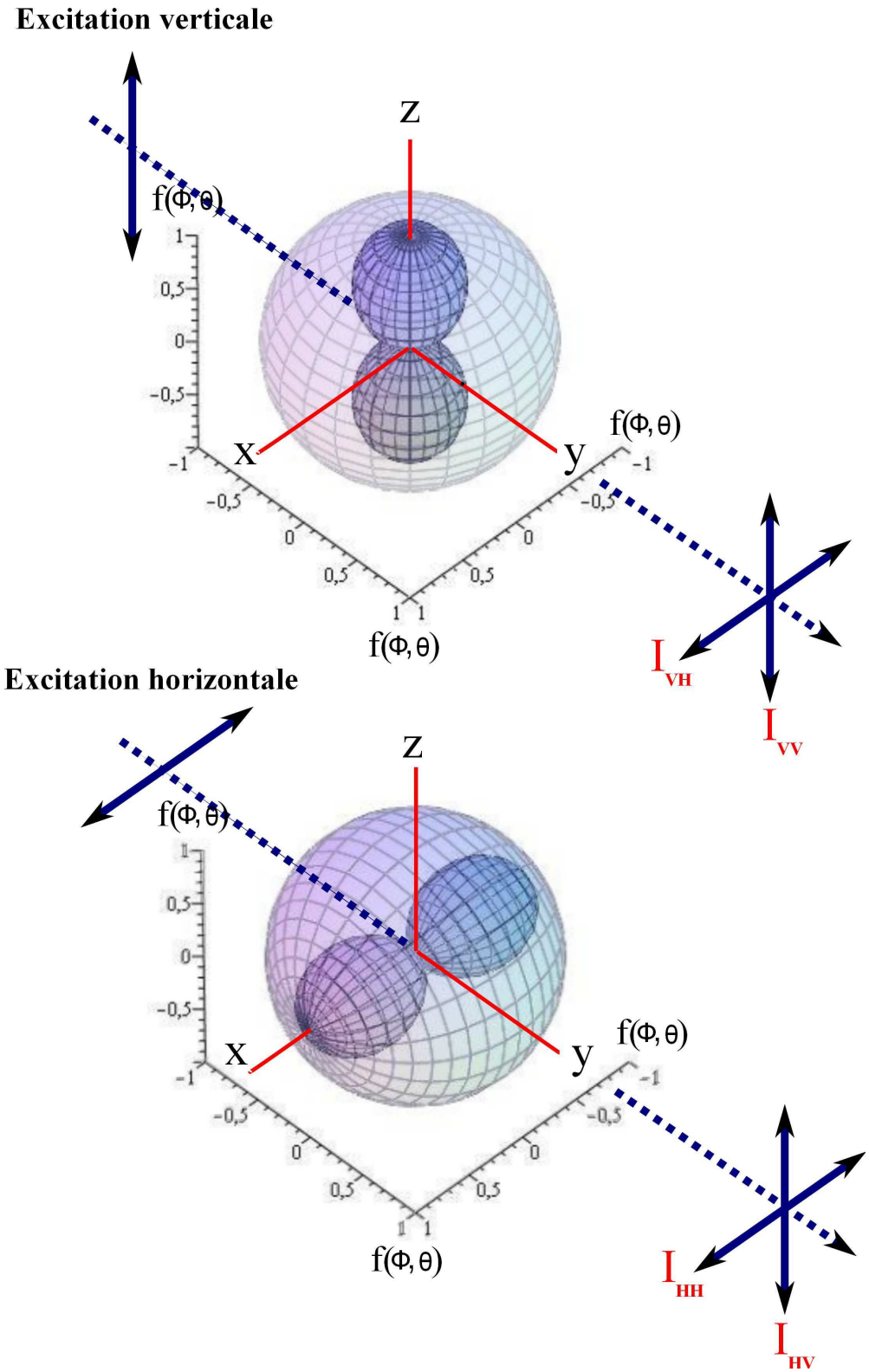


Figure 3.12 – Représentation de l'effet de photo-sélection par une excitation verticale et horizontale - Sont représentés superposés : la densité de probabilité d'excitation d'une solution homogène et isotrope de fluoroophores (sphère) et l'effet de photo-sélection des fluorophores en fonction de l'orientation de l'excitation (H pour horizontal et V pour vertical). Les axes de l'émission sont nommés selon la notation suivante : $I_{\text{orientation exciation - orientation analyseur}}$

Anisotropie fondamentale et la non colinéarité des moments dipolaires de transition d'absorption et d'émission

Cette fois, on se place dans des conditions identiques aux précédentes, mais où on observe un angle α entre μ_A et μ_E, avec $\theta_E = \theta_A + \alpha$, l'angle formé entre $\mathbf{E}$ et $\boldsymbol{\mu_E}$. Il est possible de montrer, en usant des mêmes règles de trigonométrie, que :

$$r_0 = \frac{3 < \cos^2\theta_E > -1}{2} = \frac{3 < \cos^2\theta_A > -1}{2} \cdot \frac{3 < \cos^2\alpha > -1}{2} = \frac{2}{5} \cdot \frac{3 < \cos^2\alpha > -1}{2} \tag{3.30}$$

Par conséquent, les valeurs attendues pour r_0 peuvent être comprises entre 0.4 (si $\alpha = 0°$) à -0.2 (si $\alpha = 90°$).

Précisions sur la diffusion rotationnelle

Dans le cas très particulier où les molécules sont assimilées à des sphères diffusant dans des milieux isotropes, il est possible de réécrire 3.16 par :

$$r(t) = r_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\Phi}\right) \tag{3.31}$$

Φ est le temps de corrélation rotationnel, pouvant s'exprimer en fonction de la viscosité (η), de la température (T), du volume (V) de l'unité en mouvement et de la constante R des gaz parfaits par la relation :

$$\Phi = \frac{\eta V}{RT} \tag{3.32}$$

Le temps de corrélation rotationnel peut être relié à un temps de diffusion rotationnel D par la relation : $\Phi = (6D)^{-1}$.

Lorsque les possibilités de rotations s'avèrent limitées, il s'avère que le déclin d'anisotropie ne retourne pas vers 0 : un offset (r_∞) est alors observé, et ce même à des temps long comparés à τ_{Fluo}. Une expression approchée du temps de vie d'anisotropie peut alors être donnée par :

$$r(t) = (r_0 - r_\infty)\exp\left(-\frac{t}{\Phi}\right) + r_\infty \tag{3.33}$$

Chapitre 4

Approche B : Étude du repliement de [35-50] NCp7 autour de Zn^{2+} par CID et LID

Sommaire

4.1 Matériels et méthodes **79**

4.1.1 Principaux éléments d'une expérience en phase gazeuse 79

4.1.1.1 La source ESI 79

4.1.1.2 Le spectromètre de masse en tandem 82

4.1.2 Caractéristiques du système laser 89

4.1.2.1 Le Système amplificateur 89

4.2 Fragmentation des peptides **90**

4.3 Résultats **93**

4.3.1 Spectre de masse Q_1 93

4.3.2 Spectres CID et LID de [(35-50) NCp7], $3H^+$ 93

4.3.2.1 Région de faible rapport m/z : de 100 à 300 m/z 95

4.3.2.2 Région de rapport m/z central : de 300 à 630 m/z (Fig.4.17 et 4.18) . 104

4.3.2.3 Région de rapport m/z élevé : de 650 à 1000 m/z (Fig.4.19) 107

4.3.3 Effet du Zinc sur les spectres CID et LID de [(35-50)NCp7], $3H^+$ 107

4.4 Résumé et perspectives **110**

Ce chapitre traite de l'étude des effets du repliement de NCp7 autour de son atome de zinc sur la génération de fragments induits par collisions et laser. La première partie du chapitre introduit les principaux éléments inclus dans le dispositif expérimental. Même par collision, la fragmentation des peptides est singulière et s'effectue autour de la liaison peptidique, décrite par une nomenclature qu'il est nécessaire de préciser, car l'ensemble des pics attribués par la suite y feront référence. Nous détaillerons ensuite les résultats, en commençant par une description du spectre de masse classique, caractéristique de l'ensemble des espèces pouvant être piégées, puis par une description des spectres CID et LID. En premier lieu, les spectres CID puis LID de la protéine nue seront présentés, d'abord parce qu'ils servent de base de comparaison avec ceux issus du repliement autour du Zinc, et ensuite parce que leur attribution est beaucoup plus aisée. La comparaison avec les résultats obtenus avec le zinc sera donnée en fin de chapitre.

4.1 Matériels et méthodes

4.1.1 Principaux éléments d'une expérience en phase gazeuse

Une expérience effectuée en phase gazeuse est toujours décrite en tant que combinaison des divers éléments suivants (Fig.4.1) :

- **Une source** : il s'agit d'un système permettant de faire passer les molécules d'intérêt sous forme gazeuse et ionisée. L'exemple caractéristique utilisé au sein de notre montage est un électrospray (ESI), mais il en existe bien d'autres.
- **Un spectromètre de masse tandem** : également désigné par le sigle MS/MS, il consiste en deux filtres de masse et un piège ionique radio-fréquence. Le premier filtre de masse est utilisé pour sélectionner une espèce ionique particulière en fonction de son rapport masse sur charge (m/z), puis les ions sélectionnés sont ensuite fragmentés dans le piège ionique par collisions avec un gaz neutre tel que l'Hélium ou l'Argon, résultant en un schéma de fragmentation propre à l'ion précurseur qui sera analysé par le second filtre de masse.
- **Un détecteur** : généralement consistant en un détecteur électromultiplicateur (channeltron).

4.1.1.1 La source ESI

Souvent définie comme une méthode «douce» de génération d'espèces chargées, l'Ionisation par Electrospray (ESI) permet la production d'ions en phase gazeuse à partir d'une solution mère sous pression atmosphérique. Appliquée à une molécule M, son action peut être résumée par la réaction suivante :

$$(M_{sol})^{n\pm} \rightarrow [M_{gaz} \pm n'H]^{(n+n')\pm} \tag{4.1}$$

Principe, pour des ions chargés positivement :

Une tension électrique V_0 de l'ordre du kilo-Volt est appliquée sur une aiguille métallique entourant un

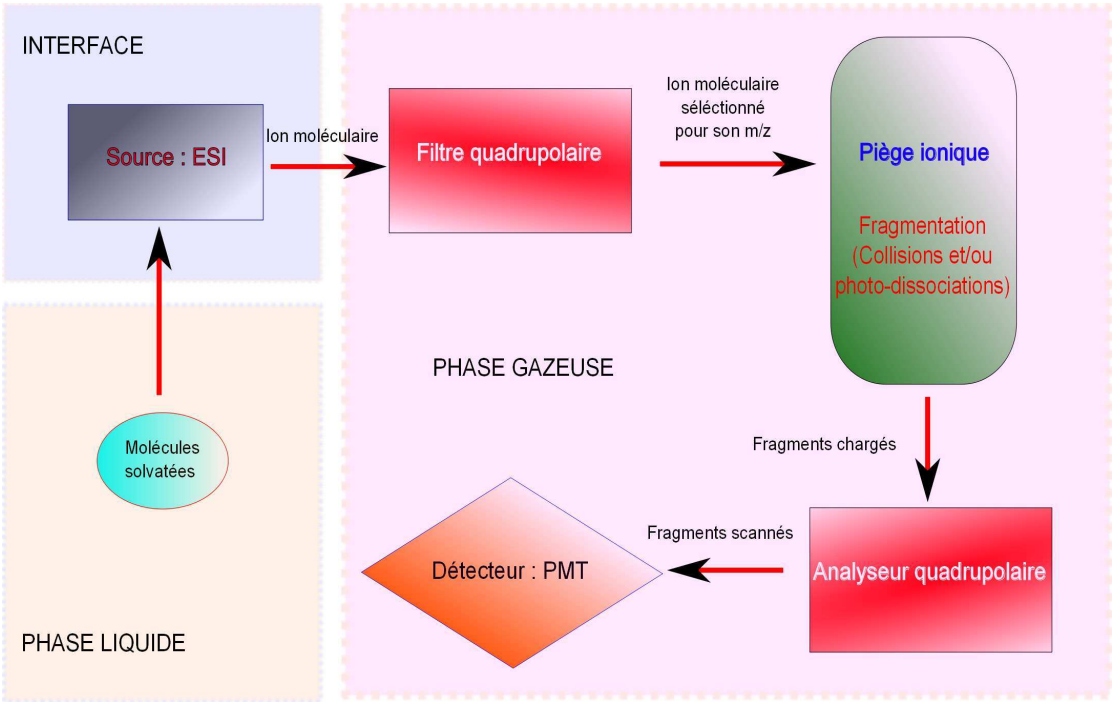


Figure 4.1 – Principaux éléments d'un appareil dédié à la spectroscopie MS/MS

capillaire de silice (Fig.4.2). A l'extrémité du capillaire, mais à une distance de 1 à 2 cm, se situe l'orifice d'entrée du spectromètre de masse. Ce dernier est porté à une tension de l'ordre de 120-130 V.

Trois étapes principales sont généralement invoquées pour décrire les effets qui apparaissent sous le champ électrique ainsi généré (Fig.4.3) :

1. *Formation d'un spray de gouttelettes à l'extrémité du capillaire :*

   Sous l'effet du champ électrique appliqué à l'extrémité du capillaire, 2 mécanismes gouvernent principalement le comportement de la solution :

   – A l'interface entre le fluide et le fourreau métallique du capillaire, des réactions d'oxydation vont s ?amorcer, augmentant le nombre de charges et induisant une plus grande répartition.

   – A l'air libre, il y a formation d'un ménisque. Sous l'action de E_c, les charges positives vont être attirées à la surface de ce dernier, alors que les charges négatives seront attirées par l'anode, induisant une déformation vers une forme optimale appelée «cône de Taylor» [122]. A la pointe de ce dernier, un seuil d'équilibre entre les tensions superficielles du liquide et les forces dues au champ est franchi : de fines gouttelettes de l'ordre du μm seront libérées.

   La tension V_0 à appliquer au niveau du capillaire peut être décrite par l'équation suivante [123] :

$$V_0 = A_1 \left[\frac{2Tr_c \cos\theta_0}{\varepsilon_0} \right]^{1/2} \ln(4d/r_c) \tag{4.2}$$

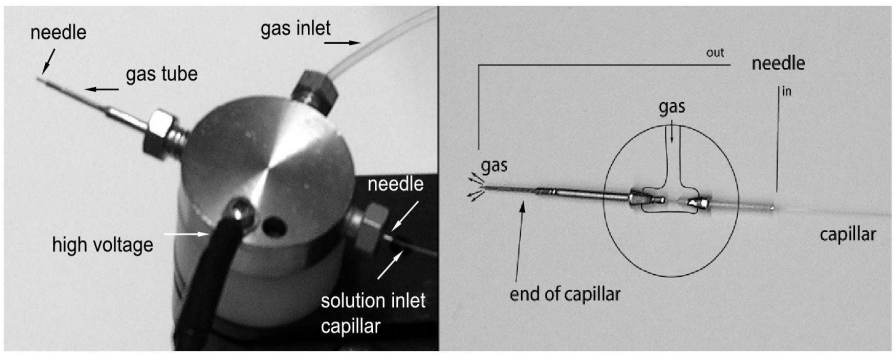


Figure 4.2 – A gauche : Photographie de la source ESI en action. A droite : Éléments de la source. L'échantillon circule dans un tube de silice de 100 μm de diamètre. Ce tube est inséré dans une aiguille métallique où une tension de l'ordre du kV est appliquée. Cette aiguille est elle même enfichée dans un fourreau métallique. Dans l'espace situé entre l'aiguille et le fourreau circule un gaz de N_2 pour l'évaporation des gouttelettes. L'aiguille est tournée d'un angle compris entre 40 et 60°pour empêcher les molécules neutres de pénétrer la première chambre sous vide du spectromètre ainsi que pour limiter l'occlusion de l'orifice d'entrée.

Où T est la tension superficielle du liquide, r_c correspond au rayon du capillaire, θ_0 est le demi angle du cône et d est la distance entre le capillaire et l'orifice. On peut donc constater que plus r_c et T sont réduits, plus la tension nécessaire pour un spray identique sera faible. Il est à noter que le solvant optimal est souvent trouvé de manière empirique. Bien souvent, un compromis doit être étudié entre : le ratio solvants volatiles (à faible T) / polaires (pour solubiliser les molécules) et le diamètre du capillaire dont on dispose. Ainsi, des mélanges eau/méthanol sont souvent employés, avec une légère acidification pour augmenter la formation de charges en solution.

2. *Réduction du volume des gouttelettes et explosion coulombienne :*

   Au fur et à mesure que les gouttes se dirigent vers l'orifice, les charges vont se présenter à leurs surfaces. En même temps, ces dernières sont en contact avec un flux d'azote gazeux (N_2) ayant pour but d'évaporer progressivement le solvant. Une réduction du volume des gouttes se produit engendrant une augmentation de la densité de charges. Lorsque la limite de Rayleigh est atteinte, le ratio entre répulsions coulombiennes et forces de tension de surface égale l'unité [124] :

$$\frac{Q_{rayleigh}}{8\pi\left(\epsilon_0\gamma R^3\right)^{1/2}} = 1 \tag{4.3}$$

   Où $Q_{rayleigh}$ est la charge à la limite de Rayleigh, ϵ_0 est la constante de permittivité du vide, γ est la tension de surface et R le rayon de la goutte. Au delà, les gouttes vont subir des déformations multipolaires résultant en une explosion Coulombienne.

3. *Désorption et production de molécules ionisées en phase gazeuse :*

   Cette étape essentielle est toujours à l'heure actuelle le fruit d'une controverse importante. Deux

images se présentent pour expliquer cette étape finale. D'un coté on distingue le modèle de la charge résiduelle, initié par Dole en 1968 [125], où les gouttelettes nouvellement générées subissent un cycle d'explosion coulombienne jusqu'à ce que seul l'ion moléculaire ne subsiste. De l'autre se présente le modèle d'évaporation de l'ion (Iribarne et Al, 1976 [126]), où pour une certaine taille de gouttelettes, les forces du champ deviennent suffisantes pour littéralement extraire les molécules de leur solvant.

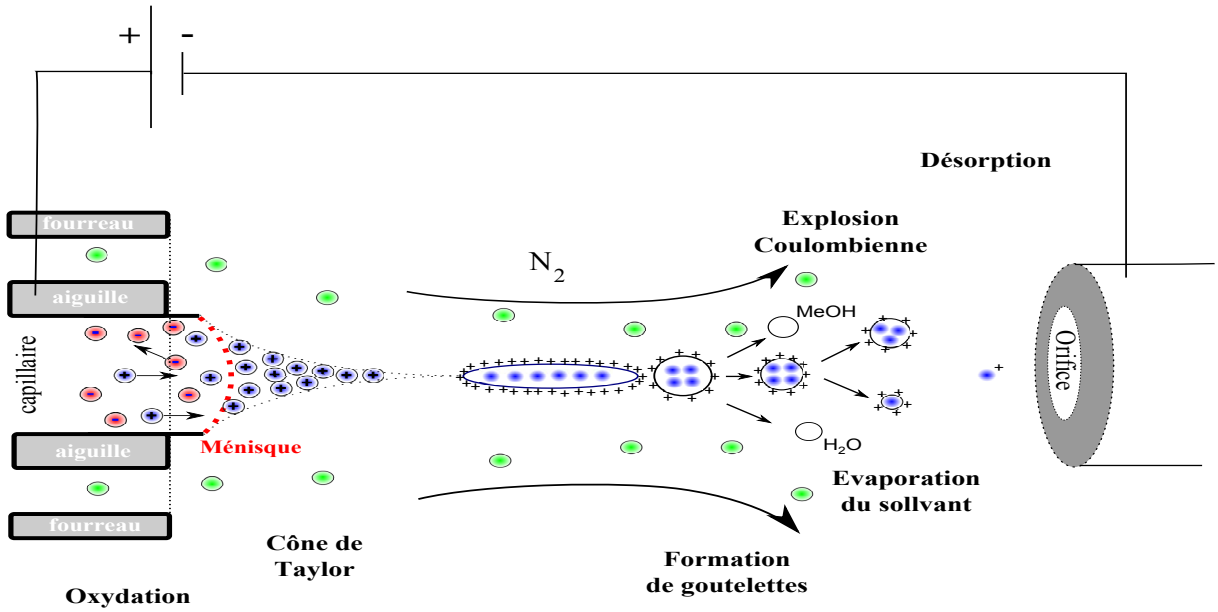


Figure 4.3 – Mécanismes de formation d'espèces chargées par ESI

4.1.1.2 Le spectromètre de masse en tandem

Le but de cette partie est de comprendre de manière simple le guidage, la sélection et le piégeage d'espèces ioniques en phase gazeuse.

