



HAL
open science

**Propriétés optiques de marqueurs fluorescents d'intérêt
biologique en interaction avec leur environnement :
étude par spectroscopie femtoseconde**

Pascal Didier

► **To cite this version:**

Pascal Didier. Propriétés optiques de marqueurs fluorescents d'intérêt biologique en interaction avec leur environnement : étude par spectroscopie femtoseconde. Physique Atomique [physics.atom-ph]. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, 2004. Français. NNT: . tel-00008127

HAL Id: tel-00008127

<https://theses.hal.science/tel-00008127>

Submitted on 19 Jan 2005

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 15 octobre 2004

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Louis Pasteur (Strasbourg I)

(Spécialité : Optique Non-Linéaire)

par

Pascal Didier

Propriétés optiques de marqueurs fluorescents d'intérêt biologique en interaction avec leur environnement : étude par spectroscopie femtoseconde.

Composition du jury

RAPPORTEURS :	Majed Chergui Nicolas Rivier Jean-François Roch
EXAMINATEURS :	Béatrice Chatel Jean-Louis Martin
INVITÉ :	Luca Guidoni
DIRECTEUR DE THÈSE :	Jean-Yves Bigot

Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg



Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord les membres de mon jury : Béatrice CHATEL, Majed CHERGI, Jean-Louis MARTIN, Nicolas RIVIER et Jean-François ROCH pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. J'ai particulièrement apprécié les différentes remarques dont ils m'ont fait part.

Je suis également reconnaissant à Bernard CARRIERE et Marc DRILLON, directeurs de l'Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Je remercie Jean-Yves BIGOT, mon directeur de thèse et directeur du Groupe d'Optique Non-Linéaire et d'Optoélectronique, pour m'avoir accueilli et encadré au cours de ces 3 années. Je lui suis reconnaissant pour la liberté qu'il m'a laissée dans mon travail ainsi que pour les conseils qu'il a pu me donner. Ce fut un grand plaisir de travailler avec une personne d'une si grande qualité scientifique.

A la liste des personnes auxquelles j'exprime ma gratitude s'ajoute : Daniel ACKER qui m'a apporté son aide pour la conception et la réalisation des pièces mécaniques indispensables au bon fonctionnement d'une "manip femto"; Michèle ALBRECHT pour son aide dans le domaine de l'électronique et la conception de programmes d'acquisition, je la remercie également sa bonne humeur et surtout sa gentillesse; François BARDOU qui m'a fait découvrir un pan de la physique qui m'était totalement inconnu, je lui suis reconnaissant pour toutes les choses que j'ai apprises en le côtoyant; Alex BOEGLIN pour les différentes discussions que nous avons eues sur les systèmes étudiés et ses conseils lors de la rédaction du manuscrit; Olivier CREGUT qui m'a énormément appris dans le domaine de l'optique non-linéaire et qui a toujours su se montrer disponible pour une explication ou un "alignement délicat"; Jean-Georges GIES pour ses conseils avisés et le plaisir que j'ai eu en enseignant à ses côtés; Valérie HALTE pour sa disponibilité, son aide sur le montage expérimental, ses nombreux conseils et sa gentillesse; Frédéric LINCKER pour son aide précieuse lors de la préparation de certains échantillons; Jean-Pierre LINK-FORMAN pour son aide et ses explications dans les expériences pompe-sonde et dans les expériences de caractérisation d'impulsions, cela m'a permis de comprendre beaucoup de choses; Laurence OSWALD pour nous avoir permis de stocker nos nombreux échantillons et qui n'a jamais refusé de nous rendre service; Georges SCHWALBACH pour la synthèse des échantillons biologiques et le temps qu'il a consacré à m'expliquer comment les produire; Etienne WEISS qui m'a accueilli dans son équipe à l'Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, je le remercie pour sa patience, les nombreuses choses apprises dans le domaine de la biologie et son irremplaçable humour.

Mais ce travail ne serait pas ce qu'il est sans Luca GUIDONI qui m'a parfaitement encadré au cours de ces trois années. Il a toujours su se montrer disponible pour me donner une explication ou pour m'aider sur le montage expérimental. De par son extraordinaire culture scientifique, tant au niveau de la physique que de la biologie, j'ai énormément appris à ses côtés et ce fut pour moi un honneur et un grand plaisir de travailler avec lui. Je remercie également Luca et sa femme pour leur aide lors de la rédaction de ce manuscrit. Je suis conscient que sans lui, ce travail ne serait pas ce qu'il est. Pour tout cela, je lui suis infiniment reconnaissant. Merci Luca.

En dehors des aspects scientifiques, je tiens à remercier Janine JOSEPH et Jeanine DRIVON pour leur patience, leur gentillesse et leur aide dans les tâches adminis-

tratives. Je remercie également Leandro ANDRADE, Abdelkrim BENABBAS, Christine BOEGLIN, Paul-Antoine HERVIEUX ainsi que tous mes collègues thésards pour leurs encouragements et leur soutien.

Je tiens aussi à remercier mes parents qui m'ont toujours soutenu tout au long de mes études. Je leur dois beaucoup et je ne serais sans doute pas arrivé là sans leur aide. Finalement j'exprime toute ma gratitude à Joëlle qui m'a soutenu et qui a surtout supporté le train de vie d'un thésard pendant trois longues années. Je la remercie tout particulièrement pour sa patience et son aide dans les dernières étapes de la rédaction du manuscrit et de la préparation de la soutenance.

TABLE DES MATIÈRES

<i>Introduction générale</i>	3
<i>1. Propriétés photophysiques de marqueurs d'intérêt biologique</i>	7
1.1 La protéine fluorescente verte (GFP)	11
1.1.1 Généralités	12
1.1.2 Photophysique de la protéine fluorescente verte	15
1.1.3 Propriétés optiques du chromophore isolé	25
1.1.4 Exemples d'applications de la protéine fluorescente verte	30
1.2 Fusion génétique fragment d'anticorps-GFP : problématique d'un point de vue biologique [Jan01]	34
1.3 Propriétés photophysiques de "rotors moléculaires"	41
1.3.1 Cas modèle du DMABN	42
1.3.2 Cas controversé des dérivés de coumarine	46
<i>2. Techniques de spectroscopie femtoseconde : aspects théoriques et pratiques</i>	54
2.1 Génération d'impulsions LASER ultracourtes	55
2.1.1 Blocage de modes [Rul04]	56
2.1.2 Dispersion de la vitesse de groupe [Alf89, RW89]	58
2.1.3 Source laser de l'expérience	64
2.2 Techniques d'optique non-linéaire en régime impulsionnel	67
2.2.1 Doublage de fréquence des impulsions pompe	67
2.2.2 Auto-modulation de phase pour la génération de l'impulsion sonde	69
2.2.3 Principe de l'amplificateur paramétrique optique en géométrie non- colinéaire [She02, Big01, CNSS98, GCH98, CS03]	71

2.2.4	Signal mesuré dans une expérience pompe-sonde [Pha96, Muk95, SD92]	77
2.2.5	Configuration expérimentale	79
2.2.6	Caractérisation des impulsions pompe et sonde [Jof98]	84
2.2.7	Cellule tournante et système de détection	95
3.	<i>Résultats expérimentaux et interprétations des expériences pompe-sonde</i>	100
3.1	Dynamique des états excités de protéines GFP	100
3.1.1	Préparation des échantillons	100
3.1.2	Propriétés optiques linéaires	103
3.1.3	Expériences résolues en temps	109
3.2	Dynamique des états excités des dérivés de coumarine	125
3.2.1	Propriétés optiques linéaires	127
3.2.2	Spectroscopie résolue en temps des dérivés de coumarine	132
4.	<i>Vieillessement statistique de la GFPuv</i>	139
4.1	Expérience sur des molécules uniques et statistiques de Lévy	140
4.1.1	Comportement de protéines GFP uniques	140
4.1.2	Statistique de Lévy [BBACT02]	144
4.2	Configuration expérimentale	149
4.3	Résultats expérimentaux et interprétation	151
4.3.1	Résultats	151
4.3.2	Modèle et interprétation	155
	<i>Conclusion générale</i>	163
	<i>Références bibliographiques</i>	165

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La possibilité de marquer des protéines d'intérêt par des sondes fluorescentes est devenue une méthode couramment utilisée dans le domaine de l'imagerie cellulaire. En effet, cette technique permet de suivre spatialement la protéine d'intérêt et de localiser ses sites d'interaction au sein de l'organisme vivant. Selon la nature du marqueur, il est possible d'obtenir en plus de l'information spatiale des informations sur l'environnement proche du marqueur grâce aux propriétés optiques linéaires des sondes fluorescentes (par exemple le rendement quantique ou la longueur d'onde d'émission) qui peuvent être modifiées par l'interaction avec l'environnement (pH, concentration en ions, viscosité ...). On voit alors l'intérêt que ces marqueurs peuvent présenter dans le cadre d'applications en imagerie cellulaire. Le but de cette étude est d'apporter un contraste supplémentaire, d'origine temporelle, qui permette de compléter les informations obtenues grâce aux modifications des propriétés optiques linéaires. La technique d'imagerie par durée de vie (lifetime imaging [DBC⁺04]) exploite déjà cette notion de contraste temporel dans le domaine de l'imagerie cellulaire. Ici, nous proposons d'étendre ce type de mesures en caractérisant les propriétés dynamiques de ces marqueurs à l'échelle de la picoseconde.

Le travail que nous avons réalisé s'inscrit dans le domaine de la spectroscopie résolue en temps (femtoseconde). En particulier, nous avons utilisé la technique pompe-sonde résolue spectralement et temporellement pour caractériser la dynamique des états excités de différents marqueurs d'intérêt biologique [CBEC⁺04, CKBB96]. En fait, dans la gamme de temps sub-picoseconde, les propriétés dynamiques peuvent être fortement modifiées par l'interaction avec l'environnement. Nous allons démontrer, tout au long de ce manuscrit, que la sensibilité apportée par les expériences résolues en temps peut être mise à profit dans le cadre d'applications biologiques.

En premier lieu, nous nous sommes intéressés à la dynamique de l'un des marqueurs les plus couramment utilisés en imagerie cellulaire : la protéine fluorescente verte (Green

Fluorescent Protein GFP). L'existence de nombreux mutants (obtenus par ingénierie moléculaire) aux propriétés optiques linéaires variées a récemment permis d'accroître son champ d'application [Tsi98]. Mais c'est principalement la possibilité de marquer un à un non-invasif d'autres protéines qui a rendu ce marqueur si populaire [CTE⁺94]. C'est en comparant les propriétés dynamiques de la protéine naturelle [CKBB96, WIS⁺02] avec celles d'un de ses mutants, que nous allons montrer l'extrême sensibilité des signatures spectro-temporelles aux modifications de l'environnement proche de la partie optiquement active de la protéine. L'un des principaux résultats obtenus provient de la collaboration avec des immuno-biologistes, qui utilisent la GFP fusionnée à un fragment d'anticorps dans le cadre d'une étude sur le cancer du col de l'utérus [GTB⁺99]. Nous avons entre autre démontré que la dynamique des états excités de la fusion anticorps-GFP peut être mise à profit pour caractériser l'état de repliement final de l'anticorps qui joue un rôle clé dans le mécanisme de reconnaissance du non-soi.

Nous avons également étudié les propriétés dynamiques d'une autre classe de sondes fluorescentes, qui ne sont généralement pas utilisées dans des expériences de marquage mais plutôt pour rapporter les propriétés de l'environnement local (par exemple une membrane biologique [ECL⁺03]). Ces sondes sont des dérivés de coumarine (petite molécule conjuguée développée comme colorant laser) qui sont parfois utilisés en imagerie cellulaire. Nous avons étudié la dynamique des états excités de ces composés, qui sont utilisés en tant que "rotors moléculaires" [GRR03], dans le but d'éclaircir le mécanisme à l'origine des modifications des propriétés d'émission. Nos résultats montrent l'absence de signatures prévues par le modèle impliquant une torsion dans l'état excité (à l'origine du nom de cette classe de molécules).

Finalement, nous nous sommes intéressés au phénomène du vieillissement statistique des protéines GFP mis en évidence par les expériences de molécules uniques. En effet, ces études ont montré que chaque marqueur effectue un nombre fini de cycles d'absorption/émission spontanée avant d'atteindre de façon définitive un état non-fluorescent [DCTM97]. D'autre part, les temps mis en jeu au cours de ce processus de vieillissement [BHM⁺03] ainsi que d'autres propriétés d'émission [BNV⁺03] sont distribués selon une classe de lois statistiques larges : les lois de Lévy [BBACT02]. Le but de notre étude est de montrer que l'on peut trouver une signature de ces statistiques dans une mesure

d'ensemble et tirer des informations sur les mécanismes à l'origine du vieillissement.

Ce manuscrit sera articulé en quatre chapitres. Le premier chapitre sera consacré à une introduction aux problématiques concernant la protéine fluorescente verte (GFP) et la classe de marqueurs connue sous le nom de "rotors moléculaires". Par une revue de la littérature existante sur le sujet, nous décrirons "l'état de l'art" qui a constitué le point de départ de ce travail. Nous introduirons tout d'abord les diverses expériences réalisées sur les protéines GFP (propriétés optiques statiques et dynamiques). Puis, nous présenterons les motivations d'ordre biologique qui ont poussé nos collaborateurs de l'École Supérieure de Biotechnologies de Strasbourg à utiliser cette protéine dans leurs études. Nous passerons ensuite aux "rotors moléculaires" basés sur des coumarines qui sont des candidats potentiels au titre de sonde de l'environnement local.

Dans un deuxième chapitre, nous aborderons les techniques expérimentales mises en oeuvre au cours de ce travail. Une première partie rappellera quelques propriétés des impulsions sub-picoseconde. Nous présenterons ensuite les techniques et les phénomènes d'optique non-linéaire qui ont été utilisés au cours des expériences résolues en temps. Ce chapitre se terminera par une description des méthodes utilisées pour caractériser les impulsions et du montage expérimental (setup pompe-sonde, technique de détection).

Le troisième chapitre sera dédié à la présentation des résultats obtenus aussi bien d'un point de vue statique que dynamique. Nos résultats seront placés dans le contexte de la littérature. En particulier nous montrerons, dans le cas de fusions génétiques anticorps-GFP, que les propriétés dynamiques peuvent être utilisées pour caractériser l'état de repliement final de l'anticorps. Cette étude est complétée par la caractérisation de la dynamique des états excités d'un analogue de la partie optiquement active de la protéine qui montre l'importance de l'interaction entre le chromophore et le reste de la protéine. En dernier lieu, l'étude des dérivés de coumarine nous a permis d'écarter la torsion dans l'état excité comme origine des modifications des propriétés d'émission de ces composés.

Dans le quatrième et dernier chapitre, nous présenterons les résultats obtenus dans le cadre de l'étude sur le vieillissement de la protéine GFP_{uv}. Nous introduirons tout d'abord les expériences de la littérature qui ont permis d'identifier et caractériser ce phénomène de vieillissement par des expériences sur des molécules uniques. Puis, nous présenterons les aspects fondamentaux des statistiques de Lévy en illustrant avec un exemple simple

quelles sont les signatures attendues lorsqu'un système physique est décrit par une loi large. Ce chapitre se poursuivra par une description du montage expérimental. Nous terminerons en présentant les résultats expérimentaux ainsi que le modèle que nous avons développé.

1. PROPRIÉTÉS PHOTOPHYSIQUES DE MARQUEURS D'INTÉRÊT BIOLOGIQUE

Introduction

L'utilisation de techniques optiques est devenue indispensable pour les biologistes depuis l'invention du microscope à la fin du XVI^{ème} siècle en Hollande par Hans et Zacharias Jansen. A partir de la deuxième moitié du XVII^{ème} siècle, à travers les travaux de l'Italien Marcello Malpighi, des Hollandais Antonie Van Leeuwenhoek et Jan Swammerdam, et des Anglais Robert Hooke et Nehemiah Grew, l'utilisation du microscope se développe massivement. Jusqu'alors, l'unique instrument optique utilisé par les biologistes, ou plutôt les naturalistes comme ils se nommaient, était l'oeil humain. L'apparition du microscope a donc permis l'observation d'entités dont la taille est bien inférieure à la limite de résolution de l'oeil humain ($75 \mu m$ à la distance optimale d'observation de 25 cm; 1 minute d'arc). C'est en 1665 que l'Anglais Robert Hooke reporta pour la première fois le croquis d'entités observées dans une plante (fig. 1.1) qu'il nomma "cellules". Suivirent alors une multitude de découvertes dont il serait difficile de dresser une liste exhaustive.

A partir de cette date et dans le but d'accroître le contraste et la résolution spatiale de cet instrument optique, la microscopie connut de nombreux développements avec l'apparition de nouvelles techniques comme le microscope à contraste de phase (Zernike 1932, sensible à la variation de l'indice de réfraction du milieu) et le microscope à contraste interférentiel différentiel (Nomarski 1952, sensible à la différence de phase entre deux points séparés spatialement) qui permettent l'observation d'objets transparents. On peut encore citer d'autres techniques qui sont très utilisées en biologie comme la microscopie de fluorescence, la microscopie confocale et, récemment, avec l'avènement des sources pulsées ultra-rapides, la microscopie non-linéaire. A travers ces différentes techniques, on voit bien que l'expérimentation en biologie a toujours été fortement corrélée à l'utilisation et

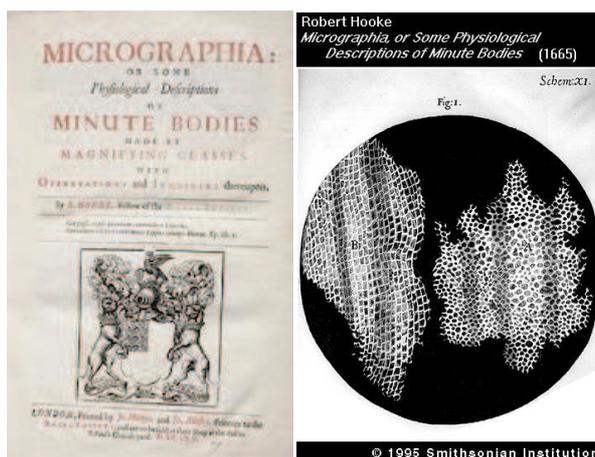


FIG. 1.1 – A gauche, couverture du traité de Robert Hooke intitulé : "Micrographia: or some Physiological Description of Minute Bodies made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries thereupon" paru en 1665. A droite, croquis de cellules de plantes observées par Hooke.

au développement des techniques optiques. Actuellement, la technique de microscopie de fluorescence utilisant des marqueurs fait partie des méthodes les plus couramment utilisées en imagerie biologique. Cette technique repose sur le marquage de l'objet biologique d'intérêt (protéine, anticorps, membrane ...) par un objet fluorescent (marqueur). Par exemple, dans le cas d'une protéine, une fois que l'on a réussi le marquage (liaison covalente entre l'objet d'intérêt et l'objet fluorescent), il est possible de suivre spatialement le marqueur et donc d'identifier les sites d'interaction de la protéine au sein de l'organisme vivant. En imagerie biologique, les marqueurs utilisés se répartissent en trois classes :

- les marqueurs inorganiques (nanocristaux de semiconducteur ou nanoparticules métalliques) [JMGaAPA98, CN98].
- les marqueurs organiques synthétiques (fluoresceine, rhodamine, cyanine ...) [WB92].
- les marqueurs organiques biologiques (protéine fluorescente verte, green fluorescent protein GFP, Photoactive Yellow Protein PYP, DsRed ...) [Tsi98, SZvF⁺01].

La principale difficulté liée à l'utilisation des marqueurs appartenant aux deux premières classes, réside dans l'efficacité du marquage. C'est à dire le nombre d'objets marqués normalisé au nombre de marqueurs. Dans la pratique, il est très difficile de faire tendre ce rapport vers 1. Autrement dit, en utilisant l'un de ces marqueurs, il est pratiquement

impossible de ne pas avoir de marqueurs non-liés dans le système. La présence de ces marqueurs libres peut engendrer des interprétations erronées sur l'activité de l'objet marqué. D'autre part, l'utilisation d'une entité étrangère à l'organisme peut s'avérer toxique. Cette difficulté peut être complètement éliminée si on utilise une protéine fluorescente comme marqueur. Dans ce cas, on peut faire produire directement par l'organisme vivant une fusion composée de la protéine fluorescente et de l'objet d'intérêt. Cela signifie que, lors de la synthèse de l'objet d'intérêt par l'organisme vivant, chaque objet sera relié à une protéine fluorescente et ceci sans altérer l'activité biologique de l'objet d'intérêt. L'une des protéines fluorescentes les plus couramment utilisées en imagerie biologique est la protéine fluorescente verte. En effet, la séquence ADN de cette protéine, qui fut découverte dans des organismes marins (méduse *Aequorea Victoria*), a été décodée [PEW⁺92]. Il est aujourd'hui très facile d'exprimer la protéine dans des organismes hôtes [CTE⁺94] et de faire du marquage un à un non-invasif grâce aux techniques de recombinaison d'acide désoxyribonucléique (ADN). Pour illustrer cela, considérons l'exemple où l'organisme hôte est une bactérie. Dans ce cas, en introduisant un plasmide¹ composé de la séquence ADN de la GFP et de la protéine d'intérêt, on peut faire produire par la bactérie une fusion possédant une double caractéristique : la fluorescence et l'activité biologique. Cette technique extrêmement puissante est maintenant utilisée dans un grand nombre de laboratoires. De plus, la création par ingénierie moléculaire de mutants ayant des propriétés spectrales différentes de la protéine naturelle (déplacement des bandes d'absorption et d'émission, augmentation de la solubilité ...) a fait des xFP l'une des familles de marqueurs les plus populaires en imagerie biologique.

Bien que l'utilisation de marqueurs organiques en imagerie *in vivo* soit plus simple d'un point de vue expérimental que l'utilisation de marqueurs inorganiques (essentiellement à cause de problèmes de fonctionnalisation), il existe un problème d'origine physique qui limite leur utilisation, notamment dans le cadre d'expériences sur des molécules uniques. Dans ce type d'expérience, on détecte l'émission fluorescente d'un marqueur unique et donc on peut localiser l'objet unique qui lui est attaché [FQS⁺03]. Dans le cas de la GFP et d'autres marqueurs organiques [LX97], les expériences ont permis de mettre

1. Courte séquence d'ADN sous forme de boucle circulaire caractéristique des bactéries.

en évidence le caractère intermittent de l'émission fluorescente d'une molécule donnée (alternance de période allumée/éteinte) [DCTM97]. Cette transition réversible s'effectue entre un état fluorescent et un état noir (souvent un état triplet). Après avoir effectué un nombre fini de cycles d'absorption-émission spontanée, la molécule transite de façon irréversible vers un autre état noir (photoblanchiment). Typiquement le nombre de ces cycles est de l'ordre de $10^5 - 10^6$ dans le cas des protéines fluorescentes mais il peut aller jusqu'à 9×10^6 pour certains colorants (par exemple Alexa 633). On peut atténuer le problème du "vieillissement" des fluorophores en utilisant des marqueurs inorganiques. La photophysique de ces marqueurs est caractérisée par l'absence presque totale d'états noirs irréversibles. Le marqueur effectue des alternances de périodes ON/OFF [BHM⁺03] et l'on peut suivre un objet marqué sur des temps très longs.

Au cours de ce travail de thèse expérimental, nous nous sommes intéressés, dans le cadre d'une collaboration avec des biologistes de l'École Supérieure de Biotechnologies de Strasbourg, aux propriétés photo-physiques d'un mutant de la GFP. Plus particulièrement, nous avons caractérisé par spectroscopie femtoseconde résolue spectralement la dynamique des états excités de ce mutant. Nous avons tout d'abord comparé les résultats obtenus avec ceux de la protéine naturelle. Cela nous a permis de montrer que la dynamique des états excités s'avère très sensible à l'environnement local de la partie optiquement active de la protéine (chromophore). Dans une deuxième partie qui concerne l'étude de fusions génétiques anticorps-GFP, nous avons utilisé la sensibilité offerte par la dynamique des états excités de la protéine pour caractériser l'état de repliement de l'anticorps fusionné. Enfin, dans une dernière partie nous avons étudié la dynamique de marqueurs à base de coumarine, dont les propriétés de fluorescence (durée de vie, rendement) sont utilisées comme sonde de l'environnement proche dans des membranes ou des polymères. Afin de mieux comprendre le mécanisme à l'origine de cette sensibilité nous avons réalisé une expérience pompe-sonde résolue temporellement et spectralement. L'idée sous-jacente de ce travail est donc d'utiliser la dynamique des états excités d'un marqueur comme sonde de l'environnement. Ce type de technique pourrait donc devenir un outil supplémentaire pour les biologistes et c'est ce que nous essaierons de démontrer tout au long de ce travail.

Cette partie présentera une revue des expériences réalisées sur les systèmes que nous

avons étudiés, et sur les différents mécanismes qui les gouvernent. Nous commencerons tout d'abord par rappeler un certain nombre de généralités sur la GFP et nous détaillerons ensuite ses propriétés optiques linéaires. Puis nous passerons en revue les différentes expériences résolues en temps qui ont été réalisées sur cette protéine ainsi que les interprétations qui leur sont associées. En particulier, nous décrirons les expériences qui sont directement comparables avec celles que nous avons réalisées (voir chapitre 3). La première section se poursuivra par la présentation d'une autre approche utilisée par de nombreux autres groupes pour caractériser la photophysique de la GFP. Cette approche consiste en l'étude de la partie optiquement active de la protéine (chromophore) isolée en solution. Finalement, nous donnerons des exemples d'applications des protéines GFP.

Dans une deuxième section, nous détaillerons la problématique liée aux fusions anticorps-GFP qui ont été étudiées dans le cadre d'une collaboration avec l'École Supérieure de Biotechnologies de Strasbourg. La troisième section sera consacrée au débat qui anime une partie de la communauté scientifique autour des mécanismes d'émission des dérivés de coumarine dits "rotors moléculaires" et de l'utilisation qui en est faite dans le domaine de l'imagerie biologique.

1.1 La protéine fluorescente verte (GFP)

Nous énumérerons tout d'abord quelques propriétés (séquence ADN, structure tertiaire, chromophore) de la GFP. Puis nous présenterons les mesures réalisées dans le domaine de l'optique linéaire (spectres d'absorption, d'excitation et d'émission) sur la GFP naturelle ou "wild type" (GFPwt) ainsi que le mutant que nous avons étudié. Dans une deuxième partie nous présenterons et discuterons les diverses expériences résolues en temps déjà réalisées sur la GFP et ce qu'elles ont apporté à la compréhension de la photophysique de cette protéine. Nous poursuivrons en décrivant plusieurs expériences réalisées sur le chromophore de la GFP isolé en solution. Finalement, afin de mieux comprendre l'intérêt qu'elle présente dans le domaine de la biologie et dans d'autres domaines, nous donnerons des exemples de son utilisation.

1.1.1 Généralités

La protéine fluorescente verte, qui fut découverte en 1962 [SJS62], provient de la méduse *Aequorea Victoria* que l'on peut trouver dans l'Atlantique nord au large de la côte Est des États-Unis. A l'heure actuelle, on ne connaît pas la fonction biologique de la GFP dans l'organisme marin et l'une des questions qui reste en suspens concerne le mécanisme évolutif qui a amené la méduse à produire cette protéine. Bien que la méduse puisse fluorescer via une stimulation électrique ou mécanique, aucun biologiste marin n'a jamais pu observer de méduses fluorescentes dans leur environnement naturel. On sait, cependant, que dans la méduse la GFP est liée à une autre protéine : l'aequorine. Et c'est par son intermédiaire que la GFP est excitée *in vivo*. En effet, lorsque l'aequorine est excitée chimiquement par des ions Ca^{2+} , elle peut émettre un photon avec un spectre d'émission centré à 470 nm et c'est cette radiation qui permet d'exciter la GFP par transfert résonnant d'énergie entre les deux protéines. La séquence ADN de la protéine a été décodée pour la première fois en 1992 [PEW⁺92] : cette étude a montré que la protéine est composée de 238 acides aminés (poids moléculaire 27000 $g.mol^{-1}$). La partie optiquement active de la protéine (chromophore p-hydroxybenzylimidazolinone), qui se forme après le repliement de la protéine dans une forme quasi-native, correspond à une sous-unité composée de trois peptides Ser^{65} - Tyr^{66} - Gly^{67} (fig. 1.2) qui résulte de la cyclisation post-traductionnelle autocatalytique et de l'oxydation du tri-peptide suivi de la de-hydrogénation de la tyrosine [CPW⁺93] (fig. 1.3). Cette réaction chimique implique

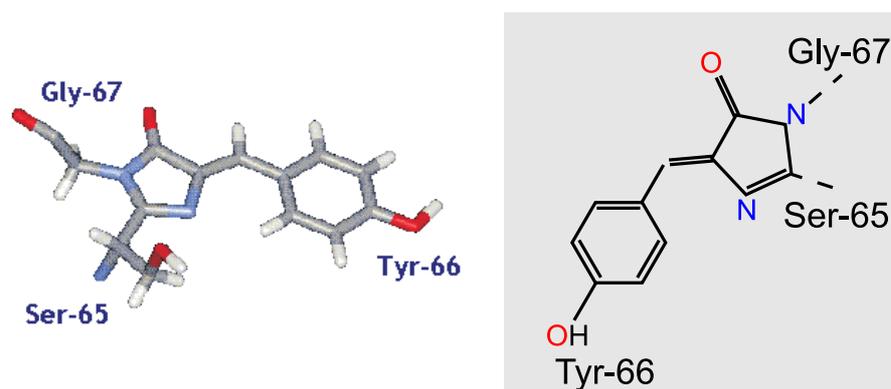


FIG. 1.2 – Structure chimique du chromophore GFP (*p*-hydroxybenzylimidazolinone) mise en évidence par Shimomura en 1979 [Shi79].

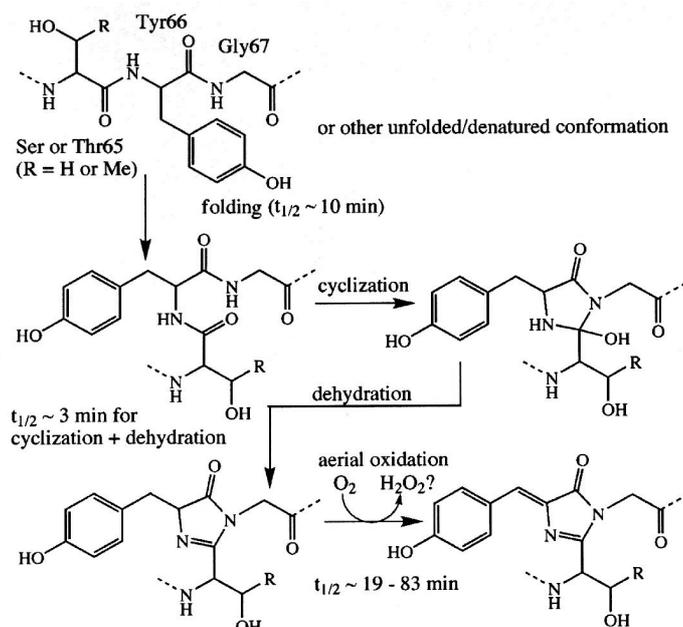


FIG. 1.3 – Mécanisme de formation du chromophore tel qu'il a été proposé par Cubitt et al. [CHA⁺95] (reproduit avec la permission des auteurs).

donc la présence d'oxygène lors de la formation du chromophore. Cela s'observe d'ailleurs expérimentalement en comparant la fluorescence émise par des colonies de bactéries qui ont poussé sur une surface d'agar à celle des colonies qui ont poussé en solution. En effet, la fluorescence des premières colonies est toujours bien supérieure à celle des secondes.

Bien que la protéine ait été cristallisée pour la première fois en 1974, ce n'est qu'en 1996 qu'Ormö et al. ont résolu sa structure tri-dimensionnelle par diffraction de rayons X sur un cristal de GFP (résolution 1.9 Å) [OCK⁺96]. Malgré la non-résolution des résidus 1 et 201-238, les auteurs ont pu démontrer que la protéine se présente sous la forme d'un cylindre composé de 11 feuillets- β (9 à 13 résidus par feuillet) entourant une hélice α qui contient le tri-peptide responsable de la formation du chromophore (fig. 1.4). Un feuillet β est une structure planaire constituée de chaînes de polypeptides très résistantes. Ce cylindre ($h=4.2$ nm, $d=2.4$ nm, $V=19$ nm³) se comporte donc comme une véritable cage protéique en protégeant le chromophore (qui en occupe le centre) des interactions avec l'environnement et en rigidifiant sa structure grâce à des liaisons hydrogènes et covalentes. C'est donc la présence de cette cage qui permet à la protéine de fluorescer (rendement quantique de 0.8 [War97]). Il a d'ailleurs été montré qu'en l'absence

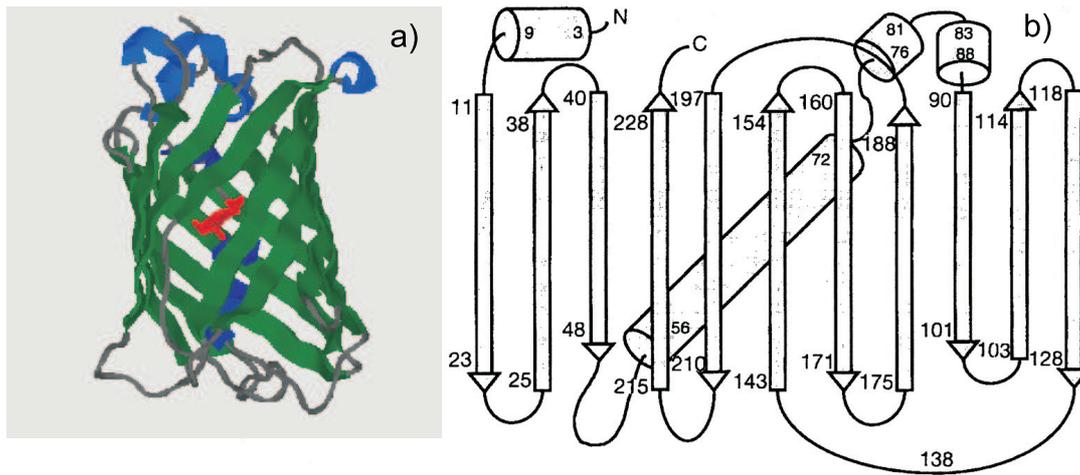


FIG. 1.4 – Structure tertiaire de la GFP naturelle résolue indépendamment par Ormö et al. et Yang et al. [OCK⁺96, YMP96] (reproduit avec la permission des auteurs de la référence [OCK⁺96]).

de cage protéique, le rendement quantique du chromophore tombe à zéro à cause d'une photoisomérisation rapide dans l'état excité [WCHC80, NIH⁺96]. La présence de la cage explique aussi pourquoi la protéine continue à fluorescer dans des plages de pH allant de 5 à 12, dans une solution d'urée de 8 M et pour des températures allant jusqu'à 65°C. En dehors de ces plages, le feuillet β est déplié et le chromophore ne fluoresce plus. On dit alors que la protéine est dénaturée. L'étude de diffraction de rayons X a de plus montré la présence de 4 molécules d'eau à l'intérieur de la cage et a permis de conforter le modèle qui concerne la formation du chromophore ; à savoir, l'absence de cofacteurs externes lors de cette formation. Remarquons finalement, que dans le cristal, la protéine naturelle est présente sous forme de dimères [Phi97]).

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à la dynamique des états excités de la GFP naturelle (GFPwt) et du mutant uv (GFPuv) [DGS⁺02] de cette protéine. Ce mutant a été obtenu en 1995 [CWTS95] par des cycles de mutagenèse aléatoire sur la protéine naturelle; il comprend 6 mutations (trois silencieuses A38A-L138L-T226T et trois actives F100S-M154T- V164A) qui n'affectent pas la structure chimique du chromophore mais modifient son environnement. L'utilisation de ce mutant dans des organismes vivants conduit à une fluorescence 18X supérieure à celle obtenue avec la protéine naturelle. Bien que les niveaux d'expression dans les organismes vivants de la GFPwt et de la GFPuv

soient comparables (75 %), les trois mutations actives de la GFPuv impliquent le remplacement de résidus hydrophobes par des résidus plus hydrophiles. En effet, dans le cas de la méduse, nous avons vu que la GFPwt est liée par l'intermédiaire de résidus hydrophobes à l'aequorine. En l'absence de cette dernière, la présence de résidus hydrophobes peut conduire à l'aggrégation de la protéine, empêchant ainsi l'activation autocatalytique du chromophore [CWTS95]. C'est ce qui est d'ailleurs observé lors de la préparation d'une solution de GFPwt où une partie des protéines produites est présente sous la forme de corps d'inclusion peu ou pas fluorescents (aggrégats de GFPwt au seins de l'organisme). Le remplacement de ces trois résidus (F100S-M154T- V164A) est donc très probablement à l'origine de l'augmentation de la fluorescence des organismes transfectés avec la GFPuv à cause de l'augmentation de la solubilité de la protéine. La structure tridimensionnelle de la GFPuv (cycle3) a été obtenue expérimentalement par Battistutta et al. [BNZ00]. Cette étude montre que la GFPuv est présente sous la forme de dimères dans le cristal et que la structure tri-dimensionnelle de la protéine est identique à celle de la GFPwt. De plus, ce travail confirme la supposition faite par Crameri et al. selon laquelle les mutations de la GFPuv favorisent la solubilité de la protéine conduisant ainsi à une fluorescence accrue dans les organismes vivants. En effet, plusieurs des acides aminés mutés sont en contact direct avec le solvant, on peut donc penser que ces sites hydrophobes servent de point d'ancrage lors de la formation des agrégats dans le cas de la protéine naturelle.

1.1.2 Photophysique de la protéine fluorescente verte

La connaissance de la séquence ADN de la GFP a permis la création de nombreux mutants aux propriétés spectrales variées (diminution du nombre de bandes d'absorption, déplacement des bandes d'absorption et d'émission ...). Dans cette partie, nous nous limiterons donc à la description des propriétés spectrales des deux protéines (GFPwt et GFPuv) que nous avons étudiées et qui appartiennent à la même classe (chromophore identique) [Tsi98]. Les propriétés spectrales des autres mutants seront évoquées dans la partie concernant les applications de la GFP.

Les spectres d'absorbance de la GFPwt et de la GFPuv présentent deux bandes respectivement centrées à 400 ($\epsilon=27000 M^{-1}cm^{-1}$ pour la GFPwt et $30000 M^{-1}cm^{-1}$ pour

la GFPuv) et 480 nm ($\epsilon=12000 M^{-1}cm^{-1}$ pour la GFPwt et $7000 M^{-1}cm^{-1}$ pour la GFPuv) (fig 1.5) [Tsi98]. Lorsque les protéines sont excitées dans la première bande d'ab-

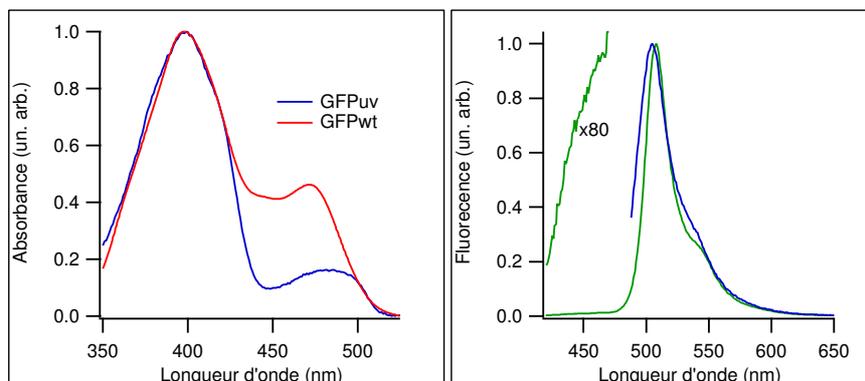


FIG. 1.5 – A gauche, spectres d'absorbance de la GFPwt (rouge, $20 \mu M$) et de la GFPuv (bleue, $60 \mu M$) à pH neutre. L'absorbance de à 400 nm a été normalisée à un pour comparer le rapport entre les deux bandes d'absorption. A droite, spectres d'émission de la GFPwt et de la GFPuv lorsque les protéines sont excitées à 400 nm (verte) et 480 nm (bleue). Les maxima d'émission sont respectivement centrés à 508 et 505 nm.

sorption à 400 nm, cela conduit à une bande d'émission de fluorescence piquée à 508 nm dans laquelle on peut distinguer une réplique vibronique et une faible bande d'émission centrée à 460 nm. En excitant la protéine à 480 nm, on obtient une bande de fluorescence centrée autour de 505 nm qui présente un épaulement moins prononcé. Le fait que le maximum et la forme du spectre d'émission dépendent de la longueur d'onde d'excitation montre que les deux bandes d'absorption sont associées à deux espèces chimiques différentes. Deux études [WCHC80, WPR⁺82], sur la dépendance du spectre d'absorption de la GFPwt en fonction du pH, ont montré que le rapport d'absorbance entre les deux bandes est modifié par ce paramètre. A pH basique, l'amplitude du pic à 480 nm croît alors que celle du pic à 400 nm décroît et inversement pour un pH acide. Cela suggère donc un équilibre thermodynamique entre une forme neutre (ou protonée) et une forme anionique (ou déprotonée) du chromophore (fig. 1.6). Dans cette hypothèse, la bande d'absorption à 400 nm est associée à la forme neutre du chromophore et celle à 480 nm est associée à la forme anionique du chromophore. Si l'on observe le spectre d'absorbance des deux protéines, on peut remarquer que le rapport d'absorbance entre la forme neutre et la forme anionique n'est pas le même. En multipliant le rapport d'absorbance entre les

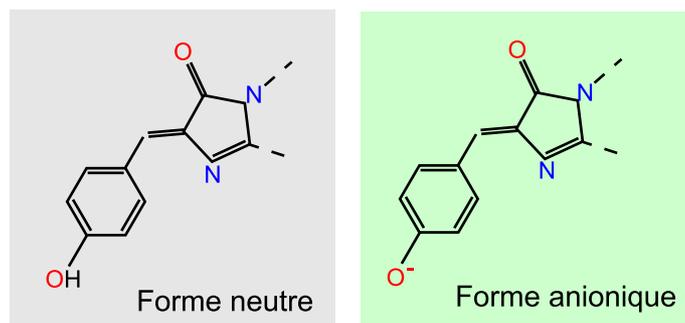


FIG. 1.6 – *Forme neutre et anionique du chromophore de la GFPwt et de la GFPuv associées respectivement aux bandes d'absorption à 400 et 480 nm.*

formes neutre et anionique par le rapport entre les coefficients d'extinction pour chaque protéine, on obtient un rapport de 6/1 dans le cas de la GFPwt alors qu'il est de 20/1 dans le cas de la GFPuv. Autrement dit, les mutations de la GFPuv, qui n'affectent pas la structure chimique du chromophore, semblent, par l'intermédiaire des modifications de l'environnement proche de celui-ci, affecter l'équilibre entre la forme neutre et la forme anionique. Les autres paramètres susceptibles de modifier le rapport entre la forme neutre et anionique sont :

- la température, qui entraîne, en augmentant, un accroissement de la bande associée à la forme anionique [WPR⁺82].
- la concentration. La forme neutre se trouve favorisée dans les échantillons très concentrés [WJS⁺03].
- la lumière, qui peut induire, plus ou moins rapidement selon son intensité, une photoconversion entre les deux espèces [WPR⁺82].

Nous allons maintenant nous intéresser aux différentes études qui ont permis d'élucider le mécanisme d'émission de fluorescence verte dans le cas de la protéine naturelle. Il s'agit presque uniquement d'expériences résolues en temps. Mais avant de commencer, il faut savoir à quelles dynamiques on s'intéresse car dans le cas de la GFP, plusieurs échelles de temps coexistent :

- minutes-heures, qui est l'échelle de temps caractéristique pour le retour à l'équilibre après photoconversion.
- secondes, qui est associée au mécanisme de conversion rapide entre un état fluo-

rescent et un état noir ("blinking" en anglais) que l'on peut observer dans des expériences sur des molécules uniques [DCTM97].

- millisecondes ; temps caractéristique associé à l'échange de proton entre l'intérieur et l'extérieur de la cage protéique [WTR99].
- nanosecondes, qui est le temps caractéristique de la durée de vie radiative de l'état responsable de la fluorescence ($\simeq 3.3 \text{ ns}$) [SSSV99].
- picosecondes, qui est la gamme de temps à laquelle nous nous sommes intéressés dans ce travail et c'est aussi celle qui est associée au mécanisme conduisant à l'émission de fluorescence verte à 508 nm [CKBB96].

La première expérience résolue en temps qui a proposé un mécanisme d'émission pour la GFP date de 1996 et a été réalisée par Chatteraj et al. [CKBB96]. Ce travail a consisté en l'étude de la dynamique des états excités de la protéine naturelle en utilisant la technique de fluorescence résolue en temps (conversion des photons de fluorescence dans un cristal non-linéaire) sur des échantillons de GFPwt et GFPwt deutérés (GFPwt-D), à température ambiante et à 77 K. La source utilisée est un oscillateur titane:saphir ayant un taux de répétition de 82 MHz. La résolution temporelle de l'expérience est estimée à 160 fs. L'expérience a été réalisée en excitant la protéine à 400 et 480 nm et en détectant la fluorescence à 460 et 508 nm. Les auteurs reportent les observations suivantes :

- en excitant à 400 nm et en détectant à 460 nm, ils remarquent qu'à température ambiante pour la GFPwt et la GFPwt-D, l'émission apparaît de façon instantanée (non-résolue). Puis cette émission décroît de façon bi-exponentielle avec un fort ralentissement dans le cas de la GFPwt-D (3.6 et 12 ps versus 22 et 116 ps).
- toujours en excitant à 400 nm, mais en détectant à 508 nm, ils observent que la dynamique d'émission de la fluorescence est plus riche. Elle se décompose en deux étapes : une montée non-résolue (environ 1/3 du maximum du signal) suivie d'une augmentation du signal selon une loi bi-exponentielle (2.2 et 8.1 ps pour la GFPwt versus 8.2 et 46 ps pour la GFPwt-D).
- en excitant à 480 nm et en détectant à 508 nm, le signal de fluorescence apparaît de façon instantanée puis reste constant durant les 160 ps de la fenêtre d'observation.
- en excitant à 400 nm et en détectant à 460 nm, ils observent à 85 K dans le cas de

la GFPwt une montée non-résolue de la fluorescence suivie d'une augmentation du signal sur une échelle de temps de l'ordre de la dizaine de picosecondes.

- finalement ils remarquent, sur le spectre d'absorbance, une photoconversion entre la forme neutre et la forme anionique du chromophore induite par l'excitation à 400 nm (temps caractéristique de quelques heures). Cette photoconversion est réversible sur une échelle de temps de l'ordre de quelques jours. D'autre part, si on superpose les différents spectres d'absorption des échantillons photoconvertis, on constate l'existence d'un point isobestique qui est la claire signature d'un mécanisme de conversion entre deux espèces chimiques.

Au vu de ces résultats, une interprétation possible du mécanisme d'émission de la GFPwt pourrait être une simple conversion de la forme neutre vers la forme anionique via un transfert de proton dans l'état excité (Excited State Proton Transfer ESPT). Dans cette hypothèse, la bande d'émission centrée à 460 nm serait associée à la forme neutre et celle centrée à 508 nm à la forme anionique. D'autre part, les constantes de temps associées à la décroissance de la fluorescence à 460 nm et à l'augmentation de l'émission à 508 nm sont compatibles avec un mécanisme de conversion entre les deux formes via un transfert de proton dans l'état excité. De plus, ce modèle est conforté par le ralentissement observé dans le cas de la GFPwt-D. Cependant, les spectres d'absorbance montrent que la photoconversion entre la forme neutre et la forme anionique, qui a lieu sur des échelles de temps de l'ordre de l'heure, n'est pas très efficace et que le retour vers la forme neutre peut prendre plusieurs dizaines d'heures. Or, dans le modèle précédent, la constante de temps associée à la décroissance de l'émission à 460 nm ($\simeq 3$ ps), indique que la conversion de la forme neutre vers la forme anionique doit être très efficace. Pour remédier à cette incohérence, les auteurs proposent l'existence d'une forme intermédiaire qui correspondrait à une forme anionique non-relaxée du chromophore. Autrement dit, le mécanisme d'émission de fluorescence verte est expliqué par un transfert de proton dans l'état excité entre la forme neutre et une forme anionique non-relaxée du chromophore. Cette forme anionique non-relaxée a une structure électronique semblable à la forme anionique relaxée mais son environnement est plus proche de celui de la forme neutre. Ce modèle permet d'expliquer, en plus de la dynamique d'émission de la protéine, la différence observée dans

les spectres d'émission lorsque la protéine est excitée à 400 et 480 nm. En effet, dans le cas d'une simple conversion entre la forme neutre et anionique, ces deux spectres doivent être strictement identiques. Finalement, la montée non-résolue à 508 nm est associée à la fraction de forme anionique relaxée qui est excitée lors de l'absorption d'un photon à 400 nm. L'expérience effectuée à 85 K (pas de diminution de l'émission à 460 nm) montre que la conversion de la forme neutre vers la forme anionique non-relaxée implique l'existence d'une barrière entre ces deux états. Pour expliquer la dynamique d'émission de la GFPwt, les auteurs proposent donc le mécanisme schématisé sur la figure 1.7.

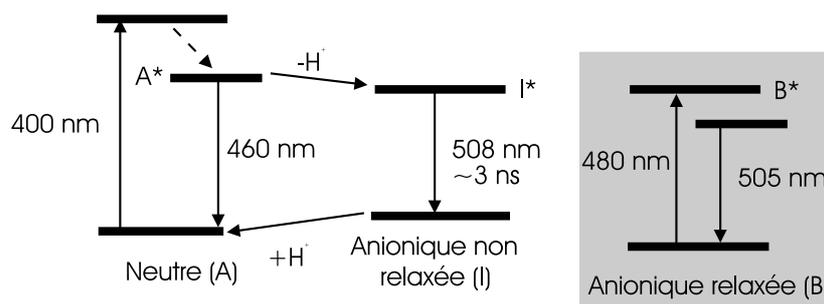


FIG. 1.7 – Mécanisme d'émission de la GFPwt proposé par Chatteraj et al. [CKBB96]. Lorsque la protéine absorbe un photon à 400 nm, cela conduit à l'émission de fluorescence verte à 508 nm via un transfert de proton dans l'état excité entre la forme neutre et la forme anionique non-relaxée du chromophore.

Dans deux autres études [LKH⁺96, KWR⁺00], la dynamique d'émission de la GFP naturelle et de quelques mutants a été abordée par la technique de fluorescence résolue spectralement et en temps (caméra à balayage de fente, résolution 6 ps) et par spectroscopie pompe-sonde (transmission différentielle avec continuum généré dans l'éthanol). Les principaux résultats pour la GFP naturelle confirment les résultats de la première expérience (dynamique picoseconde de la construction de la fluorescence à 508 nm, ralentissement de cette dynamique par substitution des protons par des deutérons). Grâce à une plus grande excursion dans le domaine temporel (quelques nanosecondes), les auteurs ont pu mettre en évidence l'existence d'une troisième constante de temps dans la décroissance de la fluorescence à 460 nm. Cette constante n'est pas sensible à la substitution de l'hydrogène par le deutérium. Pour ce qui concerne les expériences de transmission différentielle, une région d'absorption induite qui démarre à 630 nm avec un maximum

à 700 nm a été identifiée. La région de gain a été sondée seulement autour de 580 nm (aile rouge du spectre de fluorescence). Dans cette région spectrale la dynamique du gain présente une montée rapide (non résolue) suivie d'une montée plus lente (estimée à 5 ps). L'absorption induite, en revanche, présente une montée rapide non résolue suivie d'une décroissance multi-exponentielle avec des temps caractéristiques compris entre 5 et 60 ps. Des études supplémentaires sur des mutants ont montré que, dans certains cas, un changement de la coque protéique peut affecter le rendement de fluorescence via un "quenching" rapide du gain lié à la torsion du chromophore (conversion interne).

C'est une étude à basse température qui a permis de caractériser spectralement la forme anionique non-relaxée du chromophore [CLS⁺99]. Dans cette étude, les auteurs ont pu identifier, sur des échantillons de GFPwt à 1.6 K (pH=7, 50 % de glycérol), les niveaux vibroniques à partir des spectres d'absorption et d'émission et les transitions 0-0 par la technique de "hole-burning". Cette technique permet, grâce aux relaxations vibrationnelles rapides, de caractériser spectralement les seules transitions qui peuvent être saturées en régime statique. En réalisant des spectres d'excitation à 1.6 K sur un échantillon frais et excité à 400 nm, les auteurs ont également démontré l'existence d'une forme spectrale, centrée autour de 490 nm, qui apparaît après excitation de l'échantillon à 400 nm. Lorsque cette forme spectrale est excitée, le spectre d'émission se superpose parfaitement à celui obtenu en excitant la forme neutre à 400 nm. Au vu des différents modèles proposés, les auteurs attribuent cette composante spectrale du spectre d'excitation à l'espèce anionique non-relaxée du chromophore. Il est intéressant de remarquer que nous avons pu mettre en évidence sur la protéine mutante GFPuv l'équivalence entre les spectres d'émissions excités à 400 nm et à 495 nm prévue par ce modèle.

Plus récemment, Winkler et al. [WIS⁺02] ont réalisé une expérience pompe-sonde résolue spectralement et temporellement sur des échantillons de GFPwt. Dans cette expérience, la forme neutre du chromophore est excitée avec des impulsions pompes centrées à 400 nm d'une durée de 40 fs et la dynamique des états excités du système est caractérisée en mesurant la transmission différentielle d'un faisceau sonde retardé. Ce faisceau sonde correspond à un continuum spectral qui s'étend de 470 à 700 nm, le taux de répétition est de 250 kHz et la mesure se fait dans une cellule tournante (5000 trs/min). Les résultats de cette étude sont très similaires à ceux obtenus par Chatteraj et al. La dynamique

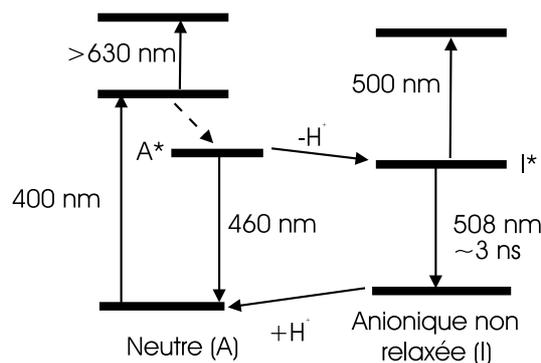


FIG. 1.8 – Schéma de niveaux proposé par Winkler et al. pour décrire la dynamique des états excités de la GFPwt [WLS⁺02].

de montée du gain à 508 nm se décompose en la somme d'une composante non-résolue, malgré les 40 fs de résolution, et de deux exponentielles (2 et 8 ps). La décroissance du gain liée à la bande d'émission de la forme neutre (460 nm) est compatible avec la montée du gain à 508 nm (forme anionique non relaxée). Un point isobestique dans les spectres de transmission différentielle a été identifié pour $\lambda = 496 \text{ nm}$ ainsi qu'une absorption induite instantanée (non-résolue transition $S_1 \rightarrow S_n$), pour des longueurs d'onde supérieures à 630 nm. Finalement, pour des retards pompe-sonde supérieurs à 10 ps, il apparaît également une absorption induite autour de 500 nm. Afin d'expliquer leurs résultats, les auteurs proposent le diagramme de niveaux représenté en figure 1.8. Dans ce modèle, la composante non-résolue dans le gain à 508 nm est attribuée à une excitation directe de la forme anionique non-relaxée à partir de la forme neutre (transition non-verticale [SD99]) alors que Chattoraj et al. avaient attribué cette composante rapide à la fraction de forme anionique relaxée qui peut être excitée lors de l'absorption d'un photon à 400 nm. L'argument pour cette attribution vient d'une expérience réalisée sur un échantillon photoconverti qui ne présente qu'une faible augmentation ($\simeq 10 \%$) de la composante "instantanée" bien que l'absorption à 480 nm soit multipliée par un facteur 5. Pour expliquer la dynamique multi-exponentielle des différents signaux, les auteurs mettent au point un modèle qui implique 3 sous-populations pour la forme neutre excitée. En effet, lors d'une excitation à 400 nm, Creemers et al. [CLS⁺99] ont montré que l'on déposait dans le système un excès d'énergie de l'ordre de 2000 cm^{-1} par rapport à la transition 0-0. Les trois sous-populations correspondraient donc à une population chaude

vibrationnellement, une population partiellement relaxée et une population complètement équilibrée. Dans ce modèle, un transfert de proton entre les deux premières populations et la forme anionique non-relaxée a lieu avec un taux de transfert qui dépend de l'excès d'énergie. Quant à la troisième population, elle est introduite pour expliquer la présence d'une troisième constante de temps qui a été mise en évidence par Lossau et al. [LKH⁺96] dans la dynamique de la fluorescence associée à la forme neutre. Cette constante de temps ($\simeq 150$ ps) est attribuée au mécanisme de conversion interne du chromophore (mouvement de torsion) et est indépendante de l'excès d'énergie vibrationnelle. Il ne reste plus maintenant qu'à attribuer une forme spectrale à l'état excité de la forme neutre. Pour cela, les auteurs utilisent l'émission de fluorescence d'un mutant de la GFPwt dans lequel le remplacement de la tyrosine 66 par une histidine inhiberait le transfert de proton; puis, ils translatent le spectre d'émission de ce mutant de 1000 cm^{-1} vers le rouge pour qu'il se superpose à l'aile bleue de la fluorescence de la GFPwt. L'utilisation de ce spectre (qui s'étend de 425 à 600 nm) permettrait en plus d'expliquer la composante non-résolue (instantanée) dans les spectres de transmission différentielle.

