Chaines peptidiques modèles en détente supersonique : Refroidissement conformationnel, structures et dynamique des états excités étudiés par modélisation Monte-Carlo, spectroscopies laser et chimie quantique

Yohan Loquais

▶ **To cite this version:**

Yohan Loquais. Chaines peptidiques modèles en détente supersonique : Refroidissement conformationnel, structures et dynamique des états excités étudiés par modélisation Monte-Carlo, spectroscopies laser et chimie quantique. Chimie théorique et/ou physique. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : . tel-00847711v1

HAL Id: tel-00847711

https://theses.hal.science/tel-00847711v1

Submitted on 24 Jul 2013 (v1), last revised 6 Sep 2013 (v2)

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.

Comprendre le monde,
construire l'avenir®

N°d'ordre : 11091

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE DE CHIMIE (ED 470)
Laboratoire Francis Perrin (URA 2453)

***DISCIPLINE** : Chimie physique*

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 10/07/2013

par

Yohan LOQUAIS

Chaines peptidiques modèles en détente supersonique :

Refroidissement conformationnel, structures et dynamique des états excités étudiés par modélisation Monte-Carlo, spectroscopies laser et chimie quantique

Directeur de thèse :	Michel MONS	Directeur de recherche CEA

Composition du jury :

Président du jury :	Anne ZEHNACKER-RENTIEN	Directeur de recherche CNRS
Rapporteurs :	Gilles GREGOIRE	Chargé de recherche CNRS
	Florent CALVO	Directeur de recherche CNRS
Examinateurs :	Gilles OHANESSIAN	Directeur de recherche CNRS
	Rodolphe ANTOINE	Directeur de recherche CNRS
Membre invité :	Eric GLOAGUEN	Chargé de recherche CNRS

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué dans le Laboratoire Francis Perrin (LFP), au sein du Service des Photons, Atomes et Molécules (SPAM) du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives de Saclay. Je souhaite remercier leurs directrices respectives, Dimitra Markovitsi (LFP) et Cécile Reynaud (SPAM), de leur accueil.

Je remercie Messieurs Gilles Grégoire et Florent Calvo d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et de l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. J'adresse également mes remerciements à Madame Anne Zehnacker-Rentien et Messieurs Gilles Ohanessian et Rodolphe Antoine qui ont eu l'amabilité de juger ce travail et de participer au jury.

Je tiens à adresser mes plus chaleureux remerciements à mon directeur de thèse, Michel Mons, et mon correspondant CEA, Eric Gloaguen. Je suis ravi d'avoir eu l'occasion de travailler en leur compagnie. Je leur suis très reconnaissant pour leur disponibilité, leurs qualités pédagogiques et scientifiques, leur franchise et leur sympathie. J'ai beaucoup appris à leurs côtés et je leur adresse ma gratitude pour tout cela.

Je souhaite remercier plus généralement l'ensemble du groupe Structures Biomoléculaires et les personnes que j'ai eu la chance de côtoyer au LFP, pour l'ambiance de travail agréable durant ces trois années et demie : Benjamin (pour tous ses conseils et pour m'avoir fait découvrir le Côté Obscur du 522), Valérie, Manuela (pour ces instants de détente et les moments partagés aux Diablerets et à Columbus), François, Himansu, Richard et Mohammad.

Cette thèse a été l'occasion de participer à de nombreuses collaborations. Je remercie l'équipe du FOM (Rijnhuizen, Pays-Bas) et plus particulièrement Anouk Rijs de leur accueil sur le laser à électrons FELIX. Je remercie Christophe Jouvet et Michel Broquier pour le soutien apporté lors des expériences au CLUPS (Université Paris-Sud, Orsay). Je tiens enfin à remercier Nađa Došlić, Ivan Ljubić et Momir Mališ de l'Institut Ruđer Bošković (Zagreb, Croatie) pour toutes leurs contributions à ces travaux.

Je remercie Loreynne Pinsard-Gaudart, Karine Steenkeste et Lionel Amiaud, responsables des unités d'enseignements dans lesquelles j'ai effectué mon monitorat à l'Université Paris-Sud, de leur accueil et de la confiance qu'ils m'ont accordée.

Je remercie ma voisine de bus, Aurélie, pour sa gentillesse et pour avoir contribué par sa présence à rendre les trajets vers le CEA un peu moins longs.

Enfin, je remercie très chaleureusement ma famille de leur soutien et de leurs encouragements.

Table des matières

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 9

1.1 NIVEAUX D'ORGANISATION D'UNE PROTEINE 12

1.1.1 Structure primaire 12

1.1.2 Flexibilité et interactions intramoléculaires 13

1.1.3 Structure secondaire 15

1.1.4 Structures tertiaire et quaternaire 17

1.2 CARACTERISATION DES STRUCTURES DE PROTEINES 18

1.3 PREDICTION DES STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES DES PROTEINES 20

1.4 SPECTROSCOPIE DE BIOMOLECULES EN PHASE GAZEUSE 21

1.5 MOTIVATIONS ET STRATEGIES D'ETUDE 23

1.5.1 Etude structurale 23

1.5.2 Etudes de dynamiques électroniques 26

1.6 BIBLIOGRAPHIE 27

CHAPITRE 2 METHODOLOGIES 31

2.1 METHODES SPECTROSCOPIQUES 33

2.1.1 Spectroscopie électronique : Ionisation résonante à deux photons à une couleur (IR2P-1C) 34

2.1.2 Spectroscopie vibrationnelle : Double résonance IR-UV 35

2.1.3 Mesures des durées de vie des états excités 36

2.2 DISPOSITIF EXPERIMENTAL 38

2.2.1 Production de biomolécules en phase gazeuse 39

2.2.2 Systèmes lasers 41

2.2.3 Détecteurs 45

2.2.4 Synchronisation 47

2.2.5 Acquisition 48

2.3 METHODES DE CALCULS 49

2.3.1 Détermination de structures 50

2.3.2 Etude des mécanismes de relaxation de l'énergie électronique 53

2.4 BIBLIOGRAPHIE 55

CHAPITRE 3 MODELISATION DU REFROIDISSEMENT CONFORMATIONNEL DANS UNE DETENTE SUPERSONIQUE 59

3.1 PROBLEMATIQUE : ETUDE CONFORMATIONNELLE DU DIPEPTIDE PROTEGE AC-ALA-ALA-OBN 62
3.2 DESCRIPTION GENERALE DU MODELE 65
3.2.1 Principe 66
3.2.2 Détente supersonique 66
3.2.3 Molécule-test 71
3.3 TRAITEMENT DES COLLISIONS 73
3.3.1 Probabilité de collision 74
3.3.2 Redistribution de l'énergie de collision 75
3.3.3 Vitesses après collision 81
3.3.4 Application au refroidissement de peptides dans une détente supersonique 82
3.3.5 Probabilité d'agrégation 84
3.4 TRAITEMENT DES ISOMERISATIONS 87
3.4.1 Probabilité d'un changement de conformation 87
3.4.2 Applications 89
3.5 PERSPECTIVES 100
3.6 BIBLIOGRAPHIE 101

CHAPITRE 4 ETUDE CONFORMATIONNELLE DE SYSTEMES BIOLOGIQUES MODELES PAR SPECTROSCOPIE DE DOUBLE RESONANCE IR/UV EN PHASE GAZEUSE 103

4.1 APPLICATION A L'ETUDE D'UNE CHAINE PEPTIDIQUE MODELE : LA PHENYLALANINE PROTEGEE 106
4.1.1 Intérêt de la sélectivité en conformation 106
4.1.2 Intérêt de la sélectivité en masse 109
4.2 MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-SOLVANT 112
4.2.1 Spectroscopie électronique 115
4.2.2 Exploration des géométries des complexes monohydratés 116
4.2.3 Spectroscopie vibrationnelle dans le proche IR 119
4.2.4 Attribution des structures 121
4.2.5 Modifications structurelles induite par la solvatation 124
4.2.6 Abondances relatives et dynamique de solvatation dans la détente supersonique 126
4.2.7 Spectroscopie vibrationnelle dans l'IR moyen et lointain 129
4.2.8 Conclusion 136
4.3 MODELISATION DES DOMAINES HYDROPHOBES DES PROTEINES 137
4.3.1 Structures adoptées en l'absence d'interactions ar-ar 139
4.3.2 Structures de peptides polyaromatiques 145
4.3.3 Conclusion 154

4.4 CONCLUSION DU CHAPITRE 4 155
4.5 BIBLIOGRAPHIE 156

CHAPITRE 5 DYNAMIQUE DE RELAXATION DE L'ENERGIE ELECTRONIQUE D'UN CHROMOPHORE AROMATIQUE DANS DE COURTES CHAINES PEPTIDIQUES 161

5.1 EFFET DE L'ENVIRONNEMENT DU CHROMOPHORE : EXEMPLE DE LA PHENYLALANINE PROTEGEE 164
5.1.1 Données expérimentales 166
5.1.2 A la recherche des mécanismes de relaxation non-radiatifs 171
5.1.3 Conclusion sur les dynamiques de relaxation des phénylalanines protégées 189
5.2 VERS DES SYSTEMES PLUS COMPLEXES 190
5.2.1 Peptides protégés Ac-Xxx-Phe-NH_2 190
5.2.2 Peptide protégé Ac-Phe-Ala-NH_2 195
5.2.3 Peptides microsolvatés 197
5.2.4 Conclusion 198
5.3 BIBLIOGRAPHIE 200

CONCLUSION GENERALE 203

ANNEXE A MODELE DE REFROIDISSEMENT CONFORMATIONNEL 211

A.1 PROCEDURE DE TIRAGE AU SORT PAR LA METHODE DE REJET 211
A.2 CALCUL DE LA VITESSE RELATIVE MOYENNE D'UNE MOLECULE-TEST PAR RAPPORT AUX ATOMES DE GAZ PORTEUR 213

ANNEXE B SPECTRES UV ET IR DE PEPTIDES PROTEGES 215

B.1 SPECTRES UV 215
B.1.1 Spectres des dipeptides Ac-Xxx-Phe-NH_2 dans le domaine spectral de l'origine de la première transition $\pi \rightarrow \pi^*$ 215
B.1.2 Intensités relatives des signaux d'IR2P-1C entre les conformations γ_L-γ_L et coudes β dans le domaine des transitions vibroniques $(6a)_0^1$ et $(6b)_0^1$ 216
B.2 SPECTRES IR PROCHE 217
B.2.1 Ac-Phe-NH_2 217
B.2.2 Ac-Gly-Phe-NHMe et Ac-Ala-Phe-NHMe 218
B.3 SPECTRES IR MOYEN ET LOINTAIN 219
B.3.1 Modes de vibration dans l'IR lointain et moyen 219
B.3.2 Spectres IR de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe monosolvatés 219
B.3.3 Comparaison des spectres théoriques des conformères C, W et X du complexe (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) . 222

B.3.4 Comparaison des fréquences harmoniques et anharmoniques du conformère X du complexe (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) *225*

ANNEXE C MECANISMES DE RELAXATION DE L'ENERGIE ELECTRONIQUE 227

C.1 MECANISME I 228

C.2 MECANISME II 229

C.2.1 Mécanisme II.b *229*

C.2.2 Energies et géométries des minimums des états excités des phénylalanines protégées *230*

C.3 MECANISME III 231

C.3.1 Mécanisme III.a *231*

C.3.2 Mécanisme III.b *231*

C.3.3 Mécanisme III.c *233*

ANNEXE D LISTE D'ABREVIATIONS 235

Chapitre 1

Introduction

Chapitre 1

Introduction

La famille des protéines regroupe un ensemble extrêmement vaste de molécules biologiques. Plus de 530 000 séquences de protéines ont ainsi été répertoriées dans la banque de données UniProt/Swiss-Prot en 2013 [1]. Chaque organisme vivant, des organismes unicellulaires les plus simples, comme les bactéries, aux organismes multicellulaires les plus complexes, utilisent des protéines pour assurer leur fonctionnement. Elles remplissent de nombreuses fonctions, très diverses, au sein de celui-ci. La protéine jaune photoactive initie par exemple un mouvement de la bactérie *Halorhodospira halophila* en réponse à une lumière bleue [2, 3] ; l'hémoglobine et la myoglobine sont deux protéines servant à transporter une molécule, le dioxygène, dans l'organisme des vertébrés [4, 5]; l'insuline est une protéine servant à transmettre un signal entre deux cellules éloignées [4]; les enzymes permettent de catalyser de nombreuses réactions chimiques … [6, 7, 8] L'intérêt porté aux protéines ne se limite cependant pas seulement à leurs fonctions biologiques. Les propriétés photophysiques particulières des protéines fluorescentes ont par exemple favorisé un développement important des techniques d'imagerie *in vivo* en permettant de localiser des protéines, de suivre leur mouvement ou encore leurs interactions avec d'autres protéines, et ce à l'échelle d'une cellule ou d'un organisme (Figure 1.1) [9, 10, 11].

Les protéines ont pour propriété d'être des molécules flexibles. Le nombre de conformations qu'une protéine peut adopter augmente très rapidement en fonction de la taille de celle-ci. Or la fonction biologique d'une protéine dépend considérablement de sa structure tridimensionnelle, de l'agencement spatial des différents groupements qui la composent [4]. Seule une protéine qui se replie correctement pourra assurer cette fonction. A l'opposé, le repliement de protéines selon une autre conformation, leur conférant de surcroît une probabilité plus élevée de s'agréger, peut avoir des conséquences dramatiques. Un nombre croissant de

maladies, incluant la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Creutzfeldt-Jakob ou le diabète de type II sont directement associées au dépôt de ces agrégats dans les tissus du cerveau, du cœur ou de la rate [12, 13]. Pour arriver à comprendre, à décrire, voire à contrôler les mécanismes d'action des protéines au niveau moléculaire, il est donc nécessaire de détailler leur structure et d'identifier les différentes interactions physico-chimiques responsables de celles-ci.

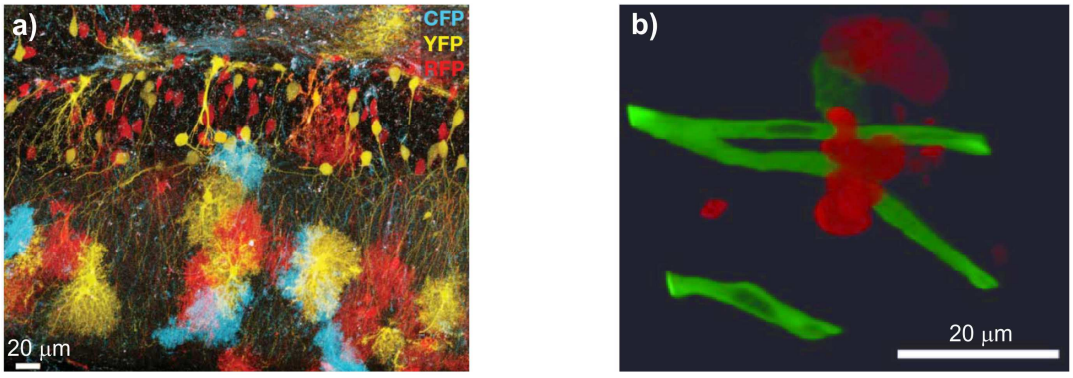


Fig. 1.1 *– Images de cellules révélées par des protéines fluorescentes. a) Cellules de l'hippocampe d'une souris, modifiées génétiquement afin de produire aléatoirement différentes quantités de trois protéines fluorescentes : CFP (cyan), YFP (jaune) et RFP (rouge) [10]. b) Cellules tumorales humaines se développant autour d'un vaisseau sanguin, respectivement marquées par les protéines DsRed (rouge) et GFP (vert). [11]*

1.1 Niveaux d'organisation d'une protéine

1.1.1 Structure primaire

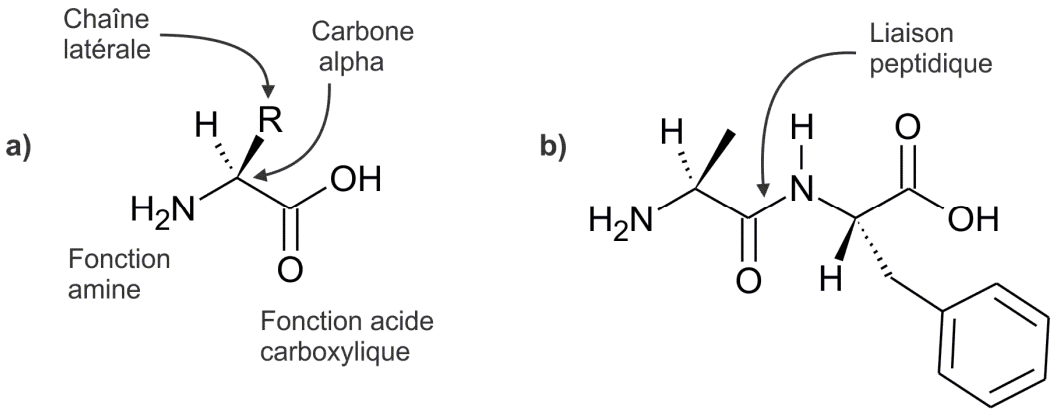


Fig. 1.2 *– a) Schéma d'un acide aminé. Le carbone alpha central est asymétrique et de stéréochimie L selon la projection de Fischer, excepté pour la glycine qui est achirale car la chaîne latérale est constituée d'un seul atome d'hydrogène. b) Schéma d'un polypeptide constitué de deux acides aminés : une alanine (R = Me) et une phénylalanine (R = CH_2-Ph).*

Une protéine est un polymère, constitué d'une ou plusieurs chaînes linéaires, dont les unités monomériques correspondent à des acides α-aminés. Ces acides aminés sont des molécules organiques de formule générale NH_2-CHR-COOH, comprenant un atome de carbone noté C_α, le plus souvent asymétrique et de configuration L, auquel sont liés une fonction amine -NH_2, une fonction acide carboxylique -COOH, un groupement R appelé chaîne latérale, et un atome d'hydrogène (Figure 1.2). Des réactions successives de condensation se produisent entre les fonctions amine et acide carboxylique d'acides aminés différents, conduisant à la formation de polypeptides. Dans une telle molécule, les acides aminés sont alors reliés entre eux par des liaisons amide -CO-NH- appelées liaisons peptidiques. Lorsque le nombre d'acides aminés constituant un polypeptide dépasse typiquement 50, celui-ci est plus généralement désigné sous le nom de protéine. La structure primaire d'une protéine correspond à l'enchaînement linéaire des acides aminés composant une chaîne polypeptidique.

1.1.2 Flexibilité et interactions intramoléculaires

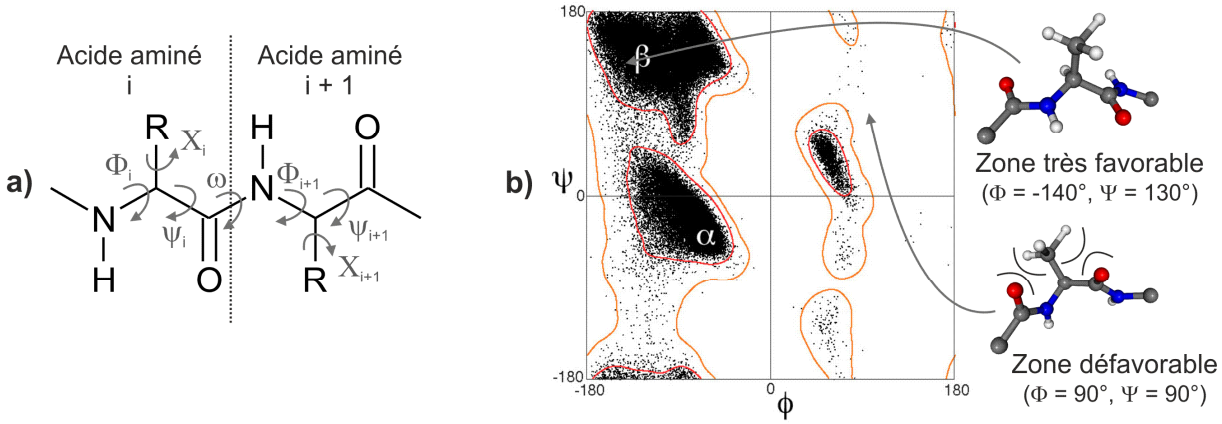


Fig. 1.3 – *a) Angles dièdres Φ, Ψ, X et ω définissant la conformation d'une chaîne peptidique. b) Diagramme de Ramachandran tiré de la Réf. [14] représentant environ 100 000 couples (Φ, Ψ) d'acides aminés, autres que la glycine et la proline, observés expérimentalement dans 500 structures de protéines. Les zones très favorables et favorables sont respectivement encerclées en rouge et en orange, les zones blanches correspondent aux régions défavorables.*

Le caractère flexible d'une protéine est dû aux rotations possibles autour des nombreuses liaisons simples qui constituent la chaîne d'acides aminés. Ces rotations sont décrites par les angles dièdres Φ, Ψ et ω qui correspondent respectivement aux angles C-N-C_α-C, N-C_α-C-N et C_α-C-N-C_α (Figure 1.3a). La délocalisation des électrons π de la liaison peptidique C-N, impliquant le doublet non-liant de l'atome d'azote et la double liaison C=O, entraîne sa planéité.

L'angle dièdre ω ne peut donc prendre que des valeurs proches de 0° (configuration cis) ou de 180° (configuration trans). Les barrières de rotation autour des autres liaisons simples étant beaucoup plus faibles, les angles Φ et Ψ peuvent prendre des valeurs comprises entre -180° et +180°. En considérant les atomes comme des sphères dures dont la dimension correspond à leur rayon de van der Waals et en variant les valeurs des angles Φ et Ψ dans l'intervalle [-180°, 180°], Ramachandran a établi une carte donnant les couples d'angles dièdres compatibles en termes de gêne stérique, prenant le nom de diagramme de Ramachandran [15]. Ce diagramme peut être divisé en trois régions principales (Figure 1.3b) : les régions très favorables, les régions favorables et les régions défavorables. Les régions très favorables et favorables correspondent aux valeurs des couples (Φ, Ψ) les plus souvent observées dans les protéines. Les régions restantes représentent les couples (Φ, Ψ) qui sont énergétiquement défavorables et par conséquent rarement observés, souvent parce qu'ils sont la cause d'une gêne stérique importante.

Le repliement d'une protéine ne résulte pas seulement d'une minimisation de l'encombrement stérique ; de nombreuses autres interactions stabilisantes ou déstabilisantes, intramoléculaires et intermoléculaires, y participent également. Parmi les plus importantes de ces interactions, on peut citer les liaisons hydrogène, stabilisantes (Figure 1.4). Les interactions de van der Waals permettent aussi de stabiliser les structures repliées des protéines, où les atomes sont proches les uns des autres. Si la protéine contient des acides aminés chargés, des interactions électrostatiques peuvent également attirer ou repousser des fragments de celle-ci.

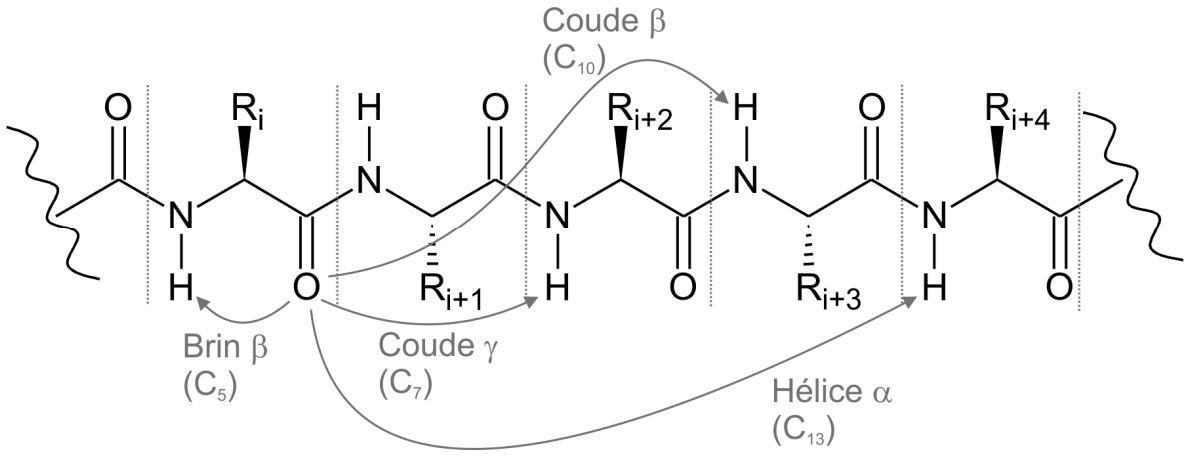


Fig. 1.4 – *Exemples de liaisons hydrogène N-H···O possibles au sein d'une chaîne peptidique et de structures secondaires contenant ces interactions (on note C_n une liaison hydrogène formant un cycle à n atomes).*

1.1.3 Structure secondaire

La structure secondaire correspond à des motifs remarquables et récurrents dans les protéines : les hélices, les feuillets et les coudes (Figure 1.5 et 1.6). Les configurations en hélice α et en feuillet β sont les formes quasi périodiques les plus courantes dans les protéines. Les coudes sont des structures non périodiques qui permettent un changement de direction de la chaîne peptidique. Un bref aperçu de diverses structures secondaires est donné ci-après.

Une **hélice α** est caractérisée par la répétition de liaisons hydrogène entre le groupement C=O d'un acide aminé en position i et le groupement N-H d'un acide aminé en position i+4, notées liaisons CO(i)→NH(i+4) (Figure 1.4). Chaque liaison hydrogène ferme alors un cycle à 13 atomes. Les chaînes latérales sont à l'extérieur de l'hélice et orientées en direction de l'extrémité N-terminale. La zone du diagramme de Ramachandran des hélices α correspond aux angles dièdres (Φ, Ψ) autour de (-45°, -55°) [16].

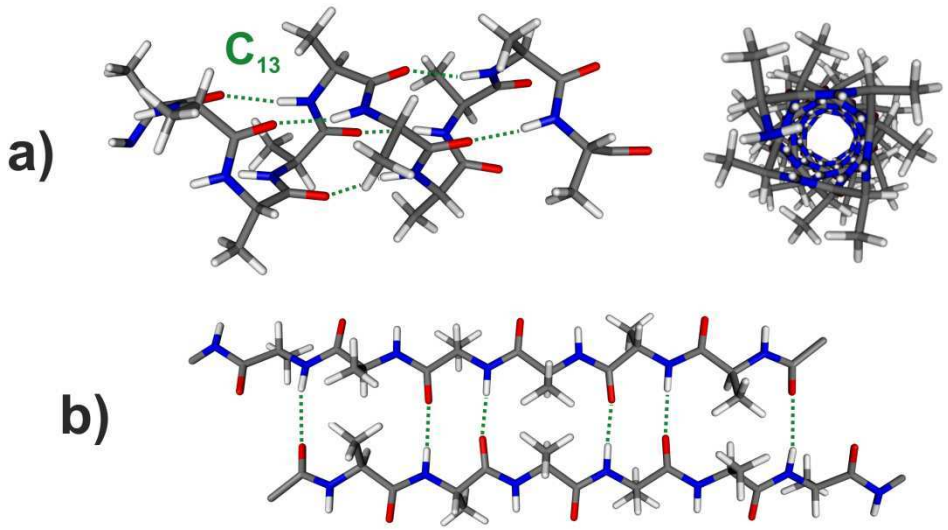


Fig. 1.5 – *Schémas de structures secondaires quasi périodiques d'acides aminés alanines et de leur réseau de liaisons hydrogène : a) hélices α, b) feuillet β antiparallèle.*

Lorsque les valeurs adoptées par les angles (Φ, Ψ) sont proches de (- 140°, 130°), la chaîne peptidique présente des interactions notées C_5 entre les groupements CO et NH d'un même acide aminé. Ces interactions sont relativement faibles car l'angle N-H···O est proche de 105°, loin de l'angle idéal pour une liaison hydrogène qui est de 180°. Une chaîne constituée par une répétition d'interactions C_5 est appelée brin β. L'agencement relatif de plusieurs brins β par la formation de liaisons hydrogène entre brins parallèles ou antiparallèles constitue un **feuillet β**.

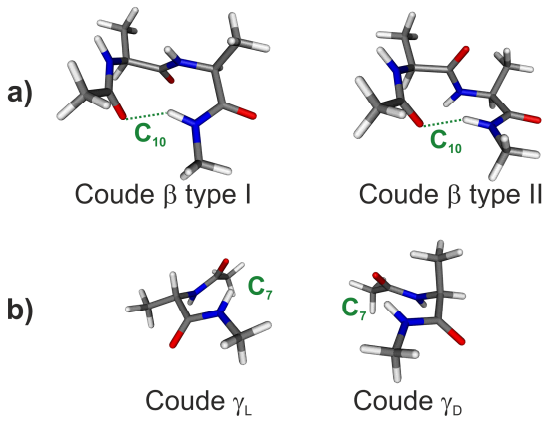


Fig. 1.6 – *Schéma des structures secondaires coudes β et γ. a) Exemples de coudes β de type I et II. Les acides aminés en position i et i+3 sont respectivement mimés par un groupement acétyle (CH_3CO-) et un groupement méthylamide (-$NHCH_3$). b) Exemples de coudes γ_L et γ_D. Les acides aminés en position i et i+2 sont respectivement mimés par un groupement acétyle et un groupement méthylamide.*

Il existe, par ailleurs, deux catégories principales de coudes, β et γ, différant par la nature des liaisons hydrogène formées (Figure 1.6). Les **coudes β**, les plus courants dans les protéines, sont définis par une liaison hydrogène CO(i)→NH(i+3) impliquant quatre acides aminés dans un cycle à 10 atomes. Les coudes β, aussi notés C_{10}, se retrouvent par exemple dans les structures dites en épingles à cheveux (*β hairpin*), où ils permettent de relier entre eux deux brins β. Suivant la valeur des angles dièdres Φ et Ψ des acides aminés en position i+1 et i+2, les coudes β sont classés dans cinq types principaux : I, II, III, VIa et VIb (Tableau 1.1) [16]. Les coudes β de type I' et II' sont respectivement les images des coudes de type I et II dans un miroir et possèdent donc des angles de torsions Φ et Ψ de signes opposés.

Type de coude β	Acide aminé i+1		Acide aminé i+2	
	Φ	Ψ	Φ	Ψ
Type I	- 60	- 30	- 90	0
Type I'	60	30	90	0
Type II	- 60	120	80	0
Type II'	60	- 120	- 80	0
Type III	- 60	- 30	- 60	- 30
Type VIa	- 60	120	- 90	0
Type VIb	- 120	120	- 60	0

Tab. 1.1 – *Angles dièdres typiques (en degrés) des acides aminés en position i+1 et i+2 dans les principaux types de coudes β*

Les **coudes γ** sont caractérisés par une liaison hydrogène CO(i)→NH(i+2) impliquant trois acides aminés dans un cycle à 7 atomes. Cette structure est communément appelée C_7. On distingue deux types de coudes γ, images l'un de l'autre dans un miroir : le coude γ_D et le coude γ_L pour lesquels la chaîne latérale de l'acide aminé en position i+1 est respectivement situé en position axiale et en position équatoriale par rapport au cycle à 7 atomes. Les structures typiques γ_D et γ_L sont respectivement définies par les couples (Φ, Ψ) (80°, -60°) et (-80°, 60°).

1.1.4 Structures tertiaire et quaternaire

La structure tertiaire d'une protéine correspond à l'agencement relatif des différentes structures secondaires (Figure 1.7). La structure quaternaire résulte de l'association d'au moins deux chaînes polypeptidiques, identiques ou différentes, par des liaisons non covalentes. L'hémoglobine est ainsi une protéine dont la structure quaternaire est constituée de quatre chaînes distinctes d'acides aminés : deux chaines appelées alpha (A et C, en bleu sur la Figure 1.7) et deux chaines beta (B et D, en rouge).

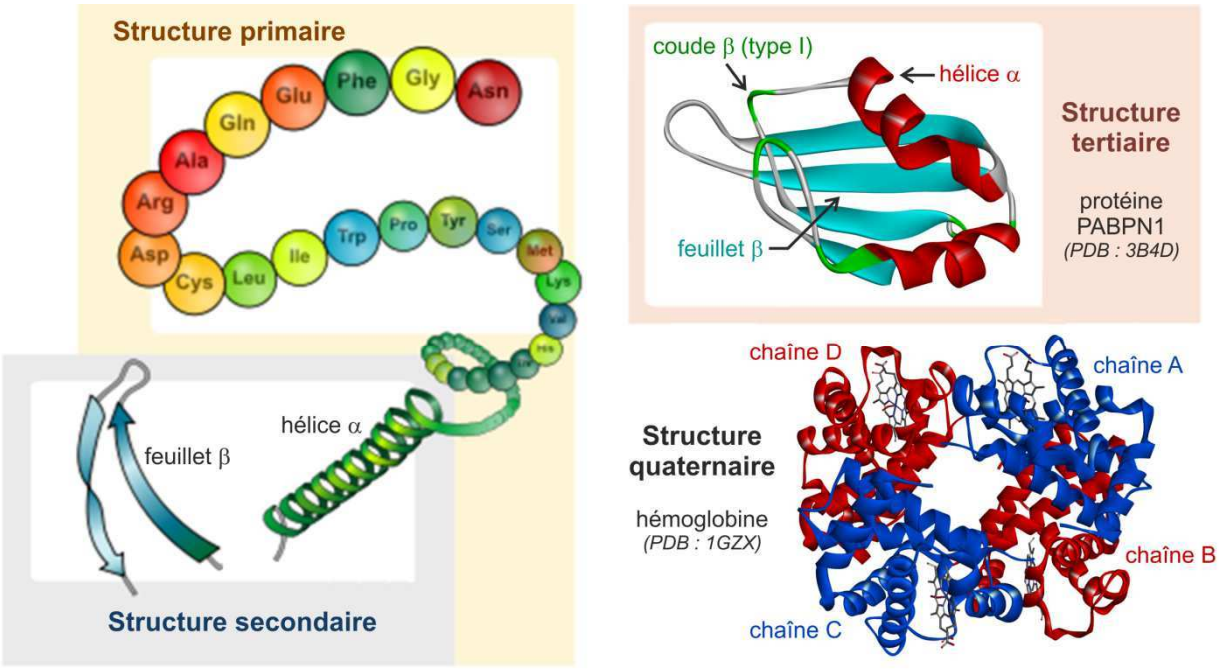


Fig. 1.7 *- Schéma des structures primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire d'une protéine. Les structures de la protéine PABPN1 et de l'hémoglobine sont respectivement tirées des Réf. [17] et [18].*

1.2 Caractérisation des structures de protéines

Les premières structures de protéines ont été déterminées il y a une soixantaine d'années. Plusieurs techniques expérimentales ont été développées depuis dans l'objectif de caractériser les différentes niveaux d'organisation de ces systèmes.

On appelle séquençage la détermination de la structure primaire d'une protéine. Le premier séquençage d'une protéine, l'insuline, a été réalisé au début des années 1950 par Frederik Sanger et ses collègues de l'Université de Cambridge. Ils ont utilisé pour cela des enzymes, d'autres protéines, permettant d'hydrolyser partiellement l'insuline en cassant les chaînes d'acides aminés à des positions spécifiques. Les fragments obtenus ont été séparés par chromatographie puis identifiés après réaction avec du 2,4 fluorodinitrobenzene [19]. Il fallut néanmoins plusieurs années avant de reconstituer la structure primaire de l'insuline. Ces travaux ont été récompensés du prix Nobel de Chimie en 1958. Depuis, les techniques expérimentales utilisées (chromatographie, spectrométrie de masse) ont été largement automatisées et plus de 100 000 séquences de protéines ont été identifiées [1].

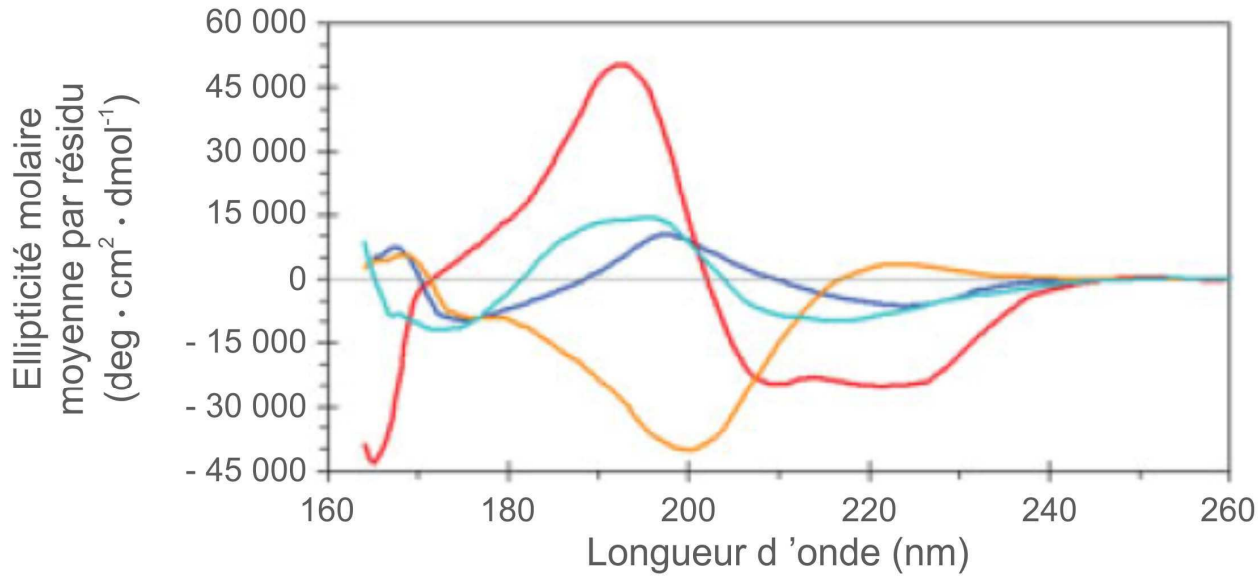


Fig. 1.8 – *Spectres de dichroïsme circulaire d'une protéine possédant majoritairement des structures en hélices α, la myoglobine (en rouge), de deux protéines possédant majoritairement des structures en feuillet β, la concanavaline A (en bleu) et la β-lactoglobuline (en cyan) et enfin du collagène (orange), tiré de la Réf. [20]*

Les protéines étant constituées d'acides aminés majoritairement chiraux, elles possèdent donc généralement un pouvoir rotatoire et présentent des bandes d'absorption en dichroïsme circulaire. Il a de plus été démontré que la présence de structures secondaires définies pour une

protéine avait une influence sur la position de ces bandes d'absorption [20, 21]. Les spectres de dichroïsme circulaire, réalisés en solution, permettent ainsi d'estimer les proportions d'une protéine dans les structures en hélice α, en feuillet β, en coudes et en structure aléatoire (Figure 1.8). Cette technique expérimentale est un outil puissant pour étudier les changements de conformation d'une protéine en fonction de paramètres comme la température ou la concentration d'un sel en solution. Elle ne fournit cependant pas d'informations sur l'arrangement relatif des structures secondaires. Pour pouvoir déconvoluer les contributions des différentes structures secondaires au spectre de dichroïsme circulaire il a donc fallu posséder des méthodes de détermination des structures tertiaires et quaternaire des protéines.

Les deux méthodes les plus utilisées pour obtenir ces structures tridimensionnelles sont la diffraction des rayons X de cristaux et la résonance magnétique nucléaire (RMN) de protéines en solution. Elles représentent respectivement 88,8% et 10,5% des 80 000 structures de protéines déposées dans la Protein Data Bank (PDB) en 2013. L'étape limitante de la détermination des structures de protéines par diffraction de rayons X est la production de cristaux de qualité suffisante. Les protéines membranaires par exemple sont difficiles à cristalliser en raison de leur caractère hydrophobe et sont donc peu présentes dans la PDB [22]. Il faut en outre souligner que cette méthode ne donne pas accès à la position des atomes d'hydrogène dans la structure et donc, notamment, pas à l'état de protonation des acides aminés. La position des atomes d'hydrogène peut être déterminée par de la diffraction des neutrons mais comparée à la diffraction des rayons X cette méthode est encore peu employée à cause du nombre limité de sources de neutrons ainsi que de leur flux assez faible, ce qui rend nécessaire des cristaux de plus grande taille donc encore plus difficiles à produire [23]. Pour s'affranchir de l'étape de cristallisation, la structure tridimensionnelle des protéines peut être obtenue par de la RMN en solution. Cette méthode est cependant limitée à l'étude de petites protéines. Alors que la PDB contient plusieurs dizaines de structures de protéines de taille supérieure à 10 000 acides aminés obtenues par la méthode de diffraction des rayons X, elle n'en contient actuellement que sept de taille supérieure à 1 000 acides aminés obtenue par RMN. Due à ces difficultés expérimentales, la fraction des protéines dont la structure primaire est connue pour laquelle une structure tridimensionnelle est disponible est actuellement inférieure à 1 pour 1000 [24]. Pour accélérer la détermination des structures des protéines restantes, de nombreuses personnes travaillent à la mise au point d'outils théoriques visant à prédire le repliement d'une protéine uniquement à partir de sa séquence d'aminés.

1.3 Prédiction des structures tridimensionnelles des protéines

Depuis 1994, une compétition baptisée CASP (Critical Assessment of protein Structure Prediction) est organisée tous les deux ans au cours de laquelle des algorithmes de prédiction de structures tridimensionnelles de protéines, développés par près de 250 groupes de recherche différents à travers le monde, sont confrontés à une centaine de protéines dont les structures sont connues des organisateurs mais pas des participants [24]. Les algorithmes donnant les meilleurs résultats lors des dernières compétitions fonctionnent tous par homologie, selon le principe que des séquences d'acides aminés similaires conduisent à des structures similaires. Les structures sont alors déterminées en comparant les séquences d'acides aminés des protéines cibles, ou des fragments de leur séquence, à celles déjà contenues dans la Protein Data Bank. Les meilleures de ces méthodes ont ainsi pu prédire jusqu'à 10% des structures des protéines de la dernière compétition, CASP9, avec une précision suffisante pour être utilisables dans des études de mécanismes biologiques (Figure 1.9). Malgré ces bons résultats, les méthodes par homologie auront toujours des difficultés à prédire les structures de protéines dont peu d'exemples sont connus, comme les protéines membranaires, ou les structures de protéines intrinsèquement désordonnées.

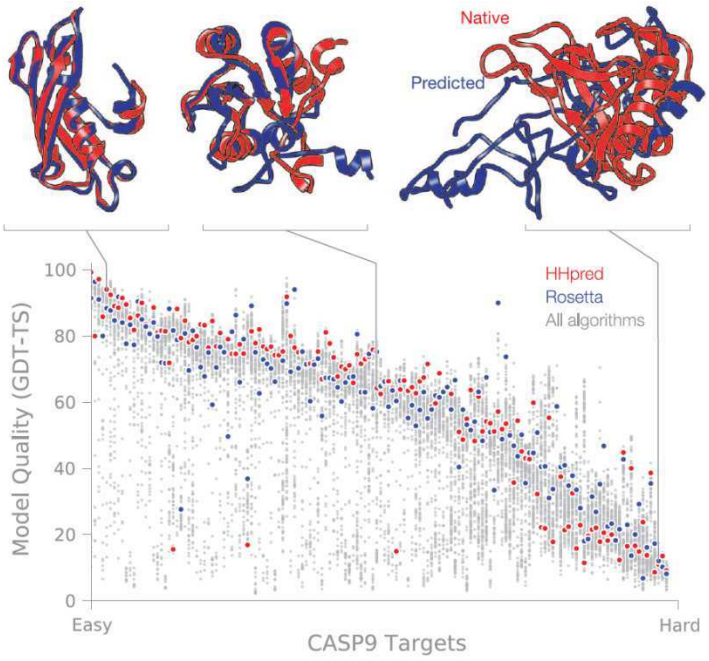


Fig. 1.9 – *Tracé de la qualité des prédictions des différents algorithmes lors du CASP9 en 2010 en fonction de la difficulté des protéines cibles (une qualité de 100 correspond à une structure où tous les acides aminés ont été prédits à la bonne position). Les performances des deux meilleurs algorithmes HHPred et Rosetta sont respectivement indiqués en rouge et en bleu sur le graphique. En haut de la figure, les meilleures prédictions de trois protéines de degré de difficulté allant de facile, intermédiaire à difficile (bleu) sont superposées aux structures expérimentales (rouge). Figure tirée de la Réf. [25].*

Une autre approche théorique pour prédire les structures de protéines consiste à modéliser les interactions covalentes et non-covalentes entre atomes. Comme les caractéristiques de ces interactions sont identiques d'une protéine à une autre, cette approche présente l'avantage par rapport aux méthodes par homologie de ne pas être limitée par le nombre de structures différentes disponibles dans les banques de données. Au-delà de la prédiction de la structure d'une protéine à l'équilibre, une description correcte des interactions non covalentes est aussi indispensable à l'étude de protéines en mouvement, au calcul de constantes d'affinité entre protéines et ligands ou encore à la détermination de la propension de certaines conformations de protéines à former des agrégats. Les champs de force sont un exemple de méthode utilisant cette approche, où l'énergie potentielle d'un système est décrite par une somme de fonctions mathématiques (potentiels) et de paramètres représentant les contributions des différentes interactions. La structure la plus probable d'une protéine peut ensuite être obtenue en cherchant celle pour laquelle l'énergie potentielle sera minimale. La précision des résultats donnés par ces méthodes dépend donc fortement des fonctions et paramètres utilisés. Ces derniers sont généralement optimisés sur des molécules organiques simples par comparaison avec des calculs précis en mécanique quantique ou des données expérimentales. Dans ce cadre, les études spectroscopiques de systèmes biologiques en phase gazeuse sont un moyen de choix d'apporter ces informations. En isolant ces systèmes et en s'affranchissant des effets d'environnement, elles permettent d'obtenir des résultats directement comparables aux données théoriques.

1.4 Spectroscopie de biomolécules en phase gazeuse

A pression et à température ambiante, les peptides et les protéines sont à l'état solide. Des alternatives au simple chauffage de ces espèces fragiles ont été développées afin de transférer ces dernières en phase gazeuse en limitant leur décomposition. La technique de désorption laser permet de produire des biomolécules neutres à l'état gazeux [26]. Les techniques de désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) [27] et d'ionisation par électronébuliseur (ESI, de l'anglais *Electrospray Ionization*) [28] sont les plus courantes pour la production d'ions.

Les techniques spectroscopiques utilisées ensuite varient selon la taille des systèmes étudiés. Les plus gros systèmes, des protéines contenant jusqu'à plusieurs dizaines, voire centaines d'acides aminés, sont produits en phase gazeuse sous forme ionique (par MALDI ou ESI). La fragmentation de protéines après excitation optique ou par collisions peut être étudiée par spectrométrie de masse [29, 30, 31, 32]. La technique de mobilité ionique, qui mesure la

vitesse de déplacement d'un ion en présence d'un champ électrique dans un tube contenant un gaz tampon, permet de différencier les structures repliées des structures étendues mais ne donne pas accès à la structure précise d'une espèce [33, 34, 35].

Les premiers spectres électroniques d'acides aminés aromatiques isolés en phase gazeuse (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) ont été enregistrés par le groupe de Levy dans les années 1980, grâce à la technique spectroscopique d'ionisation résonante à deux photons [36, 37]. Ces spectres présentaient de nombreuses structures dues à des bandes vibroniques et à la présence de plusieurs conformères. Le nombre de conformères a pu être déterminé par la suite par des méthodes de saturation [36], de fluorescence dispersée [38] et de dépopulation UV-UV [39]. Ces techniques ne permettent cependant pas d'accéder à la structure des espèces observées.

Des informations structurales peuvent en revanche être obtenues par spectroscopie vibrationnelle dans le domaine de l'infrarouge. En effet, les fréquences de vibration des liaisons C=O et N-H sont particulièrement sensibles aux liaisons hydrogène et permettent de localiser les positions de celles-ci dans la molécule. La spectroscopie de double résonance IR-UV est une technique très utilisée pour enregistrer des spectres de vibration, elle présente l'avantage d'être sélective en conformation mais nécessite la présence d'un chromophore UV. Elle a été appliquée à la détermination de structures de peptides neutres ou ioniques contenant jusqu'à une dizaine d'acides aminés [40, 41, 42, 43] et de leurs hydrates [44, 45]. C'est la technique que nous avons employée dans nos travaux et dont le principe sera détaillé au Chapitre 2. Les spectres de vibration de peptides chargés ou de peptides complexés par des ions peuvent être enregistrés sans besoin d'un chromophore UV grâce à la technique de dissociation multiphotonique IR (IRMPD, de l'anglais *IR Multiphoton Dissociation*) [46, 47]. Cette méthode fait appel à un processus de fragmentation qui résulte de l'absorption successive de photons IR suivie d'une redistribution intramoléculaire de l'énergie vibrationnelle permettant d'atteindre la limite de dissociation du système. L'apparition de fragments en fonction de l'énergie des photons IR est ensuite détectée dans un spectromètre de masse. Mais la température des ions formés par cette méthode conduit souvent à des spectres complexes dus aux contributions des différentes conformations peuplées.

La spectroscopie micro-onde permet de remonter aux constantes rotationnelles d'un système et ainsi de déterminer précisément la géométrie des conformations observées, par comparaison à des constantes rotationnelles de structures calculées. Cette technique est cependant limitée aux systèmes de petite taille, de molécules modèles d'une liaison peptidique constituées de quelques atomes jusqu'à de simples acides aminés [48, 49, 50].

1.5 Motivations et stratégies d'étude

Ce travail a un objectif double : d'un côté étudier la diversité conformationnelle de petites chaînes peptidiques, dans le but d'obtenir des informations sur les interactions intra- et inter-moléculaires intervenant dans ces systèmes, et de l'autre documenter leur dynamique électronique et notamment la dépendance de cette dernière avec leur structure. Dans les deux cas, la phase gazeuse offre une approche élégante pour traiter ces questions en isolant les molécules que l'on souhaite étudier et en contrôlant de façon aussi soignée que possible des paramètres tels que leurs températures rotationnelle et vibrationnelle ou leur degré de solvatation. Elle présente également l'immense avantage d'une comparaison rapide avec la théorie.

1.5.1 Etude structurale

Dans l'objectif d'affiner les modèles d'interactions intra- et intermoléculaires typiques des protéines, nous avons cherché à isoler et à caractériser les conformations (les structures secondaires) les plus stables adoptées par des chaînes peptidiques en phase gazeuse. Nous avons employé pour cela des techniques de spectroscopie laser associées à des calculs de chimie quantique, que nous avons appliquées à des systèmes modèles mimant des fragments de protéines. Les systèmes choisis sont des peptides dits protégés car leurs extrémités ont été chimiquement modifiées afin de ne pas perturber le repliement de la chaîne. En effet, à cause du nombre réduit d'acides aminés dans les peptides étudiés comparé à celui dans une protéine, les groupements terminaux -NH_2 et -COOH des acides aminés naturels pourraient être à l'origine d'interactions et de structures secondaires non pertinentes du point de vue de l'étude des chaînes de protéines. Par conséquent, l'extrémité N-terminale a été protégée par un groupement acétyle (Ac : CH_3-CO-) et l'extrémité C-terminale a été protégée soit par un groupement amine (-NH_2), un groupement méthylamine (-NH-CH_3, noté aussi -NHMe) ou encore un groupement benzyle (-CH_2-C_6H_5, noté aussi -CH_2-Ph ou -Bn). Un peptide constitué de deux acides aminés et protégé à ses deux extrémités contient donc trois liaisons peptidiques (Figure 1.10). Selon les auteurs, il est considéré comme un *dipeptide* (ce qui *stricto sensu* est une appellation impropre) ou un *modèle de tripeptide* (chaque protection jouant le rôle d'un « demi » - résidu). Dans la suite du manuscrit, le terme *dipeptide protégé* sera employé pour faire référence à un tel système.

La stratégie expérimentale sélectionnée consiste dans un premier temps à vaporiser les peptides protégés par une technique de désorption laser, couplée à une détente supersonique pour

refroidir ces molécules flexibles et les piéger dans leurs conformations de plus basses énergies [51]. Des techniques de spectroscopie laser seront ensuite utilisées pour caractériser ces conformations. La technique d'ionisation résonante à deux photons à une couleur (IR2P-1C) permettra d'accéder à la signature électronique des systèmes étudiés. Cette méthode d'ionisation présentera l'avantage d'apporter par la suite une sélectivité conformationnelle entre les différentes structures d'un peptide présentes en phase gazeuse. Le choix de réaliser des spectres d'action est aussi justifié par la plus grande sensibilité de la mesure d'une quantité d'ions formée, par rapport à la variation d'une intensité lumineuse en spectroscopie d'absorption classique. Les signatures vibrationnelles des différents conformères d'un peptide seront obtenues sélectivement par la mise en œuvre de la spectroscopie de double-résonance IR-UV.

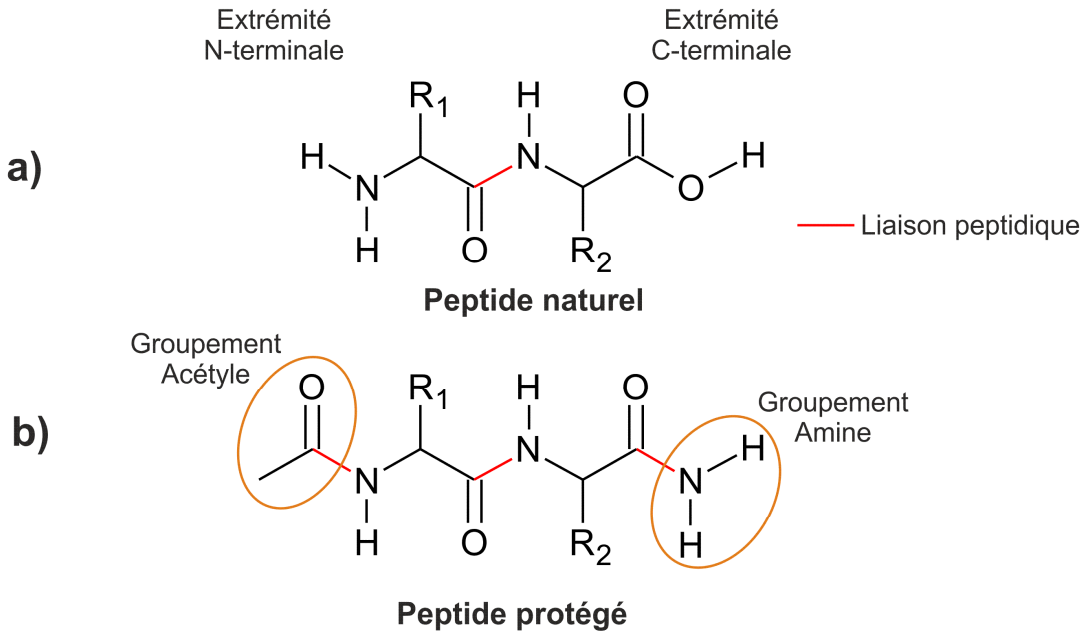


Fig. 1.10 – *a) Schéma d'un dipeptide naturel, noté R_1-R_2. b) Schéma d'un dipeptide Ac-R_1-R_2-NH_2, protégé à ses deux extrémités par un groupement acétyle et un groupement amine.*

Outre les avantages déjà évoqués, la technique d'IR2P-1C est aussi un moyen d'ioniser des peptides à partir de lasers émettant dans le domaine du proche UV, le domaine des UV entre 200 et 400 nm qui n'est pas absorbé par le dioxygène de l'air, ce qui allège considérablement le dispositif expérimental : les faisceaux lasers UV peuvent se propager dans l'air ambiant et ne nécessitent pas une atmosphère contrôlée ou un vide poussé. La principale contrainte de cette méthode est alors que les peptides doivent contenir au moins un chromophore absorbant dans la région du proche UV. Cette condition est en particulier satisfaite lorsque la chaîne polypeptidique

possède un des trois acides aminés suivants : la phénylalanine, la tyrosine ou le tryptophane (Figure 1.11). En effet, parmi les acides aminés naturels, seuls ces trois acides aminés possèdent un système aromatique sur leur chaîne latérale autorisant l'absorption d'un photon dans ce domaine spectral. L'histidine est un cas particulier d'acide aminé aromatique et n'est pas classé avec les précédents car le domaine d'absorption du chromophore situé sur sa chaîne latérale est centré vers 200 nm et s'étend donc au-delà du proche UV. La longueur d'onde nécessaire à l'ionisation de la plupart des molécules aromatiques se situe entre 130 et 180 nm, l'absorption de deux photons successifs dans le domaine 200 - 400 nm peut donc apporter suffisamment d'énergie pour réaliser ce phénomène. Tous les peptides protégés présentés dans la suite de cette étude présenteront un chromophore aromatique, soit sur la chaîne latérale d'un des acides aminés, soit comme groupement protecteur (cas du groupement -Bn).

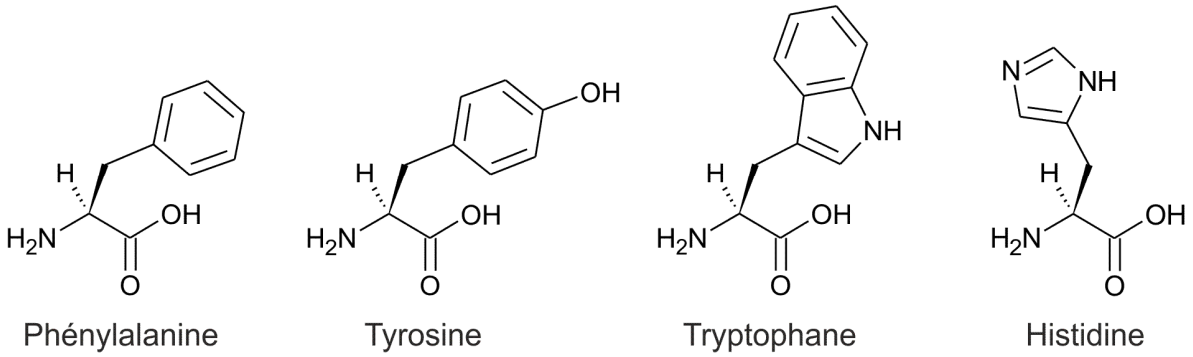


Fig. 1.11 – *Représentation des acides aminés naturels portant un chromophore aromatique*

La spectroscopie de double résonance IR-UV vise à caractériser les réseaux d'interactions non-covalentes qui gouvernent les conformations adoptées en phase gazeuse. Une attention particulière sera portée à la signature infrarouge des modes de vibration des groupements amides CO-NH car ils sont très sensibles à la présence de ce type d'interactions. Les principaux modes de vibration des groupements amides sont les suivants :

- Le mode amide A (3200-3600 cm^{-1}) qui correspond à l'élongation de la liaison N-H.
- Le mode amide I (~1650 cm^{-1}) qui correspond principalement à l'élongation de la liaison C=O couplée aux modes d'élongation de la liaison C-N et de déformation dans le plan de la liaison N-H.
- Le mode amide II (~1550 cm^{-1}) qui correspond principalement à une combinaison en opposition de phase du mode de déformation dans le plan de la liaison N-H et du mode d'élongation de la liaison C-N, faiblement couplée au mode de déformation dans le plan de la liaison C=O.

- Le mode amide III (1200-1400 cm^{-1}) qui correspond principalement à une combinaison en phase du mode de déformation dans le plan de la liaison N-H et du mode d'élongation de la liaison C-N.
- Le mode de déformation hors plan de la liaison N-H (400-700 cm^{-1})

En règle générale, les liaisons hydrogène ont tendance à abaisser les fréquences de vibration des modes d'élongation (modes amide A et amide I) et augmenter les fréquences de vibration des modes de déformation (modes amide II, amide III et hors plan). Une liaison hydrogène N-H···O peut ainsi conduire à un décalage de 100 à 200 cm^{-1} vers les basses fréquences de la fréquence de vibration d'un mode amide A par rapport à la fréquence de vibration d'un groupement N-H libre [43].

1.5.2 Etudes de dynamiques électroniques

La section précédente montre tout le savoir en matière de préparation, d'isolement et d'identification d'une conformation précise. Cette approche de phase gazeuse permet d'imaginer étudier l'influence de la conformation sur des phénomènes physico-chimiques élémentaires que peut subir la molécule, comme des dynamiques d'isomérisation entre conformations [52, 53] ou encore des dynamiques de dissociation de complexes [54]. L'étude présentée ici s'est plutôt tournée vers les phénomènes de dynamique électronique, en cherchant à répondre à la question *comment un peptide relaxe-t-il son énergie électronique après photoexcitation ?*, l'idée étant de réaliser une photophysique conformationnellement sélective ; avec en toile de fond la démarche de comparer à la théorie, à la fois pour aider à la compréhension des phénomènes observés, mais aussi pour tester les méthodes théoriques permettant d'aborder l'étude de systèmes de cette taille.

Le chapitre qui suit sera consacré à la description des méthodes spectroscopiques, du dispositif expérimental ainsi que des outils théoriques employés dans cette étude.

Le refroidissement d'une molécule flexible dans une détente supersonique, qui conduit à piéger celle-ci dans une conformation précise, est un processus complexe faisant intervenir une grande quantité de paramètres. Le chapitre 3 exposera un modèle statistique de refroidissement de molécules dans une détente supersonique développé au laboratoire dans le but de rationaliser les rapports d'abondances entre conformations obtenus expérimentalement.

Ces travaux serviront de base théorique à la présentation, dans le chapitre 4, d'études conformationnelles de systèmes biologiques modèles par spectroscopie de double résonance IR-UV en phase gazeuse. Cette technique expérimentale sera introduite par l'étude d'une chaîne peptidique modèle simple, la phénylalanine protégée, puis appliquée à deux familles de systèmes choisies pour modéliser des interactions typiques présentes dans les protéines : les interactions protéine-solvant et les interactions hydrophobes.

Enfin, dans le chapitre 5, nous revisiterons la photophysique des protéines en explorant la relation entre la conformation d'une chaîne peptidique et sa réactivité à travers la dynamique électronique mesurée, pour des conformations contrôlées de peptides modèles, par des techniques spectroscopiques pompe-sonde ou par détection de fluorescence.

1.6 Bibliographie

[1] A. Bairoch, R. Apweiler, C. H. Wu, W. C. Barker, B. Boeckmann, S. Ferro, E. Gasteiger, H. Z. Huang, R. Lopez, M. Magrane, M. J. Martin, D. A. Natale, C. O'Donovan, N. Redaschi et L. S. L. Yeh, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, D154-D159.

[2] K. J. Hellingwerf, J. Hendriks et T. Gensch, *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, (8), 1082-1094.

[3] S. Yamaguchi, H. Kamikubo, K. Kurihara, R. Kuroki, N. Niimura, N. Shimizu, Y. Yamazaki et M. Kataoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106, (2), 440-444.

[4] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et J. D. Watson, Macromolécules : structure, conformation et information. In *Biologie moléculaire de la cellule (2e Edition)*, Flammarion, **1990**, pp 87-134.

[5] J. E. Squires, *Science* **2002**, 295, (5557), 1002-1005.

[6] C. Walsh, *Nature* **2001**, 409, (6817), 226-231.

[7] A. Bairoch, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, (1), 304-305.

[8] A. M. Klibanov, *Nature* **2001**, 409, (6817), 241-246.

[9] D. M. Chudakov, S. Lukyanov et K. A. Lukyanov, *Trends Biotechnol.* **2005**, 23, (12), 605-613.

[10] J. Livet, T. A. Weissman, H. N. Kang, R. W. Draft, J. Lu, R. A. Bennis, J. R. Sanes et J. W. Lichtman, *Nature* **2007**, 450, (7166), 56-63.

[11] K. Stoletov, V. Montel, R. D. Lester, S. L. Gonias et R. Klemke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, (44), 17406-17411.

[12] C. M. Dobson, *Nature* **2003**, 426, (6968), 884-890.

[13] D. J. Selkoe, *Nature* **2003**, 426, (6968), 900-904.

[14] S. C. Lovell, I. W. Davis, W. B. Adrendall, P. I. W. de Bakker, J. M. Word, M. G. Prisant, J. S. Richardson et D. C. Richardson, *Proteins* **2003**, 50, (3), 437-450.

[15] G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan et V. Sasisekharan, *J. Mol. Biol.* **1963**, 7, (1), 95.

[16] E. Vass, M. Hollosi, F. Besson et R. Buchet, *Chem. Rev.* **2003**, 103, (5), 1917-1954.

[17] H. Ge, D. Zhou, S. Tong, Y. Gao, M. Teng et L. Niu, *Proteins* **2008**, 71, (3), 1539-1545.

[18] M. Paoli, R. Liddington, J. Tame, A. Wilkinson et G. Dodson, *J. Mol. Biol.* **1996**, 256, (4), 775-792.

[19] F. Sanger, *Nobel Lecture* **1958**.

[20] L. Whitmore et B. A. Wallace, *Biopolymers* **2008**, 89, (5), 392-400.

[21] B. Ranjbar et P. Gill, *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, 74, (2), 101-120.

[22] M. Caffrey, *J. Struct. Biol.* **2003**, 142, (1), 108-132.

[23] P. Adams et P. Langan, *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **2010**, 66, 1121-1123.

[24] J. Moult, K. Fidelis, A. Kryshtafovych et A. Tramontano, *Proteins* **2011**, 79, 1-5.

[25] K. A. Dill et J. L. MacCallum, *Science* **2012**, 338, (6110), 1042-1046.

[26] J. Grotemeyer, U. Bosel, K. Walter et E. W. Schlag, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, (14), 4233-4234.

[27] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr et F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1987**, 78, 53-68.

[28] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong et C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, 246, (4926), 64-71.

[29] R. A. Zubarev, N. L. Kelleher et F. W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, (13), 3265-3266.

[30] J. E. P. Syka, J. J. Coon, M. J. Schroeder, J. Shabanowitz et D. F. Hunt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101, (26), 9528-9533.

[31] J. P. Reilly, *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, 28, (3), 425-447.

[32] R. Antoine et P. Dugourd, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, (37), 16494-16509.

[33] G. Vonhelden, T. Wyttenbach et M. T. Bowers, *Science* **1995**, 267, (5203), 1483-1485.

[34] M. F. Jarrold, *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, (4), 360-367.

[35] Y. J. Seo, A. Andaya, C. Bleiholder et J. A. Leary, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, (11), 4325-4332.

[36] T. R. Rizzo, Y. D. Park, L. A. Peteanu et D. H. Levy, *J. Chem. Phys.* **1986**, 84, (5), 2534-2541.

[37] S. J. Martinez III, J. C. Alfano et D. H. Levy, *J. Mol. Spectrosc.* **1992**, 156, (2), 421-430.

[38] T. R. Rizzo, Y. D. Park et D. H. Levy, *J. Chem. Phys.* **1986**, 85, (12), 6945-6951.

[39] F. Piuzzi, I. Dimicoli, M. Mons, B. Tardivel et Q. Zhao, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, 320, (3-4), 282-288.

[40] B. C. Dian, A. Longarte, S. Mercier, D. A. Evans, D. J. Wales et T. S. Zwier, *J. Chem. Phys.* **2002**, 117, (23), 10688-10702.

[41] H. Fricke, A. Funk, T. Schrader et M. Gerhards, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, (14), 4692-4698.

[42] J. A. Stearns, C. Seaiby, O. V. Boyarkin et T. R. Rizzo, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, 11, (1), 125-132.

[43] W. Chin, F. Piuzzi, I. Dimicoli et M. Mons, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8, 1033-1048.

[44] N. S. Nagornova, T. R. Rizzo et O. V. Boyarkin, *Science* **2012**, 336, (6079), 320-323.

[45] H. S. Biswal, Y. Loquais, B. Tardivel, E. Gloaguen et M. Mons, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, (11), 3931-3942.

[46] C. Kapota, J. Lemaire, P. Maitre et G. Ohanessian, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, (6), 1836-1842.

[47] J. Oomens, J. D. Steill et B. Redlich, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, (12), 4310-4319.

[48] P. D. Godfrey et R. D. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, (7), 2019-2023.

[49] A. Lesarri, E. J. Cocinero, J. C. Lopez et J. L. Alonso, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2004**, 43, (5), 605-610.

[50] C. Perez, S. Mata, S. Blanco, J. C. Lopez et J. L. Alonso, *J. Phys. Chem. A* **2011**, 115, (34), 9653-9657.

[51] J.-P. Schermann, *Spectroscopy and modeling of biomolecular building blocks*. Elsevier, **2007**, p 479.

[52] B. C. Dian, J. R. Clarkson et T. S. Zwier, *Science* **2004**, 303, (5661), 1169-1173.

[53] W. Y. Sohn, M. Kim, S. S. Kim, Y. D. Park et H. Kang, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, (15), 7006-7011.

[54] J. R. Clarkson, J. M. Herbert et T. S. Zwier, *J. Chem. Phys.* **2007**, 126, (13), 134306.

Chapitre 2

Méthodologies

Chapitre 2

Méthodologies

L'étude de biomolécules en phase gazeuse nécessite un large ensemble d'outils, aussi bien expérimentaux que théoriques, qui seront l'objet ce chapitre. Notre stratégie expérimentale repose sur des techniques spectroscopiques multiphotoniques qui, associées à l'emploi d'un jet supersonique, permettent d'obtenir des informations très précises sur ces systèmes. Néanmoins, devant la grande complexité des systèmes flexibles étudiés, une analyse détaillée des résultats expérimentaux demande souvent le soutien d'outils théoriques performants. La première partie de ce chapitre sera consacrée aux techniques spectroscopiques utilisées dans nos travaux, dans la deuxième partie sera décrit le montage expérimental et dans une dernière partie seront développées les méthodes de calcul employées dans cette étude.

2.1 Méthodes spectroscopiques

Les signatures électroniques et vibrationnelles des peptides protégés étudiés en phase gazeuse seront obtenues respectivement par la mise en œuvre des techniques d'ionisation résonante à deux photons à une couleur (IR2P-1C) et de double résonance IR-UV. Ces techniques présentent l'avantage d'apporter une sélectivité en masse et en conformation des systèmes présents dans la détente supersonique et une meilleure sensibilité que celle pouvant être obtenue par une spectroscopie classique d'absorption. La durée de vie du premier état excité $\pi\pi^*$ de ces molécules sera sondée au moyen d'une méthode pompe-sonde par ionisation résonante à deux photons à deux couleurs (IR2P-2C) et de mesures de fluorescence.

2.1.1 Spectroscopie électronique : Ionisation résonante à deux photons à une couleur (IR2P-1C)

Lors du processus d'ionisation résonante à deux photons, le système est porté de son état fondamental S_0 à un état excité intermédiaire S_1, ici le premier état excité ππ*, par un premier photon, puis est ionisé par l'absorption d'un deuxième photon (Figure 2.1). On parle de processus d'ionisation résonante à deux photons à une couleur (IR2P-1C) lorsque les deux photons sont issus de la même impulsion laser et possèdent la même énergie. Un peptide ne peut être ionisé par ce processus que si l'énergie du premier photon correspond à celle d'une transition résonante de l'état fondamental vers un état électronique excité (vibrationnellement excité ou non). Deux conditions sont donc nécessaires pour pouvoir assimiler le spectre obtenu via la détection d'un signal d'ions au spectre d'absorption direct : (i) la durée de vie de l'état excité intermédiaire doit être suffisamment longue pour ne pas limiter l'absorption du second photon et (ii) la section efficace d'ionisation doit peu varier dans le domaine spectral considéré. Ces conditions sont généralement satisfaites, même si des contre-exemples fameux ont été mis en évidence [1, 2].

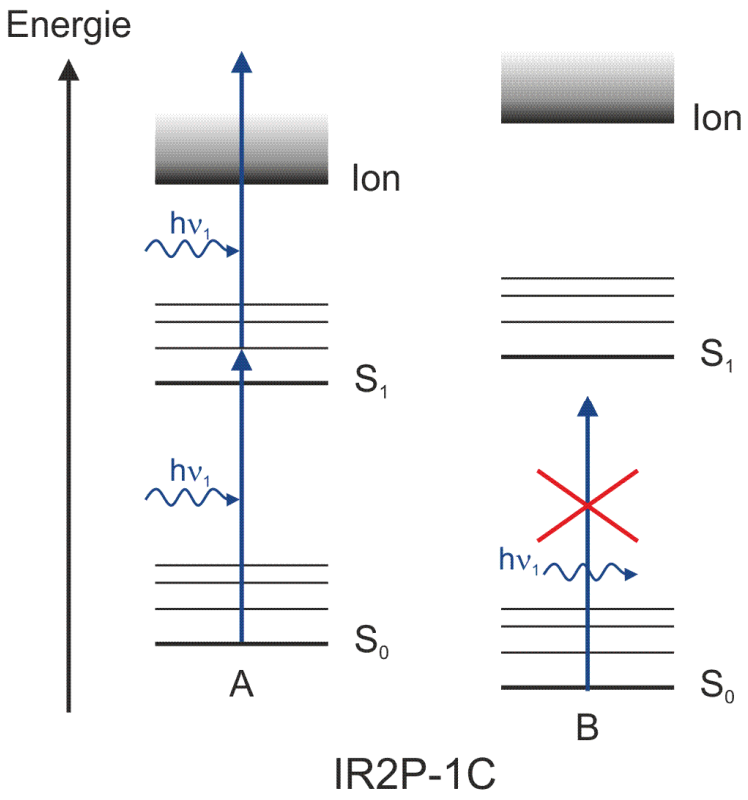


***Fig. 2.1** – Schéma du principe d'ionisation résonante à deux photons à une couleur pour deux conformations A et B d'un même peptide. L'énergie du photon UV est résonante avec la transition $S_1 \leftarrow S_0$ du conformère A mais pas avec celle du conformère B. Pour des photons de cette énergie, seul le conformère A est ionisé et est donc finalement détecté sélectivement.*

La formation d'ions et leur détection par un spectromètre de masse apporte un avantage majeur : celui de pouvoir distinguer les ions selon leur temps de vol, qui dépend de leur rapport masse/charge. Il est alors possible de réaliser de la spectroscopie résolue en masse, par exemple dans le but d'identifier la contribution de différents isotopologues au spectre électronique d'un mélange de peptides sous plusieurs états de deutération.

De plus, la signature électronique d'un chromophore traduit les perturbations induites par son environnement. Or, pour un même peptide, cet environnement varie d'une conformation à une autre et peut ainsi produire, dans certains cas, un déplacement assez grand entre les transitions $S_1 \leftarrow S_0$ de chaque conformère ou induire des activités Franck-Condon suffisamment différentes pour permettre de les distinguer dans les spectres IR2P-1C.

2.1.2 Spectroscopie vibrationnelle : Double résonance IR-UV

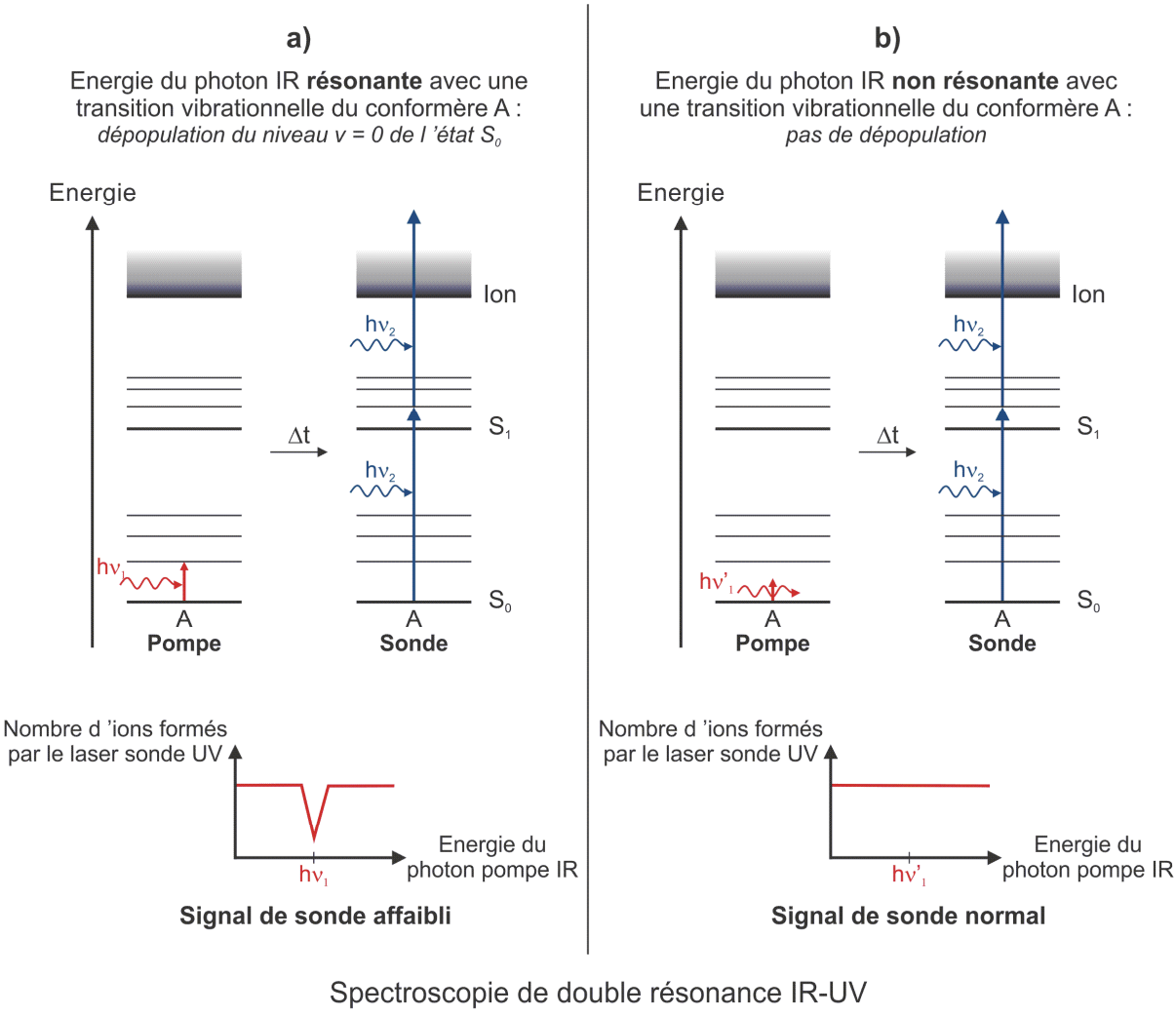


***Fig. 2.2** – Schéma du principe de la spectroscopie de double résonance IR-UV appliquée à un conformère noté A.*

La spectroscopie de double résonance IR-UV est une technique qui permet de sonder les fréquences de vibration d'un système tout en tirant profit de la sélectivité en masse et en conformation apportée par l'IR2P-1C. C'est donc une méthode de type pompe-sonde, employant deux lasers. Le laser de pompe émet des photons infrarouges de longueur d'onde variable et balaie le domaine d'absorption des modes de vibration de la molécule. Une centaine de nanosecondes après l'impulsion du laser de pompe, le laser de sonde, dont l'énergie des photons est fixe et correspond à la transition $S_1 \leftarrow S_0$ d'un des conformères dans l'UV, ionise sélectivement ce conformère par la méthode IR2P-1C. Le signal de sonde est proportionnel à la population du conformère sondé se trouvant dans le niveau vibrationnel fondamental (v = 0) de l'état S_0. Lorsque les photons infrarouges émis par le laser de pompe sont en résonance avec une transition vibrationnelle de ce conformère, le niveau fondamental est dépeuplé, ce qui entraîne une diminution du signal sonde mesuré (Figure 2.2a). Tant que les photons infrarouges ne sont pas résonants avec une transition de ce conformère, même s'ils le sont avec des transitions d'autres conformères, la quantité d'ions formée restera constante (Figure 2.2b). Un des intérêts majeurs de cette technique laser menée en phase gazeuse est donc de pouvoir mesurer indépendamment les spectres IR de *chacune* des conformations.

Lors des expériences de double résonance IR-UV, un prisme de renvoi du faisceau sonde UV situé à la sortie de la chambre d'expérience est utilisé pour former une deuxième zone d'interaction avec la détente supersonique et ainsi créer deux paquets d'ions, séparés spatialement, à chaque tir laser : un seul des paquets aura été éclairé par le laser pompe dans l'infrarouge, l'autre servira de référence. En normalisant le signal d'ions correspondant au paquet « IR » par celui correspondant au paquet « UV seul », on peut ainsi s'affranchir des fluctuations tir à tir et des variations à long terme des conditions de désorption. Dans la suite, les spectres de vibrations obtenus par la méthode de double résonance IR-UV seront présentés sous la forme de bandes d'absorption relatives (normalisées) et non de déplétion (absolues).

2.1.3 Mesures des durées de vie des états excités

Dans l'objectif de caractériser les durées de vie du premier état excité $\pi\pi^*$ des systèmes étudiés, deux techniques expérimentales complémentaires ont été choisies : l'ionisation résonante à deux photons à deux couleurs (IR2P-2C) et des mesures de déclin de fluorescence.

Le processus d'IR2P-2C est comparable à l'IR2P-1C présenté précédemment, à la différence près que le photon servant à exciter le système de l'état S_0 à l'état S_1 (photon pompe)

et le photon utilisé pour ioniser à partir de l'état S_1 (photon sonde) proviennent ici d'impulsions laser distinctes et de longueurs d'onde différentes (Figure 2.3a). Ce découplage accorde la possibilité de pouvoir varier l'intervalle de temps Δt entre les phénomènes d'excitation et d'ionisation et donc de pouvoir suivre l'évolution de la population restante dans l'état S_1 (le premier état excité $\pi\pi^*$) en fonction du temps. Les longueurs d'onde des deux photons sont fixes au cours de l'expérience d'IR2P-2C. Les photons de la première impulsion laser sont résonants avec une transition $S_1 \leftarrow S_0$ d'un des conformères. Pour éviter l'absorption de deux photons successifs provenant de cette impulsion l'intensité de celle-ci est atténuée de manière à rendre négligeable le processus d'IR2P-1C. Dans la suite, le signal résiduel dû à ce processus sera toujours soustrait du signal total. L'énergie des photons de la seconde impulsion est choisie suffisamment faible pour que ceux-ci ne puissent pas interagir avec des molécules dans leur état fondamental. L'IR2P-2C est une technique qui rend possible la mesure de la durée de vie d'un état excité d'une molécule avec une sélectivité en masse et en conformation. Cependant, elle ne permet pas de s'assurer que l'état excité dont la durée de vie est mesurée est bien l'état $\pi\pi^*$ originellement excité et qu'il n'y a pas eu de conversion rapide entre états électroniques pendant Δt.

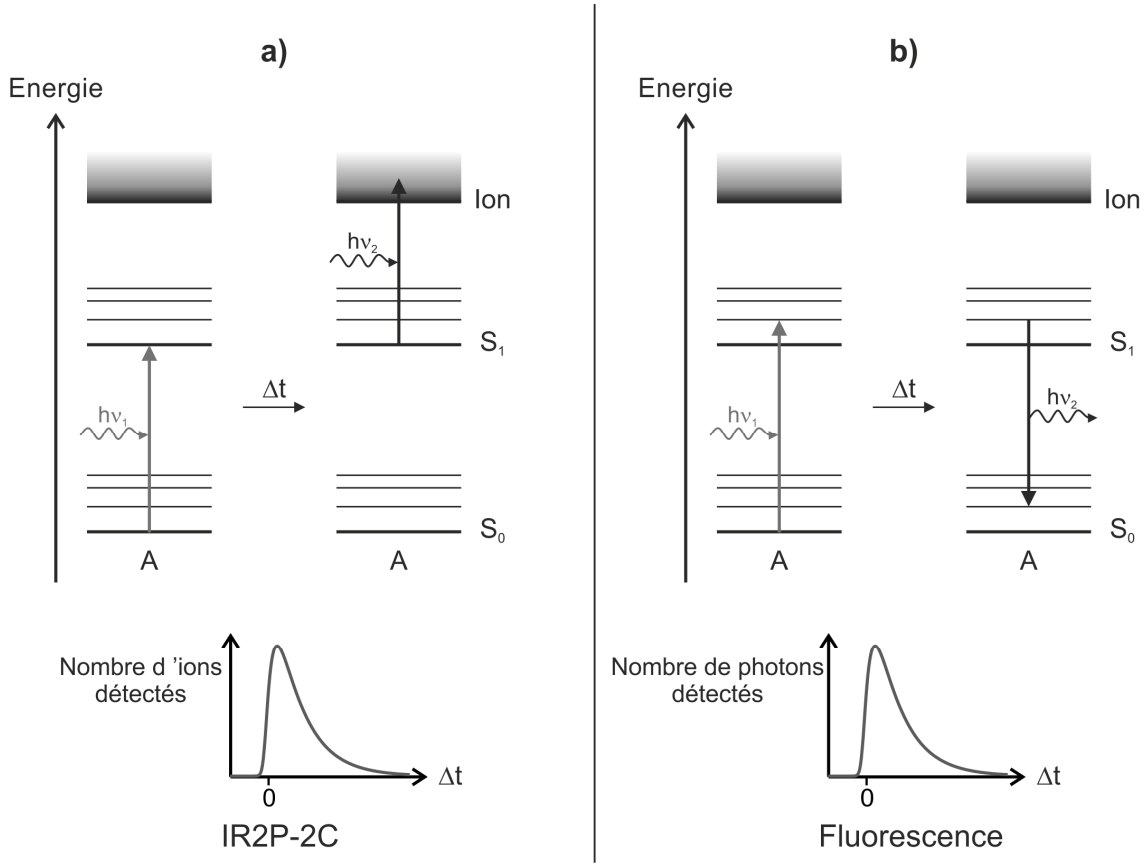


Fig 2.3 – *Schéma du principe a) de l'ionisation résonante à deux photons à deux couleurs (IR2P-2C) et b) des mesures de déclin de fluorescence.*

Un moyen de pallier ce manque est de réaliser des mesures de déclin de fluorescence, c'est-à-dire de détecter, en fonction du temps, le nombre de photons émis par des molécules excitées lors de leur relaxation vers l'état fondamental (Figure 2.3b). De manière générale, les états électroniques vers lequel peut relaxer l'état excité ππ* n'étant pas fluorescents, ou bien très peu, la méthode par fluorescence est essentiellement sensible à l'état ππ*.

2.2 Dispositif expérimental

Les techniques spectroscopiques employées nécessitent divers éléments de montages : la production de molécules en phase gazeuse, leur excitation optique par des lasers fonctionnant en régime impulsionnel et la détection des ions ou des photons résultants. Les résultats présentés dans cette étude ont été obtenus à partir d'expériences réalisées au laboratoire Francis Perrin (LFP) du CEA de Saclay, au Centre Laser de l'Université Paris-Sud (CLUPS) à Orsay et à la Fondation pour la Recherche Fondamentale sur la Matière (FOM) à Rijnhuizen aux Pays-Bas, avec le laser à électrons libres FELIX. Les dispositifs expérimentaux utilisés dans chacun de ces endroits sont très similaires ; ils diffèrent principalement par les caractéristiques des lasers employés (durée d'impulsion pour les lasers UV, région spectrale pour les lasers IR), comme indiqué dans le tableau 2.1.

Laboratoires	Ordres de grandeur des durées d'impulsion des lasers UV	Région spectrale des lasers IR	Expériences réalisées
LFP	10^{-8} s	3000 – 3800 cm^{-1}	IR2P-1C, IR-UV, IR2P-2C, Fluorescence
CLUPS	10^{-11} s		IR2P-2C
FOM (FELIX)	10^{-8} s	40 – 2500 cm^{-1}	IR-UV

Tab. 2.1 – *Comparaison des caractéristiques des chaînes lasers UV et IR des différents laboratoires dans lesquels ont été effectuées des expériences durant cette thèse.*

2.2.1 Production de biomolécules en phase gazeuse

Les peptides étudiés sont des produits commerciaux. Ils ont été achetés chez GenScript Corporation puis utilisés sans purification ultérieure.

