



HAL
open science

Génération de second harmonique de biomolécules: des acides aminés aux protéines

Julien Duboisset

► **To cite this version:**

Julien Duboisset. Génération de second harmonique de biomolécules: des acides aminés aux protéines. Physique [physics]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT: . tel-00425139

HAL Id: tel-00425139

<https://theses.hal.science/tel-00425139>

Submitted on 20 Oct 2009

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 2 octobre 2009

par

Mr Julien Duboisset

**Génération de second harmonique de biomolécules : des acides
aminés aux protéines**

Directeur de thèse : Mr Pierre-François BREVET

JURY : Mr François AMBLARD, rapporteur
Mr Pierre-François BREVET
Mr Philippe DUGOURD
Mr Stephan HAACKE, Président du jury
Mr Brahim LOUNIS
Mr Hervé RIGNEAULT, rapporteur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J.F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

UFR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Cochat

Directeur : M. le Professeur X. Martin

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F.N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

UFR SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Directeur : Mme. la Professeure S. Fleck

Directeur : M. le Professeur H. Pinon

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : M. le Professeur G. Clerc

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : Mme. la Professeure H. Parrot

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. le Professeur R. Bacon

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur M. C. Coulet

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Directeur : M. le Professeur J.C. Augros

à mes parents, à mes frères,

RESUME: Au cours de ce travail, la génération de second harmonique optique des molécules biologiques a été étudiée. Cette technique optique non linéaire possède un caractère cohérent qui permet d'accéder aux propriétés de symétrie des molécules dont la taille est très inférieure aux longueurs d'onde optiques visibles utilisées et l'hyperpolarisabilité quadratique des acides aminés aromatiques a été mesurée en solution par diffusion non linéaire. L'hyperpolarisabilité des acides aminés non aromatiques a été obtenue de manière indirecte grâce à des mesures effectuées sur le collagène, une protéine ne contenant pas d'acide aminé aromatique. Le collagène possède en fait une très forte réponse non linéaire et fait l'objet d'études intenses en microscopie optique non linéaire. Par un modèle de sommation cohérente des champs harmoniques réémis, l'origine de la très forte efficacité non linéaire de cette protéine, liée à sa grande rigidité et à son organisation spatiale en triple hélice, a pu être obtenue. En parallèle, l'étude de plusieurs petits peptides synthétiques possédant de un à quatre tryptophanes a permis de comprendre la construction de la réponse optique non linéaire de ces objets à partir de motifs répétés. Par ailleurs, pour apporter des informations supplémentaires sur les nano systèmes, un nouveau montage expérimental a été développé. La grande sensibilité du montage a permis notamment d'atteindre la sensibilité d'une seule particule dans le volume sondé et de mettre en place un système de cartographie en trois dimensions par diffusion Hyper Rayleigh. La démonstration a été réalisée pour des nanoparticules métalliques uniques d'argent piégées dans une matrice de gélatine.

MOTS-CLES: Hyperpolarisabilité, optique non linéaire, peptides membranaires, acides aminés, nanoparticule unique, diffusion hyper Rayleigh, dipôle, quadripôle, centrosymétrie.

Second Harmonic Generation of biomolecules : from amino acids to proteins

RESUME: This thesis presents an experimental study of second-harmonic generation of biological molecules. The coherent nature of this process allows obtaining the symmetries of molecules whose size is less than the wavelengths used. The hyperpolarizabilities of aromatic amino acids were measured in solution and the hyperpolarizability of non-aromatic amino acids was measured indirectly through measurements on the collagen molecule. Thus, all the building blocks of proteins are characterized. Among the biological molecules, collagen has a very strong non-linear response despite the absence of harmonophore. A model of coherent summation of the fields reissued to understand the origin of the very high non-linear efficiency from the rigidity and the spatial arrangement of amino acids in triple helix. In the same way, the study of several peptides with one to four tryptophans has enabled us to quantify the importance of conformation and the ionic environment of proteins in the non-linear response. To provide additional information on nano systems, a new setup has been developed, combining two beams of excitation. Thus, the dipole and quadrupole radiation are differentiated to obtain the symmetry of molecular arrangements. Finally, the great sensitivity of the setup allows mapping in three dimensions, with the Hyper Rayleigh scattering, singles metal nanoparticles catch in a gelatin matrix.

KEYWORDS: Hyperpolarisability, non linear optic, membranic peptide, amino acids, single nanoparticule, Hyper Rayleigh Scattering, dipole, quadripole, centrosymetry.

Remerciements :

Pendant ces trois années de thèse, et même avant celles-ci, de nombreuses personnes ont été à mes côtés et m'ont permis d'accomplir ce travail. Je tiens ici à les remercier chaleureusement.

Je remercie tout d'abord le Laboratoire de Spectrométrie Ionique et Moléculaire et son directeur, Mr Bordas, ainsi que tous les personnels techniques, pour m'avoir accueilli pendant tout ce temps.

Je commencerai par remercier Pierre-François pour son accueil au sein de l'équipe ONLI. Je le remercie pour sa grande humanité et sa sympathie en toutes circonstances. Je le remercie pour nos discussions toujours fructueuses (certaines le seront un jour) et la grande liberté d'action qu'il m'a donnée, rendant le travail au sein de l'équipe plus qu'agréable.

Je remercie également tous les membres de l'équipe, Isabelle, Guillaume, Emmanuel et Christian pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Je remercie Yara pour ses soutiens inconditionnels, Chawki pour sa bonne humeur inaltérable et Jérémy pour m'avoir permis d'apporter de jolies figures supplémentaires à ce travail.

Enfin je remercie également Claire Loison pour nos discussions scientifiques et pas scientifiques.

Je remercie aussi Marie-Claire, Ariane, Françoise, Gladys et Florence pour avoir été d'excellentes rencontres professionnelles et amicales.

Je remercie également tous les membres du jury pour leurs remarques très intéressantes ainsi que les rapporteurs Mr Amblard et Mr Rigneault pour avoir accepté d'étudier mon travail avec autant de soin.

Si je pars avec un grand regret de ce laboratoire, c'est également à cause de l'excellente ambiance qui régnait entre doctorants, techniciens, ingénieurs et chercheurs. Je me dois de remercier Matthieu, Mathieu, Francisco, Sad, Xavier, Amandine, Cyril, Laure, Renaud, Franck, Jérôme, Myriam et Nadia. Je les remercie tous pour leur amitié, les soirées foot, les

soirées jeux, les soirées dans des appartements neufs, les soirées sympas, les soirées après le footing,...

Je pense que je n'aurai pas eu la chance de côtoyer tout ces gens si d'autres ne m'avaient pas conseillé, grondé, réconforté,.... Les professeurs du collège Mr Rigoud et Mr Petit qui m'ont enseigné la rigueur et l'esprit critique, Mme Pietrucci qui en seconde m'arracha à un brillant avenir littéraire et enfin Mme Fanin qui, malgré mes notes, me passionna pour la physique. Ensuite, à l'université je remercie Mr Romagnan pour ses excellents cours. J'aimerais aussi particulièrement remercier Mr Michel, mon directeur de stage en Master2, qui me fit confiance et me recommanda pour la préparation à l'agrégation de physique de l'école normale de Lyon.

En parlant de l'école normale supérieure de Lyon, j'aimerais embrasser Claire, Vincent, Cruf et Damien sans qui je n'aurai jamais pu obtenir cette satanée agreg et sans qui cette année aurait été beaucoup moins drôle. Et il y a également tout un tas d'amis que j'aimerais remercier pour leur présence tout au long de ces années: Phildar et Seb, Serge, Olive et Jé, et bien sur Sophie, Julie, Momo et Camila.

Je tiens aussi à remercier Florence, la D489 entre Champagnac-le-vieux et la Chaise-Dieu, le 76 rue Edouard Herriot, mon violon et bien évidemment ma Vespa sans qui je n'aurai pas pu avoir toutes ces discussions intérieures.

Enfin, Je tiens à remercier mes parents sans qui rien de cela n'aurait été possible. Ils ont toujours été présents, aimants et disponibles. Je les remercie pour les sacrifices qu'ils ont faits pour que nous réussissions, mes frères et moi. Je remercie également mes deux frères, François et Laurent, mais les mots seraient de trop et les raisons évidentes.

INTRODUCTION.....	15
--------------------------	-----------

CHAPITRE 1: DIFFUSION HYPER RAYLEIGH : THEORIE ET SYSTEME EXPERIMENTAL 19

1.1	INTRODUCTION	19
1.2	GENERATION DE SECOND HARMONIQUE	22
1.2.1	<i>Principes</i>	22
1.2.2	<i>Diffusion Hyper Rayleigh</i>	28
1.2.3	<i>Diffusion Hyper Rayleigh résolue en polarisation</i>	30
1.2.4	<i>Passage du référentiel macroscopique au référentiel microscopique : la matrice d'Euler</i>	35
1.2.5	<i>Exemple : les molécules planes</i>	36
1.3	MONTAGE EXPERIMENTAL.....	40
1.3.1	<i>Laser et optique</i>	40
1.3.2	<i>Système de détection</i>	43
1.3.3	<i>Mesure de spectre d'absorption UV-Visible</i>	46
1.4	PRINCIPE DE LA MESURE	47
1.4.1	<i>Spectre HRS</i>	47
1.4.2	<i>Référence externe</i>	48
1.4.3	<i>Référence interne</i>	49
1.4.4	<i>Sensibilité des mesures</i>	50
1.5	CONCLUSIONS.....	51
1.6	BIBLIOGRAPHIE	53

CHAPITRE 2: DIFFUSION HYPER RAYLEIGH ET GENERATION DE SECOND HARMONIQUE DE BIOMOLECULES..... 55

2.1	HRS DE BIOMOLECULES	55
2.1.1	<i>Introduction</i>	55
2.1.2	<i>Molécules sondes exogènes</i>	56
2.1.3	<i>Molécules sondes endogènes</i>	62
2.1.4	<i>Peptides synthétiques</i>	71
2.1.5	<i>Peptides membranaires</i>	79
2.2	GENERATION DE SECOND HARMONIQUE DU PEPTIDE W4.....	83
2.2.1	<i>Introduction</i>	83
2.2.2	<i>Montage expérimental</i>	84
2.2.3	<i>Théorie</i>	87
2.2.4	<i>W4 à l'interface air/eau</i>	90
2.2.5	<i>W4 aux interfaces lipidiques</i>	94
2.3	CONCLUSIONS.....	100
2.4	BIBLIOGRAPHIE	101

CHAPITRE 3: DETECTION DE PARTICULES UNIQUES ET CARTOGRAPHIE HRS EN 3 DIMENSIONS 105

3.1	INTRODUCTION	105
3.2	DETECTION DYNAMIQUE HRS DE NANO PARTICULES D' ARGENT D' UN DIAMETRE DE 80 NM.....	107
3.2.1	<i>Résultats expérimentaux</i>	107
3.2.2	<i>Modélisation</i>	113
3.2.3	<i>Comparaison théorie et expérience</i>	117
3.3	CARTOGRAPHIE 3D DE MICRO ET NANO PARTICULES EN HRS ET FLUORESCENCE.....	120
3.3.1	<i>Montage expérimental</i>	120
3.3.2	<i>Bille de latex en fluorescence</i>	124
3.3.3	<i>Particule d'argent de diamètre 80 nm en diffusion Hyper Rayleigh</i>	128
3.4	CONCLUSIONS.....	129
3.5	BIBLIOGRAPHIE	131

CHAPITRE 4: ARRANGEMENTS MOLECULAIRES CENTROSYMETRIQUES 133

4.1	INTRODUCTION	133
4.2	DIFFUSION NON LINEAIRE D'ASSEMBLAGES : FORMALISME	134
4.2.1	<i>Rappel sur la réponse dipolaire électrique</i>	134
4.2.2	<i>Référentiel mésoscopique</i>	135
4.2.3	<i>Exemple : le Cristal Violet</i>	136
4.3	ASSEMBLAGES CENTROSYMETRIQUES	138
4.3.1	<i>Prise en compte des effets retardés</i>	138
4.3.2	<i>Assemblages résolus en polarisation</i>	141
4.4	LE PARAMETRE η	144
4.5	ASSEMBLAGE CENTROSYMETRIQUE ORDONNE : LA REPARTITION SPHERIQUE	145
4.6	ASSEMBLAGES CENTROSYMETRIQUES DESORDONNES : LES SOLVANTS	149
4.6.1	<i>Description</i>	149
4.6.2	<i>HRS de solvant : eau, acétonitrile et chloroforme</i>	151
4.6.3	<i>Etude de l'eau salée</i>	155
4.7	CONCLUSIONS.....	158
4.8	BIBLIOGRAPHIE	159

CHAPITRE 5: ORIGINE DE LA REPOSE NON LINEAIRE DU COLLAGENE TRIPLE HELICE 161

5.1	INTRODUCTION	161
5.2	CONSTRUCTION DE LA REPOSE NON LINEAIRE DU COLLAGENE NATIF	163
5.2.1	<i>Structure du collagène</i>	163
5.2.2	<i>Résultats expérimentaux</i>	165
5.2.3	<i>Construction cohérente</i>	167
5.3	ORIGINE DE LA REPOSE.....	173
5.3.1	<i>Comparaison collagène / gélatine</i>	173
5.3.2	<i>Etude en polarisation de PPG10</i>	175
5.4	CONCLUSIONS.....	182
5.5	BIBLIOGRAPHIE	184

CHAPITRE 6: SYMETRIE ET ARRANGEMENT..... 187

6.1	INTRODUCTION	187
6.2	REPARTITION DE N POINTS SUR UNE SPHERE	188
6.2.1	<i>Solides de Platon</i>	188
6.2.2	<i>Répartition de Thomson</i>	190
6.2.3	<i>Répartition de Tammes</i>	193
6.3	DIFFUSION NON LINEAIRE DETECTEE A 90°	196
6.3.1	<i>Théorie</i>	196
6.3.2	<i>Résultats</i>	199
6.4	COMBINAISON DE LA DIFFUSION A 90° ET 180°.....	204
6.4.1	<i>Théorie</i>	204
6.4.2	<i>Montage expérimental</i>	207
6.4.3	<i>Résultats préliminaires</i>	208
6.5	CONCLUSIONS.....	212
6.6	BIBLIOGRAPHIE	214

CONCLUSION 217

Introduction

Ces dernières décennies, le développement des techniques physiques ont permis d'explorer une part de plus en plus importante du monde biologique. Ainsi, cette thèse s'inscrit dans le cadre général de l'utilisation de l'optique pour les sciences du vivant. Parmi les techniques optiques non linéaires ayant déjà fait l'objet d'un tel intérêt, on peut citer la fluorescence à deux photons ou la génération de second harmonique, essentiellement utilisées jusqu'à présent comme outils d'imagerie afin de mieux localiser les éléments constitutifs des cellules et de mieux comprendre leur fonction. Les méthodes d'imagerie non linéaire sont devenues un outil pertinent en imagerie biologique en raison notamment d'une meilleure localisation des sondes non linéaires et par conséquent d'une résolution accrue des images obtenues. En effet, en raison de la dépendance de l'intensité du signal à la fréquence harmonique avec le carré de l'intensité de l'onde incidente, le processus de conversion, c'est-à-dire de deux photons à la fréquence fondamentale en un photon à la fréquence harmonique, n'est effectué efficacement que dans un volume réduit de l'espace. En microscopie confocale, ce volume peut être ramené à environ $1\mu\text{m}^3$ avec l'utilisation d'objectif de forte ouverture numérique ce qui autorise une imagerie optique tridimensionnelle lorsque le volume sondé est déplacé dans l'échantillon. Par rapport à la fluorescence à deux photons, la génération de second harmonique permet d'obtenir des informations sur l'arrangement spatial sub-longueur d'onde des sondes non linéaires. En effet, la génération de second harmonique est interdite dans les milieux possédant un centre d'inversion ce qui rend ce processus extrêmement sensible aux symétries. La grande spécificité des sondes utilisées en génération de seconde harmonique permet également d'obtenir de forts contrastes, utiles en imagerie. Ces travaux ont permis l'avènement de nouveaux outils pour la biologie, en particulier la microscopie confocale couplée SHG-TPEF (génération de second harmonique et fluorescence excitée à deux photons simultanément) et se sont particulièrement focalisés sur l'imagerie optique non linéaire des tissus.

En imagerie SHG, le processus d'émission est un processus cohérent où l'intensité à l'échelle moléculaire dépend de la densité moléculaire au carré. L'intensité non linéaire est également très sensible à l'organisation des biomolécules dans le volume. Ainsi

l'hétérogénéité de l'organisation des sondes au sein des protéines rend la relation entre l'intensité du signal et le nombre de sondes extrêmement complexe. La microscopie SHG ne permet donc pas à l'heure actuelle d'apporter des informations quantitatives sur les concentrations moléculaires. De plus, le manque de données quantitatives sur la réponse non linéaire des sondes rencontrées rend l'interprétation des données difficiles. Par le passé, la diffusion Hyper Rayleigh, processus SHG incohérent, a également été utilisée pour l'étude des protéines mais la relation entre leur structure et l'intensité du signal non linéaire mesuré s'est avérée complexe. A ce jour, il existe peu d'outils de diagnostic optique permettant de suivre les modifications conformationnelles des protéines en solution liquide ou insérées dans les membranes.

Nous proposons de poursuivre ces efforts en proposant non pas une nouvelle technique d'imagerie mais plutôt un outil de diagnostic, non invasif, pour l'étude de la conformation des protéines en milieu liquide ou insérées dans les membranes. Dans ce travail de thèse, deux lignes directrices sont explorées. (1) la relation entre les sondes non linéaires, endogènes ou exogènes, et le signal non linéaire afin de définir les briques élémentaires responsables de la génération de second harmonique. (2) la relation entre la structure spatiale des sondes au sein des arrangements et l'intensité du signal.

La première partie sur la relation sonde-signal est développée en trois chapitres. Le chapitre I pose les bases théoriques de la diffusion Hyper Rayleigh qui est la technique choisie pour obtenir les informations nécessaires en découplant l'intensité du signal et les orientations des sondes, contrairement à la microscopie SHG ou à la SHG aux interfaces. Le montage expérimental de diffusion Hyper Rayleigh, permettant des mesures ultra sensibles, est ensuite décrit en détail.

Dans le chapitre II, une large étude des molécules sondes en optique non linéaire est menée. Tout d'abord, un panel de molécules de synthèse, qui ont pour but dans un futur proche d'être greffées sur des molécules biologiques, est caractérisé. Ces molécules dont l'efficacité non linéaire est forte permettront de marquer de manière spécifique des protéines dont la réponse non linéaire est trop faible pour être détectée. Ensuite, un effort particulier a été fait pour mesurer l'efficacité non linéaire des constituants élémentaires des protéines : les acides aminés. Notre attention s'est particulièrement portée sur les trois acides aminés aromatiques, le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine. Enfin, après avoir caractérisé les

principales sondes non linéaires présentes dans les protéines, l'étude d'un peptide synthétique, riche en tryptophane, a été menée à l'interface de membranes biomimétiques. Cette étude a démontré la nécessité de connaître précisément l'efficacité non linéaire des briques élémentaires.

La sensibilité de l'expérience est d'une grande importance car les signaux mesurés sur les molécules biologiques peuvent être faibles voire parfois indétectables. Le chapitre III développe les expériences mises en jeu pour caractériser précisément la sensibilité du montage. Des nano particules d'argent de 80 nm de diamètre, dont les caractéristiques optiques sont bien connues, ont servi d'objets test pour déterminer les seuils de détectabilités. Ainsi, une seule nano particule présente dans le volume sondé par le laser incident est nécessaire pour contribuer à une augmentation significative du signal non linéaire. Grâce à ces résultats, la perspective d'étudier des objets uniques en diffusion Hyper Rayleigh est bien réelle puisque des cartographies préliminaires en trois dimensions de nano particules ont été obtenues.

Dans une deuxième partie, la relation entre la structure spatiale des sondes et l'intensité non linéaire est établie et étudiée. Déterminer la conformation d'un objet biologique telle qu'une protéine est primordiale et peu de techniques non invasives en sont capables en milieu liquide. Pour cela, la théorie de la diffusion Hyper Rayleigh des assemblages moléculaires est développée dans le chapitre IV. L'approximation dipolaire électrique développée dans le chapitre I n'est plus suffisante et les termes prenant en compte la taille des assemblages doivent être pris en compte. L'importance de l'arrangement moléculaire sur le signal non linéaire est démontrée sur des assemblages centrosymétriques sphériques telles que les micelles et sur des systèmes où les orientations des molécules ne sont pas corrélées, comme les solvants.