Parallèlement à ces études dynamiques, différents travaux de diffraction de rayons X sur des cristaux de GFPwt [YMP96, BSK⁺97] ont permis de mettre en évidence que l'équilibre entre la forme neutre et anionique relaxée est gouverné par le réseau de liaisons hydrogènes (via les molécules d'eau), le glutamate en position 222 (accepteur de proton) et la thréonine en position 203 (changement de conformation lors du passage de la forme neutre vers la forme anionique) qui entourent le chromophore. L'étude faite par Brejc et al. [BSK⁺97] sur des monomères de GFPwt a permis de proposer un modèle structural (comparaison de la GFPwt et du mutant S65T, fig. 1.9) qui permet d'expliquer les conversions entre les différentes formes du chromophore ainsi que les réarrangements structuraux qui leur sont associés. Cependant, en employant la technique de spectroscopie infra-rouge par transformée de Fourier (FITR) qui permet, contrairement à la diffraction de rayon X, d'être sensible à l'état de protonation, Thor et al. [vTPNR⁺98] ont montré, dans le cas de la GFPuv, que l'état de protonation du glutamate en position 222 n'était pas modifié lors du passage de la forme neutre vers la forme anionique. Cette étude remet donc en cause le rôle d'accepteur de proton de ce résidu. De plus, une étude systématique sur des mutants de la GFPwt, dans lesquels la thréonine en position 203 est remplacée

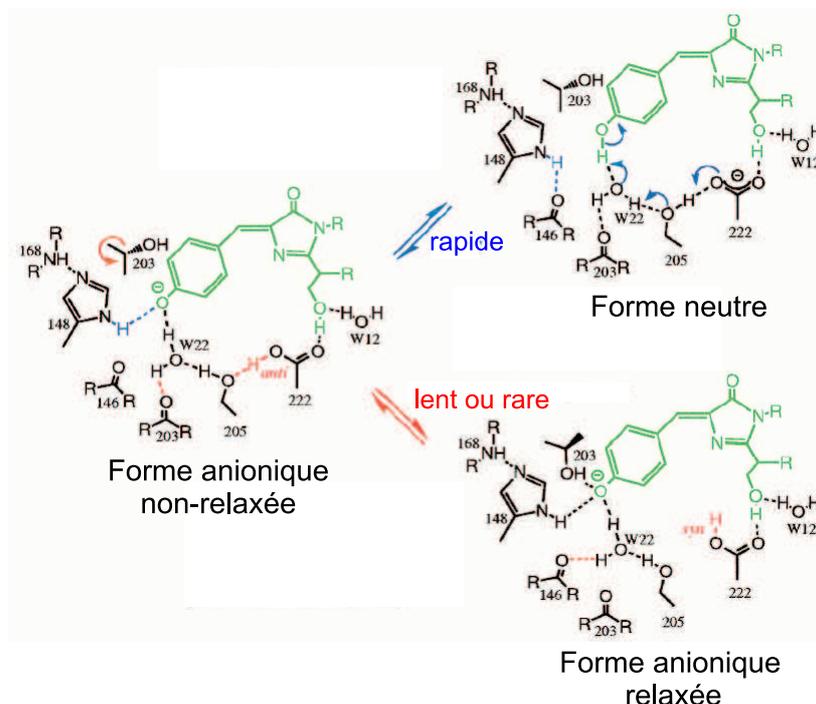


FIG. 1.9 – Mécanisme proposé par Brejc et al. pour expliquer le mécanisme de photoconversion rapide entre les différentes formes du chromophore, en tenant compte des données structurales [BSK⁺97] et spectroscopiques [CKBB96] (reproduit avec la permission des auteurs de la référence [BSK⁺97]).

par d'autres résidus, semble exclure l'isomérisation de la thréonine comme mécanisme nécessaire au transfert de proton [KKL⁺98]. La question de l'interaction entre le chromophore et le reste de la cage protéique reste donc ouverte. Dans un travail de synthèse [Phi97] sur les travaux liés à la structure de la GFPwt et certains mutants, Phillips passe en revue les différentes mutations qui permettent de favoriser l'une ou l'autre forme du chromophore et évoque comment contrôler la dimérisation de la protéine (essentiellement liée à la concentration de l'échantillon, constante de dissociation $K_D = 100 \mu M$). On peut aussi citer un mécanisme alternatif à celui proposé par Chatteraj et al. [CKBB96]. Dans ce modèle [WHML99], les auteurs introduisent deux espèces correspondant à la forme zwitterionique et cationique du chromophore et tiennent compte des possibilités de désexcitation non-radiative pour les différentes formes du chromophore. Ils montrent, dans le cas de la forme zwitterionique, que le mécanisme de désexcitation le plus probable est un mécanisme non-radiatif de conversion interne. Cependant, l'existence de ces deux

nouvelles formes du chromophore n'a jamais pu être mise en évidence expérimentalement. En dernier lieu, une étude de la dynamique de la GFP a été effectuée sur le mutant EGFP (enhanced GFP) [CTP⁺01], qui est très utilisé pour son rendement élevé et la possibilité d'excitation dans le bleu (488 nm). Les auteurs ont effectué une étude par spectroscopie pompe-sonde dégénérée avec des impulsions sub-10fs centrées à 500 nm. Dans cette étude il a été possible d'identifier un mouvement vibrationnel cohérent du chromophore. L'assignation à un mode de déformation dans le plan du chromophore des deux anneaux et du chemin de conjugaison qui les relie a été possible grâce à une simulation numérique. Il est intéressant de remarquer que cette simulation prévoit un pic Raman autour de 3400 cm^{-1} qui correspondrait à la vibration du groupement OH de la tyrosine.

Ces différentes expériences ont donc permis de définir les mécanismes à l'origine des propriétés photophysiques de la protéine fluorescente verte. Il reste cependant des questions ouvertes, notamment sur la dynamique structurale liée au transfert de proton, ainsi que sur la nature chimique des espèces impliquées dans le photoblanchiment. En ce qui concerne les expériences résolues en temps, le modèle faisant intervenir un transfert de proton dans l'état excité, entre la forme neutre et anionique non relaxée, est maintenant bien établi. Toutefois, l'idée selon laquelle la composante non-résolue dans la dynamique de gain à 508 nm est attribuée à l'émission de la forme neutre reste à confirmer. Remarquons finalement qu'à ce jour aucune expérience résolue en temps sur la GFP telle qu'elle est utilisée en imagerie cellulaire (c'est à dire fusionnée à un autre objet), n'a été réalisée. Il est donc tout particulièrement intéressant d'étudier la dynamique des états excités de la GFP dans ces conditions, car on peut espérer trouver, grâce à la sensibilité de la méthode, une signature de la présence de l'objet fusionné à la GFP.

1.1.3 Propriétés optiques du chromophore isolé

Nous allons maintenant nous intéresser à une autre approche souvent utilisée pour comprendre la photophysique de la GFP, qui consiste en l'étude du chromophore isolé. En effet, ce type d'approche permet de différencier, dans la photophysique de la GFP, les propriétés associées à la structure électronique du chromophore de celles qui résultent de l'interaction avec le reste de la protéine. De plus, l'étude du chromophore en solution

permet de comprendre les mécanismes liés à la modification de paramètres comme la viscosité et la polarité. Les études utilisant ce type d'approche peuvent être décomposées en trois classes :

- les études théoriques qui s'intéressent aux propriétés statiques du chromophore.
- les expériences explorant les propriétés optiques linéaires du chromophore.
- les expériences résolues en temps concernant la dynamique du chromophore dans l'état excité.

Parmi les études théoriques, on peut citer les travaux du groupe dirigé par de M. E. Michel-Beyerle [VMBR97, VMBR98a, VMBR98b, VKMBR00] qui cherchent à comprendre via les différents états de protonation du chromophore (neutre, anionique, zwitterionique et cationique) les propriétés d'absorption ainsi que les mécanismes de conversion interne qui sont à l'origine de l'absence de fluorescence du chromophore de la GFP en solution (fig. 1.10). Les calculs de chimie quantique (INDO, ZINDO et NDDO-G) ont permis à ces auteurs d'associer les bandes d'absorption aux différents états de protonation du chromophore et de caractériser les effets solvatochromiques dans l'éthanol. De plus, ces calculs montrent que le mécanisme non-radiatif de conversion interne est plus favorable dans le cas de la forme protonée que dans le cas de la forme anionique. Rappelons que dans le cas des études résolues en temps sur la protéine, la durée de vie de la forme neutre est de quelques picosecondes alors que celle de la forme anionique est de plusieurs nanosecondes. D'autres auteurs ont adopté ce type de démarche et ont proposé un modèle, dérivé du modèle de Chatteraj et al., pour expliquer la photophysique de la GFP. Dans ce modèle [WHML99], la forme zwitterionique est associée à un état noir (à cause de la forte probabilité de rotation dans l'état excité $C_1 - C_2$) et l'isomérisation dans l'état excité n'est possible que dans le cas la forme protonée. Les auteurs semblent exclure l'existence de la forme cationique. D'autres simulations [TN01, HaPJT02, MNO04] basées sur des méthodes de dynamique moléculaire ont permis de mettre en évidence les géométries dans l'état excité des différentes formes du chromophore (neutre, anionique, cationique et zwitterionique) ainsi que des modes de vibrations mis en jeu au cours de cette dynamique. Cependant, d'autres études [vTPNR⁺98, BHWT00, SJE⁺01] s'intéressant aux propriétés vibrationnelles du chromophore et de la protéine, ont démontré, contrairement à ce qui à

été proposé dans les modèles théoriques, que ce sont bien les formes neutre et anionique qui sont à l'origine des propriétés photophysiques de la GFP.

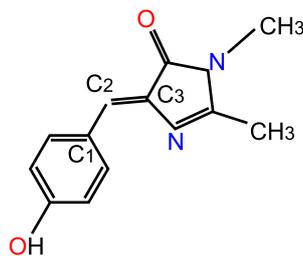


FIG. 1.10 – Structure de la molécule HBDI (*4-hydroxybenzylidene-2,3-dimethyl-imidazolinone*) utilisée pour modéliser le chromophore de la protéine GFP.

Concernant les propriétés optiques linéaires du chromophore de la GFP, on peut distinguer les études réalisées en jet moléculaire [NLA⁺01, ALN⁺02] (chromophore en phase gazeuse) et à basse température [SS03]. L'étude du spectre d'absorption du chromophore de la GFP en phase gazeuse montre, selon l'état de protonation (neutre, anionique), que les bandes d'absorption coïncident parfaitement avec celles de la protéine (neutre 400 nm et anionique 480 nm). Cela démontre, d'après les auteurs, que les propriétés d'absorption dépendent de la structure électronique, mais aussi l'importance du rôle joué par l'interaction avec la cage protéique, qui protège le chromophore des interactions avec l'environnement, sans toutefois induire des modifications électroniques via les interactions avec les acides-aminés. En effet, les études réalisées dans plusieurs solvants (eau, alcool) montrent des spectres très différents de ceux de la protéine. Dans une étude [SS03] qui concerne les propriétés optiques linéaires du chromophore (HBDI 4'-hydroxybenzylidene-2,3-dimethyl-imidazolinone) dans des verres de solvant (méthanol, éthanol et butanol), les auteurs ont pu mettre en évidence l'existence des trois formes du chromophore (neutre, anionique relaxée et anionique non-relaxée) ainsi que le rôle prépondérant joué par les liaisons hydrogènes dans le mécanisme de photoconversion entre les différentes espèces. Finalement, la caractérisation et l'assignement des modes normaux du chromophore (HBDI) [ESPR01] a permis de montrer que l'évolution structurelle dans l'état excité est dominée par le stretching de la liaison C=N de l'imidazolinone dans le plan du chromophore et par le stretching de la liaison C₂=C₃ qui lie les deux anneaux. Cette étude a aussi montré la faible contribution, dans la dynamique structurelle, du stretching de la liaison O-H de

la tyrosine. Les auteurs soulignent cependant le rôle clé joué par le reste de la protéine dans le mécanisme du transfert de proton.

Les études résolues en temps ont principalement été menées sur le chromophore synthétique HBDI (fig. 1.10) dans différents solvants, à différents pH et à différentes températures (verre de solvant). Les expériences réalisées par le groupe dirigé par S. Meech [WLM01, LWM01, MTWM02, LWM03, MTM04] montrent, à travers des mesures de fluorescence résolue en temps, que la décroissance à partir de l'état excité (forme neutre et anionique du chromophore) se fait avec deux temps caractéristiques de l'ordre de quelques picosecondes ($\tau_{neutre} < \tau_{anionique}$) qui sont indépendants de la viscosité ($0.3 < \eta < 20$ cp) et de la polarité du solvant. Cependant, la dynamique observée présente des différences notables selon que le solvant soit protique ou aprotique. L'apparition de la fluorescence, à partir de l'état excité, est instantanée (non-résolue temporellement). La combinaison des mesures d'anisotropie et de fluorescence résolue en temps montre que la dynamique du système fait intervenir une seule espèce électronique avec un état fondamental, un état excité et un état métastable dans le fondamental. Cet état métastable joue alors le rôle de goulot d'étranglement et a été mis en évidence dans une configuration pompe-sonde dégénérée [LWM01]. Au vu de ces différentes expériences, les auteurs proposent un mécanisme de relaxation non-radiatif du type "Hula-Twist" (rotation simultanée autour des liaisons $C_1 - C_2 = C_3$ du chromophore). En effet, la faible variation des temps caractéristiques de relaxation en fonction de la viscosité suggère une conversion interne impliquant un déplacement de volume minimal. Le modèle proposé implique deux états excités avec deux coordonnées de réaction (stretching couplé à la torsion du chromophore) [MTM04]. Dans ce modèle, le couplage entre le mode à haute fréquence (stretching $\simeq 1500$ cm^{-1}) et des modes de torsion à basses fréquences (typiquement < 100 cm^{-1}) est nécessaire au mécanisme de conversion interne qui se fait via le "Hula-Twist". C'est d'ailleurs de cette manière que les auteurs expliquent l'absence de conversion interne dans la protéine naturelle, à cause de l'absence des modes à basses fréquences et de la présence d'un réseau de liaisons hydrogènes. Dans une étude utilisant la technique de fluorescence résolue en temps sur un analogue du chromophore HBDI, Kummer et al. [KKN⁺00] montrent une forte dépendance de la dynamique d'émission de fluorescence avec la viscosité ($1.7 < \eta < 9900$ cp) dans différents solvants et à différentes températures. Cette étude montre, contrairement

aux travaux de Meech et al., que dans le cas de la forme neutre de cet analogue, la conversion interne se fait via l'isomérisation autour de la liaison simple $C_1 - C_2$. Pour la forme anionique, la rotation la plus probable se fait autour de la liaison double $C_2 = C_3$. Finalement, dans une expérience pompe-sonde et pompe-déplétion-sonde (pump-dump-probe en anglais) (125 fs), Vengris et al. [VvSh⁺04] montrent que la dynamique des états excités et fondamentaux du chromophore HBDI présente les propriétés suivantes :

- les signaux d'absorption différentielle présentent différentes signatures : blanchiment d'absorption sur la transition $S_0 \rightarrow S_1$, absorption induite et émission stimulée.
- une étude en fonction de l'intensité de pompe permet de mettre en évidence la présence d'un électron solvaté (dû à l'absorption de deux photons pompe par HBDI) et du radical qui lui est associé. Ces deux entités donnent lieu à deux absorptions induites centrées respectivement à 650 et 420 nm.
- après avoir identifié les deux précédentes contributions, les auteurs montrent, en utilisant la technique de pompe-déplétion-sonde qui permet de caractériser la dynamique de l'état fondamental, l'existence d'espèces transitoires.
- un modèle à trois états excités, trois états de base et une photoionisation permettrait de décrire les résultats expérimentaux et d'attribuer une forme spectrale à chaque état.
- la dynamique de la forme neutre est plus rapide que celle associée à la forme anionique.
- pas d'effets de la viscosité sur la dynamique du système.

Comme dans le cas des études réalisées par le groupe de S. Meech, le mécanisme invoqué par Vengris et al., pour expliquer la conversion interne et au faible rendement quantique de fluorescence du chromophore HBDI à température ambiante, fait intervenir la rotation simultanée autour de deux liaisons du chromophore ($C_1 - C_2 = C_3$, "Hula-Twist").

En résumé, dans le cas du chromophore HBDI, le mécanisme de conversion interne le plus probable est celui qui fait intervenir la rotation simultanée autour de deux liaisons du chromophore ($C_1 - C_2 = C_3$, "Hula-Twist"). Ces différentes études semblent donc mettre en avant l'importance de la structure électronique du chromophore dans la dynamique d'émission, sans toutefois proposer un mécanisme d'interaction entre le chromophore et

le reste de la protéine (à cause de certains résultats contradictoires). La combinaison de ce type d'approche avec les études de dynamiques structurales devrait permettre, dans le futur, de répondre à ces différentes questions.

1.1.4 Exemples d'applications de la protéine fluorescente verte

Le point crucial, qui rend la GFP intéressante pour l'imagerie biologique, est relié à la démonstration faite par Chalfie et al. en 1994 [CTE⁺94]. Dans ce travail, les auteurs ont montré que l'expression du gène codant pour la GFP dans un organisme hôte conduit à l'apparition de la fluorescence verte dans cet organisme (fig. 1.11). Cela implique donc que la séquence codant pour la protéine contient toute l'information nécessaire à la formation du chromophore et qu'aucun cofacteur externe n'est nécessaire. Une façon très répandue d'utiliser la GFP consiste à la faire exprimer avec une autre protéine d'intérêt sous le contrôle d'un même promoteur². En mesurant la fluorescence de la GFP on accède alors au niveau d'expression de ce gène [SWR01]. L'une des premières voies explorées par les

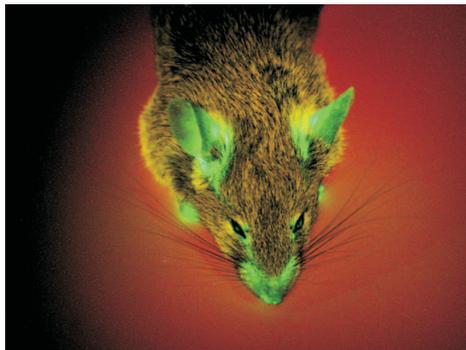


FIG. 1.11 – *Souris transgénique dans laquelle est exprimé le gène codant pour la GFP* (<http://www.tsienlab.ucsd.edu/Images.htm>[©]).

biochimistes, pour rendre plus flexible l'utilisation de la GFP, a consisté en la synthèse de mutants de la protéine naturelle qui présentent des propriétés spectrales différentes de la GFPwt. Cette technique d'ingénierie moléculaire a permis de décaler les longueurs d'onde d'absorption et d'émission vers la partie rouge du spectre visible (fig. 1.12). Cela permet de s'affranchir plus facilement de l'autofluorescence qui provient de l'absorption des acides-

2. Séquence d'ADN nécessaire à l'initiation de la transcription et le plus souvent située en amont de la partie transcrite des gènes.

aminés (partie UV du spectre). D'autre part, en décalant les spectres d'absorption vers le rouge, l'excitation de ces mutants devient possible avec des lasers tel que les lasers à argon qui sont très utilisés en microscopie. Parmi les différents mutants de la GFP, on peut citer le cas du mutant obtenu par Lippincott-Schwartz et al. : Photo-Activable GFP (PA-GFP) [PLS02]. Ce mutant a la particularité de présenter un fluorescence qui est multipliée par 100 lorsque la protéine est excitée à 488 nm à condition d'avoir préalablement irradié la protéine à 413 nm. En activant alors une zone déterminée de l'échantillon, on peut par exemple suivre la diffusion des PA-GFP en dehors de cette zone. Ce mutant offre donc une alternative à la technique de retour de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescence Recovery After Photobleaching FRAP).

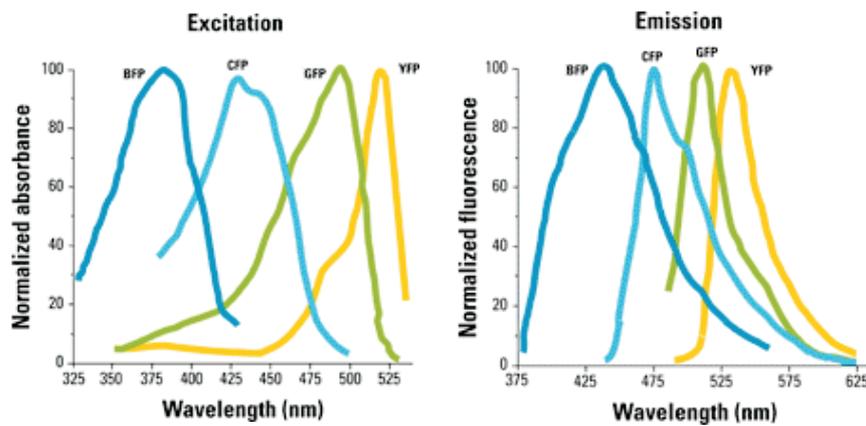


FIG. 1.12 – Spectres d'absorption et d'émission de différents mutants de la GFP. De la gauche vers la droite : BlueFP, CyanFP, EnhancedFP et YellowFP. Spectre provenant de site web de Clontech[©].

Mais l'application la plus courante en biologie cellulaire est liée à la possibilité de réaliser des fusions génétiques de la GFP avec une autre protéine (voir section 1.2). Dans ce cas, la fusion exprimée dans un organisme peut à la fois être fluorescente et conserver la fonction biologique de la protéine attachée à la GFP. Par exemple, dans le cas d'une fusion de la GFP avec un fragment d'anticorps, Hink et al. [HGB⁺00] ont montré, par des mesures d'affinité et d'anisotropie de fluorescence, que la fonction biologique de l'anticorps n'est pas altérée par la présence de la GFP, grâce au lien flexible (composé de trois alanines) qui lie les deux entités. L'avantage de cette méthode réside bien sûr dans le marquage un à un qui rend possible la visualisation de la dynamique cellulaire,

l'identification des sites d'interactions de l'objet attaché à la GFP ainsi que la détermination de sa concentration [LSSK01]. Dans son article de revue [Tsi98], R. Y. Tsien dresse



FIG. 1.13 – Représentation tri-dimensionnelle d'une fusion composée de la GFP (vert) liée (partie jaune) à un fragment d'anticorps (bleu-jaune) extrait de [HGB⁺00] (reproduit avec la permission des auteurs).

la liste impressionnante des organelles (membrane plasmique, noyau, mitochondries ...) dans lesquelles la présence de la GFP a été mise en évidence. Ce qui montre une fois de plus le potentiel d'application de cette protéine fluorescente. Dans une autre étude, Tsien et al. [BZT99] ont montré qu'il était possible d'insérer, en réalisant des permutations circulaires dans la séquence de la GFP, la séquence d'une autre protéine. De cette manière, les auteurs ont obtenu, en insérant une calmoduline à la place de la tyrosine 145 dans un mutant jaune de la GFP (yellow fluorescent protein YFP), une protéine dont la fluorescence est modulée par la présence d'ion Ca^{2+} dans les cellules de mammifères ($K_d = 7 \mu\text{M}$). Cette technique, ré-utilisée dans un autre mutant de la GFP (enhanced green fluorescent protein EGFP), a permis d'atteindre des niveaux de sensibilité à la concentration en Ca^{2+} plus élevés ($K_d = 235 \text{ nM}$) [NOI01]. L'utilisation de mutants de la GFP comme sondes ioniques peut aussi se généraliser à la détection d'ions métalliques [BZT99]. L'existence de mutants GFP a aussi ouvert la possibilité d'utiliser *in vivo* la technique du transfert résonnant d'énergie entre deux marqueurs (Fluorescent Resonant Energy Transfer FRET). Cette technique, qui a été démontrée avec plusieurs types de marqueurs, consiste en l'utilisation de deux GFP dont le spectre d'absorption de l'une recouvre le spectre d'émission de l'autre. Si les dipôles associés à chaque protéine sont suffisamment proches, alors un transfert d'excitation non-radiatif peut s'établir entre les deux marqueurs. L'efficacité d'un tel processus varie comme $\frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$ où r est la distance

entre les marqueurs et R_0 la distance pour laquelle l'efficacité vaut 50% (distance de Förster de l'ordre de 5 à 10 nm). Prenons par exemple un couple BFP/GFP (Blue Fluorescent

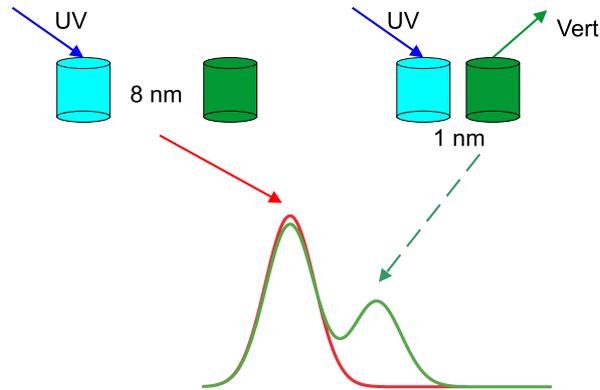


FIG. 1.14 – Illustration du transfert résonnant d'énergie entre deux marqueurs (FRET). On observe une modification du spectre d'émission lorsque la distance entre les deux protéines est inférieure à 8 nm.

Protein, BFP) et utilisons une longueur d'onde d'excitation qui soit en résonance avec la bande d'absorption de la BFP : dans un configuration où les marqueurs sont très éloignés ($r \gg R_0$), on observe uniquement la fluorescence de la BFP (fig. 1.14). Par contre, dans le cas où la distance entre les marqueurs est inférieure à la distance de Förster, on n'observe que l'émission verte provenant de la GFP (fig. 1.14). Tsien et al. ont appliqué cette technique au problème de la sensibilité aux ions Ca^{2+} et ont montré que, lorsque la longueur de la partie liant une BFP et une GFP dépend de la concentration en ions Ca^{2+} , la technique de FRET peut être utilisée comme reporteur de la présence de cet ion [MLH⁺97]. La protéine peut aussi être utilisée comme reporteur de pH *in vivo*. En effet, comme nous l'avons vu dans la section précédente, le spectre d'absorption et d'émission de la GFP dépend du pH du milieu. Cette technique a par exemple permis de caractériser le pH à l'intérieur de mitochondries [TZCH01]. Les mutants GFP qui présentent une sensibilité au pH sont connus sous le nom de pHluorins [MAR98].

Pour terminer, et montrer que la GFP peut trouver des applications dans d'autres domaines que la biologie, on peut citer le travail réalisé par Cinelli et al. [CPF⁺01] sur l'utilisation de la GFP comme élément optiquement contrôlable en bio-électronique. Dans cette étude, les auteurs démontrent qu'une mutation spécifique de la EGFP permet d'ob-

tenir deux états ON/OFF (0 ou 1) et ainsi de créer une mémoire bio-optique. En effet, le passage de l'état fluorescent vers l'état noir est activé par le laser : en excitant le système à 476 nm, le laser induit le passage vers un état noir, mais le retour vers l'état fluorescent est possible en ré-excitant la molécule à 350 nm. En 2002, il a aussi été démontré qu'il est possible d'utiliser la GFP comme milieu de gain dans une microcavité [PKT⁺02]. Cette micro-cavité laser produit de la lumière visible à 509 nm quand elle est pompée par un laser pulsé à 790 nm (absorption à deux photons).

Les domaines d'applications de la GFP restent donc nombreux et variés, et nul doute qu'une compréhension étendue des ses propriétés photophysiques fera encore croître le nombre de ses applications.

1.2 Fusion génétique fragment d'anticorps-GFP : problématique d'un point de vue biologique [Jan01]

Au fil de l'évolution, les vertébrés ont développé un mécanisme de défense très élaboré pour se protéger des attaques d'agents extérieurs (virus, bactéries, protéines étrangères, agents chimiques ...) qui peuvent conduire à l'apparition de maladies et, dans des cas extrêmes, à la mort de l'individu. Ce mécanisme de défense, appelé système immunitaire, permet d'éradiquer les agents pathogènes (antigènes) qui ont envahi l'organisme. Ce processus d'élimination comporte trois étapes essentielles:

- le mécanisme de reconnaissance qui permet de repérer l'antigène.
- le signalement de l'objet étranger aux cellules capables de le détruire.
- et finalement, l'élimination de l'agent pathogène.

La première étape, indispensable à cette élimination, est donc liée à la reconnaissance du non-soi. Dans le système immunitaire, cette fonction est assurée par deux types de cellules : les lymphocytes B et T. Ces lymphocytes sont respectivement associées à la réponse humorale et à la réponse cellulaire du système immunitaire. Dans le premier cas, ce sont des protéines en solution (immunoglobulines) qui induisent la réponse immunitaire. La réponse cellulaire est, quant à elle, assurée par les lymphocytes T (reconnaissance spécifique pour des antigènes protéiques), qui possèdent des récepteurs membranaires ne se dissociant jamais de la cellule. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux

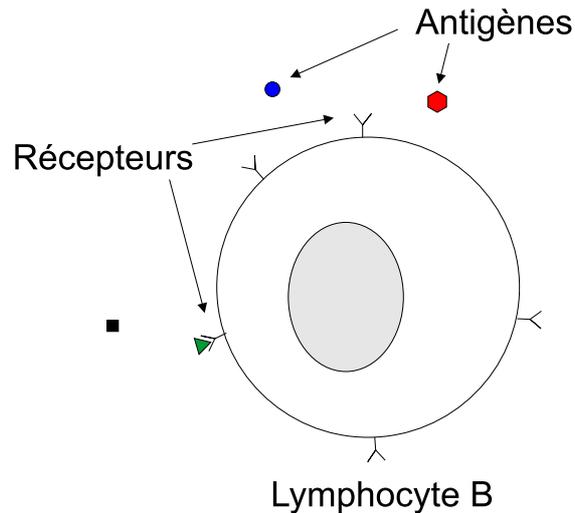


FIG. 1.15 – Schéma d'un lymphocyte B : les récepteurs membranaires sont chargés de l'identification des antigènes présents dans l'organisme [Jan01].

immunoglobulines ou anticorps produits par les lymphocytes B. Dans cette section, nous allons donc nous limiter à une description sommaire du fonctionnement de ces anticorps ce qui nous permettra ensuite de présenter la problématique biologique qui est à l'origine de notre travail de caractérisation biophysique.

La maturation des lymphocytes B se fait dans la moelle osseuse, ces lymphocytes circulent ensuite dans le sang où ils sont chargés d'identifier les agents pathogènes et ce sont des récepteurs disposés à la surface du lymphocyte ($\simeq 10^5$ par lymphocyte B) qui permettent la reconnaissance des antigènes (fig. 1.15). Un lymphocyte n'est capable d'identifier qu'un antigène donné; la zone de l'antigène à laquelle se lie le récepteur (ou l'anticorps) est nommée épitope. Après identification de l'antigène, le mécanisme de production des anticorps s'enclenche via une seconde phase de maturation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques). Cette seconde phase requiert généralement une coopération entre les lymphocytes B et T. Après cette étape de synthèse, l'anticorps (dont la structure est presque identique à celle du récepteur membranaire du lymphocyte B correspondant) est excrété par les cellules qui le produisent et part dans l'organisme à la recherche de l'antigène pour lequel il présente une forte affinité. Un anticorps est très sélectif et ne présente d'affinité que pour un épitope donné. Une fois l'anticorps lié à cet antigène, s'enclenche alors la phase de signalisation

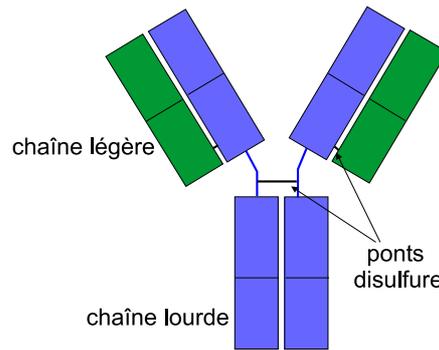


FIG. 1.16 – Structure d'un anticorps : on identifie deux chaînes lourdes (bleu) et deux chaînes légères (vert) liées par des ponts disulfure (noir). Un anticorps possède deux régions capables de reconnaître un antigène [Jan01].

et d'élimination de l'antigène. Un mécanisme de défense efficace implique d'une part une grande diversité des lymphocytes B produits par l'organisme. D'autre part, il est constaté expérimentalement que la réponse à la deuxième rencontre avec un antigène est toujours plus rapide et efficace que la première. Cela signifie donc que le système immunitaire garde mémoire des antigènes rencontrés au cours de l'existence et qu'il fonctionne selon un mode d'apprentissage. Afin de mieux comprendre le mécanisme de diversité qui est absolument primordial dans un mécanisme de défense efficace, nous allons nous intéresser à la structure de l'anticorps et aux mécanismes biologiques qui sont à l'origine de cette diversité. Pour cela nous allons utiliser l'exemple de l'immunoglobuline de classe g (il existe en fait cinq classes d'immunoglobulines qui correspondent chacune à un type de réponse effectrice³). L'effet mémoire est quant à lui assuré par des lymphocytes à durée de vie longue (année, décennie).

Un anticorps se compose de deux parties : une partie liante, qui permet la reconnaissance d'un antigène donné et une seconde, qui induit la réponse du système immunitaire après identification de l'antigène. La structure de l'anticorps est constituée de 4 chaînes polypeptidiques (2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères) qui sont liées par des ponts disulfures (fig. 1.16). Comme le montre la figure 1.16, l'anticorps présente un axe de symétrie, il y a donc deux régions capables d'identifier un antigène. Le séquençage des chaînes

3. Le mécanisme effecteur désigne les fonctions de réponse aux stimulations antigéniques naturelles (agents infectieux) ou artificielles (vaccins).

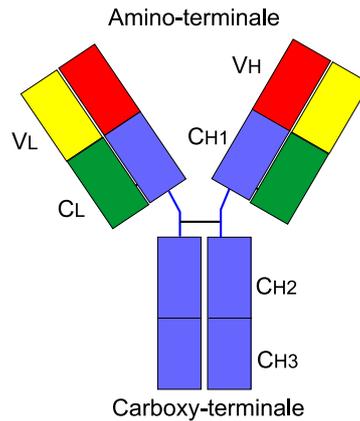


FIG. 1.17 – Décomposition de la structure de l'anticorps en domaines variables (V) et en domaines constants (C). Les chaînes légères (L light) possèdent une région variable et une région constante. Les chaînes lourdes (H heavy) possèdent une région variable et trois régions constantes [Jan01].

lourdes et légères a montré que chaque chaîne se décompose en sous-domaines de tailles équivalentes ($\simeq 110$ acides aminés). Les chaînes légères comportent deux domaines et les chaînes lourdes quatre. En comparant les séquences de différents anticorps, on remarque que les extrémités amino-terminales des chaînes lourdes et légères présentent une variabilité plus grande que les extrémités carboxy-terminales. Les sous-domaines, mis en évidence par le séquençage des chaînes lourdes et légères, sont donc répartis en deux classes : les domaines variables et les domaines constants. On recense respectivement un domaine variable et un domaine constant pour les chaînes légères, tandis que les chaînes lourdes se décomposent en un domaine variable et trois domaines constants (fig. 1.17). Le domaine variable est la partie de l'anticorps impliquée dans la reconnaissance de l'antigène. Les domaines constants sont responsables de la réponse effectrice et assurent la structure tridimensionnelle de l'anticorps. Les expériences de diffraction de rayons X sur des cristaux d'anticorps montrent que la structure tridimensionnelle de l'anticorps se présente sous la forme d'un Y (les deux régions liantes correspondent aux extrémités supérieures du Y). Ces expériences ont aussi révélé la présence d'un pont disulfure intrachaîne, qui permet de compacter et d'assurer la stabilité structurale de chaque sous-domaine (variable et constant).

Les parties variables des chaînes lourdes et légères se décomposent elles aussi en plusieurs régions (sept) qui présentent des degrés de variabilité différents. Il y a quatre parties à faible variabilité qui assurent la structure du domaine variable. Les trois autres régions, qui présentent une très grande variabilité, sont directement impliquées dans le mécanisme de reconnaissance de l'anticorps : ce sont les domaines hypervariables. Dans l'anticorps, ces régions hypervariables forment des boucles qui définissent la zone d'interaction avec l'antigène (surface d'interaction $\simeq 1000 \text{ \AA}^2$). L'interaction avec l'antigène est pilotée par plusieurs forces (électrostatiques, hydrophobe, Van der Waals, formation de liaisons hydrogène) mais il n'y a jamais formation de liaisons covalentes. En résumé, il y a dans l'anticorps deux extrémités qui assurent la reconnaissance de l'antigène. Chaque extrémité est formée de trois boucles hypervariables de la chaîne légère interagissant avec les trois boucles hypervariables de la chaîne lourde, cette région forme la zone d'interaction avec l'antigène.

Afin d'assurer une plus grande efficacité, le nombre d'anticorps différents présents dans l'organisme doit être très élevé pour permettre la reconnaissance du plus grand nombre possible d'antigènes. Ce nombre, qui est de l'ordre de 10^{11} , est obtenu grâce à plusieurs mécanismes. Le premier mécanisme est lié à l'hérédité qui assure la transmission de nombreux gènes codant pour des anticorps. Il a ensuite été montré qu'au cours de la maturation du lymphocyte B dans la moelle osseuse, les régions variables complètes sont formées à partir de la recombinaison de segments d'ADN génomiques. Un degré de diversité ultérieur est obtenu lors de l'association des chaînes lourdes et légères. Finalement, après identification de l'antigène par le lymphocyte B, il apparaît, pendant la synthèse des anticorps par ce lymphocyte, des mutations somatiques⁴ qui conduisent elles aussi à une augmentation de la diversité.

Au cours de ce travail, nous avons été amenés à collaborer avec des biologistes du laboratoire de Biotechnologie des Interactions Macromoléculaires de l'ESBS. Leurs travaux portent sur l'étude de la fonction et de la structure de la protéine E6. Cette protéine est une oncoprotéine de la famille des papillomavirus qui joue un rôle clé dans le développement du cancer du col de l'utérus. Elle intervient notamment dans l'inhibition de la

4. Mutation survenant dans une cellule non germinale.

fonction de la protéine P53. Dans la mesure où elle contrôle le bon déroulement de la duplication de l'ADN, la protéine P53 joue le rôle d'un véritable "gardien de l'intégrité génomique". En effet, dans une cellule normale, cette protéine est présente à des concentrations très faibles. Mais dès que la cellule est soumise à un "stress" qui entraîne une erreur dans la duplication de l'ADN, le taux de P53 augmente fortement, ce qui a pour conséquence l'arrêt du cycle cellulaire, afin de permettre la réparation de l'ADN. Cependant, si la réparation de l'ADN est impossible, la protéine P53 induit la mort de la cellule par apoptose. Dans le cas du cancer du col de l'utérus, il y a production de la protéine E6 par le papillomavirus. En se liant à la protéine P53, cette protéine va inhiber son action, empêchant ainsi le contrôle de la phase de duplication de l'ADN. Il est important de noter que la présence du papillomavirus n'est pas une condition suffisante pour provoquer le cancer du col de l'utérus, mais d'autres facteurs sont nécessaires à l'apparition du cancer. Par contre, dans le cas de cellules cancéreuses, l'action de la protéine E6 est dramatique puisqu'elle empêche l'élimination des cellules malades par apoptose conduisant ainsi à leur prolifération.

Dans une étude récente, Weiss et al. ont réussi à isoler une série d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine E6. A partir de ces anticorps, ils ont produit des fragments d'anticorps capables d'inhiber E6 dans des expériences *in vitro* [GTB⁺99]. Ces fragments d'anticorps recombinant simple-chaîne ou scFv (Single Chain Antibody Fragment) résultent de l'association du domaine variable de la chaîne lourde avec celui de la chaîne légère. Ils correspondent donc à la partie de l'anticorps qui est chargée de la reconnaissance de l'antigène. Malheureusement, lorsque les scFv capables d'inhiber la protéine E6 sont exprimés dans des cellules humaines, ils conduisent à la formation d'aggrégats toxiques pour la cellule. En effet, la stabilité structurale des différents domaines (domaines variables et intermédiaire de repliement) est assurée par la formation de ponts disulfures. Dans le contexte réducteur du cytoplasme, la formation de ces ponts n'est pas possible. En revanche, lors de la production de l'anticorps par le lymphocyte B l'étape d'excrétion permet la formation des ponts disulfures. Mais ici, l'idée consiste à produire directement dans la cellule des anticorps cytoplasmiques (intracorps) afin d'inhiber les antigènes qui s'expriment dans le cytoplasme (immunité intracellulaire). L'absence du pont disulfure entraîne alors un mauvais repliement du fragment d'anticorps (à cause des

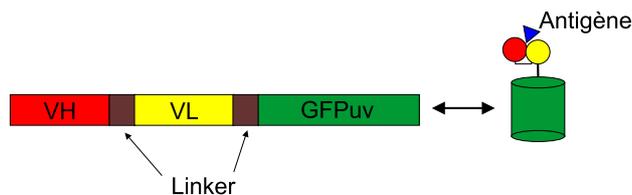


FIG. 1.18 – Séquence linéaire d'ADN comportant les domaines variables des chaînes lourdes et légères fusionnés à la GFPuv. À droite, schéma de la structure tridimensionnelle correspondant à la séquence linéaire.

interactions entre les parties hydrophobes de la chaîne d'acides aminés) qui conduit à la formation d'aggrégats. La stratégie développée par nos collègues pour remédier à ce problème de solubilité intra-cellulaire consiste, en partant d'un fragment d'anticorps qui est connu pour être soluble dans un contexte cytoplasmique [MJW98, SNM⁺03], à créer une banque (ensemble d'anticorps monoclonaux) de scFv solubles. L'idée est d'utiliser la charpente de ce fragment d'anticorps comme squelette de base (confère la solubilité) et de modifier les boucles hypervariables de la chaîne lourde et légère qui présentent le plus de variabilité. Dans un premier temps, l'accent est porté sur la solubilité du scFv. L'une des parties du projet va donc consister en la sélection des fragments d'anticorps solubles. Il est maintenant bien établi que lors du repliement d'une fusion génétique composée de 2 polypeptides, le mauvais repliement de la première séquence peut affecter le repliement de la seconde. Pour cela, nous allons étudier des fusions scFv-GFPuv et nous servir des propriétés photophysiques de la GFPuv fusionnée à l'extrémité carboxy-terminal du scFv (fig. 1.18) comme reporteur de solubilité. Si le scFv fusionné est insoluble (ou mal replié), celui-ci devrait induire un mauvais repliement de la GFPuv qui pourrait engendrer une modification de ses propriétés photophysiques. En effet, comme nous l'avons vu dans la première partie, les propriétés d'émission de la protéine sont très sensibles à l'environnement proche du chromophore. Un mauvais repliement peut induire, via un réarrangement de l'environnement proche du chromophore, des modifications dans les propriétés d'émission de la protéine. En particulier, nous aimerions savoir si la diminution de l'intensité de fluorescence observée avec un scFv peu soluble est due à la réduction du taux d'expression de GFPuv bien repliées et/ou est le reflet de la modification des propriétés intrinsèques de fluorescence de la GFPuv due à un mauvais repliement de la

protéine. Afin de différencier dans quelle configuration se trouve la fusion, nous proposons d'utiliser la dynamique ultra-rapide des états excités de la GFPuv. On peut donc espérer avoir des informations sur l'état de repliement (solubilité) du fragment d'anticorps via les modifications de la dynamique des états excités de la protéine. Nous allons d'ailleurs voir, dans la partie qui concerne les résultats expérimentaux, que nous avons été capables, en utilisant cette technique, de différencier deux fusions dont nous savions à l'avance que l'une était soluble et l'autre pas. Cette expérience, qui constitue une étape initiale dans la problématique biologique, nous a permis de démontrer la validité de la méthode et ainsi de donner une information pertinente et indispensable (solubilité \leftrightarrow état de repliement) à la réalisation d'une banque de fragments d'anticorps solubles utilisables dans un contexte intracellulaire.

1.3 Propriétés photophysiques de "rotors moléculaires"

Au cours de ce travail, nous avons aussi étudié les propriétés dynamiques des états excités d'une famille de marqueurs moléculaires parfois employés en imagerie cellulaire. Ces marqueurs, qui sont des dérivés de la molécule de coumarine, sont utilisés comme sonde locale de l'environnement car leurs propriétés de fluorescence sont modifiées par leurs interactions avec l'environnement. En particulier, ce sont les chutes de rendement quantique de fluorescence et les modifications des durées de vies radiatives de ces marqueurs qui offrent une sensibilité à l'environnement local. Le mécanisme couramment invoqué pour expliquer cette sensibilité implique l'existence de deux états excités : le premier correspond à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ de la partie conjuguée du chromophore qui conserve la forme plane de la molécule, et le second à une bande dite à transfert de charge conduisant à un changement de géométrie. Ces marqueurs sont appelés "rotors moléculaires" à cause de la rotation dans l'état électronique excité et se présentent donc comme de bons candidats au titre de reporteurs de la viscosité locale. Ce mécanisme de photoisomérisation, qui implique deux états excités avec deux géométries distinctes (plane, twistée), a été introduit pour la première fois par Grabowski et al. en 1973 [RGG73] pour expliquer la fluorescence double d'un dérivé du benzène : le 4-(N,N-diméthylamino)-benzonitrile (DMABN fig. 1.19). Ce modèle a par la suite été repris par certains groupes pour expli-

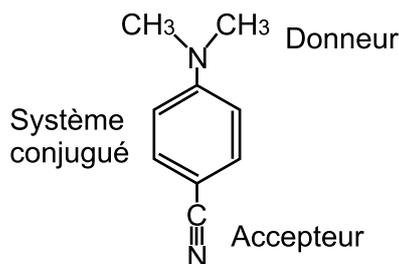


FIG. 1.19 – Structure chimique du 4-(*N,N*-diméthylamino)-benzonitrile (DMABN). La rotation dans l'état excité se fait autour de la liaison C-N après transfert d'électron du donneur vers l'accepteur.

quer les propriétés d'émission des dérivés de coumarine. Cependant, l'application de ce modèle à cette famille de marqueurs est loin de faire l'unanimité dans la communauté scientifique et malgré la controverse existante, certains groupes (notamment dans le domaine de l'imagerie biologique) continuent d'utiliser les marqueurs fluorescents à base de coumarine comme reporteurs de la viscosité locale (par exemple dans des membranes de cellules endothéliales [ECL⁺03]). Pour valider cette interprétation, il serait indispensable de démontrer que les changements observés mettent effectivement en jeu des mouvements de grande amplitude au sein du composé.

Afin de répondre à cette question, nous avons entrepris une étude de la dynamique des états excités de certains dérivés de coumarine à l'aide de la technique pompe-sonde résolue temporellement et spectralement. Avant de présenter les résultats de ces travaux, nous allons introduire la notion d'état twisté à transfert de charges (twisted intramolecular charge transfer TICT) en décrivant le cas modèle du DMABN. Nous présenterons ensuite les différentes expériences de la littérature qui tendent à confirmer ou infirmer le mécanisme de rotation dans l'état excité comme processus à l'origine des modifications des propriétés d'émission des marqueurs à base de coumarine. Puis nous passerons en revue les différentes applications des dérivés de coumarine en tant que rotors moléculaires.

1.3.1 Cas modèle du DMABN

En étudiant les propriétés optiques du DMABN, Lippert et al. découvrirent en 1961 [LLB62] l'apparition d'une seconde bande d'émission dans le spectre de fluorescence du DMABN lorsque la polarité du solvant augmente. Dans les solvants apolaires (rouge fig.

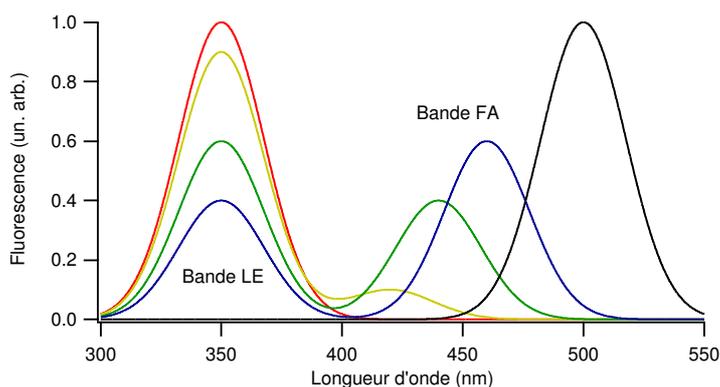


FIG. 1.20 – Représentation schématisée du spectre d'émission du DMABN en fonction de la polarité du solvant (rouge→noir : non polaire→polaire) lorsque la molécule est excitée au maximum d'absorption (270 nm).

1.20), on distingue une seule bande d'émission qui est associée à un état excité localement (Locally Excited LE), qui n'altère pas la répartition de la densité électronique le long du chemin de conjugaison. Alors que dans les solvants polaires une seconde bande d'émission, qui présente une forte dépendance en fonction de la polarité du solvant (fig. 1.20), apparaît autour de 420-500 nm. Cette bande, appelée bande de fluorescence anormale (FA), voit son intensité augmentée (par rapport à l'intensité de la bande LE) lorsque la polarité du solvant augmente. L'interprétation donnée par Lippert et al., pour expliquer cette fluorescence double, fait intervenir deux états excités de polarité différente (1L_a et 1L_b avec $E_{^1L_a} > E_{^1L_b}$) en équilibre thermodynamique. Dans ce modèle, lors de la relaxation orientationnelle dans les solvants polaires l'énergie de l'état excité 1L_a devient inférieure à celle de l'état 1L_b (inversion des niveaux) conduisant ainsi à l'apparition d'une seconde bande de fluorescence qui correspond à la relaxation à partir de l'état 1L_a . En 1973, Grabowski et al. proposèrent une nouvelle interprétation afin d'expliquer la présence d'une seconde bande dans le spectre d'émission du DMABN et les résultats contradictoires obtenus dans les expériences d'anisotropie de fluorescence [RGG73]. Le mécanisme proposé fait intervenir un transfert de charge et un changement de géométrie de la molécule dans l'état excité. L'absorption d'un photon conduit à la formation d'un état excité plan puis, selon la polarité du solvant, il y a un rapide transfert de charge intramoléculaire suivi d'une rotation du groupement diméthylamino autour de la liaison

N-phényle. En effet, le DMABN constitue une molécule du type donneur (groupement diméthylamino)/accepteur (groupement cyano) liés par un chemin de conjugaison (phényle). Ce processus de transfert d'électron du donneur vers l'accepteur est stabilisé par la rotation du groupement diméthylamino ($\varphi = 90^\circ$) autour de la liaison N-phényle conduisant ainsi à la formation d'un état twisté à transfert de charge (TICT) et à un découplage des orbitales du donneur et de l'accepteur (orbitale $P_z(N) \parallel$ phényle).

Dans ce modèle, la bande d'émission du côté des hautes énergies est associée à l'état LE et celle qui présente une dépendance à la polarité du solvant est associée à l'état TICT. Bien que proposé en 1973, ce modèle a longtemps été sujet à controverse et ce n'est que récemment qu'il a été adopté comme le meilleur candidat pour expliquer la fluorescence double du DMABN et de ses dérivés. Dans un article de revue paru en 2003, Grabowski et al. [GRR03] discutent des changements structuraux qui accompagnent le transfert d'électron intramoléculaire dans le DMABN et ses dérivés. En particulier, les auteurs présentent les différentes études sur les propriétés de fluorescence de ces composés (spectroscopie statique, dynamique en phase gazeuse et liquide; diffraction de rayon X résolue en temps sur des cristaux de DMABN), les modèles théoriques développés pour expliquer ces propriétés ainsi que les preuves en faveur du modèle TICT. Nous allons maintenant présenter les expériences qui ont permis de confirmer le modèle qui fait intervenir deux géométries dans l'état excité. Pour cela, nous allons nous appuyer sur l'article cité précédemment [GRR03].

C'est une étude utilisant la technique d'absorption transitoire qui a permis de mettre en évidence la présence de deux bandes d'absorption dans l'état excité. L'une apparaît immédiatement après excitation de l'échantillon (330 nm); alors que la seconde, centrée autour de 400 nm, accuse un net retard par rapport à la première. Ce retard est fonction de la polarité du solvant [OUK⁺99]. Dans cette expérience, la première bande a été attribuée à l'absorption à partir de l'état excité LE et la seconde bande est associée à l'absorption à partir de l'état TICT. Il est par ailleurs intéressant de noter la similitude entre le spectre d'absorption de l'état TICT et celui de l'anion radicalaire du DMABN. En effet, cette similitude est en faveur d'une absence de recouvrement entre les orbitales P_z du donneur et de l'accepteur suite à la rotation de 90° du groupement diméthylamino. Dans une expérience de fluorescence résolue en temps, Changenet et al. [CPMM97] ont pu

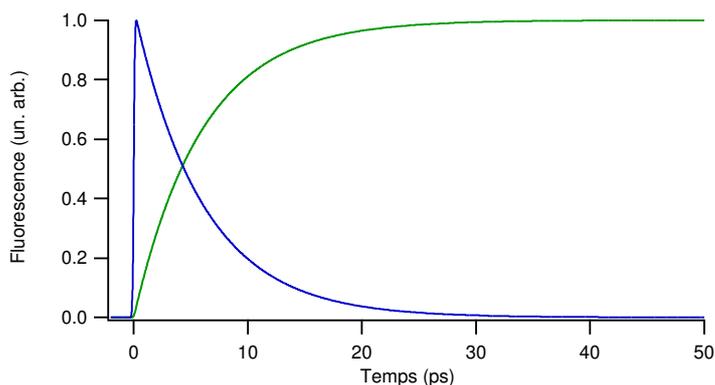


FIG. 1.21 – Représentation schématique du déclin de fluorescence du DMABN dans l'acétonitrile. En bleu, déclin associé à l'état LE et en vert, celui associé à l'état TICT (temps caractéristique 6 ps) [CPMM97].

déterminer le temps caractéristique associé au transfert de charge dans différents solvants et montrer la corrélation entre la disparition de la bande d'émission LE et l'apparition de l'émission associée à l'état TICT. Notons que ce temps est de l'ordre de 6 ps dans l'acétonitrile (fig. 1.21). Parmi les autres expériences en faveur d'un état TICT, on peut citer les travaux concernant les dérivés du DMABN [GRR03] : dans le cas des dérivés bloqués (pas de rotation possible autour de la liaison N-phényle) on note l'absence de la bande d'émission associée à l'état TICT (quelle que soit la polarité du solvant). De même, dans le cas des dérivés où l'encombrement stérique force la torsion autour de la liaison diméthylamino-phényle, on note l'absence d'émission de fluorescence à partir de l'état LE plan.