Dans les conditions standards de température et de pression, ces molécules sont sous forme solide et possèdent une pression de vapeur saturante extrêmement faible. Pour augmenter cette dernière et obtenir une pression suffisante de peptides neutres en phase gazeuse pour permettre leur détection il serait envisageable de les chauffer directement, mais les peptides étant des biomolécules relativement fragiles, ils se décomposent rapidement sous l'effet de la température. Pour limiter ce phénomène, le dispositif mis en œuvre au LFP repose sur une technique de vaporisation par désorption laser couplée à une détente supersonique [3]. Cette technique de vaporisation, développée dans les années 80-90, est assez proche de la technique MALDI classiquement utilisée en spectrométrie de masse pour porter des biomolécules chargées en phase gazeuse et qui a valu le prix de Nobel de Chimie à Tanaka en 2002. Elle a été depuis largement utilisée pour réaliser la spectroscopie de molécules neutres [4, 5, 6, 7, 8]. Son principe est d'utiliser une matrice capable d'absorber la lumière, dans notre cas le graphite excité à la longueur d'onde de 532 nm. L'échauffement de la matrice, contrôlé par un laser, conduit à sa vaporisation ainsi que celles des molécules qu'elle contient. Outre le faible taux de dégradation des peptides par rapport à la méthode par chauffage, la technique de désorption laser présente également l'avantage de ne requérir que de faibles quantités de produit (typiquement de l'ordre de 50 mg par échantillon).

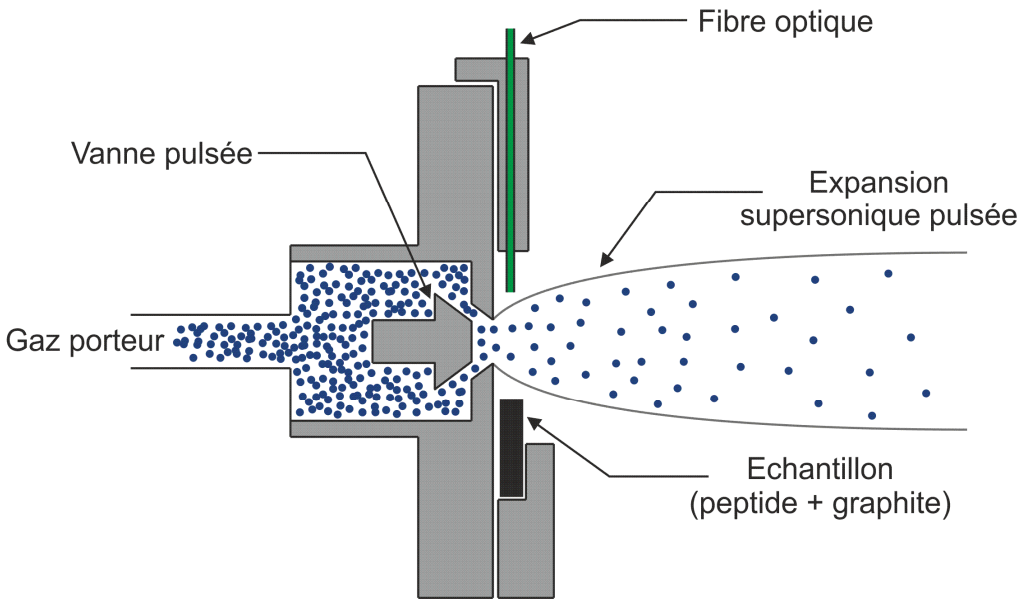


Fig 2.4 – *Schéma du dispositif de vaporisation par désorption laser.*

En pratique, une pastille de 6 mm de diamètre et d'environ 2 mm d'épaisseur est obtenue en pressant un mélange de poudres de graphite et de peptide, respectivement en proportion molaire 4 : 1, dans une presse hydraulique, sous une pression d'environ 1,6 tonnes. Le faisceau d'un laser pulsé Continuum Minilite Nd : YAG doublé en fréquence (λ = 532 nm, 10 Hz, 0.5-3 mJ par impulsion), guidé par une fibre optique, est envoyé sur la pastille où il est absorbé par la matrice de graphite, permettant alors la vaporisation de l'échantillon (Figure 2.4). Pour diminuer la vitesse d'altération de la surface de la pastille celle-ci est placée sur un chariot effectuant un mouvement de va-et-vient dans une direction perpendiculaire aux axes du faisceau laser de vaporisation et de la détente supersonique et assurant ainsi un balayage de toute la surface de l'échantillon par le laser. Régulièrement, lorsque la dégradation de cette surface devient trop importante celle-ci est régénérée par limage.

Le dispositif de vaporisation par désorption laser décrit ci-dessus a été adapté à la chambre d'expérience du CLUPS lors des mesures de durées de vie dans le régime picoseconde. Le dispositif utilisé au FOM, inspiré de celui développé par deVries à l'Université de Californie, Santa Barbara [9], repose sur le même principe, avec néanmoins quelques différences. Dans ce dernier, le mélange de poudres de graphite et de peptide n'est pas pressé : une fine couche en est déposée sur un support en graphite de 5 cm de long et 2 mm de large. A chaque tir, l'énergie de l'impulsion émise par un laser Nd : YAG à 1064 nm est suffisante pour vaporiser toute la poudre éclairée par le laser. Un mouvement de translation de va-et-vient n'est donc pas possible dans ce cas, un léger déplacement du support en graphite est effectué entre chaque tir laser et l'échantillon est renouvelé lorsque toute la poudre a été vaporisée.

Le protocole de préparation des pastilles a été adapté aux études de microsolvatation et de deutération des peptides. Les pastilles microsolvatées ont été préparées en ajoutant deux à trois gouttes de solvant au mélange de poudre juste avant de presser l'échantillon. Les molécules de solvant sont donc désorbées de la matrice de graphite en même temps que les peptides. La deutération des peptides a, en revanche, été réalisée avant l'expérience en dissolvant ceux-ci dans un solvant deutéré, contenant également la poudre de graphite, pendant 170 heures à 40 °C. Les pastilles ont ensuite été pressées après évaporation du solvant à pression atmosphérique. Afin de contrôler le degré de deutération, le solvant utilisé est constitué d'un mélange de méthanol deutéré (CH_3OD) et d'éthanol (C_2H_5OH) dans des proportions respectives allant de 100 : 0 à 33 : 66.

Les peptides vaporisés suite à l'impulsion du laser de désorption sont relativement chauds et possèdent suffisamment d'énergie pour explorer différentes conformations. Il est nécessaire de les refroidir afin de créer des systèmes isolés, froids, conduisant à des signatures spectroscopiques sans élargissement spectral et par conséquent exploitables pour réaliser des attributions de structures secondaires. Les molécules chaudes vont pour cela croiser l'axe d'expansion d'un jet supersonique où, par collisions successives, leur énergie interne rovibrationnelle sera convertie en énergie de translation. Un jet supersonique est formé par détente adiabatique d'un gaz, dans notre cas, soit de l'argon, soit un mélange 70 % / 30 % en volume d'hélium et de néon à des pressions initiales respectives de 9 et 20 bars, à travers une vanne pulsée (General Valve, orifice de 300 ou 1000 µm, cadence de 10 Hz) dans une enceinte maintenue sous une pression de l'ordre de 10^{-5} mbar par une pompe turbomoléculaire de grand débit (1700 L/s). Les propriétés d'une détente supersonique seront évoquées plus en détail dans la partie 3.2.2 du chapitre 3. Les molécules entraînées par le jet supersonique sont ensuite dirigées vers la zone d'interaction avec les faisceaux lasers.

2.2.2 Systèmes lasers

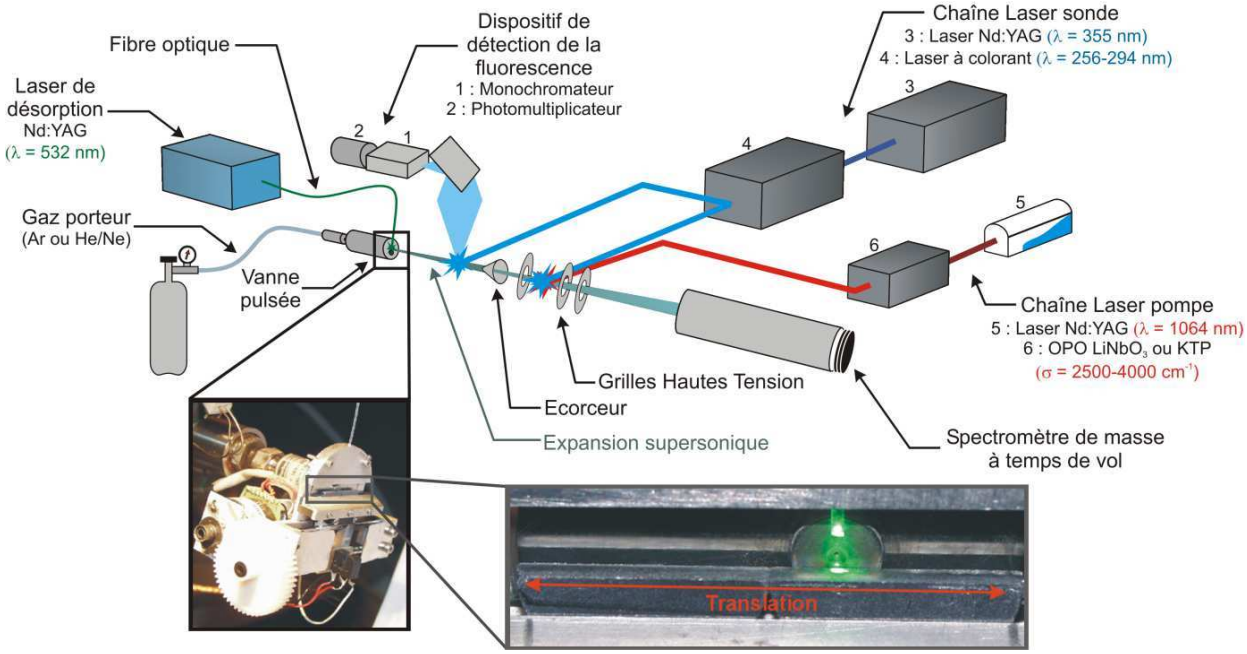


Fig 2.5 – *Schéma du dispositif expérimental. Lors des expériences d'IR2P-2C les lasers 5 et 6 sont respectivement substitués par un laser à exciplexe et un laser à colorant.*

Outre le laser servant à la désorption des peptides, le dispositif expérimental est constitué de plusieurs chaînes lasers UV et IR dédiées aux études spectroscopiques de ces molécules (Figure 2.5). Les mesures de spectres électroniques, de spectres vibrationnels dans la région des modes amides A (3200-3600 cm^{-1}) et les expériences d'IR2P-2C en régime nanoseconde ont été menées au sein du Laboratoire Francis Perrin (LFP) du CEA de Saclay. Les dynamiques de relaxation électronique rapides ont été étudiées au moyen des lasers picoseconde du Centre Laser de l'Université Paris-Sud (CLUPS) à Orsay. La spectroscopie IR dans le domaine des modes de déformation hors plan des liaisons N-H (400-700 cm^{-1}) a été réalisée avec le laser à électrons libres FELIX du FOM à Rijnhuizen (Pays-Bas).

2.2.2.a Lasers UV

Les chaînes lasers UV nanosecondes utilisées au LFP et au FOM sont composées de lasers à colorant (Lambda Physik LPD3000 et Radiant Dyes Narrow Scan) pompés par un laser à exciplexe XeCl (Lambda Physik EMG 102 MSC) ou un laser Nd:YAG (Continuum Precision II).

Le principe du laser à exciplexe repose sur l'excitation d'un mélange de gaz, ici un mélange de xénon, de chlorure d'hydrogène et d'un gaz tampon constitué d'hélium et de néon, par une décharge électrique. A l'état excité se forme un complexe stable XeCl* qui, lors de sa relaxation vers son état fondamental, se dissocie en émettant un photon de longueur d'onde fixe (308 nm pour XeCl*). Les impulsions produites par ce laser ont une largeur temporelle de 15 ns et une énergie de l'ordre de 150 mJ.

Le milieu amplificateur d'un laser Nd:YAG est un cristal, un grenat d'yttrium et d'aluminium ($Y_3^{3+}Al_5^{3+}O_{12}^{2-}$) dans lequel une partie des ions Y^{3+} ont été substitués par des ions néodyme Nd^{3+}. Un pompage optique à l'aide de lampes flash permet de réaliser une inversion de population des ions Nd^{3+} qui résultera en un rayonnement laser à 1064 nm. La troisième harmonique de ce rayonnement, d'une longueur d'onde de 355 nm, est utilisée pour pomper les lasers à colorants.

Le laser à exciplexe et le laser Nd:YAG émettent des impulsions lasers intenses, mais de longueur d'onde fixe. Un laser à colorant est donc placé en sortie de ceux-ci afin d'obtenir une accordabilité en longueur d'onde du faisceau UV, nécessaire à nos études spectroscopiques. Ainsi, pour accéder à la bande d'absorption du phényle dans le proche UV (~266 nm), le rayonnement doublé en fréquence de la coumarine 540A, un colorant dont le maximum d'émission se situe à 537 nm en solution dans l'éthanol, a été utilisé. Ce colorant est efficace pour

un domaine s'étendant de 512 à 588 nm. Le doublage en fréquence est réalisé par un cristal non linéaire de BBO (Figure 2.6). On obtient finalement un faisceau UV caractérisé par des durées d'impulsion de l'ordre d'une dizaine de nanosecondes, une largeur spectrale de 0.2 cm^{-1} et des énergies de l'ordre de 500 µJ par impulsion dans le domaine d'absorption de la phénylalanine.

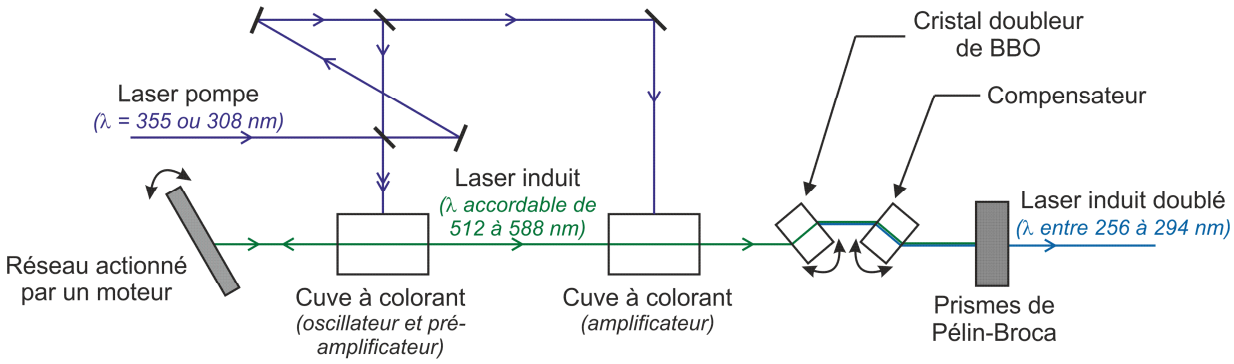


Fig 2.6 – *Schéma de principe d'un laser à colorant.*

Pour les expériences dans le domaine picoseconde réalisées au CLUPS à Orsay, la troisième harmonique à 355 nm du rayonnement issu d'un laser picoseconde Nd:YAG à verrouillage de modes (EKSPLA-SL300) est séparée en deux faisceaux permettant de pomper chacun un amplificateur paramétrique optique, à l'origine de l'accordabilité en longueur d'onde de cette chaîne laser, couplé à un système de générations de seconde harmonique (EKSPLA-PG411). Cette chaîne laser produit des impulsions d'une largeur temporelle de 10 ps avec une largeur spectrale de 5 cm^{-1} et des énergies par impulsion de l'ordre de 120 µJ [10].

2.2.2.b Lasers IR

La chaîne laser IR utilisée pour étudier les modes amides A (3200-3600 cm^{-1}) se divise elle aussi en deux parties : un laser Nd:YAG émettant à une longueur d'onde fixe de 1064 nm est chargé de pomper un oscillateur paramétrique optique (OPO) assurant l'accordabilité en longueur d'onde du faisceau IR. Un oscillateur paramétrique optique est constitué d'une cavité optique contenant un cristal non linéaire, ici du niobate de lithium ($LiNbO_3$) ou du phosphate de potassium titanyl (KTP). Ils permettent de couvrir une région allant de 3000 à 3800 cm^{-1}. Le cristal de $LiNbO_3$ présente néanmoins une forte bande d'absorption entre 3465 et 3500 cm^{-1} qui résulte en un effondrement du gain du milieu amplificateur. L'absence de photons dans cette région empêche la détection avec ce cristal des bandes d'absorption correspondant aux modes de

vibrations d'élongation des groupements NH libres, c'est-à-dire n'étant engagés dans aucune interaction intra- ou intermoléculaire. Cependant, les structures secondaires de peptides sont déterminées par leur réseau de liaisons hydrogène, elles peuvent donc être identifiées même sans avoir caractérisé le domaine spectral des vibrations des groupements NH libres. Les impulsions produites par cette chaîne laser ont une largeur spectrale de 1 cm^{-1} et une énergie de l'ordre de 1 mJ.

Pour accéder au domaine des modes de déformation hors plan des liaisons N-H dans le lointain infrarouge (400-700 cm^{-1}) une autre source de lumière a été utilisée, le laser à électrons libres FELIX (Free Electron Laser for Infrared eXperiments). Le principe de ce laser repose sur le rayonnement synchrotron, le rayonnement produit par des particules chargées en mouvement non rectiligne uniforme. Les particules chargées, ici des électrons, sont accélérées jusqu'à des vitesses relativistes avant de passer au travers d'un onduleur, une série d'aimants permanents qui crée un champ magnétique périodique perpendiculaire à la direction des électrons (Figure 2.7). L'onduleur force les électrons à adopter une trajectoire sinusoïdale et à émettre des photons par rayonnement synchrotron. La longueur d'onde du rayonnement émis par ce laser peut être ajustée en modifiant la vitesse du paquet d'électrons ou la distance entre les aimants dans l'onduleur. La largeur spectrale de FELIX dans le domaine étudié est de l'ordre de 1%, soit environ 5 cm^{-1} dans le domaine étudié.

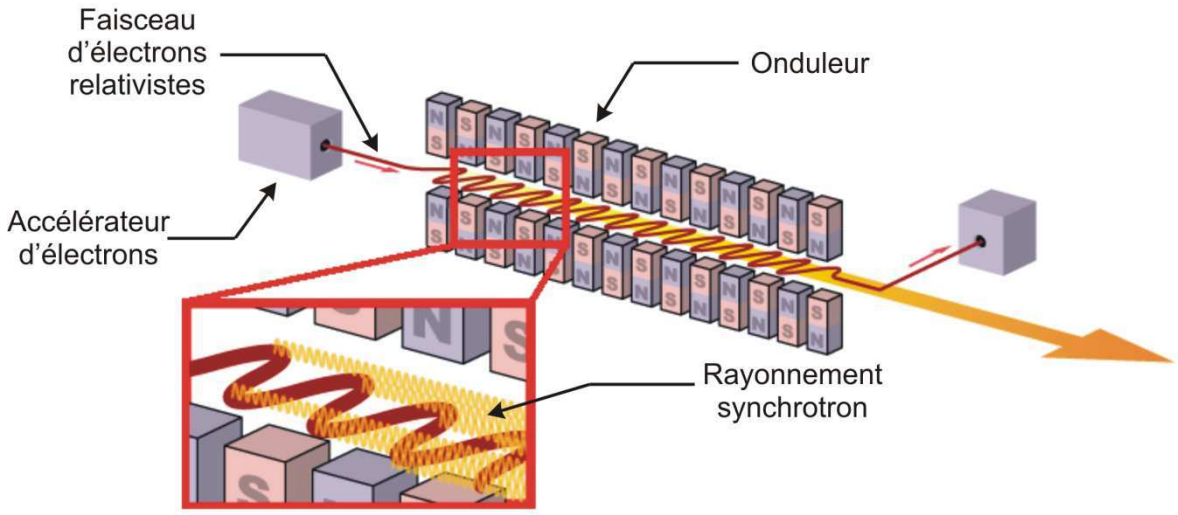


Fig 2.7 – *Schéma de principe d'un laser à électrons libres.*

2.2.3 Détecteurs

2.2.3.a Détection des ions

Les peptides ionisés sont détectés par un spectromètre de masse à temps de vol, utilisé en mode linéaire ou en mode réflectron [11, 12], ce qui permet une détection des ions sélective en masse et donc l'observation de la formation d'éventuels fragments ou agrégats dans la détente supersonique. Le principe de ce détecteur repose sur le fait que des ions de même charge *q* mais de masses *m* différentes n'acquièrent pas la même vitesse après accélération par un champ électrique. Le temps que mettent les ions pour parcourir la zone de vol libre est alors proportionnel à $\sqrt{m/q}$.

Le schéma d'un spectromètre de masse à temps de vol est présenté sur la Figure 2.8. Un écorceur permet de collecter la partie centrale de la détente supersonique, celle où les molécules sont le plus efficacement refroidies. Le trajet des peptides à l'intérieur du spectromètre de masse peut ensuite être divisé en trois parties. Dans la première zone, dite extractrice d'ions, comprise entre la grille répulsive d'ions et la grille extractrice, les peptides sont ionisés par le faisceau laser UV selon le processus d'ionisation à deux photons. Les ions ainsi formés sont ensuite amenés vers la zone d'accélération par un champ électrique uniforme. Dans cette zone, ils sont alors soumis à un second champ électrique uniforme qui leur permet d'acquérir leur énergie cinétique finale avant de traverser, lorsque le spectromètre de masse est utilisé en mode linéaire, une zone sans champ, dite de vol libre, jusqu'au détecteur constitué de galettes de micro-canaux. Lorsque le spectromètre de masse est utilisé en mode réflectron, cette zone comprend également un miroir électrostatique.

Lors des expériences de double résonance IR-UV, deux paquets d'ions de même rapport *m/q* sont formés à des endroits différents dans la zone d'ionisation, correspondant à l'ionisation de molécules excitées par le laser IR ou non. Dans les conditions de focalisation spatiale de Wiley-McLaren [13] ces paquets auraient cependant le même temps de vol et arriveraient au même instant sur les galettes de micro-canaux, ce qui rendrait impossible la comparaison des signaux correspondant à chacun des paquets. Les potentiels appliqués aux différentes grilles sont donc choisis pour se placer légèrement en dehors de ces conditions de focalisation. Les deux paquets d'ions sont alors séparés de quelques centaines de nanosecondes pour un temps de vol de quelques dizaines de microsecondes, ce qui est suffisant pour les résoudre sur le spectre de masse.

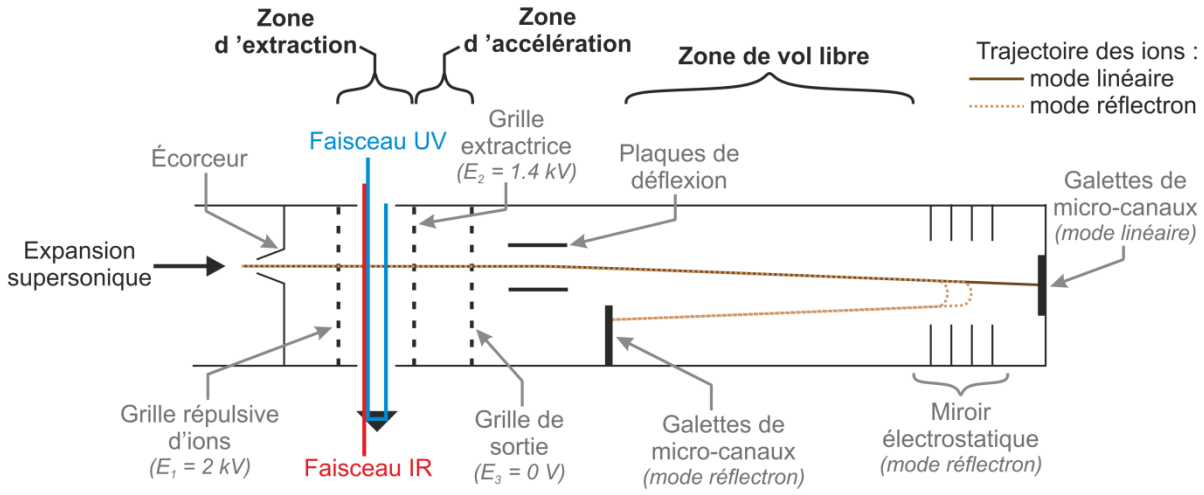


Fig 2.8 – *Schéma d'un spectromètre de masse à temps de vol utilisé pour une expérience de double résonance IR-UV. La création de deux paquets d'ions hors des conditions de focalisation Wiley-McLaren permet de s'affranchir des fluctuations tir à tir du processus de désorption, de l'intensité des lasers ainsi que des variations à long terme des conditions de désorption.*

L'utilisation du spectromètre de masse en mode réflectron, tel que proposé par Mamyrin *et al.* [11, 14] permet d'améliorer la résolution de l'appareil en corrigeant la dispersion initiale d'énergie cinétique et en allongeant le temps de vol, pour une même taille d'analyseur. Le réflectron fonctionne comme un miroir électrostatique : il met en œuvre un champ électrique pour réfléchir le paquet d'ions vers le détecteur. Les ions les plus rapides s'enfonçant plus loin dans le miroir que les plus lents, il existe une relation liant position du détecteur et caractéristiques électriques de la source et du miroir pour laquelle la pénalité en temps passé dans le réflectron compense exactement la vitesse plus élevée des ions les plus énergétiques.

2.2.3.b Détection de la fluorescence

Les photons émis par fluorescence sont focalisés dans un monochromateur Bausch & Lomb (modèle 33-86-07), utilisé comme un filtre à basse résolution afin d'éliminer la lumière diffusée, puis détectés grâce à un photomultiplicateur relié à un oscilloscope LeCroy. Le temps de réponse du photomultiplicateur, de l'ordre de la nanoseconde, permet d'étudier des dynamiques de relaxation de l'énergie électronique à partir d'états excités ayant des durées de vie allant jusqu'à environ 5 ns. En effet, la largeur à mi-hauteur de la fonction d'appareil totale de ce dispositif a été mesurée à 17 ns. Des spectres d'excitation de fluorescence peuvent également être réalisés grâce à ce dispositif en intégrant tout ou partie du signal de fluorescence détecté à différentes longueurs d'onde d'excitation.

2.2.4 Synchronisation

Les sources lasers fonctionnant en régime impulsionnel, il est nécessaire d'utiliser un générateur d'impulsions retardées pour contrôler le déclenchement des différents éléments du dispositif expérimental et obtenir une bonne synchronisation entre ceux-ci. On peut ainsi définir plusieurs délais.

Le premier délai contrôle l'intervalle de temps entre l'ouverture de la vanne créant la détente supersonique et le tir du laser de désorption. Il permet de déplacer la position des peptides vaporisés dans l'impulsion de gaz porteur et ainsi de sélectionner la zone du jet à ensemencer pour refroidir efficacement les molécules.

Un deuxième délai est défini entre le déclenchement du laser de désorption et le laser UV d'ionisation. Il dépend du temps que mettent les molécules pour parcourir la distance séparant la zone de désorption de la zone d'interaction avec les lasers UV et IR et donc de la nature du gaz utilisé pour la détente supersonique.

Pour les expériences pompe-sonde à deux couleurs (IR-UV ou UV-UV), un autre délai contrôle le décalage temporel entre le tir du laser pompe et celui du laser sonde. Dans les expériences de double résonance IR-UV, le délai Δt entre le tir des deux lasers est fixe et de l'ordre d'une centaine de nanosecondes.

Dans les expériences d'IR2P-2C, deux techniques ont été utilisées pour faire varier le délai Δt, selon le domaine temporel étudié :

- En régime nanoseconde, le balayage en Δt est contrôlé par un générateur de délai Stanford DG535 piloté par LabVIEW. Les durées d'impulsions des lasers UV nanoseconde permettraient théoriquement de mesurer des durées de vie de l'ordre de 10 ns. Cependant, à cause d'imperfections inhérentes à ceux-ci, le déclenchement du tir laser n'est précis qu'à une dizaine de nanosecondes près par rapport à l'ordre envoyé par le générateur de délai, ce qui augmente considérablement la largeur de la fonction d'appareil. Pour retrouver une largeur temporelle de la fonction d'appareil de 10 ns, la solution adoptée est de mesurer à chaque tir le délai réel entre les deux lasers par des photodiodes reliées à un oscilloscope LeCroy. Par conséquent, il n'est plus nécessaire de réaliser un balayage linéaire du délai, Δt peut être échantillonné aléatoirement dans un domaine allant de - 50 ns à plusieurs centaines de nanosecondes, ce qui de surcroît rend la mesure moins sensible à la diminution à long terme de l'efficacité du processus de désorption.

- En régime picoseconde, le délai Δt est contrôlé par une ligne à retard pilotée par ordinateur et peut varier entre -350 et 1300 ps. Pour éviter des artefacts lors des expériences IR2P-2C dans ce domaine temporel, la mesure de la durée de vie du premier état excité ππ* du toluène a été choisie comme critère du bon alignement spatial des faisceaux lasers. En effet, cet état excité à une durée de vie de 86 ns [15] et doit donc produire une fonction échelon dans l'intervalle temporel balayé par la ligne à retard.

2.2.5 Acquisition

Le signal provenant des galettes de micro-canaux, ou du photomultiplicateur lors des mesures de fluorescence, est envoyé sur un oscilloscope numérique interfacé avec un ordinateur. Cependant, la vitesse de transfert d'un spectre de masse complet entre l'oscilloscope et l'ordinateur est assez faible devant la fréquence de répétition des tirs lasers (10 ou 15 Hz selon le dispositif expérimental). Lors de l'acquisition des spectres électroniques, vibrationnels et des expériences d'IR2P-2C où le délai Δt entre les lasers pompe et sonde est balayé linéairement, une moyenne du signal sur plusieurs tirs est réalisée directement par l'oscilloscope et permet d'augmenter le rapport signal-sur-bruit sans saturer les communications avec l'ordinateur. L'oscilloscope envoie un signal moyenné à l'ordinateur seulement toutes les cinq secondes environ, c'est-à-dire après l'accumulation de 30 à 100 tirs lasers selon les expériences. Le spectre de masse moyenné est ensuite intégré, par un logiciel programmé en langage LabVIEW, sur plusieurs intervalles de temps de vol : (i) les intervalles correspondant aux temps de vol des ions étudiés (ou des deux paquets d'ions dans le cas des expériences de double résonance IR-UV) et (ii) un intervalle où aucun ion n'est observé et qui sera systématiquement soustrait des précédents pour obtenir une ligne de base en absence de signal. Un mode de fonctionnement identique est utilisé pour acquérir le signal de fluorescence provenant du photomultiplicateur. Dans les expériences d'IR2P-2C où le délai est échantillonné, la modification du délai Δt à chaque tir complique la procédure de moyennage du signal qui ne peut plus être effectuée par l'oscilloscope. L'intégration des intervalles de temps de vol est alors réalisée par l'oscilloscope et la moyenne par le programme LabVIEW. L'oscilloscope dispose ainsi d'assez de temps pour envoyer la valeur du délai Δt et des signaux intégrés entre chaque tir laser.

Le programme LabVIEW utilisé au LFP, dont une partie a été développée durant mes travaux de thèse, ne se limite pas à la communication avec l'oscilloscope. Il est également interfacé avec différents autres éléments du dispositif expérimental afin d'automatiser la procédure d'acquisition. Celle-ci peut se décomposer en les étapes suivantes :

i. Envoi par le programme d'un ordre de déplacement de la longueur d'onde aux lasers UV ou IR (spectres IR2P-1C ou IR-UV) ou d'un ordre de déplacement du délai pompe-sonde au générateur d'impulsions retardées (durées de vie IR2P-2C).

ii. Envoi de l'ordre de lancement de l'acquisition d'un signal à l'oscilloscope, moyenné sur un certain nombre de points (1 point dans le cas des durées de vie IR2P-2C avec échantillonnage du délai).

iii. Attente du message de fin d'acquisition envoyé par l'oscilloscope.

iv. Récupération des données de l'oscilloscope et traitement du signal pour afficher le spectre en temps réel.

v. Sauvegarde intermédiaire des données et retour à l'étape i.

Les programmes d'acquisition utilisés au CLUPS et au FOM fonctionnent sur un principe similaire mais sont adaptés aux spécificités des dispositifs expérimentaux (contrôle d'une ligne à retard pour le CLUPS, communication avec le laser à électrons libres FELIX pour le FOM).

2.3 Méthodes de calculs

Les peptides étudiés sont des molécules flexibles. Comme illustré dans la Figure 1.3, ils possèdent de nombreux degrés de libertés de rotation autour de liaisons simples entre atomes. Devant le très grand nombre de conformères envisageables pour de tels systèmes, il est nécessaire de s'appuyer sur des résultats de calculs de chimie quantique pour attribuer sans ambiguïté une conformation à un spectre expérimental de vibrations dans l'infrarouge. L'exploration du rôle de la conformation sur la dynamique de relaxation des états électroniques excités a également fait appel à des outils théoriques spécifiques qui seront présentés dans cette partie. L'attribution des structures des conformères a été réalisée au laboratoire ; l'étude des états excités a été menée en collaboration avec le groupe de chimie théorique de Nađa Došlić de l'Institut Ruđer Bošković à Zagreb (Croatie).

2.3.1 Détermination de structures

La stratégie adoptée pour attribuer une structure à un spectre expérimental d'absorption dans l'infrarouge a été la suivante. Dans un premier temps, une exploration de la surface d'énergie potentielle du peptide est réalisée en effectuant des rotations aléatoires des angles dièdres Φ, Ψ et X représentés sur la Figure 1.3, puis en optimisant les géométries obtenues grâce au champ de forces Amber99 [16] implémenté dans le logiciel Hyperchem 8.0 [17]. Ce champ de force a été choisi en particulier parce qu'il a été conçu pour modéliser des systèmes proches de ceux choisis pour cette étude ; il a en effet été optimisé sur des structures de protéines et d'acides nucléiques en phase condensée. Cette méthode permet de réaliser rapidement un inventaire des structures que peut adopter le peptide, toutefois les géométries des conformères obtenus ne sont pas assez fiables pour mener à des fréquences de vibration directement comparable à l'expérience et sont donc réoptimisées par la suite par des méthodes de chimie quantique. Comme il n'est pas envisageable de pouvoir réaliser cette nouvelle optimisation sur toutes les conformations résultant de l'exploration, un premier tri est réalisé sur un critère structurel à l'aide d'un logiciel, développé au laboratoire, détectant automatiquement le nombre et la nature de leurs liaisons hydrogène. Un grand nombre de structures de chaque famille possédant des enchaînements de liaisons hydrogène compatibles avec les spectres IR expérimentaux est cependant conservé car les énergies prédites par les champs de force ne sont pas assez fiables pour constituer un critère de tri précis. Certaines structures de départ qui ne sont pas trouvées par le champ de force sont de plus quelquefois générées manuellement afin de s'assurer de l'exhaustivité de l'inventaire réalisé.

Les interactions intramoléculaires, qui jouent un rôle crucial dans les structures adoptées par des chaînes peptidiques, peuvent s'exprimer en fonction de quatre forces fondamentales : l'interaction électrostatique entre dipôles permanents (forces de Keesom) ; l'interaction entre un dipôle permanent et un dipôle induit (forces de Debye) ; l'interaction entre deux dipôles instantanés (forces de dispersion de London) et l'interaction répulsive entre électrons, également appelée corrélation électronique [18]. Les méthodes de chimie quantique utilisées pour calculer les structures de peptides doivent donc décrire ces interactions le plus précisément possible.

La méthode de chimie quantique la plus simple pouvant être employée pour calculer l'énergie d'un système est la méthode d'Hartree-Fock : une fonction d'onde électronique décrivant le système est d'abord postulée, sous la forme d'un déterminant de Slater, puis optimisée par un principe variationnel jusqu'à ce que son énergie converge vers une valeur

minimale [19]. Par construction, la méthode Hartree-Fock ne prend cependant en compte qu'une partie de la corrélation électronique : seul le mouvement entre électrons de spins parallèles est corrélé, celui entre électrons de spins opposés ne l'est pas [20] ; ce qui conduit souvent à des écarts importants avec les résultats expérimentaux.

Un certain nombre de méthodes, appelées méthodes post-Hartree-Fock, ont été développées dans l'objectif d'améliorer le traitement de la corrélation électronique. On peut notamment citer, parmi ces méthodes, la théorie de la perturbation de Møller-Plesset (MP) [21], l'interaction de configuration (IC) ou encore la méthode du cluster couplé (CC). Cette amélioration entraîne cependant une augmentation des temps de calcul : alors qu'il est proportionnel à N^4 dans la méthode Hartree-Fock (où N représente le nombre de fonctions de base), le temps de calcul varie en N^5 pour la méthode MP au second ordre (MP2) et en N^7 pour la méthode CC. Dans le cadre de cette étude, seule la méthode post-Hartree-Fock la moins coûteuse, la méthode MP2, peut donc être employée en des temps réalistes pour réaliser des optimisations de géométrie et des calculs de fréquences de vibrations sur plusieurs dizaines de conformations de systèmes de la taille de petits peptides protégés. Malheureusement, la méthode MP2 produit des erreurs de superposition de base (BSSE pour *Basis Set Superposition Errors*) importantes lorsqu'elle est employée avec des fonctions de base de tailles moyennes, ce qui induit dans ce cas une surestimation de la force des interactions intramoléculaires attractives [22, 23, 24]. La BSSE peut toutefois être minimisée en augmentant la taille des fonctions de base, ou bien corrigée au moyen de la méthode de rééquilibrage (CP pour *CounterPoise method*), mais ces deux méthodes ont pour conséquence d'augmenter encore les temps de calcul.

Une alternative, moins coûteuse, aux méthodes post-Hartree-Fock sera donc employée pour déterminer les structures de peptides protégés : la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT pour *Density Functional Theory*). Cette méthode repose sur un principe différent des méthodes post-Hartree-Fock, l'énergie du système y est calculée en fonction de la densité électronique et non plus en fonction de la fonction d'onde électronique [25] ; les temps de calculs sont donc réduits à une variation en N^4 dû au fait que la densité électronique est seulement fonction de trois variables (au lieu de trois variables *par* électrons pour la fonction d'onde). D'après les équations de Kohn-Sham, l'énergie électronique du système peut s'écrire comme la somme de trois termes fonctions de la densité électronique : un terme d'énergie cinétique des électrons, un terme d'interaction électron-noyau et un terme d'interaction électron-électron [26]. Le principal inconvénient de la méthode DFT provient du fait que l'expression exacte de ce dernier terme n'est pas connue, la corrélation électronique doit donc être calculée au moyen de

fonctionnelles approchées. Ces fonctionnelles peuvent être classées en plusieurs catégories, selon le type d'approximations réalisées. On peut citer, par ordre de qualité croissante : les fonctionnelles reposant sur l'approximation de la densité locale (LDA pour *Local Density Approximation*), les fonctionnelles basées sur l'approximation des gradients généralisés (GGA pour *Generalized Gradient Approximation*) ou encore les fonctionnelles hybrides. En ce qui concerne le calcul des interactions intramoléculaires, la DFT est beaucoup moins sensible à la BSSE que la méthode MP2 [27] mais les résultats obtenus pour un même système peuvent varier considérablement en fonction de la fonctionnelle utilisée. En effet, la plupart des fonctionnelles (LDA, GGA ou hybrides) ne prennent pas en compte les forces de dispersion de London. Les géométries de complexes liés par des liaisons hydrogène obtenues à l'aide de certaines fonctionnelles, comme la fonctionnelle hybride B3LYP, peuvent être en relativement bon accord avec l'expérience mais il a été montré que ces bons résultats étaient surtout dus à une compensation d'erreur et ne pouvaient pas être généralisés au cas de chaînes peptidiques [28]. Plusieurs fonctionnelles et bases d'orbitales ont été testées au laboratoire et par Grégoire *et al.* en comparant leurs prédictions de spectres de vibration de peptides dans l'infrarouge [29, 30], la fonctionnelle que nous avons retenue à la suite de ces tests est la B97-D. Cette fonctionnelle est construite à partir d'une fonctionnelle de type GGA en lui ajoutant un terme correctif semi-empirique, pour tenir compte des interactions dispersives à longue portée, puis en ré-optimisant a posteriori la fonctionnelle pour tenir compte de l'ajout de ce terme supplémentaire [31]. Concernant les bases d'orbitales, la base triple-zêta de valence TZVPP [32] s'est trouvée être un bon compromis entre une précision suffisante pour décrire de faibles variations des fréquences de vibration des modes amides A et des temps de calculs raisonnables pour l'étude de peptides contenant jusqu'à cinq acides aminés. Enfin, pour réduire les temps de calculs, ceux-ci ont été réalisés en utilisant l'approximation de la résolution de l'identité (RI-DFT) [33].

Les géométries déterminées par le champ de force sont donc dans un premier temps ré-optimisées en utilisant la méthode DFT (RI-B97-D/TZVPP), par l'intermédiaire du logiciel Turbomole 6.4 [34]. Les fréquences de vibration harmoniques sont ensuite calculées avec la même méthode à partir des géométries optimisées.

Les fréquences de vibration d'élongation des groupements amides obtenues par cette méthode présentent néanmoins quelques défauts inhérents à la méthode choisie (choix de la fonctionnelle d'échange-corrélation et de la base d'orbitales) et également à la non prise en compte de l'anharmonicité de la surface d'énergie potentielle lors du calcul des fréquences dans

le cadre de l'approximation harmonique. Pour obtenir malgré ces approximations des résultats permettant une exploitation des spectres expérimentaux, les fréquences théoriques sont multipliées par un facteur correctif (facteur d'échelle). Les facteurs d'échelle utilisés dans cette étude ont été déterminés à partir des attributions déjà réalisées au sein du laboratoire sur plus d'une vingtaine de peptides. Les fréquences de vibration expérimentales des modes amides A de ces peptides ont été tracées en fonction de leur fréquence théorique attribuée (Figure 2.9). On peut remarquer que les trois modes de vibration d'élongation des liaisons N-H (élongation d'un groupement NH, élongations symétrique et antisymétrique d'un groupement NH_2) présentent des comportements différents. Trois corrections affines seront donc appliquées aux fréquences théoriques, selon le mode de vibration d'élongation. Après application des facteurs d'échelle, les nombres d'onde calculés des différents modes présentent typiquement un écart de l'ordre de la dizaine de cm^{-1} par rapport aux valeurs expérimentales. Les conformations qui seront retenues pour l'attribution seront donc les conformations dont les nombres d'onde calculés, pour les différentes vibrations d'élongation des liaisons N-H, présentent des écarts inférieurs à 20 cm^{-1} avec les nombres d'onde expérimentaux.

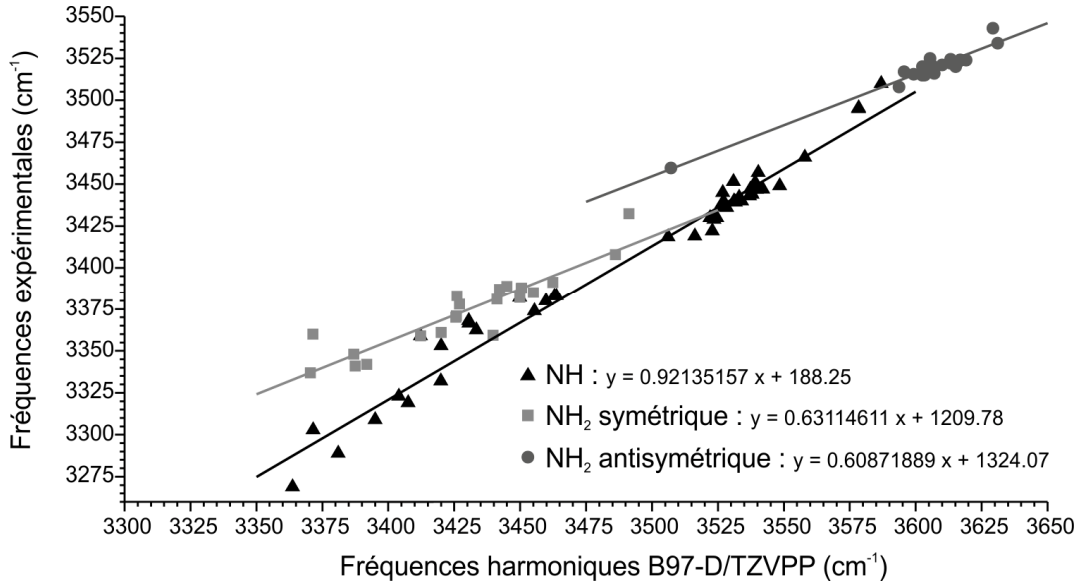


Fig 2.9 – *Tracé des fréquences expérimentales des vibrations d'élongation des liaisons N-H en fonction de leur fréquence calculée par la méthode RI-B97-D/TZVPP.*

2.3.2 Etude des mécanismes de relaxation de l'énergie électronique

Dans l'objectif de déterminer les mécanismes de relaxation pouvant intervenir après une excitation électronique $\pi \rightarrow \pi^*$ d'un chromophore aromatique d'un peptide, une première

exploration des mécanismes possibles et des états excités impliqués est réalisée au moyen d'une méthode de dynamique non adiabatique utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité dépendant du temps (TDDFT), selon une procédure proposé par Bonačić-Koutecky *et al.* [35]. La fonctionnelle choisie pour cette étude est la fonctionnelle PBE0 [36] associée à la base cc-pVDZ [37], il a été démontré précédemment que cette fonctionnelle donne d'assez bons résultats lors de calculs d'états excités [38]. Au commencement de chaque trajectoire, le peptide débute dans son premier état excité ππ*, la position et quantité de mouvement initiales des noyaux atomiques sont tirées au sort d'après une première dynamique du peptide dans son état fondamental, réalisée à 298 K. Bien que très supérieure à la température attendue pour une molécule refroidie dans une détente supersonique, cette valeur a été arbitrairement choisie pour échantillonner un grand nombre de conformations permettant, une fois à l'état excité, d'explorer assez efficacement les distorsions structurelles susceptibles de mener à une dynamique non-adiabatique. On espère ainsi favoriser « l'observation » de tels processus de relaxation en des temps de calculs restants raisonnables. L'échantillonnage ainsi que la possible diversité des modes de relaxation imposent de lancer un nombre important de trajectoires différentes. Au cours de chaque trajectoire, le mouvement des noyaux est propagé conformément à l'algorithme classique de Verlet [39] avec un pas de temps de 0.25 fs et pendant une durée totale de 1250 fs (5000 pas). De plus, à chaque pas de 0.1 as est calculé et tiré au sort la probabilité de changer d'état électronique, selon la procédure de Tully [40], parmi un ensemble d'états comprenant l'état électronique fondamental et les quatre premiers états excités. Plusieurs dizaines de trajectoires sont ainsi réalisées afin d'échantillonner les divers mécanismes de relaxation. Il faut cependant noter que, malgré l'emploi d'une fonctionnelle adaptée à l'étude d'états excités, la TDDFT est seulement une méthode qualitative, elle ne permet pas de comparer entre eux ces mécanismes. Il a été montré en particulier qu'elle ne décrit pas avec suffisamment d'exactitude les intersections coniques qui sont pourtant à l'origine d'un grand nombre de propriétés photophysiques [41].

Par conséquent, les mécanismes de relaxation observés durant les simulations de dynamique non-adiabatique utilisant la TDDFT sont ensuite recalculés avec une méthode plus quantitative [42] dans le but de vérifier l'existence d'intersections coniques et d'estimer les barrières d'énergies à franchir le long de ces mécanismes. La méthode CC2 basée sur la théorie du cluster couplé [43] est employée pour ces calculs, avec la base cc-pVDZ et dans le cadre de l'approximation de la résolution de l'identité (RI-CC2) pour effectuer ceux-ci en des temps raisonnables. Les mécanismes issus de la dynamique non-adiabatique ont permis d'identifier pour chacun d'eux une coordonnée de réaction caractéristique, typiquement l'allongement d'une

liaison covalente. Les évolutions des énergies de l'état fondamental et des quatre premiers états excités au cours de ces mécanismes de relaxation sont calculées au niveau RI-CC2/cc-pVDZ en réalisant des optimisations sous contraintes, pendant lesquelles toutes les coordonnées internes sont autorisées à relaxer, sauf la coordonnée de réaction qui est fixe et est seulement incrémentée à chaque nouvelle optimisation. Tant que les variations des coordonnées internes autorisées à relaxer ne sont pas trop importantes, ces optimisations fournissent une bonne approximation du chemin de moindre énergie pour ce mécanisme de relaxation. Des variations importantes des coordonnées internes sont toutefois à attendre dans certaines régions critiques, notamment proche des intersections coniques. Lorsque de tels cas surviennent, les énergies des différents états électroniques sont calculées à partir de géométries obtenues en interpolant linéairement toutes les coordonnées internes de la molécule entre les dernières optimisations réussies de part et d'autre de la région critique. Enfin, lorsque la force associée à la coordonnée de réaction change de signe et que d'attractive elle devient répulsive, une optimisation complète du système est alors réalisée. Ces optimisations sans contraintes mènent généralement à une région où la différence d'énergie entre deux états électroniques devient très faible et apporte la preuve de la présence d'une intersection conique entre ceux-ci.

2.4 Bibliographie

[1] M. Mons, F. Piuzzi, I. Dimicoli, L. Gorb et J. Leszczynski, *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110, (38), 10921-10924.

[2] M. Mons, I. Dimicoli et F. Piuzzi, *Int. Rev. Phys. Chem.* **2002**, 21, 101--135.

[3] F. Piuzzi, I. Dimicoli, M. Mons, B. Tardivel et Q. Zhao, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, 320, (3-4), 282-288.

[4] J. R. Cable, M. J. Tubergen et D. H. Levy, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, (20), 6198-6199.

[5] A. Abo-Riziq, B. O. Crews, M. P. Callahan, L. Grace et M. S. de Vries, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2006**, 45, (31), 5166-5169.

[6] E. C. Stanca-Kaposta, D. P. Gamblin, E. J. Cocinero, J. Frey, R. T. Kroemer, A. J. Fairbanks, B. G. Davis et J. P. Simons, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, (32), 10691-10696.

[7] A. M. Rijs, E. R. Kay, D. A. Leigh et W. J. Buma, *J. Phys. Chem. A* **2011**, 115, (34), 9669-9675.

[8] R. J. Plowright, E. Gloaguen et M. Mons, *ChemPhysChem* **2011**, 12, (10), 1889-1899.

[9] G. Meijer, M. S. Devries, H. E. Hunziker et H. R. Wendt, *Appl. Phys. B* **1990**, 51, (6), 395-403.

[10] G. A. Pino, A. N. Oldani, E. Marceca, M. Fujii, S. I. Ishiuchi, M. Miyazaki, M. Broquier, C. Dedonder et C. Jouvet, *J. Chem. Phys.* **2010**, 133, (12), 124313.

[11] V. I. Karataev, D. V. Shmikk et B. A. Mamyrin, *Soviet Physics Technical Physics-Ussr* **1972**, 16, (7), 1177-1179.

[12] B. A. Mamyrin, *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, 206, 251--266.

[13] W. C. Wiley et I. H. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.* **1955**, 26, (12), 1150-1157.

[14] B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk et V. A. Zagulin, *Sov. Phys.-JETP* **1973**, 37, (1), 45-48.

[15] C. G. Hickman, J. R. Gascooke et W. D. Lawrance, *J. Chem. Phys.* **1996**, 104, (13), 4887-4901.

[16] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell et P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, (19), 5179-5197.

[17] *Hyperchem 8.0*, Hypercube, Inc.: 1115 NW 4th Street, Gainesville, FL 32608 (USA).

[18] G. Chalasinski et M. M. Szczesniak, *Chem. Rev.* **1994**, 94, (7), 1723-1765.

[19] A. Szabo et O. N.S., The Hartree-Fock Approximation. In *Modern Quantum Chemistry : Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*, Dover Publications, **1996**, pp 108-230.

[20] A. Szabo et O. N.S., Many Electron Wave Functions and Operators. In *Modern Quantum Chemistry : Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*, Dover Publications, **1996**, pp 39-107.

[21] C. Møller et M. S. Plesset, *Phys. Rev.* **1934**, 46, 618-622.

[22] M. Kolar et P. Hobza, *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111, (26), 5851-5854.

[23] A. E. Shields et T. van Mourik, *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111, (50), 13272-13277.

[24] L. F. Holroyd et T. van Mourik, *Chem. Phys. Lett.* **2007**, 442, (1-3), 42-46.

[25] P. Hohenberg et W. Kohn, *Phys. Rev. B* **1964**, 136, (3B), 864-871.

[26] W. Kohn et L. J. Sham, *Phys. Rev. A* **1965**, 140, (4A), 1133-1138.

[27] T. van Mourik, *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, 4, (10), 1610-1619.

[28] J. Cerny et P. Hobza, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, 9, (39), 5291-5303.

[29] E. Gloaguen, H. Valdes, F. Pagliarulo, R. Pollet, B. Tardivel, P. Hobza, F. Piuzzi et M. Mons, *J. Phys. Chem. A* **2010**, 114, (9), 2973-2982.

[30] Y. Bouteiller, J. C. Poully, C. Desfrançois et G. Grégoire, *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113, (22), 6301-6307.

[31] S. Grimme, *J. of Comput. Chem.* **2006**, 27, (15), 1787-1799.

[32] F. Weigend, M. Haser, H. Patzelt et R. Ahlrichs, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 294, (1-3), 143-152.

[33] C. K. Skylaris, L. Gagliardi, N. C. Handy, A. G. Ioannou, S. Spencer et A. Willetts, *Theochem-J. Mol. Struct.* **2000**, 501, 229-239.

[34] R. Ahlrichs, M. Bar, M. Haser, H. Horn et C. Kolmel, *Chem. Phys. Lett.* **1989**, 162, (3), 165-169.

[35] R. Mitric, U. Werner et V. Bonacic-Koutecky, *J. Chem. Phys.* **2008**, 129, (16), 164118.

[36] J. P. Perdew, K. Burke et M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, 77, (18), 3865-3868.

[37] T. H. Dunning, *J. Chem. Phys.* **1989**, 90, (2), 1007-1023.

[38] D. Jacquemin, E. A. Perpete, G. E. Scuseria, I. Ciofini et C. Adamo, *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, 4, (1), 123-135.

[39] L. Verlet, *Phys. Rev.* **1967**, 159, (1), 98-103.

[40] J. C. Tully, *J. Chem. Phys.* **1990**, 93, (2), 1061-1071.

[41] L. Gonzalez, D. Escudero et L. Serrano-Andres, *ChemPhysChem* **2012**, 13, (1), 28-51.

[42] M. Schreiber, M. R. Silva-Junior, S. P. A. Sauer et W. Thiel, *J. Chem. Phys.* **2008**, 128, (13), 134110.

[43] O. Christiansen, H. Koch et P. Jorgensen, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, 243, (5-6), 409-418.

Chapitre 3

Modélisation du refroidissement conformationnel dans une détente supersonique

Chapitre 3

Modélisation du refroidissement conformationnel dans une détente supersonique

Lors de l'étude conformationnelle de systèmes flexibles en phase gazeuse par spectroscopie de double résonance IR-UV, deux critères sont généralement utilisés pour attribuer une structure calculée à un conformère observé expérimentalement. Le premier est un critère spectroscopique : un bon accord doit exister entre les fréquences de vibration théoriques de la structure et les fréquences de vibration mesurées expérimentalement. L'amélioration des prédictions fournies par les outils théoriques actuels a rendu ce critère de plus en plus robuste. Pour les peptides protégés, la méthode DFT RI-B97-D/TZVPP couplée à des facteurs d'échelle affines spécifiques à chaque mode de vibration amide A (3200-3600 cm^{-1}) permet ainsi d'obtenir dans cette région des prédictions avec un écart inférieur à 20 cm^{-1} par rapport aux fréquences expérimentales (Chapitre 2). Le deuxième critère, quelque fois plus difficile à appréhender, est un critère énergétique : les structures attribuées aux conformations observées dans une détente supersonique sont supposées être les structures les plus stables, c'est-à-dire possédant les enthalpies à 0 K les plus basses. Des contre-exemples du critère énergétique ont cependant été mis en évidence à plusieurs reprises [1, 2, 3, 4], notamment dans le cas du dipeptide protégé Ac-Ala-Ala-OBn [1], qui sera introduit dans la première partie de ce chapitre. Dans l'objectif de mieux caractériser l'origine de ces contre-exemples, un modèle de refroidissement conformationnel de molécules dans une détente supersonique a été développé durant cette thèse : son principe général sera décrit dans la deuxième partie de ce chapitre. Les deux parties suivantes seront ensuite consacrées au détail du traitement des collisions et des isomérisations dans le modèle.

3.1 Problématique : Etude conformationnelle du dipeptide protégé Ac-Ala-Ala-OBn

Les signatures électroniques dans le proche UV de deux conformères du dipeptide protégé Ac-Ala-Ala-OBn ont été détectées par IR2P-1C au LFP, avec des lasers fonctionnant en régime nanoseconde (Figure 3.1). Les spectres de vibration des modes amide A obtenus par spectroscopie de double résonance IR-UV, associés à des calculs de fréquences de vibration au niveau RI-B97-D/TZVPP [1], ont permis d'attribuer les structures suivantes à ces deux conformères : une structure étendue caractérisée par deux interactions de type C_5 pour le conformère **A**, et une structure repliée présentant une liaison hydrogène C_7 et une interaction NH-π pour le conformère **B**. Parmi les deux familles de structures possédant le meilleur accord avec les spectres IR (C_5-C_5 et π-C_7), ces deux géométries possèdent chacune l'enthalpie libre à 0 K (correspondant à la somme de l'énergie électronique et de l'énergie vibrationnelle du point zéro) la plus basse. Néanmoins, la différence d'enthalpie libre à 0 K calculée entre les deux structures est importante (11,8 kJ · mol^{-1}), ce qui rend très surprenant l'observation simultanée de celles-ci expérimentalement. De plus, c'est la moins stable des deux formes prédites par le calcul (le conformère **A**) qui correspond au signal d'ions le plus intense.

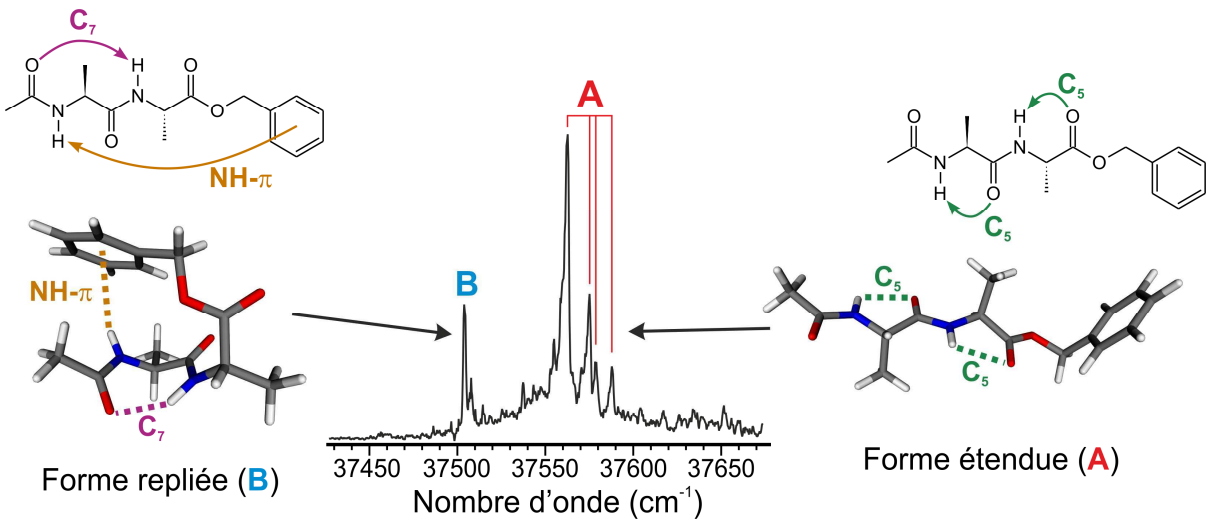


***Fig. 3.1** – Spectre d'IR2P-1C du dipeptide protégé Ac-Ala-Ala-OBn dans le domaine du proche UV (au centre) présentant les signatures électroniques de deux conformères, notés **A** et **B**, dont les structures attribuées, calculées au niveau RI-B97-D/TZVPP, sont respectivement représentées à droite et à gauche de la figure.*

On peut cependant argumenter sur le fait que, dans les expériences d'IR2P-1C, les rapports d'intensités des signaux d'ions entre conformères peuvent dans certains cas ne pas être

directement reliés aux rapports de population dans la détente supersonique. Avant de conclure à un paradoxe entre les prédictions énergétiques et les observations expérimentales, il faut donc au préalable justifier que les conformères **A** et **B** présentent des sections efficaces d'ionisation proches. La section efficace d'ionisation d'un conformère dépend de : (i) la probabilité d'absorber le premier photon, (i) la probabilité d'absorber le deuxième photon et (iii) la probabilité d'ionisation. Les deux conformères possédant le même chromophore, il est peu probable que la variation de l'environnement proche autour de celui-ci puisse à elle seule conduire à des probabilités d'absorption du premier photon très différentes. La probabilité d'absorber le deuxième photon dépend aussi de la durée de vie de l'état excité ππ*. Il est donc nécessaire de vérifier que la durée de vie du premier état excité ππ* du conformère **B** n'est pas petite devant la durée d'impulsion du laser UV nanoseconde, ce qui pourrait limiter l'absorption d'un second photon et donc affecter notre capacité à détecter le signal d'ion correspondant à ce conformère. Pour cela, des spectres d'IR2P-1C ont été réalisés au CLUPS en conservant les mêmes conditions expérimentales de désorption et de détente supersonique qu'au laboratoire, mais en utilisant des lasers UV picosecondes. Durant ces expériences aucune variation notable du rapport d'intensité des bandes associées aux conformères **A** et **B** n'a pu être mis en évidence. Ce résultat a été confirmé par la suite par des expériences pompe-sonde d'IR2P-2C : des durées de vie du même ordre de grandeur ont été mesurées pour le premier état excité ππ* de **A** et **B**, respectivement 45 et 30 ns, ce qui est également largement supérieur à la durée des impulsions d'un laser UV nanoseconde. Enfin, concernant le point (iii) évoqué précédemment, pour que les probabilités d'ionisation des deux conformères soient très différentes il faudrait par exemple que les différences de géométrie entre la molécule neutre et l'ion varie beaucoup entre **A** et **B**, ce qui est également peu probable. Ces hypothèses ayant été écartées, il faut donc en conclure que l'intensité du signal d'ion reflète très vraisemblablement les abondances expérimentales : les deux formes sont présentes simultanément dans la détente supersonique et la forme étendue est le conformère majoritaire.

L'origine du paradoxe apparent des abondances expérimentales de Ac-Ala-Ala-OBn provient de la grande différence de géométrie entre les deux structures : la structure du conformère **B**, contrainte par la présence des interactions C_7 et NH-π, est beaucoup moins flexible que celle associée au conformère **A**. En d'autres termes, le conformère **A** possède des modes de vibration de plus basses fréquences que le conformère **B**. Les enthalpies libres des deux conformations présentent donc des comportements très différents vis-à-vis de la température. Les modes de basses fréquences entraînent en effet une augmentation plus rapide de la densité d'états

vibrationnels du conformère **A** avec l'énergie ; plus l'énergie augmente, plus ce conformère est favorisée pour des raisons entropiques. L'évolution des enthalpies libres relatives des formes étendues et repliées en fonction de la température est représentée dans la Figure 3.2. La différence d'enthalpie libre entre le conformère **A** et le conformère **B** diminue lorsque la température augmente. Il existe même une température d'inversion à partir de laquelle la forme étendue devient la forme la plus stable du dipeptide protégé. Cette température d'inversion vaut 260 K pour des enthalpies libres calculées avec la méthode DFT RI-B97-D/TZVPP (mais peut varier de plusieurs centaines de Kelvin selon la fonctionnelle et la base utilisées [1]). Tout se passe donc comme si la température conformationnelle (la température définie d'après les rapports de population entre conformations à l'équilibre thermodynamique) du système était supérieure à 260 K dans la zone d'interaction avec les lasers. Nous avons donc cherché à comprendre pourquoi cette dernière température était aussi différente des températures vibrationnelles et rotationnelles (estimées à environ une dizaine de Kelvin) dans le cas de Ac-Ala-Ala-OBn.

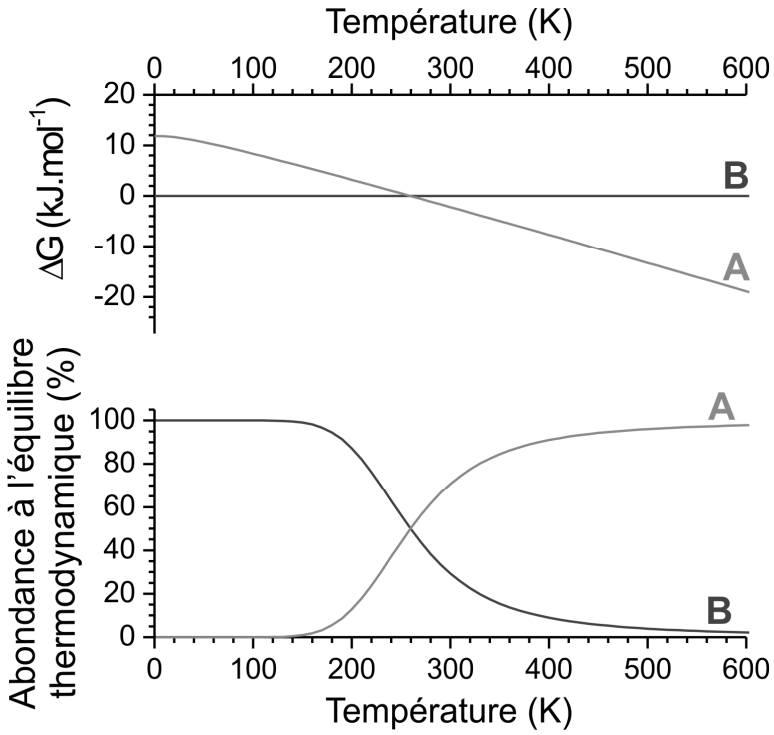


Fig. 3.2 – *Haut : Evolution des enthalpies libres relatives (ΔG en kJ · mol^{-1}) des conformères **A** et **B** du dipeptide protégé Ac-Ala-Ala-OBn en fonction de la température, calculée à partir des énergies et fréquences harmoniques obtenues au niveau RI-B97-D/TZVPP. Bas : Evolution des abondances relatives des conformères **A** et **B** en fonction de la température, calculées par la loi de Maxwell-Boltzmann. Ces abondances correspondent à celles obtenues dans le cadre d'un équilibre thermodynamique entre les deux structures.*

Pour cela, nous nous sommes intéressés au processus de refroidissement de molécules flexibles dans une détente supersonique. Il a été montré qu'après désorption d'une surface de graphite (avant refroidissement dans une détente supersonique) des températures vibrationnelles de l'ordre de 300 à 450 K pouvaient être atteintes [5]. Le processus suivant peut donc être imaginé : le conformère **A**, initialement très majoritaire, est refroidi par collisions dans la détente supersonique, ce qui diminue ainsi son abondance au profit du conformère **B**. Cependant, après un certain nombre de collisions, l'énergie interne disponible devient faible devant la barrière d'isomérisation, ce qui ralentit considérablement la cinétique de ce processus. Le système passe alors d'un état d'équilibre thermodynamique à un état hors équilibre, les températures vibrationnelles et rotationnelles du peptide continuent de diminuer suite à des collisions mais la température conformationnelle (définie par le rapport d'abondance entre conformations à l'équilibre thermodynamique) ne varie plus. Pour résumer, le rapport d'abondance entre conformations observées dans une détente supersonique est gouverné par un contrôle cinétique dû à la compétition entre la vitesse de refroidissement par collisions et la vitesse d'isomérisation entre conformations.

Pour tenir compte de ce phénomène une correction est souvent apportée au critère énergétique utilisé lors de l'attribution de spectres IR et présenté au début de ce chapitre. Elle consiste à comparer les enthalpies libres calculées à 300 K et non pas à 0 K. Ce qui revient à estimer une température conformationnelle finale du système de 300 K. Toutefois, on doit s'attendre à ce que les rapports d'abondances entre conformations dépendent de nombreux facteurs, dont par exemple les hauteurs de barrières d'isomérisation et les caractéristiques de la détente supersonique. Cette valeur empirique de température conformationnelle est donc difficilement généralisable d'un système à un autre. Pour essayer d'améliorer notre compréhension du processus de refroidissement dans une détente supersonique, une partie de mes travaux de thèse a été consacrée au développement d'un modèle statistique de transfert d'énergie interne par collisions et d'isomérisations de molécules vaporisées par désorption laser, ou par simple chauffage, et refroidies dans une détente supersonique.

3.2 Description générale du modèle

Pour pouvoir décrire numériquement le refroidissement conformationnel d'une molécule dans une détente supersonique il faut pouvoir modéliser les propriétés de la détente, celles de la molécule et les phénomènes de collisions inélastiques et d'isomérisation. Cette partie a pour

objectif de présenter le principe général du modèle et les hypothèses réalisées afin de décrire numériquement la détente supersonique et les molécules.

3.2.1 Principe

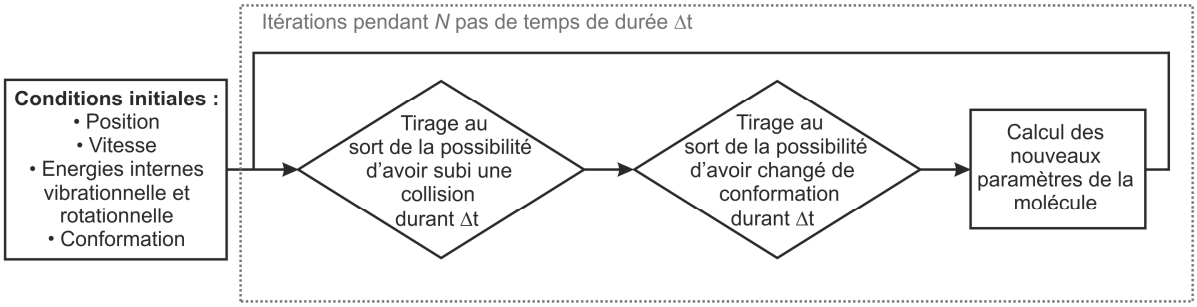


Fig. 3.3 – *Schéma du principe de fonctionnement du modèle de refroidissement conformationnel*

Le modèle de refroidissement conformationnel a été programmé en langage C++, couplé à la bibliothèque Qt pour la gestion d'interfaces graphiques. Il est basé sur une méthode de type Monte-Carlo cinétique : un certain ensemble de conditions initiales est attribué à une molécule-test puis des évènements aléatoires simulent l'évolution de cette molécule unique dans une détente supersonique en fonction du temps. A chaque pas de temps la réalisation des deux phénomènes suivant est tirée au sort : (i) une collision de la molécule avec un atome du gaz porteur et (ii) une isomérisation de la molécule. Un schéma résumant le principe de fonctionnement de la simulation est représenté sur la Figure 3.3. L'évolution des propriétés moléculaires le long de de la détente, par exemple les énergies vibrationnelle et rotationnelle, les abondances relatives de conformations ou encore les nombres de collisions subies par les molécules, est ensuite obtenue *a posteriori* en moyennant ces grandeurs en chaque point de la détente sur un grand nombre de simulations de molécule unique (typiquement de l'ordre de plusieurs milliers).

3.2.2 Détente supersonique

Expérimentalement, une détente consiste en une expansion d'un gaz, initialement à la pression P_0 et à la température T_0, à travers un orifice de faible diamètre d et dans une enceinte maintenue à une pression P' inférieure à P_0. Lors de l'expansion, l'énergie thermique des atomes est transformée par collisions successives en énergie cinétique translationnelle, conduisant ainsi à

leur refroidissement. Dans l'hypothèse d'une détente adiabatique d'un gaz parfait, la température T_1 des atomes à une position donnée au sein de l'expansion est reliée à la pression P_1 à cette position par l'équation (3.1), avec γ le rapport des capacités calorifiques à pression constante et à volume constant.

$$T_1 = T_0 \left(\frac{P_1}{P_0} \right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} \qquad \text{(Eq. 3.1)}$$

La vitesse v_1 du jet à cette position peut être déduite de l'équation de conservation de l'énergie le long d'une ligne de courant (équation de Bernoulli). Pour un écoulement d'un gaz parfait et en considérant que la capacité calorifique à pression constante C_p est constante dans le domaine de température considéré, cette vitesse dépend uniquement de la nature du gaz et de la différence de température entre T_0 et T_1 selon l'équation suivante :

$$\frac{1}{2} m v_1^2 = \frac{\gamma}{\gamma-1} k \left(T_0 - T_1 \right) \qquad \text{(Eq. 3.2)}$$

avec m la masse d'un atome du gaz (en kg)

v_1 la vitesse du jet (en $m \cdot s^{-1}$)

k la constante de Boltzmann (en $J \cdot K^{-1}$)

Une détente est dite supersonique lorsque la vitesse de l'écoulement v_1 dépasse la vitesse locale du son a. Elle est alors caractérisée par un nombre de mach M supérieur à l'unité ($M = v_1 / a$). Pour un gaz parfait, la vitesse du son est définie par :

$$a = \sqrt{\frac{\gamma k T_1}{m}} \qquad \text{(Eq. 3.3)}$$

D'après les équations (3.1) à (3.3) la condition que doivent respecter les pressions P_0 et P_1 pour obtenir un jet supersonique lors d'une détente adiabatique idéale d'un gaz parfait est la suivante :

$$\frac{P_0}{P_1} \geq \left(\frac{\gamma+1}{2} \right)^{\frac{\gamma}{\gamma-1}} \qquad \text{(Eq. 3.4)}$$

Cette condition devient $P_0 \geq 2.1\, P_1$ pour un gaz monoatomique ($\gamma = 5/3$), ce qui est largement vérifié dans les conditions décrites au chapitre 2 (avec un rapport P_0 / P' de l'ordre de 10^9).

Les équations (3.2) et (3.3) peuvent être combinées afin d'exprimer les propriétés de l'écoulement sous une forme plus pratique, dépendant uniquement des propriétés du gaz en amont de la vanne (P_0, T_0) et de deux autres paramètres : le rapport des capacités calorifiques γ et le nombre de Mach M.

$$\frac{T_0}{T_1} = 1 + \frac{\gamma - 1}{2} M^2 \qquad \text{(Eq. 3.5a)}$$

D'après la relation (3.1) d'un écoulement adiabatique et l'équation d'état des gaz parfaits les expressions de la pression P_1 et de la densité particulaire n_1 peuvent alors se mettre sous la forme :

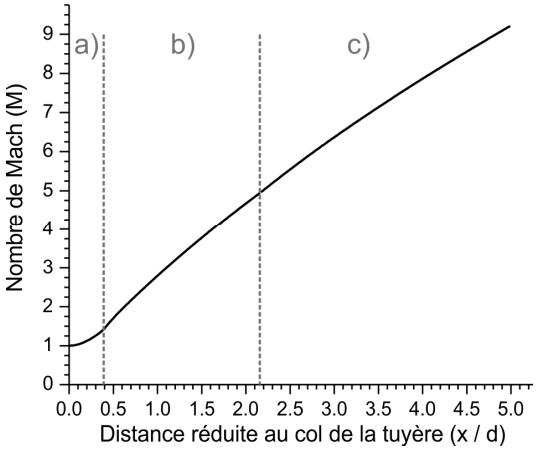
$$\frac{P_0}{P_1} = \left(1 + \frac{\gamma - 1}{2} M^2\right)^{\frac{\gamma}{\gamma - 1}} \qquad \text{(Eq. 3.5b)}$$

$$\frac{n_0}{n_1} = \left(1 + \frac{\gamma - 1}{2} M^2\right)^{\frac{1}{\gamma - 1}} \qquad \text{(Eq. 3.5c)}$$

Par conséquent, la connaissance du nombre de Mach M suffit pour calculer toutes les grandeurs thermodynamiques caractérisant l'expansion supersonique. Pour se placer dans les limites des approximations ayant conduit aux équations précédentes, la détente supersonique est donc représentée par un jet continu dans le modèle statistique de refroidissement conformationnel. De plus, la fraction molaire des molécules ensemencées dans le jet est supposée négligeable, de manière à ce que les propriétés du jet ne soient pas modifiées par la présence de celle-ci et à justifier la simulation de molécule-test unique, la probabilité de collision entre deux molécules étant nulle.

De nombreux travaux théoriques et expérimentaux ont été menés afin de caractériser l'évolution de M à l'intérieur d'une expansion supersonique [6]. Une des conclusions importantes de ces travaux est que les propriétés d'un écoulement créé par un orifice circulaire de diamètre d, possédant donc une symétrie de révolution autour d'un axe (Ox), ne dépendent sur l'axe du jet

(Ox) que de la distance à l'orifice. *M* peut donc être exprimé en fonction de la seule variable réduite *x/d* définie sur la Figure 3.5a. Plusieurs formules analytiques de *M* en fonction de *x/d* ont été proposées, chacune possédant un certain domaine de validité le long de l'axe *(Ox)*. Les équations (3.6a) et (3.6b) formulées par Miller et Murphy et l'équation (3.6c) formulée par Ashkenas et Sherman [6] ont été implantées dans le modèle de refroidissement conformationnel (Figure 3.4). La première équation a été paramétrée pour reproduire l'évolution de *M* au début de la détente, à des distances *x* petites devant le diamètre de l'orifice. Les deux autres permettent de calculer *M* à de plus grandes distances. Les bornes limites d'application des équations (3.6b) et (3.6c) dans le modèle ont été choisies légèrement en dehors des domaines de validité indiqués dans la Réf. [6] de manière à assurer une continuité de la valeur de *M* le long de l'axe du jet. Cependant, les valeurs de *M* calculées par l'équation (3.6b) en dehors de son domaine de validité ($0{,}390 \le (x/d) < 0{,}5$) présentent un écart maximum inférieur à 4% avec celles calculées par l'équation (3.6a) dans ce domaine. De même, les valeurs de *M* calculées par l'équation (3.6c) présentent un écart maximum inférieur à 0.7% avec celles calculées par l'équation (3.6b) dans le domaine $2{,}159 \le (x/d) < 2{,}5$. Les valeurs des coefficients utilisés dans ces équations ainsi que leurs domaines de validité et d'application sont indiquées dans le tableau 3.1. Un exemple d'application des équations précédentes, donnant l'évolution de la température et de la pression dans une détente supersonique le long de l'axe du jet, est représenté sur la Figure 3.5b.



$$a)\quad M = 1.0 + A_1\left(\frac{x}{d}\right)^2 + A_2\left(\frac{x}{d}\right)^3 \qquad \text{(Eq. 3.6a)}$$

$$b)\quad M = \left(\frac{x}{d}\right)^{\gamma-1}\left[B_1 + \frac{B_2}{\left(\frac{x}{d}\right)} + \frac{B_3}{\left(\frac{x}{d}\right)^2} + \frac{B_4}{\left(\frac{x}{d}\right)^3}\right] \qquad \text{(Eq. 3.6b)}$$

$$c)\quad M = C\left(\frac{x}{d} - \frac{x_0}{d}\right)^{\gamma-1} - \frac{1}{2}\,\frac{\gamma+1}{\gamma-1}\left[C\left(\frac{x}{d} - \frac{x_0}{d}\right)^{\gamma-1}\right]^{-1} \qquad \text{(Eq. 3.6c)}$$

Fig. 3.4 – *Tracé du nombre de Mach (M) en fonction de la distance réduite au col de la tuyère (x/d) d'après les équations phénoménologiques tirées de la Réf. [6].*

Les équations précédentes permettent de calculer les propriétés de l'expansion sur l'axe du jet. Or, pour pouvoir simuler les trajectoires de molécules désorbées loin de l'axe il est nécessaire de pouvoir déterminer celles-ci en chaque point de l'espace. Par la suite, on

considèrera que la température ne dépend que de la variable *x*. La pression en un point *N* de coordonnées (*x*, *y*, *z*) sera calculée d'après la pression sur l'axe du jet aux coordonnées (*x*, *y = 0*, *z = 0*) par l'équation phénoménologique (3.7). Elle diminue dans une direction perpendiculaire à l'axe du jet selon une loi en $\cos^4(\theta)$. L'allure des courbes de pression en dehors de l'axe du jet est schématisée sur la Figure 3.5c pour une vanne d'1 mm de diamètre.

	Coefficients				Domaine de validité	Domaine d'application
Eq. 3.6a	A_1	A_2			$0 < (x/d) < 1{,}0$	$0 < (x/d) < 0{,}390$
	3,337	-1,541				
Eq. 3.6b	B_1	B_2	B_3	B_4	$0{,}5 < (x/d)$	$0{,}390 \leq (x/d) < 2{,}159$
	3,232	-0,7563	0,3937	-0,0729		
Eq. 3.6c	C	x_0/d			$2{,}5 < (x/d)$	$2{,}159 \leq (x/d)$
	3,26	0,075				

Tab. 3.1 – *Coefficients et domaines de validité des équations (3.6a) à (3.6c) pour des gaz parfaits monoatomiques ($\gamma = 5/3$), tirés de la Réf. [6].*

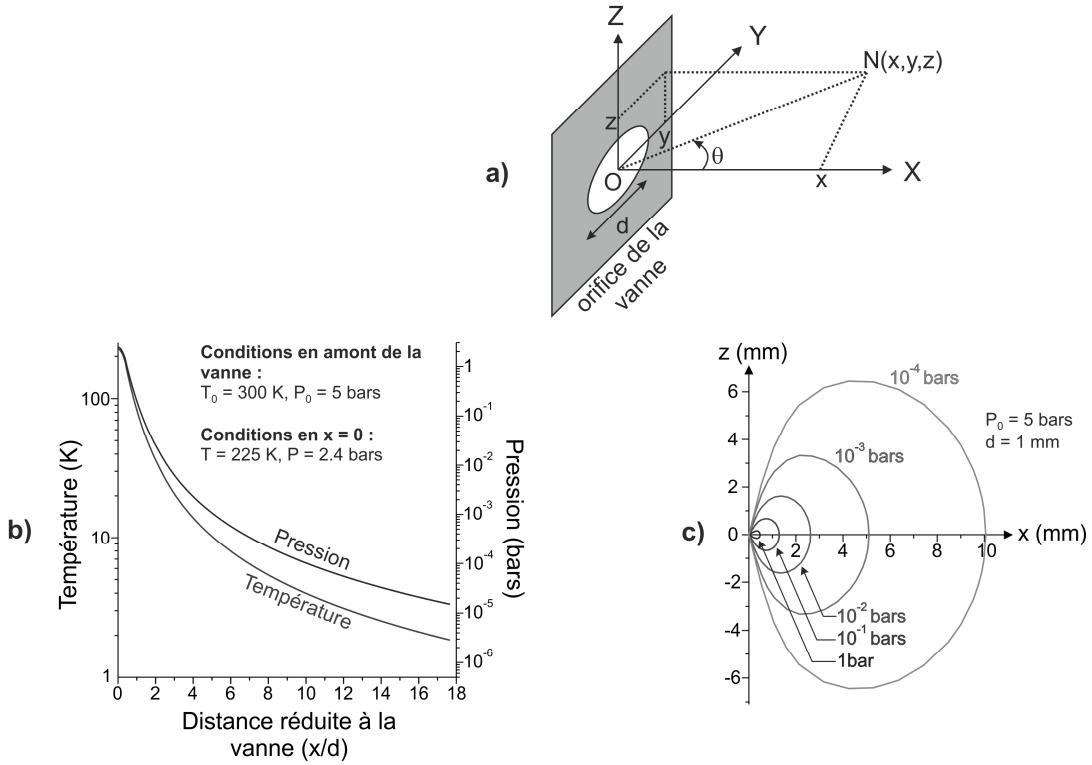


Fig. 3.5 – *a) Définition du système de coordonnées utilisées dans le modèle. b) Evolution de la pression et de la température le long de l'axe du jet pour une détente supersonique d'un gaz monoatomique, calculée d'après les équations (3.5) et (3.6). La pression et la température en amont de l'orifice ont été respectivement prises égales à 5 bars et de 300 K. c) Courbes de pressions constantes dans le plan (xOz) pour un orifice de diamètre 1 mm et une pression en amont de la vanne égale à 5 bars.*

$$\begin{cases} P(x,y,z) = P_{axe}(x,0,0)\cos(\theta)^2 \cos\left(\dfrac{\pi\,\theta}{2\times\Phi}\right)^2 & si\ \theta < \Phi \\ P(x,y,z) = 0 & si\ \theta \geq \Phi \end{cases} \qquad \text{(Eq. 3.7)}$$

avec $\tan(\theta) = \dfrac{\sqrt{y^2+z^2}}{x}$ et Φ = 1,365 pour un gaz monoatomique

3.2.3 Molécule-test

La molécule-test est décrite par un système modèle simple possédant deux conformations d'énergies différentes et séparée par une barrière d'énergie potentielle (Figure 3.6). Les deux conformations sont donc reliées par un unique état de transition.

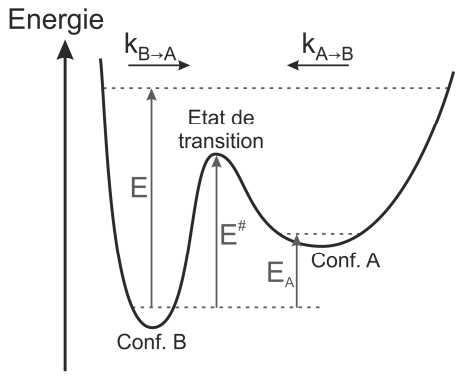


Fig. 3.6 – *Représentation simplifiée de la surface d'énergie potentielle de la molécule-test selon la coordonnée de réaction correspondant à l'isomérisation entre les conformations* ***A*** *et* ***B****.*

A chaque début de simulation, un ensemble de conditions initiales constitué d'une position, une vitesse, une énergie interne rotationnelle, une énergie interne vibrationnelle et une conformation est attribué à la molécule-test. Ces conditions initiales peuvent soit être identiques pour chacune des simulations, soit être échantillonnées aléatoirement selon les lois suivantes :

- **Conformation :** la conformation initiale peut être tirée selon une loi de Boltzmann à une température donnée, la probabilité P_A de débuter dans la conformation A est par exemple :

$$P_A = \frac{1}{1+\exp\left(\dfrac{G_A - G_B}{k\,T_0}\right)} \qquad \text{(Eq. 3.8)}$$

avec G_A et G_B les enthalpies libres des conformères **A** et **B** à la température T_0.