Parmi les protéines dont la structure est bien connue, le collagène de type I possède une très forte efficacité non linéaire malgré l'absence de forts harmonophores. Dans le chapitre V, il est démontré que sa structure atypique en triple hélice joue un rôle prépondérant dans la construction du signal non linéaire. De plus, des mesures en polarisation ont permis d'attribuer l'origine du dipôle non linéaire au niveau de la liaison peptidique et de déterminer son orientation au sein de la molécule.

Ainsi, la structure des objets a une grande importance dans l'intensité mesurée et le dernier chapitre est donc consacré à l'étude de l'intensité Hyper Rayleigh en fonction de la symétrie de l'arrangement des sondes. Dans ce chapitre il est démontré que la combinaison de plusieurs directions de propagation et de polarisation du faisceau incident, permet de déterminer la symétrie de l'objet étudié avec une grande précision. Ces résultats théoriques sont prouvés expérimentalement sur des systèmes tests grâce à la mise en place d'un nouveau montage mêlant deux directions d'excitation.

Chapitre 1: Diffusion Hyper Rayleigh : Théorie et système expérimental

1.1 Introduction

Le processus de génération de second harmonique (acronyme anglais *Second Harmonic Generation*, SHG) est un processus optique au cours duquel deux photons incidents à la fréquence fondamentale sont convertis en un seul photon à la fréquence harmonique. Il est usuel de distinguer le processus incohérent du processus cohérent. Dans le premier cas, les sources non linéaires participant au processus de conversion forment ensemble une source incohérente d'une onde harmonique. Les phases de chacune des ondes élémentaires produites par les sources non linéaires sont aléatoires. Ce processus porte le nom de diffusion hyper Rayleigh ou diffusion harmonique de lumière (acronyme anglais *Harmonic Light Scattering*, HLS, ou *Hyper Rayleigh Scattering*, HRS). Le terme de génération de second harmonique est réservé au processus cohérent pour lequel une relation de phase non aléatoire existe entre les ondes élémentaires. Nous verrons au cours de ce travail que la séparation entre les deux processus est parfois plus délicate que ne le laisse paraître la règle énoncée ci-dessus. Du point de vue de l'intensité harmonique produite, la cohérence ou non de la source macroscopique, c'est-à-dire de l'ensemble des sources non linéaires élémentaires, conduit à une dépendance linéaire ou quadratique en fonction du nombre de sources élémentaires. Les conséquences sur la détectabilité de cette intensité sont donc grandement tributaire du nombre de sources élémentaires impliquées, le cas cohérent conduisant à de fortes intensités dans le cas d'un grand nombre de sources élémentaires présentes. Ce dernier cas correspond par exemple au cas du processus SHG macroscopique que l'on rencontre couramment en physique des lasers pour doubler une longueur d'onde avec une efficacité proche de l'unité. Dans ce travail de thèse, nous nous intéresserons plutôt au cas d'ensembles restreints de sources élémentaires non linéaires. En plus des aspects cohérents et incohérents, un second point essentiel pour la discussion du processus SHG est la symétrie de l'arrangement spatial des sources élémentaires. Un exemple maintenant bien décrit dans la littérature est celui des nano particules métalliques d'or ou d'argent sphériques de quelques nanomètres de diamètre.

Les études tant expérimentales que théoriques ont en effet clairement montré que la symétrie sphérique parfaite de ces objets constitués, de plus, par un matériau dont la structure cristalline est centrosymétrique conduit à des règles de sélection qui interdisent une réponse purement dipolaire électrique. Toute déviation à cette centrosymétrie conduit inexorablement à la brisure de la symétrie et des règles de sélection qui lui sont attachées. La combinaison de ces deux points fondamentaux, la cohérence et la symétrie, permet au final d'apporter des informations fines sur la structure et l'organisation des nano systèmes à des échelles bien inférieures aux longueurs d'onde optiques utilisées. On remarque ainsi toute la pertinence de ces études si l'on se souvient du critère de Rayleigh stipulant qu'il est impossible de résoudre des détails spatiaux dont la taille est bien inférieure à environ la moitié de la longueur d'onde d'excitation. Le processus de génération de second harmonique permet de passer outre cette contrainte et d'apporter des informations sur la structure et l'organisation d'objets dont la taille est 10 à 100 fois inférieure aux longueurs d'onde utilisées.

Quelque soit le degré de cohérence du processus observé, SHG ou HRS, l'intensité à la fréquence harmonique dépend de la section efficace du processus et de l'intensité à la fréquence fondamentale au carré puisque le processus implique deux photons de fréquence fondamentale. Ainsi :

$$I^{2\omega} = \sigma^{2\omega} (I^\omega)^2 \quad (1-1)$$

mais il conviendra de distinguer la section efficace du processus cohérent $\sigma_{SHG}^{2\omega}$ de celle du processus incohérent $\sigma_{HRS}^{2\omega}$ puisque la dépendance linéaire ou quadratique avec le nombre de sources élémentaires se trouve précisément rejetée dans cette quantité. La section efficace du processus de conversion est usuellement très faible dans le cas incohérent. En effet nous estimons par exemple l'intensité HRS produite par une cellule d'eau pure à 100 photons/s pour une intensité d'excitation de notre source laser (voir 1.3.1) de 10^{18} photons/s à la fréquence fondamentale. Cependant, si la source possède un seuil de dommage suffisamment élevé, une source laser plus intense permettrait d'obtenir un plus grand nombre de photons harmoniques.

La première observation de diffusion non linéaire a été réalisée par R.W. Terhune *et coll.* dès 1965 sur des solutions liquides telle que l'eau et du quartz fondu [1]. Plusieurs autres expériences ont par la suite été menées par diffusion de second harmonique dans les liquides [2]. Ces mesures ont permis en particulier de mettre en évidence des modes de vibrations non additifs dans les liquides. Parallèlement au développement de la diffusion non linéaire, la diffusion hyper Raman a également connu un grand intérêt. Ce processus hyper Raman est au processus hyper Rayleigh ce qu'est le processus Raman au processus linéaire de diffusion Rayleigh. Cependant, le passage au régime non linéaire modifie les règles de sélections autorisant l'excitation de modes non visibles en diffusion Raman linéaire [3]. Par ailleurs, la faible section efficace de la diffusion Hyper Rayleigh a motivé le développement de la technique de génération de second harmonique induite par champ électrique (acronyme anglais *Electric Field Induced Second Harmonic*, EFISH) [4, 5]. En effet, l'application d'un champ électrique statique important, pouvant atteindre plusieurs kV/cm, rompt l'isotropie du fluide et oriente les molécules. Le processus de conversion de fréquence devient alors cohérent et l'intensité mesurée est importante. Cependant, cette technique ne permet pas de mesurer le moment dipolaire et l'hyperpolarisabilité du second ordre de manière indépendante. De plus, de fortes restrictions s'appliquent à l'utilisation de la méthode. En particulier, les molécules doivent posséder des forts moments dipolaires et ne pas être ioniques pour éviter toute électrolyse ou phénomène migratoire. Malgré tout, l'utilisation de lasers impulsionsnels ayant de fortes puissances crêtes ainsi que des détections plus sensibles ont permis ces dernières années d'obtenir des mesures d'hyperpolarisabilités quadratiques faibles par HRS sur des composés organiques très variés ou des nanoparticules métalliques. La résolution en polarisation des mesures d'hyperpolarisabilités a apporté des informations sur la géométrie des molécules [6] ainsi que sur la géométrie d'assemblages moléculaires [7]. L'étude spectrale des largeurs de raies hyper Rayleigh fournit quant à elle des informations sur les modes de réorientation moléculaire de basse fréquence par diffusion quasi-élastique [8]. Du point de vue de l'appareillage expérimental, différentes géométries accessibles par système goniométrique avec des angles d'excitation et de collection variables ont été mises au point afin d'obtenir un maximum d'informations sur les composés moléculaires. En effet, la configuration traditionnelle avec la direction de collection faisant un angle droit avec la direction de l'excitation ne permet d'obtenir qu'un nombre réduit de paramètres alors qu'il a été démontré que six invariants sont en fait accessibles. Seule une expérience plus complète où différentes géométries sont explorées peut permettre d'accéder à tous ces invariants et

donc d'apporter toute l'information [9]. Ces dernières années, les expériences de diffusion non linéaire SHG ou HRS ont porté sur des objets plus gros que les petites molécules traditionnellement la cible de ces études dans le cadre de l'ingénierie moléculaire. Ainsi des protéines [10, 11], des liposomes [12-14], des micelles [15, 16] ont fait l'objet d'études similaires ainsi que les nano objets métalliques telles que les particules d'or et argent [17-21] et des alliages métalliques [22]. Dans ce chapitre, nous reviendrons sur les principaux éléments de la théorie HRS ainsi que sur le système expérimental.

1.2 Génération de second harmonique

1.2.1 Principes

Dans le modèle du dipôle oscillant, l'émission d'une onde électromagnétique est due à l'oscillation d'un dipôle électrique. Ce dipôle peut être excité par un champ incident. En optique non linéaire, ce dipôle dépend alors non linéairement du champ électrique incident. D'un point de vue macroscopique, les quantités microscopiques sont moyennées sur un volume grand devant les tailles microscopiques caractéristiques mais petit devant la longueur d'onde. On introduit alors la polarisation et les susceptibilités pour formuler ce processus par :

$$\vec{P} = \vec{P}_L + \vec{P}_{NL} = \epsilon_0 (\tilde{\chi}^{(1)} \vec{E} + \tilde{\chi}^{(2)} : \vec{E}\vec{E} + \dots) \quad (1-2)$$

avec ϵ_0 la permittivité diélectrique du vide, $\tilde{\chi}^{(1)}$ le tenseur de susceptibilité d'ordre 2 à 9 composantes et $\tilde{\chi}^{(2)}$ le tenseur de susceptibilité d'ordre 3 à 27 composantes. Le tenseur de susceptibilité quadratique contient plus de composantes que le tenseur de susceptibilité linéaire et par conséquent est potentiellement plus riche en information. Les tenseurs de susceptibilité décrivant des milieux matériels, restent invariants par les mêmes transformations qui laissent invariant le milieu matériel. Ainsi, un milieu centrosymétrique reste invariant par une inversion par rapport à l'origine du repère. Si nous considérons la transformation géométrique de symétrie centrale du point de coordonnées (x,y,z) , nous obtenons le point de coordonnées $(-x,-y,-z)$. Lorsque cette même transformation est appliquée à la polarisation non linéaire \vec{P}_{NL} , nous obtenons :

$$-\vec{P}_{NL} = \epsilon_0 \chi^{(2)}(-\vec{E})(-\vec{E}) = \epsilon_0 \chi^{(2)} \vec{E} \vec{E} = \vec{P}_{NL} \quad (1-3)$$

en utilisant le fait que la susceptibilité du milieu reste inchangée par la transformation car le milieu est centrosymétrique et un vecteur est transformé en son opposé. La seule solution à cette équation est $\vec{\chi}^{(2)} = 0$. Le processus de génération de seconde harmonique est par conséquent interdit dans tout milieu possédant un centre d'inversion. Les liquides ou les gaz tombent ainsi dans cette catégorie. Nous allons voir cependant que cette règle peut être brisée. En particulier, la règle (1-3) interdit l'existence d'un processus cohérent mais ne stipule en rien qu'un processus incohérent est interdit. Par ailleurs, la règle (1-3) est établie pour un processus dipolaire électrique. L'introduction de contributions dues aux ordres multipolaires plus élevés permet d'aller au-delà de cette restriction. Ajoutons enfin que cette règle (1-3) a été à l'origine du développement des études des surfaces entre milieux centrosymétriques par génération de second harmonique en raison de la rupture de cette centrosymétrie précisément à l'interface. Tous les types d'interfaces ont été considérés dans le passé, des interfaces gaz/solide, gaz/liquide, liquide/solide ou même solide/solide et liquide/liquide. L'application aux surfaces biomimétiques reconstituées à l'interface air-eau ou en liposomes par exemple sera discutée par la suite.

Afin d'aller au-delà des informations relatives aux quantités macroscopiques comme le tenseur de susceptibilité et ses éléments, l'accès aux paramètres microscopiques pertinents est réalisé par le passage des quantités macroscopiques aux quantités microscopiques par une moyenne sur un volume de longueur caractéristique bien inférieure à la longueur d'onde. En particulier, ce passage implique des hypothèses parfois fortes dont nous ne ferons pas l'étude exhaustive. Nous admettrons simplement le passage par simple superposition en tenant compte éventuellement d'un champ électromagnétique local différent du champ électromagnétique macroscopique appliqué. Le passage est donc réduit à l'expression $N \langle \vec{\beta} \rangle = \epsilon_0 \vec{\chi}^{(2)}$ en incorporant les facteurs de champ locaux dans l'hyperpolarisabilité $\langle \vec{\beta} \rangle$. Le symbole $\langle \rangle$ indique ici l'opération de moyenne sur les orientations des différentes sources élémentaires auxquelles est attaché l'hyperpolarisabilité. La géométrie du montage

expérimental permettra alors un accès à des grandeurs dans le repère du laboratoire et la relation de passage permettra le retour aux grandeurs microscopiques.

Le système expérimental le plus commun en diffusion Hyper Rayleigh est un montage où les directions d'excitation et de collection font un angle de 90° , comme schématisé ci-dessous.

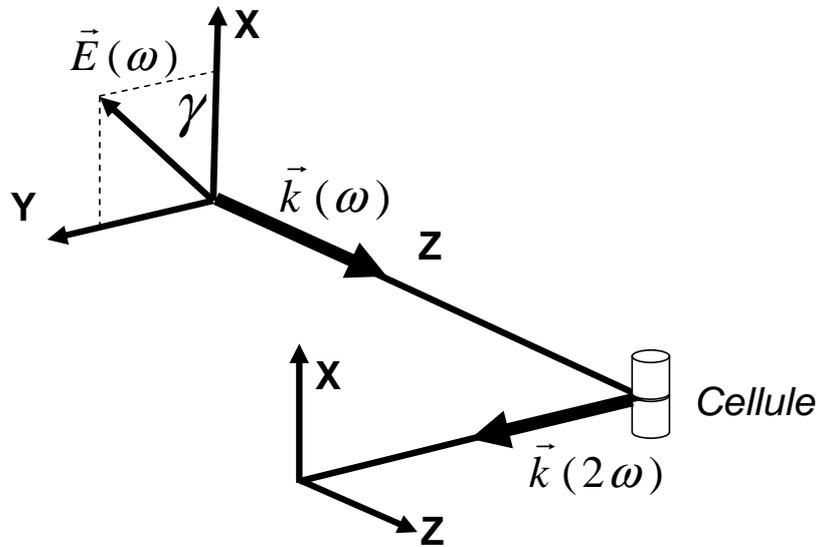


Figure 1-1 : schéma du montage expérimental. Le faisceau fondamental est polarisé suivant l'angle γ . Le faisceau harmonique est détecté à 90° du fondamental.

En considérant la géométrie du système expérimental illustré en Figure 1-1, le champ électromagnétique incident s'écrit, sous la forme d'une onde plane monochromatique de fréquence fondamentale ω , selon :

$$\vec{E}(\vec{r}', \omega) = E_\omega (\hat{X} \cos \gamma + \hat{Y} \sin \gamma e^{i\delta}) e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r}' - \omega t)} \quad (1-4)$$

où γ est l'angle de polarisation de l'onde plane incidente et δ est la phase relative entre les composantes du champ selon les axes \hat{X} et \hat{Y} . La direction de propagation de l'onde

incidente est ici selon l'axe Oz . La détection est réalisée selon la direction Oy et fait un angle de 90° avec la direction d'excitation. Le choix de cet angle est motivé essentiellement par des raisons pratiques de construction du montage expérimental, le faisceau fondamental naturellement rejeté de la direction de collection, seule la partie diffusée linéairement étant présente. Cette configuration à 90° permet aussi d'obtenir plus d'information qu'à 0° ou 180° , comme nous le verrons dans les chapitres suivants lorsque les contributions multipolaires sont introduites. Toutefois, le choix de fixer l'angle de collection ne nous permettra pas de récolter toute l'information disponible. En effet, il faudrait pour cela un système goniométrique qui permettrait de faire varier l'angle de collection [23].

L'onde incidente induit sur le composé cible présent dans la cellule un dipôle total dont l'expression est :

$$\vec{p} = \vec{\mu}_0 + \alpha \vec{E}_{loc} + \vec{\beta} : \vec{E}_{loc} \vec{E}_{loc} + \dots \quad (1-5)$$

où $\vec{\mu}_0$ est le dipôle permanent et les termes suivants un développement en puissance du champ électrique local \vec{E}_{loc} , effectivement présent au niveau du dipôle. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons exclusivement au dipôle induit à la fréquence harmonique puisqu'il est la source de l'onde élémentaire à cette fréquence. En combinant les relations (1-4) et (1-5), nous obtenons l'expression du dipôle à la fréquence harmonique :

$$\vec{p}(\vec{r}', 2\omega) = E_\omega^2 \vec{\beta}_L (\hat{X}\hat{X} \cos^2 \gamma + (\hat{X}\hat{Y} + \hat{Y}\hat{X}) e^{i\delta} \sin \gamma \cos \gamma + \hat{Y}\hat{Y} \sin^2 \gamma e^{2i\delta}) e^{2i(\vec{k} \cdot \vec{r}' - \alpha t)} \quad (1-6)$$

où $\vec{\beta}_L$ est le tenseur d'hyperpolarisabilité microscopique dans le référentiel du laboratoire, comme l'indique l'indice L . Le champ électromagnétique harmonique détecté est le champ émis par le dipôle harmonique $\vec{p}(\vec{r}', 2\omega)$. Le champ émis par un dipôle rayonnant est bien connu [24]. La configuration expérimentale nous place dans l'hypothèse de ce que l'on appelle la zone lointaine de radiation où la taille caractéristique du dipôle est très petite devant la longueur d'onde qui elle-même est très petite devant la distance de collection. Dans ce cas, le champ radié est :

$$\vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) = \left(\frac{2\omega n^2 \omega}{c} \right)^2 \left[(\hat{h} \times \vec{p}(\vec{r}', 2\omega)) \times \hat{h} \right] \frac{e^{iK|\vec{r}-\vec{r}'|}}{|\vec{r}-\vec{r}'|} \quad (1-7)$$

en posant $K = 2\omega n^2 \omega / c$, la norme du vecteur d'onde à la fréquence harmonique et $\hat{h} = \vec{r}/r$ la direction de propagation de l'onde harmonique. Cette relation est valide dans le cas où il n'existe pas de diffusion multiple, c'est-à-dire dans le cas de milieux très diffusants, ni d'interactions entre la diffusion à la fréquence fondamentale et la diffusion à la fréquence harmonique. A partir des relations (1-6) et (1-7), nous obtenons le champ diffusé par le dipôle non linéaire pour la configuration expérimentale choisie, c'est-à-dire pour $\hat{h} = \hat{Y}$:

$$\vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) = \begin{pmatrix} P'_X \\ P'_Y \\ P'_Z \end{pmatrix} E_\omega^2 K^2 \frac{e^{iK|\vec{r}-\vec{r}'|}}{|\vec{r}-\vec{r}'|} e^{2i\vec{k} \cdot \vec{r}'} \quad (1-8)$$

avec

$$\begin{pmatrix} P'_X \\ P'_Y \\ P'_Z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \beta_{L,XXX} \cos^2 \gamma + 2e^{i\delta} \beta_{L,XXY} \cos \gamma \sin \gamma + e^{2i\delta} \beta_{L,XYX} \sin^2 \gamma \\ 0 \\ \beta_{L,ZXX} \cos^2 \gamma + 2e^{i\delta} \beta_{L,ZXY} \cos \gamma \sin \gamma + e^{2i\delta} \beta_{L,ZYX} \sin^2 \gamma \end{pmatrix} \quad (1-9)$$

Pour le tenseur $\vec{\beta}_L$, le premier indice correspond à la direction du champ électrique émis alors que les deux derniers indices correspondent aux directions du champ électrique d'excitation. Comme les deux champs d'excitation sont indiscernables, la permutation des deux derniers indices est autorisée. Cette relation (1-8), développée dans l'approximation du champ lointain avec $r' \ll r$, donne :

$$\vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) = \begin{pmatrix} P'_X \\ P'_Y \\ P'_Z \end{pmatrix} E_\omega^2 K^2 \frac{e^{iK|\vec{r}|}}{r} e^{i(2\vec{k}-\vec{K}) \cdot \vec{r}'} \quad (1-10)$$

Dans l'approximation dipolaire électrique, les sources élémentaires positionnées en \vec{r}' sont contenues dans un volume de longueur caractéristique bien inférieure à la longueur d'onde. Ainsi, nous pouvons développer l'exponentielle dans (1-10) :

$$e^{i(2\vec{k}-\vec{K})\cdot\vec{r}'} \approx 1 + i(2\vec{k} - \vec{K})\cdot\vec{r}' + \quad (1-11)$$

et dans le cas limite ne conserver que le premier terme. Nous obtenons alors le champ rayonné dans l'approximation dipolaire électrique, en champ lointain, pour une source située en \vec{r}' . Ce champ est alors indépendant de la position de la source, considérée ainsi à l'origine :

$$\vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) = \begin{pmatrix} P'_X \\ P'_Y \\ P'_Z \end{pmatrix} E_\omega^2 K^2 \frac{e^{iK|\vec{r}|}}{r} \quad (1-12)$$

L'intensité totale radiée à la fréquence 2ω est alors immédiat. Toutefois, il est intéressant d'observer le problème du point de vue des impulsions courtes. En effet, pour les impulsions de l'ordre de 180 fs, comme celles utilisées dans ce travail, la largeur spectrale est de 6 nm environ. Il est donc possible de construire une réponse à la fréquence harmonique par une contribution de somme de fréquence de la forme $(\omega+\delta) + (\omega-\delta)$. Plusieurs problèmes apparaissent immédiatement, comme celui portant sur les règles de permutations d'indice qui ne sont plus les mêmes que celles utilisées plus haut. Un traitement plus complet nécessiterait le retour aux champs $\vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', t)$ dans le domaine temporel. L'intensité $\tilde{I}(\vec{r}, \vec{r}', \nu)$ à la fréquence ν prend alors l'expression [25, 26] :

$$\tilde{I}(\vec{r}, \vec{r}', \nu) = \frac{\epsilon_0 c}{n\nu} \int_{-\infty}^{+\infty} \vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', t) \vec{E}^*(\vec{r}, \vec{r}', t) e^{-i\nu t} dt \quad (1-13)$$

Dans le cadre des développements théoriques de ce travail, nous avons fait l'hypothèse d'une onde fondamentale monochromatique. Par suite, l'intensité à la fréquence harmonique s'écrit simplement :

$$I(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) = \frac{\epsilon_0 c}{n^{2\omega}} \vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) \vec{E}^*(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) \quad (1-14)$$

Notons enfin, que nous pouvons simplement assimiler l'intensité $I(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega)$ avec l'intensité $I(\vec{r}, 2\omega)$ à ce stade des développements puisque l'intensité mesurée ne dépend pas de la position de la source, celle-ci étant ici replacée à l'origine.