Sélection et guidage des ions : Le théorême d'Earnshaw [127] stipule qu'il est impossible d'utiliser un seul champ électrostatique pour piéger un ion. Pour qu'une particule chargée puisse être en équilibre en un point r_i donné, il est à la fois nécessaire que le champ $\overrightarrow{E(r_i)}$ soit nul en ce point et unique dans l'espace contenant ce champ : aucune autre charge de position $r_{n\neq i}$ ne peut alors être en état d'équilibre. L'équilibre stable en r_i impliquerait que la charge ressente automatiquement une force de rappel pour toute perturbation faible par rapport au point d'origine. S'il existait une surface fermée S infiniment petite entourant r_i, une telle force de rappel signifierait l'existence d'un flux de sens opposé à celui initialement généré par la charge en r_i. Ceci rentre formellement en contradiction avec le théorème de Gauss, selon lequel le flux de $\overrightarrow{E}$ est nul seulement en l'absence de charges au sein de S. Une manière de palier à cette problématique est d'utiliser la capacité des molécules chargées à maintenir une trajectoire stable sous l'effet d'un potentiel électrique oscillant $\Phi(t)$. Ce dernier se décompose en deux parties telles

que :

$$\Phi(x, y, z, t) = \phi(x, y, z) \cdot \Phi_0(t) \tag{4.4}$$

Le potentiel électrostatique $\phi(x, y, z)$, correspond à la composante spatiale de Φ. Il est lié au nombre, à la disposition et la forme des électrodes constituant le système de guidage. Dans le vide, ϕ se doit de respecter l'équation de Laplace : $\Delta\phi = 0$. En corollaire à ce qui a été énoncé plus haut, on remarquera que ϕ ne présente aucun minimum ou maximum local, et ne peut donc être un bon candidat au confinement d'un ion. En supposant que la forme des électrodes est infiniment longue et invariable selon l'axe z (on néglige ici les solutions à base d'électrodes circulaires), $\phi(x, y)$ peut correspondre à n'importe qu'elle fonction harmonique respectant la condition :

$$\frac{\partial^2 \phi_n}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \phi_n}{\partial y^2} = 0 \tag{4.5}$$

où n est l'ordre d'expansion multipolaire de $\phi(x, y)$. Les mécanismes utilisés dans le cadre du laboratoire correspondent à des solutions de type [128] :

$$\text{Quadrupolaire} \quad : \quad \phi_2(x, y) = x^2 - y^2 \tag{4.6}$$

$$\text{Decapolaire} \quad : \quad \phi_5(x, y) = x^5 - 10x^3y^2 + 5xy^4 \tag{4.7}$$

$$\text{Hexadecapolaire} \quad : \quad \phi_8(x, y) = x^8 - 28x^6y^2 + 70x^4y^4 - 28x^2y^6 + y^8 \tag{4.8}$$

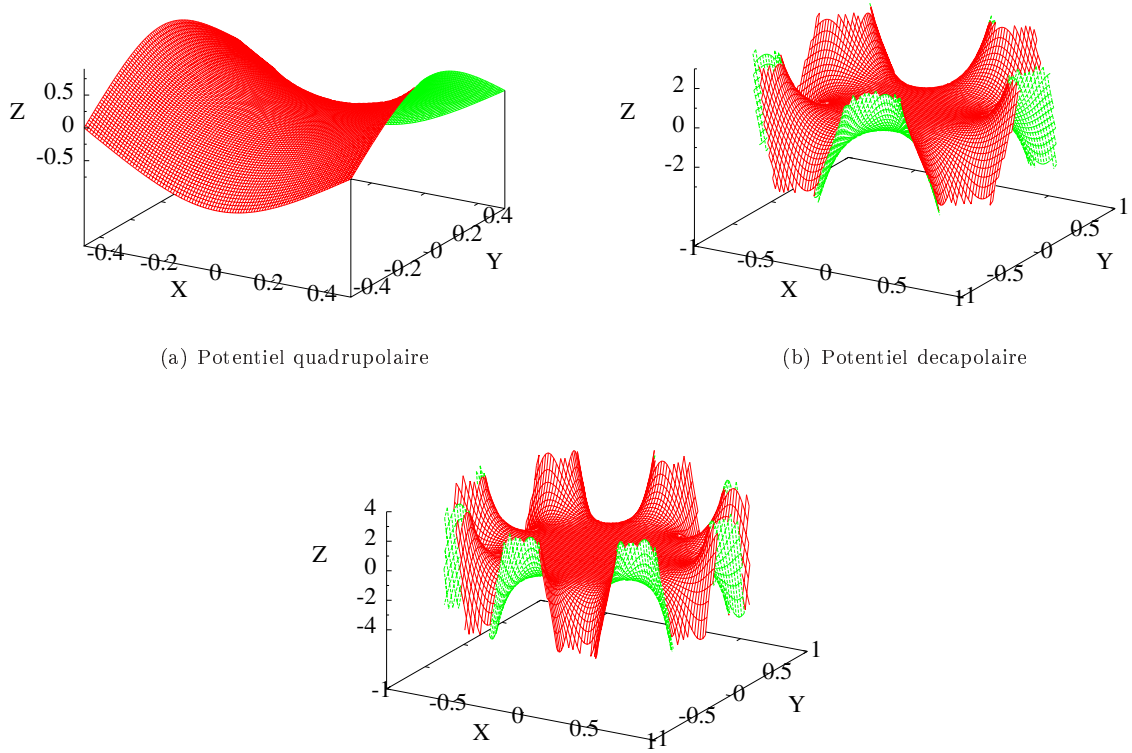
et les formes de ces potentiels sont représentés au sein de la figure 4.4. Remarquons que les équipotentielles $\phi_n(x, y) = k$ ont une forme hyperbolique, la condition limite à l'interface des électrodes impose également une telle forme à ces dernières [129]. Dans la pratique, les électrodes de formes rondes sont utilisées car plus faciles à mettre en oeuvre, avec un rapport entre le rayon de l'électrode et le rayon du puits de potentiel (r_e/r_0) bien défini pour chaque type de configuration [130]. Puisqu'une oscillation confinée selon une coordonnée x reviendrait à faire diverger l'ion selon y, ce dernier ne peut avoir une trajectoire stable selon z que si la surface est inversée à une fréquence bien précise, ce qui est le rôle de composante oscillante de Φ : à savoir $\Phi_0(t)$.

La partie dépendante du temps $\Phi_0(t)$ résulte d'une combinaison entre une tension continue U et alternative V de fréquence ω :

$$\Phi_0(t) = U + V\cos(\omega t) \tag{4.9}$$

Les forces exercées sur une particule chargée dans l'espace pourront se résumer à :

$$\mathbf{F} = -e \cdot [U + V\cos(\omega t)]\boldsymbol{\nabla}\phi(x, y) \tag{4.10}$$



(a) Potentiel quadrupolaire

(b) Potentiel decapolaire

(c) Potentiel hexadecapolaire

Figure 4.4 – Potentiels électrostatiques ϕ utilisés pour le guidage des ions moléculaires : Pour des systèmes : (a) quadrupôlaires, (b) décapôlaires, (c) hexadécapôlaires. Remarquons que plus le nombre de pôles augmente, plus les potentiels deviennent raides aux extrémités, et plus la zone centrale de confinement $\Delta\phi \approx 0$ est grande. (b),(c) sont donc plus indiqués pour le guidage et le piégeage des ions, alors que (a) permettra un filtrage et une analyse précise des molécules ionisées.

Pour un potentiel quadrupôlaire de rayon r_0, les équations de mouvements s'écrivent :

$$\begin{cases} \ddot{x} + [U + V\cos(\omega t)]\,(e/mr_0^2)x &= 0 \\ \ddot{y} - [U + V\cos(\omega t)]\,(e/mr_0^2)y &= 0 \end{cases} \tag{4.11}$$

Les solutions de ces équations différentielles couplées, non triviales, permettent d'obtenir une description complète de la trajectoire de n'importe quel ion à partir de leurs conditions initiales.

En définissant deux paramètres a et q tels que :

$$a = \frac{4eU}{\omega^2 r_0^2 m} \quad \text{et} \quad q = \frac{2eV}{\omega^2 r_0^2 m} \tag{4.12}$$

Et par un changement de variable $\xi = \dfrac{t}{2}$, il est possible d'aboutir à la forme canonique des équations

de Mathieu :

$$\frac{d^2x}{d\xi^2} + [a + 2q\cos(2\xi)]x = 0$$
$$\frac{d^2y}{d\xi^2} - [a + 2q\cos(2\xi)]y = 0 \tag{4.13}$$

Il n'est cependant pas nécessaire de posséder une connaissance analytique complète des équations de Mathieu pour appréhender le fonctionnement des pièges ou filtres. Notamment, il a pu être montré que la stabilité des solutions dépend uniquement de a et q. Il est possible de représenter sur un graphique les variations de a en fonction de q pour les différents axes du système et ainsi obtenir ce qu'on appelle un diagramme de stabilité (Fig.4.5). Cela autorise avant tout la réduction d'un problème à 6 dimensions (impliquant e, ω, r_0, m, U et V) à un problème à 2 dimensions [131], où la région d'intérêt représentera le croisement entre les solutions stables pour les deux axes au sein de l'espace a-q (en jaune, sur la figure 4.5)

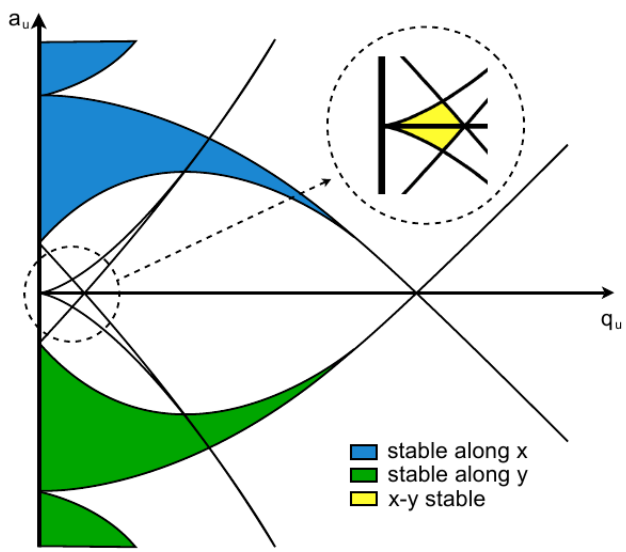


Figure 4.5 – Diagramme de stabilité dans le système de coordonnées (a_z, q_z) : En jaune, on distingue les solutions stables dans le plan transversal des électrodes. Issu du travail de thèse d'Aldo Mirabal, *Charge-Reversal Spectroscopy of Cluster Reactivity for modeling Surface Catalysis*, FU Berlin, 2009, p.24.

Même si en théorie il est possible d'appliquer indépendamment n'importe quelle valeur de paramètre a et q, en pratique, le fonctionnement d'un filtre passe bande opère de telle sorte que ces valeurs sont toujours reliées entre elles par un ratio fixe, vis à vis de l'amplitude des tensions U et V :

$$\frac{a}{q} = \frac{2U}{V} \tag{4.14}$$

Ce qui signifie restreindre le mode opératoire du filtre de masse de manière à conserver qu'un ensemble

(a ;q) de paramètres, s'étendant le long d'une droite affine passant par l'origine appelée la ligne de masse. Si pendant un moment nous supposons que les paramètres e, ω, r_0, U et V sont fixes, alors la ligne de masse devient une droite qui contient les masses des particules, telles que les ions les plus légers se situent au sein de sa partie supérieure droite, puisque m est inversement proportionnel à a et q. La figure 4.6 présente une région du diagramme de stabilité 4.5 où les ions pour une masse donnée sont stables dans le plan (x,y) (Il s'agit de la moitié supérieure de l'aire jaune, dans la figure 4.5.). La pointe supérieure de cette aire pouvant être utilisée pour créer un filtre de masse précis. Juste en ajustant le ratio U/V, il est possible de contrôler la pente de la ligne de masse de telle sorte que seulement une seule masse ne puisse passer au travers de la structure de l'électrode. Par conséquent, en gardant le ratio U/V constant et augmentant simultanément les amplitudes de U et V, il est possible de faire translater l'aire de stabilité vers la droite et le haut de la ligne de masse, ce qui permet de scanner différentes masses et de toujours rester dans des conditions optimales de filtration (Fig.4.7).

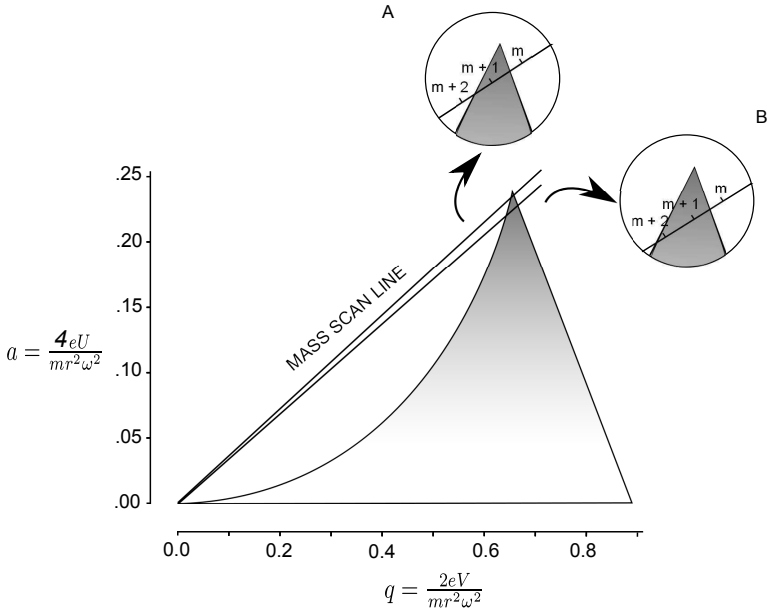


Figure 4.6 – Diagramme de stabilité dans le système de coordonnées (a_z, q_z) : La région en dégradé représente les couples (a_z, q_z) correspondant aux solutions stables du système d'équations différentielles de Mathieu. En A : ligne de scan pour un filtre de masse passe-bande, le coefficient directeur 2U/V est positionné pour que seule la masse sur charge = m+1 soit prise en compte. En B : la bande passante du filtre est plus large, les ions filtrés sont m+1 et m+2. Adapté de [132].

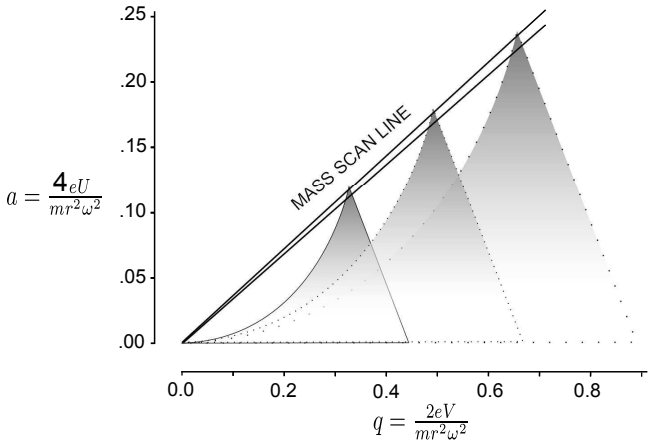


Figure 4.7 – Diagramme de stabilité dans le système de coordonnées (a_z, q_z) : Le ratio 2U/V fixe le degré de filtration du quadrupôle, en faisant évoluer de concert U et V, il est possible de scanner l'ensemble des masses situées sur la ligne de masse. Adapté de [132].

Application au montage expérimental : Une représentation schématisée du spectromètre de masse en tandem est illustrée au sein de la partie inférieure droite de figure 4.8. Ce dernier se compose de chambres (I, II, III, IV), disposées en «U» de telles sortes que seule la chambre III soit complètement exposée à un éventuel rayonnement laser. Toutes sont soumises à un vide poussé, allant de 10^{-7} à 10^{-9} mbar.

Les ions générés au sein de la source sont sélectionnés à l'entrée de I par un skimmer conique de telle sorte que les composantes transverses de leur vitesse soient faibles. Au sein de la première chambre, ils traversent le décapole Q_0, dont le but est à la fois de guider mais aussi de créer un faisceau moléculaire plus compact spatialement et plus homogène cinétiquement, au travers de collisions avec un gaz neutre (hélium ou argon) injecté au sein de Q_0 à faible atmosphère (10^{-3} mbar).

Le faisceau moléculaire est ensuite redirigé à 90° par un déflecteur quadrupolaire (D_0), dont le mode de fonctionnement est identique à celui exposé au sein du paragraphe précédent, mais avec l'application d'un unique potentiel électrostatique. L'orientation à 90° des électrodes et le fait que les ions se déplacent cette fois selon le plan (x,y) du quadrupole expliquent le changement de trajectoire à destination du premier filtre de masse quadrupolaire (Q_1). Q_1 peut être configuré de telle sorte qu'il analyse l'ensemble des différentes espèces contenues dans le faisceau, ou tout simplement filtrer la molécule de rapport m/z désiré.

Si cette solution est retenue, l'ion parental est ensuite dirigé, toujours au travers d'un déflecteur D_1 vers le piège à ion (Q_2). Ce dernier consiste en 16 électrodes disposées circulairement, entourées de part et d'autre par deux lentilles électrostatiques. Le fonctionnement du piège est présenté au sein de la figure 4.9. Le piège est rempli d'Helium ultra-pur (6.0) à une pression de 0.2 mbar. Le potentiel de la première lentille électrostatique est ajusté de manière à ce que l'énergie cinétique des ions incidents soit juste suffisante pour que ces derniers la franchisse.

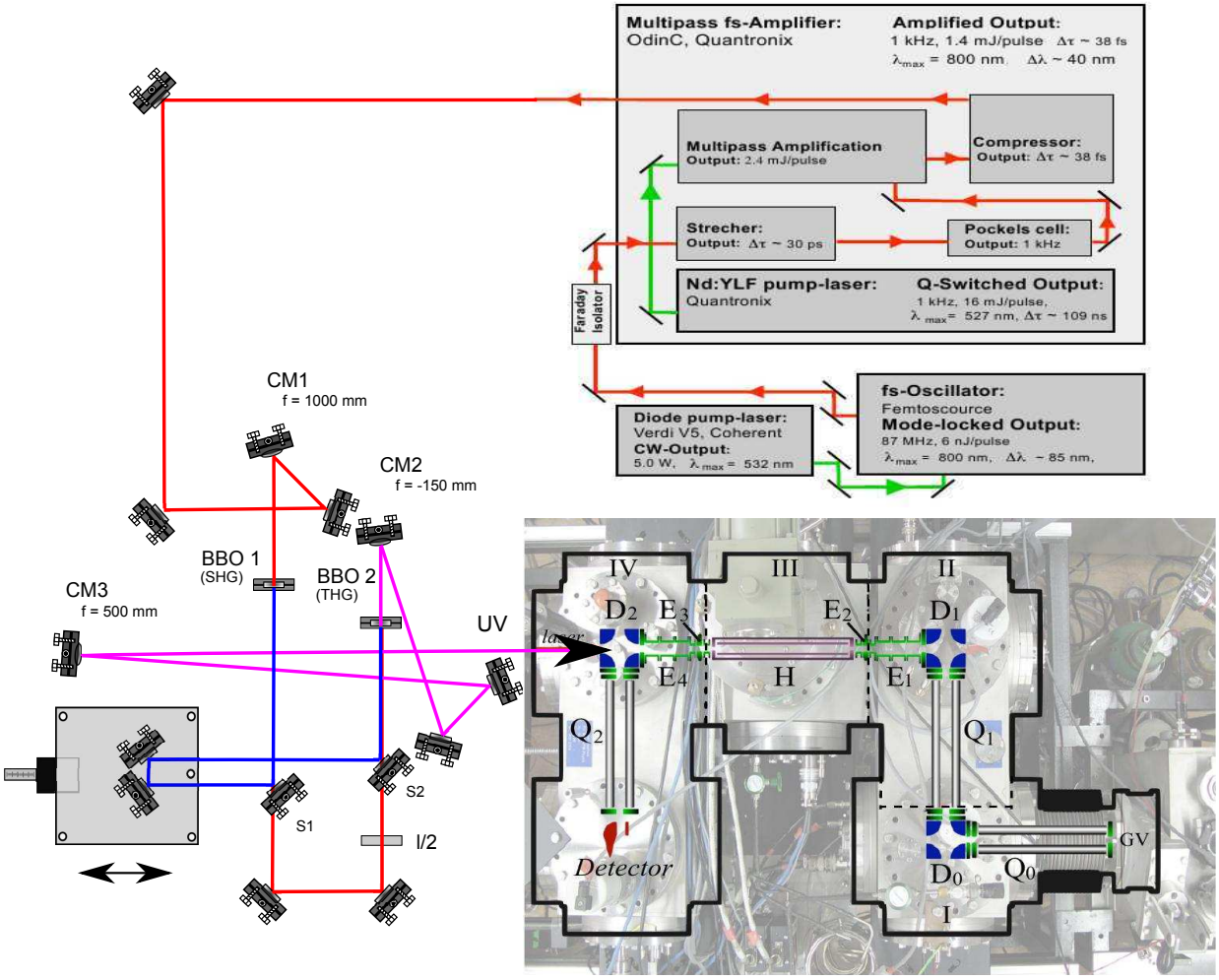


Figure 4.8 – Présentation du montage expérimental dans sa globalité.

Lorsque les molécules chargées pénètrent au sein de l'hexadecapole, elles entrent en collision avec les molécules d'hélium. Les successions de chocs inélastiques font perdre à la fois de l'énergie cinétique aux molécules et de l'énergie interne, lorsque ces dernières fragmentent. Le potentiel de la lentille en sortie est toujours positionné plus haut que celui d'entrée. En perdant de l'énergie, les ions ne sont plus capables de sortir au travers de la barrière initiale de potentiel.

En raison de la taille du peptide étudié, le temps de remplissage du piège s'avère relativement long, de l'ordre de 0.5 à 3 ms, afin d'effectuer une thermalisation du système. Le potentiel de la lentille électrostatique de sortie est ensuite amené à une valeur faible de manière à ce que les nouvelles espèces présentes dans le piège puissent être analysées. Dans la chambre IV, Les fragments ainsi que le pic mère sont déviées par D_2 vers un nouvel analyseur quadrupolaire Q_2. En fonction du ratio U/V choisi, les espèces filtrées peuvent ensuite être détectées par le tube électromultiplicateur.

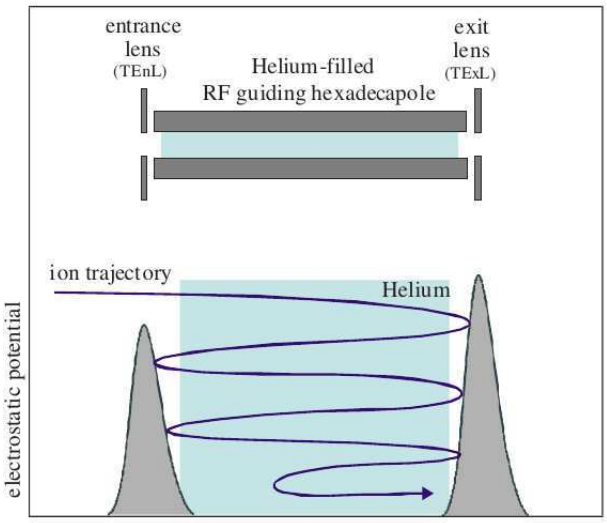


Figure 4.9 – Fonctionnement d'un piège ionique multipolaire : La partie supérieure représente le piège entouré de ses deux lentilles électrostatiques (entrée et sortie). La partie inférieure décrit la perte d'énergie cinétique des espèces chargées par collision avec l?atmosphère d'Hélium. Il en résulte une perte d'énergie cinétique résultant en un confinement des molécules après thermalisation. Issu du travail de thèse de Eva Cristina Kaposta, *Gas Phase Infrared Photodissociation Spectroscopy Mass Selected Cluster Ions*, FU Berlin, 2005, p.22.