- **Position et vitesse :** Les composantes de ces deux conditions initiales selon les axes *(Ox)*, *(Oy)* et *(Oz)* peuvent être définies indépendamment les unes des autres. Elles peuvent être fixes ou bien suivre une loi gaussienne d'une largeur L_i spécifique (Eq. 3.9), ce qui permet notamment de simuler la vaporisation à partir d'une tache gaussienne en deux dimensions d'un laser de désorption sur la surface de l'échantillon.

$$f(u_i) = \frac{1}{\sigma_i \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(u_i - u_0)^2}{2\sigma_i^{\,2}} \right) \qquad \text{(Eq. 3.9)}$$

avec σ_i l'écart-type ($i = x, y$ ou z), relié à la largeur à mi-hauteur L_i de la gaussienne par $L_i = 2\sqrt{2\ln(2)}\,\sigma_i$

u_0 la position du centre de la gaussienne

- **Energies internes rotationnelle et vibrationnelle :** Si les énergies internes initiales ne sont pas fixes, elles sont alors tirées au sort à la température T_0. L'équation (3.10) formulée par Hinshelwood donne la fonction de distribution de l'énergie interne ε_i, d'un mode interne i possédant ζ_i degrés de libertés, en fonction de la température [7]. Le terme pré-exponentiel $\varepsilon_i^{(\zeta/2-1)}$ représente dans cette équation la densité d'états du mode interne i à l'énergie ε_i.

$$f(\varepsilon_i) \propto \varepsilon_i^{\,\zeta_i/2-1} \exp\left(-\frac{\varepsilon_i}{k T_0} \right) \qquad \text{(Eq. 3.10)}$$

Les molécules considérées dans cette étude possèdent des constantes rotationnelles très faibles ce qui signifie que même à des températures de l'ordre de 1 K de nombreux niveaux rotationnels sont peuplés. La densité d'états rotationnels de la molécule-test est donc bien une grandeur qui peut être supposée continue et le nombre de degrés de libertés rotationnels constant et égal à trois (molécule non-linéaire). Par conséquent, l'énergie interne rotationnelle initiale $E_{rot,0}$ est tirée au sort par une méthode de rejet, décrite dans l'Annexe A.1, selon la fonction de distribution suivante, avec A, B et C les constantes rotationnelles de la molécule-test [8]:

$$f\left(E_{rot,0}\right) = \frac{2\sqrt{E_{rot,0}}}{\sqrt{ABC}} \exp\left(-\frac{E_{rot,0}}{k\,T_0} \right) \qquad \text{(Eq. 3.11)}$$

En revanche, l'approximation précédente d'une densité d'états continue n'est plus valable pour les modes internes de vibration. En effet, elle ne peut être justifiée que si la température T_0 est très supérieure à la température vibrationnelle caractéristique de chaque mode $\theta_{v,i}$, définie par l'équation (3.12) [9]. Or, la température vibrationnelle θ_v associée à un mode de vibration amide A d'un peptide (~3500 cm^{-1}) est supérieure à 5000 K.

$$\theta_{v,i} = \frac{h\,c\,v_i}{k} \qquad \text{(Eq. 3.12)}$$

avec h la constante de Planck (en J · s)

c la vitesse de la lumière dans le vide (en m · s^{-1})

v_i le nombre d'onde du mode de vibration i (en m^{-1})

k la constante de Boltzmann (en J · K^{-1})

Le terme pré-exponentiel de l'équation (3.10) est ainsi remplacé par la densité discrète ρ_{vib} d'états vibrationnels de la molécule-test dans la fonction de distribution (3.13). Cette densité d'états est calculée dans l'approximation harmonique grâce à l'algorithme de Beyer et Swinehart [10] à partir des fréquences harmoniques de vibration de la molécule-test (non corrigées par des facteurs d'échelle). L'algorithme de Beyer et Swinehart est une méthode de comptage du nombre d'états vibrationnels dans des boîtes de largeur constante. Une résolution de 1 cm^{-1} sera utilisée dans la suite pour la largeur des boîtes.

$$f\left(E_{vib,0}\right) = \rho_{vib}\left(E_{vib,0}\right)\exp\left(-\frac{E_{vib,0}}{k\,T_0}\right) \qquad \text{(Eq. 3.13)}$$

3.3 Traitement des collisions

Le traitement des collisions entre une molécule et un atome dans la détente supersonique peut se décomposer en plusieurs étapes (Figure 3.7). A chaque pas de temps, la probabilité de subir une collision pendant l'intervalle de temps Δt est calculée et la possibilité que cet évènement se produise est ensuite tirée au sort. Si elle est acceptée, de nouveaux paramètres sont attribués à la molécule et un nouveau tirage au sort a lieu pour déterminer si l'atome se colle à la molécule.

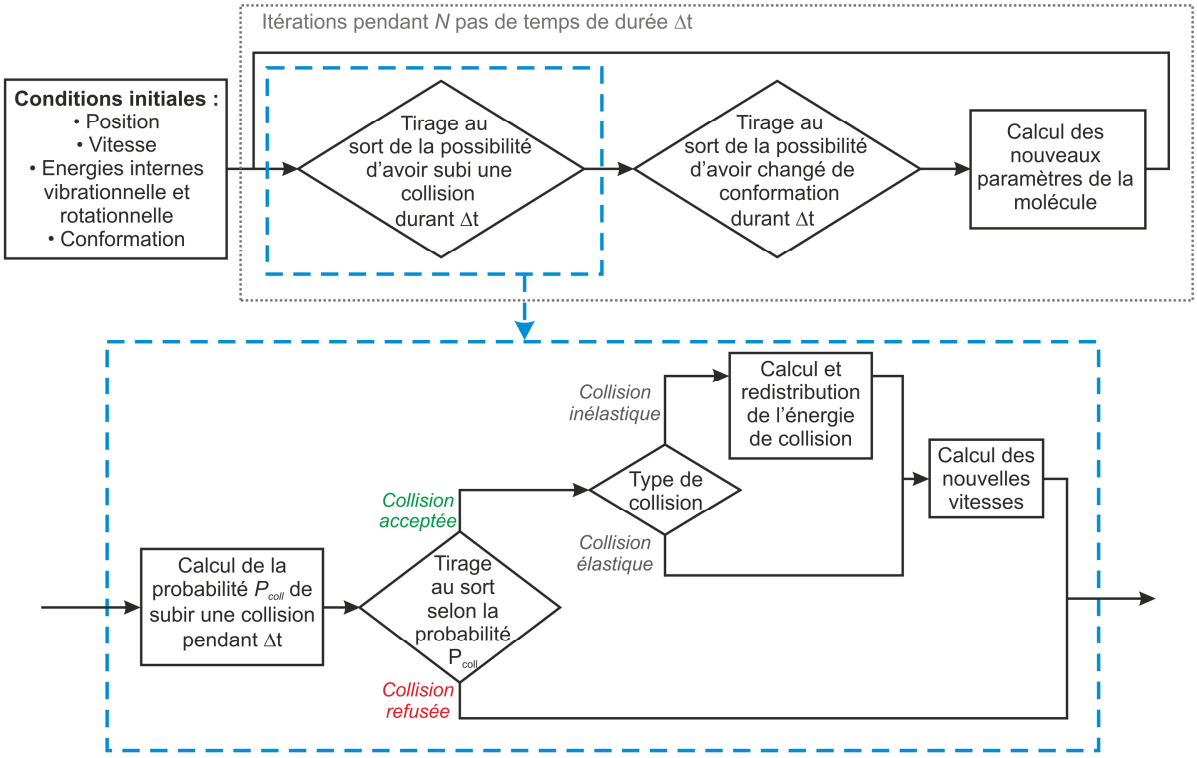


***Fig. 3.7** – Schéma du principe du traitement des phénomènes de collisions dans la simulation.*

3.3.1 Probabilité de collision

La probabilité P_{coll} qu'une collision avec un atome de gaz noble survienne pendant la durée d'un pas de temps est calculée dans le cadre d'un modèle de sphères dures (Eq. 3.14). Elle est égale à la probabilité de trouver un tel atome dans un volume défini par la section efficace de collision S_{coll} et la vitesse relative moyenne entre la molécule-test et un atome dans le jet (Figure 3.8).

$$P_{coll} = n_{gaz} \times S_{coll} \times \sqrt{\left\langle \left\| \vec{v}_{relative} \right\|^2 \right\rangle}\, \Delta t \qquad \text{(Eq. 3.14)}$$

La densité particulaire n_{gaz} d'atomes est obtenue d'après l'équation (3.5c). La section efficace de collision S_{coll} est estimée par une méthode Monte-Carlo, en assimilant les atomes de la molécule-test et ceux du gaz à des sphères dont les rayons sont égaux aux rayons de van der Waals de ceux-ci [11, 12].

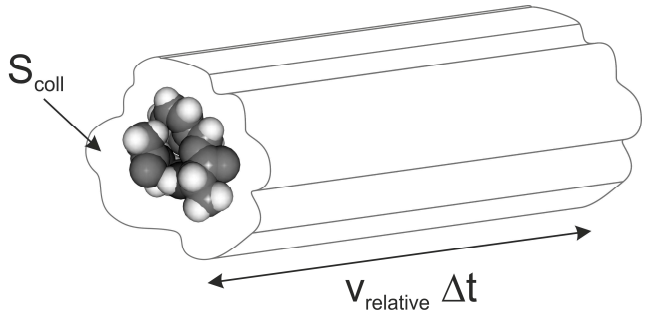


Fig. 3.8 – *Volume de collision dans le modèle de sphères dures.*

La vitesse relative moyenne dépend de deux facteurs (Eq. 3.15) : la vitesse relative entre la molécule-test et l'écoulement et la vitesse moyenne due à l'agitation thermique des atomes dans l'expansion à la température T (Annexe A.2).

$$\left\langle \left\| \vec{v}_{relative} \right\|^2 \right\rangle = \left\| \vec{v}_{jet} - \vec{v}_{molécule} \right\|^2 + \frac{3kT}{m} \qquad \text{(Eq. 3.15)}$$

avec v_{jet} et T respectivement obtenus par les équations (3.2) et (3.5a)

m la masse d'un atome du gaz (en kg)

La probabilité de collision étant tirée uniquement une seule fois par intervalle de temps, la durée du pas de temps Δt est choisie suffisamment faible (généralement de l'ordre de 10 ps) pour pouvoir négliger la probabilité d'une deuxième collision pendant celui-ci.

Un des premiers paramètres ajustables du modèle est le pourcentage de collisions inélastiques par rapport au nombre de collisions total. Trois voies sont donc possibles à l'issue du tirage de la collision : (i) la collision est acceptée et est inélastique, les énergies internes de la molécule-test sont redistribuées et de nouvelles vitesses sont calculées, (ii) la collision est acceptée et est élastique, seules les vitesses varient après la collision, les énergies internes ne changent pas et (iii) la collision est refusée et le programme passe à l'étape éventuelle d'isomérisation.

3.3.2 Redistribution de l'énergie de collision

Lors de collisions inélastiques, l'énergie de collision est calculée puis redistribuée entre les différents degrés de liberté de la paire collisionnelle. Dans la suite, les énergies avant et après collision seront respectivement notées E et E^*.

3.3.2.a Calcul de l'énergie de collision

Pour des collisions impliquant la molécule-test et un gaz monoatomique, l'énergie de collision correspond à la somme des énergies internes rotationnelle et vibrationnelle de la molécule-test et de l'énergie translationnelle entre la molécule et l'atome de gaz noble (Eq. 3.16). Les deux premières énergies sont connues à chaque instant dans la simulation, la dernière est tirée au sort à chaque fois qu'une collision est acceptée.

$$\begin{aligned} E_{coll} &= E_{vib,molécule} + E_{rot,molécule} + E_{Trans} \\ &= E_{vib,molécule} + E_{rot,molécule} + \frac{1}{2}\mu\, v_{relative}{}^2 \end{aligned} \qquad \text{(Eq. 3.16)}$$

avec $\mu = \dfrac{m_{molécule} \times m_{gaz}}{m_{molécule} + m_{gaz}}$ la masse réduite de la paire collisionnelle (en kg)

et $\vec{v}_{relative} = \vec{v}_{gaz} - \vec{v}_{molécule} = \left(\vec{v}_{jet} + \vec{v}_{thermique}\right) - \vec{v}_{molécule}$ la vitesse relative (en $m \cdot s^{-1}$)

Contrairement à l'équation (3.14) la composante de la vitesse relative due à l'agitation thermique des atomes dans la détente n'est pas une vitesse moyenne ; elle est ici tirée aléatoirement. Sa norme est tirée selon une distribution de Maxwell des vitesses (Eq. 3.17) [13]. Son orientation est déterminée dans un système de coordonnées sphériques par un tirage équiprobable de deux angles θ et φ respectivement entre [0, π] et [0, 2π] afin d'obtenir une distribution isotrope de cette composante due à l'agitation thermique.

$$f\left(v_{thermique}{}^2\right) = 4\pi\left(\frac{m_{gaz}}{2\pi k T}\right)^{\frac{3}{2}} v_{thermique}{}^2 \exp\left(-\frac{m_{gaz}\, v_{thermique}{}^2}{2 k T}\right) \qquad \text{(Eq. 3.17)}$$

3.3.2.b Redistribution

La théorie employée pour décrire la variation d'énergie interne de la molécule-test après une collision inélastique, aussi appelée théorie des collisions ergodiques, repose sur un modèle proposé par Borgnakke et Larsen en 1975 [14]. Elle est basée sur l'hypothèse que les deux partenaires de collision sont en équilibre microcanonique à l'énergie totale de collision définie par l'équation (3.16). Selon cette hypothèse, la probabilité $P(E_{coll}, E^*_{int})$ que la molécule-test possède une énergie interne finale E^*_{int} lorsque l'énergie de collision vaut E_{coll} est proportionnelle

au produit de la densité totale d'états internes (rotationnels et vibrationnels) de la molécule à l'énergie E^*_{int} et de la densité d'états translationnels à l'énergie restante (E_{coll} - E^*_{int}) [15].

$$P\left(E_{coll}, E^*_{\text{int}}\right) \propto \rho_{\text{int}}\left(E^*_{\text{int}}\right) \times \rho_{trans}\left(E_{coll} - E^*_{\text{int}}\right) \qquad \text{(Eq. 3.18)}$$

Cette méthode de redistribution ne fait cependant intervenir que l'énergie interne totale de la molécule-test sans distinction des modes internes de vibration par rapport à ceux de rotation. Il a été toutefois démontré que le modèle de Borgnakke-Larsen pouvait se ramener à une succession de redistributions, chacune impliquant un mode interne (rotation ou vibration) et le mode de translation [7].

L'énergie de collision est donc dans un premier temps redistribuée entre la rotation et la translation. L'énergie rotationnelle finale est tirée entre 0 et la somme des énergies rotationnelle et translationnelle initiales selon la probabilité suivante :

$$P\left(E_{coll}, E^*_{rot}\right) \propto \rho_{rot}\left(E^*_{rot}\right) \times \rho_{trans}\left(E_{rot} + E_{trans} - E^*_{rot}\right)$$

$$\text{avec} \quad 0 \le E^*_{rot} \le E_{rot} + E_{trans}$$

Aux températures atteintes dans une détente supersonique, les densités d'états rotationnels et translationnels peuvent être considérées continues et approchées par l'expression $\varepsilon^{(\zeta/2-1)}$. Une molécule non-linéaire possède trois degrés de libertés de rotation et le mode de translation est caractérisé par quatre degrés de liberté dans le cadre de l'approximation de collisions entre sphères dures [16]. L'équation précédente peut donc se mettre sous la forme :

$$P\left(E_{coll}, E^*_{rot}\right) \propto \sqrt{E^*_{rot}} \times \left(E_{rot} + E_{trans} - E^*_{rot}\right) \qquad \text{(Eq. 3.19)}$$

L'énergie vibrationnelle finale peut ensuite varier entre 0 et la somme de l'énergie vibrationnelle initiale et de l'énergie translationnelle initiale restante après la redistribution sur le mode de rotation. La densité d'états vibrationnels utilisée dans le calcul de la probabilité $P(E_{coll}, E^*_{vib})$ est la densité d'états harmoniques obtenu par l'algorithme de Beyer et Swinehart.

$$P\left(E_{coll}, E^*_{vib}\right) \propto \rho_{vib}\left(E^*_{vib}\right) \times \left[E_{vib} + \left(E_{rot} + E_{trans} - E^*_{rot}\right) - E^*_{vib}\right] \qquad \text{(Eq. 3.20)}$$

$$\text{avec} \quad 0 \le E^*_{vib} \le E_{vib} + \left(E_{rot} + E_{trans} - E^*_{rot}\right)$$

Pour finir, l'énergie restante est attribuée à la translation et interviendra dans le calcul des vitesses après collision.

$$E^*_{trans} = E_{coll} - E^*_{vib} - E^*_{rot} \qquad \text{(Eq. 3.21)}$$

Un premier test du modèle a été de s'assurer qu'après un nombre suffisant de collisions dans un réservoir d'atomes à température *T* fixée, la distribution finale en énergie interne de la molécule-test converge effectivement vers une distribution de Boltzmann à la même température *T*, et ce quelle que soit sa distribution initiale. Un exemple appliqué à la conformation repliée du dipeptide protégé Ac-Ala-Ala-OBn, est présenté dans la Figure 3.9. Un ensemble de 100 000 simulations ont été effectuées en tirant au sort des énergies internes initiales à une température de 500 K puis en laissant évoluer les molécules dans un réservoir d'atomes de néon à la température de 300 K. Les distributions finales correspondent aux distributions d'énergies internes après 1 000 collisions inélastiques, lorsque le système est à l'équilibre. Les distributions finales se superposent parfaitement avec les distributions de Boltzmann de la molécule à 300 K, la température du réservoir, ce qui valide la capacité du modèle de redistribution de l'énergie à décrire l'équilibre thermodynamique.

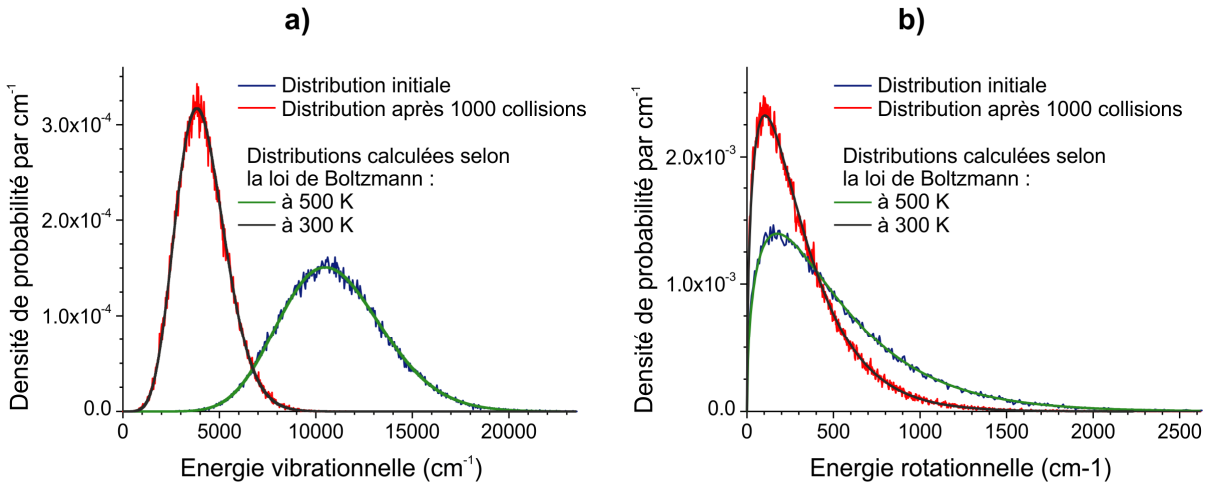


Fig. 3.9 – *Comparaison des distributions initiales et finales des énergies internes vibrationnelle (a) et rotationnelle (b) avec les distributions de Boltzmann à 300 K et à 500 K de la forme repliée du dipeptide protégé Ac-Ala-Ala-OBn.*

Néanmoins, le fait que l'état d'équilibre soit correctement prédit par le modèle n'implique pas que la quantité d'énergie échangée à chaque collision soit correctement décrite. En effet, une collision ergodique [15] est un cas limite de collision où tous les modes internes de la molécule participent et échangent de l'énergie. Dans l'objectif de réaliser des comparaisons avec des résultats expérimentaux il peut être plus réaliste d'introduire une limite à l'énergie échangée par

les modes de vibration en autorisant seulement une redistribution partielle de celle-ci. Un moyen consiste à sélectionner un certain nombre de modes de vibration actifs qui seront en équilibre microcanonique avec les modes de rotation et de translation lors des collisions et échangeront de l'énergie avec les atomes de gaz, les autres modes n'étant pas affectés par la collision. L'énergie vibrationnelle redistribuable lors des collisions est alors la fraction de l'énergie vibrationnelle totale contenue dans les modes actifs ; elle est déterminée en considérant qu'un équilibre microcanonique entre les différents modes de vibration a le temps de s'établir entre chaque collision. La fonction de distribution de l'énergie vibrationnelle après collision est ensuite obtenue à partir de l'équation (3.20) en remplaçant la densité d'états vibrationnels totale ρ_{vib} par la densité d'états calculée à partir des seuls modes actifs. Ce modèle est appelé modèle de collisions partiellement ergodiques [15].

	Modèles	Nombres de modes actifs	Energies internes avant collision			
			10 000 cm^{-1}	20 000 cm^{-1}	30 000 cm^{-1}	40 000 cm^{-1}
$\langle \Delta E \rangle$ (cm^{-1})	KCSI	---	- 176	- 346	- 521	- 700
	B-L	72	- 535	- 937	- 1285	- 1612
		4	- 323	- 596	- 836	- 1066
		3	- 277	- 523	- 739	- 945
		2	- 206	- 412	- 590	-762
$\langle \Delta E^2 \rangle^{1/2}$ (cm^{-1})	KCSI	---	481	748	1028	1313
	N-N	3,70 à 4,95	454	670	902	1134
	B-L	72	837	1306	1721	2115
		4	521	804	1064	1320
		3	458	705	936	1159
		2	369	562	745	926

Tab. 3.2 – *Valeurs moyennes $<\Delta E>$ et valeurs quadratiques moyennes $<\Delta E^2>^{1/2}$ de l'énergie transférée pendant une collision par le trans-stilbène à une certaine énergie interne vers un atome d'argon à 300 K. Les valeurs provenant des expériences KCSI et du modèle de Nilsson et Nordholm (N-N) sont respectivement tirées des Réfs. [17] et [15]. Les résultats du modèle de Borgnakke-Larsen (B-L) ont été obtenus en considérant un pourcentage de collisions inélastiques de 100% et en choisissant les modes de plus basses fréquences comme modes actifs. Le trans-stilbène, de formule brute $C_{14}H_{12}$, possède 72 modes de vibrations.*

Le nombre et la nature des modes actifs à sélectionner peuvent être caractérisés en comparant les résultats obtenus sur le *trans*-stilbène par le modèle de Borgnakke-Larsen et par le

modèle de collisions partiellement ergodiques développé par Nilsson et Nordholm [15]. Ce dernier se différencie principalement par l'expression de la densité d'états ro-vibrationnels qui prend la forme suivante :

$$\rho_{\text{int}}(E) = C\, E^{\zeta/2-1} \qquad \text{(Eq. 3.22)}$$

où C et ζ sont deux paramètres ajustés sur des expériences KCSI *(Kinetically Controlled Selective Ionization)* [17], ζ représentant le nombre de degrés de libertés des modes actifs. Cette expression peut être utilisée pour simuler le transfert d'énergie de molécules très excitées (l'énergie interne moyenne du *trans*-stilbène est d'environ 2000 cm^{-1} à 300 K) vers un réservoir d'atomes à température ambiante mais son caractère continu ne permettra pas de décrire un refroidissement vibrationnel complet dans une détente supersonique. Leurs meilleurs ajustements des paramètres ont été obtenus avec un nombre de modes actifs ζ variant de 3,70 lorsque l'énergie interne initiale de la molécule est de 10 000 cm^{-1} à 4,95 pour une énergie de 40 000 cm^{-1}. Le tableau 3.2 compare les valeurs prédites par différents modèles des énergies moyennes et énergies quadratiques moyennes transférées par le *trans*-stilbène à un atome d'argon pour plusieurs valeurs d'énergies internes avant collision. On peut voir qu'il faut réduire le nombre de modes actifs dans le modèle de Borgnakke-Larsen jusqu'à environ 3 pour obtenir en accord avec les autres modèles. La valeur moyenne plus importante de l'énergie transférée dans ce premier modèle s'explique par le fait que, contrairement aux autres modèles, la position du maximum de la fonction $P(E_{coll}, E^*_{int})$ est décalée par rapport à celle des collisions élastiques (Figure 3.10). Cette distribution peut donc être corrigée en augmentant la proportion de collisions inélastiques. Les modes actifs utilisés pour obtenir les résultats du tableau 3.2 sont les modes de plus basses fréquences du *trans*-stilbène, tirés de la Réf. [17], car ce sont les modes mous qui sont le plus susceptibles d'échanger de l'énergie lors des collisions. Cependant pour des molécules possédant une énergie interne de quelques dizaines de milliers de cm^{-1} la nature des modes actifs a peu d'influence sur l'énergie moyenne transférée. Une augmentation de 1% seulement de cette valeur est observée lorsque les modes actifs sont les modes ν_{31} à ν_{33} (945 cm^{-1}, 953 cm^{-1} et 961 cm^{-1}) au lieu des trois modes de plus basses fréquences (11 cm^{-1}, 57 cm^{-1} et 75 cm^{-1}). Néanmoins, plus l'énergie interne de la molécule sera faible et plus cette différence sera importante. Les modes actifs choisis dans la suite seront donc les trois modes de plus basses fréquences, comme suggéré par l'étude précédente. De plus, le pourcentage de collisions élastiques sera fixé à 30 % pour obtenir des valeurs d'énergies moyennes transférées proche de celles des expériences KCSI dans le cas du *trans*-stilbène.

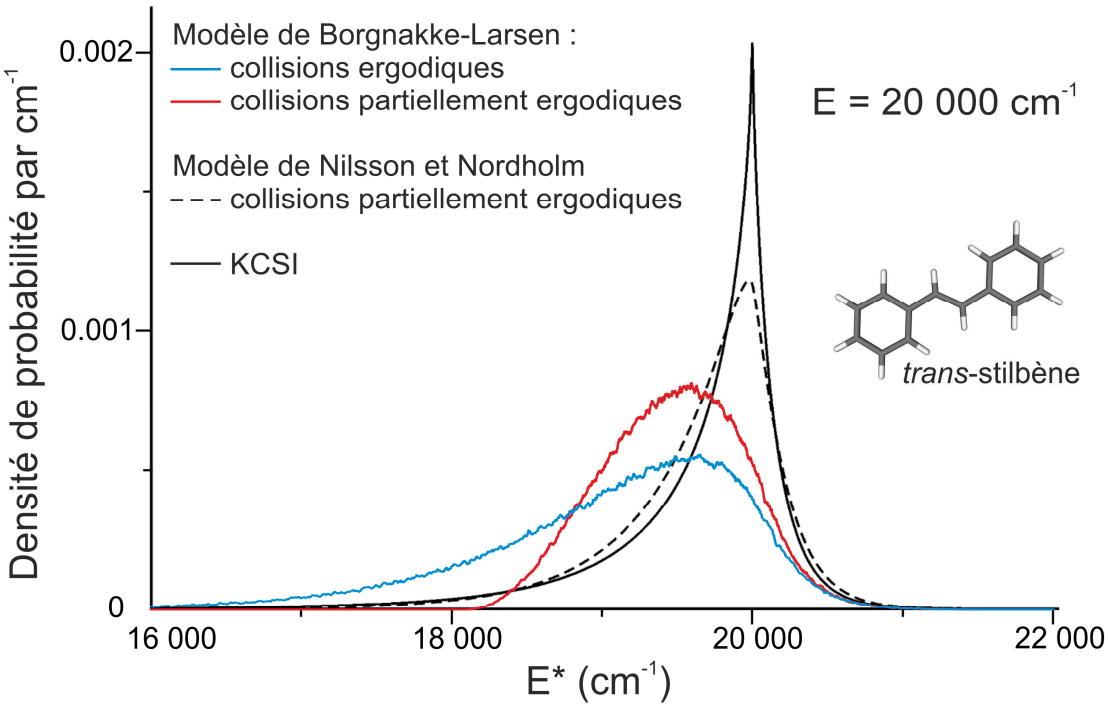


Fig. 3.10 – *Probabilités selon différents modèles pour le trans-stilbène de posséder une énergie interne E^* après une collision avec un atome d'argon à la température de 300 K lorsque l'énergie interne initiale est égale à 20 000 cm^{-1}. Les résultats du modèle de Nilsson et Nordholm et des expériences KCSI sont tirés de la Réf. [15]. Les résultats du modèle de Borgnakke-Larsen ont été obtenus en considérant un pourcentage de collisions inélastiques de 100% et en choisissant les trois modes de plus basses fréquences comme modes actifs dans le cas des collisions partiellement ergodiques.*

3.3.3 Vitesses après collision

Les vitesses de la molécule-test et de l'atome de gaz noble après collision sont déterminées d'après les deux relations suivantes :

- la conservation de la quantité de mouvement lors de la collision :

$$m_{gaz}\,\vec{v}_{gaz} + m_{molécule}\,\vec{v}_{molécule} = m_{gaz}\,\vec{v}_{gaz}^{\,*} + m_{molécule}\,\vec{v}_{molécule}^{\,*} \qquad \text{(Eq. 3.23)}$$

- l'expression de l'énergie cinétique après collision :

$$\left(\vec{v}_{gaz}^{\,*} - \vec{v}_{molécule}^{\,*}\right)^2 = \frac{2\,E^*_{trans}}{\mu} \qquad \text{(Eq. 3.24)}$$

L'équation (3.24) étant une relation scalaire, l'orientation de la vitesse relative entre la molécule-test et l'atome de gaz noble est de plus tirée au sort de manière équiprobable dans tout l'espace.

3.3.4 Application au refroidissement de peptides dans une détente supersonique

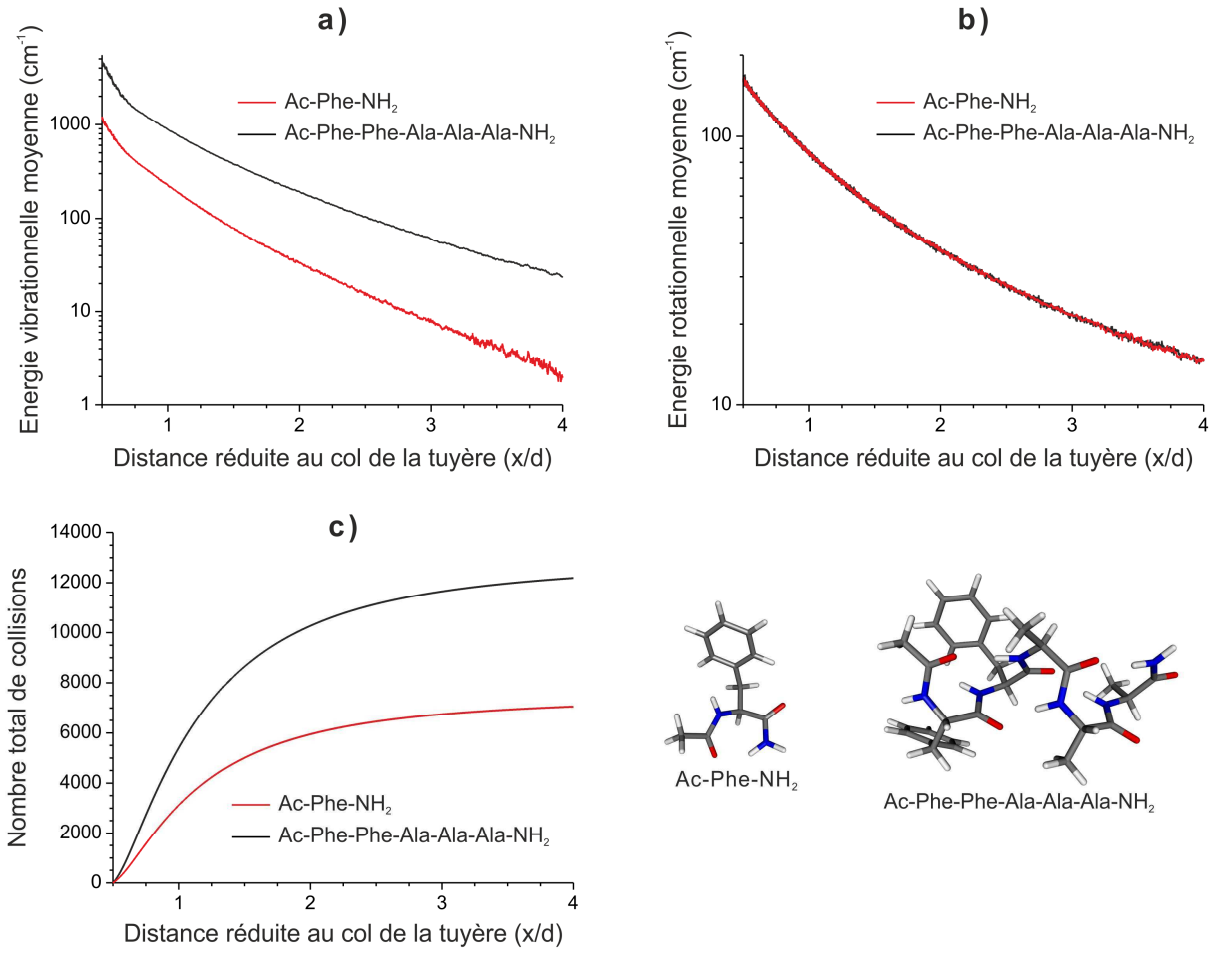


Fig. 3.11 – *Simulation du refroidissement vibrationnel (a), rotationnel (b) et du nombre total de collisions subies (c) par deux peptides protégés dans une détente supersonique (d=1 mm, $P_{0,néon}$ = 5 bars, $T_{0,néon}$ = 300 K).*

Dans l'objectif d'observer l'influence de la taille de la molécule-test sur l'efficacité du refroidissement vibrationnel et rotationnel dans une détente supersonique, le modèle de collisions décrit dans les parties précédentes a été appliqué à deux peptides (Figure 3.11) : l'acide aminé protégé Ac-Phe-NH_2 et le pentapeptide protégé Ac-Phe-Phe-Ala-Ala-Ala-NH_2. La détente supersonique est modélisée par une expansion de néon, initialement à la pression de 5 bars et à la température de 300 K, à travers un orifice de 1 mm. La position initiale du peptide correspond à celle utilisée dans les expériences de désorption par laser : 0,5 mm en aval de la vanne et 0,5 mm au-dessous du centre de l'orifice. Son énergie interne initiale est tirée au sort à une température de 600 K. Enfin, seuls les trois premiers modes de vibration de chaque peptide sont actifs lors des collisions et le pourcentage de collisions élastiques est fixé à 30%.

De manière générale, comme l'énergie interne d'une molécule croît avec le nombre de degrés de liberté de vibration, plus la taille d'un peptide augmentera et plus le nombre de collisions nécessaires pour le refroidir vibrationnellement sera important. Il existe donc une limite supérieure à la taille des molécules flexibles étudiées au moyen d'une détente supersonique à partir de laquelle il ne sera plus possible de toutes les piéger dans une conformation précise. Cette limite se traduit expérimentalement par l'apparition de bandes d'absorption larges. L'acide aminé protégé et le pentapeptide protégé possèdent ici respectivement 81 et 231 modes de vibrations. Les résultats de la simulation montrent qu'à une distance de 4 mm de la vanne, le premier a une énergie interne vibrationnelle moyenne inférieure à $2\,cm^{-1}$, ce qui signifie qu'il est majoritairement dans son état fondamental $v = 0$. Le second, qui a subi environ le double de collisions pendant le même trajet, possède une énergie vibrationnelle moyenne 10 fois plus importante, plusieurs niveaux excités de vibration sont donc encore peuplés. En revanche, comme le nombre de degrés de liberté de rotation est fixé à trois quelle que soit la taille de la molécule-test, cette dernière n'a pas d'effet sur la cinétique du refroidissement rotationnel.

Les trajectoires des molécules-test dans la simulation fournissent également des informations intéressantes (Figure 3.12). Nous avons ainsi pu remarquer que lorsque les conditions initiales de la molécule sont choisies pour simuler le processus de vaporisation par désorption laser (c'est-à-dire avec une position initiale en aval de la vanne pulsée, en-dessous de l'axe du jet et une vitesse initiale perpendiculaire à l'axe de l'expansion supersonique), la distribution finale de la coordonnée *z* des molécules (Figure 3.5) n'est pas centrée autour de zéro, mais autour d'une valeur négative. Le nombre de collisions avec des atomes de gaz porteur est suffisamment grand pour modifier la trajectoire des molécules, même les molécules les plus lourdes telles que des pentapeptides, avant que ces dernières n'atteignent l'axe de la détente supersonique. Comme la pression en gaz porteur diminue rapidement en dehors de l'axe de la détente, cela signifie que le nombre de collisions final avec les conditions de vaporisation par désorption laser sera inférieur de plusieurs ordres de grandeur à celui qui aurait été obtenu avec des conditions de coexpansion (position initiale sur l'axe du jet et vitesse initiale parallèle à l'axe du jet). A pressions de gaz porteur égales, il sera donc plus difficile de refroidir une molécule désorbée qu'une molécule vaporisée en amont de la vanne pulsée. Ces résultats correspondent très bien à ce que nous avons déjà pu observer expérimentalement : pour maximiser l'intensité du signal d'ions, la position en *z* de la vanne pulsée par rapport à l'écorceur (Figure 2.5) doit être plus basse si les molécules sont désorbées par rapport au cas d'une coexpansion, car dans le

premier cas les molécules n'atteignent pas le centre de l'expansion. Nous avions aussi pu constater une meilleure efficacité du refroidissement en augmentant le diamètre *d* de la vanne pulsée et en plaçant l'échantillon plus près de l'axe du jet ($z_{initial}$ compris entre – *d/4* et – *d/2*), ce qui équivalait donc à augmenter fortement le nombre de collisions.

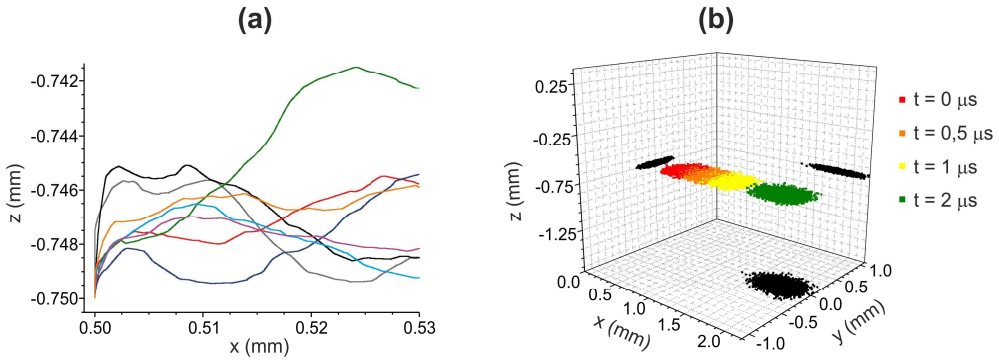


Fig. 3.12 – *Trajectoires de Ac-Phe-NH_2 obtenues par la simulation de détente supersonique (a) Exemples de trajectoires. (b) Position des molécules à différents instants dans la détente. Les points noirs correspondent à la projection des coordonnées des molécules à t = 2 µs sur les plans (xOy), (xOz) et (yOz). Les propriétés de la détente supersonique sont les suivantes : d=1 mm, $P_{0,néon}$ = 5 bars, $T_{0,néon}$ = 300 K.*

3.3.5 Probabilité d'agrégation

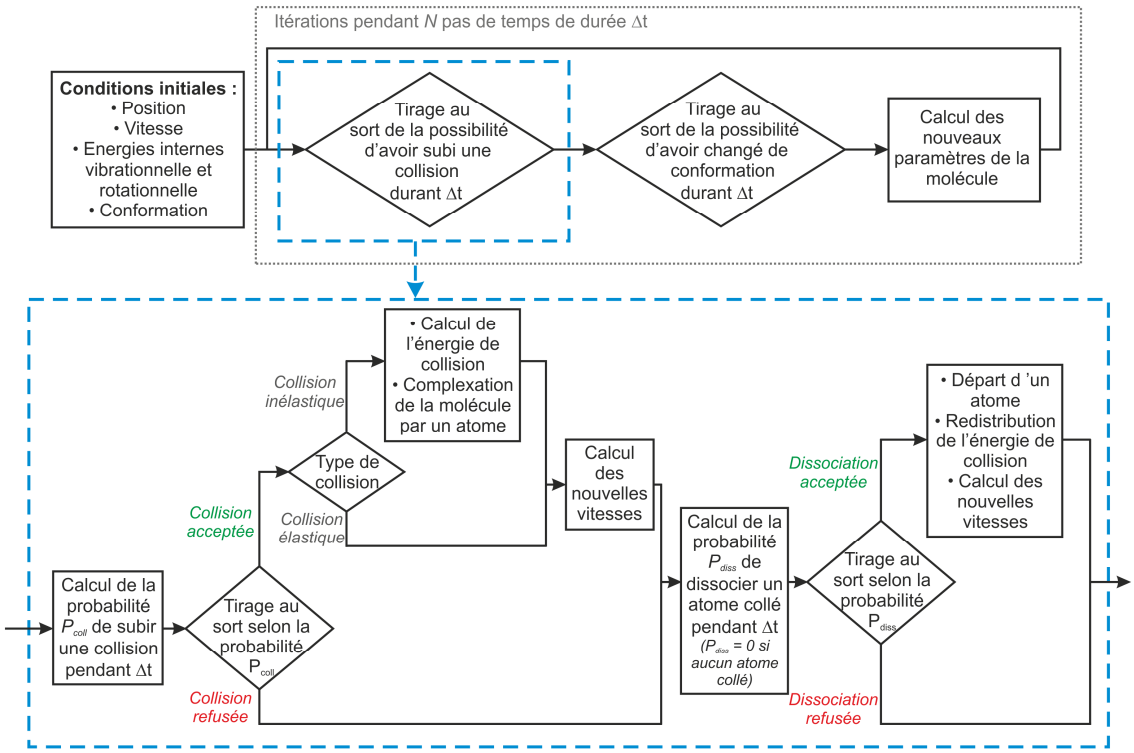


Fig. 3.13 – *Schéma du principe du traitement des phénomènes de collisions dans la simulation lorsque l'on accorde à l'atome la possibilité de complexer la molécule-test.*

Jusqu'à présent, la nature du gaz utilisé pour former l'expansion supersonique n'influence dans le modèle que la vitesse de l'écoulement (Eq. 3.2). Or, d'autres effets de la nature du gaz sont observés expérimentalement : par exemple, la pression à partir de laquelle des atomes du gaz porteur commencent à former des complexes avec la molécule est dépendante du gaz, des complexes apparaîtront à des pressions plus réduites si le gaz porteur est de l'argon au lieu de l'hélium [18, 19]. Pour tenir compte de ce phénomène, il a été donné la possibilité aux atomes de gaz porteur de se coller à la molécule-test à l'issue de la collision. Le principe du traitement des collisions est alors légèrement modifié par rapport à ce qui a été vu précédemment (Figure 3.13) : à chaque fois qu'une collision a été acceptée, un atome de gaz porteur est collé à la molécule-test avec une probabilité de 1, l'énergie de translation est ajouté à l'énergie interne de la molécule-test et la vitesse du complexe est calculée d'après la loi de conservation de la quantité de mouvement (Eq. 3.23) ; un tirage au sort est ensuite effectué selon la probabilité P_{diss} (Eq. 3.25) pour déterminer si l'atome reste collé jusqu'au pas de temps suivant (collision collante) ou si le complexe se dissocie immédiatement (collision non-collante). A chaque pas de temps, tant que la molécule est complexée par au moins un atome de gaz porteur, la dissociation du complexe est tirée au sort. Lorsque la dissociation est acceptée, la redistribution de l'énergie de collision et le calcul des vitesses après collision est traitée de façon identique à ce qui a été vue dans les parties 3.3.2 et 3.3.3.

$$P_{diss}(E) = 1 - \exp\left(-k_{diss}(E) \times \Delta t\right) \qquad \text{(Eq. 3.25)}$$

où $k_{diss}(E)$ est la constante de vitesse de dissociation d'un complexe d'énergie totale $E = E_{vib} + E_{trans}$, calculée par la théorie de Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus (RRKM) [20] :

$$k_{diss}(E) = \frac{N^{\#}\left(E - E^{\#}\right)}{h\,\rho(\mathrm{E})} \qquad \text{(Eq. 3.26)}$$

avec $E^{\#}$ l'énergie de l'état de transition

$N^{\#}(E\text{-}E^{\#})$ le nombre d'états vibrationnels de l'état de transition compris entre $E^{\#}$ et E

$\rho(E)$ la densité d'état du complexe à l'énergie E

h la constante de Planck

Le calcul des constantes de vitesse de dissociation est réalisé en effectuant l'hypothèse qu'un atome de gaz noble interagit principalement avec le cycle aromatique des molécules étudiées. Par conséquent, l'énergie d'interaction $E^{\#}$ entre l'atome et la molécule est prise égale à l'énergie d'interaction entre ce même atome et une molécule de benzène (80 cm^{-1} pour l'hélium,

160 cm^{-1} pour le néon et 320 cm^{-1} pour l'argon) [21, 22, 23] et la coordonnée de réaction de dissociation correspond à l'allongement de la distance entre l'atome et le centre du cycle aromatique, selon une direction perpendiculaire au plan de ce-dernier. La figure 3.14a représente l'évolution des probabilités de dissociation de complexe entre Ac-Phe-NH_2 et un atome de gaz porteur en fonction de l'énergie de collision (somme de l'énergie interne de la molécule-test et de l'énergie de translation). On peut remarquer que pour que la probabilité d'une collision collante soit non négligeable pour l'hélium il faut que l'énergie de collision soit inférieure à quelques centaines de cm^{-1}. Ce type de collisions ne peut donc pas survenir au début de la détente supersonique, lorsque les molécules-test sont encore chaudes et ont une direction perpendiculaire à celle des atomes de gaz porteur. La probabilité de dissociation diminue ensuite progressivement de l'hélium, au néon et à l'argon.

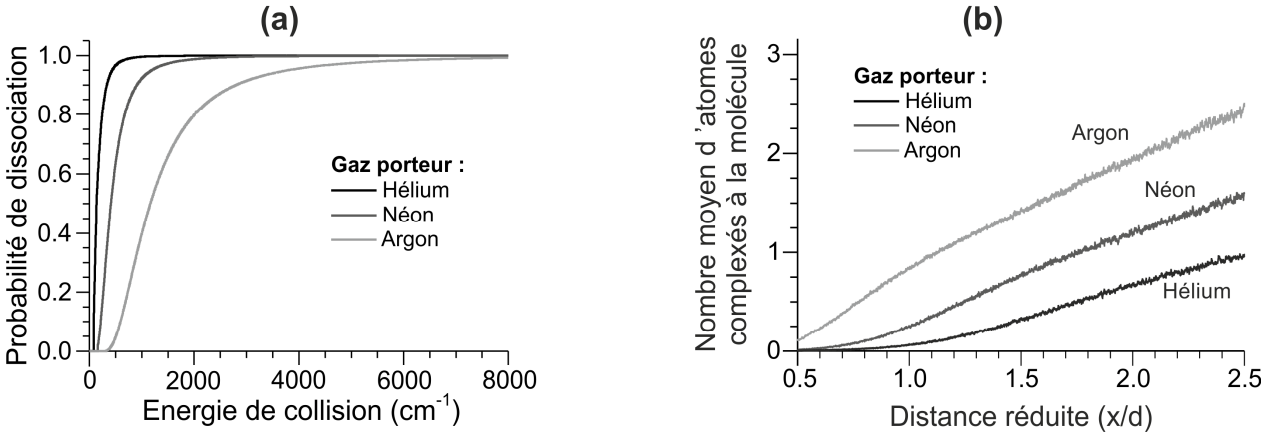


Fig. 3.14 – *(a) Probabilité de dissociation d'un complexe 1 : 1 entre Ac-Phe-NH_2 et un atome de gaz porteur pendant un pas de temps de 10 ps.(b) Evolutions du nombre moyen d'atomes de gaz nobles complexés sur l'acide aminé protégé Ac-Phe-NH_2 à la fin de chaque pas de temps en fonction de la distance réduite à la vanne. La pression en amont de la vanne est égale à 5 bars pour les trois gaz et le diamètre de la vanne est de 1 mm.*

Pour limiter le nombre d'atomes de gaz porteur pouvant se coller à la molécule-test, la barrière d'énergie de la dissociation est abaissée pour chaque nouvel atome collé. La solution adoptée pour cela est de la multiplier arbitrairement par un facteur *1/N*, avec *N* le nombre d'atomes collés. Un traitement plus précis nécessiterait le calcul par des méthodes de chimie quantique des énergies de dissociation de complexes de différentes tailles. Il faut noter que cette description conduit à surestimer le phénomène de complexation : un nombre trop important d'atomes de gaz noble complexé est trouvé en comparaison avec les observations expérimentales (Figure 3.14b) : la probabilité d'observer une molécule d'Ac-Phe-NH_2 complexée par un atome d'hélium ou de néon dans ces conditions devrait être quasi nulle. Ce modèle simple doit donc être

affiné si l'on souhaite reproduire le processus d'agrégation dans une détente supersonique : il ne permet pas pour l'instant de prédire correctement quel sera le nombre final d'atomes collés sur une molécule. Il peut néanmoins être utilisé pour donner la possibilité à la nature de l'atome de gaz d'influencer le processus d'isomérisation. Ce point sera discuté dans la partie 3.4.2.b traitant du refroidissement conformationnel de la molécule de (S)-1-indanol.

3.4 Traitement des isomérisations

A chaque pas de temps, après avoir résolu le traitement des collisions, le programme donne la possibilité à la molécule-test de réaliser des isomérisations. Cette partie a pour objectif de présenter le calcul des probabilités d'isomérisations puis de comparer les prédictions d'abondances du modèle avec des résultats expérimentaux obtenus sur le dipeptide protégé Ac-Ala-Ala-OBn et la molécule de (S)-1-indanol.

3.4.1 Probabilité d'un changement de conformation

Le traitement des isomérisations dans le modèle consiste en un tirage au sort de la probabilité pour la molécule-test de posséder une conformation différente au début et à la fin du pas de temps, qui est différente de la probabilité de subir une isomérisation : une molécule peut s'isomériser plusieurs fois pendant un pas de temps et pourtant posséder la même conformation au début et à la fin de celui-ci. La probabilité de changer de conformation est calculée dans le modèle d'un équilibre entre deux géométries séparées par une simple barrière d'énergie potentielle (Figure 3.6). L'évolution en fonction du temps des probabilités $P_A(E,t)$ et $P_B(E,t)$ qu'à un temps t une molécule possédant une énergie interne vibrationnelle E soient respectivement dans la conformation **A** et dans la conformation **B** est définie par les deux équations suivantes :

$$\left(\frac{\partial P_A(E-E_A,t)}{\partial t}\right)_E = -k_{A\to B}(E-E_A)\times P_A(E-E_A,t) + k_{B\to A}(E)\times P_B(E,t) \qquad \text{(Eq. 3.27a)}$$

$$\left(\frac{\partial P_B(E,t)}{\partial t}\right)_E = -k_{B\to A}(E)\times P_B(E,t) + k_{A\to B}(E-E_A)\times P_A(E-E_A,t) \qquad \text{(Eq. 3.27b)}$$

où $k_{A\to B}$ et $k_{B\to A}$ sont respectivement les constantes de vitesse, calculées par la théorie RRKM, des réactions d'isomérisation de **A** vers **B** et de **B** vers **A** :

$$k_{A\to B}(E-E_A)=\frac{N^{\#}(E-E^{\#})}{h\,\rho_A(E-E_A)} \qquad \text{(Eq. 3.28a)}$$

$$k_{B\to A}(E)=\frac{N^{\#}(E-E^{\#})}{h\,\rho_B(E)} \qquad \text{(Eq. 3.28b)}$$

avec ρ_A, ρ_B respectivement les densités d'états vibrationnels de la conformation **A** et de la conformation **B** et $N^{\#}$ le nombre d'états vibrationnels de l'état de transition calculés dans l'approximation harmonique.

La molécule-test ne peut prendre qu'une des deux géométries (**A** ou **B**) d'où $P_A(E\text{-}E_A,t) + P_B(E,t) = 1$. En intégrant les équations (3.27) par rapport au temps, ces probabilités peuvent se mettre sous les formes suivantes :

$$P_A(E-E_A,t+\Delta t)=\frac{k_{B\to A}(E)}{k_{A\to B}(E-E_A)+k_{B\to A}(E)} + \left[P_A(E-E_A,t)-\frac{k_{B\to A}(E)}{k_{A\to B}(E-E_A)+k_{B\to A}(E)}\right]\exp\left[-\left(k_{A\to B}(E-E_A)+k_{B\to A}(E)\right)\Delta t\right] \qquad \text{(Eq. 3.29a)}$$

$$P_B(E,t+\Delta t)=\frac{k_{A\to B}(E-E_A)}{k_{A\to B}(E-E_A)+k_{B\to A}(E)} + \left[P_B(E,t)-\frac{k_{A\to B}(E-E_A)}{k_{A\to B}(E-E_A)+k_{B\to A}(E)}\right]\exp\left[-\left(k_{A\to B}(E-E_A)+k_{B\to A}(E)\right)\Delta t\right] \qquad \text{(Eq. 3.29b)}$$

Les probabilités $P_{A\to B}(E\text{-}E_A,\Delta t)$ et $P_{B\to A}(E,\Delta t)$ pour la molécule-test de posséder des conformations différentes au début et à la fin du pas de temps sont donc :

$$P_{A\to B}(E-E_A,\Delta t)=\left[1-\frac{k_{B\to A}(E)}{k_{A\to B}(E-E_A)+k_{B\to A}(E)}\right]\left[1-\exp\left(-\left(k_{A\to B}(E-E_A)+k_{B\to A}(E)\right)\Delta t\right)\right]$$

(Eq. 3.30a)

$$P_{B\to A}(E,\Delta t)=\left[1-\frac{k_{A\to B}(E-E_A)}{k_{A\to B}(E-E_A)+k_{B\to A}(E)}\right]\left[1-\exp\left(-\left(k_{A\to B}(E-E_A)+k_{B\to A}(E)\right)\Delta t\right)\right]$$

(Eq. 3.30b)

Le calcul de la probabilité d'un changement de conformation dans le cas d'une molécule complexée est similaire à ce qui a été décrit ci-dessus, la seule différence étant le remplacement de la densité d'états de la molécule isolée par la densité d'états du complexe dans le calculs des constantes de vitesse par la théorie RRKM.

3.4.2 Applications

Dans l'objectif d'estimer l'influence des différents paramètres intervenant dans le modèle de refroidissement conformationnel ainsi que des approximations réalisées, les rapports d'abondances entre conformations prédits par celui-ci ont été comparés à des résultats expérimentaux obtenus sur deux systèmes : le dipeptide protégé Ac-Ala-Ala-OBn et la molécule d'indanol.

3.4.2.a Ac-Ala-Ala-OBn

Le spectre d'IR2P-1C représenté sur la Figure 3.1 a été réalisé dans les conditions suivantes : les peptides protégés ont été vaporisés par désorption laser puis refroidis dans une expansion supersonique pulsée d'un mélange d'hélium et de néon (P_0 = 10 bars, T_0 = 300 K, d = 300 μm). Deux conformations de Ac-Ala-Ala-OBn ont été détectées, le signal d'ions le plus intense correspond à une géométrie étendue (**A**), l'autre signal correspond à une géométrie repliée (**B**). Le rapport d'intensité **A** : **B** entre les signaux dus aux deux conformères est environ égal à 80 : 20 (soit une température conformationnelle $T_{conf} \approx 340$ K) et s'est avéré peu sensible à une variation de la pression P_0 dans le domaine 7-16 bars.

Afin de comparer ces résultats expérimentaux aux prédictions du modèle, des simulations ont été réalisées selon les mêmes conditions de vaporisation et d'expansion et en supposant une température initiale de 600 K pour le peptide. La différence d'enthalpie libre à 0 K entre les deux conformations (énergie E_A sur la Figure 3.6) a été calculée au niveau RI-B97-D/TZVPP et vaut 11,8 kJ · mol^{-1} (986 cm^{-1}). La hauteur de la barrière d'énergie de la réaction d'isomérisation est en revanche plus difficile à estimer. En effet, les géométries des conformères **A** et **B** étant très différentes, il n'existe pas d'état de transition unique permettant de passer de l'une à l'autre (Figure 3.15). Probablement plusieurs chemins réactionnels différents peuvent être empruntés pour effectuer cette réaction, chacun étant composé d'une succession de minima locaux (**M**)

séparés par des barrières d'énergie. L'influence du choix de l'état de transition présente donc une importance et sera discutée plus loin. Deux états de transitions ont été identifiés grâce à l'application des algorithmes décrits par Schlegel *et al.* [24, 25] : un état $\mathbf{T_1}$ de géométrie proche du minimum $\mathbf{M_1}$ et un état $\mathbf{T_A}$ de géométrie proche du minimum **A**.

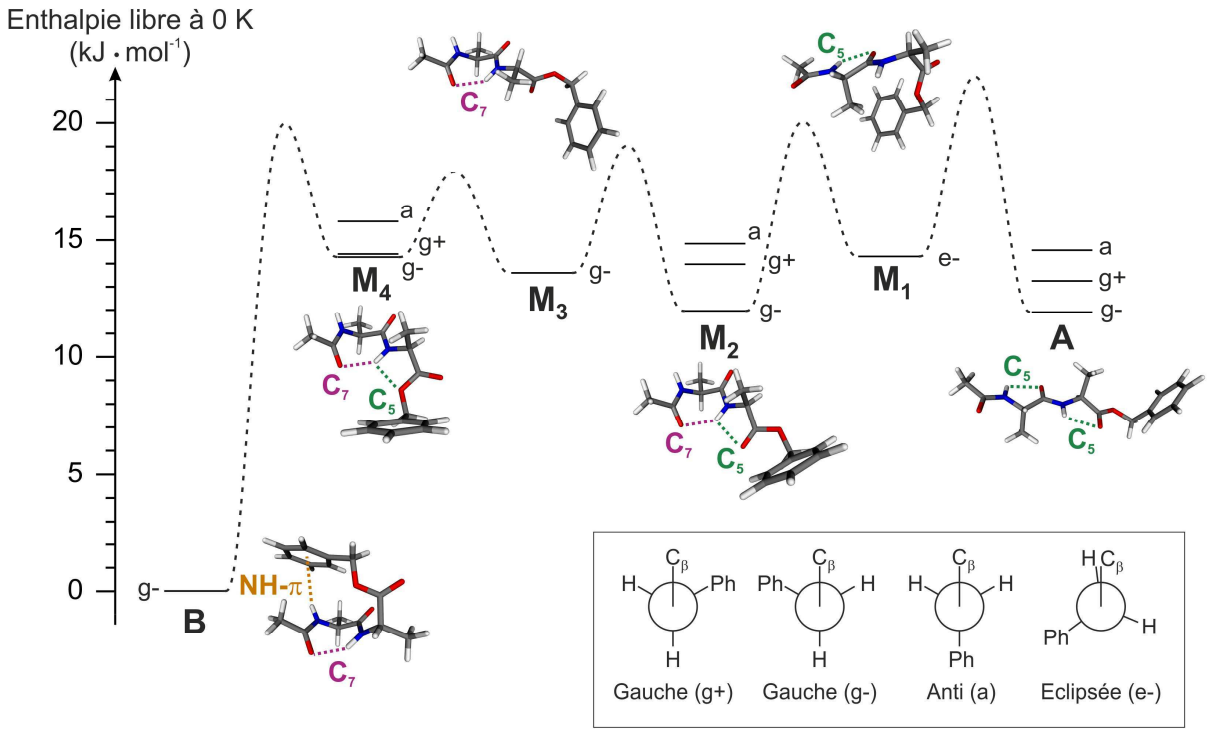


Fig. 3.15 – *Exemple d'un chemin réactionnel d'une isomérisation entre les conformations **A** et **B** empruntant quatre minima locaux (**M_1 à M_4**). Les énergies des rotamères différant uniquement par la valeur de l'angle dièdre C_β-O-C-C_{Ph} (g+, g-, a ou e-) sont représentées verticalement. Les hauteurs des barrières d'énergie en pointillés sont arbitraires.*

Dans une première simulation, utilisant l'état de transition $\mathbf{T_1}$ à une énergie de 14,3 kJ · mol^{-1} (1200 cm^{-1}) pour le calcul des constantes de vitesse d'isomérisation, le rapport final de population obtenu entre les conformations **A** et **B** est 0 : 100 (Figure 3.16). La population du conformère **A** initialement majoritaire à une température de 600 K a complètement disparu à une distance réduite de la vanne égale à 1,80. Le refroidissement conformationnel théorique est donc beaucoup plus efficace que celui observé expérimentalement. Deux facteurs peuvent expliquer le fait que les molécules ne soient pas piégées assez rapidement dans une conformation : une trop faible vitesse de refroidissement vibrationnel ou une surestimation des constantes de vitesse d'isomérisation. La première hypothèse est la moins probable, le modèle ayant plutôt tendance à surestimer l'énergie échangée à chaque collision (Figure 3.10).

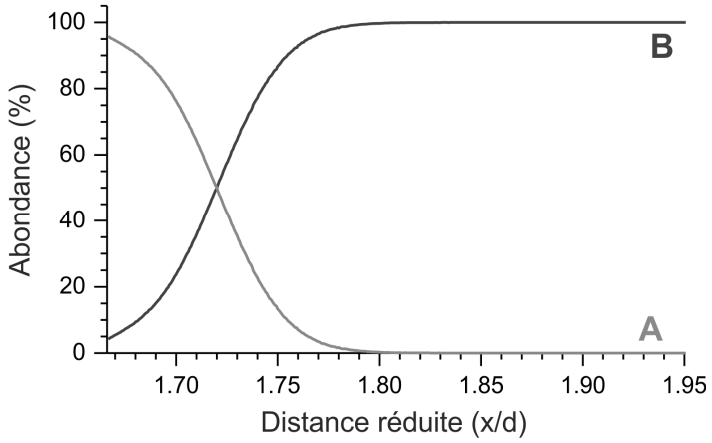


Fig. 3.16 – *Evolution des abondances relatives des conformères **A** et **B** de Ac-Ala-Ala-OBn en fonction de la distance réduite à la vanne x/d pour une expansion de néon à P_0 = 10 bars et T_0 = 300 K. L'état de transition est l'état $\mathbf{T_1}$ et la hauteur de la barrière d'énergie est égale à 2,5 kJ·mol^{-1} depuis la conformation **A**.*

Afin de déterminer les incertitudes sur le rapport d'abondance obtenu, on peut s'intéresser à l'influence de différents paramètres sur celui-ci : la température initiale de la molécule-test, la pression du gaz porteur et le choix de l'état de transition. Pour pouvoir observer une évolution des rapports d'abondances dans les deux premières séries de simulations la hauteur de la barrière d'énergie d'isomérisation a été augmentée jusqu'à ce que la population finale du conformère **A** soit différente de 0. Dans un intervalle de température compris entre 400 et 800 K le rapport d'abondance à l'équilibre thermodynamique entre les deux conformations varie de moins de 10 %, ce qui explique que la température initiale de la molécule-test n'ait aucune influence sur les abondances finales dans cet intervalle (Figure 3.17a). L'estimation à une centaine de Kelvin près de la température des molécules désorbées ne contribue donc que très peu à l'incertitude sur les résultats. De façon similaire à ce qui est observé expérimentalement, une variation de la pression de néon entre 5 et 20 bars n'entraîne qu'une très légère augmentation de l'abondance du conformère **A** (Figure 3.17b). En effet, la vitesse de refroidissement augmente avec le nombre de collisions, donc avec la pression, et les molécules sont piégées plus rapidement dans une conformation, d'où la température conformationnelle plus élevée à 20 bars.

L'approximation la plus importante réalisée pour le système Ac-Ala-Ala-OBn est probablement celle sur la géométrie et l'énergie de l'état de transition. Ne disposant pas d'un chemin réactionnel complet entre les conformations **A** et **B**, il n'est pas sûr que cet état de transition corresponde à l'étape cinétiquement déterminante de la réaction d'isomérisation (état

de transition de plus haute énergie). Des simulations ont été effectués à partir des deux états de transition $\mathbf{T_1}$ et $\mathbf{T_A}$ en variant la valeur de leur enthalpie libre à 0 K entre 14 et 39 kJ · mol^{-1} (Figure 3.17c). Pour les deux états de transition, les constantes de vitesses d'isomérisation diminuent lorsque les hauteurs de barrière d'énergie augmentent (Eq. 3.28). Une barrière d'énergie élevée défavorise donc le transfert de population de la conformation **A** vers la conformation **B** lors du refroidissement. L'état de transition $\mathbf{T_A}$, proche en géométrie de la forme étendue **A** qui est la conformation la plus flexible, a une densité d'états vibrationnels qui augmente légèrement plus vite que l'état de transition $\mathbf{T_1}$ et conduit donc à des constantes de vitesse d'isomérisation plus élevées. Par conséquent une hauteur de barrière plus élevée est nécessaire dans le cas $\mathbf{T_A}$ par rapport au cas $\mathbf{T_1}$ pour retrouver les abondances expérimentales (respectivement ~26 kJ · mol^{-1} et ~22 kJ · mol^{-1}). La différence entre ces deux hauteurs de barrière est cependant faible devant la hauteur de barrière calculée avec la méthode RI-B97-D/TZVPP (~2,5 kJ · mol^{-1}). On peut également noter l'importance d'une bonne description des modes de vibration de basse fréquence de la molécule-test puisque ce sont ces modes de basses fréquences qui contribuent le plus fortement à la densité d'états vibrationnels. Or ces modes sont ceux qui sont les moins bien décrits par les méthodes théoriques.

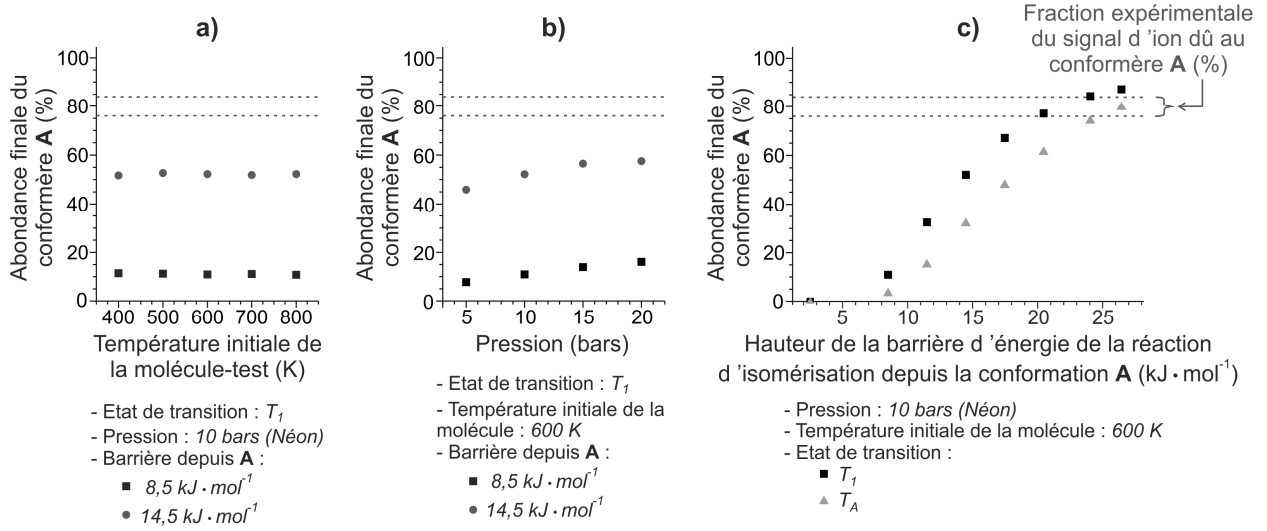


Fig. 3.17 – *Evolution de l'abondance finale de la conformation étendue (**A**) en % en fonction de (a) la température initiale de la molécule-test, (b) la pression initiale en gaz noble P_0 et (c) les enthalpies libres à 0 K des états de transition $\boldsymbol{T_1}$ et $\boldsymbol{T_A}$. La température initiale du gaz porteur (néon) est égale à 300 K et le diamètre de la vanne est de 300 μm. L'abondance du conformère **A** mesurée expérimentalement est de l'ordre de 80 %.*

L'exemple du dipeptide protégé Ac-Ala-Ala-OBn montre que le modèle présenté dans cette étude reproduit qualitativement la physique du refroidissement conformationnel dans une détente supersonique. L'évolution des rapports d'abondance prédits en fonction de la pression du

gaz porteur, de la nature de l'état de transition ou encore de la hauteur de la barrière d'énergie d'isomérisation sont en accord avec ce qui est attendu pour un tel système. Les prédictions réalisées directement à partir des géométries et des énergies des états de transition obtenues par la méthode RI-B97-D/TZVPP sont cependant assez éloignées des résultats expérimentaux. Cette différence peut avoir plusieurs origines, liées au calcul des probabilités de changement de conformation. Des résultats plus proches de l'expérience pourraient en effet être obtenus si ces probabilités étaient plus faibles. Une première raison pourrait être due au calcul harmonique des densités d'états à partir des modes de vibrations donnés par la méthode RI-B97-D/TZVPP : une mauvaise prédiction des modes de vibration de basses fréquences pourrait conduire à une surestimation des constantes de vitesse d'isomérisation calculées par la théorie RRKM. Une autre possibilité provient de la difficulté dans le cas de Ac-Ala-Ala-OBn de trouver un état de transition pour une réaction d'isomérisation entre deux conformations de géométries aussi différentes. Un état de transition hypothétique plus rigide que $\mathbf{T_1}$ ou $\mathbf{T_A}$ présenterait un meilleur accord avec l'expérience. Dans ce sens, il est intéressant de tester les prédictions du modèle sur la molécule d'indanol, où l'état de transition de la réaction d'isomérisation est beaucoup plus facile à identifier.

3.4.2.b Indanol

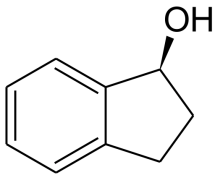


Fig. 3.18 – *Formule topologique du (S)-1-indanol*

Les spectroscopies UV et IR en phase gazeuse d'un des énantiomères de la molécule d'indanol ont été étudiées par Zehnacker *et al.* [26, 27] et Caminati *et al.* [28]. Dans ces expériences, du (S)-1-indanol (Figure 3.18) a été chauffé à une température d'environ 50°C en amont d'une vanne pulsée de 300 μm de diamètre puis refroidi par coexpansion avec de l'hélium à 2 bars, du néon à 0,7 bars ou de l'argon à 1 bar. Deux conformations ont été identifiées grâce aux techniques spectroscopiques d'IR2P-1C et de double résonance IR-UV : une où le groupement -OH est en position axiale par rapport au cycle à cinq atomes de carbone et une où celui-ci est en position équatoriale (Figure 3.19a). Il a de plus été observé expérimentalement que le rapport d'intensité des signaux d'ions des deux conformations varie fortement selon le gaz

noble utilisé [29], le signal relatif de la conformation équatoriale augmentant progressivement avec la masse atomique du gaz. En effet, le rapport d'intensité entre la conformation équatoriale et la conformation axiale est environ 67 : 33 dans l'hélium, 75 : 25 dans le néon et 100 : 0 dans l'argon où seule la forme équatoriale est observée. Des simulations ont donc été réalisées sur ce système afin de savoir si le modèle de refroidissement conformationnel mis au point permettait de reproduire qualitativement ces observations expérimentales et éventuellement de proposer une explication quant à l'origine des différences de comportement entre gaz nobles.

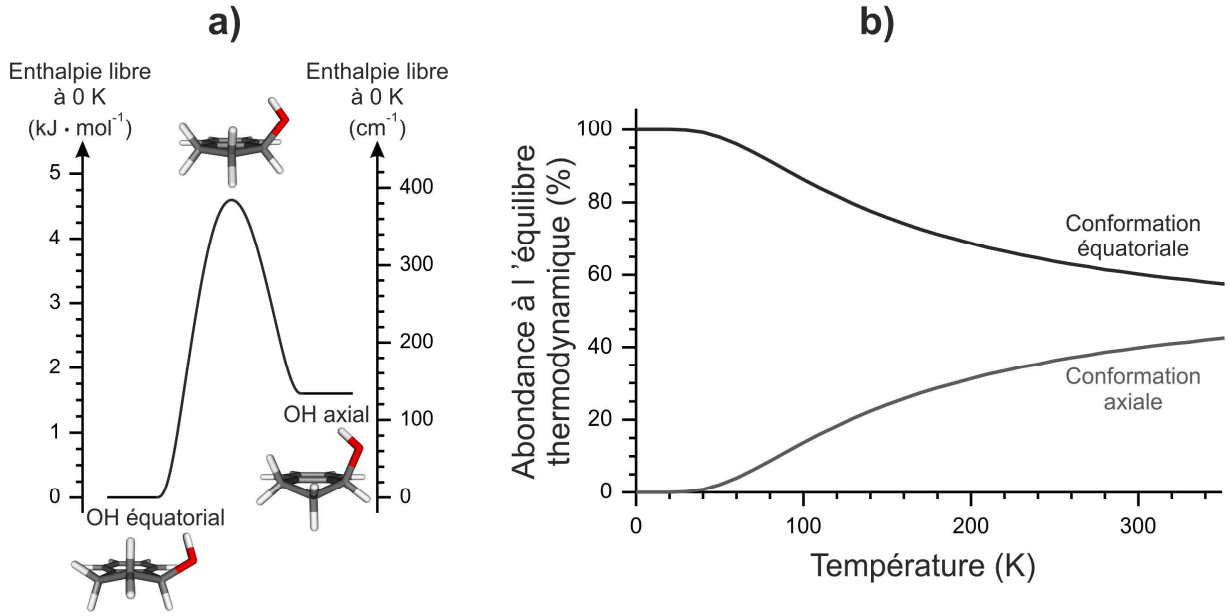


Fig. 3.19 – *(a) Enthalpies libres à 0 K des conformations équatoriale et axiale et de l'état de transition du (S)-1-indanol calculées par la méthode RI-B97-D/TZVPP. (b) Abondances relatives des conformations équatoriale et axiale à l'équilibre thermodynamique en fonction de la température.*

Les deux conformations du (S)-1-indanol sont reliées ici par un état de transition unique et facilement identifiable, il s'agit de la géométrie où tous les atomes de carbone des deux cycles sont dans un même plan. Les enthalpies libres à 0 K et les fréquences de vibrations des deux conformations et de l'état de transition ont été calculées au niveau RI-B97-D/TZVPP. Selon cette méthode, la conformation équatoriale est plus stable de 1,6 kJ · mol^{-1} (135 cm^{-1}) par rapport à l'axiale à 0 K et cette première forme reste la plus stable jusqu'à des températures supérieures à 600 K, ce qui est cohérent avec le fait que celle-ci est la forme majoritaire expérimentalement, quel que soit le gaz noble. La hauteur de la barrière d'énergie de la réaction d'isomérisation depuis la forme équatoriale est égale à 4,6 kJ · mol^{-1} (385 cm^{-1}). Dans une coexpansion, le nombre de collisions en amont de l'orifice est suffisamment important pour pouvoir réaliser

l'hypothèse que la molécule-test est en tout point en équilibre avec le gaz noble. La molécule de (S)-1-indanol est donc placée au début de chaque simulation au centre de l'orifice, en x = 0, et son énergie interne est tirée au sort selon une température de 245 K, qui correspond à la température du gaz noble à cette position pour une température en amont de la vanne de 325 K.

Pour estimer l'influence relative des différents paramètres de la simulation sur les rapports de population finaux donnés par celle-ci, la probabilité de former des complexes entre un atome de gaz porteur et une molécule d'indanol a dans un premier temps été négligée. Les abondances finales de la conformation équatoriale, la conformation la plus stable à 0 K, ont ensuite été calculées pour différentes valeurs de la différence d'enthalpie entre les deux conformations et de la hauteur de la barrière d'énergie de la réaction d'isomérisation. Ces résultats sont regroupés dans la Figure 3.20. Pour une différence d'enthalpie de 135 cm^{-1} et une hauteur de barrière de 385 cm^{-1} depuis la forme équatoriale (valeurs calculées avec la méthode RI-B97-D/TZVPP), des rapports de population voisins ont été obtenus dans l'hélium, le néon et l'argon : respectivement 84 : 16, 81 : 19 et 83 : 17 entre les conformations équatoriale et axiale. De manière générale, le même constat peut être réalisé pour toutes les valeurs de différences d'enthalpie et de hauteurs de barrière choisies ici : dans ce modèle les abondances finales ne dépendent pas du gaz considéré. De plus, contrairement au cas de Ac-Ala-Ala-OBn, on peut également remarquer que les abondances finales dépendent très peu de la hauteur de la barrière d'énergie. Ces résultats montrent que l'effet observé expérimentalement n'est pas dû à une cinétique de refroidissement vibrationnel qui varie selon le gaz porteur (par exemple à cause d'un nombre différent de collisions subies durant l'expansion) et que par conséquent un nouveau paramètre doit être ajouté à la simulation pour obtenir des résultats comparables aux expériences.

Le paramètre ajouté a été la probabilité d'agrégation, telle que définie au paragraphe 3.3.5. Les simulations du refroidissement conformationnel de l'indanol de la Figure 3.20 peuvent alors être comparées à celles de la Figure 3.21, réalisées avec le même jeu de paramètres, mais en accordant cette fois la possibilité aux atomes de gaz porteur de complexer la molécule. Pour une différence d'enthalpie de 135 cm^{-1} et une hauteur de barrière de 385 cm^{-1} depuis la forme équatoriale, les rapports de population deviennent ainsi égaux à 91 : 9 dans l'hélium, 95 : 5 dans le néon et 99 : 1 dans l'argon. Pour ce couple de paramètres, la possibilité de former des complexes a donc pour effet d'augmenter la population de la forme équatoriale au détriment de la population de la forme axiale.

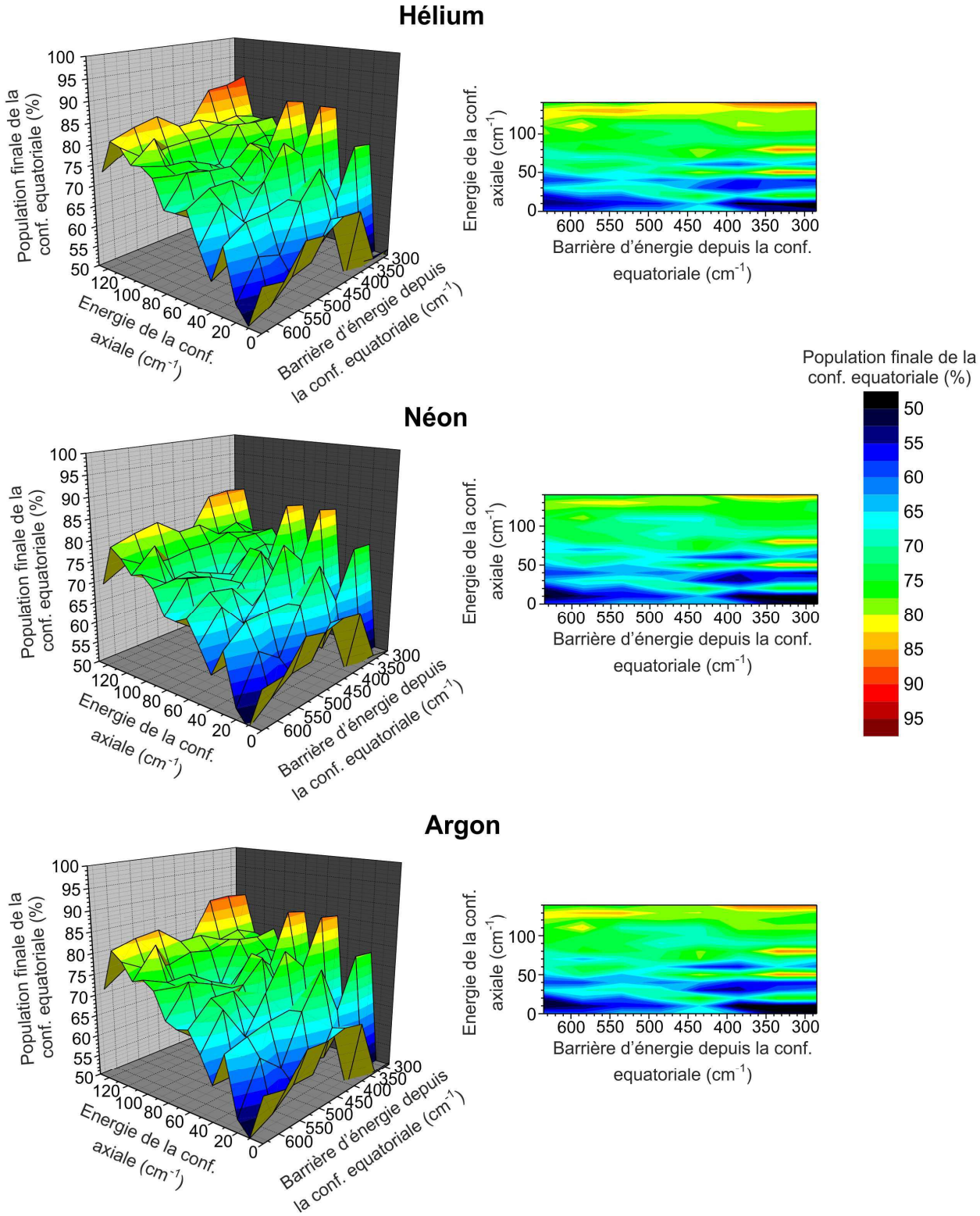


Fig. 3.20 – *Evolution de l'abondance finale de la conformation équatoriale du (S)-1-indanol en fonction de la différence d'enthalpie entre les deux conformations, de la hauteur de la barrière d'énergie à l'isomérisation et de la nature du gaz porteur. La température et la pression du gaz porteur en amont de la vanne pulsée ont été fixées à 50°C et respectivement 2 bars, 0,7 bars et 1 bar pour l'hélium, le néon et l'argon. Le diamètre de la vanne pulsée a été pris égal à 0,3 mm. La probabilité de former un complexe à l'issue d'une collision a été définie comme étant nulle.*

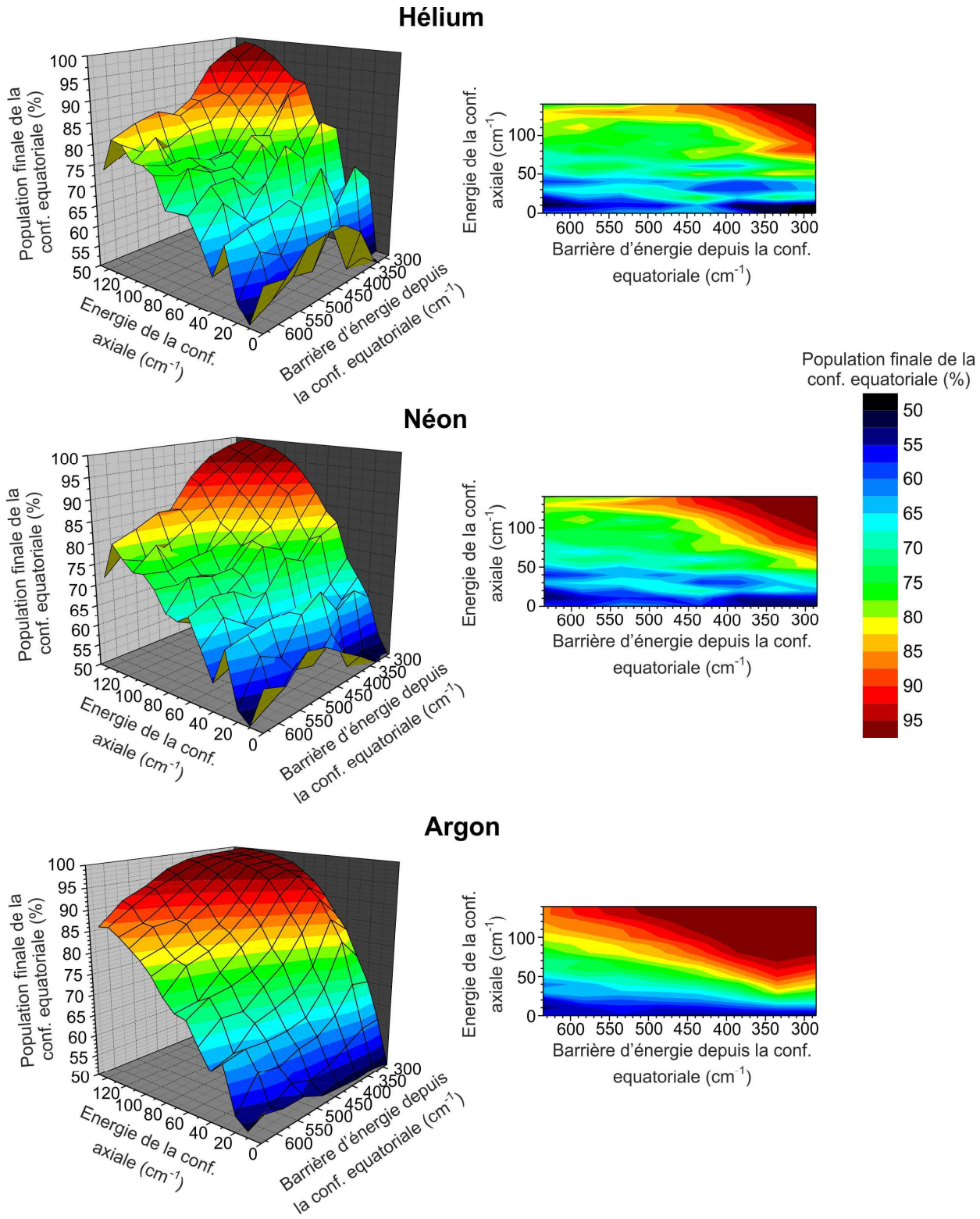


Fig. 3.21 – *Evolution de l'abondance finale de la conformation équatoriale du (S)-1-indanol en fonction de la différence d'enthalpie entre les deux conformations, de la hauteur de la barrière d'énergie à l'isomérisation et de la nature du gaz porteur lorsque l'atome de gaz a la possibilité de former un complexe avec la molécule à l'issue de la collision. Les conditions des simulations sont identiques à celles définies dans la légende de la Figure 3.20.*

Cet effet provient du fait que, sans formation de complexes (c'est-à-dire dans la configuration présentée dans la Figure 3.7), les phénomènes de collision et d'isomérisation sont traités de manière indépendante dans le modèle. Les probabilités d'isomérisations ne dépendent que de l'énergie interne vibrationnelle présente dans la molécule à un instant donné, ce qui revient à négliger la possibilité d'isomérisation dans une paire collisionnelle entre la molécule et un atome de gaz porteur. En accordant la possibilité à cette paire collisionnelle d'avoir une durée de vie non nulle (Figure 3.13), l'énergie de translation des deux particules dans la collision s'ajoute à l'énergie interne de la molécule et devient disponible pour effectuer des isomérisations, jusqu'à ce que le complexe se dissocie. Par conséquent, grâce à cette énergie apportée par la collision, des isomérisations peuvent survenir pendant plus longtemps dans la détente, même après que l'énergie interne de la molécule devienne inférieure à la hauteur de la barrière d'énergie. Ce qui n'était pas le cas précédemment. Or, lorsque l'énergie interne de la molécule devient inférieure à la hauteur de la barrière, et pour une même énergie interne dans les deux conformations, une énergie de collision plus élevée est nécessaire pour réaliser une isomérisation de la forme équatoriale vers la forme axiale que pour réaliser le chemin inverse. En effet, la hauteur de la barrière d'énergie depuis la conformation axiale est plus faible que celle depuis la conformation équatoriale (Figure 3.19a). La probabilité de réaliser une isomérisation de la forme axiale vers la forme équatoriale est ainsi plus importante que celle d'une isomérisation de la forme équatoriale vers la forme axiale. La formation de complexes dans le modèle a donc tendance à augmenter la population de la conformation équatoriale.