1.2.2 Diffusion Hyper Rayleigh

Aux problèmes de largeur spectrale associée à la durée courte des impulsions laser utilisées, nous devons ajouter l'évolution dans le temps de l'orientation du dipôle élémentaire dans la solution liquide par un processus de diffusion lié à l'agitation thermique. Il faut donc prendre en compte ces différentes orientations du dipôle au cours du temps. L'intensité harmonique dépend alors d'une intégrale sur la durée d'impulsion de l'orientation du dipôle, et peut prendre la forme simple suivante :

$$I(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) = \frac{\epsilon_0 c}{n^{2\omega}} \left\langle \vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) \vec{E}^*(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) \right\rangle_T \quad (1-15)$$

où $\langle \rangle_T$ représente la moyenne temporelle. En effet, pour N objets sans interaction, ce qui est le cas pour les solutions liquides très diluées que nous utiliserons, nous pouvons appliquer le principe d'ergodicité. Ce principe établit une équivalence entre les orientations d'un dipôle au cours du temps et les orientations de tous les dipôles à un instant t . Ce principe est applicable au milieu centrosymétrique dans lequel un très grand nombre de dipôles élémentaires est présent. L'intensité de diffusion Hyper Rayleigh résulte alors de la sommation incohérente des champs élémentaires émis par les sources élémentaires, ou d'après le principe d'ergodicité, de la moyenne sur le temps de la réponse d'un seul dipôle multipliée par le nombre de dipôles concernés. Nous exprimerons ainsi cette intensité par la relation suivante où le symbole $\langle \rangle$ représente la moyenne temporelle sur toutes les orientations explorées par l'un des dipôles élémentaires :

$$I_{HRS}(\vec{r}, 2\omega) = \frac{\epsilon_0 c}{n^{2\omega}} N \left\langle \vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) \vec{E}^*(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) \right\rangle \quad (1-16)$$

L'intensité HRS en fonction de l'intensité fondamentale se met alors sous la forme suivante :

$$I_{HRS}(\vec{r}, 2\omega) = \frac{(8\pi)^4 c n_{(2\omega)}^3 \epsilon_0}{r^2 \lambda^4} N \langle \beta_L^2 \rangle I_\omega^2 \quad (1-17)$$

Par commodité, nous introduirons par la suite la constante $G' = (8\pi)^4 c n_{(2\omega)}^3 \epsilon_0 / r^2 \lambda^4$, l'intensité I_ω du champ fondamental incident, le nombre N de dipôles élémentaires associés au nombre de molécules, et $\langle \beta_L^2 \rangle = \langle \beta_{L,XXX}^2 \rangle + \langle \beta_{L,ZXX}^2 \rangle$ le module de l'hyperpolarisabilité quadratique moyennée sur toutes les orientations prises par une molécule en tenant compte de la configuration expérimentale choisie. Dans notre expérience, la polarisation de l'onde fondamentale incidente orientée verticalement correspond à la direction Ox et la polarisation harmonique verticale ou horizontale respectivement aux directions Ox et Oz . Enfin, λ est la longueur d'onde fondamentale, ϵ_0 la permittivité du vide et $n^{(2\omega)}$ l'indice optique à la fréquence harmonique.

Nous pouvons donc maintenant donner une expression de la section efficace de diffusion harmonique totale en intégrant sur tout l'espace :

$$I_{HRS}^{2\omega} = \sigma_{HRS} (I^\omega)^2 = 4\pi G' N \beta^2 (I^\omega)^2 \quad (1-18)$$

Cette section efficace ne sera bien entendu pas la section efficace mesurée car seule une partie de l'intensité harmonique est détectée en raison de l'angle solide fini de la collection. De plus, expérimentalement la section efficace de diffusion hyper Rayleigh n'est pas toujours accessible en raison des pertes dans les différents instruments optiques et des rendements instrumentaux non idéaux. Il faut aussi tenir compte des processus de diffusion et d'absorption dans la solution. En effet les photons aux fréquences fondamentale et harmonique peuvent notamment être absorbés durant leur trajet dans la solution liquide, indépendamment du processus de génération de second harmonique. L'intensité HRS mesurée doit donc être corrigée par un facteur correspondant à la loi de Beer-Lambert :

$$I_{HRS} = I_{HRS}^{mesuré} e^{(2A_{2\omega} + A_\omega)} \quad (1-19)$$

où A_ω et $A_{2\omega}$ sont respectivement les absorbances de la solution à la fréquence fondamentale et à la fréquence harmonique. Celle-ci pourra en particulier être obtenue par une mesure indépendante d'absorption linéaire plutôt que par un ajustement de la courbe (1-19) aux résultats expérimentaux. Enfin, les problèmes de mesures absolues des hyperpolarisabilités quadratiques seront résolus par la mesure d'une cellule de référence, le plus souvent ne contenant que le solvant pur.

1.2.3 Diffusion Hyper Rayleigh résolue en polarisation

La mesure de l'intensité HRS résolue en polarisation permet d'accéder aux éléments du tenseur d'hyperpolarisabilité quadratique. Le paramètre obtenu est appelé coefficient de dépolarisation et permet d'accéder à la symétrie du composé moléculaire considéré. En effet, à partir des équations (1-8) et (1-15), nous pouvons obtenir les intensités HRS obtenues pour les deux types de polarisations, verticale et horizontale, du champ électromagnétique harmonique en fonction de l'angle γ de polarisation incident:

$$I_{HRS}^V = G' NI_\omega^2 \left(\langle \beta_{L,XXX} \beta_{L,XXX}^* \rangle \cos^4 \gamma + \langle 4\beta_{L,XXY} \beta_{L,XXY}^* + 2\beta_{L,XXX} \beta_{L,XYX}^* \cos 2\delta \rangle \cos^2 \gamma \sin^2 \gamma + \langle \beta_{L,XYX} \beta_{L,XYX}^* \rangle \sin^4 \gamma \right) \quad (1-20)$$

$$I_{HRS}^H = G' NI_\omega^2 \left(\langle \beta_{L,ZXX} \beta_{L,ZXX}^* \rangle \cos^4 \gamma + \langle 4\beta_{L,ZXY} \beta_{L,ZXY}^* + 2\beta_{L,ZXX} \beta_{L,ZYX}^* \cos 2\delta \rangle \cos^2 \gamma \sin^2 \gamma + \langle \beta_{L,ZYX} \beta_{L,ZYX}^* \rangle \sin^4 \gamma \right) \quad (1-21)$$

Dans la configuration expérimentale que nous avons utilisée, la polarisation incidente est toujours linéaire et le terme $\cos 2\delta$ est égal à 1. L'intensité HRS s'écrit donc de manière générale :

$$I_{HRS}^\Gamma = a^\Gamma \cos^4 \gamma + b^\Gamma \cos^2 \gamma \sin^2 \gamma + c^\Gamma \sin^4 \gamma \quad (1-22)$$

où Γ est l'angle de polarisation du champ harmonique. Nous avons en effet $\Gamma = 0^\circ$ pour la polarisation verticale selon la direction Ox et $\Gamma = 90^\circ$ pour la polarisation horizontale selon

l'axe Oz . A l'aide des relations (1-20) et (1-21), nous obtenons pour les différents coefficients :

$$a^V = GNI_\omega^2 \langle \beta_{L,XXX} \beta_{L,XXX}^* \rangle \quad (1-23)$$

$$b^V = GNI_\omega^2 \langle 4\beta_{L,XXY} \beta_{L,XXY}^* + 2\beta_{L,XXX} \beta_{L,XXY}^* \rangle \quad (1-24)$$

$$c^V = GNI_\omega^2 \langle \beta_{L,XXY} \beta_{L,XXY}^* \rangle \quad (1-25)$$

$$a^H = GNI_\omega^2 \langle \beta_{L,ZXX} \beta_{L,ZXX}^* \rangle \quad (1-26)$$

$$b^H = GNI_\omega^2 \langle 4\beta_{L,ZXY} \beta_{L,ZXY}^* + 2\beta_{L,ZXX} \beta_{L,ZXY}^* \rangle \quad (1-27)$$

$$c^H = GNI_\omega^2 \langle \beta_{L,ZXY} \beta_{L,ZXY}^* \rangle \quad (1-28)$$

L'intensité HRS polarisée selon la direction V ou H ne dépend donc que de trois paramètres. Ces trois paramètres conduisent à un rapport entre les différentes composantes du tenseur d'hyperpolarisabilité quadratique d'une source élémentaire. Dans le cadre de l'approximation dipolaire électrique et pour une émission incohérente, il existe de plus des relations particulières entre ces trois paramètres [27].

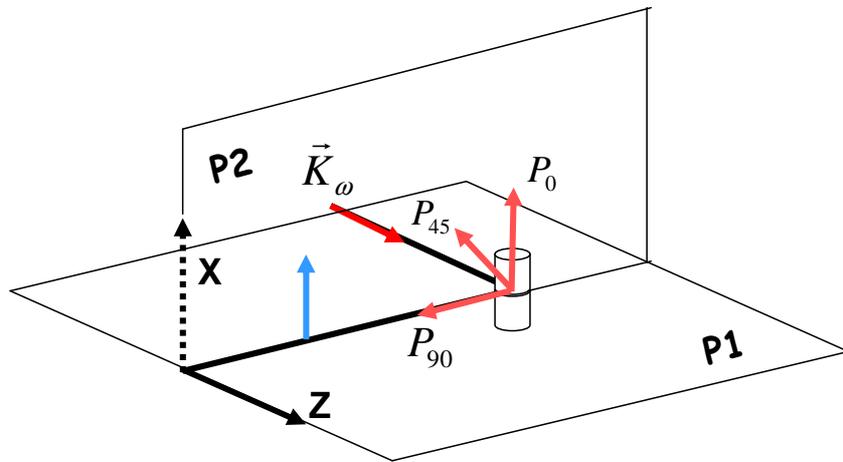


Figure 1-2 : configuration lorsque la polarisation de détection (bleue) est verticale

En prenant la relation (1-22) pour le cas $\Gamma = 0^\circ$ avec $\gamma = 45^\circ$, nous obtenons :

$$(I_{HRS}^{45^\circ})^V = \frac{1}{4}a^V + \frac{1}{4}b^V + \frac{1}{4}c^V \quad (1-29)$$

Par ailleurs, la décomposition du dipôle émetteur élémentaire orienté dans le repère du laboratoire à 45° en fonction des dipôles élémentaires à 0° et 90° , voir Figure 1-2, conduit à :

$$P_{45} = \frac{1}{\sqrt{2}}P_0 + \frac{1}{\sqrt{2}}P_{90} \quad (1-30)$$

La nature incohérente du processus de diffusion nous permet alors d'écrire :

$$P_{45}^2 = \frac{1}{2}P_0^2 + \frac{1}{2}P_{90}^2 \quad (1-31)$$

et donc par conséquent :

$$2(I_{HRS}^{45^\circ})^V = (I_{HRS}^0)^V + (I_{HRS}^{90^\circ})^V \quad (1-32)$$

Nous obtenons finalement :

$$a^V + c^V = \frac{1}{2}(a^V + b^V + c^V) \text{ soit } a^V + c^V = b^V \quad (1-33)$$

Ce raisonnement étant également vrai pour une détection horizontale, nous obtenons donc aussi :

$$a^H + c^H = b^H \quad (1-34)$$

Cependant, dans le cas horizontal, il existe également une seconde relation liant les coefficients entre eux. Sur la Figure ci-dessous, l'excitation du dipôle par un champ électrique fondamental contenu dans le plan P2 alors que le champ harmonique détecté est contenu dans

le plan P1 indique que quelque soit l'orientation du champ excitateur dans ce plan, les mêmes effets seront produits. Ainsi :

$$(I_{HRS}^{0^\circ})^H = (I_{HRS}^{45^\circ})^H = (I_{HRS}^{90^\circ})^H \quad (1-35)$$

En combinant cette équation avec l'équation précédente (1-34) :

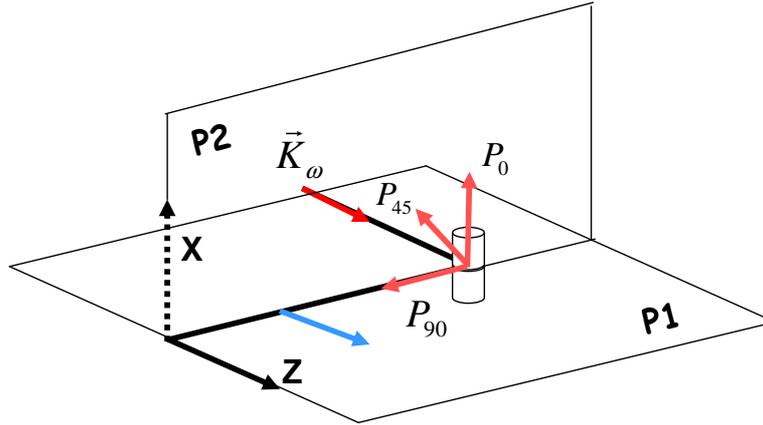


Figure 1-3 : configuration lorsque la polarisation de détection est horizontale

nous obtenons simplement :

$$2a^H = 2c^H = b^H \quad (1-36)$$

De la même manière, nous pouvons trouver une relation entre les coefficients de l'intensité polarisée en V et en H, voir Figure 1-4. En effet, nous remarquons l'équivalence de la configuration telle que l'excitation est dans le plan P1 et la détection dans le plan P2 avec celle pour laquelle l'excitation est dans le plan P2 et la détection dans le plan P1. Ainsi, nous écrivons :

$$c^V = a^H \quad (1-37)$$

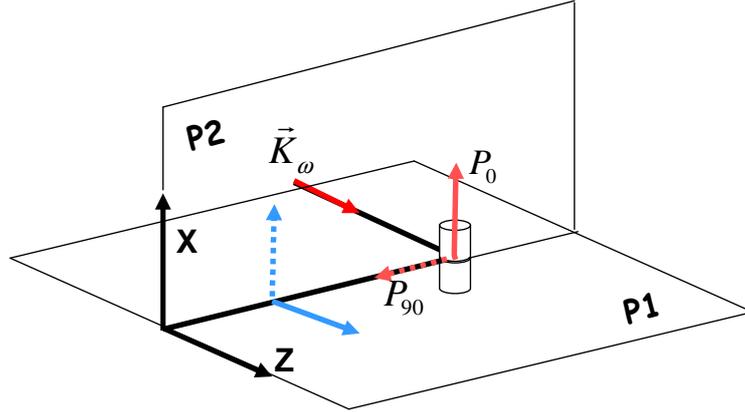


Figure 1-4 : équivalence entre une excitation verticale et une détection horizontale, et une excitation horizontale et une détection verticale

Dans le cadre de l'approximation dipolaire, l'intensité HRS se met finalement sous la forme :

$$I_{HRS}^V = a^V \cos^2 \gamma + c^V \sin^2 \gamma \quad (1-38)$$

$$I_{HRS}^H = c^V \quad (1-39)$$

L'intensité HRS ne dépend donc que de deux paramètres indépendants, a^V et c^V et l'intensité HRS polarisée selon la direction H ne dépend pas de l'angle γ . Puisque le plus souvent les mesures sont réalisées pour une intensité harmonique arbitraire, un seul paramètre, D , est utile, établi comme le rapport de dépolarisation :

$$D = \frac{c^V}{a^V} = \frac{\langle \beta_{L,XYX} \beta_{L,XYX}^* \rangle}{\langle \beta_{L,XXX} \beta_{L,XXX}^* \rangle} \quad (1-40)$$

Ce rapport de dépolarisation est un paramètre adimensionnel qui dépend des valeurs du tenseur d'hyperpolarisabilité quadratique. Ces valeurs des éléments du tenseur sont la somme sur toutes les orientations des éléments du tenseur décrit dans le référentiel microscopique. Ce paramètre D renseigne sur la symétrie à l'échelle microscopique des sources non linéaires, le plus souvent formées par des composés moléculaires appelés aussi harmonophores.

1.2.4 Passage du référentiel macroscopique au référentiel microscopique : la matrice d'Euler

Les valeurs des composantes du tenseur d'hyperpolarisabilité dans le référentiel du laboratoire dépendent des composantes du tenseur dans le référentiel du composé. Pour passer du référentiel du composé au référentiel du laboratoire, la prise en compte de l'orientation de la source dans l'espace est nécessaire. Pour définir une orientation, trois angles habituels d'Euler sont nécessaires. Dans la convention z - x - z , en utilisant les angles d'Euler, nous pouvons définir une matrice de transposition $T(\theta, \varphi, \psi)$ qui permet le passage du référentiel microscopique *mic* (rouge) au référentiel du laboratoire L (noir), voir Figure (1-5).

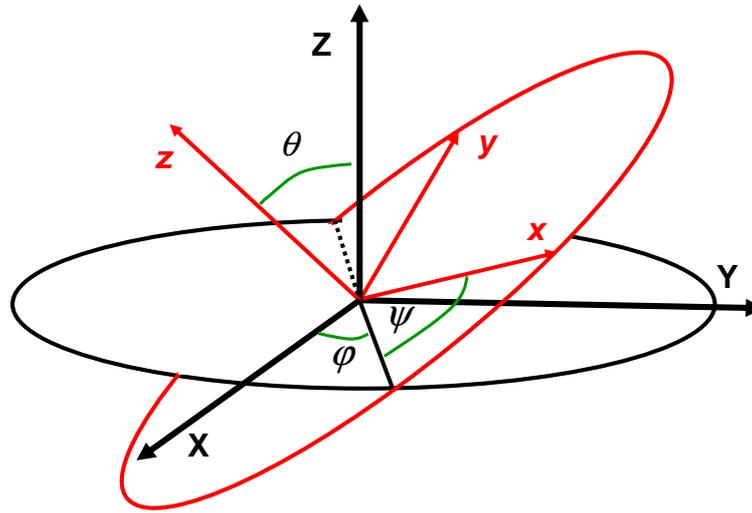


Figure 1-5 : angles d'Euler dans la convention z - x - z . (Noir) référentiel macroscopique. (Rouge) référentiel microscopique.

$$T(\theta, \varphi, \psi) = \begin{pmatrix} -\sin \varphi \sin \psi + \cos \theta \cos \varphi \cos \psi & -\sin \varphi \cos \psi - \cos \theta \cos \varphi \sin \psi & \sin \theta \cos \varphi \\ \cos \varphi \sin \psi + \cos \theta \sin \varphi \cos \psi & \cos \varphi \cos \psi - \cos \theta \sin \varphi \sin \psi & \sin \theta \sin \varphi \\ -\sin \theta \cos \varphi & \sin \theta \sin \varphi & \cos \theta \end{pmatrix} \quad (1-41)$$

Le passage aux éléments du tenseur dans le référentiel du laboratoire comme transformés des éléments du tenseur dans le référentiel microscopique par les trois rotations d'Euler définies par les trois angles est réalisé selon la règle suivante :

$$\beta_{L,ijk} = \sum_{i,j,k} T_i^i(\theta, \varphi, \psi) T_j^j(\theta, \varphi, \psi) T_k^k(\theta, \varphi, \psi) \beta_{mic,ijk} \quad (1-42)$$

Par conséquent, le rapport de dépolarisation D s'exprime en fonction des différentes composantes du tenseur d'hyperpolarisabilité dans le référentiel microscopique. D'après la relation (1-40), toutes les orientations pouvant être prises par la source élémentaire doivent être moyennées en intégrant des angles d'Euler sur leur domaine de variation.