4.1.2 Caractéristiques du système laser

4.1.2.1 Le Système amplificateur

Les impulsions laser, nécessaires à l'activation photo-induite des molécules piégées, sont générées en tout premier lieu par un oscillateur couplé à un milieu amplificateur (représenté en parallèle du spectromètre de masse sur la figure 4.8). L'oscillateur se compose d'un cristal Ti :Saphir, pompé optiquement à 532 nm par une diode Laser (*Verdi*, Coherent), à une puissance de 5W. Les 85 nm de largeur de bande d'émission du cristal permettent, lorsqu'une relation de phase entre les différents modes est induite, de

générer des impulsions d'environ 12 fs, centrées à 800 nm, à une fréquence de 87 Mhz et une puissance crête de 6 nJ. Ces dernières ont donc besoin d'être amplifiées, ce qui est permis par un système amplificateur à dérive de fréquence (CPA) par passages multiples (*Odin*, Quantronix). Les impulsions en sortie d'oscillateur sont étirées par un réseau jusqu'à une largeur de 50 ps, puis amplifiées en passant 8 fois au travers d'un deuxième cristal Ti :saphir pompé à 527 nm par un Laser pulsé de type Nd :YLF (Quantronix) à 1kHz. Après recompression par un réseau disposé symétriquement par rapport au premier, le système peut donc délivrer des impulsions de 35 fs, d'une énergie de 1.2 mJ, centrées à 800 nm et avec un taux de répétition de 1 kHz. Ce faisceau sera ensuite triplé (par génération de troisième harmonique) afin d'obtenir une pompe à 266 nm, de puissance égale à 160 mW.

4.2 Fragmentation des peptides

De manière générale, on peut distinguer deux types de dissociations possibles des peptides : une fragmentation par excitation vibrationnelle à l'état fondamental ou par promotion vers un état électronique excité.

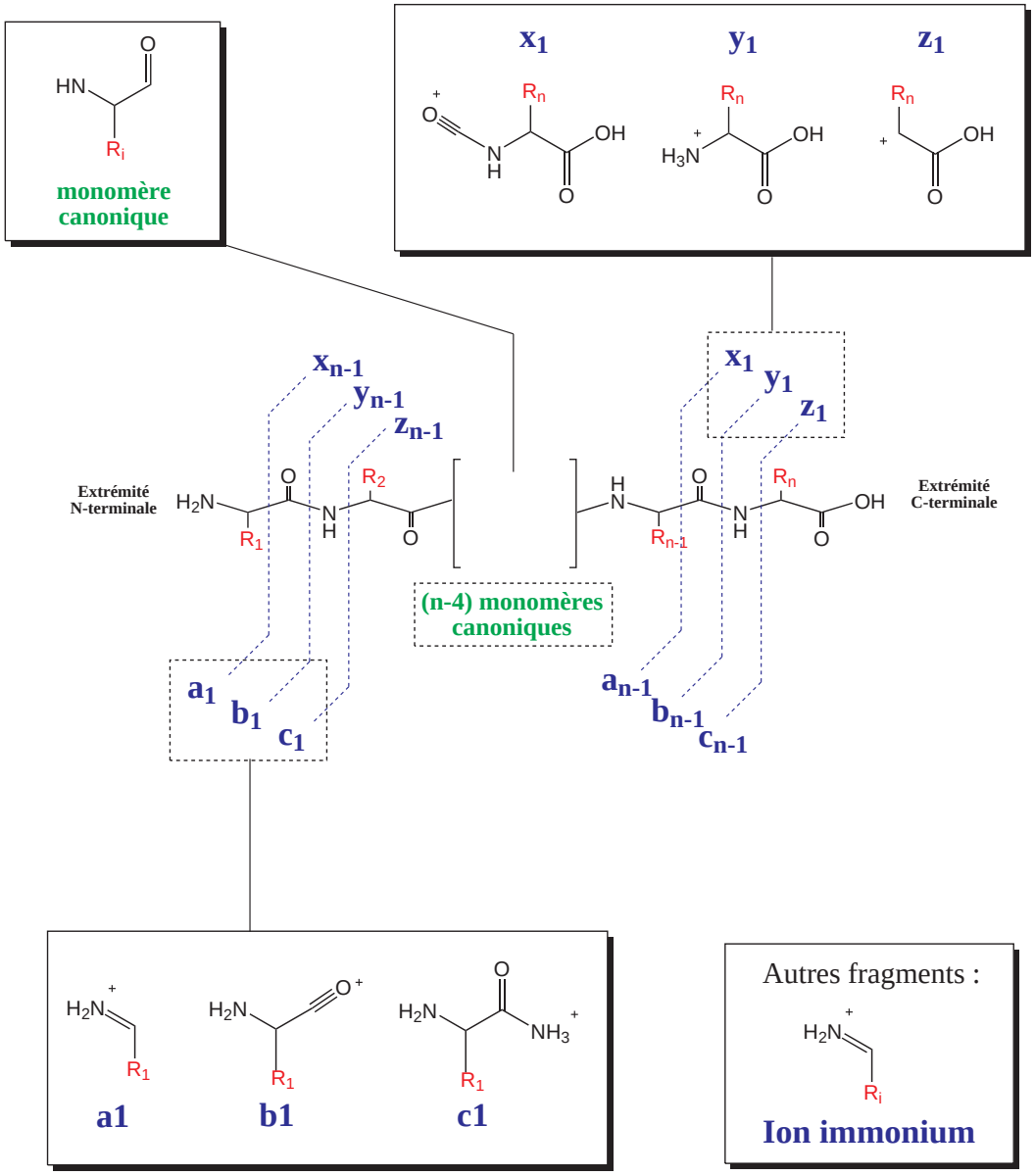
Les dissociations induites par excitation multi-photonique dans l'infra-rouge (*infrared multiphoton dissociation* ou IRMPD) ou par collision à basse énergie (*collision induced dissociation* ou CID. sont typiquement des méthodes d'activation de type vibrationnel [133]. Dans le cas du CID, les ions créés par l'électrospray atteignent le piège ionique avec une certaine énergie cinétique E_c. Sous l'effet de chocs inélastiques avec un gaz neutre, une fraction de E_c est convertie en énergie interne telle que $E_U = E_{U_{init}} + E_U^*$ grâce à un transfert d'énergie au centre de masse E_{cm} :

$$E_{cm} = E_c[M_c/(M_c + M_i)] \tag{4.15}$$

Avec M_c la masse de la cible et M_i, celle de l'ion incident. Remarquons dans un premier temps que plus l'ion possède une masse élevée, moins efficace est la collision pour une énergie cinétique donnée. De plus, la part d'énergie interne accumulée au cours d'une collision (E_U^*) n'est qu'une faible proportion de E_{cm}. En 1952, deux théories (RRKM [134] et du quasi-équilibre [135]) apparaissent pour expliquer les étapes après absorption de E_U^*. Concrètement, elle se dépose statistiquement sur l'ensemble des degrés de liberté de la molécule et s'effectue plus rapidement que la dissociation à proprement parler. En multipliant les probabilités de collision pendant le piégeage des molécules, on chauffe progressivement l'ion par le fond du puits de potentiel à l'état fondamental. Dès que l'énergie suffisante est apportée, il est possible d'accéder à un potentiel de dissociation électroniquement plus faible que le précédent, et la molécule fragmente selon ses liaisons les plus fragiles. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, ces dernières sont très spécifiques. Elles suivent un schéma précis, caractérisé par un modèle empirique qualifié de «proton mobile» [2]. Ce dernier est le fruit de constatations conjointes issues de différentes équipes, parmi lesquelles celles de Wysocki [136], Harrisson [137], Gaskell [138] et de Boyd [139]. Pour des collisions de faibles énergies, il

part du principe qu'une charge positive, provenant d'un proton issu d'un site basique de la protéine, peut être directement transférée sur les fonctions amides des liaisons peptidiques, engendrant des fragments provenant du clivage de cette dernière et des deux liaisons avoisinantes. Comme le montre la figure 4.10, les fragments se répartissent en deux groupes, ceux du coté N-terminal sont dénommés a,b,c et x,y,z pour ceux du coté C-terminal. Les fragments au sein de chaque groupe se différencient selon qu'ils contiennent 0,1 ou 2 des groupements de la liaison peptidique (groupement acyle CO, et/ou amine secondaire NH). Si l'ion possède une charge, l'un des fragments sera chargé et l'autre neutre. Pour les ions multichargés, il est possible d'observer une répartition de ces derniers si les charges sont situées de part et d'autre de la liaison rompue. Le clivage de deux liaisons au sein du squelette conduit à la formation de fragments internes, parmi lesquels l'ion immonium, qui ne contient qu'un seul radical dans sa structure. D'autres formes de dissociation existent, parmi lesquelles la perte de neutre, sous la forme de groupement H_2O ou NH_3, issus des extrémités terminales oùu des groupes fonctionnels contenant des amines primaires ou des alcools. Les masses de l'ensemble des fragments possibles à partir de la séquence ont été calculées par le logiciel massXpert [140]. La méthode de calcul des masses molaires est expliquée en bas de la figure 4.10.

En revanche, des techniques de dissociation induites par capture d'électron (*electron-capture disociation* ou ECD) ou par laser UV (*laser-induced dissociation* ou LID sont à même de générer une fragmentation « non ergodique», à savoir que la rupture de liaison est plus rapide que la redistribution de l'énergie sur l'ensemble des modes normaux de la molécule. Les nouveaux fragments observés sont alors le plus souvent spécifiques du mode d'excitation sous-jacent à la technique. En ECD, un électron thermique neutralise un proton porté par le peptide. Il en résulte une structure hypervalente se traduisant par un excès d'énergie au sein de la molécule. Un hydrogène radicalaire est alors éjecté du système et transféré sur le groupement carbonyle CO le plus proche. Il en résulte un mécanisme de réarrangement radicalaire entraînant une rupture au niveau d'un carbone C_α et la génération de fragments de type c-z. Une fragmentation induite par LID implique dans un premier temps l'absorption d'un photon UV entrant en résonance avec un chromophore porté le peptide. A cet instant précis, il se créé une compétition entre une relaxation radiative vers l'état fondamental (la re-déposition statistique de l'énergie dans les modes normaux fondamentaux engendrant des fragments similaires à ceux observés en CID) et une dissociation induite par un transfert de charge vers un état dissociatif électroniquement excité. Les canaux observés dépendent de paramètres tels que le chromophore en question, l'énergie déposée (donc du spectre d'excitation du chromophore), ou la proximité du site de transfert de charge.



Méthode de calcul des différents fragments :

$$m(a_i) = \left[\sum_{j=1}^{i} m(\text{monomère } j)\right] - CO + H$$

$$m(b_i) = \left[\sum_{j=1}^{i} m(\text{monomère } j)\right] + H$$

$$m(c_i) = \left[\sum_{j=1}^{i} m(\text{monomère } j)\right] + NH_3 + H$$

$$m(z_i) = \left[\sum_{j=n}^{i} m(\text{monomère } j)\right] - NH + OH$$

$$m(y_i) = \left[\sum_{j=n}^{i} m(\text{monomère } j)\right] + H_2 + OH$$

$$m(x_i) = \left[\sum_{j=n}^{i} m(\text{monomère } j)\right] + CO + OH$$

Figure 4.10 – Présentation des fragments les plus probables du squelette peptidique : Illustration de la position de la rupture pour chaque type de fragments . La méthode de calcul de chaque fragment est indiquée, partant de l'hypothèse d'ions monochargés. Extrait du manuel du logiciel massXpert [140].

4.3 Résultats

4.3.1 Spectre de masse Q_1 : identification et sélection des ions parents à disposition

Afin de pouvoir caractériser qualitativement l'ensemble des espèces présentes en solution et générées au cours de l'ionisation par électrospray, nous avons pulvérisé notre échantillon dans des conditions «non-dénaturantes» [141] en activant uniquement l'analyseur de masse Q_1. L'appareil fonctionne alors comme un spectromètre de masse classique. A partir des explications fournies au sein du paragraphe 4.1.1.1, les modalités de mise en spray signifient ne pas ajouter d'acide, normalement utilisé afin d'amplifier la quantité de charges dans l'échantillon, et donc de faciliter la formation de gouttelettes. En effet, la diminution drastique du pH engendrerait une oxydation des cystéines (empêchant le Zinc de se lier au motif CCHC), ainsi qu'une rupture prématurée de certaines liaisons peptidiques. Ainsi, la préparation d'un échantillon doit remplir deux conditions principales :

- Être compatible avec un procédé ESI, à savoir qu'il est recommandé d'employer des solvants volatiles pour favoriser la génération d'explosions coulombiennes.
- L'intégrité des liaisons non-covalentes doit être préservée.

Nous avons empiriquement trouvé qu'un mélange Eau-Methanol (70%/30%) tamponné à pH 7 par l'ajout de 100 μM de tampon acétate d'ammonium cadrait le mieux nos pré-requis.

Le spectre de masse suivant (Fig.4.11) a été obtenu grâce à la mise en spray d'une solution de 25 μM de [35-50] NCp7 en compagnie de 50 μM de sulfate de zinc. L'échelle dynamique des analyseurs quadrupôlaires utilisés s'étend de 0 à 1000 m/z. De ce fait, au vu de la masse importante de nos peptides, nous n'avons pu étudier que les ions présentant 3 charges +. Au vu de la composition du peptide (Fig.1.7), il semble légitime de s'intéresser aux sites potentiels porteurs de charges. La présence de 3 lysines, d'une histidine, d'un acide aspartique et d'un acide glutamique suggérerait une charge maximale égale à +3, à condition que l'environnement local de l'histidine permette un pH inférieur au pKa de l'imidazole au sein du squelette carboné. L'avantage d'un état à charge 3+ pour [35-50] NCp7 nue est d'être certain de la localisation des dites charges sur le peptide à l'état fondamental. Nous observons cet ion pour le pic situé à 604.4 m/z.

4.3.2 Spectres CID et LID de [(35-50) NCp7], $3H^+$

La fragmentation d'un peptide aussi imposant que [35-50] NCp7],$3H^+$ est riche et variée. Pour plus de clarté, les spectres de collision et de photo-dissociation seront «découpés» en trois zones dépendant du ratio m/z, allant de faible (0 à 300 m/z) jusqu'à élevé (650-990 m/z) en passant par une région charnière. Étant donné la quantité d'informations présentes pour chaque spectre, nous avons été obligé de suivre

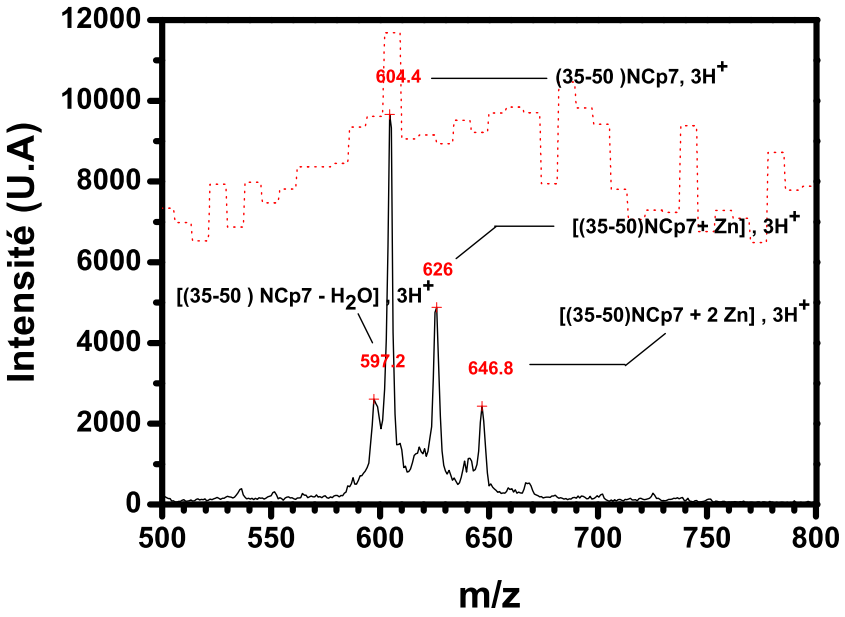


Figure 4.11 – Analyse de la composition de la solution pulvérisée : Spectres de masse Q1 d'une solution de 25 μM de (35-50)NCp7 + 50 μM de Zn, dans 1 mL de solution H_2O/MeOH (70%/30%) contenant 100 μM de tampon acetate d'ammonium, pH7. Les pointillés rouges correspondent au suivi de l'intensité du pic mère pendant le déroulement du scan.

une stratégie de lecture particulière. Cette dernière n'est pas exhaustive, laisse de nombreuses étapes non-résolues, mais permet de dégager quelques points essentiels. Étant donné que la fragmentation du peptide nu sous CID est assez triviale, nous avons dans un premier temps tenté d'effectuer une attribution la plus exhaustive de ces derniers. A l'exception de la figure 4.14, chaque spectre de fragmentation par collision est représenté par un tracé noir, auquel nous avons superposé sous la forme de barres rouges les différents pics assignés.

Pour les 3 zones du spectre de masse, cette désignation sert de socle pour une comparaison directe avec les spectres de photo-dissociation. Expérimentalement parlant, ils résultent d'une acquisition dans des conditions strictement identiques à la CID, à l'exception de l'introduction du faisceau UV dans le piège. Nous avons par conséquent choisi d'afficher chaque graphique traitant de la LID juste en dessous des spectres CID. Cependant, ils sont représentés de la manière suivante :

- En bleu, la différence entre les spectres LID et CID, normalisés par rapport à l'intensité du pic mère, permet de tracer la force de l'effet par rapport à l'ensemble des autres canaux de dissociation.
- En rouge, sous la forme d'un histogramme, sont superposés les pourcentages d'évolution du pic LID par rapport au pic CID où :

$$\frac{I_{\text{pic LID normalisé}} - I_{\text{pic CID normalisé}}}{I_{\text{pic CID normalisé}}} \tag{4.16}$$

Masses Mono-isotopiques : [(35-50)NCp7] : 1809,74 amu Zn : 65.38 amu Ag : 107.87 amu	Masses Monoisotopiques Charge 3+	Données expérimentales
[(35-50)NCp7], $3H^+$	604,25 m/z	604,4 m/z
[(35-50)NCp7 + Zn], $3H^+$	626,04 m/z	626 m/z
[(35-50)NCp7 + 2 Zn], $3H^+$	647,83 m/z	646,8 m/z

Table 4.1 – Spectre de masse 4.11 : Comparaison entre les masses théoriques et les fragments assignés

4.3.2.1 Région de faible rapport m/z : de 100 à 300 m/z (Fig.4.12(a) et 4.12(b))

Fragments observés : Cette fenêtre de détection présente un intérêt tout particulier car c'est à cet endroit qu'apparaissent les pics liés à la perte du radical des acides aminés, ou tout simplement les fragments issus des extrémités du peptide. La figure 4.12(a) correspond au spectre CID alors que 4.12(b) est la version LID de la même région, décrite selon les commentaires du paragraphe précédent.

Les pics CID de 4.12(a) peuvent être répartis en trois catégories :

1. Une fragmentation issue des clivages au niveau des liaisons peptidiques, pour des positions situées aux extrémités du squelette :

Fragments	Ratio m/z observé
y_1^+ (T)	120
b_2^+ (GC)	161
y_2^+ (CT)	224

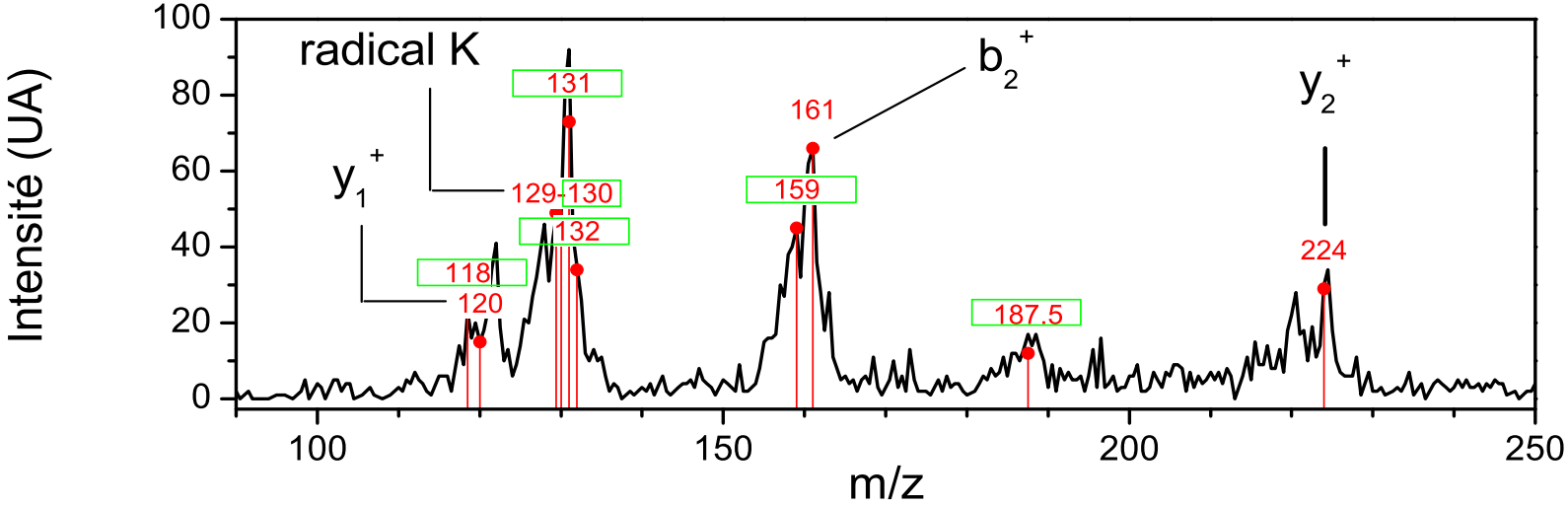
Table 4.2 – Fragments b, y observés, issus du clivage des extrémités du peptide

On remarquera que le fragment b_1^+ (G), situé à 58 m/z, n'a pas été mesuré. Sans doute par un défaut de sensibilité de l'analyseur pour des valeurs m/z proches des extrema de scan.