La plupart de ces expériences semblent donc favoriser le mécanisme basé sur la formation d'un état TICT. Mais, selon Grabowski et al., les expériences qui apportent une preuve formelle de l'existence d'un état TICT sont : l'étude des spectres vibrationnels (absorption infrarouge résolue en temps et spectroscopie Raman résolue en temps avec et sans substitution isotopique) et une expérience de stéréochimie. Le premier type d'étude a permis de déterminer et d'identifier quelques fréquences de vibrations de l'état à transfert de charge du DMABN. Les différences observées, entre les fréquences dans l'état fondamental et dans l'état excité, sont en faveur d'une rotation dans l'état excité qui découplerait le donneur et l'accepteur. On note à nouveau une forte similitude entre les

fréquences mesurées dans le cas de l'état à transfert de charge et de l'anion radicalaire du DMABN [GRR03]. La preuve stéréochimique est apportée par l'étude, à basse température (-90°C), des spectres RMN de deux rotamères d'une dialkylamino-pyridine présentant une fluorescence double [DWK⁺02]. Comme les spectres de RMN permettent de différencier les deux rotamères, les auteurs sont capables de suivre, à basse température, le passage d'un rotamère à l'autre après absorption d'un photon. Cette observation est possible si et seulement si le transfert de charge dans l'état excité implique une rotation de 90° du groupement dialkylamino.

Etant donné le nombre de preuves expérimentales en faveur de l'existence d'une rotation dans l'état excité, c'est tout naturellement qu'il a été proposé d'utiliser le DMABN en tant que rotor moléculaire. L'une des applications courantes du DMABN et de ses dérivés consiste en l'étude de la viscosité et du volume libre de solution de polymères [AHMS98]. En effet, l'intensité relative ainsi que le déclin de fluorescence associés à l'état à transfert de charge présentent une dépendance en fonction du poids moléculaire des chaînes et du volume libre de la matrice de polymères. Cette molécule se comporte donc comme un reporteur des propriétés locales du milieu environnant et il serait fort intéressant de pouvoir l'utiliser pour des applications biologiques (caractérisation de la viscosité de membrane). Malheureusement, la superposition de la bande d'absorption du DMABN avec celles des acides-aminés rend son utilisation problématique en imagerie cellulaire. Notons finalement, que l'article de Grabowski et al. [GRR03] se termine par une énumération des différentes molécules susceptibles de présenter un état TICT dans leur dynamique d'émission. Dans cette partie, les auteurs semblent exclure l'existence d'un état TICT dans la dynamique d'émission des dérivés de la coumarine.

1.3.2 Cas controversé des dérivés de coumarine

Comme nous l'avons vu dans la section précédente, l'absorption d'un photon par un rotor moléculaire conduit à la formation de deux états électroniques excités : un état plan et un état twisté à transfert de charge entre groupements donneur et accepteur d'électrons, à travers le chemin de conjugaison. Partant de cette hypothèse, plusieurs groupes se sont intéressés aux propriétés d'émission des dérivés de coumarine car leurs propriétés

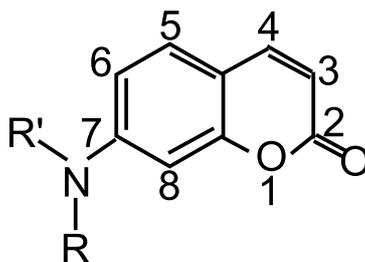


FIG. 1.22 – Structure chimique de la 7-aminocoumarine.

d'absorption et d'émission en font de bons candidats pour des applications en imagerie cellulaire. Parmi ces dérivés, il y a une classe particulièrement intéressante qui, de par sa similitude avec le DMABN, pourrait constituer une famille de rotors moléculaires émettant dans la partie visible du spectre. Cette famille correspond aux dérivés de type 7-aminocoumarine (fig. 1.22). En effet, comme dans le cas du DMABN, on retrouve un groupement amino (donneur d'électrons) lié à un chemin de conjugaison. On peut donc espérer, à condition de placer un groupement accepteur d'électrons sur la molécule, que cette famille de molécules se comporte également comme des rotors moléculaires. Dans le but de répondre à cette question, de nombreuses études, cherchant à caractériser les propriétés photophysiques de ces composés, ont été réalisées depuis le début des années 80. Comme nous allons le voir dans la suite, beaucoup de ces travaux semblent se contredire. La question qui concerne l'existence d'états TICT dans les dérivés de type 7-aminocoumarine reste donc ouverte.

Dans le but de donner une vision d'ensemble du problème, nous allons passer en revue ces différentes expériences (celles en faveur et celles en défaveur de l'existence d'états TICT) puis nous présenterons quelques travaux qui utilisent ces dérivés comme s'il s'agissait de rotors moléculaires, malgré la controverse existante.

Dans une étude sur les dérivés de coumarine possédant une amine libre de tourner en position 7, Jones et al. [IJH80] ont mesuré les rendements quantiques (ϕ_f) et les durées de vie radiative de ces composés dans les solvants polaires. Afin d'expliquer d'une part l'absence de fluorescence double et d'autre part les faibles valeurs mesurées (comparées au cas des solvants non-polaires), les auteurs proposent l'existence d'une voie de désexcitation non-radiative faisant intervenir une rotation dans l'état excité autour de la liaison C-N. Ce comportement s'explique bien si le mécanisme d'émission implique l'existence de deux

états excités : un état plan pouvant se relaxer par voie radiative et un état twisté à transfert de charge qui se désexcite de façon non-radiative. Un tel modèle permet de décrire le comportement de ces composés dans les solvants polaires. En effet, comme dans le cas du DMABN, les solvants polaires favorisent l'existence de l'état TICT mais si la force d'oscillateur associée à cet état est nulle, la molécule voit son rendement quantique de fluorescence et sa durée de vie radiative chuter dans ces milieux. Ce modèle est conforté par une seconde étude réalisée en 1985 par Jones et al. [IJCB85] sur des dérivés du type 7-aminocoumarine qui possèdent un substitut accepteur d'électrons en position 4. En comparant les propriétés d'émission (rendement quantique et durée de vie) de dérivés possédant une amine libre de tourner en position 7 à celles de dérivés dont la rotation est bloquée par des liaisons covalentes, les auteurs montrent que, dans le cas de solvants polaires, les rendements et les durées de vie sont très faibles pour le premier type de composés alors que ces valeurs sont beaucoup plus élevées dans le deuxième cas (par exemple, dans l'acétonitrile : $\phi_f = 0.09$ pour une coumarine non-bloquée, $\phi_f = 0.9$ pour son analogue bloqué) [IJ99].

L'existence d'une seconde bande d'émission serait une preuve déterminante qui permettrait de prouver l'existence d'un état TICT dans la dynamique d'émission des dérivés de coumarine. Plusieurs expériences, qui concernent l'étude des propriétés d'amplification de l'émission spontanée (ASE) de dérivés de coumarine [MSNN87, EKR89, VRPM01], semblent avoir démontré l'existence d'une bande d'amplification associée à l'état TICT. Grâce à cette technique, les auteurs ont réussi à mettre en évidence la présence d'une seconde bande d'amplification de l'émission spontanée dans le cas de solvants polaires. Dans un solvant non-polaire (cyclohexane) l'amplification de l'émission spontanée présente une seule bande, pour un solvant de polarité intermédiaire (acétate de n-butyl) le spectre d'amplification possède deux bandes et pour un solvant de forte polarité (méthanol), seule la seconde bande subsiste. Les auteurs associent donc cette seconde bande à la formation d'un éventuel état TICT. En étudiant le déclin de fluorescence de la coumarine 102 (bloquée) et 1 (non-bloquée) en solution aqueuse, Yip et al. [YWS93] montrent que le déclin de fluorescence est mono-exponentiel (5.96 ns) pour la coumarine 102, alors qu'il est non-exponentiel, avec une composante rapide de l'ordre de 0.5 ps pour la coumarine 1. Les auteurs associent cette composante rapide à la rotation du groupement diéthylamino.

Une autre étude systématique des durées de vie radiative de coumarines bloquées et non-bloquées dans différents solvants confirment le rôle joué par les solvants polaires dans la diminution des durées de vie des coumarines non-bloquées [RK94]. Dans cette étude, les auteurs comparent les propriétés des états excités des 7-aminocoumarines d'un point de vue expérimental et théorique et mettent en évidence la présence d'un état TICT dans le mécanisme de relaxation de ces composés. Les calculs semi-empiriques (MOPAC 6.0) montrent, comme dans le cas du DMABN, que l'état TICT possède un moment dipolaire plus grand que celui associé à l'état S_1 lui-même plus important que celui de S_0 . Dans le cas de la coumarine 152 (7-diméthylamino-4-trifluorométhyl-coumarine), et contrairement à la coumarine 120 (7-amino-4-méthyl-coumarine), les calculs semi-empiriques montrent que la surface de potentiel, associée à la géométrie dans l'état excité, présente un minimum pour un groupement diméthylamino perpendiculaire au plan de l'anneau. Dans le cadre de ce calcul, la relaxation radiative à partir de ce minimum donne lieu à une émission centrée autour de $1 \mu m$ avec un rendement quantique de fluorescence de 0.001. Ces travaux expliquent donc les modifications des propriétés d'émission des coumarines dans différents solvants (non-polaires/polaires) sur la base d'un mécanisme de relaxation faisant intervenir un état TICT. Le comportement anormal de certaines coumarines (C120 et C151), qui présentent de faibles rendements dans des solvants non-polaires, est expliqué par la formation de complexes soluté-solvant.

D'autres études [RV94, IJ99], sur la variations des propriétés d'émission en fonction des substituants en position 3, montrent que l'augmentation du pouvoir accepteur de ce substituant favorise la formation de l'état TICT dans les solvants polaires grâce à une augmentation de la probabilité du transfert de charge entre le donneur et l'accepteur. Dans le cas de substituants du type azole [IJ01], la diminution du rendement quantique et de la durée de vie radiative dans un milieu acide cette fois-ci est attribuée à la formation d'un état TICT. Plus récemment, dans une étude sur le transfert d'électron entre des dérivés de la 7-diéthylaminocoumarine (bloquée/non-bloquée) et des nanoparticules de TiO_2 [RG02], les auteurs mettent également en avant l'existence de deux états excités (plan et TICT). Leur argumentation repose sur le fait que l'efficacité du transfert d'électron, du colorant vers la nanoparticule, est augmentée par la forte séparation de charge induite par l'état TICT. De plus, la variation du rendement quantique de fluorescence en fonction du

paramètre du solvant $\Delta f = \frac{\epsilon-1}{2\epsilon+1} - \frac{n^2-1}{2n^2+2}$ où ϵ est la constante diélectrique et n l'indice de réfraction, présente une dépendance bi-linéaire dans le cas de la coumarine non-bloquée. Ce type de dépendance est généralement associée à l'apparition d'une seconde voie de désexcitation non-radiative. Par analogie avec des études sur les propriétés d'émission du DMABN dans des solutions de nanoparticules de SiO_2 [KCY⁺97], les auteurs attribuent cette seconde bande d'émission à la stabilisation de l'état TICT via la création de liaisons hydrogènes avec la nanoparticule. Cette interprétation est confortée par l'apparition d'une seconde bande d'émission lorsque la concentration en TiO_2 augmente.

Malgré les différentes preuves apportées par ces divers travaux, on peut recenser dans la littérature un nombre assez important d'articles dans lesquels l'existence d'un état TICT dans les dérivés du type 7-aminocoumarine est fortement remise en question. Par exemple, dans une expérience pompe-sonde résolue temporellement (picoseconde) et spectralement, Yip et al. montrent que la coumarine 1 (non-bloquée) et la coumarine 120 (bloquée) présentent le même spectre d'absorption dans l'état excité quelle que soit la polarité du solvant [YW89]. Ces observations sont consistantes avec la présence d'une seule espèce dans l'état excité (état excité à transfert de charge plan). Dans une autre étude, Lopez Arbeloa et al. montrent que les modifications des propriétés d'émission (rendement quantique et durée de vie radiative) de différentes 7-aminocoumarine (non-bloquées) peuvent être expliquées à la fois par un mécanisme faisant intervenir un état TICT et/ou par un changement d'hybridation de l'atome d'azote en position 7. Toutefois, le modèle basé sur l'existence d'un état TITC ne permet pas de décrire les modifications des propriétés d'émission des 7-aminocoumarine dans les solvants protiques alors qu'un modèle impliquant un passage d'une hybridation $sp^2 \rightarrow sp^3$ du groupement amino en position 7 permet de décrire ces modifications, via la création de liaison hydrogène.

Comme nous l'avons vu, c'est une étude de fluorescence résolue en temps qui a permis de mettre en évidence l'existence d'un état TICT dans le cas du DMABN [CPMM97]: dans l'acétonitrile, le déclin de fluorescence associé à l'état LE a lieu avec une constante de temps courte de l'ordre de 6 ps. Parallèlement, l'augmentation de la fluorescence de la bande associée à l'état TICT se fait avec une constante de temps similaire. Autrement dit, le temps caractéristique associé à la rotation dans l'état excité doit être de l'ordre de 6 ps. Dans le cas des dérivés du type 7-aminocoumarine, même si l'état TICT n'est

pas fluorescent, on devrait retrouver un comportement semblable à celui du DMABN. A savoir, un déclin rapide de la fluorescence dans un solvant polaire, étant donné que pour ces dérivés de coumarine le groupement (amino) mis en jeu lors de la rotation est le même que celui du DMABN. Cela signifie que dans le cas d'un solvant polaire le temps caractéristique du passage d'un état fluorescent vers un état TICT non-fluorescent devrait être du même ordre de grandeur (quelques picosecondes). Or, dans une étude sur la dynamique de solvatation de plusieurs 7-aminocoumarines (bloquée et non-bloquée), dans laquelle les auteurs utilisent la technique de fluorescence résolue en temps [GCG⁺98], on constate que les spectres enregistrés ne présentent pas de déclin rapide de la fluorescence, et ce quelle que soit la polarité du solvant. De plus, les dynamiques d'émission des coumarines bloquée et non-bloquée sont très similaires, ce qui semble vouloir dire que la dynamique d'émission de ces dérivées ne met pas en jeu un changement rapide de géométrie dans l'état électronique excité. Cette absence de composante rapide se retrouve aussi dans l'article de Kang et al. [PK98] où les auteurs ont étudié, toujours par la technique de fluorescence résolue en temps, la dynamique d'émission de la coumarine 481 dans l'acétonitrile. Ces deux expériences résolues en temps sont corroborées par les travaux de Samanta et al. [SF00]. Dans cette étude, les auteurs ont déterminé le moment dipolaire de plusieurs dérivés du type 7-aminocoumarine dans leur état excité, en utilisant une technique d'absorption micro-ondes. Les résultats montrent que le moment dipolaire de l'état excité est plus élevé que celui du fondamental. Dans l'état excité, les moments dipolaires des coumarines bloquées et non-bloquées sont de l'ordre de 10 Debye. Or dans le cas du DMABN, nous avons vu que le moment dipolaire associé à l'état TICT est plus élevé que celui associé à l'état plan (à cause de la séparation de charge). Les valeurs mesurées pour les composés bloqués et non-bloqués devraient donc être différentes. De plus, d'après des calculs semi-empiriques, les auteurs s'attendent à mesurer un moment dipolaire de l'ordre de 20 Debye dans le cas d'un état TICT. A la liste des faits expérimentaux en défaveur de l'existence d'un état TICT s'ajoute aussi l'absence de variation du moment dipolaire de l'état excité en fonction de la polarité du solvant. Dans une étude théorique (dynamique moléculaire, optimisation de géométrie, ZINDO et Time-Dependent Density Functional Theory TDDFT) réalisée par Cave et al. [CBC02] sur les coumarines 151 et 120 (non-bloquées) en phase gazeuse et en solution (application d'un champ électrique

statique pour simuler le solvant), les auteurs montrent tout d'abord que l'hybridation de l'azote en position 7 dans le fondamental est du type sp^3 . En optimisant la géométrie dans l'état excité, il apparaît que la formation d'un état twisté est très peu probable (en phase gazeuse ainsi qu'en solution) et que la géométrie dans l'état excité correspond à une forme plane de la molécule (hybridation sp^2 sur l'atome d'azote). Finalement, dans une étude de la dynamique rotationnelle de la coumarine 1 dans l'acétonitrile [GCM⁺03], on peut voir sur les déclinés de fluorescence reportés que la relaxation à partir de l'état fluorescent ne présente pas de composante rapide qui serait la signature claire de la présence d'un état TICT. Au cours de leur discussion, les auteurs, qui souhaitent comparer le temps caractéristique associé à la rotation de la molécule à celui donné par la théorie de Stokes-Einstein-Debye, évoquent la possibilité de l'existence d'un état TICT (importance de la géométrie de la molécule nécessaire à la détermination de son volume hydrodynamique) en disant toutefois que cette dernière est loin d'être prouvée expérimentalement.

A travers ces différents travaux, on voit bien que la question, qui concerne l'existence d'un état TICT dans la dynamique d'émission des dérivés du type 7-aminocoumarines, est loin d'être élucidée. D'une part, les études statiques montrent que ces dérivés présentent des modifications des propriétés d'émission (variation du rendement quantique de fluorescence et de la durée de vie radiative en fonction de la polarité du solvant) qui s'accorderaient avec un modèle impliquant un changement de géométrie dans l'état excité (plane et twistée). Cependant, si on regarde les expériences résolues en temps, on constate que la dynamique d'émission ne présente pas de signatures d'une photoisomérisation rapide.

Nous allons maintenant passer en revue deux expériences types qui prétendent exploiter ces marqueurs fluorescents comme sondes locales de la viscosité, malgré l'absence de preuves formelles de mouvements de grandes amplitudes dans l'état excité. Dans une première étude réalisée par Jones et al. [IJ01], les auteurs observent les modifications des rendements quantiques et des durées de vie radiative de dérivés de coumarine dans des matrices de polymères. Ils interprètent alors ces modifications comme un effet du micro-environnement sur la cinétique de formation d'un état TICT. Ils proposent donc d'utiliser ces marqueurs comme reporteurs de la viscosité de ce micro-environnement. Le second type d'expérience prétend également sonder la viscosité locale, mais de membranes

biologiques (ou biopolymères) [GVCB⁺00, TEB⁺02, ECL⁺03] cette fois. Dans ces différentes études, les auteurs ont fonctionnalisé des dérivés du type 7-aminocoumarine pour les rendre solubles dans les membranes. Au vu des modifications des propriétés d'émission les auteurs proposent, une fois encore, d'utiliser ces marqueurs comme reporteurs de la viscosité de l'environnement proche du chromophore. Mais la seule hypothèse de travail est qu'il existe une rotation dans l'état excité qui de fait présente une sensibilité à la viscosité du milieu environnant. Or les diverses expériences décrites précédemment semblent plutôt montrer que l'hypothèse d'un état TICT est vraisemblablement fautive et si tel est bien le cas, les effets sur le rendement quantique de fluorescence proviennent d'un mécanisme non encore identifié, mais qui doit se dérouler sur une échelle de temps beaucoup plus longue qu'une photoisomérisation par rotation d'un groupement somme toute assez petit. Dans le cadre de ce travail nous avons étudié la dynamique des états excités de plusieurs dérivés du type 7-aminocoumarines et nous avons montré (voir chapitre 3) que ces dérivés ne présentent pas de signatures d'un changement de géométrie rapide dans l'état électronique excité.

2. TECHNIQUES DE SPECTROSCOPIE FEMTOSECONDE : ASPECTS THÉORIQUES ET PRATIQUES

Introduction

Ce chapitre sera dédié à la description des dispositifs expérimentaux utilisés dans le cadre de ce travail. Cette description concernera les expériences pompe-sonde résolues spectralement et temporellement qui ont permis de caractériser la dynamique des états excités de la Green Fluorescent Protein (GFP) ainsi que celle des dérivés de coumarine.

La dynamique d'émission de la GFP est associée, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, à un transfert de proton dans l'état excité entre la forme neutre et anionique non-relaxée du chromophore [CKBB96]. Le temps caractéristique de ce transfert est de l'ordre de quelques picosecondes dans le cas de la protéine naturelle et des mutants qui appartiennent à la même classe [CKBB96, LKH⁺96, KWR⁺00]. Afin d'obtenir des informations sur la dynamique et la nature des espèces mises en jeu au cours de l'émission de fluorescence verte, nous avons utilisé la technique pompe-sonde résolue spectralement et temporellement. Cette technique, qui est une technique de base de la spectroscopie résolue en temps, peut être décrite qualitativement de la façon suivante : une première impulsion pompe excite le système et on caractérise la dynamique des états excités en mesurant la variation de transmission d'une impulsion sonde retardée dans le temps. En utilisant une sonde large spectralement, on a alors accès aux dynamiques de relaxation associées aux différentes transitions optiques permises par le système. Nous avons donc besoin, en premier lieu, d'une impulsion pompe qui permet d'exciter la protéine dans sa forme neutre (400 nm) et ainsi de déclencher le mécanisme d'émission. L'impulsion sonde utilisée dans cette étude consiste en un continuum spectral obtenu grâce au phénomène d'automodulation de phase dans un cristal de saphir. La largeur spectrale associée à l'impulsion sonde nous permet de mettre en évidence les espèces impliquées dans la

dynamique d'émission.

Dans le cadre de l'étude sur la dynamique d'émission des dérivés de coumarine, nous avons développé un amplificateur paramétrique optique en géométrie non-colinéaire (Non-collinear Optical Parametric Amplifier, NOPA) [She02, CNSS98] afin d'obtenir des impulsions pompe accordables dans le visible. De cette manière nous avons pu étudier un composé synthétisé au Département de Chimie Physique des Réactions du groupe ENSIC à Nancy et ainsi caractériser sa dynamique d'émission.

Nous commencerons ce chapitre en rappelant quelques notions de base sur la génération d'impulsions laser sub-picoseconde puis nous décrirons la source utilisée ainsi que ses différentes caractéristiques. Nous expliquerons ensuite par quels mécanismes sont obtenues les différentes impulsions pompe et sonde et par quelles techniques optiques nous les avons caractérisées. En particulier, nous présenterons le phénomène de doublage de fréquence, de génération de continuum, le principe de fonctionnement d'un NOPA ainsi que la nature du signal mesuré dans une expérience pompe-sonde. Nous détaillerons ensuite les dispositifs expérimentaux ainsi que les méthodes employées pour caractériser ces impulsions. Finalement, ce chapitre se terminera par une description du moyen simple que nous avons utilisé pour nous affranchir de certains artefacts de mesure et de la technique de détection utilisée.

2.1 Génération d'impulsions LASER ultracourtes

L'apparition de techniques optiques permettant la génération d'impulsions sub-picoseconde a ouvert la voie à l'étude, dans le régime temporel, des processus fondamentaux en physique de la matière condensée. En effet, il est maintenant possible, à l'aide de ces techniques, de suivre des mécanismes dont les temps caractéristiques sont de l'ordre de la centaine ou de la dizaine de femtosecondes. On peut citer, à titre d'exemple, l'observation de la thermalisation des électrons autour du niveau de Fermi dans les métaux [SVA⁺94] ou encore l'observation de paquets d'onde vibrationnels dans les systèmes moléculaires [EKS⁺01]. D'autre part, la puissance crête associée à ces impulsions permet, en plus de la possibilité d'obtenir une forte densité d'excitation, d'accéder facilement à plusieurs phénomènes non-linéaires (absorption multiphotonique, doublage de fréquence,

amplification paramétrique). La relation de Fourier, qui lie l'énergie et le temps, nous dit que pour obtenir des impulsions courtes on doit disposer d'un champ électrique qui possède un spectre large. Dans la pratique, la génération de telles impulsions se fait en synchronisant les différents modes longitudinaux d'une cavité laser (blocage des modes). Cependant, lors de la propagation dans un milieu dispersif, un effet linéaire induit un élargissement temporel des impulsions. Cet effet, appelé dispersion de la vitesse de groupe, peut être compensé à l'aide de différents systèmes optiques qui seront décrits dans cette section.

2.1.1 Blocage de modes [Rul04]

En partant de la relation de Fourier qui lie les variables temps et fréquence,

$$\Delta\nu\Delta t \geq \frac{1}{2} \quad (2.1)$$

on obtient facilement :

$$\Delta t \geq \frac{\lambda_0^2}{2c\Delta\lambda} \quad (2.2)$$

où Δt est la largeur temporelle minimale d'une impulsion associée à un spectre de largeur $\Delta\lambda$; elle est aussi appelée "impulsion transformée limite" du spectre. A partir de l'expression 2.2, on voit clairement que la génération d'impulsions courtes impose une certaine largeur spectrale (par exemple, un spectre centré à 500 nm de 25 nm de largeur à mi-hauteur peut potentiellement donner lieu à une impulsion transformée limite de 16.6 fs). Pour donner une image concrète de ce phénomène, plaçons-nous dans le cas d'une cavité laser linéaire. Dans ce cas, le champ électrique total s'écrit comme la somme des modes longitudinaux (nous avons choisi $E_0 = 1$) :

$$E(t) = \sum_{i=0}^n \cos((\omega_0 + i\Omega)t + \phi_i) \quad (2.3)$$

où ϕ_i est la phase relative entre chaque mode de la cavité, ω_0 la pulsation centrale et Ω l'intervalle en fréquence entre les différents modes longitudinaux de la cavité :

$$\Omega = \frac{\pi c}{L} \quad (2.4)$$

avec L la longueur de la cavité laser. Prenons tout d'abord le cas où la phase relative est aléatoire. On remarque dans cette situation que l'intensité laser est indépendante du

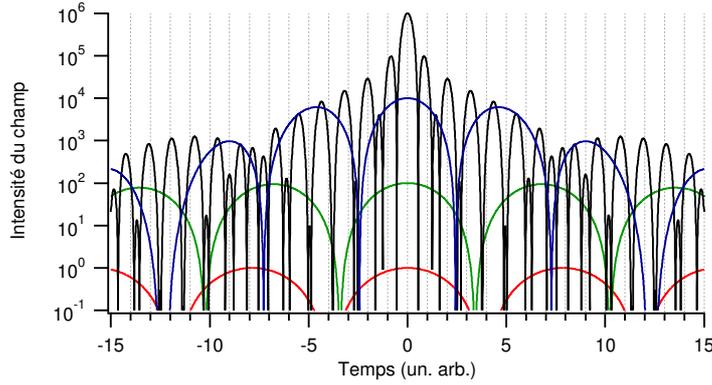


FIG. 2.1 – Illustration du phénomène de battement entre 1 (rouge), 25 (vert), 100 (bleu) et 1000 (noir) modes de la cavité.

temps (aux fluctuations près) car les processus d'interférence se moyennent à zéro. Dans l'exemple suivant (voir fig. 2.1), nous avons fixé la phase relative entre les modes à zéro. Cet exemple montre que plus le nombre des modes qui interfèrent dans la cavité est grand, plus on réduit la durée temporelle de l'impulsion résultante et plus on augmente l'intensité crête associée à cette impulsion. En effet, l'intensité du champ résultant du processus d'interférence est proportionnelle à $|NE_0|^2$. Pour obtenir une impulsion courte, il suffit donc de faire interférer un grand nombre de modes du champ électromagnétique de la cavité, pourvu que l'on ait réussi à bloquer la phase relative entre chaque mode. Dans une cavité laser, le blocage de modes peut se faire de façon active ou passive. Dans le premier cas, c'est un élément externe qui bloque la phase relative entre les différents modes. La technique du blocage de modes actif consiste à moduler un paramètre de la cavité à une fréquence qui est un multiple de l'écart en fréquence entre chaque mode. Imaginons que l'on module l'amplitude du mode central à la fréquence Ω , on peut alors montrer que le champ électrique résultant s'écrit :

$$E(t) = E_0(1 + \alpha \cos \Omega t)e^{i(\omega_0 t + \varphi_0)} = E_0 e^{i(\omega_0 t + \varphi_0)} + \frac{\alpha E_0}{2} e^{i((\omega_0 + \Omega)t + \varphi_0)} + \frac{\alpha E_0}{2} e^{i((\omega_0 - \Omega)t + \varphi_0)} \quad (2.5)$$

de cette manière, les modes $\omega_0 \pm \Omega$ vont osciller en phase avec le mode ω_0 . Ce processus va se répercuter de proche en proche et ainsi bloquer entre eux les différents modes de la cavité.

Dans la cavité titane:saphir utilisée dans l'expérience, le blocage de modes se fait

de façon passive : le phénomène non-linéaire d'autofocalisation présent dans le milieu de gain est exploité pour stabiliser le régime pulsé. En effet, lors de la propagation dans le milieu de gain, l'indice de réfraction du barreau va être modifié par le profil transverse de l'intensité du faisceau :

$$n(x,y) = n_0 + I(x,y)n_2 \quad (2.6)$$

où n_0 est l'indice linéaire du milieu, n_2 l'indice non-linéaire et $I(x,y)$ le profil spatial transverse du faisceau. Cet effet peut être décrit de la façon suivante. Lors de sa propagation dans la cavité, le centre du faisceau voit un indice plus élevé que le bord du faisceau. Le milieu de gain se comporte alors comme une lentille convergente (lentille Kerr). Si la condition de stabilité de la cavité est choisie pour favoriser l'oscillation en présence de lentille Kerr, on obtient un blocage de modes puisque plus l'intensité crête est élevée plus l'effet d'autofocalisation est important. Le blocage de modes résulte donc de la modulation de l'indice non-linéaire du milieu de gain à la fréquence Ω . Il est toutefois nécessaire d'initier le phénomène de blocage de modes passif; pour cela nous utilisons un dispositif qui permet de bloquer les modes de façon active (modulateur acousto-optique). Une fois le blocage de modes déclenché, ce dispositif n'est plus nécessaire.

2.1.2 Dispersion de la vitesse de groupe [Alf89, RW89]

La dispersion de la vitesse de groupe est liée à la dépendance spectrale de l'indice de réfraction d'un milieu. Dans un milieu dispersif normal, l'indice de réfraction augmente quand la longueur d'onde diminue et ce fait a des conséquences importantes pour la propagation des impulsions lumineuses courtes. A titre d'exemple, nous avons représenté en fig. 2.2 la variation de l'indice de réfraction de la silice fondue en fonction de la longueur d'onde. Pour comprendre l'origine de cet effet, considérons une impulsion gaussienne de durée τ_0 centrée autour de ω_0 en $z = 0$:

$$E(t,0) = E_0 e^{-\left(\frac{t}{\tau_0}\right)^2} e^{i\omega_0 t} \quad (2.7)$$

sa transformée de fourier est :

$$E(\omega,0) = \frac{E_0 \tau_0}{2\sqrt{\pi}} e^{-\frac{\tau_0^2(\omega-\omega_0)^2}{4}} \quad (2.8)$$

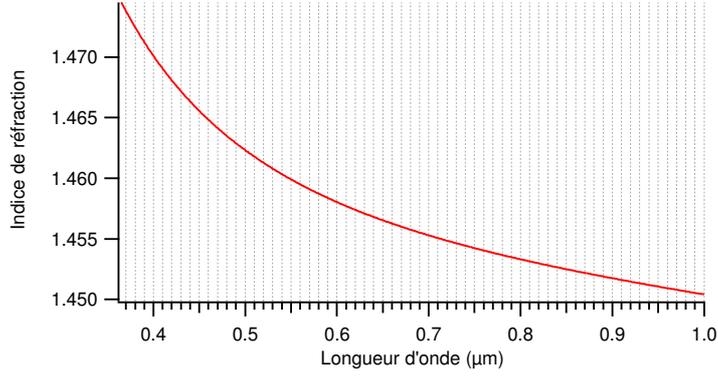


FIG. 2.2 – Variation de l'indice de réfraction de la silice fondue en fonction de la longueur d'onde. Cette courbe est obtenue à partir des coefficients de Sellmeier de la silice fondue (coefficients extraits du catalogue CVI).

après avoir parcouru une distance z , le champ est déphasé de $\Phi(\omega) = k(\omega)z$. En z , le champ se réécrit donc:

$$E(\omega, z) = \frac{E_0 \tau_0}{2\sqrt{\pi}} e^{\frac{\tau_0^2(\omega - \omega_0)^2}{4}} e^{-ik(\omega)z} \quad (2.9)$$

La phase spectrale ($\Phi(\omega)$) accumulée lors de la propagation peut être développée en série de Taylor autour de la porteuse ω_0 :

$$\Phi(\omega) = \Phi(\omega_0) + (\omega - \omega_0) \left(\frac{\partial \Phi}{\partial \omega} \right)_{\omega_0} + \frac{(\omega - \omega_0)^2}{2} \left(\frac{\partial^2 \Phi}{\partial \omega^2} \right)_{\omega_0} + \frac{(\omega - \omega_0)^3}{3} \left(\frac{\partial^3 \Phi}{\partial \omega^3} \right)_{\omega_0} + \dots \quad (2.10)$$

il est maintenant facile de calculer les trois premiers termes du développement de Taylor dans le cas d'un milieu d'indice n :

$$\frac{\partial \Phi}{\partial \omega} = -\frac{\lambda z}{c} \frac{\partial n}{\partial \lambda} + \frac{nz}{c} = \frac{z}{v_g} \quad (2.11)$$

$$\frac{\partial^2 \Phi}{\partial \omega^2} = \frac{\lambda^3 z}{2\pi c^2} \frac{\partial^2 n}{\partial \lambda^2} = z \left(\frac{\partial}{\partial \omega} \left(\frac{1}{v_g} \right) \right) \quad (2.12)$$

$$\frac{\partial^3 \Phi}{\partial \omega^3} = -\frac{3\lambda^4 z}{4\pi^2 c^3} \frac{\partial^2 n}{\partial \lambda^2} - \frac{\lambda^5 z}{4\pi^2 c^3} \frac{\partial^3 n}{\partial \lambda^3} = z \left(\frac{\partial^2}{\partial \omega^2} \left(\frac{1}{v_g} \right) \right) \quad (2.13)$$

Ces trois termes sont respectivement appelés: retard de groupe, dispersion de la vitesse de groupe et dispersion du troisième ordre. En considérant le premier terme, il est possible d'introduire de façon naturelle la vitesse de groupe v_g qui sera donc une quantité bien définie seulement pour des impulsions de largeur spectrale limitée.

Considérons maintenant le développement de Taylor jusqu'à l'ordre 2. Le champ de l'impulsion s'écrit :

$$E(\omega, z) = \frac{E_0 \tau_0}{2\sqrt{\pi}} e^{\frac{\tau_0^2 (\omega - \omega_0)^2}{4}} e^{-i(\Phi(\omega_0) + (\omega - \omega_0) \left(\frac{\partial \Phi}{\partial \omega}\right)_{\omega_0} + \frac{(\omega - \omega_0)^2}{2} \left(\frac{\partial^2 \Phi}{\partial \omega^2}\right)_{\omega_0})} \quad (2.14)$$

En repassant dans le domaine temporel, on obtient :

$$E(t, z) = \frac{E_0 \tau_0}{2\sqrt{\alpha}} e^{i(\Phi(\omega_0) + \omega_0 t)} e^{-\frac{((\frac{\partial \Phi}{\partial \omega})_{\omega_0} - t)^2}{2\alpha}} \quad \text{avec} \quad \alpha = \frac{\tau_0^2}{4} + \frac{i}{2} \left(\frac{\partial^2 \Phi}{\partial \omega^2}\right)_{\omega_0} \quad (2.15)$$

l'intensité de l'impulsion est alors égale à :

$$I(t, z) = \frac{E_0^2 \tau_0^2}{2\sqrt{\beta}} e^{-\frac{\tau_0^2 ((\frac{\partial \Phi}{\partial \omega})_{\omega_0} - t)^2}{2\beta}} \quad \text{avec} \quad \beta = \frac{\tau_0^4}{4} + \left(\frac{\partial^2 \Phi}{\partial \omega^2}\right)_{\omega_0}^2 \quad (2.16)$$

et la largeur à mi-hauteur vaut :

$$\Delta\tau_{\frac{1}{2}} = \sqrt{\frac{8\beta}{\tau_0^2} \ln \frac{\tau_0^2}{\sqrt{\beta}}} \quad (2.17)$$

alors qu'initialement on avait :

$$\Delta\tau_{\frac{1}{2}} = \tau_0 \sqrt{2 \ln 2} \quad (2.18)$$

A partir de l'équation (2.15), on voit que le terme d'ordre 0 modifie la phase du champ et que le terme d'ordre 1 déplace temporellement le centre de l'impulsion (retard de groupe). L'équation (2.17) montre, quelle que soit le signe de $(\frac{\partial^2 \Phi}{\partial \omega^2})_{\omega_0}$, que la durée de l'impulsion ne peut qu'augmenter lors de la propagation. A titre d'exemple, la figure (2.3) représente la dispersion de la vitesse de groupe et le retard de groupe qui sont associés à la propagation dans une lame de silice fondue de 5 mm d'épaisseur. Considérons maintenant un spectre gaussien, centré à 500 nm, qui possède une largeur à mi-hauteur de 25 nm. En $z = 0$, le profil temporel de l'impulsion est donné par la transformée de Fourier inverse du spectre (transformée limite en trait plein dans la fig. 2.4). Après qu'elle s'est propagée dans 5 mm de silice fondue, si l'on considère uniquement le terme d'ordre 2 dans le développement de Taylor, on obtient le profil temporel en pointillé dans la figure (2.4). On voit très bien dans cet exemple que le terme du deuxième ordre induit un élargissement temporel de l'impulsion. Si l'on tient compte uniquement du terme du troisième ordre, il apparaît des impulsions secondaires dans le profil temporel de l'impulsion (tiret). Les exemples de la figure 2.4 ont été obtenus à l'aide d'un programme que nous avons écrit pour simuler les

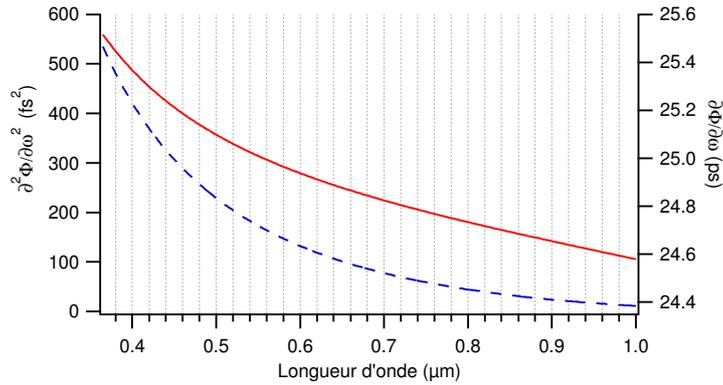


FIG. 2.3 – Dispersion de la vitesse de groupe (trait plein, échelle de gauche) et retard de groupe (tiret, échelle de droite) pour une impulsion se propageant dans 5 mm de silice fondue en fonction de sa longueur d'onde centrale. Ces courbes sont dérivées de la figure 2.2 à travers les expressions 2.11 et 2.12.

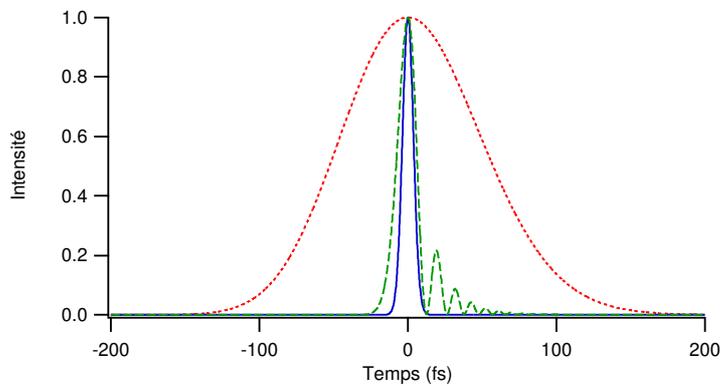


FIG. 2.4 – Impulsions obtenues par transformée de Fourier inverse d'un spectre gaussien centré à 500 nm de 25 nm de largeur à mi-hauteur. Trait plein : impulsion transformée limitée; pointillé : impulsion après propagation dans 5 mm de silice fondue (en ne tenant compte que des effets du deuxième ordre) et impulsion après propagation dans 2 cm de silice fondue (tiret, en ne tenant compte que des effets du troisième ordre).

effets de dispersion liés à la propagation d'impulsions ultracourtes dans un milieu d'indice $n(\lambda)$. Ce programme nous permet d'inclure les termes du développement de Taylor dans l'espace des pulsations et de remonter, par transformée de Fourier inverse numérique (FFT^{-1}), dans l'espace des temps et ainsi d'obtenir le profil temporel des impulsions. Il est donc très facile de voir l'effet de chaque ordre séparément car, si on veut tenir compte des ordres supérieurs à l'ordre 2, il n'existe plus de solutions analytiques simples.

Plusieurs dispositifs expérimentaux permettent de compenser ces effets de dispersion. Nous avons vu, dans le cas d'un milieu dispersif normal, que les composantes basses fréquences subissent un retard de groupe moins important que les composantes hautes fréquences. Il suffit donc d'imaginer un dispositif qui permette de façonner $\frac{\partial^2 \phi}{\partial \omega^2}$ et $\frac{\partial^3 \phi}{\partial \omega^3}$. Nous pouvons citer à titre d'exemple le cas des miroirs chirpés qui permettent, grâce à un effet d'interférence entre les couches diélectriques qui le composent, de contrôler ces deux paramètres. Dans notre expérience, nous avons utilisé une paire de prismes et de réseaux afin de compenser les effets de dispersion [Alf89]. Lorsqu'ils sont utilisés dans une certaine géométrie (comme dans la figure 2.5) la paire de prismes et de réseaux permettent, grâce à la différence de chemin optique entre la composante spectrale "rouge" et "bleue" de l'impulsion, de corriger les effets de dispersion. De la même manière que pour un milieu d'indice $n(\lambda)$, on peut obtenir les termes du développement de Taylor associés au déphasage introduit par ces deux "compresseurs". Dans le cas de la paire de réseaux, les termes d'ordre deux et trois s'écrivent :

$$\frac{\partial^2 \Phi}{\partial \omega^2} = \frac{\lambda^3 l_r}{\pi c^2 d^2} \left(1 - \left(\frac{\lambda}{d} - \sin \gamma\right)^2\right)^{-\frac{3}{2}} \quad (2.19)$$

$$\frac{\partial^3 \Phi}{\partial \omega^3} = -\frac{\partial^2 \Phi}{\partial \omega^2} \frac{6\pi\lambda}{c} \frac{(1 + \frac{\lambda}{d} \sin \gamma - \sin^2 \gamma)}{(1 - (\frac{\lambda}{d} - \sin \gamma)^2)} \quad (2.20)$$

où d est le pas du réseau, l_r la distance entre les deux réseaux et γ l'angle d'incidence [Alf89]. Dans le cas d'une paire de prismes, ces deux termes s'écrivent :

$$\frac{\partial^2 \Phi}{\partial \omega^2} = \frac{\lambda^3}{2\pi c^2} \frac{\partial^2 P}{\partial \lambda^2} \quad (2.21)$$

$$\frac{\partial^3 \Phi}{\partial \omega^3} = -\frac{\lambda^4}{4\pi^2 c^3} \left(3 \frac{\partial^2 P}{\partial \lambda^2} + \lambda \frac{\partial^3 P}{\partial \lambda^3}\right) \quad (2.22)$$

où P représente le chemin optique dans le compresseur à prismes. Les dérivées seconde

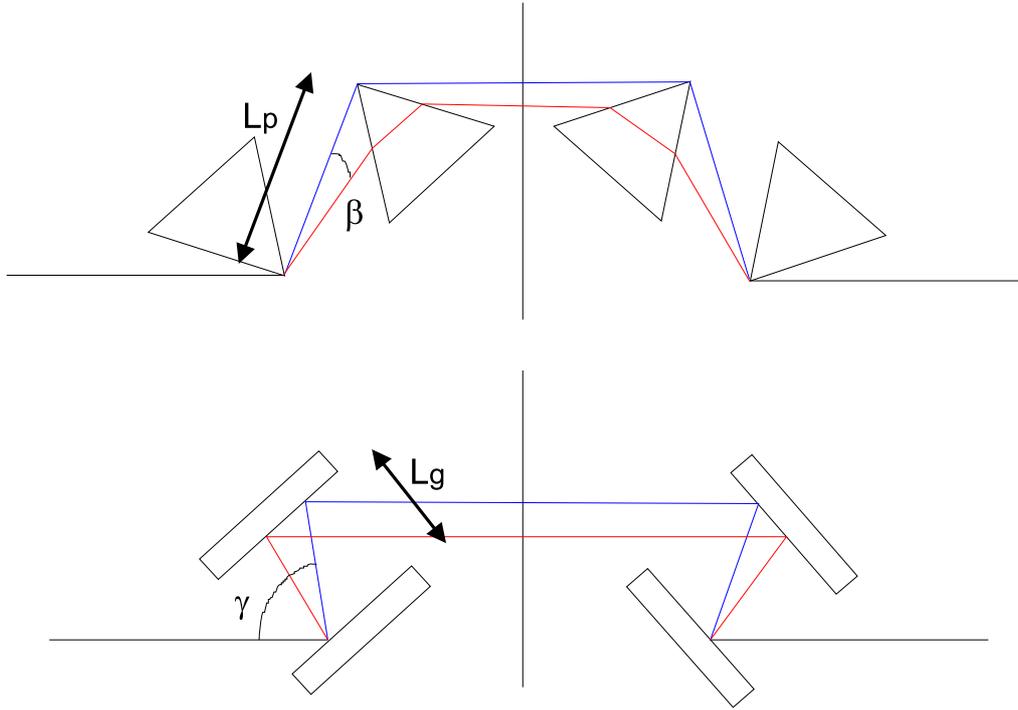


FIG. 2.5 – Dispositifs optiques, à bases de prismes et de réseaux, permettant de compenser les effets de dispersion des impulsions ultracourtes [Alf89].

et troisième du chemin optique sont :

$$\frac{\partial^2 P}{\partial \lambda^2} = 4 \left(\frac{\partial^2 n}{\partial \lambda^2} + \left(2n - \frac{1}{n^3} \right) \left(\frac{\partial n}{\partial \lambda} \right)^2 \right) l_p \sin \beta - 8 \left(\frac{\partial n}{\partial \lambda} \right)^2 l_p \cos \beta \quad (2.23)$$

$$\frac{\partial^3 P}{\partial \lambda^3} = 4 \frac{\partial^3 n}{\partial \lambda^3} l_p \sin \beta - 24 \frac{\partial n}{\partial \lambda} \frac{\partial^2 n}{\partial \lambda^2} l_p \cos \beta \quad (2.24)$$

où l_p est la distance entre les sommets des deux prismes, β l'angle entre le rayon réfracté à la pulsation ω et la ligne joignant les apices des deux prismes [Alf89]. En examinant les expressions des différents ordres pour la paire de réseaux et de prismes, on peut voir que ces deux dispositifs corrigent les ordres deux et trois de manière différente (c.f. tableau suivant) :

Dérivée	Prismes	Réseaux	Matière
$\frac{\partial^2 \Phi}{\partial \omega^2} (f s^2)$	$648-32l_p$	$-3640l_r$	$2900l_m$
$\frac{\partial^3 \Phi}{\partial \omega^3} (f s^3)$	$277-49l_p$	$+3120l_r$	$1620l_m$

Les distances l_p , l_r et l_m sont données en centimètres. Ces valeurs, reportées à titre

d'exemple, sont obtenues dans le cas de prismes en silice fondue (angle au sommet 60° , longueur d'onde centrale 615 nm) et de réseaux ayant 600 traits par millimètre (angle d'incidence 45°) [Alf89]. On remarque qu'il est possible de compenser les effets du deuxième et troisième ordre, en utilisant simultanément une paire de prismes et de réseaux. En particulier, une compensation parfaite du troisième ordre peut être obtenue grâce au signe opposé de la dispersion à l'ordre trois pour la paire de prismes et de réseaux. Notons que, dans le cas de l'oscillateur titane:saphir utilisé dans l'expérience, la compensation de la dispersion de la vitesse de groupe se fait à l'aide d'une double paire de prismes intracavité.

Au cours de ce travail, nous avons été amenés à utiliser ces différents compresseurs afin de réduire la durée de nos impulsions. De plus, dans un souci de modélisation de la dispersion introduite par les différents éléments du montage, nous avons développé une série de programmes qui nous permettent, à partir de la variation d'indice de réfraction des matériaux, d'obtenir les cinq premiers ordres du développement de Taylor de la phase du champ. Nous sommes donc capables de prédire la forme temporelle des impulsions à la sortie du montage et de la corréler aux résultats obtenus grâce aux différentes techniques de caractérisation d'impulsions.

2.1.3 Source laser de l'expérience

La source primaire utilisée dans notre expérience est un oscillateur titane:saphir (Tsunami Spectra-Physics) qui délivre des impulsions de 80 fs pour une puissance moyenne de 600 mW et un taux de répétition d'environ 82 MHz (7.2 nJ/pulse). Le milieu de gain est un barreau de saphir dopé aux ions titane Ti^{3+} . Ce barreau est pompé par un laser continu ($Nd YVO_4$) doublé, qui délivre une puissance moyenne de 5 W et qui émet à 527 nm. Les propriétés de fluorescence du barreau de saphir dopé aux ions Ti^{3+} (large spectre d'émission, fig 2.6) permettent d'amplifier des plages spectrales suffisamment larges (nombre de modes élevé) pour obtenir des impulsions femtosecondes. Typiquement, un oscillateur de ce type est accordable entre 700 et 900 nm. La compensation de la dispersion de la vitesse de groupe se fait à l'aide d'une double paire de prismes (voir fig. 2.7). Ce dispositif permet aussi de faire une sélection en longueur d'onde et en largeur spectrale grâce à une fente

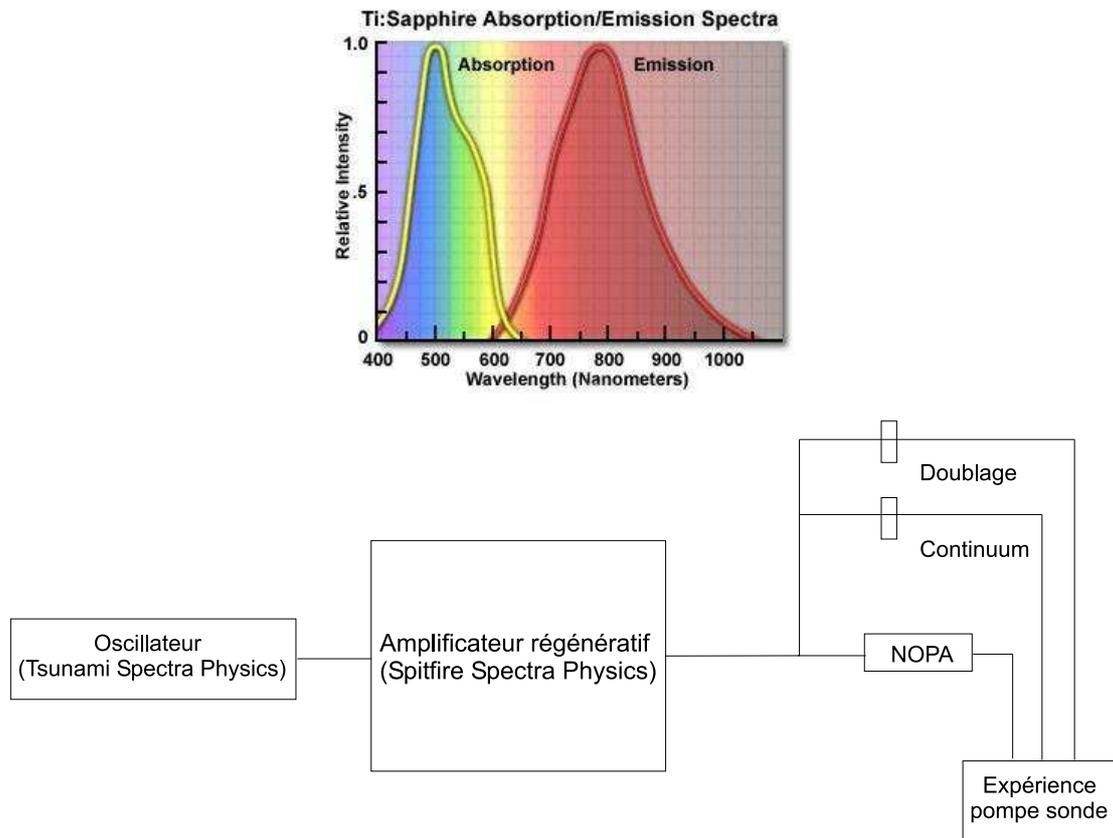


FIG. 2.6 – En haut, spectre d'absorption et d'émission d'un barreau de saphir dopé aux ions Ti^{3+} (site web d'Olympus[©]). En bas, schéma général du montage expérimental.

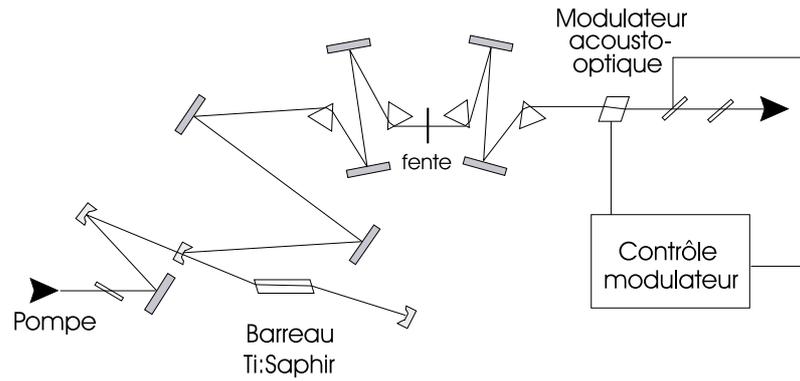


FIG. 2.7 – Schéma de l'oscillateur titane:saphir (*Tsunami Spectra Physics*).

ajustable placée entre les deux paires de prismes. Le blocage de modes se fait de façon passive grâce à la lentille Kerr dans le milieu de gain. Un modulateur acousto-optique est utilisé pour déclencher l'effet Kerr.

Bien que l'oscillateur nous permette de générer des impulsions courtes avec un spectre accordable, la puissance crête des impulsions n'est pas suffisante pour engendrer des effets non-linéaires du type génération de continuum et amplification paramétrique. Il est donc nécessaire d'amplifier ces impulsions (voir fig. 2.6). La technique d'amplification régénérative utilisée dans le montage expérimental (*Spitfire Spectra Physics*) consiste à injecter les impulsions générées par l'oscillateur dans une seconde cavité laser. Le milieu de gain est encore un barreau de saphir dopé aux ions Ti^{3+} pompé par un laser YLF doublé et pulsé (2.5 ou 5 kHz, 527 nm 4 ou 2.5 mJ/pulse). Cette technique d'amplification repose sur un contrôle actif du nombre de passages dans la cavité amplificatrice. En effet, si le nombre de passages est trop élevé, le gain n'arrive plus à compenser les pertes et l'intensité de l'impulsion diminue. Le contrôle du nombre de passages est réalisé grâce à deux cellules de Pockels qui permettent de modifier l'état de polarisation des impulsions et ainsi d'injecter et d'extraire les impulsions de la cavité régénérative. Cependant, afin de ne pas endommager le milieu actif par autofocalisation des impulsions amplifiées, il est nécessaire d'étirer temporellement les impulsions pour diminuer leur intensité crête. Pour cela, un étireur à réseaux [Mar87] est placé avant l'injection de l'impulsion dans la cavité et un compresseur à réseaux réduit la durée temporelle des impulsions amplifiées en sortie. A la sortie de l'amplificateur, nous disposons d'impulsions centrées à 790 nm, d'une durée de 150 fs pour une énergie par impulsions d'environ 200 ou 400 μJ (selon

le taux de répétition du laser de pompe). Le rapport d'amplification vaut $\simeq 20000$ ou 40000 mais le prix à payer est une diminution du taux de répétition (2.5 ou 5 kHz versus 82 MHz).