1.2.5 Exemple : les molécules planes

L'application au cas d'une molécule de géométrie plane permet de bien mettre en évidence le principe de transformation. Une telle molécule possède un tenseur d'hyperpolarisabilité quadratique dominé par exemple par deux composantes microscopiques indépendantes si sa symétrie est C_{2v} . Ces deux éléments non nuls et indépendants sont alors β_{zzz} et β_{zxx} [28]. Le calcul du coefficient de dépolarisation pour ce composé est très simple si de plus nous admettons que seule la composante β_{zzz} est non nulle. Ainsi :

$$\begin{aligned} a^V &= GNI^2 \langle \beta_{L,xxx} \beta_{L,xxx}^* \rangle \\ &= \frac{GNI^2}{8\pi^2} \iiint_{\substack{\theta=0 \rightarrow \pi \\ \phi=0 \rightarrow 2\pi \\ \psi=0 \rightarrow 2\pi}} T_X^z T_X^z T_X^z \beta_{m,zzz} T_X^z T_X^z T_X^z \beta_{m,zzz}^* \sin \theta d\theta d\phi d\psi \\ &= \frac{GNI^2}{7} |\beta_{m,zzz}|^2 \end{aligned} \quad (1-43)$$

$$\begin{aligned} c^V &= GNI^2 \langle \beta_{L,xyy} \beta_{L,xyy}^* \rangle \\ &= \frac{GNI^2}{8\pi^2} \iiint_{\substack{\theta=0 \rightarrow \pi \\ \phi=0 \rightarrow 2\pi \\ \psi=0 \rightarrow 2\pi}} T_X^z T_Y^z T_Y^z \beta_{m,zzz} T_X^z T_Y^z T_Y^z \beta_{m,zzz}^* \sin \theta d\theta d\phi d\psi \\ &= \frac{GNI^2}{35} |\beta_{m,zzz}|^2 \end{aligned} \quad (1-44)$$

Et nous obtenons le coefficient de dépolarisation :

$$D = \frac{c^v}{a^v} = \frac{7}{35} = 0.2 \quad (1-45)$$

Cette valeur du rapport de dépolarisation est donc associée à la symétrie d'une molécule linéaire où seule une composante microscopique du tenseur est dominante [7]. Expérimentalement, ce cas est rencontré pour la molécule de iodure de 4-(4-dihexadécylaminostyryl)-N-méthylpyridinium ou Dia, voir Figure 1-6.

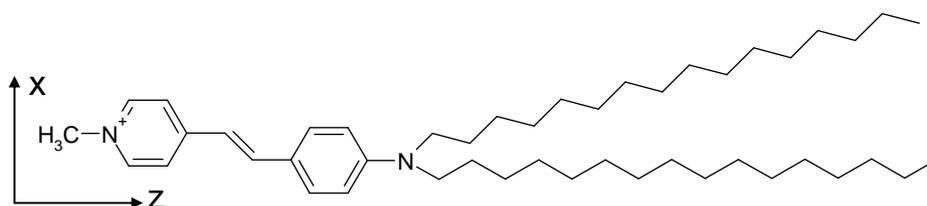


Figure 1-6 : Formule développée du iodure de 4-(4-dihexadécylaminostyryl)-N-méthylpyridinium (Dia)

Le Dia possède un groupe important d'électrons π délocalisés sur les deux cycles, liés par la double liaison C=C selon une direction proche de la direction Oz sur laquelle se trouve le groupe accepteur pyridinium chargé positivement et le groupe donneur amine. La composante du tenseur d'hyperpolarisabilité quadratique qui prédomine est donc la composante β_{zzz} selon ce même axe, les composantes impliquant une direction perpendiculaire étant bien moins importants. Expérimentalement, le rapport de dépolarisation mesuré est égal à $D = 0.22 \pm 0.03$ en accord avec ces principes généraux sur la structure électronique, voir Figure (1-7).

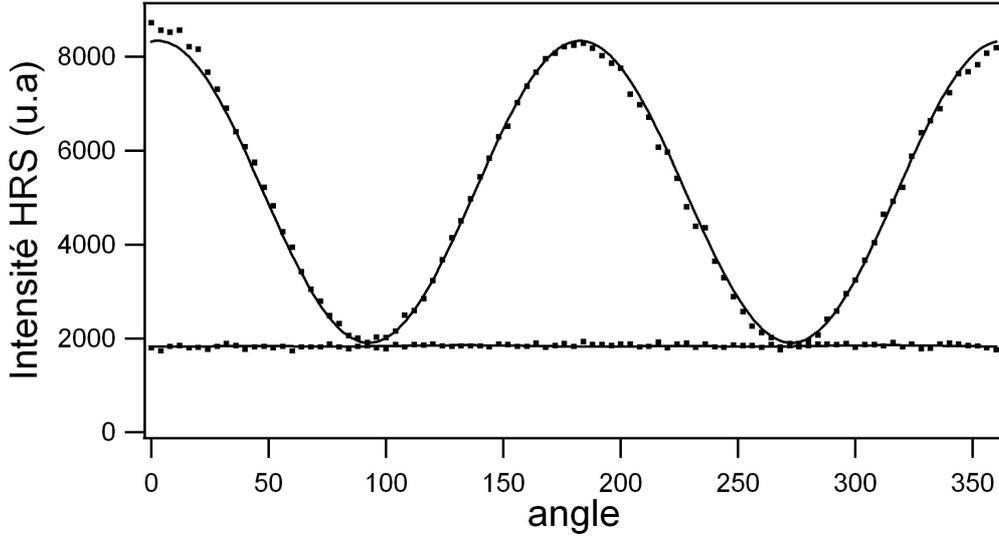


Figure 1-7 : Intensité résolue en polarisation du Dia. Les coefficients normalisés par rapport à c^H sont : $a^V = 4.53$, $b^V = 5.57$, $c^V = 1.03$ et $a^H = 1.01$, $b^H = 1.98$, $c^H = 1$.

Le même travail peut être réalisé pour obtenir le rapport de dépolarisation d'une molécule octupolaire telle que le Cristal Violet [16, 29], voir Figure 1-8. Ce composé moléculaire possède la symétrie D_{3h} avec deux éléments non nuls β_{zzz} et β_{zxx} et égaux [28]. Ainsi, pour les coefficients de l'intensité harmonique :

$$\begin{aligned}
 a^V &= GNI^2 \langle \beta_{L,XXX} \beta_{L,XXX}^* \rangle \\
 &= \frac{GNI^2}{8\pi^2} \iiint_{\substack{\theta=0 \rightarrow \pi \\ \phi=0 \rightarrow 2\pi \\ \psi=0 \rightarrow 2\pi}} (T_X^z T_X^z T_X^z \beta_{m,zzz} + T_X^z T_X^x T_X^x \beta_{m,zxx}) (T_X^z T_X^z T_X^z \beta_{m,zzz}^* + T_X^z T_X^x T_X^x \beta_{m,zxx}^*) \sin \theta d\theta d\phi d\psi \\
 &= \frac{4.GNI^2}{35} |\beta_{m,zzz}|^2
 \end{aligned} \tag{1-46}$$

$$\begin{aligned}
 c^V &= GNI^2 \langle \beta_{L,XYX} \beta_{L,XYX}^* \rangle \\
 &= \frac{GNI^2}{8\pi^2} \iiint_{\substack{\theta=0 \rightarrow \pi \\ \phi=0 \rightarrow 2\pi \\ \psi=0 \rightarrow 2\pi}} (T_X^z T_Y^z T_Y^z \beta_{m,zzz} + T_X^z T_Y^x T_Y^x \beta_{m,zxx}) (T_X^z T_Y^z T_Y^z \beta_{m,zzz}^* + T_X^z T_Y^x T_Y^x \beta_{m,zxx}^*) \sin \theta d\theta d\phi d\psi \\
 &= \frac{8.GNI^2}{105} |\beta_{m,zzz}|^2
 \end{aligned}$$

(1-47)

et le rapport de dépolarisation est alors :

$$D = \frac{c^v}{a^v} = \frac{2}{3} \quad (1-48)$$

Ce rapport de dépolarisation, pour les molécules appartenant au groupe de symétrie C_{2v} , varie entre 0.2 et 0.66 si l'on considère la seconde composante β_{zxx} en plus de la composante β_{zzz} . Ces deux valeurs extrêmes correspondent ainsi au cas de la molécule linéaire dont seule la composante β_{zzz} domine et à une molécule octupolaire où les deux composantes sont égales, respectivement.

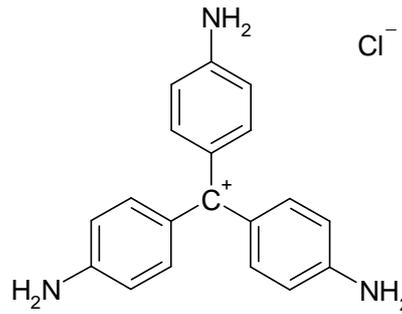


Figure 1-8 : molécule de Cristal Violet

Pour une molécule sans symétrie particulière, la généralisation conduit à exprimer le rapport de dépolarisation en fonction de tous les éléments du tenseur microscopique [27]. Ainsi :

$$D = \frac{\frac{1}{35} \sum_i \beta_{iii}^2 - \frac{2}{105} \sum_{i \neq j} \beta_{iii} \beta_{ijj} + \frac{11}{105} \sum_{i \neq j} \beta_{ijj}^2 - \frac{2}{105} \sum_{i \neq j \neq k} \beta_{ijj} \beta_{ikk} + \frac{8}{35} \sum_{i \neq j \neq k} \beta_{ijk}^2}{\frac{1}{7} \sum_i \beta_{iii}^2 + \frac{6}{35} \sum_{i \neq j} \beta_{iii} \beta_{ijj} + \frac{9}{35} \sum_{i \neq j} \beta_{ijj}^2 + \frac{6}{35} \sum_{i \neq j \neq k} \beta_{ijj} \beta_{ikk} + \frac{12}{35} \sum_{i \neq j \neq k} \beta_{ijk}^2} \quad (1-49)$$

Nous observons que la mesure du rapport de dépolarisation est un outil simple, nécessitant la mesure indépendante de deux intensités harmoniques correspondant aux

paramètres a^V et c^V . La mesure de ce rapport de dépolarisation permet finalement d'obtenir immédiatement un rapport entre deux éléments indépendants du tenseur microscopique, pour des symétries simples. Pour les géométries plus élaborées des composés moléculaires étudiés, il est bien souvent difficile voire impossible de déterminer tous les éléments dominant du tenseur d'hyperpolarisabilité.

1.3 Montage expérimental

1.3.1 Laser et optique

Pour réaliser les expériences de diffusion Hyper Rayleigh, nous avons utilisé comme source laser un oscillateur femtoseconde Titane-Saphir (Coherent Mira 900) cadencé à 76 MHz pompé par un laser continu d'une puissance de 5W à 532 nm (Coherent Verdi 5W). En sortie d'oscillateur, la puissance moyenne est de 800 mW. La longueur d'onde optimale est centrée autour de 790 nm avec une largeur à mi-hauteur de 6 nm environ pour des impulsions dont la durée déterminée par la largeur spectrale est de l'ordre de 180 femtosecondes.

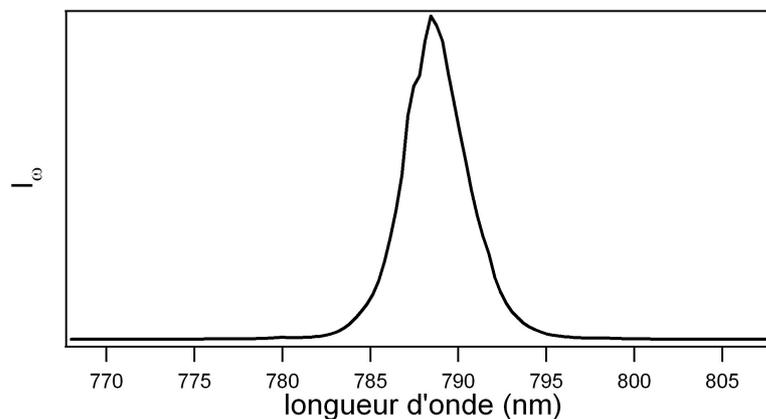


Figure 1-9 : spectre du faisceau laser à la sortie de l'oscillateur Ti :Sa

L'utilisation de ce type de source est motivée par plusieurs raisons. Tout d'abord, comme établi précédemment, la diffusion hyper Rayleigh dépend quadratiquement de l'intensité d'excitation. Il est donc nécessaire d'avoir une intensité crête la plus importante possible. Notre source laser délivre ainsi une puissance crête de l'ordre de 60 kW. Ensuite, il

faut également que l'énergie absorbée par le système soit la plus faible possible afin de ne pas détruire les composés présents dans les cellules ou provoquer des échauffements dommageables au bon déroulement de l'expérience. La configuration utilisée permet d'avoir seulement 10 nJ par impulsion femtoseconde environ. La polarisation du faisceau laser incident est linéaire et contrôlée par une lame demi-onde montée sur une platine de rotation contrôlée par ordinateur. Ensuite, le plus proche possible de la cellule, un filtre rouge est placé pour bloquer tout résidu issu du laser de pompe mais aussi et surtout la fréquence harmonique produit par la lame demi-onde qui est constituée pour partie d'une lame de quartz cristalline et, dans une moindre mesure, par les miroirs et le reste des optiques placés sur le chemin optique. Un hacheur optique (Stanford Research Systems, SR540) permet de réaliser un comptage de photons à portes dans le but d'éliminer en temps réel les bruits parasites. Ce hacheur mécanique est constitué d'une roue dentée bloquant et laissant passer alternativement le faisceau laser à une fréquence d'environ 130 Hz.

Le faisceau laser à la fréquence fondamentale est ensuite focalisé par un objectif de microscope (Melles Griot, NA 0.32, $\times 16$) dans une cellule de quartz suprasil transparent à 400 nm de dimension 1 cm \times 1 cm ou 5 mm \times 5 mm selon les expériences. Pour limiter la réabsorption, le faisceau laser est focalisé au plus proche de la face de sortie de la cellule sans que les parois de celle-ci gênent le signal diffusé. Lorsque les produits sont rares, la cellule de petites dimensions permet d'utiliser moins de volume de solution, seulement 500 μ L environ, contre 3 mL pour la grande cellule. Au niveau de la cellule, après le passage par le hacheur optique et les différents éléments optiques, la puissance du laser est de seulement 280 mW environ. La puissance moyenne dans la cellule est ainsi 65 % plus faible que la puissance moyenne en sortie du laser. Notons cependant que le hacheur optique, par nature, possède une transmission de 50 % à lui seul.

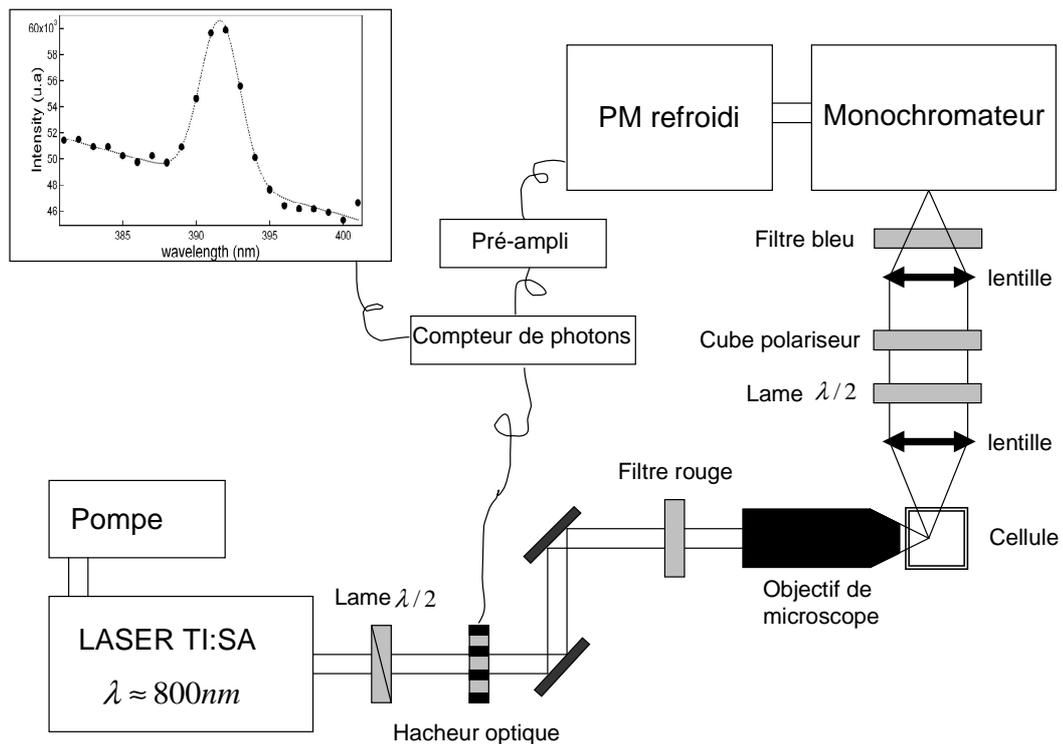


Figure 1-10 : schéma du montage expérimental

L'intensité émise à 90° est récoltée par une lentille convergente (Melles Griot, NA 0.5, focale 25 mm, diamètre 25 mm) située à une distance du point focal dans la cellule égale à la distance focale afin d'obtenir un faisceau parallèle. Pour sélectionner la polarisation verticale ou horizontale de l'intensité harmonique, une lame demi-onde dans une monture tournante et un cube polariseur sont disposés sur le chemin optique. Ces deux composants sont placés dans cet ordre afin que l'intensité mesurée par le détecteur ait toujours la même polarisation. En effet, le monochromateur possède une réponse dépendant de la polarisation sur le spectre visible et en particulier autour de 400 nm où nous réaliserons les mesures. Juste avant le monochromateur, un filtre bleu supprime la fréquence fondamentale diffusée et une deuxième lentille convergente de focale 25 mm focalise le faisceau sur la fente d'entrée du monochromateur.

1.3.2 Système de détection

Le monochromateur (Acton, SP 150) utilise un réseau blasé à 500 nm gravé de 1200 traits/mm possédant une résolution atteignant 0.1 nm et efficace sur une plage spectrale s'étendant de 350 nm à 850 nm environ. Il permet un filtrage des photons à la fréquence harmonique avant la détection par le photomultiplicateur (Hamamatsu, R643-02). Celui-ci convertit les photons en impulsions de courant qui sont ensuite pré-amplifiées avant d'être comptées par un compteur de photon (Stanford Research Systems, SR400).