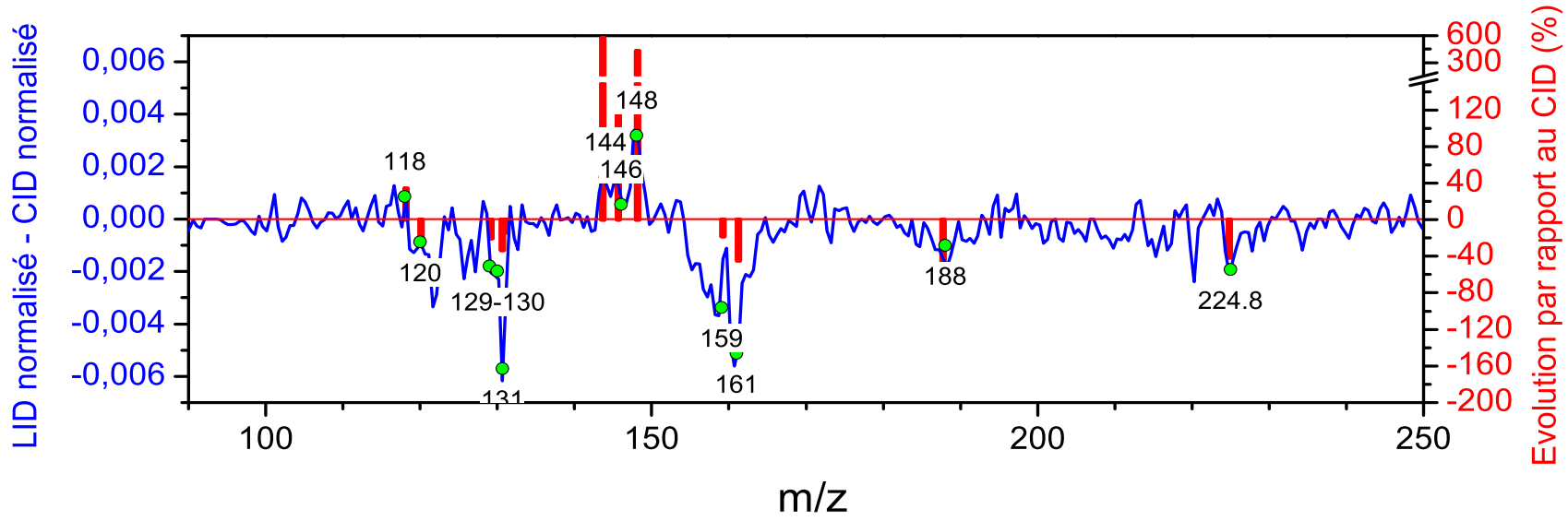
2. Une série de fragments révélant la signature de canaux spécifiques de dissociation du Tryptophane : sur la figure 4.12(a), les ratios m/z correspondant sont spécialement encadrés en vert :

Fragments	Ratio m/z observé
W : Ion Immonium	159.5 (a)
W : Fragmentation avec une perte de NH_3	187.5 (b)
W : fragmentation avec une perte de $NH_2CHCOOH$	130,131,132 (c)

Table 4.3 – Fragments spécifiques dérivant du Tryptophane

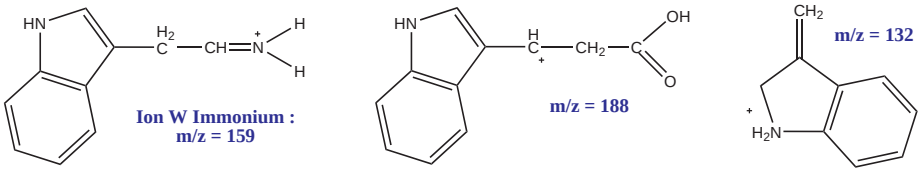


(a)



(b)

Figure 4.12 – Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7)$^{3+}$: zoom sur la région de faible m/z (a)- Spectre CID de ((35-50)NCp7)$^{3+}$, zone de fragmentation des extrémités du squelette peptidique et des chaînes latérales de W et K, en partie expliqués par le mécanisme 4.15. (b), spectre différentiel LID-CID (en bleu), les barres rouges représentent le pourcentage d'induction de la lumière par rapport au CID. Création d'un nouvel état dissociatif par la lumière (144-148 m/z) entrant en compétition avec les canaux du mécanisme 4.15.



(a) (b) (c)

3. Un fragment à 129 m/z, issu de la chaîne latérale de Lysine. Ce fragment a été particulièrement étudié par Yalcin et al. [142] en 1996, auprès de dérivés acétylés de Lysine et dans des structures de type H-Lys-Gly-OH.

Parmi les variations intéressantes que l'on constate suite à l'excitation à 266 nm (Fig.4.12(b)), on distingue essentiellement :

1. Une diminution conjointe d'intensité des fragments issus des tables 4.2 et 4.3, avec des valeurs comprises entre -20 et -45 %.

2. La création d'une région complètement induite par la lumière, entre 144 et 148 m/z.

Discussion sur les canaux attribués au Tryptophane et à la Lysine, en CID :

L'attribution des pics de la table 4.3 a été facilitée par diverses études impliquant le tryptophane protoné (TrpH+, m/z = 205) comme ion parent. Ce dernier fut excité par CID en 2004 par El aribi [3], dans des expériences de MS^n avec échange hydrogène/deutérium. Les mécanismes de fragmentation ainsi répertoriés furent communément admis comme étant issus d'un chauffage vibrationnel de l'état fondamental de $TrpH^+$. Le tableau suivant en résume les principales étapes :

Voie(s) de fragmentation :	Pertes :
205 → 188	$-NH_3$
205 → 188 → 146	$-NH_3$ & $-CH_2O$
205 → 188 → 144	$-NH_3$ & $-CO_2$
205 → 159	$-(H_2O + CO)$
205 → 159 → 132	$-(H_2O + CO)$ & -HCN

Table 4.4 – Principales voies de fragmentation de $TrpH^+$ par CID, d'après [3]

On constate donc à première vue que :

– Les produits finaux de dissociation de $TrpH^+$ sont remarquablement en accord avec ce que l'on pense être de la signature de fragmentation du résidu tryptophane, au sein de notre peptide.

– Deux voies de dissociation différentes sont possibles à partir du $TrpH^+$ en fonction que le premier pas réactionnel soit lié à la perte du groupement amine ou à la perte de $CO+H_2O$. Il semblerait

toutefois que la voie conduisant d'abord au fragment [Trp + H -NH_3]$^+$ (188 m/z) soit la plus favorable [143].

De manière intéressante, cette dernière tendance n'est pas suivie au sein de [35-50] NCp7^{3H+}. Tout en étant conscient de l'extrême différence entre les micro-environnements impliquant le TrpH$^+$ et celui du Trp dans le squelette peptidique de notre molécule, la présence en majorité des ions 159 et 132 m/z implique plutôt une fragmentation orientée initialement vers la perte de CO.

L'un des éléments susceptible d'induire une telle différence pourrait être la présence, parmi les acides aminés entourant le tryptophane, d'une Lysine en position C-terminale (Pour rappel, les 6 premiers acides aminés de [35-50] NCp7 sont disposés selon la séquence suivante : GC**WK**CG...).

Les peptides contenant uniquement une Lysine comme acide aminé basique sont majoritairement protonés sur son groupe amine ϵ (Fig.4.13.A) [144]. Lorsque la Lysine est interne au peptide, ils fragmentent abondamment au niveau de la liaison amide C-terminale (Lys-Xxx), comme il l'a été démontré par Kish et Wesdemiotis [145] dans des modèles de type [GGKAA + cat]$^+$, où cat correspond à un cation monovalent (H^+, K^+, Ag^+, Li^+, Na^+). Le mécanisme généralement invoqué est un transfert de proton depuis la chaîne latérale vers le groupement amide Lys-Xxx , entraînant une cyclisation du groupe ϵ-amino (Fig.4.13.B) et la formation d'un complexe lié par le proton (Fig.4.13.C) [146]. En fonction de l'affinité protonique des deux entités formant le complexe, ce dernier peut évoluer pour former soit un ion de type coprolactame, isomère d'un fragment de type b_i (Fig.4.13.D), soit un ion de type y_{n-i} (Fig.4.13.E), accompagnés de leur neutre respectif.

Le dérivé b_i coprolactame peut évoluer en un complexe similaire au précédent, au sein duquel la perte d'un groupement CO est favorisée (Fig.4.13.F). Il s'agit d'un mécanisme de type $b_i \rightarrow a_{i-1}$ [2], conduisant soit à l'ion a_{i-1} (Fig.4.13.G), soit au fragment α-amino-ϵ-coprolactame à 129 m/z (Fig.4.13.H). Notons que par le biais de la spectrométrie de masse à plusieurs étapes (MS^n) Kish et Wesdemiotis [145] confirment que le passage b_3 vers a_2 pour GGKAA s'effectue bien par libération du fragment 129 m/z.

En complément, signalons que l'étude de dissociations produites par conversion internes sur les dipeptides [WK + H]$^+$ et [KW+H]$^+$ par le groupe de Jouvet a révélé l'absence de perte initiale de NH, ainsi qu'une majorité de fragments dérivés de la Lysine. Ceci est du à la plus forte affinité protonique de la Lysine (995 kJ.mol^{-1}) par rapport au Tryptophane (923 kJ.mol^{-1}). Les mécanismes de dissociation sont toujours similaires à la figure 4.13, mais avec n=2.

- Pour [KW+H]$^+$, R_1 représente la chaîne latérale de la Lysine et R_2 le noyau indole du Tryptophane. Le mécanisme 4.13 s'arrête en D, avec uniquement production de l'ion 129 m/z en une seule étape [142].

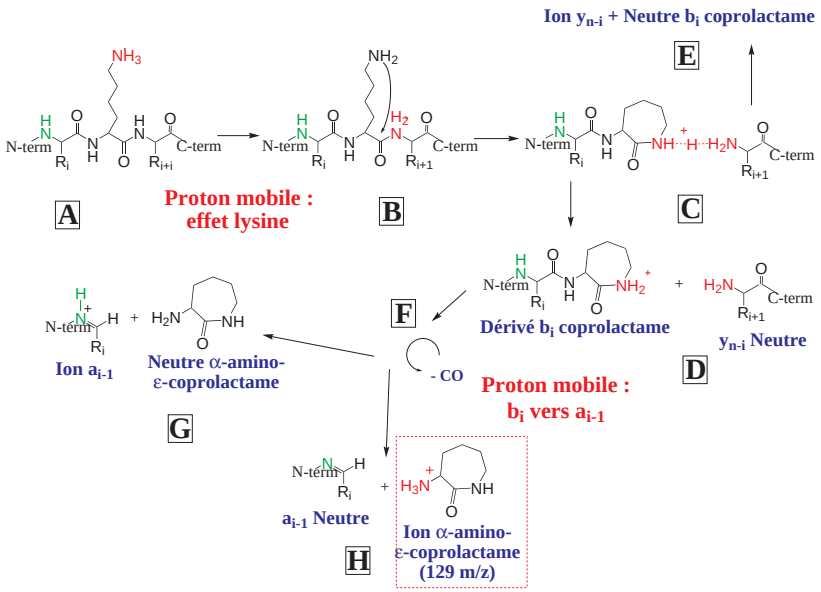


Figure 4.13 – Mécanisme séquentiel de production de l'ion 129 m/z, d'après les étapes esquissées dans [2].

– Pour $[WK + H]^+$, les radicaux sont inversés, et on observe la présence de l'ion 159 m/z en plus du 129 m/z. Ici, le mécanisme est séquentiel et identique à 4.13 (avec $y_{n-i} = H_2O$).

Étant donné que [35-50] $NCp7^{3+}$ contient 3 lysines, il y a de fortes chances que ces résidus soient protonés à l'état fondamental. Ces 3 acides aminés auront donc tendance à séquestrer les 3 protons mobiles, et les liaisons les plus fragiles doivent être du type Lys- Xxx. Autrement dit, pour une énergie d'activation inférieure, les fragments reliés aux Lysines doivent apparaître en premier. Au sein de la figure 4.14, deux expériences de CID ont été réalisées sur [35-50] $NCp7^{3+}$, telles que la pression d'helium au sein de Q0 est passée de $1,12 \cdot 10^{-4}$ à $1,47 \cdot 10^{-4}$ mbar. L'énergie cinétique des ions arrivant dans l'hexadecapole s'en trouve diminuée.

Dans les deux cas, les ions à 129 m/z sont présents. Alors qu'ils sont majoritaires à faible énergie cinétique (Fig.4.14, spectres bleus, graphique du bas), des fragments supplémentaires apparaissent lorsque l'énergie augmente. La présence de Lysine protonées à l'état fondamental est donc bien mise en évidence. S'il est difficile de savoir si l'ensemble des Lysines sont chargées, la présence du fragment 159 m/z permet de lever le doute en ce qui concerne Lys39. Appliqué à notre peptide, et afin d'expliquer en partie les fragments observés dans la zone de faible masse sur charge, nous suggérons un mécanisme où le point de départ serait la protonation des 3 lysines à l'état fondamental pour le pic mère [35-50] $NCp7^{3+}$ (Fig.4.15), ce qui a pour avantage de considérer le squelette peptidique autour du Trp avec le même nombre de charges qu'au sein de $[W\text{-}K]^+$. En fonction de l'affinité protonique des différentes espèces mises en jeu, ce mécanisme pourra aboutir à la formation d'ions y_{12}^{2+} ainsi que des ions α-amino-ϵ-coprolactam (129 m/z) et de l'ion immonium tryptophane (159 m/z) à partir d'un dérivé b_4^+ coprolactame et de deux pertes de

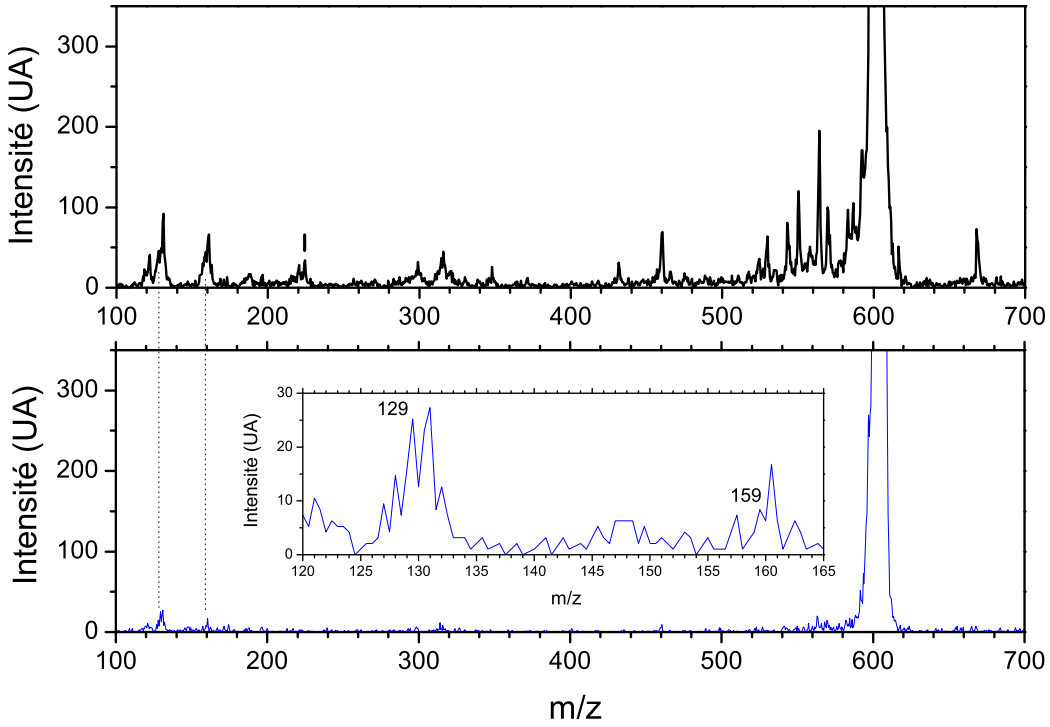


Figure 4.14 – Spectres CID de (35-50)NCp7 à différentes énergies cinétiques : En haut, spectre CID à énergie cinétique élevée, correspondant à une pression dans Q0 de mbar. En bas, à énergie cinétique plus faible, pour une pression de mbar. En comparaison, ce dernier se dissocie relativement mal, mais on peut remarquer l'existence des fragments à 129 m/z et 159 m/z dans les deux cas (zoom sur la partie de faible m/z).

CO. Ce modèle à l'avantage de conforter celui du proton mobile dans l'explication des cinétiques mises en jeu : les effets lysine, passage de b_n vers a_{n-1} et a_{n-1} vers a_{n-2} ayant déjà été maintes fois commentés [2]. Remarquons que ce mécanisme est valable pour un état de charge initial donné.

Discussion sur les fragments nouvellement générés par photodissociation :

L'effet le plus marquant de la LID dans cette région est la génération de nouveaux canaux de dissociation autour de 144-148 m/z. Afin de mieux appréhender ce résultat, il semble judicieux de s'intéresser à ce qui a déjà été fait en matière de photo-fragmentation autour de l'indole protoné, que ce soit $TrpH^+$ ou inclus dans un environnement peptidique.

Suite aux résultats issus de CID, $TrpH^+$ fut rapidement examiné par LID (Talbot et Al. [147]), lors d'une expérience de photodissociation du $TrpH^+$ à 266 nm avec un montage de type «pseudo-MS^3». Ces derniers ont soulignés la très forte analogie entre les pics observés par CID et LID. Un fragment à 204 m/z correspondant à $Trp^{\bullet+}$ (issu de la perte d'un radical $H^\bullet$) a été mis en évidence. Une fois piégé, $Trp^{\bullet+}$ peut secondairement se fragmenter pour générer un ion de masse 130 m/z , attribué à une rupture de

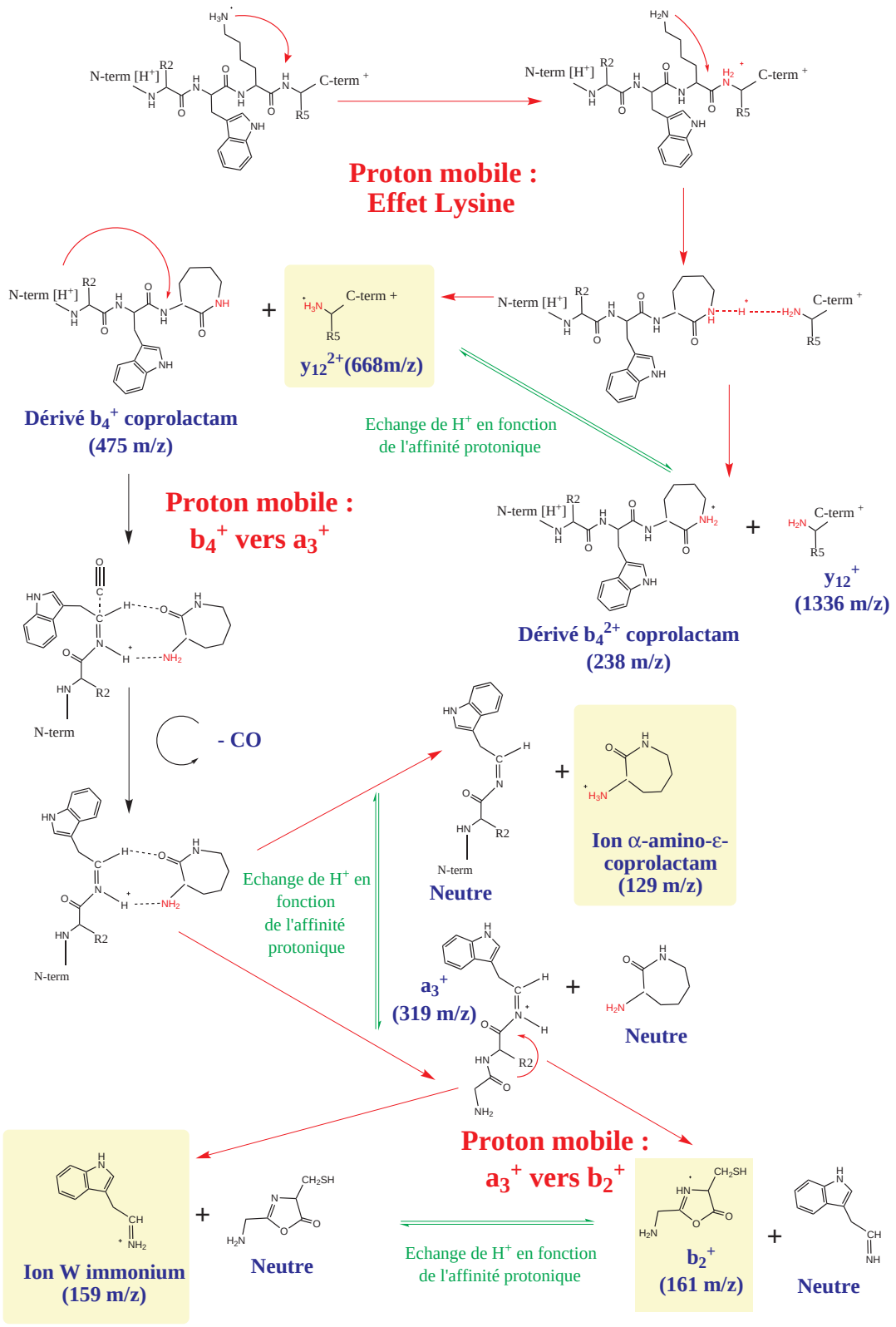


Figure 4.15 – Un des nombreux mécanismes possible permettant l'obtention des fragments 129, 159, 668 m/z : schémas réactionnels basés à partir de [2]

la liaison C_α-C_β. [148]. Même si 130 m/z peut être obtenu en tant que fragment secondaire à partir du 159 m/z par collision, il a été rapidement qualifié de seul canal de dissociation spécifique en LID par rapport au CID. En 2010, Joshua & al.[149] prouveront que ce canal peut aussi être activé par LID à haute énergie (keV régime).

Kang et Al., à partir de travaux sur la tryptamine protonée [150], ont suggéré que $H^\bullet$ serait issu de l'amine primaire NH_3^+, et proviendrait d'un transfert de charge entre l'état excité $\pi - \pi^*$ de l'indole vers un état Rydberg $\pi - \sigma^*$, le long d'une coordonnée NH. Un réarrangement de $Trp^{\bullet +}$ aboutirait à la libération du fragment 130 m/z. La photo-dissociation pompe-sonde (*pump probe photo-induced dissociation* ou PID, pompe à 266 nm, sonde à 800 nm) du pic 130 m/z suggère que ce couplage est rapide (le passage de $TrpH^+$ à $Trp^{\bullet +}$ se ferait en moins de 400 fs) [151].