2.2 Techniques d'optique non-linéaire en régime impulsionnel

Dans cette section, nous allons nous intéresser aux différents phénomènes qui ont permis de générer les impulsions utilisées au cours des expériences. En particulier, nous allons présenter leurs aspect théoriques, en commençant par décrire le phénomène de doublage de fréquence qui est utilisé pour générer les impulsions pompe dans l'expérience sur les protéines GFP et sur les dérivés simples de coumarine. Nous décrirons ensuite le mécanisme de génération de continuum qui permet d'obtenir des impulsions sonde larges spectralement. Afin de pouvoir caractériser la dynamique des états excités des dérivés de coumarine synthétisés à Nancy, nous avons développé une source accordable dans le visible. Le dispositif utilisé est un amplificateur paramétrique optique en géométrie non-colinéaire (Non-collinear Optical Parametric Amplifier NOPA). Nous présenterons plus en détail les aspects théoriques de cette technique car nous n'avons pas toujours trouvé facilement dans la littérature ce type d'informations. La description d'un point de vue théorique de ces différents phénomènes se terminera par une présentation de la technique de spectroscopie utilisée : la technique pompe-sonde. Nous présenterons ensuite le montage expérimental ainsi que les méthodes que nous avons utilisées pour caractériser les impulsions ultra-courtes. Finalement, cette section se terminera par une description de la cellule tournante utilisée dans les différentes expériences et par une présentation du système de détection.

2.2.1 Doublage de fréquence des impulsions pompe

C'est l'expérience de Franken et al. (1961) [FHPW61] qui a démontré la possibilité d'obtenir, par effet non-linéaire, un faisceau à fréquence double (347 nm) en focalisant un laser à rubis (694 nm) dans un cristal de quartz. Dans cette expérience, l'efficacité du processus de doublage était de l'ordre de 10^{-8} . A l'heure actuelle, les cristaux optimisés utilisés en spectroscopie, combinés aux intensités crête élevées des impulsions

ultra-courtes, permettent d'obtenir des efficacités de l'ordre de 50%. Pour modéliser ce processus considérons un champ de la forme :

$$E(z,t) = E_0 e^{i(kz - \omega t)} \quad , \quad (2.25)$$

où n_ω est l'indice de réfraction du milieu à la pulsation ω . Si on se place dans le cas où l'on peut négliger l'atténuation de l'amplitude du champ $E(z,t)_\omega$ et si on considère uniquement le terme d'ordre deux de la polarisation non-linéaire, on peut montrer dans le cadre de l'approximation de l'enveloppe lentement variable que [She02, Big01]:

$$I(2\omega) = \frac{32\pi^3\omega^2}{c^3\varepsilon(\omega)n(2\omega)} |\chi^2(2\omega)|^2 I^2(\omega) l^2 \frac{\sin^2 \frac{\Delta k l}{2}}{(\frac{\Delta k l}{2})^2} \quad , \quad (2.26)$$

où $\varepsilon(\omega) = n^2(\omega)$, l la longueur du cristal et $\Delta k = 2k_\omega - k_{2\omega}$ est le désaccord de phase. On voit que dans le cas où $\Delta k = 0$ l'intensité à 2ω varie comme le carré de l'intensité à ω et comme le carré de l'épaisseur du cristal. La condition d'accord de phase ($\Delta k = 0$) implique que $n(\omega) = n(2\omega)$, cette dernière ne peut être satisfaite dans un milieu à dispersion normale (fig 2.2). Pour satisfaire cette relation, on peut utiliser un cristal biréfringent pour lequel l'indice de l'onde ordinaire à la fréquence ω peut être égal à celui de l'onde extraordinaire à la fréquence 2ω (ou inversement selon l'état de polarisation du faisceau incident par rapport au plan défini par l'axe optique du cristal et le vecteur d'onde \vec{k}). En effet, dans un tel cristal, l'indice extraordinaire dépend de l'angle entre la direction de propagation et l'axe optique du cristal. On peut donc ajuster cette angle pour que $n_e(2\omega, \theta) = n_o(\omega)$ et ainsi maximiser l'efficacité du processus.

Dans le cas où l'accord de phase n'est pas parfait ($\Delta k \neq 0$), on peut montrer que l'intensité à 2ω s'annule pour des épaisseurs de cristal qui sont un multiple de

$$\frac{\lambda}{(n(\omega) - n(2\omega))} \quad . \quad (2.27)$$

En cas d'efficacité élevée, il faut tenir compte de l'atténuation du faisceau à la pulsation ω , $I(2\omega)$ varie alors comme la tangente hyperbolique de l'épaisseur du cristal.

Dans le cas des impulsions courtes, l'intensité crête élevée favorise le processus de doublage mais la condition d'accord de phase ne garantit plus une interaction sur toute la longueur du cristal entre l'impulsion à la fréquence ω et celle à la fréquence 2ω . En fait, les vitesses de groupe à ω et 2ω ne sont pas identiques, ce qui introduit un désaccord de

vitesse de groupe $\Delta v^{-1} = \frac{1}{v_{2\omega}} - \frac{1}{v_{\omega}}$ qui est à l'origine d'une longueur optimale d'interaction $L_{opt} = \frac{|\Delta v|}{\Delta\omega}$ où $\Delta\omega$ est la largeur spectrale de l'impulsion à la pulsation ω . Dans le cas où cette longueur d'interaction est plus courte que la taille du cristal, la condition d'accord de phase ne s'applique plus pour toutes les longueurs d'onde ce qui a pour effet d'élargir la durée des impulsions (ou de rétrécir le spectre). Dans notre expérience, le cristal utilisé pour le doublage de fréquence est un cristal de BBO de 1.5 mm d'épaisseur ($\theta = 29.4^\circ$, géométrie de type I), la longueur d'onde incidente est 790 nm (diamètre du faisceau 5 mm, 30 μJ /pulse, 150 fs) et nous obtenons des impulsions centrées à 395 nm avec une efficacité de conversion l'ordre de 30%.

2.2.2 Auto-modulation de phase pour la génération de l'impulsion sonde

L'impulsion sonde utilisée dans nos expériences correspond à un continuum spectral obtenu par auto-modulation de phase dans un cristal de saphir [Alf89]. Cette sonde nous permet d'accéder, comme nous allons le voir dans la section 2.2.4, à l'évolution temporelle de la polarisation non-linéaire $P^{(3)}(\omega_s, \tau)$ sur une large gamme de fréquences et donc d'obtenir des informations sur la relaxation des populations électroniques.

La possibilité d'élargir le spectre d'une impulsion a été découverte dans les années soixante par les pionniers de l'optique non-linéaire [BL66, AS70]: cet effet résulte de l'interaction entre une impulsion laser et le milieu dans lequel elle se propage. De façon analogue au cas de l'autofocalisation (2.1.1), cet élargissement spectral est dû à un effet non-linéaire du troisième ordre (effet Kerr). En effet, un champ pulsé intense va induire une dépendance en intensité de l'indice du milieu qui va à son tour modifier la phase du champ incident :

$$n(r,t) = n_0 + I(r,t)n_2 \quad (2.28)$$

L'indice du milieu (dans le cas où le deuxième terme n'est plus négligeable par rapport au premier) va donc dépendre à la fois du profil spatial et temporel des impulsions. Autrement dit, la variation de l'indice de réfraction va induire une modulation temporelle et spatiale de la phase du champ. D'un point de vue microscopique, ce sont les modifications des fonctions d'ondes électroniques ou les déplacements des niveaux qui peuvent être à l'origine des modifications de l'indice de réfraction dans les solides. D'autres phéno-

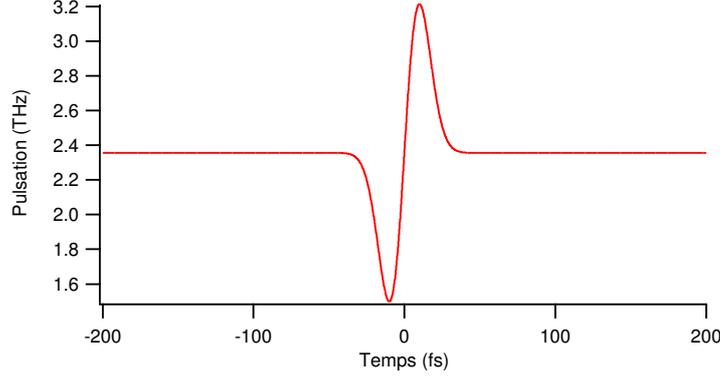


FIG. 2.8 – Exemple de variation de fréquence instantanée induite par l'interaction entre le champ électrique et le milieu. $\lambda_0 = 800 \text{ nm}$, $\tau_0 = 100 \text{ fs}$, $z = 2 \text{ mm}$, $n_2 = 1 \times 10^{-15} \text{ esu}$ et $a_0^2 = 9.10^{12} \text{ V}^2/\text{m}^2$.

mènes, comme la diffusion Raman stimulée ou encore le mélange à quatre ondes, peuvent contribuer à l'élargissement spectral, en plus du phénomène d'auto-modulation de phase.

En considérant une impulsion avec une enveloppe gaussienne dont le champ électrique est polarisé linéairement et dans le cadre de l'approximation de l'enveloppe lentement variable, Alfano et al. [Alf89] ont montré que le shift en fréquence est donné par la relation suivante :

$$\omega(\tau) = \omega_0 \left(1 + \frac{2n_2 a_0^2 z}{c\tau_0^2} \tau e^{-2(\frac{\tau}{\tau_0})^2} \right) \quad (2.29)$$

où ω_0 est la pulsation centrale, $n_2 = \frac{2\pi}{n_0} \chi^{(3)}(\omega)$ est l'indice de réfraction non-linéaire du milieu, a_0 est l'amplitude du champ, z l'épaisseur du matériau et τ_0 la durée de l'impulsion. La figure (2.8) donne un exemple d'élargissement spectral d'une impulsion sub-picoseconde traversant un milieu ayant un indice non-linéaire de l'ordre de 10^{-15} esu [Alf89]. L'équation (2.29) montre que l'élargissement spectral est proportionnel à la distance z parcourue dans le matériau, la pulsation ω_0 et l'indice non-linéaire du milieu (on peut donc augmenter l'effet dans un matériau ayant un $\chi^{(3)}$ élevé). Mais la meilleure façon d'accroître l'élargissement est encore d'augmenter l'amplitude a_0^2 , ce qui revient à diminuer la durée de l'impulsion. Cependant lorsque l'intensité est trop élevée, on peut induire, en plus de l'endommagement du matériau, de la multi-filamentation qui conduit à l'apparition d'inhomogénéités (points chauds) dans le profil spatial du faisceau. Cet effet rend alors les impulsions inutilisables pour des expériences résolues en temps.

2.2.3 Principe de l'amplificateur paramétrique optique en géométrie non-colinéaire

[She02, Big01, CNSS98, GCH98, CS03]

Dans cette partie, nous allons décrire le dispositif expérimental qui nous a permis de générer des impulsions pompes accordables dans le visibles (500-700 nm) d'une durée de l'ordre de 20 fs. Dans un premier temps, nous présenterons le principe de l'amplification paramétrique dans un cristal non-linéaire (BBO géométrie de type I, puisque c'est celui utilisé dans le montage expérimental) puis nous examinerons les conditions nécessaires à l'amplification sur une large bande spectrale (géométrie non-colinéaire).

L'amplification paramétrique est un processus du second ordre qui résulte de l'interaction de trois champs électriques dans un milieu non-centrosymétrique ($\chi^{(2)} \neq 0$). Dans le cas de la génération de seconde harmonique, nous avons vu que deux photons de pulsation ω pouvaient donner lieu, via un processus du second ordre, à un photon de pulsation $2\omega = \omega + \omega$. Ce formalisme peut se généraliser au cas où les trois champs ont des pulsations différentes : $\omega_3 = \omega_1 \pm \omega_2$. Deux photons ω_1 et ω_2 peuvent donc générer par somme ou différence de fréquences un photon à ω_3 . De même, on peut obtenir à partir d'un photon à ω_3 deux photons d'énergie plus faible. C'est sur ce principe que repose la technique de l'amplification paramétrique. Lors de la propagation d'un faisceau intense (pompe) de pulsation ω_3 dans un milieu non-centrosymétrique, l'interaction non-linéaire va donner lieu à la génération de champs de pulsation ω_1 et ω_2 respectivement appelés faisceaux signal et complémentaire. Dans notre expérience, un faisceau pompe ($\lambda = 395$ nm) qui se propage dans un cristal non-linéaire va spontanément donner lieu à des photons visibles (signal) et infrarouges (complémentaire). Ce phénomène, qui n'apparaît que lors de l'accord de phase $\Delta k = 0$, est appelé fluorescence paramétrique. Imaginons maintenant qu'il se propage, en plus du faisceau pompe intense, un deuxième faisceau visible de faible intensité superposé temporellement au faisceau pompe; ce dernier verra alors son intensité augmentée via l'interaction non-linéaire avec le faisceau pompe. Dans le cadre de l'approximation de l'enveloppe lentement variable et en ne tenant compte que des termes d'ordre deux en champ, les équations de propagation des champs transverses aux pulsations ω_1 , ω_2 et ω_3 s'écrivent :

$$\frac{\partial E_1}{\partial z} = i \frac{2\pi\omega_1^2}{k_1 c^2} \chi^{(2)}(\omega_1; -\omega_2, \omega_3) E_2^*(-\omega_2) E_3(\omega_3) e^{i\Delta k z} \quad (2.30)$$

$$\frac{\partial E_2}{\partial z} = i \frac{2\pi\omega_2^2}{k_2 c^2} \chi^{(2)}(\omega_2; -\omega_1, \omega_3) E_1^*(-\omega_1) E_3(\omega_3) e^{i\Delta k z} \quad (2.31)$$

$$\frac{\partial E_3}{\partial z} = i \frac{2\pi\omega_3^2}{k_3 c^2} \chi^{(2)}(\omega_3; \omega_1, \omega_2) E_1(\omega_1) E_2(\omega_2) e^{-i\Delta k z} \quad (2.32)$$

où $\Delta k = k_1 + k_2 - k_3$. Plaçons-nous maintenant dans l'approximation où le faisceau pompe n'est pas atténué $\frac{\partial E_3}{\partial z} = 0$, où les faisceaux signal et complémentaire ne sont pas absorbés par le milieu et où le champ $E_1(0) \neq 0$. On peut alors montrer que :

$$E_1(z) = E_{10}(\cosh(\alpha z) - i \frac{\Delta k}{2\alpha} \sinh(\alpha z)) e^{\frac{i\Delta k z}{2}} \quad (2.33)$$

et

$$E_2(z) = i E_{10} \frac{2\pi\omega_2^2}{k_2 c^2 \alpha} \chi^{(2)}(\omega_2; -\omega_1, \omega_3) E_3 \sinh(\alpha z) e^{\frac{i\Delta k z}{2}} \quad (2.34)$$

où $\alpha = \sqrt{K_1 K_2 - (\frac{\Delta k}{2})^2}$ et $K_{1,2} = \frac{2\pi\omega_{1,2}^2}{k_{1,2} c^2} \chi^{(2)}(\omega_{1,2}; -\omega_{2,1}, \omega_3) E_3$. Le coefficient α est appelé gain paramétrique effectif, il est donc au maximum égal à :

$$\sqrt{\frac{4\pi^2\omega_1^2\omega_2^2}{k_1 k_2 c^4} \chi^{(2)} |E_3|^2} \quad (2.35)$$

dans le cas où le milieu a une symétrie cubique et où la condition d'accord de phase est satisfaite ($\Delta k = 0$). Dans la limite où $\alpha z \gg 1$, l'amplitude des champs aux pulsations ω_1 et ω_2 est proportionnelle à $e^{\alpha z}$.

Afin de maximiser l'amplitude du faisceau signal, il faut se placer dans des conditions pour lesquelles $\Delta k \rightarrow 0$. Autrement dit, il faut que $\vec{k}_p = \vec{k}_s + \vec{k}_c$ avec comme autre condition la conservation de l'énergie $\omega_p = \omega_s + \omega_c$. Dans le cas d'un cristal uniaxial négatif (BBO utilisé dans l'expérience, configuration de type I), les polarisation des faisceaux signal et complémentaire sont perpendiculaires à la polarisation du faisceau pompe. Dans cette configuration le faisceau pompe est polarisé selon l'axe extraordinaire et les faisceaux signal et complémentaire sont polarisés selon l'axe ordinaire du cristal biréfringent (e \rightarrow o+o). Pour ajuster la valeur de Δk , on fait varier l'indice extraordinaire vu par le faisceau pompe. Pour cela, on ajuste l'angle entre l'axe optique et \vec{k}_p car les lois de l'optique cristalline montrent que, dans le cas d'un cristal uniaxial négatif, l'indice extraordinaire est lié à cet angle par la relation suivante :

$$\frac{1}{n_{extra}^2(\theta, 2\omega)} = \frac{\cos^2 \theta}{n_{ord}^2(\omega)} + \frac{\sin^2 \theta}{n_{extra}^2(\omega)} \quad (2.36)$$

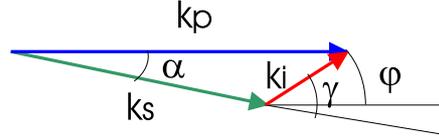


FIG. 2.9 – Schéma de la configuration d'amplification paramétrique en géométrie non-colinéaire.

où θ est l'angle entre l'axe optique et \vec{k}_p et n_{ord} et n_{extra} sont les indices ordinaire et extraordinaire à la pulsation ω . Si maintenant on s'intéresse à la génération ou à l'amplification d'impulsions courtes, il faut prendre en compte la largeur spectrale des impulsions qui devient non-négligeable. Autrement dit, il faut que la condition d'accord de phase, qui est donnée par l'angle θ , varie très peu autour de la longueur d'onde centrale de l'impulsion. Deux cas sont alors à considérer :

- la configuration en géométrie colinéaire
- et la configuration en géométrie non-colinéaire (fig. 2.9).

Dans le premier cas, l'indice extraordinaire vu par le faisceau pompe doit être égal à l'expression suivante pour satisfaire la condition d'accord de phase :

$$n_p^e = \frac{\lambda_p}{\lambda_s} n_s^o + \frac{\lambda_s - \lambda_p}{\lambda_s} n_c^o \quad (2.37)$$

où n_p^e est l'indice extraordinaire vu par la pompe, n_s^o et n_c^o sont les indices ordinaires vus par le signal et le complémentaire et λ_p , λ_s et λ_c sont les longueurs d'onde de la pompe, du signal et du complémentaire.

Dans la configuration en géométrie non-colinéaire (fig 2.9), la relation d'accord de phase s'écrit en projetant sur \vec{k}_p :

$$\begin{cases} k_p = k_s \cos \alpha + k_i \cos \varphi \\ 0 = -k_s \sin \alpha + k_i \sin \varphi \end{cases} \quad (2.38)$$

où α est l'angle entre \vec{k}_p et \vec{k}_s et φ l'angle entre \vec{k}_p et \vec{k}_c . Dans cette configuration, l'indice extraordinaire vu par le faisceau pompe vaut :

$$n_p^e = \frac{\lambda_p}{\lambda_s} n_s^o \cos \alpha + \lambda_p \sqrt{\left(\frac{\lambda_s - \lambda_p}{\lambda_s \lambda_p} n_c^o\right)^2 - \left(\frac{n_s^o}{\lambda_s}\right)^2 \sin^2 \alpha} \quad (2.39)$$

Il reste maintenant à déterminer la valeur de l'angle α , pour cela on fait l'hypothèse suivante : Δk indépendant de ω_s (c'est à priori ce que l'on cherche), autrement dit :

$$\frac{\partial \Delta k}{\partial \omega_s} = 0 \quad (2.40)$$

Dans l'expérience, \vec{k}_p et α sont constants, on obtient donc en projetant sur \vec{k}_s :

$$\begin{cases} 0 = \frac{\partial k_s}{\partial \omega_s} + \frac{\partial k_c}{\partial \omega_c} \frac{\partial \omega_c}{\partial \omega_s} \cos \gamma + k_i \frac{\partial \cos \gamma}{\partial \gamma} \frac{\partial \gamma}{\partial \omega_s} \\ 0 = \frac{\partial k_c}{\partial \omega_c} \frac{\partial \omega_c}{\partial \omega_s} \sin \gamma + k_i \frac{\partial \sin \gamma}{\partial \gamma} \frac{\partial \gamma}{\partial \omega_s} \end{cases} \quad (2.41)$$

avec $\frac{\partial k_i}{\partial \omega_i} = \frac{1}{v_i}$ où v_i est la vitesse de groupe du faisceau i . A partir du système précédent, on obtient facilement la relation suivante :

$$v_s = v_c \cos \gamma \quad . \quad (2.42)$$

Cette relation montre que Δk varie peu avec ω_s si l'angle entre le signal et le complémentaire est tel que la projection de v_c sur v_s est égale à v_s . Dans la géométrie non-colinéaire, les enveloppes du signal et du complémentaire sont toujours en coïncidence temporelle; cela permet d'éviter un élargissement temporel et de conserver un gain d'amplification plus important que dans le cas de la géométrie colinéaire (désaccord des vitesses de groupe). En utilisant la relation 2.42, on peut déterminer l'angle α qui satisfait la relation 2.40 :

$$\alpha = \arctan \frac{n_c^o \sqrt{1 - \beta^2}}{\frac{n_s^o \lambda_p}{\lambda_s - \lambda_p} + n_c^o \beta} \quad (2.43)$$

où $\beta = \frac{v_s}{v_c}$. La figure (2.10) montre la dépendance de l'angle α en fonction de la longueur d'onde du signal pour deux longueurs d'onde de pompe différentes dans le cas du BBO (coefficients de Sellmeier obtenus sur le site web de Eksma[©] : <http://www.eksma.lt/en>). On se place maintenant à la longueur d'onde pour laquelle l'angle α varie peu avec la longueur d'onde du signal (i.e. 500 nm pour $\lambda_p = 330 \text{ nm}$ et 600 nm pour $\lambda_p = 395 \text{ nm}$). On peut alors obtenir, à partir de la relation 2.39, la valeur de l'angle θ entre l'axe optique du cristal et \vec{k}_p pour laquelle $\Delta k = 0$ (fig 2.11). A titre de comparaison, nous avons rajouté sur les graphiques de la figure 2.11 la variation de l'angle θ en géométrie colinéaire. Ces figures illustrent bien le fait qu'en géométrie non-colinéaire, l'angle θ qui satisfait la condition d'accord de phase varie très peu avec la longueur d'onde du signal autour d'une longueur d'onde donnée. On a donc tout intérêt à travailler en géométrie non-colinéaire pour obtenir des impulsions amplifiées larges spectralement. Finalement, on peut représenter la condition d'accord de phase normalisée à $\frac{\pi}{L}$ où L est la longueur du cristal. La condition d'accord de phase, en fonction de l'angle α et de la longueur

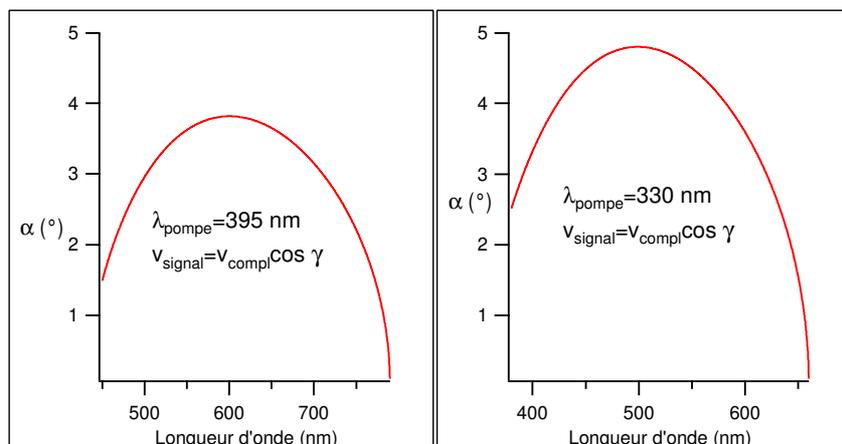


FIG. 2.10 – Variation de l'angle α en fonction de la longueur d'onde de la sonde pour deux longueurs d'onde de pompe différentes (BBO géométrie de type I, $L=1 \text{ mm}$). Ces courbes sont obtenues dans la configuration où $v_s = v_c \cos \gamma$ est vérifiée.

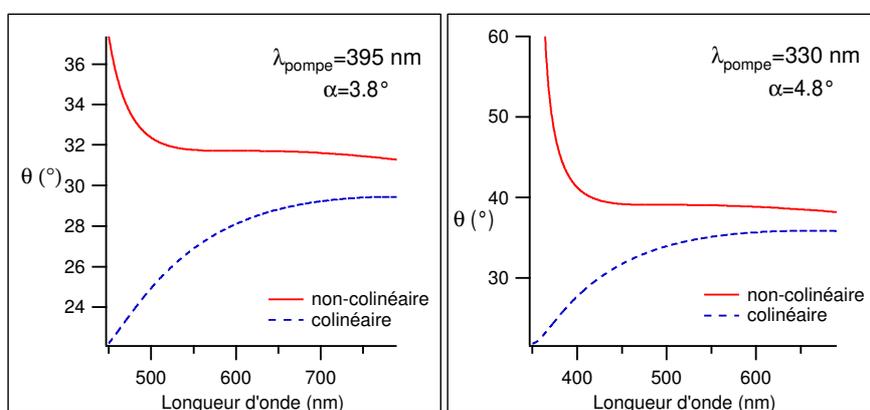


FIG. 2.11 – Variation de l'angle θ , qui satisfait la condition d'accord de phase pour un cristal de BBO (géométrie de type I, 1 mm d'épaisseur), en fonction de la longueur d'onde du signal pour deux longueurs d'onde de pompe différentes. Ces courbes sont obtenues à partir de la relation 2.37 (colinéaire) et 2.39 (non-colinéaire).

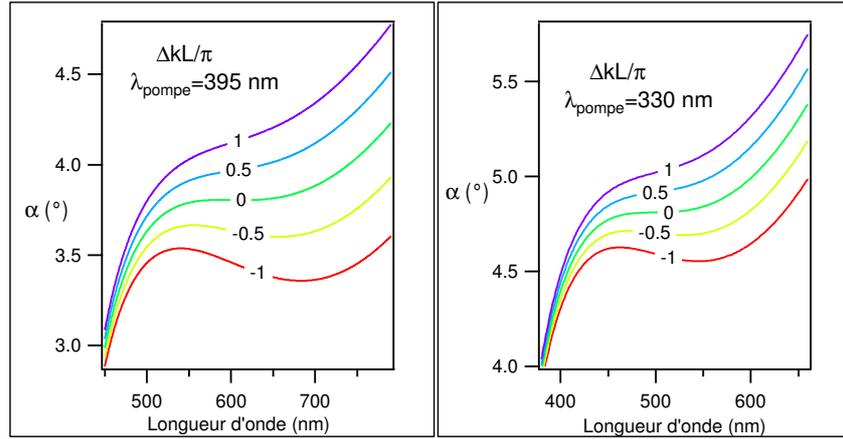


FIG. 2.12 – Condition d'accord de phase normalisée (BBO géométrie de type I, $L=1$ mm) en fonction de l'angle α entre le signal et la pompe et de la longueur d'onde du signal. $\lambda_p = 395$ nm correspond à un angle θ de 31.7° et $\lambda_p = 330$ nm à un angle θ de 39° .

d'onde du signal, est représentée sur la figure 2.12. Les deux conditions nécessaires à une amplification d'impulsions larges spectralement et à un gain paramétrique élevé sont :

- $\frac{\Delta kL}{\pi}$ indépendant de la longueur d'onde du signal
- et $|\frac{\Delta kL}{\pi}| < 1$.

La figure 2.12 illustre bien le fait que la valeur de l'angle α est très critique puisqu'il suffit que cet angle varie de 1° pour diminuer fortement le gain d'amplification sur une large bande spectrale. Dans le dispositif expérimental, le faisceau pompe est centré à 395 nm. En choisissant un angle α égal à 3.8° , on remarque que la bande d'amplification autour de 600 nm est de plus de 200 nm. A titre de comparaison, un faisceau pompe centré à 330 nm avec un angle α égal à 4.8° permettrait d'amplifier une plage spectrale de 150 nm autour de 500 nm. En dernier lieu, signalons que la bande passante de l'amplificateur est inversement proportionnelle à la racine carré de l'épaisseur du cristal. Il faut donc trouver un bon compromis entre le gain d'amplification qui varie comme $e^{\alpha L_c}$ ($\alpha L_c \gg 1$) et la bande passante ($\propto \frac{1}{\sqrt{L_c}}$). Dans notre cas, nous avons utilisé un cristal de BBO de 1 mm d'épaisseur.

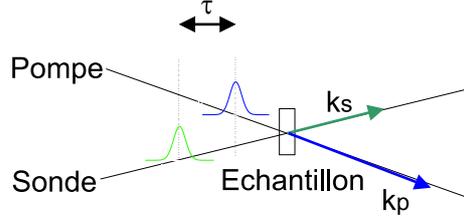


FIG. 2.13 – Schéma de principe de l'expérience pompe-sonde. Le système est excité par l'impulsion pompe et la caractérisation de la dynamique des états excités se fait par la mesure de la variation de transmission de l'impulsion sonde.

2.2.4 Signal mesuré dans une expérience pompe-sonde [Pha96, Muk95, SD92]

La technique pompe-sonde est l'une des techniques plus couramment utilisées en spectroscopie résolue en temps. L'idée de base de cette technique réside dans la mesure des variations de transmission et/ou de réflexion d'un échantillon induites par un faisceau pompe et mesurées par un faisceau sonde retardé. La figure 2.13 est un schéma de principe de cette technique. Le signal mesuré dans un expérience pompe-sonde (transmission différentielle) s'écrit :

$$\frac{\Delta T}{T} = \frac{I_t^p - I_t^0}{I_t^0} \quad (2.44)$$

où I_t^p et I_t^0 sont les intensités de sonde transmises en présence et en absence du faisceau pompe. Le signal de transmission différentielle dépend du retard entre la pompe et la sonde ainsi que des pulsations ω_p et ω_s . Du point de vue de l'optique non-linéaire la configuration pompe-sonde est un cas particulier du mélange à quatre ondes. Ce signal est un processus non-linéaire du troisième ordre qui fait intervenir susceptibilité $\chi^{(3)}$ et qui peut se produire dans tous les milieux sans conditions de symétrie particulière. Considérons la polarisation du troisième ordre du milieu avec $\chi^{(3)}$ la susceptibilité d'ordre 3 du milieu et $E_p(\omega_p)$, $E_s(\omega_s)$ les transformées de Fourier des champs associés à la pompe et la sonde. Dans l'expression totale de la polarisation du troisième ordre il apparaît plusieurs termes, mais comme le signal mesuré est la variation de transmission de la sonde, on ne s'intéresse qu'aux termes $\propto k_s$. Il ne restera donc que les termes du type $E_p E_p^* E_s$ et $E_s E_s^* E_s$ (plus les permutations entre p, p et s et les complexes conjugués); on remarque alors que le second terme est négligeable par rapport au premier qui est proportionnel à l'intensité du faisceau pompe I_p (faisceau intense dans une expérience).

Dans ce cas particulier, la polarisation du troisième ordre s'écrit :

$$P^3(\omega_s) = \sum_{i,j,k} \frac{\varepsilon_0 \chi^{(3)}(\omega_s; \omega_i, \omega_j, \omega_k)}{8} E_i(\omega_i) E_j^*(\omega_j) E_k(\omega_k) + c.c. \quad (2.45)$$

où i, j et k cas peuvent être égaux à p (pompe) ou s (sonde) avec la condition d'avoir toujours deux champs pompes.

Dans le cas d'un milieu peu absorbant, on peut montrer que la variation de transmission du faisceau sonde s'écrit :

$$\frac{\Delta T}{T}(\omega_s, \tau) \cong -\Delta\alpha(\omega_s, \tau)d \quad (2.46)$$

où d est l'épaisseur de l'échantillon, ω_s la pulsation de l'impulsion sonde, τ le retard entre la pompe et la sonde et $\Delta\alpha(\omega_s, \tau) = \alpha_t^p(\omega_s, \tau) - \alpha_t^0(\omega_s)$ la variation d'absorption du milieu. Comme l'absorption d'un milieu peu absorbant est proportionnelle à la partie imaginaire de la susceptibilité, on obtient la relation suivante :

$$\frac{\Delta T}{T}(\omega_s, \tau) \propto \text{Im}\left(\frac{P^{(3)}(\omega_s, \tau)}{\varepsilon_s(\omega_s)}\right) \quad (2.47)$$

où $\varepsilon_s(\omega_s)$ est la transformée de Fourier de l'enveloppe de l'impulsion sonde.

Si on développe maintenant $P^{(3)}(\omega_s, \tau)$, en tenant compte des permutations entre ω_p , $-\omega_p$ et ω_s , on peut montrer que $P^{(3)}(\omega_s, \tau)$ se décompose en trois termes :

- un terme du type $\omega_s, \omega_p(-\omega_p), -\omega_p(\omega_p)$ (cette série signifie que le milieu va d'abord interagir avec deux photons pompe puis avec un photon sonde). Ce terme contient une partie proportionnelle à l'inversion de population induite par la pompe qui décroît avec la durée de vie (T_1) de l'état excité. Dans le cas où la pompe est suffisamment large spectralement, on doit tenir compte, en plus du terme précédent, d'un terme de cohérence induite entre les niveaux vibrationnels de l'état excité. Ce terme décroît avec la durée de cohérence ($T_{2\nu}$) entre les états vibrationnels du niveau excité.
- un terme du type $\omega_p(-\omega_p), \omega_s, -\omega_p(\omega_p)$ qui décrit l'interaction d'une seconde impulsion pompe avec le réseau transitoire créé par l'interférence entre la polarisation induite par la première impulsion pompe et l'impulsion sonde. Ce terme, appelé terme cohérent, n'existe que lors de la superposition temporelle des impulsions.

- et un terme du type $\omega_p(-\omega_p), -\omega_p(\omega_p), \omega_s$ qui correspond à la perturbation de la polarisation de la pompe induite par la sonde. Ce terme est non nul uniquement quand la sonde précède la pompe. Ce terme est fonction de la constante de déphasage électronique T_{2e} et s'annule dans le cas d'un élargissement inhomogène.

Dans notre expérience pompe-sonde, le signal que nous mesurons nous permet uniquement, de par la largeur spectrale de la pompe, d'observer la dynamique des populations électroniques ainsi que le terme cohérent à retard nul.

2.2.5 Configuration expérimentale

Expérience pompe bleue - sonde continuum

Dans la première série d'expériences réalisées sur le protéine fluorescente verte, sur les fusions GFP anticorps et sur certains dérivés de coumarine, nous nous sommes placés dans la configuration où les impulsions pompe sont obtenues par doublage de fréquence dans un cristal non-linéaire (Beta Borate de Barium, BBO). Nous avons donc réalisé ces expériences avec une pompe centrée à 395 nm d'une durée d'environ 200 fs. A cette longueur d'onde, nous sommes en mesure d'exciter la GFP dans la bande d'absorption qui correspond à la forme neutre du chromophore [Tsi98] et ainsi d'induire le transfert de proton dans l'état excité [CKBB96]. Il en est de même pour les fusions génétiques. Cette longueur d'onde est aussi utilisable pour étudier la dynamique des états excités de certains dérivés de coumarine qui possèdent des bandes d'absorption $S_0 \rightarrow S_1$ centrées autour de 400 nm dans différents solvants.

Dans la pratique (voir fig. 2.14), les deux faisceaux (pompe bleue et sonde blanche) sont obtenus en séparant en deux parties les impulsions délivrées par l'amplificateur régénératif. La majeure partie de l'énergie ($\simeq 30\mu J$ /pulse) est utilisée pour générer les impulsions pompe par doublage de fréquence dans un BBO de 1.5 mm d'épaisseur. L'autre partie du faisceau ($\simeq 1\mu J$ /pulse) est focalisée (diamètre du faisceau incident 5 mm et distance focale de la lentille 100 mm) dans un cristal de saphir (épaisseur 2 mm, orienté 0001) pour générer un continuum spectral par auto-modulation de phase. Ce continuum s'étend de 450 à $\simeq 1100$ nm à cause de l'élargissement presque symétrique de part et d'autre de la longueur d'onde centrale (790 nm). Dans notre expérience, nous avons uniquement

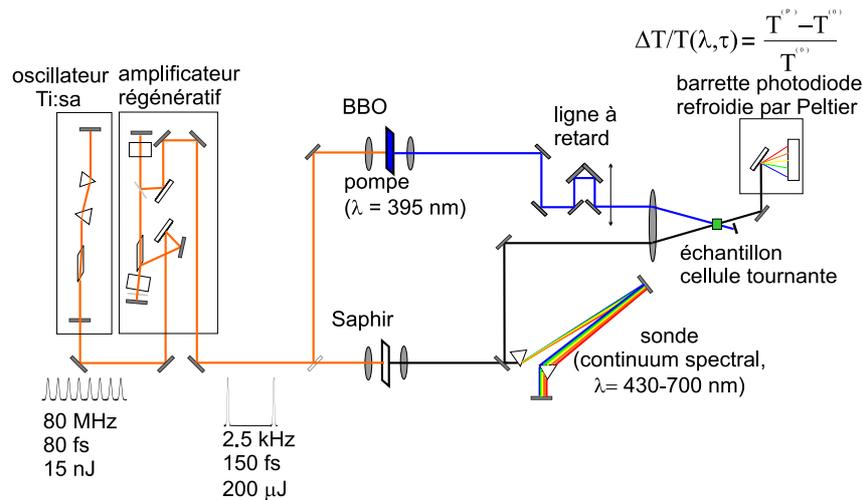


FIG. 2.14 – Schéma de l'expérience pompe (bleue) sonde (blanche). Les faisceaux pompe et sonde sont obtenus par doublage de fréquence dans un cristal de BBO (1.5 mm) et par auto-modulation de phase dans un cristal de saphir (2 mm). Après compensation de la dispersion de la vitesse de groupe de la sonde, les deux faisceaux sont focalisés à l'aide d'un miroir parabolique hors d'axe (90° , $f=38.7$ mm) sur une cellule tournante qui contient l'échantillon. La variation de transmission différentielle est mesurée, après avoir dispersé le faisceau sonde dans un spectromètre, par une barrette de photodiodes refroidie par Peltier

utilisé la partie visible du spectre (450-700 nm). La dispersion de la vitesse de groupe du faisceau sonde est partiellement compensée par un double passage dans un compresseur à prismes (les longueurs d'onde comprises entre 450 et 700 nm arrivent en moins de 1.2 ps sur l'échantillon). Une fente placée devant le miroir de repliement du compresseur nous permet de faire une sélection spectrale sur la sonde (notamment d'éliminer la longueur d'onde centrale qui reste très intense après la génération de continuum). Après le passage du faisceau pompe par une ligne à retard, les deux faisceaux sont focalisés par un miroir parabolique, hors d'axe (90°) de 38.7 mm de focal, sur une cellule tournante qui contient l'échantillon. L'utilisation d'éléments optiques en réflexion nous permet de minimiser la dispersion de la vitesse de groupe de l'impulsion sonde. Nous mesurons ensuite la variation de transmission de la sonde en fonction du retard entre la pompe et la sonde et de la longueur d'onde. Les spectres de transmission différentielle sont obtenus en dispersant le faisceau sonde dans un spectromètre (1.2 nm de résolution) et en enregistrant l'intensité spectrale de la sonde avec une barrette de photodiode refroidie par un Peltier.

Expérience NOPA-continuum

Dans le montage expérimental que nous avons développé (fig 2.15), le faisceau pompe, centré à 395 nm, est obtenu par génération de seconde harmonique dans un cristal de BBO dans une configuration de type I ($L=1.5$ mm, $\theta = 29.4^\circ$). Le faisceau signal est un continuum spectral obtenu par auto-modulation de phase dans un cristal de saphir ($L=2$ mm, orienté 0001) en focalisant une faible portion de l'énergie incidente ($\simeq 1\mu J/\text{pulse}$) à l'aide d'une lentille en silice ($f=100$ mm). Afin de minimiser la dispersion de la vitesse de groupe liée à la propagation dans les différents éléments optiques, nous avons utilisé un miroir sphérique ($f=60$ mm) pour re-focaliser le continuum spectral dans le second cristal de BBO. En effet, comme l'amplification n'a lieu que lors de la superposition temporelle des impulsions pompe et signal, il faut absolument que la dispersion ne soit pas trop importante pour amplifier de larges bandes spectrales (à cause de l'élargissement temporel). Le faisceau pompe passe à travers une ligne à retard et est focalisé dans le second cristal de BBO. En fait nous nous plaçons dans une situation où le cristal de BBO est positionné après le waist du faisceau bleu pour ne pas endommager le cristal. De plus, la lentille de

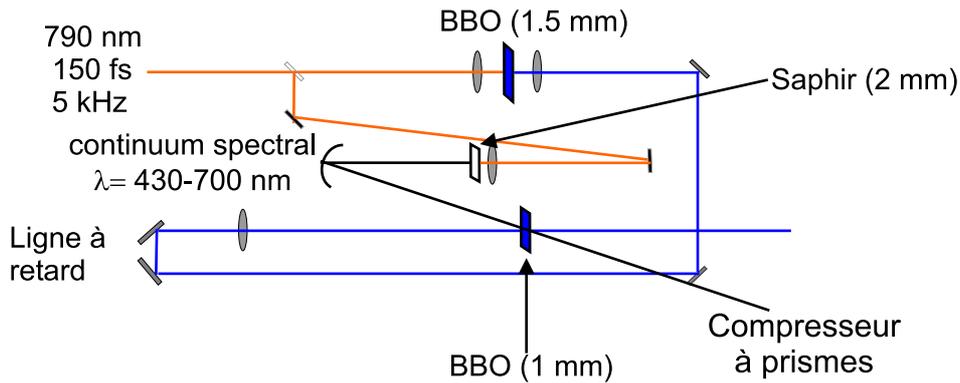


FIG. 2.15 – Schéma de l'amplificateur paramétrique optique en géométrie non-colinéaire. Le faisceau pompe est obtenu par doublage dans un BBO de 1.5 mm d'épaisseur ($\theta = 29.4^\circ$). Le signal correspond à un continuum spectral obtenu par auto-modulation de phase dans un saphir de 2 mm d'épaisseur (orienté 0001). L'amplification a lieu dans un autre cristal de BBO de 1 mm d'épaisseur ($\theta = 29^\circ$) et l'angle externe entre la pompe et le signal est de 6.35° .

focalisation ainsi qu'une translation placée sur l'axe perpendiculaire à celui de la ligne à retard permettent de régler l'angle entre la pompe et le signal. Ces deux faisceaux interagissent dans un cristal de BBO (type I, $L=1$ mm, $\theta = 29^\circ$) pour donner lieu à de l'amplification paramétrique sur le signal. La géométrie choisie est donc une géométrie non-colinéaire à un seul passage avec un angle externe entre la pompe et le signal égal à 6.35° (3.8° à l'intérieur du cristal).

La première condition expérimentale requise concerne le mode spatial des faisceaux dans le BBO. En effet, les deux faisceaux sont faiblement focalisés dans le cristal. Tout d'abord pour éviter les problèmes d'endommagement liés à une intensité crête trop importante mais aussi pour permettre un bon recouvrement des modes spatiaux des deux faisceaux. Nous avons remarqué de façon empirique que ce dernier point était crucial pour une bonne amplification. Il faut en effet que les deux faisceaux aient une divergence comparable pour obtenir un gain optimal; cette condition est plus facile à obtenir expérimentalement dans le cas de faisceaux faiblement divergents. Il a ensuite fallu faire face à un second problème lié à l'utilisation du miroir sphérique sur le continuum spectral, car dès que l'on ne se trouve plus en incidence normale, ce dernier introduit de l'astigmatisme. Nous avons donc dû utiliser un second miroir sphérique pour compenser l'astigmatisme

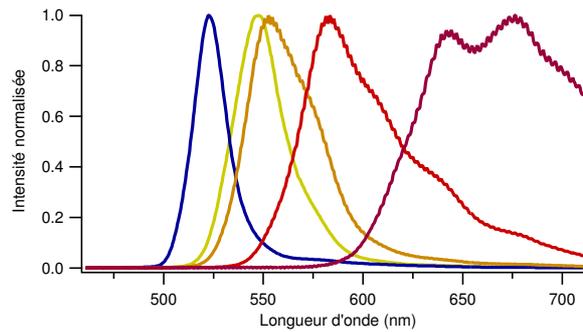


FIG. 2.16 – Exemple de spectres obtenus après amplification paramétrique dans le BBO de 1 mm d'épaisseur.

introduit par le premier. Pour cela l'astuce consiste à envoyer le faisceau dans un plan perpendiculaire au plan de la table, dans lequel se fait l'amplification. La figure 2.16 représente un ensemble de spectres obtenus après amplification paramétrique dans le cristal de BBO. L'énergie par impulsion est de l'ordre de $0.8 \mu\text{J}/\text{pulse}$ (juste avant l'échantillon et après recompression) pour une pompe de $20 \mu\text{J}/\text{pulse}$. Les différents spectres ont été obtenus en modifiant le retard entre la pompe et le signal, l'angle d'accord de phase et l'angle entre la pompe et le signal.

Pour compenser la dispersion de la vitesse de groupe introduite par le processus de génération de continuum et par le cristal de BBO, nous avons utilisé un simple compresseur à prismes en silice fondue. Pour donner un ordre de grandeur des durées théoriques que l'on peut espérer avec les impulsions délivrées par le NOPA, on peut effectuer une transformée de Fourier inverse sur les spectres précédents. Le résultat de cette opération montre que les impulsions amplifiées ont des transformées limites qui ont un profil temporel gaussien avec des durées de l'ordre de 20 fs car dans notre dispositif, nous avons effectué un pré-filtrage en fréquence parce que la simple paire de prismes ne permet pas une compensation parfaite à tous les ordres de la phase spectrale introduite lors de la propagation. Remarquons que d'autres techniques de compensation ont permis d'obtenir des impulsions de l'ordre de 5 fs [SSTK99].

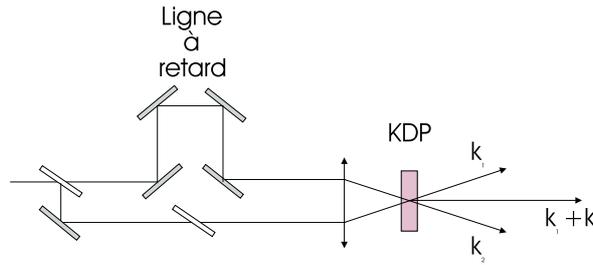


FIG. 2.17 – Schéma de l'autocorrélation en géométrie non-colinéaire. Le faisceau est séparé en deux parties, l'une des deux parties passe par une ligne à retard. Les deux faisceaux sont ensuite focalisés dans un cristal non-linéaire (KDP géométrie de type I, $\theta = 29.4^\circ$ et $e=300 \mu\text{m}$), la mesure du signal dans la direction k_1+k_2 permet de remonter à la durée de l'impulsion.

2.2.6 Caractérisation des impulsions pompe et sonde [Jof98]

Dans cette partie, nous allons présenter les différentes techniques employées pour caractériser la durée des impulsions utilisées dans les expériences. Comme nous allons le voir, les techniques de caractérisation que nous avons utilisées mettent en jeu des effets non-linéaires. En fait, les mesures linéaires, qui ne dépendent pas de la phase spectrale, ne permettent pas de caractériser la durée des impulsions (par exemple autocorrélation en champ).

Pompe bleue et continuum spectral

Nous avons tout d'abord caractérisé les impulsions délivrées par l'amplificateur régénératif en utilisant la technique d'autocorrélation en géométrie non-colinéaire (fig. 2.17). Dans cette configuration, où les deux faisceaux n'interfèrent pas, la polarisation non-linéaire d'ordre deux est simplement proportionnelle à la somme des deux champs, élevée au carré :

$$P^{(2)}(t) \propto \chi^{(2)}(E_1(t) + E_2(t))^2 \propto \chi^{(2)}(|E_1(t)|^2 + |E_2(t)|^2 + 2E_1(t)E_2(t)) \quad (2.48)$$

A partir de cette expression, on remarque que lors de la superposition temporelle des deux impulsions, le dernier terme de l'expression précédente donne lieu à un faisceau à fréquence double dans la direction $k_1 + k_2$, pourvu que la condition d'accord de phase soit satisfaite. Si on place le détecteur dans cette direction, le signal mesuré sera simplement

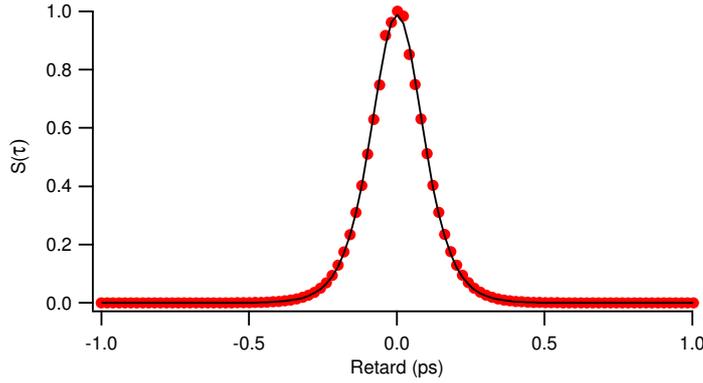


FIG. 2.18 – Autocorrélation en intensité des impulsions délivrées par l'amplificateur régénératif dans un cristal de KDP de $300 \mu\text{m}$ d'épaisseur. En points les données expérimentales et en ligne continue le fit en sécante hyperbolique carré. La durée des impulsions, obtenue par cette méthode, est de 155 fs.

proportionnel à l'intégrale du dernier terme au carré :

$$S(\tau) \propto \int_{-\infty}^{\infty} |E(t)E(t-\tau)|^2 \propto \int_{-\infty}^{\infty} I(t)I(t-\tau) \quad (2.49)$$

A partir de cette mesure on peut déduire la durée de l'impulsion (à un facteur de correction $\sqrt{2}$ dans le cas d'une impulsion gaussienne et 1.54 dans le cas d'une sécante hyperbolique carrée). Dans la figure 2.18, nous avons reporté l'autocorrélation obtenue, avec les impulsions délivrées par l'amplificateur régénératif, dans un cristal de KDP de $300 \mu\text{m}$ d'épaisseur. En tenant compte du facteur correctif lié au profil en sécante hyperbolique carrée (1.54), la durée mesurée des impulsions est de l'ordre de 150 fs.

Après avoir caractérisé les impulsions délivrées par l'amplificateur régénératif, nous avons entrepris la caractérisation des impulsions pompe (bleue) et sonde (continuum). Pour cela nous avons utilisé la technique d'absorption à deux photons dans un semi-conducteur à grand gap. Cette technique consiste à faire interagir deux faisceaux, en géométrie non-colinéaire, dans du ZnS ($E_g = 3.7 \text{ eV}$) de $\simeq 100 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Séparément, les photons de chaque faisceau ont une énergie insuffisante pour franchir le gap entre la bande de valence et la bande de conduction. Cependant, dans des régimes où la puissance par unité de surface est suffisamment intense (GW/cm^2), il est possible d'induire une absorption à deux photons lorsque les deux faisceaux coïncident temporellement (fig 2.19). Cette absorption se fait via un niveau virtuel entre la bande de valence et la

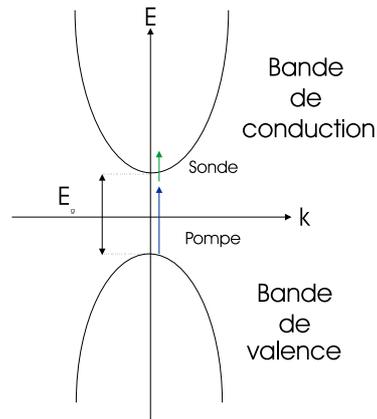


FIG. 2.19 – Schéma de principe de la caractérisation des impulsions par la technique d'absorption à deux photons dans un semiconducteur (ZnS dans notre cas $E_g = 3.7$ eV).

bande de conduction, le faisceau le plus intense joue le rôle de pompe et nous enregistrons les variations de transmission du second faisceau. Le faisceau pompe (395 nm) possède une énergie de 3.14 eV et le deuxième faisceau, qui est le continuum spectral, possède une énergie comprise entre 1.77 et 2.88 eV. De cette manière, le deuxième faisceau ne pourra être absorbé qu'en présence du premier. Cette technique présente l'avantage d'être identique à la configuration utilisée dans les différentes expériences. En fait le ZnS joue le rôle d'un échantillon quelconque.

En enregistrant la transmission différentielle du deuxième faisceau, nous obtenons un signal d'intercorrélation (ou autocorrélation dans la configuration dégénérée) qui nous renseigne sur la durée des impulsions (fig. 2.20). Dans le cas du continuum, nous sommes en mesure de caractériser le retard de groupe du spectre de lumière blanche, en fonction de λ , qui est engendré par le chirp résiduel. Dans le cas dégénéré, nous pouvons évaluer la durée des impulsions pompe centrée à 395 nm. Cependant la valeur obtenue ne constitue qu'une limite supérieure car il faut tenir compte de l'élargissement temporel introduit par le ZnS. En effet, la dispersion de vitesse de groupe est très importante pour les longueurs d'onde bleues dans le cas du ZnS. Les systèmes de détection utilisés sont :

- une photodiode couplée à un système de détection synchrone dans le cas où le deuxième faisceau est centré à 395 nm (configuration dégénérée). Le faisceau pompe est modulé par un hacheur ($F=200$ Hz).
- le spectromètre couplé à la barrette de photodiodes dans le cas du continuum spec-

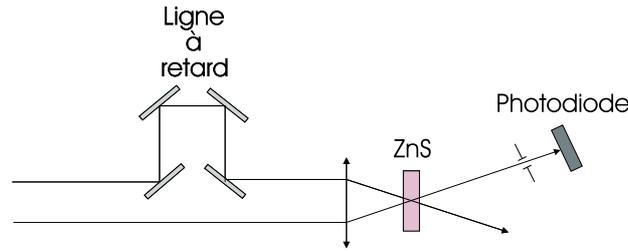


FIG. 2.20 – Schéma de l'expérience d'absorption à deux photons dans du ZnS ($E_g = 3.7$ eV, $e \simeq 100$ μm). Le faisceau d'énergie plus élevé passe par une ligne à retard, les deux faisceaux sont ensuite focalisés dans le ZnS et nous enregistrons la variation de transmission du deuxième faisceau en fonction du retard entre les deux faisceaux et, dans le cas du continuum spectral, de la longueur d'onde.

tral. De cette manière, nous mesurons les spectres de transmission différentielle en fonction du retard entre les deux faisceaux et de la longueur d'onde.

Les résultats obtenus avec le continuum spectral sont représentés en figure 2.21. Dans la première série (a et b) nous avons obtenu le retard de groupe dans le cas où la dispersion de la vitesse de groupe est compensée avec un compresseur à prismes en BK7 ($l_p = 86$ cm). La série suivante représente le retard de groupe dans le cas où la dispersion est compensée avec une paire de prismes et de réseaux ($l_p = 96$ cm et $l_r = 2.92$ cm). Ces deux séries démontrent bien que la correction de la dispersion de la vitesse de groupe ne se fait pas de la même manière, aux différents ordres du développement de Taylor, pour la paire de prismes et la paire de réseaux (voir 2.1.2). En connaissant le retard de groupe du continuum, nous sommes en mesure, par déconvolution, de corriger les spectres de transmission différentielle obtenus dans les différentes expériences.