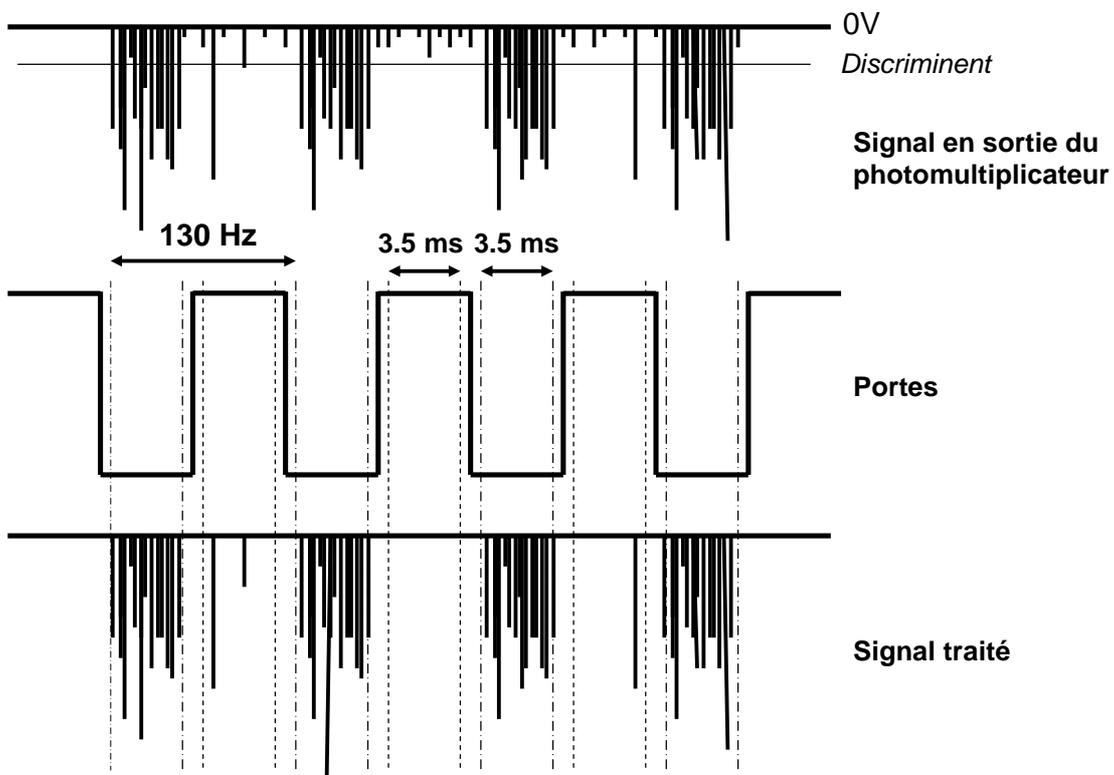


Figure 1-11 : principe du comptage de photons avec système de portes

Le compteur de photons reçoit une série de pulses correspondant aux photons de signal ou de bruit. Le compteur de photons étant synchronisé avec le hacheur optique, l'ouverture de portes sur deux voies indépendantes réalise un comptage à deux voies, l'une pour le signal total (quand la porte du hacheur est ouverte, le laser produit des photons de signal à la fréquence harmonique en plus du bruit) et l'autre pour le bruit uniquement (quand la porte du hacheur est fermée, seuls les photons de bruit sont comptés), voir Figure 1-11. Il suffit ensuite de soustraire le comptage de la première et de la seconde voie pour obtenir le signal vrai. Il faut cependant être attentif car les deux mesures ne sont pas simultanées et le niveau de bruit

peut être différent entre deux ouvertures de porte du hacheur. C'est pour cela qu'il est préférable de prendre la moyenne des deux voies sur un grand ensemble de tirs laser.

Le photomultiplicateur convertit les photons en impulsions de courant électrique mais il existe toujours des impulsions parasites. Afin d'être sûrs que le pulse de courant détecté provient bien d'un photon, un seuil est fixé au dessus duquel toute impulsion est attribuée au comptage d'un photon. En dessous, le comptage est attribué à un évènement de bruit. Le but de cette opération est de supprimer toutes les contributions photoniques, thermiques ou électriques qui peuvent contribuer au bruit. L'étape de fixation de ce seuil doit donc être réalisée avec précautions pour ne pas placer le seuil trop haut et considérer comme étant du bruit des photons associés au signal. Le photomultiplicateur peut être utilisé avec plusieurs tensions d'amplification différentes, plus la tension est élevée et plus le signal est amplifié. Il faut cependant faire attention à bien rester dans les limites de linéarité du photomultiplicateur afin d'éviter toute distorsion du signal. C'est pourquoi le photomultiplicateur n'a pas été utilisé au delà de 2100 V. Pour différentes valeurs de tension du photomultiplicateur, l'intensité HRS de l'eau pure en termes de coups de photons a été enregistrée en fonction de plusieurs seuils de détection, voir Figure 1-12.

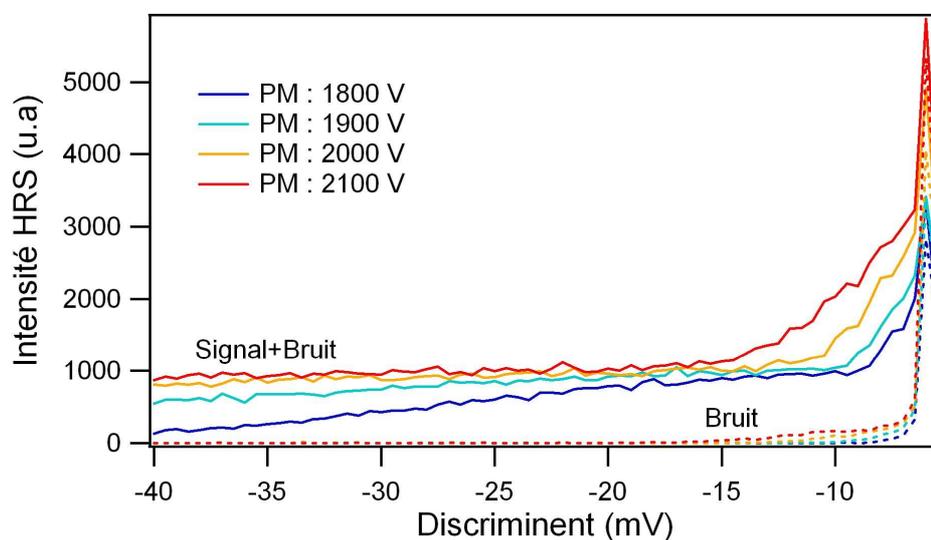


Figure 1-12 : intensité HRS mesurée pour différentes valeurs du photomultiplicateur en fonction du discriminant.

Lorsque le seuil, encore appelé discriminant, est proche de zéro, le signal est très important car tous les coups comptés sont associés au signal, y compris le bruit. En revanche,

lorsque le discriminant augmente, le signal tend à disparaître car de moins en moins de coups sont associés aux photons de signal. On notera enfin ici que le signal de sortie du photomultiplicateur étant négatif, le discriminant est aussi négatif. Pour déterminer avec précision la valeur du seuil, les courbes de la Figure 1-12 sont dérivées afin d'obtenir la répartition des impulsions en fonction de leur intensité en mV. Ainsi, pour la tension d'alimentation du photomultiplicateur fixée à 1800 V, nous obtenons deux distributions, l'une due au bruit et l'autre due au signal. Pour séparer sans ambiguïté ces deux distributions, le choix a été fait de placer le seuil à -11mV. Ainsi, toutes les contributions de bruit sont rejetées, voir Figure 1-13.

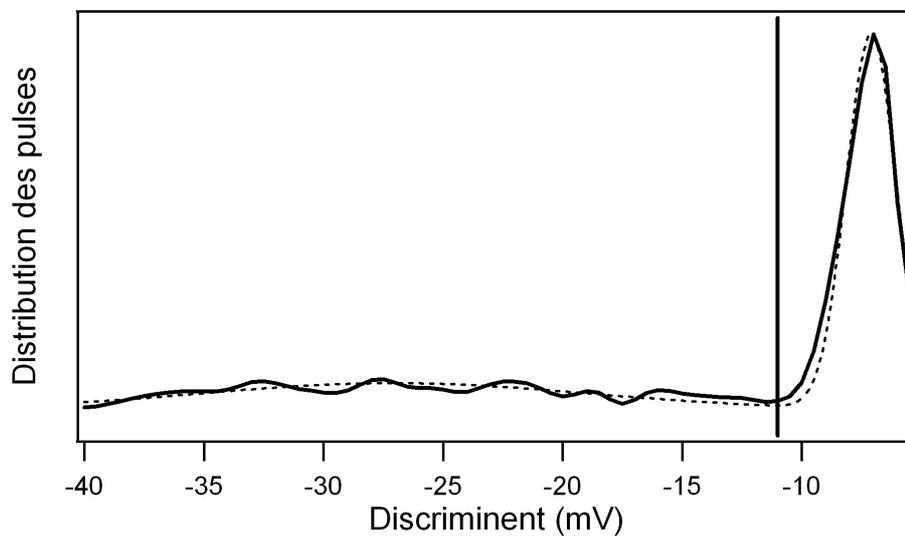


Figure 1-13 : répartition des impulsions de courant en fonction de leurs intensités pour une valeur de l'alimentation du photomultiplicateur de 1800 V. Le seuil est placé à -11mV, limite entre la contribution de signal et de bruit (droite verticale noire). En pointillé, ajustement par deux gaussiennes.

En déterminant le seuil de détection et la largeur temporelle des portes, le montage expérimental a été optimisé pour obtenir le rapport signal sur bruit maximum. Cette étude préalable a été très utile pour la suite, notamment quand les niveaux de signaux ont été très faibles. La configuration choisie permet également d'avoir un niveau de bruit très faible et d'atteindre un signal parasite de seulement quelques photons par seconde.

1.3.3 Mesure de spectre d'absorption UV-Visible

Les solutions nécessitent une caractérisation par spectrométrie d'absorption afin de pouvoir déterminer le caractère résonant ou non de l'expérience. Pour cela, nous avons utilisé un système commercial (Ocean Optics, SD 2000). La source lumineuse est une lampe blanche au Deutérium-Tungstène et Halogène (Ocean optics, DT-MINI) couvrant un spectre large bande de 250 à 800 nm. Le faisceau lumineux est transmis jusqu'à la cellule par une fibre optique large bande (Ocean optics, CUV-UV) et traverse la cellule qui est identique aux cellules des mesures HRS. La lumière transmise est récoltée par une seconde fibre identique à la première et la lumière est analysée par un spectromètre à barrettes CCD (Ocean optics USB 2000). Pour obtenir le spectre d'absorbance du composé moléculaire, l'intensité I_0 transmise par le solvant pur ainsi que l'intensité I_b mesurée lorsque la lampe est éteinte sont aussi enregistrées. Les spectres d'absorbance sont ensuite obtenus en utilisant la relation bien connue suivante :

$$A_\omega = \log\left(\frac{I - I_b}{I_0 - I_b}\right) \quad (1-50)$$

le coefficient d'absorption de la solution étant alors extrait par la loi de Beer-Lambert :

$$A_\omega = \sigma_\omega Cl \quad (1-51)$$

où σ_ω est la section efficace d'extinction de la solution à la fréquence ω , C est la concentration en mol/L de la solution et l est la longueur du chemin optique dans la solution traversée. De cette manière, l'intensité HRS est corrigée de l'absorption aux longueurs d'ondes fondamentale et harmonique, cf. 1.2.2.

1.4 Principe de la mesure

1.4.1 Spectre HRS

Pour obtenir une information sur l'intensité HRS d'un échantillon, des mesures préalables sont nécessaires afin de s'assurer de l'origine de la réponse mesurée. Pour cela, nous avons enregistré à chaque fois des spectres autour de la fréquence double de la fréquence fondamentale, la fréquence fondamentale étant fixe. Sur la voie A du compteur, nous enregistrons donc le signal plus le fond alors que sur la voie B seul le fond est enregistré.

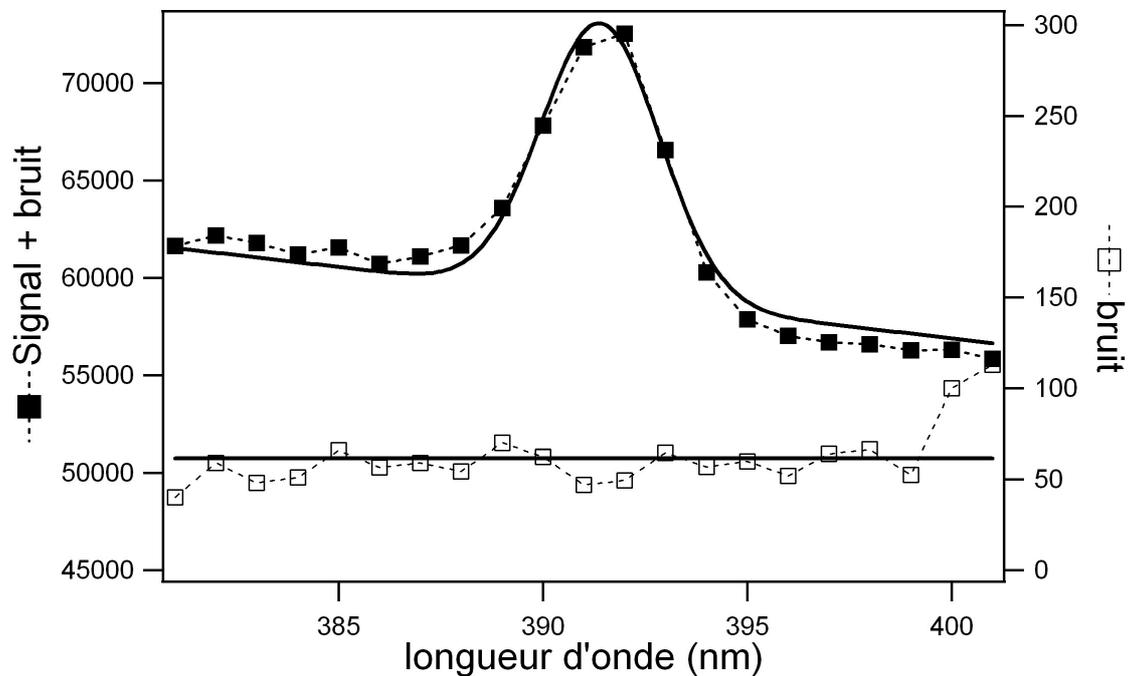


Figure 1-14 : spectre HRS d'un peptide contenant du tryptophane. Temps d'acquisition par point : 60s.

Cette manière de procéder est nécessaire pour s'assurer que le processus observé est bien un processus de conversion de 2 photons fondamentaux en 1 photon harmonique. Par ailleurs, sur la Figure 1-14, nous observons clairement sous le spectre de la raie HRS un fond spectral non nul large bande correspondant à une intensité de fluorescence, ou luminescence de manière plus générale. On attribue cette contribution au signal mesuré à des processus de fluorescence à 3 photons au moins en excitation puisque le spectre s'étend à des énergies supérieures à l'énergie de deux photons. Aux énergies inférieures à l'énergie de deux photons,

les contributions de fluorescence à 2 photons s'ajoutent à celles à trois photons et plus. Pour extraire l'intensité HRS, le spectre est modélisé par une droite en fonction de la longueur d'onde représentant la fluorescence, ou la luminescence, et une fonction de profil gaussien correspondant à la contribution HRS, voir relation (1-52). Le spectre est ainsi ajusté et les différents paramètres extraits, voir Figure 1-14.

$$I(\lambda) = a + b\lambda + I^{HRS} e^{-\frac{(\lambda-\lambda_0)^2}{\sigma}} \quad (1-52)$$

Cette opération de superposition est valide car nous admettons que les processus de doublage de fréquence et de fluorescence sont indépendants. Ainsi, la hauteur de la raie du profil gaussien correspond uniquement au nombre de photons provenant de ce processus non linéaire et détermine l'intensité relative HRS. La mesure absolue de l'hyperpolarisabilité quadratique nécessite une référence. Deux méthodes sont couramment utilisées : la référence interne et la référence externe.

1.4.2 Référence externe

La méthode de la référence externe [6] consiste à normaliser la mesure relative par la mesure d'une référence dont l'hyperpolarisabilité quadratique et la concentration sont bien connues. Dans ce cas, nous pouvons écrire :

$$\frac{I_{HRS}^{composé}}{I_{HRS}^{référence}} = \frac{\langle N_{Sc} \beta_{Sc}^2 + N_c \beta_c^2 \rangle e^{-(A_{2\omega}^c + 2A_\omega^c)}}{\langle N_{Sr} \beta_{Sr}^2 + N_r \beta_r^2 \rangle e^{-(A_{2\omega}^r + 2A_\omega^r)}} = a + bN_c \langle \beta_c^2 \rangle \quad (1-53)$$

avec

$$a = \frac{\langle N_{Sc} \beta_{Sc}^2 \rangle}{\langle N_{Sr} \beta_{Sr}^2 + N_r \beta_r^2 \rangle} e^{-(A_{2\omega}^c + 2A_\omega^c) + (A_{2\omega}^r + 2A_\omega^r)} \quad (1-54)$$

et

$$b = \frac{e^{-(A_{2\omega}^c + 2A_\omega^c) + (A_{2\omega}^r + 2A_\omega^r)}}{\langle N_{Sr} \beta_{Sr}^2 + N_r \beta_r^2 \rangle} \quad (1-55)$$

en n'oubliant pas que tout signal HRS mesuré comprend une contribution des composés moléculaires présents en solution et une contribution due au solvant. Ainsi, dans les relations (1-53) à (1-55), S désigne le solvant, c le composé et r la référence. Comme les absorbances sont connues, l'obtention de la seule inconnue $b \langle \beta_c^2 \rangle$ nécessite la détermination de la pente et de l'ordonné à l'origine de la droite obtenue par dilutions successives du composé d'intérêt. Plusieurs composés moléculaires de référence ont été utilisés par le passé mais le plus fréquemment utilisée reste la para-nitroaniline (pNA) solubilisée dans le méthanol avec une concentration de 0.1 M [30]. Toutefois, cette référence n'est pas adaptée pour une longueur d'onde fondamentale de 800 nm environ en raison de la proximité de la résonance à la longueur d'onde harmonique. Cette référence est en fait le plus souvent utilisée à 1064 nm.

1.4.3 Référence interne

La méthode de la référence interne [6] consiste quant à elle à utiliser le solvant comme référence connue.

$$\frac{I_{HRS}^{composé}}{I_{HRS}^{solvant}} = \frac{\langle N_S \beta_S^2 + N_c \beta_c^2 \rangle}{\langle N_S \beta_S^2 \rangle} e^{-(A_{2\omega}^c + 2A_\omega^c)} = a' + b' N_c \langle \beta_c^2 \rangle \quad (1-56)$$

avec

$$a' = e^{-(A_{2\omega}^c + 2A_\omega^c)} \quad (1-57)$$

et

$$b' = \frac{e^{-(A_{2\omega}^c + 2A_\omega^c)}}{\langle N_S \beta_S^2 \rangle} \quad (1-58)$$

La difficulté de cette méthode réside dans l'obtention d'une intensité suffisamment forte pour le solvant pur qui sert de mesure de référence. L'erreur expérimentale sur cette mesure doit donc à tout prix être minimisée. C'est en partie pour cela que la méthode de la référence externe est souvent préférée afin de mesurer des intensités fortes dans tous les cas. En revanche, la méthode de la référence interne possède l'énorme avantage de s'affranchir des fortes erreurs expérimentales qui surviennent lorsque les solvants changent entre le composé d'intérêt et la référence. En particulier, des problèmes de focalisation différente dans la cellule à cause de l'indice optique des liquides, les problèmes d'alignement également dus aux différences d'indice optique, les problèmes dus aux multiples manipulations de cellule,... peuvent constituer un handicap. Pour cela, dans les expériences que nous avons effectuées, la méthode de la référence interne sur l'eau ou des solvants connus et référencés dans la littérature a été utilisée. Notons ici que la grande sensibilité du montage expérimental nous permet de mesurer une intensité relativement importante, y compris pour les solvants purs.

1.4.4 Sensibilité des mesures

La précision de la mesure de l'intensité HRS diffusée par le solvant pur doit être optimale. De plus, la précision des mesures, de manière générale, conditionne aussi la sensibilité des expériences effectuées. En particulier, plus la mesure sur l'intensité de la référence sera précise et plus les faibles augmentations du signal provenant des composés présents pourront être mesurées. En régime de comptage de photons, l'intensité mesurée est proportionnelle au nombre de photons détectés, ce nombre de photons détectés dépendant lui-même directement du temps d'acquisition, de la concentration des composés moléculaires et de leur efficacité en optique non linéaire. La précision de la mesure dépend elle de la racine carrée du nombre de photons mesuré. Par exemple, pour une solution d'eau pure, environ 100 photons sont détectés par seconde. Si l'acquisition dure 1 seconde, alors l'erreur est de ± 10 photons, ce qui correspond à une erreur relative de 10 %. Ici, l'erreur utilisée correspond à la déviation standard de la distribution de probabilité centrée sur la valeur moyenne de la mesure. Le rapport signal sur bruit croît donc comme la racine du nombre de photons mesurés. L'erreur relative diminue parallèlement comme l'inverse de la racine du nombre de photons mesurés. Pour pouvoir déceler la présence d'un composé moléculaire en solution de manière certaine, ici au sens d'une déviation standard, il faut donc que le nombre de photons harmoniques correspondant à la contribution du composé moléculaire soit supérieur à une

déviations standard obtenues sur la mesure du solvant pur. Dans l'exemple précédent, la contribution du composé moléculaire doit atteindre 10 photons par seconde au moins. Il est finalement possible de fixer une limite de sensibilité à nos mesures qui dépend de la déviation standard de la mesure sur le solvant. Nous pouvons formuler ce seuil de sensibilité par :

$$(N_c \beta_c^2)_{seuil} = \frac{\Delta I_s}{I_s} (N_s \beta_s^2) \quad (1-59)$$

où l'indice c est utilisé pour le composé moléculaire et l'indice s pour le solvant. Il est ainsi possible, à partir du temps d'acquisition, de déterminer la sensibilité de l'expérience pour un solvant particulier.