Les sites de transfert de l'électron après photo-excitation ont fait l'objet de calculs ab-initio [152]. Au nombre de 3, ils semblent être énergétiquement proches les un des autres. Outre la confirmation du site $\pi - \sigma^*$, l'électron peut aussi être transféré sur le site $\pi - \pi^*$ du groupement CO, ou bien rester confiner au sein de l'indole (excitation $\pi - \pi^*$). En 2007, Lepère et al. [153], en partant de ces sites, ont pu caractériser de manière «compréhensible» l'ensemble des canaux de dissociation. Ils ont pour cela utilisé un système de détection original permettant de d'observer conjointement des fragments neutres et chargés. Le modèle de dissociation qu'ils en ont déduit est présenté au sein du tableau 4.5.
Ultérieurement, certaines remarques ont complété cette étude. Ainsi, le couplage entre l'état π-π^* photo-induit de l'indole et l'état π-π^* du groupement carbonyle peut engendrer un transfert de proton du NH_3^+ vers CO, également à même d'initier une rupture C_α-C_β, et donc la production d'un second canal de fragmentation photo-induit du 130 m/z. Contrairement à celui évoqué précédemment, ce processus serait rapide ($<$ 100 ns). De même, la formation du fragment 144-146 m/z fut remise en question par des expériences complétées avec des calculs sur la Tryptamine complexées avec de l'ether couronne [154]. Ainsi, la perte de NH_3 inhérente à la création de ce fragment pourrait être due à un transfert d'électron sur une orbitale anti-liante π-σ^* située entre le C_α et l'amine primaire, plutôt que par un mécanisme de conversion interne.

En parallèle au modèle simple de l'acide aminé protoné, des études prenant en compte le Tryptophane dans un contexte peptidique ont également été menées. Par exemple, en 2006, Antoine et Al. [155] ont comparé par CID, LID et ECD, la dissociation d'un pentapeptide AGWLK (Ala-Gly-Trp-Leu-Lys). Outre le fait que le Trp soit inclus au centre du squelette peptidique, la présence d'une lysine autorise l'étude du peptide à l'état simple ou double charge. Dans les deux cas, les spectres CID présentent les habituels fragments classiques a, b, y. La LID du peptide simplement protoné a permis la mise en évidence de fragments b_3, b_4 et 130 m/z à 260 nm. Excité à 220 nm, le même peptide présente des fragments issus

Site de transfert de l'électron excité de l'indole (266nm)	Voie(s) de fragmentation	Mécanisme	Vu en :
A :$\pi\pi*$: noyau indole	205 → 131,132	Rupture C_α-C_β par transfert de proton sur le groupe amine du noyau indole	**CID & LID**
B :$\pi\sigma*$: NH_3	205 → 204 → 130	Rupture C_α-C_β par perte du proton H^+ de la fonction amine suite à un transfert de charge avec un radical porté par le cycle	**LID**
	205 → 188 → 146	Perte consécutive de NH_3 et CO_2 au cours d'une relaxation par conversion interne	**CID & LID**
C :$\pi\pi*$: CO_3	205 → 130 205 → 187 → 159	Transfert d'électron sur $\pi*_{CO}$ de l'acide carboxylique, favorisant un transfert de proton de la fonction amine vers l'acide.	**CID & LID**

Table 4.5 – Description des canaux de dissociation du TrpH$^+$, en fonction du site de transfert de l'électron photo-induit par excitation de l'indole à 266 nm

de pertes radicalaires (-1 Da et -130 Da). En revanche, la LID du peptide doublement protoné présente une efficacité de fragmentation près de 50 fois plus petite. La séquence du peptide suggère que la transition vers l'état excité est essentiellement due à un état $\pi - \pi^*$ de l'indole. Une variation de la section efficace d'absorption peut être écartée, étant donné que le Trp, TrpH$^+$, où les peptides contenant un Trp en phase gazeuse comme aqueuse absorbent tous dans la même région d'énergie. A l'aide de simulation de type monte-carlo, les auteurs suggèrent que les différences de fragmentation sont liées à des géométries différentes à l'état fondamental. La proximité de NH_3^+ et de l'indole favoriserait le couplage entre $\pi - \pi^*$ et $\pi - \sigma^*$. Le peptide passerait d'une forme globulaire en charge +1 à une forme plus étirée en charge +2, due à la répulsion électrostatique des deux charges, ce qui éloignerait les deux groupements.

Jouvet et Al. réitérèrent en 2010 l'expérience de détection conjointe des neutres et des particules chargées, mais cette fois sur des di et tri-peptides de type [XW]H$^+$, [WX]H$^+$ et [GWG]H$^+$, avec X = Glycine (G) ou Leucine (L) [156]. Bien que les résultats mettent en avant des voies de dissociation similaires à celles de la table 4.5, le rôle de la proximité de la fonction amine est largement mis en valeur. Ainsi, 144-146 m/z ne sont observés que lorsque le Tryptophane est en position N_{term}. De même, le

fragment 132 m/z, devenu principale voie de dissociation de type C_α-C_β, sera créé en une seule étape conjointement avec une fragmentation de type «a», si W est en position N_{term} Éloigné de l'amine primaire, cette rupture est permise par un processus en deux étapes non totalement expliqué.

Notons que des différences majeures apparaissent entre notre signature du tryptophane photo-induit et celles proposées plus haut. En effet, la figure 4.12(b) nous montre que le seul canal entièrement induit par la lumière correspond à celui du fragment 146-148 m/z. Par rapport aux fragments issus du CID, nous n'observons pas d'induction liée à la lumière. Au contraire, une diminution flagrante des ions 129, 130, 159, 161 et 188 m/z (comprise entre -20 et -40 %) suggère l'existence d'un mécanisme entrant en compétition avec une fragmentation par conversion interne due à un effet lysine. Il semble à peu près clair que la génération d'ions à 144-146 m/z nécessite la perte d'une fonction amine primaire directement en N-terminal du groupement Tryptophane. Ce qui ne peut avoir lieu que par le biais d'une fragmentation préalable de type b_2-y_{14}. Remarquons que selon le modèle 4.15, cela signifierait priver l'extrémité C-Term de b_4^+ d'un éventuel proton mobile pour générer les fragments CID sus-mentionnés.

La question de savoir si l'ensemble du mécanisme se fait de concert ou par processus multi-étape est épineuse. Le véritable problème sous-jacent étant de savoir si l'excitation s'effectue sur le pic mère ou bien sur un produit de fragmention y_{14}. Pour tenter d'y répondre, nous avons effectué un «storage-scan», sur 3 secondes avec un pas de 50 ms (Fig4.16). Cela consiste à effectuer une mesure d'intensité de fragments en fonction du temps de piégeage des molécules mère dans l'hexadecapole. En théorie, les ions provenant de collisions doivent présenter une saturation correspondant au temps de thermalisation des molécules dans le piège. Il en est de même pour les photo-fragments provenant d'excitation d'ions collisionnels. Pendant le temps de mesure imparti, le fragment à 146 m/z adopte une évolution linéaire, signe d'une excitation issue de l'ion parent. Le fragment m/z, pris en tant que témoin, reste à une valeur stable, et ce jusqu'à au moins 10 secondes.

Nous suggérons donc un mécanisme où la fragmentation b_2-y_{14}, l'élimination de NH_3 ainsi qu'un réarrangement radicalaire en une seule étape à partir de l'excitation de l'indole contenu dans le pic mère. Ce processus séquestrerait le proton mobile ce qui l'empêcherait de servir à la génération des fragments «empruntes» issus d'une éventuelle conversion interne.

4.3.2.2 Région de rapport m/z central : de 300 à 630 m/z (Fig.4.17 et 4.18)

Cette partie du spectre est dominée par la présence de pics de fragmentation b, y provenant de l'ensemble du squelette peptidique. Le tableau suivant permet de faire un récapitulatif des fragments assignés au sein de la figure 4.17. On y retrouve également les canaux de dissociation issus de la perte de neutres, ces derniers pouvant correspondre à la fois à une perte de H_2O ou de NH_3.

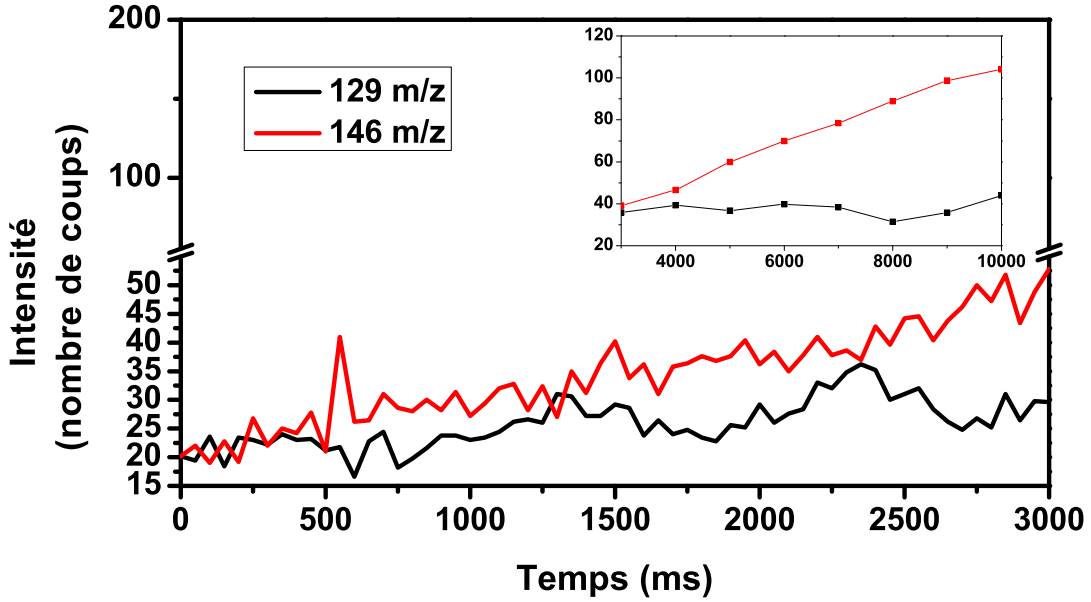


Figure 4.16 – Storage-scan des ions 129 et 146 m/z

Fragments	Ratio m/z observé
[(35-50)NCp7 - 1 neutre],3H$^+$	597.5
[(35-50)NCp7 - 2 neutres],3H$^+$	592
b_{15}-neutral;Z_3	558

Contrairement à la section précédente, nous n'avons pas observés de pics générés par la lumière. En revanche, l'excitation à 266 nm est à l'origine de quelques modulations au sein des ratios de fragmentation, principalement localisés autour du pic mère (Fig4.18).

- Le spectre LID de la figure 4.18 montre une large augmentation du nombre de protons perdus à partir du pic mère (600.5 à 602.5 m/z). Ceci n'est pas sans rappeler la loi formulée par Tabarin et al.[157] : *lorsqu'une quantité significative d'énergie (UV) est introduite de manière localisée dans un ion possédant un grand nombre d'hydrogènes, une partie de ces hydrogène est expulsée*, tout en relativisant sur le fait que ce phénomène est dans notre cas également observé pour les CID, mais en moindre mesure.
- Les pics résultant d'une perte de neutre sont assez bien exaltés, allant d'une induction de 24 à 60%. La perte de neutre est très documentée au sein de la littérature dédiée à la fragmentation de peptide. Les pertes de molécules d'eau (-18 Da en charge +1) peuvent provenir des acides carboxyliques issus de l'extrémité C-term, ou bien des acides Aspartiques et Glutamiques. Une déshydratation des chaines latérales de Sérines ou Thréonines peut également survenir [158]. De même, des pertes de NH_3 (-17 Da) peuvent survenir, majoritairement issues des chaines latérales de Lysine, Glutamine et Arginine. En charge 3+ et avec notre résolution, il est tout simplement impossible de les différencier (cf : Fig.4.18).

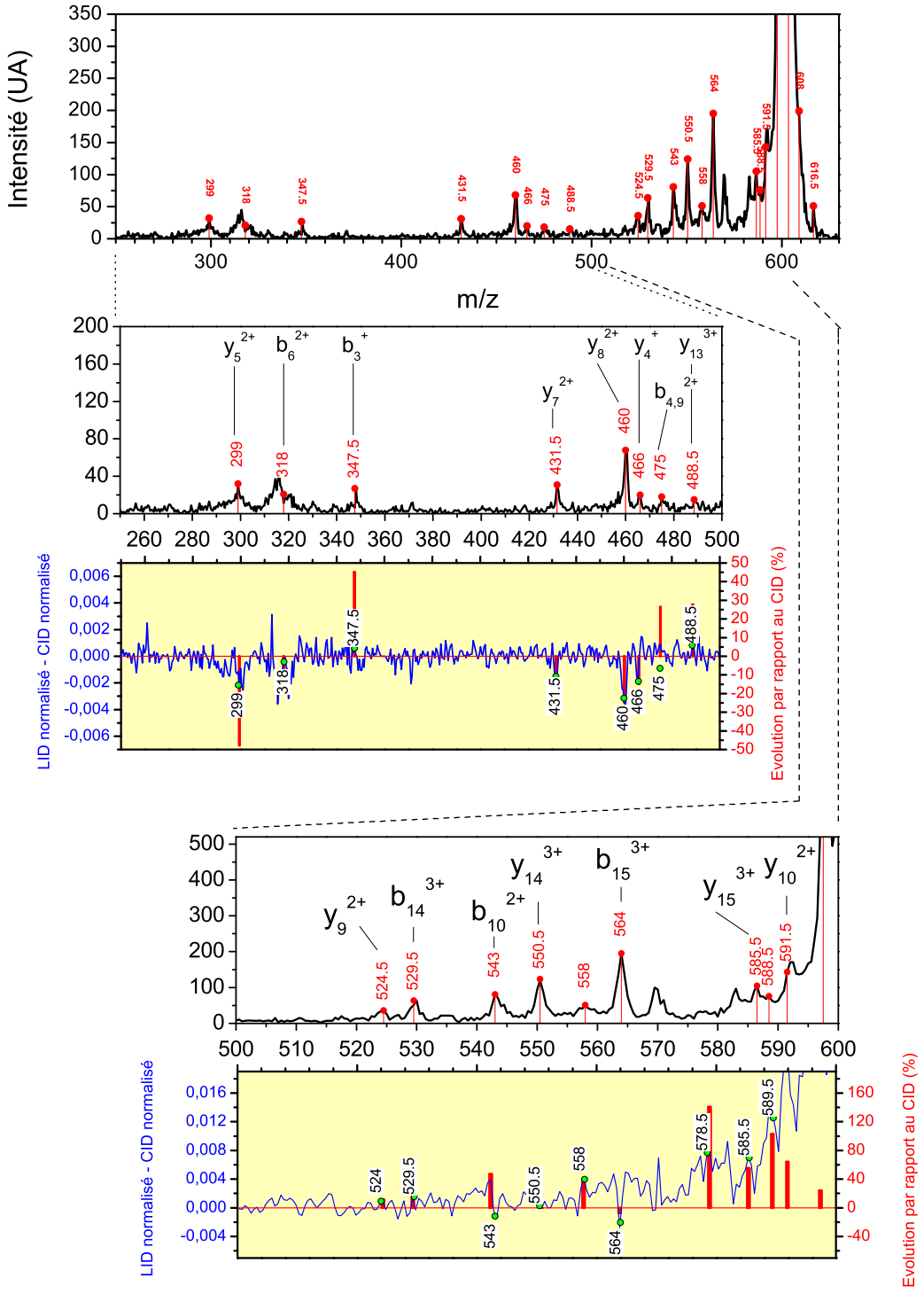


Figure 4.17 – Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7)$^{3+}$: zoom sur la région entre 300 et 600 m/z : Il s'agit de la région susceptible de donner le plus d'information sur la composition du squelette, on y retrouve les principaux fragments «b» et «y» issus d'une CID à basse énergie. Pas de fragments induits par la lumière, forte induction de $b_5{}^{+}$(578.5 m/z) et de y_{10}^{2+}(589 m/z).

Fragments	Ratio m/z observé
b_3^+ (GCW)	348
b_4^+ (GCWK)	475
b_5^+ (GCWKC)	578.5
b_6^{2+} (GCWKCG)	318
b_8^{2+} (GCWKCGKE)	447
b_9^{2+} (GCWKCGKEG)	475
b_{10}^{2+} (GCWKCGKEGH)	543
b_{14}^{3+} (GCWKCGKEGHQMKD)	529.5
b_{15}^{3+} (GCWKCGKEGHQMKDC)	564
y_4^1 (KDCT)	466
y_5^1 (MKDCT)	597.5
y_7^{2+} (HQMKDCT)	431.5
y_8^{2+} (GHQMKDCT)	460
y_9^{2+} (EGHQMKDCT)	524.5
y_{10}^{2+}(KEGHQMKDCT)	589
y_{13}^{3+} (KCGKEGHQMKDCT)	488
y_{14}^{3+} (WKCGKEGHQMKDCT)	550
y_{15}^{3+} (CWKCGKEGHQMKDCT)	586

– Les canaux b_5^+, y_{10}^{2+} ont une intensité multipliée par deux par photo-dissociation.

4.3.2.3 Région de rapport m/z élevé : de 650 à 1000 m/z (Fig.4.19)

Il s'agit de la zone se situant au delà du pic mère, on y retrouve principalement des pics issus d'une fragmentation «classique» du squelette contenant une ou deux charges.

Fragments	Ratio m/z observé
b_{12}^{2+}	674.5
b_{13}^{2+}	739
y_6^{1+}	725.5
y_{12}^{2+}	668
y_{13}^{2+}	733.5

Il semble évident d'insister sur la large intensité du pic y_{12}^{2+}, promptement visible en CID et augmenté de près de 71 % sous LID. On peut y voir la réciproque de l'effet lysine, avec une certaine affinité orienté vers la production d'ions y. Le fragment b complémentaire est 34 % plus dissocié sous LID : l'effet de la lumière peut aller dans le sens de l'affinité du proton au sein du mécanisme de dissociation b_4-y_{12}.

4.3.3 Effet du Zinc sur les spectres CID et LID de [(35-50)NCp7], $3H^+$

Après avoir amplement décrit les fragments de la protéine nue, nous disposons donc d'un témoin sur lequel appuyer la prochaine discussion. Cette partie tente de créer un lien entre les changements de structure et de charge globale impliqués lors de la complexation du squelette protéique avec le zinc, et la répartition de l'énergie déposée au sein du peptide. Les spectres qui vont suivre ont été réalisés dans

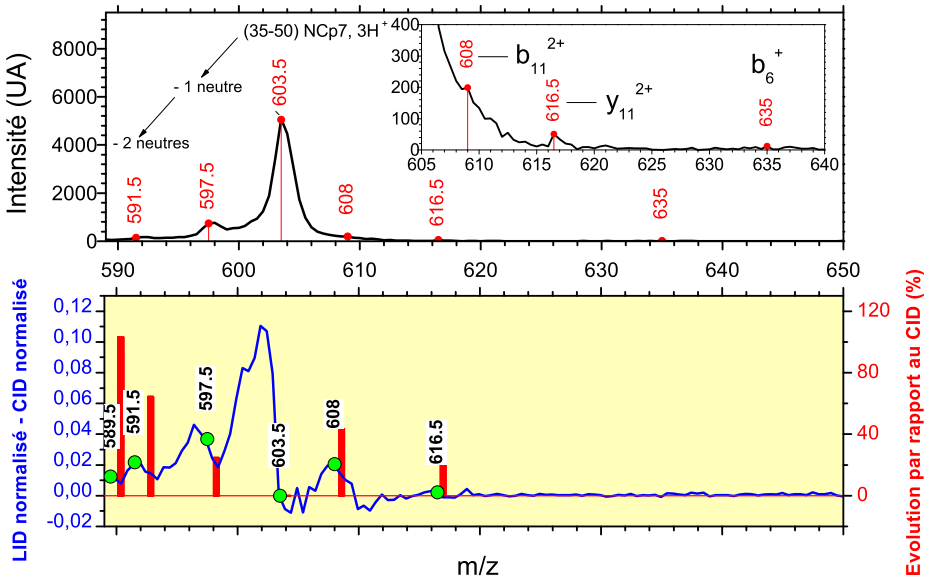


Figure 4.18 – Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7)$^{3+}$: zoom sur la région autour de 600 m/z : On y distingue la perte de neutres, fortement induite par la lumière. L'épaulement à gauche de 603.5 m/z sur le spectre LID différentiel correspond à la déprotonation successive de ce dernier.

les même conditions expérimentales que le paragraphe précédent, et la manière de les présenter suit à peu près le même code. Au sein des spectres CIDs, sont superposés en bleu (trait plein) le spectre CID avec Zinc et en noir le spectre CID sans Zinc, normalisé à la valeur maximum du précédent. La quantité d'ions complexés générés étant sensiblement plus faible que ceux issus de la protéine nue, l'intensité de ces derniers s'en trouve linéairement réduite. En estimant le bruit de mesure (pris dans une zone ou aucun fragment n'est attendu) à 0.2-0.5 unité, on en conclu que chaque signal supérieur à cette valeur correspond à la présence d'un ion. Les points colorés indiquent la position des pics dont le ratio m/z est équivalent à ceux attribués pour la protéine nue. La couleur verte reflète l'intensité de ces pics en présence de Zinc, les points rouges en l'absence de zinc. En violet, sont présentés quelques pics supposés correspondre au ratio m/z d'un fragment complexé avec le zinc.

D'un point de vue global, il existe bel et bien un effet dû à la présence du Zinc : une augmentation du rendement global de fragmentation. Les figures 4.20, 4.23, 4.25 présentent toutes une intensité de fragmentation supérieure pour le spectre de la protéine complexée (courbes bleues au dessus des noires.) La comparaison avec les spectres de la protéine nue est instructive, car là où on observait une tendance épousant la formation des fragments b et y, cette structuration du spectre apparaît beaucoup moins évidente en présence de Zinc. Cela est amplement visible au sien de la figure 4.23, entre 300 et 550 m/z, ou une forêt diffuse de pics globalement amplifiés remplace ce que l'on qualifiait auparavant de zone informative

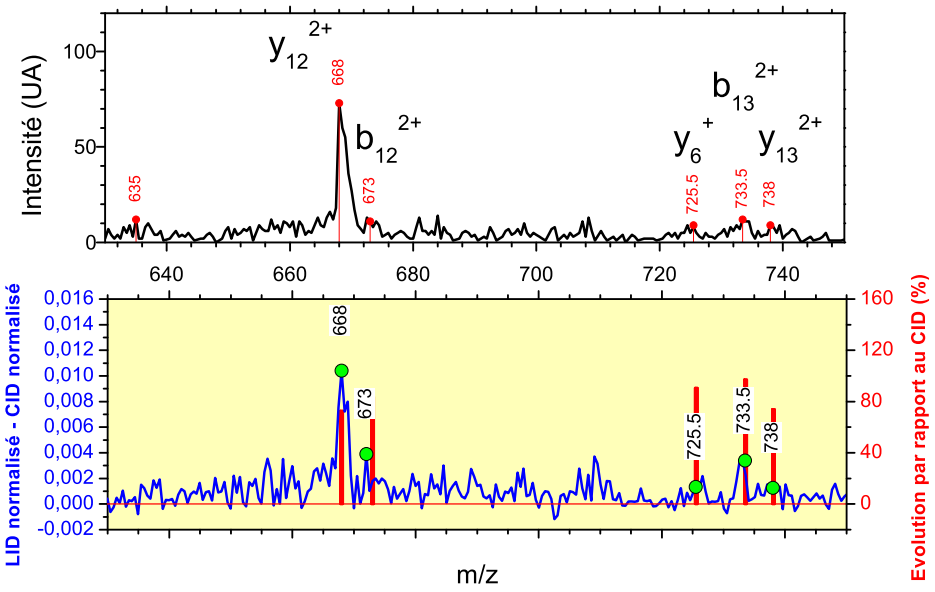


Figure 4.19 – Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7)$^{3+}$: zoom sur la région de rapport m/z élevé : Événement majeur étant la présence proéminente du pic y_{12}^{2+}, allant dans le sens de l'hypothèse formulée par le mécanisme 4.15.

sur la fragmentation classique du squelette peptidique. On remarque également la diminution du pic à 668 m/z, maintenant comparable aux pics adjacents. Un éventuel shift du spectre dû à l'ajout du zinc est à exclure. S'il est possible de distinguer certains fragments complexés avec le zinc, ces derniers ne sont cependant pas plus intenses.