L'effet de la formation de complexe sur le refroidissement conformationnel est d'autant plus fort que la durée de vie de la paire collisionnelle est importante (la probabilité de réaliser une isomérisation sera plus grande si l'énergie excédentaire est disponible pendant plus longtemps). Comme l'énergie d'interaction entre le gaz porteur et la molécule décroît de l'argon à l'hélium, cet effet sera donc plus important dans l'argon que dans le néon, et plus important dans le néon que dans l'hélium. Cela explique pourquoi la population de la forme équatoriale la plus élevée est trouvée dans l'argon. En comparant les Figures 3.20 et 3.21, on peut également remarquer que l'effet induit par la formation de complexe est d'autant plus fort que la barrière d'énergie de la réaction d'isomérisation est faible : pour des hauteurs de barrière d'énergie depuis la conformation équatoriale supérieures à environ 450 cm^{-1}, les résultats obtenus pour l'hélium et le néon sont comparables dans les deux figures. Ce qui signifie que l'énergie de collision disponible dans ces deux gaz n'est alors plus suffisante pour permettre de franchir la barrière d'énergie. A l'inverse, si la hauteur de la barrière d'énergie devient trop faible (cas de l'argon, pour une

barrière d'énergie depuis la forme équatoriale inférieure à 340 cm^{-1}), la probabilité de réaliser une isomérisation de la forme équatoriale vers la forme axiale n'est plus négligeable devant l'isomérisation de la forme axiale vers la forme équatoriale et on peut observer une diminution de la population de la forme équatoriale.

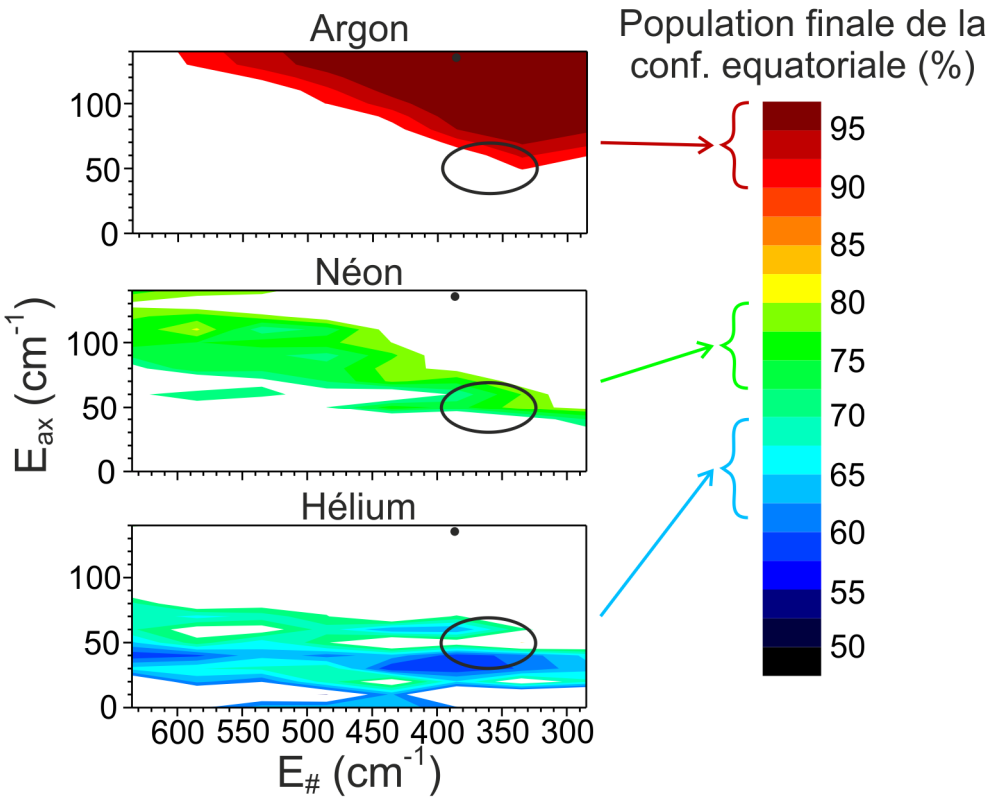


Fig. 3.22 – *Les couples de paramètres (Energie de la forme axiale ; Hauteur de la barrière d'énergie) conduisant à une population finale calculée de la conformation équatoriale proche de celle observée expérimentalement (67% dans l'hélium, 75% dans le néon et 100% dans l'argon) sont représentés en bleu (hélium), en vert (néon) et en rouge (argon). La position des énergies calculées au niveau RI-B97-D/TZVPP est représentée par un point noir. Le cercle noir indique les couples de paramètres qui permettent d'obtenir des valeurs proches de l'expérience pour les trois gaz.*

Afin de tester les modèles, nous avons cherché à voir si des couples particuliers de valeurs de l'énergie de la conformation axiale et de la hauteur de la barrière d'énergie permettaient de retrouver les observations expérimentales dans les trois gaz porteurs (c'est-à-dire 67 : 33 dans l'hélium, 75 : 25 dans le néon et 100 : 0 dans l'argon). A cette fin, les régions de la Figure 3.21 présentant un écart de plus de 5% avec les valeurs expérimentales ont été supprimées (Figure 3.22). On peut noter qu'il est possible de trouver des couples de paramètres tels que les résultats donnés par la simulation sont proches des observations expérimentales dans chacun des gaz (cercle noir sur la Figure 3.22). Les hauteurs de barrière d'énergie de ces couples particuliers

sont voisines de celle calculée par la méthode RI-B97-D/TZVPP (385 cm^{-1}). Les énergies de la conformation axiale doivent être légèrement plus faibles que la valeur calculée (135 cm^{-1}) mais restent largement dans l'intervalle d'incertitude de cette méthode.

En conclusion, parmi les deux modèles extrêmes testés, seul celui prenant en compte explicitement l'interaction entre la molécule et le gaz porteur, au travers de la formation d'un complexe transitoire, est susceptible de rendre compte des observations, à savoir l'influence de la nature du gaz porteur sur le refroidissement conformationnel. Les paramètres ajustables du modèle, déterminés par comparaison expérience-théorie, sont en accord qualitatif avec les prédictions énergétiques par chimie quantique, renforçant ainsi notre confiance dans ce modèle.

3.5 Perspectives

Le modèle présenté dans cette étude a été développé dans l'objectif de reproduire à l'aide d'outils statistiques le refroidissement conformationnel d'une molécule dans une détente supersonique. Il est constitué de deux grandes parties, les collisions inélastiques sont traitées dans le cadre de la théorie des collisions partiellement ergodiques du modèle de Borgnakke-Larsen et l'isomérisation est calculée d'après la théorie RRKM. Le refroidissement vibrationnel et rotationnel par collisions donne des résultats satisfaisants. Le système converge vers le bon état d'équilibre et la quantité d'énergie échangée à chaque collision peut être paramétrée, grâce au choix du nombre de modes actifs lors de la redistribution et du pourcentage de collisions élastiques, afin de trouver des résultats en accord avec la littérature. Le processus d'agrégation des atomes sur la molécule, nécessaire pour coupler les phénomènes de collision et d'isomérisation et observer des effets dépendants de la nature du gaz porteur, conduit actuellement au collage d'un trop grand nombre d'atomes. L'hypothèse d'une probabilité de collage égale à 1 quel que soit le nombre d'atomes déjà présents sur la molécule est trop forte, même si elle est compensée par une vitesse de dissociation qui augmente avec le nombre d'atomes. Ce traitement pourrait être amélioré en identifiant les différents sites de collage de la molécule et en calculant les barrières d'énergies de dissociation associées à chacun. Un tirage au sort de ces sites pourrait ensuite être effectué à chaque collision.

En ce qui concerne la prédiction de rapports d'abondances entre conformations, le modèle permet de reproduire les tendances d'évolution des populations en fonction de paramètres expérimentaux (température, pression) ou de grandeurs intrinsèques du système étudié (différence d'énergie entre conformations, densité d'états vibrationnels, hauteur de barrière

d'énergie). Il peut donc être utilisé dans le but de rationaliser des observations expérimentales mais doit encore être affiné avant de pouvoir prédire des rapports d'abondances avec suffisamment de précision pour être comparé aux expériences. Une piste pour réaliser cela peut être de vérifier, par comparaison des prédictions du modèle avec un plus grand nombre de résultats expérimentaux, si de meilleurs résultats sont obtenus systématiquement pour des vitesses d'isomérisations plus faibles que celles prédites par la théorie RRKM et d'ajuster les constantes de vitesse d'isomérisation en fonction de ces résultats.

3.6 Bibliographie

[1] E. Gloaguen, B. de Courcy, J. P. Piquemal, J. Pilme, O. Parisel, R. Pollet, H. S. Biswal, F. Piuzzi, B. Tardivel, M. Broquier et M. Mons, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, (34), 11860-11863.

[2] R. S. Ruoff, T. D. Klots, T. Emilsson et H. S. Gutowsky, *J. Chem. Phys.* **1990**, 93, (5), 3142-3150.

[3] V. P. Manea, K. J. Wilson et J. R. Cable, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, (8), 2033-2039.

[4] P. D. Godfrey, R. D. Brown et F. M. Rodgers, *J. Mol. Struct.* **1996**, 376, 65-81.

[5] M. Handschuh, S. Nettesheim et R. Zenobi, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, (10), 1719-1726.

[6] D. R. Miller, Free Jet Sources. In *Atomic and Molecular Beam Methods*, G. Scoles, Oxford University Press, **1988**, Vol. 1, pp 14-53, et références citées.

[7] G. A. Bird, Inelastic Collisions and Surface Interactions. In *Molecular Gas Dynamics and the Direct Simulation of Gas Flows*, J. M. Brady, Oxford Science Publications, **1994**, pp 99-122.

[8] T. Baer et W. L. Hase, Statistical Theory of Unimolecular Decomposition. In *Unimolecular Reaction Dynamics: Theory and Experiments*, Oxford University Press, **1996**, pp 171-211.

[9] P. W. Atkins, Statistical thermodynamics: the machinery. In *Physical Chemistry: Fifth Edition*, Oxford University Press, **1994**, pp 691-720.

[10] T. Beyer et D. F. Swinehart, *Commun. ACM* **1973**, 16, (6), 379.

[11] A. Bondi, *J. Phys. Chem.* **1964**, 68, (3), 441-451.

[12] R. S. Rowland et R. Taylor, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, (18), 7384-7391.

[13] P. W. Atkins, The properties of gases. In *Physical Chemistry: Fifth Edition*, Oxford University Press, **1994**, pp 21-54.

[14] C. Borgnakke et P. S. Larsen, *J. Comput. Phys.* **1975**, 18, (4), 405-420.

[15] D. Nilsson et S. Nordholm, *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110, (9), 3289-3296.

[16] G. A. Bird, Equilibrium Gas Properties. In *Molecular Gas Dynamics and the Direct Simulation of Gas Flows*, J. M. Brady, Oxford Science Publications, **1994**, pp 77-98.

[17] H. Frerichs, M. Hollerbach, T. Lenzer et K. Luther, *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110, (9), 3179-3185.

[18] O. F. Hagena et W. Obert, *J. Chem. Phys.* **1972**, 56, (5), 1793-1802.

[19] G. N. Makarov et A. N. Petin, *J. Exp. Theor. Phys.* **2008**, 107, (5), 725-733.

[20] R. A. Marcus, *J. Chem. Phys.* **1952**, 20, (3), 359-364.

[21] R. G. Satink, H. Piest, G. von Helden et G. Meijer, *J. Chem. Phys.* **1999**, 111, (24), 10750-10753.

[22] D. Cappelletti, M. Bartolomei, F. Pirani et V. Aquilanti, *J. Phys. Chem. A* **2002**, 106, (45), 10764-10772.

[23] M. Alberti, *J. Phys. Chem. A* **2010**, 114, (6), 2266-2274.

[24] C. Y. Peng, P. Y. Ayala, H. B. Schlegel et M. J. Frisch, *J. Comput. Chem.* **1996**, 17, (1), 49-56.

[25] P. Y. Ayala et H. B. Schlegel, *J. Chem. Phys.* **1997**, 107, (2), 375-384.

[26] K. Le Barbu-Debus, F. Lahmani, A. Zehnacker-Rentien, N. Guchhait, S. S. Panja et T. Chakraborty, *J. Chem. Phys.* **2006**, 125, 174305.

[27] J. Altnoder, A. Bouchet, J. J. Lee, K. E. Otto, M. A. Suhm et A. Zehnacker-Rentien, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, 15, (25), 10167-10180.

[28] B. Velino, P. Ottaviani, W. Caminati, A. Giardini et A. Paladini, *ChemPhysChem* **2006**, 7, (3), 565-568.

[29] A. Zehnacker-Rentien, (Communication privée, Octobre 2012)

Chapitre 4

Etude conformationnelle de systèmes biologiques modèles par spectroscopie de double résonance IR/UV en phase gazeuse

Chapitre 4

Etude conformationnelle de systèmes biologiques modèles par spectroscopie de double résonance IR/UV en phase gazeuse

La spectroscopie de double résonance IR-UV est un outil puissant qui permet, via l'étude de peptides modèles simples en phase gazeuse, d'obtenir des informations précises sur les interactions intramoléculaires gouvernant le repliement des protéines. En effet, les conditions de la phase gazeuse ne sont pas si éloignés qu'il pourrait paraître au premier abord, des conditions régnant au cœur de ces macromolécules, ou dans des milieux biologiques hydrophobes, notamment si l'on compare la constante diélectrique de ces milieux [50]. Cela confère aux géométries observées en phase gazeuse une pertinence certaine vis-à-vis des questions structurelles des protéines. Notons d'ailleurs que la structure de celles-ci est déterminée pour nombre d'entre elles par diffraction de rayons X dans des conditions d'empilement cristallin parfois très éloignées des conditions fonctionnelles dans la cellule. Des études récentes réalisées au sein de notre laboratoire ont ainsi permis de mettre en évidence un très bon accord entre les paramètres structuraux (longueur de liaisons hydrogène et angles dièdres Φ, Ψ) de dipeptides protégés et de fragments de protéines constitués des mêmes acides aminés répertoriés dans la Protein Data Bank [1].

Dans ce chapitre, les spécificités de la technique de double résonance IR-UV (sélectivité en conformation, sélectivité en masse) seront dans un premier temps introduites sur un exemple de chaîne peptidique modèle, la phénylalanine protégée. Cette méthode expérimentale sera ensuite appliquée à l'étude des interactions protéines-solvant et des interactions hydrophobes. Ce chapitre a également pour objectif d'introduire les structures des systèmes étudiés dans le chapitre 5.

4.1 Application à l'étude d'une chaîne peptidique modèle : la phénylalanine protégée

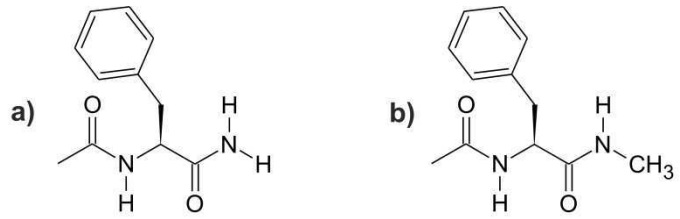


Fig. 4.1 – *Formules topologiques de phénylalanines protégées : a) Ac-Phe-NH_2 et b) Ac-Phe-NHMe.*

Les phénylalanines protégées par un groupement amine (Ac-Phe-NH_2) et par un groupement méthylamine (Ac-Phe-NHMe) (Figure 4.1) sont parmi les peptides protégés les plus simples qui possèdent un chromophore aromatique dans le domaine du proche UV. Et pourtant, en dépit de leur petite taille, ces systèmes montrent déjà des effets de conformations très intéressants, qui seront l'un des objets du chapitre 5. Cette partie a pour but de présenter sur des exemples concrets les avantages apportés par les sélectivités en conformation et en masse des techniques spectroscopiques d'IR2P et de double résonance IR-UV.

4.1.1 Intérêt de la sélectivité en conformation

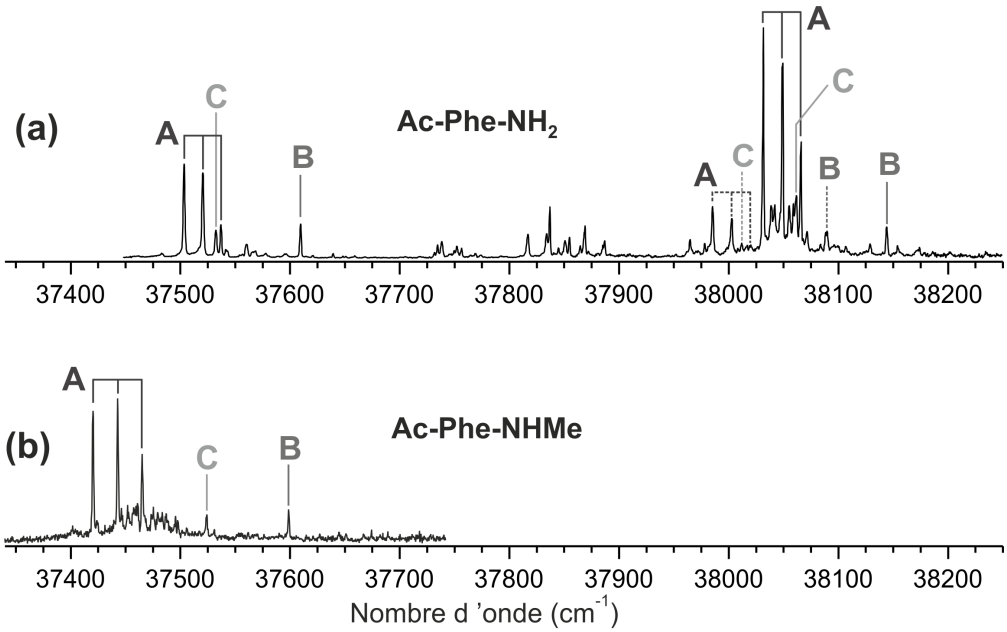


Fig. 4.2 –*Spectres d'excitation UV de (a) Ac-Phe-NH_2 et (b) Ac-Phe-NHMe dans le domaine de la première transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du chromophore aromatique. Les transitions dans le domaine 37 950 - 38 150 cm^{-1} correspondent aux transitions vibroniques des modes de déformation dans le plan du cycle aromatique 6a (tirets) et 6b (trait plein).*

Les systèmes Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe ont respectivement été l'objet d'études menées au sein du laboratoire [2] et par Gerhards *et al.* [3]. Ces études ont permis d'enregistrer, grâce à la méthode d'IR2P-1C, les spectres d'excitation de ces molécules dans le domaine 37300 - 37700 cm^{-1}, correspondant à l'origine de la transition électronique de leur état fondamental vers leur premier état excité $\pi\pi^*$ (Figure 4.2). Les deux spectres d'excitation présentent une grande similarité dans ce domaine : on retrouve dans chacun un système de trois bandes, espacées de 17 cm^{-1} pour Ac-Phe-NH_2 (37 503, 37 520 et 37 537 cm^{-1}) et 22 cm^{-1} pour Ac-Phe-NHMe (37 420, 37 443 et 37 465 cm^{-1}), et deux bandes situées à 37532 et 37610 cm^{-1} pour Ac-Phe-NH_2 et 37 524 et 37 599 cm^{-1} pour Ac-Phe-NHMe. Cette ressemblance est un signe que les conformations adoptées par ces deux molécules ont des structures proches. On peut également remarquer que les bandes, dues à une excitation du cycle aromatique, ne sont pas affectées de la même manière par la méthylation : le système de trois bandes est décalé dans Ac-Phe-NHMe de plus de 80 cm^{-1} vers les basses fréquences alors que les deux autres bandes ne le sont que d'une quinzaine de cm^{-1}. On peut donc en déduire qu'il existe plusieurs conformères différents et que dans celui associé au système de trois bandes le groupement -NH_2 / -NHMe terminal se situe dans l'environnement proche du cycle aromatique.

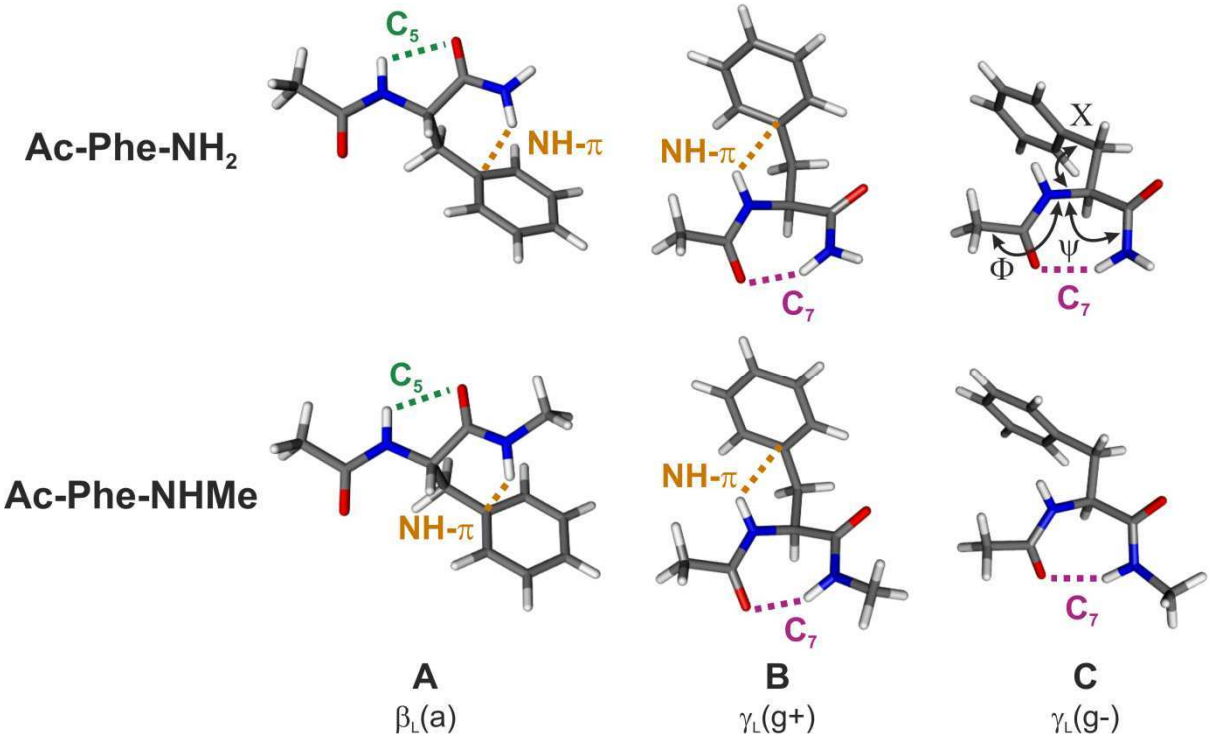


Fig. 4.3 – *Géométries des conformations **A**, **B** et **C** des phénylalanines protégées Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe calculées avec la méthode RI-B97-D/TZVPP. Les angles dièdres **Φ**, **Ψ** et **X** sont définis sur la géométrie γ_L(g-) de Ac-Phe-NH_2.*

Des spectres IR sélectifs en conformation ont été enregistrés dans le domaine des modes d'élongation des groupements -NH (3200–3600 cm^{-1}) par spectroscopie de double résonance IR-UV (Annexe B.2.1 et [3]) et ont permis, par comparaison avec des calculs RI-B97-D/TZVPP, d'attribuer une structure à chacune des bandes observées à l'origine de la transition (Figure 4.3). Ces mesures ont confirmé que les conformères de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe ont des structures proches (Tableau 4.1). Le système de trois bandes constitue une progression vibrationnelle d'un même conformère, appelé **A**. Les deux autres bandes sont attribuées à des conformations notées **B** et **C**, qui sont deux rotamères (g+ et g-) d'un coude γ_L. Ces trois structures sont parmi les plus basses en énergie de ces systèmes, la conformation **A** étant légèrement plus stable que les conformations **B** et **C**. Comme le suggérait le déplacement des transitions UV du conformère **A** entre Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe, le cycle aromatique de ce conformère est bien impliqué dans une interaction NH-π avec le groupement -NH_2 ou -NHMe terminal. La position des fréquences des transitions UV des autres conformères est moins sensible à la méthylation car dans le conformère **B** le cycle aromatique forme une interaction NH-π avec le groupement -NH de la première liaison peptidique et dans le conformère **C** il n'est impliqué dans aucune interaction intramoléculaire. La méthylation de la deuxième liaison peptidique perturbe donc peu l'environnement proche autour du cycle aromatique dans ces deux derniers conformères.

		Angles dièdres			Interactions intramoléculaires		Géométries
		Φ (°)	Ψ (°)	X (°)	$d_{N\text{-}H\ldots O}$ (pm)	$d_{N\text{-}H\ldots Ph}$ (pm)	
Ac-Phe-NH_2	**A**	- 160	159	- 168	-	256	β_L (a)
	B	- 83	55	44	202	244	γ_L (g+)
	C	- 85	72	- 55	203	-	γ_L (g-)
Ac-Phe-NHMe	**A**	- 161	154	- 172	-	260	β_L (a)
	B	- 83	56	44	201	244	γ_L (g+)
	C	- 85	73	- 55	203	-	γ_L (g-)

Tab. 4.1 – *Angles dièdres Φ, Ψ, X (en degrés), longueurs des liaisons hydrogène C_7 ($d_{N\text{-}H\ldots O}$) et des interactions NH-π ($d_{N\text{-}H\ldots Ph}$) des conformations **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe calculés avec la méthode RI-B97-D/TZVPP.*

Le spectre d'excitation de Ac-Phe-NH_2 dans le domaine 37800 - 38200 cm^{-1} a été enregistré durant cette thèse. Il a ceci de remarquable que les rapports d'intensités entre bandes dans cette région ressemblent fortement à ceux observés à l'origine de la première

transition $\pi \rightarrow \pi^*$ (37500 - 37620 cm^{-1}), ces derniers semblent y être reproduit deux fois, à environ + 480 cm^{-1} et + 530 cm^{-1} par rapport à l'origine (Tableau 4.2). Ces nombres d'onde sont proches de ceux des modes de déformation du cycle aromatique 6a et 6b observés respectivement à 450 et 530 cm^{-1} dans le toluène [4]. Les bandes dans le domaine 37800 - 38200 cm^{-1} correspondent donc à des transitions vibroniques des conformères observés à l'origine, il est par conséquent possible de déterminer à quels conformères sont dus les bandes dans cette région spectrale à partir de l'attribution réalisée à l'origine (Figure 4.2a).

Conformères	**Ac-Phe-NH_2**		
	Origine (cm^{-1})	6a (cm^{-1})	6b (cm^{-1})
A	37 503	+ 482	+ 528
	37 520	+ 482	+ 528
	37 537	+ 483	+ 529
B	37 610	+ 479	+ 534
C	37 532	+ 479	+ 529

Tab. 4.2 – *Nombres d'onde des transitions UV des conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2 observées à l'origine de la première transition $\pi \rightarrow \pi^*$ et déplacement des transitions vibroniques 6a et 6b par rapport à l'origine.*

4.1.2 Intérêt de la sélectivité en masse

La sélectivité en masse est une composante essentielle de la spectroscopie d'IR2P, ce qui est un avantage nécessaire lorsque l'on souhaite s'assurer de la nature des molécules étudiées ou encore de la présence d'agrégats ou de fragments dans une expérience. Elle peut également être mise à profit pour étudier le cas particulier d'un mélange de molécules possédant des spectres d'absorption très proches mais des masses différentes, par exemple un mélange d'isotopologues obtenu après une réaction de deutération incomplète. En effet, les hydrogènes portés par les groupements -NH d'un peptide protégé possédant la même labilité, si on ne remplace pas tous les atomes d'hydrogène de ces groupements par des atomes de deutérium on obtiendra toujours un mélange de molécules différant par le nombre d'atomes de deutérium (des isotopologues) et par la position de ces derniers dans la molécule (des isotopomères). Il est impossible de deutérer sélectivement une telle molécule en une position précise afin étudier l'influence de ce changement sur ses propriétés photophysiques.

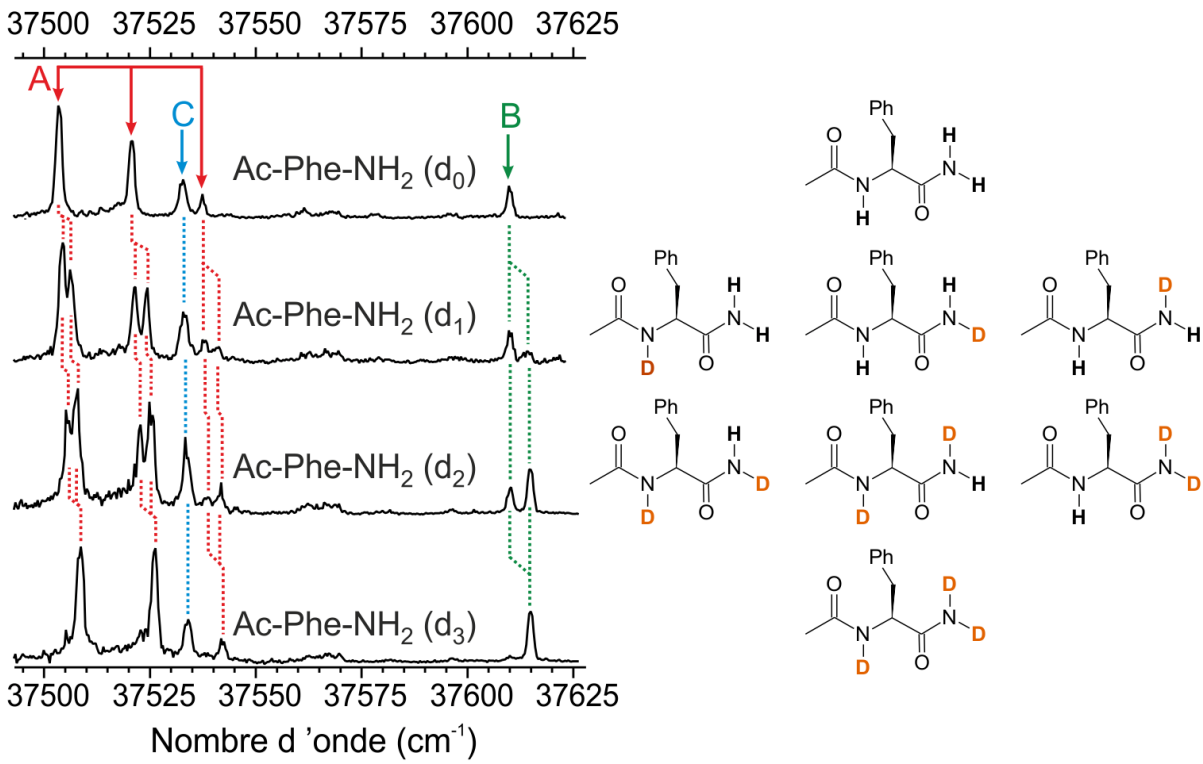


Fig. 4.3 – *Spectres d'excitation IR2P-1C des isotopologues d_0 à d_3 de Ac-Phe-NH_2 dans le domaine de la première transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du cycle aromatique. Les spectres des isotopologues d_1 et d_2 sont constitués des contributions des trois isotopomères (possédant la même masse) représentés à droite de la figure. Les bandes appartenant aux mêmes conformères sont indiquées par des pointillés de la même couleur.*

La détection par un spectromètre de masse permet alors de manière très efficace de mesurer simultanément et sélectivement des spectres d'excitation des isotopologues d_0 à d_3 de Ac-Phe-NH_2. Il suffit pour cela d'intégrer la partie du signal d'ions correspondant aux rapports m/z suivants: 206, 207, 208 et 209 respectivement pour les isotopologues d_0, d_1, d_2 et d_3. Les spectres d'excitation à l'origine de la première transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du cycle aromatique sont présentés sur la Figure 4.3. Dans le cas du conformère **B**, seulement deux bandes distinctes à 37610 et 37615 cm^{-1} sont observées, avec des rapports d'intensité proches de 2 : 1 et 1 : 2 pour les isotopologues d_1 et d_2. Ces derniers correspondant à un mélange de trois isotopomères, ce résultat suggère que la deutération en un site précis (très probablement sur le groupement -NH impliqué dans l'interaction NH-π avec le cycle aromatique) provoque un déplacement spectral de la bande de ce conformère. Le cas du conformère **A** est un peu plus compliqué car un déplacement de la bande est observé à chaque ajout d'un atome de deutérium. Enfin, la fréquence de la transition ππ* du conformère **C** est très peu sensible à la deutération.

Dans l'objectif d'identifier le groupement -NH du conformère **B** responsable du déplacement observé sur le spectre UV, des expériences de double résonance IR-UV dans le domaine des vibrations d'élongation des liaisons N-H ont été réalisées sur chacune des bandes des différents isotopologues de ce conformère (Figure 4.4). La fréquence de vibration d'une liaison N-D étant comprise entre 2500 et 2600 cm^{-1}, c'est l'absence de bandes de vibration dans le domaine 3300 – 3600 cm^{-1}, comparée aux bandes vibration de l'isotopologue d_0, qui apportera des informations sur la nature du site de deutération. Non deutéré, le conformère **B** présente trois bandes de vibration dans le domaine des élongations des liaisons N-H : la bande à 3342 cm^{-1} (bleu foncé) est caractéristique des liaisons hydrogène C_7, celle à 3438 cm^{-1} (rouge) correspond à une interaction NH-π avec le cycle aromatique et celle à 3517 cm^{-1} (bleu clair) à une liaison N-H libre. Pour une énergie fixée du laser d'ionisation (37610 cm^{-1}), les bandes du groupement -NH_2 terminal associées à la liaison hydrogène C_7 et la liaison N-H libre disparaissent progressivement avec le degré de deutération de la molécule. Seule la bande associée à l'interaction NH-π demeure dans l'isotopologue d_2. A l'opposé, cette bande disparaît lorsque c'est la transition à 37615 cm^{-1} qui est sondée par le laser d'ionisation. Le déplacement de 5 cm^{-1} de la transition UV est donc bien causé par la deutération sélective du groupement NH de la première liaison peptidique, ce qui ne peut se comprendre que par un effet vibrationnel, puisque la deutération ne modifie pas la structure électronique. De façon générale, les transitions électroniques (ou vibroniques) impliquent une différence entre les énergies vibrationnelles du point zéro (ZPE) des états électroniques fondamental et excité. Les modes de vibrations de hautes fréquences (les élongations des liaisons C-H et N-H notamment) contribuant notablement à cette ZPE, la fréquence des transitions électroniques va donc dépendre en partie de la variation des modes de vibration des liaisons N-H entre état fondamental et excité, situation que l'on peut rencontrer lorsque ces vibrateurs sont impliqués dans des interactions de type π avec le cycle aromatique. L'excitation électronique modifie alors la force de l'interaction intramoléculaire, donc la fréquence du mode d'élongation de la liaison N-H et donc enfin la différence de ZPE. Cette différence sera ainsi dépendante de la nature de l'isotopomère (NH vs ND) : un bien moindre effet sera attendu si le groupement deutéré n'est pas impliqué dans une interaction susceptible d'être modifiée par l'excitation du chromophore électronique (cas du conformère **C**).

Par conséquent, malgré la présence d'un mélange d'isotopologues dans l'expansion supersonique, la sélectivité en masse et en conformation apportée par la spectroscopie d'IR2P permet de séparer les contributions de ceux-ci et d'étudier l'influence de la deutération en une

position précise. Cet effet sera notamment utilisé au chapitre suivant pour mesurer l'influence de la deutération sur la durée de vie du premier état excité ππ*.

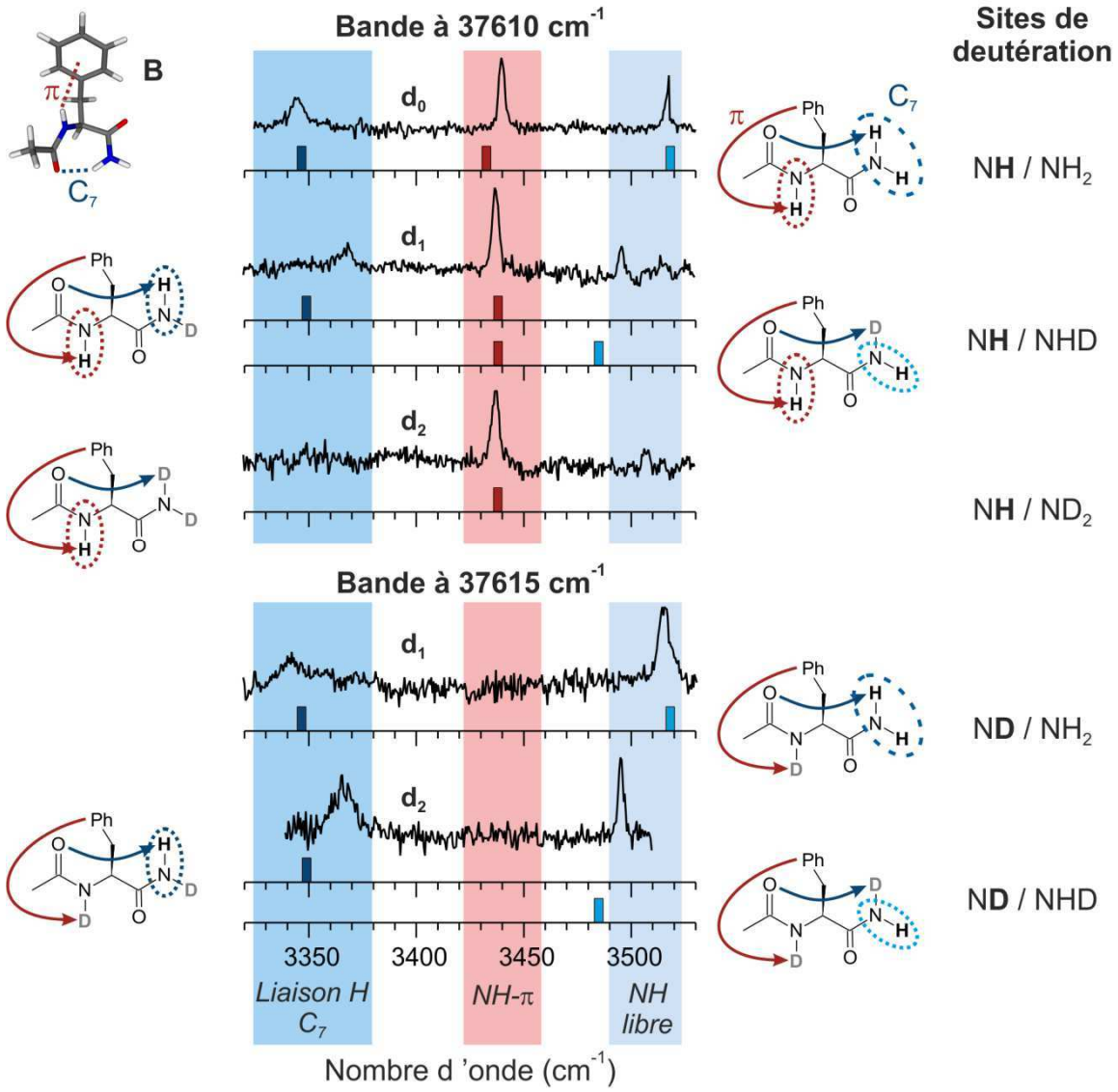


Fig. 4.4 – *Spectres de double résonance IR-UV des isotopologues d_0, d_1 et d_2 du conformère **B** de Ac-Phe-NH_2 enregistrés en fixant le laser d'ionisation à 37610 et 37615 cm^{-1}. Les fréquences de vibration harmoniques calculées avec la méthode RI-B97-D / TZVPP, corrigées de facteurs d'échelle selon la méthode décrite au chapitre 2, figurent au-dessous de chaque spectre et les molécules y contribuant sont représentées de part et d'autre de celui-ci.*

4.2 Modélisation des interactions protéine-solvant

A l'état naturel, les protéines sont entourées de nombreuses molécules d'eau, les interactions avec ce solvant jouent un rôle très important sur leurs propriétés biologiques. En établissant des liaisons hydrogène avec des groupements donneurs et accepteur de la chaîne

peptidique, l'eau permet par exemple de diminuer le nombre de liaisons hydrogène intramoléculaires, un facteur de rigidification de la structure. Cette flexibilité apportée par l'eau est essentielle dans un grand nombre de mécanismes biologiques où un équilibre entre plusieurs conformations de la protéine doit être possible. L'activité catalytique d'enzymes est ainsi beaucoup plus faible, voire complètement nulle, dans des solvants organiques mais est retrouvée dès lors qu'une faible quantité d'eau est ajoutée au milieu [5, 6]. Des études de dynamique moléculaire ont également permis de mettre en évidence le rôle de molécules d'eau lors du repliement de la protéine Src-SH3 [7, 8], de l'eau piégée au sein du cœur hydrophobe permet à ce dernier d'explorer différentes conformations jusqu'à atteindre sa forme fonctionnelle. A l'opposé, des molécules d'eau peuvent parfois être figées sur des sites de solvatation précis et être considérées comme partie intégrante de la structure secondaire, cela semble par exemple être le cas pour l'internaline B où des éléments éloignés de la chaîne peptidique sont reliés par des ponts de liaisons hydrogène formés par des molécules d'eau [9]. Ces exemples montrent que si l'on souhaite prédire le repliement de protéines dans un milieu aqueux, il n'est pas suffisant de seulement modéliser les interactions protéines-solvant par un potentiel global. Une approche plus réaliste peut consister à diviser les molécules d'eau en deux groupes, (i) un groupe comprenant les molécules liées à la protéine par des liaisons hydrogène dans des sites de solvatation spécifiques et (ii) un groupe de molécules d'eau non liées possédant des propriétés proches de l'eau liquide. Mais il est pour cela nécessaire de posséder une bonne compréhension des mécanismes de solvatation. Dans ce sens, la résolution en conformation des techniques spectroscopiques en phase gazeuse apporte des informations précises sur les interactions protéine-solvant et les sites de solvatation et fournit ainsi des données de référence directement comparables aux méthodes de chimie quantique et aux champs de force polarisables utilisés pour modéliser des protéines entières et leur environnement. Les études en phase gazeuse permettent en effet de contrôler le nombre de molécules de solvant entourant un système [10] et ainsi d'observer le rôle successif de chacune d'elles.

Un certain nombre d'études spectroscopiques de la microsolvatation en phase gazeuse sont présentes dans la littérature. Il a par exemple été montré que la microsolvatation de systèmes flexibles, tels que la tryptamine ou l'acide indole-3-propanoïque, pouvait induire une isomérisation conformationnelle conduisant à la formation de conformations non observées lorsque les systèmes étaient isolés [11, 12]. Un transfert d'une molécule d'eau, contrôlé par laser, entre deux sites de solvatation distincts a pu être observé sur le formanilide, un modèle rigide de liaison peptidique [13]. Le nombre d'études concernant des peptides microsolvatés en phase

gazeuse est en revanche plus réduit, ce qui est dû à la plus grande difficulté de vaporiser ces systèmes puis de les complexer avec des molécules d'eau. Les acides aminés naturels glycine et phénylalanine, solvatés par une molécule d'eau, ont respectivement été étudiés par spectroscopie micro-onde [14] et spectroscopie de double résonance IR-UV [15, 16]. Dans ces deux systèmes, la molécule d'eau forme des liaisons hydrogène avec le groupement acide carboxylique terminal ; elle provoque peu de changements structuraux mais modifie les rapports de population entre conformations. La géométrie de l'acide aminé protégé Ac-Phe-OMe est également peu modifiée lorsqu'il est solvaté par une ou deux molécules d'eau [17]. On peut cependant reprocher à ces molécules de ne pas posséder de liaisons peptidiques, ou bien des liaisons peptidiques incomplètes, et en ce sens de ne pas être des systèmes pertinents pour modéliser un segment de protéine. Le groupement acide carboxylique n'est en effet pas représentatif des sites de solvatation disponibles dans une protéine.

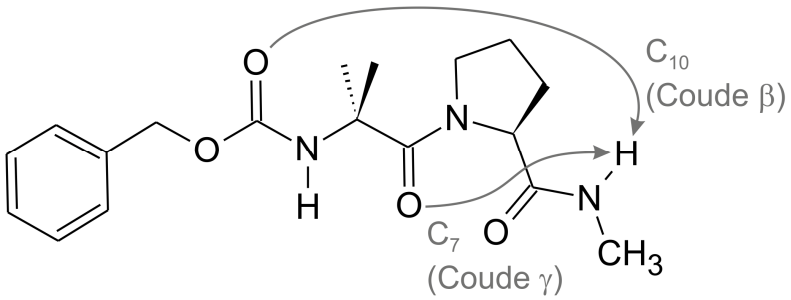


Fig. 4.5 – *Formule topologique du dipeptide protégé Z-Aib-Pro-NHMe.*

Les acides aminés protégés Ac-Gly-NHMe et Ac-Ala-NHMe sont les modèles les plus simples d'acides aminés possédant deux liaisons peptidiques complètes ; la spectroscopie de ces systèmes microsolvatés n'a pour le moment été effectuée qu'en matrice de gaz noble [18]. Malheureusement ces molécules ne possèdent pas de chromophore dans le domaine du proche UV permettant de les étudier au moyen de la spectroscopie de double résonance IR-UV. Plus récemment, Zhu *et al.* ont obtenu des résultats intéressants en phase gazeuse sur le dipeptide protégé Z-Aib-Pro-NHMe (Figure 4.5) [19]. Ce système qui, isolé en phase gazeuse, adopte une structure en coude γ, tend à former des structures en coude β après solvatation par deux molécules de méthanol. Or, la structure en coude β est celle qui est majoritairement observée en solution, lorsque la molécule est complètement solvatée [20].

Nous avons choisi de tirer parti des études approfondies précédemment réalisées sur les molécules Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe isolées (Partie 4.1.1) pour nous intéresser aux changements structuraux et à l'évolution des distributions conformationnelles de peptides

protégés induits par la microsolvatation par une molécule d'eau. La préparation des molécules hydratées est décrite dans la partie 2.2.1.

4.2.1 Spectroscopie électronique

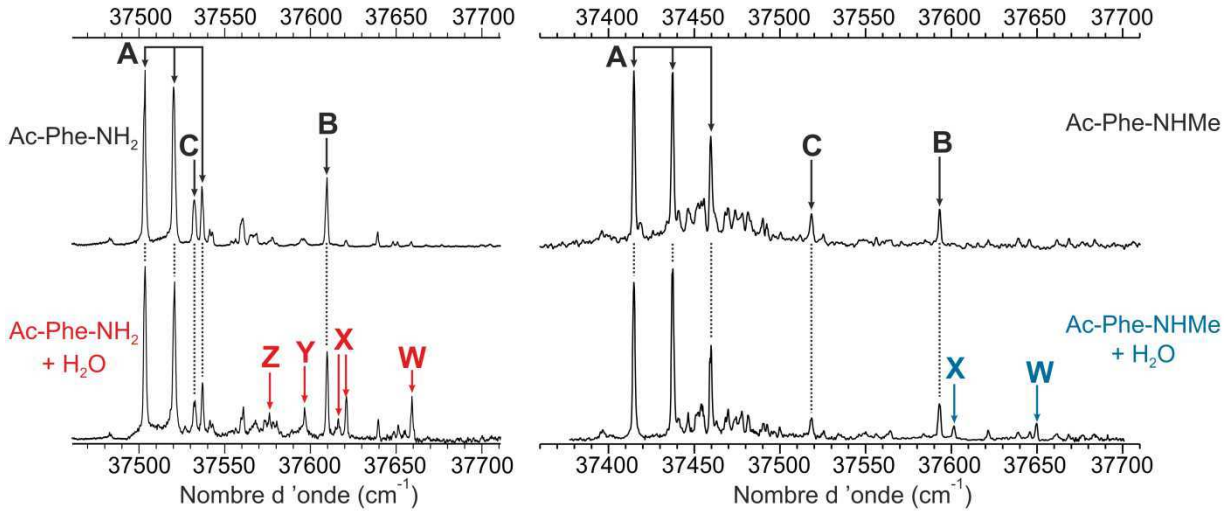


Fig. 4.6 – *Spectres d'IR2P-1C dans le domaine de la première transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du cycle aromatique de Ac-Phe-NH_2 (gauche) et de Ac-Phe-NHMe (droite), enregistrés à la masse de la molécule isolée, pour un échantillon sec (haut) ou hydraté (bas). Les conformères **A**, **B** et **C** sont les conformères des molécules non solvatées précédemment identifiés.*

Des complexes liés par des interactions non-covalentes peuvent se fragmenter durant le processus d'IR2P [15, 21, 22]. Ce processus est très important dans le cas du complexe (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) : la comparaison des intensités des signaux d'ions détectés à la masse de la molécule monohydratée et à la masse de la molécule isolée a permis d'estimer le taux de fragmentation à environ 80 %. Les spectres d'excitation UV des molécules hydratées ont par conséquent été enregistrés à la masse des molécules isolées, ce qui conduit donc à une superposition des contributions des molécules hydratées et des molécules isolées (Figure 4.6 bas). Cinq nouvelles bandes ont été détectées dans le domaine de la première transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du cycle aromatique pour Ac-Phe-NH_2 (37 576, 37 597, 37 616, 37 620 et 37 659 cm^{-1}) et deux dans le cas de Ac-Phe-NHMe (37 601 et 37 650 cm^{-1}). Ces bandes peuvent être attribuées à des phénylalanines complexées par des molécules d'eau. Cependant, les signaux d'ions étant enregistrés à la masse des peptides isolés, il n'est pas possible de déterminer la stœchiométrie de ces complexes d'après les spectres IR2P-1C. Le nombre de molécules d'eau dans ceux-ci peut toutefois être déterminé en comptant le nombre de bandes de vibration associés à des liaisons

O-H dans les spectres IR. Ces mesures ont permis de s'assurer que toutes les nouvelles transitions UV observées correspondent à des complexes monohydratés et non à la fragmentation de complexes avec plusieurs molécules d'eau.

Les déplacements des transitions UV des complexes (Ac-Phe-NHMe : H_2O) par rapport à la conformation isolée **B** de cette molécule (+ 8 et + 57 cm^{-1}) sont très proches de ceux observés dans le cas de Ac-Phe-NH_2 (+10 et + 49 cm^{-1}). Les monohydrates de Ac-Phe-NHMe ont donc probablement des structures proches de celles des conformères **W** et **X** de Ac-Phe-NH_2. Par ailleurs, on peut également remarquer que les rapports de populations entre les conformations isolées **A**, **B** et **C** des deux molécules sont conservés lorsque l'échantillon est hydraté. Il n'y a donc pas de solvatation préférentielle d'une des conformations lors de la formation des complexes, ni de phénomène d'isomérisation conformationnelle assistée par solvant comme cela a pu être observé dans le cas du 3-aminophénol [23].

4.2.2 Exploration des géométries des complexes monohydratés

L'exploration des structures possibles du monohydrate de l'acide aminé protégé Ac-Phe-NH_2 a été effectuée selon la procédure décrite dans la partie 2.3.1. Parmi les structures explorées par le champ de force, 125 ont été retenues, selon des critères structurels et énergétiques, pour une optimisation au niveau RI-B97-D / TZVPP. En éliminant les structures obtenues plusieurs fois, car ayant convergé vers des géométries identiques, 69 conformations différentes ont finalement été identifiées. Ces conformations peuvent être nommées en fonction de quatre paramètres structuraux : la géométrie de la chaîne principale, l'orientation de la chaîne latérale (*g*+, *g*- ou *a*), le site de solvatation occupé par la molécule d'eau et l'orientation de la molécule d'eau par rapport à la chaîne principale.

Les géométries étendues (*E*) et repliées (R^L) représentées sur la Figure 4.7 correspondent respectivement aux géométries β_L et γ_L observées expérimentalement pour la molécule isolée (Figure 4.3). La géométrie R^D correspond au second type de repliement des coudes γ (γ_D). La géométrie I^L est une géométrie intermédiaire entre les structures *E* et *R*, où la liaison hydrogène C_7 s'est ouverte pour accepter une molécule d'eau. De manière analogue aux deux types de repliement des coudes γ, une forme énantiomère I^D de la géométrie I^L pourrait être envisagée mais n'a pas été trouvée par les calculs. Enfin, un dernier type de géométrie regroupe les structures partiellement repliées *P*.

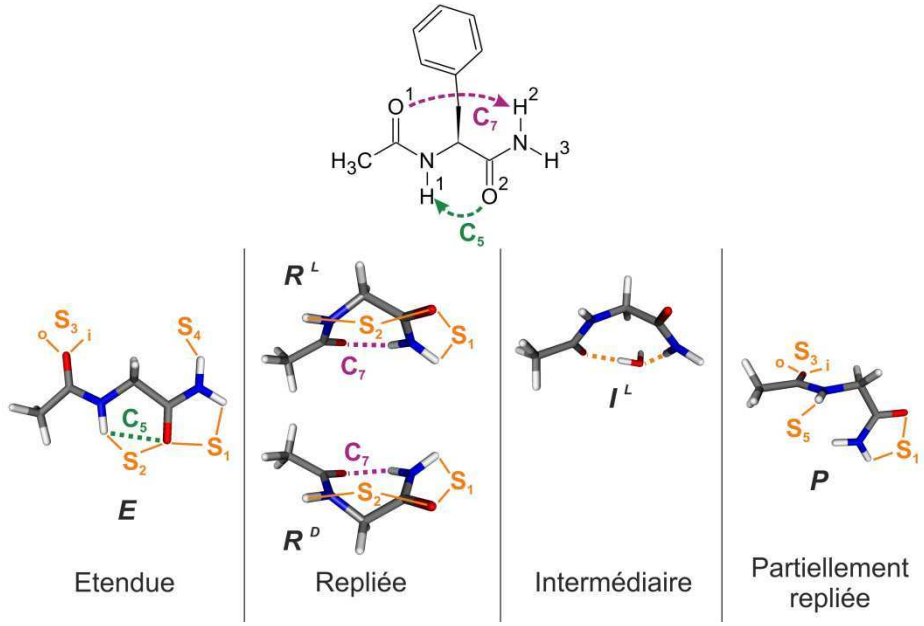


Fig. 4.7 – *Classes de géométries de chaîne principale (E, R, I et P) et sites de solvatation (S_1 à S_5) obtenus par la méthode RI-B97-D / TZVPP.*

Les sites de solvatation sont identifiés par un chiffre (S_1 à S_5) selon les atomes impliqués dans les liaisons hydrogène intermoléculaires formées avec la molécule d'eau. Le site S_1 correspond à la solvatation de la seconde liaison peptidique, l'eau se lie aux atomes d'oxygène O^2 et d'hydrogène H^3. La liaison peptidique étant rigide, ce site est toujours présent pour Ac-Phe-NH_2, quelle que soit la conformation. En revanche, ce site de solvatation disparaît pour les conformations repliées (R^L et R^D) de Ac-Phe-NHMe. Les molécules d'eau situées dans les sites S_2 sont également liées au peptide par deux interactions intermoléculaires, avec les atomes H^1 et O^2. Dans les sites restants (S_3 à S_5) l'eau ne forme qu'une seule liaison hydrogène avec le peptide protégé.

La connaissance du site de solvatation ne suffit cependant pas pour décrire totalement la géométrie du complexe. Les différentes orientations possibles de la molécule d'eau au sein d'un site peuvent former des minima locaux distincts, séparés par des barrières d'énergie potentielle (Tableau 4.3). Ces minima seront identifiés par les lettres suivantes :

- *u* (« up ») si liaison O-H libre de la molécule d'eau est dirigée vers le cycle aromatique et *d* (« down ») sinon.
- *o* (« out ») et *i* (« in ») en fonction du doublet non liant de l'atome d'oxygène O^1 impliqué dans la liaison hydrogène avec l'eau.
- *v* (« vertical ») lorsque la molécule d'eau est située en dehors du plan de la liaison peptidique.

	Géométries		ΔG (kJ · mol^{-1})		Nombres d'onde (cm^{-1})				
			0 K	300 K	NH	NH_2 ^{sym}	NH_2 ^{anti}	OH_2 ^{sym}	OH_2 ^{anti}
1.	*E(a) S_1(u)*		5	4	3445	**3347**	3515	3451	3721
2.	*E(a) S_1(d)*		4	4	3446	**3344**	3513	3449	3720
3.	*E(a) S_2(u)*		7	6	**3307**	3416	3532	3467	3722
4.	*E(a) S_2(d)*		6	1	**3305**	3414	3531	3449	3719
5.	*E(a) S_3(i,d)*		3	4	3420	3414	3531	3417	3727
6.	*E(a) S_3(o,u)*		11	7	3432	3419	3535	3458	3722
7.	*E(a) S_3(o,d)*		11	9	3430	3418	3534	3459	3722
8.	*E(a) S_3(v)*	**Z**	11	4	3430	3419	3535	3514	3724
9.	*E(a) S_4(u)*		4	2	3441	**3305**	3508	3621	3726
10.	*E(g+) S_1(d)*		9	7	3449	**3345**	3532	3454	3719
11.	*E(g+) S_2(u)*		3	6	**3267**	3433	3550	3520	3676
12.	*E(g+) S_2(d)*		13	11	**3312**	3435	3553	3495	3717
13.	*E(g+) S_3(i,d)*		10	7	3429	3434	3551	3423	3725
14.	*E(g+) S_3(o,u)*		17	13	3430	3436	3553	3459	3722
15.	*E(g+) S_3(v)*		14	11	3430	3439	3556	3482	3727
16.	*E(g+) S_4(u)*		17	14	3443	**3383**	3528	3653	3744
17.	*E(g-) S_1(d)*		15	12	3468	**3341**	3530	3446	3720
18.	*E(g-) S_3(v)*		15	16	3454	3430	3549	3525	3692
19.	*R^D(g-) S_1(u)*		9	10	3486	3314	**3455**	3416	3719
20.	*R^D(g-) S_2(u)*		9	11	**3454**	3329	3506	3472	3729
21.	*R^L(a) S_1(u)*		9	7	3467	3346	**3488**	3433	3718
22.	*R^L(a) S_1(d)*		9	7	3468	3350	**3493**	3433	3720
23.	*R^L(a) S_2(u)*		3	5	**3351**	3399	3520	3444	3725
24.	*R^L(a) S_2(d)*		3	5	**3343**	3403	3522	3425	3725
25.	*R^L(g+) S_1(u)*	**Y**	8	9	3442	3331	**3465**	3434	3719
26.	*R^L(g+) S_1(d)*	**Y**	7	9	3442	3331	**3464**	3431	3718
27.	*R^L(g+) S_2(u)*		3	8	**3283**	3384	3516	3574	3680
28.	*R^L(g-) S_1(u)*		7	6	3466	3331	**3464**	3428	3718
29.	*R^L(g-) S_1(d)*		8	7	3464	3332	**3465**	3428	3721
30.	*R^L(g-) S_2(u)*	**X**	2	3	**3418**	3381	3512	3446	3727
31.	*R^L(g-) S_2(d)*	**W**	3	4	**3376**	3389	3516	3441	3725
32.	*I(a) (u)*		0	1	3456	**3280**	3503	3385	3723
33.	*I(a) (d)*		1	2	3458	**3278**	3503	3367	3726
34.	*I(g+) (d)*		8	10	3448	**3290**	3494	3365	3726
35.	*I(g-) (u)*		1	1	3466	**3289**	3501	3357	3726
36.	*I(g-) (d)*		1	0	3469	**3271**	3501	3343	3726
37.	*P(g+) S_1(u)*		10	8	3437	**3352**	3527	3433	3721
38.	*P(g+) S_1(d)*		8	7	3439	**3351**	3529	3425	3719
39.	*P(g+) S_5(u)*		5	8	**3287**	3412	3529	3614	3692

Tab. 4.3 – *Energies libres et nombres d'onde théoriques des modes de vibration, corrigés par des facteurs d'échelle affines, pour des géométries de (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) présentant au moins une liaison hydrogène intermoléculaire forte. Les groupements N-H jouant un rôle donneur dans ces liaisons hydrogène intermoléculaires sont indiqués en gras.*

4.2.3 Spectroscopie vibrationnelle dans le proche IR

La spectroscopie vibrationnelle dans le domaine du proche IR compris entre 3200 et 3760 cm^{-1} permet de sonder les vibrations d'élongation des liaisons N-H et O-H et ainsi de déterminer les structure de chaque hydrate détecté par IR2P-1C. Quatre spectres de double résonance IR-UV différents ont été obtenus pour les complexes (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) (Figure 4.8.a, b, e, f), les transitions UV à 37 616 et 37 620 appartiennent donc à la même conformation, **X**.

Cinq bandes IR ont bien été observées pour les hydrates **W**, **Y** et **Z** de Ac-Phe-NH_2, ce qui est cohérent avec la solvatation du peptide protégé par une seule molécule d'eau (trois des bandes sont dues à des liaisons N-H et deux à des liaisons O-H). Même si le spectre IR du conformère **X** présente six bandes dans le proche IR, celui-ci peut tout de même être attribué à un peptide protégé monohydraté. En effet, si le peptide protégé était solvaté par deux molécules d'eau, sept bandes de vibration auraient dû être observées sur le spectre IR, dont deux dans le domaine 3715 - 3730 cm^{-1} (si aucune molécule d'eau n'est doublement donneuse de liaison hydrogène). La présence d'une seule bande fine dans ce domaine rend cette hypothèse peu probable. La bande à 3565 cm^{-1} (indiquée par un + sur la Figure 4.8.b), située en dehors des domaines de fréquences des vibrations d'élongation des liaisons N-H (Figure 4.8.g) et d'intensité trop faible pour être due à la vibration d'une liaison O-H, a donc été attribuée à une bande de combinaison. Cette attribution est confirmée par la comparaison des fréquences expérimentales des conformères **X** de (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) et (Ac-Phe-NHMe : H_2O).

Les deux vibrations d'élongation des liaisons N-H du groupement protecteur NH_2 étant fortement couplées, la position de la bande du mode d'élongation antisymétrique dans le domaine 3500 - 3550 cm^{-1} permet de fournir une estimation de la position de la bande du mode d'élongation symétrique [24]. Les élongations NH_2 antisymétriques des conformères **W** et **X** de (Ac-Phe-NH_2 : H_2O), respectivement à 3515 et 3510 cm^{-1} (Figure 4.8.a et b), sont ainsi associés à des élongations symétriques dont les nombres d'onde sont inférieurs à 3400 cm^{-1}. Cela permet donc d'attribuer la bande à 3360 cm^{-1} de **X** et une des deux bandes du doublet (3380, 3388 cm^{-1}) de **W** au mode d'élongation NH_2 symétrique. En revanche, le couplage entre les deux vibrations d'élongation O-H de la molécule d'eau étant beaucoup plus faible, un raisonnement analogue ne peut pas être effectué pour déterminer la position de celles-ci : la fréquence du mode d'élongation OH_2 antisymétrique correspond quasiment à celle d'une liaison O-H libre et dépend peu très peu du type d'interaction intermoléculaire (Tableau 4.3).

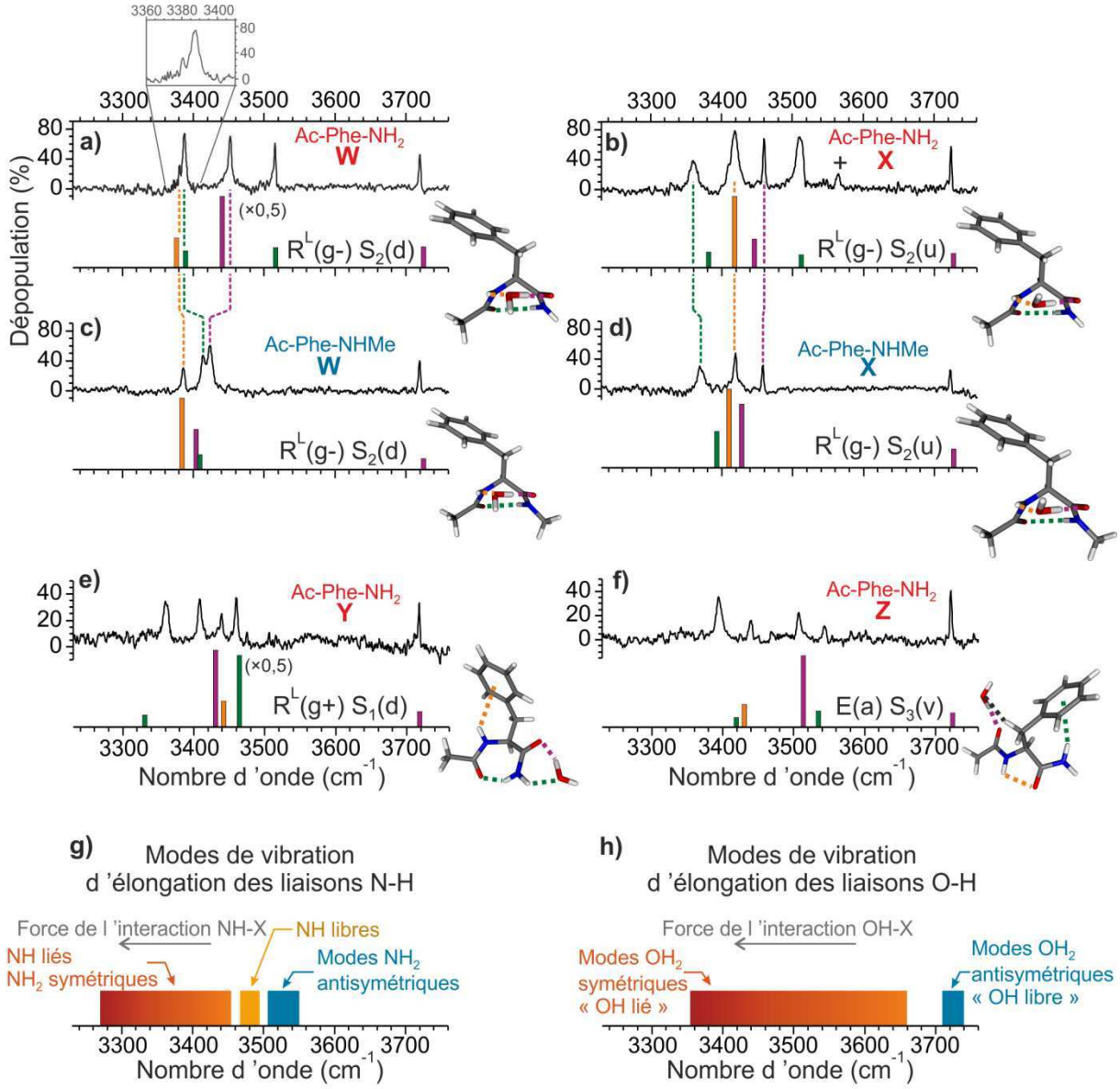


Fig. 4.8 – *Spectres de double résonance IR-UV des conformères **W**, **X**, **Y**, **Z** des hydrates de Ac-Phe-NH_2 (a, b, e, f) et des conformères **W**, **X** de Ac-Phe-NHMe (c, d). La bande + est une bande de combinaison. Sous chaque spectre expérimental sont représentées les fréquences théoriques et les intensités relatives des modes de vibration d'élongation des groupements OH (violet), NH (orange) et NH_2 (vert) obtenues par la méthode RI-B97-D / TZVPP et corrigées par des facteurs d'échelle. Les nombres d'onde caractéristiques des modes de vibration d'élongation des groupements N-H et O-H sont indiqués dans les figures g) et h), pour des groupements NH_2 et OH_2 simplement donneur de liaisons hydrogène.*

Le conformère **Y** ne possède pas de bandes dans le domaine 3500 - 3550 cm^{-1} (Figure 4.8.e), ce qui est possible uniquement si le groupement NH_2 est doublement donneur de liaisons hydrogène. La seule géométrie où ce groupement peut être impliqué dans deux liaisons hydrogène fortes est la géométrie repliée avec solvatation du site S_1. Les bandes d'élongations NH_2 symétrique et antisymétrique sont donc respectivement situées à 3360 et 3460 cm^{-1}. Parmi les deux bandes restant à identifier sur le spectre IR, aucune n'est dans le domaine de fréquences

des élongations des liaisons N-H libres, le groupement NH est donc impliqué dans une interaction NH-π faible avec le cycle aromatique.

Dans le cas du conformère **Z**, deux bandes IR sont situées dans le domaine 3500 - 3550 cm^{-1} et peuvent être attribuées au mode d'élongation NH_2 antisymétrique. Cependant, un mode NH_2 antisymétrique à 3507 cm^{-1} devrait être associé à un mode NH_2 symétrique de nombre d'onde inférieur à 3350 cm^{-1} [24]. Comme la bande IR la plus basse est observée à 3394 cm^{-1} sur ce spectre, les modes de vibration NH_2 symétrique et antisymétrique peuvent être respectivement attribués aux bandes à 3440 et 3543 cm^{-1}. La bande à 3507 cm^{-1} est donc due à la vibration d'élongation de la liaison O-H liée et celle à 3394 cm^{-1} au groupement NH.

4.2.4 Attribution des structures

Une attribution plus précise des structures des hydrates de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe peut être réalisée en comparant les fréquences de vibration expérimentales aux fréquences calculées contenues dans le Tableau 4.3. Une structure sera considérée convenable si toutes ses fréquences calculées sont comprises dans un intervalle de ± 20 cm^{-1} par rapport aux fréquences expérimentales. En revanche, les intensités relatives calculées des bandes IR ne sont pas assez fiables pour permettre de guider l'attribution. Les fréquences théoriques des structures attribuées à chaque hydrate sont résumées dans le Tableau 4.4 et représentées dans la Figure 4.8 en-dessous de chaque spectre expérimental.

Parmi toutes les géométries calculées, une seule a toutes ses fréquences de vibration dans un intervalle de ± 20 cm^{-1} autour des fréquences expérimentales du conformère **W** de (Ac-Phe-NH_2 : H_2O). Il s'agit de la géométrie $R^L(g-)\,S_2(d)$ (géométrie n° 31 dans le Tableau 4.3), qui présente un écart maximum de 11 cm^{-1} pour la vibration d'élongation de la liaison O-H liée. Toutes les autres structures ont au moins une fréquence présentant un écart supérieur à 30 cm^{-1}. L'attribution de ce conformère est donc relativement directe et est de plus confirmée par le fait que la géométrie $R^L(g-)\,S_2(d)$ possède également un bon accord avec le conformère **W** de (Ac-Phe-NHMe : H_2O) (Tableau 4.4).

Dans le cas du conformère **X** de (Ac-Phe-NH_2 : H_2O), deux géométries sont en bon accord avec l'expérience : la géométrie $R^L(a)\,S_2(u)$ (n° 23) et la géométrie $R^L(g-)\,S_2(u)$ (n° 30). Ce sont deux rotamères qui diffèrent principalement par l'orientation du cycle aromatique de leur chaîne latérale. Néanmoins, l'ordre relatif des fréquences des modes de vibration d'élongation NH et

NH_2 symétrique n'est pas le même pour les deux géométries. La bande IR expérimentale à 3360 cm^{-1} est bien attribuée au mode d'élongation NH_2 symétrique pour $R^L(g-)\,S_2(u)$ mais au mode d'élongation NH pour $R^L(a)\,S_2(u)$, ce qui est en contradiction avec les conclusions de la partie précédente. La structure $R^L(g-)\,S_2(u)$ peut donc être attribuée au conformère **X**. L'écart maximum de fréquences est alors obtenu pour le mode d'élongation NH_2 symétrique, avec une différence de 21 cm^{-1}. Encore une fois, cette attribution est confirmée par la comparaison des fréquences de la géométrie $R^L(g-)\,S_2(u)$ avec celles du conformère **X** de (Ac-Phe-NHMe : H_2O).

Conformères	**Fréquences de vibration (cm^{-1})**					**ΔG ($kJ \cdot mol^{-1}$)**		**Distances (pm)**	
(abondance)	NH	NH_2^{sym}	NH_2^{anti}	OH lié	OH libre	0 K	300 K	O^1- H^2	H^1- O^2
				Ac-Phe-NH_2 : H_2O (1:1)					
W (34%)	**3380**	**3388**	**3515**	**3452**	**3720**				
$R^L(g-)\,S_2(d)$	*3376*	*3389*	*3516*	*3441*	*3725*	*3*	*4*	*232*	*319*
X (48%)	**3418**	**3360**	**3510**	**3459**	**3723**				
$R^L(g-)\,S_2(u)$	*3418*	*3381*	*3512*	*3446*	*3727*	*2*	*3*	*226*	*325*
Y (10%)	**3439**	**3360**	**3460**	**3408**	**3718**				
$R^L(g+)\,S_1(d)$	*3442*	*3331*	*3464*	*3431*	*3718*	*7*	*9*	*204*	*385*
$R^L(g+)\,S_1(u)$	*3442*	*3331*	*3465*	*3434*	*3719*	*8*	*9*	*204*	*385*
Z (8%)	**3394**	**3440**	**3543**	**3507**	**3722**				
$E(a)\,S_3(v)$	*3430*	*3419*	*3535*	*3514*	*3724*	*11*	*4*	*501*	*226*
				Ac-Phe-NH_2					
A (79%)	**3434**	**3426**	**3543**	**-**	**-**				
E(a)	*3438*	*3418*	*3534*	*-*	*-*	*0*	*0*	*499*	*228*
B (11%)	**3438**	**3342**	**3516**	**-**	**-**				
$R^L(g+)$	*3438*	*3347*	*3518*	*-*	*-*	*2*	*5*	*202*	*388*
C (10%)	**3466**	**3348**	**3517**	**-**	**-**				
$R^L(g-)$	*3466*	*3343*	*3514*	*-*	*-*	*3*	*3*	*203*	*374*
				Ac-Phe-NHMe : H_2O (1:1)					
W	**3385**	**3423**	**-**	**3413**	**3719**				
$R^L(g-)\,S_2(d)$	*3384*	*3409*	*-*	*3404*	*3725*	*0*	*2*	*234*	*317*
X	**3419**	**3370**	**-**	**3458**	**3722**				
$R^L(g-)\,S_2(u)$	*3410*	*3393*	*-*	*3428*	*3727*	*0*	*0*	*228*	*323*
				Ac-Phe-NHMe					
A	**3438**	**3465**	**-**	**-**	**-**				
E(a)	*3440*	*3451*	*-*	*-*	*-*	*0*	*0*	*488*	*230*
B	**3438**	**3350**	**-**	**-**	**-**				
$R^L(g+)$	*3436*	*3330*	*-*	*-*	*-*	*4*	*10*	*201*	*386*
C	**3467**	**3362**	**-**	**-**	**-**				
$R^L(g-)$	*3465*	*3330*	*-*	*-*	*-*	*4*	*4*	*203*	*372*

Tab. 4.4 – *Comparaison des données expérimentales (en gras) et théoriques (en italique) obtenues pour les conformères de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe, hydratés et isolés.*

D'après la position de la bande IR associée au mode de vibration d'élongation antisymétrique du groupement NH_2, nous avions pu conclure dans la partie précédente que la géométrie du conformère **Y** était une géométrie repliée avec solvatation du site S_1. La chaîne principale pouvant se replier de deux manières différentes (R^L ou R^D), la chaîne latérale ayant trois orientations possibles (*g+*, *g-* ou *a*) et la molécule d'eau possédant deux orientations distinctes dans le site S_1 (*u* ou *d*), douze conformations correspondent à cette description. Cependant, si le groupement NH est de plus impliqué dans une interaction NH-π, seules les orientations *g+* pour le repliement R^L et *g-* pour le repliement R^D sont acceptables, ce qui ramène le nombre de conformations à quatre : $R^L(g+)\,S_1(u)$, $R^L(g+)\,S_1(d)$, $R^D(g-)\,S_1(u)$ et $R^D(g-)\,S_1(d)$. Les structures $R^D(g-)$ peuvent être éliminés par comparaison avec les fréquences expérimentales : les fréquences calculées des modes de vibration d'élongation des groupements NH et NH_2 symétriques différent respectivement de 44 et 46 cm^{-1} par rapport à celles-ci. Les structures $R^L(g+)\,S_1(u)$ et $R^L(g+)\,S_1(d)$ (n° 25 et 26) possédant des fréquences de vibration identiques, à 3 cm^{-1} près, les deux peuvent finalement être attribuées au conformère **Y**. Sa géométrie sera donc seulement appelée $R^L(g+)\,S_1$ dans la suite. L'accord pour ce conformère est légèrement moins bon que pour les précédents, avec deux fréquences de vibration en dehors de l'intervalle de ± 20 cm^{-1} : 23 et 29 cm^{-1} d'écart respectivement pour les modes d'élongation OH lié et NH_2 symétrique de la géométrie $R^L(g+)\,S_1(d)$.

La géométrie présentant le meilleur accord avec les fréquences expérimentales du conformère **Z** est la géométrie $E(a)\,S_3(v)$ (n° 8), malgré un écart de 36 cm^{-1} pour le mode d'élongation du groupement NH. Cet écart important peut avoir deux origines : (i) la fonctionnelle B97-D peut ne pas parvenir à décrire suffisamment correctement la compétition entre les différentes interactions non-covalentes dans cette structure et ainsi conduire à une géométrie légèrement incorrecte ou (ii) le calcul de fréquences harmoniques ne permet pas de bien prendre en compte le couplage entre les modes d'élongation NH et NH_2 symétrique. En effet, la différence de fréquence entre ces deux modes, égale à 26 cm^{-1} pour des fréquences harmoniques non corrigées, diminue à 11 cm^{-1} après correction pour tenir compte des effets d'anharmonicité. Il est donc possible le couplage entre ces deux modes, calculé pour des fréquences harmoniques, soit sous-estimé. Cela permettrait aussi d'expliquer pourquoi le mode NH_2 symétrique est prédit à des nombres d'onde trop faibles.

4.2.5 Modifications structurelles induite par la solvatation

Les structures attribuées aux hydrates **W**, **X**, **Y** et **Z** de Ac-Phe-NH_2 sont proches de celles déterminées pour les conformations isolées **A**, **B** et **C**. Les modifications structurelles induites par l'ajout d'une molécule d'eau dans un site de solvatation précis peuvent donc être révélées par la comparaison des structures calculées des couples (molécule isolée / molécule solvatée) suivants : (**C** / **W**, **X**), (**B** / **Y**) et (**A** / **Z**).

La conformation **C** de Ac-Phe-NH_2 est caractérisée par une géométrie repliée $R^L(g-)$, ou $\gamma_L(g-)$, avec une seule interaction intramoléculaire forte : une liaison hydrogène C_7. L'ajout d'une molécule d'eau dans le site de solvatation S_2 crée deux nouvelles interactions fortes, les atomes $N\text{-}H^1$ et O^2 deviennent respectivement donneur et accepteur de liaisons hydrogène avec la molécule d'eau. Les modifications des géométries de **W** et **X**, par rapport à celle de **C**, reflètent une compétition entre liaisons hydrogène intra- et inter-moléculaires. Les liaisons hydrogène intermoléculaires tendent en effet à rapprocher les atomes H^1 et O^2, la distance entre ces deux atomes est donc plus courte d'environ 15% dans **W** et **X**. Cependant, ce rapprochement ne peut avoir lieu qu'en échange d'un affaiblissement de la liaison hydrogène intramoléculaire, la longueur de la liaison hydrogène C_7 (distance $O^1\text{-}H^2$) est ainsi plus élevée de 15% dans **W** et **X** (Tableau 4.4). Cette diminution de la force de la liaison hydrogène C_7 se traduit spectroscopiquement par une augmentation du nombre d'onde du mode de vibration NH_2 symétrique (respectivement + 40 et + 12 cm^{-1} pour **W** et **X**). Les modifications structurelles dues à la solvatation peuvent être représentées sur un diagramme de Ramachandran (Figure 4.9). Le conformère **C** possède un couple d'angles dièdres (Φ, Ψ) caractéristiques des coudes γ : (-85°, 72°). Les couples associés aux conformères **W** et **X**, respectivement (-85°, 90°) et (-84°, 89°), diffèrent donc principalement par la valeur de l'angle Ψ. Il est intéressant de remarquer que cette variation correspond à un déplacement en direction du domaine des hélices polyproline II, situé autour des angles (-80°, 145°). Ce domaine ne correspond pas à des configurations stables de la molécule *isolée* car, dépourvues de liaisons H, elles sont énergétiquement défavorisées. L'hélice polyproline II est néanmoins la conformation majoritairement observée pour des peptides protégés complètement solvatés, en solution aqueuse [25, 26]. La solvatation du conformère **C** via le site S_2, qui provoque l'affaiblissement de la liaison hydrogène C_7 peut donc être vu comme une première étape vers l'hydratation complète. Ces changements de géométrie bouleversent l'environnement autour du cycle aromatique et expliquent le fort déplacement des transitions UV des deux hydrates par rapport à celle de la molécule isolée : + 127 cm^{-1} pour **W** et + 84 cm^{-1} pour **X** par rapport à **C** ; à comparer aux

déplacements d'une dizaine de cm^{-1} observés lorsque l'eau se situe dans un site de solvatation rigide et ne perturbe pas la conformation [15, 16].

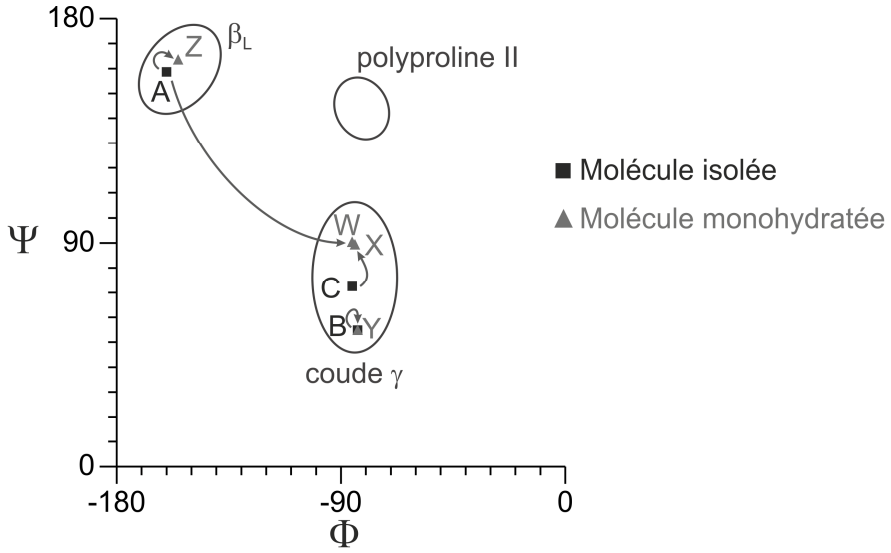


Fig. 4.9 – *Diagrammes de Ramachandran des conformations isolées (carrés noirs) et monohydratées (triangles verts) de Ac-Phe-NH_2. Les domaines caractéristiques des conformations étendues (β_L), des coudes γet de la polyproline II sont indiqués par des cercles rouges. Les modifications structurelles et les isomérisations induites par la solvatation sont représentées par des flèches bleues.*

A l'opposé des structures $R^L(g+)\,S_1(d)$ et $R^L(g+)\,S_1(u)$, attribuées aux conformères **Y**, et dont les fréquences de vibration calculées sont identiques à 3 cm^{-1} près, une variation de plus de 40 cm^{-1} est prédite entre les fréquences de vibration d'élongation du groupement NH des structures $R^L(g-)\,S_2(d)$ (**W**) et $R^L(g-)\,S_2(u)$ (**X**). La réaction d'isomérisation entre **W** et **X** n'est donc pas limitée à un simple basculement de la molécule d'eau mais fait également intervenir des déformations de la chaîne principale du peptide. La longueur de la liaison hydrogène C_7 est par exemple plus longue de 6 pm dans la structure $R^L(g-)\,S_2(d)$ par rapport à $R^L(g-)\,S_2(u)$. Le phénomène d'isomérisation par effet tunnel, généralement associé à ce mouvement de la molécule d'eau dans un site de solvatation [27], est donc très limité dans le cas de **W** et **X**. C'est pourquoi cette isomérisation n'est pas observée expérimentalement : elle n'a pas le temps de se produire dans l'intervalle de temps séparant les impulsions IR et UV. La déformation de la chaîne principale pourrait s'expliquer par la présence d'une interaction stabilisante dans **W** entre le groupement CH_2 situé sur la chaîne latérale et un des doublets non-liants de l'atome d'oxygène de la molécule d'eau. En effet, la distance CH ••• O^{eau} est légèrement plus courte dans **W** que dans **X** (respectivement 250 et 258 pm). La variation faible, entre **W** et **X**, des fréquences de vibration calculées du mode d'élongation NH_2 symétrique (8 cm^{-1} contre 28 cm^{-1}

expérimentalement) signifierait cependant que la méthode B97-D sous-estime l'influence de la solvatation sur la structure du peptide protégé.

L'accord entre le conformère **Y** et les structures calculées $R^L(g+)\,S_1(d)$ et $R^L(g+)\,S_1(u)$ étant légèrement moins bon que dans les cas de **W** et **X**, il est possible que ces géométries ne soient pas tout-à-fait correctement décrites par la méthode B97-D. A cette précaution près, le conformère **Y** possède une structure quasiment identique à celle du conformère **B**. Les variations calculées des distances O^1-H^2 et H^1-O^2 sont négligeables (~1%) et expérimentalement la transition $\pi\rightarrow\pi^*$ du conformère **Y** est très peu déplacée par rapport à celle de **B** (- 13 cm^{-1}). L'ajout d'une molécule d'eau dans le site S_1, très rigide, perturbe donc très peu la structure.

Le conformère **Z** est la seule forme étendue du complexe (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) observée expérimentalement. L'accord avec les fréquences calculées de la structure attribuée à ce conformère est cependant trop mauvais pour pouvoir comparer cette dernière au conformère **A** et analyser en détail les modifications induites par la solvatation

4.2.6 Abondances relatives et dynamique de solvatation dans la détente supersonique

On peut remarquer, d'après le Tableau 4.3, que le cas des complexes (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) est un nouvel exemple de cas où les rapports d'abondances entre conformères ne sont pas contrôlés par un équilibre thermodynamique. Aucune des conformations *I* (n°32 à 36), pourtant prédites les plus stables par la méthode B97-D, n'a été observée expérimentalement et, à l'inverse, le conformère **Y** a été observé alors qu'il possède une énergie plus élevée d'environ 10 kJ · mol^{-1}, bien supérieure à l'incertitude de la méthode utilisée (~4 kJ · mol^{-1}). Il n'est pas exclu que toutes les conformations présentes dans la détente supersonique ne soient pas détectées par la technique d'IR2P-1C. Cependant, la proportion de complexe 1 : 1 de (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) observée dans l'expérience est déjà importante, elle représente environ 30% du signal du peptide isolé, il est donc peu probable que beaucoup de conformations majoritaires ne soient pas détectées. Le modèle de refroidissement conformationnel détaillé dans le Chapitre 3 n'a pas encore été appliqué à cet exemple car il nécessiterait également de pouvoir décrire le mécanisme de formation des complexes avec l'eau et traiter des isomérisations entre un nombre de conformations très supérieur à deux. Néanmoins, les raisonnements utilisés dans le chapitre précédent peuvent permettre de proposer une explication aux abondances observées ici.