Temps d'acquisition	Photons détectés pour l'eau, N=55 M $\beta = 0.56 \cdot 10^{-30} \text{ esu}$	Erreur relative	Sensibilité seuil (esu ² M/L)	Hyperpolarisabilité accessible pour une concentration de 10mM
1 s	100	10%	1.7E ⁻⁶⁰	13 E ⁻³⁰ esu
10 s	1000	3%	5.4E ⁻⁶¹	7 E ⁻³⁰ esu
30 s	3000	1.8%	3.1E ⁻⁶¹	5.5 E ⁻³⁰ esu
30000 s	3000000	0.5%	8.6E ⁻⁶²	1 E ⁻³⁰ esu

Tableau 1 : sensibilités en fonction des temps d'acquisition sur le solvant pur.

Les ordres de grandeur des hyperpolarisabilités quadratiques données dans le Tableau 1 sont des valeurs minimales. En effet, il existe d'autres sources d'erreur telles que les fluctuations du laser ou la détermination des concentrations des composés moléculaires, sources qui contribuent toutes à l'augmentation de l'erreur relative.

1.5 Conclusions

La diffusion Hyper Rayleigh est une technique très riche pour obtenir de l'information sur les composés moléculaires. La théorie développée dans ce chapitre constitue la base des développements présentés dans les chapitres suivants. En effet, pour l'étude de systèmes plus complexes tels que des ensembles de molécules ou des nanoparticules métalliques, le formalisme doit être développé pour prendre en compte les effets de tailles non négligeables

devant la longueur d'onde des nanosystèmes. Le principe du montage expérimental décrit dans ce chapitre est le même que lors des premières expériences qui ont été rapportées dans la littérature. Cependant, les progrès de l'instrumentation, tels que les lasers à impulsions courtes stables ou les détecteurs très sensibles, ont permis d'obtenir des mesures plus précises d'hyperpolarisabilités quadratiques faibles. Dans ce travail, nous avons entrepris d'améliorer le montage expérimental afin d'atteindre la meilleure sensibilité accessible. L'optimisation de tous les éléments constituant le montage expérimental a permis de gagner un facteur significatif sur le nombre de photons harmoniques détectés, par exemple dans le cas des solvants purs. Combinés à des méthodes de mesures nouvelles impliquant une étude statistique des taux de comptage, nous verrons que ces progrès dans l'appareillage nous ont permis d'atteindre la sensibilité ultime sur certaines catégories de nanosystèmes.

1.6 Bibliographie

- [1] R. W. Terhune, P. D. Maker and C. M. Savage, *Phys. Rev. Lett.*, **14**, (1965) 681
- [2] J. A. Giordmaine, *Phys. Rev.*, **138**, (1965) A1599
- [3] S. J. Cyvin, J. E. Rauch and J. C. Decius, *J. Chem. Phys.*, **43**, (2004) 4083-4083
- [4] F. Kajzar, I. Ledoux and J. Zyss, *Phys. Rev. A*, **36**, (1987) 2210
- [5] J. L. Oudar and D. S. Chemla, *J. Chem. Phys.*, **66**, (1977) 2664
- [6] K. Clays and A. Persoons, *Phys. Rev. Lett.*, **66**, (1991) 2980
- [7] G. Revillod, J. Duboisset, I. Russier-Antoine, E. Benichou, G. Bachelier, C. Jonin and P.-F. Brevet, *J. Phys. Chem. C*, **112** (7), (2008) 2716–2723
- [8] D. P. Shelton and P. Kaatz, *Phys. Rev. Lett.*, **84**, (2000) 1224-1227
- [9] V. Ostroverkhov, R. G. Petschek, K. D. Singer, L. Sukhomlinova, R. J. Twieg, S.-X. Wang and L. C. Chien, *J. Opt. Soc. Am. B*, **17**, (2000) 1531
- [10] E. H. K. Clays, M. Triest, T. Verbiest, A. Persoons, C. Dehu, and J.-L. Brédas, *Science*, **262**, (1993) 5138
- [11] J. S. Salafsky, *J. Chem. Phys.*, **125**, (2006) 074701-7
- [12] A. Srivastava and K. B. Eisenthal, *Chem. Phys. Lett.*, **292**, (1998) 345-351
- [13] E. C. Y. Yan, Y. Liu and K. B. Eisenthal, *J. Phys. Chem. B*, **102**, (1998) 6331-6336
- [14] E. C. Y. Yan and K. B. Eisenthal, *Biophys. J.*, **79**, (2000) 898-903
- [15] S. Ghosh, A. Krishnan, P. K. Das and S. Ramakrishnan, *J. Am. Chem. Soc.*, **125** (6), (2003) 1602–1606
- [16] G. Revillod, I. Russier-Antoine, E. Benichou, C. Jonin and P.-F. Brevet, *J. Phys. Chem. B*, **109**, (2005) 5383–5387
- [17] E. C. Hao, G. C. Schatz, R. C. Johnson and J. T. Hupp, *J. Chem. Phys.*, **117**, (2002) 5963-5963
- [18] I. Russier-Antoine, C. Jonin, J. Nappa, E. Bénichou and P. F. Brevet, *J. Chem. Phys.*, **120**, (2004) 10748-10748
- [19] J. Nappa, G. Revillod, I. Russier-Antoine, E. Benichou, C. Jonin and P. F. Brevet, *Phys. Rev. B*, **71**, (2005) 165407-165407

-
- [20] J. Nappa, I. Russier-Antoine, E. Benichou, C. Jonin and P. F. Brevet, *J. Chem. Phys.*, **125**, (2006)
- [21] J. I. Dadap, J. Shan, K. B. Eisenthal and T. F. Heinz, *Phys. Rev. Lett.*, **83**, (1999) 4045-4048
- [22] I. Russier-Antoine, G. Bachelier, V. Sablonière, J. Duboisset, E. Benichou, C. Jonin, F. Bertorelle and P. F. Brevet, *Phys. Rev. B*, **78**, (2008) 35436-35436
- [23] P. Lemaillot, F. Pellen, S. Rivet, B. Le Jeune and J. Cariou, *J. Opt. Soc. Am. B*, **24**, (2007) 609-614
- [24] J. D. Jackson, *Classical Electrodynamics*, 1925
- [25] P. D. Maker, *Phys. Rev. A*, **1**, (1970) 923-951
- [26] M. C. Wang and G. E. Uhlenbeck, *Rev. Mod. Phys.*, **17**, (1945) 323-342
- [27] S. Brasselet and J. Zyss, *J. Opt. Soc. Am. B*, **15**, (1998) 257-288
- [28] R. W. Boyd, *Nonlinear Optics*, Academic Press, 2003
- [29] J. Zyss, T. C. Van, C. Dhenaut and I. Ledoux, *J. Chem. Phys.*, **177**, (1993) 281-296
- [30] G. J. T. Heesink, A. G. T. Ruiter, N. F. van Hulst and B. Bölger, *Phys. Rev. Lett.*, **71**, (1993) 999-1002

Chapitre 2: Diffusion Hyper Rayleigh et Génération de Second Harmonique de Biomolécules

2.1 HRS de biomolécules

2.1.1 Introduction

Avec le développement des techniques physiques pour les sciences du vivant, l'optique de manière générale et l'optique non linéaire de manière plus particulière font l'objet d'un grand intérêt. Ces dernières années, la fluorescence à deux photons et la génération de second harmonique par exemple mais aussi la microscopie de troisième harmonique ont été utilisées comme outils d'imagerie afin de mieux localiser notamment les éléments constitutifs d'une cellule ou d'un tissu et d'en déterminer leur fonction ou pathologie [1]. En parallèle, le développement des sondes optiques non linéaires parfois spécifiques d'un tissu ou d'un domaine comme la membrane cellulaire, a permis d'imager par l'une ou l'autre de ces techniques les systèmes biologiques avec une grande résolution. L'un des atouts de ces méthodes non linéaires réside dans la dépendance de l'intensité du signal mesuré à la fréquence harmonique avec le carré de l'intensité de l'onde incidente. En effet, les processus multi-photoniques de conversion ne peuvent être efficaces que dans un volume réduit de l'espace où la densité d'énergie est suffisante. Dans ce cadre général, la génération de second harmonique est devenue un outil important parmi cette panoplie disponible car la réponse observée est fortement liée à l'organisation des sources moléculaires élémentaires dans les tissus. Un cas d'école est ainsi l'observation des membranes par SHG en raison de l'asymétrie des forces intermoléculaires y régnant. A cause des forces hydrophiles et hydrophobes, une organisation préférentielle des molécules sondes agissant comme sources élémentaires permet une localisation différenciée par rapport au milieu cytoplasmique de la cellule, milieu non organisé du point de vue de l'orientation moléculaire [2]. Nous constatons ainsi que pour un impact fort dans les milieux de l'imagerie des milieux biologiques, il est impératif de combiner aux techniques optiques non linéaires une connaissance poussée des sondes moléculaires employées. Pour l'imagerie SHG, la caractérisation est naturellement réalisée par diffusion hyper Rayleigh pour déterminer l'efficacité des sondes à travers leur

hyperpolarisabilité quadratique ainsi que leur géométrie dominante par le coefficient de dépolarisation [3, 4].

Dans ce chapitre, nous décrivons dans un premier temps une étude de molécules de synthèse. Le but de cette étude a été de déterminer l'hyperpolarisabilité quadratique de ces molécules dans le but de les utiliser ultérieurement comme sondes moléculaires dans des systèmes biologiques. Ces résultats sont donc importants pour guider le choix de l'une de ces molécules au détriment d'autres en fonction de ses spécificités telles que l'énergie de ses résonances ou la magnitude de son hyperpolarisabilité quadratique. Parallèlement à l'étude de ces molécules de synthèse, nous avons mené pour la première fois une étude sur des molécules naturelles en solution liquide : les acides aminés. En effet, jusqu'à présent la génération de second harmonique des acides aminés n'avait été effectuée que pour des monocouches déposées en surface liquide [5] ou pour des formes cristallisées [6]. Cependant, ces molécules qui sont les briques élémentaires des protéines peuvent également servir de sondes moléculaires avec l'avantage d'être endogènes. Cependant, une détermination précise de leur hyperpolarisabilité est requise et la compréhension de la relation entre la réponse optique non linéaire des objets biologiques complexes, comme les protéines, et la réponse de leurs éléments constitutifs reste un grand challenge. La diffusion Hyper Rayleigh permet toutefois d'obtenir des informations sur les systèmes complexes comme les assemblages moléculaires tels que les micelles ou les liposomes [7]. Ainsi, en nous basant sur ces travaux antérieurs, nous avons étendu l'approche aux peptides, premiers pas vers l'étude des protéines [8][9-11]. Nous avons ainsi étudié la réponse non linéaire de petits peptides synthétiques et effectué une première étude sur des peptides naturels.

2.1.2 Molécules sondes exogènes

En l'absence d'une réponse optique non linéaire propre des systèmes biologiques visés, la méthode pour obtenir un signal caractéristique d'objets tels que des peptides ou des protéines est de greffer une sonde moléculaire dont la réponse est elle bien connue. Ces sondes exogènes doivent présenter lors de mesures SHG une forte réponse non linéaire du second ordre, c'est-à-dire une forte hyperpolarisabilité quadratique intrinsèque. Ces fortes valeurs d'hyperpolarisabilité sont obtenues avec des molécules organiques dites « *push-pull* » dans lesquelles un groupement donneur et un groupement accepteur encadrent un système

électronique conjugué étendu [12]. Sous l'action du champ électrique intense à la fréquence fondamentale, les électrons délocalisés sont mis en mouvement et oscillent non seulement à la fréquence fondamentale d'excitation mais aussi aux fréquences harmoniques en raison de l'anharmonicité du potentiel dans lequel se meuvent les électrons du fait de la présence du groupe donneur et du groupe accepteur. Il est donc indispensable d'avoir des groupes donneur et accepteur forts pour favoriser la dissymétrie du potentiel ainsi qu'un grand nombre d'électrons délocalisés. A cette propriété optique, il faut également ajouter une propriété chimique afin de pouvoir greffer la sonde sur la cible qui ne possède *a priori* pas de réponse optique non linéaire. Nous avons participé à un tel travail en mesurant les valeurs des hyperpolarisabilités quadratiques de plusieurs molécules. Ces molécules ont été synthétisées par l'équipe du Laboratoire de Chimie à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon [13].

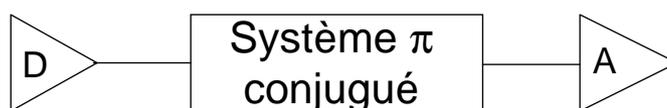


Figure 2-1 : représentation schématique d'un système push-pull linéaire. D est le groupe donneur et A le groupe accepteur.

Il est usuel de synthétiser des molécules par famille dont les membres varient par la nature de leur groupe donneur, accepteur ou de leur système conjugué. Une famille est alors caractérisée par le groupement contenant le système d'électrons délocalisés. Nous avons porté notre attention sur 8 molécules en particulier. Ces 8 molécules ont été optimisées en vue d'un greffage sur des biomolécules et par conséquent celles-ci sont peu solubles dans l'eau. Le chloroforme a donc été privilégié comme solvant pour ces études HRS. Pour obtenir les hyperpolarisabilités quadratiques absolues des molécules sondes synthétisées, la méthode de la référence interne a été utilisée avec pour valeur de l'hyperpolarisabilité quadratique du chloroforme $\beta = 0.26 \times 10^{-30}$ esu [3]. Ces 8 molécules s'organisent en 4 familles.

Groupe fluorenyl - Tableau 2

Pour cette famille, le groupe fluorenyl, voir Tableau 2 partie bleue de la molécule, est encadré par le groupement nitro NO₂, partie rouge, agissant comme accepteur et un groupement donneur variable, partie orange. Pour les deux molécules de cette famille, nous constatons une absorbance très similaire tant en ce qui concerne le maximum de la section efficace que l'énergie pour laquelle le maximum est atteint. L'hyperpolarisabilité quadratique de ces deux composés est, aux erreurs expérimentales près, la même. Les groupes donneurs dans ces deux molécules jouent donc de ce point de vue un même rôle avec la même force. L'hyperpolarisabilité quadratique dépasse largement la centaine de 10⁻³⁰ esu mais cette valeur est probablement atteinte en raison d'un caractère au moins partiellement résonant à 400 nm, longueur d'onde harmonique.

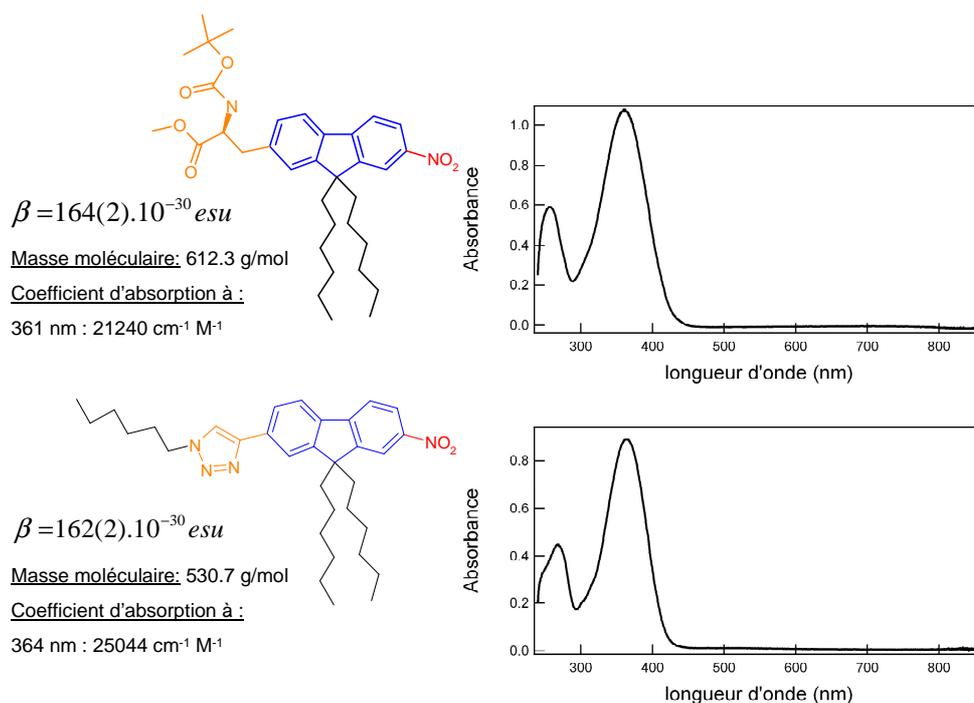
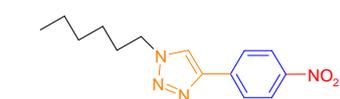


Tableau 2

Groupe Phényle - Tableau 3

Pour cette famille, c'est le groupe central contenant le système électronique délocalisé qui est modifié. Le motif de base reste cependant un groupement phényle. Ce système délocalisé est encadré à chaque fois des mêmes groupes donneur et accepteur, respectivement

un groupe triazole et un groupe nitro. La taille du système conjugué change et, dans la mesure où celui-ci reste de dimension modeste, cet effet devrait être visible. Dans le premier cas, il s'agit d'un groupement phényle simple alors que dans le second cas une triple liaison carbone-carbone est ajoutée. L'énergie de la résonance dans le second cas est légèrement décalée vers le rouge, en association avec l'allongement de cette partie riche en électrons délocalisés. Les hyperpolarisabilités de ces deux molécules sont en revanche bien inférieures à celles de la famille précédente des fluorenyl. En comparant les différents groupes accepteurs et donateurs, nous constatons que la forte réduction de l'hyperpolarisabilité dans cette famille des phényles est probablement associée à la diminution de la taille du groupement délocalisé. En effet, le groupement phényle est moins riche en électrons délocalisés que le groupement fluorenyl. Cette famille de molécules contenant un groupement phényle est donc peu attrayante pour une application éventuelle.

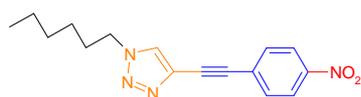
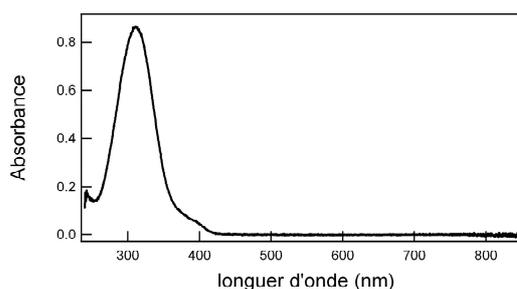


$$\beta = 24.9(1) \cdot 10^{-30} \text{ esu}$$

Masse moléculaire: 274.32 g/mol

Coefficient d'absorption à :

312 nm : 15000 cm⁻¹ M⁻¹



$$\beta = 35.8(5) \cdot 10^{-30} \text{ esu}$$

Masse moléculaire: 298.34

Coefficient d'absorption à :

323 nm : 19233 cm⁻¹ M⁻¹

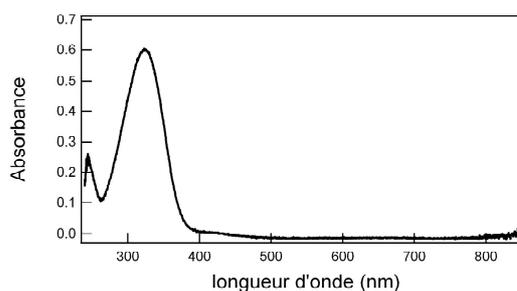
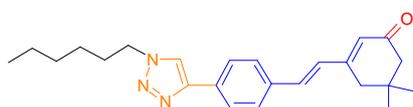


Tableau 3

Groupe C₁₄H₁₂ - Tableau 4

Pour cette famille, le groupement conjugué comporte deux cycles dont l'un est aromatique et les groupements donneur et accepteur changent. Si on ne considère que le groupe accepteur, l'oxygène dans le premier cas ou (CN)₂ dans le deuxième cas, nous

remarquons que le spectre d'absorption est très différent. Le groupement (CN)₂ déplace en effet de manière importante la résonance vers le rouge. Ce groupe accepteur doit donc être efficace, tant en optique linéaire qu'en optique non linéaire car l'hyperpolarisabilité dans le deuxième cas est le double du premier cas. Par ailleurs, nous observons que la résonance est localisée entre les longueurs d'onde correspondant à une excitation fondamentale à 800 nm et une émission harmonique à 400 nm. Cette configuration est intéressante car lorsque la bande d'absorption est localisée à une longueur d'onde inférieure à 400 nm, la fluorescence excitée par plus de deux photons est émise sur un spectre large décalé par effet Stoke vers le rouge par rapport à l'absorption qui peut s'ajouter au signal harmonique à 400 nm et venir ainsi gêner la réponse SHG. De manière générale cependant, ces hyperpolarisabilités sont tout à fait comparables à celles obtenues pour la première famille des fluorenyl.