La majorité des résultats présentés dans ce travail sont obtenus dans la première configuration ($l_{prisme} = 86$ cm). Cette configuration expérimentale a été préférée à cause de la perte en intensité sur le faisceau sonde induite par la réflexion sur les réseaux ($\simeq 50\%$). La caractérisation de la durée des impulsions pompe centrées à 395 nm est obtenue dans la configuration dégénérée. La durée des impulsions pompes, déduites par cette méthode et en tenant compte de l'élargissement introduit par le ZnS, est d'environ 200 fs. Dans le cadre des expériences pompe bleue-sonde continuum, cette durée fixe la résolution temporelle des expériences.

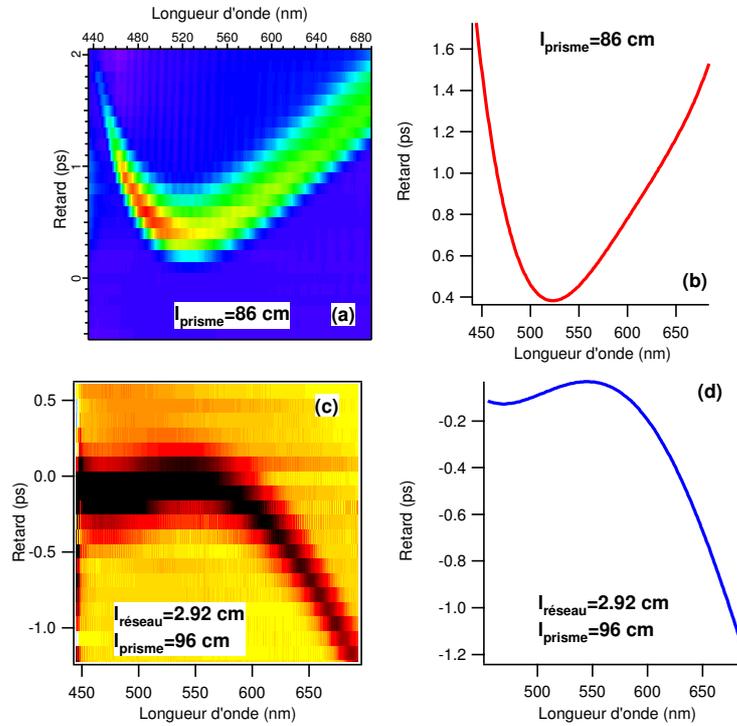


FIG. 2.21 – Spectres de transmission différentielle du continuum spectral à travers un cristal de ZnS $e \simeq 100 \mu\text{m}$ et en présence d'un faisceau pompe $\lambda = 395 \text{ nm}$. Nous observons de l'absorption induite lorsque le continuum et la pompe coïncident temporellement. a) et b) Retard de groupe du continuum spectral en fonction de la longueur d'onde. Cette courbe correspond au cas où le continuum est comprimé avec une paire de prismes en BK7 uniquement ($l_{\text{prisme}} = 86 \text{ cm}$). c) et d) Retard de groupe du continuum spectral en fonction de la longueur d'onde. Cette courbe correspond au cas où le continuum est comprimé avec une paire de prismes en BK7 ($l_{\text{prisme}} = 96 \text{ cm}$) et une paire de réseaux ($l_{\text{réseau}} = 2.92 \text{ cm}$, 1200 traits/mm).

Impulsions délivrées par le NOPA

Pour caractériser temporellement les impulsions délivrées par l'amplificateur paramétrique nous avons choisi la méthode de l'autocorrélation interférométrique. Cette méthode permet, en plus de déterminer la durée des impulsions, de se faire une idée de la dispersion de la vitesse de groupe résiduelle des impulsions délivrées par le NOPA. La méthode consiste à faire propager le faisceau dans un interféromètre de Michelson; on place ensuite un cristal non-linéaire sur la voie de sortie de l'interféromètre et on mesure l'intensité à 2ω en fonction du retard entre les deux bras de l'interféromètre. Comme les deux faisceaux interfèrent, le signal mesuré à 2ω est donné par la relation suivante :

$$S(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} |(E(t) + E(t - \tau))|^2 \quad (2.50)$$

où τ est le retard entre les deux faisceaux. Dans le cas d'une impulsion gaussienne nous avons :

$$E(t) = e^{(-\frac{t}{\tau_0})^2} \cos \omega_0 t \quad (2.51)$$

où τ_0 est la durée de l'impulsion et ω_0 la pulsation centrale de l'impulsion. On obtient facilement l'expression du signal interférométrique (interférogramme doublé) :

$$S(\tau) = 1 + 4 \cos(\omega_0 \tau) e^{-\frac{3}{4}(\frac{\tau}{\tau_0})^2} + \cos(2\omega_0 \tau) e^{-(\frac{\tau}{\tau_0})^2} + 2e^{-(\frac{\tau}{\tau_0})^2} \quad (2.52)$$

Si on tient maintenant compte de la dispersion de la vitesse de groupe à l'ordre deux, le champ électrique est donné par la relation suivante :

$$E(t) = \frac{e^{-\frac{t^2}{2\alpha}}}{\sqrt{\alpha}} \cos \omega_0 t \quad (2.53)$$

avec $\alpha = \frac{\tau_0^2}{4} + \frac{i}{2} \phi^{(2)}(\omega_0)$ où τ_0 est la durée de l'impulsion, ω_0 la pulsation centrale de l'impulsion et $\phi^{(2)}(\omega_0)$ la dispersion de vitesse de groupe. Avec un tel champ, le signal d'autocorrélation interférométrique se réécrit :

$$S(\tau) = 1 + 4 \cos(\omega_0 \tau - \frac{b}{4(a^2 + b^2)} \tau^2) e^{-\frac{3a^2 + b^2}{8a(a^2 + b^2)} \tau^2} + \cos(2\omega_0 \tau) e^{-(\frac{1}{2a}) \tau^2} + 2e^{-\frac{a}{2(a^2 + b^2)} \tau^2} \quad (2.54)$$

avec $a = \frac{\tau_0^2}{4}$ et $b = \frac{\phi^{(2)}(\omega_0)}{2}$. La figure 2.22 représente l'autocorrélation interférométrique calculée à partir des expressions précédentes pour une impulsion gaussienne centrée à

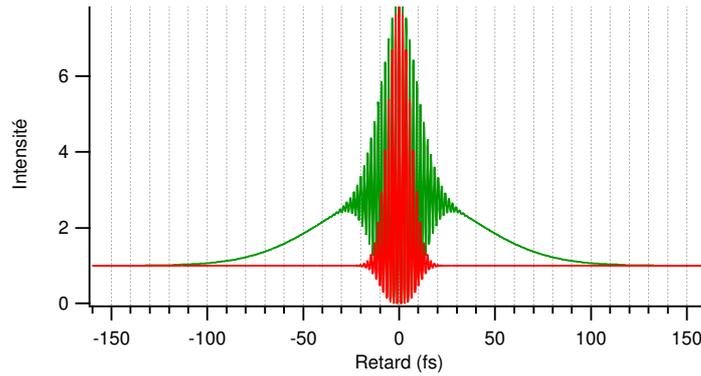


FIG. 2.22 – Autocorrélation interférométrique d'une impulsion centrée à 550 nm d'une durée de 15 fs. En rouge le signal théorique obtenu sans dispersion de vitesse de groupe. En vert, le signal théorique obtenu avec une dispersion de vitesse résiduelle de groupe de 200 fs^2 qui correspond à une propagation dans 3.3 mm de silice fondue à 550 nm.

550 nm d'une durée de 15 fs. L'effet d'une dispersion de la vitesse de groupe résiduelle est donc de faire apparaître des ailes sans franges dans l'interférogramme doublé. Cette signature permet d'estimer la dispersion résiduelle et d'optimiser la compression des impulsions.

Dans la pratique, l'interféromètre de Michelson est monté sur plaque d'aluminium (20 cm x 20 cm) fixée sur un pied en acier de 10 cm de diamètre. Les deux bras de l'interféromètre font 8 cm de longueur et la lame séparatrice (compensatrice) est un substrat de silice fondue (qualité optique $\frac{\lambda}{10}$) de 1 mm d'épaisseur sur lequel nous avons déposé un film d'aluminium de 32 \AA d'épaisseur. Cette épaisseur nous permet d'obtenir une réflectivité quasi constante sur l'ensemble du spectre visible ainsi qu'une dispersion de la vitesse de groupe négligeable. Cet interféromètre mobile peut donc être utilisé pour caractériser des impulsions courtes dans un domaine spectral allant de 500 à 700 nm. Sur l'un des deux bras, le miroir de renvoi est placé sur une translation micrométrique afin de trouver le zéro de l'interféromètre. Le miroir du second bras est placé sur un haut-parleur. Cette technique nous permet, en appliquant une tension périodique au haut-parleur d'acquérir rapidement ($\simeq 5 \text{ Hz}$) l'interférogramme. Le faisceau en sortie de l'interféromètre est ensuite focalisé, grâce à un miroir parabolique hors d'axe (90° , $f=25 \text{ mm}$), sur un cristal de BBO (type I, $\theta=45.3^\circ$) de $100 \text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur et le signal à 2ω est mesuré à l'aide d'un photo-multiplicateur. De plus, nous faisons passer dans l'interféromètre un faisceau

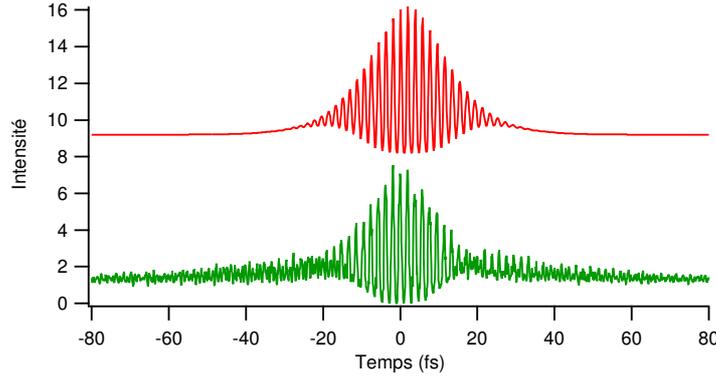


FIG. 2.23 – En bas, autocorrélation interférométrique obtenue dans un cristal de BBO de $100 \mu\text{m}$ d'épaisseur pour un spectre du NOPA centré autour de 570 nm (le taux de rafraîchissement des courbes est d'environ 1 Hz). En haut, fit de la courbe verte obtenue à l'aide de la relation 2.54 avec $\omega_0 = 330 \text{ THz}$, $\tau_0 = 15 \text{ fs}$ et $|\phi^{(2)}(\omega_0)| = 160 \text{ fs}^2$.

provenant d'un laser hélium-néon ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$) et nous enregistrons simultanément l'interférogramme doublé et le système de franges de l'hélium-néon avec un photodiode. Les deux signaux sont acquis à l'aide d'un oscilloscope numérique et transférés par bus GPIB vers un ordinateur. L'acquisition de la figure d'interférence de l'hélium-néon nous permet d'obtenir une échelle absolue des temps, puisque l'on connaît la période temporelle entre chaque frange (2.1 fs). Nous sommes donc en mesure de corriger les erreurs de déplacement du haut-parleur qui se traduisent par un espacement non-constant entre les franges de l'hélium-néon. Cette méthode d'acquisition présente un double avantage par rapport aux méthodes utilisant un moteur pas à pas ou une platine piézo-électrique. D'une part, même si la fréquence d'affichage sur l'écran de l'oscilloscope est faible (quelques Hz), la mesure de la figure d'interférence peut se faire en temps réel permettant ainsi d'aligner très facilement l'interféromètre. D'autre part cette technique d'acquisition est, d'un point de vue pratique, très peu onéreuse.

La figure 2.23 représente une courbe d'autocorrélation interférométrique obtenue par le système décrit précédemment pour un spectre du NOPA centré autour de 570 nm . Nous avons utilisé la relation 2.54 pour fitter la courbe expérimentale obtenue sur l'oscilloscope numérique. Les paramètres utilisés sont les suivants : $\omega_0 = 330 \text{ THz}$, $\tau_0 = 15 \text{ fs}$ et $|\phi^{(2)}(\omega_0)| = 160 \text{ fs}^2$. La durée de l'impulsion pour un spectre centré à 570 nm est

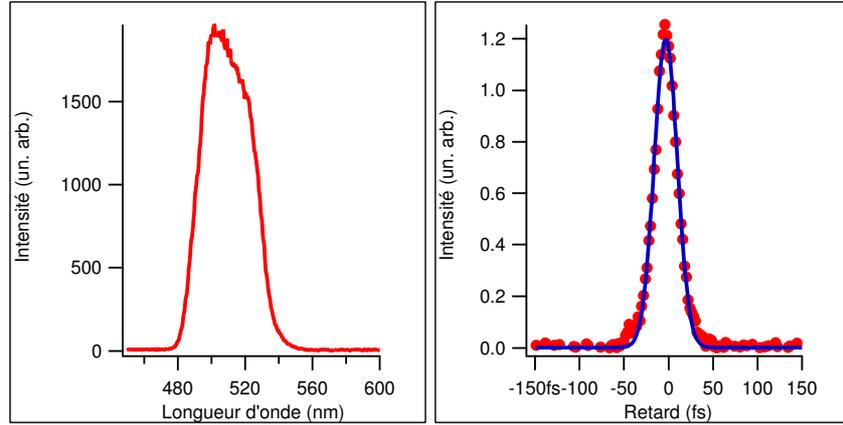


FIG. 2.24 – Autocorrélation en intensité (point à droite) obtenue pour une impulsion centrée autour de 505 nm (à gauche) (BBO type I, $\theta=45.3^\circ$, $L=100 \mu\text{m}$). La courbe en trait plein est un fit gaussien avec un durée d'impulsion de 20 fs.

donc d'environ 15 fs pour une distance inter-prismes de 66 cm. La présence d'aile dans l'interférogramme doublé est la signature de la présence de dispersion de la vitesse de groupe résiduelle et/ou de la présence d'ordres supérieurs ($\frac{\partial^3 \phi}{\partial \omega^3}$). Rappelons qu'un simple compresseur à prismes ne permet pas de compenser simultanément l'ordre deux et trois de la phase spectrale accumulée lors de la propagation (voir section 2.1.2). En plus des mesures d'autocorrélation interférométrique, nous avons caractérisé la durée des impulsions en utilisant la méthode d'autocorrélation en géométrie non-colinéaire décrite dans la figure 2.17. Un exemple de courbe d'autocorrélation en intensité, dans un cristal de BBO de 100 μm d'épaisseur, pour une impulsion centrée autour de 505 nm est donné sur la figure 2.24.

Cet amplificateur paramétrique optique nous permet donc d'obtenir des impulsions pompes accordables dans le visible (505-720 nm) qui ont une durée de l'ordre de 20 fs et une énergie d'environ 0.8 $\mu\text{J}/\text{pulse}$. En théorie, on pourrait encore diminuer la durée de ces impulsions en utilisant, en plus du compresseur à prismes, un compresseur à réseaux. Cela nous permettrait de mieux compenser le troisième ordre de la dispersion, mais le prix à payer serait une perte en intensité sur le faisceau. Il existe une autre méthode qui consiste en l'utilisation de miroirs "chirpés". Ces miroirs permettent, grâce à un effet d'interférence entre les couches diélectriques qui le composent, de pré-compenser les termes $\frac{\partial^2 \phi}{\partial \omega^2}$ et $\frac{\partial^3 \phi}{\partial \omega^3}$ liés à la propagation des impulsions courtes. Pour l'instant nous n'avons pas employé ces

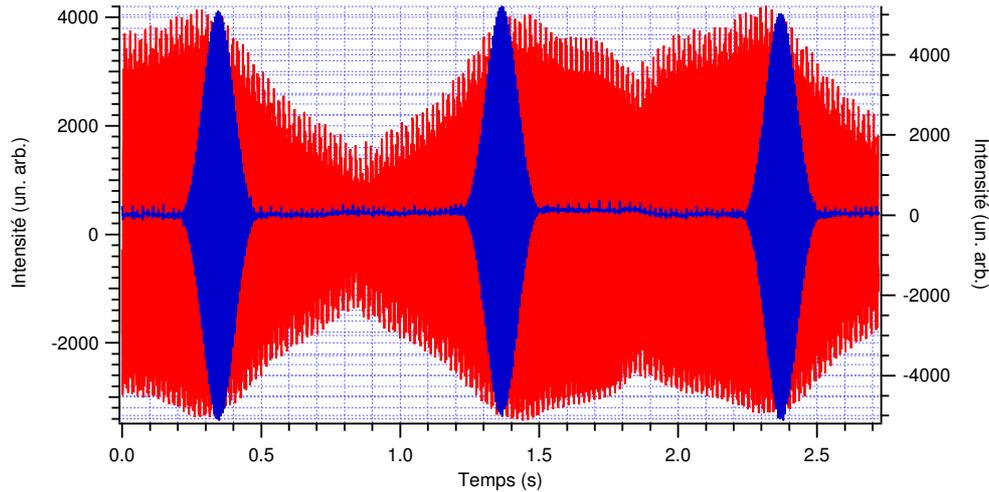


FIG. 2.25 – *Module d'acquisition des signaux d'entrée de la carte son. Autocorrélation en champ des impulsions délivrées par l'oscillateur titane-saphir (bleue) et du laser hélium-néon (rouge).*

différentes techniques car la durée des impulsions était suffisamment courte par rapports aux temps caractéristiques des systèmes que nous avons étudiés. Pour nous, l'intérêt résidait plutôt dans l'accordabilité de l'amplificateur paramétrique.

Toujours dans le but d'obtenir un système de caractérisation simple et peu coûteux, nous avons entrepris la réalisation d'un système d'acquisition des interférogrammes qui utilise la carte son d'un ordinateur. En effet, celle-ci permet, grâce à son entrée stéréo, de numériser sur 16 bits deux signaux électriques avec un taux d'échantillonnages de 48 kHz. Pour ce faire, nous utilisons un des modules du programme Igor Pro de Wavemetrics[©] qui permet l'acquisition des deux canaux d'entrée de la carte son. Ce système de caractérisation a été testé sur un oscillateur titane-saphir maison délivrant des impulsions de quelques dizaines de femtosecondes. L'interféromètre de Michelson est placé après le compresseur à prismes et nous réalisons une autocorrélation en champ avec les impulsions délivrées par l'oscillateur. En appliquant une tension périodique sur le haut parleur, nous enregistrons l'interférogramme acquis par une photodiode sur la première voie de la carte son. De façon analogue, la seconde voie est utilisée pour enregistrer les franges d'interférence d'un laser hélium-néon qui passe lui aussi par le Michelson. Le résultat brut obtenu en utilisant le module d'Igor pro est représenté sur la figure 2.25. Le taux

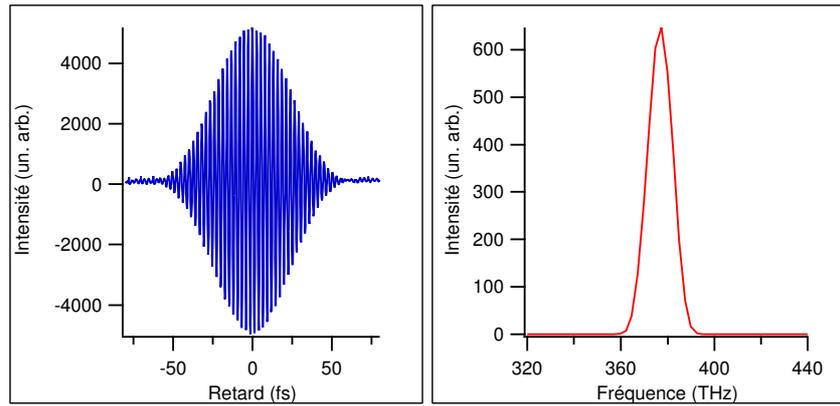


FIG. 2.26 – *Interférogramme (à gauche) acquis à l'aide de la carte son de l'ordinateur, l'échelle de temps est déduite des franges d'interférence de l'hélium-néon qui permettent aussi de tenir compte des erreurs de déplacement du haut-parleur. Cet interférogramme est obtenu avec des impulsions centrées autour de 796 nm qui ont une largeur temporelle de 30 fs. A droite spectre obtenu par transformée de Fourier inverse de l'interférogramme. Le taux de rafraîchissement avec l'interférogramme et le spectre à l'écran est d'environ 0.3 Hz.*

de rafraîchissement peut aller jusqu'à 20 images par seconde. En utilisant les franges de l'hélium-néon, nous pouvons corriger en temps réel l'axe temporel des mouvements du haut-parleur. Il apparaît donc dans le logiciel une fenêtre qui montre un seul interférogramme avec l'axe des temps gradué en femtoseconde (fig. 2.26). Le coût de cette opération est une diminution du taux de rafraîchissement qui tombe à quelques images par seconde. Finalement en réalisant une transformée de Fourier numérique (FFT) sur l'interférogramme nous pouvons obtenir le spectre de l'impulsion délivrée par l'oscillateur (fig. 2.26). Bien que la résolution en fréquence ne soit pas très bonne (cette dernière est inversement proportionnelle à la longueur spatiale du scan) cela constitue néanmoins un spectromètre à transformée de Fourier à moindre coût. Avec le spectre affiché à l'écran, le taux de rafraîchissement tombe à 0.3 Hz, mais cela est bien évidemment une fonction des performances de l'ordinateur utilisé pour acquérir et traiter le signal. Pour rendre ce système complètement autonome, la dernière étape consiste à utiliser la sortie de la carte son pour générer la tension périodique que l'on applique sur le haut-parleur de l'interféromètre. Il faut pour cela utiliser un amplificateur audio car la tension délivrée par la



FIG. 2.27 – Cellule tournante utilisée dans les expériences pompe-sonde.

carte son n'est pas suffisante pour effectuer de grands déplacements.

Ce système constitue donc un dispositif de caractérisation d'impulsions très économique car il suffit de disposer d'un ordinateur équipé d'une carte son, d'un haut-parleur bon marché (puisque l'on est capable de corriger les erreurs de déplacement grâce aux franges de l'hélium-néon), de deux photodiodes et d'un amplificateur. Il est même possible d'utiliser ce système pour enregistrer une autocorrélation interférométrique avec l'ajout d'un cristal non-linéaire à condition de rajouter un amplificateur entre le photomultiplicateur et la carte son. En utilisant un miroir dichroïque et une carte son 5 voies (actuellement disponibles à moindre coût) nous envisageons donc de construire un système de caractérisation complet (autocorrélation interférométrique + spectre).

2.2.7 Cellule tournante et système de détection

Au cours des expériences réalisées sur les échantillons biologiques, nous nous sommes heurtés à plusieurs difficultés liées à la nature des échantillons. En effet, les expériences pompe-sonde ne donnent des résultats facilement interprétables que si les molécules étudiées se trouvent dans un état bien défini (état électronique fondamental) au moment de l'excitation. Un moyen simple pour se trouver dans cette situation est de renouveler le volume d'excitation étudié chaque fois qu'une nouvelle impulsion pompe excite les molécules. Cette condition est d'autant plus importante si les molécules se piègent dans des états noirs à durée de vie longue, les molécules "blanchies" sont alors invisibles pour la

sonde. Pour remédier à ce problème, nous avons entrepris la construction d'une cellule tournante (voir photo fig 2.27). Cette cellule consiste en deux fenêtres de silice fondue de 1 mm d'épaisseur qui sont séparées par un joint d'éthylène propylène diméthyle (EPDM). La cuve est placée entre deux anneaux en inox serrables qui assurent l'étanchéité et le parallélisme entre les fenêtres. Le tout est ensuite inséré dans un roulement à billes entraîné par un moteur électrique via une courroie crantée. Le diamètre (40 mm) et la vitesse de rotation (3000 tours/min) ont été choisis de manière à exciter un nouveau volume de l'échantillon avec chaque impulsion pompe. En effet, dans l'expérience, une impulsion pompe arrive sur l'échantillon toutes les $400\mu s$ (ou $200\mu s$ selon le taux de répétition) et la fréquence de rotation est de 50 Hz. On en déduit donc, qu'entre chaque impulsion, un point sur la circonférence de la cellule aura parcouru 2,5 mm (ou 1.25 mm) ce qui est amplement suffisant puisque les faisceaux sont focalisés sur une tache dont le diamètre est inférieur à $100\mu m$. Il est maintenant important de signaler que cette technique expérimentale est absolument indispensable lorsqu'on travaille avec des échantillons qui sont sujets à des phénomènes de photoblanchiment. En effet, la présence de molécules photoconverties dans le volume focal peut fortement modifier le signal pompe-sonde et ainsi donner lieu à une interprétation erronée de la dynamique des états excités du système d'intérêt. Nous avons constaté cet effet dans le cas où l'échantillon est placé dans une simple cellule avec agitateur magnétique. Nous insistons sur ce point car nous avons trop souvent remarqué, au cours des diverses recherches bibliographiques, qu'un grand nombre d'expérimentateurs ne prenait pas en compte ce genre de considérations.

Le système de détection utilisé au cours des expériences pompe-sonde peut être décrit de la façon suivante. Le faisceau sonde, qui est polarisé linéairement à l'angle magique par rapport à la polarisation linéaire de la pompe, est tout d'abord collimaté après être passé à travers un diaphragme. En sélectionnant un angle solide réduit, on élimine ainsi une partie de la fluorescence qui est émise de façon isotrope. Le faisceau sonde collimaté passe ensuite à travers un polariseur qui permet encore d'éliminer 66% de la fluorescence résiduelle. Finalement, la sonde est focalisée par un achromat ($f = 30\text{ mm}$) sur la fente d'entrée d'un spectromètre qui disperse le faisceau à l'aide d'un réseau (600 traits/mm). L'intensité spectrale est alors enregistrée par une barrette de photodiode (EG&G Reticon, 512 canaux \rightarrow 25.6 ms de temps de lecture) refroidie par un Peltier. Le signal lu sur la barrette est

ensuite numérisé sur 16 bits par un convertisseur analogique/numérique. Les données sont acheminées par fibre optique à la carte d'interface puis elles sont transférées par DMA (Direct Memory Access) dans la mémoire de l'ordinateur. Le programme d'acquisition, très ancien, fonctionne sous Windows 3.1 en mode standard (à cause de l'accès mémoire par DMA) et la synchronisation de la lecture de la barrette se fait via la carte d'interface. Les modes d'acquisition utilisés lors des expériences pompe-sonde sont les suivants :

- le mode ΔT qui permet, grâce à un shutter placé sur le faisceau pompe, d'acquérir $I_t^p - I_t^0$. L'ordinateur synchronise des signaux TTL (qui commandent les shutters) sur les opérations de lecture de la barrette. Pour cela on programme une séquence de 4 lectures : vide-avec pompe-vide-sans pompe (les séquences "vide" sont là pour s'assurer que le shutter est bien ouvert ou fermé). Pour chacune des lectures on choisit un temps d'intégration x puis on moyenne sur n acquisitions (typiquement, $n=100$ et $x=30$ ms). Dans ce mode, il y a également un shutter ouvert sur la sonde.
- le mode $T = I_t^0$ qui permet d'acquérir l'intensité de sonde transmise en absence de la pompe. Le shutter de la pompe est fermé et celui de la sonde ouvert. La séquence est : vide-sans pompe-vide-vide; cette acquisition est suivie d'une mesure du bruit de fond (shutters pompe et sonde fermés) et I_t^0 est obtenu en soustrayant le bruit de fond. Les paramètres d'acquisition sont les mêmes que précédemment.
- le mode ΔT avec le shutter de la sonde fermé qui permet d'acquérir la fluorescence résiduelle de l'échantillon qui parvient sur le détecteur.

On mesure donc séparément ces trois signaux et le temps typique d'acquisition par spectre est de l'ordre de la minute. Dans la pratique le signal de transmission différentielle est donné par :

$$\frac{\Delta T}{T} = \frac{I_t^p - I_t^0 - I_{fl}^p}{I_t^0} \quad (2.55)$$

où I_t^p et I_t^0 sont les intensités de sonde transmise en présence et en absence du faisceau pompe et I_{fl}^p est l'intensité de fluorescence parvenant au détecteur. Afin d'automatiser l'acquisition, nous avons développé une interface, sous le logiciel Igor Pro (Wavemetrics[©]), qui permet de piloter le PC d'acquisition (vieux système à barrettes) par port série. Il est ensuite possible d'acquérir un nombre m de scans car le programme sous Igor Pro pilote simultanément le PC d'acquisition et la ligne à retard. Avec ce

système d'acquisition, nous sommes capables de mesurer des signaux $\frac{\Delta T}{T}$ de l'ordre de 5×10^{-3} dans les échantillons biologiques ($\simeq 6$ heures d'acquisition qui correspondent à une soixantaine de retards moyennés 6 fois). Le rapport signal à bruit est probablement limité par la présence de particules diffusantes d'origine biologique qui sont en suspension dans la solution. Dans le cas d'échantillons non-biologiques, les signaux mesurables sont de l'ordre de $2 \cdot 10^{-3}$ (pour $\simeq 6$ heures d'acquisition). La limitation de cette technique réside dans le fait que l'on n'enregistre pas simultanément ΔT et T et ce quelque soit l'intervalle de temps entre les deux mesures (ici l'intervalle de temps minimum vaut $\simeq 100$ ms). Autrement dit, le signal est complètement dominé par les fluctuations rapides de la sonde (spectralement et en intensité).

Nous avons aussi été amenés à la fin de ce travail de thèse à tester une autre technique de détection. Malheureusement, nous n'avons pas pu utiliser extensivement cette technique sur les échantillons biologiques. Le principe de cette technique est le même que celui décrit précédemment : nous enregistrons l'intensité spectrale de la sonde à travers un spectromètre, mais cette fois ci, le détecteur est une caméra CCD (Charge Coupled Device) refroidie par azote liquide. En plus du détecteur qui possède un bruit de lecture plus faible, nous avons utilisé un deuxième faisceau sonde comme référence. Ce faisceau passe par l'échantillon avec une avance d'environ 1 ns par rapport à la sonde qui nous sert à faire la mesure et il passe par la même zone de l'échantillon (il est donc soumis aux mêmes fluctuations que la sonde). L'intérêt d'utiliser une caméra CCD est que l'on peut acquérir simultanément la sonde et la référence sur deux zones distinctes de la caméra. Le mode d'acquisition utilisé dans cette série préliminaire est différent de celui décrit précédemment; plutôt que d'acquérir à $\simeq 1$ min d'intervalle les différents spectres, nous utilisons deux shutters placés sur le trajet de la pompe et des sondes. Cela nous permet de faire des séquences *avec pompe-sans pompe-bruit de fond* pour le faisceau sonde et la référence. En faisant le rapport entre la transmission de la référence prise avec et en absence de la pompe, nous pouvons corriger les fluctuations spectre à spectre de la sonde et donc, soustraire ces fluctuations des spectres de transmission différentielle de la sonde. Le résultat de notre test s'est montré très concluant puisque nous arrivons à mesurer sur des échantillons non-biologiques des variations de transmission différentielle avec un bruit de l'ordre de $2 \cdot 10^{-4}$ alors que dans le mode d'acquisition sans référence (pour un temps

d'acquisition équivalent), le bruit sur le signal est de 1.10^{-3} .

3. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET INTERPRÉTATIONS DES EXPÉRIENCES POMPE-SONDE

Introduction

Ce chapitre sera dédié à la description des résultats expérimentaux obtenus dans le cadre des travaux concernant la caractérisation de la photophysique de différents marqueurs fluorescents. Il est séparé en deux sections : la première sera consacrée aux expériences concernant les protéines fluorescentes et la seconde à l'étude de la dynamique des états excités des dérivés de coumarine. Dans la section qui concerne les expériences résolues en temps sur les protéines, nous présenterons tout d'abord le protocole existant qui nous a permis de produire les échantillons biologiques (protéine, fusion). Puis nous décrirons brièvement celui utilisé par les chimistes de la Faculté de Pharmacologie de Strasbourg pour produire l'analogue synthétique du chromophore GFP. Nous présenterons ensuite les propriétés optiques linéaires de ces composés. Cette section se terminera par une présentation des résultats des expériences résolues en temps ainsi que de l'interprétation à laquelle ils ont donné lieu. Dans la section dédiée aux expériences sur les dérivés de coumarine, nous donnerons en premier lieu les propriétés optiques linéaires des différents composés. Nous présenterons ensuite l'étude sur la dynamique des états excités de ces dérivés.

3.1 Dynamique des états excités de protéines GFP

3.1.1 Préparation des échantillons

La production de la GFP_{uv}, de la GFP_{wt} et des fusions fragments d'anticorps/GFP_{uv} peut être décrite de la façon suivante : les cellules de bactérie *Escherichia Coli* sont transfectées par un plasmide grâce à un choc thermique. Un plasmide est une molécule d'ADN

circulaire double-brin qui contient la séquence de la protéine que l'on cherche à produire (GFPuv, GFPwt ou fusion anticorps/GFPuv). Ces plasmides sont des unités de répllication autonome qui se répliquent en général de manière indépendante du chromosome bactérien. C'est cependant la machinerie de la cellule qui assure leur répllication. Une fois que l'on a inséré un fragment d'ADN cloné dans un plasmide on peut réussir à faire exprimer les gènes qu'il porte dans les cellules d'*Escherichia Coli*. Cette expression nécessite la transcription de ce fragment et la traduction de l'ARN messenger correspondant. On peut ainsi faire fabriquer à *Escherichia Coli* des protéines étrangères. C'est par cette technique que l'on obtient par exemple des protéines d'intérêt thérapeutique. Les bactéries transfectées se développent à 37°C dans un milieu nutritif jusqu'à ce qu'une densité optique de 0.8 à 600 nm soit atteinte. Puis les bactéries sont incubées à 30°C pendant 3 heures après addition de 0.2% d'arabinose (opéron¹ qui contrôle la transcription des gènes : induction-répression). Les bactéries sont ensuite stockées pendant 2 jours à 4°C. Après ces différentes étapes, une fraction de cette solution est déposée sur une surface d'agar-LB (élément nutritif) contenant de l'ampicilline. L'ampicilline est un antibiotique qui empêche la synthèse de la membrane de la bactérie. Les clones, porteurs du gène d'intérêt, produisent une enzyme (β -lactamase) qui hydrolyse l'ampicilline, permettant ainsi aux bactéries de se dupliquer. Puis les bactéries se développent à 37°C durant toute une nuit. Pour la GFPuv, la GFPwt et les fusions anticorps-GFPuv, les extraits cytoplasmiques bruts ont été obtenus en resuspendant les cellules, qui ont poussé sur la surface d'agar-LB, dans 25 ml Tris-HCl, pH 8, 150 nM NaCl, 1 mM d'EDTA (1/20 du volume original). Cette solution est complétée avec de l'inhibiteur de protéase (enzyme coupant les protéines). Les parois cellulaires sont ensuite détruites à l'aide d'une pointe à ultrasons (lyse par la sonication). L'extrait cytoplasmique ainsi obtenu est purifié par centrifugation à 22.000 g (protéine soluble dans le surnageant) et par filtration avec des membranes Durapore de 0.22 μ m (millipore). Les échantillons sont ensuite stockés à -20°C jusqu'à utilisation. Dans le cas de la GFPwt, nous n'avons pas été à même de produire des solutions suffisamment concentrées. Pour remédier à ce problème, nous avons opté pour

1. Unité de transcription constituée par : un promoteur qui est nécessaire à la transcription, un opérateur qui correspond au site de liaison avec un répresseur (empêche la transcription) et un ou plusieurs gènes de structure.

l'achat d'une solution commerciale de protéines recombinantes (Roche Diagnostics[©]).

Les fusions génétiques (couple de protéines liées de façon covalente qui résulte de l'expression d'un gène modifié) étudiées au cours de ce travail sont composées d'une partie codant pour le fragment d'anticorps qui est lié, par un résidu de 17 acides-aminés, à la GFPuv. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, le fragment variable d'un anticorps correspond à la partie chargée de reconnaître un antigène donné. Les paramètres clés de ce mécanisme de reconnaissance sont la séquence des acides-aminés et la structure tertiaire de l'anticorps. De manière générale, un mauvais repliement affecte la solubilité de l'anticorps car les parties hydrophobes de l'anticorps se trouvent en contact avec le solvant conduisant ainsi à la formation d'agrégats. Deux fusions, notées 13R4 et 1F4, ont été étudiées au cours de ce travail. La première correspond à un fragment d'anticorps qui présente une affinité pour une protéine de la bactérie *Escherichia Coli* (β -galactosidase). Ce fragment ne présente aucun intérêt thérapeutique mais il va nous servir de modèle de fragment d'anticorps soluble car il est actif dans le cytoplasme des cellules animales [SNM⁺03]. Le second fragment (1F4) est un anticorps permettant d'inhiber l'activité de la protéine E6 du papillomavirus humain qui est impliquée dans le développement du cancer du col de l'utérus (voir chapitre 1). Malheureusement, ce fragment d'anticorps n'est pas soluble dans un contexte cellulaire et conduit à la formation d'agrégats toxiques pour la cellule. Ce fragment va donc nous servir de modèle d'anticorps insoluble. Disposant de ces deux fusions modèles, nous allons pouvoir comparer leurs propriétés dynamiques. Le protocole utilisé pour produire ces deux fusions est identique à celui utilisé pour la GFPuv et la GFPwt. Toutefois, dans le cas de la fusion insoluble, la partie fluorescente (qui contient l'anticorps) ne se trouve pas dans le surnageant. Afin d'étudier la fusion insoluble 1F4-GFPuv, nous avons dissous le culot dans une solution tampon (pH=8) contenant 0.5% de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, tensioactif) en volume. Cette procédure nous a permis de dissoudre partiellement les agrégats 1F4-GFPuv et de réduire la diffusion de la lumière par l'échantillon qui rendait impossible les expériences résolues en temps. Il est important de noter qu'aux concentrations utilisées (jusqu'à 1% de SDS en volume) les propriétés optiques statiques et dynamiques de la GFPuv ne sont pas affectées par la présence du surfactant.

Afin de valider notre protocole de purification (qui ne garantit pas l'absence d'autres

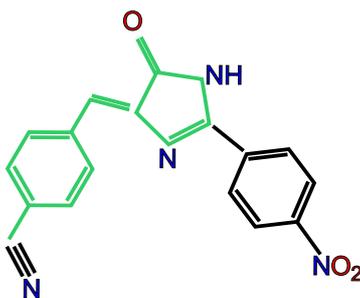


FIG. 3.1 – Structure chimique de l’analogue synthétique du chromophore de la GFP. En vert la partie commune avec le chromophore GFP.

protéines dans le solution) nous avons comparé les propriétés optiques statiques et dynamiques de nos échantillons à celles d’échantillons commerciaux de protéines recombinantes (Clontech[©] et Roche Diagnostics[©]). Mise à part une proportion accrue du pic d’absorption à 270 nm dans le cas de nos échantillons, cette comparaison nous a permis de montrer que les propriétés statiques et dynamiques de la GFP_{uv} et la GFP_{wt} ne sont pas modifiées par notre technique simple de purification (sonication, centrifugation et filtration).

L’analogue synthétique du chromophore de la GFP (2-(4- nitrophenyl)-5-(4-cyanophényl méthylidène) imidazol-4-one), dont la structure chimique est représentée en figure 3.1, a été synthétisé selon le protocole de Ganapathiplackal [Gan76] par un groupe de chimistes de la Faculté de Phamacologie de Strasbourg. Le composé a été purifié par recristallisation à partir d’une solution d’éthanol et caractérisé par RMN (signal typique du proton à 7.1 ± 0.2 ppm). Des solutions mères de 3×10^{-3} M ont été préparées par dissolution dans le dioxane et stockées dans le noir à température ambiante jusqu’à utilisation.

3.1.2 Propriétés optiques linéaires

Avant d’entreprendre les études sur les propriétés dynamiques des différents échantillons, nous devons avoir une bonne connaissance de leurs propriétés optiques linéaires. Dans un premier temps, nous allons présenter et comparer les propriétés de la protéine naturelle et du mutant uv. Puis nous décrirons les propriétés optiques linéaires des fusions génétiques fragments d’anticorps/GFP_{uv} ainsi que celles d’un analogue synthétique du chromophore de la GFP.

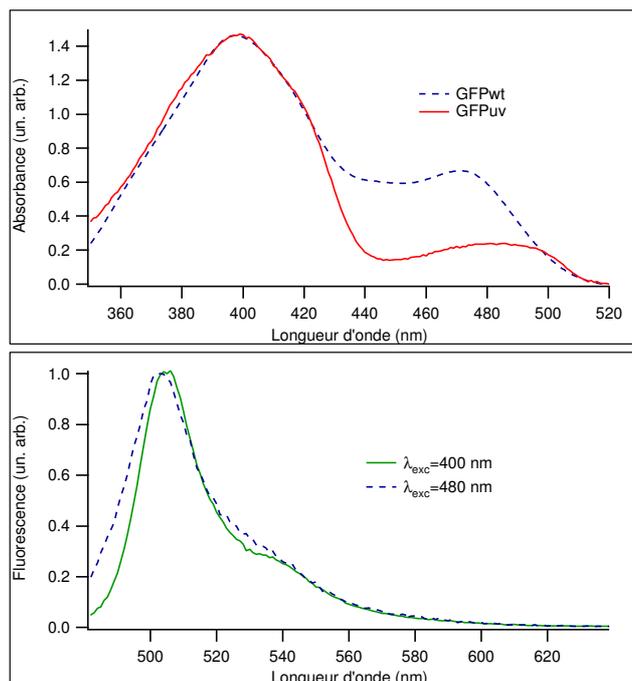


FIG. 3.2 – En haut, spectres d'absorbance de la GFP naturelle et du mutant uv. A concentration de forme neutre équivalente, le rapport d'absorbance neutre/anionique vaut, en tenant compte des coefficients d'extinction de chaque bande, 6/1 pour la GFPwt et 20/1 pour la GFPuv. En bas, spectres de fluorescence lorsque les protéines sont excitées à 400 et 480 nm. Les spectres d'émission sont identiques pour les deux protéines.

GFP naturelle et mutant uv

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, la GFPuv et la GFPwt possèdent le même chromophore et seul l'environnement proche à l'intérieur de la cage protéique diffère à cause des six mutations qui apparaissent dans le cas de la GFPuv (trois silencieuses A38A-L138L-T226T et trois actives F100S-M154T- V164A). Lorsque les deux protéines sont en solution aqueuse, deux sous-populations sont présentes : la première a le chromophore dans la forme neutre et la seconde a le chromophore dans la forme anionique relaxée. Cet équilibre peut être modifié par plusieurs paramètres (pH, température ...). Le spectre d'absorbance des deux protéines présente deux bandes d'absorption (400 et 480 nm) respectivement associées à la forme neutre et la forme anionique relaxée. Comme nous pouvons le voir dans la figure 3.2, si on tient compte des coefficients d'extinction de chaque bande [Tsi98], les rapports d'absorbance entre les formes neutre et anionique re-

laxée valent 6/1 dans le cas de la GFPwt et 20/1 dans le cas de la GFPuv. Le mécanisme qui donne lieu à l'émission de fluorescence verte est le suivant [CKBB96] : l'absorption d'un photon à 400 nm, par la forme neutre du chromophore, conduit à l'émission de fluorescence avec un maximum centré à 508 nm via un transfert de proton dans l'état excité entre la forme neutre et la forme anionique non-relaxée du chromophore. Ce mécanisme permet d'expliquer la similitude des spectres d'émission lorsque les protéines sont excitées à 400 et 480 nm (voir fig. 3.2). Cependant, l'absorption d'un photon à 400 nm génère une bande d'émission avec un maximum centré autour de 508 nm dans laquelle on distingue une réplique vibronique et une seconde bande de fluorescence autour de 460 nm beaucoup plus faible que la précédente alors que l'absorption d'un photon à 480 nm donne lieu à une unique bande de fluorescence piquée autour de 505 nm qui présente un épaulement moins prononcé (fig. 3.2). Ces différences entre les deux bandes d'émission sont vraisemblablement dues aux modifications conformationnelles entre la forme anionique relaxée et non-relaxée. Dans le cadre de l'expérience réalisée par Creemers et al. [CLS⁺99], les auteurs avaient mis en évidence la présence d'une bande associée à l'absorption de la forme anionique non-relaxée (495 nm) dans le cas de la GFPwt. Cette observation se confirme dans notre étude puisque les bandes d'émission, lorsque les protéines sont excitées à 400 et 495 nm, sont spectralement identiques. Notons en outre que les deux protéines présentent les mêmes spectres d'émission et que dans le cas de la GFPuv, la fraction de forme anionique relaxée excitée à 395 nm est moins importante que dans le cas de la GFPwt, à cause de la différence entre les rapports d'absorbance des formes neutre et anionique relaxée.

Avant de passer aux études résolues en temps, nous souhaitons attirer l'attention sur les modifications du spectre d'absorbance de la GFP en fonction du temps d'illumination (voir fig. 3.3). Pour illustrer cette dépendance, nous sommes partis d'un échantillon frais (peu ou pas exposé à la lumière) puis nous l'avons éclairé, en utilisant la cellule tournante, avec des impulsions centrées à 395 nm. Chaque spectre correspond à $\simeq 3$ heures d'illumination (60 nJ/impulsion), le faisceau pompe est focalisé à l'aide d'un miroir parabolique de 38.1 mm de focal (waist de l'ordre de 80 μm , fluence 1.2 mJ/cm²). Sur la figure 3.3, nous observons la présence d'un point isobestique (427 nm) qui est la claire signature d'une conversion entre deux espèces chimiques. Bien qu'il soit tentant d'associer

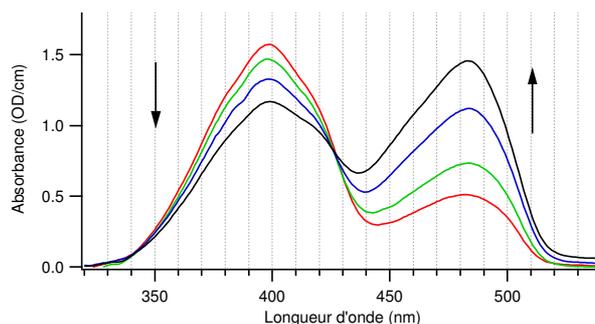


FIG. 3.3 – Variation du spectre d'absorbance de la GFPuv en fonction du temps d'illumination. Chaque spectre correspond à 3 heures d'exposition au faisceau pompe (395 nm, 1.2 mJ/cm^2). On note la présence d'un point isobestique à 427 nm qui est la claire signature d'une conversion entre deux espèces chimiques. Ce mécanisme de photoconversion est irréversible même après avoir passé 24 heures dans le noir.

à cette photoconversion la forme neutre et anionique relaxée du chromophore, il faut rappeler qu'à l'heure actuelle aucune expérience n'a montré, de manière claire et précise, que cette hypothèse est bien valide. Cette espèce photoconvertie pourrait par exemple correspondre à un autre état de protonation du chromophore comme cela a été supposé dans certaines études théoriques [VMBR98a, VMBR98b]. Notons finalement que cette photoconversion est irréversible, même après avoir placé l'échantillon 24 heures dans le noir. Les expériences résolues en temps ont été réalisées dans des conditions d'excitation pour lesquelles le spectre d'absorbance n'est pas sensiblement modifié durant le temps d'acquisition. De plus, il faut ajouter que pour des énergies d'excitation élevées ($>0.5 \text{ mJ/cm}^2$ pour lesquelles il y a photoconversion entre les deux espèces), les propriétés dynamiques (excitation à 395 nm) ne sont pas modifiées par la photoconversion.

Fusions génétiques fragment d'anticorps/GFPuv

Dans la figure 3.4, nous avons représenté les spectres d'absorbance (normalisés à l'absorbance à 400 nm) de la GFPuv (solution aqueuse), de la fusion soluble 13R4-GFPuv (solution aqueuse) et de la fusion insoluble 1F4-GFPuv (solution aqueuse + 0.5% SDS). Les concentrations de ces trois échantillons sont les suivantes : $45 \mu\text{M}$ pour la GFPuv, $10 \mu\text{M}$ pour 13R4-GFPuv et $3 \mu\text{M}$ pour 1F4-GFPuv. Nous n'avons pas représenté les différents spectres d'émission car ils sont identiques à ceux présentés dans la figure 3.2.

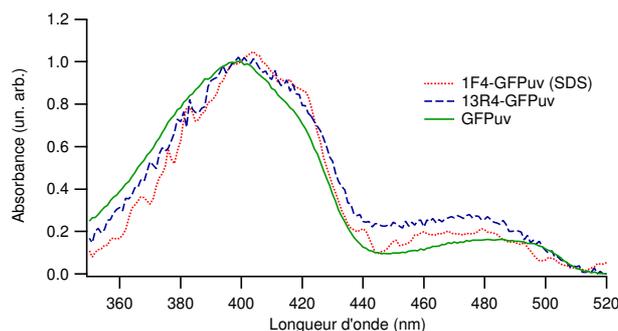


FIG. 3.4 – Spectres d'absorbance (normalisés au maximum d'absorbance à 400 nm) de la GFPuv (solution aqueuse), de la fusion 13R4-GFPuv (solution aqueuse) et de la fusion 1F4-GFPuv (solution aqueuse + 0.5% SDS). Notons que le spectre d'absorbance de la GFPuv dans le SDS (0.5% en volume) est identique (rapport d'absorbance entre les formes neutre et anionique relaxée) à celui en solution aqueuse.

Deux points importants sont à noter : tout d'abord, l'ajout de 0.5% de SDS en volume ne modifie pas le spectre d'absorbance de la GFPuv (le rapport d'absorbance entre les formes neutre et anionique relaxée reste constant). D'autre part, il est intéressant de remarquer la similitude entre les différents spectres d'absorbance. Dans le cas de la fusion 13R4-GFPuv, on sait que l'anticorps est bien replié, puisqu'il est actif et soluble dans le cytoplasme. On peut donc s'attendre à ce que la GFPuv soit aussi bien repliée. Cela explique pourquoi les rapports d'absorbance entre les formes neutre et anionique relaxée de la fusion soluble et de la GFPuv sont si proches (respectivement 16/1 et 20/1). Dans le cas de la fusion insoluble, les rapports sont encore plus proches (20/1 pour la GFPuv et la fusion insoluble). Or, on pouvait s'attendre à ce que la présence d'un anticorps mal replié modifie fortement, à cause du caractère séquentiel du processus de repliement, la structure tertiaire de la GFPuv et donc ses propriétés optiques. La question qui se pose maintenant est donc la suivante : comment différencier, alors que les propriétés optiques linéaires ne nous le permettent pas, les fusions solubles des fusions insolubles ? Comme nous allons le voir dans la section qui concerne les expériences résolues en temps, une réponse est apportée par l'étude et la comparaison de la dynamique des états excités des fusions et de la GFPuv.

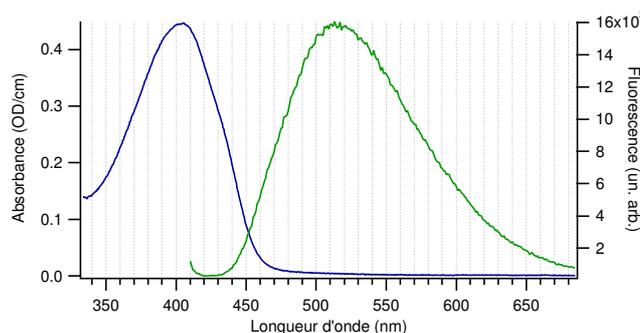


FIG. 3.5 – Spectre d'absorbance (échelle de gauche) et spectre d'émission (échelle de droite, $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$) du chromophore synthétique (fig. 3.1) dissous dans le dioxane.

Chromophore synthétique

Afin de découpler les effets dus à la structure électronique de ceux dus à l'interaction entre le chromophore et la cage protéique, nous avons étudié la dynamique des états excités d'un analogue synthétique du chromophore GFP. Ce type d'étude permet, en principe, de modifier un certains nombres de paramètres comme la polarité, la viscosité ou encore le pH. Ici, nous avons choisi d'étudier les propriétés photophysiques d'un dérivé synthétique de l'imidazolidinone dont les extensions vers les chaînes polypeptidiques ont été remplacées par deux substituants électro-attractifs. Cette substitution induit une délocalisation électronique sur toute la molécule qui rend ce chromophore fluorescent à température ambiante (rendement quantique $\phi = 0.22$). Les spectres d'absorbance et d'émission dans le dioxane sont représentés dans la figure 3.5. Le spectre d'absorbance présente un maximum, correspondant à la transition $S_0 \rightarrow S_1$, autour de 406 nm ($\epsilon_{406 \text{ nm}} = 20700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). L'émission de fluorescence est quant à elle piquée à 508 nm. Ces paramètres rendent compatible la caractérisation des propriétés photophysiques du chromophore avec notre expérience pompe-sonde dans des conditions identiques à celles de l'expérience sur les protéines fluorescentes. Le dioxane, qui est un solvant aprotique, a été choisi pour réduire le phénomène de solvation et parce que sa constante diélectrique est très proche de celle de l'intérieur de la protéine.

3.1.3 Expériences résolues en temps

Cas du mutant uv et de la protéine naturelle

Dans cette section, nous nous sommes intéressés à l'étude et à la comparaison de la dynamique des états excités de la GFP naturelle et du mutant uv. Comme nous l'avons vu précédemment, les structures chimiques des chromophores de la GFPwt et de la GFPuv sont identiques et les seules différences entre les deux protéines résident dans les modifications de la cage protéique qui entoure la partie optiquement active de la protéine. Ces modifications conduisent à une augmentation de la solubilité de la GFPuv lorsque celle-ci est produite par des organismes vivants [CWTS95]. Cette augmentation de la solubilité est interprétée comme la signature d'un mécanisme de repliement plus efficace. Si on regarde les propriétés optiques linéaires de ces deux protéines, on remarque que la seule différence entre les deux protéines est liée au rapport d'absorbance entre les formes neutre et anionique relaxée. Cette différence est probablement due aux modifications de l'environnement proche du chromophore qui stabilise la forme neutre dans le cas de la GFPuv. Nous allons dans un premier temps présenter les résultats obtenus dans le cas du mutant uv ainsi que notre interprétation. Puis nous décrirons les propriétés dynamiques de la protéine naturelle. Finalement, nous discuterons de l'origine des différences observées.

Le faisceau pompe, centré à 395 nm, va nous permettre d'exciter la protéine dans la bande d'absorption de la forme neutre. Nous mesurons la transmission différentielle d'un faisceau sonde retardé. Comme nous l'avons vu dans la partie dédiée à la description des dispositifs expérimentaux, cette technique nous donne accès à la dynamique des populations électroniques. L'utilisation d'une sonde large spectralement permet d'obtenir des informations sur toutes les transitions optiques mises en jeu lors de la relaxation du système. De façon générale, dans une expérience pompe-sonde (voir fig. 3.6), une diminution de la transmission différentielle est due à de l'absorption induite à partir d'un état excité vers un état S_n et une augmentation du signal correspond soit à de l'émission stimulée (gain) à partir d'un état excité, soit à du blanchiment de l'absorption de la transition $S_0 - S_1$.