Le fait que seules des conformations proches des trois structures isolées du peptide protégé Ac-Phe-NH_2 (**A**, **B** et **C**) soient observés pour les hydrates **W**, **X**, **Y** et **Z** apporte des indices sur le mécanisme de solvatation. La géométrie *I* est une forme intermédiaire entre les conformations étendue (**A**) et repliée (**B** et **C**) ; elle ne peut donc apparaître que si la molécule d'eau complexe le peptide protégé à un moment où celui-ci possède une énergie interne suffisante pour réaliser des isomérisations entre ces deux géométries. Cependant, plus l'énergie interne du peptide protégé est importante et plus la probabilité que la molécule d'eau reste collée est faible. Comme la géométrie *I* n'est pas observée expérimentalement, on peut en déduire que le système initialement formé n'explore que partiellement l'ensemble des conformations accessibles des complexes : la molécule d'eau ne se fixe au peptide protégé que lorsque ce dernier s'est suffisamment refroidi et a adopté une des conformations **A**, **B** ou **C**. Par conséquent, les abondances finales doivent plutôt refléter les abondances de la molécule isolée, et non un équilibre entre les conformations des molécules solvatées.

L'orientation (*g+*) de la chaîne latérale dans la conformation **B** rend le site S_2 inaccessible pour une molécule d'eau. Le seul site disponible pour cette conformation est donc le site S_1, qui conduit directement aux structures $R^L(g+)\,S_1$ attribuées au conformère **Y**. Ce conformère a ainsi la possibilité de se former dans l'expansion supersonique malgré son énergie libre relativement importante. Les abondances des conformères **Y** et **B**, respectivement 10% et 11%, sont en bon accord (Tableau 4.4).

Dans le cas du conformère **C**, la chaîne latérale ne gêne pas la solvatation dans le site S_2, les deux sites de solvatation S_1 et S_2 sont donc possibles. Cependant, seules les structures $R^L(g-)\,S_2\,(d)$ et $R^L(g-)\,S_2\,(u)$, attribuées à **W** et **X**, ont été observées expérimentalement, et non les structures $R^L(g-)\,S_1\,(d)$ et $R^L(g-)\,S_1\,(u)$, plus hautes en énergie. L'énergie interne au moment où la molécule d'eau interagit avec le peptide protégé, dont une partie est apportée par les liaisons hydrogène intermoléculaires (~25 kJ · mol^{-1}), doit donc être suffisante pour que la molécule d'eau puisse explorer les deux sites S_1 et S_2 et ainsi privilégier le site S_2, le plus stable. On peut toutefois remarquer que la somme des abondances des conformères **W** et **X** (81%) est très supérieure à celle du conformère **C** (10%) alors que l'abondance de **Z** (8%) est inférieure à celle de **A** (79%). Il est donc possible que **W** et **X** ne soient pas formés uniquement par la solvatation du site S_2 de **C** mais également par une isomérisation de **A**.

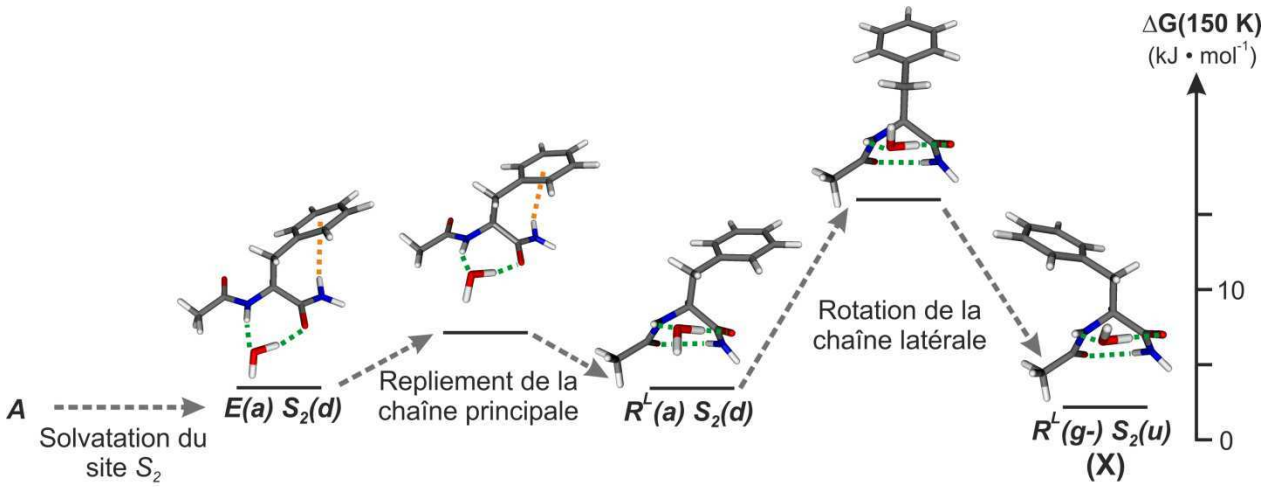
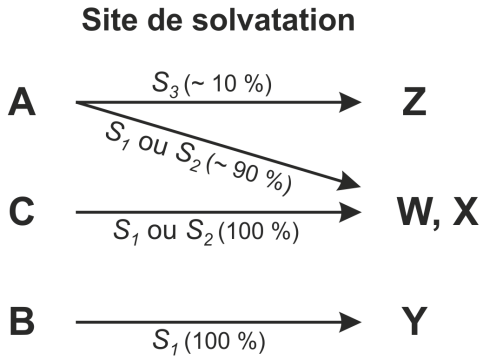


Fig. 4.10 – *Diagramme énergétique de la réaction d'isomérisation de la conformation **A** vers la conformation **X**. Une énergie d'environ 25 kJ · mol^{-1} est apporté par les liaisons hydrogène formées lors de la solvatation.*

En effet, des trois possibilités de solvatation de la conformation **A** (S_1, S_2 et S_3), seule l'occupation du site S_3, la moins stable énergétiquement, a été observée. Pour proposer une explication à ce phénomène la réaction d'isomérisation entre la structure de **A** solvatée dans le site S_2 et la structure $R^L(g\text{-})\,S_2\,(u)$ de **X** a été étudiée avec la méthode RI-B97-D/TZVPP (Figure 4.10). Cette isomérisation consiste dans un premier temps à un repliement de la chaîne principale du peptide protégé ($E(a)\,S_2 \rightarrow R^L(a)\,S_2$) puis à une rotation de la chaîne latérale ($R^L(a)\,S_2 \rightarrow R^L(g\text{-})\,S_2$) qui est l'étape limitante de cette réaction. La barrière énergétique de la seconde étape, estimée à 14 kJ · mol^{-1}, est néanmoins suffisamment basse pour pouvoir être franchie grâce à la redistribution de l'énergie de liaison de la molécule d'eau (~25 kJ · mol^{-1}). On peut toutefois noter que ce mécanisme ne permet pas d'expliquer pourquoi la géométrie $R^L(a)\,S_2(d)$ n'est pas observée expérimentalement, alors que selon celui-ci une partie de la population devrait rester piégée dans cette géométrie. Cependant, il est possible que cette géométrie particulière ne soit pas observée à cause d'effets dynamiques ; cette hypothèse sera discutée plus en détail dans le Chapitre 5. L'isomérisation entre le conformère **A** solvaté dans les sites S_1 et S_2 et les conformères **W** et **X** semble donc être la meilleure explication des abondances expérimentales observées. En revanche, la solvatation dans le site S_3, où une seule liaison hydrogène intermoléculaire est formée, ne doit pas apporter suffisamment d'énergie pour pouvoir déclencher une isomérisation vers les conformations repliées. Le complexe est alors piégé dans la conformation **Z**.

Le mécanisme de solvatation du peptide protégé Ac-Phe-NH_2 dans une détente supersonique, proposé d'après les structures déterminées par spectroscopie IR et les abondances observées sur les spectres UV, est résumé ci-dessous :



4.2.7 Spectroscopie vibrationnelle dans l'IR moyen et lointain

Jusqu'à présent, les structures des conformères des complexes (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) et (Ac-Phe-NHMe : H_2O) ont été discutées uniquement à partir des fréquences de vibrations d'élongation des liaisons N-H et O-H dans l'IR proche (3200 – 3750 cm^{-1}). Ces modes de vibrations, très sensibles aux liaisons hydrogène, ont permis de déterminer les sites de solvatation de la molécule d'eau et les modifications structurelles induites par la solvatation. Le domaine de l'IR moyen et de l'IR lointain (50 – 800 cm^{-1}) est un autre domaine d'étude intéressant car il correspond aux modes de vibrations intermoléculaires, c'est-à-dire aux mouvements de la molécule d'eau au sein du complexe. Comme ces mouvements entraînent d'importants changements de l'orientation du moment dipolaire de l'eau, ils sont actifs en IR et peuvent être assez intenses. Ces modes de vibration intermoléculaires ont déjà été étudiés par spectroscopie IR ou Raman, pour des complexes entre molécules d'eau ou avec des petites molécules modèles, en matrice [28, 29, 30] ou dans une détente supersonique [31, 32]. Cependant, contrairement à la méthode de double résonance IR-UV, ces études spectroscopiques ne sont pas sélectives en conformation et ne permettent donc pas de distinguer les contributions des différents conformères.

Très peu d'études de double résonance IR-UV sur des acides aminés ont été réalisées dans le domaine de l'IR lointain [33, 34] et les modes de vibrations intermoléculaires sont encore mal caractérisés. En effet, ces modes peuvent être fortement couplés avec des modes de basses fréquences de la chaîne principale du peptide protégé, ce qui rend leur étude délicate. Les informations expérimentales apportées par les modes de vibration intermoléculaires sont pourtant

très précieuses, elles peuvent servir de données de référence, complémentaires de celles obtenues dans le proche IR, dans l'objectif d'améliorer les outils théoriques décrivant les protéines et leur environnement. Nous avons donc utilisé le dispositif expérimental de double résonance IR-UV de l'équipe d'Anouk Rijs, alors situé au FOM, près d'Utrecht aux Pays-Bas [35], avec le laser à électrons libres FELIX comme source de lumière dans l'IR lointain, pour étudier les modes de vibration intermoléculaires des monohydrates de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe. Comme les complexes de ces molécules avec l'eau ont des structures très proches des molécules isolées (Partie 4.2.5), nous avons également enregistré les spectres de vibration de ces dernières pour faciliter la distinction entre les modes de vibration intra et intermoléculaires situés dans ce domaine.

4.2.7.a Spectroscopie des molécules isolées

Les spectres des conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2 dans l'IR lointain et moyen sont représentés dans la Figure 4.11, avec les spectres calculés par la méthode RI-B97-D. Les spectres calculés sont proches des spectres expérimentaux et permettent de proposer l'attribution suivante : (i) les bandes situées entre 150 et 215 cm^{-1} à un mouvement global de la chaîne principal du peptide protégé, (ii) les bandes situées vers 450 cm^{-1} à des mouvements couplés de pliage des groupements NH et NH_2 hors des plans des liaisons peptidiques et (iii) les bandes situées vers 550 et 700 cm^{-1} qui correspondent respectivement à des vibrations de déformation dans le plan (le mode 6a de la partie 4.1.1) et hors du plan (« mode papillon ») du cycle phényle (Annexe B.3.1). Il existe un bon accord entre les fréquences de vibration expérimentales et les fréquences RI-B97-D, calculées dans l'approximation harmonique et non corrigées, pour les modes de torsion de la chaîne principale et les déformations du cycle phényle. Les mouvements de pliage hors plan des groupements NH et NH_2 sont moins bien prédits, ce qui suggère une plus forte anharmonicité de ces modes. De plus, les couplages entre ces modes ne sont pas correctement reproduits.

La comparaison des spectres de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe (Figure 4.12) confirme l'attribution de ces modes de vibration. La méthylation du groupement NH_2 terminal n'influence quasiment pas les fréquences de vibration des modes de pliage du groupement NH de la première liaison peptidique ou des modes de déformations du phényle.

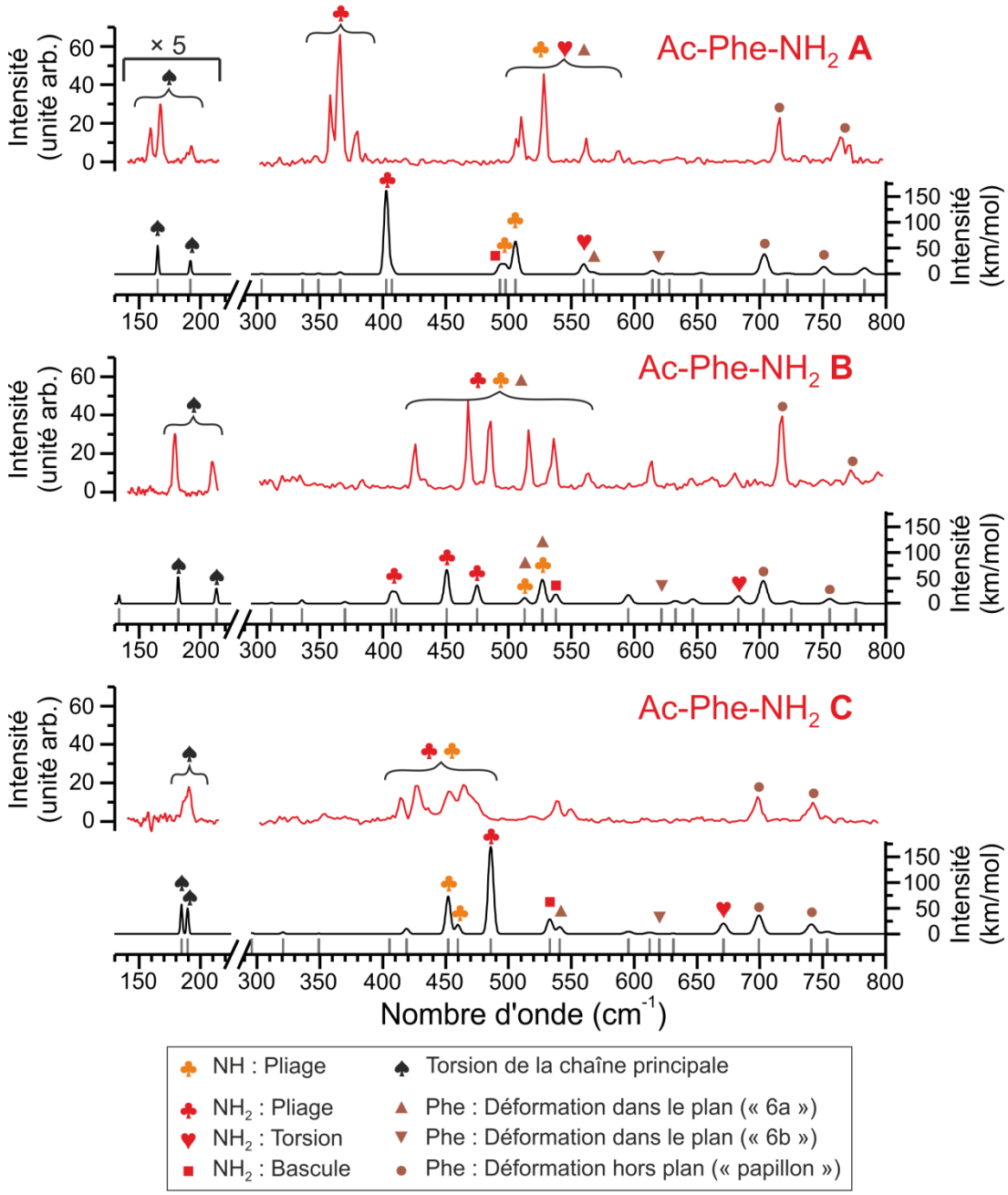


Fig. 4.11 – *Spectres de double résonance IR-UV (en rouge) des conformères* ***A***, ***B*** *et* ***C*** *de Ac-Phe-NH_2 comparés aux spectres harmoniques non corrigés (en noir) calculés avec la méthode RI-B97-D / TZVPP. L'intensité des spectres expérimentaux et théoriques a été multipliée par 5 dans la région 130 - 225 cm^{-1} pour les trois conformères. Les barres grises indiquent les fréquences calculées dans cette région spectrale. Les modes de vibration sont définis dans l'annexe B.3.1.*

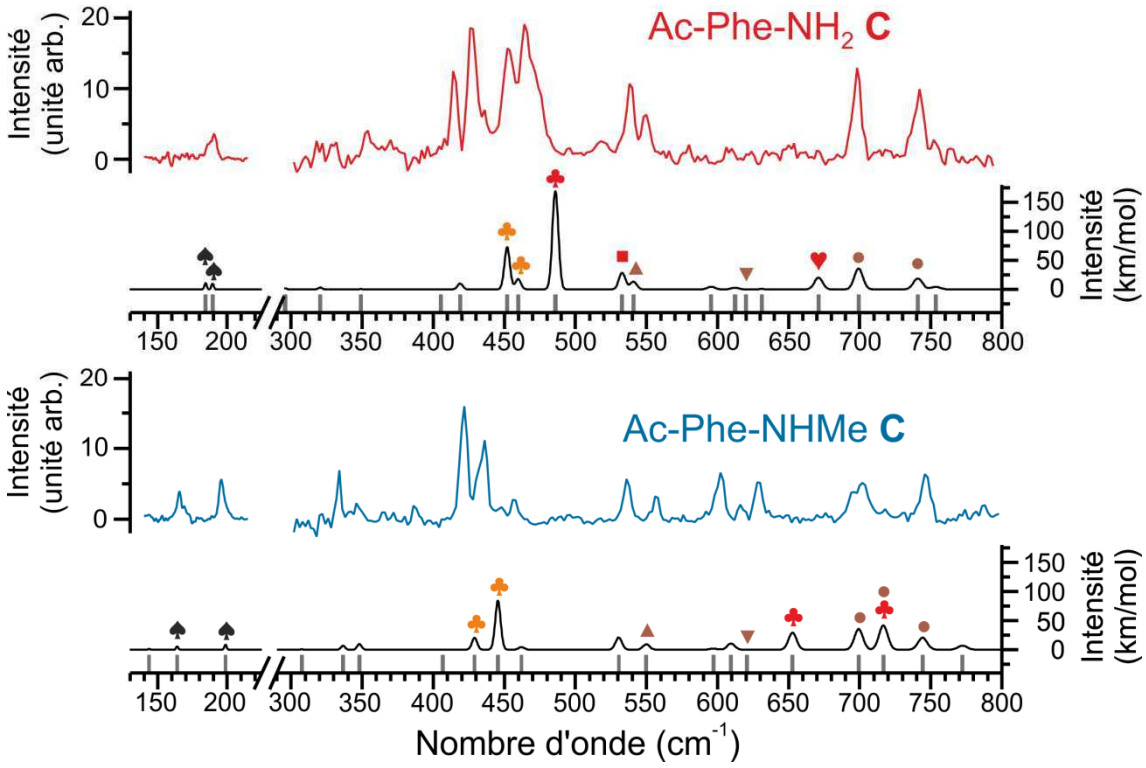


Fig. 4.12 – *Spectres de double résonance IR-UV des conformères* ***C*** *de Ac-Phe-NH_2 (en rouge) et de Ac-Phe-NHME (en bleu) comparés aux spectres harmoniques non corrigés (en noir) calculés avec la méthode RI-B97-D / TZVPP. Les modes de vibration sont définis dans la légende de la Figure 4.11.*

4.2.7.b Spectroscopie des molécules monosolvatées

Les spectres de vibration des conformères **W**, **X**, **Y** et **Z** de Ac-Phe-NH_2 et des conformères **W** et **X** de Ac-Phe-NHMe ont été enregistrés dans l'IR moyen et lointain. Les spectres des conformères **W** et **X** de Ac-Phe-NH_2 sont comparés au spectre du conformère isolé **C** dans la Figure 4.13. Les spectres des autres conformères de Ac-Phe-NH_2, qui présentaient un moins bon accord dans l'IR proche avec les structures calculées, et des deux conformères de Ac-Phe-NHMe sont rassemblés dans l'annexe B.3.2.

Comme dans le cas du conformère isolé **C**, les modes de pliage des groupements NH et NH_2 sont toujours prédits avec une forte intensité par la méthode RI-B97-D dans **W** et **X**. Les nombres d'onde de ces modes sont néanmoins plus élevés d'une cinquantaine de cm^{-1} dans ces deux dernières conformations. Cette tendance est retrouvée expérimentalement pour les deux monohydrates : la bande isolée à 479 cm^{-1} dans le spectre de **W** est attribuée au mode de pliage du groupement NH_2 et le doublet intense à 498 et 527 cm^{-1} de **X** est attribué aux modes de pliage de NH et NH_2. Les deux bandes situées dans la région 700 - 750 cm^{-1}, attribuées au mode papillon du phényle, sont comparables à celles observées pour le conformère seul, ce qui est en

accord avec la faible interaction attendue entre la molécule d'eau et le cycle aromatique dans la structure $R^L(g-)$.

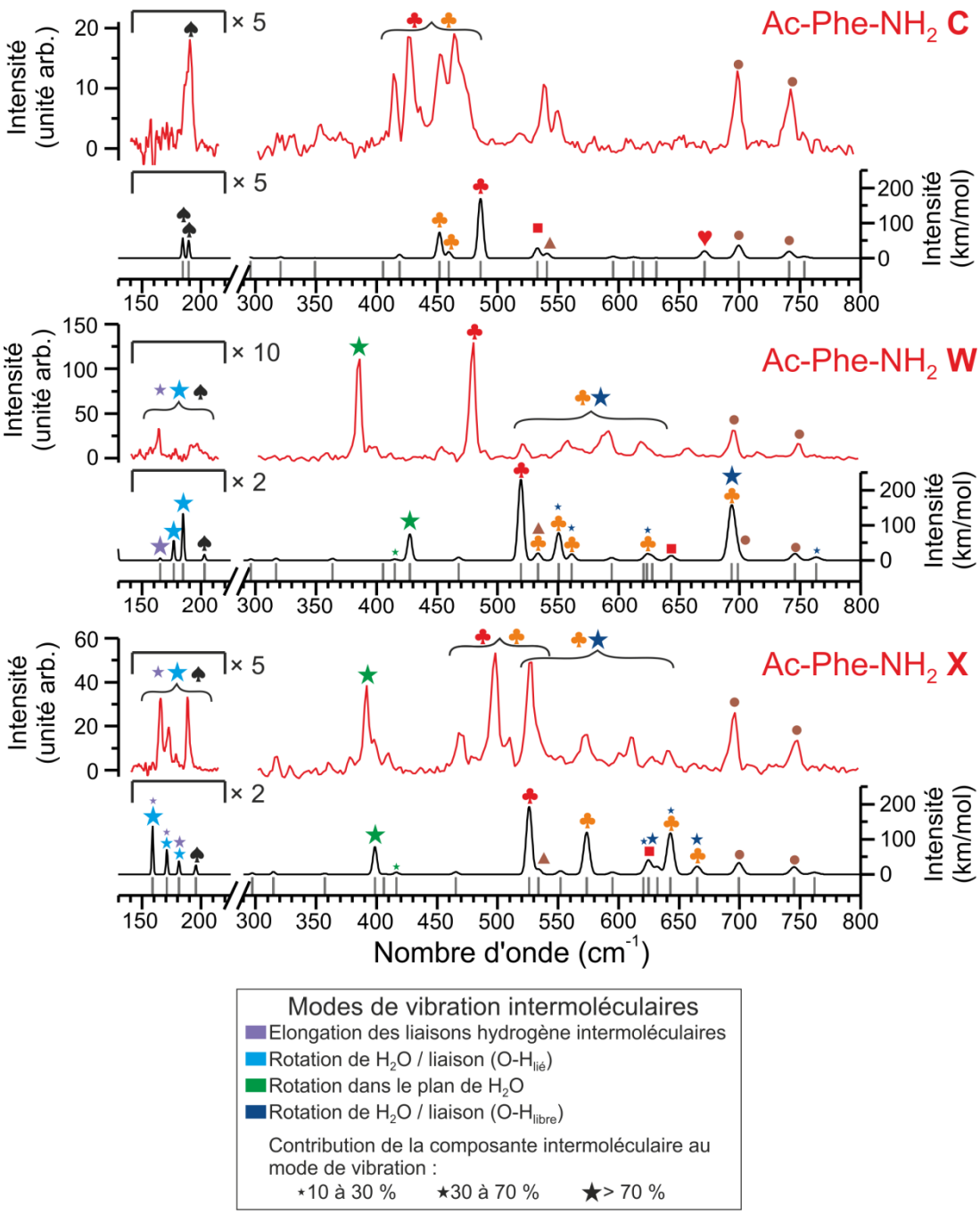


***Fig. 4.13** – Spectres de double résonance IR-UV des conformères **C**, **W** et **X** de Ac-Phe-NH_2 (en rouge) comparés aux spectres harmoniques non corrigés (en noir) calculés avec la méthode RI-B97-D / TZVPP. Pour les spectres théoriques, la taille des étoiles est reliée au pourcentage de contribution des modes de vibration de la molécule d'eau.*

Les calculs RI-B97-D ont montré que les quatre modes de vibration intermoléculaires (représentés par des étoiles sur la Figure 4.13) pouvaient être classés dans trois régions spectrales distinctes (Figure 4.14) :

- 150 – 200 cm^{-1} : un mode de libration (rotation empêchée) de la molécule d'eau par rapport à l'axe de la liaison O-$H_{lié}$ (étoiles bleu clair) et un mode, d'intensité plus faible, de respiration intermoléculaire (élongation des liaisons hydrogène intermoléculaire, étoiles violettes)
- 370 – 440 cm^{-1} : un mode de libration dans le plan de la molécule d'eau (étoiles vertes)
- 500 – 750 cm^{-1} : un mode de libration de la molécule d'eau par rapport à l'axe de la liaison O-H_{libre} (étoiles bleu foncé)

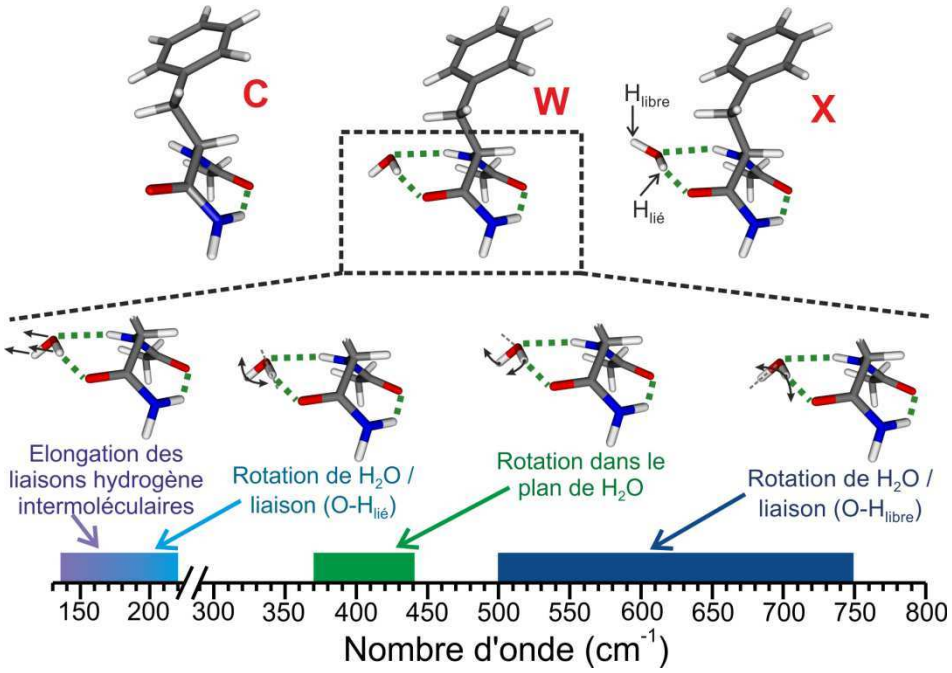


Fig. 4.14 – *Schéma et domaines spectraux des modes de vibration intermoléculaires du complexe (Ac-Phe-NH_2 : H_2O). La masse du peptide étant beaucoup plus élevée que celle de la molécule d'eau, seul le mouvement de cette dernière est représenté sur le schéma.*

Les modes de vibration intermoléculaires sont souvent couplés à plusieurs modes de vibration du peptide. Afin d'estimer plus quantitativement la force de ces couplages, les contributions des quatre modes intermoléculaires aux modes de vibration RI-B97-D ont été calculées et sont représentées sur la Figure 4.13 par des étoiles de tailles proportionnées à l'intensité du couplage. Les contributions calculées correspondent au carré du produit scalaire entre les vecteurs propres des modes RI-B97-D et des modes intermoléculaires (en %). A cette

fin, les coordonnées de vibration des modes intermoléculaires ont été obtenues de la façon suivante : (i) les coordonnées de déplacement de la molécule d'eau selon les différents axes de rotation sont calculées d'après les coordonnées des atomes O, $H_{lié}$ et H_{libre}, puis (ii) les coordonnées de déplacement du peptide protégé sont déduites de la loi de conservation de la quantité de mouvement et de la loi de conservation du moment cinétique dans le complexe, en supposant les deux molécules rigides. En pratique, comme la masse du peptide est très supérieure à la masse de la molécule d'eau (rapport 11 : 1 dans le cas de Ac-Phe-NH_2 : H_2O), la vibration intermoléculaire est quasiment entièrement portée par la molécule d'eau et le déplacement du peptide est très faible.

Les bandes isolées à 385 cm^{-1} pour **W** et 392 cm^{-1} pour **X** sont en bon accord avec les prédictions réalisées pour le mode de libration dans le plan de la molécule d'eau (étoiles vertes sur la Figure 4.13) : elles sont intenses et peu couplées avec les modes du peptide protégé. L'accord semble meilleur pour le conformère **X** que pour le conformère **W** (avec un écart respectif des fréquences calculées de 6 et 41 cm^{-1}), ce qui peut suggérer une forte anharmonicité de ce mode de vibration.

Les calculs montrent un comportement très différent pour le mode de libration de la molécule d'eau autour de la liaison O-H_{libre} (étoiles bleu foncé). Plusieurs contributions significatives apparaissent, couvrant un large domaine de nombres d'onde (500 – 750 cm^{-1}). Dû à la plus forte densité d'états vibrationnels du peptide protégé dans ce domaine, ce mode intermoléculaire est fortement couplé aux modes de vibration de la chaîne principale du peptide protégé, et en particulier au mode de pliage du groupement NH impliqué dans la liaison hydrogène intermoléculaire. Cela peut expliquer l'observation de plusieurs bandes d'intensité moyenne dans cette région spectrale sur les spectres expérimentaux, qui ne sont pas présentes sur le spectre de la molécule seule : la force d'oscillateur de ce mode intermoléculaire est répartie entre de nombreux modes par couplage vibrationnel. Bien que le phénomène de couplage apparaisse qualitativement sur les spectres théoriques de la Figure 4.13, l'allure des bandes ne présente cependant pas un très bon accord avec les spectres expérimentaux. Le calcul des modes de vibration du peptide protégé dans cette région spectrale à ce niveau de théorie n'est probablement pas assez précis pour conduire à des calculs de couplages corrects.

Dans le lointain IR, en plus de la bande associée au mode de torsion de la chaîne principale déjà observée dans **C**, une bande supplémentaire à 164 cm^{-1} et un doublet à 166 et 173 cm^{-1} sont respectivement observées dans **W** et **X**. L'attribution des bandes de vibration dans cette région spectrale est plus délicate car elle fait intervenir différents modes de vibration : le

mode de libration de la molécule d'eau autour de la liaison O-$H_{lié}$ (étoiles bleu clair), le mode d'élongation des liaisons hydrogène intermoléculaires (étoiles violettes) et leurs couplages éventuels avec les modes de torsion de la chaîne principale du peptide protégé. La présence de bandes d'intensité comparables à celles-ci situées en-dessous de 150 cm^{-1}, domaine qu'il n'a pas été possible de balayer durant les expériences à FELIX, n'est également pas à exclure car les autres fonctionnelles que B97-D testées sur ce système prédisent systématiquement la bande de libration autour de la liaison O-$H_{lié}$ vers 130 cm^{-1} (Annexe B.3.3); ce qui ne facilite pas l'attribution.

La comparaison entre les fréquences expérimentales et les fréquences harmoniques non corrigées montre le besoin de tenir compte des effets anharmoniques lors du calcul des couplages entre modes intermoléculaires et modes de basses fréquences du peptide protégé. Dans ce sens, un premier test a été réalisé en utilisant une des méthodes les moins coûteuses en temps de calcul : une approche perturbationnelle au second ordre (PT2) [36]. Cette méthode n'apporte cependant aucune amélioration quant aux prédictions : par exemple, l'accord existant pour le conformère **X** entre la fréquence harmonique du mode de libration dans le plan de la molécule d'eau et la bande à 392 cm^{-1} est perdu : après correction par la méthode PT2 cette bande se situe à 181 cm^{-1}, soit un écart de plus de 200 cm^{-1} avec la fréquence expérimentale (Annexe B.3.4). L'anharmonicité de ces modes de vibration doit être trop importante pour pouvoir être prise en compte par une méthode perturbationnelle ; une méthode variationnelle peut alors être envisagée pour résoudre ce problème [37].

4.2.8 Conclusion

La spectroscopie de double résonance IR-UV en phase gazeuse dans l'IR proche a permis de déterminer les sites de solvatation d'un peptide modèle préférentiellement occupés par une molécule d'eau, des structures ont pu être proposées pour les quatre conformères solvatés observés. Les rapports de population entre ces conformères ne sont pas gouvernés par un équilibre thermodynamique, ils résultent de la solvatation de peptides protégés froids vibrationnellement, et donc déjà piégés dans une conformation (**A**, **B** ou **C**). La totalité de la surface d'énergie potentielle n'est donc pas explorée lors de la solvatation, ce qui explique pourquoi certaines conformations stables (*I*) ne sont pas observées. La solvatation peut avoir différents effets sur la structure du peptide protégé : (i) elle change très peu la structure lorsque la molécule d'eau est dans un site de solvatation rigide (**Y**), (ii) elle peut la déformer légèrement

lorsque l'eau est dans un site plus flexible (**W**, **X**) et (iii) elle peut provoquer une isomérisation conformationnelle entre une forme étendue et une forme repliée du peptide protégé (**A** → **W**, **X**). Il serait intéressant de compléter cette étude par l'observation de plus gros complexes, afin de suivre l'évolution sur le diagramme de Ramachandran de la géométrie de la chaîne principale du peptide protégé après chaque ajout d'une molécule d'eau et de déterminer le nombre minimal de molécules d'eau nécessaires pour atteindre le domaine des structures en hélice polyproline II.

Les expériences réalisées dans l'IR moyen et lointain ont permis d'obtenir les premières observations sélectives en conformation des modes de vibration intermoléculaires de complexes entre un peptide protégé et une molécule d'eau. Ces résultats ont montré que les couplages vibrationnels étaient très dépendants du mode intermoléculaire considéré, le mode de libration de la molécule d'eau autour de la liaison O-H_{libre} étant le plus couplé aux modes du peptide protégé. Le calcul des fréquences de vibration dans ce domaine spectral reste un défi, même avec des fonctionnelles DFT-D récentes. Il n'aurait pas été possible de réaliser une attribution uniquement à partir de cette région spectrale, sans s'appuyer sur les vibrations d'élongation dans l'IR proche. Cette étude fournit donc des données de références, pouvant servir de base à l'amélioration de la description des interactions dispersives des méthodes de chimie quantique, et plus particulièrement des fonctionnelles DFT-D. Elle a également permis de mettre en évidence le besoin de tenir compte d'effets anharmoniques pour attribuer les modes de vibration intermoléculaires. Dans cette optique, des calculs anharmoniques reposant sur une méthode variationnelle sont en cours dans le laboratoire.

4.3 Modélisation des domaines hydrophobes des protéines

Le terme d'effet *hydrophobe* est un terme générique utilisé pour nommer la tendance de composés non polaires à s'agréger lorsqu'ils sont entourés de molécules d'eau [38]. Ce nom est dû à l'apparente répulsion entre l'eau et les molécules non polaires, mais l'origine des effets hydrophobes provient en réalité de deux interactions attractives : (i) les forces de dispersion de London entre molécules non polaires et (ii) les liaisons hydrogène entre molécules d'eau. En effet, dans l'eau liquide une molécule d'eau peut former des liaisons hydrogène avec toutes les molécules qui l'entourent, ce qui rend donc peu couteux en énergie le changement d'orientation des molécules, qui sont par conséquent très mobiles. En revanche, le fait que les molécules d'eau ne puissent pas former de liaisons hydrogène avec des molécules non polaires restreint leur mobilité car une orientation particulière devient préférentielle : l'orientation des liaisons

hydrogène tangentiellement à la surface de la molécule non polaire permet de maximiser le nombre de celles-ci. Chaque molécule non polaire est ainsi entourée d'une « cage » de molécules d'eau, partiellement structurée. L'agrégation de molécules non polaires est donc favorisée car, en diminuant la surface de contact de ces molécules avec l'eau, elle permet d'augmenter l'entropie du système et donc le nombre de liaisons hydrogène par molécules d'eau (Figure 4.15b).

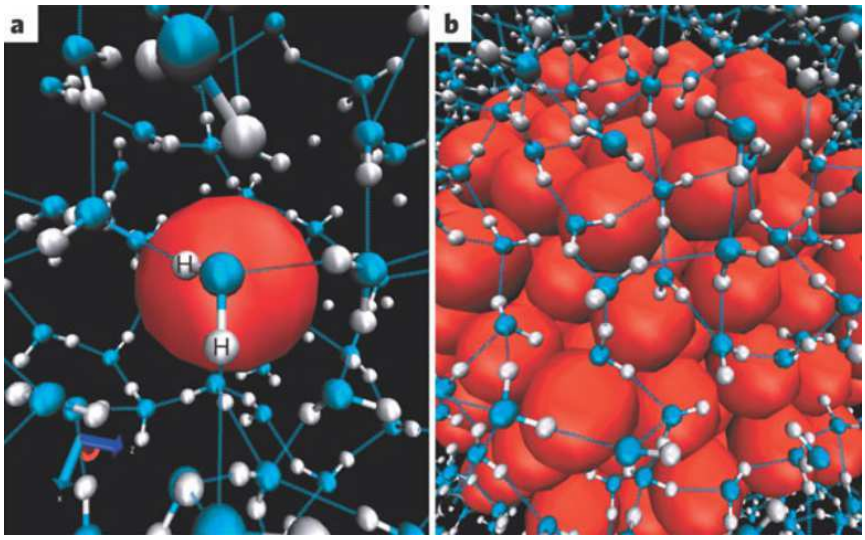


Fig. 4.15 – *Représentation de l'organisation des molécules d'eau (atomes bleus et blancs) à l'interface avec des molécules non polaires (sphères rouges), tiré de la Réf. [39]. Pour une faible surface de contact (a), la situation des molécules d'eau est peu différente de celle en absence de molécule non polaire, chaque molécule d'eau peut former quatre liaisons hydrogène. A partir d'une certaine taille d'agrégats de molécules non polaires (b) la situation à l'interface devient plus défavorable pour les molécules d'eau car elles ne peuvent former qu'un nombre réduit de liaisons hydrogène (typiquement trois ou moins).*

Plusieurs acides aminés, et en particulier les acides aminés aromatiques, possèdent des chaînes latérales non polaires. Il est donc attendu que, dans un milieu aqueux, ces acides aminés soient enfouis au cœur de la protéine, pour qu'ainsi la surface exposée au solvant contienne majoritairement des chaînes latérales polaires [39, 40]. Dans ce sens, la formation de domaines hydrophobes est un des moteurs du repliement des protéines, au même titre que la formation des liaisons hydrogène conduisant aux structures secondaires [41, 42]. Au début du repliement, pour des domaines hydrophobes de petites tailles, les liaisons hydrogène entre molécules d'eau sont peu perturbées (Figure 4.15a) [39] et l'effet hydrophobe est surtout dominé par les interactions dispersives entre chaînes latérales non polaires. Par ailleurs, à l'issue du repliement, les interactions dispersives entre chaînes latérales aromatiques sont également connues pour stabiliser la conformation de protéines [43, 44, 45, 46, 47], et pour intervenir dans des processus de reconnaissance moléculaire [48, 49].

L'approche de la spectroscopie en phase gazeuse pour étudier les domaines hydrophobes des protéines offre plusieurs avantages. Premièrement, la résolution de ces méthodes spectroscopiques permet de caractériser finement les structures adoptées par ces systèmes et donc d'obtenir une image précise des interactions qui les gouvernent. Ensuite, d'un point de vue électrostatique, l'environnement d'un système isolé en phase gazeuse n'est pas très éloigné des milieux biologiques à faible permittivité électrique**,** tels que les cœurs hydrophobes des protéines ou les bicouches lipidiques [50]. Les structures de la phase gazeuse peuvent donc être directement comparées à des structures déterminées en phase condensée (RX, RMN) et présenter de bons accords avec ces dernières [1]. Enfin, en éliminant la composante liée au solvant, la phase gazeuse nous donne l'opportunité d'étudier sélectivement le rôle structurel des interactions dispersives entre chaînes latérales aromatiques (ar-ar).

Cette approche a été utilisée dans plusieurs études sur des molécules polyaromatiques ou des dimères de molécules aromatiques et a permis de caractériser différent types d'interactions entre les cycles. Arunan et Gutowsky ont montré en 1993 que les deux molécules du dimère de benzène interagissaient via une structure en T [51]. Hobza *et al.* ont prédit par des calculs de chimie quantique (CCSD(T)) une seconde structure, quasiment isoénergétique à la structure en T, où les deux cycles aromatiques sont parallèles mais légèrement décalés l'un par rapport à l'autre [52]. Cette structure a plus tard été identifiée expérimentalement pour un dimère de benzène protoné [53]. Un troisième type d'interaction, en V, a également été identifiée pour le diphénylméthane [54, 55].

Dans cette partie nous nous intéresserons à l'influence des interactions dispersives ar-ar entre cycles aromatiques sur les structures adoptées par des peptides protégés en phase gazeuse. Pour cela, nous comparerons les géométries préférentiellement adoptées par trois systèmes : des dipeptides protégés possédant un seul cycle aromatique, où il n'y a pas d'interactions ar-ar, et les systèmes Ac-Phe-Phe-NH_2 et Ac-Phe-Phe-Phe-NH_2 possédant respectivement deux et trois phényles.

4.3.1 Structures adoptées en l'absence d'interactions ar-ar

Les conformères principaux des dipeptides protégés Ac-Xxx-Phe-NH_2 et Ac-Phe-Xxx-NH_2 (avec Xxx = Gly, Ala ou Val) ont été caractérisés durant la thèse de Wutharath Chin au sein du laboratoire [56, 57]. Trois familles de géométries ont été identifiées pour ces deux séries de dipeptides : des structures à un ou deux coudes γ et des coudes β.

4.3.1.a Géométries des dipeptides protégés Ac-Xxx-Phe-NH_2 et Ac-Xxx-Phe-NHMe

Le spectre de Ac-Gly-Phe-NH_2 est présenté dans la Figure 4.16, les spectres des autres dipeptides protégés de la série Ac-Xxx-Phe-NH_2 sont montrés dans l'annexe B.1.1. Chacun de ces spectres est constitué d'une large progression vibrationnelle et de bandes isolées, l'intensité relative entre ces bandes pouvant varier. Deux types de conformères avaient été identifiés par W. Chin pour chaque molécule : (i) des conformères possédant deux liaisons hydrogène C_7 fortes (**A**), de structure γ_L-γ_L(g-), responsable de la progression vibrationnelle et (ii) des conformères avec des structures en coude β (**B'** pour Ac-Gly-Phe-NH_2 et **B** pour Ac-Ala-Phe-NH_2 et Ac-Val-Phe-NH_2) [56]. Parmi les coudes β, deux types (I et II') possédaient un excellent accord avec les fréquences expérimentales des conformères **B** et **B'**. En effet, les fréquences calculées pour ces deux types de coudes β sont très proches car ces derniers ne diffèrent que par l'orientation du premier acide aminé (Tableau 1.1). Comme le groupement NH de cet acide aminé n'est impliqué dans aucune interaction intramoléculaire dans les deux géométries, sa fréquence de vibration d'élongation se situe toujours dans le domaine des NH libres, vers 3480 cm^{-1} (Tableau 4.5). Cependant, la gêne stérique entre les chaînes latérales des deux acides aminés est plus importante dans la conformation coude β type II' que dans la conformation coude β type I. La structure $\beta_{II'}$(g+) de Ac-Ala-Phe-NH_2 possède ainsi une enthalpie libre à 300 K plus élevée d'environ 10 kJ · mol^{-1} par rapport à la structure β_I(g+). Les coudes β type I étaient alors les candidats les plus probables pour les conformères **B** de Ac-Ala-Phe-NH_2 et Ac-Val-Phe-NH_2. Toutefois, la chaîne latérale de la glycine étant constitué d'un seul atome d'hydrogène, la différence de gêne stérique entre les coudes β I et II' est beaucoup plus faible dans le cas de Ac-Gly-Phe-NH_2 (1,5 kJ · mol^{-1} à 300 K). Il n'a donc pas été possible d'exclure un des deux types de coude sur un critère énergétique.

Durant cette thèse, deux conformères supplémentaires de Ac-Gly-Phe-NH_2 (appelés **A'** et **B**) ont été observés, ce qui illustre la flexibilité accrue de la chaîne principale lorsqu'une glycine y est présente. Les fréquences de vibration expérimentales des conformères **A'** et **B** sont respectivement très proches de celles des conformères **A** et **B'** (Tableau 4.5). On peut donc en déduire directement que ces deux conformères correspondent à une structure en double coude γ (pour **A'**) et une structure en coude β (pour **B**).

Les structures γ_L-γ_L(g-) et γ_D-γ_L(g-) possèdent un bon accord avec les fréquences de **A'**. La structure γ_L-γ_L(g-) a cependant déjà été attribuée au conformère **A** sur la base d'une comparaison des fréquences des transitions UV et de l'allure de la progression vibrationnelle avec les autres

peptides de la série Ac-Xxx-Phe-NH_2. La structure γ_D-γ_L(g-) peut donc être attribuée à **A'**. L'enthalpie libre plus élevée de cette structure concorde également avec la plus faible intensité du signal d'ion de **A'** par rapport à **A**.

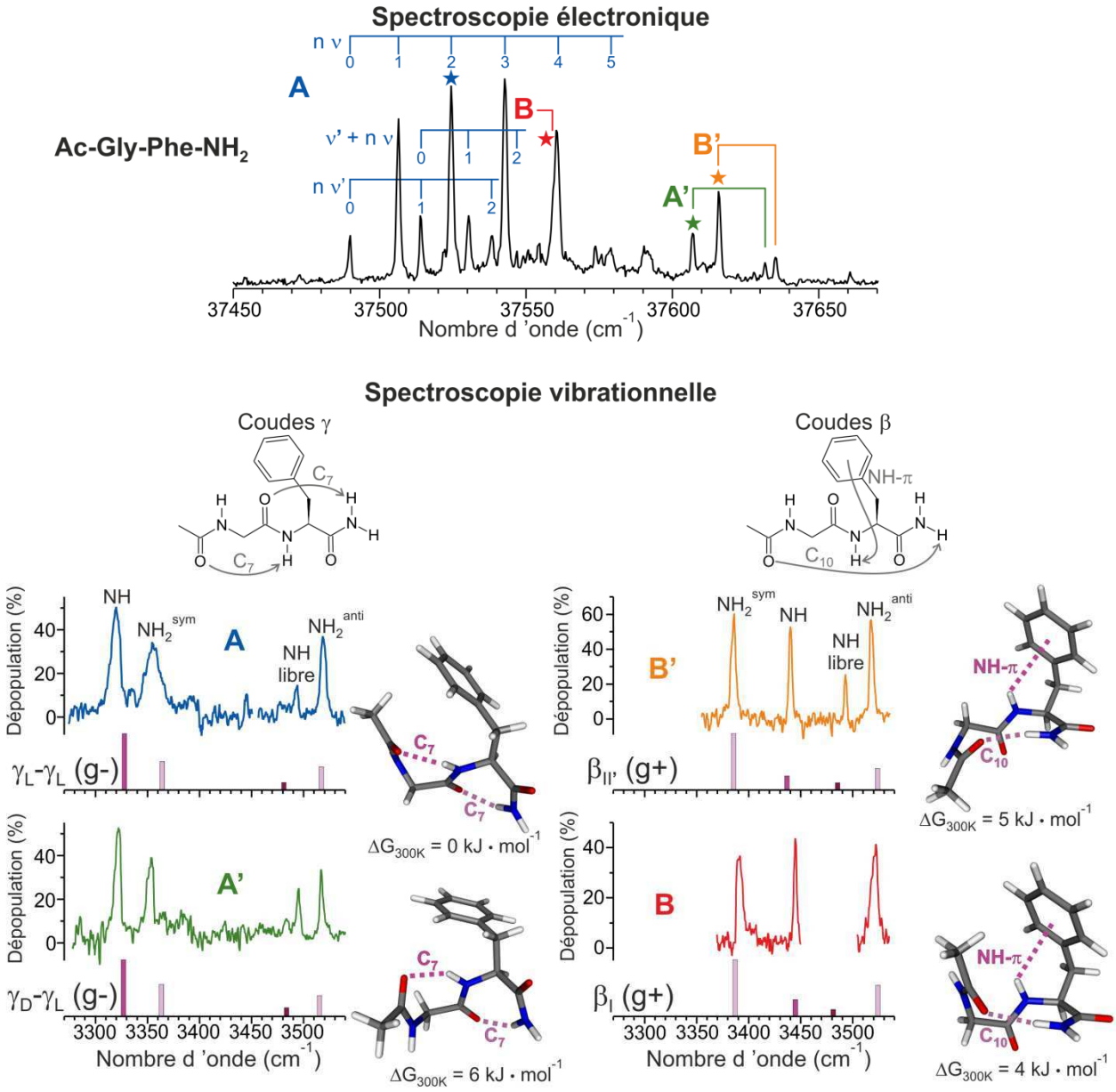


Fig. 4.16 – *(haut) Spectre de Ac-Gly-Phe-NH_2 dans le domaine de la première transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du chromophore aromatique. Les étoiles indiquent les longueurs d'ondes UV auxquelles ont été enregistrés les spectres de double résonance IR-UV. (bas) Spectres de doubles résonances IR-UV des conformères **A**, **A'**, **B** et **B'** de Ac-Gly-Phe-NH_2. Les spectres en bâtonnets représentent les fréquences harmoniques corrigées RI-B97-D/TZVPP des structures situées à droite de chaque spectre IR.*

Conformères	Fréquences de vibration (cm^{-1})				δ^{max} (cm^{-1})	δ^{RMS} (cm^{-1})	ΔG (kJ · mol^{-1})	
							0 K	300 K
A (exp)	**3319.5**	**3355**	**3493**	**3519**				
γL-γL (g-)	***3328***	***3364***	***3481***	***3517***	***12***	***9***	***1***	***0***
γD-γL (g-)	*3327*	*3363*	*3484*	*3515*	*9*	*7*	*6*	*6*
A' (exp)	**3321.5**	**3352.5**	**3494.5**	**3517**				
γL-γL (g-)	*3328*	*3364*	*3481*	*3517*	*14*	*9*	*1*	*0*
γD-γL (g-)	***3327***	***3363***	***3484***	***3515***	***11***	***8***	***6***	***6***
B' (exp)	**3385**	**3440.5**	**3493**	**3518**				
βI (g+)	*3387*	*3445*	*3481*	*3524*	*12*	*7*	*0*	*4*
βII' (g+)	***3386***	***3437***	***3485***	***3524***	***8***	***5***	***5***	***5***
B (exp)	**3391**	**3445**	**-**	**3521**				
βI (g+)	***3387***	***3445***	***3481***	***3524***	***4***	***3***	***0***	***4***
βII' (g+)	*3386*	*3437*	*3485*	*3524*	*8*	*5*	*5*	*5*

Tab. 4.5 – *Comparaison des données expérimentales et théoriques (en italique) obtenues pour les conformères **A**, **A'**, **B** et **B'** de Ac-Gly-Phe-NH_2. Les structures calculées attribuées à chaque conformère sont indiquées en gras. Les fréquences théoriques sont issues de calculs au niveau RI-B97-D/TZVPP et corrigées par des facteurs d'échelles affines spécifiques à chaque mode de vibration. δ^{max} et δ^{RMS} correspondent respectivement à l'écart maximal et à l'écart quadratique moyen entre les fréquences expérimentales et théoriques ($\delta^{max} = Max(|f_i^{exp}-f_i^{th}|)$ et $\delta^{RMS} = (\Sigma(f_i^{exp}-f_i^{th})^2/n)^{1/2}$), avec n le nombre de fréquences expérimentales observées dans le proche IR). Les valeurs plus faibles des δ de **B'** sont dues à la fréquence de vibration du groupement NH libre non observée avec l'OPO $LiNbO_3$.*

L'observation d'un nouveau coude β permet de préciser la structure du conformère **B'** de Ac-Gly-Phe-NH_2. En effet, le conformère **B'** possède un accord légèrement meilleur avec la structure $\beta_{II'}$(g+) qu'avec la structure β_I(g+), et l'inverse est observé pour **B**. Le conformère **B** peut donc être attribué à la structure β_I(g+). Cette attribution est confirmée par la valeur de la fréquence de la transition UV du conformère **B** qui est très proche de celles des conformères **B** de Ac-Ala-Phe-NH_2 et Ac-Val-Phe-NH_2, aussi des coudes β type I. Le conformère **B'** correspond alors à la structure $\beta_{II'}$(g+). Il n'est pas possible de comparer ici l'intensité relative du signal d'ions de **B** et **B'** car l'origine de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ de **B** coïncide avec une bande de la progression vibrationnelle de **A** et les expériences de dépopulation UV-UV et IR-UV réalisées n'ont pas permis de séparer les contributions de chacun des conformères à cette bande.

Les spectres UV de Ac-Gly-Phe-NHMe et Ac-Ala-Phe-NHMe sont présentés sur la Figure 4.17. Leur similarité avec les spectres des molécules Ac-Xxx-Phe-NH_2 nous indique immédiatement que la méthylation n'a encore une fois que très peu d'influence sur les structures adoptées en phase gazeuse. Ces systèmes adoptent les deux mêmes types de géométrie : des

structures en doubles coudes γ et des structures en coudes β. Ces attributions ont été confirmées par l'enregistrement des spectres de double résonance IR-UV des différents conformères (Annexe B.2.2).

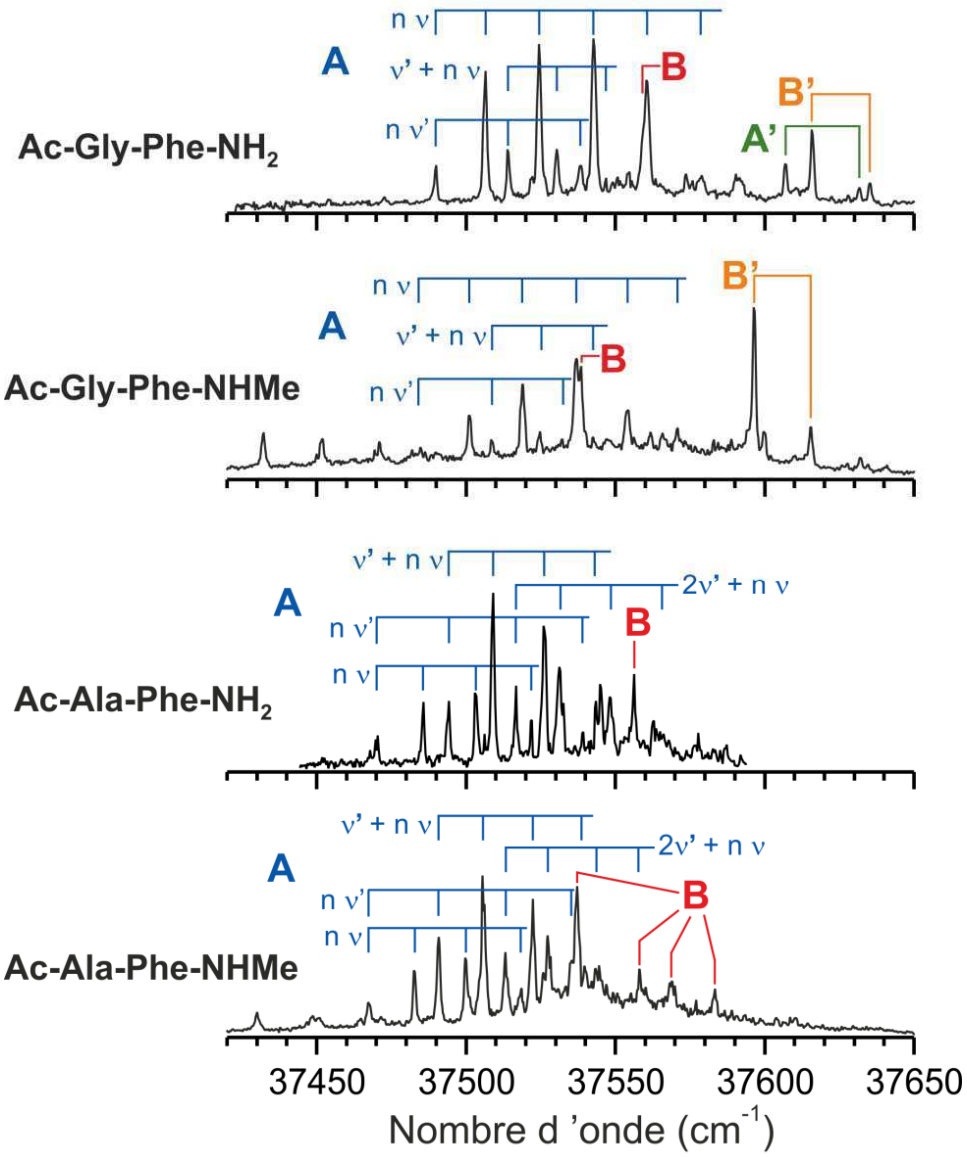


Fig. 4.17 – *Comparaison des spectres de Ac-Gly-Phe-NH_2, Ac-Ala-Phe-NH_2 et de leur analogue méthylé sur le groupement NH_2 terminal, dans le domaine de la première transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du cycle aromatique.*

4.3.1.b Géométries des dipeptides protégés Ac-Phe-Xxx-NH_2

La position relative de deux acides aminés dans la chaîne peptidique a une influence forte sur les structures adoptées. Les conformères majoritaires des dipeptides protégés de la série Ac-Phe-Xxx-NH_2, où l'acide aminé phénylalanine est en première position dans la chaîne peptidique, sont des structures β_L(a)-γ_L, stabilisée par une liaison hydrogène C_7 forte, une interaction NH-π et une interaction C_5 faible (Figure 4.18) [57].

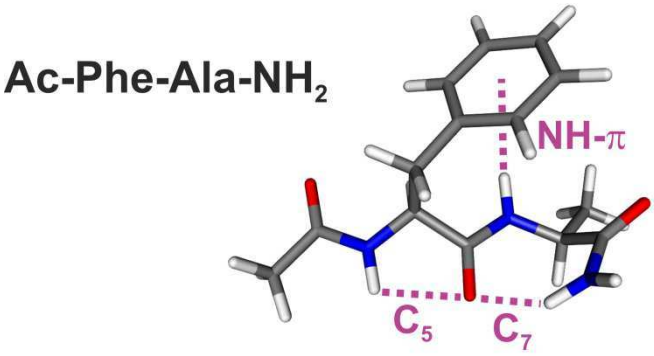


***Fig. 4.18** – Structure $\beta_L(a)$-γ_L de l'unique conformère observé pour Ac-Phe-Ala-NH_2.*

4.3.1.c Influence de la conformation sur l'intensité des transitions vibroniques

Les spectres IR2P-1C de différents dipeptides des séries Ac-Xxx-Phe-NH_2 et Ac-Phe-Xxx-NH_2 ont été étendus au domaine des transitions vibroniques 6a et 6b (~ 38 000 cm^{-1}). Le spectre de Ac-Gly-Phe-NH_2 est présenté dans la Figure 4.19. Les spectres de quelques autres dipeptides protégés sont réunis dans l'annexe B.1.2.

A l'opposé des conformères de Ac-Phe-NH_2, qui présentaient des transitions vibroniques intenses dans cette région spectrale (Figure 4.2), les transitions vibroniques observées dans le cas de Ac-Gly-Phe-NH_2 sont moins intenses que les transitions observées à l'origine. On peut également remarquer une variation importante de l'intensité relative entre les transitions vibroniques des quatre conformères de Ac-Gly-Phe-NH_2, la progression vibrationnelle due au conformère **A'** a quasiment disparu alors que les bandes des autres conformères sont encore clairement visibles. De plus, le même effet conformationnel est retrouvé pour tous les dipeptides de la série Xxx-Phe, que le groupement NH_2 terminal soit méthylé ou non : l'intensité des transitions vibroniques des conformères de structures γ_L-γ_L (**A**) décroît toujours fortement par rapport à celles des conformères en coude β (**B**).

Plusieurs phénomènes physiques peuvent être responsables de cette différence de comportement entre les structures γ_L-γ_L et les coudes β. Par exemple, les modes de vibration de basse fréquence de la chaîne principale d'un peptide étant très dépendants de la conformation, il est possible qu'un couplage vibrationnel dans le premier état excité ππ*, entre le mode de déformation du cycle aromatique et des modes de basses fréquences de la chaîne peptidique, puisse intervenir dans une structure et pas dans une autre. Ceci pourrait expliquer l'apparente diminution d'intensité de la progression vibrationnelle des structures γ_L-γ_L. Les modes de basse fréquence pourraient aussi être responsables d'une relaxation de l'énergie vibrationnelle

intramoléculaire (IVR) plus rapide dans un conformère que dans un autre. La présence d'un couplage vibronique avec le deuxième état excité ππ* du cycle aromatique, relativement proche en énergie est également possible. Enfin, une relaxation électronique rapide de l'état excité ππ* d'un des conformères n'est pas non plus à exclure. Ce dernier point sera discuté plus en détail dans le chapitre 5 mais, en conclusion, on peut voir qu'il est assez difficile de proposer une explication à ce phénomène uniquement à partir de ces observations expérimentales. Des calculs de chimie quantique des états excités permettront de proposer des pistes quant aux mécanismes responsables.

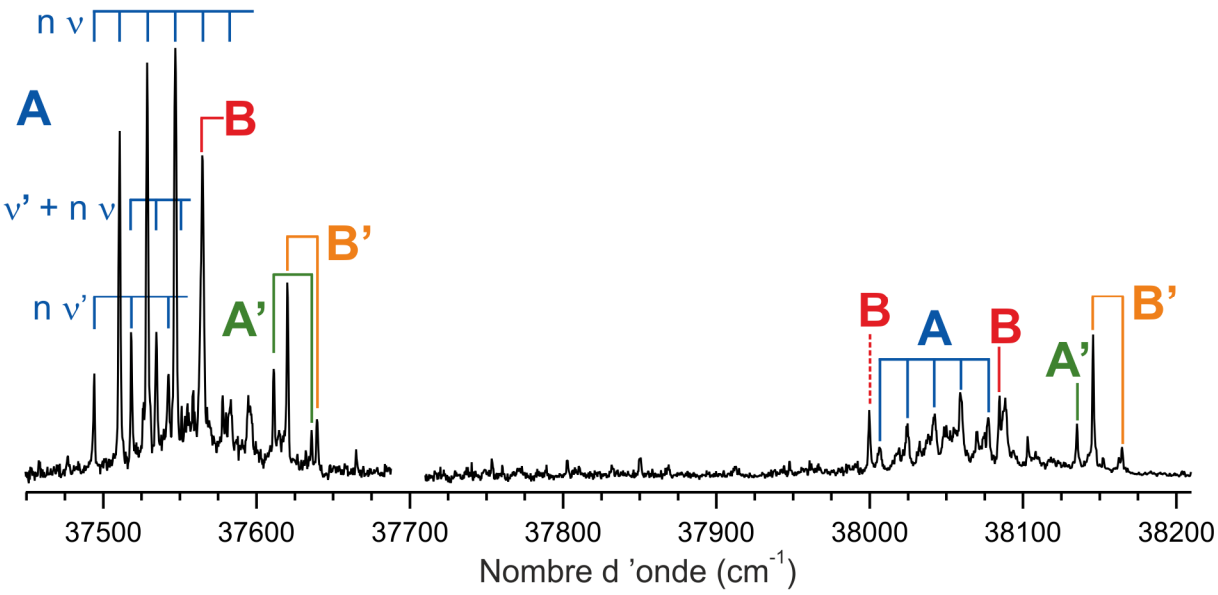


Fig. 4.19 – *Spectres IR2P-1C de Ac-Gly-Phe-NH_2 enregistrés dans le domaine de la première transition π→π* du cycle aromatique (origine et transitions vibroniques 6a et 6b). Les bandes situées dans la région 6 (6a en tirets et 6b en trait plein) ont été attribuées d'après les fréquences de vibration d'élongation symétrique et antisymétrique du groupement NH_2.*

4.3.2 Structures de peptides polyaromatiques

4.3.2.a Détermination des structures de Ac-Phe-Phe-NH_2

Dans une étude précédente menée au laboratoire, un conformère unique (**A**) avait été détecté pour le dipeptide protégé Ac-Phe-Phe-NH_2 [58]. La structure de ce conformère était définie par une liaison hydrogène C_{10} (coude β), deux interactions NH-π et une interaction en T entre les deux cycles aromatiques. On peut voir une première influence des interactions ar-ar dans le fait que seul un coude β ait été observé, alors que cette structure est minoritaire, voire non observée, dans les dipeptides protégés Ac-Xxx-Phe-NH_2 et Ac-Phe-Xxx-NH_2. Nous avons

cherché à compléter cette étude par l'observation de conformations de plus haute énergie. Comme cela a été montré dans le chapitre précédent, il est possible d'augmenter le nombre de conformations observées dans la détente supersonique, donc la température conformationnelle, en augmentant la vitesse de refroidissement de la molécule. Un moyen pour réaliser cela est d'augmenter le nombre de collisions avec le gaz porteur. Par conséquent, la vanne pulsée de 0,3 mm de diamètre a été remplacée par une vanne de 1 mm de diamètre et la pression du gaz porteur a été augmentée (19 bars d'un mélange 7 : 3 de He : Ne au lieu de 7 bars d'Ar). La modification de ces paramètres expérimentaux a effectivement provoqué l'apparition de nouvelles bandes UV dans le domaine spectral de l'origine de la transition π→π* (Figure 4.20).

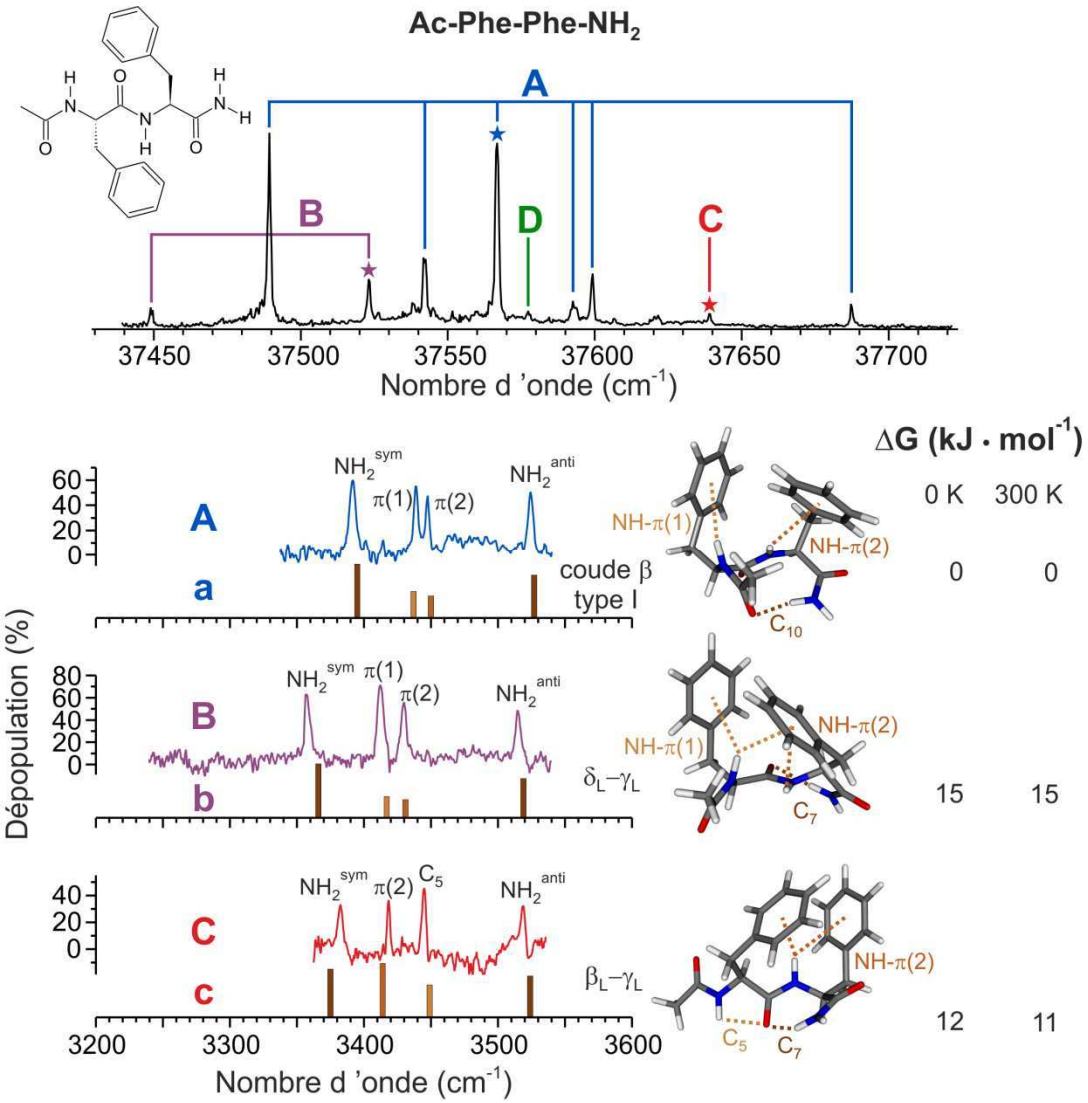


Fig. 4.20 – *(haut) Spectre de Ac-Phe-Phe-NH_2 dans le domaine de la première transition π→π* du chromophore aromatique. Les étoiles indiquent les longueurs d'ondes UV auxquelles ont été enregistrés les spectres de double résonance IR-UV. (bas) Spectres de doubles résonances IR-UV des conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-Phe-NH_2. Les spectres en bâtonnets représentent les fréquences harmoniques corrigées RI-B97-D/TZVPP des structures situées à droite de chaque spectre IR.*

Le conformère **A**, seul observé lorsque le gaz porteur était de l'argon, est vraisemblablement toujours le conformère majoritaire. Il contribue à lui seul à environ 87 % du signal d'ion total dans ce domaine spectral. Trois conformères minoritaires supplémentaires ont été observés avec le mélange He : Ne à 19 bars : un conformère **B** à 37 523 cm^{-1} et 37 449 cm^{-1} représentant environ 9 % du signal d'ion total, un conformère **C** à 37 639 cm^{-1} (~3 %) et un conformère **D** à 37 577 cm^{-1} (~1 %).

Dû au faible signal d'ions de ce dernier conformère, son spectre de dépopulation IR-UV possède un bruit important et seulement trois bandes ont pu être identifiées (à 3380, 3402 et 3520 cm^{-1}), ce qui rend difficile l'attribution d'une structure. Les spectres IR des autres conformères ont en revanche pu être enregistrés (Figure 4.20). Comme **A**, les conformères **B** et **C** ne possèdent pas de bandes dans le domaine des vibrations d'élongation des liaisons NH libres (3460 -3500 cm^{-1}), leurs trois groupements NH sont donc impliqués dans des interactions intramoléculaires.

Les conformations calculées (RI-B97-D/TZVPP) de Ac-Phe-Phe-NH_2 où les trois groupements NH participent à des interactions intramoléculaires sont regroupées dans le Tableau 4.6. Chaque conformère détecté expérimentalement est comparé à une série de structures calculées, classées selon des valeurs de δ^{max} croissante (écart maximal entre les fréquences expérimentales et les fréquences harmoniques corrigées). Comme dans le cas des hydrates, on considère qu'un bon accord est obtenu lorsque $\delta^{max} \leq$ ~20 cm^{-1} et $\delta^{RMS} \leq$ ~10 cm^{-1}. La structure *a*, la plus stable, a déjà été attribué au conformère **A** [58].

Deux structures, *b* et *c*, correspondent aux critères de δ pour le conformère **B** ; l'accord étant un peu moins bon avec la structure *c* qu'avec la *b*. De plus, on peut remarquer que le premier groupement NH du dipeptide protégé est impliqué dans une interaction NH-π dans la structure *b* (fréquence de vibration à 3431 cm^{-1}) et dans une interaction C_5 dans la structure *c* (fréquence de vibration à 3449 cm^{-1}). Or, la fréquence de vibration expérimentale associée (3430 cm^{-1}) correspondrait à une valeur anormalement basse pour une interaction C_5. En revanche, c'est une fréquence typique d'une interaction NH-π. La structure *b* peut donc être attribuée au conformère **B**.

Si l'on exclut les structures *a* et *b* déjà attribuées, il reste à considérer quatre géométries pour le conformère **C** : *c*, *e*, *f* et *i*. L'écart δ^{max} le plus important correspond à la prédiction de la fréquence à 3418 cm^{-1}. Pour les quatre structures cette fréquence est attribuée à la vibration d'élongation du deuxième groupement NH, impliqué dans une interaction NH-π. Cependant,

seule la structure *c* arrive à reproduire correctement une interaction NH-π à une aussi basse fréquence (3414 cm^{-1}), alors que les trois autres la prédisent à des valeurs plus usuelles (3433 - 3440 cm^{-1}). La structure du conformère **C** est donc attribuée à la forme *c*.

Conf.	Fréquences de vibration (cm^{-1})				δ^{max} (cm^{-1})	δ^{RMS} (cm^{-1})	ΔG (kJ · mol^{-1}) 0 K	ΔG (kJ · mol^{-1}) 300 K	Liaisons H		
A (exp)	**3391**	**3438**	**3447**	**3524**				**0**			
a	***3395***	***3437***	***3450***	***3527***	***4***	***3***	***0***	***0***	***π***	***π***	***10***
e	*3385*	*3433*	*3446*	*3520*	*6*	*4*	*18*	*13*	*5*	*π*	*7*
f	*3374*	*3437*	*3440*	*3521*	*17*	*7*	*13*	*10*	*π*	*π*	*10*
g	*3415*	*3424*	*3445*	*3541*	*24*	*14*	*28*	*24*	*5*	*π*	*π*
h	*3415*	*3444*	*3454*	*3530*	*24*	*11*	*42*	*41*	*π*	π^b	*π*
c	*3375*	*3414*	*3449*	*3524*	*24*	*11*	*12*	*11*	*5*	*π*	*7*
b	*3366*	*3417*	*3431*	*3519*	*25*	*17*	*15*	*15*	*π*	*π*	*7*
B (exp)	**3357**	**3412**	**3430**	**3514**				**6**			
b	***3366***	***3417***	***3431***	***3519***	***9***	***5***	***15***	***15***	***π***	***π***	***7***
c	*3375*	*3414*	*3449*	*3524*	*19*	*12*	*12*	*11*	*5*	*π*	*7*
f	*3374*	*3437*	*3440*	*3521*	*25*	*14*	*13*	*10*	*π*	*π*	*10*
i	*3365*	*3440*	*3442*	*3521*	*28*	*13*	*14*	*15*	*5*	*π*	*7*
e	*3385*	*3433*	*3446*	*3520*	*28*	*17*	*18*	*13*	*5*	*π*	*7*
j	*3355*	*3444*	*3446*	*3512*	*32*	*13*	*13*	*7*	*5*	*π*	*7*
k	*3351*	*3446*	*3449*	*3515*	*34*	*12*	*29*	*23*	*5*	*π*	*7*
C (exp)	**3382**	**3418**	**3445**	**3518**				**8**			
c	***3375***	***3414***	***3449***	***3524***	***7***	***5***	***12***	***11***	***5***	***π***	***7***
e	*3385*	*3433*	*3446*	*3520*	*15*	*5*	*18*	*13*	*5*	*π*	*7*
b	*3366*	*3417*	*3431*	*3519*	*16*	*8*	*15*	*15*	*π*	*π*	*7*
f	*3374*	*3437*	*3440*	*3521*	*19*	*9*	*13*	*10*	*π*	*π*	*10*
a	*3395*	*3437*	*3450*	*3527*	*19*	*11*	*0*	*0*	*π*	*π*	*10*
i	*3365*	*3440*	*3442*	*3521*	*22*	*11*	*18*	*13*	*5*	*π*	*7*
j	*3355*	*3444*	*3446*	*3512*	*27*	*15*	*13*	*7*	*5*	*π*	*7*

Tab. 4.6 – *Comparaison des données expérimentales et théoriques (en italique) obtenues pour les conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-Phe-NH_2. Les structures calculées attribuées à chaque conformère sont indiquées en gras. Les fréquences théoriques sont issues de calculs au niveau RI-B97-D/TZVPP et corrigées par des facteurs d'échelles affines spécifiques à chaque mode de vibration. Les ΔG des conformères **A**, **B** et **C** sont déduites des abondances expérimentales en supposant une température conformationnelle de 300 K. Le calcul de δ^{max} et δ^{RMS} est présenté dans la légende du Tableau 4.5. Le réseau de liaisons hydrogène des groupements NH est indiqué de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique : les liaisons hydrogène C_n sont représentées par le nombre n (5, 7, 10 ou 13) ; π et π^b signifient respectivement des interactions NH-π avec le système π d'un cycle aromatique ou avec des électrons π de la chaîne principale (« backbone ») ; les groupements NH libres sont indiqués par le code X.*

4.3.2.b Détermination des structures de Ac-Phe-Phe-Phe-NH_2

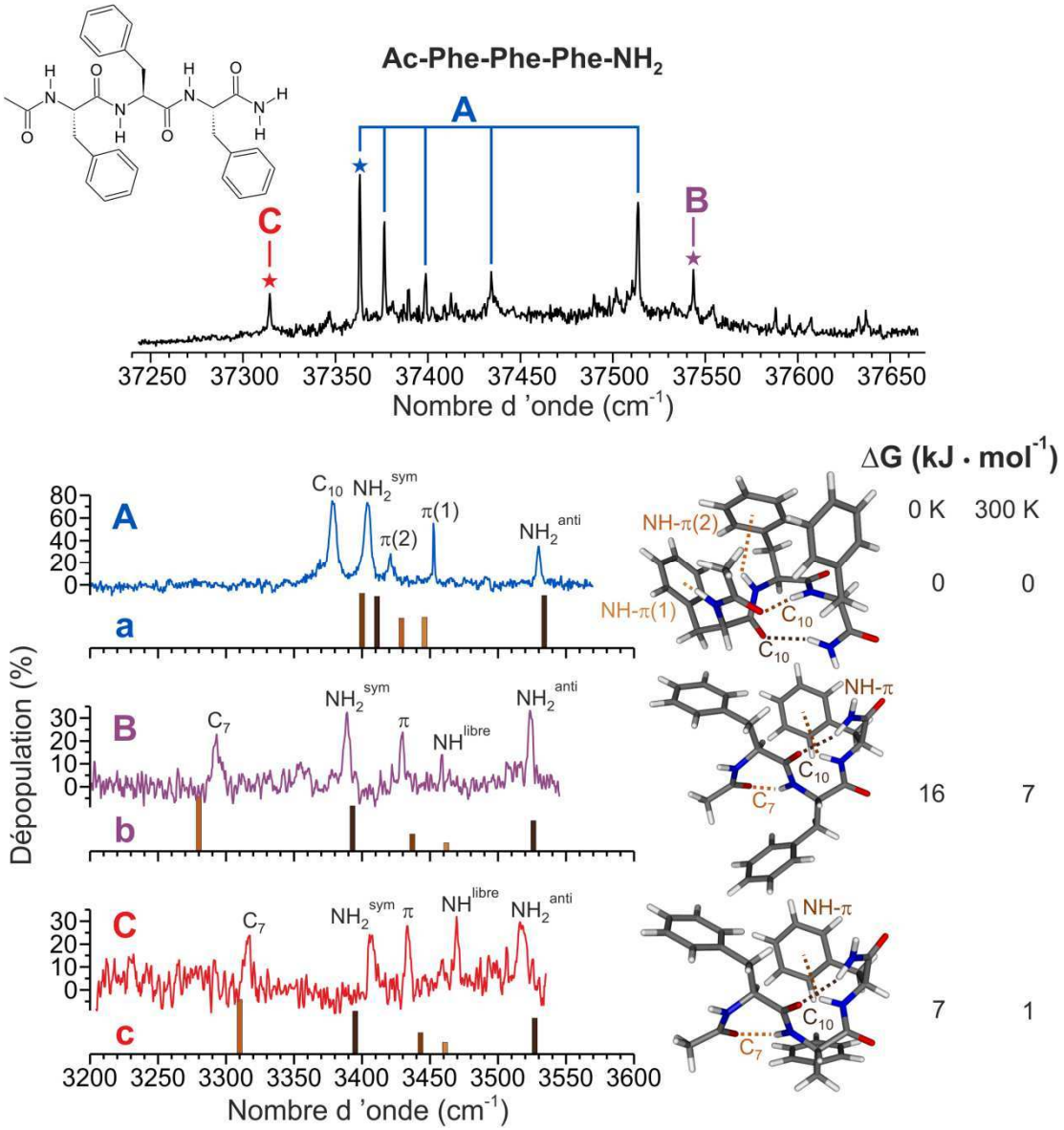


Fig. 4.21 – *(haut) Spectre de Ac-Phe-Phe-Phe-NH_2 dans le domaine de la première transition $\pi\rightarrow\pi^*$ du chromophore aromatique. Les étoiles indiquent les longueurs d'ondes UV auxquelles ont été enregistrés les spectres de double résonance IR-UV. (bas) Spectres de double résonance IR-UV des conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-Phe-Phe-NH_2. Les spectres en bâtonnets représentent les fréquences harmoniques corrigées RI-B97-D/TZVPP des structures situées à droite de chaque spectre IR.*

Le spectre d'excitation UV de Ac-Phe-Phe-Phe-NH_2 a été enregistré dans les mêmes conditions que celui de Ac-Phe-Phe-NH_2 (Figure 4.21). Trois conformères **A**, **B** et **C** ont été identifiés. Le conformère majoritaire est le conformère **A** ; il représente environ 86 % du signal d'ions enregistrés (hors fond). Les trois transitions les plus intenses de ce conformère (37 363, 37 376 et 37 513 cm^{-1}) sont probablement les origines des transitions $\pi\rightarrow\pi^*$ des trois chromophores aromatiques de la molécule. Les conformères **B** (37 544 cm^{-1}) et **C** (37 314 cm^{-1})

comptent ensuite respectivement pour ~9 % et ~5 % du signal d'ions. D'autres bandes sont également visibles sur le spectre UV, mais avec des intensités trop faibles pour permettre de les attribuer aux transitions des autres chromophores de ces conformères, ou à des transitions de conformères différents.

Les spectres de vibration des conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-Phe-Phe-NH_2 dans l'IR proche sont représentés dans la Figure 4.21. Le conformère **C** possède une bande à 3469 cm^{-1}, dans le domaine des vibrations d'élongation des groupements NH libres (Figure 4.8), sa structure doit donc être recherchée parmi celles où un des groupes NH ne participe à aucune interaction intramoléculaire. Les conformères **A** et **B**, ont chacun une bande située à la limite du domaine des groupements NH libres (respectivement à 3452 et 3459 cm^{-1}). Les fréquences de ces bandes ne sont toutefois pas assez basses pour pouvoir être attribuées avec certitude à des interactions NH-π ou C_5. Par conséquent, toutes les structures possédant trois ou quatre interactions intramoléculaires sont des candidates possibles pour ces conformères, ce qui augmente considérablement le nombre de géométries à comparer (Tableau 4.7).