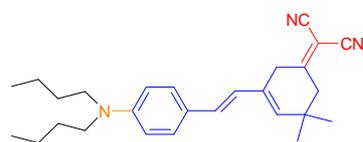
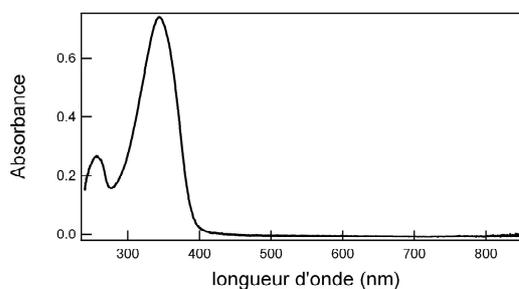


$$\beta = 114(2) \cdot 10^{-30} \text{ esu}$$

Masse moléculaire: 377.5 g/Mol

Coefficient d'absorption à :

344 nm : 49533 cm⁻¹ M⁻¹



$$\beta = 228(5) \cdot 10^{-30} \text{ esu}$$

Masse moléculaire: 401.6 g/mol

Coefficient d'absorption à :

521 nm : 35480 cm⁻¹ M⁻¹

325 nm : 15660 cm⁻¹ M⁻¹

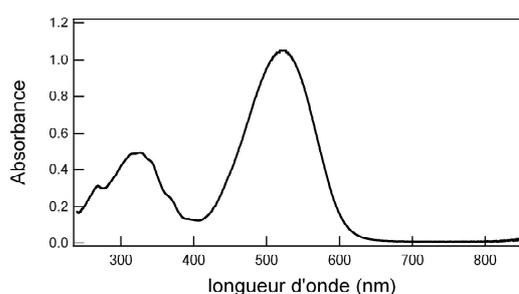
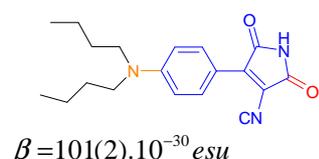


Tableau 4

Groupe C₁₂H₇NO - Tableau 5

Pour cette famille, le groupe délocalisé possède une structure plus complexe. Le groupe donneur est aussi le même que le second membre de la famille précédente. Il s'agit d'une alkylamine à double chaîne. Dans le premier cas, le groupement accepteur est réduit à un oxygène et la résonance principale se situe aux alentours de 550 nm. Lorsque le groupe

accepteur est échangé pour le groupe (CN)₂, la résonance est à nouveau décalée vers le rouge, atteignant 660 nm. L'hyperpolarisabilité de cette seconde molécule est également plus forte que la première. Si on compare cette seconde molécule à la deuxième de la famille précédente, il n'y a que le groupe conjugué qui change. Pour cette famille, l'hyperpolarisabilité est un peu plus faible avec une résonance plus loin dans le rouge qu'avec la deuxième molécule de la famille précédente. L'hyperpolarisabilité est toutefois assez proche alors que la résonance est nettement moins décalée vers le rouge.

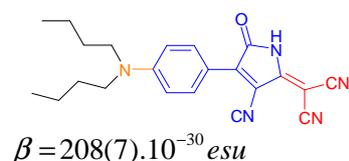
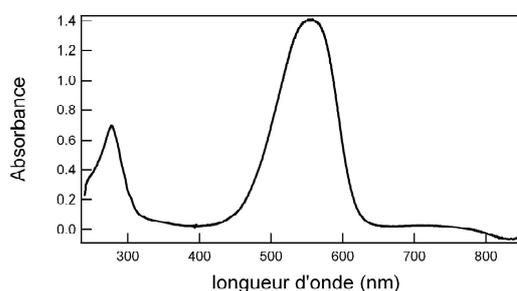


Masse moléculaire: 325.41 g/mol

Coefficient d'absorption à :

552 nm : 34250 cm⁻¹ M⁻¹

278 nm : 15767 cm⁻¹ M⁻¹



Masse moléculaire: 373.4 g/mol

Coefficient d'absorption à :

664 nm : 53684 cm⁻¹ M⁻¹

378 nm : 7316 cm⁻¹ M⁻¹

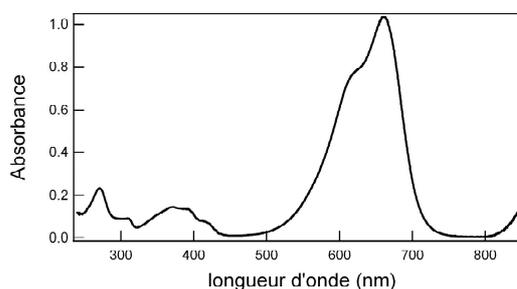


Tableau 5

Cette étude des quatre familles de composés synthétiques permet de tirer quelques règles générales liées aux différents groupes donneurs et accepteurs et au motif central apportant les électrons délocalisés. Pour les groupes donneurs, il est toutefois difficile de conclure sans ambiguïté. Il semble que le groupe triazole ne soit pas forcément beaucoup plus efficace que le groupement amine par exemple, voir Tableau 5. Pour les groupements accepteurs, il est de même difficile de comparer les différents groupements. Toutefois, il semble assez net que le groupement di-cyano (CN)₂ décale fortement la résonance principale vers le rouge et que ce déplacement s'accompagne d'une augmentation de l'hyperpolarisabilité de la molécule, voir Tableau 5. Pour les groupements conjugués

centraux, les différents groupements étudiés ont des effets du même ordre. Seul le groupement phényl conduit à des hyperpolarisabilités plus faibles de près d'un ordre de grandeur. Nous constatons donc qu'il est possible, par la variabilité des trois éléments constituant ces molécules push-pull, de modifier les propriétés optiques linéaires et non linéaires de ces molécules, les sections efficaces d'absorption et de HRS étant ici affectées.

Ces études montrent cependant que les combinaisons optimales pour les applications en greffage sur biomolécules sont longues et difficiles. Il n'est en effet pas garanti que le composé obtenant les meilleurs scores du point de vue des propriétés optiques linéaires et non linéaires soit aussi le plus simple à greffer sur une biomolécule. Dans le cadre de cette collaboration avec le Laboratoire de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon, les chimistes ont décidé de porter leur choix sur le deuxième membre de la troisième famille, voir Tableau 4, en raison de sa bonne hyperpolarisabilité et d'une bande d'absorption localisée entre 400 et 800 nm, les deux longueurs d'onde fondamentale et harmonique actuellement à notre disposition. Dans le futur, ce composé moléculaire sera greffé sur des objets biomoléculaires comme des peptides et éventuellement sur une protéine.

2.1.3 Molécules sondes endogènes

2.1.3.1 Acides aminés aromatiques

Les protéines, molécules synthétisées dans les cellules des organismes vivants, ont des tailles très variables, allant de quelques centaines d'atomes à plusieurs centaines de milliers d'atomes. Ces protéines se caractérisent par leur structure qui est un enchaînement répété de briques chimiques élémentaires constituées par les acides aminés. En milieu naturel, les acides aminés sont essentiellement au nombre de vingt. La séquence des acides aminés d'une protéine constitue alors ce que l'on appelle la séquence primaire de la protéine.

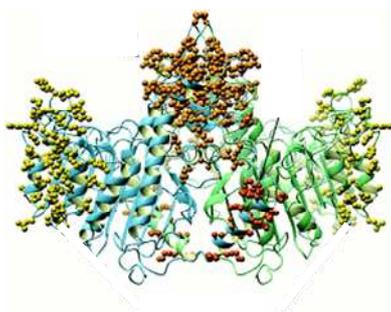


Figure 2-2 : exemple de protéine : la phosphatase alcaline, enchaînement de 1230 acides aminés.

Les acides aminés sont de petites molécules toutes constituées suivant le même schéma de principe à l'exception de la proline. Elles possèdent ainsi toutes une fonction amine, une fonction acide et une chaîne latérale. C'est cette chaîne latérale qui confère à ces molécules leurs propriétés chimiques particulières. Ces chaînes latérales peuvent être chargées ou neutres, hydrophiles ou hydrophobes, à encombrement stérique petit ou grand, ...

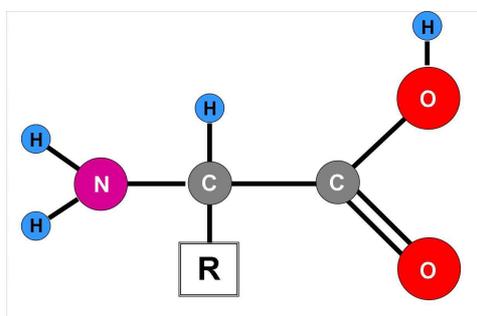


Figure 2-3 : représentation d'un acide aminé ou R correspond à la chaîne latérale

Parmi les 20 acides aminés courants qui composent les protéines du vivant, seuls 3 ont une chaîne latérale possédant un cycle aromatique. Ces trois acides aminés sont donc les bons candidats pour une étude similaire à celle réalisée pour les sondes exogènes. En effet, ce cycle aromatique peut constituer le groupement riche en électrons délocalisés. Il est cependant clair que ce groupement n'est pas le plus efficace à la vue des résultats précédents indiquant que le groupement phényle ne favorisait pas les plus fortes hyperpolarisabilités. De même, les groupements donneur et accepteur ne sont pas clairement identifiés comme tels. C'est pour cette raison que les hyperpolarisabilités de ces acides aminés sous forme moléculaires n'ont

jamais fait l'objet d'étude préalable [5-6]. Les trois acides aminés retenus sont donc le tryptophane (Trp ou W), la tyrosine (Tyr ou Y) et la phénylalanine (Phe ou F), voir Figure 2-4.

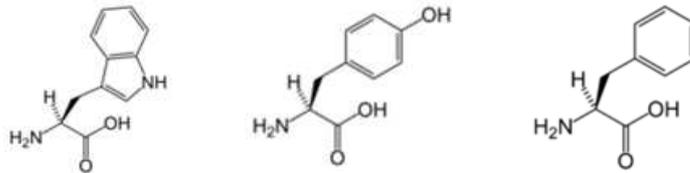
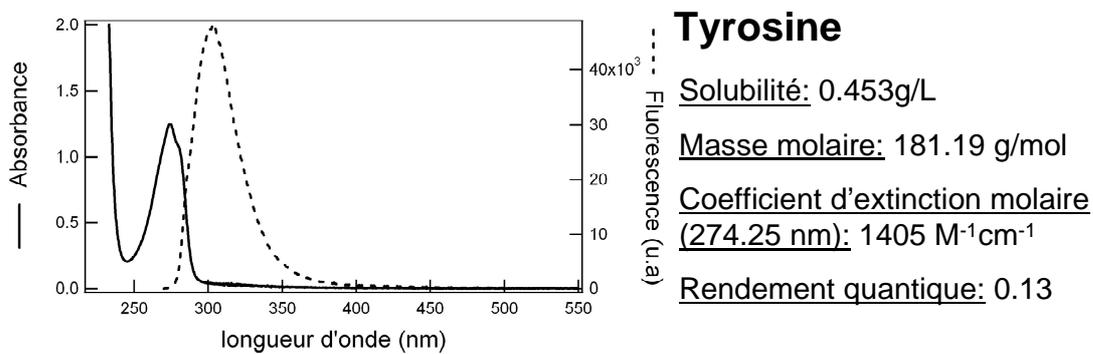
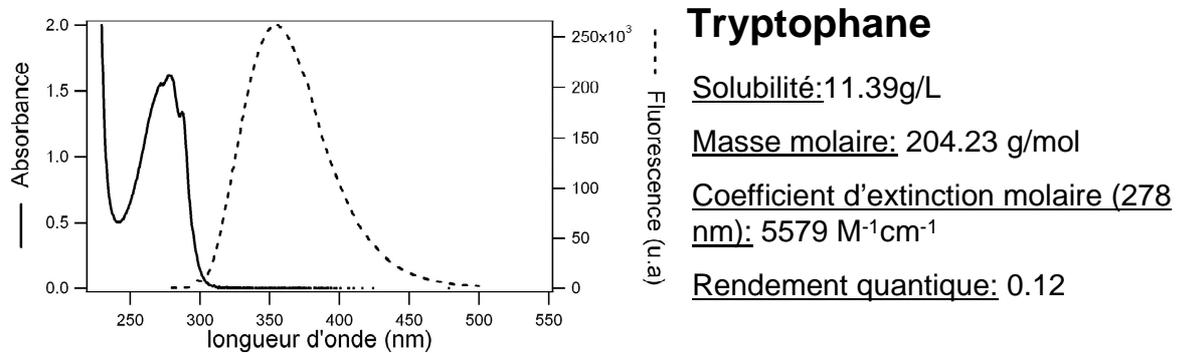


Figure 2-4 : les trois acides aminés aromatiques : le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine.

Ces trois acides aminés ont été solubilisés dans des solutions aqueuses dont le pH de 8.5 a été choisi proche du pH physiologique présent dans les cellules, avec une concentration en sel de 150 mM.



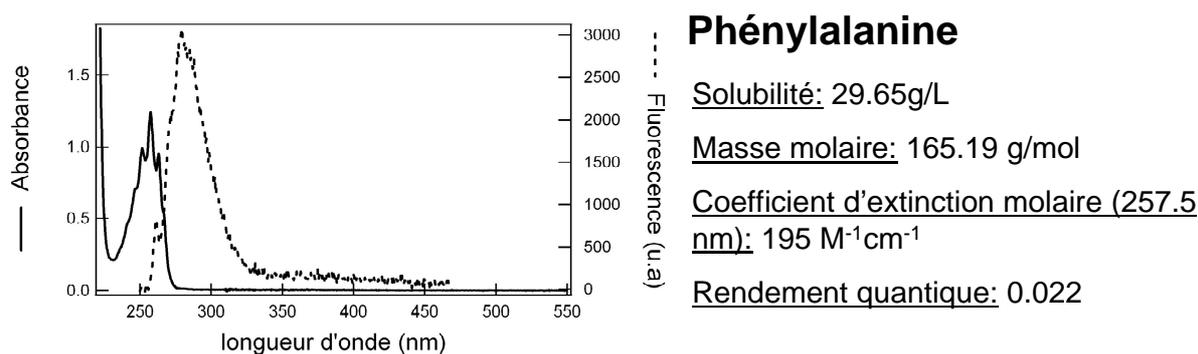


Figure 2-5 : Absorbance et fluorescence des trois acides aminés aromatiques [14].

Cependant, ces trois acides aminés sont naturellement hydrophobes à la vue de leur formule chimique et il ne sera pas possible d'atteindre de fortes concentrations en solution aqueuse. Enfin, d'après la Figure 2-5 et les spectres d'absorbance, les mesures effectuées avec une longueur d'onde fondamentale de 800 nm et une longueur d'onde harmonique de 400 nm seront réalisées dans des conditions hors résonance ce qui réduira d'autant la valeur des hyperpolarisabilités mesurées.

Les valeurs des hyperpolarisabilités de ces trois acides aminés ont été obtenues par la méthode de la référence interne. De cette manière, l'intensité HRS est enregistrée en fonction de la concentration en acide aminé. La linéarité du graphe obtenu permet de s'assurer que l'augmentation du signal est bien due à l'augmentation de la concentration en soluté et qu'aucun phénomène d'agrégation ou de détérioration du composé n'a lieu. Des mesures préliminaires de comparaison de solution d'eau pure et d'eau tamponnée n'ont pas montré de différence d'intensité HRS, aux erreurs expérimentales près. Nous avons donc utilisé la méthode de la référence interne avec pour le tampon, l'hyperpolarisabilité de l'eau comme référence. Dans tous les cas, nous avons mesuré l'intensité HRS en enregistrant un spectre en longueur d'onde autour du pic HRS afin de retirer la contribution de fluorescence excitée à plusieurs photons par la méthode de l'ajustement décrite dans le chapitre précédent.

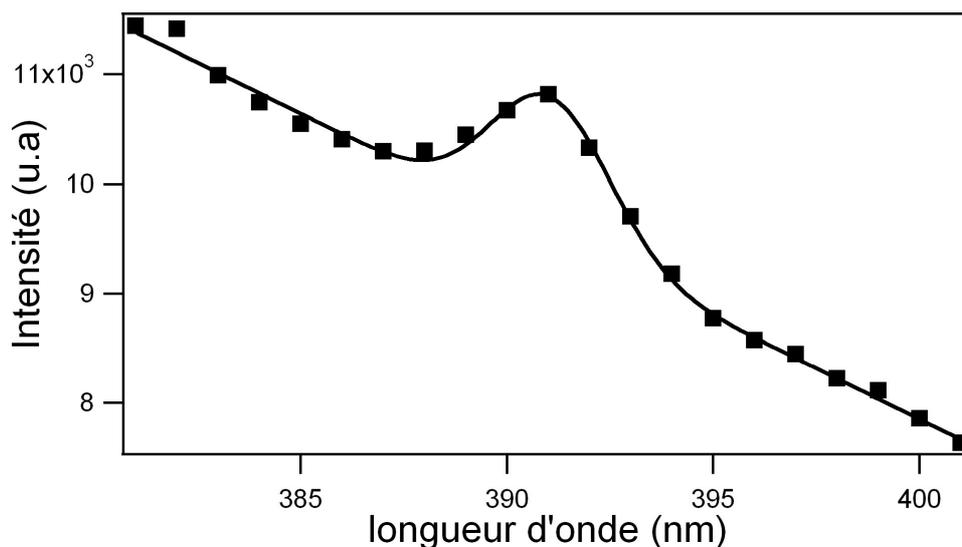


Figure 2-6 : spectre HRS du Tryptophane à une concentration de 4×10^{-4} mol/L. acquisition par point : 50 secondes. Carrés pleins : points expérimentaux – ligne : ajustement

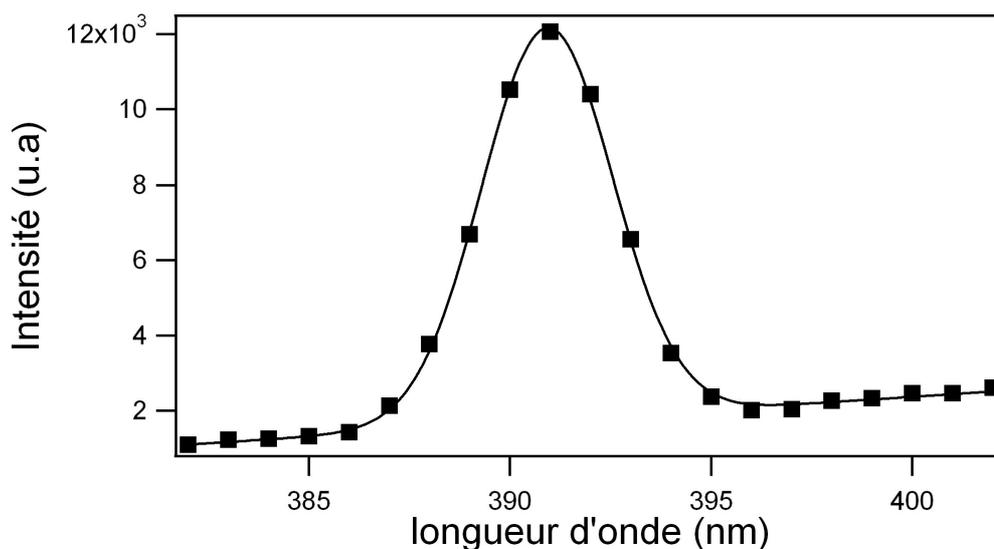


Figure 2-7 : spectre HRS de la tyrosine à une concentration de 0.0028 mol/L. acquisition par point : 100 secondes. Carrés pleins : points expérimentaux – ligne : ajustement

On constate sur le spectre du Tryptophane, Figure 2-6, qu'il y a deux contributions distinctes. En effet, la raie de diffusion hyper Rayleigh se trouve sur un fond large bande de fluorescence. Ce fond contribue en fait majoritairement au signal total mesuré à la longueur d'onde harmonique. En revanche, pour la tyrosine, Figure 2-7, ce fond de fluorescence est largement minoritaire, ce qui favorise la précision de la mesure. En effet, en régime de

comptage de photons, la déviation standard associée à la moyenne du nombre de photons N mesuré par unité de temps est égale à \sqrt{N} . Ainsi, plus le nombre de photons total mesuré est grand, plus cette déviation standard l'est aussi, indépendamment de l'origine des photons eux-mêmes. Pour le Tryptophane, le nombre de photons provenant du processus HRS est de l'ordre de grandeur de la déviation standard associée à la moyenne du nombre total de photons mesuré. Cette mesure nécessite donc des temps d'intégration relativement longs. Cependant, il n'est pas utile non plus de trop concentrer les composés ayant une forte fluorescence car celle-ci masque les photons harmoniques. Par ailleurs, pour la Phénylalanine, aucune augmentation de l'intensité totale mesurée n'a été observée, même pour la concentration la plus forte de 6 mM. Dans ce cas particulier, nous avons fixé la valeur minimale de l'hyperpolarisabilité correspondant au seuil de détectabilité. Ce seuil est fixé à environ 5% de l'intensité mesurée sur le solvant pur pour la concentration maximale de soluté.