Dans l'expérience sur la GFPuv, nous avons mesuré la variation de transmission différentielle d'une sonde polarisée linéairement à l'angle magique (54.7°) par rapport à la

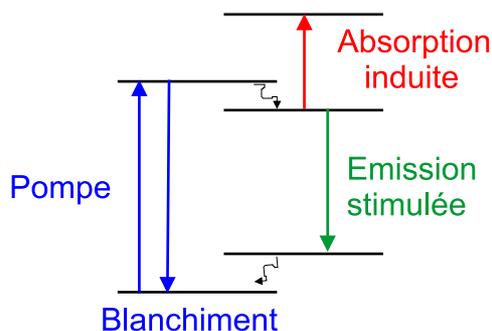


FIG. 3.6 – Schéma de principe de l'expérience pompe-sonde. Le système est excité par l'impulsion pompe et la caractérisation de la dynamique des états excités se fait par la mesure de la variation de transmission de l'impulsion sonde.

polarisation linéaire de la pompe. Cette configuration permet de s'affranchir des effets d'orientation du dipôle moléculaire. Néanmoins, à l'échelle de temps à laquelle nous nous intéressons, la dynamique du signal n'est pas affectée par la rotation de la protéine. Ces expériences ont été réalisées avec différentes intensités de pompe (10-80 nJ par impulsion dans le régime de linéarité du signal), à différents pH (entre 5 et 12), avec des échantillons présentant des rapports d'absorbance entre les formes neutre et anionique relaxés différents (modifiés par photoconversion) et à différentes concentrations (30-120 μM). Il est important de noter que nous n'avons pas observé de modifications qualitatives des signaux spectro-temporels en variant ces différents paramètres. Dans la figure 3.7, nous avons représenté un résultat typique de transmission différentielle en fonction de la longueur d'onde de la sonde et du retard entre la pompe et la sonde. Ces spectres sont obtenus pour une énergie de pompe de 40 nJ/pulse et pour une concentration en GFPuv de 62 μM à pH=8. La contribution la plus importante, dans le spectre total de transmission différentielle, provient de la dynamique du gain associée à l'émission de fluorescence verte piquée autour de 508 nm. On peut aussi distinguer l'apparition, non-résolue temporellement, d'une forme spectrale centrée autour de 480 nm qui recouvre l'aile de l'émission stimulée à 508 nm. Directement après excitation de l'échantillon, il apparaît une faible absorption induite (2.3×10^{-3}) autour de 650 nm. Finalement, pour des retards pompe-sonde supérieurs à 10 ps, une seconde bande d'absorption induite apparaît autour de 480 nm.

L'ensemble de ces spectres de transmission différentielle est bien décrit par un modèle

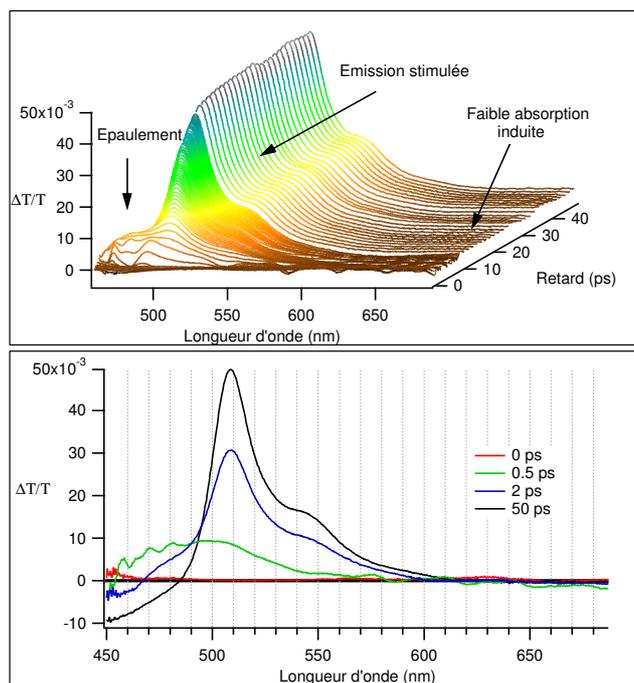


FIG. 3.7 – Spectres de transmission différentielle obtenus à l'angle magique pour un échantillon de GFP_{uv} de $62 \mu\text{M}$ à $\text{pH}=8$. L'échantillon est placé dans la cellule tournante (3000 rpm) et est excité, à 395 nm, par une impulsion de 200 fs qui possède une énergie de 40 nJ.

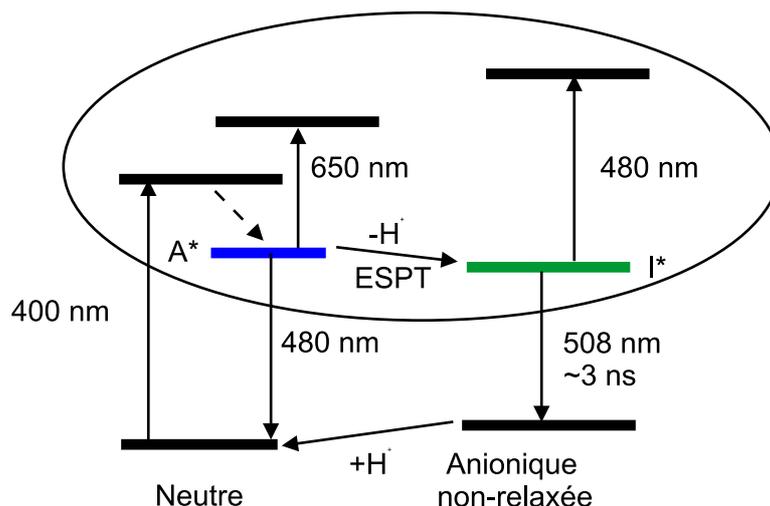


FIG. 3.8 – Représentation schématique de la dynamique des états excités de la GFPuv [CKBB96]. Un modèle impliquant deux espèces (neutre et anionique non-relaxée) nous permet de décrire le spectre total de transmission différentielle et d'extraire le temps caractéristique associé au transfert de proton dans l'état excité.

qui implique un transfert de populations entre deux états excités (voir fig. 3.8). Dans un tel modèle, nous nous attendons à observer la présence d'un point isobestique dans le spectre total de transmission différentielle. Dans ce cas, il devrait exister une longueur d'onde à laquelle il n'y a pas d'évolution temporelle du signal. Cela est effectivement le cas et la longueur d'onde se trouve à 496 nm : le signal reste bien constant durant les 50 ps de la fenêtre d'observation (fig. 3.9). Ce point isobestique constitue donc une signature claire du fait que le signal est dû au transfert de population entre deux états excités différents. En tenant compte des modèles précédemment développés, on peut en conclure que la forme neutre est convertie en forme anionique non-relaxée via un transfert de proton dans l'état excité. A l'aide d'un schéma de niveaux impliquant ces deux espèces (fig. 3.8), nous sommes en mesure d'attribuer la dynamique de gain à 480 nm, dont la montée est non-résolue, à l'émission stimulée à partir de l'état excité de la forme neutre. Cette bande de gain à 480 nm est liée à la faible bande de fluorescence qui apparaît dans les spectres d'émission lors d'une excitation à 395 nm. La dynamique du gain à 508 nm est, quant à elle, attribuée à l'émission stimulée à partir de l'état excité de la forme anionique non-relaxée. Cette attribution est confortée par la similitude entre le spectre de transmission différentielle à temps long et le spectre de fluorescence de la protéine. De par son caractère

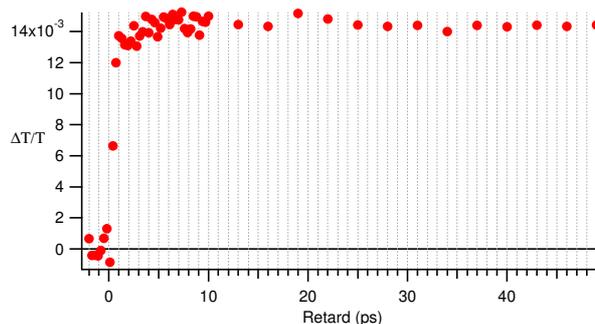


FIG. 3.9 – Coupe temporelle, centrée à 496 nm, extraite du spectre total de transmission différentielle représenté en figure 3.7. Après excitation ($\tau = 0$) le gain atteint instantanément (dynamique non-résolue) la valeur de 1.4 % et reste constant sur toute la durée de notre fenêtre temporelle.

instantané (résolution temporelle 200 fs), l'absorption induite à 650 nm est attribuée à une transition vers un état S_n à partir de l'état excité de la forme neutre. Finalement, l'absorption induite qui apparaît de façon retardée à 480 nm est attribuée à une transition vers un état S_n à partir de l'état excité de la forme anionique non-relaxée. En effet, cette absorption induite ne peut avoir lieu qu'après formation de l'espèce anionique non-relaxée. Avec l'hypothèse d'un modèle à deux états excités, nous pouvons appliquer un algorithme de décomposition en valeur unique qui est inclus dans le programme de traitement de données Igor Pro de Wavemetrics[©] (Single Value Decomposition SVD). Cet algorithme permet d'isoler les vecteurs propres (dans notre cas les spectres des deux états excités) à partir desquels l'évolution temporelle du spectre total de transmission différentielle peut être reconstruite. Le résultat d'une telle analyse est représenté dans la figure 3.10. Dans l'interprétation proposée, le spectre centré autour de 480 nm correspond au spectre de l'état excité de la forme neutre et celui centré autour de 508 nm est associé à l'état excité de la forme anionique non-relaxée. Les oscillations (500-570 nm) présentes dans le spectre associé à la forme neutre sont un artefact de l'algorithme de décomposition qui est dû à la forte contribution du gain à 508 nm par rapport au gain à 480 nm. En revanche, il est intéressant de voir que l'absorption induite à 650 nm est bien associée à la forme neutre du chromophore.

En réalisant maintenant un tranche temporelle centrée sur le maximum de gain à 508 nm, nous sommes en mesure de suivre le transfert de proton dans l'état excité entre la

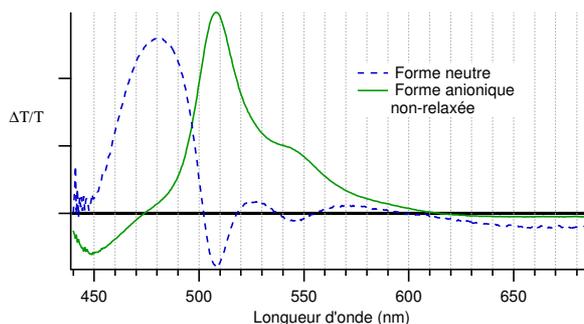


FIG. 3.10 – Résultat de la décomposition en valeur unique du spectre total de transmission différentielle. En tiret, la forme spectrale associée à l'état excité de la forme neutre et en trait plein, celle associée à l'état excité de la forme anionique non-relaxée.

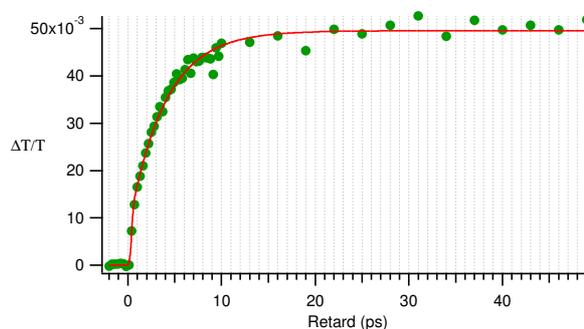


FIG. 3.11 – Coupe temporelle, centrée à 508 nm, extraite du spectre total de transmission différentielle représenté en figure 3.7. La dynamique du gain présente une composante non-résolue de l'ordre de 25% de l'amplitude totale puis le gain croît de façon mono-exponentielle avec un temps caractéristique de l'ordre de 4 ps.

forme neutre et la forme anionique non-relaxée. Cette courbe (fig. 3.11) peut être ajustée à l'aide d'une fonction qui correspond à la convolution entre une mono-exponentielle, un step (pour tenir compte d'une contribution non-résolue) et une impulsion gaussienne. La composante instantanée représente environ 25% de l'amplitude maximale du gain et le temps caractéristique obtenu à partir de l'exponentielle est de 4 ps. Autrement dit, comme l'apparition du gain à 508 nm est liée au transfert de proton dans l'état excité, le temps caractéristique associé à ce transfert est de l'ordre de 4 ps. De la même manière, nous pouvons réaliser une tranche temporelle dans la région spectrale de l'absorption induite ($\simeq 650$ nm). Cette courbe est reportée en figure 3.12. L'apparition de l'absorption induite n'est pas résolue temporellement, ensuite l'amplitude décroît de façon mono-exponentielle

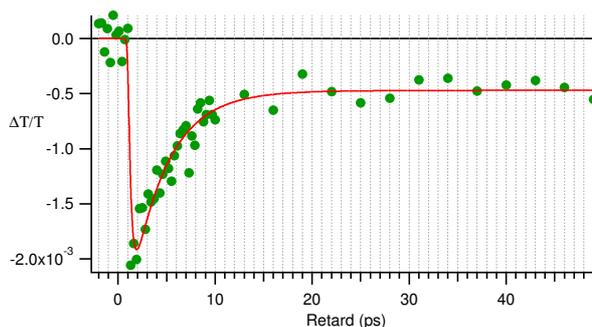


FIG. 3.12 – Coupe temporelle, centrée à 680 nm, extraite du spectre total de transmission différentielle représenté en figure 3.7. La montée de l’absorption induite est non-résolue puis décroît de façon mono-exponentielle avec un temps caractéristique de l’ordre de 3.8 ps vers un plateau constant sur la durée de notre fenêtre d’observation.

(3.8 ps) vers un plateau constant ($\simeq 25\%$ du signal). Le temps caractéristique associé à la décroissance de l’absorption induite est compatible avec celui associé à la montée du gain à 508 nm (3.8 ps versus 4 ps). Nos résultats sur le mutant uv montrent l’existence de composantes non-résolues (“prompt”) aussi bien dans la région spectrale du gain (508 nm) que dans celle de l’absorption induite (650 nm). Ces composantes non-résolues ont déjà été observées dans le cas de la protéine naturelle. Cette observation semble en contradiction avec le résultat obtenu à l’aide de la décomposition en valeur unique, car nous aurions dû trouver, en appliquant cet algorithme, une troisième forme spectrale qui n’évolue pas au cours du temps. Cependant, nous avons été contraints d’utiliser les spectres de transmission différentielle obtenus pour des retards supérieurs à 200 fs à cause de la présence d’oscillations spectrales (effet cohérent dû au solvant qui apparaît à retard nul). Dans cette situation l’algorithme n’est pas capable d’isoler cette forme spectrale puisqu’à $\tau = 200$ fs le signal n’est pas nul; c’est comme si nous avions décalé tous les spectres d’une valeur constante.

Pour valider les mesures obtenues sur la GFPuv produite par culture bactérienne, nous avons répété les expériences de dynamique sur l’échantillon commercial purifié: la dynamique observée est identique à celle obtenue avec les échantillons produits à l’ESBS. En dernier lieu, nous allons définir, de façon empirique, le rapport entre le maximum de gain à 508 nm et le maximum de l’absorption induite à 650 nm: $R = \frac{\max |\frac{\Delta T}{T}(508 \text{ nm})|}{\max |\frac{\Delta T}{T}(650 \text{ nm})|}$. Ce rapport, qui va nous être utile dans la suite, est égal à 22 dans le cas de la GFPuv.

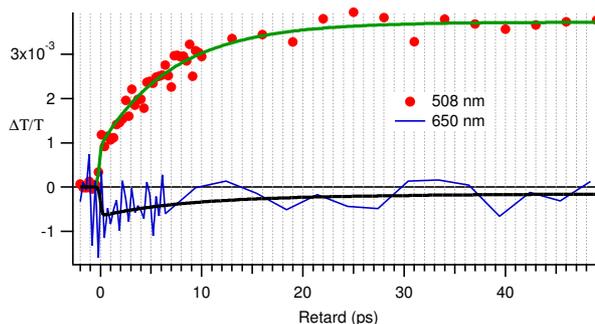


FIG. 3.13 – Evolution temporelle de la transmission différentielle obtenue pour un échantillon de GFPwt de $10 \mu\text{M}$ à $\text{pH}=8$. L'échantillon est placé dans la cellule tournante (3000 rpm) et est excité, à 395 nm, par une impulsion de 200 fs qui possède une énergie de 24 nJ. Ces tranches temporelles sont extraites du spectre total de transmission différentielle. En points et en trait plein fin nous avons représenté les variations de transmission différentielle associées à la dynamique du gain à 508 nm et à la dynamique de l'absorption induite à 650 nm. Les fonctions utilisées pour fitter les données expérimentales sont représentées en ligne continue (trait plein large).

Nous allons maintenant passer à l'étude des propriétés dynamiques de la GFPwt et nous allons voir quelles conclusions nous pouvons tirer des différences qui existent entre les deux protéines. L'expérience pompe-sonde a été réalisée sur un échantillon de GFPwt en solution aqueuse ($\text{pH}=8$) de concentration $10 \mu\text{M}$. L'échantillon est placé dans la cellule tournante (3000 rpm) et est excité à 395 nm par une impulsion de 200 fs (24 nJ). Les résultats obtenus montrent, malgré le niveau de bruit élevé (faible concentration), que la dynamique des états excités des deux protéines présente des différences notables. De façon qualitative, la dynamique des états excités de la GFPwt présente les mêmes signatures spectrales que le mutant uv. En particulier, on retrouve une bande de gain dans la région spectrale de fluorescence (508 nm) et deux bandes d'absorption induite (480 et 650 nm). La tranche temporelle (fig. 3.13) centrée à 508 nm présente, comme dans le cas de la GFPuv, une composante non-résolue qui contribue pour 25% du signal. En revanche, nous observons que le temps caractéristique associé au transfert de proton est de l'ordre de 7 ps alors que, dans le cas de la GFPuv, ce temps caractéristique est d'environ 4 ps. Cependant, cette différence n'est pas la plus importante. Si on s'intéresse à la dynamique de l'absorption induite à 650 nm, on remarque que cette contribution

est 3.6 fois plus importante que dans le cas de la GFPuv (à concentration équivalente). En effet, le rapport R que nous avons défini précédemment est égal à 6 pour la protéine naturelle alors qu'il vaut 22 dans le cas de la GFPuv. Le ralentissement du transfert de proton et surtout l'augmentation de l'absorption induite à 650 nm sont donc vraisemblablement dus aux mutations (seules différences entre les deux protéines) qui affectent l'environnement proche du chromophore et qui modifient par ailleurs le rapport d'absorbance entre les formes neutre et anionique. Nous sommes donc sensibles, à travers la dynamique des états excités, aux modifications qui affectent l'environnement proche du chromophore bien que nous ne sachions pas exactement ce qui modifie le rapport entre le gain et l'absorption induite. Notons finalement, que nos résultats sont parfaitement compatibles avec ceux obtenus dans les différentes expériences résolues en temps réalisées sur la protéine naturelle [CKBB96, WIS⁺02].

Une hypothèse possible, pour expliquer l'origine de la composante instantanée dans le gain à 508 nm et du plateau dans l'absorption induite à 650 nm, serait que ces contributions soient dues à la fraction de forme anionique relaxée excitée à 395 nm (comme l'avaient postulé Chatteraj et al. [CKBB96]). Dans cette hypothèse, comme la durée de vie radiative de l'état excité associé à la forme anionique relaxée est de l'ordre de 3 ns [SSSV99], on peut observer de l'émission stimulée ainsi qu'une absorption induite qui ont un temps caractéristique de quelques nanosecondes à partir de cet état excité. Dans ce cas, les signaux à 508 et 650 nm se décomposeraient en une exponentielle (temps caractéristique 4 ps) convoluée avec un step constant durant les 50 ps de la fenêtre d'observation. Cependant, certains auteurs [WIS⁺02] affirment que la dynamique des états excités, lorsque la protéine est excitée à 400 nm, n'est pas modifiée par les variations du rapport d'absorbance entre les formes neutre et anionique relaxée induites par photoconversion. Cet argument semble donc exclure l'hypothèse d'une excitation directe de la forme anionique relaxée à 395 nm. Toutefois, personne n'est en mesure de dire si l'espèce photoconvertie créée par l'excitation à 395 nm est bien la forme anionique relaxée. Il pourrait s'agir par exemple d'un autre état de protonation du chromophore [VMBR98a, VMBR98b]. Dans ce cas, la comparaison des propriétés dynamiques entre échantillons photoconvertis n'est pas la bonne méthode pour déterminer l'origine de la composante instantanée.

L'étude sur la protéine naturelle montre que les amplitudes relatives, de la composante instantanée dans le gain à 508 nm et du plateau dans l'absorption induite à 650 nm sont à nouveau de $\simeq 25\%$. Cela semble donc exclure une excitation directe de la forme anionique relaxée comme origine de ces deux contributions. En effet, comme les rapports d'absorbance entre les formes neutre et anionique relaxée sont différents pour les deux protéines (6/1 versus 20/1), on devrait voir une différence notable dans les propriétés dynamiques des deux protéines dans le cas où la composante instantanée (508 nm) et le plateau (650 nm) sont dus à une excitation directe de la forme anionique relaxée. Rappelons que celle-ci pourrait être due, comme l'ont postulé Winkler et al. [WIS⁺02], à la dynamique de gain associée à la forme neutre du chromophore. A l'heure actuelle, nous ne sommes pas en mesure de dire si cette hypothèse est valide.

Plusieurs problèmes restent donc ouverts. Le premier concerne la nature chimique de l'espèce photoconvertie qui apparaît dans le spectre d'absorbance. Le meilleur moyen, pour déterminer la nature chimique de cette espèce, serait de réaliser une expérience pompe-sonde sur un échantillon frais et photonconverti en excitant à 480 nm dans la bande d'absorption de la forme anionique relaxée et de la forme photoconvertie. Dans le cas où la dynamique des états excités des deux échantillons serait identique, cela signifierait et constituerait une preuve indiscutable que la lumière convertit bien la forme neutre en forme anionique relaxée. Dans le cas contraire, la photoconversion serait à l'origine de la formation d'une autre espèce chimique (par exemple un nouvel état de protonation du chromophore) dont le spectre d'absorbance se superpose à celui de la forme anionique relaxée. De plus, une expérience pompe-sonde résolue spectralement et temporellement en excitant à 480 nm sur un échantillon frais, permettrait de caractériser les propriétés dynamiques de la forme anionique relaxée et de répondre à la seconde question ouverte qui concerne l'implication de cette espèce dans la dynamique des états excités de la protéine, lorsque celle-ci est excitée à 395 nm.

Cas des fusions anticorps-GFPuv

Au vu des résultats obtenus dans l'étude comparative entre la GFPwt et la GFPuv, nous proposons d'utiliser le rapport, que nous avons défini de façon empirique dans la

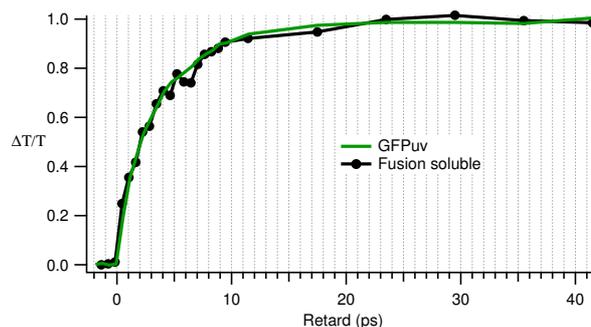


FIG. 3.14 – Variation de la transmission différentielle à 508 nm obtenue pour un échantillon de 13R4-GFPuv de 10 μM à $\text{pH}=8$ comparée à celle de la GFPuv isolée. L'échantillon est placé dans la cellule tournante (3000 rpm) et est excité, à 395 nm, par une impulsion de 200 fs qui possède une énergie de 40 nJ. Ces tranches temporelles normalisées sont extraites du spectre total de transmission différentielle de la GFPuv isolée et de la fusion soluble 13R4-GFPuv. On remarque que les dynamiques du gain sont indiscernables.

section précédente, comme reporteur des modifications de l'environnement proche du chromophore dans le cas des fusions génétiques fragments d'anticorps-GFPuv. Etant incapables de caractériser l'activité biologique (ou l'état de repliement) par les propriétés optiques linéaires de la fusion (voir fig. 3.4), notre idée est d'utiliser la sensibilité offerte par le rapport R pour caractériser l'état de repliement de l'anticorps marqué. En effet, si l'état de repliement de l'anticorps affecte l'état de repliement (ou l'environnement proche) de la protéine fluorescente, nous devrions observer une modification dans la dynamique des états excités de la fusion par rapport à celle de la protéine isolée.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la dynamiques des états excités de deux fusions modèles : une fusion soluble (13R4-GFPuv) et une fusion insoluble (1F4-GFPuv). L'étude de la fusion soluble (13R4-GFPuv) a été réalisée sur un échantillon en solution aqueuse ($\text{pH}=8$) de concentration 10 μM . Les conditions d'excitation sont identiques à celles de l'expérience sur la GFPuv. Les résultats obtenus montrent que la dynamique des états excités de la fusion soluble est identique à celle de la GFPuv isolée. Le temps caractéristique associé au transfert de proton est de l'ordre de 4 ps (voir fig. 3.14) et le rapport R, entre le maximum de gain et le maximum d'absorption induite, est égal à 22. Cette similarité entre les résultats obtenus pour la fusion soluble et la

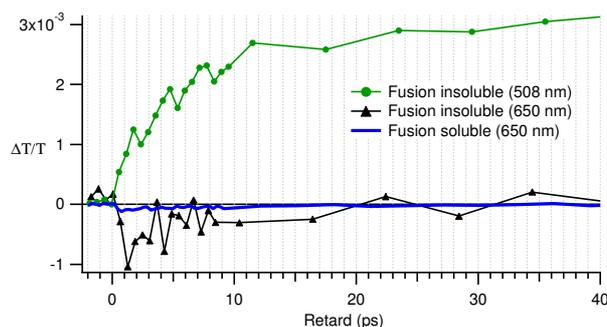


FIG. 3.15 – Variation de la transmission différentielle à 508 nm (point) et 650 nm (triangle), obtenue pour un échantillon de 1F4-GFPuv de $3 \mu\text{M}$ en solution aqueuse à $\text{pH}=8$ (+0.5% de SDS en volume). L'échantillon est placé dans la cellule tournante (3000 rpm) et est excité, à 395 nm, par une impulsion de 200 fs qui possède une énergie de 24 nJ. Pour comparaison, nous avons représenté en trait plein la variation de transmission différentielle centrée autour de 650 nm pour un échantillon de 13R4-GFPuv dont le maximum de gain serait de même amplitude que celui de la fusion insoluble.

GFPuv isolée montre que la présence d'un fragment d'anticorps soluble (bien replié) ne modifie pas l'état de repliement final de la GFPuv et laisse donc inchangé l'environnement proche du chromophore. Dans le cas de la fusion insoluble (1F4-GFPuv), la dynamique des états excités est en revanche affectée par la présence du fragment d'anticorps mal replié. Comme nous l'avons dit dans la section qui concerne la préparation des échantillons, nous avons dû rajouter un tensioactif (SDS) pour dissoudre les agrégats composés de la fusion 1F4-GFPuv (ainsi que les morceaux de membrane présents dans le culot après l'étape de centrifugation). Afin de s'assurer que la présence du SDS ne modifie pas la dynamique du système, nous avons réalisé une première expérience pompe-sonde sur un échantillon de GFPuv contenant 0.5% de SDS en volume. Cette étude montre bien que la dynamique des états excités de la GFPuv n'est pas modifiée par la présence du tensioactif (mêmes signatures spectrales, $\tau_{ESPT} = 4 \text{ ps}$ et $R=22$). L'étude de la fusion insoluble (1F4-GFPuv) a été réalisée sur un échantillon en solution aqueuse ($\text{pH}=8$) de concentration $3 \mu\text{M}$ contenant 0.5% de SDS en volume.

Comme dans les autres expériences, l'échantillon est placé dans la cellule tournante (3000 rpm) et est excité à 395 nm par une impulsion de 200 fs (24 nJ). Une fois de

plus, on retrouve le même comportement qualitatif des spectres de transmission différentielle. Cependant, il existe plusieurs différences, notamment dans l'amplitude relative des différentes contributions, entre la fusion insoluble et les deux autres échantillons. Tout d'abord, le temps caractéristique associé à la dynamique de gain à 508 nm (transfert de proton dans l'état excité) est maintenant de l'ordre de 7 ps (comme dans le cas de la GFPwt) (fig. 3.15). La différence la plus marquante concerne cependant l'absorption induite centrée autour de 650 nm, car son amplitude relative, par rapport au gain à 508 nm, a augmenté (fig. 3.15). Dans le cas de la fusion insoluble, le rapport R est maintenant égal à 3 alors qu'il vaut 22 dans le cas de la fusion soluble et de la GFPuv isolée. Nous attribuons ces différences à la présence d'un anticorps insoluble (mal replié) qui modifie, lors du processus séquentiel de repliement de la fusion (fragment d'anticorps puis GFPuv), l'état de repliement final (ou la structure tertiaire) de la protéine induisant ainsi une modification de l'environnement proche du chromophore. Cette modification de l'environnement perturbe alors la dynamique des états excités de la GFPuv et se traduit par une augmentation de l'absorption induite à 650 nm par rapport à l'amplitude du gain à 508 nm. Comme dans le cas de la GFPwt, la solubilité et l'état de repliement affectent les propriétés dynamiques. Mais la détermination de l'origine des modifications des propriétés dynamiques peut être reléguée au second plan, puisque notre but est de pouvoir différencier, grâce à la dynamique des états excités, les fusions solubles des fusions insolubles. Et bien que nous ne sachions pas ce qui a exactement été modifié dans l'environnement proche du chromophore, notre expérience montre que le rapport entre le maximum de gain et d'absorption induite, que nous avons défini de façon empirique, peut être utilisé comme reporteur de solubilité du fragment d'anticorps fusionné à la GFPuv. Comme nous sommes en mesure de caractériser l'état de repliement de l'anticorps grâce à la sensibilité apportée par la technique pompe-sonde, nous pouvons fournir, aux immunobiologistes avec lesquels nous travaillons, une technique de tri qui permet d'éliminer les candidats présentant une solubilité réduite de la banque de fragment d'anticorps créée.

	GFP _{wt}	GFP _{uv}	13R4-GFP _{uv}	1F4-GFP _{uv}
	solubilité réduite	soluble	anticorps soluble	anticorps insoluble
$\tau_{ESPT}(ps)$	7	4	4	7
$\frac{max \frac{\Delta T}{T}(508 \text{ nm}) }{max \frac{\Delta T}{T}(650 \text{ nm}) }$	6	22	22	3

Résultats obtenus lors des expériences pompe-sonde sur les protéines GFP.

Cas de l'analogue synthétique du chromophore de la GFP

Une autre approche intéressante, dans l'étude des propriétés photophysiques de la GFP, consiste en l'étude du chromophore isolé en solution. Deux voies sont alors envisageables : la première consiste en l'étude du chromophore naturelle de la GFP (HBDI) qui ne fluoresce pas à température ambiante. La seconde voie réside dans l'étude d'analogues synthétiques du chromophore fluorescents à température ambiante. Au cours de ce travail nous avons choisi la seconde voie, en collaboration avec un groupe de chimistes de la faculté de Pharmacologie de Strasbourg qui s'intéressent aux propriétés électroniques de ces dérivés. Nous avons choisi d'étudier l'analogue synthétique, dont la structure chimique est représenté en figure 3.1, car ses propriétés d'absorption et d'émission sont très proches de celles de la protéine. De plus l'utilisation du dioxane comme solvant permet, tout en minimisant les phénomènes de solvatation, de reproduire la constante diélectrique de la protéine. Dans cette expérience, nous avons mesuré la variation de transmission différentielle d'une sonde polarisée linéairement à l'angle magique (54.7°) par rapport à la polarisation linéaire de la pompe. Notons qu'à l'échelle de temps à laquelle nous nous intéressons, la dynamique du signal est très sensible à la relaxation orientationnelle du chromophore ce qui rend cette configuration indispensable pour bien isoler la dynamique des états excités du chromophore.

Dans la figure 3.16, nous avons représenté différents spectres de transmission différentiels obtenus pour une solution de chromophore synthétique dans le dioxane ($18 \mu M$) excitée à 400 nm par une impulsion de 200 fs (60 nJ). L'échantillon est placé dans la cellule tournante (3000 rpm). Nous observons plusieurs contributions dans les spectres de transmission différentielle :

- à retard nul, il apparaît un pic positif centré autour de 450 nm. Cette contribution,

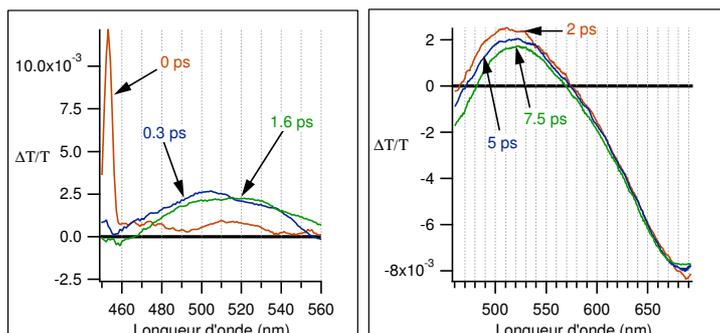


FIG. 3.16 – Spectres de transmission différentielle obtenus pour l'analogue synthétique du chromophore GFP. L'échantillon ($18 \mu\text{M}$, dioxane) est placé dans la cellule tournante (3000 rpm) et il est excitée à 400 nm par une impulsion de 200 fs (60 nJ).

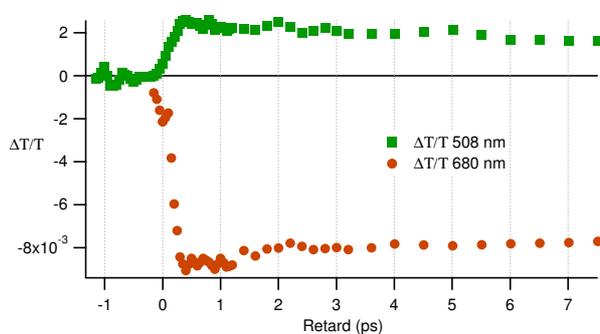


FIG. 3.17 – Coupes temporelles, centrées à 508 et 680 nm , extraites des spectres de transmission différentielle représentés en figure 3.16.

qui est uniquement présente lors de la superposition temporelle de la pompe et de la sonde, est due à la diffusion Raman stimulée (dépendance linéaire en fonction de l'intensité de la pompe) provenant de la vibration C-H_2 du dioxane (2400 cm^{-1}).

- ensuite, il apparaît de façon non-résolue une bande d'émission stimulée autour de 510 nm .
- de la même manière, nous observons simultanément l'apparition d'une bande d'absorption induite centrée autour de 680 nm .

La bande d'émission stimulée présente une dynamique de solvatation (déplacement de la longueur d'onde d'émission vers le rouge) qui possède deux échelles de temps caractéristiques : $\simeq 500 \text{ fs}$ et $\simeq 10 \text{ ps}$. En effectuant deux tranches temporelles centrées sur les maxima d'absorption induite (680 nm) et d'émission stimulée (510 nm), nous obtenons

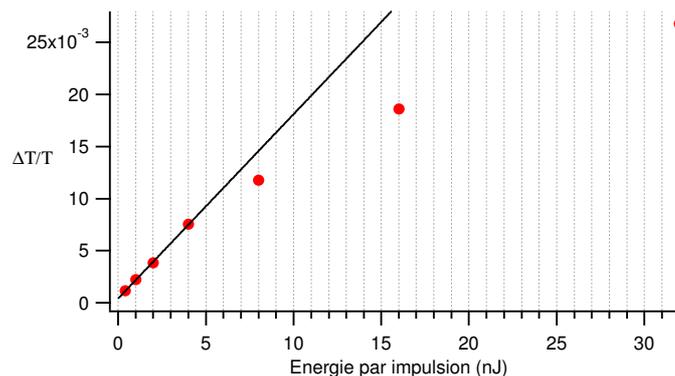


FIG. 3.18 – Variation de la transmission différentielle à 650 nm ($\tau = 10$ ps) en fonction de l'énergie par impulsion.

les deux courbes représentées sur la figure 3.17. On remarque que l'apparition de ces deux composantes est instantanée (non-résolue). De par la similitude entre les longueurs d'onde d'émission de fluorescence et d'émission stimulée, nous avons attribué la composante positive dans les spectres de transmission différentielle à l'émission stimulée à partir de l'état excité S_1 du chromophore. Il reste maintenant à déterminer l'origine de l'absorption induite centrée à 680 nm. Deux hypothèses peuvent être formulées : dans la première, l'absorption induite est due à une transition du type $S_1 \rightarrow S_n$. Dans la seconde hypothèse, l'absorption induite correspond à la bande d'absorption d'un électron solvaté présent en solution [VvSh⁺04]. La présence de cet électron solvaté serait due à une photoionisation du chromophore, induite par l'absorption de deux photons pompe. L'absorption induite que nous mesurons serait alors le spectre d'absorption de l'électron ainsi formé. Afin de vérifier laquelle de ces deux hypothèses est vraie, nous avons mesuré l'amplitude de l'absorption induite à un retard donné en fonction de l'intensité de la pompe. Le résultat de cette expérience est reporté dans la figure 3.18. Sur cette figure, on voit clairement que pour les faibles énergies, l'amplitude de l'absorption induite varie de façon linéaire. Puis, lorsque l'énergie par impulsion augmente, il apparaît un phénomène de saturation dans l'amplitude de l'absorption induite. Cette expérience nous permet d'exclure la présence d'un électron solvaté dans le cas de ce chromophore synthétique et d'attribuer la bande d'absorption induite à une transition du type $S_1 \rightarrow S_n$. Nous pouvons donc dire que la dynamique des états excités de ce chromophore présente des caractéristiques communes à

celles d'une grande majorité de colorants laser : bande de gain, bande d'absorption induite décalée vers le rouge et dynamique de solvatation. Cette dynamique pourrait s'apparenter à la dynamique d'émission de la forme anionique relaxée de la GFPwt, à cause de la montée rapide du gain à 508 nm (non-résolue dans notre expérience) comme cela a été démontré par Chatteraj et al. [CKBB96]. Une autre information apportée par cette étude de l'analogue synthétique du chromophore, est que la dynamique d'émission de la GFP n'est pas uniquement due à la structure électronique du chromophore, mais que le transfert de proton (qui ne peut pas avoir lieu dans le dioxane) et l'interaction avec le reste de la protéine jouent un rôle prépondérant.

En résumé de cette première section, nous avons tout d'abord démontré, par la comparaison entre la GFPuv et la GFPwt, que la dynamique des états excités est sensible aux modifications de l'environnement proche du chromophore. Cette sensibilité peut être mise à profit dans le cadre de l'étude des fusions génétiques fragment d'anticorps/GFPuv. En effet, même si nous ne sommes pas en mesure de dire ce qui a exactement été modifié dans l'environnement proche du chromophore, cette sensibilité nous permet de différencier une fusion soluble d'une fusion insoluble. Cette démonstration constitue donc une étape importante dans la création d'une banque de fragments d'anticorps solubles car elle permet, aux immuno-biologistes avec lesquels nous collaborons, d'éliminer les fragments d'anticorps insolubles (inactifs et toxiques) de la banque d'anticorps.

Finalement, l'étude d'un analogue synthétique du chromophore de la GFP nous a permis de confirmer que la dynamique particulière des états excités de la protéine n'est pas uniquement due à la structure électronique du chromophore, mais que le transfert de proton et l'interaction avec la cage protéique jouent un rôle clé dans ce mécanisme. Là encore, des études complémentaires (chromophore isolé ou chromophore dans une cage synthétique) permettraient de mieux comprendre la riche photophysique de la GFP.

3.2 *Dynamique des états excités des dérivés de coumarine*

Dans le but de comprendre l'origine des modifications des propriétés d'émission des dérivés de coumarine, nous avons étudié la dynamique des états excités de cette famille de marqueurs moléculaires qui sont parfois employés en imagerie cellulaire. Comme nous

l'avons vu dans le premier chapitre, l'un des modèles utilisés pour tenir compte de la sensibilité à l'environnement de ces marqueurs fait intervenir deux géométries dans l'état excité: la première correspond à la forme plane de la molécule et la seconde à un état "twisté" à transfert de charge. L'application de ce modèle aux marqueurs de la famille des coumarines est loin de faire l'unanimité dans la communauté scientifique. Afin de confirmer ou d'infirmer ce modèle à deux états, nous avons réalisé une expérience pompe-sonde résolue temporellement et spectralement. Pour cela, nous avons tout d'abord étudié la dynamique d'émission d'une molécule dérivée d'une coumarine. Cette molécule, que nous appellerons CNAN, a été synthétisée au Département de Chimie Physique des Réactions du groupe ENSIC à Nancy. Les chimistes, avec lesquels nous collaborons, utilisent ces dérivés en tant que "rotors moléculaires" dans des membranes biologiques. Les expériences réalisées sur ce dérivé de coumarine ne nous ont pas permis de mettre en évidence une signature d'un passage par un état twisté. N'ayant pas trouvé une telle signature dans la dynamique de la molécule CNAN, nous avons décidé d'étudier une coumarine chimiquement plus simple (coumarine 152A) dont la nature de rotor moléculaire a été évoquée dans la littérature (voir chapitre 1). Ce choix est motivé par le fait que le groupement, qui pourrait être mis en jeu lors de la rotation dans l'état excité, est similaire à celui qui fait du DMABN un "rotor moléculaire". De plus, les modifications des propriétés d'émission (rendement et durée de vie) observées dans la littérature, lorsqu'on passe d'un solvant apolaire vers un solvant polaire, seraient compatibles avec l'existence d'un état TICT. Notre étude de la dynamique des états excités de la coumarine C152A (non-bloquée) et C153 (bloquée) dans différents solvants montre que même cette coumarine ne présente pas les signatures dynamiques d'un comportement de type "rotor moléculaire". Nos expériences démontrent donc que le modèle à deux états, qui implique une torsion de la molécule dans l'état excité, ne s'applique pas à cette famille de molécules.

Cette section est constituée de deux parties: dans une première partie, nous allons présenter les différents dérivés que nous avons étudiés au cours de ce travail (structures chimiques et propriétés optiques linéaires dans différents solvants). Nous commencerons à décrire les propriétés du composé synthétisé par nos collègues de Nancy (CNAN) et nous terminerons par décrire celles de la coumarine C152A et C153. Dans une seconde partie, nous présenterons et discuterons les résultats des expériences pompe-sonde que

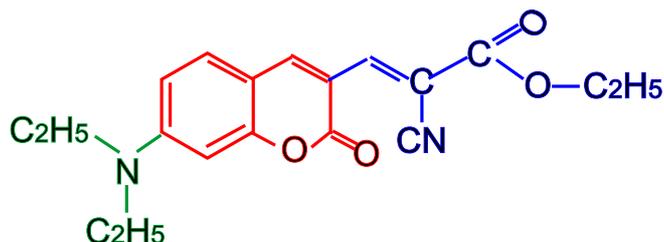


FIG. 3.19 – Structure chimique de la molécule CNAN qui a été synthétisée Département de Chimie Physique des Réactions du groupe ENSIC à Nancy. La base du type coumarine est représentée en rouge, en vert nous avons le groupement diéthyl-amino de même nature que le groupement impliqué dans la torsion de la molécule dans l'état excité du DMABN et, en bleu, le groupement accepteur rajouté par les chimistes pour rendre soluble la molécule dans les membranes biologiques.

nous avons réalisées sur ces différents composés.

3.2.1 Propriétés optiques linéaires

Dans cette partie, dédiée à l'étude des propriétés optiques linéaires des dérivés de coumarine, nous allons voir que ces composés présentent, en fonction de la polarité et de la viscosité des solvants utilisés, un comportement qui s'apparente à celui du DMABN. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'un grand nombre de groupes utilise le mécanisme TICT (qui implique une torsion dans l'état excité) pour expliquer les modifications des propriétés spectrales observées en fonction des caractéristiques du solvant (polarité, viscosité).

Dans la figure 3.19, nous avons représenté la structure chimique du dérivé de coumarine CNAN. La base du type coumarine est représentée en rouge, en vert nous avons le groupement semblable à celui du DMABN (groupement impliqué dans la torsion dans l'état excité) et en bleu, le groupement accepteur rajouté par les chimistes pour rendre soluble la molécule dans les membranes biologiques. Dans l'hypothèse où ce composé se comporte comme un rotor moléculaire, nous avons entrepris l'étude de ces propriétés d'émission dans l'éthanol (viscosité $\simeq 1.2 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$) et dans le glycérol (viscosité $\simeq 1 \text{ Pa.s}$) car ces deux solvants possèdent une viscosité très différente (facteur 830). En plus de ces deux expériences, nous avons réalisé la même étude dans un mélange eau/éthanol mais des problèmes de solubilité (précipitation d'une partie des molécules) ne nous ont pas

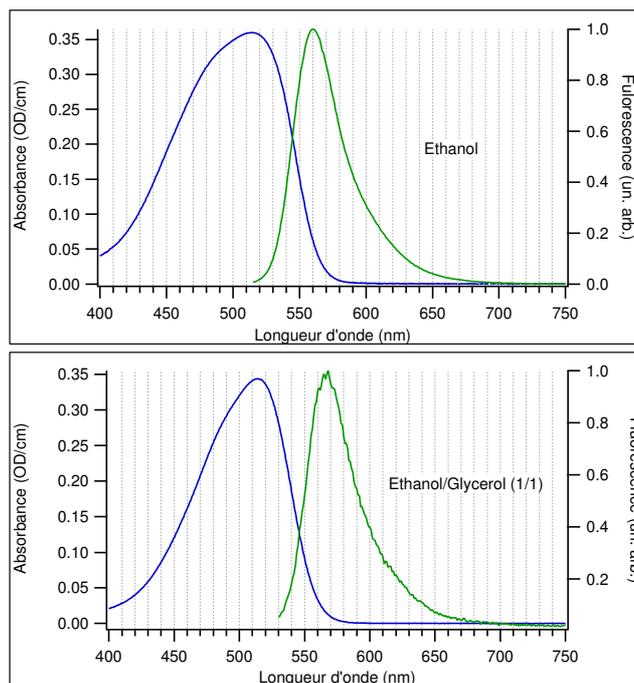


FIG. 3.20 – Spectres d'absorbance (échelle de gauche) et d'émission (échelle de droite) du dérivé CNAN (figure 3.19) dissous dans l'éthanol et dans un mélange éthanol/glycérol (1/1). Ce mélange est utilisé pour des raisons de solubilité. Dans les deux cas, la concentration est de 10^{-5} M.

permis d'obtenir des résultats fiables.

Dans la figure 3.20, on peut voir les spectres d'absorbance et d'émission de la molécule CNAN dans l'éthanol et dans un mélange éthanol/glycérol (1/1). Ce mélange de solvants a été utilisé pour des raisons de solubilité. Etant donné que CNAN se dissout très mal dans le glycérol pur, il faut d'abord le dissoudre dans l'éthanol puis rajouter du glycérol. En accord avec les résultats de la littérature concernant les dérivés de coumarine, CNAN ne présente pas de fluorescence double: l'état TICT ne présenterait donc pas de force d'oscillateur et se désexciterait de façon non-radiative. Dans l'éthanol, le composé présente un maximum d'absorbance centré autour de 515 nm et le maximum d'émission pique à 560 nm; le rendement de fluorescence mesuré par nos collègues est de 0.171 dans l'éthanol. Dans le mélange éthanol/glycérol (1/1), le composé présente un maximum d'absorbance centré autour de 515 nm et le maximum d'émission pique à 566 nm; le rendement de fluorescence est de 0.846. Les propriétés optiques linéaires de CNAN pourraient être

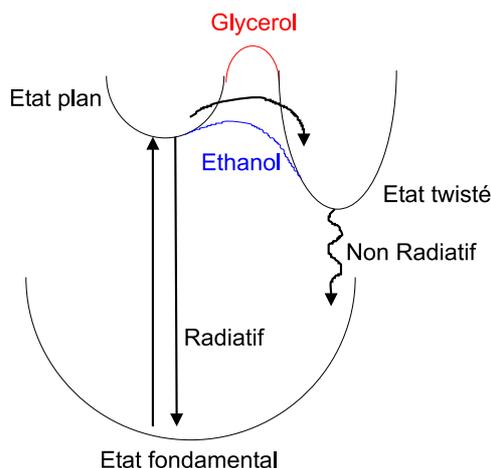


FIG. 3.21 – Schéma de niveaux expliquant la dynamique d'émission dans le cas d'un mécanisme impliquant une torsion dans l'état excité. Dans le cas de l'éthanol, la barrière séparant l'état plan de l'état twisté ne serait pas suffisamment haute à température ambiante. La probabilité de désexcitation non-radiative via l'état TICT serait donc plus grande que celle radiative associée à l'état plan. Nous observons une diminution du rendement quantique dans le cas de l'éthanol et une augmentation du rendement quantique de fluorescence dans le cas du glycérol.

compatibles avec un mécanisme impliquant un état TICT : la forte augmentation du rendement quantique dans le glycérol pourrait en fait être expliquée par l'inhibition de la torsion causée par la viscosité (voir fig. 3.21). Malgré ce point en faveur de la présence d'un état TICT dans la photophysique de ce composé, la dynamique des états excités de CNAN ne présente pas, comme nous le verrons, de signature de la présence d'un tel état. C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés à la photophysique d'un autre dérivé de coumarine, dont la nature possible de "rotor moléculaire" a été évoquée dans la littérature [IJC85]. Il s'agit de la coumarine C152A dont la structure chimique est représentée en figure 3.22. Ce composé commercial existe aussi dans sa forme "bloquée" (C153, fig. 3.22) ce qui permet de comparer le comportement d'un "rotor" potentiel à celui d'une molécule qui ne peut pas présenter d'état TICT. Ces composés présentent en plus l'avantage d'être parfaitement solubles dans les différents solvant utilisés (cyclohexane et acétonitrile). Cet aspect rend nos expériences plus faciles à interpréter.

Dans la figure 3.23, nous avons représenté les spectres d'absorbance et d'émission de la coumarine C152A dans le cyclohexane (apolaire), dans l'acétonitrile (très polaire) ainsi

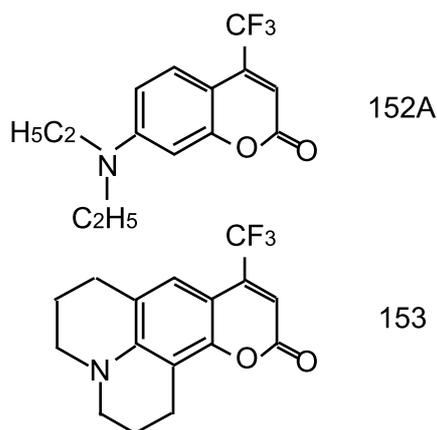


FIG. 3.22 – Structure chimique de la coumarine C152A (non-bloquée) et C153 (bloquée) étudiées au cours de ce travail.

que ceux de la coumarine C153 dans l'acétonitrile. Dans le cas de la coumarine C153, nous nous sommes uniquement intéressés à l'acétonitrile (solvant pour lequel il pourrait y avoir une rotation dans le cas de la coumarine C152A). La concentration des solutions est de 10^{-4} M. Encore une fois nos données confirment l'absence de fluorescence double pour les dérivés de coumarine. Dans le cyclohexane, la coumarine C152A présente un maximum d'absorbance centré autour de 380 nm et le maximum d'émission pique à 430 nm. Le rendement de fluorescence (mesuré dans la référence [IJCB85]) est égal à 1. Il est intéressant de noter l'apparition d'une structure vibrationnelle dans le spectre d'absorbance et d'émission. L'apparition de ces structures est corrélée au rôle minimal joué par les phénomènes de solvation de la molécule dans un solvant apolaire. Dans l'acétonitrile, la coumarine C152A présente un maximum d'absorbance centré autour de 400 nm et le maximum d'émission pique à 495 nm. Le rendement de fluorescence (mesuré dans la référence [IJCB85]) est de 0.09. Dans le cas de la coumarine C153, l'absorbance pique autour de 420 nm et la bande de fluorescence est centrée à 515 nm. Le rendement quantique de fluorescence mesuré dans la référence [RPMS03] est de 0.6 dans l'acétonitrile et il est identique dans le cyclohexane. Une fois de plus, les variations des rendements quantiques pourraient être compatibles avec l'existence d'un état TICT. En effet, on constate que lorsque la polarité du solvant augmente, le rendement quantique de fluorescence chute et l'émission est fortement déplacée vers les longueurs d'onde rouges. Comme dans le cas de CNAN, nous pouvons construire un schéma de niveaux (fig. 3.21), dans lequel la

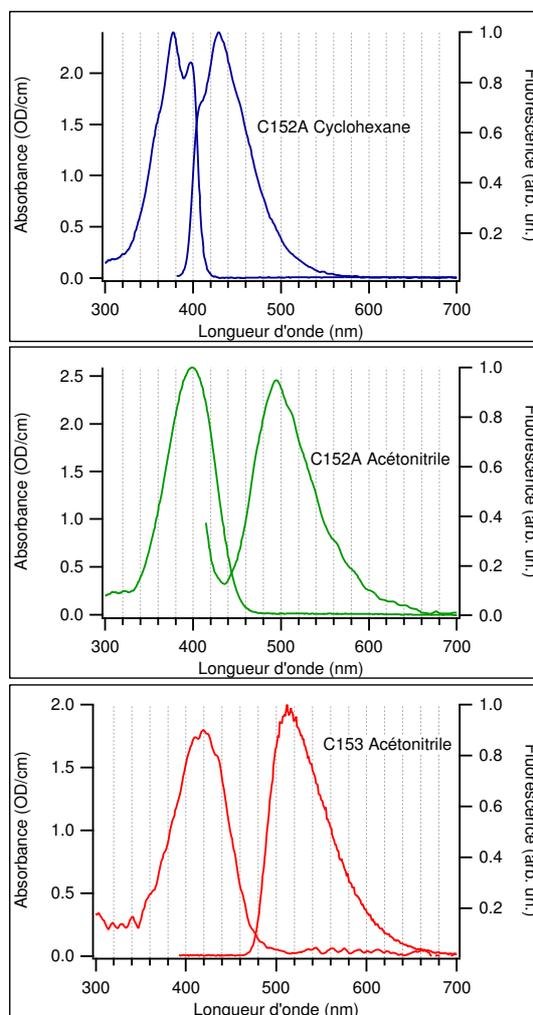


FIG. 3.23 – Spectres d'absorbance (échelle de gauche) et d'émission (échelle de droite) de la coumarine C152A dans le cyclohexane (non-polaire), dans l'acétonitrile (polaire) et de la coumarine C153 dans l'acétonitrile. La concentration des solutions est de 10^{-4} M.

polarité est capable de modifier la hauteur de la barrière qui sépare l'état plan de l'état twisté. Un solvant polaire favorisera donc un transfert de charge intramoléculaire conduisant ainsi à la formation de l'état TICT alors que dans le cas d'un solvant apolaire, ce transfert est fortement défavorisé, ce qui a pour effet d'éliminer le chemin de relaxation non-radiatif via l'état TICT. Contrairement à ce qui se passe dans le cas de la coumarine C152A, le rendement quantique de fluorescence de la coumarine C153 est identique dans le cyclohexane et l'acétonitrile [RPMS03]. Cette constatation est aussi en faveur d'un mécanisme impliquant l'existence d'un état TICT puisque dans le cas de la coumarine C153, la rotation est impossible.

C'est ce type d'observations et d'argumentations qui ont poussé un grand nombre d'auteurs (voir chapitre 1) à appliquer le modèle de l'état TICT aux dérivés de coumarine. Les expériences résolues en temps que nous avons réalisées ne présentent, en revanche, aucune signature de ce phénomène.

3.2.2 Spectroscopie résolue en temps des dérivés de coumarine

Composé synthétisé à l'ENSIC

Après avoir caractérisé les propriétés linéaires de la coumarine CNAN, nous avons entrepris l'étude de la dynamique des états excités en utilisant la technique pompe-sonde. Les impulsions pompes proviennent d'un amplificateur paramétrique optique en géométrie non-colinéaire (NOPA) : durée 30 fs, $\lambda_0=505$ nm et d'énergie par impulsion de l'ordre de 30 nJ. Le faisceau sonde correspond à un continuum spectral qui s'étend de 450 à 750 nm. L'échantillon est placé dans une cellule tournante (3000 rpm) afin d'exciter une partie fraîche de l'échantillon entre chaque impulsion pompe. Le faisceau sonde est polarisé linéairement à l'angle magique (54.7°) par rapport à la polarisation linéaire du faisceau pompe.