Il existe pourtant deux régions qui contredisent légèrement cet état de fait. La région de faible masse sur charge conserve globalement la même structuration que la protéine sans Zinc, tout en voyant son rendement de fragmentation augmenter de manière globale. (Voir Figure 4.22(a) à 4.21(e)). Au sein de la région de 590 à 650 m/z (Fig.4.24), on observe également toujours une perte de neutres, issue du pic mère, mais aussi une perte de Zinc à 603 m/z également suivie par élimination de neutres. Seule la perte de ces derniers est d'ailleurs induite par la lumière, comme observé dans le cas de la protéine nue. Notons qu'en parvenant à générer un complexe [(35-55)NCp7+Zn]$^{3+}$, ce dernier présente une distribution de charges forcément très différente de celle de la protéine nue. Le zinc chelaté aux histidines conserve sa charge +2, il ne reste plus qu'une charge disponible sur le squelette peptidique. Au vu de la structuration de la zone à faible masse sur charge, presque identique à celle de la protéine nue, nous pouvons penser que celle-ci pourrait être fortement localisée sur le squelette de la lysine. La faible fragmentation de y_{12}^{2+} pouvant tout simplement s'expliquer par une neutralisation de celui-ci, si la charge résiduelle est portée par b_4 coprolactame et qu'une expulsion du Zinc se fasse au même moment. Étant donné l'impossibilité

d'estimer la position du fragment de Zinc sur le squelette, on ne peut que se référer à l'affinité du motif CCHC pour ce dernier [26], [159]. Remarquons que l'exaltation de la fragmentation est en accord avec une étude basée sur un complexe Oxytocine-copper [16].

4.4 Résumé et perspectives

L'état de charge du peptide fait que ces dernières (positives !) sont localisées sur les chaînes latérales fortement basiques des Lysines, en plus de la fonction amine primaire N-terminale. La majeure partie des pics observés en CID à faible énergie peut être expliquée par le modèle du proton mobile.

La fenêtre de faible masse sur charge est très informative sur la fragmentation du Tryptophane. De nature très variée et intense, elle est probablement due à la présence d'une Lysine voisine en C-terminal. L'interaction du proton porté par cette dernière avec la fonction amide primaire en C-term (effet de charge localisé) pourrait à l'origine d'un modèle séquentiel de fragmentation (Fig.4.15), expliquant la tendance du Trp à fragmenter du côté CO, au lieu du côté NH_3 habituellement observé pour le même acide aminé à l'état libre mais protoné.

La totalité des fragments issus du Trp trouvent donc une explication logique, la redistribution d'énergie vibrationnelle acquise au cours des collisions puise son sens dans la proximité de cette Lysine.

L'action de la LID sur le peptide est extrêmement faible. On devrait s'attendre à une amplification des fragments localisés comme étant autour du Tryptophane, lorsqu'on observe uniquement la génération d'un seul pic à 148 m/z au détriments des autres pics issus de LID. Cette faiblesse s'explique par l'absence initiale de centre réactif à proximité de l'indole optiquement excité. Ce centre réactif est essentiellement identifié comme étant un transfert de charge vers les orbitales non liantes de type π-σ^* entourant la fonction amine primaire protonée. Cette distance peut s'expliquer de prime abord par la séquence mais aussi par la distribution de charges le long du squelette, favorisant un éventuel alignement. Nous supposons que l'action de l'excitation à 266 nm agisse sur la fragmentation b_2-y_{14}, donc en N-term de Trp, dans un mécanisme de dissociation directe, où les intermédiaires réactionnels (ion y_{14}^{3+}, la perte de NH_3, et redistribution radicalaire vers 146 m/z) ont une durée de vie extrêmement courte.

Lorsque la protéine est complexée au Zinc, l'effet le plus surprenant est une augmentation de la fragmentation. Cette augmentation se situe d'une part sur l'intensité des pics en communs avec NCp7 nue (essentiellement dans la région de faible masse sur charge) et d'autre part par la génération d'une multitude d'autre fragments plus difficiles à déterminer. Remarquons que le Zinc en lui même dispose de deux charges positives supplémentaires, ce qui doit complètement bouleverser la répartition des charges au

sein du complexes chargé +3. La ressemblance frappante des deux zones de fragmentation à faible masse sur charge pourrait sous-entendre au moins une répartition des charges analogues autour du tryptophane. Le rendement global plus élevé des fragments peut s'expliquer par une structure plus globulaire du squelette, favorisant les transferts de charges.

Il reste toutefois de nombreuses questions que l'on peut soulever. Une simple étude mieux résolue des fragments autour du Tryptophane pourrait donner plus de poids à notre argumentation. Des expériences de pompe sonde résolue en temps UV-proche IR permettraient de définir un temps de relaxation du site π-π^* de l'indole, en monitorant l'évolution fragment 146 m/z

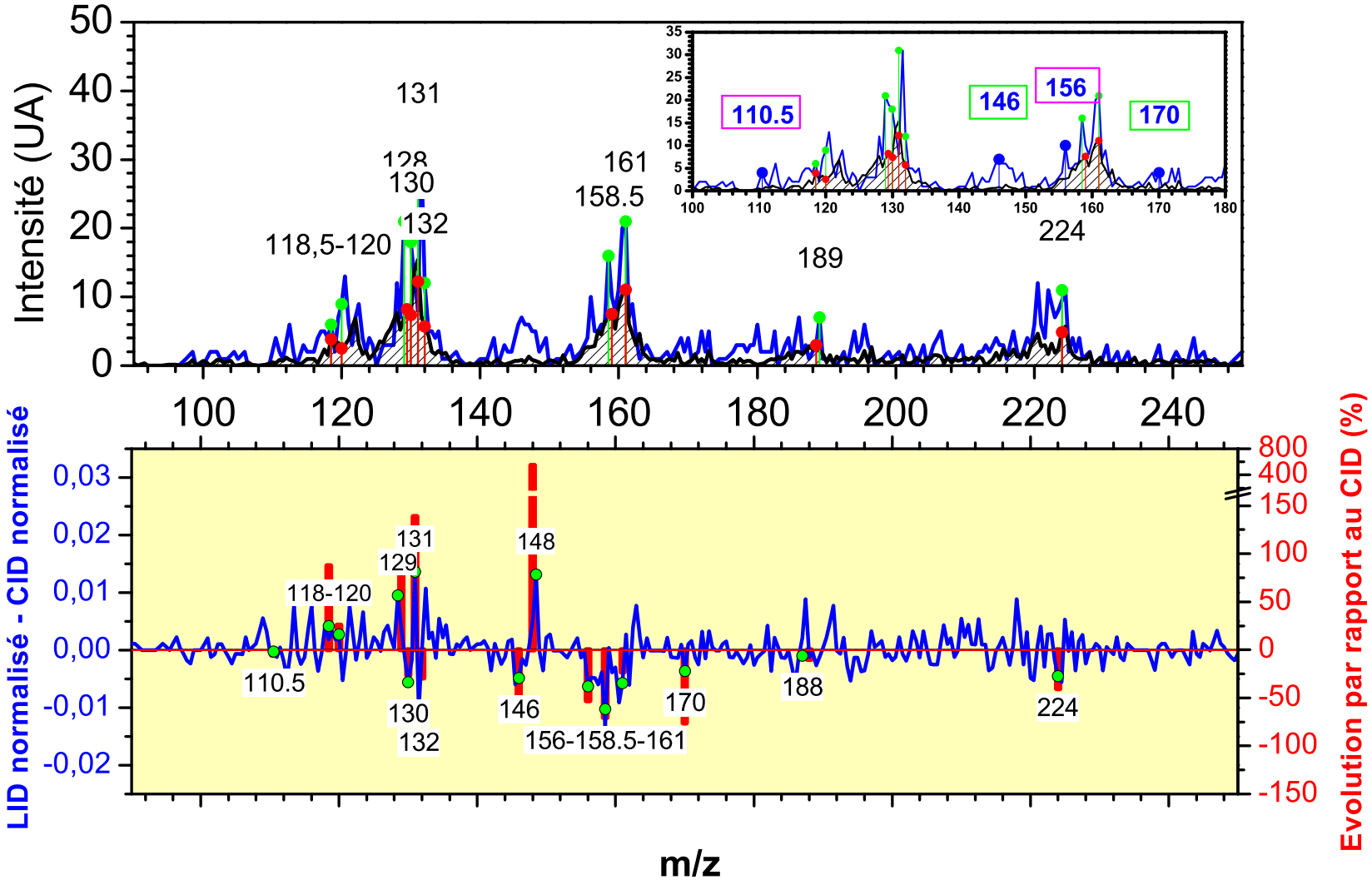


FIGURE 4.20 – Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7+Zn)^{3}+ : zoom sur la région de faible m/z :

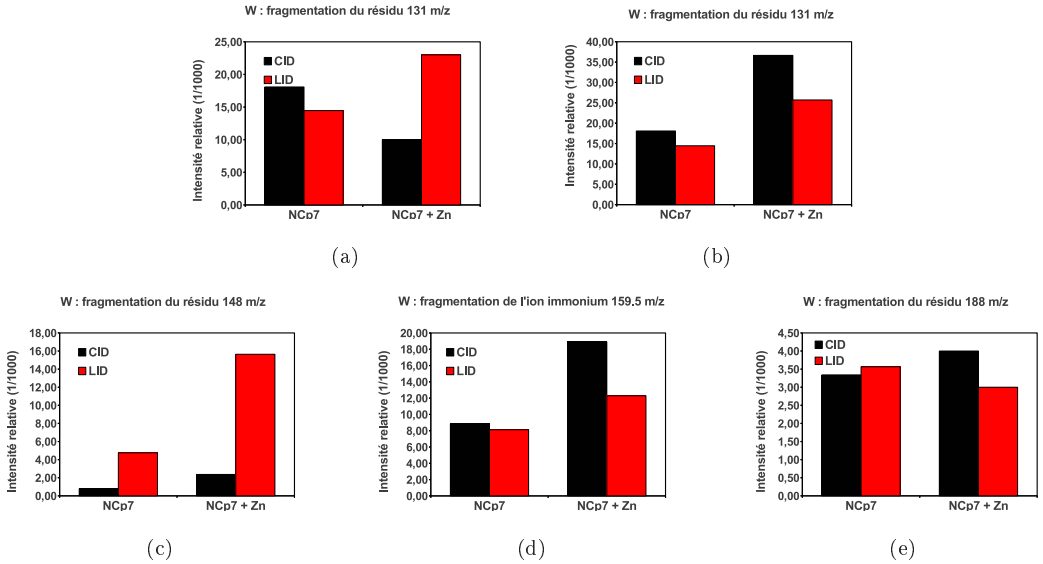


Figure 4.21 – Histogramme des fragments dérivés du tryptophane :

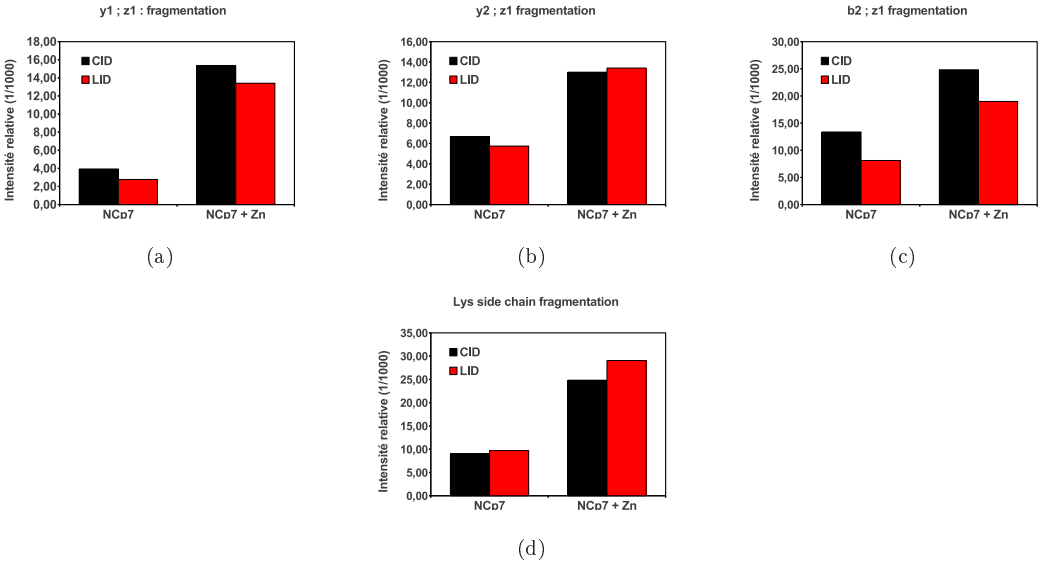


Figure 4.22 – Histogramme des fragments dérivés des extrémités du squelette et de la lysine

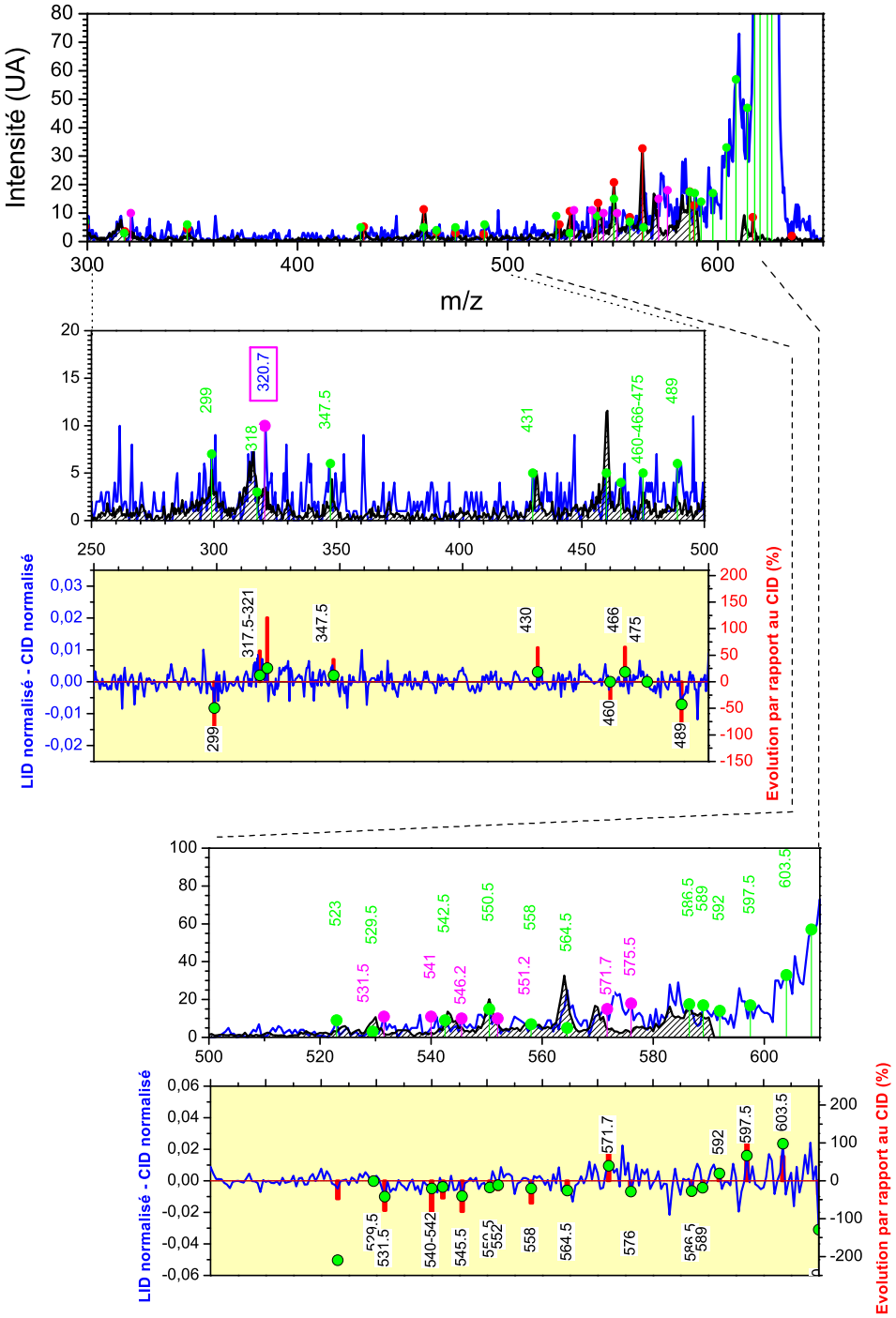


Figure 4.23 – Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7+Zn)$^{3+}$: zoom sur la région entre 300 et 600 m/z

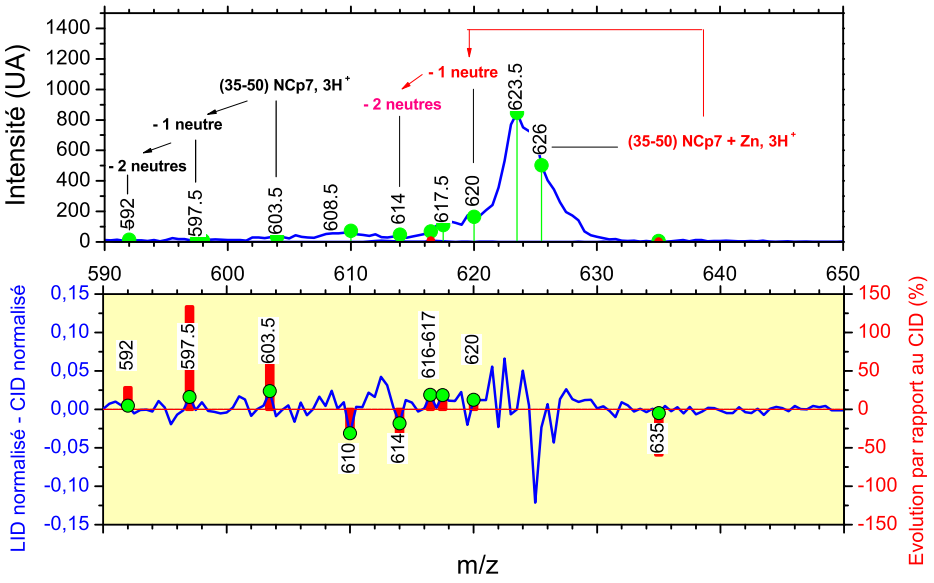


Figure 4.24 – Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7+Zn)$^{3+}$: zoom sur la région autour de 600 m/z

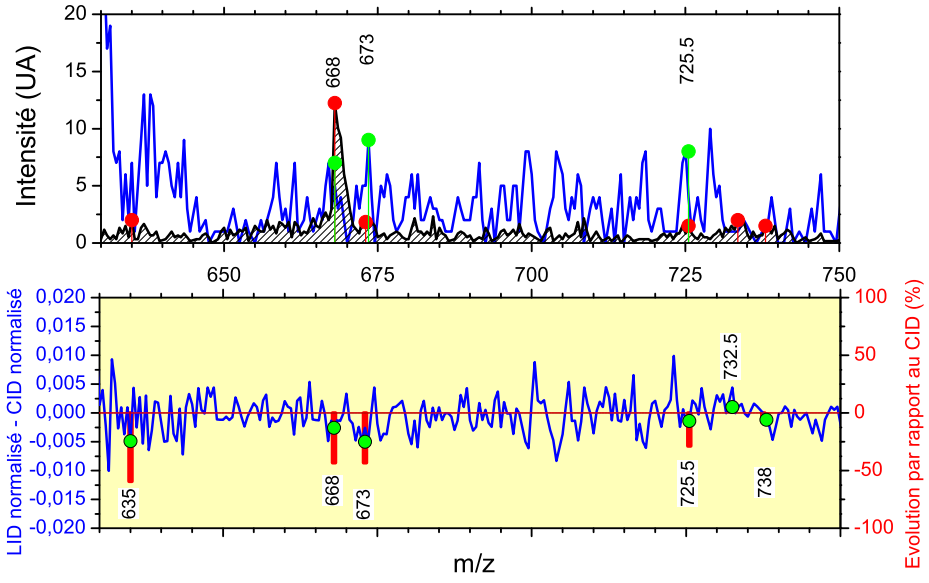


Figure 4.25 – Spectres CID et LID différentiel de ((35-50)NCp7+Zn)$^{3+}$: zoom sur la région de rapport m/z élevé

Chapitre 5

Conclusion

L'objectif de cette thèse était de pouvoir caractériser la flexibilité de deux partenaires biologiques intervenant dans l'étape de second saut de brin de la transcription inverse du VIH, à savoir la tige boucle Δ(-)PBS et la protéine NCp7. Deux approches différentes ont été mises en place, nécessitant deux montages expérimentaux bien distincts.

La première approche, ie, l'étude de la dynamique structurale de la boucle de PBS, a nécessité la conception et la mise en oeuvre d'un nouveau système permettant la caractérisation de la fluorescence résolue en temps de composés biologiques, à savoir la Down-Conversion de Fluorescence. Les avantages de ce setup sont nombreux : disposer d'un rapport signal à bruit amélioré, d'une résolution temporelle sub-picoseconde (300 fs), et d'une détection polychromatique. Par rapport aux montages plus conventionnels, la combinaison de ces atouts tend à réduire le nombre d'acquisitions nécessaires pour avoir des résultats satisfaisants, ce qui permet de réduire l'exposition de la molécule d'intérêt. Des améliorations potentielles sont à pourvoir, comme le fait d'utiliser une impulsion gate décalée dans l'infrarouge, afin que la diffusion de cette dernière ne vienne pas parasiter le signal converti. Il reste que pour des molécules à faible coefficient d'absorption molaire, les concentrations nécessaires sont très importantes, de l'ordre du mM, ce qui nécessite des coûts très importants en termes de production d'échantillon. Ce défaut, inhérent à l'ensemble des dispositifs similaires, fait qu'elles ne peuvent être utilisées qu'au dernier stade de caractérisation de systèmes biologiques.