Conf.	**Fréquences de vibration** (cm^{-1})					δ^{max} (cm^{-1})	δ^{RMS} (cm^{-1})	**ΔG (kJ · mol^{-1})** 0 K	300 K	**Liaisons H**			
A(exp)	**3378**	**3404**	**3420**	**3452**	**3530**				**0**				
d	*3376*	*3409*	*3427*	*3444*	*3531*	*8*	*5*	*45*	*31*	*π*	*π*	10	10
e	*3379*	*3395*	*3418*	*3448*	*3522*	*9*	*5*	*36*	*29*	*π*	*π*	*7*	*7*
f	*3387*	*3410*	*3423*	*3453*	*3520*	*10*	*6*	*14*	*13*	*5*	*π*	*π*	*10*
g	*3386*	*3401*	*3431*	*3449*	*3527*	*11*	*6*	*33*	*25*	*π*	*7*	*π*	*10*
h	*3389*	*3395*	*3420*	*3461*	*3527*	*11*	*6*	*23*	*20*	*X*	*π*	*10*	*10*
i	*3368*	*3393*	*3418*	*3460*	*3527*	*11*	*7*	*24*	*18*	*X*	*π*	*10*	*10*
j	*3383*	*3414*	*3432*	*3448*	*3534*	*12*	*7*	*25*	*17*	*π*	*π*	*10*	*10*
k	*3390*	*3413*	*3428*	*3456*	*3527*	*12*	*7*	*10*	*8*	*5*	*π*	*π*	*7*
l	*3376*	*3404*	*3424*	*3440*	*3531*	*12*	*3*	*11*	*8*	*π*	*π*	*10*	*10*
m	*3385*	*3413*	*3431*	*3440*	*3537*	*12*	*9*	*27*	*14*	*π*	*π*	*10*	*10*
n	*3373*	*3401*	*3433*	*3457*	*3531*	*13*	*5*	*31*	*26*	*X*	*π*	*10*	*10*
o	*3391*	*3394*	*3424*	*3459*	*3527*	*13*	*7*	*22*	*19*	*X*	*π*	*10*	*10*
p	*3379*	*3395*	*3427*	*3439*	*3522*	*13*	*7*	*34*	*27*	*π*	*π*	*π*	*7*
q	*3393*	*3409*	*3422*	*3438*	*3536*	*15*	*8*	*24*	*22*	*π*	*π*	*10*	*10*
r	*3385*	*3419*	*3427*	*3442*	*3522*	*15*	*9*	*19*	*17*	*5*	*π*	*π*	*10*
s	*3380*	*3417*	*3436*	*3452*	*3523*	*16*	*8*	*18*	*15*	*5*	*π*	*π*	*10*
t	*3394*	*3398*	*3430*	*3447*	*3523*	*16*	*9*	*45*	*31*	*π*	*π*	*10*	*10*
u	*3384*	*3420*	*3437*	*3439*	*3528*	*16*	*11*	*26*	*29*	*5*	*π*	*π*	*10*
v	*3386*	*3421*	*3432*	*3437*	*3525*	*17*	*11*	*19*	*13*	*π*	*π*	*π*	*10*
w	*3371*	*3411*	*3439*	*3462*	*3533*	*19*	*9*	*37*	*26*	*π*	*X*	*10*	*10*
x	*3385*	*3423*	*3437*	*3456*	*3519*	*19*	*11*	*19*	*22*	*π*	*π*	*X*	*13*
y	*3359*	*3409*	*3431*	*3434*	*3535*	*19*	*12*	*20*	*17*	*π*	*π*	*10*	*10*
z	*3363*	*3394*	*3440*	*3470*	*3527*	*20*	*13*	*8*	*2*	*X*	*7*	*π*	*10*

aa	*3398*	*3420*	*3432*	*3441*	*3532*	*20*	*12*	*15*	*18*	*5*	*π*	*π*	*10*
ab	*3394*	*3399*	*3441*	*3454*	*3520*	*21*	*11*	*37*	*27*	*π*	*π*	*10*	*10*
ac	*3386*	*3415*	*3441*	*3456*	*3538*	*21*	*10*	*11*	*12*	*X*	*π*	*10*	*10*
ad	*3378*	*3421*	*3441*	*3458*	*3540*	*21*	*11*	*22*	*18*	*π*	*π*	*10*	*π*
ae	*3400*	*3417*	*3427*	*3442*	*3532*	*22*	*11*	*25*	*21*	*5*	*π*	*π*	*10*
a	***3400***	***3411***	***3429***	***3446***	***3534***	***22***	***10***	***0***	***0***	***π***	***π***	***10***	***10***
af	*3356*	*3416*	*3431*	*3448*	*3536*	*22*	*11*	*25*	*21*	*π*	*π*	*10*	*10*
ag	*3401*	*3415*	*3429*	*3449*	*3538*	*23*	*11*	*9*	*8*	*π*	*π*	*10*	*10*
ah	*3370*	*3427*	*3440*	*3457*	*3512*	*23*	*15*	*21*	*27*	*π*	*π*	*X*	*13*
ai	*3401*	*3413*	*3431*	*3434*	*3537*	*23*	*14*	*23*	*13*	*π*	*π*	*10*	*10*
aj	*3391*	*3410*	*3444*	*3450*	*3537*	*24*	*10*	*20*	*21*	*π*	*π*	*10*	*10*
ak	*3380*	*3416*	*3444*	*3450*	*3522*	*24*	*9*	*18*	*12*	*5*	*π*	*π*	*10*
al	*3402*	*3406*	*3440*	*3457*	*3530*	*24*	*10*	*28*	*21*	*π*	*π*	*10*	*10*
am	*3354*	*3396*	*3420*	*3439*	*3528*	*24*	*10*	*13*	*10*	*π*	*X*	*10*	*10*
an	*3354*	*3405*	*3432*	*3434*	*3533*	*24*	*12*	*20*	*15*	*π*	*π*	*10*	*10*
ao	*3359*	*3395*	*3427*	*3477*	*3521*	*25*	*14*	*36*	*36*	*X*	*7*	*10*	*10*
ap	*3403*	*3426*	*3428*	*3441*	*3531*	*25*	*13*	*17*	*8*	*π*	*π*	*π*	*10*
aq	*3403*	*3415*	*3437*	*3441*	*3536*	*25*	*14*	*14*	*9*	*π*	*π*	*10*	*10*
ar	*3389*	*3404*	*3445*	*3463*	*3525*	*25*	*10*	*22*	*20*	*5*	*π*	*10*	*10*
as	*3395*	*3429*	*3436*	*3439*	*3527*	*25*	*15*	*24*	*16*	*π*	*π*	*10*	*13*
B(exp)	**3293**	**3389**	**3430**	**3459**	**3523**				**6**				
at	*3285*	*3397*	*3434*	*3461*	*3523*	*8*	*5*	*41*	*29*	*π*	*7*	*X*	*10*
b	***3280***	***3393***	***3437***	***3462***	***3526***	***13***	***6***	***16***	***7***	***X***	***7***	***π***	***10***
c	*3310*	*3395*	*3443*	*3461*	*3527*	*17*	*8*	*7*	*1*	*X*	*7*	*π*	*10*
au	*3282*	*3408*	*3439*	*3456*	*3534*	*19*	*10*	*47*	*33*	*π*	*7*	*X*	*10*
av	*3302*	*3410*	*3434*	*3460*	*3536*	*21*	*11*	*46*	*35*	*π*	*7*	*X*	*10*
aw	*3290*	*3387*	*3435*	*3437*	*3525*	*22*	*7*	*16*	*9*	*π*	*7*	*π*	*10*
ax	*3314*	*3392*	*3437*	*3437*	*3526*	*22*	*11*	*9*	*5*	*π*	*7*	*π*	*10*
ay	*3305*	*3367*	*3436*	*3446*	*3520*	*22*	*11*	*21*	*20*	*π*	*7*	*π*	*10*
az	*3316*	*3387*	*3426*	*3481*	*3525*	*23*	*11*	*37*	*43*	*X*	*π*	*10*	*10*
ba	*3314*	*3413*	*3447*	*3464*	*3527*	*24*	*14*	*14*	*12*	*X*	*7*	*π*	*10*
bb	*3300*	*3414*	*3450*	*3461*	*3536*	*25*	*13*	*34*	*20*	*X*	*7*	*π*	*10*
C(exp)	***3315***	***3406***	***3433***	***3469***	***3517***				**7**				
c	***3310***	***3395***	***3443***	***3461***	***3527***	***11***	***9***	***7***	***1***	***X***	***7***	***π***	***10***
ba	*3314*	*3413*	*3447*	*3464*	*3527*	*14*	*8*	*14*	*12*	*X*	*7*	*π*	*10*
bc	*3334*	*3407*	*3450*	*3466*	*3519*	*19*	*8*	*40*	*25*	*X*	*7*	*π*	*10*
av	*3302*	*3410*	*3434*	*3460*	*3536*	*19*	*9*	*46*	*35*	*π*	*7*	*X*	*10*
bb	*3300*	*3414*	*3450*	*3461*	*3536*	*19*	*14*	*34*	*20*	*X*	*7*	*π*	*10*
az	*3316*	*3387*	*3426*	*3481*	*3525*	*19*	*11*	*37*	*43*	*X*	*π*	*10*	*10*
bd	*3335*	*3407*	*3450*	*3466*	*3519*	*20*	*8*	*41*	*32*	*X*	*7*	*π*[b]	*10*
be	*3301*	*3415*	*3435*	*3465*	*3538*	*21*	*10*	*21*	*15*	*X*	*7*	*π*	*10*
bf	*3289*	*3416*	*3441*	*3466*	*3530*	*26*	*12*	*32*	*31*	*X*	*7*	*π*	*10*

Tab. 4.7 – *Comparaison des données expérimentales et théoriques (en italique) obtenues pour les conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-Phe-Phe-NH_2. Se référer à la légende du Tableau 4.6 pour plus de détails.*

Le Tableau 4.7 montre que les fréquences de vibrations du conformère **A** ne sont pas très discriminantes, plus d'une trentaine de structures correspondent aux critères fixés sur les valeurs de δ^{max} et δ^{RMS}. Pour aller plus loin dans l'attribution, il est alors nécessaire de prendre en compte le critère énergétique : le conformère **A** étant très majoritaire, il doit se trouver parmi les structures les plus basses en énergies. Même si la (ou les) température(s) conformationnelle(s) de ce système ne sont pas connues précisément, le choix d'une température arbitraire de 300 K pour calculer les enthalpies libres fournit généralement une bonne approximation et permet de désigner les structures les plus probables. En tenant compte du critère énergétique ($\Delta G(300\ K) < 5\ kJ \cdot mol^{-1}$), le nombre de structures possibles pour ce conformère n'est plus que de deux : les structures *a* et *z*. La bande à 3378 cm^{-1} de **A** est la bande la moins bien prédite par la structure *a* ($\delta^{max} = 22\ cm^{-1}$), elle correspond à la vibration d'élongation d'un groupement NH impliqué dans une liaison hydrogène C_{10}. Cette différence peut donc s'expliquer par une géométrie légèrement incorrecte de la liaison hydrogène C_{10}. Il est en revanche beaucoup plus difficile de proposer une explication à la valeur anormalement basse qu'aurait la fréquence de vibration d'élongation du groupement NH libre de la structure *z* (prédite ici à 3470 cm^{-1}) par rapport à la fréquence de vibration de **A** à 3452 cm^{-1}. Le meilleur candidat pour le conformère **A** est donc la structure *a*.

Comme dans le cas précédent, la comparaison des fréquences calculées avec la fréquence à 3459 cm^{-1} du conformère **B** peut servir de bon indicateur de la qualité de l'attribution. Cette fréquence peut correspondre soit à une fréquence de vibration anormalement basse d'un groupement NH libre, soit à un groupement NH impliqué dans une liaison hydrogène très faible. Quatre structures n'arrivent pas à reproduire cette fréquence de vibration et peuvent être éliminées directement : les structures *aw*, *ax* et *ay* ont une fréquence typique d'une interaction NH-π (3437 ou 3446 cm^{-1}) et la structure *az* celle d'un groupement NH libre (3481 cm^{-1}). Parmi les structures restantes, plusieurs ont des valeurs de ΔG à 300 K supérieures à $20\ kJ \cdot mol^{-1}$, ce qui rendrait leur observation expérimentale très improbable. Ces deux critères, sur les fréquences et l'énergie, ne laissent plus que trois possibilités pour la structure du conformère **B** : *b*, *c* ou *ba*. Ces trois conformations, très proches, sont toutes les trois caractérisées par le même réseau de liaison hydrogène ($X\text{-}C_7\text{-}\pi\text{-}C_{10}$) et possèdent de plus des angles dièdres Φ et Ψ proches (géométries coude γ_L pour la liaison hydrogène C_7 et coude β type I pour la liaison hydrogène C_{10}). L'orientation des chaînes latérales représente la principale différence entre les trois structures : g- g- g+, g- g+ g+ et a g- g+ respectivement pour *b*, *c* et *ba*. En conclusion, la structure *b* est celle qui présente le meilleur accord avec les fréquences expérimentales et le

conformère **B** est très probablement une structure X-$C_{7,L}$-π-$C_{10,I}$, même si l'incertitude demeure quant à l'orientation des chaînes latérales.

Un critère énergétique similaire à celui utilisé pour le conformère **B** peut être appliqué au conformère **C**. En éliminant les structures possédant un ΔG à 300 K supérieur ou égal à 20 kJ · mol^{-1}, il ne reste que trois structures à considérer : *c*, *ba* et *be*. Le repliement de la chaîne principale est également identique dans les trois structures (X-$C_{7,L}$-π-$C_{10,I}$) et peut donc être attribué au conformère **C**. La structure *c*, possédant à la fois un bon accord en fréquence et l'énergie la plus basse parmi les trois, est donc la structure la plus probable du conformère **C** mais malgré ça l'orientation des chaînes latérales reste incertaine (g- g+ g+ dans *c*, a g- g+ dans *ba* et *be*).

On peut remarquer que l'attribution des conformères de Ac-Phe-Phe-Phe-NH_2 est moins définitive que celle réalisée pour Ac-Phe-Phe-NH_2. Dû à l'augmentation rapide du nombre de repliements possibles lorsque la chaîne augmente, et en tenant compte des incertitudes provenant des méthodes théoriques, il devient de plus en plus difficile de déterminer complètement les structures des conformères. On commence, avec ce tripeptide protégé, à approcher la limite en taille des structures de systèmes flexibles pouvant être caractérisées uniquement à partir des fréquences de vibration dans l'IR proche.

4.3.2.c Rôle structurel des interactions Ar-Ar

Des paramètres (valeurs des angles dièdres et nature de l'interaction Ar-Ar) des structures attribuées aux conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-Phe-NH_2 sont indiqués dans le Tableau 4.8. Le conformère **A** a une structure en coude β type I. Le conformère **C** possède une structure β_L - γ_L, déjà observée pour les dipeptides de la série Ac-Phe-Xxx-NH_2 [57]. Le cas du conformère **B** est plus inhabituel car la géométrie du premier acide aminé ne correspond ni à une préférence conformationnelle locale d'un acide aminé (liaison hydrogène C_5 ou C_7) ni celle d'une liaison hydrogène d'un ordre plus élevé ($C_{n>7}$). C'est la première fois qu'une géométrie de ce type (δ_L - γ_L) est observée pour un dipeptide en phase gazeuse. Il est intéressant de remarquer que la géométrie de **B** est intermédiaire entre celle de **A** et de **C** : **B** diffère de **A** principalement par les angles Φ_1 et Ψ_2 et de **C** par l'angle Ψ_1.

Malgré des géométries très différentes, les conformères de Ac-Phe-Phe-NH_2 et Ac-Phe-Phe-Phe-NH_2 ont en commun d'être tous stabilisés par des interactions entre cycles aromatiques, ce qui montre le rôle important que jouent ces interactions ar-ar lors du repliement. Ces interactions sont suffisamment fortes pour entrer en compétition avec les préférences

structurelles de la chaîne principale et modifier profondément les distributions conformationnelles par rapport aux dipeptides protégés Ac-Xxx-Phe-NH_2 et Ac-Phe-Xxx-NH_2. La géométrie γ_L-γ_L des conformères majoritaires des peptides Ac-Xxx-Phe-NH_2 n'est pas observée dans Ac-Phe-Phe-NH_2 car elle ne permet pas la formation d'interactions ar-ar et est donc déstabilisée par rapport aux structures où celles-ci sont possibles, comme par exemple les coudes β. A l'inverse, des géométries généralement non observées (δ_L - γ_L) peuvent être favorisées dans Ac-Phe-Phe-NH_2 par leur capacité à former des interactions ar-ar.

	Angles dièdres				**Interactions ar-ar**	**Géométries**
	Φ_1 (°)	Ψ_1 (°)	Φ_2 (°)	Ψ_2 (°)		
A	– 68	– 13	– 100	7	en T	Coude β type I
B	– 138	25	– 94	68	en V	δ_L - γ_L
C	– 160	152	– 82	63	face à face	β_L - γ_L

Tab. 4.8 – *Valeurs des angles dièdres des orientations relatives des deux cycles aromatiques dans les conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-Phe-NH_2.*

On peut constater que les interactions ar-ar possèdent des formes variées dans les trois conformères de Ac-Phe-Phe-NH_2 : (i) une interaction en T pour **A**, (ii) une interaction en V pour **B** et (iii) une géométrie avec deux cycles face à face, légèrement décalés l'un par rapport à l'autre, pour **C** ; ce qui rappelle les résultats obtenus sur le dimère de benzène [51, 53]. Le caractère peu directionnel des interactions ar-ar est ainsi mis en évidence pour les interactions entre deux cycles aromatiques situés sur des chaînes latérales d'acides aminés. C'est ce caractère qui, relié à la flexibilité de la chaîne principale d'un peptide, permet l'observation de nombreuses conformations stabilisées par des interactions ar-ar.

4.3.3 Conclusion

La spectroscopie de double résonance IR-UV a permis de déterminer les structures de trois conformères de Ac-Phe-Phe-NH_2 et de proposer trois structures pour les conformères de Ac-Phe-Phe-Phe-NH_2. Nous avons vu que les paysages conformationnels de ces deux molécules sont gouvernés par la présence d'interactions ar-ar. Les peptides étudiés sont donc des modèles intéressants pour étudier de façon précise les interactions dispersives mises en jeu lors de la création des domaines hydrophobes des protéines, en éliminant les contributions dues au solvant.

Le caractère faiblement directionnel des interactions ar-ar permet en particulier d'apporter une certaine flexibilité à la chaîne peptidique en rendant énergétiquement accessible de nouvelles conformations.

La proximité des cycles aromatiques, situés sur des acides aminés contigus, est sans doute une des raisons pour laquelle les interactions ar-ar ont un rôle structurel aussi important dans Ac-Phe-Phe-NH_2 et Ac-Phe-Phe-Phe-NH_2. Par conséquent, il serait intéressant d'observer comment évolue la compétition entre les interactions ar-ar et le repliement de la chaîne principale lorsque les acides aminés aromatiques sont séparés par un, ou plusieurs, acides aminés non aromatiques dans la chaîne peptidique. L'étude de tels systèmes pourrait fournir des informations complémentaires sur les mécanismes mis jeu lors des premières étapes du repliement des protéines.

4.4 Conclusion du Chapitre 4

Nous nous sommes attachés dans ce chapitre à montrer que la résolution et la sélectivité des techniques spectroscopiques en phase gazeuse, et en particulier celles de la spectroscopie de double résonance IR-UV, pouvaient apporter des informations structurelles précises sur des systèmes très variés. Nous avons ainsi pu distinguer les différents isotopomères de Ac-Phe-NH_2 et déterminer les différents sites de solvatation de cette molécule, ce qui a permis ensuite de proposer un mécanisme de formation des hydrates dans la détente supersonique. Il a également été possible d'obtenir des informations précieuses sur la compétition entre les différentes interactions intramoléculaires dans des peptides polyaromatiques (interactions ar-ar vs liaisons hydrogène de la chaîne principale).

Pour exploiter les informations spectroscopiques obtenues par la méthode de double résonance IR-UV, une hypothèse a cependant été utilisée durant tout ce chapitre. Nous avons dû considérer à plusieurs reprises (par exemple lors de l'attribution de Ac-Phe-Phe-NH_2) que le rapport d'intensité des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ dans l'UV, observé à travers l'acquisition d'un signal d'ions, pouvait être utilisé pour estimer les abondances des différentes conformations dans la détente supersonique. Cette hypothèse, communément admise, est d'ordinaire justifiée par le fait que les sections efficaces d'ionisation dépendent peu de la conformation d'une molécule ou d'un complexe. Bien que discutable, cette justification passe également sous silence les propriétés dynamiques de l'état excité : sa durée de vie doit être suffisamment grande pour que le processus d'IR2P reste efficace. Deux constats réalisés dans ce chapitre peuvent toutefois nous amener à

remettre cette hypothèse en question. D'une part, relativement peu de structures différentes ont été détectées pour les complexes de Ac-Phe-NH_2 avec l'eau malgré le grand nombre de géométries calculées à des énergies proches. On aurait pu s'attendre en particulier à observer la géométrie $R^L(a)\ S_2(d)$, intervenant dans le mécanisme d'isomérisation du conformère **A** de Ac-Phe-NH_2 en **W** ou **X**. Et d'autre part, nous avons vu dans le cas des dipeptides protégés Ac-Xxx-Phe-NH_2 que l'intensité des transitions UV pouvaient varier fortement d'un conformère à un autre lors d'excitations vibroniques vers la région 6 de l'état $\pi\rightarrow\pi^*$. Cela pose le problème de savoir si des conformations pourraient demeurer « invisibles » dans les spectres IR2P-1C réalisés à l'origine de la transition $\pi\rightarrow\pi^*$. Pour répondre à cette question, nous appliquerons dans le Chapitre 5 les techniques spectroscopiques sélectives en conformation déjà présentées, à l'étude des mécanismes de relaxation électronique de l'état $\pi\pi^*$.

4.5 Bibliographie

[1] H. S. Biswal, E. Gloaguen, Y. Loquais, B. Tardivel et M. Mons, *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, 3, (6), 755-759.

[2] W. Chin, M. Mons, J.-P. Dognon, R. Mirasol, G. Chass, I. Dimicoli, F. Piuzzi, P. Butz, B. Tardivel, I. Compagnon, G. von Helden et G. Meijer, *J Phys. Chem. A* **2005**, 109, 5281-5288.

[3] M. Gerhards, C. Unterberg, A. Gerlach et A. Jansen, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6, (10), 2682-2690.

[4] J. B. Hopkins, D. E. Powers et R. E. Smalley, *J. Chem. Phys.* **1980**, 72, (9), 5039-5048.

[5] P. Ball, *Chem. Rev.* **2008**, 108, (1), 74-108.

[6] C. Mattos et D. Ringe, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, 11, (6), 761-764.

[7] M. S. Cheung, A. E. Garcia et J. N. Onuchic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, (2), 685-690.

[8] J. E. Shea, J. N. Onuchic et C. L. Brooks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, (25), 16064-16068.

[9] M. Marino, L. Braun, P. Cossart et P. Ghosh, *Mol. Cell.* **1999**, 4, (6), 1063-1072.

[10] R. N. Pribble et T. S. Zwier, *Science* **1994**, 265, (5168), 75-79.

[11] J. R. Carney, B. C. Dian, G. M. Florio et T. S. Zwier, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, (23), 5596-5597.

[12] M. Schmitt, M. Bohm, C. Ratzer, C. Vu, L. Kalkman et W. L. Meerts, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, (29), 10356-10364.

[13] J. R. Clarkson, E. Baquero, V. A. Shubert, E. M. Myshakin, K. D. Jordan et T. S. Zwier, *Science* **2005**, 307, (5714), 1443-1446.

[14] J. L. Alonso, E. J. Cocinero, A. Lesarri, M. E. Sanz et J. C. Lopez, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2006**, 45, (21), 3471-3474.

[15] K. T. Lee, J. Sung, K. J. Lee, S. K. Kim et Y. D. Park, *J. Chem. Phys.* **2002**, 116, (19), 8251-8254.

[16] T. Ebata, T. Hashimoto, T. Ito, Y. Inokuchi, F. Altunsu, B. Brutschy et P. Tarakeshwar, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8, (41), 4783-4791.

[17] H. Fricke, K. Schwing, A. Gerlach, C. Unterberg et M. Gerhards, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, (14), 3511-3521.

[18] G. Tarczay, S. Gobi, E. Vass et G. Magyarfalvi, *Vib. Spectrosc.* **2009**, 50, (1), 21-28.

[19] H. Zhu, M. Blom, I. Compagnon, A. M. Rijs, S. Roy, G. von Helden et B. Schmidt, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, (14), 3415-34253425.

[20] C. P. Rao, R. Nagaraj, C. N. R. Rao et P. Balaram, *Biochemistry* **1980**, 19, (3), 425-431.

[21] R. J. Graham, R. T. Kroemer, M. Mons, E. G. Robertson, L. C. Snoek et J. P. Simons, *J. Phys. Chem. A* **1999**, 103, 9706--9711.

[22] E. G. Robertson, M. R. Hockridge, P. D. Jelfs et J. P. Simons, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, 3, (5), 786-795.

[23] W. Y. Sohn, M. Kim, S. S. Kim, Y. D. Park et H. Kang, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, (15), 7006-7011.

[24] W. Chin, F. Piuzzi, I. Dimicoli et M. Mons, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8, 1033-1048.

[25] C. D. Poon, E. T. Samulski, C. F. Weise et J. C. Weisshaar, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, (23), 5642-5643.

[26] Z. S. Shi, C. A. Olson, G. D. Rose, R. L. Baldwin et N. R. Kallenbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, (14), 9190-9195.

[27] R. J. Lavrich et M. J. Tubergen, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, (12), 2938-2943.

[28] A. Engdahl, B. Nelander et P. O. Astrand, *J. Chem. Phys.* **1993**, 99, (7), 4894-4907.

[29] J. Ceponkus, G. Karlstrom et B. Nelander, *J. Phys. Chem. A* **2005**, 109, (35), 7859-7864.

[30] J. Ceponkus, P. Uvdal et B. Nelander, *J. Chem. Phys.* **2008**, 129, (19), 194306.

[31] Y. Q. Liu, M. Weimann et M. A. Suhm, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6, (13), 3315-3319.

[32] R. M. Balabin, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, (46), 15075-15078.

[33] J. M. Bakker, L. M. Aleese, G. Meijer et G. von Helden, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 91, (20), 4.

[34] P. Carcabal, R. T. Kroemer, L. C. Snoek, J. P. Simons, J. M. Bakker, I. Compagnon, G. Meijer et G. von Helden, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6, (19), 4546-4552.

[35] A. M. Rijs, E. R. Kay, D. A. Leigh et W. J. Buma, *J. Phys. Chem. A* **2011**, 115, (34), 9669-9675.

[36] V. Barone, *J. Chem. Phys.* **2005**, 122, (1), 014108.

[37] M. Neff et G. Rauhut, *J. Chem. Phys.* **2009**, 131, (12), 124129.

[38] P. Muller, *Pure Appl. Chem.* **1994**, 66, (5), 1077-1184.

[39] D. Chandler, *Nature* **2005**, 437, (7059), 640-647.

[40] C. Tanford, *Science* **1978**, 200, (4345), 1012-1018.

[41] R. L. Baldwin, *Science* **2002**, 295, (5560), 1657-1658.

[42] J. J. T. Huang, R. W. Larsen et S. I. Chan, *Chem. Commun.* **2012**, 48, (4), 487-497.

[43] S. K. Burley et G. A. Petsko, *Science* **1985**, 229, (4708), 23-28.

[44] S. M. Butterfield, P. R. Patel et M. L. Waters, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, (33), 9751-9755.

[45] A. Thomas, R. Meurisse et R. Brasseur, *Proteins-Struct. Funct. Genet.* **2002**, 48, (4), 635-644.

[46] B. S. Frank, D. Vardar, D. A. Buckley et C. J. McKnight, *Protein Sci.* **2002**, 11, (3), 680-687.

[47] C. D. Tatko et M. L. Waters, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, (32), 9372-9373.

[48] E. A. Meyer, R. K. Castellano et F. Diederich, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2003**, 42, (11), 1210-1250.

[49] L. M. Salonen, M. Ellermann et F. Diederich, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2011**, 50, (21), 4808-4842.

[50] B. L. Mellor, E. C. Cortes, D. D. Busath et B. A. Mazzeo, *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, (10), 2205-2213.

[51] E. Arunan et H. S. Gutowsky, *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, (5), 4294-4296.

[52] P. Hobza, H. L. Selzle et E. W. Schlag, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, (48), 18790-18794.

[53] B. Bandyopadhyay, T. C. Cheng, S. E. Wheeler et M. A. Duncan, *J. Phys. Chem. A* **2012**, 116, (26), 7065-7073.

[54] N. R. Pillsbury, J. A. Stearns, C. W. Muller, D. F. Plusquellic et T. S. Zwier, *J. Chem. Phys.* **2008**, 129, (11), 114301.

[55] J. A. Stearns, N. R. Pillsbury, K. O. Douglass, C. W. Muller, T. S. Zwier et D. F. Plusquellic, *J. Chem. Phys.* **2008**, 129, (22), 224305.

[56] W. Chin, J.-P. Dognon, C. Canuel, F. Piuzzi, I. Dimicoli, M. Mons, I. Compagnon, G. von Helden et G. Meijer, *J. Chem. Phys.* **2005**, 122, (5), 054317.

[57] W. Chin, F. Piuzzi, J.-P. Dognon, I. Dimicoli et M. Mons, *J. Chem. Phys.* **2005**, 123, (8), 084301.

[58] E. Gloaguen, H. Valdes, F. Pagliarulo, R. Pollet, B. Tardivel, P. Hobza, F. Piuzzi et M. Mons, *J. Phys. Chem. A* **2010**, 114, (9), 2973-2982.

Chapitre 5

Dynamique de relaxation de l’énergie électronique d’un chromophore aromatique dans de courtes chaînes peptidiques

Chapitre 5

Dynamique de relaxation de l'énergie électronique d'un chromophore aromatique dans de courtes chaînes peptidiques

Dans la nature, les protéines sont quotidiennement soumises à des rayonnements UV capables d'exciter électroniquement les chromophores aromatiques des acides aminés phénylalanine, tryptophane et tyrosine. Or, l'absorption d'un photon UV par une protéine peut être le point de départ de réactions photochimiques qui entraîneront une dégradation de cette dernière. L'existence de mécanismes de relaxation non-radiatifs efficaces est alors d'une importance cruciale pour assurer leur photostabilité [1, 2, 3]. L'étude de ces mécanismes nécessite une étroite collaboration entre expérience (mesures de fluorescence, méthodes pompe-sonde) et théorie (calcul des états excités avec des méthodes de chimie quantique), qui est cependant difficile à mener sur des systèmes aussi gros que des protéines. Des informations précieuses peuvent alors être obtenues à travers l'étude de peptides modèles [2, 4, 5, 6, 7]. Nous avons en particulier montré dans le chapitre précédent que la spectroscopie en phase gazeuse permettait de caractériser et d'étudier sélectivement les structures d'un peptide modèle. Nous allons mettre à profit cette sélectivité dans ce chapitre pour traiter de la relation entre conformation et dynamique de relaxation.

Cette approche expérimentale a déjà été utilisée pour étudier les mécanismes de relaxation de plusieurs acides aminés aromatiques protonés [8, 9, 10, 11] et a notamment permis de révéler des dynamiques femtoseconde dans le cas du tryptophane protoné [12]. Parallèlement, grâce à des outils théoriques de plus en plus perfectionnés, il a été possible de préciser la nature des états excités et des éventuelles intersections coniques impliqués dans ces mécanismes [13, 14, 15]. Ainsi, les conditions pour une confrontation fructueuse des approches expérimentale et théorique

apparaissent désormais remplies [16]. En ce qui concerne les molécules neutres, un mécanisme de relaxation non-radiatif a été proposé par Shemesh *et al.* à partir de calculs réalisés sur des peptides naturels ou protégés, contenant un acide aminé tryptophane (Ac-Trp-NHMe [17], Trp-Gly [18]) ou phénylalanine (Ac-Ala-Phe-NH_2 [19], Gly-Phe-Ala [20]). Même s'il fait l'objet d'une promotion remarquée [16], on peut cependant noter que, ce mécanisme faisant intervenir un transfert d'un atome d'hydrogène le long d'une liaison hydrogène C_7, son applicabilité est limité aux conformations en coude γ.

L'objectif de cette étude a été de tirer profit de la caractérisation des structures des conformères de Ac-Phe-NH_2 réalisée dans des travaux précédents, afin d'observer l'influence du changement de l'environnement proche du chromophore sur la dynamique de relaxation du premier état excité ππ*. Nous avons cherché à déterminer les mécanismes de relaxation intervenant dans ce système modèle en s'appuyant sur une comparaison entre des résultats de calculs de chimie quantique et des données expérimentales variées (effet de la deutération, de la méthylation). Les progrès effectués sur cette molécule simple nous ont ensuite amené à nous intéresser à des systèmes de plus en plus complexes, c'est-à-dire des peptides de plus grande taille ainsi qu'à des espèces microsolvatées.

5.1 Effet de l'environnement du chromophore : exemple de la phénylalanine protégée

Une mesure préliminaire de la durée de vie du premier état excité ππ* des conformères **A** et **C** de Ac-Phe-NH_2 a été réalisée en 2005 par Chin *et al.*, grâce à des expériences de déclin de fluorescence [21]. Des durées de vie de 62 ± 2 ns et 42 ± 2 ns avaient respectivement été trouvées pour ces deux conformères à l'origine de la transition π→π*. En revanche, la durée de vie du conformère **B** n'avait pas pu être enregistrée car aucune fluorescence provenant de celui-ci n'avait pu être détectée. Nous avons réalisé à nouveau ces expériences durant cette thèse : une meilleure sensibilité à cette fois permis de détecter un signal de fluorescence dû au conformère **B** mais d'intensité trop faible par rapport à **A** et **C** pour pouvoir en déduire la durée de vie de l'état excité ππ* de ce conformère.

Les durées de vie de l'état excité ππ* des conformères de la molécule Ac-Phe-NH_2 peuvent être comparées à celle obtenue pour le toluène, le chromophore de la phénylalanine dans le proche UV. Des durées de vie de l'état ππ* du toluène, isolé en détente supersonique, ont été

enregistrés par Lawrance *et al.* par des mesures de déclin de fluorescence, pour différentes transitions vibroniques vers cet état [22] : une valeur de 86,4 ± 0,7 ns a été obtenue après excitation à l'origine de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ dans ces expériences. De plus, les rendements quantiques de différentes voies de relaxation de l'état $\pi\pi^*$ du toluène ont été déterminés par Burton *et al.*[23] par comparaison avec les valeurs déjà obtenues pour le benzène. Ils ont obtenu une valeur de 0,30 ± 0,07 pour le rendement quantique de fluorescence du toluène en comparant l'intensité de l'émission de fluorescence de ce dernier et du benzène et ont ensuite estimé la valeur du rendement quantique de conversion intersystème (CIS) vers l'état triplet à 0,72 ± 0,01 en utilisant la méthode de Cundall [24, 25], une méthode de transfert d'état triplet vers une espèce intermédiaire (ici le *cis*-but-2-ène). Le rendement quantique de conversion intersystème du toluène a également été calculé par Dietz *et al.* [26] en utilisant une méthode pompe-sonde pour mesurer l'évolution de la population du premier état singulet et triplet en fonction du temps. Une valeur de 0,64 ± 0,05 a alors été obtenue. On peut remarquer que la somme des rendements quantiques de fluorescence et de croisement intersystème est très proche de 1. Par conséquent, on peut considérer que ce sont les deux seules voies de relaxation du toluène et que les processus de conversion interne sont négligeables. Les durées de vie des processus de fluorescence (τ_{fluo}) et de croisement intersystème (τ_{CIS}) peuvent donc être estimées d'après les équations suivantes :

$$\tau_{fluo} = \frac{\tau_{\pi\pi^*,\exp}}{\Phi_{fluo}} \approx 290\ ns \qquad \text{(Eq. 5.1)} \qquad\qquad \tau_{CIS} = \frac{\tau_{\pi\pi^*,\exp}}{\Phi_{CIS}} \approx 125\ ns \qquad \text{(Eq. 5.2)}$$

avec $\tau_{\pi\pi^*,\,\exp}$ = 86,4 ns, la durée de vie expérimentale de l'état $\pi\pi^*$ tirée de la Réf. [22]

Φ_{fluo} et Φ_{CIS} les rendements quantiques de fluorescence et de croisement intersystème tirés de la Réf. [23], respectivement pris égaux à 0,30 et 0,70.

Les différences observées entre les trois conformères de Ac-Phe-NH_2 et avec le toluène signifient donc que d'autres mécanismes de relaxation non-radiatifs, dépendants de la conformation, entrent possiblement en compétition lorsque le chromophore aromatique est situé sur la chaîne latérale d'un acide aminé. Un effet conformationnel similaire à celui de Ac-Phe-NH_2 a été reporté pour la phénylalanine naturelle (H-Phe-OH) avec des durées de vie du premier état excité $\pi\pi^*$ variant de 20-30 ns à environ 90 ns selon les conformations [27, 28] et avait été attribué soit à l'augmentation de la probabilité du croisement inter-système dans une conformation [27], soit à un couplage de l'état $\pi\pi^*$ avec un état $n\pi^*$ [28].

Dans le but de déterminer les mécanismes de relaxation non-radiatifs de l'état $\pi\pi^*$ de la phénylalanine protégée, nous avons complété les études de déclin de fluorescence par (i) des

expériences pompe-sonde d'IR2P-2C, dans le domaine nanoseconde pour tous les conformères et dans le domaine picoseconde pour le conformère **B** et (ii) des études des effets de la deutération et de la méthylation du groupement NH_2 terminal sur les dynamiques de relaxation.

5.1.1 Données expérimentales

5.1.1.a Dynamiques de relaxation des conformères de Ac-Phe-NH_2

Les déclins de population du premier état excité ππ*, après excitation à l'origine de la transition $\left(0_0^0\right)$ ou dans la région de la transition vibronique $6b_0^1$, ont été enregistrés par IR2P-2C dans le domaine nanoseconde au LFP (Saclay) pour les trois conformères de Ac-Phe-NH_2 (Figure 5.1). Une expérience d'IR2P-2C dans le domaine picoseconde a également été réalisée au CLUPS (Orsay) dans le but de déterminer la durée de vie de l'état excité du conformère **B** après excitation à l'origine. Les durées de vie des états excités ont ensuite été calculées en ajustant manuellement une fonction Π(t) aux déclins de population expérimentaux, où Π(t) correspond au produit de convolution d'une fonction d'appareil C(t) et d'un déclin monoexponentiel avec une durée de vie τ (Eq. 5.3).

$$\Pi(t) = \int_0^\infty \exp\left(-\frac{x}{\tau}\right) C(t-x)\,dx \qquad \text{(Eq. 5.3)}$$

L'allure temporelle des impulsions des lasers picosecondes a été déterminée précédemment [29] et peut être assimilée à une fonction gaussienne de 10 ps de largeur à mi-hauteur. Dans le régime picoseconde, la fonction d'appareil C_{ps} utilisée a été la fonction suivante :

$$C_{ps}(t) = \frac{1}{\cosh^2\left(\frac{t}{L}\right)} \qquad \text{(Eq. 5.4)}$$

avec L = 15 ps, un paramètre lié à la largeur temporelle de la fonction d'appareil. Le meilleur ajustement de la fonction Π(t) au déclin du signal pompe-sonde picoseconde a été obtenu pour une durée de vie du conformère **B** de 1,5 ns ± 0,3 ns, soit une valeur 20 à 40 fois inférieure à celle qui avait été mesurée pour les autres conformères par des mesures de fluorescence. La dynamique rapide du conformère **B** permet donc de comprendre pourquoi aucun signal de fluorescence n'avait été détecté pour ce dernier : son rendement quantique de fluorescence est beaucoup plus faible dû à des mécanismes non-radiatifs plus efficaces que dans les conformères **A** ou **C**.

La durée de vie du conformère **B** obtenue d'après les expériences en régime picoseconde a ensuite été utilisée pour déterminer la fonction d'appareil des expériences dans le domaine nanoseconde. En effet, comme cette durée de vie est plus courte que la durée des impulsions des lasers nanoseconde (~ 10 ns), le signal pompe-sonde de **B** dans ce domaine temporel est essentiellement dominé par la fonction d'appareil C_{ns}. Le résultat de l'ajustement a conduit à l'expression suivante de C_{ns} :

$$C_{ns}(t) = \frac{4}{\left[\exp\left(-\frac{t}{L'_1}\right) + \exp\left(-\frac{t}{L'_2}\right)\right]^2} \qquad \text{(Eq. 5.5)}$$

avec L'_1 = 4 ns et L'_2 = 13 ns.

Le fait de pouvoir observer par mesure de fluorescence un signal résonant pour les trois conformères de Ac-Phe-NH_2, ainsi que des durées de vie de l'état excité des conformères **A** et **C** proche de celles obtenues par la méthode pompe-sonde (Tableau 5.1), démontre que cette dernière technique sonde bien la durée de vie de l'état ππ* originellement excité. Des expériences ont également été réalisées en excitant vibroniquement la phénylalanine protégée (transition $6b_0^1$) et ont donné des résultats similaires à celles conduites à l'origine de la transition, y compris la durée de vie courte du conformère **B** (Figure 5.1). Un excès d'énergie d'environ 500 cm^{-1} dans ce mode de vibration n'a donc pas d'effet sur la dynamique de relaxation de l'état ππ*.

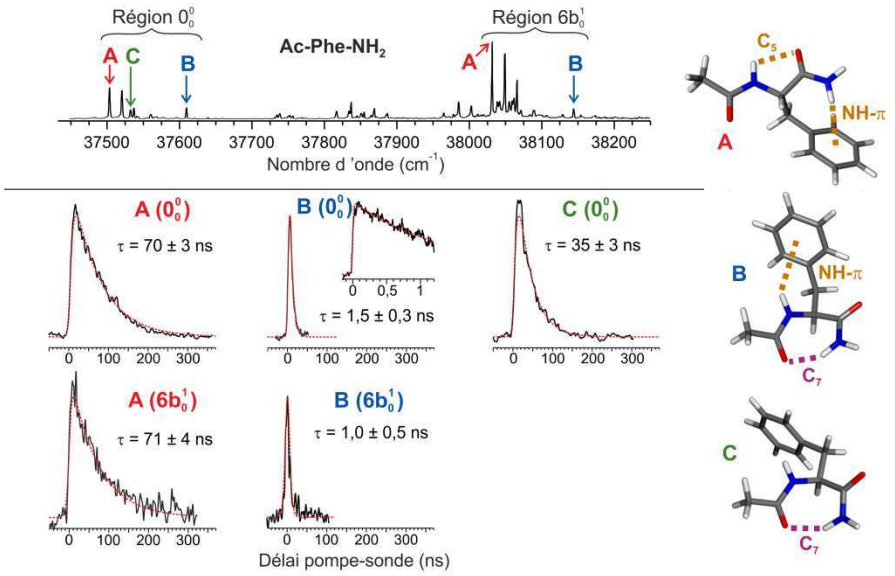


***Fig. 5.1** – (haut) Spectre d'excitation UV de Ac-Phe-NH_2 enregistré dans le domaine de la première transition π→π* du cycle aromatique (origine de la transition et transition vibronique $6b_0^1$). (bas) Déclins de population des conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2 (trait plein, noir) dans le domaine ns et ps (encart du graphe de **B** 0_0^0) avec leur meilleur ajustement (tiret, rouge).*

5.1.1.b Effet de la deutération

Les expériences IR2P-2C en régime picoseconde ont montré que la durée de vie du conformère **B** était 20 fois plus faible que celle du conformère **C**. Or, la seule différence entre ces deux structures réside dans l'orientation de la chaîne latérale aromatique, qui permet la formation d'une interaction NH-π dans **B** et pas dans **C**. Nous avons donc cherché à savoir si cette interaction particulière pouvait être l'origine de la dynamique rapide observée pour le conformère **B**. Un moyen pour cela est de remplacer l'atome d'hydrogène du groupement NH par un atome de deutérium. En effet, si le mécanisme de relaxation non-radiatif dominant dans **B** nécessite une distorsion de cette liaison N-H pour se produire, alors la substitution par un isotope plus lourd devrait provoquer une augmentation de la durée de vie de l'état ππ*. Un facteur 15 a par exemple été observé entre les durées de vie de l'état ππ* de différents isotopologues du phénol (durées de vie comprises entre ~2 et 30 ns) [30] et a ainsi permis de proposer un mécanisme de relaxation non-radiatif passant par l'élongation d'une liaison O-H [13]. De plus, nous avons montré dans le chapitre précédent qu'il était possible d'exciter sélectivement les différents isotopomères des conformères Ac-Phe-NH_2 (Figure 4.3), ce qui pourra permettre de différencier par IR2P-2C l'effet de la deutération en des sites précis.

Isotopologues		**Méthodes**	**A**	**B**	**C**
d_0	NH/NH_2	IR2P ps/ns	70 ± 3	1,5 ± 0,3	35 ± 3
		Fluo	69 ± 3	-	38 ± 4
d_1	NH/NHD	IR2P ns	-	< 3	-
	ND/NH_2	IR2P ns	-	< 3	-
d_2	NH/ND_2	IR2P ns	-	< 3	-
	ND/NHD	IR2P ns	-	< 3	-
d_3	ND/ND_2	IR2P ns	78 ± 4	< 3	44 ± 4

***Tab. 5.1** – Durées de vie du premier état excité ππ* des conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2, enregistrés à l'origine de la transition π→π*. La durée de vie de l'isotopologue d_0 du conformère **B** a été mesurée par des expériences en régime picoseconde. Les durées de vie obtenues par mesures de fluorescence indiquées dans le tableau sont celles qui ont été acquises pendant cette thèse, ce qui explique le léger écart avec les valeurs de la Réf. [21].*

Dû à la faible sélectivité entre les trois isotopomères des isotopologues d_1 et d_2 des conformères **A** et **C** de Ac-Phe-NH_2, seules les durées de vies de l'état ππ* des isotopologues d_0

et d_3 ont été mesurées et un faible effet de la deutération a été observé (Tableau 5.1). Des mesures ont également été réalisées sur les isotopologues du conformère **B** par IR2P-2C dans le régime nanoseconde (Figure 5.2). En effet, la largeur spectrale plus importante des lasers picoseconde n'aurait pas permis de résoudre le doublet à 37 610 et 37 615 cm^{-1} et donc de faire la distinction entre les effets d'une deutération d'un groupement NH ou d'un groupement NH_2. Aucune augmentation de la largeur à mi-hauteur du signal pompe-sonde n'a pu être mise en évidence pour les isotopologues de **B**, la durée de vie de leur état excité ππ* est inférieure à 3 ns. Finalement, comme aucun effet significatif de la deutération n'a été observé, il est peu probable que des distorsions des liaisons N-H soient impliquées dans les mécanismes de relaxation de ce système et une autre explication doit être trouvée à la dynamique particulière du conformère **B**. La piste suivante est alors de comparer les durées de vie de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe. Comme les structures des conformères de ces deux molécules sont très proches, il est alors possible de déterminer si des distorsions de la seconde liaison peptidique interviennent dans les mécanismes de relaxation.

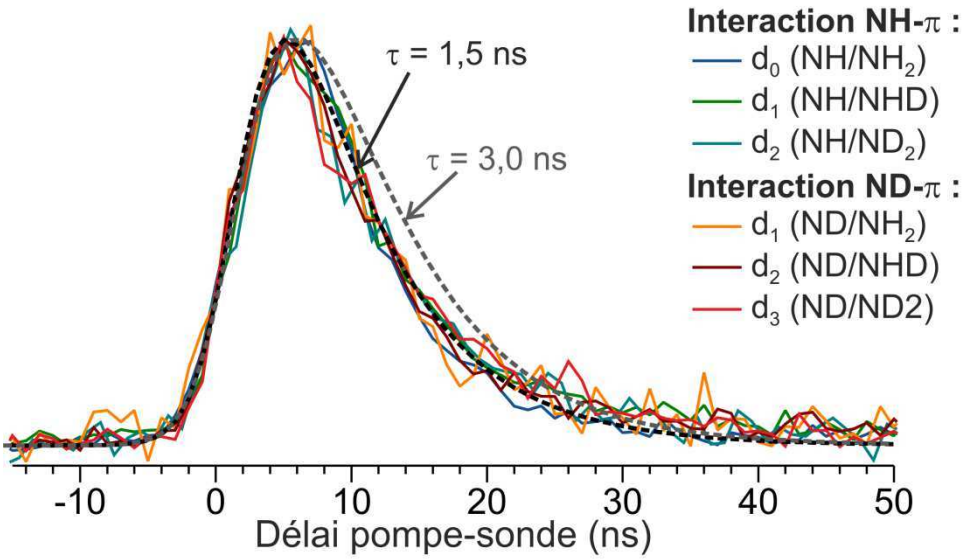


***Fig 5.2** – Déclins des signaux pompe-sonde (traits pleins) des isotopologues du conformère **B** de Ac-Phe-NH_2 et produits de convolution $\Pi(t)$ de la fonction d'appareil $C_{ns}(t)$ avec une exponentielle décroissante de durée de vie 1,5 ns (tirets, noir) et 3,0 ns (tirets, gris).*

5.1.1.c Effet de la méthylation du groupement NH_2 terminal

Les déclins des signaux pompe-sonde des conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2, enregistrés à l'origine de la première transition π→π*, sont comparés à ceux des conformères de Ac-Phe-NHMe dans la Figure 5.3. On peut remarquer que l'amplitude de l'effet de la méthylation

sur la durée de vie de l'état excité ππ* est différente pour les trois conformères : la durée de vie de l'état excité du conformère **A** de chaque molécule est identique tandis que celles des conformères **C** et **B** augmentent respectivement d'un facteur 1,8 et 30 après la méthylation.

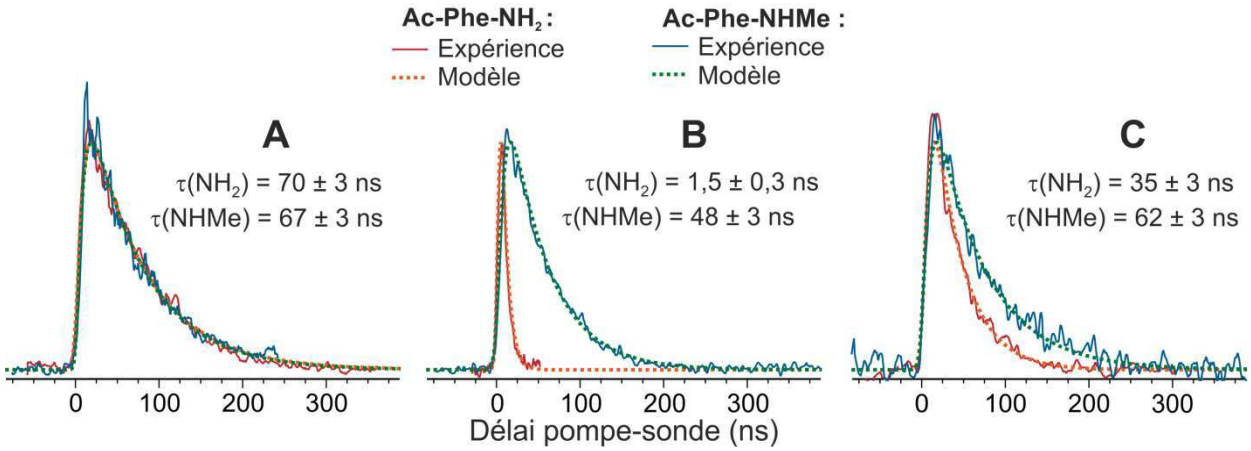


Fig. 5.3 – *Déclins des signaux pompe-sonde enregistrés aux origines de la première transition π→π* des conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe.*

En conclusion, les valeurs obtenues pour les durées de vie du premier état excité ππ* des phénylalanines protégées peuvent être rationnalisées de la façon suivante : (i) les durées de vie de l'état excité des conformères **A** étant proches de celle du toluène (86,4 ns), on peut supposer qu'elles sont également principalement limitées par un croisement intersystème et (ii) les durées de vie plus courtes obtenues pour les conformères **B** et **C** signifient probablement qu'une nouvelle voie de relaxation non-radiative peut être empruntée dans ces structures, dans laquelle le groupement NH_2 terminal joue un rôle particulier. Nous allons donc dans la suite essayer de caractériser celle-ci en déterminant les mécanismes de relaxation non-radiatifs susceptibles de se produire dans ces systèmes. Pour pouvoir comparer les données expérimentales obtenues aux résultats théoriques, il est possible d'estimer la durée de vie de la nouvelle voir de relaxation ($\tau_{\text{nouveau mécanisme}}$) en supposant que les autres processus (fluorescence et conversion intersystème) possèdent la même efficacité que pour le toluène, ce qui sera justifié en détail dans la partie suivante :

$$\frac{1}{\tau_{toluène}} + \frac{1}{\tau_{nouveau\ mécanisme}} = \frac{1}{\tau_{\pi\pi^*,\text{exp}}} \qquad \text{(Eq. 5.6)}$$

avec $\tau_{\text{toluène}}$ la durée de vie expérimentale du toluène tiré de la Réf. [22]

$\tau_{\pi\pi^*,\text{ exp}}$ les durées de vies expérimentale de l'état ππ* des phénylalanines protégées

Les durées de vie $\tau_{\text{nouveau mécanisme}}$ calculées d'après l'équation 5.6 pour les conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe sont rassemblées dans le Tableau 5.2. Si la durée de vie légèrement plus faible des conformères **A** par rapport au toluène était due à la présence d'une nouvelle voie de relaxation, celle-ci serait toutefois beaucoup moins efficace que le croisement intersystème dont la durée de vie a été estimée à environ 125 ns. Dans le conformère **B** de Ac-Phe-NHMe ces deux processus auraient à peu près la même efficacité. Finalement, le nouveau mécanisme est le processus majoritaire dans la relaxation de l'état $\pi\pi^*$ des conformères **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2.

Molécules		Durées de vie (ns) A	B	C
Ac-Phe-NH_2	$\tau_{\text{nouveau mécanisme}}$	**390 ± 90**	**1,5 ± 0,3**	**59 ± 8**
	$\tau_{\pi\pi^*,\,exp}$	*70 ±3*	*1,5 ±0,3*	*35 ±3*
Ac-Phe-NHMe	$\tau_{\text{nouveau mécanisme}}$	**310 ± 60**	**110 ± 15**	**225 ± 39**
	$\tau_{\pi\pi^*,\,exp}$	*67 ±3*	*48 ±3*	*62 ±3*

Tab. 5.2 – *Estimation de la durée de vie des nouvelles voies de relaxation (gras) identifiées dans les conformères des phénylalanines protégées, calculée d'après la durée de vie de l'état $\pi\pi^*$ mesurée expérimentalement à l'origine de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ (italique) et la durée de vie de l'état $\pi\pi^*$ du toluène tirée de la Réf. [22] (Eq. 5.6).*

5.1.2 A la recherche des mécanismes de relaxation non-radiatifs

Les mécanismes de relaxation non-radiatifs peuvent être classés en deux catégories principales, selon la multiplicité de spin des états électroniques mis en jeu : si les deux états électroniques ont la même multiplicité de spin, le mécanisme est appelé conversion interne ; s'ils ont une multiplicité de spin différente, il s'agit alors d'un processus de croisement intersystème. A priori, des transitions de l'état singulet $^1\pi_{\text{Phe}}\pi_{\text{Phe}}^*$ (S_1) vers des états triplets se produisent dans les phénylalanines protégées et les croisements intersystèmes doivent donc être considérés parmi les mécanismes de relaxation possibles. En effet, ce sont ces transitions qui limitent principalement la durée de vie de l'état S_1 du toluène (86,4 ns à l'origine [22] alors que la durée de vie radiative de cet état a été estimée à environ 290 ns [23, 26]). Le croisement intersystème intervient donc aussi sûrement ici dans la relaxation de l'état $^1\pi_{\text{Phe}}\pi_{\text{Phe}}^*$ mais plusieurs raisons nous ont amené à abandonner l'idée qu'elle puisse être responsable de l'effet conformationnel observé dans les phénylalanines protégées et en particulier de la dynamique rapide du conformère

B de Ac-Phe-NH_2. Le processus de croisement intersystème dépend principalement de deux facteurs : la constante de couplage spin-orbite et le recouvrement des états vibrationnels de l'état singulet S_1 et triplet T. Or il n'existe pas de relation évidente entre la conformation d'une molécule et la constante de couplage spin-orbite qui permettrait d'expliquer une variation aussi forte des durées de vie de l'état $^1\pi\pi^*$. Des variations des constantes de vitesse des transitions S-T ont déjà été observées sur des dérivées du benzène, en fonction de la nature de la molécule et de l'excès d'énergie vibrationnelle dans l'état électronique excité [31]. Elles restent cependant inférieures à un facteur ~ 2, une valeur bien inférieure au facteur ~ 45 observé dans Ac-Phe-NH_2 entre les conformères **A** et **B**. Outre la variation du couplage spin-orbite, une dégénérescence accidentelle entre l'état S_1 et un état T aurait également pu être invoquée. Un tel cas a déjà été observé pour le pérylène et conduisait à une variation d'un facteur ~ 5 de la durée de vie de l'état S_1 [32], une valeur toujours très inférieure à celle observée pour Ac-Phe-NH_2. De plus, une dégénérescence accidentelle ne se produisant que pour un des conformères de Ac-Phe-NH_2 reste peu probable : l'état triplet du toluène est situé à environ 9000 cm^{-1} au-dessous de l'état S_1 [26] et les phénylalanines protégées sont des molécules flexibles, possédant de nombreux modes de vibration de basses fréquences ; la densité d'états vibrationnels de l'état triplet est donc très importante au voisinage de l'état vibrationnel fondamental de l'état S_1. De plus une coïncidence entre états devrait être fortement dépendante du niveau vibrationnel excité dans l'état S_1, ce qui n'est pas compatible avec les observations expérimentales : la durée de vie de l'état S_1 du conformère **B** de Ac-Phe-NH_2 est aussi courte lorsqu'il est formé dans son état vibrationnel fondamental que lorsque la vibration 6b est excitée (Figure 5.1). Enfin, une étude récente [33] a permis de démontrer, grâce à des études de photodissociation de molécules possédant un chromophore toluène (dont l'acide aminé protégé Ac-Phe-OMe), que les processus de conversion interne pouvaient devenir des voies de relaxation plus importantes que le croisement intersystème lorsque que le chromophore aromatique était situé sur la chaîne latérale d'un acide aminé. C'est pourquoi, dans la suite, le mécanisme de relaxation rapide observé expérimentalement sera recherché uniquement parmi des mécanismes de conversion interne (la durée de vie de la nouvelle voie de relaxation rapide sera donc notée τ_{CI} au lieu de $\tau_{\text{nouveau mécanisme}}$ dans la suite).

Les mécanismes de relaxation rapide des états excités (durées de vie inférieures ou de l'ordre de la nanoseconde) correspondent le plus souvent à des transferts d'énergie entre deux états excités à travers une intersection conique, le retour direct à l'état fondamental (conversion interne $S_1 \rightarrow S_0$) étant généralement beaucoup plus lent. Les mécanismes de conversion interne entre états excités peuvent être distingués en fonction du nombre d'électrons impliqués

(Figure 5.4) : les mécanismes par transfert de charge font intervenir le mouvement d'un seul électron entre orbitales moléculaires alors que les mécanismes de transfert d'excitation type Förster [34] ou Dexter [35] nécessitent l'échange de deux électrons. Il est à noter que, bien que les mécanismes type Förster et Dexter soient similaires en apparence, ils possèdent des caractéristiques très différentes :

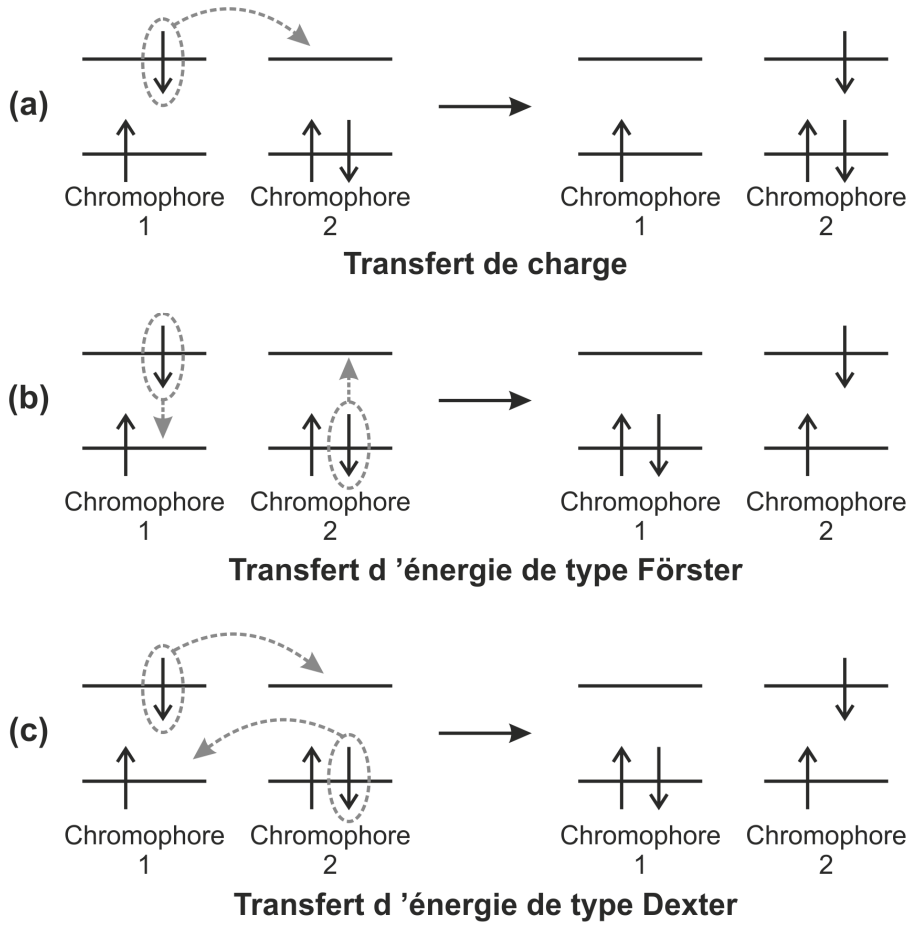


Fig. 5.4 – *Schéma des mécanismes de relaxation non-radiatifs par conversion interne : (a) mécanisme par transfert de charge, (b) mécanisme de type Förster et (c) mécanisme de type Dexter.*

- Le transfert d'excitation de type Förster est une interaction dipôle-dipôle entre deux chromophores, la probabilité de ce transfert est proportionnelle à la force d'oscillateur des deux transitions électroniques mises en jeu et varie en $1/r^6$ avec la distance entre les deux chromophores. Il peut se produire pour des distances entre chromophores comprises entre 1 et 10 nm [36, 37].
- Le transfert d'excitation de type Dexter correspond à un double échange d'électrons entre des orbitales des deux chromophores [35]. Par conséquent, ce transfert nécessite

un recouvrement entre ces orbitales moléculaires, ce qui n'est possible qu'à très courtes distances (typiquement inférieures à ~ 1 nm). La probabilité de ce type de transfert décroît exponentiellement avec la distance entre les deux chromophores.

Une stratégie, détaillée dans la Partie 2.3.2 du Chapitre 2, a été adoptée dans le but de caractériser plus finement les mécanismes de relaxation par conversion interne des phénylalanines protégées. Cette stratégie, réalisée en collaboration avec le groupe de N. Došlić à l'Institut Ruđer Bošković de Zagreb, consiste dans un premier temps à identifier les coordonnées de réaction conduisant à des relaxations de l'état ππ* à partir de trajectoires de dynamique non adiabatique utilisant de la TDDFT (Figure 5.5).

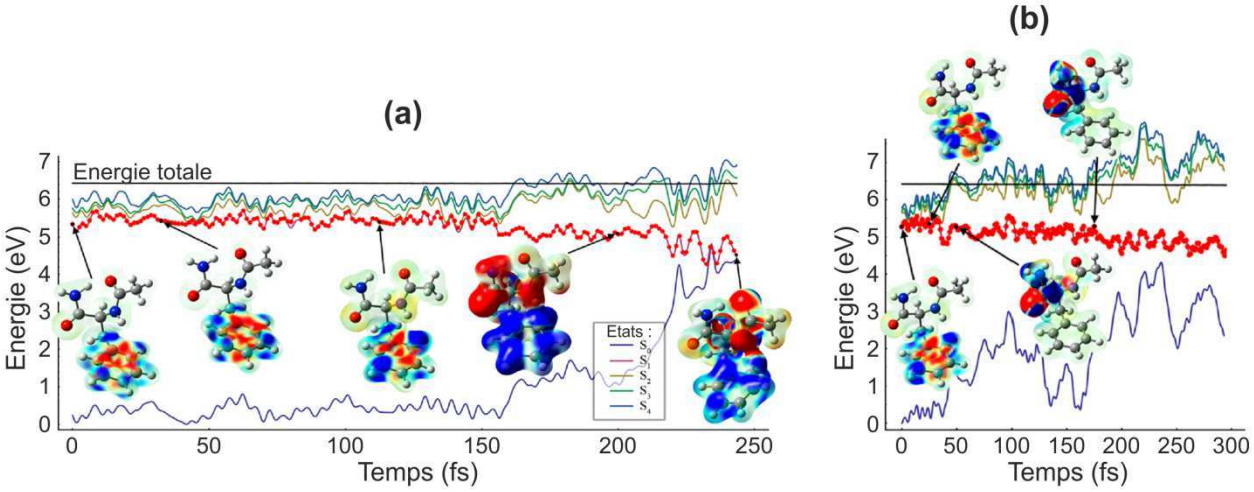


Fig. 5.5 – *Exemples de trajectoires de dynamique non adiabatique (TDDFT : PBE0/cc-pVDZ) représentant l'évolution en fonction du temps des énergies de l'état électronique fondamental et des quatre premiers états excités du conformère* ***B*** *de Ac-Phe-NH$_2$. L'état électronique occupé dans la trajectoire est indiqué par des points rouges. Les encarts montrent la différence de densité électronique entre le premier état excité (S_1) et l'état fondamental (S_0) dans la géométrie de l'état S_1. Les zones de l'espace où la densité électronique est plus importante (plus faible) qu'à l'état fondamental sont représentées en bleu (rouge). (a) Illustration du mécanisme I (voir plus bas) : une transition est observée à environ 150 fs, entre l'état ππ* et un état à transfert de charge (transfert d'électron depuis la chaine principale vers le cycle aromatique). (b) Illustration du mécanisme II : un transfert d'énergie se produit à environ 60 fs, depuis le cycle aromatique vers la seconde liaison peptidique (transition entre un état $\pi_{Phe}\pi_{Phe}^*$ et un état $n_{bb}\,\pi_{CO}^*$).*

Les énergies de l'état fondamental et des premiers états excités sont ensuite calculées le long de ces coordonnées de réaction. L'exploitation des trajectoires de dynamique non adiabatique a permis l'identification de plusieurs mécanismes de relaxation non-radiatifs. Ces mécanismes ont en commun de faire apparaître chacun deux intersections coniques : une première entre l'état excité ππ* et un état électronique excité intermédiaire et une deuxième entre

cet état intermédiaire et l'état fondamental (Figure 5.6). Ils diffèrent cependant entre eux par la nature de l'état excité intermédiaire et des coordonnées de réaction menant aux intersections coniques. Ces deux différences seront donc utilisées dans la suite pour nommer les mécanismes : la nature de l'état excité intermédiaire sera définie par un chiffre romain (I, II, III) et, pour un même état électronique intermédiaire, les différentes coordonnées seront indiquées par des lettres de *a* à *f* (Tableau 5.3). Les mécanismes étant similaires pour les différents conformères, seuls ceux du conformère **B** de Ac-Phe-NH_2 seront représentés par la suite, les autres seront inclus dans l'Annexe C .

Mécanismes		**1^{ere} coord. de réaction**	**Etat intermédiaire**	**2^{e} coord. de réaction**	**Conformères concernés**
I		Elongation d'une liaison N-H	$(n_{bb}/\pi_{CO})\ \pi_{Phe}^*$	Transfert d'hydrogène vers le cycle aromatique	**A**, **B**, **C**
II	b c d e f	Distorsion de la seconde liaison peptidique	$n_{bb}\ \pi_{CO}^*$ (2^{e} liaison peptidique)	Elongation de la liaison C-O (2^{e} liaison peptidique)	**A**, **B**, **C**
III	a	Distorsion de la première liaison peptidique	$n_{bb}\ \pi_{CO}^*$ (1^{ere} liaison peptidique)	Transfert d'hydrogène le long d'une liaison C_7	**B**, **C**
	b c			Elongation de la liaison C-O (1^{ere} liaison peptidique)	**A**, **B**, **C**

Tab. 5.3 – *Résumé des coordonnées de réaction et des états excités impliqués dans les différents mécanismes de relaxation. La nomenclature des orbitales est la suivante : n_{bb} pour une orbitale non liante localisée sur la chaîne principale (« backbone »), π_{Phe} et π_{CO} pour des orbitales π respectivement localisées sur le cycle aromatique et sur une double liaison C=O. Les 1^{ere} et 2^{e} coordonnées de réactions sont les coordonnées de réaction conduisant respectivement à la 1^{ere} et à la 2^{e} intersection conique (Figure 5.6).*

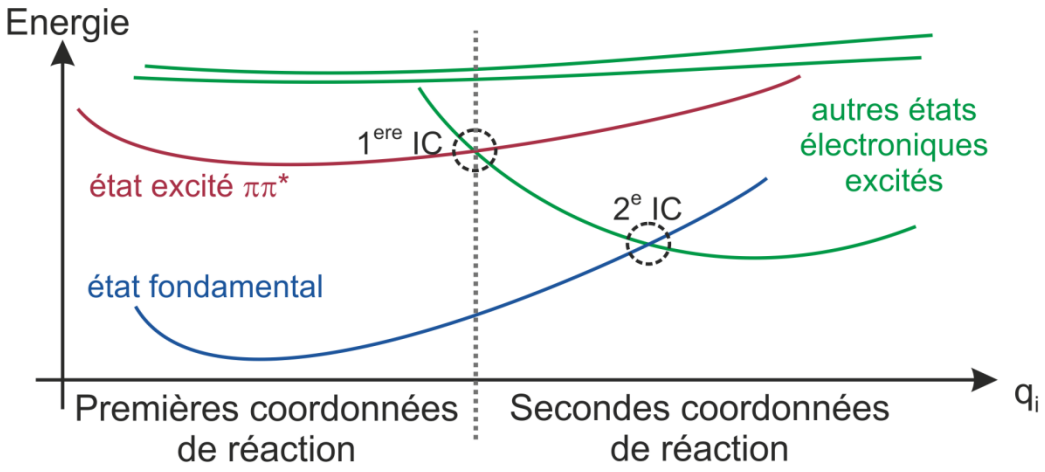


Fig. 5.6 – *Représentation schématique des mécanismes de relaxation non-radiatifs des phénylalanines protégées, après excitation à l'origine de la première transition $\pi \rightarrow \pi^*$. Les intersections coniques (IC) sont indiquées par des cercles noirs.*

5.1.2.a Nature des états excités de plus basses énergies

Dans la géométrie de l'état fondamental des trois conformères des phénylalanines protégées, l'état électronique excité le plus bas en énergie, calculé par la méthode RI-CC2, est l'état $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}^*$ (S_1) localisé sur le cycle aromatique, dérivé de l'état $^1B_{2u}$ du benzène [38]. Les deux états excités suivants sont des états $n_{bb}\,\pi_{CO}^*$, localisés sur la première ou la deuxième liaison peptidique, et correspondant à un transfert d'électron d'un doublet non liant d'un atome d'oxygène ou d'un atome d'azote vers une l'orbitale π antiliante de la double liaison C=O. Le quatrième état excité est un deuxième état $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}^*$ localisé sur le cycle aromatique, analogue cette fois à l'état $^1B_{1u}$ du benzène.

Pour les trois conformères, l'optimisation de la géométrie de l'état S_1 au niveau RI-CC2 ne conduit qu'à de légères déformations de la géométrie par rapport à celle de l'état fondamental. Les caractéristiques principales des conformères (interactions NH-π, liaisons hydrogène C_7) sont donc conservées dans le premier état excité.

5.1.2.b Mécanisme I

Le mécanisme I concerne tous les conformères de la phénylalanine protégée, la première coordonnée de réaction est une élongation d'une liaison N-H en direction du cycle aromatique. Les liaisons N-H concernées sont donc celles impliquées dans des interactions NH-π avec le phényle, ou les plus proches du phényle, c'est-à-dire la liaison N-H de la première liaison peptidique pour **B** et **C** et de la deuxième liaison peptidique pour **A**. Les mécanismes de type I,

dont un exemple (conformère **B** de Ac-Phe-NH_2) est représenté dans la Figure 5.7, ont été calculés de la manière suivante : une optimisation partielle a été réalisée à partir de la géométrie la plus stable de l'état $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}^*$, en augmentant progressivement la longueur de la liaison N-H et en laissant la possibilité à toutes les autres coordonnées internes de se relaxer. Cette élongation provoque une augmentation de l'énergie de l'état fondamental et de l'état $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}^*$ et, à partir d'une distance de 114 pm pour le conformère **B** de Ac-Phe-NH_2, l'apparition d'un état à transfert de charge $(n_{bb}/\pi_{CO})\ \pi_{Phe}^*$ parmi les quatre états excités les plus bas en énergie. A partir de 116 pm, la proximité des états $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}^*$ et $(n_{bb}/\pi_{CO})\ \pi_{Phe}^*$ perturbe fortement le processus d'optimisation partielle, qui ne fournit plus de résultats fiables. Pour des distances plus grandes entre les deux atomes (d(N-H) > 122 pm), la force entre ces derniers devient répulsive dû à un changement d'état électronique ($\pi_{Phe}\pi_{Phe}^* \rightarrow (n_{bb}/\pi_{CO})\ \pi_{Phe}^*$). Une optimisation complète de la géométrie conduit alors à un transfert de proton sur le cycle aromatique et à une intersection conique avec l'état fondamental.

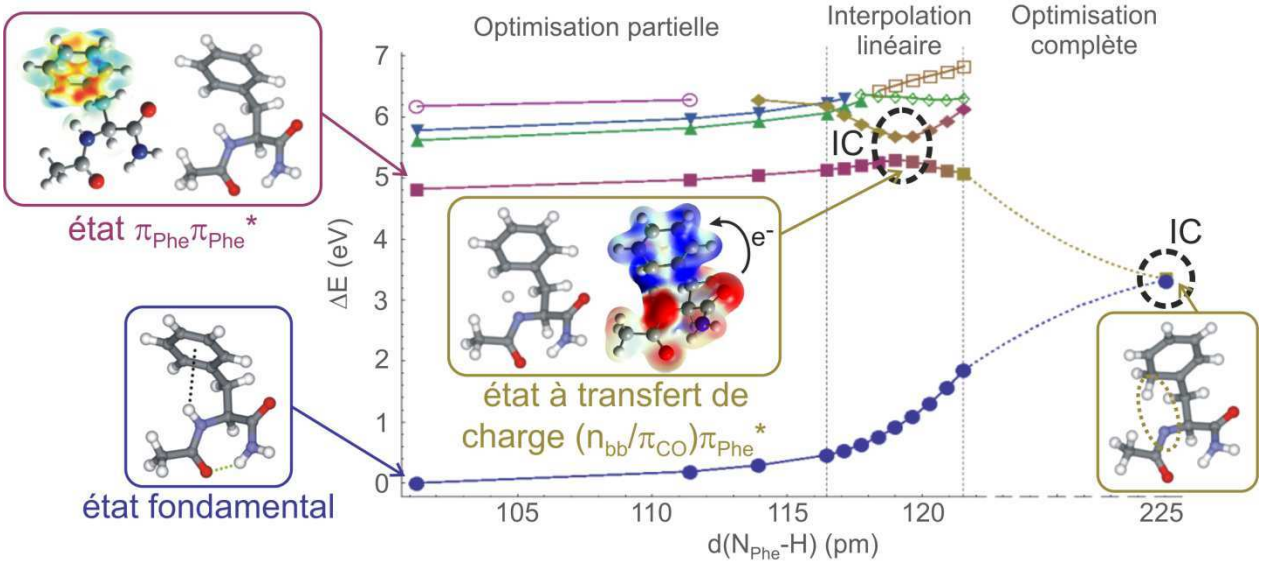


Fig. 5.7 – *Mécanisme I : Représentation de l'énergie RI-CC2/cc-pVDZ de l'état fondamental et des trois premiers états excités du conformère* ***B*** *de Ac-Phe-NH_2, en fonction de l'élongation de la liaison N-H impliquée dans l'interaction avec le phényle. Les encarts indiquent les géométries du peptide protégé à différents moments du mécanisme ainsi que la différence de densité électronique entre le premier état excité et l'état fondamental pour ces géométries. Les zones de l'espace où la densité électronique est plus importante (plus faible) qu'à l'état fondamental sont représentées en bleu (rouge).*

Finalement, pour calculer les surfaces d'énergie potentielle dans la région 116 – 122 pm, où les optimisations partielles ont échoué, une interpolation linéaire de toutes les coordonnées de la molécule a été réalisée entre la dernière structure fiable de l'état $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}^*$ et la première structure pour laquelle la force entre les atomes d'azote et d'hydrogène devient répulsive.

L'interpolation linéaire permet ainsi d'obtenir une série de géométries intermédiaires entre ces deux dernières structures, sans réaliser d'optimisations avec une méthode de chimie quantique. Les énergies de l'état fondamental et des quatre premiers états excités sont alors calculées dans chacune des géométries intermédiaires. Au lieu de faire apparaître une intersection conique claire entre les états S_1 et S_2, on peut cependant remarquer que l'interpolation linéaire montre une diminution progressive de la contribution de l'état $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}^*$ à l'état S_1 au profit de l'état à transfert de charge. Il a toutefois été montré qu'un tel minimum entre les énergies des états S_1 et S_2 étaient le signe d'une intersection conique proche [39]. La hauteur de la première barrière d'énergie a ainsi pu être estimée à environ 0,48 eV pour le conformère **B** de Ac-Phe-NH_2.

Des calculs similaires ont été effectués sur les conformères **A** et **C** de Ac-Phe-NH_2 (Annexe C.1). Dans le cas du conformère **C**, la première intersection conique a été démontrée clairement par un croisement des énergies des états S_1 et S_2 lorsque la distance N-H augmente. Une barrière de ~0,64 eV a été obtenu pour ce conformère. Sa valeur plus élevée que celle trouvée pour le conformère **B** est bien cohérente avec la plus grande difficulté de réaliser le transfert de l'atome d'hydrogène lorsque la distance avec le cycle aromatique augmente et en l'absence d'interaction NH-π. Pour le conformère **A**, l'atome d'hydrogène transféré sur le cycle aromatique provient cette fois du groupement NH_2 terminal et la barrière d'énergie a été estimée à ~0,55 eV.

L'ordre relatif des barrières d'énergie des conformère **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2 pour le mécanisme I est compatible avec la durée de vie expérimentale de l'état $\pi\pi^*$, plus courte pour le conformère **B** que pour le conformère **C**. Cependant, la première coordonnée de réaction de ce mécanisme correspondant principalement à l'élongation d'une liaison N-H, un effet fort sur la durée de vie de l'état $\pi\pi^*$ aurait dû être observé suite à la deutération si celui-ci se produisait réellement. Cela suggère par conséquent que le mécanisme I n'est pas le mécanisme responsable de la durée de vie courte de conformère **B** de Ac-Phe-NH_2. Il n'a donc pas été calculé pour les conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-NHMe.

5.1.2.c Mécanismes II

Les mécanismes de type II correspondent à des transferts d'excitation du cycle aromatique (état $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}^*$) vers la deuxième liaison peptidique (état $n_{bb}\,\pi_{CO}^*$). Ils concernent les trois conformères des phénylalanines protégées. Les coordonnées de réaction conduisant à la première intersection conique sont plus complexes que dans le cas du mécanisme I, il s'agit ici d'une

distorsion globale de la seconde liaison peptidique (pyramidalisation de l'atome de carbone et de l'atome d'azote, diminution de l'angle O=C-N), ce qui rend le principe d'une optimisation partielle plus difficilement applicable. Une stratégie différente a donc été adoptée : des minima énergétiques locaux (M_{II}) ont été recherchés sur la surface d'énergie potentielle de l'état $n_{bb}\,\pi_{CO}^*$, en réalisant des optimisations complètes de la structure à partir de géométries initiales où la seconde liaison peptidique a perdu sa planéité (géométries obtenues soit à partir des simulations TDDFT, soit par des déformations obtenues « manuellement »). Les énergies de l'état fondamental et des premiers états excités sont ensuite calculées le long de l'interpolation linéaire entre le minimum de l'état $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}^*$ ($M_{\pi\pi^*}$) et l'un des minima de l'état $n_{bb}\,\pi_{CO}^*$ trouvés. La première étape des mécanismes II.b, II.c, II.d, II.e et II.f correspond ainsi à des distorsions différentes de la seconde liaison peptidique, conduisant à des minima distincts sur la surface de l'état $n_{bb}\,\pi_{CO}^*$. Par la suite, des lettres identiques pour les mécanismes de relaxation des conformères de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe indiquent des déformations identiques. Les minima $M_{II.b}$ et $M_{II.c}$ sont par exemple atteints par des déformations locales symétriques par rapport au plan de la seconde liaison peptidique (Figure 5.8). Les hauteurs de barrières des premières intersections coniques des mécanismes II.b à II.f sont indiquées dans le Tableau 5.4 pour les trois conformères de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe. Les paramètres structurels et les géométries des minimums des états $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}^*$ et $n_{bb}\,\pi_{CO}^*$ sont indiqués dans l'Annexe C.

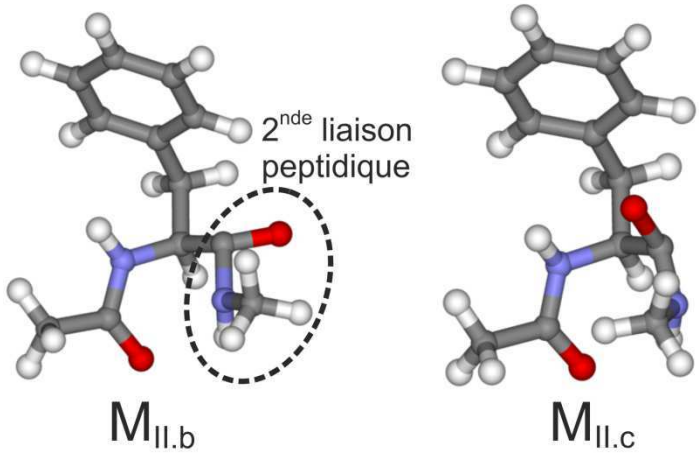


Fig. 5.8 – *Représentations des géométries de deux minima locaux ($M_{II.b}$ et $M_{II.c}$) de la surface d'énergie potentielle de l'état excité $n_{bb}\,\pi_{CO}^*$ du conformère **B** de Ac-Phe-NHMe.*

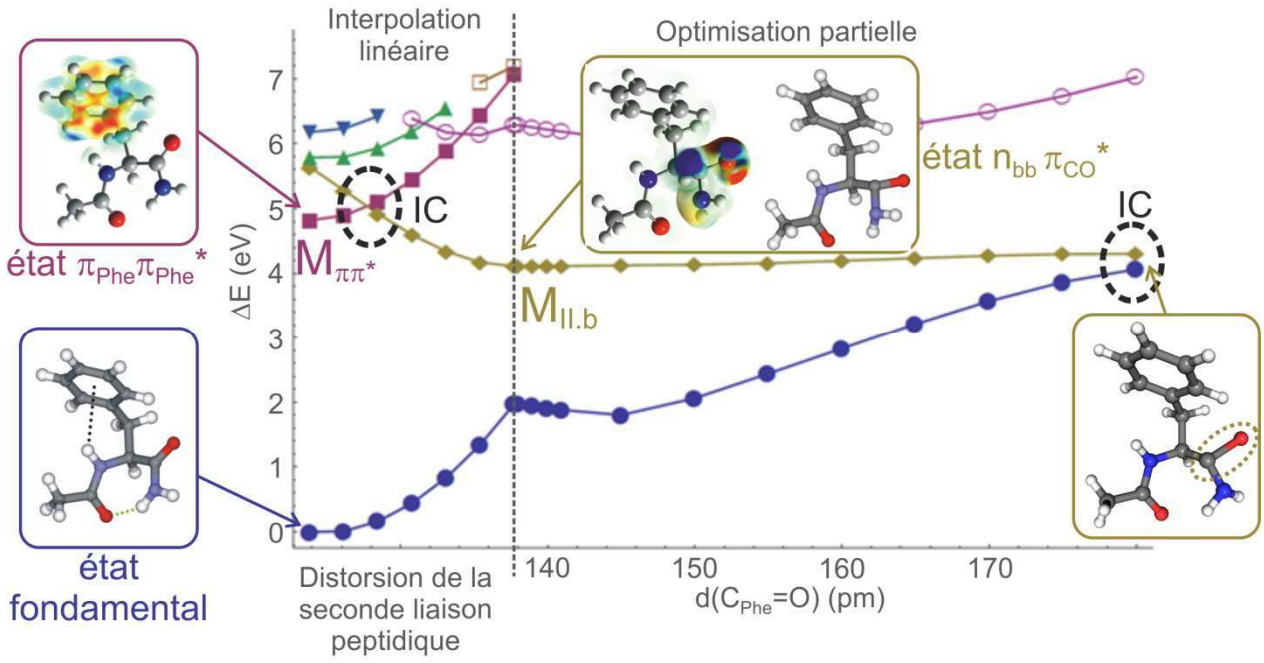


Fig. 5.9 – *Mécanisme II.b : Représentation de l'énergie RI-CC2/cc-pVDZ de l'état fondamental et des premiers états excités du conformère* ***B*** *de Ac-Phe-NH_2 le long de l'interpolation linéaire reliant les géométries des minima $M_{\pi\pi^*}$ et $M_{II.b}$ puis de l'élongation de la liaison C_{Phe}=O de la deuxième liaison peptidique. Les notations sont définies dans la légende de la Figure 5.7.*

La deuxième coordonnée de réaction est identique pour les mécanismes II.b à II.f, il s'agit de l'élongation de la liaison C-O de la seconde liaison peptidique. Le chemin vers la deuxième intersection conique a donc pu être calculé en réalisant une optimisation partielle (distance C-O fixée, toutes les autres coordonnées internes libres de relaxer). La liaison C-O, affaiblie par la population de l'orbitale antiliante π_{CO}^*, ne nécessite quasiment pas d'effort pour être allongée dans l'état $n_{bb}\,\pi_{CO}^*$. La seconde intersection conique, avec l'état fondamental, est ainsi atteinte pour une distance C-O d'environ 180 pm et est située seulement 0,19 eV au-dessus du minimum $M_{II.b}$ dans le cas du conformère **B** de Ac-Phe-NH_2 (Figure 5.9). Ce mécanisme semble donc suggérer que, grâce à une transition entre l'état $\pi_{Phe}\pi_{Phe}^*$ et un état $n_{bb}\pi_{CO}^*$, il est possible de rompre la liaison C-O en apportant ~ 5 eV au système. Cette énergie est à comparer à l'énergie nécessaire pour rompre la double liaison C=O directement depuis l'état fondamental, qui est typiquement de 7,7 eV (~ 750 kJ · mol^{-1}). Cependant, le fait que l'énergie calculée de l'état fondamental reste très inférieure à 7 eV lorsque la liaison C=O est allongée (courbe bleue de la Figure 5.9) pose la question de la fiabilité des calculs CC2 dans ces géométries. L'intérêt de ces calculs était donc avant tout de montrer qu'il existait au moins une coordonnée de réaction permettant d'atteindre une intersection conique entre l'état $n_{bb}\pi_{CO}^*$ et l'état fondamental, ce qui

ne signifie pas que d'autres coordonnées de réaction que l'allongement de la liaison C=O ne soient également possibles.

5.1.2.d Mécanismes III

Les mécanismes où le transfert d'excitation depuis l'état $\pi_{Phe}\pi_{Phe}^*$ se produit vers la première liaison peptidique sont appelés mécanismes de type III. Ils ont été calculés de la même façon que les mécanismes II, en recherchant des minima (M_{III}) sur la surface d'énergie potentielle de l'état $n_{bb}\,\pi_{CO}^*$ puis en réalisant des interpolations linéaires entre les géométries des minima $M_{\pi\pi^*}$ et M_{III}. Des déformations de la première liaison peptidique, analogues à celles observées dans les mécanismes II.b et II.c sur la seconde liaison peptidique, conduisent respectivement aux minima $M_{III.b}$ et $M_{III.c}$. Le retour à l'état fondamental peut ensuite s'effectuer grâce à une élongation de la liaison C-O de la première liaison peptidique (Annexe C.3). Les hauteurs de barrière de ces deux mécanismes figurent dans le Tableau 5.4.

Enfin, nous avons également cherché à retrouver avec cette méthode un mécanisme de relaxation secondaire (c'est-à-dire intervenant après la première intersection conique) similaire à celui proposé par Shemesh *et al.*, c'est-à-dire ayant pour coordonnées de réaction une élongation de la liaison N-H du groupement NH_2 (ou NHMe) terminal, le long d'une liaison hydrogène C_7 [20]. Pour cela, des optimisations complètes de géométrie des conformères **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe dans l'état $n_{bb}\,\pi_{CO}^*$ ont été réalisées, à partir de structures initiales proches de celle du minimum de Ac-Trp-NHMe dans l'état « localement excité » (LE) de la Réf. [17]. Le minimum trouvé par ces optimisations a été appelé $M_{III.a}$ et peut être obtenu à partir de la géométrie du minimum $M_{\pi\pi^*}$ par des distorsions de la première liaison peptidique. Depuis le minimum $M_{III.a}$, l'état fondamental peut ensuite effectivement être atteint par une élongation de la liaison N-H de la seconde liaison peptidique : une optimisation complète de géométrie conduit à la deuxième intersection conique dès que la distance N-H est supérieure à environ 115 pm (Figure 5.10). L'intersection conique avec l'état fondamental se situe respectivement 0,15 et 0,25 eV au-dessus des minima $M_{III.a}$ des conformères **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2 et est donc facilement accessible depuis la première intersection conique. Une fois retourné dans l'état fondamental, les simulations de dynamique non adiabatique suggèrent un transfert inverse rapide de l'atome d'hydrogène (de l'atome d'oxygène vers l'atome d'azote). On peut remarquer que le mécanisme III.a présente finalement quelques différences importantes avec le mécanisme de Shemesh *et al.* : (i) il démontre que l'intersection conique avec l'état fondamental peut être

atteinte directement à partir d'un état « localement excité » (l'état $n_{bb}\,\pi_{CO}$*), sans faire intervenir un deuxième état excité intermédiaire, à transfert de charge et (ii) l'élongation de la liaison N-H n'est ici une coordonnée de réaction pertinente que dans la deuxième étape du mécanisme de relaxation, la première étant constitué d'une déformation globale de la première liaison peptidique. Ce dernier point est également la raison pour laquelle les expériences de deutération, uniquement sensibles à la durée de vie de l'état ππ* (première étape du mécanisme), ne permettent pas d'éliminer le mécanisme III.a.