Dans la figure 3.24 a), nous avons représenté les spectres de transmission différentielle du composé dans l'éthanol (3.5×10^{-5} M). Le pic centré à 505 nm correspond au blanchiment de l'absorption (saturation de la transition $S_0 \rightarrow S_1$ se traduisant par une augmentation de la transmission de la sonde). Le décalage vers le rouge du pic d'émission ($\simeq 560$ nm) du composé, qui correspond à la dynamique de solvation dans l'éthanol,

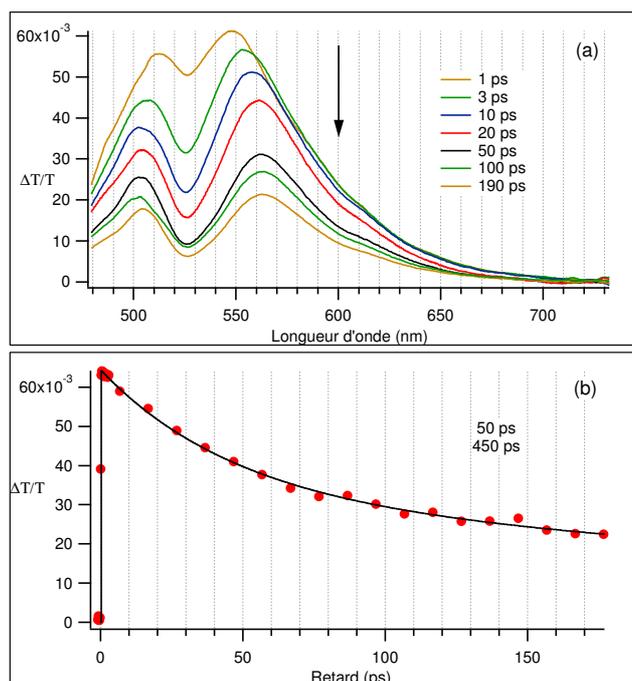


FIG. 3.24 – Spectres de transmission différentielle de la molécule CNAN ($3.5 \times 10^{-5} M$ dans l'éthanol) excité à 505 nm par une impulsion de 30 fs (30 nJ). L'échantillon est placé dans la cellule tournante. En bas, coupe temporelle réalisée en suivant le maximum de gain autour de 560 nm (points), cette courbe est fittée par une fonction (trait plein) qui correspond à la convolution d'une impulsion gaussienne et d'une décroissance bi-exponentielle. Les temps caractéristiques de la relaxation sont de 50 et 450 ps.

est très bien résolu (temps caractéristique $\simeq 100$ fs et $\simeq 10$ ps). En réalisant une tranche temporelle qui suit le maximum de gain autour de 560 nm (fig. 3.24 b)) nous avons accès à la dynamique de relaxation à partir de l'état S_1 . En fittant cette courbe avec une fonction qui correspond à la convolution entre une impulsion gaussienne et une décroissance bi-exponentielle, nous pouvons extraire les temps caractéristiques de la relaxation du composé dans l'éthanol. Ces temps caractéristiques valent respectivement 50 et 450 ps.

Dans le cas du mélange éthanol/glycérol, nous avons répété l'expérience précédente (conditions d'excitation identiques) sur un échantillon de concentration ($3.5 \times 10^{-5} M$). Les spectres de transmission différentielle présentent plusieurs contributions (fig. 3.25 a)). Comme dans le cas de l'éthanol, nous observons bande positive autour de 505 nm qui correspond au blanchiment de l'absorption. La dynamique de solvatation de la bande de

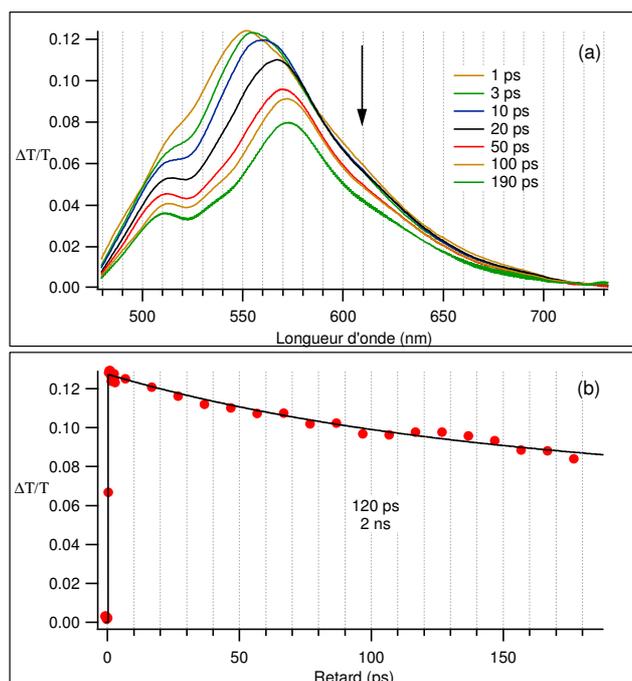


FIG. 3.25 – Spectres de transmission différentielle du composé synthétisé à l'ENSIC ($3.5 \times 10^{-5} M$ dans un mélange éthanol/glycérol 1/1) excité à 505 nm par une impulsion de 30 fs (30 nJ). L'échantillon est placé dans la cellule tournante. En bas, coupe temporelle réalisée en suivant le maximum de gain autour de 566 nm (points), cette courbe est fittée par une fonction (trait plein) qui correspond à la convolution d'une impulsion gaussienne et d'une décroissance bi-exponentielle. Les temps caractéristiques de relaxation sont de 120 ps et 2 ns.

gain, associée à la bande de fluorescence du composé, est à nouveau bien résolue (temps caractéristiques de $\simeq 500$ fs et $\simeq 30$ ps). Si on effectue une coupe temporelle qui suit le maximum de gain autour de 566 nm (fig 3.25 b)), les constantes de temps, obtenues à l'aide de la fonction précédente qui permet de décrire la relaxation à partir de l'état S_1 , sont maintenant de 120 ps et 2 ns.

Au vu de ces différents résultats, on remarque tout d'abord l'absence d'une composante rapide (même avec les 30 fs de résolution) dans la dynamique de gain autour de 560 nm lorsque le solvant utilisé est l'éthanol (polaire, très peu visqueux). Or, si on fait l'hypothèse d'un mécanisme impliquant une torsion de la molécule dans l'état excité, le temps caractéristique devrait être de l'ordre de quelques picosecondes puisque le groupement mis en jeu lors de la rotation est de même nature que celui du DMABN. Comme on

peut le voir dans la figure 3.24 b) le temps caractéristique associé à la composante rapide est de 50 ps. Cette constante de temps est incompatible avec la rotation du groupement diéthyl-amino (6 ps pour le groupement diméthyl-amino du DMABN dans l'acétonitrile [CPMM97]). Ces résultats sont donc en contradiction avec un modèle impliquant une torsion dans l'état excité. Afin de déterminer l'origine des différentes constantes de temps obtenues pour la coumarine CNAN dans l'éthanol et dans le mélange éthanol/glycérol, il faudrait s'intéresser à la dynamique de relaxation de ce composé dans une cage de solvation formée d'éthanol et entourée de glycérol. Il s'agit d'un problème compliqué qui va au-delà des objectifs de ce travail. C'est pour cette raison que nous avons adopté une autre stratégie qui consiste en l'étude de dérivés de coumarine chimiquement plus simples et solubles dans une large gamme de solvants.

	Ethanol	Glycérol/Ethanol (1/1)
Viscosité (Pa.s)	1.2×10^{-3}	1*
Φ_f	0.171	0.846
τ_1 (ps)	50	120
τ_2 (ns)	0.45	2

*Propriétés optiques du composé CNAN dans différents solvants (*glycérol pur).*

Coumarine C152A

L'étude de la dynamique des états excités de la coumarine C152A dans différents solvants et la comparaison avec la coumarine C153 devraient nous permettre de confirmer ou d'infirmer la présence d'une rotation dans l'état excité. Les solvants utilisés, dans cette étude, sont le cyclohexane et l'acétonitrile. L'utilisation de ces deux solvants nous permet d'étudier la dépendance de la dynamique de relaxation en fonction de la polarité du solvant qui est un paramètre clé dans le mécanisme de formation de l'état TICT. Ces deux études ont été réalisées dans une configuration où les impulsions pompe sont centrées autour de 395 nm (200 fs, $\simeq 40$ nJ/pulse), la sonde correspond au continuum spectral. Les échantillons sont placés dans la cellule tournante (3000 rpm) et le faisceau sonde est polarisé linéairement à l'angle magique (54.7°) par rapport à la polarisation

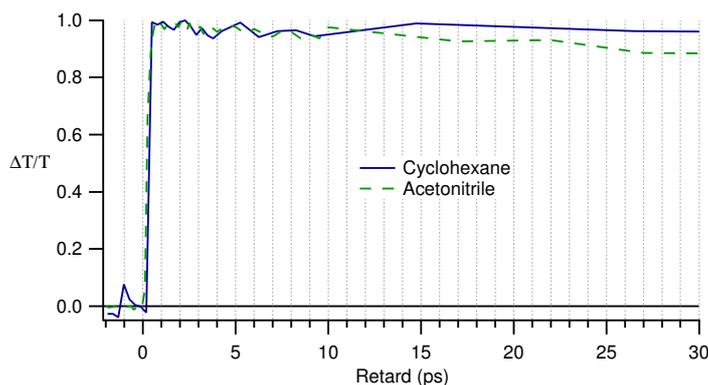


FIG. 3.26 – Coupes temporelles extraites des spectres de transmission différentielle de la coumarine C152A dans le cyclohexane (495 nm) et l'acétonitrile (570 nm). Comme cela est expliqué dans le texte, ces deux tranches sont extraites à $\lambda_{fl} + \Delta\lambda_0$ (où λ_{fl} et $\Delta\lambda_0$ correspondent respectivement à la longueur d'onde du maximum d'émission et à la largeur à mi-hauteur de la bande d'émission de la coumarine C152A).

linéaire de la pompe nous permettant ainsi de nous affranchir de la dynamique orientacionnelle. La concentration des échantillons est de 10^{-5} M. Dans ces conditions l'amplitude des spectres de transmission différentielle varie linéairement en fonction de l'intensité du faisceau pompe. L'unique contribution qui apparaît dans les spectres de transmission différentielle, que ce soit dans le cas du cyclohexane ou de l'acétonitrile, est attribuée à la dynamique de gain associée à la bande de fluorescence de la coumarine C152A dans ces deux solvants. Nous observons également l'absence de solvation dans le cas du cyclohexane (apparition non-résolue du gain et décroissance exponentielle). Dans le cas de l'acétonitrile, le temps caractéristique associé à la solvation est de l'ordre de 500 fs. N'étant pas en mesure de suivre le maximum de gain dans le cas du cyclohexane (le continuum ne s'étend pas jusqu'à cette longueur d'onde : 430 nm), nous avons comparé deux tranches temporelles (voir fig. 3.26) extraites à $\lambda_{fl} + \Delta\lambda_0$ (où λ_{fl} et $\Delta\lambda_0$ correspondent respectivement à la longueur d'onde du maximum d'émission et à la largeur à mi-hauteur de la bande d'émission de la coumarine C152A). Cette procédure empirique a été utilisée dans le but de comparer la dynamique de relaxation de la coumarine C152A dans le cyclohexane et dans l'acétonitrile. Le résultat de cette opération est représenté dans la figure 3.26 où il apparaît clairement que les dynamiques de relaxation de la coumarine C152A dans le cyclohexane et l'acétonitrile sont très semblables. Cette constatation est donc en

pleine contradiction avec l'existence d'une rotation dans l'état excité. En effet, rappelons que dans le cas du DMABN, c'est une expérience de fluorescence [CPMM97] résolue en temps dans l'acétonitrile qui avait permis de déterminer le temps caractéristique (6 ps) associé à la rotation du groupement diméthyl-amino. Or, même si dans le cas de la coumarine C152A le groupement qui pourrait être mis en jeu lors de la rotation dans l'état excité n'est pas exactement identique à celui du DMABN, on s'attend tout de même à ce que le temps caractéristique associé à la rotation (ou à la formation de l'état TICT) soit de l'ordre de quelques picosecondes (<10 ps). Comme on peut le voir dans la figure 3.26, une telle composante est absente de la dynamique de gain de la coumarine C152A dans l'acétonitrile. Nous interprétons l'absence de cette composante rapide comme une preuve de la non-existence d'un état TICT dans la dynamique des états excités de la coumarine C152A. Pour mémoire, rappelons que l'étude sur la dynamique de solvatation de la coumarine C152A réalisée par Gustavsson et al. n'avait pas mis en évidence de composante rapide dans le signal de fluorescence résolue en temps [GCG⁺98]. Afin de conforter notre interprétation, nous avons réalisé la même expérience pompe-sonde sur l'analogue bloqué de la coumarine C152A (C153). L'expérience est réalisée en plaçant un échantillon de coumarine C153 (10^{-4} M, acétonitrile) dans la cellule tournante (3000 rpm). Cet échantillon est excité à 395 nm par une impulsion (32 nJ). On observe à nouveau, comme dans le cas de la coumarine C152A, une seule contribution dans le spectre total de transmission différentielle. Cette bande positive est associée au gain qui provient de la bande d'émission centrée autour de 515 nm. Cette fois, nous sommes en mesure d'extraire une coupe temporelle qui suit le maximum de gain autour de 580 nm et de la comparer à la courbe de gain obtenue dans le cas de la coumarine C152A dissoute dans l'acétonitrile. Ces deux courbes sont reportées dans la figure 3.27. Étant donné la similitude entre les deux dynamiques de gain, nous arrivons à la conclusion que le mécanisme qui implique une rotation dans l'état excité ne peut en aucun cas s'appliquer à la coumarine C152A.

Ces expériences semblent donc confirmer les observations faites sur le composé synthétisé à l'ENSIC et tendent à montrer que le modèle de l'état TICT ne s'applique pas aux dérivés du type 7-amino-coumarine. Nous tenons donc à attirer l'attention des personnes qui utilisent ces composés en tant que rotors moléculaires, car l'interprétation des modifications des propriétés d'émission en terme de variation de la viscosité locale, via la

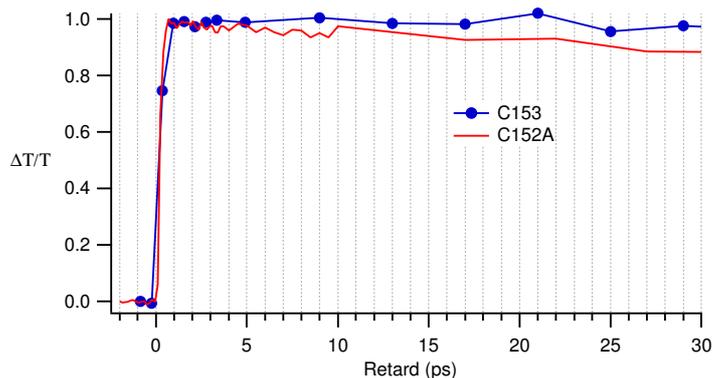


FIG. 3.27 – Coupes temporelles extraites, en suivant le maximum de gain) des spectres de transmission différentielle de la coumarine C153 (trait et points) et C152A (trait plein) dans l'acétonitrile.

rotation dans l'état excité, est vraisemblablement fautive. Les modifications observées sont probablement dues à des effets aux temps longs (formation d'état triplet, interaction avec des ions, solvation ...) qui ne font en aucun cas intervenir un changement de géométrie rapide dans l'état excité.

	C152A Cyclohexane	C152A Acétonitrile	C153 Acétonitrile
Φ_f	1	0.09	0.6
déclin rapide (<10 ps)	non	non	non

Propriétés optiques de la coumarine non-bloquée (C152A) et bloquée (C153) dans différents solvants.

4. VIEILLESSEMENT STATISTIQUE DE LA GFPUV

Introduction

Au cours de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés, en collaboration avec M. François Bardou, à un sujet qui sort totalement du cadre des expériences résolues en temps. Cette problématique concerne l'étude du vieillissement (ou perte de fluorescence) qui affecte tous les marqueurs organiques. En effet, les techniques d'imagerie de molécules uniques ont mis en évidence le fait qu'un marqueur organique ne peut effectuer qu'un nombre fini de cycles d'absorption-émission spontanée ($\simeq 10^5$ dans le cas de la GFP) après lesquels la molécule atteint un état non-fluorescent (état noir) permanent. A cause de ce phénomène, plus connu sous le nom de photoblanchiment (photobleaching), le suivi d'un objet marqué, en imagerie biologique, ne peut se faire que sur des temps limités (quelques secondes). Il est donc très important de comprendre l'origine de ce mécanisme. C'est dans ce cadre que nous avons entrepris l'étude du vieillissement de la GFPuv.

L'une des approches couramment utilisées pour comprendre l'origine de ce mécanisme consiste en l'étude des propriétés optiques de marqueurs uniques. L'argument avancé par les auteurs qui emploient ce type d'approche est que, si l'on cherche à déterminer la valeur d'un paramètre expérimental, l'étude d'une multitude de systèmes uniques permet d'obtenir plus d'informations qu'une mesure d'ensemble. En effet, dans le premier cas nous pouvons obtenir la distribution de probabilité de la valeur du paramètre d'intérêt et, dans l'autre, nous n'obtenons que la valeur moyenne de ce paramètre. La première approche est donc plus riche en informations que la seconde. Dans ce travail, nous avons pourtant choisi une approche qui consiste à étudier un ensemble bien défini de marqueurs fluorescents. Nous allons montrer que l'évolution temporelle de la fluorescence, obtenue à partir de la mesure d'ensemble, permet d'obtenir des informations physiques sur les processus mis en jeu dans le mécanisme de vieillissement et de remonter à la distribution d'un paramètre

physique tel qu'une barrière de potentiel. Pour cela, nous avons étudié sous excitation continue et, à l'aide d'un microscope confocal, l'évolution temporelle de la fluorescence d'un ensemble bien déterminé de GFPuv. Nos résultats montrent que la décroissance de la fluorescence associée au blanchiment (temps d'illumination supérieurs à $\simeq 100$ s) ne suit pas une simple loi exponentielle mais plutôt une loi de puissance, avec un exposant compris entre 0 et 1. La présence de cette loi de puissance avec un exposant compris entre 0 et 1 montre que la dynamique du système est décrite par une statistique de type Lévy. Le modèle que nous avons développé pour expliquer les résultats expérimentaux prend en compte un mécanisme de photoconversion irréversible entre un état fluorescent et un état noir. Ces deux états sont séparés par une barrière de potentiel et les temps associés au franchissement de la barrière sont distribués selon une loi large. Dans ce modèle, une transformation mathématique permet de relier directement l'évolution temporelle de l'intensité de fluorescence à la distribution des barrières. A partir de mesures d'ensemble, nous sommes donc capables d'obtenir des informations sur les mécanismes physiques à l'origine du vieillissement.

Ce chapitre se divise en trois sections : dans la première, nous passerons en revue quelques expériences qui se sont intéressées aux propriétés d'émission de protéines GFP uniques. Nous définirons ensuite ce qu'est une loi de Lévy et nous décrirons les propriétés, parfois surprenantes, des systèmes gouvernés par ce type de loi. Dans une deuxième section nous décrirons brièvement l'expérience (configuration expérimentale et production des échantillons). Finalement, nous présenterons, dans la dernière section, les résultats expérimentaux ainsi que le modèle que nous avons développé.

4.1 *Expérience sur des molécules uniques et statistiques de Lévy*

4.1.1 *Comportement de protéines GFP uniques*

Depuis la fin des années 1990, le nombre d'études concernant des expériences sur des molécules uniques ne cesse d'augmenter. Un des domaines dans lequel ce type d'études connaît un succès grandissant est celui de l'imagerie biologique. En fait, la possibilité de suivre la position d'un marqueur unique à travers ses propriétés optiques est devenu un outil indispensable et très puissant [PHBV97, Wei99]. Les travaux des pionniers

[MO99] ont montré que les propriétés optiques d'une molécule unique peuvent servir à caractériser l'environnement local de la molécule. L'intérêt par rapport à une mesure d'ensemble réside dans le fait que l'on s'affranchit des inhomogénéités d'environnement qui affectent chaque marqueur et qui dominent souvent les valeurs moyennes. Encore plus intéressant est le fait que l'on peut reconstruire la distribution d'ensemble par des mesures répétées sur une multitude d'objets uniques. Cette méthode devient encore plus puissante si la molécule unique est utilisée comme marqueur attaché à un objet d'intérêt biologique (protéine ...). Dans ce cas, on obtient directement une information, à travers la fluorescence du marqueur, sur la position de l'objet d'intérêt. Cette approche a par exemple été utilisée pour caractériser l'activité de la kinésine (moteur moléculaire) [PHBV97] ou encore la transcription de l'ADN à l'aide de technique de transfert résonnant d'énergie [Wei99]. Malheureusement, le suivi d'une sonde fluorescente est limité dans le temps car un marqueur organique ne peut effectuer qu'un nombre fini de cycles absorption/émission spontanée avant d'atteindre un état non-fluorescent. Cette conversion peut, sous certaines conditions, être réversible. Notons finalement, qu'il existe une autre classe de marqueurs (inorganiques) pour lesquels le mécanisme de photoblanchiment est moins efficace. L'utilisation de ces marqueurs permet donc, malgré le phénomène d'intermittence dans l'émission de fluorescence (blinking), un suivi sur des temps plus longs. Les principaux inconvénients des marqueurs inorganiques sont cependant liés à leur compatibilité avec les milieux biologiques et/ou à leur fonctionnalisation dans des expériences de marquage.

Comme nous nous sommes intéressés au mécanisme de photoblanchiment de la GFPuv, nous allons passer en revue quelques expériences qui ont mis en évidence ce type de comportement dans le cas des protéines GFP excitées en continu. En 1997, Moerner et al. [DCTM97] ont observé, en étudiant la fluorescence de la Yellow Fluorescent Protein (YFP un mutant de la GFP) dispersée dans un gel de polymères (Polyacrylamide PAA), le caractère intermittent de l'émission des YFP uniques lorsque elles sont excitées à 488 nm. Ces résultats montrent que l'émission d'une YFP unique présente une alternance de périodes dans lesquelles la molécule fluoresce et ne fluoresce pas (ON/OFF) avant d'atteindre définitivement un état non-fluorescent (noir). En construisant les histogrammes des temps ON et OFF, les auteurs constatent que ces distributions peuvent être

fittées respectivement par une loi exponentielle (temps caractéristique $\simeq 0.8$ s) et une bi-exponentielle (temps caractéristiques de 1 s et quelques dizaines de secondes). Les auteurs montrent également que le retour vers l'état fluorescent est possible si la molécule est excitée par un second laser à 405 nm. Cette expérience met donc en évidence la présence de deux mécanismes distincts : le premier correspond à une transition rapide et réversible entre un état fluorescent et un premier état noir qui se traduit par une alternance de périodes ON/OFF (blinking). Le second mécanisme est relié au passage d'un état fluorescent vers un état noir stable. Afin de tenir compte de ces deux mécanismes, les auteurs proposent un modèle à trois espèces : une fluorescente et deux autres non-fluorescentes. Etant donné que la photophysique de cette famille de protéines fait intervenir différents états de protonation du chromophore (voir chapitre 1), l'état fluorescent est attribué à la forme anionique relaxée du chromophore (espèce fluorescente lorsque la protéine est excitée à 488 nm), l'état noir permanent est attribué à la forme neutre du chromophore à cause du retour possible vers l'état fluorescent si la protéine est excitée à 405 nm. Finalement, la forme responsable de l'intermittence dans l'émission de fluorescence de la protéine est attribuée à une forme I dont la nature chimique est indéterminée. Dans deux autres expériences utilisant une technique de champ proche et la technique de microscopie confocale, Garcia-Parajo et al. [GPVSN⁺99, GPSNV⁺00] observent le même type de comportement sur le mutant EGFP dispersé dans un gel de polyacrylamide (PAA). Les temps caractéristiques associés aux histogrammes des temps ON et OFF sont similaires à ceux trouvés dans le cas de la YFP. Comme dans l'étude précédente, les auteurs suggèrent un modèle à trois espèces et attribuent l'origine de l'état noir permanent à l'interaction entre le chromophore et l'oxygène singulet via une déformation (ouverture) de la cage protéique. Moerner et al. ont confirmé ces observations dans le cas de EGFP dispersées dans un gel de PAA [PBM99]. Une fois de plus, les auteurs observent une dynamique de clignotement suivie d'une conversion irréversible vers un état noir, sauf si la molécule est excitée à une autre longueur d'onde (405 nm). Comme mécanismes possibles à l'origine de la formation de cet état noir, les auteurs proposent la photoisomérisation du chromophore ou encore la formation d'un nouvel état de protonation du chromophore. Les auteurs s'intéressent aussi aux rôles du pH et de l'intensité laser dans le mécanisme du clignotement. Le premier paramètre ne modifie pas ce mécanisme. L'absence de variations

avec le pH suggère que le mécanisme du clignotement n'implique pas, contrairement à ce qui avait été postulé, la forme neutre du chromophore. En revanche, le temps moyen associé à la distribution des temps ON diminue fortement quand l'intensité laser augmente, ce qui suggère que la transition ON-OFF se fasse par l'état excité. Cette dépendance ne se retrouve pas dans le cas des temps OFF. Finalement, les auteurs proposent un transfert d'électron à l'intérieur de la cage, un autre état de protonation du chromophore ou bien encore la photoisomérisation du chromophore comme mécanismes possibles pour le photoblanchiment. L'absence de la forme neutre du chromophore dans le mécanisme du clignotement est confirmée par une étude réalisée par Webb et al. [SKH⁺00] sur la YFP à pH élevé. Cette étude confirme de plus que la conversion entre l'état fluorescent et l'état noir a lieu dans l'état excité.

Pour résumer ces quelques travaux, on peut dire que les propriétés d'émission de GFP uniques sont bien caractérisées dans le sens où la dynamique des mécanismes mis en jeu a été largement étudiée. Une molécule au repos (pas d'éclairement préalable) effectue un nombre fini de cycles d'absorption et d'émission spontanée qui se traduit par une alternance de périodes ON/OFF dont les durées sont distribuées selon une loi exponentielle. Après avoir effectué un certains nombres de cycles (\simeq qlqs 10^5 pour la GFP), la molécule se piège dans un état noir permanent (ou temporaire si on excite à une autre longueur d'onde). Selon le mutant considéré, cette dynamique d'émission peut impliquer plusieurs états fluorescents et non-fluorescents. Jusqu'à l'heure actuelle, la nature chimique des différents états noirs ainsi que les mécanismes qui conduisent à la formation de ces états restent à déterminer. Le mécanisme de photoblanchiment, qui correspond à la transition irréversible vers un état non-fluorescent avec un temps caractéristique de l'ordre de quelques secondes, rend particulièrement difficile les expériences en molécule unique dans le domaine de l'imagerie biologique, à cause des durées d'observation réduites. Toutefois, l'existence de cette conversion fluorescent/non-fluorescent peut être mise à profit dans certaines applications. Par exemple, Patterson et al. [PLS02] ont créé un mutant de la GFP photo-activable. Au repos, l'absorption d'un photon à 488 nm par ce mutant ne comporte pas de fluorescence. Par contre, après excitation à 400 nm, l'échantillon excité à 488 nm, est fluorescent. Avec un tel mutant, il devient par exemple très facile d'étudier les phénomènes de diffusion entre deux régions d'un échantillon. Une autre application

possible concerne la bioélectronique [CPF⁺01]. En effet, on peut imaginer un système de stockage binaire utilisant ces deux états pour coder l'information et qui soit contrôlé par la lumière.

4.1.2 Statistique de Lévy [BBACT02]

Contrairement aux différents travaux que nous venons de citer, nous avons entrepris l'étude du mécanisme de photoblanchiment de la GFPuv en étudiant la fluorescence d'un ensemble de protéines. Cette étude a mis en évidence le fait que le vieillissement statistique de la GFPuv fait intervenir des lois de distributions larges, les lois de Lévy. Nous allons voir, dans la partie qui concerne les résultats expérimentaux, que nous sommes capables, à partir de la variation temporelle de l'intensité de fluorescence totale, d'obtenir par les lois de Lévy des informations sur les phénomènes à l'origine du photoblanchiment. La présence de ces distributions dans l'évolution temporelle de l'émission de l'ensemble conduit en particulier à l'existence d'un état fluorescent instable, qui possède une durée de vie moyenne infinie. Afin de mieux comprendre l'origine contre-intuitive de ce résultat (habituellement la durée de vie moyenne d'un état instable est finie), nous allons introduire des concepts élémentaires concernant les lois de Lévy.

Pour introduire l'origine des statistiques de Lévy, considérons la somme T_N de N variables aléatoires positives indépendantes distribuées selon la loi $P(\tau)$:

$$T_N = \sum_{i=1}^N \tau_i \quad (4.1)$$

Si $P(\tau)$ est une loi "normale" (dans laquelle on peut définir une valeur moyenne ainsi qu'une variance) alors on peut écrire :

$$T_N = \langle \tau \rangle N + \sigma \sqrt{N} \xi \quad (4.2)$$

où $\langle \tau \rangle$ est défini comme la valeur moyenne, $\sigma^2 = \langle \tau^2 \rangle - \langle \tau \rangle^2$ la variance et ξ une nouvelle variable aléatoire sans dimension. Dans cette situation, le théorème de la limite centrale, qui s'applique dans le cas de variables distribuées selon des lois étroites, dit que si N tend vers l'infini, alors ξ est distribuée selon une loi gaussienne centrée réduite $G(\xi)$. Autrement dit, ξ possède une valeur moyenne nulle et une variance égale à un :

$$G(\xi) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{\xi^2}{2}} \quad (4.3)$$

Le théorème de la limite centrale nous donne donc la forme de la distribution $P(\tau)$:

$$\lim_{N \rightarrow \infty} P(\xi_1 \leq \frac{T_N - \langle \tau \rangle N}{\sigma \sqrt{N}} \leq \xi_2) = \int_{\xi_1}^{\xi_2} G(\xi) d\xi \quad (4.4)$$

Que se passe-t-il maintenant si la variable τ est distribuée selon une loi $P(\tau)$ qui présente une queue en loi de puissance (loi de Pareto) :

$$P(\tau) \underset{\tau \rightarrow \infty}{\sim} \frac{\alpha \tau_0^\alpha}{\tau^{1+\alpha}} \quad (4.5)$$

où τ_0 définit l'échelle du phénomène et α est l'exposant qui donne la vitesse à laquelle la distribution tend vers 0 ($\alpha > 0$ pour que la densité de probabilité soit normalisable)? Le moment d'ordre n est défini par la relation suivante :

$$\langle \tau^n \rangle = \int_0^\infty \tau^n P(\tau) d\tau \quad (4.6)$$

A partir de cette relation, on obtient facilement la condition pour laquelle le moment d'ordre n est fini : $n < \alpha$. Dans le cas où l'exposant de la loi de puissance est inférieur à un, la valeur moyenne $\langle \tau \rangle$ de la variable τ est infinie. Dès lors, le théorème de la limite centrale tel qu'il a été énoncé précédemment ne s'applique plus car la relation 4.2 n'est plus valide (invalide également pour $\alpha = 2$).

C'est dans les années 1930 que le mathématicien français Paul Lévy généralisa le théorème de la limite centrale, afin de pouvoir traiter de telles distributions. En effet, dans le cas où $\alpha < 1$ (on ne traitera pas le cas où $1 \leq \alpha \leq 2$), la valeur moyenne et la variance divergent. Ce qui implique que la somme T_N croît plus vite que le nombre de termes N . Dans ce cas, la relation 4.2 est remplacée par l'expression suivante :

$$T_N = \xi \tau_0 N^{\frac{1}{\alpha}} \quad (4.7)$$

où ξ est cette fois une variable d'ordre 1 distribuée selon une loi de Lévy $D_\alpha(\xi)$ dont la transformée de Laplace est :

$$L[D_\alpha(s)] = \int_0^\infty D_\alpha(\xi) e^{-s\xi} d\xi = e^{-\Gamma(1-\alpha)s^\alpha} \quad (4.8)$$

où $\Gamma(\alpha)$ est la fonction gamma. Dans ce cas, l'équation 4.4 se réécrit :

$$\lim_{N \rightarrow \infty} P(\xi_1 \leq \frac{T_N}{\tau_0 N^{\frac{1}{\alpha}}} \leq \xi_2) = \int_{\xi_1}^{\xi_2} D_\alpha(\xi) d\xi \quad (4.9)$$

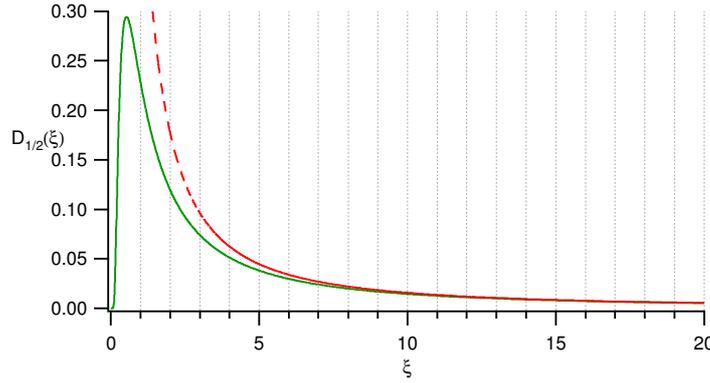


FIG. 4.1 – Fonction de Lévy $D_{\frac{1}{2}}(\xi)$ (trait plein). Pour des valeurs de ξ élevées, la loi décroît comme $\frac{1}{2\xi^{\frac{3}{2}}}$ (tiret).

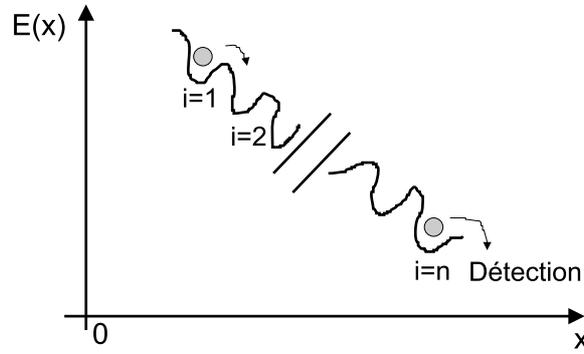


FIG. 4.2 – Schéma de principe de la cascade d'Arrhénius.

Dans le cas particulier où $\alpha = \frac{1}{2}$ nous pouvons donner l'expression analytique de la loi de Lévy :

$$D_{\frac{1}{2}}(\xi) = \theta(\xi) \frac{1}{2\xi^{\frac{3}{2}}} e^{-\frac{\pi}{4\xi}} \quad (4.10)$$

où $\theta(\xi)$ est la fonction de Heaviside. Dans la figure 4.1, nous avons représenté cette fonction. La question qui se pose maintenant est : que se passe-t-il si l'évolution temporelle d'un système est régie par une distribution qui possède une queue en loi de puissance avec un exposant inférieur à 1 ? Pour illustrer cela, nous allons présenter l'exemple de la cascade d'Arrhénius [Bar99].

Considérons un système physique soumis aux fluctuations thermiques et placé sur une surface de potentiel à une dimension (voir fig. 4.2). La variable x représente un paramètre quelconque du système. Cette surface présente n minima locaux d'indice i et chaque puits est séparé du suivant par une barrière de hauteur E_i . Si la hauteur des

barrières est distribuée selon une loi exponentielle, alors on peut écrire :

$$P(E) = \frac{1}{E_0} e^{-\frac{E}{E_0}} \quad (4.11)$$

où E_0 est la hauteur moyenne des barrières. Le passage de puits en puits se fait via les fluctuations thermiques et l'inclinaison de la surface est suffisante pour que le système effectue une cascade le long de cette surface. La loi d'Arrhénius nous donne le temps de piégeage moyen dans chaque puits :

$$\tau_i = \tau_0 e^{\frac{E_i}{k_B T}} \quad (4.12)$$

où τ_0 est le temps d'essai (lié au nombre d'essais du franchissement de la barrière), k_B la constante de Boltzmann et T la température. A partir de ces deux expressions, il est facile d'exprimer la densité de probabilité $P(\tau)$ du temps de piégeage. Pour cela, on utilise le fait que $P(\tau)d\tau = P(E)dE$; on obtient alors :

$$P(\tau) = \alpha \frac{\tau_0^\alpha}{\tau^{1+\alpha}} \quad (4.13)$$

avec $\alpha = \frac{k_B T}{E_0}$. Donc notre système de "cascade d'Arrhénius" possède des temps de piégeage distribués selon une loi de puissance du type 4.5.

Considérons maintenant une expérience dans laquelle l'observateur veut mesurer le temps de piégeage moyen dans un puits. Pour cela, il va mesurer le temps total mis par le système pour franchir les n puits et il va éventuellement répéter l'expérience m fois afin de réduire l'incertitude. Cela signifie alors que le temps de piégeage moyen peut être obtenu en divisant le temps total par le nombre de puits explorés :

$$\langle \tau_{exp}(N) \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \tau_i \quad (4.14)$$

avec $N = n \times m$. Si le système est placé à une température $T = \frac{3E_0}{k_B}$ ($\alpha = 3$) alors, la loi des grands nombres qui est une conséquence du théorème de la limite centrale s'applique, et quand N tend vers l'infini on a bien $\langle \tau_{exp} \rangle \rightarrow \langle \tau \rangle$. Dans ce cas, l'observateur a accès au temps moyen de piégeage dans un puits. Imaginons maintenant, que le système soit placé à basse température, par exemple tel que $T = \frac{0.5E_0}{k_B}$ ($\alpha = 0.5$). Nous sommes donc dans la situation où le coefficient de la loi de puissance, qui caractérise la distribution

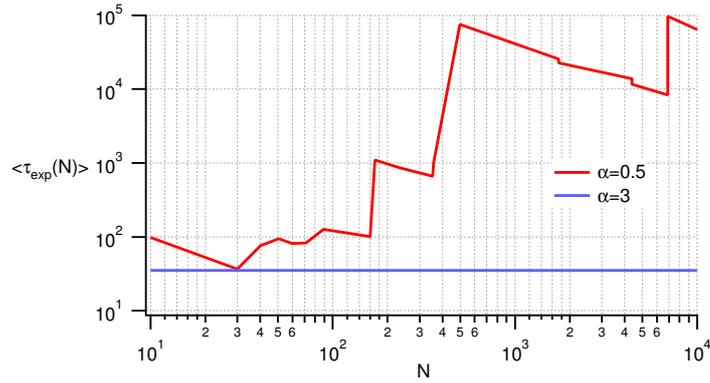


FIG. 4.3 – Simulation de la mesure expérimentale du paramètre $\langle \tau_{exp}(N) \rangle$ en fonction du nombre de puits exploré pour $\alpha = 0.5$ et $\alpha = 3$ ($\times 30$). Les paramètres n et τ_0 sont respectivement égaux à 10 et 1. Les données sont extraites de la référence [Bar99].

des temps τ , est inférieur à un. Comme nous l'avons vu précédemment, le théorème de la limite centrale généralisé nous dit que $T_N \sim N^{\frac{1}{\alpha}}$; cela a pour conséquence de faire diverger la mesure expérimentale du temps $\langle \tau_{exp} \rangle$ ($\propto N^{\frac{1-\alpha}{\alpha}}$). Afin d'illustrer ce comportement contre-intuitif, nous avons représenté en figure 4.3 le résultat de simulations associées aux deux cas décrits précédemment (extraits de la référence [Bar99]). Le résultat de la simulation montre que pour $\alpha = 0.5$ $\langle \tau_{exp} \rangle$ ne converge pas vers une valeur bien définie (absence de valeur moyenne par définition) et ce, quelque soit le nombre de mesures. Un autre point illustré par la simulation concerne le fait que l'évolution temporelle du système est dominée par des événements rares (temps de piégeage longs). Autrement dit, le poids statistique des termes contenus dans la queue de la loi de puissance est beaucoup plus important que celui des autres termes si bien, que T_N est proportionnelle au terme le plus grand de la distribution :

$$T_N \simeq \tau_{max} \quad . \quad (4.15)$$

Dans ce cas ($\alpha < 1$), la somme fluctue autant qu'un seul terme.

La présence de statistiques de Lévy dans la dynamique du système conduit donc à des comportements assez inhabituels dans le sens où nous sommes plutôt familiers avec des distributions de probabilité qui nous permettent de calculer des valeurs moyennes ou bien encore une variance. Ici, au contraire, il devient impossible de déterminer ces paramètres car les notions qui leur sont associées n'ont plus de sens par définition. Et

cela peut devenir un véritable problème dans les situations où l'expérimentateur n'a pas conscience que le système qu'il est en train d'observer est gouverné par de telles lois. En effet, toutes mesures de valeurs moyennes, de part la nature des statistiques de Lévy, conduisent à des résultats erronés et donc à des interprétations fausses.

Finalement, même si ce type de statistique paraît un peu exotique au premier abord, son domaine d'application n'en est pas moins vaste. Ces lois peuvent s'appliquer dans des domaines allant de la physique (refroidissement laser [BBACT02], diffusion anormale [BG90]...) à la modélisation d'avalanches ou de tremblements de terre [Bak96] en passant par le domaine de la finance (bourse) [Sch03]. Nous allons voir, dans la partie concernant les résultats expérimentaux, que ce type de formalisme appliqué à la fluorescence d'un ensemble de GFPuv nous permet d'obtenir des informations sur les phénomènes à l'origine du vieillissement.

4.2 Configuration expérimentale

Dans le but d'étudier le vieillissement d'un ensemble bien défini de protéines fluorescentes, nous avons utilisé un microscope confocal (fig. 4.4) où l'excitation se fait par un laser à argon ($\lambda = 457 \text{ nm}$). Cette longueur d'onde permet d'exciter la seconde bande d'absorption de la GFP [Tsi98]. L'utilisation d'un télescope nous permet d'éclairer toute la pupille d'entrée de l'objectif. L'échantillon est placé sur une platine piézo-électrique de $80 \mu\text{m}$ de course (x,y, le déplacement en z se fait avec une platine micrométrique manuelle) et de 2 nm de résolution. Une plaque chauffante est montée sur la platine afin de contrôler la température de l'échantillon (dans la plage 20-100°C). La température de la plaque est contrôlée par un thermostat, via une résistance chauffante et une sonde de température en platine qui sont fixées sur la plaque en aluminium. L'intensité de fluorescence, récoltée à travers l'objectif d'excitation, le miroir dichroïque et le pinhole ($20 \mu\text{m}$), est détectée par un photo-multiplicateur fonctionnant en mode courant. Le courant est enregistré par un amplificateur à détection synchrone. L'acquisition démarre par l'ouverture d'un shutter mécanique, qui permet l'excitation de l'échantillon, et consiste à enregistrer l'intensité de fluorescence en fonction du temps écoulé depuis l'ouverture. Afin de suivre les variations d'intensité du laser nous enregistrons simultanément celles-ci à l'aide d'une photodiode.

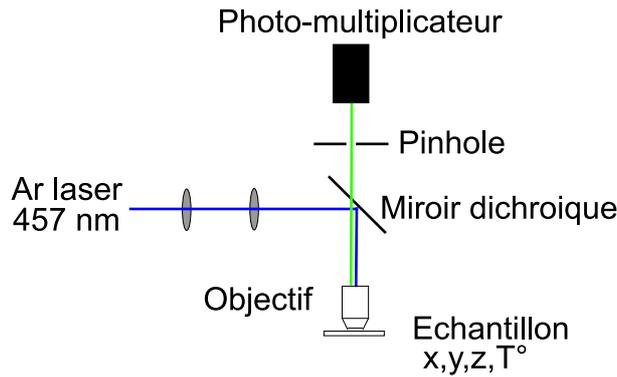


FIG. 4.4 – Schéma du microscope confocal. Le laser de pompe est un laser à argon ($\lambda = 457 \text{ nm}$), l'échantillon est placé sur un platine piézo-électrique chauffante et la fluorescence est récoltée à travers l'objectif, le miroir dichroïque et le pinhole par un photomultiplicateur couplé à un amplificateur à détection synchrone.

L'un des autres points expérimentaux, qui est absolument crucial dans l'étude d'un ensemble, réside dans la stabilité mécanique du système. En effet, dans l'étude du mécanisme du vieillissement, il est nécessaire que l'ensemble placé dans le volume focal ne soit pas renouvelé au cours du temps. Nous avons vérifié la stabilité du pointage du système sur des périodes longues (entre 10 et 24 heures). Sauf accidents (grosses vibrations à l'échelle du bâtiment) la stabilité est de l'ordre de la résolution spatiale du microscope.

Initialement, ce microscope a été développé dans le but de faire de l'imagerie confocale dans des tissus biologiques. L'intérêt de l'utilisation d'un microscope confocal en imagerie biologique réside dans l'élimination de la fluorescence qui provient des plans de l'échantillon autres que le plan observé. En effet, les fluorophores utilisés en imagerie par épifluorescence absorbent aussi la lumière en dehors du plan focal. Comme on peut le voir sur la figure 4.5, le pinhole permet de sélectionner un plan en z dont l'épaisseur va dépendre de la taille du pinhole. Autrement dit, le pinhole joue le rôle d'un filtre spatial en éliminant la fluorescence en provenance des plans qui ne sont pas imagés sur le plan du pinhole. Dans notre expérience, cette configuration a permis de définir un volume focal suffisamment petit ($\simeq 0.5 \mu\text{m}^3$) pour pouvoir négliger le profil d'intensité du faisceau excitateur. Nous avons utilisé un objectif d'ouverture numérique égale à 0.65 (x40) conduisant à une résolution latérale théorique d'environ 300 nm.

Les différents échantillons ont été obtenus en dispersant une solution aqueuse de GF-

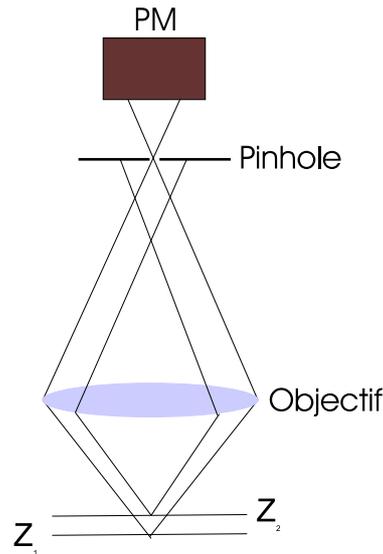


FIG. 4.5 – Schéma de principe illustrant le rôle du pinhole. Le pinhole, qui est placé dans le plan conjugué de Z_1 , permet de récolter la fluorescence provenant de ce plan.

Puv ($125 \mu M$ pH=8) dans un gel de polyacrylamide. La solution de GFPuv est ajoutée après polymérisation du gel afin que ce mécanisme ne vienne pas altérer la protéine (présence de radicaux libres pendant le processus de polymérisation). Le mélange est ensuite déposé sur une lame de microscope. Après évaporation totale de l'eau, la concentration finale du gel sec est d'environ 4×10^5 molécules par μm^3 . L'ensemble que nous observons est donc composé d'environ 200000 molécules (volume observé $\simeq 0.5 \mu m^3$). L'échantillon est ensuite placé sur la platine du microscope confocal et excité par la raie à 457 nm d'un laser à argon ionisé. Les puissances mises en jeu au cours de l'expérience varient entre 0.01 et 2 MW/cm². Le signal mesuré est l'évolution temporelle de l'intensité de fluorescence en provenance de l'ensemble de molécules contenu dans le volume d'excitation et excité par le laser continu.

4.3 Résultats expérimentaux et interprétation

4.3.1 Résultats

Nous allons maintenant présenter les différents résultats que nous avons obtenus sur les protéines immobilisées dans les films de polymères. Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à l'évolution temporelle de l'intensité de fluorescence à température ambiante.

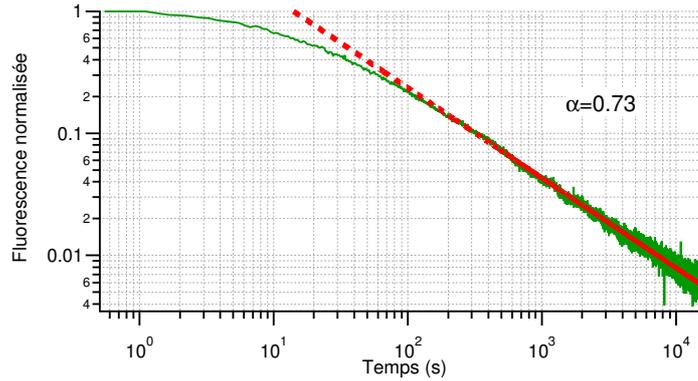


FIG. 4.6 – Courbe typique obtenue sur un échantillon de GFPuv dispersées dans un gel de PAA. La puissance laser utilisée est de 0.96 MW/cm^2 ($\lambda = 457 \text{ nm}$). La courbe expérimentale (trait plein) est ajustée avec une fonction $f(t) = \frac{\tau_0^\alpha}{t^\alpha}$ (tiret). Dans ce cas particulier, les coefficients α et τ_0 valent respectivement 0.73 et 4.5 s .

Dans la figure 4.6, nous avons représenté une courbe typique obtenue dans le cas où la puissance laser est égale à 0.96 MW/cm^2 . L'intensité de fluorescence décroît d'abord lentement (sur deux décades et demi en échelle log/log). Puis après un certain temps caractéristique, cette décroissance suit une loi de puissance avec un exposant inférieur à 1. Comme nous nous intéressons au comportement à temps longs, les données expérimentales sont ajustées à l'aide d'une fonction en loi de puissance $((\frac{\tau_0}{t})^\alpha)$. Cette expérience à température ambiante a été répétée pour différentes puissances du laser. Les différents résultats sont tous qualitativement comparables à ceux représentés dans la figure 4.6, mais les résultats obtenus montrent que les coefficients α et τ_0 dépendent de ce paramètre (fig. 4.7). Nous attirons l'attention du lecteur sur le fait que pour bien isoler la dépendance en loi de puissance, une expérience sur des temps relativement longs (4 décades) est nécessaire. Nous avons également testé la notion d'irréversibilité associée au processus de vieillissement. Pour cela, nous avons effectué une expérience de vieillissement sur un échantillon donné. A la fin de cette expérience ($\simeq 10$ heures), nous avons laissé l'échantillon, durant toute une journée, au repos dans le noir et à température ambiante, puis nous avons à nouveau mesuré le niveau de fluorescence du même volume de l'échantillon. Le résultat obtenu montre que l'intensité de fluorescence est identique à celle mesurée 24 heures auparavant. Cela prouve donc que le processus de vieillissement est bien irréversible (à l'échelle d'une journée). D'autre part, afin de s'assurer que le passage de l'état

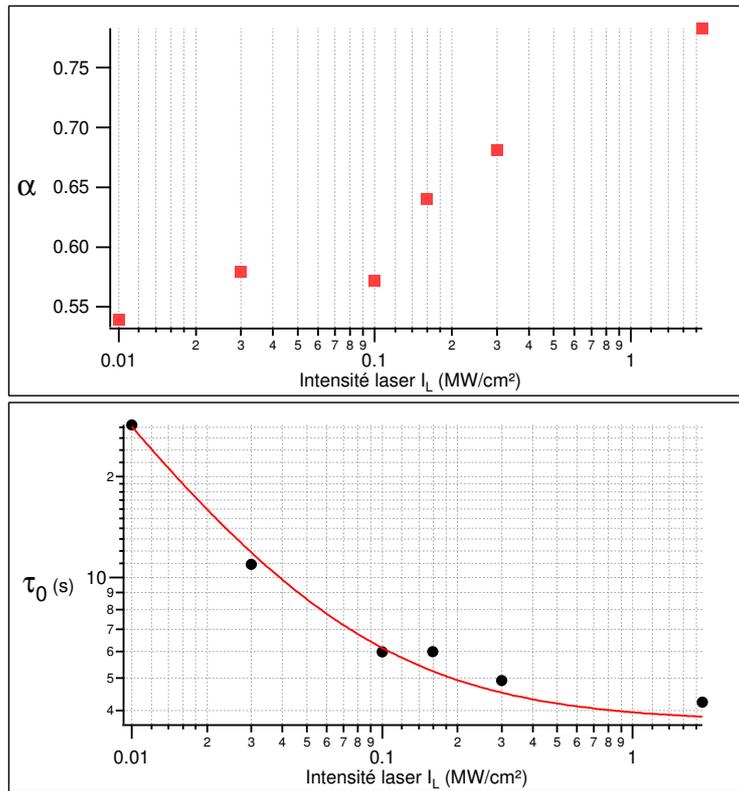


FIG. 4.7 – Variation des paramètres α (en haut) et τ_0 (en bas, points) en fonction de la puissance laser. Dans le cas du paramètre τ_0 , la courbe en trait plein représente un fit obtenu à l'aide de la fonction $g(I_L) = A + \frac{B}{I_L}$ caractéristique d'un phénomène de saturation ($A=3.7$ s et $B=0.24$ s.MW.cm⁻²).

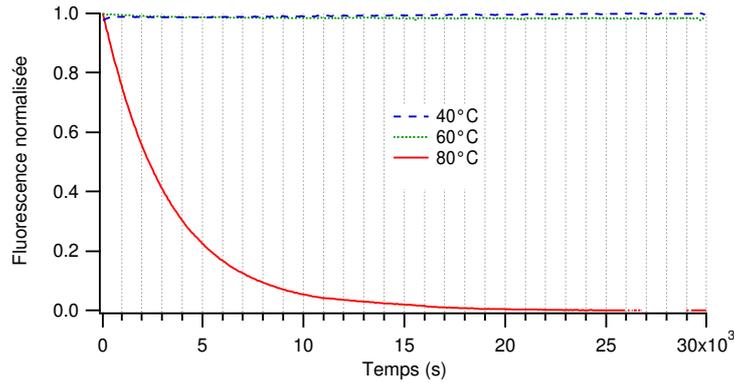


FIG. 4.8 – Variation de l'intensité de fluorescence d'une solution aqueuse de GFPuv ($125 \mu M$ $pH=8$) en fonction de la température. L'échantillon est excité par une lampe blanche dans un fluorimètre commercial.

fluorescent vers l'état noir se fait bien par l'état excité, nous avons réalisé une expérience dans laquelle nous éclairons l'échantillon par intermittence. Cette expérience montre que l'évolution temporelle de l'intensité de fluorescence dépend uniquement du temps total d'illumination.

Comme nous l'avons vu dans le cas de la cascade d'Arrhénius, la température joue un rôle clé dans l'évolution temporelle du système. Afin de confirmer l'importance de ce paramètre, nous avons répété l'expérience à plusieurs températures pour une puissance laser donnée. Avant de réaliser ces expériences, il a tout d'abord fallu s'assurer que la température seule n'induit pas un vieillissement de l'échantillon. Pour cela, nous avons placé une solution aqueuse de GFPuv ($125 \mu M$ $pH=8$) dans une cellule chauffante et enregistré l'intensité de fluorescence au cours du temps en excitant l'échantillon avec une lampe blanche dans un fluorimètre commercial. La faible puissance de la lampe permet de négliger le vieillissement induit par la lumière (en première approximation). Les résultats obtenus (fig. 4.8) montrent que l'effet de la température seule est négligeable jusqu'à $65^\circ C$ (diminution de la fluorescence totale de moins de 2% sur 10 heures d'observation). Au delà de cette température, l'intensité décroît plus rapidement, probablement à cause d'une dénaturation de la protéine qui rend l'effet de la température sur le vieillissement non-négligeable. Il est intéressant de noter que le vieillissement de l'échantillon (ou plutôt la dénaturation induite par la température) suit une loi exponentielle contrairement au vieillissement induit par la lumière.

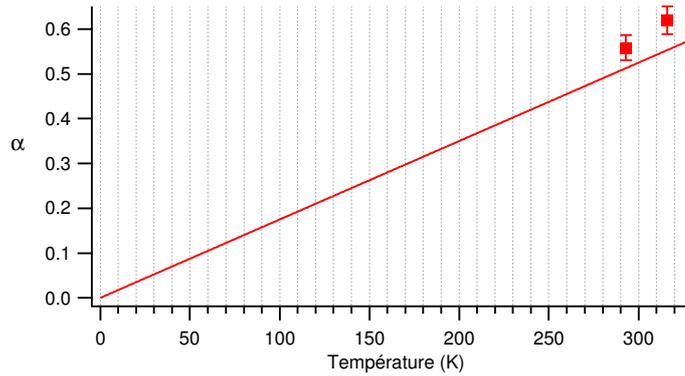


FIG. 4.9 – Variation du paramètre α en fonction de la température pour une intensité laser de (0.01 MW/cm^2). En trait plein, courbe linéaire $f(T)=a \times T$.