La mise en pratique de ce système s'est donc effectuée sur l'étude Δ(-)PBS. Afin de pouvoir disposer d'informations locales au sein de la boucle, la fluorescence d'une sonde extrinsèque, la 2Ap a été étudiée en position 6, 8 et 10. Les cinétiques multi-exponentielles des déclins de fluorescence nous ont apporté des informations précises et locales sur l'environnement de notre sonde structurelle. Jusqu'à quatre temps de vie ont pu être établis, allant de la pico-seconde (0.8 - 3.7 ps) à la nano-seconde (1.9 - 3.1 ns). Non seulement les espèces «sombres» pour d'autres setups ont pu être résolues, mais la totalité des différents sous-états conformationnels ont été mis en évidence. Ces derniers sont de plus spécifiques au site de

mutation ponctuelle. Le Quenching par CT est très efficace en position 10 (+ de 80% d'amplitude au cours des 5 premières ps), ce qui corrobore les QY obtenus par fluorescence statique, et est en accord avec de précédentes études structurales par RMN, où la 2Ap est à même d'interagir par empilement avec G(10). Les deux premiers temps ont été attribués à des conformations efficacement empilées, où les temps de vie mesurés reflètent un Quenching par CT, de type «statique apparent». Ils reflètent des structures apparaissant comme figées par rapport au temps de vie de relaxation de la 2Ap, ne dépendant pas de la diffusion. Les temps de vie les plus longs ont été attribués à des sous- états conformationnels plus labiles, ou la 2Ap entre en collision avec ces partenaires dans des mouvements limités par la diffusion. Ces assertions ont été validées par une étude de l'anisotropie de fluorescence de ces composés, où nous mettons en évidence les temps minimum de correlation possibles, qui sont de 130 ps pour une rotation locale de la 2Ap au sein de la boucle, et de 750 ps pour des mouvements segmentaires de cette dernière. Les résultats basés sur un changement de viscosité du milieu, ont plutôt mis en évidence une interaction spécifique de la 2Ap avec le glycerol, ce qui explique à la fois la perte du caractère site-spécifique du quenching, ainsi que le déplacement des amplitudes des temps de vie courts vers les temps de vie long.

La seconde approche visait à étudier la possibilité de mettre en phase gazeuse une même protéine, à la fois à l'état random coiled et à l'état replié. La fragmentation de NCp7 a donc été étudiée par CID et LID, selon deux états : nue et repliée autour de son atome de zinc. L'étude par CID de la protéine nue nous est apparue riche et instructive, de part la présence de pics bien définis, aisément attribuables selon le modèle du proton mobile. Au sein de la fenêtre de faible masse sur charge, une description détaillée de la fragmentation du Trp a pu être mise en évidence, où les particularismes sont expliqués par la proximité d'une lysine. La faiblesse de l'action du laser sur la protéine s'explique en partie par l'état de charge de cette dernière, favorisant un alignement qui va à l'encontre d'un transfert de charge de l'indole vers les sites accepteurs. Seul un pic à 148 m/z est optiquement induit, aux détriments des autres fragments. L'effet principal de la complexation avec le zinc est une augmentation générale de la fragmentation accompagnée d'une perte du caractère défini de type proton mobile. La répartition des charges au sein du squelette doit être bouleversée, et est probablement à l'origine d'une conformation de type globulaire favorisant les CT. Il ressort de cette expérience le fait que la spectrométrie de masse est tout à fait à même de pouvoir étudier des molécules biologiques en fonction de leur conformation, si cette dernière est due majoritairement à des liaisons non covalentes. Il est clair que la structuration de la protéine change la répartition et l'intensité des pics de fragmentation où les radicaux sont impliqués dans la complexation. Cependant, exploiter d'aussi grosses protéines présente plusieurs inconvénients : la quantité d'informations générées est importante, ce qui noie l'essentiel. L'étude de la protéine en charge 3+ empêche une fragmentation par LID efficace. Dans ce travail, de nombreuses hypothèses sont mises en avant, et nécessitent pour être pleinement considérées un important travail d'analyse sur les points essentiels qui ont été dégagés, spécialement autour de la fragmentation du Trp (Cf : 4.4).

En ce qui concerne l'aspect fondamental du projet, les informations recueillies mettent en avant

le potentiel de la phase gazeuse pour étudier intrinsèquement la conformation d'un peptide autour de liaisons non covalentes, informations essentielles pour modéliser théoriquement de telles structures. En ce qui concerne le contexte général de l'étude, les informations engrangées par la down-conversion sont essentielles. Le Quenching local de la 2Ap fourni de précieuses données sur la dynamique structurelle de la boucle. Ces informations pourront être utilisées pour modéliser avec plus de précision la tige boucle, en prenant également en compte la flexibilité de cette dernière. D'autre part, elles serviront de socle comparatif avec une futur étude impliquant la complexation de NCp7. Les résultats obtenus seront essentiels et donneront de plus amples informations locales et dynamiques sur l'initiation de la formation des complexes boucles-boucles, induits par NCp7. La connaissance détaillée de ces mécanismes pourrait tendre vers une conception rationnelle de médicaments inhibant l'interaction par compétition. L'idéal sur ce plan, étant de combiner les précieuses données issues de criblage à haut débit à une approche compréhensive de l'interaction afin de tendre vers des médicaments plus spécifiques et plus efficaces.

Bibliographie

[1] Julien Godet, Nick Ramalanjaona, Kamal K Sharma, Ludovic Richert, Hugues De Rocquigny, Jean-Luc Darlix, Guy Duportail, and Yves Mély. **Specific Implications of the HIV-1 Nucleocapsid Zinc Fingers in the Annealing of the Primer Binding Site Complementary Sequences During the Obligatory Plus Strand Transfer**. *Nucleic Acids Research*, **39**(15) :6633–6645, August 2011.

[2] Béla Paizs and Sándor Suhai. **Fragmentation pathways of protonated peptides**. *Mass Spectrometry Reviews*, **24**(4) :508–548, July 2005.

[3] Houssain El Aribi, Galina Orlova, Alan C. Hopkinson, and K. W. Michael Siu. **Gas-Phase Fragmentation Reactions of Protonated Aromatic Amino Acids : Concomitant and Consecutive Neutral Eliminations and Radical Cation Formations**. *J. Phys. Chem. A*, **108**(17) :3844–3853, 2004.

[4] Emil Fischer. **Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme**. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **27**(3) :2985–2993, 1894.

[5] D. E. Koshland. **Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **44**(2) :98–104, February 1958.

[6] Tianbing Xia, Hans-Christian Becker, Chaozhi Wan, Adam Frankel, Richard W. Roberts, and Ahmed H. Zewail. **The RNA–protein complex : Direct probing of the interfacial recognition dynamics and its correlation with biological functions**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**(14) :8119–8123, July 2003.

[7] Liang Zhao and Tianbing Xia. **Probing RNA conformational dynamics and heterogeneity using femtosecond time-resolved fluorescence spectroscopy**. *Methods (San Diego, Calif.)*, **49**(2) :128–135, October 2009. PMID : 19362148.

[8] Chaozhi Wan, Tianbing Xia, Hans-Christian Becker, and Ahmed H. Zewail. % bf Ultrafast unequilibrated charge transfer : A new channel in the quenching of fluorescent biological probes. *Chemical Physics Letters*, **412**(1–3) :158–163, August 2005.

[9] Weihong Qiu, Tanping Li, Luyuan Zhang, Yi Yang, Ya-Ting Kao, Lijuan Wang, and Dongping Zhong. % bf Ultrafast quenching of tryptophan fluorescence in proteins : Interresidue and intrahelical electron transfer. *Chemical Physics*, **350**(1–3) :154–164, June 2008.

[10] Thomas Gelot, Patricia Tourón-Touceda, Olivier Crégut, Jérémie Léonard, and Stefan Haacke. **Ultrafast site-specific fluorescence quenching of 2-aminopurine in a DNA hairpin studied by femtosecond down-conversion**. *The journal of physical chemistry. A*, **116**(11) :2819–2825, March 2012. PMID : 22289047.

[11] Julius C. Fister III and Joel M. Harris. % bf Data analysis techniques for monitoring excited state kinetics. *Analytica Chimica Acta*, **348**(1–3) :311–325, August 1997.

[12] Ulai Noomnarm and Robert M. Clegg. **Fluorescence lifetimes : fundamentals and interpretations**. *Photosynthesis Research*, **101**(2-3) :181–194, July 2009.

[13] Mattanjah S. de Vries and Pavel Hobza. **Gas-Phase Spectroscopy of Biomolecular Building Blocks**. *Annual Review of Physical Chemistry*, **58**(1) :585–612, 2007.

[14] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse. **Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules**. *Science*, **246**(4926) :64–71, October 1989.

[15] Michael Karas and Franz Hillenkamp. **Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons**. *Analytical Chemistry*, **60**(20) :2299–2301, October 1988.

[16] Laure Joly, Rodolphe Antoine, Florian Albrieux, Renaud Ballivian, Michel Broyer, Fabien Chirot, Jérôme Lemoine, Philippe Dugourd, Claudio Greco, Roland Mitrić, and Vlasta Bonačić-Koutecký. **Optical and Structural Properties of Copper-Oxytocin Dications in the Gas Phase**. *J. Phys. Chem. B*, **113**(32) :11293–11300, 2009.

[17] John P. Harley, Donald A. Klein, Lansing M. Prescott, Linda M. Sherwood, Joanne M. Willey, and Christopher J. Woolverton. *Microbiologie*. De Boeck Supérieur, April 2010.

[18] John B. Carter and Venetia A. Saunders. *Virology : Principles and Applications*. John Wiley $0 Sons, August 2007.

[19] Saleta Sierra, Bernd Kupfer, and Rolf Kaiser. **Basics of the virology of HIV-1 and its replication**. *Journal of Clinical Virology*, **34**(4) :233–244, December 2005.

[20] M. Mirande. **Détournement d'ARNt cellulaire par le VIH1**. *Virologie*, **12**(2) :95–103, June 2008.

[21] Sarah Bourbigot, Nick Ramalanjaona, Christian Boudier, Gilmar F.J. Salgado, Bernard P. Roques, Yves Mély, Serge Bouaziz, and Nelly Morellet. % bf How the HIV-1 Nucleocapsid Protein Binds and Destabilises the (-)Primer Binding Site During Reverse Transcription. *Journal of Molecular Biology*, **383**(5) :1112–1128, November 2008.

[22] L. E. Henderson, M. A. Bowers, R. C. Sowder, S. A. Serabyn, D. G. Johnson, J. W. Bess, L. O. Arthur, D. K. Bryant, and C. Fenselau. **Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1 : posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences.** *Journal of Virology*, **66**(4) :1856–1865, April 1992.

[23] Lori V. Coren, James A. Thomas, Elena Chertova, Raymond C. Sowder, Tracy D. Gagliardi, Robert J. Gorelick, and David E. Ott. **Mutational Analysis of the C-Terminal Gag Cleavage Sites in Human Immunodeficiency Virus Type 1**. *Journal of Virology*, **81**(18) :10047–10054, September 2007.

[24] Valérie Tanchou, Didier Decimo, Christine Péchoux, Daniela Lener, Véronique Rogemond, Lionel Berthoux, Michèle Ottmann, and Jean-Luc Darlix. **Role of the N-Terminal Zinc Finger of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Protein in Virus Structure and Replication**. *Journal of Virology*, **72**(5) :4442–4447, May 1998.

[25] J. W. Bess, P. J. Powell, H. J. Issaq, L. J. Schumack, M. K. Grimes, L. E. Hender-

son, and L. O. Arthur. **Tightly bound zinc in human immunodeficiency virus type 1, human T-cell leukemia virus type I, and other retroviruses.** *Journal of Virology*, **66**(2) :840–847, February 1992.

[26] Y. Mély, H. De Rocquigny, N. Morellet, B. P. Roques, and D. Gérard. **Zinc Binding to the HIV-1 Nucleocapsid Protein : A Thermodynamic Investigation by Fluorescence Spectroscopy†**. *Biochemistry*, **35**(16) :5175–5182, 1996.

[27] E Bombarda, N Morellet, H Cherradi, B Spiess, S Bouaziz, E Grell, B.P Roques, and Y Mély. % bf Determination of the pKa of the four Zn2+-coordinating residues of the distal finger motif of the HIV-1 nucleocapsid protein : Consequences on the binding of Zn2+. *Journal of Molecular Biology*, **310**(3) :659–672, July 2001.

[28] Elisa Bombarda, Ernst Grell, Bernard P. Roques, and Yves Mély. **Molecular Mechanism of the Zn2+-Induced Folding of the Distal CCHC Finger Motif of the HIV-1 Nucleocapsid Protein**. *Biophysical Journal*, **93**(1) :208–217, July 2007.

[29] Jean-Luc Darlix, Julien Godet, Roland Ivanyi-Nagy, Philippe Fossé, Olivier Mauffret, and Yves Mély. % bf Flexible Nature and Specific Functions of the HIV-1 Nucleocapsid Protein. *Journal of Molecular Biology*, **410**(4) :565–581, July 2011.

[30] N. Morellet, H. de Rocquigny, Y. Mély, N. Jullian, H. Déméné, M. Ottmann, D. Gérard, J.L. Darlix, M.C. Fournie-Zaluski, and B.P. Roques. % bf Conformational behaviour of the active and inactive forms of the nucleocapsid NCp7 of HIV-1 studied by 1H NMR. *Journal of Molecular Biology*, **235**(1) :287–301, January 1994.

[31] Simon N. Covey. **Amino acid sequence homology in gag region of reverse transcribing elements and the coat protein gene of cauliflower mosaic virus**. *Nucleic Acids Research*, **14**(2) :623–633, January 1986.

[32] B. Maurer, H. Bannert, G. Darai, and R. M. Flügel. **Analysis of the primary structure of the long terminal repeat and the gag and pol genes of the human spumaretrovirus.** *Journal of Virology*, **62**(5) :1590–1597, May 1988.

[33] H. Demene, C. Z. Dong, M. Ottmann, M. C. Rouyez, N. Jullian, N. Morellet, Y. Mely, J. L. Darlix, and M. C. Fournie-Zaluski. **1H NMR structure and biological studies of the His23 .fwdarw. Cys mutant nucleocapsid protein of HIV-1 indicate that the conformation of the first zinc finger is critical for virus infectivity**. *Biochemistry*, **33**(39) :11707–11716, October 1994.

[34] Y. Mely, N. Jullian, N. Morellet, H. De Rocquigny, C. Z. Dong, E. Piemont, B. P. Roques, and D. Gerard. **Spatial Proximity of the HIV-1 Nucleocapsid Protein Zinc Fingers Investigated by Time-Resolved Fluorescence and Fluorescence Resonance Energy Transfer**. *Biochemistry*, **33**(40) :12085–12091, October 1994.

[35] Wai-Chung Lam, August H. Maki, Jose R. Casas-Finet, John W. Erickson, Bradley P. Kane, Raymond C. Sowder, and Louis E. Henderson. **Phosphorescence and Optically Detected Magnetic Resonance Investigation of the Binding of the Nucleocapsid Protein of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 and**

Related Peptides to RNA. *Biochemistry*, **33**(35) :10693–10700, September 1994.

[36] Y. Mély, E. Piémont, M. Sorinas-Jimeno, H. de Rocquigny, N. Jullian, N. Morellet, B. P. Roques, and D. Gérard. **Structural and dynamic characterization of the aromatic amino acids of the human immunodeficiency virus type I nucleocapsid protein zinc fingers and their involvement in heterologous tRNA(Phe) binding : a steady-state and time-resolved fluorescence study**. *Biophysical Journal*, **65**(4) :1513–1522, October 1993.

[37] T. Dorfman, J. Luban, S. P. Goff, W. A. Haseltine, and H. G. Göttlinger. **Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein.** *Journal of Virology*, **67**(10) :6159–6169, October 1993.

[38] Daniel Herschlag. **RNA Chaperones and the RNA Folding Problem**. *Journal of Biological Chemistry*, **270**(36) :20871–20874, September 1995.

[39] Shi-Jie Chen and Ken A. Dill. **RNA folding energy landscapes**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**(2) :646–651, January 2000.

[40] Rick Russell, Xiaowei Zhuang, Hazen P. Babcock, Ian S. Millett, Sebastian Doniach, Steven Chu, and Daniel Herschlag. **Exploring the folding landscape of a structured RNA**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(1) :155–160, January 2002.

[41] Yves Mély, Hugues de Rocquigny, Monica Sorinas-Jimeno, Gérard Keith, Bernard P. Roques, Roland Marquet, and Dominique Gérard. **Binding of the HIV-1 Nucleocapsid Protein to the Primer tRNA, inVitro, Is Essentially Not Specific**. *Journal of Biological Chemistry*, **270**(4) :1650–1656, January 1995.

[42] Mari ?a A Urbaneja, Bradley P Kane, Donald G Johnson, Robert J Gorelick, Louis E Henderson, and José R Casas-Finet. % bf Binding properties of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein p7 to a model RNA : elucidation of the structural determinants for function. *Journal of Molecular Biology*, **287**(1) :59–75, March 1999.

[43] J. Andrew Berglund, Bruno Charpentier, and Michael Rosbash. **A High Affinity Binding Site for the HIV-1 Nucleocapsid Protein**. *Nucleic Acids Research*, **25**(5) :1042–1049, March 1997.

[44] Robert J. Fisher, Alan Rein, Matthew Fivash, Maria A. Urbaneja, José R. Casas-Finet, Maxine Medaglia, and Louis E. Henderson. **Sequence-Specific Binding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Protein to Short Oligonucleotides**. *Journal of Virology*, **72**(3) :1902–1909, March 1998.

[45] C. Vuilleumier, E. Bombarda, N. Morellet, D. Gérard, B. P. Roques, and Y. Mély. **Nucleic Acid Sequence Discrimination by the HIV-1 Nucleocapsid Protein NCp7 : A Fluorescence Study†**. *Biochemistry*, **38**(51) :16816–16825, December 1999.

[46] S. V Avilov, E. Piemont, V. Shvadchak, H. De Rocquigny, and Y. Mély. **Probing Dynamics of HIV-1 Nucleocapsid Protein/Target Hexanucleotide Complexes by 2-Aminopurine**. *Nucleic Acids Research*, **36**(3) :885–896, February 2008.

[47] Sergiy V. Avilov, Julien Godet, Etienne Piémont, and Yves Mély. **Site-Specific**

Characterization of HIV-1 Nucleocapsid Protein Binding to Oligonucleotides with Two Binding Sites†. *Biochemistry*, **48**(11) :2422–2430, 2009.

[48] Ali Bazzi, Loussiné Zargarian, Françoise Chaminade, Christian Boudier, Hughes De Rocquigny, Brigitte René, Yves Mély, Philippe Fossé, and Olivier Mauffret. **Structural insights into the cTAR DNA recognition by the HIV-1 nucleocapsid protein : role of sugar deoxyriboses in the binding polarity of NC**. *Nucleic Acids Research*, **39**(9) :3903–3916, May 2011.

[49] Mark C. Williams, Robert J. Gorelick, and Karin Musier-Forsyth. **Specific zinc-finger architecture required for HIV-1 nucleocapsid protein's nucleic acid chaperone function**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(13) :8614–8619, June 2002.

[50] Hervé Beltz, Joel Azoulay, Serena Bernacchi, Jean-Pierre Clamme, Damien Ficheux, Bernard Roques, Jean-Luc Darlix, and Yves Mély. % bf Impact of the Terminal Bulges of HIV-1 cTAR DNA on its Stability and the Destabilizing Activity of the Nucleocapsid Protein NCp7. *Journal of Molecular Biology*, **328**(1) :95–108, April 2003.

[51] Hervé Beltz, Etienne Piémont, Emmanuel Schaub, Damien Ficheux, Bernard Roques, Jean-Luc Darlix, and Yves Mély. % bf Role of the Structure of the Top Half of HIV-1 cTAR DNA on the Nucleic Acid Destabilizing Activity of the Nucleocapsid Protein NCp7. *Journal of Molecular Biology*, **338**(4) :711–723, May 2004.

[52] Peter Tompa and Peter Csermely. **The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones**. *The FASEB Journal*, **18**(11) :1169–1175, August 2004.

[53] G. Krishnamoorthy, Bernard Roques, Jean-Luc Darlix, and Yves Mély. **DNA condensation by the nucleocapsid protein of HIV-1 : a mechanism ensuring DNA protection**. *Nucleic Acids Research*, **31**(18) :5425–5432, September 2003.

[54] Vladimir N. Uversky. **Intrinsically Disordered Proteins and Their Environment : Effects of Strong Denaturants, Temperature, pH, Counter Ions, Membranes, Binding Partners, Osmolytes, and Macromolecular Crowding**. *The Protein Journal*, **28**(7-8) :305–325, October 2009.

[55] Sarah A. Woodson. **Taming free energy landscapes with RNA chaperones**. *RNA Biology*, **7**(6) :677–686, November 2010.

[56] Peter Tompa and Monika Fuxreiter. % bf Fuzzy complexes : polymorphism and structural disorder in protein–protein interactions. *Trends in Biochemical Sciences*, **33**(1) :2–8, January 2008.

[57] Julien Godet, Christian Boudier, Nicolas Humbert, Roland Ivanyi-Nagy, Jean-Luc Darlix, and Yves Mély. % bf Comparative nucleic acid chaperone properties of the nucleocapsid protein NCp7 and Tat protein of HIV-1. *Virus Research*, **169**(2) :349–360, November 2012.

[58] Laurent Houzet, Zakia Morichaud, Ludovic Didierlaurent, Delphine Muriaux, Jean-Luc Darlix, and Marylène Mougel. **Nucleocapsid mutations turn HIV-1 into a DNA-containing virus**. *Nucleic Acids Research*, **36**(7) :2311–2319, April 2008.

[59] H. De Rocquigny, C. Gabus, A. Vincent, M. C. Fournié-Zaluski, B. Roques, and

J. L. Darlix. **Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**(14) :6472–6476, July 1992.

[60] L C Sowers, G V Fazakerley, R. Eritja, B E Kaplan, and M F Goodman. **Base pairing and mutagenesis : observation of a protonated base pair between 2-aminopurine and cytosine in an oligonucleotide by proton NMR**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **83**(15) :5434–5438, August 1986.