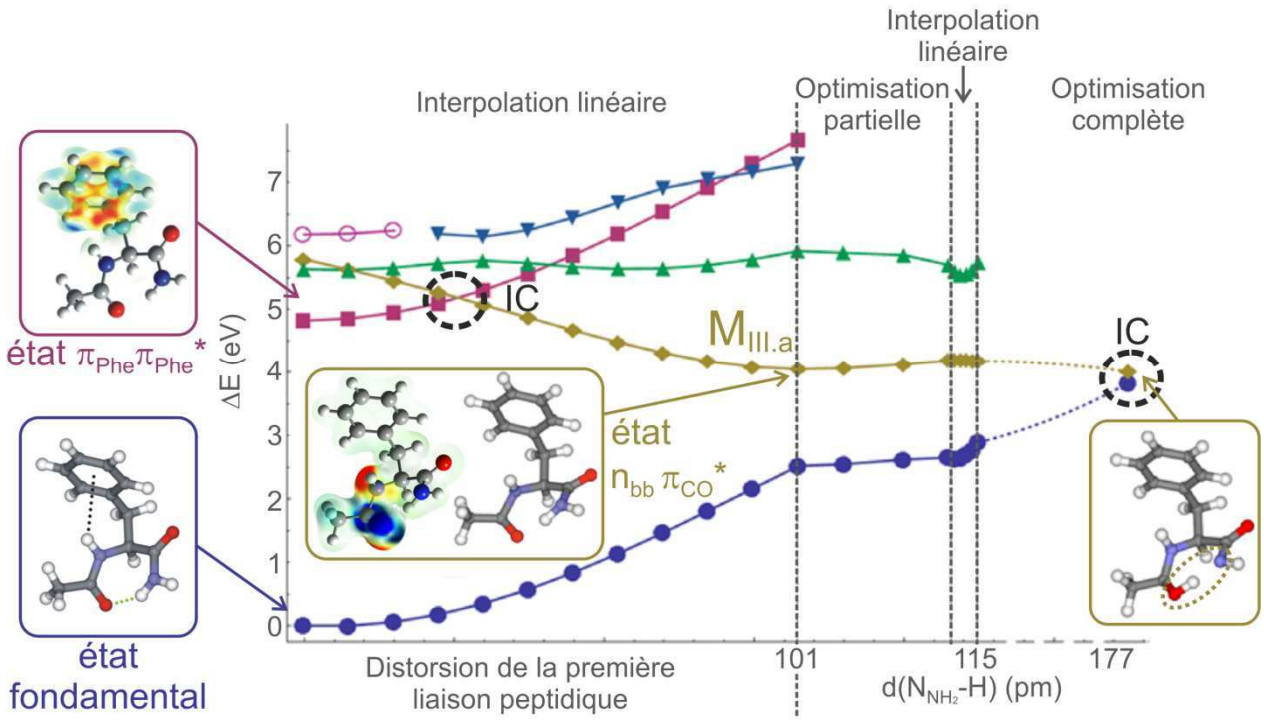


Fig. 5.10 – *Mécanisme III.a : Représentation de l'énergie RI-CC2/cc-pVDZ de l'état fondamental et des premiers états excités du conformère* ***B*** *de Ac-Phe-NH_2 le long de l'interpolation linéaire reliant les géométries des minima $M_{\pi\pi^*}$ et $M_{III.a}$ puis de l'élongation de la liaison N-H impliqué dans la liaison hydrogène C_7. Les notations sont définies dans la légende de la Figure 5.7.*

5.1.2.e Discussion

Dans tous les mécanismes de conversion interne décrits dans les parties précédentes (types I, II et III), une molécule, initialement dans l'état $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}$*, a besoin de se déformer légèrement pour atteindre une intersection conique avec un état excité intermédiaire. Le temps nécessaire pour sortir de l'état $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}$* dépend donc de deux facteurs : (i) l'accessibilité de l'intersection conique, c'est-à-dire la probabilité d'atteindre la région de la première intersection

conique pour une énergie vibrationnelle donnée et (ii) le couplage électronique entre l'état $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}^*$ et l'état excité intermédiaire.

En première approximation, l'accessibilité de l'intersection conique peut être estimée d'après la hauteur des barrières d'énergie par rapport au minimum de l'état $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}^*$. Ces valeurs, calculées pour les conformations **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe, et pour les mécanismes I, II et III, sont rassemblées dans le Tableau 5.4. Quelques précautions doivent néanmoins être prises avant de comparer les hauteurs de barrières des différents mécanismes. Il est utile en particulier de rappeler qu'au voisinage de la première intersection conique les énergies des états excités ont été calculées en réalisant des interpolations linéaires. Ces dernières peuvent donc ne pas correspondre exactement au chemin de moindre énergie conduisant à l'intersection conique. Par conséquent, les valeurs calculées doivent plutôt être considérées comme des limites supérieures des hauteurs des barrières. De plus, les hauteurs de barrière ne fournissent pas d'information directe sur l'énergie vibrationnelle réellement disponible dans l'état $\pi\pi^*$ pour atteindre l'intersection conique. Les mesures de durées de vie sont réalisées à l'origine de la transition $\pi\rightarrow\pi^*$ du chromophore aromatique, l'énergie vibrationnelle totale dans l'état $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}^*$ est donc toujours égale à l'énergie vibrationnelle du point zéro (ZPE). Cependant, la quantité d'énergie vibrationnelle à prendre en compte dans le calcul de la probabilité d'atteindre la région de la première intersection conique est uniquement la fraction de celle-ci qui est contenue dans les modes de déformation conduisant vers cette région. L'énergie contenue dans les autres modes de vibration n'intervient pas. Comme les coordonnées de réaction varient en fonction des mécanismes considérés, cela signifie que les modes de vibrations pertinents changent également d'un mécanisme à un autre, il en va donc de même pour la fraction de l'énergie vibrationnelle contenue dans ces modes.

De manière générale, les hauteurs de barrière obtenues sont relativement basses et proches les unes des autres. Elles appartiennent quasiment toutes à un intervalle compris entre 0,2 et 0,5 eV. En comparant les hauteurs de barrières calculées pour Ac-Phe-NH_2, on peut remarquer que les valeurs les plus élevées sont trouvées pour le mécanisme I ; elles sont situées pour chaque conformère environ 0,2 eV au-dessus de celles des autres mécanismes. Le mécanisme I ne peut toutefois pas être éliminé sur ce seul critère énergétique, et ce pour plusieurs raisons :

1) Il faut prendre en compte le fait que la première coordonnée de réaction du mécanisme I (élongation d'une liaison N-H) est fondamentalement différente de celles des mécanismes II et III (respectivement des distorsions de la deuxième et de la première liaison peptidique). La vibration d'élongation d'une liaison N-H possède une fréquence

d'environ 3500 cm^{-1}, on peut donc estimer l'énergie vibrationnelle disponible pour atteindre l'intersection conique à ~ 0,22 eV (1750 cm^{-1}). A l'opposé, les distorsions des mécanismes II et III font appel à des modes de basses fréquences de la chaîne principale (quelques centaines de cm^{-1}). Leurs hauteurs de barrière sont donc plus basses, mais ils disposent également de moins d'énergie pour les franchir.

2) Comme la première coordonnée de réaction du mécanisme I correspond au déplacement d'un atome d'hydrogène, un franchissement de la barrière d'énergie potentielle de la première intersection conique par effet tunnel est possible. Ce qui n'est pas le cas dans les mécanismes II et III, où les premières coordonnées de réaction contiennent des mouvements d'atomes plus lourds (C, O, N).

		Hauteurs des barrières d'énergie (eV)									**τ_{CI} (ns)**
Conf.		**I**	**II.b**	**II.c**	**II.d**	**II.e**	**II.f**	**III.a**	**III.b**	**III.c**	
Ac-Phe-NH_2	**A**	0,55	0,32	0,57	*(c)*	*(c)*	*(c)*	*(b)*	0,25	0,28	390 ± 90
	B	0,48	0,22	0,35	0,19	0,25	0,29	0,36	0,26	0,23	1,5 ± 0,3
	C	0,64	0,39	0,25	*(c)*	*(c)*	*(c)*	0,51	0,32	0,30	59 ± 8
Ac-Phe-NHMe	**A**	*(a)*	0,45	0,58	*(c)*	*(c)*	*(c)*	*(b)*	0,28	0,30	310 ± 60
	B	*(a)*	0,32	0,33	0,24	0,25	0,32	0,37	0,26	0,24	110 ± 15
	C	*(a)*	0,43	0,28	*(c)*	*(c)*	*(c)*	0,47	0,32	0,32	225 ± 39

Tab. 5.4 – *Hauteurs des barrières d'énergie calculées (RI-CC2/cc-pVDZ) des premières intersections coniques des mécanismes I, II et III (en eV) et durées de vies estimées (en ns) du processus de conversion interne (Tableau 5.2) à l'origine de la transition $\pi\rightarrow\pi^*$ des conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe. (a) Mécanisme non compatible avec les résultats des expériences sur les molécules deutérés et non calculé pour Ac-Phe-NHMe (cf. texte).(b) Mécanisme impossible pour le conformère **A** car il nécessite une liaison hydrogène C_7. (c) Calculs en cours. Les énergies relatives des minimums $M_{II.b}$ à $M_{II.f}$ par rapport à l'énergie du minimum $M_{\pi\pi^*}$ sont inclues dans le Tableau C.2.2 de l'Annexe C.*

C'est donc la comparaison à l'expérience et l'absence d'effets signicatifs de la deutération des groupements NH sur les durées de vie de l'état $\pi\pi^*$ du conformère **B** de Ac-Phe-NH_2 (Figure 5.2) qui permettent d'affirmer que le mécanisme I n'est pas le mécanisme de relaxation responsable de la dynamique rapide de ce dernier. On peut donc en déduire que le mécanisme de relaxation rapide est un mécanisme de transfert d'excitation vers une des liaisons peptidiques (II

ou III). Il n'est cependant pas possible de déterminer quelle est la liaison impliquée (la première ou la deuxième) à partir des seules données expérimentales obtenues sur Ac-Phe-NH_2 car tous les autres mécanismes (types II et types III) ont des hauteurs de barrière relativement proches, comparées aux incertitudes de la méthode théorique employée (~ 0,1 eV en valeur absolue, une erreur relative moindre peut être attendue en comparant deux conformères d'une molécule).

Toutefois, des informations complémentaires peuvent être tirées de la comparaison des données expérimentales obtenues sur Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe. Les durées de vie τ_{CI} des conformères **B** et **C** sont plus élevées dans Ac-Phe-NHMe que dans Ac-Phe-NH_2 (respectivement d'un facteur ~ 70 et ~ 4). On peut donc s'attendre à ce que la hauteur de barrière du mécanisme recherché soit également plus élevée dans l'espèce méthylée. Or, on peut remarquer dans le Tableau 5.4 que seuls deux mécanismes correspondent à cette description : les mécanismes II.b et II.d, pour lesquels la hauteur de la barrière du conformère **B** augmente respectivement de 45 et 32 % après méthylation. Dans tous les autres mécanismes de types II et III calculés, la variation de la hauteur de la barrière est inférieure à 5 % pour ce conformère. Les deux mécanismes II.b et II.d sont également ceux qui ont les barrières les plus basses (respectivement 0,22 et 0,19 eV), ce qui en fait les meilleurs candidats à la relaxation rapide du conformère **B** de Ac-Phe-NH_2. Finalement, il est possible de proposer l'attribution suivante des mécanismes de relaxation de l'état $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}^*$ des phénylalanines protégées :

- La durée du vie courte de l'état $\pi_{Phe}\,\pi_{Phe}^*$ conformère **B** de Ac-Phe-NH_2 est due à un transfert d'excitation du cycle aromatique vers la seconde liaison peptidique (mécanisme II.b et/ou II.d).
- Les durées de vie longues des conformères **A** de Ac-Phe-NH_2 et **A** et **C** de Ac-Phe-NHMe sont principalement limitées par un croisement intersystème vers un état triplet.
- Une compétition entre les deux précédentes voies de relaxation interviennent dans les conformères à durée de vie intermédiaire (**C** de Ac-Phe-NH_2 et **B** de Ac-Phe-NHMe).

L'attribution précédente a été réalisée en se basant uniquement sur la valeur des hauteurs de barrières d'énergie. Ce raisonnement présente cependant l'inconvénient de ne pas proposer d'explication au fait que le mécanisme III ne se produise pas, alors que les barrières des mécanismes III.b et III.c sont très proches de celles des mécanismes II.b et II.d. On peut également se demander si l'augmentation de la hauteur de la barrière du conformère **B** entre

Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe (0,1 et 0,06 eV respectivement pour les mécanismes II.b et II.d) suffit à justifier l'augmentation d'un facteur 30 de la durée de vie de l'état ππ* observée expérimentalement. Pour essayer de répondre à ces questions, nous avons cherché à visualiser d'une façon légèrement différente l'accessibilité de la première intersection conique depuis l'état ππ*. Pour cela, les coordonnées de réaction conduisant à la première intersection conique des différents mécanismes de relaxation ont été décomposées sur la base des modes normaux de vibrations de chaque conformère, dans l'état ππ*. L'énergie nécessaire V_i qui doit être contenue dans le mode de vibration *i* pour atteindre l'intersection conique peut alors être estimée d'après l'expression suivante :

$$V_i = \frac{1}{2}\omega_i^2 Q_i^2 \qquad \text{(Eq. 5.4)}$$

avec ω_i la fréquence de vibration du mode *i* (en s^{-1})

Q_i la projection de la coordonnée de réaction conduisant à la première intersection conique sur les coordonnées des modes de vibration dans l'état ππ* (en $m \cdot kg^{1/2}$).

Les peptides protégés étant excités à l'origine de la transition π→π*, l'énergie vibrationnelle initialement contenue dans chaque mode *i* est égale à l'énergie vibrationnelle du point zéro ($ZPE_i = \hbar\omega_i / 2$). En comparant, pour chaque mode, la valeur de l'énergie V_i à celle de la ZPE_i, il devient alors possible d'identifier quelles déformations sont nécessaires pour accéder à l'intersection conique : ce sont celles qui possèdent un rapport V_i/ZPE_i élevé. Ces rapports ont été tracés pour différents mécanismes de relaxation du conformère **B** de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe dans la Figure 5.11. Cette représentation permet de mettre en évidence une différence importante entre les mécanismes II.b, II.d et III.c dans Ac-Phe-NH_2. On peut remarquer directement que dans les deux premiers mécanismes la ZPE est suffisante pour atteindre la première intersection conique ($V_i/ZPE_i < 1$ pour tous les modes *i*), alors que dans le mécanisme III.c deux modes à 93 et 1687 cm^{-1} sont limitants. Ces deux modes correspondent à des déformations de la première liaison peptidique : le premier est une torsion autour de la liaison N-C_α (angle dièdre ϕ), le second est une élongation de la double liaison C=O. Malgré des hauteurs de barrière très proches (respectivement 0,22, 0,19 et 0,23 eV pour II.b, II.d et III.c), la première intersection conique est donc beaucoup moins accessible dans le mécanisme III.c que dans les deux autres, ce qui confirme l'attribution précédemment réalisée.

Comme le laissaient prévoir les barrières plus élevées calculées pour le conformère **B** de Ac-Phe-NHMe, plus de modes de vibration ont des rapports V_i/ZPE_i proches de 1 dans cette molécule (Figure 5.11). L'accessibilité de l'intersection conique est par conséquent plus faible, ce qui est cohérent avec les durées de vie de l'état ππ* plus longues mesurées expérimentalement. Dans le cas du mécanisme II.b, trois modes présentent même des valeurs supérieures à 1, ce qui suggère que ce mécanisme est légèrement moins favorable que le mécanisme II.d.

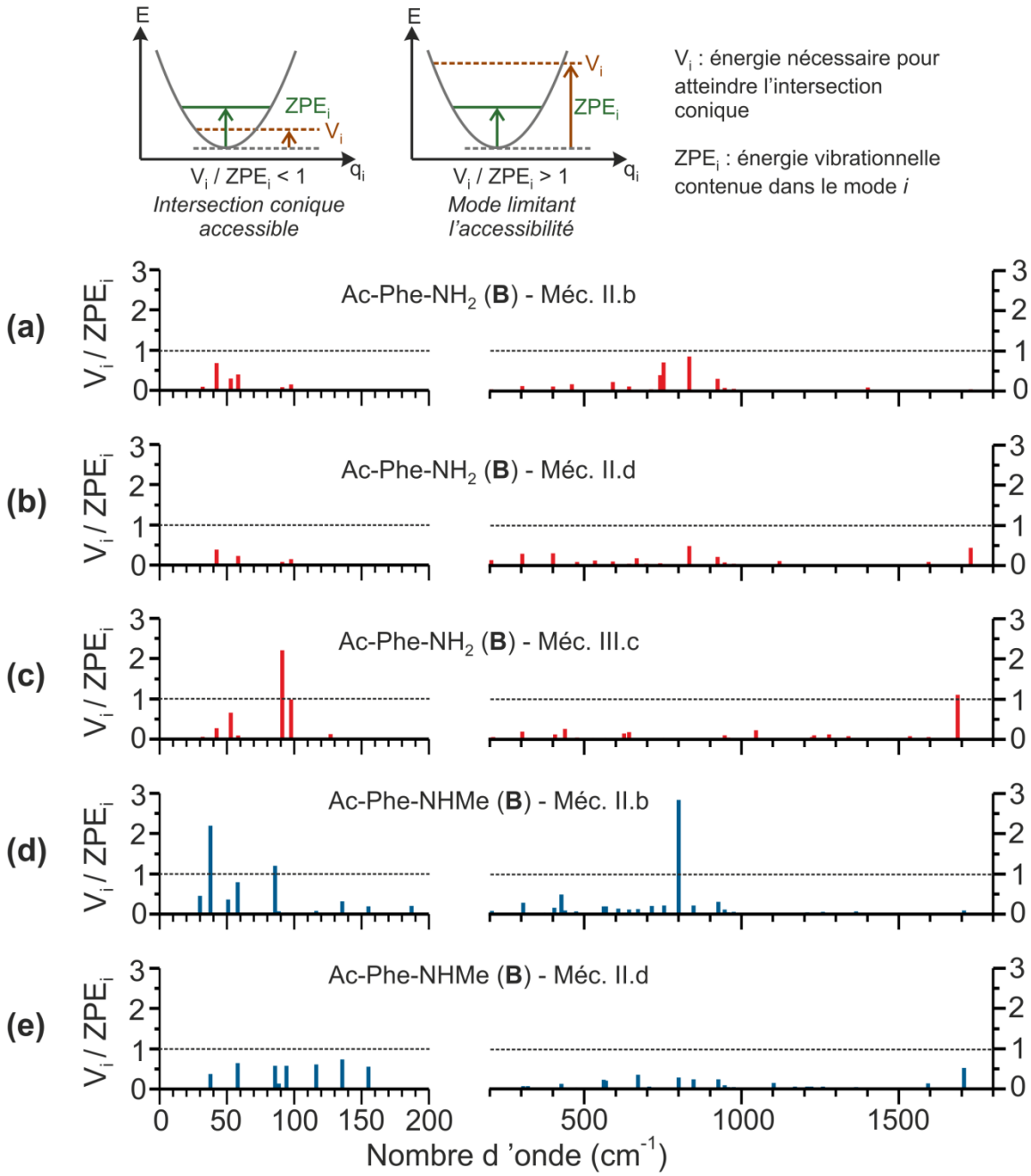


Fig. 5.11 – *Rapport V_i /ZPE_i de l'énergie potentielle nécessaire pour atteindre l'intersection conique via les mécanismes II.b (a,d), II.d (b,e) et III.c (c) sur l'énergie potentielle du point zéro des modes de vibration de l'état ππ* des conformères* ***B*** *de Ac-Phe-NH_2 (a,b,c) et Ac-Phe-NHMe (d,e).*

Jusqu'à présent, le rôle des couplages entre états électroniques à la géométrie de la première intersection conique n'a pas été évoqué. L'hypothèse sous-jacente de la discussion précédente était donc que ces couplages sont quasiment identiques pour chaque conformère et chaque mécanisme. Une manière simplifiée d'estimer l'influence de ces couplages, et de voir si celle-ci confirme l'attribution précédente, peut être de déterminer de quels modèles phénoménologiques ces mécanismes se rapprochent le plus. Les mécanismes de type II et III sont des transferts d'excitation du cycle aromatique vers les liaisons peptidiques ($\pi\pi^* \rightarrow n_{bb}\,\pi_{CO}^*$). Ce sont des processus à deux électrons qui peuvent donc être décrits soit par un transfert d'énergie de type Förster, soit un transfert d'énergie de type Dexter (Figure 5.4). Le fait que les transitions $n\rightarrow\pi^*$ des doubles liaisons C=O et les transitions $\pi\rightarrow\pi^*$ du toluène ont généralement des forces d'oscillateurs assez faibles rend plus probable ici le transfert de type Dexter. Dans le but de comparer quantitativement la force relative de ce type de couplage, entre les différents mécanismes de relaxation et les différents conformères des phénylalanines protégées, il a été envisagé de calculer le recouvrement entre les orbitales moléculaires localisées sur les deux groupements impliqués. Cependant, comme la probabilité du transfert d'excitation de type Dexter diminue très rapidement avec la distance, il est possible d'estimer qualitativement la force du couplage en mesurant, dans la géométrie de l'état $\pi\pi^*$, la distance $d(O\bullet\bullet\bullet H_{Phe})$ entre un atome d'oxygène d'une des liaisons peptidiques et l'atome d'hydrogène du cycle aromatique le plus proche de celui-ci (Figure 5.12). Il faut cependant noter que le recouvrement entre orbitales (le paramètre pertinent à comparer dans un transfert d'énergie de type Dexter) dépend aussi de l'orientation relative ente le cycle aromatique et la double liaison C=O. On peut remarquer que le conformère **B** est celui où le cycle aromatique est le plus proche d'une double liaison C=O ($d_{O\bullet\bullet\bullet H}$ = 235 pm), cette dernière appartenant à la deuxième liaison peptidique, ce qui est en accord avec l'attribution précédente d'un mécanisme de type II pour expliquer la dynamique rapide de celui-ci. A l'opposé, le cycle aromatique du conformère **A**, qui est bien orienté vers la seconde liaison peptique, est cependant situé de l'autre côté de la chaîne principale par rapport à la liaison C=O, la distance $d_{O\bullet\bullet\bullet H}$ entre le cycle et cette liaison peptidique est donc beaucoup plus longue que dans le cas du conformère **B** ($d_{O\bullet\bullet\bullet H}$ = 411 pm). Le transfert de type Dexter doit donc probablement être plus difficile pour ce dernier conformère. Enfin, le cycle aromatique du conformère **C** est celui qui est le plus éloigné des deux liaisons C=O (respectivement 463 et 476 pm avec la première et la deuxième liaison peptidique). Le cycle étant légèrement plus proche de la première liaison peptidique que de la seconde, cela pourrait signifier qu'un mécanisme de type III serait plus favorable pour ce conformère.

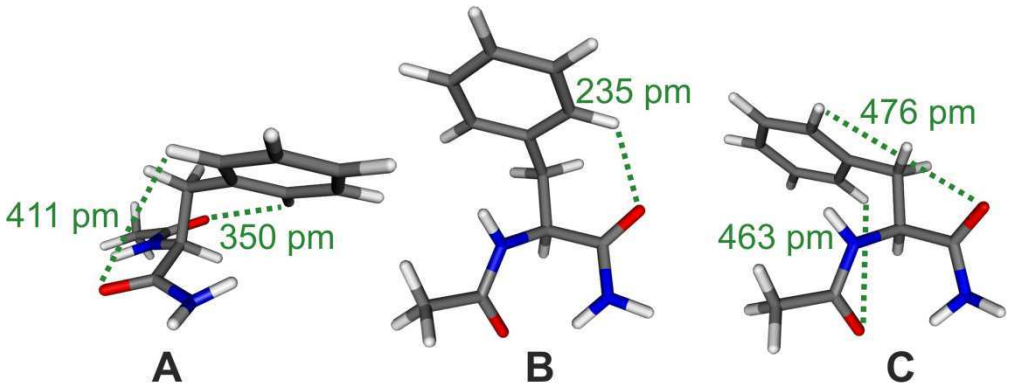


Fig. 5.12 – *Structures des conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2 optimisées dans le premier état excité ππ* (RI-CC2/cc-pVDZ). Les distances indiquées sont les distances minimales entre les atomes d'oxygène des liaisons peptidiques et les atomes d'hydrogène du cycle aromatique.*

5.1.3 Conclusion sur les dynamiques de relaxation des phénylalanines protégées

Des expériences de spectroscopie pompe-sonde, associées à des calculs de chimie quantique des états excités, ont permis de montrer l'influence forte que pouvait avoir l'environnement proche du chromophore aromatique de la phénylalanine protégée sur la dynamique de relaxation des états excités de cette molécule. Nous avons démontré que les mécanismes de relaxation de l'état $\pi_{Phe}\pi_{Phe}^*$ de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe variaient d'un conformère à un autre et qu'en particulier un mécanisme de transfert d'excitation vers les liaisons peptidiques pouvait être responsable de la durée de vie anormalement basse du conformère **B** de Ac-Phe-NH_2, mettant ainsi en exergue, et c'est le résultat marquant de cette étude, le rôle des états excités de la chaîne peptidique (nπ*) dans la relaxation électronique des états excités des chromophores aromatiques.

La décomposition de l'accessibilité de l'intersection conique sur les différents modes de vibration des phénylalanines protégées amène à penser que des modes particuliers peuvent limiter la dynamique de relaxation. Il serait donc intéressant de pouvoir exciter vibroniquement des modes de vibration de l'état excité ππ* pour observer si la dynamique de relaxation de cet état peut être accélérée en apportant plus d'énergie dans ces modes. Malheureusement, les phénylalanines protégées ne possèdent pas d'importantes progressions vibrationnelles permettant de mettre en évidence un tel effet. De longues progressions vibrationnelles existent en revanche pour certains conformères des dipeptides protégés de la série Ac-Xxx-Phe-NH_2 vus dans le

chapitre précédent et c'est donc une des raisons qui nous ont conduits à étudier ces systèmes plus complexes.

5.2 Vers des systèmes plus complexes

Dans cette partie les dynamiques de relaxation de deux types de systèmes seront abordées : d'une part celles des dipeptides protégés des séries Ac-Xxx-Phe-NH_2 et Ac-Phe-Xxx-NH2 et, de l'autre, celle des hydrates, les complexes 1 : 1 de (Ac-Phe-NH_2 : H_2O).

5.2.1 Peptides protégés Ac-Xxx-Phe-NH_2

Les dipeptides protégés de la série Ac-Xxx-Phe-NH_2 possèdent des structures très différentes de celles des conformères de la phénylalanine protégée. L'environnement proche autour du chromophore étant modifié, on peut alors se demander si les mécanismes de relaxation précédemment identifiés sont toujours actifs dans ces systèmes. Pour répondre à cette question, nous nous sommes intéressés à plusieurs effets : l'influence de la conformation sur la dynamique de relaxation, l'effet d'excitations vibroniques et de la méthylation du groupement NH_2 terminal.

5.2.1.a Effets conformationnels

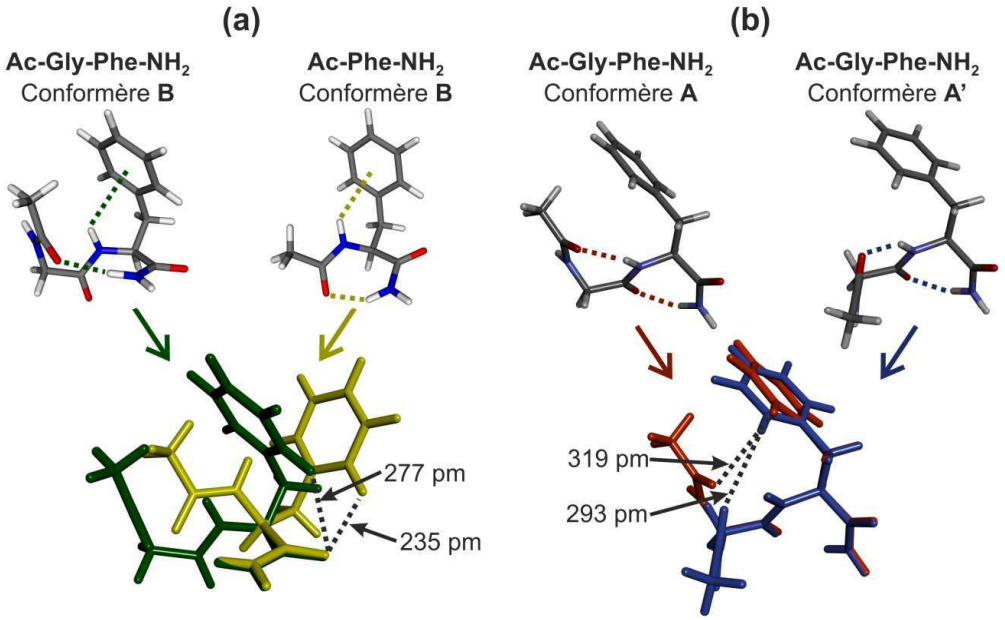


Fig. 5.13 – *(a) Comparaison des structures calculées du conformère **B** de Ac-Gly-Phe-NH_2 et du conformère **B** de Ac-Phe-NH_2 dans leur état fondamental (RI-B97-D/TZVPP). (b) Structures des conformères **A** et **A'** de de Ac-Gly-Phe-NH_2 dans leur état fondamental, calculées selon la même méthode.*

Les conformères des dipeptides Ac-Gly-Phe-NH_2, Ac-Ala-Phe-NH_2 et Ac-Val-Phe-NH_2 ont été décrits au chapitre précédent. Ils peuvent être classés en deux familles : les structures avec deux coudes γ, appelées **A** (γ_L-γ_L) ou **A'** (γ_D-γ_L), et les structures en coude β, appelées respectivement **B** et **B'** pour les coudes β type I et type II' (Figure 4.16). Les conformères **A'** et **B'** n'ont été observés que pour Ac-Gly-Phe-NH_2, dû à la plus grande flexibilité de l'acide aminé glycine. Les intensités des transitions UV du conformère **A** de Ac-Val-Phe-NH_2 sont trop faibles pour permettre une détermination de la durée de vie du premier état excité ππ* de ce conformère par les techniques d'IR2P-2C ou de mesures de fluorescence. Les durées de vie des autres conformères de ces dipeptides sont indiquées dans le Tableau 5.5. On peut remarquer qu'un effet de la conformation est toujours présent dans ces dipeptides protégés : les états excités des conformères **A** possèdent des durées de vies autour de 60 ns, environ trois fois plus longues que celles des conformères **A'**, **B** et **B'** ; ce qu'on peut interpréter, par analogie avec Ac-Phe-NH_2, comme l'intervention de mécanismes de relaxation non-radiatifs différents dans ces conformères.

	Durée de vie des conformères à l'origine de la transition π→π* ($\tau_{\pi\pi^*, exp}$)			
	A	**A'**	**B**	**B'**
Ac-Gly-Phe-NH_2	55 ± 3 ns	19 ± 2 ns	30 ± 3 ns [(b)]	19 ± 2 ns
Ac-Ala-Phe-NH_2	55 ± 3 ns [(a)]	[(c)]	23 ± 2 ns	[(c)]
Ac-Val-Phe-NH_2	43 ± 3 ns	[(c)]	12 ± 10 ns	[(c)]

Tab. 5.5 – *Durées de vie du premier état excité ππ* des conformères **A**, **A'**, **B** et **B'** des dipeptides protégés de la série Ac-Xxx-Phe-NH_2 déterminées par IR2P-2C. Les durées de vie ont toutes été enregistrées après excitation à l'origine de la transition π→π* sauf (a), déterminée à partir de la première transition vibronique, dû à une intensité trop faible à l'origine. (b) Une coïncidence spectrale avec une bande de la progression vibrationnelle du conformère **A** peut expliquer la valeur plus élevée de ce conformère par rapport aux autres dipeptides protégés. (c) Conformères non détectés pour ces molécules.*

On peut noter que l'environnement du cycle aromatique dans les structures en coude β (g+) (**B** et **B'**) présente des similitudes avec celui observé dans le conformère **B** de Ac-Phe-NH_2 (Figure 5.13a) : le cycle est proche de la liaison peptidique de l'extrémité C terminal ($d_{O\cdots H}$ = 277 pm et 269 pm respectivement pour les conformères **B** et **B'** de Ac-Gly-Phe-NH_2). Il est donc probable qu'un mécanisme de transfert d'excitation vers cette liaison peptidique puisse également se produire dans ces structures et être responsable des durées de vie faibles de l'état ππ* observées. En revanche, dans les structures γ-γ l'orientation différente du cycle aromatique (g-) l'éloigne des liaisons peptidiques (Figure 5.13b). La distance entre le cycle aromatique et la

première liaison peptidique est de plus légèrement plus courte dans le cas du conformère **A'** que du conformère **A** de Ac-Gly-Phe-NH_2.

5.2.1.b Effets vibrationnels

Les conformères **A** de Ac-Gly-Phe-NH_2 et Ac-Ala-Phe-NH_2 possèdent des progressions vibrationnelles assez longues dues à deux modes de vibration de l'état ππ*, appelés ici ν et ν'. Nous avons donc cherché à étudier l'influence d'un excès d'énergie dans ces deux modes de vibration sur la durée de vie de l'état ππ*. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 5.14. Les durées de vie de l'état ππ* des conformères **A** des deux molécules diminuent avec l'excès d'énergie apportée dans les modes ν et ν', elles sont de 30 à 40% plus faibles à la fin de la progression vibrationnelle qu'à l'origine de la transition. Cet effet ne semble cependant pas dépendre de la nature du mode de vibration excité (ν ou ν'). Le fait que la durée de vie de l'état ππ* diminue lorsque la quantité d'énergie vibrationnelle dans ces modes augmente est probablement un signe qu'à l'origine de la transition l'énergie contenue dans ces modes de vibration est insuffisante pour atteindre de manière efficace la région de l'intersection conique. La probabilité d'atteindre l'intersection conique serait donc, dans les conformères **A**, limitée par des modes de basses fréquences. En supposant que le calcul des modes de vibration de l'état ππ* permette d'attribuer les modes ν et ν', un calcul des rapports V_i/ZPE_i analogue à celui réalisé pour les phénylalanines protégées pourrait apporter un critère discriminant entre plusieurs mécanismes de relaxation.

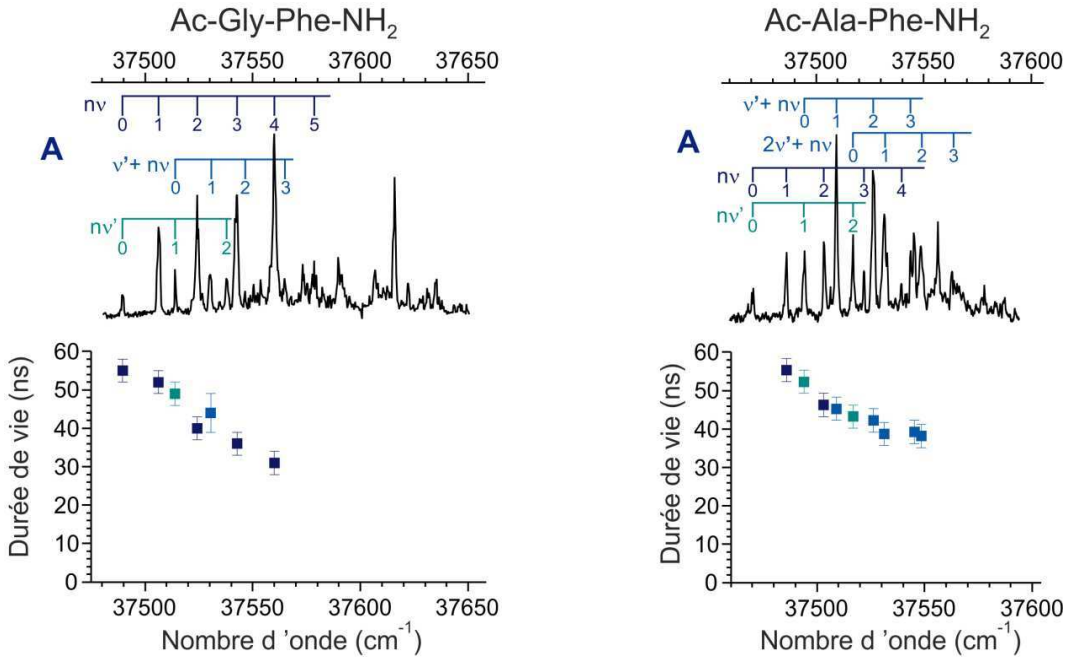


Fig. 5.14 – *Spectres d'excitation UV et évolutions des durées de vie en fonction des transitions vibroniques excitées pour les conformères **A** de Ac-Gly-Phe-NH_2 (gauche) et Ac-Ala-Phe-NH_2 (droite). Les durées de vie ont été enregistrées par la méthode pompe-sonde.*

5.2.1.c Effet de la méthylation du groupement NH_2 terminal

Une augmentation de la durée de vie des conformères **B** et **C** de la phénylalanine protégée avait été observée après méthylation du groupement NH_2 terminal (Figure 5.3). Dans le but de vérifier si cet effet est commun à d'autres peptides dont l'extrémité C-terminale est protégée sous la forme d'un amide primaire, les durées de vie de l'état excité ππ* de Ac-Gly-Phe-NH_2 et Ac-Ala-Phe-NH_2 ont été comparées à celles des dipeptides méthylés Ac-Gly-Phe-NHMe et Ac-Ala-Phe-NHMe. Une augmentation de la durée de vie de l'état ππ* d'environ 30 ns et 20 ns a été observée respectivement pour les conformères **A** de Ac-Gly-Phe-NHMe et Ac-Ala-Phe-NHMe par rapport aux dipeptides non méthylés (Figure 5.15). Des durées de vie plus élevées ont également été obtenues pour les conformères **B** et **B'** de Ac-Gly-Phe-NHMe et pour le conformère **B** de Ac-Ala-Phe-NHMe (respectivement 67, 75 et 68 ns) (Tableau 5.6). La présence d'une liaison peptidique $CONH_2$ du côté C-terminal plutôt qu'une liaison CONHMe facilite donc ici aussi la relaxation électronique depuis l'état excité ππ*. Une raison pour expliquer cela pourrait être que la substitution d'un atome d'hydrogène par un groupement méthyle augmente l'encombrement stérique sur la dernière liaison peptidique, il devient alors plus coûteux en énergie de déformer cette liaison et par conséquent plus difficile de franchir la barrière à l'intersection conique. Des calculs des états excités de ces systèmes au niveau chimie quantique sont cependant nécessaires pour vérifier cette hypothèse et déterminer si les mécanismes de relaxation par transfert d'excitation vers les liaisons peptidiques sont également possibles pour ces dipeptides protégés.

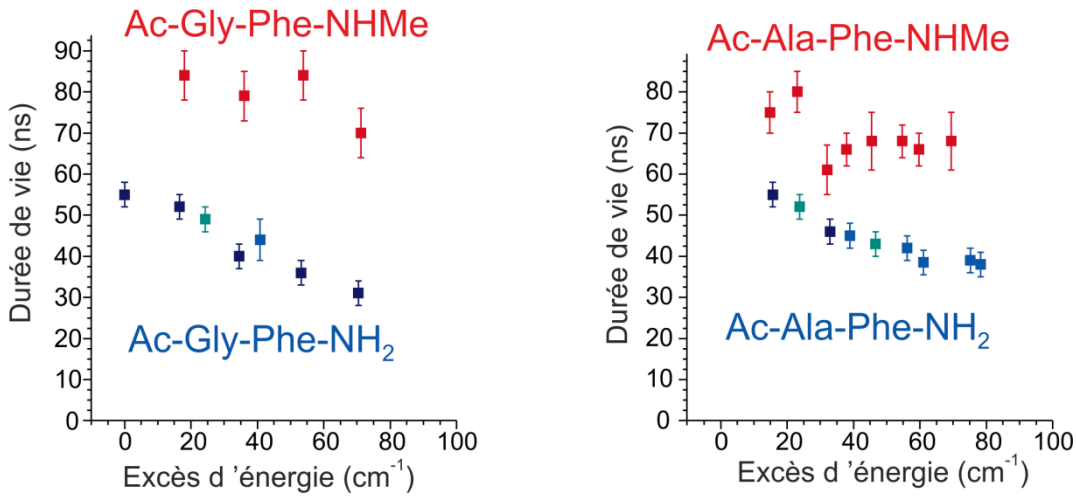


***Fig. 5.15** – Durées de vie du premier état excité ππ* de Ac-Gly-Phe-NH_2, Ac-Gly-Phe-NHMe (gauche), Ac-Ala-Phe-NH_2 et Ac-Ala-Phe-NHMe (droite) mesurées par spectroscopie pompe-sonde en fonction de l'excès d'énergie dans l'état excité.*

	Durée de vie des conformères			
	A	**A'**	**B**	**B'**
Ac-Gly-Phe-NH_2	30 – 55 ± 3 ns [(a)]	19 ± 2 ns	30 ns ± 3 ns	19 ± 2 ns
Ac-Gly-Phe-NHMe	70 – 85 ± 4 ns [(a)]	[(b)]	67 ± 4 ns	75 ± 4 ns
Ac-Ala-Phe-NH_2	38 – 55 ± 3 ns [(a)]	[(c)]	23 ± 2 ns	[(c)]
Ac-Ala-Phe-NHMe	60 – 80 ± 4 ns [(a)]	[(c)]	68 ± 4 ns	[(c)]

Tab. 5.6 – *Durées de vie du premier état excité ππ* des conformères **A**, **A'**, **B** et **B'** des dipeptides protégés de la série Ac-Xxx-Phe-NH_2 et Ac-Xxx-Phe-NHMe déterminées par IR2P-2C. (a) Valeurs extrêmes des durées de vie obtenues en excitant les bandes de la progression vibrationnelles du conformère A. (b) Intensité de la transition UV trop faible pour permettre de mesurer la durée de vie de ce conformère. (c) Conformères non détectés pour ces molécules.*

5.2.1.d Retour sur les transitions vibroniques $6a_0^1$ et $6b_0^1$

Dans le chapitre précédent, nous avions pu constater que les intensités des transitions vibroniques $6a_0^1$ et $6b_0^1$ des dipeptides de la série Ac-Xxx-Phe-NH_2 étaient anormalement faibles comparées à celles de Ac-Phe-NH_2 (Figures 4.2 et 4.19). Cet effet était notamment plus marqué sur les conformères **A** (géométrie γ_L-γ_L) que sur les conformères **B** ou **B'** (coudes β). Une des hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène avait été une relaxation rapide du premier état excité ππ* des conformères **A**. Comme un excès d'énergie de 80 cm^{-1} dans les modes de basses fréquences de l'état ππ* des conformères **A** provoque déjà une diminution de sa durée de vie d'environ 35 %, nous avons cherché à savoir si l'ajout de plusieurs centaines de cm^{-1} dans les vibrations 6a et 6b pouvait être responsable d'une augmentation de plusieurs ordres de grandeur de la dynamique de relaxation. Des durées de vie du premier état ππ* des dipeptides Ac-Xxx-Phe-NH_2 ont donc été mesurées en excitant les bandes les plus intenses apparaissant dans la région des transitions vibroniques $6a_0^1$ et $6b_0^1$ (Tableau 5.7).

Les durées de vie des états excités des conformères **B** ont été trouvées égales à ~ 15 ns pour les dipeptides protégés par un groupement amide primaire sur l'extrémité C-terminale et ~ 60 - 70 ns pour ceux protégés par un groupement amide secondaire. On peut remarquer que les durées de vie des conformères **B** dans cette région spectrale sont peu différentes de celles obtenues après excitation à l'origine de la transition π→π* (Tableau 5.6), la méthylation du groupement NH_2 terminal a toujours pour effet d'augmenter la durée de vie de l'état ππ*. Les durées de vie des états excités des conformères **A** n'ont pu être enregistrées que pour Ac-Gly-Phe-NH_2 (~ 15 ns), les transitions vibroniques 6a et 6b de ce conformère n'étaient pas assez intenses dans Ac-Ala-Phe-NH_2 pour effectuer ces mesures et étaient inexistantes sur les spectres

IR2P-1C des trois autres dipeptides protégés présentés dans le Tableau 5.7. Or, d'après l'exemple du conformère **B** de Ac-Phe-NH_2 (Figure 5.1), on sait qu'il est possible d'ioniser des espèces excitées dont la durée de vie est de l'ordre de la nanoseconde avec les mêmes lasers UV nanosecondes. De plus, on se serait attendu à observer une différence de comportement entre les conformères **A** des espèces protégées par un groupement NH_2 ou NHMe si la durée de vie était un facteur limitant. Par conséquent, il est probable que la disparition des transitions vibroniques 6a et 6b des conformères **A** sur les spectres IR2P-1C soit due à un autre effet (couplage vibrationnel, électronique ou IVR) plutôt qu'à une dynamique ultra-rapide de l'état $\pi\pi^*$. Finalement, ces résultats apportent un nouveau critère spectroscopique permettant de confirmer l'attribution des structures réalisées à partir des spectres de vibration dans l'IR et de différencier les structures γ_L-γ_L des coudes β.

	Durée de vie des conformères dans la région spectrale des transitions vibroniques 6a et 6b			
	A	**A'**	**B**	**B'**
Ac-Gly-Phe-NH_2	15 ± 2 ns [b]	8,5 ± 2 ns [b]	14 ± 2 ns [a]	9 ± 2 ns [b]
Ac-Gly-Phe-NHMe	[d]	[d]	59 ± 3 ns [b]	[d]
Ac-Ala-Phe-NH_2	[d]	[c]	14 ± 2 ns [b]	[c]
Ac-Ala-Phe-NHMe	[d]	[c]	70 ± 4 ns [a] 67 ± 4 ns [b]	[c]
Ac-Val-Phe-NH_2	[d]	[c]	15 ± 5 ns [b]	[c]

Tab. 5.7 – *Durées de vie du premier état excité $\pi\pi^*$ des conformères **A**, **B** et **B'** des dipeptides protégés de la série Ac-Xxx-Phe-NH_2 et Ac-Xxx-Phe-NHMe déterminées par IR2P-2C dans le domaine des transitions vibroniques (a) 6a et (b) 6b. (c) Conformères non détectés pour ces molécules. (d) Intensité de la transition UV trop faible pour permettre de mesurer la durée de vie de l'état $\pi\pi^*$. Les structures des différents conformères sont indiquées dans la Figure 4.16 du Chapitre 4 et dans l'Annexe B.2.2.*

5.2.2 Peptide protégé Ac-Phe-Ala-NH_2

L'étude de la dynamique de relaxation du dipeptide protégé Ac-Phe-Ala-NH_2 est très intéressante car l'environnement du chromophore aromatique du conformère β_L(a)-γ_L de ce dipeptide protégé est très proche de celui du conformère **A** de Ac-Phe-NH_2 ou Ac-Phe-NHMe (Figure 5.16). On pouvait donc s'attendre à ce que leurs mécanismes de relaxation soient similaires. Dans le cas du conformère **A** des phénylalanines protégées, qui ont une durée de vie d'environ 70 ns à l'état excité, nous avions conclu dans la partie précédente que le mécanisme

principal de relaxation était le même que pour le toluène, c'est-à-dire le croisement intersystème. Cependant, ce ne peut plus être le cas pour le conformère $\beta_L(a)$-γ_L de Ac-Phe-Ala-NH_2 car la durée de vie que nous avons mesurée pour l'état $\pi\pi^*$ de celui-ci est environ deux fois plus faible (33 ns). L'ajout d'un acide aminé alanine dans la chaîne peptidique ouvre donc une nouvelle voie de relaxation plus rapide que le croisement intersystème. On peut remarquer que dans le dipeptide Ac-Phe-Ala-NH_2, contrairement au conformère **A** de Ac-Phe-NH_2, une double liaison C=O (celle de la dernière liaison peptidique) est située dans l'environnement proche du cycle aromatique. Dans l'hypothèse d'un transfert d'excitation de type Dexter vers la dernière liaison peptidique ($\pi_{Phe}\pi_{Phe}^* \rightarrow n_{bb}\pi_{CO}^*$), la proximité de cette double liaison pourrait faciliter la relaxation depuis l'état excité $\pi\pi^*$. Il reste toutefois à démontrer par des calculs de chimie quantique que ce mécanisme est possible, mais cet exemple montre à quel point il est difficile de prédire *a priori*, uniquement à partir des structures calculées, les mécanismes de relaxation électronique. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer la durée de vie de l'état $\pi\pi^*$ du tripeptide protégé Ac-Phe-Ala-Ala-NH_2 car celui-ci adopte une conformation de type $\beta_L(a)$-γ_L-γ_L [40], avec un environnement proche autour du cycle aromatique qui semble très voisin de celui du conformère $\beta_L(a)$-γ_L de Ac-Phe-Ala-Ala-NH_2. Cependant, la distance entre le cycle aromatique et la dernière liaison peptidique étant plus grande que pour Ac-Phe-Ala-NH_2 ($d_{O\cdots H}$ = 531 pm), la durée de vie de son état $\pi\pi^*$ devrait être rallongée.

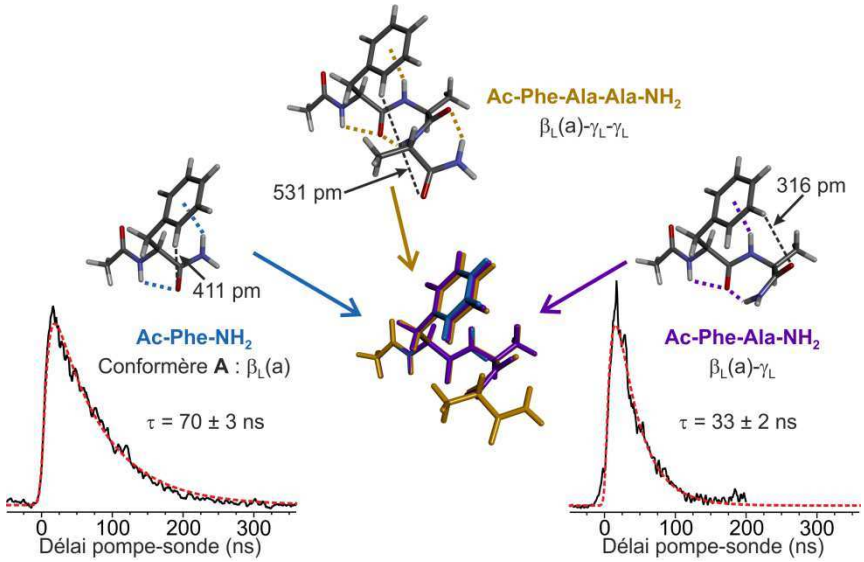


***Fig. 5.16** – Structures calculées (RI-B97-D/TZVPP) et durées de vie du premier état excité $\pi\pi^*$ du conformère **A** de Ac-Phe-NH_2 (gauche) et du conformère majoritaire de Ac-Phe-Ala-NH_2 (droite). La structure du tripeptide protégée Ac-Phe-Ala-Ala-NH_2, déterminée dans des expériences précédentes [40] et recalculée avec la même méthode théorique, est indiquée pour comparaison.*

5.2.3 Peptides microsolvatés

Dans le chapitre précédent (Figure 4.8), nous avons démontré que la solvatation d'un peptide protégé par une molécule d'eau modifiait de façon importante l'environnement autour du chromophore aromatique : les origines des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ des hydrates **W** et **X** de Ac-Phe-NH_2 sont par exemple déplacées respectivement de + 127 cm^{-1} et + 84 cm^{-1} par rapport à celle de **C**, le conformère isolé dont ils sont le plus proches en structure. Nous avons donc également voulu déterminer quelle était l'influence de cette modification d'environnement sur la dynamique de relaxation de l'état excité $\pi\pi^*$. Cependant, le fait que les complexes avec l'eau se dissocient majoritairement lors du processus d'ionisation à deux photons empêche d'utiliser pour cela la spectroscopie pompe-sonde d'IR2P-2C, car elle ne permet pas de déterminer si la fragmentation a lieu dans l'état excité ou dans l'ion. Par conséquent, les dynamiques de relaxation de ces systèmes ont été étudiées par spectroscopie de fluorescence. Les spectres d'excitation de fluorescence de (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) et (Ac-Phe-NHMe : H_2O) sont comparés aux spectres d'IR2P-1C de ces systèmes dans la Figure 5.17. On peut remarquer qu'aucun signal de fluorescence n'a été détecté pour les deux hydrates **W** et **X** de (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) alors que ce sont les hydrates possédant les transitions les plus intenses sur le spectre d'IR2P-1C. Un signal de fluorescence peut être identifié sur le spectre de (Ac-Phe-NHMe : H_2O) après excitation à la longueur d'onde d'absorption de **W** mais son intensité reste très faible par rapport à celle des conformères isolés. Le fait de pouvoir observer la fluorescence émise par le conformère **B** de Ac-Phe-NH_2, qui n'a pourtant une durée de vie que de 1,5 ns dans l'état $\pi\pi^*$, suggère que l'ajout d'une molécule d'eau au système ouvre de nouvelles voies de relaxation encore plus rapides. Une limite supérieure de la durée de vie des phénylalanines protégées monohydratées peut alors être estimée à quelques centaines de picosecondes. Afin d'identifier les mécanismes pouvant être responsables de la relaxation rapide, des calculs de dynamique non-adiabatique utilisant la TDDFT sont actuellement en cours dans le groupe de N. Došlić.

Contrairement aux résultats obtenus sur les dipeptides Ac-Xxx-Phe-NH_2 et Ac-Phe-Ala-NH_2, qui peuvent être expliqués à partir des mécanismes découverts sur la phénylalanine protégée, ces derniers résultats montrent que la dynamique de relaxation des peptides hydratés est profondément différente de celle des molécules isolées. On est donc en droit de se demander si certains conformères hydratés qui peuvent se former dans la détente supersonique pourraient avoir une durée de vie à l'état excité trop faible pour être détectés par spectroscopie d'IR2P-1C. Le cas des conformations de type *I*, les plus basses en énergie, où la molécule d'eau est insérée dans la liaison hydrogène C_7 a déjà été évoqué dans le chapitre

précédent. La non-observation de cette géométrie a été attribué au fait que la molécule d'eau ne puisse pas rester collée au peptide si ce dernier n'est pas suffisamment refroidi, donc s'il ne s'est pas déjà replié. Alternativement, elle pourrait être due à une dynamique ultrarapide spécifique. De la même manière, dans le cas des conformations repliées de type S_2, la conformation $R^L(a)\,S_2(d)$, proposée comme intermédiaire dans le mécanisme d'isomérisation du conformère **A** en **W** et **X** (Figure 4.10), n'est pas observée, bien qu'elle soit quasiment isoénergétique des structures **W** et **X**. Une interprétation a été proposée, basée sur la thermodynamique et des effets de température. L'existence d'une dynamique ultra rapide empêchant son observation par IR2P serait tout aussi crédible.

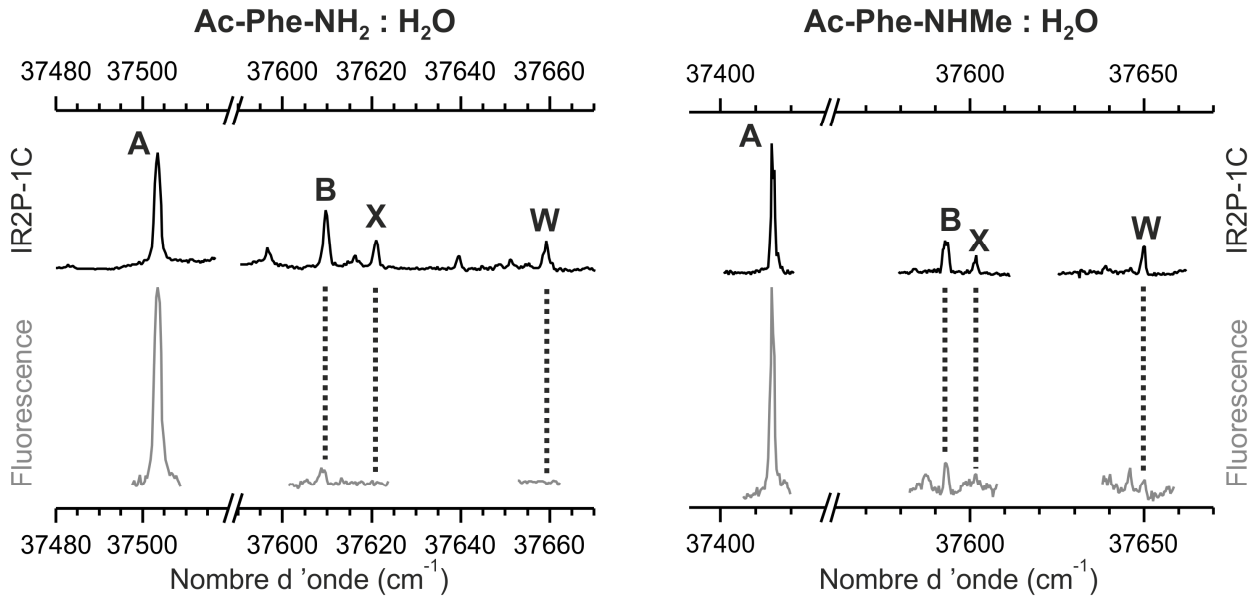


Fig. 5.17 – *Spectres UV des complexes 1 : 1 de (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) (gauche) et (Ac-Phe-NHMe : H_2O) (droite) obtenus par les techniques d'IR2P-1C (haut, noir) ou d'excitation de fluorescence (bas, rouge).*

5.2.4 Conclusion

Les résultats expérimentaux obtenus sur les dipeptides protégés et sur les complexes avec une molécule d'eau ont permis de mettre en évidence un certain nombre d'effets : les caractéristiques des mécanismes de relaxation des conformères γ_L-γ_L (**A**) des dipeptides protégés Ac-Xxx-Phe-NH_2 sont par exemple très différentes de celles des coudes β (**B**) et l'ajout d'une molécule d'eau ouvre de nouvelles voies de relaxation beaucoup plus rapides que celles présentes dans la molécule isolée. Par ailleurs, l'exemple du dipeptide protégé Ac-Phe-Ala-NH_2 montre que les mécanismes mis en jeu sont complexes et qu'il est délicat d'extrapoler les résultats obtenus

sur Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe à des systèmes différents. Il est pour cela crucial de disposer d'une contrepartie théorique à ces observations expérimentales.

Un des résultats importants de ces travaux est que la présence d'un groupement -$CONH_2$ sur la chaîne principale d'un dipeptide semble être un facteur favorisant la relaxation électronique de l'état $\pi\pi^*$. La méthylation de ce groupement conduit en effet dans nos expériences à une augmentation marquée de la durée de vie. Bien qu'absent -$CONH_2$ dans la chaîne principale des protéines, ce groupement est néanmoins présent sur la chaîne latérale de deux acides aminés: l'asparagine et la glutamine (Figure 5.18), ce qui suggère qu'il puisse jouer un rôle dans la photophysique des phenylalanines au sein des protéines. Afin d'apprécier l'éventuel caractère général de ces propriétés, nous envisageons d'étudier plus précisément la dynamique de relaxation de dipeptides protégés contenant l'un de ces acides aminés et l'acide aminé phénylalanine ; l'enjeu étant d'observer le transfert d'excitation entre ces deux chaînes latérales.

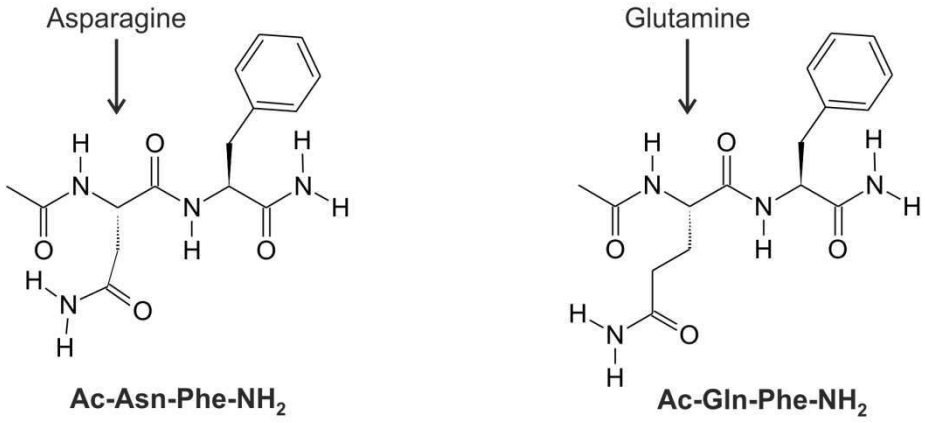


Fig. 5.18 – *Formules topologiques des dipeptides protégés Ac-Asn-Phe-NH_2 et Ac-Gln-Phe-NH_2 possédant respectivement un acide aminé asparagine et glutamine.*

L'observation d'un tel transfert d'énergie en phase gazeuse de Phe vers les chromophores UV que sont les liaisons peptidiques, suggère que des transferts vers d'autres chromophores puissent également être diagnostiqués d'une manière comparable. Ainsi, une dynamique de relaxation ultrarapide de l'état $\pi\pi^*$ est actuellement suspectée dans le cas du tripeptide protégé Ac-Cys-Phe-Cys-NH_2, où les chaînes latérales des deux acides aminés cystéines (Cys) forment un pont disulfure (Figure 5.19a). En effet, des expériences récentes réalisées au sein du laboratoire n'ont pu détecter aucun signal provenant de ce système par spectroscopie d'IR2P-1C. Dans ce cas, ce serait le pont disulfure, également chromophore UV, qui pourrait accepter l'excitation du cycle aromatique et accélérer la relaxation. Cette interprétation fait écho à des

expériences menées sur une enzyme cutinase d'un champignon, le *Fusarium solani*, montrant qu'un pont disulfure proche d'un acide aminé tryptophane pouvait désactiver la fluorescence de ce dernier (Figure 5.19b) [41] : dès que le pont disulfure est réduit, la fluorescence du tryptophane réapparaît. Des expériences de spectroscopie femtoseconde pompe-sonde sont donc envisageables dans des petits peptides en phase gazeuse, dans l'objectif de mesurer la dynamique de relaxation de la phénylalanine en présence d'un pont disulfure. Dans la mesure, où dans ce cas la sélectivité conformationnelle serait perdue (à cause de la largeur spectrale du laser fs), il faudrait cependant imaginer, pour être complet, de développer des expériences de double résonance IR-UV, couplant lasers IR ns et UV femtoseconde et susceptibles de caractériser les conformations de ces systèmes. Dans ce cas l'absorption IR devra alors être mise en évidence de façon différente de celle des expériences IR/UV classiques en régime ns, par exemple en détectant le chauffage IR par une modification de la distribution des photoélectrons.

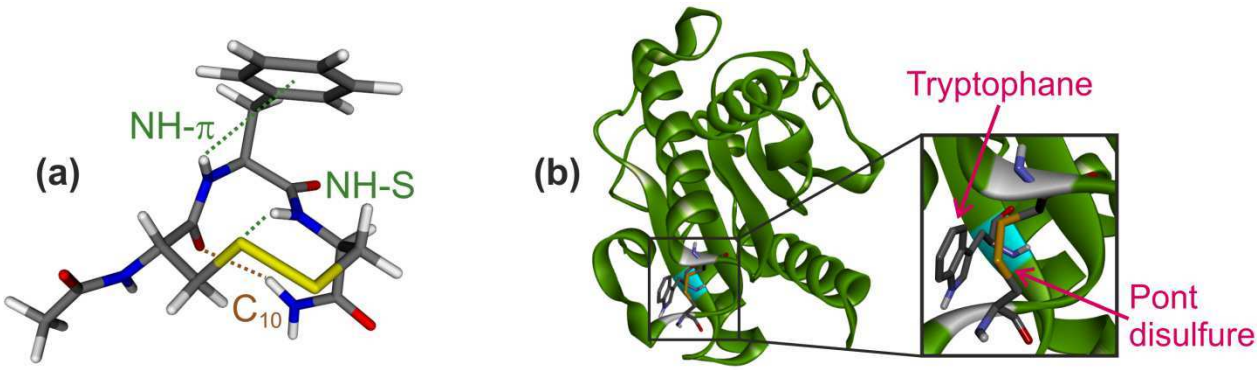


Fig. 5.19 – *(a) Structure la plus stable du tripeptide protégé Ac-Cys-Phe-Cys-NH_2 calculée par la méthode RI-B97-D/TZVPP. Le pont disulfure (liaison S-S) est représenté en jaune. (b) Structure de la cutinase du Fusarium solani déterminée par diffraction de rayons X [42] (Réf PDB : 1CUS)*

5.3 Bibliographie

[1] Y. Chen et M. D. Barkley, *Biochemistry* **1998**, 37, (28), 9976-9982.

[2] P. R. Callis et T. Q. Liu, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, (14), 4248-4259.

[3] J. R. Lakowicz, Protein Fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, **1983**, pp 342-385.

[4] H. Shizuka, M. Serizawa, T. Shimo, I. Saito et T. Matsuura, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, (6), 1930-1934.

[5] L. P. McMahon, W. J. Colucci, M. L. McLaughlin et M. D. Barkley, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, (22), 8442-8448.

[6] H. T. Yu, W. J. Colucci, M. L. McLaughlin et M. D. Barkley, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, (22), 8449-8454.

[7] Y. Chen, B. Liu, H. T. Yu et M. D. Barkley, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, (39), 9271-9278.

[8] H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, S. Martrenchard, G. Grégoire, C. Desfrancois, J. P. Schermann, M. Barat et J. A. Fayeton, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6, (10), 2628-2632.

[9] D. Nolting, C. Marian et R. Weinkauf, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6, (10), 2633-2640.

[10] O. V. Boyarkin, S. R. Mercier, A. Kamariotis et T. R. Rizzo, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, (9), 2816-2817.

[11] J. A. Stearns, S. Mercier, C. Seaiby, M. Guidi, O. V. Boyarkin et T. R. Rizzo, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, (38), 11814-11820.

[12] H. Kang, C. Jouvet, C. Dedonder-Lardeux, S. Martrenchard, G. Grégoire, C. Desfrancois, J. P. Schermann, M. Barat et J. A. Fayeton, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, 7, (2), 394-398.

[13] A. L. Sobolewski, W. Domcke, C. Dedonder-Lardeux et C. Jouvet, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, 4, (7), 1093-1100.

[14] G. Grégoire, C. Jouvet, C. Dedonder et A. L. Sobolewski, *Chem. Phys.* **2006**, 324, (2-3), 398-404.

[15] L. Blancafort, D. Gonzalez, M. Olivucci et M. A. Robb, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, (22), 6398-6406.

[16] W. Domcke et A. L. Sobolewski, *Nat. Chem.* **2013**, 5, (4), 257-258.

[17] D. Shemesh, A. L. Sobolewski et W. Domcke, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, (19), 4899-4905.

[18] D. Shemesh, C. Hattig et W. Domcke, *Chem. Phys. Lett.* **2009**, 482, (1-3), 38-43.

[19] D. Shemesh et W. Domcke, *ChemPhysChem* **2011**, 12, (10), 1833-1840.

[20] D. Shemesh, A. L. Sobolewski et W. Domcke, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, (4), 1374-1375.

[21] W. Chin, M. Mons, J.-P. Dognon, R. Mirasol, G. Chass, I. Dimicoli, F. Piuzzi, P. Butz, B. Tardivel, I. Compagnon, G. von Helden et G. Meijer, *J Phys. Chem. A* **2005**, 109, 5281-5288.

[22] C. G. Hickman, J. R. Gascooke et W. D. Lawrance, *J. Chem. Phys.* **1996**, 104, (13), 4887-4901.

[23] C. S. Burton et W. A. Noyes, *J. Chem. Phys.* **1968**, 49, (4), 1705-1714.

[24] R. B. Cundall et D. G. Milne, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, (18), 3902-3903.

[25] R. B. Cundall, F. J. Fletcher et D. G. Milne, *J. Chem. Phys.* **1963**, 39, (12), 3536-3537.

[26] T. G. Dietz, M. A. Duncan et R. E. Smalley, *J. Chem. Phys.* **1982**, 76, (3), 1227-1232.

[27] Y. H. Lee, J. W. Jung, B. Kim, P. Butz, L. C. Snoek, R. T. Kroemer et J. P. Simons, *J. Phys. Chem. A* **2004**, 108, (1), 69-73.

[28] T. Hashimoto, Y. Takasu, Y. Yamada et T. Ebata, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, 421, (1-3), 227-231.

[29] G. A. Pino, A. N. Oldani, E. Marceca, M. Fujii, S. I. Ishiuchi, M. Miyazaki, M. Broquier, C. Dedonder et C. Jouvet, *J. Chem. Phys.* **2010**, 133, (12), 124313.

[30] C. Ratzer, J. Kupper, D. Spangenberg et M. Schmitt, *Chem. Phys.* **2002**, 283, (1-2), 153-169.

[31] H. G. Lohmannsroben, K. Luther et M. Stuke, *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, (13), 3499-3503.

[32] A. J. Kaziska, S. A. Wittmeyer, A. L. Motyka et M. R. Topp, *Chem. Phys. Lett.* **1989**, 154, (3), 199-206.

[33] C.-M. Tseng, M.-F. Lin, Y. L. Yang, Y. C. Ho, C.-K. Ni et J.-L. Chang, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, (19), 4989-4995.

[34] T. Forster, *Ann. Phys.-Berlin* **1948**, 2, (1-2), 55-75.

[35] D. L. Dexter, *J. Chem. Phys.* **1953**, 21, (5), 836-850.

[36] L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, 47, 819-846.

[37] H. Wallrabe et A. Periasamy, *Current Opinion in Biotechnology* **2005**, 16, (1), 19-27.

[38] G. Herzberg, Building-up principles, electron configurations and stability of electronic states In *Molecular Spectra and Molecular Structure. III. Electronic Spectra and Electronic Structure of Polyatomic Molecules*, D. van Nostrand Company, New York, **1966**, pp 276-420.

[39] D. G. Truhlar et C. A. Mead, *Phys. Rev. A* **2003**, 68, (3), 032501.

[40] W. Chin, F. Piuzzi, J. P. Dognon, I. Dimicoli, B. Tardivel et M. Mons, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, (34), 11900-11901.

[41] J. J. Prompers, C. W. Hilbers et H. A. M. Pepermans, *FEBS Lett.* **1999**, 456, (3), 409-416.

[42] C. Martinez, P. Degeus, M. Lauwereys, G. Matthyssens et C. Cambillau, *Nature* **1992**, 356, (6370), 615-618.

Conclusion générale

Conclusion générale

Cette thèse avait deux objectifs principaux. Le premier consistait à déterminer les conformations préférentiellement adoptées par de petites chaînes peptidiques modèles dans une détente supersonique, et ce dans le but d'obtenir des informations sur les interactions intra- et inter-moléculaires intervenant dans ces systèmes. Il s'agissait ensuite, dans un deuxième temps, d'étudier la dynamique de relaxation électronique de ces systèmes et en particulier la dépendance de celle-ci avec leur structure.

Les structures de ces molécules biologiques flexibles ont pu être caractérisées finement grâce aux outils expérimentaux et théoriques employés lors de ces travaux. La spectroscopie de double résonance IR-UV a permis de mesurer les spectres IR d'espèces sélectionnées par une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ de leur chromophore aromatique dans l'UV. Cette technique spectroscopique présente l'avantage d'être à la fois sélective en termes de masse, grâce au couplage avec un spectromètre de masse, et en termes de conformation. En effet, la résolution apportée par la phase gazeuse et le refroidissement en détente supersonique, combinée à la finesse spectrale des sources laser nanoseconde, permet de distinguer les contributions de chacun des conformères au spectre UV (sauf cas exceptionnels de coïncidence spectrale entre conformères) et ainsi d'exciter sélectivement une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ d'un conformère particulier. La comparaison entre les fréquences expérimentales des modes de vibration d'élongation des groupements NH des peptides dans l'IR et des fréquences harmoniques calculées au moyen d'une méthode DFT-D, et corrigées par des facteurs d'échelles spécifiques à chaque mode de vibration, donne ensuite accès aux réseaux de liaisons hydrogène intra- ou inter-moléculaires, et donc à la structure des molécules ou complexes.

Le paysage conformationnel de ces molécules flexibles est cependant très vaste. Ce qui implique que, dans nombre de cas, un accord entre fréquences expérimentales et théoriques peut ne pas être un critère suffisant pour attribuer une structure à un conformère. Une solution est apportée par le fait que, comme les peptides sont refroidis dans une détente supersonique, on peut s'attendre à ce que ceux-ci adoptent les structures les plus stables. Toutefois, la stabilité relative

entre conformations (c'est-à-dire leur différence d'enthalpie libre) peut varier fortement en fonction de la température, allant même parfois jusqu'à s'inverser. Or, entre l'instant de la désorption et le moment où ils entrent dans la zone d'interaction avec les lasers, la température des peptides (température *interne*, définie par l'énergie interne de la molécule) varie de plusieurs centaines de degrés (de ~ 600 K à ~ 10 K). Il se pose alors la question de savoir à quelle température (température *conformationnelle*) calculer les enthalpies libres pour obtenir des valeurs pertinentes à la comparaison avec les abondances expérimentales. Dans le but de rationaliser l'influence de différents paramètres (extérieurs ou intrinsèques aux systèmes) sur la valeur de cette dernière température, nous avons donc cherché, à l'aide d'un modèle statistique, à simuler les processus de collisions inélastiques et d'isomérisations subis par une molécule dans une détente supersonique. Les tendances d'évolution des rapports de population en fonction de paramètres tels que la température interne initiale, la pression en gaz porteur ou la hauteur de barrière d'énergie entre conformations ont pu être reproduites de manière qualitative par le modèle. Ces résultats ont permis d'améliorer notre compréhension du processus de refroidissement conformationnel dans une détente supersonique et ont montré la nécessité de comparer à la fois les enthalpies libres à « basse » et à « haute » températures (0 K et 300 K) lors de l'attribution des spectres de double résonance IR-UV. Le modèle utilisé doit cependant être encore affiné avant de pouvoir prétendre fournir des résultats directement comparables aux observations expérimentales. Plusieurs pistes ont été envisagées pour cela, notamment une modification du calcul des constantes de vitesse d'isomérisation ou encore un tirage au sort des sites de collage d'un atome de gaz porteur sur la molécule.

Nous avons ensuite cherché à appliquer la spectroscopie de double résonance IR-UV à la caractérisation des conformations adoptées par des peptides hydratés et des peptides possédant plusieurs chaînes latérales aromatiques. Ces systèmes modèles ont été choisis pour étudier des interactions structurantes intervenant dans les protéines : respectivement les interactions protéines-solvant et les interactions hydrophobes.

L'étude des conformations des complexes 1 : 1 de (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) et (Ac-Phe-NHMe : H_2O) nous a permis de déterminer quels étaient les sites de solvatation occupés par une molécule d'eau. Nous avons ainsi pu montrer que le mécanisme de formation des complexes dans la détente supersonique pouvait s'expliquer par la solvatation de peptides protégés froids vibrationnellement, piégés dans une des conformations du système isolé. La solvatation provoque peu de changements structurels par rapport à ces dernières lorsque l'eau est dans un site rigide. L'énergie apportée par la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires

peut cependant être suffisante pour provoquer une isomérisation conformationnelle entre une forme étendue et une forme repliée du peptide protégée. Ces résultats nous encouragent à étendre nos travaux à des complexes de stœchiométrie supérieure afin d'observer l'évolution progressive des géométries des peptides en direction des structures identifiées en solution. De telles investigations pourraient néanmoins entraîner quelques difficultés. D'un point de vue expérimental, comme des fragmentations peuvent survenir durant le processus d'IR2P, la sélectivité apportée par le spectromètre de masse ne permet pas ici de donner avec certitude la stœchiométrie des complexes. Cette dernière doit être déterminée d'après le nombre de bandes de vibrations d'élongation dans les spectres IR. Or, le nombre croissant de liaisons O-H pourrait poser un problème de recouvrements spectraux dans ce domaine. De plus, le nombre de structures envisageables pour ces complexes augmentant très rapidement avec le nombre de molécules d'eau, une exploration complète du paysage conformationnel de ceux-ci par des méthodes de chimie quantique sera de plus en plus coûteuse en temps de calcul. L'attribution des structures calculées sera également compliquée par la présence de nombreuses conformations ayant des fréquences harmoniques proches.

L'influence structurelle des interactions entre chaînes latérales aromatiques (Ar-Ar) a ensuite pu être mise en évidence en étudiant deux peptides protégés contenant un enchaînement de plusieurs acides aminés phénylalanines : Ac-Phe-Phe-NH_2 et Ac-Phe-Phe-Phe-NH_2. Nous avons montré que ces interactions étaient présentes dans tous les conformères de ces molécules et possédaient un rôle structurant très fort. Les distributions conformationnelles sont en effet profondément modifiées par rapport aux peptides ne possédant qu'une seule chaîne latérale aromatique : les structures où ces interactions sont possibles sont clairement favorisées par rapport aux autres. Ces effets sont renforcés par le fait que les interactions ar-ar sont peu directionnelles car les cycles aromatiques peuvent interagir dans des géométries relatives variées (en T, en V, parallèles). Pour compléter cette étude, il serait maintenant intéressant d'observer comment évolue la compétition entre les interactions ar-ar et le repliement de la chaîne principale lorsque les acides aminés aromatiques sont séparés par un, ou plusieurs, acides aminés non aromatiques dans la chaîne peptidique.

Ce travail s'est poursuivi par l'étude des dynamiques de relaxation électronique du premier état excité $\pi\pi^*$ de divers peptides protégés, à la fois par spectroscopie pompe-sonde et par mesures de fluorescence. Ces résultats expérimentaux ont été complétés par des calculs de chimie quantique (TDDFT et CC2) afin d'explorer les mécanismes de relaxation intervenant dans ces systèmes. Nous avons ainsi démontré la présence d'un fort effet de conformation sur la

dynamique de relaxation de la molécule Ac-Phe-NH_2. Cet effet peut s'expliquer par un transfert d'excitation, depuis le cycle aromatique vers l'une des liaisons peptidiques de la chaîne principale, facilité dans la géométrie γ_L (g+) (conformère **B**). Nous avons également pu observer des effets de conformations sur les dipeptides de la série Ac-Xxx-Phe-NH_2 (structures γ_L-γ_L vs coudes β), ainsi que des diminutions de la durée de vie de l'état $\pi\pi^*$ le long des progressions vibrationnelles des structures γ_L-γ_L (conformères **A**). Cette étude montre clairement le rôle des états excités des liaisons peptidiques dans les phénomènes de relaxation de la phénylalanine excitée. Cette conclusion a sans doute une portée plus générale, et cette possible implication doit être considérée dès lors qu'on s'intéresse à la dynamique électronique de peptides, neutres ou chargés. Rappelons, enfin, que l'ajout d'une seule molécule d'eau sur le peptide Ac-Phe-NH_2 semble déjà ouvrir de nouvelles voies ultrarapides de relaxation non-radiative. Des calculs, analogues à ceux réalisés sur Ac-Phe-NH_2 isolé, devraient permettre de préciser les mécanismes de relaxation mis en jeu dans ces systèmes.

Annexes

Annexe A

Modèle de refroidissement conformationnel

A.1 Procédure de tirage au sort par la méthode de rejet

Une simulation de type Monte-Carlo nécessite de nombreux tirages au sort des valeurs de plusieurs variables (positions, énergies, vitesses, …). De plus, les intervalles des valeurs que peuvent prendre les variables ainsi que leur fonction de distribution sont très diverses. Or, les procédures de tirage au sort implémentées dans la plupart des langages de programmation ne fournissent que des nombres aléatoires *R* uniformément répartis entre 0 et 1. La méthode de rejet est une procédure générale qui permet, à partir de ces nombres aléatoires *R*, de tirer au sort la valeur d'une variable physique *x* du système, dans un intervalle compris entre les valeurs *a* et *b*, selon une fonction de distribution *f* [1]. Pour cela, la fonction de distribution *f* est tout d'abord normalisée par le maximum f_{max} de cette fonction pour donner une fonction *g* dont les valeurs sont comprises entre 0 et 1.

$$g(x) = \frac{f(x)}{f_{\max}} \qquad \text{(Eq. A.1.1)}$$

Une valeur de la variable *x* est ensuite choisie aléatoirement selon l'équation A.1.2. D'après les caractéristiques du tirage au sort de *R*, ce tirage au sort fournit des valeurs de *x* uniformément réparties entre *a* et *b*.

$$x = a + R(b - a) \qquad \text{(Eq. A.1.2)}$$

Après cette étape, la valeur de la fonction *g* est calculée pour cette valeur de *x* et un deuxième nombre aléatoire *R* est généré. Deux possibilités se présentent alors :

- Si $R < g(x)$, la valeur de *x* est acceptée et la procédure de tirage au sort est terminée.

- Si $R > g(x)$, la valeur de x est rejetée. Une nouvelle valeur de x est donc tirée au sort d'après l'équation A.1.2 et la procédure est répétée jusqu'à ce qu'une valeur soit acceptée.

Puisque R est uniformément réparti entre 0 et 1, la probabilité qu'une valeur particulière de x soit acceptée est directement proportionnelle à $g(x)$, les valeurs acceptées respectent donc bien la distribution initiale f.

Exemple du tirage au sort de l'énergie rotationnelle initiale d'une molécule :

L'expression de la fonction de distribution de l'énergie rotationnelle initiale $E_{rot,0}$ d'une molécule à une température T_0 est donnée par l'équation suivante [2]:

$$f\left(E_{rot,0}\right) = \frac{2\sqrt{E_{rot,0}}}{\sqrt{ABC}} \exp\left(-\frac{E_{rot,0}}{k\,T_0}\right) \qquad \text{(Eq. A.1.3)}$$

Le maximum de la fonction f est atteint pour $E_{rot,0} = kT_0 / 2$, d'où :

$$f_{\max} = \sqrt{\frac{2kT_0}{ABC}} \exp\left(-\frac{1}{2}\right) \qquad \text{(Eq. A.1.4)}$$

D'après l'équation A.1.1, la fonction g est définie par :

$$g\left(E_{rot,0}\right) = \sqrt{\frac{2E_{rot,0}}{k\,T_0}} \exp\left(-\frac{E_{rot,0}}{k\,T_0} + \frac{1}{2}\right) \qquad \text{(Eq. A.1.5)}$$

L'énergie rotationnelle initiale d'une molécule est comprise entre 0 et $+\infty$. Pour pouvoir tirer au sort une énergie $E_{rot,0}$ selon l'équation A.1.2, il est nécessaire que l'intervalle de valeurs ait une limite supérieure finie. La valeur de b doit donc être fixée arbitrairement. Le critère utilisé dans la simulation est de choisir la valeur de b de manière à ce que la fraction des valeurs de $E_{rot,0}$ situées en dehors de l'intervalle $[0,b]$ soit inférieure à 10^{-5} :

$$1 - \frac{F(b)}{F_{\max}} = 1 - \frac{\int_0^b f\left(E_{rot,0}\right) dE_{rot,0}}{\int_0^\infty f\left(E_{rot,0}\right) dE_{rot,0}} < 10^{-5} \qquad \text{(Eq. A.1.5)}$$

$$1 - \frac{F(b)}{F_{\max}} = 1 - erf\left(\sqrt{\frac{b}{k\,T_0}}\right) + \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sqrt{\frac{b}{k\,T_0}} \exp\left(-\frac{b}{k\,T_0}\right) < 10^{-5}$$

$$b > 13\,k\,T_0$$

où *erf* représente la fonction d'erreur.

Une énergie $E_{rot,0}$ est donc tirée au sort selon l'expression suivante :

$$E_{rot,0} = R \times (13 k T_0) \qquad \text{(Eq. A.1.6)}$$

Un autre nombre aléatoire R est ensuite généré et, si $g(E_{rot,0}) > R$, $E_{rot,0}$ est acceptée. Si $g(E_{rot,0}) < R$, la valeur de $E_{rot,0}$ est rejetée et les deux tirages au sort précédents sont répétés jusqu'à ce qu'une valeur soit acceptée.

[1] G. A. Bird, Sampling from a prescribed distribution. In *Molecular Gas Dynamics and the Direct Simulation of Gas Flows*, J. M. Brady, Oxford Science Publications, **1994**, pp 423-428.

[2] T. Baer et W. L. Hase, Statistical Theory of Unimolecular Decomposition. In *Unimolecular Reaction Dynamics: Theory and Experiments*, Oxford University Press, **1996**, pp 171-211.

A.2 Calcul de la vitesse relative moyenne d'une molécule-test par rapport aux atomes de gaz porteur

La vitesse d'un atome de gaz porteur dans une détente supersonique peut être décomposée en une somme de la vitesse de l'écoulement de gaz (v_{jet}) et d'une vitesse liée à l'agitation thermique des atomes ($v_{thermique}$). La vitesse relative entre une molécule et un atome de gaz dans la détente est donc définie par :

$$\vec{v}_{relative} = \vec{v}_{gaz} - \vec{v}_{molécule} = \left(\vec{v}_{jet} + \vec{v}_{thermique}\right) - \vec{v}_{molécule} \qquad \text{(Eq. A.1.7)}$$

D'où,

$$\left\|\vec{v}_{relative}\right\|^2 = \left\|\vec{v}_{jet} - \vec{v}_{molécule} + \vec{v}_{thermique}\right\|^2$$

$$\left\|\vec{v}_{relative}\right\|^2 = \left\|\vec{v}_{jet} - \vec{v}_{molécule}\right\|^2 + 2\left(\vec{v}_{jet} - \vec{v}_{molécule}\right).\vec{v}_{thermique} + \left\|\vec{v}_{thermique}\right\|^2$$

La distribution de la direction de la vitesse liée à l'agitation thermique étant isotrope, le terme central de l'équation précédente est nul en moyenne. Cette dernière peut donc s'écrire sous la forme suivante :

$$\left\langle \left\| \vec{v}_{relative} \right\|^2 \right\rangle = \left\| \vec{v}_{jet} - \vec{v}_{molécule} \right\|^2 + \left\langle \left\| \vec{v}_{thermique} \right\|^2 \right\rangle$$

De plus, $v_{thermique}$ peut être décrite par une distribution de Maxwell [1] :

$$\left\langle \left\| \vec{v}_{thermique} \right\|^2 \right\rangle = \int_0^\infty 4\pi \left(\frac{m_{gaz}}{2\pi kT} \right)^{3/2} v^4 \exp\left(-\frac{m_{gaz} v^2}{2kT} \right) dv$$

$$\left\langle \left\| \vec{v}_{thermique} \right\|^2 \right\rangle = \frac{3kT}{m_{gaz}}$$

[1] P. W. Atkins, The properties of gases. In *Physical Chemistry: Fifth Edition*, Oxford University Press, **1994**, pp 21-54.