Après avoir déterminé la plage de température ($<65^\circ\text{C}$) que nous pouvions explorer, nous avons réalisé les expériences sous microscope en fonction de la température. Qualitativement, les courbes obtenues sont identiques à celles présentées dans la figure 4.6. Les trois températures étudiées sont 20 , 43 et 57°C , la puissance laser était de 0.01 MW/cm^2 . Une fois encore, le coefficient α est inférieur à un (fig. 4.9). D'autre part, ces résultats préliminaires montrent que le coefficient α pourrait effectivement dépendre de la température.

4.3.2 Modèle et interprétation

Le modèle, que nous avons développé pour tenir compte des résultats (schéma en figure 4.10), implique une transition irréversible entre un état fluorescent et un état noir. Ce modèle nous permet de décrire le cas d'une mesure d'ensemble car dans cette situation, nous n'avons pas accès à la dynamique du clignotement. Il s'agit donc d'un modèle différent de celui qui s'applique aux expériences sur des molécules uniques. La transition vers l'état noir se fait par le franchissement d'une barrière de potentiel à partir de l'état excité F. Ce processus est supposé être activé thermiquement (Arrhénius). Dans ce modèle, chaque molécule effectue des cycles d'absorption-émission spontanée. Après un certain temps, la molécule franchit de manière irréversible la barrière qui sépare l'état fluorescent de l'état noir. Considérons maintenant que le temps τ , associé au franchissement de la barrière,

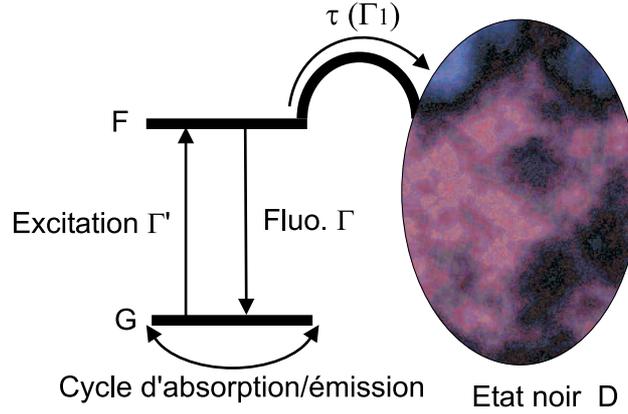


FIG. 4.10 – *Modèle à trois niveaux utilisé pour décrire les résultats expérimentaux. Chaque molécule effectue plusieurs cycles d'absorption/émission avant de se piéger dans un état noir. Dans notre modèle, le temps τ nécessaire pour franchir la barrière est distribué selon une loi large.*

est distribué selon une loi large qui possède une queue en loi de puissance :

$$P(\tau) = \alpha \frac{\tau_0^\alpha}{\tau^{1+\alpha}} \quad (4.16)$$

avec $\alpha = \frac{k_B T}{E_0}$. Dans ce cas, le nombre de molécules fluorescentes (proportionnel à l'intensité de fluorescence) est égal au nombre de molécules qui possèdent une durée de vie (pas la durée de vie radiative mais la durée de vie associée à la permanence dans le cycle absorption/émission spontanée) plus grande que le temps τ . Autrement dit, la fluorescence est donnée par la relation suivante :

$$I(t) = \int_t^\infty P(\tau) d\tau = \left(\frac{\tau_0}{t}\right)^\alpha \quad (4.17)$$

Cela correspond parfaitement à ce qui est observé expérimentalement aux temps longs (voir section résultats).

Quelles sont les implications d'un tel modèle? Tout d'abord la présence de lois larges nous dit qu'il n'existe pas de valeur moyenne associée à τ : $\langle \tau \rangle = \infty$. Cela signifie donc que l'état fluorescent est un état instable à durée de vie infinie puisque le temps associé au franchissement de la barrière est lui-même infini. La seconde remarque concerne la variation du paramètre α avec la température. Selon ce modèle, α doit varier linéairement avec ce paramètre : $\alpha = \frac{k_B T}{E_0}$. Les seules données expérimentales, que nous avons obtenues en fonction de la température, sont reportées dans la figure 4.9. Malheureusement,

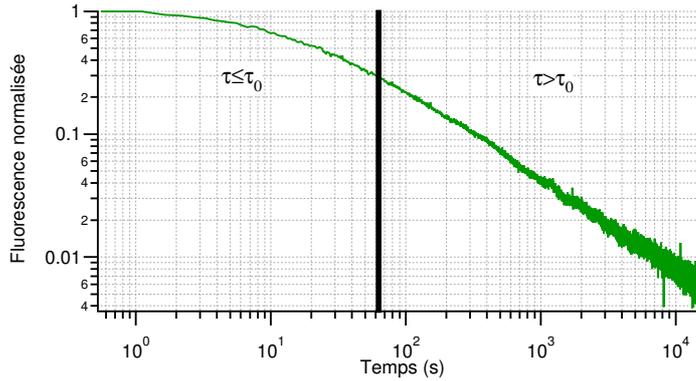


FIG. 4.11 – *Domaine de validité du modèle que nous avons développé. La loi d'Arrhénius ne s'applique plus lorsque $E < k_B T$ ($\tau \leq \tau_0$).*

le manque de données ne nous permet pas de conclure de façon catégorique sur cette dépendance. L'un des problèmes expérimentaux majeurs est lié au fait que nous sommes limités à une plage de température assez restreinte de par la dénaturation de la protéine au dessus de 65°C.

La variation du paramètre τ_0 (fig. 4.7) en fonction de l'intensité laser est compatible avec un mécanisme de saturation dans l'état excité. En effet, en augmentant l'intensité laser, on sature la population dans l'état F, ce qui a pour effet de diminuer le temps τ_0 qui correspond au temps minimum nécessaire pour franchir la barrière. A intensité nulle, ce temps tend vers l'infini puisque le passage vers l'état noir se fait par l'état excité. De même, lorsque l'intensité laser est trop importante, on sature la population dans l'état F et le temps τ_0 tend vers une constante.

Ce modèle nous permet donc de décrire les observations qualitatives sur l'évolution temporelle de la fluorescence dans notre système. Cependant, nous devons nous demander maintenant où se trouve la limite de validité de ce modèle. Pour cela, examinons les hypothèses de départ : l'une d'entre elles concerne le temps caractéristique associé au franchissement de la barrière. Or nous savons que la loi d'Arrhénius n'est pas valable pour $E < k_B T$, ce qui signifie que notre modèle ne tient pas compte des barrières dont la hauteur est inférieure à $k_B T$, ou encore que le modèle ne s'applique pas quand $\tau \leq \tau_0$ (fig. 4.11).

Nous allons maintenant traiter le problème de manière plus formelle en considérant

un système à trois niveaux (voir figure 4.10) dans lequel nous déterminons, à l'aide d'un système d'équations taux, la population dans l'état F. On définit tout d'abord les taux de désexcitation associés à chaque état (fig. 4.10) : Γ le taux d'émission spontanée à partir de l'état F, Γ' le taux d'absorption (et d'émission stimulée) entre l'état G et F et Γ_1 le taux de fuite vers l'état noir. En résolvant le système d'équations obtenu en considérant les populations de l'état F et G, on peut montrer que la population dans l'état F s'écrit :

$$\pi_F(\Gamma_1, t) = \frac{\Gamma'}{\sqrt{(\Gamma + 2\Gamma' + \Gamma_1)^2 - 4\Gamma'\Gamma_1}} e^{-\frac{\Gamma + 2\Gamma' + \Gamma_1}{2}t} \left(e^{\frac{\sqrt{(\Gamma + 2\Gamma' + \Gamma_1)^2 - 4\Gamma'\Gamma_1}}{2}t} - e^{-\frac{\sqrt{(\Gamma + 2\Gamma' + \Gamma_1)^2 - 4\Gamma'\Gamma_1}}{2}t} \right) \quad (4.18)$$

Afin d'introduire la stochasticité dans le modèle, nous allons tenir compte de la distribution dans taux $\Gamma_1 = \frac{1}{\tau}$ en considérant uniquement les temps supérieurs à τ_0 (ou encore pour des $\Gamma_1 < \Gamma_0$) pour les raisons évoquées précédemment. Dans ce cas, on peut écrire :

$$\langle \pi_F(t) \rangle_{\Gamma_1} = \int_0^{\Gamma_0} \pi_F(\Gamma_1, t) P(\Gamma_1) d\Gamma_1 = \int_{\tau_0}^{\infty} \pi_F(\Gamma_1 = \frac{1}{\tau}, t) P(\tau) d\tau \quad (4.19)$$

Comme nous nous intéressons aux temps longs (τ grands), nous allons utiliser plusieurs développements limités afin de simplifier l'expression de $\langle \pi_F(t) \rangle_{\Gamma_1}$. Ces différentes simplifications conduisent à l'expression suivante :

$$\langle \pi_F(t) \rangle_{\Gamma_1} \simeq \frac{\alpha \tau_0^\alpha \Gamma'}{\Gamma + 2\Gamma'} \int_{\tau_0}^{\infty} \frac{1}{\tau^{1+\alpha}} e^{-\frac{\Gamma' t}{\tau(\Gamma + 2\Gamma')}} d\tau \quad (4.20)$$

Si on regarde la variation de la fonction exponentielle en fonction de τ , on constate qu'elle tend vers 1 en un temps caractéristique $\tau_c = \frac{\Gamma' t}{\Gamma + 2\Gamma'}$. En intégrant de τ_c à l'infini, on obtient finalement :

$$\langle \pi_F(t) \rangle_{\Gamma_1} \simeq \frac{\tau_0^\alpha \Gamma'}{\Gamma + 2\Gamma'} \left(\frac{\Gamma + 2\Gamma'}{\Gamma' t} \right)^\alpha \quad (4.21)$$

Dans le dépouillement des données expérimentales, nous avons considéré des intensités de fluorescence normalisées. Afin de comparer l'expérience et le modèle, il nous faut maintenant normaliser l'expression 4.21 qui est valable pour $t > \tau_c$. Pour cela, nous allons dire que la population dans l'état F, pour $t < \tau_c$, est égale à la population dans l'état stationnaire d'un système à deux niveaux (équation 4.18 avec $\Gamma_1 = 0$ et $t \rightarrow \infty$) :

$$\langle \pi_F(t) \rangle_{\Gamma_1} (t < \tau_c) = \frac{\Gamma'}{\Gamma + 2\Gamma'} \quad (4.22)$$

On arrive donc à l'expression finale pour $\langle \pi_F(t) \rangle_{\Gamma_1}$ normalisée :

$$\langle \pi_F(t) \rangle_{\Gamma_1, norm} \simeq \left(\tau_0 \frac{\Gamma + 2\Gamma'}{\Gamma'} \right)^\alpha \frac{1}{t^\alpha} \quad (4.23)$$

Il est intéressant de noter que le terme en $\frac{1}{t^\alpha}$ n'est rien d'autre que la probabilité de survie dans l'état F (eq. 4.17). D'autre part, l'apparition du terme $(\frac{\Gamma+2\Gamma'}{\Gamma'})^\alpha$ est compatible avec le phénomène de saturation évoqué précédemment puisque Γ' dépend de l'intensité laser.

Dans notre modèle, qui est inspiré de la cascade d'Arrhénius, les hauteurs de barrières sont distribuées selon une loi exponentielle. Regardons maintenant si nous sommes capables, à partir de la variation temporelle de l'intensité de fluorescence, de remonter à cette distribution. En reprenant le même argument que nous avons utilisé pour écrire l'équation 4.17, nous pouvons dire que la population dans l'état F (ou l'intensité de fluorescence) est proportionnelle au nombre de molécules qui n'ont pas encore franchi la barrière de hauteur E . Il s'agit donc des molécules qui voient une hauteur de barrière plus grande que E . En effet, n'oublions pas qu'à tout τ est associée une hauteur de barrière via la relation d'Arrhénius. L'intensité de fluorescence peut donc s'écrire :

$$I(t) = I_0 \int_{E(t)}^{\infty} P(E) dE \quad (4.24)$$

avec $E(t) = k_B T \ln(\frac{t}{\tau_0})$. Si on dérive cette expression par rapport à t , nous obtenons :

$$\frac{\partial I(t)}{\partial t} = -I_0 \frac{k_B T}{t} P(E = k_B T \ln(\frac{t}{\tau_0})) \quad \text{avec} \quad t = \tau_0 e^{\frac{E}{k_B T}} \quad (4.25)$$

A partir de cette relation, on peut donc facilement relier la distribution des hauteurs de barrières à la variation temporelle de l'intensité de fluorescence :

$$P(E) = -\frac{t}{I_0} \frac{\partial I(t)}{\partial t} \frac{1}{k_B T} \quad (4.26)$$

Cette formule nous permet de remonter à la distribution des hauteurs de barrières en dérivant le signal de fluorescence normalisé, en le multipliant par $\frac{t}{k_B T}$ et en remplaçant t par $\tau_0 e^{\frac{E}{k_B T}}$. Le temps τ_0 utilisé est obtenu à l'aide du fit en loi de puissance. Le résultat d'une telle opération est reporté dans la figure 4.12 qui représente la distribution des hauteurs de barrières obtenue pour $T=40^\circ\text{C}$ ($0.01 \text{ MW}/\text{cm}^2$). Etant donné que notre modèle ne s'applique aux temps de l'ordre de τ_0 (ou pour les barrières petites), nous avons masqué la partie des faibles énergies. La courbe obtenue est compatible avec notre hypothèse de départ qui postulait une distribution exponentielle des hauteurs de barrières. D'autre part, si on regarde l'énergie des barrières mises en jeu dans le processus de vieillissement, on constate que les hauteurs, obtenues à l'aide de la relation 4.26, sont compatibles avec

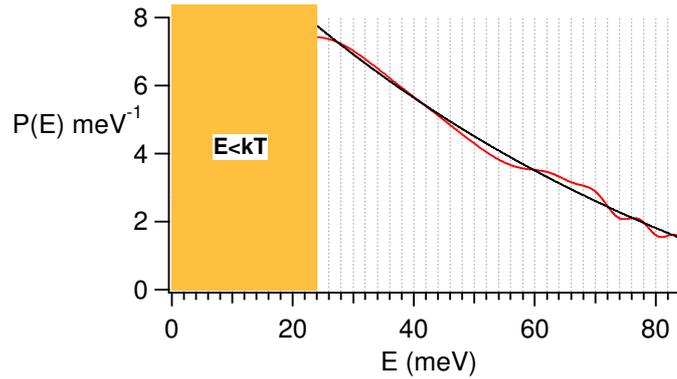


FIG. 4.12 – Distribution des barrières (trait plein) obtenue pour $T=40^\circ\text{C}$ (0.01 MW/cm^2) en appliquant la procédure décrite dans le texte. La partie masquée correspond au domaine où la loi d'Arrhénius ne s'applique plus. En pointillé, ajustement exponentiel.

les hauteurs des barrières ($\simeq k_B T$) rencontrées dans les processus biologiques tels que les changements de conformation (de l'ordre de la centaine de meV).

Même si notre modèle décrit assez bien nos observations, la dépendance du coefficient α en fonction de la puissance laser reste pour le moment un point obscur. En effet, d'après les hypothèses de départ, le coefficient α devrait dépendre uniquement de la température. Or, nous observons une dépendance logarithmique (fig. 4.7) en fonction de la puissance laser. Une explication possible serait que le laser joue, d'une certaine manière qui reste à définir, le rôle de la température. L'autre point qui reste à confirmer concerne la dépendance linéaire du paramètre α en fonction de la température. Pour cela, nous envisageons d'accroître le nombre de données expérimentales en accédant aux températures inférieures à la température ambiante à l'aide d'un porte échantillon refroidi par effet Peltier.

L'étude du vieillissement d'un ensemble bien défini de GFPuv nous a permis de montrer que ce mécanisme semble gouverné par une statistique du type Lévy. Cette observation a été possible en étudiant la variation temporelle de l'intensité de fluorescence d'un ensemble bien défini. Plus précisément, c'est la présence d'une évolution temporelle de l'intensité de fluorescence suivant une loi de puissance qui possède un exposant compris entre 0 et 1, qui nous a permis d'identifier la présence d'une statistique de Lévy. Cette description démontre l'existence d'un état fluorescent instable à durée de vie moyenne infinie ($\langle \tau \rangle = \infty$). Bien que nous ayons étudié un ensemble de molécules, une trans-

formation mathématique simple nous permet, dans le cadre de ce modèle, de remonter à la distribution des hauteurs de barrières qui séparent l'état fluorescent de l'état noir. Les premières expériences en fonction de la température sont compatibles avec l'existence d'un mécanisme du type Arrhénius dans le processus de vieillissement. L'un des points qui restent en suspens concerne la variation de l'exposant de la loi de puissance en fonction de la puissance laser car, dans notre modèle, ce coefficient dépend uniquement de la température.

Finalement, il est important de mentionner le fait que cette étude fournit uniquement des informations de nature énergétique car nous ne sommes en aucun cas capables de nous prononcer sur la nature microscopique de l'état noir. En effet, la distribution des hauteurs de barrières ne nous apporte que des renseignements sur les énergies mises en jeu lors du passage de l'état fluorescent à l'état noir. Sans doute qu'une combinaison astucieuse avec des expériences résolues en temps nous permettrait de mieux répondre au problème de l'identification de l'état noir. Nous pensons également que ce type de modèles ne se limite pas uniquement au cas de la GFP mais qu'il pourrait se généraliser à d'autres marqueurs organiques. Nous avons d'ailleurs réalisé le même type d'expérience sur des molécules de fluorescéine immobilisées dans un gel de polyacrylamide. Les résultats préliminaires obtenus montrent qu'une fois de plus la variation temporelle de la fluorescence suit une loi de puissance avec un exposant compris entre 0 et 1 aux temps longs. Il est intéressant de comparer la valeur de l'exposant à celle obtenue dans le cas de la GFPuv : pour la GFPuv le coefficient α varie entre 0.5 et 0.8 alors que, dans le cas de la fluorescéine, α est environ égal à 0.2.

En dernier lieu, nous tenons à attirer l'attention du lecteur sur la difficulté que comporte la mise en évidence de ce type de lois. Dans notre cas, nous avons été obligés de travailler sur des temps très longs (en moyenne, une expérience dure plus de 10 heures), sans quoi il est impossible d'observer une dépendance claire en loi de puissance. Il est évident qu'une expérience sur des molécules uniques aurait aussi besoin d'une très bonne statistique et, donc, de temps d'acquisitions très longs. En effet, si l'on cherche à déterminer expérimentalement la distribution des temps de blanchiment dans une expérience sur des molécules uniques, il faudrait effectuer la mesure un grand nombre de fois car la présence des statistiques de Lévy conduit, par définition, à une grande dispersion du pa-

ramètre expérimental d'intérêt (dans notre cas, la distribution du temps de blanchiment). Cela prouve donc qu'une mesure d'ensemble peut compléter parfaitement les informations obtenues dans les expériences sur des molécules uniques, au delà du fait que ces dernières sont plus difficiles à mettre en oeuvre.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail a été consacré à l'étude des propriétés optiques de marqueurs fluorescents d'intérêt biologique. L'étude et la comparaison de la GFP_{uv} et de la GFP_{wt} par spectroscopie femtoseconde nous a permis de montrer que la dynamique ultra-rapide des états excités est un excellent reporteur des modifications de l'environnement proche de la partie optiquement active. Dans le cas de fusions génétiques fragment d'anticorps-GFP_{uv}, cette sensibilité a pu être utilisée pour caractériser l'état de repliement final (ou la solubilité) du fragment d'anticorps lié à la GFP_{uv}. Cette démonstration constitue donc une étape essentielle dans l'introduction des techniques résolues en temps pour le tri des anticorps fonctionnels au sein d'une banque de fragments d'anticorps. L'étude du chromophore synthétique a également confirmé que la dynamique d'émission de la GFP n'est pas uniquement due aux propriétés électroniques du chromophore mais que l'interaction avec la cage protéique et le transfert de proton jouent un rôle clé dans cette dynamique.

Les expériences sur les "rotors moléculaires" à base de coumarine ont permis de mettre un point final à la question qui concerne l'existence d'un état TICT dans la dynamique d'émission de ces marqueurs. En effet, nos résultats montrent clairement l'absence de changement rapide de géométrie dans l'état excité.

En dernier lieu, l'étude du vieillissement de l'intensité de fluorescence d'un ensemble bien défini de protéines GFP_{uv} nous a permis de montrer que ce mécanisme est gouverné par une statistique de type Lévy. La présence de lois larges dans l'évolution temporelle du système conduit à l'existence d'un état instable à durée de vie infinie. Un modèle simplifié que nous avons mis en place nous permet de remonter à la distribution des hauteurs de barrières qui séparent l'état fluorescent de l'état noir.

Cette série d'expériences ouvre un certain nombre de perspectives. Une première série de mesures très intéressantes concernera les propriétés dynamiques des protéines GFP obtenues en excitant la forme anionique relaxée du chromophore (480 nm). Une étude de

ce type présente un double intérêt : d'une part elle permettra de caractériser la dynamique des états excités de la forme anionique relaxée, apportant ainsi une réponse quant à son implication dans les propriétés dynamiques lorsque la GFP est excitée à 400 nm. D'autre part, elle permettra de mieux cerner la nature chimique de l'espèce photoconvertie lors de l'excitation de la forme neutre du chromophore. Dans le but de compléter les études sur les chromophores synthétiques, une perspective intéressante consiste à reprendre l'étude du chromophore naturel de la GFP en solution. Ceci sera le point de départ pour s'attaquer aux propriétés dynamiques du chromophore dans le cas où ce dernier est placé dans une cage synthétique (par exemple une cyclodextrine).

Pour ce qui concerne le thématique directement connectée à l'immunotechnologie, l'étape suivante est de réaliser ce type d'expériences *in vivo*. Si on regarde au-delà du défi technique, essentiellement lié à des problèmes de détection, que représente la réalisation d'une expérience pompe-sonde sous microscope et sur un échantillon biologique, ce type d'expériences est destiné à devenir un outil très puissant pour les biologistes.

BIBLIOGRAPHIE

- [AHMS98] K. A. Al-Hassan, M. A. Meetani, and Z. F. M. Said. Fluorescence probes as molecular weight detectors of polymers. *Journal of fluorescence*, 8:93–100, 1998.
- [Alf89] R. R. Alfano. *The Supercontinuum Laser Source*. Springer Verlag, 1989.
- [ALN⁺02] L. H. Andersen, A. Lapierre, S. B. Nielsen, I. B. Nielsen, S. U. Andersen, and S. Tomita. Chromophore of the green fluorescent protein studied in the gas phase. *The European Physical Journal D*, 20:597–600, 2002.
- [AS70] R. R. Alfano and S. L. Shapiro. Observation of self-phase modulation and small-scale filaments in crystals and glasses. *Physical Review Letters*, 24:592–594, 1970.
- [Bak96] P. Bak. *How Nature Works*. Springer Verlag, New York, 1996.
- [Bar99] F. Bardou. Cooling gases with lévy flights: using the generalized central limit theorem in physics. In O. Barndorff-Nielsen, S. E. Graversen, and T. Mikosch, editors, *Lévy processes: theory and applications*, 1999. <http://arxiv.org/abs/physics/0012049>.
- [BBACT02] F. Bardou, J.-F. Bouchaud, A. Aspect, and C. Cohen-Tannoudji. *Lévy Statistics and Laser Cooling: How Rare Events Bring Atoms to Rest*. Cambridge University Press, 2002.
- [BG90] J.-P. Bouchaud and A. Georges. Anomalous diffusion in disordered media: statistical mechanisms, models and physical applications. *Physics Reports*, 195:265–286, 1990.
- [BHM⁺03] X. Brockmann, J.-P. Hermier, G. Messin, P. Desbiolles, J.-P. Bouchaud, and M. Dahan. Statistical aging and nonergodicity in the fluorescence of single nanocrystals. *Physical Review Letters*, 90, 2003.

-
- [BHWT00] A. F. Bell, X. He, R. M. Wachter, and P. J. Tonge. Probing the ground state structure of the green fluorescent protein chromophore using raman spectroscopy. *Biochemistry*, 39:4423–4431, 2000.
- [Big01] J.-Y. Bigot. Cours de dea : Physique de la matière condensée optique non-linéaire. Université Louis Pasteur, 2000-01.
- [BL66] N. Bloembergen and P. Lallemand. Complex intensity-dependent index of refraction, frequency broadening of stimulated raman lines, and stimulated rayleigh scattering. *Physical Review Letters*, 16:81–84, 1966.
- [BNV⁺03] E. Barkai, A. V. Naumov, Y. G. Vainer, M. Bauer, and L. Kador. Lévy statistics for random single-molecule line shapes in a glass. *Physical Review Letters*, 91(7):5502–5505, 2003.
- [BNZ00] R. Battistutta, A. Negro, and G. Zanotti. Crystal structure and refolding properties of the mutant f99s/m153t/v163a of the green fluorescent protein. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 41:429–437, 2000.
- [BSK⁺97] K. Brejc, T. K. Sixma, P. A. Kitts, S. R. Kain, R. Y. Tsien, M. Ormö, and S. J. Remington. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the aequorea victoria green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 94:2306–2311, 1997.
- [BZT99] G. S. Baird, D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 96:11241–11246, 1999.
- [CBC02] R. J. Cave, K. Burke, and E. W. Castner. Theoretical investigation of the ground and excited states of coumarin 151 and coumarin 120. *Journal of Physical Chemistry A*, 106:9294–9305, 2002.
- [CBEC⁺04] P. Changenet-Barret, A. Espagne, S. Charier, J.-B. Baudin, L. Jullien, P. Plaza, K. J. Hellingwerf, and M. M. Martin. Early molecular events in the photoactive yellow fluorescent protein: role of the chromophore photophysics. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 3:823–829, 2004.
- [CHA⁺95] A. B. Cubitt, R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, and R. Y.

- Tsien. Understanding, improving and using green fluorescent protein. *Trends in Biochemical Science*, 20:448–455, 1995.
- [CKBB96] M. Chatteraj, B. A. King, G. U. Bulbitz, and S. G. Boxer. Ultra-fast excited state dynamics in the green fluorescent protein: Multiple states and proton transfer. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 93:8362–8367, 1996.
- [CLS⁺99] T. M. H. Creemers, A. J. Lock, V. Subramaniam, T. M. Jovin, and S. Völker. Three photoconvertible forms of green fluorescent protein identified by spectral hole-burning. *Nature Structural Biology*, 6:557–560, 1999.
- [CN98] W. C. W. Chan and S. Nie. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 281:2016–2018, 1998.
- [CNSS98] G. Cerullo, M. Nilosi, S. Stagira, and S. De Silvestri. Sub-8-fs pulses from an ultrabroadband optical parametric amplifier in the visible. *Optics Letters*, 26(16):1283–1285, 1998.
- [CPF⁺01] R. A. G. Cinelli, V. Pellegrini, A. Ferrari, P. Faraci, R. Nifosi, M. Tyagi, M. Giacca, and F. Beltram. Green fluorescent proteins as optically controllable elements in bioelectronics. *Applied Physics Letters*, 79:3353–3355, 2001.
- [CPMM97] P. Changenet, P. Plaza, M. Martin, and Y. H. Meyer. Role of intramolecular torsion and solvent dynamics in the charge-transfer kinetics in triphenylphosphine oxide derivatives and dmabn. *Journal of Physical Chemistry A*, 101:8186–8194, 1997.
- [CPW⁺93] C. W. Cody, D. C. Prasher, W. M. Westler, F. G. Prendergast, and W. W. Ward. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry*, 32:1212–1218, 1993.
- [CS03] G. Cerullo and S. De Silvestri. Ultrafast optical parametric amplifiers. *Review of Scientific Instruments*, 74(1):1–18, 2003.
- [CTE⁺94] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263:802–805, 1994.

- [CTP⁺01] R. A. G. Cinelli, V. Tozzini, V. Pellegrini, F. Beltram, G. Cerullo, M. Zavelani-Rossi, S. De Silvestri, M. Tyagi, and M. Giacca. Coherent dynamics of photoexcited green fluorescent proteins. *Physical Review Letters*, 86:3439–3442, 2001.
- [CWTS95] A. Crameri, E. A. Whitehorn, E. Tate, and W. P. C. Stemmer. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using dna shuffling. *Nature Biotechnology*, 14:315–319, 1995.
- [DBC⁺04] R. R. Duncan, A. Bergmann, M. A. Cousin, D. K. Apps, and M. J. Shipston. Multi-dimensional time-correlated single photon counting (tcspe) fluorescence lifetime imaging microscopy (flim) to detect fret in cells. *Journal of Microscopy*, 215:1–12, 2004.
- [DCTM97] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, and W. E. Moerner. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature*, 388:655–658, 1997.
- [DGS⁺02] P. Didier, L. Guidoni, G. Schwalbach, M. Bourotte, A. Follenius-Wund, C. Pigault, and J.-Y. Bigot. Ultrafast gain dynamics of the green fluorescent protein. *Chemical Physics Letters*, 364:503–510, 2002.
- [DWK⁺02] J. Dobkowski, J. Wojcik, W. Kozminski, R. Kolos, J. Waluk, and J. Milch. An experimental test of c-n bond twisting in the tict state: Syn-anti photoisomerization in 2-(n-methyl-n-isopropylamino)-5-cyanopyridine. *Journal of the American Chemical Society*, 124:2406–2407, 2002.
- [ECL⁺03] P. Even, F. Chaubet, D. Letourneur, M. L. Viriot, and M. C. Carré. Coumarin-like fluorescent molecular rotors for bioactive polymers probing. *Biorheology*, 40:261–263, 2003.
- [EKR89] M. El-Kemary and W. Rettig. Dual amplified spontaneous emission from 7-amino-4-methyl coumarin dye. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 49:89–96, 1989.
- [EKS⁺01] N. P. Ernsting, S. A. Kovalenko, T. Senyushkina, J. Saam, and V. Farztdinov. Wave-packet-assisted decomposition of femtosecond transient ultraviolet-visible absorption spectra: Application to excited-state intra-

- molecular proton transfer in solution. *Journal of Physical Chemistry A*, 105:3443–3453, 2001.
- [ESPR01] A. P. Esposito, P. Schellenberg, W. W. Parson, and P. J. Reid. Vibrational spectroscopy and mode assignments for an analog of the green fluorescent protein chromophore. *Journal of Molecular Structure*, 569:25–41, 2001.
- [FHPW61] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters, and G. Weinreich. Generation of optical harmonic. *Physical Review Letters*, 7(4):1283–1285, 1961.
- [FQS+03] J. N. Forkey, M. E. Quinlan, M. A. Shaw, J. E. T. Corrie, and Y. E. Goldman. Three-dimensional structural dynamics of myosin v by single-molecule fluorescence polarization. *Nature*, 422:399–404, 2003.
- [Gan76] M. D. Ganapathiplackal. A new method for the synthesis of unsaturated 2,4-disubstituted 2-imidazolin-5-ones. *Tetrahedron Letters*, 17:571–572, 1976.
- [GCG+98] T. Gustavsson, L. Cassara, V. Gulbinas, G. Gurzadyan, J.-C. Mialocq, S. Pommeret, M. Sorgius, and P. van der Meulen. Femtosecond spectroscopic study of relaxatin processes of three amino-substituted coumarin dyes in methanol and dimethyl sulfoxide. *Journal of Physical Chemistry A*, 102:4229–4245, 1998.
- [GCH98] G. M. Gale, M. Cavallari, and F. Hache. Femtosecond visible optical parametric oscillator. *Journal of Optical Society of America B*, 15(2):702–714, 1998.
- [GCM+03] T. Gustavsson, L. Cassara, S. Marguet, G. Gurzadyan, P. van der Meulen, S. Pommeret, and J.-C. Mialocq. Rotational diffusion of the 7-diethylamino-4-methylcoumarin c1 dye molecule in polar protic and aprotic solvents. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2:329–341, 2003.
- [GPSNV+00] M. F. Garcia-Parajo, G. M. J. Segers-Nolten, J.-A. Veerman, J. Greve, and N. F. van Hulst. Real-time light-driven dynamics of the fluorescence emission in single green fluorescent protein molecules. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 97:7237–7242, 2000.
- [GPVSN+99] M. F. Garcia-Parajo, J.-A. Veerman, G. M. J. Segers-Nolten, B. G.

- de Grooth, J. Greve, and N. F. van Hulst. Visualising individual green fluorescent proteins with a near field optical microscope. *Cytometry*, 36:239–246, 1999.
- [GRR03] Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, and W. Rettig. Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: Focus on twisted intramolecular charge-transfer states and structures. *Chemical Reviews*, 103:38992–4031, 2003.
- [GTB⁺99] C. Giovane, G. Travé, A. Briones, Y. Lutz, B. Wasyluk, and E. Weiss. Targetting of the n-terminal domain of the human papillomavirus type 16 e6 oncoprotein with monomeric scfv blocks the e6-mediated degradation of cellular p53. *Journal of Molecular Recognition*, 12:141–152, 1999.
- [GVCB⁺00] C. Geoffroy-Vhapotot, M. C. Carré, F. Baros, S. Muller, D. Dumas, J. F. Stoltz, and M. L. Viriot. Three-dimensional fluorescence microscopy of endothelial cells labeled with coumarins. *Journal of fluorescence*, 10:203–207, 2000.
- [HaPJT02] X. He and A. F. Bell and P. J. Tonge. Isotopic labeling and normal-mode analysis of model green fluorescent protein chromophore. *Journal of Physical Chemistry B*, 106:6056–6066, 2002.
- [HGB⁺00] M. A. Hink, R. A. Griep, J. W. Borst, A. van Hoek, M. H. M. Eppink, A. Schots, and A. J. W. G. Visser. Structural dynamics of green fluorescent protein alone and fused with a single chain fv protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 275:17556–17560, 2000.
- [IJ99] G. Jones II and J. A. C. Jimenez. Intramolecular photoinduced electron transfer for cations derived from azole-substituted coumarin dyes. *Tetrahedron Letters*, 40:8551–8555, 1999.
- [IJ01] G. Jones II and J. A. C. Jimenez. Intramolecular photoinduced electron transfer for cations derived from azole-substituted coumarin dyes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 65:5–12, 2001.
- [IJCB85] G. Jones II, W. R. Jackson, C.-Y. Choi, and W. R. Bergmark. Solvent effects on emission yields and lifetime for coumarin laser dyes. requirements

- for a rotary decay mechanism. *Journal of Physical Chemistry*, 89:294–300, 1985.
- [IJH80] G. Jones II, W. R. Jackson, and A. M. Halpern. Medium effects on fluorescence quantum yields and lifetimes for coumarin laser dyes. *Chemical Physics Letters*, 72:391–395, 1980.
- [Jan01] C. A. Janeway. *Immunobiology*. Churchill Livingstone, 2001.
- [JMGaAPA98] M. Bruchez Jr., M. Moronne, P. Gin, and S. Weiss and A. P. Alivisatos. Semiconductor nanocrystal as fluorescent biological labels. *Science*, 281:2013–2016, 1998.
- [Jof98] M. Joffre. Cours de dea : Propagation linéaire et non-linéaire d'une impulsion ultra-brève. Ecole polytechnique Palaiseau, 1993-98.
- [KCY⁺97] Y. Kim, H. W. Cheon, M. Yoon, N. W. Song, and D. Kim. *SiO₂* colloidal effects on the twisted intramolecular charge transfer of p-n,n-dimethylaminobenzoic acid in acetonitrile. *Chemical Physics Letters*, 264:673–679, 1997.
- [KKL⁺98] A. D. Kummer, C. Kompa, H. Lossau, F. Pöllinger-Dammer M. E. Michel-Beyerle, C. M. Silva, E. J. Bylina, W.J. Coleman, M. M. Yang, and D. C. Youvan. Dramatic reduction in fluorescence quantum yield in mutants of green fluorescent protein due to fast internal conversion. *Chemical Physics*, 237:183–193, 1998.
- [KKN⁺00] A. D. Kummer, C. Kompa, H. Niwa, T. Hirano, S. Kojima, and M. E. Michel-Beyerle. Viscosity-dependent fluorescence decay of the gfp chromophore in solution due to fast internal conversion. *Journal of Physical Chemistry B*, 106:7554–7559, 2000.
- [KWR⁺00] A. D. Kummer, J. Wiehler, H. Rehaber, C. Kompa, B. Steipe, and M. E. Michel-Beyerle. Effects of threonine 203 replacements on excited-state dynamics and fluorescence properties of the green fluorescent protein (gfp). *Journal of Physical Chemistry B*, 104:4791–4798, 2000.
- [LKH⁺96] H. Lossau, A. Kummer, R. Heinecke, F. Pöllinger-Dammer, C. Kompa, G. Bieser, T. Jonsson, C. M. Silva, M. M. Yang, D. C. Youvan, and M. E.

- Michel-Beyerle. Time-resolved spectroscopy of wild-type and mutant green fluorescent proteins reveals excited state deprotonation consistent with fluorophore-protein interactions. *Chemical physics*, 213:1–16, 1996.
- [LLB62] E. Lippert, W. Lüder, and H. Boos. *Advances in Molecular Spectroscopy*. Pergamon Press New York, 1962.
- [LSSK01] L. Lippincott-Schwartz, E. Snapp, and A. Kenworthy. Studying protein dynamics in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2:444–456, 2001.
- [LWM01] K. L. Litvinenko, N. M. Webber, and S. R. Meech. An ultrafast polarisation spectroscopy study of internal conversion and orientational relaxation of the chromophore of the green fluorescent protein. *Chemical Physics Letters*, 346:47–53, 2001.
- [LWM03] K. L. Litvinenko, N. M. Webber, and S. R. Meech. Internal conversion in the chromophore of the green fluorescent protein: Temperature dependence and isoviscosity analysis. *Journal of Physical Chemistry A*, 107:2616–2623, 2003.
- [LX97] H. P. Lu and X. S. Xie. Single-molecule spectral fluctuations at room temperature. *Nature*, 385:143–146, 1997.
- [Mar87] O. E. Martinez. 3000 times grating compressor with positive group velocity dispersion: application to fiber compensation in 1.3-1.6 μm region. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 23:59, 1987.
- [MAR98] G. Miesenböck, D. A. De Angelis, and J. E. Rothman. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent protein. *Nature*, 394:192–195, 1998.
- [MJW98] P. Martineau, P. Jones, and G. Winter. Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *Journal of Molecular Biology*, 280:1744–1747, 1998.
- [MLH⁺97] A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, and R. Y. Tsien. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388:882–887, 1997.

- [MNO04] M. E. Martin, F. Negri, and M. Olivucci. Origin, nature, and fate of the fluorescent state of the green fluorescent protein chromophore at the caspt2//casscf resolution. *Journal of the American Chemical Society*, 126:5452–5464, 2004.
- [MO99] W. E. Moerner and M. Orrit. Illuminating single molecules in condensed matter. *Science*, 283:1670–1676, 1999.
- [MSNN87] V. Masilamani, D. Sastikumar, S. Natarajan, and P. Natarajan. Simultaneous dual superradiance from the planar and twisted conformations of laser dye. *Optics Communications*, 62:389–395, 1987.
- [MTM04] D. Mandal, T. Tahara, and S. R. Meech. Excited-state dynamics in the green fluorescent protein chromophore. *Journal of Physical Chemistry B*, 108:1102–1108, 2004.
- [MTWM02] D. Mandal, T. Tahara, N. M. Webber, and S. R. Meech. Ultrafast fluorescence of the chromophore of the green fluorescent protein in alcohol solutions. *Chemical Physics Letters*, 358:495–501, 2002.
- [Muk95] S. Mukamel. *Principles of Nonlinear Optical Spectroscopy*. Oxford University Press, 1995.
- [NIH⁺96] H. Niwa, S. Inouye, T. Hirano, T. Matsuno, S. Kojima, M. Kubota, M. Ohashi, and F. I. Tsuji. Chemical nature of the light emitter of the aequorea green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 93:13617–13622, 1996.
- [NLA⁺01] S. B. Nielsen, A. Lapierre, J. U. Andersen, U. V. Pedersen, S. Tomita, and L. H. Andersen. Absorption spectrum of the green fluorescent protein chromophore anion in vacuo. *Physical Review Letters*, 87:228102–228104, 2001.
- [NOI01] J. Nakai, M. Ohkura, and K. Imoto. A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of single green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 19:137–141, 2001.
- [OCK⁺96] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, and S. J.

- Remington. Crystal structure of the aequorea victoria green fluorescent protein. *Science*, 273:1392–1395, 1996.
- [OUK⁺99] T. Okada, M. Uesugi, G. Kohler, K. Rechthaler, K. Rotkiewicz, W. Rettig, and G. Grabner. Time-resolved spectroscopy of dmabn and its cage derivatives 6-cyanobenzquinuclidine (cbq) and benzquinuclidine (bq). *Chemical Physics*, 241:327–337, 1999.
- [PBM99] E. J. G. Peterman, S. Brasselet, and W. E. Moerner. The fluorescence dynamics of single molecules of green fluorescent protein. *Journal of Physical Chemistry A*, 103:10553–10560, 1999.
- [PEW⁺92] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Pendergast, and M. J. Cornier. Primary structure of the aequorea victoria green fluorescent protein. *Gene*, 111:229–233, 1992.
- [Pha96] T. A. Pham. *Dynamique femtoseconde des états vibroniques de polydiacétylènes sous forme de films minces épitaxiés*. PhD thesis, Université Louis Pasteur, Strasbourg, 1996.
- [PHBV97] D. W. Pierce, N. Hom-Booher, and R. D. Vale. Imaging individual green fluorescent proteins. *Nature*, 388:338, 1997.
- [Phi97] G. N. Phillips. Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Current Opinion in Structural Biology*, 7:821–827, 1997.
- [PK98] G. Park and T. J. Kang. Dynamics of polar solvation for the electronic excited state of coumarin 481 with excess vibrational energy. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 19:799–802, 1998.
- [PKT⁺02] D. J. Pikas, S. M. Kirkpatrick, E. Tewksbury, L. L. Brott, R. R. Naik, and M. O. Stone. Nonlinear saturation and lasing characteristics of green fluorescent protein. *Journal of Physical Chemistry B*, 106:4831–4837, 2002.
- [PLS02] G. H. Patterson and L. Lippincott-Schwartz. A photoactivatable gfp for selective photolabeling of proteins and cells. *Science*, 297:1873–1877, 2002.
- [RG02] G. Ramakrishna and H. N. Ghosh. Efficient electron injection from twisted intramolecular charge transfert (tict) state of 7-diethyl amino cou-

- marin 3-carboxylic acid (d-1421) dye to tio_2 nanoparticule. *Journal of Physical Chemistry A*, 106:2545–2553, 2002.
- [RGG73] K. Rotkiewicz, K. H. Grellmann, and Z. R. Grabowski. Reinterpretation of the anomalous fluorescence of p-n,n-dimethylamino-benzonitrile. *Chemical Physics Letters*, 19:315–318, 1973.
- [RK94] K. Rechthaler and G. Kölher. Excited state properties and deactivation pathways of 7-aminocoumarins. *Chemical Physics*, 189:99–116, 1994.
- [RPMS03] A. Ramalingan, P. K. Palanisamy, V. Masilamani, and B. M. Sivaram. Multiple emission in coumarins with heterocyclic substituents. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 5:5121–5128, 2003.
- [Rul04] C. Rullière. *Femtosecond Laser Pulses, Principles and experiments*. Springer Verlag, 2nd ed. 2004.
- [RV94] B. B. Raju and T. S. Varadarajan. Substituents and solvent effects on the twisted intramolecular charge transfer of three new 7-(diethylamino)coumarin-3-aldehyde derivatives. *Journal of Physical Chemistry*, 98:8903–8905, 1994.
- [RW89] W. Rudolph and B. Wilhelm. *Light Pulse compression*. Taylor and Francis, 1989.
- [Sch03] W. Schoutens. *Lévy Processes in Finance: Pricing Financial Derivatives*. Wiley, 2003.
- [SD92] G. Stock and W. Domcke. Detection of ultrafast molecular-excited-state dynamics with time- and frequency-resolved pump-probe spectroscopy. *Physical Review A*, 45(5):3232–3243, 1992.
- [SD99] A. L. Sobolewski and W. Domcke. Ab initio potential-energy functions for excited state intramolecular proton transfer: a comparative study of o-hydroxybenzaldehyde, salicylic acid and 7-hydroxy-1-indanone. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 1:3065–3072, 1999.
- [SF00] A. Samanta and R. W. Fessenden. Excited-state dipole moment of 7-aminocoumarins as determined from time-resolved microwave dielectric

- absorption measurements. *Journal of Physical Chemistry A*, 104:8577–8582, 2000.
- [She02] Y. R. Shen. *The principles of Nonlinear Optics*. Wiley Classics Library, 2002.
- [Shi79] O. Shimomura. Structure of the chromophore aequorea green fluorescent protein. *FEBS Letters*, 104:220–222, 1979.
- [SJE⁺01] P. Schellenberg, E. Johnson, A. P. Esposito, P. J. Reid, and W. W. Parson. Resonance raman scattering by the green fluorescent protein and an analogue of its chromophore. *Journal of Physical Chemistry B*, 105:5316–5322, 2001.
- [SJS62] O. Shimomura, F. H. Johnson, and Y. Saiga. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 62:1–8, 1962.
- [SKH⁺00] P. Schwille, S. Kummer, A. A. Heikal, W. E. Moerner, and W. W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 97:151–156, 2000.
- [SNM⁺03] A.-P. Sibler, A. Nordhammer, M. Masson, P. Martineau, G. Trave, and E. Weiss. Nucleocytoplasmic shuttling of antigen in mammalian cells conferred by a soluble versus insoluble single-chain antibody fragment equipped with import/export signals. *Experimental Cell Research*, 286:276–287, 2003.
- [SS03] M. Stübner and P. Schellenberg. Low-temperature photochemistry and photodynamics of the chromophore of green fluorescent protein (gfp). *Journal of Physical Chemistry A*, 107:1246–1252, 2003.
- [SSSV99] G. Striker, V. Subramaniam, C. A. M. Seidel, and A. Volkmer. Photochromicity and fluorescence lifetimes of green fluorescent protein. *Journal of Physical Chemistry B*, 103:8612–8617, 1999.
- [SSTK99] A. Shirakawa, I. Sakane, M. Takasaka, and T. Kobayashia. Sub-5-fs visible

- pulse generation by pulse-front-matched noncollinear optical parametric amplification. *Applied Physics Letters*, 74:2268–2270, 1999.
- [SVA⁺94] C.-K. Sun, F. Vallée, L. H. Acioli, E. P. Ippen, and J. G. Fujimoto. Femtosecond-tunable measurement of electron thermalization in gold. *Physical Review B*, 50:15337–15348, 1994.
- [SWR01] Y. Sun, M. D. Wong, and B. P. Rosen. Role of cysteinyl residues in sensing pb(ii), cd(ii), and zn(ii) by the plasmid pi258 cadc repressor. *Journal of Biological Chemistry*, 276:14955–14960, 2001.
- [SZvF⁺01] T. A. Schuttrigkeit, U. Zachariae, T. von Feilitzsch, J. Wiehler, J. von Hummel, B. Steipe, and M.-E. Michel-Beyerle. Picosecond time-resolved fret in the fluorescent protein from discosoma red (wt-dsred). *ChemPhysChem*, 2:325–328, 2001.
- [TEB⁺02] M.-H. Teiten, P. Even, P. Burgos, C. Frochot, S. Aubert, M. C. Carré, L. Bolotine, J.-L. Merlin andd F. Guillemein, and M. L. Viriot. Specific fluorescent tracers. imaging and applications for photodynamic therapy. *Comptes Rendus de Biologie*, 325:487–493, 2002.
- [TN01] V. Tozzini and R. Nifosi. Ab-initio molecular dynamics of the green fluorescent protein (gfp) chromophore: An insight into the photoinduced dynamics of green fluorescent proteins. *Journal of Physical Chemistry B*, 105:5797–5803, 2001.
- [Tsi98] R. Y. Tsien. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67:509–544, 1998.
- [TZCH01] A. Takahashi, Y. Zhang, V. E. Centonze, and B. Herman. Measurement of mitochondrial ph in situ. *Biotechniques*, 30:804–815, 2001.
- [VKMBR00] A. A. Voityuk, A. D. Kummer, M. E. Michel-Beyerle, and N. Rösch. Absorption spectra of the gfp chromophore in solution: comparison of theoretical and experimental results. *Chemical Physics*, 269:83–91, 2000.
- [VMBR97] A. A. Voityuk, M. E. Michel-Beyerle, and N. Rösch. Protonation effects on the chromophore of the green fluorescent protein. quantum chemical

- study of the absorption spectrum. *Chemical Physics Letters*, 272:162–167, 1997.
- [VMBR98a] A. A. Voityuk, M. E. Michel-Beyerle, and N. Rösch. Quantum chemical modeling of structure and absorption spectra of the chromophore in green fluorescent proteins. *Chemical Physics*, 231:13–25, 1998.
- [VMBR98b] A. A. Voityuk, M. E. Michel-Beyerle, and N. Rösch. Structure and rotation barriers for ground and excited states of isolated chromophore of the green fluorescent protein. *Chemical Physics Letters*, 296:269–276, 1998.
- [VRPM01] C. Vijila, A. Ramalingan, P. K. Palanisamy, and V. Masilamani. Role of dipole moment of solvents in formation and stabilization of the tict states in coumarin 445 under nitrogen laser excitation. *Spectrochimica Acta Part A*, 57:491–497, 2001.
- [vTPNR⁺98] J. J. van Thor, A. J. Pierik, I. Nugteren-Roodzant, A. Xie, and K. J. Hellingwerf. Characterization of the photoconversion of green fluorescent protein with ftir spectroscopy. *Biochemistry*, 37:16915–16921, 1998.
- [VvSh⁺04] M. Vengris, I. H. M. van Stokkum, X. he, A. F. Bell, P. J. Tonge, R. van Grondelle, and D. S. Larsen. Ultrafast excited and ground-state dynamics of the green fluorescent protein chromophore in solution. *Journal of Physical Chemistry A*, 108:4587–4598, 2004.
- [War97] W. W. Ward. *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols*. John Wiley & Sons, 1997.
- [WB92] M. W. Wessendorf and T. C. Brelje. Which fluorophores is brightest? a comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine, rhodamine, texas red and cyanine 3.18. *Histochemistry*, 98:81–85, 1992.
- [WCHC80] W. W. Ward, C. W. Cody, R. C. Hard, and M. J. Cormier. Spectrophotometric identity of the transfer chromophores in renilla and aequorea green-fluorescent proteins. *Photochemistry and Photobiology*, 31:611–615, 1980.

- [Wei99] S. Weiss. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science*, 283:1676–1683, 1999.
- [WHML99] W. Webber, V. Helms, J. McCammon, and P. Langhoff. Shedding light on the dark and weakly fluorescent states of green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 96:6177–6182, 1999.
- [WJS⁺03] J. Wiehler, G. Jung, C. Seebacher, A. Zumbusch, and B. Steipe. Mutagenic stabilization of the photocycle intermediate of green fluorescent protein (gfp). *ChemBioChem*, 4:1164–1171, 2003.
- [WLM01] N. M. Webber, K. L. Litvinenko, and S. R. Meech. Radiationless relaxation in a synthetic analogue of the green fluorescent protein chromophore. *Journal of Physical Chemistry B*, 105:8036–8039, 2001.
- [WIS⁺02] K. Winkler, J. Lindner, V. Subramaniam, T. M. Jovin, and P. Vöhringer. Ultrafast dynamics in the excited state of green fluorescent protein (wt) studied by frequency resolved femtosecond pump-probe spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 4:1072–1081, 2002.
- [WPR⁺82] W. W. Ward, H. J. Prentice, A. F. Roth, C. W. Cody, and S. C. Reeves. Spectral perturbations of the aequorea green-fluorescent protein. *Photochemistry and Photobiology*, 35:803–808, 1982.
- [WTR99] J. Widengren, B. Terry, and R. Rigler. Protonation kinetics of gfp and fitc investigated by fcs: aspects of the use of fluorescent indicators for measuring ph. *Chemical Physics*, 249:259–271, 1999.
- [YMP96] F. Yang, L. G. Moss, and G. N. Phillips. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 14:1246–1251, 1996.
- [YW89] R. W. Yip and Y.-X. Wen. Photophysics of 7-diethylamino-4-methylcoumarin: picosecond time-resolved absorption and amplified emission study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 54:263–270, 1989.
- [YWS93] R. W. Yip, Y.-X. Wen, and A. G. Szabo. Decay associated fluorescence spectra of couarin 1 and coumarin 102: Evidence for a two-state solvation

kinetics in organic solvents. *Journal of Physical Chemistry*, 97:10458–10462, 1993.

Résumé

Au cours de ce travail expérimental, nous nous sommes intéressés aux propriétés photo-physiques d'un mutant de la protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein, GFP). Plus particulièrement, nous avons caractérisé par spectroscopie femtoseconde résolue spectralement la dynamique des états excités de ce mutant. Nous avons tout d'abord comparé les résultats obtenus avec ceux de la protéine naturelle. Cela nous a permis de montrer que la dynamique des états excités s'avère très sensible aux modifications de l'environnement proche de la partie optiquement active de la protéine. Dans une deuxième partie qui concerne l'étude de fusion génétique fragment d'anticorps-GFP, nous avons utilisé la sensibilité offerte par la dynamique des états excités de la protéine pour caractériser l'état de repliement de l'anticorps fusionné. Une autre partie de ce travail a été consacrée à l'étude des propriétés dynamiques de certains dérivés de la coumarine dont la nature de rotors moléculaires a été évoquée dans la littérature. Nous avons montré que la dynamique des états excités ne présente pas de signatures d'un tel comportement. Parallèlement aux études dynamiques, nous avons étudié le vieillissement ou diminution du nombre de molécules fluorescentes d'un ensemble bien déterminé de GFP sous illumination continue. Cette étude a mis en évidence le fait que l'évolution temporelle du système est gouvernée par une statistique de Lévy. L'une des conséquences principales étant l'existence d'un état instable à durée de vie moyenne infinie.

Mots clés : Spectroscopie pompe-sonde femtoseconde, dynamique des états excités, amplificateur paramétrique optique en géométrie non-colinéaire (NOPA), Green Fluorescent Protein (GFP), fusion génétique anticorps-GFP, amino-coumarine, rotors moléculaires, vieillissement, statistique de Lévy.

Abstract

During this experimental work, we have investigated the photo-physical properties of a Green Fluorescent Protein mutant (Green Fluorescent Protein, GFP). In particular, we have characterized the excited-states dynamics of this mutant by using spectrally time-resolved femtosecond spectroscopy. The comparison between the results obtained for the mutant and those obtained for the wild type protein allowed us to show that the excited-states dynamics is very sensitive to the modifications of the local environment of the optically active part of the protein. In a second part, devoted to the study of genetic fusion antibody fragment-GFP, we have used this sensitivity to characterize the final folded state of the antibody fragment. In another part of this work we have studied the dynamical properties of some coumarin derivatives whose molecular rotors character has been evoked in the literature. This study showed that the excited-states dynamics do not present signatures of such a behavior. Finally, we have characterized the aging mechanism or the reduction in the number of fluorescent molecules of a well-defined ensemble of GFP under cw excitation. This study evidenced that the temporal evolution of the system is governed by Lévy statistics. One of the main consequences is the existence of an unstable state with an infinite mean lifetime.

Key Words : Femtosecond pump-probe spectroscopy, excited-states dynamics, non-collinear optical parametric amplifier (NOPA), Green Fluorescent Protein (GFP), genetic fusion antibody-GFP, amino-coumarin, molecular rotors, aging, Lévy statistics.