[61] André Dallmann, Lars Dehmel, Torben Peters, Clemens Mügge, Christian Griesinger, Jennifer Tuma, and Nikolaus P. Ernsting. % bf 2-Aminopurine Incorporation Perturbs the Dynamics and Structure of DNA. *Angewandte Chemie International Edition*, **49**(34) :5989–5992, 2010.

[62] T. M. Nordlund, S. Andersson, L. Nilsson, R. Rigler, A. Graeslund, and L. W. McLaughlin. **Structure and dynamics of a fluorescent DNA oligomer containing the EcoRI recognition sequence : fluorescence, molecular dynamics, and NMR studies**. *Biochemistry*, **28**(23) :9095–9103, 1989.

[63] Christopher R. Guest, Remo A. Hochstrasser, Lawrence C. Sowers, and David P. Millar. **Dynamics of mismatched base pairs in DNA**. *Biochemistry*, **30**(13) :3271–3279, 1991.

[64] Steen Steenken and Slobodan V. Jovanovic. **How Easily Oxidizable Is DNA ? One-Electron Reduction Potentials of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution**. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**(3) :617–618, 1997.

[65] S. O. Kelley. **Electron Transfer Between Bases in Double Helical DNA**. *Science*, **283**(5400) :375–381, January 1999.

[66] Olaf F.A. Larsen, Ivo H.M. van Stokkum, Bas Gobets, Rienk van Grondelle, and Herbert van Amerongen. **Probing the Structure and Dynamics of a DNA Hairpin by Ultrafast Quenching and Fluorescence Depolarization**. *Biophysical Journal*, **81**(2) :1115–1126, August 2001.

[67] C. Wan. **Femtosecond direct observation of charge transfer between bases in DNA**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**(26) :14052–14055, December 2000.

[68] John M Jean and Kathleen B Hall. **2-Aminopurine Fluorescence Quenching and Lifetimes : Role of Base Stacking**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(1) :37–41, January 2001.

[69] John M. Jean and Kathleen B. Hall. **2-Aminopurine Electronic Structure and Fluorescence Properties in DNA†**. *Biochemistry*, **41**(44) :13152–13161, 2002.

[70] T. Xia. **RNA-protein recognition : Single-residue ultrafast dynamical control of structural specificity and function**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**(37) :13013–13018, September 2005.

[71] Tianbing Xia. % bf Taking femtosecond snapshots of RNA conformational dynamics and complexity. *Current Opinion in Chemical Biology*, **12**(6) :604–611, December 2008.

[72] Hieu-Ngoc Nguyen, Liang Zhao, Carla W. Gray, Donald M. Gray, and Tianbing Xia. **Ultrafast Fluorescence Decay Profiles Reveal Differential Unstacking of 2-Aminopurine from Neighboring Bases in Single-Stranded DNA-Binding Protein Subsites**. *Biochemistry*, **50**(42) :8989–9001, 2011.

[73] Koichi Tanaka, Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida, Tamio Yoshida, and T. Matsuo. % bf Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2**(8) :151–153, 1988.

[74] Masamichi Yamashita and John B. Fenn. **Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme**. *J. Phys. Chem.*, **88**(20) :4451–4459, 1984.

[75] Zhongqi Zhang. **Prediction of Low-Energy Collision-Induced Dissociation Spectra of Peptides**. *Anal. Chem.*, **76**(14) :3908–3922, 2004.

[76] Károly Vékey. **Internal Energy Effects in Mass Spectrometry**. *Journal of Mass Spectrometry*, **31**(5) :445–463, 1996.

[77] J Léonard, T Gelot, K Torgasin, and S Haacke. **Ultrafast fluorescence spectroscopy of biologically relevant chromophores using type II difference frequency generation**. *Journal of Physics : Conference Series*, **277** :012017, January 2011.

[78] **Time-Domain Lifetime Measurements**. In Joseph R. Lakowicz, editor, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, pages 97–155. Springer US, Boston, MA, 2006.

[79] S. Arzhantsev and M. Maroncelli. **Design and Characterization of a Femtosecond Fluorescence Spectrometer Based on Optical Kerr Gating**. *Applied Spectroscopy*, **59**(2) :206–220, February 2005.

[80] Aike Stortelder, Joost B. Buijs, Jaap Bulthuis, Cees Gooijer, and Gert van der Zwan. **Fast-Gated Intensified Charge-Coupled Device Camera to Record Time-Resolved Fluorescence Spectra of Tryptophan**. *Applied Spectroscopy*, **58**(6) :705–710, June 2004.

[81] J Easter, R Detoma, and L Brand. **Nanosecond time-resolved emission spectroscopy of a fluorescence probe adsorbed to L-alpha-egg lecithin vesicles**. *Biophysical Journal*, **16** :571–583, June 1976.

[82] Mark Maroncelli and Graham R. Fleming. **Picosecond solvation dynamics of coumarin 153 : The importance of molecular aspects of solvation**. *The Journal of Chemical Physics*, **86** :6221, 1987.

[83] **PicoQuant - Photon Counting Instrumentation**. http://www.picoquant.com/products/instrumentation.htm.

[84] Yurii V. Il'ichev, Wolfgang Kühnle, and Klaas A. Zachariasse. **Intramolecular Charge Transfer in Dual Fluorescent 4-(Dialkylamino)benzonitriles. Reaction Efficiency Enhancement by Increasing the Size of the Amino and Benzonitrile Subunits by Alkyl Substituents**. *J. Phys. Chem. A*, **102**(28) :5670–5680, 1998.

[85] **HAMAMATSU - Streak Systems**. http://sales.hamamatsu.com/en/products/system-division/ultra-fast/streak-systems.php.

[86] Satyen Saha, Prasun K. Mandal, and Anunay Samanta. **Solvation dynamics of Nile Red in a room temperature ionic liquid using streak camera**. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **6**(12) :3106–3110, June 2004.

[87] B. Schmidt, S. Laimgruber, W. Zinth, and P. Gilch. **A broadband Kerr shutter for femtosecond fluorescence spectroscopy**. *Applied Physics B : Lasers and Optics*, **76** :809–814, July 2003.

[88] S. Haacke, R. A. Taylor, I. Bar-Joseph, M. J. S. P. Brasil, M. Hartig, and B. De-

veaud. **Improving the signal-to-noise ratio of femtosecond luminescence upconversion by multichannel detection**. *Journal of the Optical Society of America B*, **15**(4) :1410–1417, April 1998.

[89] Lijuan Zhao, J. Luis Pérez Lustres, Vadim Farztdinov, and Nikolaus P. Ernsting. **Femtosecond fluorescence spectroscopy by upconversion with tilted gate pulses**. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **7**(8) :1716–1725, March 2005.

[90] Joseph R. Lakowicz. *Techniques*. Springer, 1991.

[91] Bernard Valeur and Jean-Claude Brochon. *New trends in fluorescence spectroscopy : applications to chemical and life sciences*. Springer, 2001.

[92] M. A. Duguay. **AN ULTRAFAST LIGHT GATE**. *Applied Physics Letters*, **15** :192, 1969.

[93] Sergei Arzhantsev, Hui Jin, Gary A. Baker, and Mark Maroncelli. **Measurements of the Complete Solvation Response in Ionic Liquids†**. *J. Phys. Chem. B*, **111**(18) :4978–4989, 2007.

[94] C. Rullière, T. Amand, and X. Marie. **Spectroscopic Methods for Analysis of Sample Dynamics**. In Claude Rullière, editor, *Femtosecond Laser Pulses*, pages 223–281. Springer New York, New York, NY.

[95] H. Mahr and Mitchell D. Hirsch. **An optical up-conversion light gate with picosecond resolution**. *Optics Communications*, **13**(2) :96–99, February 1975.

[96] J. Shah. **Ultrafast luminescence spectroscopy using sum frequency generation**. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, **24**(2) :276–288, February 1988.

[97] R. Schanz, S. A. Kovalenko, V. Kharlanov, and N. P. Ernsting. **Broad-band fluorescence upconversion for femtosecond spectroscopy**. *Applied Physics Letters*, **79** :566, 2001.

[98] Thorlabs. **Spectre de transmission du BBO**, 2012.

[99] Leslie A. Hallidy and Michael R. Topp. **Picosecond luminescence detection using type-II phase-matched frequency conversion**. *Chemical Physics Letters*, **46**(1) :8–14, February 1977.

[100] C Radzewicz, Y.B Band, G.W Pearson, and J.S Krasinski. **Short pulse nonlinear frequency conversion without group-velocity-mismatch broadening**. *Optics Communications*, **117**(3–4) :295–302, June 1995.

[101] Giulio Cerullo and Sandro De Silvestri. **Ultrafast optical parametric amplifiers**. *Review of Scientific Instruments*, **74**(1) :1–18, January 2003.

[102] P. Di Trapani, A. Andreoni, C. Solcia, P. Foggi, R. Danielius, A. Dubietis, and A. Piskarskas. **Matching of group velocities in three-wave parametric interaction with femtosecond pulses and application to traveling-wave generators**. *Journal of the Optical Society of America B*, **12**(11) :2237–2244, November 1995.

[103] Takayoshi Kobayashi. **Femtosecond Noncollinear Parametric Amplification and Carrier-Envelope Phase Control**. In Jun Ye and Steven T. Cundiff, editors, *Femtosecond Optical Frequency Comb : Principle, Operation, and Applications*, pages 133–175. Springer US, January 2005.

[104] Oleksandr Isaienko and Eric Borguet. **Pulse-front matching of ultrabroadband**

near-infrared noncollinear optical parametric amplified pulses. *Journal of the Optical Society of America B*, **26**(5) :965–972, May 2009.

[105] Donna Strickland and Gerard Mourou. **Compression of amplified chirped optical pulses**. *Optics Communications*, **55**(6) :447–449, October 1985.

[106] G. Cheriaux, P. Rousseau, F. Salin, J. P. Chambaret, Barry Walker, and L. F. Dimauro. **Aberration-free stretcher design for ultrashort-pulse amplification**. *Optics Letters*, **21**(6) :414–416, March 1996.

[107] Klaas Wynne, Gavin D. Reid, and Robin M. Hochstrasser. **Regenerative amplification of 30-fs pulses in Ti :sapphire at 5 kHz**. *Optics Letters*, **19**(12) :895–897, June 1994.

[108] R. L. Fork, O. E. Martinez, and J. P. Gordon. **Negative dispersion using pairs of prisms**. *Optics Letters*, **9**(5) :150–152, May 1984.

[109] E. Treacy. **Optical pulse compression with diffraction gratings**. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, **5**(9) :454– 458, September 1969.

[110] Robert R. Alfano. *The supercontinuum laser source : fundamentals with updated references*. Birkhäuser, 2006.

[111] Satoshi Takeuchi and Tahei Tahara. **Ultrafast Fluorescence Study on the Excited Singlet-State Dynamics of all-trans-Retinal**. *J. Phys. Chem. A*, **101**(17) :3052–3060, 1997.

[112] D.J.S. Birsch. **Excimer Photophysics of Macromolecular Scintillators**. 1987.

[113] J. A. Armstrong, N. Bloembergen, J. Ducuing, and P. S. Pershan. **Interactions between Light Waves in a Nonlinear Dielectric**. *Physical Review*, **127**(6) :1918–1939, September 1962.

[114] N. Bloembergen and P. S. Pershan. **Light Waves at the Boundary of Nonlinear Media**. *Physical Review*, **128**(2) :606–622, October 1962.

[115] J. R. Lakowicz, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, E. Danielsen, and M. J. Wirth. **Time-resolved fluorescence intensity and anisotropy decays of 2,5-diphenyloxazole by two-photon excitation and frequency–domain fluorometry**. *The Journal of Physical Chemistry*, **96**(7) :3000–3006, 1992.

[116] Caroline Egelé, Emmanuel Schaub, Nick Ramalanjaona, Etienne Piémont, Damien Ficheux, Bernard Roques, Jean-Luc Darlix, and Yves Mély. % bf HIV-1 Nucleocapsid Protein Binds to the Viral DNA Initiation Sequences and Chaperones their Kissing Interactions. *Journal of Molecular Biology*, **342**(2) :453–466, September 2004.

[117] Gary Bonner and Alexander M Klibanov. **Structural stability of DNA in nonaqueous solvents**. *Biotechnology and Bioengineering*, **68**(3) :339–344, May 2000.

[118] Michael Zuker. **Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction**. *Nucleic Acids Research*, **31**(13) :3406–3415, July 2003.

[119] Bernard Valeur. *Invitation À la Fluorescence Moléculaire*. De Boeck Supérieur, September 2004.

[120] Thomas Gustavsson, Alexei Sharonov, Delphine Onidas, and Dimitra Markovitsi. % bf Adenine, deoxyadenosine and deoxyadenosine 5'-monophosphate studied by femtosecond fluorescence upconversion spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, **356**(1–2) :49–54, April 2002.

[121] Anders Holmén, Bengt Nordén, and Bo Albinsson. **Electronic Transition Moments of 2-Aminopurine**. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**(13) :3114–3121, 1997.

[122] Geoffrey Taylor. **Disintegration of Water Drops in an Electric Field**. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, **280**(1382) :383–397, July 1964.

[123] David P. H. Smith. **The Electrohydrodynamic Atomization of Liquids**. *Industry Applications, IEEE Transactions on*, **IA-22**(3) :527 –535, May 1986.

[124] Lord Rayleigh. **XXI. On an instrument capable of measuring the intensity of aerial vibrations**. *Philosophical Magazine Series 5*, **14**(87) :186–187, 1882.

[125] Malcolm Dole, L. L Mack, R. L Hines, R. C Mobley, L. D Ferguson, and M. B Alice. **Molecular Beams of Macroions**. *The Journal of Chemical Physics*, **49**(5) :2240–2249, September 1968.

[126] J. V Iribarne and B. A Thomson. **On the evaporation of small ions from charged droplets**. *The Journal of Chemical Physics*, **64**(6) :2287–2294, March 1976.

[127] S Earnshaw. **{On the nature of the molecular forces which regulate the constitution of the luminiferous ether}**. *Trans. Camb. Phil. Soc*, **7** :97–112, 1842.

[128] Miklós Szilágyi. *Electron and ion optics*. Plenum Press, 1988.

[129] Imre Szabo. **New ion-optical devices utilizing oscillatory electric fields. I. Principle of operation and analytical theory of multipole devices with two-dimensional electric fields**. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **73**(3) :197–235, November 1986.

[130] Donald J Douglas, Aaron J Frank, and Dunmin Mao. **Linear ion traps in mass spectrometry**. *Mass Spectrometry Reviews*, **24**(1) :1–29, February 2005. PMID : 15389865.

[131] Wolfgang Paul. % bf Electromagnetic Traps for Charged and Neutral Particles (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, **29**(7) :739–748, July 1990.

[132] Philip E. Miller and M. Bonner Denton. **The quadrupole mass filter : Basic operating concepts**. *J. Chem. Educ.*, **63**(7) :617, 1986.

[133] Anil K. Shukla and Jean H. Futrell. **Tandem mass spectrometry : dissociation of ions by collisional activation**. *Journal of Mass Spectrometry*, **35**(9) :1069–1090, 2000.

[134] R. A. Marcus and O. K. Rice. **The Kinetics of the Recombination of Methyl Radicals and Iodine Atoms.** *J. Phys. Chem.*, **55**(6) :894–908, 1951.

[135] H. M Rosenstock, M. B Wallenstein, A. L Wahrhaftig, and Henry Eyring. **Absolute Rate Theory for Isolated Systems and the Mass Spectra of Polyatomic Molecules**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **38**(8) :667–678, August 1952.

[136] Vicki H. Wysocki, George Tsaprailis, Lori L. Smith, and Linda A. Breci. **Mobile and localized protons : a framework for understanding peptide dissociation**. *Journal of Mass Spectrometry*, **35**(12) :1399–1406, 2000.

[137] Alex G. Harrison and Talat Yalcin. % bf Proton mobility in protonated amino acids and peptides. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **165–166**(0) :339–347, November 1997.

[138] Odile Burlet, Ralph S. Orkiszewski, Kevin D. Ballard, Simon J. Gaskell, and

M. J. Bertrand. % bf Charge promotion of low-energy fragmentations of peptide ions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **6**(11) :658–662, 1992.

[139] Xue Jun Tang, Pierre Thibault, and Robert K. Boyd. **Fragmentation reactions of multiply-protonated peptides and implications for sequencing by tandem mass spectrometry with low-energy collision-induced dissociation**. *Anal. Chem.*, **65**(20) :2824–2834, 1993.

[140] F. Rusconi. **massXpert 2 : a cross-platform software environment for polymer chemistry modelling and simulation/analysis of mass spectrometric data**. *Bioinformatics*, **25**(20) :2741–2742, September 2009.

[141] Sarah Sanglier, Cédric Atmanene, Guillaume Chevreux, and Alain Dorsselaer. **Nondenaturing Mass Spectrometry to Study Noncovalent Protein/Protein and Protein/Ligand Complexes : Technical Aspects and Application to the Determination of Binding Stoichiometries**. In Julie D. Thompson, Marius Ueffing, and Christine Schaeffer-Reiss, editors, *Functional Proteomics*, **484** of *Methods in Molecular Biology*, pages 217–243. Humana Press, 2008.

[142] Talat Yalcin and Alex G. Harrison. **Ion Chemistry of Protonated Lysine Derivatives**. *Journal of Mass Spectrometry*, **31**(11) :1237–1243, 1996.

[143] Hadi Lioe, Richard A.J O'Hair, and Gavin E Reid. % bf Gas-phase reactions of protonated tryptophan. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **15**(1) :65–76, January 2004.

[144] Z.B. Maksić and B. Kovačević. % bf Towards the absolute proton affinities of 20 α-amino acids. *Chemical Physics Letters*, **307**(5–6) :497–504, July 1999.

[145] Michelle M Kish and Chrys Wesdemiotis. % bf Selective cleavage at internal lysine residues in protonated vs. metalated peptides. *International Journal of Mass Spectrometry*, **227**(1) :191–203, May 2003.

[146] Richard D. Hiserodt, Sharon M. Brown, Dennis F.H. Swijter, Nicole Hawkins, and Cynthia J. Mussinan. % bf A Study of b1+H2O and b1-Ions in the Product Ion Spectra of Dipeptides Containing N-Terminal Basic Amino Acid Residues. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **18**(8) :1414–1422, August 2007.

[147] Francis O Talbot, Thibault Tabarin, Rodolphe Antoine, Michel Broyer, and Philippe Dugourd. **Photodissociation spectroscopy of trapped protonated tryptophan**. *The Journal of Chemical Physics*, **122**(7) :074310–074310–5, February 2005.

[148] H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, S. Martrenchard, G. Grégoire, C. Desfrançois, J.-P. Schermann, M. Barat, and J. A. Fayeton. **Photo-induced dissociation of protonated tryptophan TrpH+ : A direct dissociation channel in the excited states controls the hydrogen atom loss**. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **6**(10) :2628–2632, May 2004.

[149] Joshua A. Gregersen and František Tureček. **Mass-spectrometric and computational study of tryptophan radicals (Trp + H) ? produced by collisional electron transfer to protonated tryptophan in the gas phase**. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **12**(41) :13434–13447, October 2010.

[150] H. Kang, C. Jouvet, C. Dedonder-Lardeux, S. Martrenchard, C. Char-

rière, G. Grégoire, C. Desfrançois, J. P Schermann, M. Barat, and J. A Fayeton. **Photoinduced processes in protonated tryptamine**. *The Journal of Chemical Physics*, **122**(8) :084307–084307–7, February 2005.

[151] H. Kang, C. Jouvet, C. Dedonder-Lardeux, S. Martrenchard, G. Grégoire, C. Desfrançois, J.-P. Schermann, M. Barat, and J. A. Fayeton. **Ultrafast deactivation mechanisms of protonated aromatic amino acids following UV excitation**. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **7**(2) :394–398, December 2005.

[152] Gilles Grégoire, Christophe Jouvet, Claude Dedonder, and Andrzej L. Sobolewski. **Ab initio Study of the Excited-State Deactivation Pathways of Protonated Tryptophan and Tyrosine**. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**(19) :6223–6231, 2007.

[153] V. Lepère, B. Lucas, M. Barat, J. A Fayeton, V. J Picard, C. Jouvet, P. Çarçabal, I. Nielsen, C. Dedonder-Lardeux, G. Grégoire, and A. Fujii. **Comprehensive characterization of the photodissociation pathways of protonated tryptophan**. *The Journal of Chemical Physics*, **127**(13) :134313–134313–11, October 2007.

[154] U. Kadhane, M. Pérot, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, C. Jouvet, A. Ehlerding, M.-B.S. Kirketerp, S. Brøndsted Nielsen, J.A. Wyer, and H. Zettergren. % bf Photodissociation of protonated tryptamine and its supramolecular complex with 18-crown-6 ether : Dissociation times and channels, absorption spectra, and excited states calculations. *Chemical Physics Letters*, **480**(1–3) :57–61, September 2009.

[155] R. Antoine, M. Broyer, J. Chamot-Rooke, C. Dedonder, C. Desfrançois, P. Dugourd, G. Grégoire, C. Jouvet, D. Onidas, P. Poulain, T. Tabarin, and G. van der Rest. **Comparison of the fragmentation pattern induced by collisions, laser excitation and electron capture. Influence of the initial excitation**. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **20**(11) :1648–1652, 2006.

[156] M. Pérot, B. Lucas, M. Barat, J. A. Fayeton, and C. Jouvet. **Mechanisms of UV Photodissociation of Small Protonated Peptides†**. *J. Phys. Chem. A*, **114**(9) :3147–3156, 2009.

[157] Thibault Tabarin, Rodolphe Antoine, Michel Broyer, and Philippe Dugourd. **Specific photodissociation of peptides with multi-stage mass spectrometry**. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19**(20) :2883–2892, October 2005.

[158] Kevin D. Ballard and Simon J. Gaskell. **Dehydration of peptide [M + H]+ ions in the gas phase**. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **4**(6) :477–481, June 1993.

[159] E. Bombarda, H. Cherradi, N. Morellet, B. P. Roques, and Y. Mély. **Zn2+ Binding Properties of Single-Point Mutants of the C-Terminal Zinc Finger of the HIV-1 Nucleocapsid Protein : Evidence of a Critical Role of Cysteine 49 in Zn2+ Dissociation†**. *Biochemistry*, **41**(13) :4312–4320, 2002.