Annexe B

Spectres UV et IR de peptides protégés

B.1 Spectres UV

B.1.1 Spectres des dipeptides Ac-Xxx-Phe-NH_2 dans le domaine spectral de l'origine de la première transition $\pi \rightarrow \pi^*$

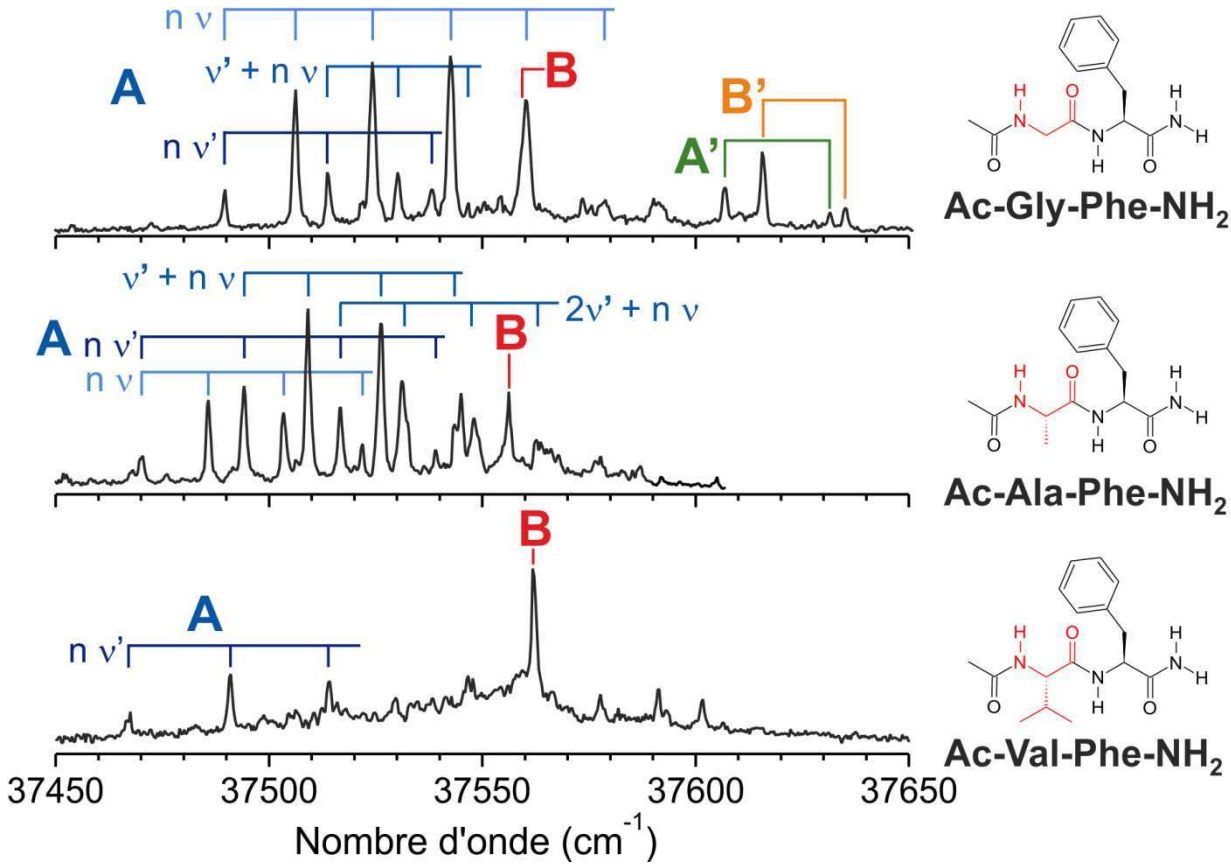


Fig. B.1.1.a *– Comparaison des spectres IR2P-1C de Ac-Gly-Phe-NH_2, Ac-Ala-Phe-NH_2 et Ac-Val-Phe-NH_2.*

B.1.2 Intensités relatives des signaux d'IR2P-1C entre les conformations γ_L-γ_L et coudes β dans le domaine des transitions vibroniques $(6a)_0^1$ et $(6b)_0^1$

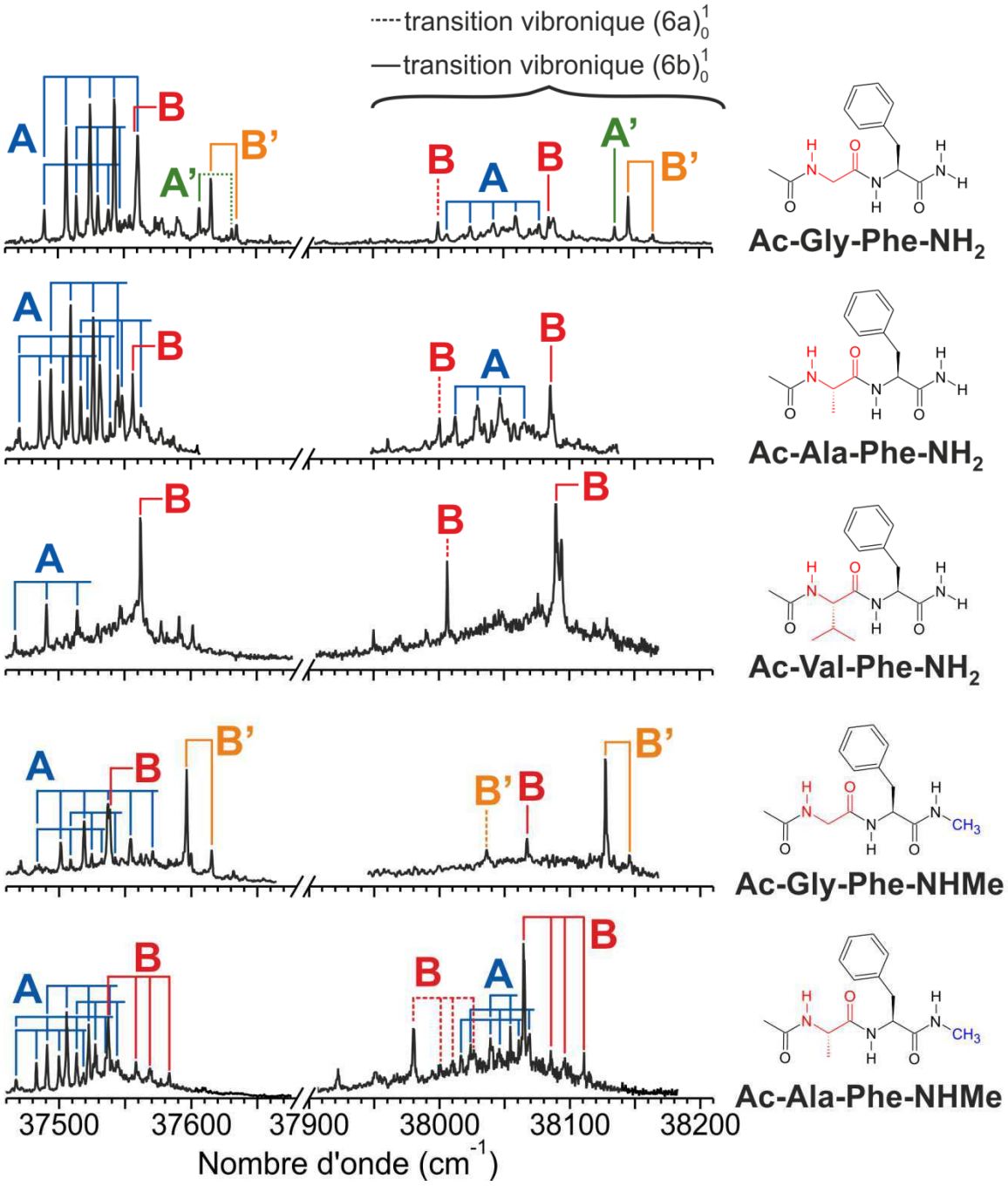


Fig. B.1.2.a *– Spectres IR2P-1C de dipeptides protégés enregistrés dans le domaine de la première transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du cycle aromatique (origine et transitions vibroniques 6a et 6b).*

B.2 Spectres IR proche

B.2.1 Ac-Phe-NH_2

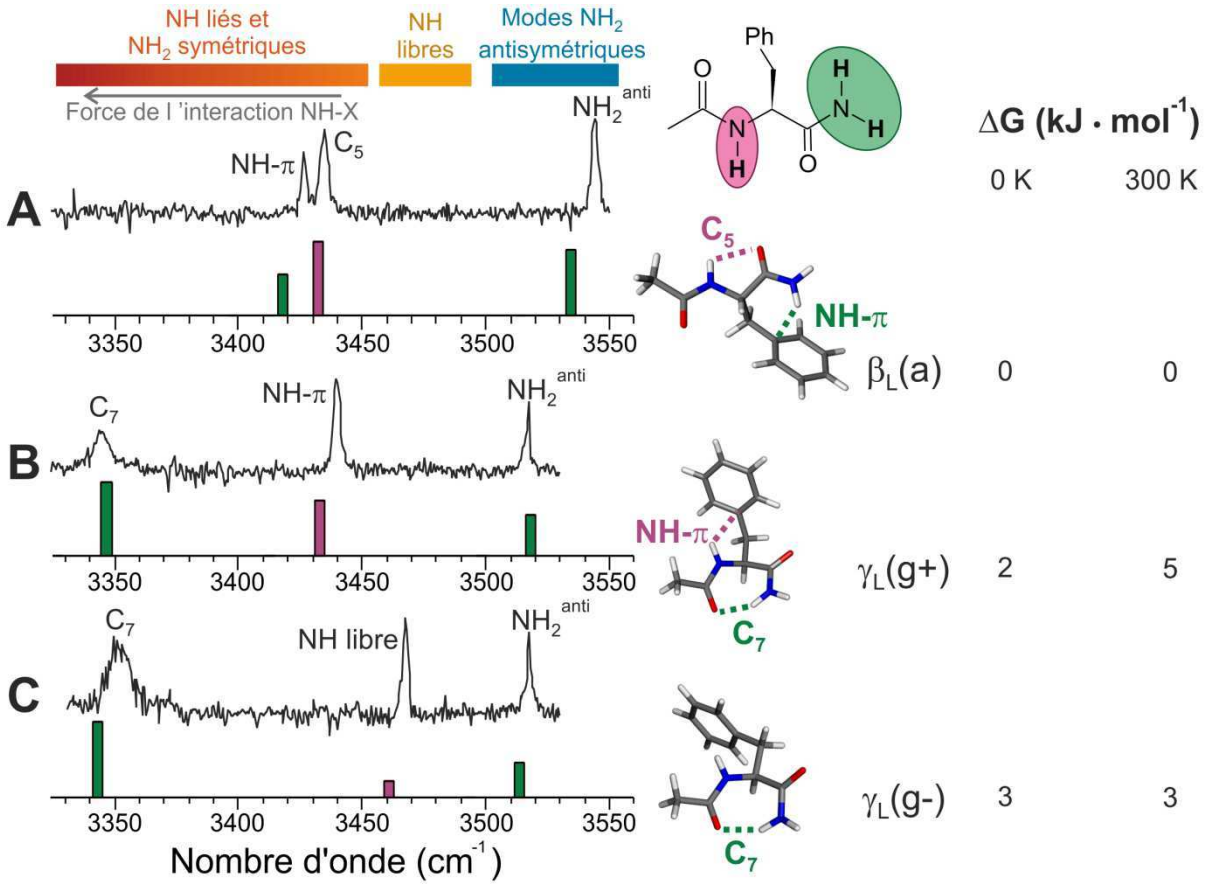


Fig. B.2.1.a – *Comparaison des spectres de double résonance IR-UV des conformères **A**, **B** et **C** de Ac-Phe-NH_2 et des fréquences calculées des structures $\beta_L(a)$, $\gamma_L(g+)$ et $\gamma_L(g-)$ par la méthode RI-B97-D/TZVPP. Les fréquences calculées des modes de vibrations d'élongation des groupements NH (violet) et des modes d'élongations symétrique et antisymétrique des groupements NH_2 (vert) sont corrigées par des fonctions affines spécifique à chaque mode de vibration.*

B.2.2 Ac-Gly-Phe-NHMe et Ac-Ala-Phe-NHMe

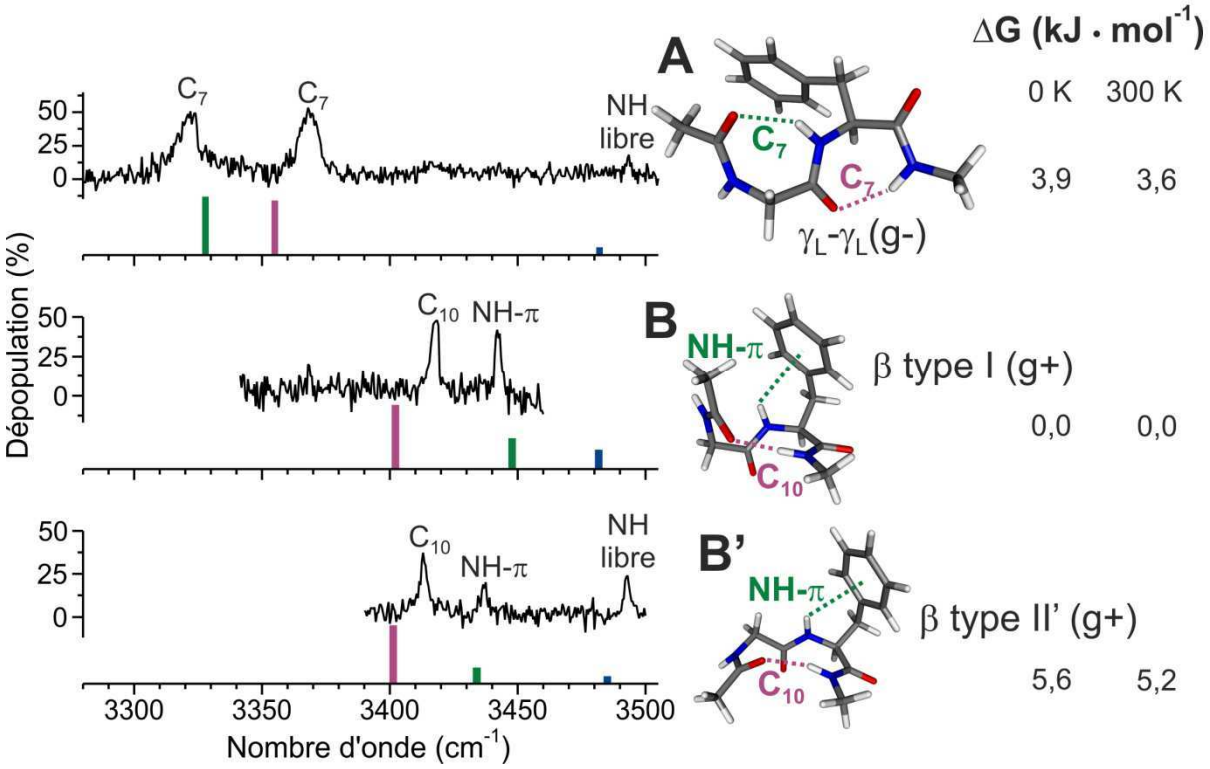


Fig. B.2.2.a – *Spectres de double résonance IR-UV des conformères **A**, **B** et **B'** de Ac-Gly-Phe-NHMe. La bande du groupement NH libre du conformère **B** (bleue) est située dans le domaine d'absorption de l'OPO LiNbO3.*

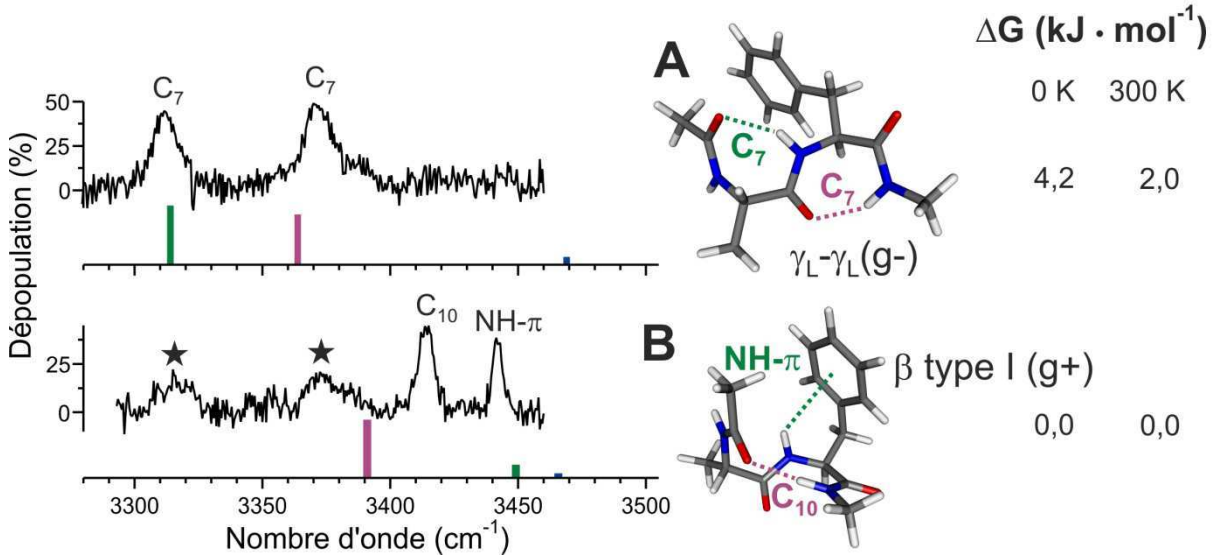


Fig. B.2.2.b – *Spectres de double résonance IR-UV des conformères **A** et **B** de Ac-Ala-Phe-NHMe. Les bandes des groupements NH libre (bleue) sont situées dans le domaine d'absorption de l'OPO LiNbO3. Une faible absorption de **A** à l'origine de la première transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du conformère **B** est responsable des bandes indiquées par des étoiles sur le spectre IR de ce dernier.*

B.3 Spectres IR moyen et lointain

B.3.1 Modes de vibration dans l'IR lointain et moyen

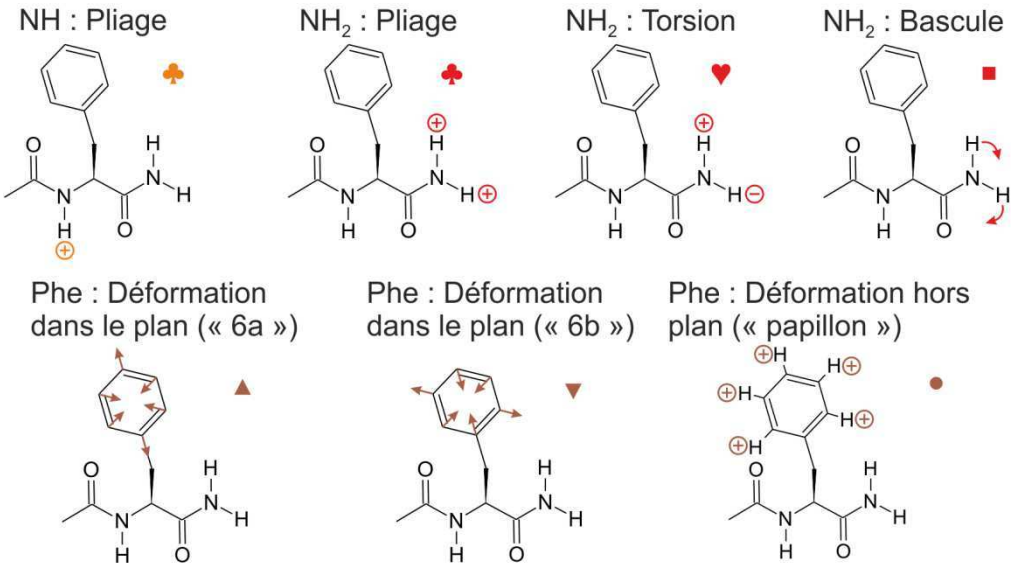


Fig. B.3.1.a – *Schémas des modes de vibrations d'un peptide protégé dans l'IR lointain et moyen. Les flèches représentent des déformations dans le plan des liaisons peptidiques ou du cycle aromatique. Les signes + et – représentent des déformations hors de ces plans.*

B.3.2 Spectres IR de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe monosolvatés

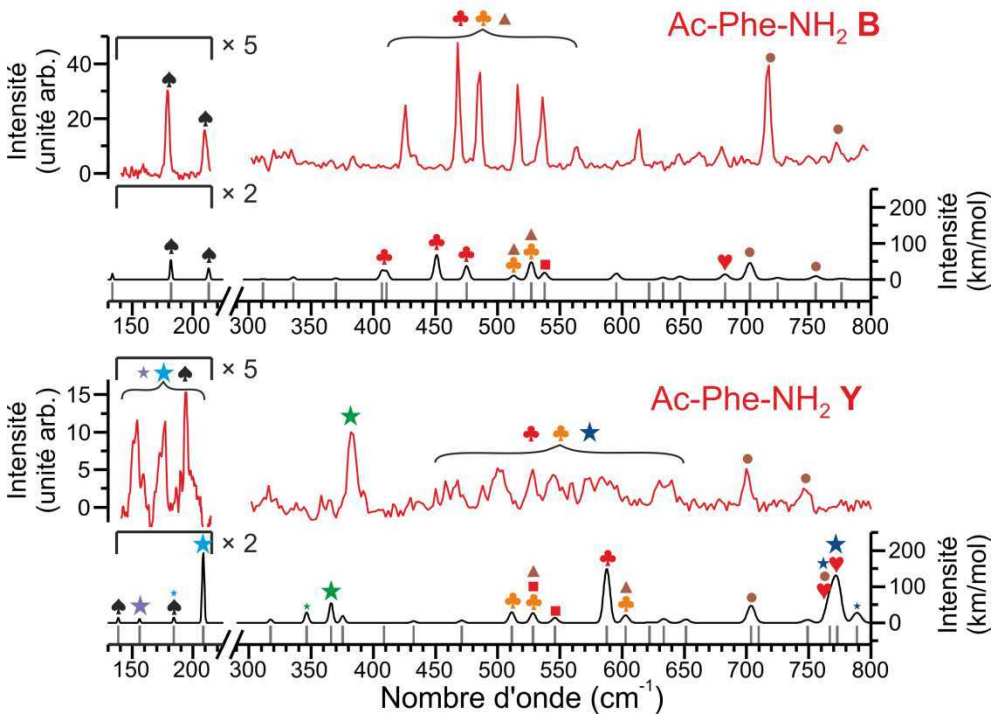


Fig. B.3.2.a – *Comparaison des spectres de double résonance IR-UV des conformères* ***B*** *(isolé) et* ***Y*** *(monosolvaté) de Ac-Phe-NH_2 (en rouge) et des spectres harmoniques RI-B97-D non corrigés (en noir). Les significations des symboles des modes de vibration sont indiquées dans la Figure B.3.3.a de l'annexe B.*

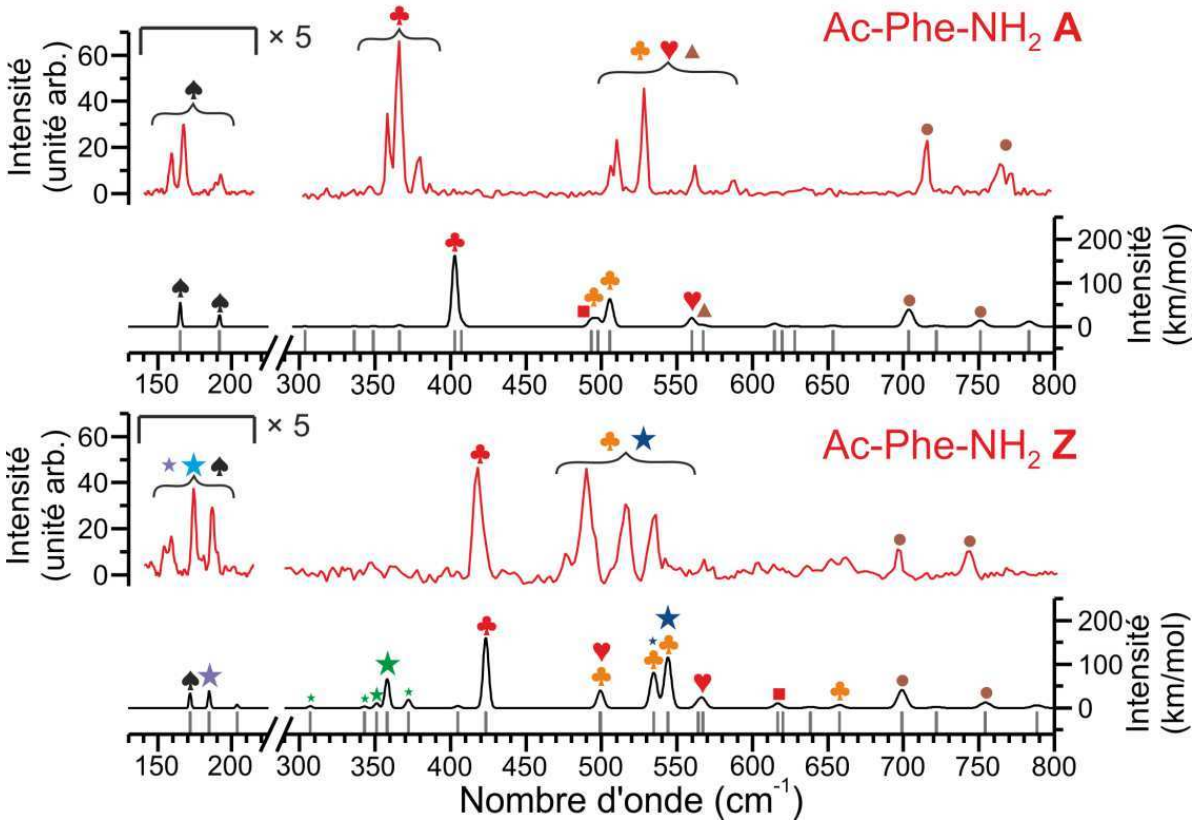


Fig. B.3.2.b – *Comparaison des spectres de double résonance IR-UV des conformères* ***A*** *(isolé) et* ***Z*** *(monosolvaté) de Ac-Phe-NH_2 (en rouge) et des spectres harmoniques RI-B97-D non corrigés (en noir). Les significations des symboles des modes de vibration sont indiquées dans la Figure B.3.3.a de l'annexe B. La fréquence calculée du mode rotation de la molécule d'eau autour de la liaison O-$H_{lié}$ du conformère* ***Z*** *(étoile bleu clair), non représentée sur le schéma, est prédite à 126 cm^{-1}.*

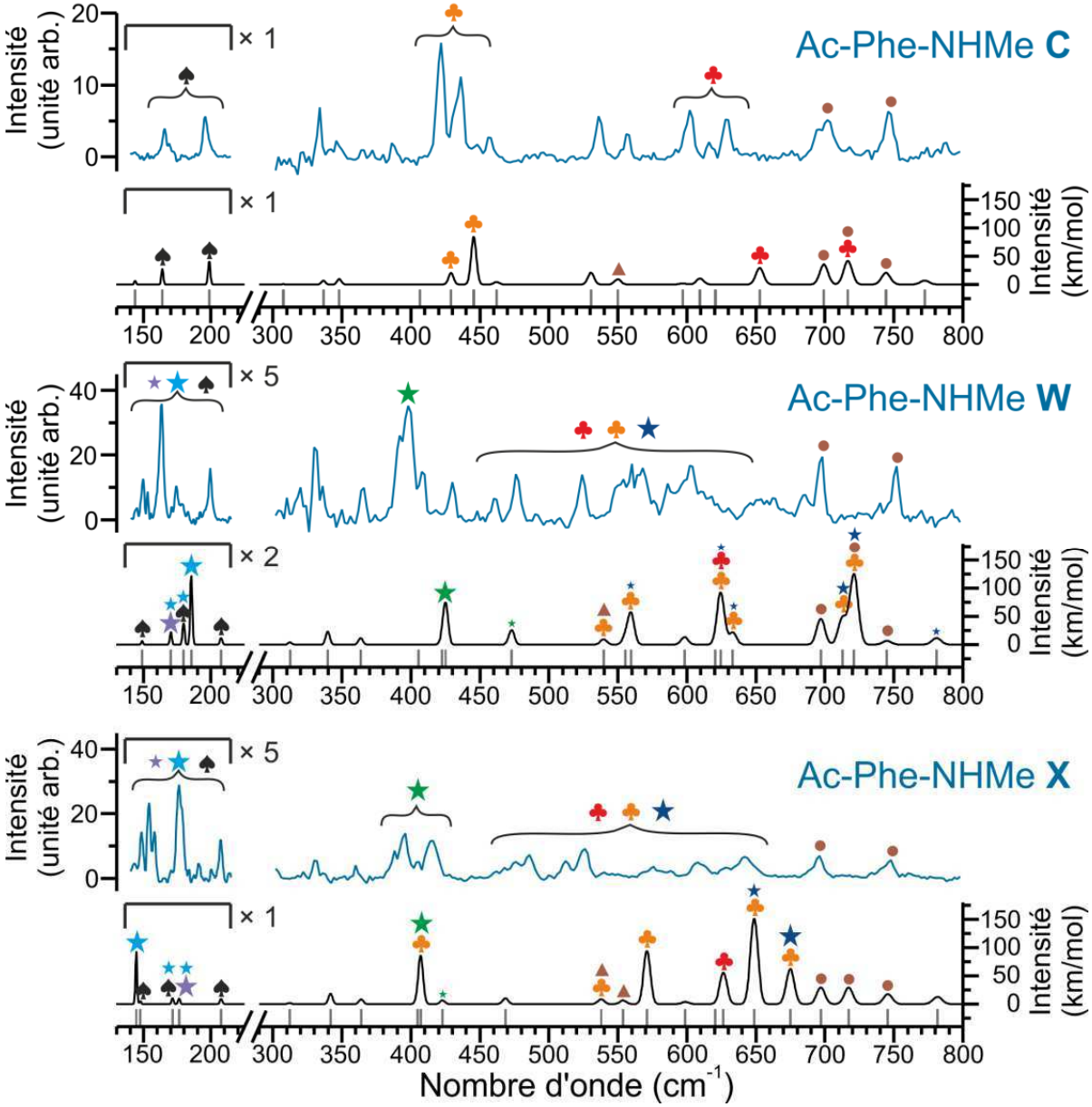


Fig. B.3.2.c – *Comparaison des spectres de double résonance IR-UV des conformères* ***C*** *(isolé),* ***W*** *et* ***X*** *(monosolvatés) de Ac-Phe-NHMe (en bleu) et des spectres harmoniques RI-B97-D non corrigés (en noir). Les significations des symboles des modes de vibration sont dans la Figure B.3.3.a de l'annexe B.*

B.3.3 Comparaison des spectres théoriques des conformères C, W et X du complexe (Ac-Phe-NH_2 : H_2O)

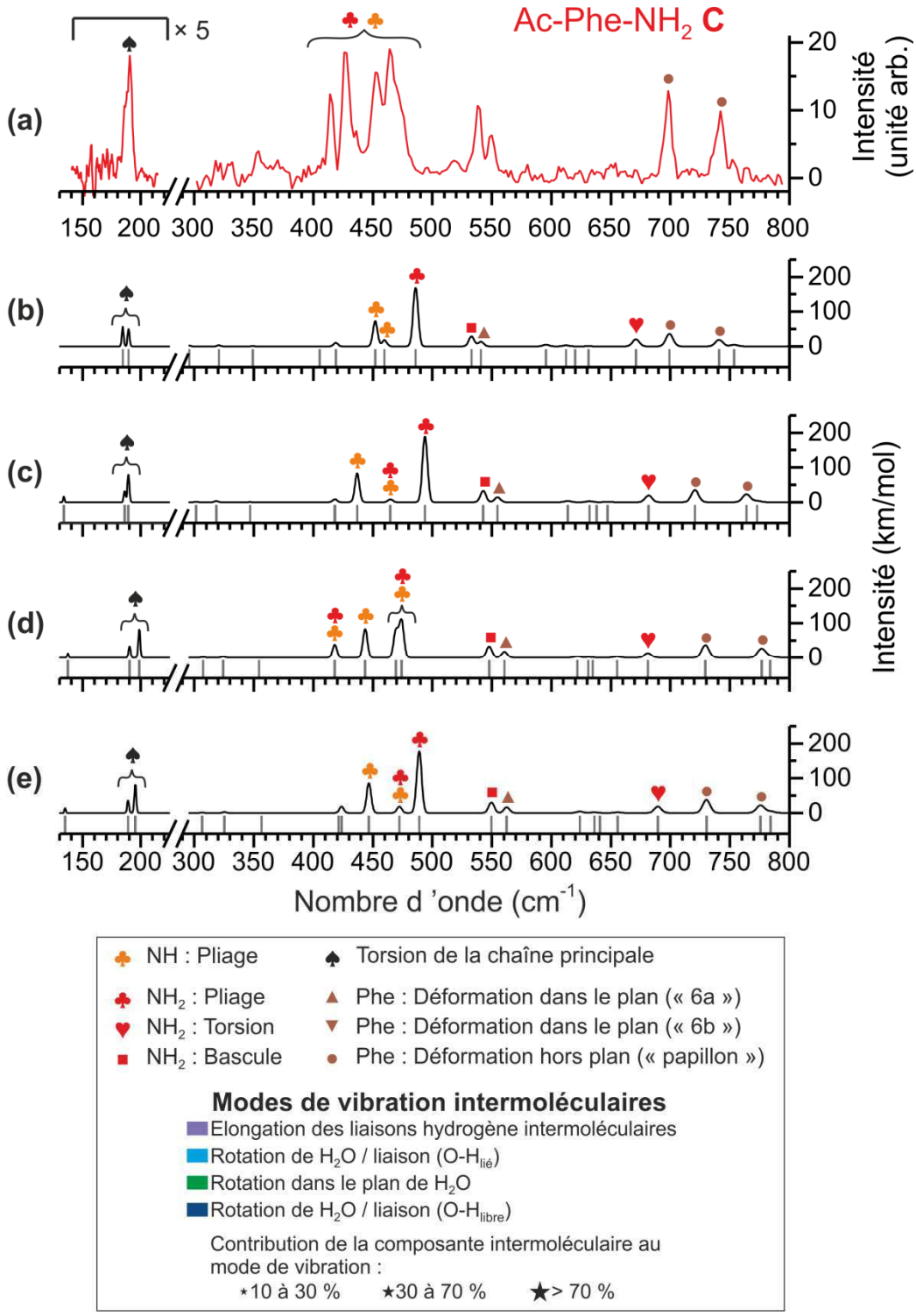


***Fig. B.3.3.a** – Spectre de double résonance IR-UV du conformère **C** de Ac-Phe-NH_2 (a) comparé à des spectres harmoniques non corrigés calculés à partir de différentes méthodes DFT et DFT-D : RI-B97-D/TZVPP (b), B3LYP/cc-pVTZ (c), M06-2X/cc-pVTZ (d) et ωB97XD/cc-pVTZ (e).*

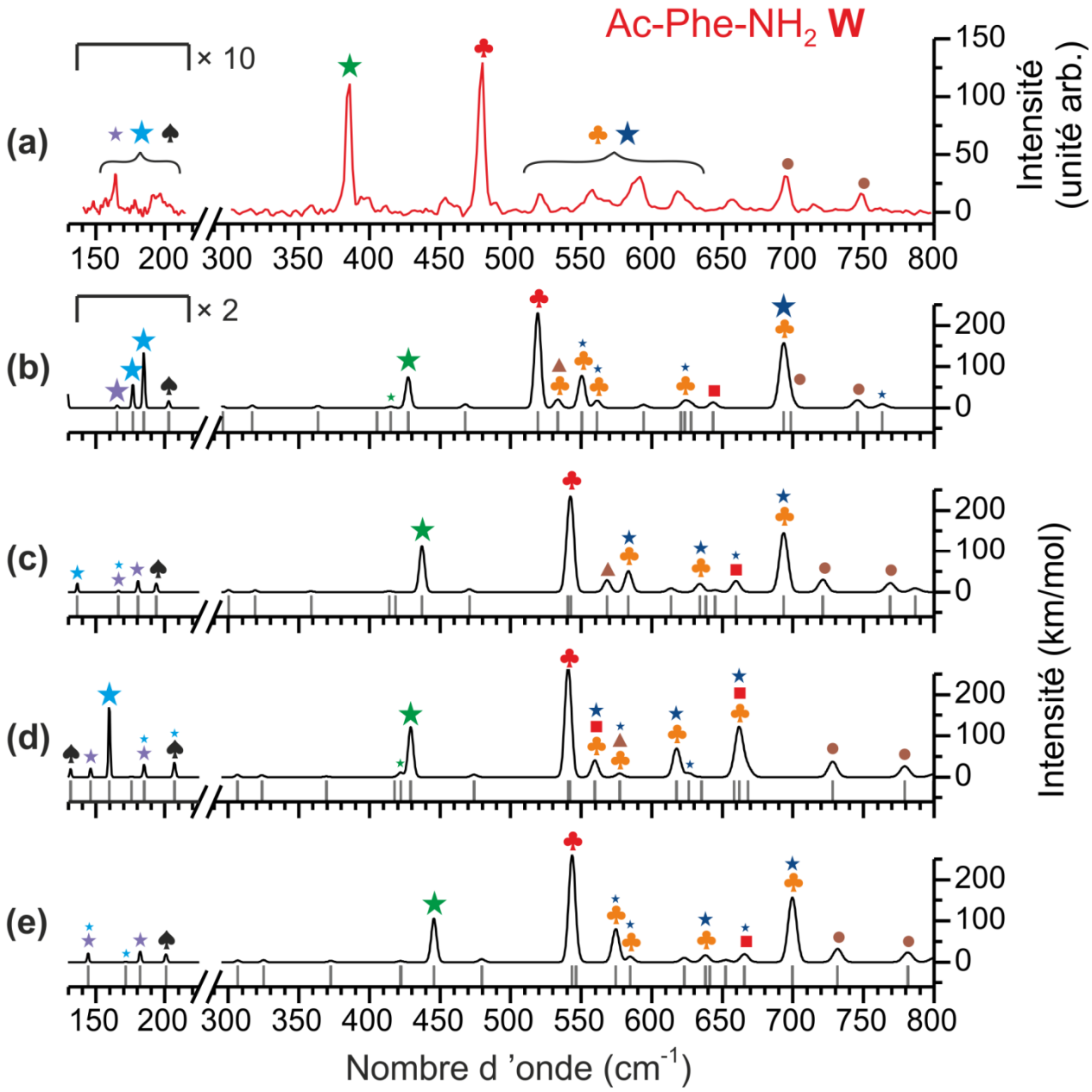


Fig. B.3.3.b – *Spectre de double résonance IR-UV du conformère* ***W*** *de (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) (a) comparé à des spectres harmoniques non corrigés calculés à partir de différentes méthodes DFT et DFT-D : RI-B97-D/TZVPP (b), B3LYP/cc-pVTZ (c), M06-2X/cc-pVTZ (d) et ωB97XD/cc-pVTZ (e). Les significations des symboles des modes de vibration sont indiquées dans la Figure B.3.3.a de l'annexe B.*

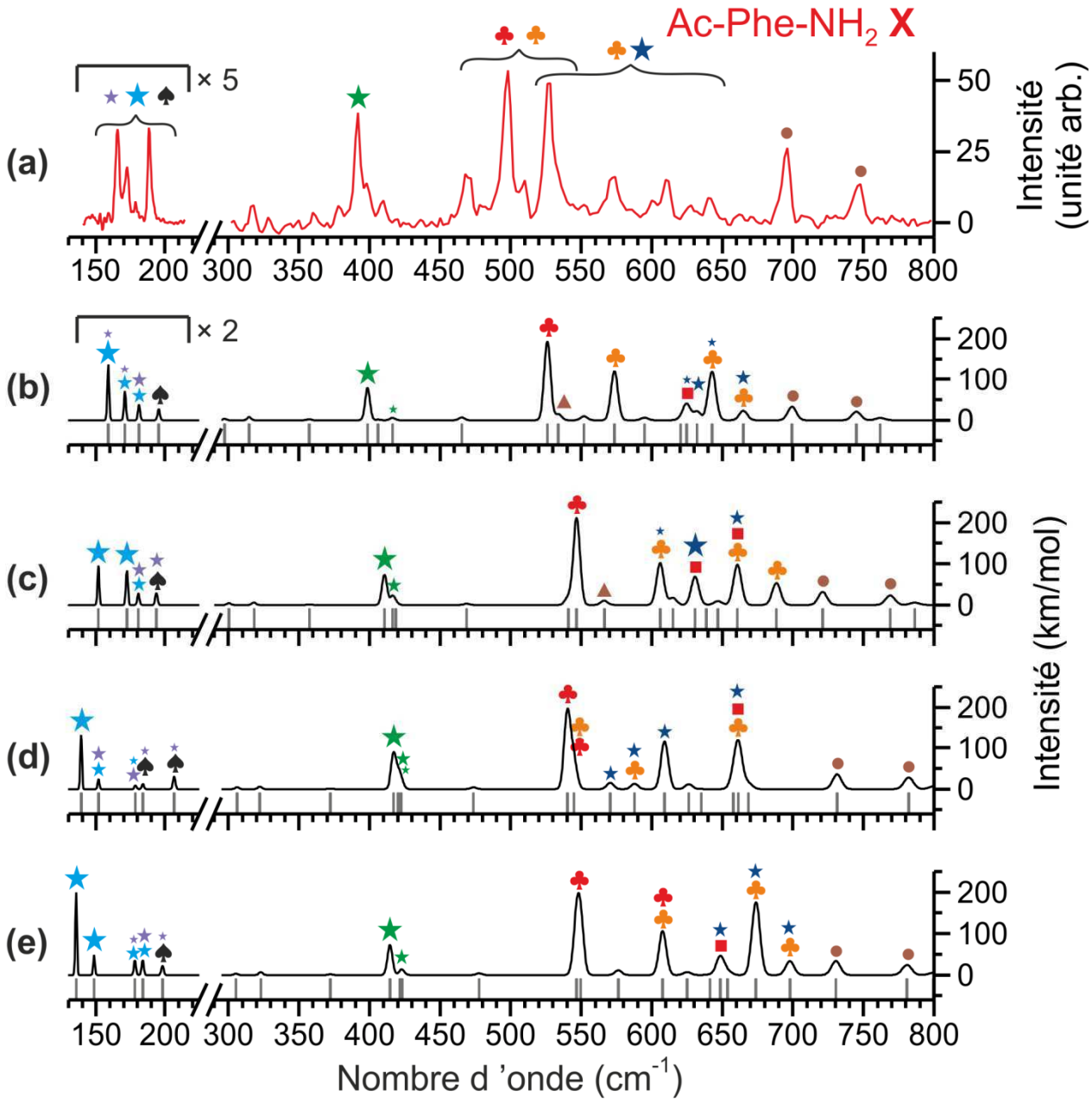


Fig. B.3.3.c *– Spectre de double résonance IR-UV du conformère* ***X*** *de (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) (a) comparé à des spectres harmoniques non corrigés calculés à partir de différentes méthodes DFT et DFT-D : RI-B97-D/TZVPP (b), B3LYP/cc-pVTZ (c), M06-2X/cc-pVTZ (d) et ωB97XD/cc-pVTZ (e). Les significations des symboles des modes de vibration sont indiquées dans la Figure B.3.3.a de l'annexe B.*

B.3.4 Comparaison des fréquences harmoniques et anharmoniques du conformère X du complexe (Ac-Phe-NH_2 : H_2O)

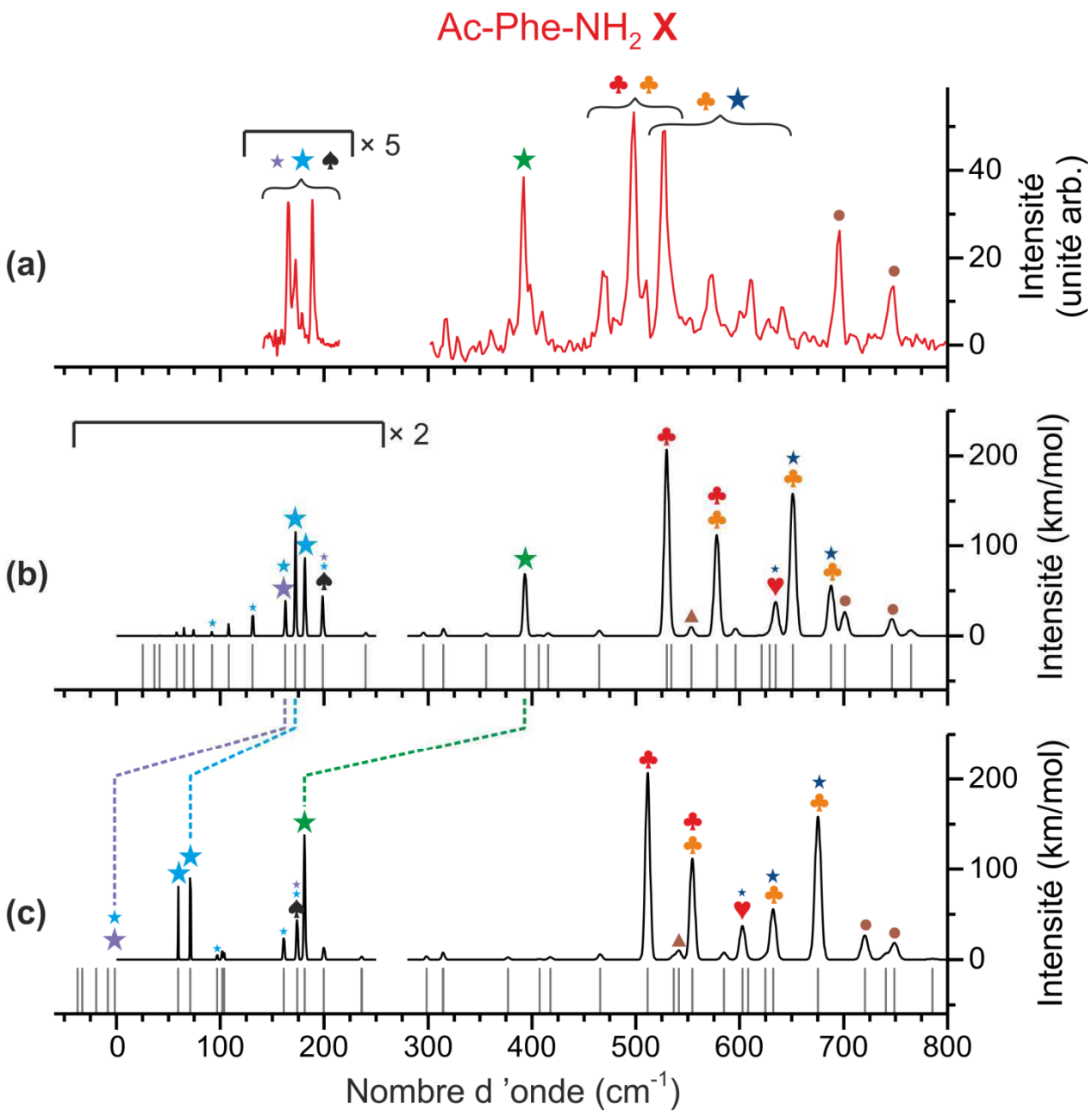


Fig. B.3.4.a *– Spectre de double résonance IR-UV du conformère* ***X*** *de (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) (a) comparé à un spectre harmonique (b) et un spectre anharmonique corrigé par la méthode PT2 (c) calculés au niveau B97-D/cc-pVTZ. Les significations des symboles des modes de vibration sont indiquées dans la Figure B.3.3.a de l'annexe B.*

Annexe C

Mécanismes de relaxation de l’énergie électronique

C.1 Mécanisme I

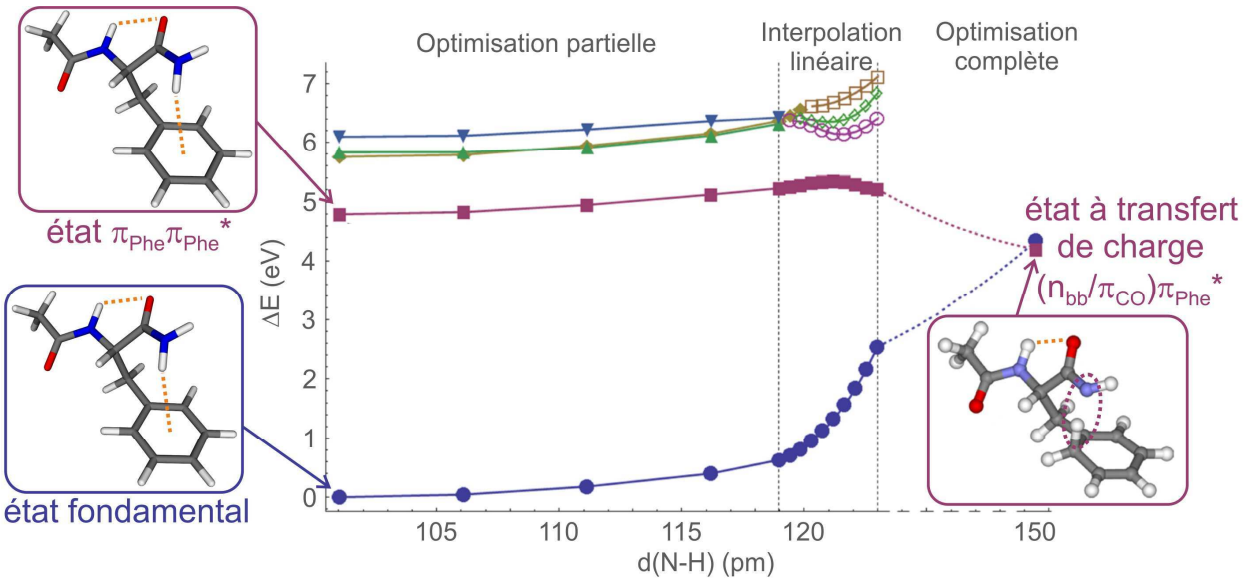


Fig. C.1.1 – *Mécanisme I – Conf.* ***A****: Représentation de l'énergie RI-CC2/cc-pVDZ de l'état fondamental et des trois premiers états excités du conformère* ***A*** *de Ac-Phe-NH$_2$, en fonction de l'élongation de la liaison N-H impliquée dans l'interaction avec le phényle. Les encarts indiquent les géométries du peptide protégé à différents instants du mécanisme.*

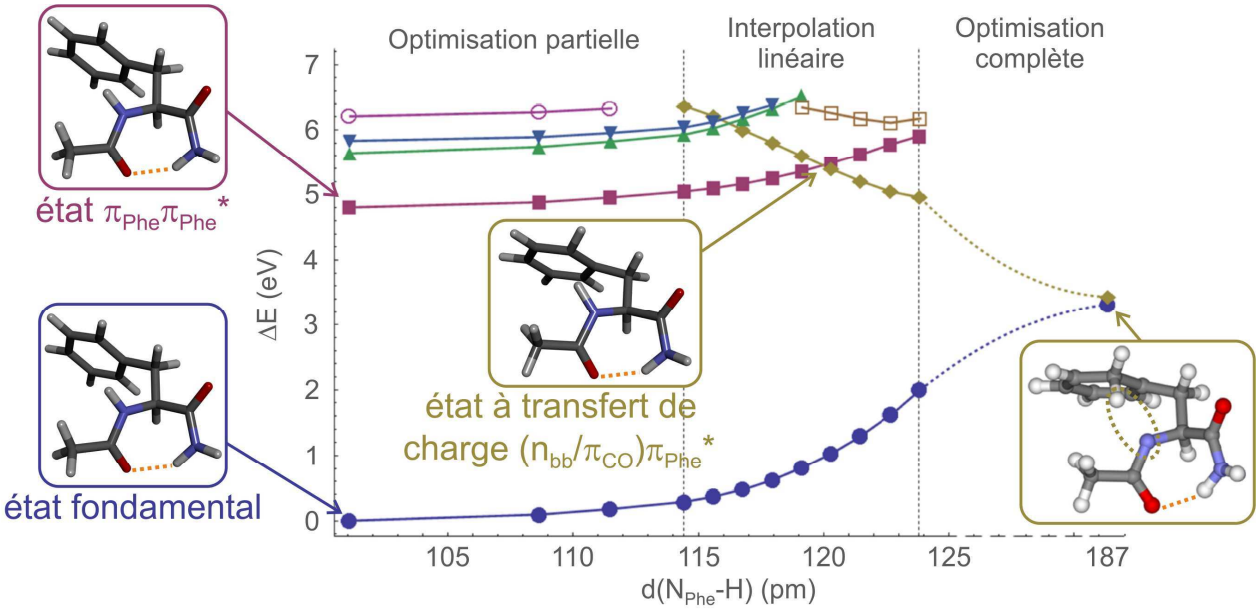


Fig. C.1.2 – *Mécanisme I – Conf.* ***C****: Représentation de l'énergie RI-CC2/cc-pVDZ de l'état fondamental et des trois premiers états excités du conformère* ***C*** *de Ac-Phe-NH$_2$, en fonction de l'élongation de la liaison N-H impliquée dans l'interaction avec le phényle. Les encarts indiquent les géométries du peptide protégé à différents instants du mécanisme.*

C.2 Mécanisme II

C.2.1 Mécanisme II.b

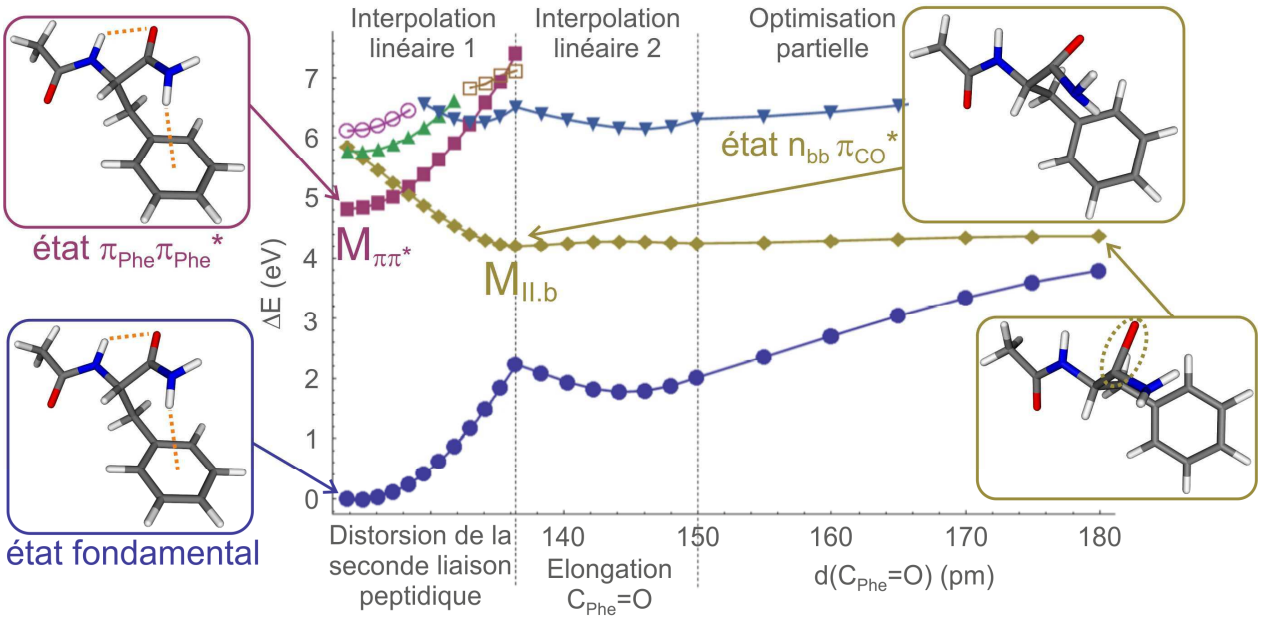


***Fig. C.2.1.1** – Mécanisme II.b – Conf. **A**: Représentation de l'énergie RI-CC2/cc-pVDZ de l'état fondamental et des trois premiers états excités du conformère **A** de Ac-Phe-NH_2.*

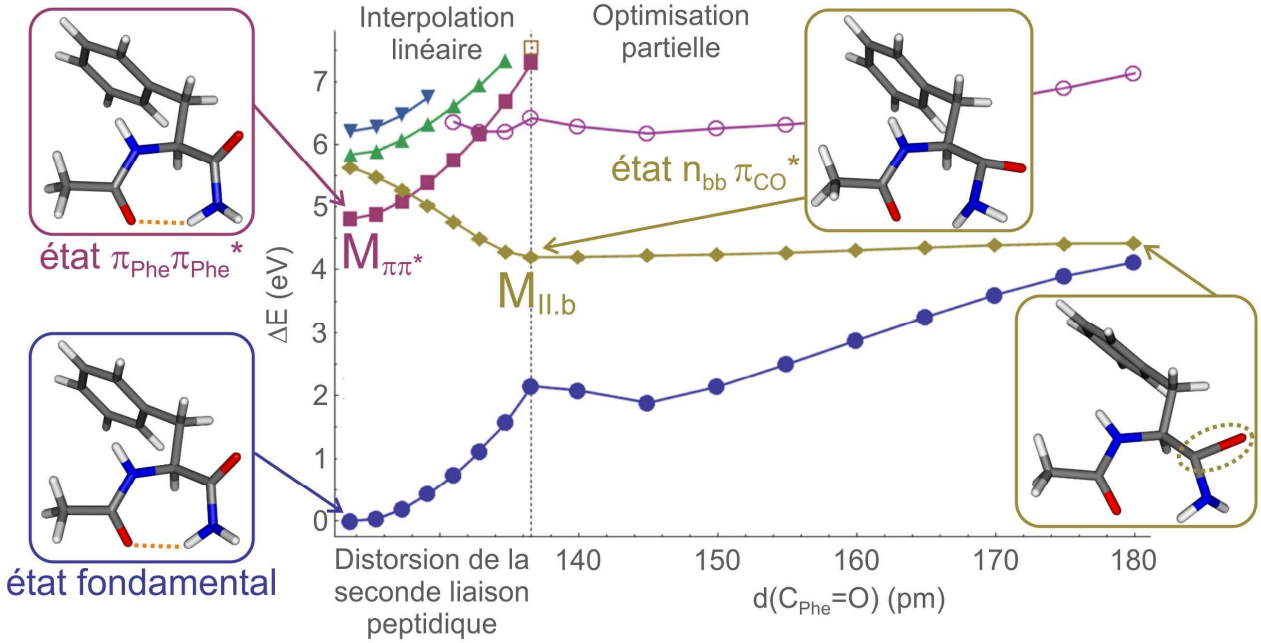


***Fig. C.2.1.2** – Mécanisme II.b – Conf. **C**: Représentation de l'énergie RI-CC2/cc-pVDZ de l'état fondamental et des trois premiers états excités du conformère **C** de Ac-Phe-NH_2.*

C.2.2 Energies et géométries des minimums des états excités des phénylalanines protégées

	Ac-Phe-NHMe – Conf. **B**					Ac-Phe-NH_2 – Conf. **B**				
	Energie (eV)	θ_N (°)	θ_C (°)	ω_2 (°)	$d_{C=O}$ (pm)	Energie (eV)	θ_N (°)	θ_C (°)	ω_2 (°)	$d_{C=O}$ (pm)
$M_{\pi\pi^*}$	0,00	- 1,5	- 1,9	178,4	124	0,00	- 20,2	- 1,5	- 173,1	124
$M_{II.b}$	- 0,72	- 33,9	- 53,0	118,4	133	- 0,71	- 56,8	- 47,1	146,8	138
$M_{II.c}$	- 0,68	42,6	47,2	170,8	148	- 0,72	54,1	45,1	176,5	145
$M_{II.d}$	- 0,63	- 44,1	- 43,8	- 172,9	148	- 0,69	- 55,3	- 43,1	- 178,4	145
$M_{II.e}$	- 0,62	43,1	- 47,4	130,0	148	- 0,64	50,6	- 47,2	123,1	146
$M_{II.f}$	- 0,67	- 43,8	50,4	- 138,5	148	- 0,69	- 52,6	49,8	- 135,1	146

Tab. C.2.2 *– Energies relatives par rapport au minimum de l'état $\pi\pi^*$ (en eV) et paramètres structurels des minimums de l'état excité $n\pi^*$ localisé sur la seconde liaison peptidique (mécanismes de type II) des conformères **B** de Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe. Les angles θ_N et θ_C représentent respectivement les angles de pyramidalisation de l'atome d'azote et de l'atome de carbone de la seconde liaison peptidique (un angle de 0° correspondant à une géométrie trigonale plane). L'angle ω_2 est l'angle de torsion de la seconde liaison peptidique défini dans la Figure 1.3 du Chapitre 1 (angle C_α-C-N-C_α), égal à 180° lorsque la liaison peptidique est plane et de configuration trans. La longueur de la double liaison C=O de la seconde liaison peptidique est donnée par $d_{C=O}$.*

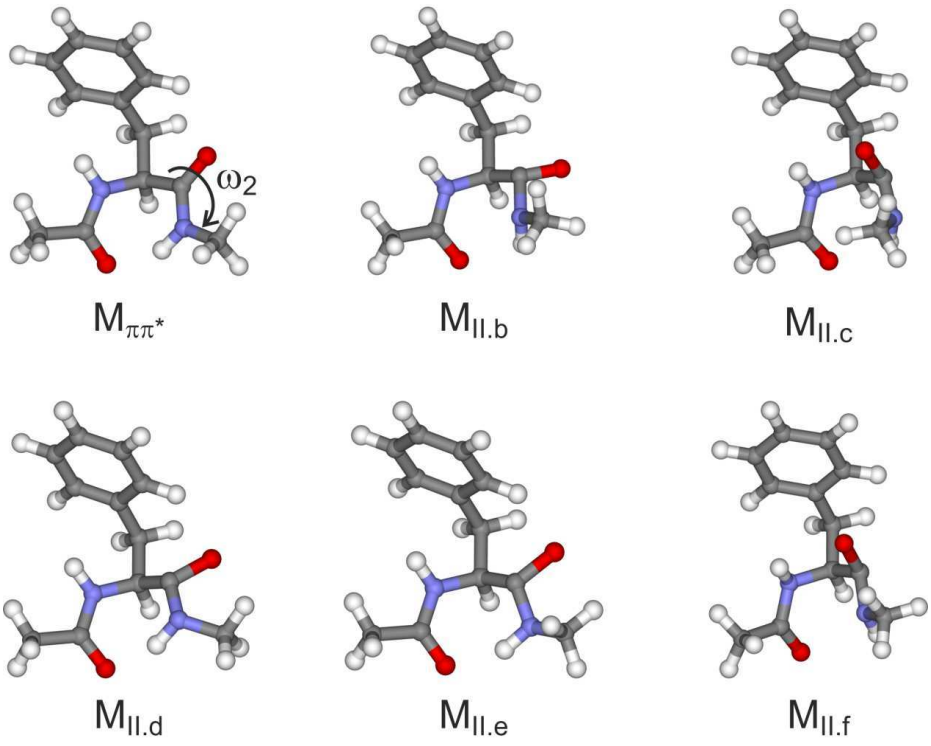


Fig. C.2.2 *– Géométries des minimums des états $\pi\pi^*$ ($M_{\pi\pi^*}$) et $n\pi^*$ ($M_{II.b}$ à $MI_{I.f}$) du conformère **B** de Ac-Phe-NHMe.*

C.3 Mécanisme III

C.3.1 Mécanisme III.a

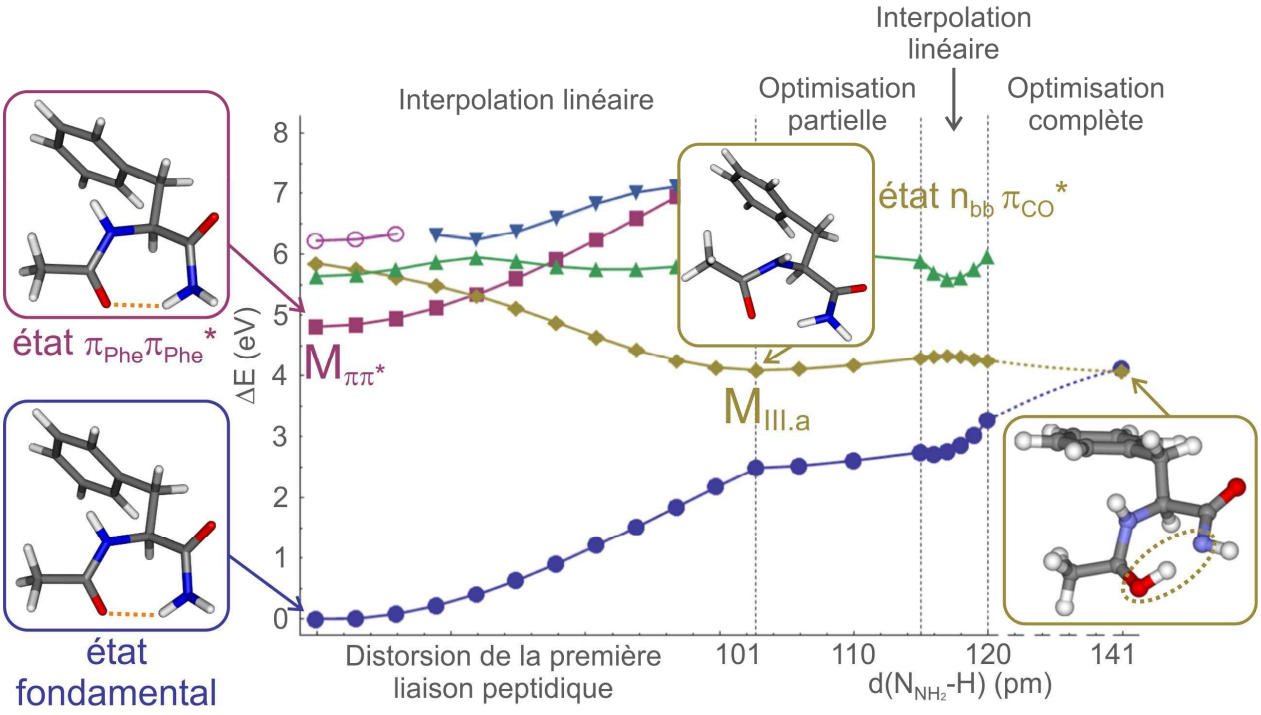


Fig. C.3.1.1 – *Mécanisme III.a – Conf.* ***C****: Représentation de l'énergie RI-CC2/cc-pVDZ de l'état fondamental et des trois premiers états excités du conformère* ***B*** *de Ac-Phe-NH_2.*

C.3.2 Mécanisme III.b

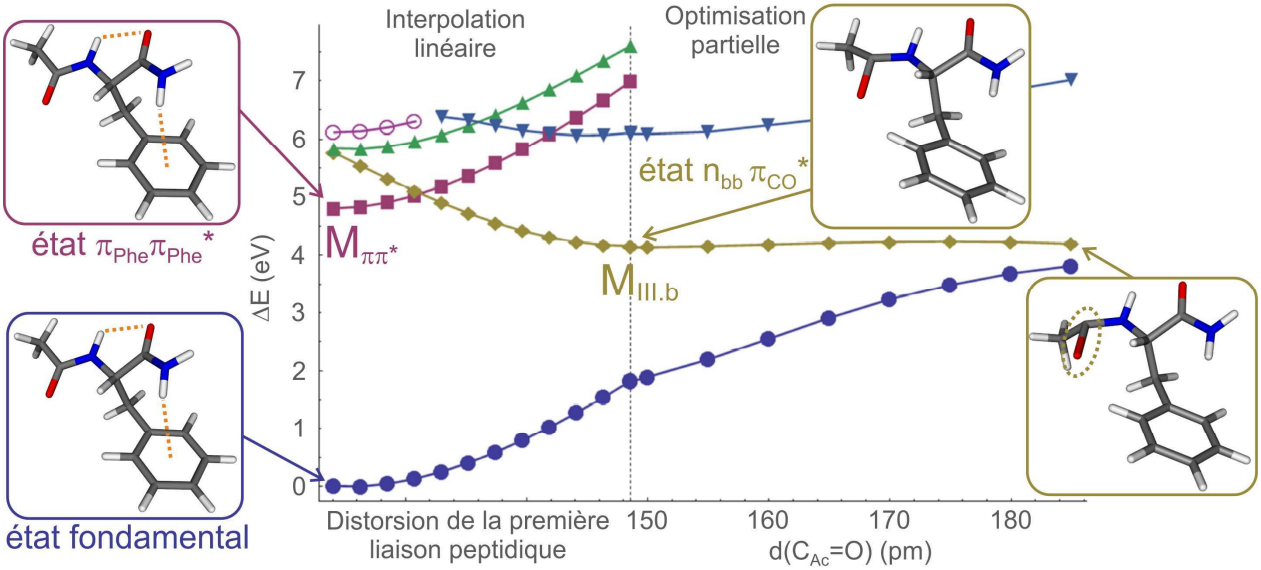


Fig. C.3.2.1 – *Mécanisme III.b – Conf.* ***A****: Représentation de l'énergie RI-CC2/cc-pVDZ de l'état fondamental et des trois premiers états excités du conformère* ***A*** *de Ac-Phe-NH_2.*

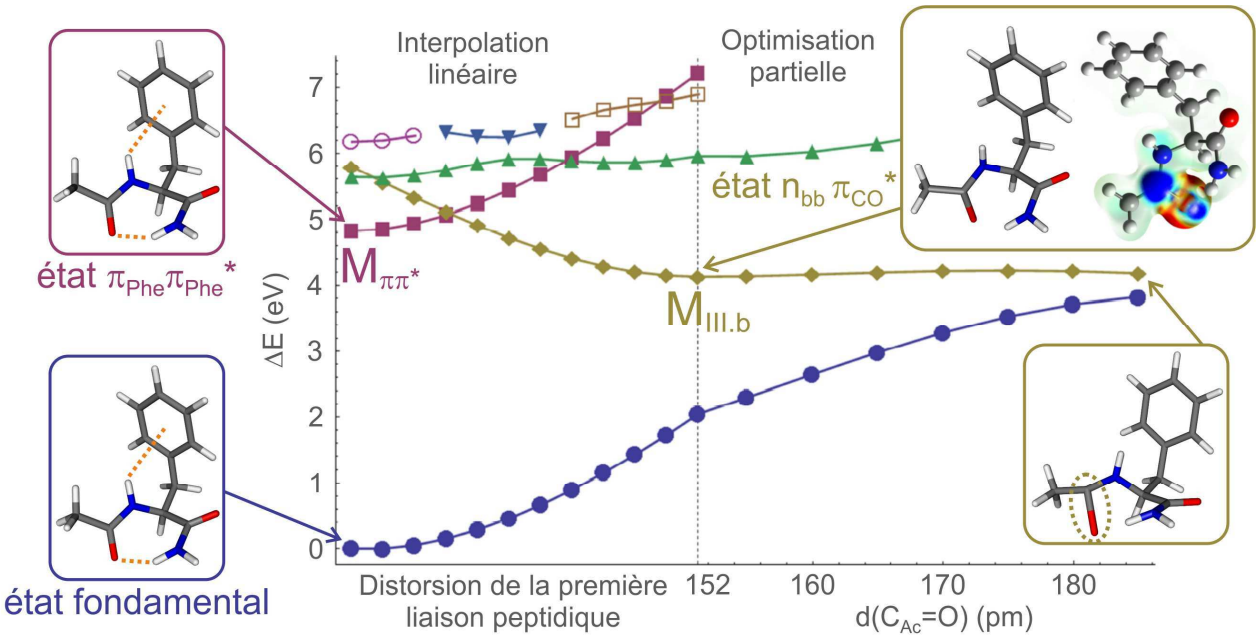


Fig. C.3.2.2 – *Mécanisme III.b – Conf.* ***B****: Représentation de l'énergie RI-CC2/cc-pVDZ de l'état fondamental et des trois premiers états excités du conformère* ***B*** *de Ac-Phe-NH_2.*

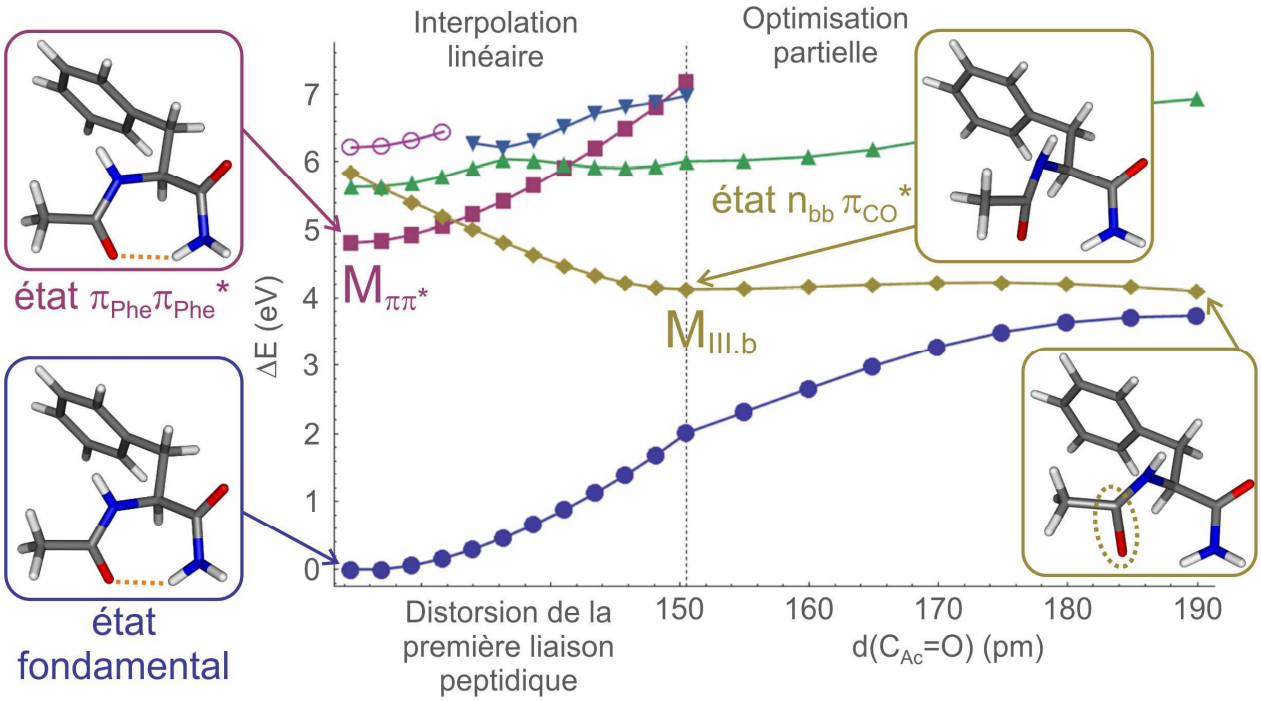


Fig. C.3.2.3 – *Mécanisme III.b – Conf.* ***C****: Représentation de l'énergie RI-CC2/cc-pVDZ de l'état fondamental et des trois premiers états excités du conformère* ***C*** *de Ac-Phe-NH_2.*

C.3.3 Mécanisme III.c

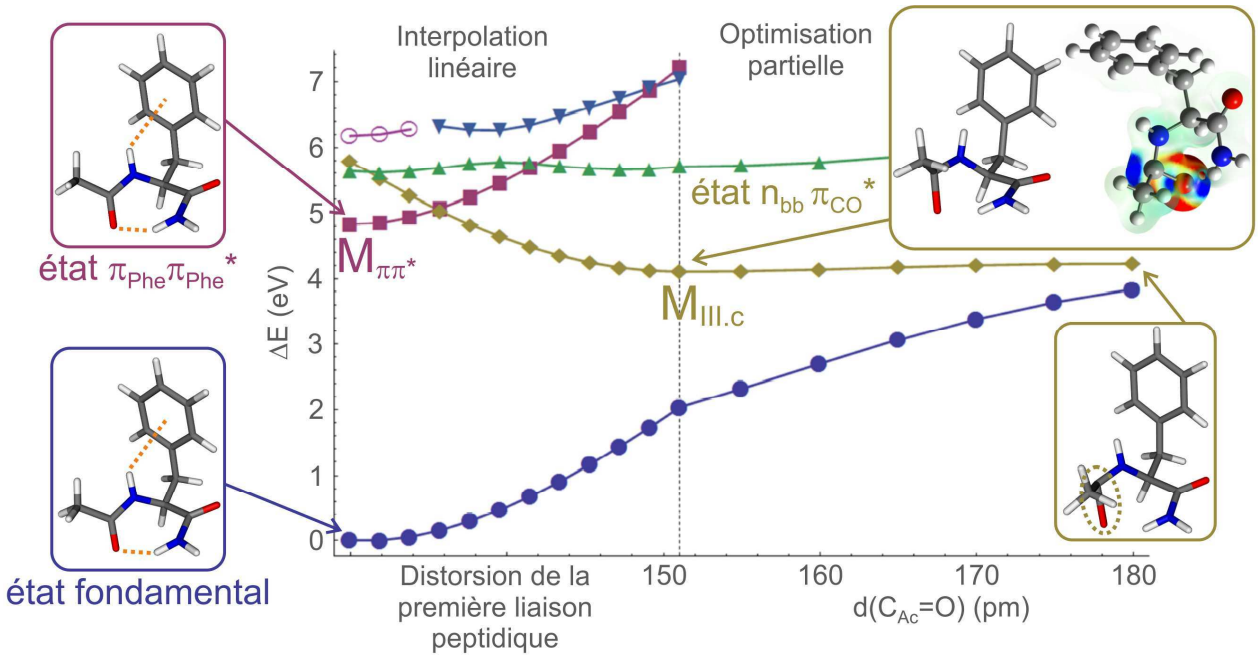


***Fig. C.3.3.1** – Mécanisme III.c – Conf. **B**: Représentation de l'énergie RI-CC2/cc-pVDZ de l'état fondamental et des trois premiers états excités du conformère **B** de Ac-Phe-NH_2.*

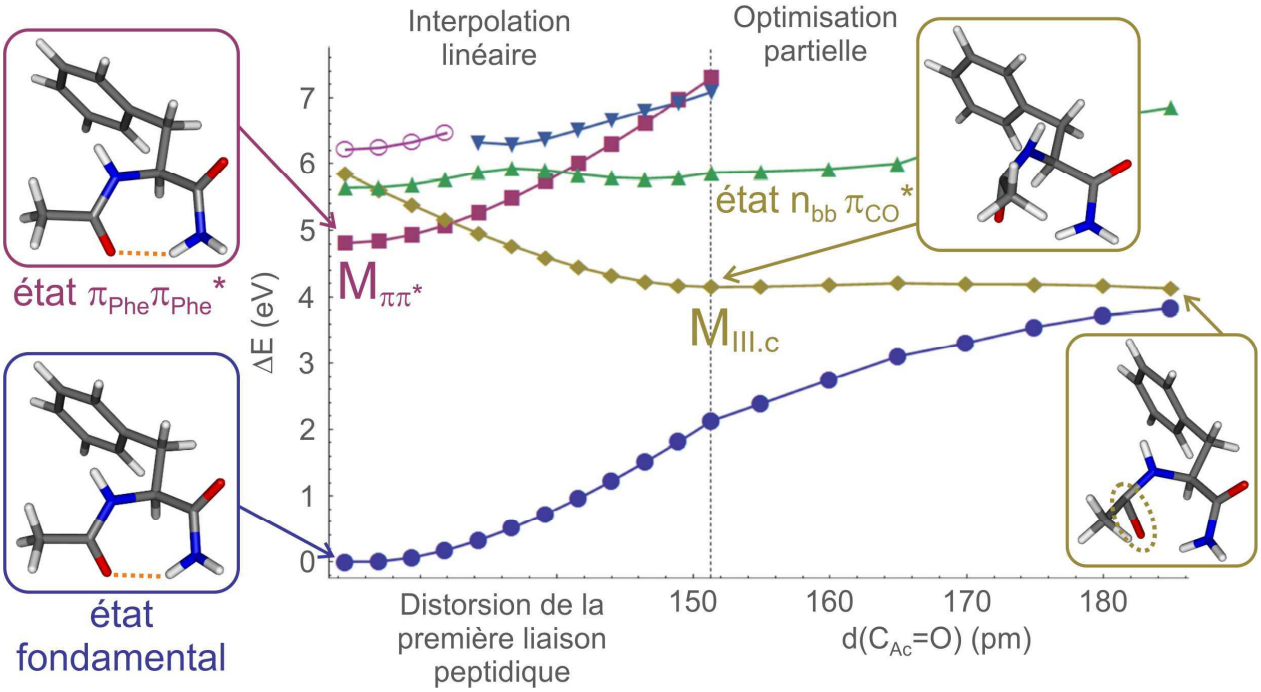


***Fig. C.3.3.2** – Mécanisme III.c – Conf. **C**: Représentation de l'énergie RI-CC2/cc-pVDZ de l'état fondamental et des trois premiers états excités du conformère **C** de Ac-Phe-NH_2.*

Annexe D

Liste d'abréviations

- Ac : Groupement acétyle (CH_3-CO-)
- Ala : Acide aminé alanine (R = CH_3)
- BBO : Béta borate de baryum (β-BaB_2O_4)
- Bn : Groupement benzyle (-CH_2-C_6H_5)
- CC : Théorie du cluster couplé
- CI : Conversion interne
- CIS : Conversion intersystème
- CLUPS : Centre Laser de l'Université Paris-Sud, Orsay (France)
- Cys : Acide aminé cystéine (R = CH_2-SH)
- DFT : Théorie de la fonctionnelle de la densité *(Density Functional Theory)*
- FELIX : Laser à électrons libres pour des expériences infrarouges (*Free Electron Laser for Infrared eXperiments)*
- FOM : Fondation pour la Recherche Fondamentale sur la Matière , Rijnhuizen (Pays-Bas)
- GGA : Approximation des gradients généralisés *(Generalized Gradient Approximation)*
- Gly : Acide aminé glycine (R = H)
- IC : Intersection conique
- IR : Infrarouge
- IR2P-1C : Ionisation résonante à deux photons à une couleur
- IR2P-2C : Ionisation résonante à deux photons à deux couleurs
- KTP : Phosphate de potassium titanyl
- LFP : Laboratoire Francis Perrin, CEA, Saclay (France)
- MALDI : Désorption-ionisation laser assistée par matrice *(Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization)*
- Me : Groupement méthyle (-CH_3)
- OPO : Oscillateur paramétrique optique
- Phe : Acide aminé phénylalanine (R = CH_2-C_6H_5)
- RI : Approximation de la résolution de l'identité
- RRKM : Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus
- TDDFT : Théorie de la fonctionnelle de la densité dépendant du temps *(Time-Dependent Density Functional Theory)*

- UV : Ultraviolet
- Val : Acide aminé valine (R = $CH(CH_3)_2$)
- YAG : grenat d'yttrium et d'aluminium ($Y_3^{3+}Al_5^{3+}O_{12}^{2-}$)
- ZPE : Energie vibrationnelle du point zéro *(Zero-Point Energy)*

Chaines peptidiques modèles en détente supersonique :

Refroidissement conformationnel, structures et dynamique des états excités étudiés par modélisation Monte-Carlo, spectroscopies laser et chimie quantique

Résumé

Cette thèse présente une étude expérimentale et théorique de petites chaines peptidiques modèles en phase gazeuse. Le premier objectif de ce travail consistait à déterminer les conformations préférentiellement adoptées par ces molécules isolées, en vue d'obtenir des informations sur les interactions intra- et inter-moléculaires intervenant dans ces systèmes flexibles. La stratégie expérimentale utilisée associait la vaporisation laser à une détente supersonique et reposait sur la spectroscopie laser de double résonance IR-UV. L'attribution finale des structures a ensuite été réalisée par comparaison des spectres expérimentaux à des spectres issus de calculs de chimie quantique au niveau DFT-D. Dans un deuxième temps, il s'agissait d'étudier la dynamique de relaxation électronique de ces systèmes par spectroscopie pompe-sonde et mesures de fluorescence, et en particulier la dépendance de celle-ci avec la structure secondaire des peptides modèles.

La question de la population conformationnelle de molécules flexibles en phase gazeuse est un sujet délicat et bien souvent éludée car les distributions observées expérimentalement résultent d'un passage hors équilibre lors de la détente supersonique, définissant ainsi une température conformationnelle effective. Un modèle statistique a été développé, décrivant le refroidissement et les isomérisations subis durant la détente par une molécule. Les résultats de ces modélisations reproduisent les tendances d'évolution des rapports d'abondances entre conformations observés expérimentalement et permettent de fournir des ordres de grandeurs relatifs aux processus mis en jeu (nombre de collisions efficaces, trajectoire dans la détente après désorption, températures finales) ainsi qu'une meilleure compréhension des processus de refroidissement et de relaxation conformationnelle.

Les études conformationnelles ont été appliquées à deux systèmes modèles choisis pour étudier des interactions structurantes intervenant dans les protéines : les interactions protéines-solvant et les interactions hydrophobes. L'étude des complexes (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) et (Ac-Phe-NHMe : H_2O) ont permis d'identifier les sites de solvatation préférentiellement occupés par une molécule d'eau et ainsi de proposer des mécanismes de formation des complexes dans la détente supersonique. Le rôle structurant très fort des interactions hydrophobes entre chaînes latérales aromatiques a pu être mis en évidence en étudiant deux peptides modèles contenant un enchainement de plusieurs acides aminés phénylalanine : Ac-Phe-Phe-NH_2 et Ac-Phe-Phe-Phe-NH_2.

L'étude des dynamiques de relaxation du premier état excité $\pi\pi^*$, réalisée sur divers peptides modèles, a permis de démontrer la présence d'effets conformationnels importants. Des calculs de chimie quantique (TDDFT et CC2) réalisés sur les systèmes Ac-Phe-NH_2 et Ac-Phe-NHMe ont montré que cet effet pouvait être expliqué par un transfert d'excitation depuis le cycle aromatique présent sur la chaîne latérale vers les liaisons peptidiques de la chaine principale. Enfin, l'ajout d'une molécule d'eau sur le peptide Ac-Phe-NH_2 semble ouvrir de nouvelles voies ultrarapides de relaxation non-radiative.

Mots clés

Peptides
Spectroscopie laser
Phase gazeuse
Chimie quantique
Structures secondaires
Refroidissement conformationnel
Dynamique de relaxation

Supersonic expansion of model peptides:

Conformational cooling, structures and excited states dynamics studied by Monte-Carlo methods, laser spectroscopy and quantum chemistry

Abstract

The very good spectral resolution of laser spectroscopy achieved in the gas phase is a powerful tool to study the folding properties and the hydrogen bonding network of flexible molecules such as small peptide chains. The experimental strategy used in this work to determine the structural properties of these systems is based on IR-UV double resonance spectroscopy and combines laser vaporisation with a supersonic expansion. The final assignment then requires a comparison between experimental spectra and DFT-D calculations. The conformational selectivity brought by gas phase laser spectroscopy also makes it possible to study the dependence of the dynamics of relaxation of electronic excited states of model peptides with their secondary structure by using pump-probe methods or fluorescence detection.

The issue of the conformational population of flexible molecules cooled in a supersonic expansion is a difficult issue, often disregarded due to the nonequilibrium processes that control the distributions experimentally observed. A statistical model was developed in order to describe this collisional cooling and the isomerizations experienced by one molecule during the expansion. These calculations were consistent with the experimental trends in the population ratios between conformations, they have provided orders of magnitude for the different processes involved (number of collision, trajectory in the expansion after desorption, final temperatures) and a better understanding of the cooling processes and the conformational relaxation.

The conformational studies have been applied to two model systems selected to investigate structural interactions involved in proteins: protein-solvent interactions and hydrophobic interactions. The microhydrated protected phenylalanines (Ac-Phe-NH_2 : H_2O) and (Ac-Phe-NHMe : H_2O) were used to locate the solvation sites preferentially occupied by a water molecule, which then helped to propose a mechanism for the formation of hydrates in the supersonic expansion. The strong structuring properties of hydrophobic interactions between aromatic side chains has been revealed by studying two model peptides containing a sequence of phenylalanine amino acids: Ac-Phe-Phe-NH_2 and Ac-Phe-Phe-Phe-NH_2.

A comparative study of the relaxation dynamics of the first $\pi\pi^*$ excited state performed on various model peptides has demonstrated the existence of a strong conformational effect. TDDFT and CC2 calculations carried out on the protected phenylalanines have shown that this effect could be explained by an excitation transfer from the aromatic ring of a side chain toward a peptide bond of the backbone. Finally, adding a water molecule to the protected phenylalanine is also found to open new ultrafast channels of nonradiative deactivation.

Keywords

Peptides
Laser spectroscopy
Gas phase
Quantum chemistry
Secondary structures
Conformational cooling
Excited state dynamics