	Tryptophane	Tyrosine	Phénylalanine
β (10^{-30} esu)	29.6 (4)	25.7 (3)	< 8.5

Tableau 6 : hyperpolarisabilité des 3 acides aminés aromatiques.

Les hyperpolarisabilités présentées dans le Tableau 5 sont relativement importantes compte tenu de la nature des molécules. On constate aussi que les valeurs du Tryptophane et de la Tyrosine sont du même ordre de grandeur. Comme attendu, la valeur de la Phénylalanine, déterminée comme étant inférieure au seuil de détectabilité, est bien en-dessous. Ces valeurs s'expliquent en grande partie par la structure chimique de ces acides aminés qui ne ressemble en rien à la structure des composés « *push-pull* » décrits ci-dessus. La Tyrosine est constituée par un cycle benzénique encadré de part et d'autre par un groupement hydroxyle et un atome de carbone permettant la liaison à la chaîne peptidique. Les électrons délocalisés appartiennent donc à ce cycle aromatique dont nous avons vu par ailleurs sa faible efficacité. Le groupe donneur est alors formé par la chaîne peptidique elle-même et le groupe accepteur est constitué par le groupe hydroxyle. Cette vision simplifiée de cet acide aminé montre bien qu'aucun des groupements, ni le donneur, ni l'accepteur ni le groupement contenant les électrons délocalisés n'est optimal. Pour la phénylalanine, nous

constatons que le groupe accepteur a disparu par rapport à la Tyrosine. Ainsi, la dissymétrie ressentie par les électrons délocalisés est moins forte et la valeur de l'hyperpolarisabilité moins importante que dans le cas de la Tyrosine. Enfin, le Tryptophane présente une réponse aussi importante que la Tyrosine. Cet acide aminé possède en effet un groupe indole riche en électrons délocalisés malgré des groupements donneur et accepteur absents. La dissymétrie est toutefois suffisante pour induire une hyperpolarisabilité aussi forte que celle de la Tyrosine.

Nous avons comparé nos résultats expérimentaux à des résultats théoriques issus de simulations numériques effectuées sur les acides aminés aromatiques [15] ainsi que sur les groupement benzène [16], indol [17, 18] et phénol [16]. Ces simulations conduisent à des valeurs plus importantes pour les acides aminés que pour les groupes isolés. La chaîne peptidique joue donc un rôle majeur dans la dissymétrisation du potentiel électronique ressenti par les électrons délocalisés, induisant alors une réponse non linéaire quadratique suffisante pour envisager des études sur sondes endogènes.

	Trp	indol	Tyr	phénol	Phe	toluène
$\beta(0) (10^{-30} esu)$	1.00	0.86	1.24	1.01	0.34	0.30

Tableau 7 : Valeurs théoriques de l'hyperpolarisabilité statique des acides aminés aromatiques et des principaux groupements aromatiques dans le vide [15].

Nous constatons cependant que les valeurs des hyperpolarisabilités théoriques et expérimentales sont très différentes. Outre tous les problèmes de normalisation et de références impliqués au passage des valeurs théoriques aux valeurs expérimentales, ces différences peuvent provenir d'une variabilité associée à l'environnement, les calculs étant réalisés pour les molécules dans le vide. Il reste cependant intéressant de noter que les valeurs relatives des hyperpolarisabilités évoluent de manière similaire pour les valeurs théoriques et pour les valeurs expérimentales. En effet, la valeur théorique de l'hyperpolarisabilité de la phénylalanine est beaucoup moins importante que celle du Tryptophane et de la Tyrosine qui présentent des valeurs assez proches.

2.1.3.2 Le tryptophane et son environnement

L'environnement d'un acide aminé dans une protéine peut être très différent de celui rencontré lors d'une dissolution en phase liquide. En effet, les protéines présentent non seulement des domaines hydrophiles ou hydrophobes mais aussi des interactions à courte portée entre groupements voisins facilitant l'apparition des structures secondaires ou même tertiaires. Ainsi, l'acide aminé pourra être orienté vers l'extérieur de la protéine, en contact direct avec un milieu environnant qui pourra lui-même être aqueux ou hydrophobe dans le cas d'insertion dans une membrane, ou bien orienté vers l'intérieur de la protéine, protégé du milieu extérieur mais au contact d'autres acides aminés pouvant présenter des groupements hydrophobes ou chargés électriquement. Afin d'apporter des éléments de réponse à cette problématique, nous avons tenté de modifier l'environnement proche des acides aminés. Le choix de l'acide aminé s'est porté sur le Tryptophane car il possède intrinsèquement une forte réponse non linéaire quadratique ainsi qu'une forte fluorescence excitée à plusieurs photons qui dépend aussi de son environnement [19]. La première modification effectuée a été de changer l'environnement ionique de l'acide aminé. Des mesures ont été réalisées dans de l'eau ultra pure à pH 7, de conductivité 18 MOhm, et comparées aux mesures en solution tamponnée à pH 8.5 et 150 mM de sel. Cette différence d'environnement ionique n'a pas apporté de différence sur les valeurs mesurées de l'hyperpolarisabilité du Tryptophane. Il est probable que le Tryptophane ayant un caractère hydrophobe, l'addition d'espèces ioniques ne perturbe pas la solvatation du groupement indole en particulier. Ensuite, le Tryptophane a été solubilisé avec une grande quantité de lysines, un autre acide aminé servant le plus souvent d'aide à la solubilisation en milieu aqueux dans les synthèses peptidiques. Nous verrons par la suite le rôle de ces lysines dans les petits peptides synthétiques. La lysine est un acide aminé dont la chaîne latérale est constituée d'une longue chaîne carbonée se terminant par un groupe amine, voir Figure 2-8. La chaîne carbonée est saturée et présente un caractère plutôt hydrophobe. Cette chaîne peut donc avoir une affinité pour le groupe indole en milieu aqueux, perturbant alors la distribution électronique dans le groupement indole et par conséquent affectant l'hyperpolarisabilité [20]. L'hyperpolarisabilité de la lysine seule en solution aqueuse n'a pas pu être mesurée. Même à une concentration atteignant 0.12 mol/L, aucune intensité HRS associée à la lysine n'a été détectée, indiquant une hyperpolarisabilité inférieure à $\beta = 1.5 \times 10^{-30}$ esu. En présence du Tryptophane, nous avons observé une hyperpolarisabilité du Tryptophane diminuée d'un facteur 2 pour une concentration en lysine

10 fois supérieure à celle du tryptophane, voir Tableau 8. Ajoutons que pour cette mesure, nous avons considéré que la lysine ne possède pas d'hyperpolarisabilité propre.

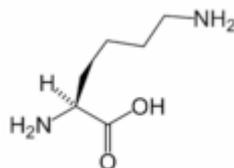


Figure 2-8 : Lysine (Lys ou K)

Enfin, nous avons dissout le Tryptophane en présence d'un composé ayant une forte affinité pour le groupement indole, un sel d'argent. Il existe en effet une très grande affinité de l'argent sous forme ionique pour le tryptophane et son groupe indole riche en électrons en particulier, qui a donné lieu à une abondante littérature, tant en solution [21] qu'en phase gazeuse [22, 23]. En solution, des complexes Trp-Ag_n où *n* indique le nombre d'ions Ag⁺ se forment. Il semblerait qu'il soit difficile d'obtenir des complexes *n* = 1 de manière certaine mais des complexes entre un Tryptophane et des petits agrégats d'argent sous une forme plus ou moins réduite semblent relativement stables. Nous n'avons pu déterminer dans une étude complète la stoechiométrie des complexes formés. Cependant, nous avons remarqué une forte augmentation de l'hyperpolarisabilité du Tryptophane après incorporation d'ions Ag⁺.

	Trp (pH 8.5)	Trp (pH 7)	Trp – 10 Lys	Trp - Ag	Lys
β (10^{-30} esu)	29.6 (4)	28.6 (4)	18.3 (3)	64 (5)	< 1.5

Tableau 8 : Hyperpolarisabilité du Tryptophane pour différents environnements

Il apparaît donc finalement, qu'en plus d'une hyperpolarisabilité de l'ordre de plusieurs dizaines de 10^{-30} esu, le Tryptophane possède une hyperpolarisabilité ayant une forte variabilité en fonction de son environnement. Cette propriété est déjà connue en optique linéaire et utilisée en biochimie [24]. Ces études montrent de manière très claire que ce comportement se reproduit aussi en optique non linéaire. Cette observation pourrait avoir un intérêt dans le cadre d'une utilisation du Tryptophane comme sonde de son environnement en régime optique non linéaire.

2.1.4 Peptides synthétiques

2.1.4.1 Tripeptide : Lysine – tryptophane - lysine (W1)

Avant de nous intéresser aux protéines, et en raison de la grande variabilité de l'hyperpolarisabilité du Tryptophane, une étape intermédiaire a été nécessaire. Le Tryptophane a ainsi été incorporé dans des petits peptides, c'est-à-dire des enchaînements courts n'excédant pas 50 acides aminés. Pour un nombre plus important d'acides aminés, il est usuel de parler de polypeptides. Ces peptides de petite taille ont un grand rôle dans le fonctionnement des cellules mais nous porterons notre attention sur des peptides synthétiques sans activité biologique. Le Tryptophane possédant une réponse non linéaire quadratique suffisante ainsi qu'une grande variabilité vis-à-vis de son environnement, notamment en surface [20], nous avons porté notre effort sur des petits peptides contenant des Tryptophanes. Plus particulièrement, afin de mieux comprendre comment se construit une réponse non linéaire quadratique dans un enchaînement d'acides aminés, quatre petits peptides riches en Tryptophane ont été synthétisés. Ces quatre peptides contiennent de 1 à 4 Tryptophanes et des Lysine uniquement. Afin d'assurer la stabilité chimique et la solubilité de ces peptides en phase aqueuse, l'incorporation de lysines est nécessaire car elles sont très solubles. Nous avons montré par ailleurs précédemment que l'hyperpolarisabilité de la Lysine est très faible. La variabilité de la Lysine elle-même n'a pas été étudiée mais la structure chimique de cet acide aminé ne comportant pas d'électrons délocalisés soutient l'idée d'une hyperpolarisabilité faible indépendamment de l'environnement. Le premier peptide est un enchaînement de 3 acides aminés : deux lysines et un tryptophane, voir Figure 2-9.

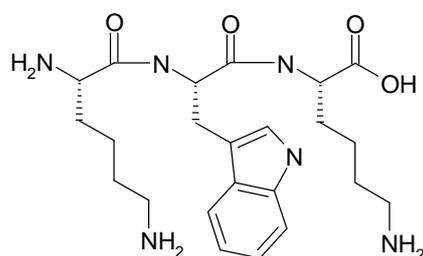


Figure 2-9 : tripeptide synthétique contenant 1 tryptophane au centre et deux lysines.

Tout d'abord, une étude en fluorescence a été menée afin de contrôler le comportement de ce peptide. La fluorescence du KWK ou W1 est dominée par la fluorescence du Tryptophane, voir Figure 2-10. La fluorescence du peptide est toutefois beaucoup moins

importante que celle du Tryptophane seul pour une même concentration en Tryptophane. Aucun décalage notable en longueur d'onde du spectre de fluorescence du peptide par rapport à celui du Tryptophane seul n'est observé cependant.

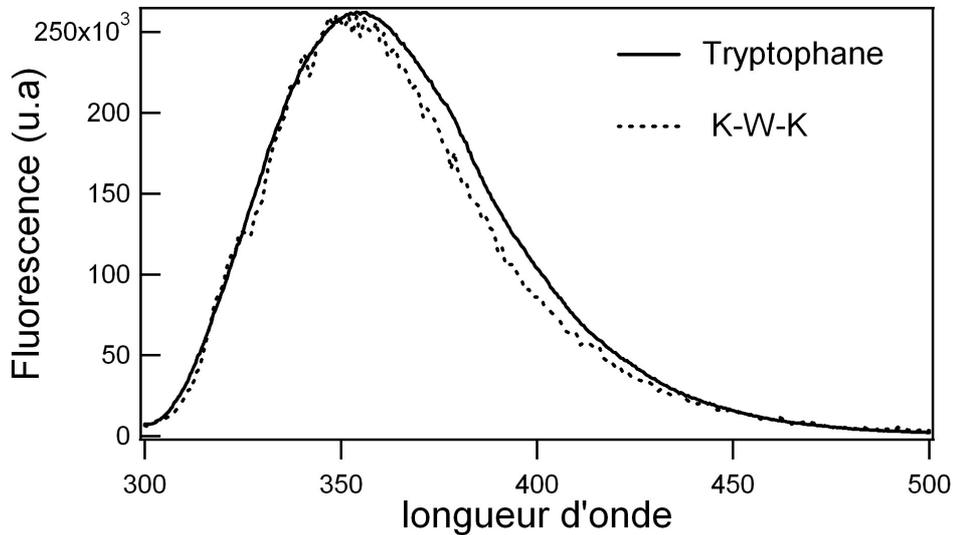


Figure 2-10 : Fluorescence du tryptophane seul et du tripeptide K-W-K

La fluorescence du Tryptophane est toutefois connue pour dépendre de son environnement, le maximum du spectre de fluorescence se déplaçant d'une dizaine de nanomètres, de 355 nm vers 345 nm, lorsque l'environnement devient hydrophobe comme dans une insertion du Tryptophane dans une membrane cellulaire par exemple [24].

Ce tri-peptide a été étudié en diffusion HRS par la même méthode que précédemment pour le Tryptophane seul. La concentration en peptide a été variée entre 20 mM et 50 mM. Pour ce peptide, les solutions utilisées sont assez concentrées car l'intensité reste très faible. La valeur de l'hyperpolarisabilité obtenue est de $\beta = (5.4 \pm 2)10^{-30}$ esu. Cette valeur est étrangement faible par rapport au Tryptophane seul. Compte tenu de l'étude sur la variabilité de cette hyperpolarisabilité, il est probable que l'hyperpolarisabilité diminue à cause de l'environnement du Tryptophane. La grande proximité des Lysines est vraisemblablement responsable d'un environnement hydrophobe du Tryptophane à cause des chaînes carbonées saturées. Nous avons vu en effet que le Tryptophane, en présence d'une forte concentration en lysines, voit son hyperpolarisabilité diminuer même sans liaison covalente à travers la chaîne peptidique. Comme les Lysines sont plus proches du Tryptophane dans le peptide, cette

décroissance plus importante d'un facteur 6 environ est assez logique. Afin d'affiner ces observations, des simulations numériques de dynamique moléculaire ont été menées dans le but de connaître les conformations de ce tri-peptide, en particulier pour observer les interactions à courtes portées entre le Tryptophane et les Lysines.

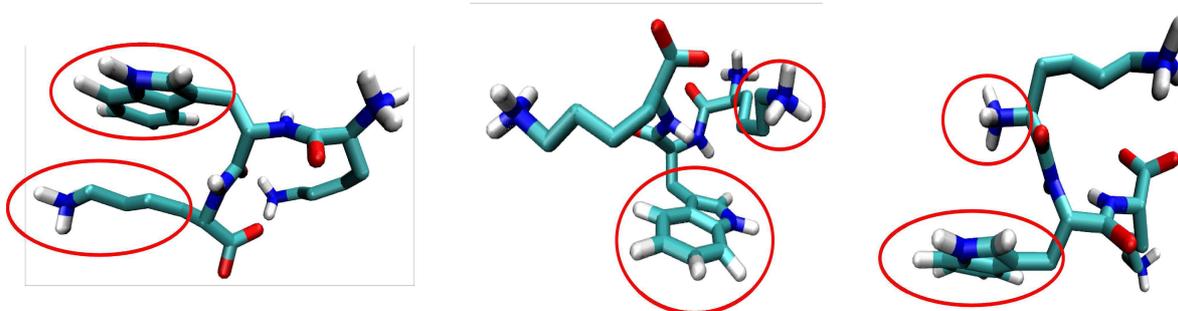


Figure 2-11 : trois conformations stables du tri-peptide W1. Simulations de dynamique moléculaire réalisées par Claire Loison, équipe Physico-Chimie Théorique au LASIM.

Le tri-peptide possède trois conformations stables en solution liquide. Deux de ces trois conformations correspondent à une position du groupe indole du Tryptophane en regard de la chaîne carbonée saturée de l'une des deux Lysines. La diminution importante de l'hyperpolarisabilité du tri-peptide W1 par rapport à celle du Tryptophane seul semble donc bien provenir de l'environnement hydrophobe proche apporté par la Lysine.

2.1.4.2 Peptides riches en Tryptophanes

Nous avons poursuivi l'étude en augmentant le nombre de Tryptophanes dans des petits peptides. Le nombre de Tryptophanes varie ainsi de 2 à 4 mais des Lysines doivent être ajoutées pour assurer la stabilité de l'ensemble en solution aqueuse, voir Figure 2-12 à 2-14.

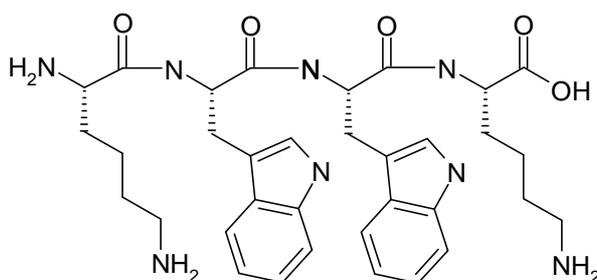


Figure 2-12 : peptide W2

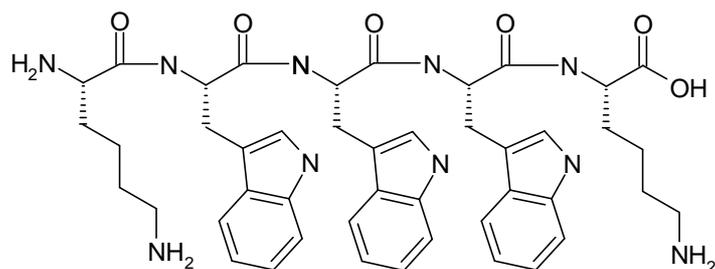


Figure 2-13 : peptide W3

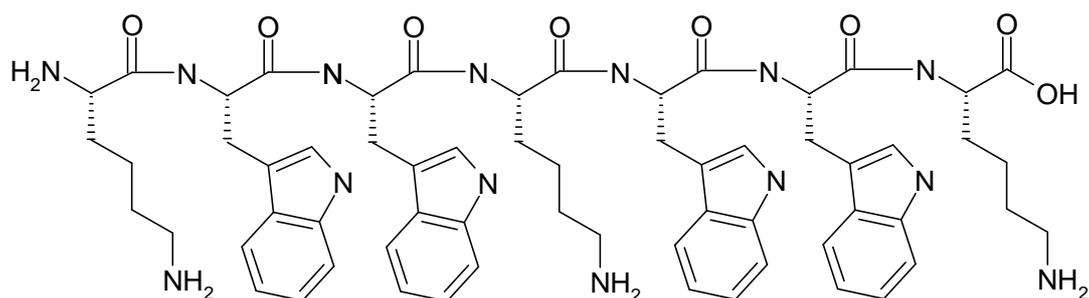


Figure 2-14 : peptide W4

Ainsi, le peptide contenant 4 Tryptophanes possède une lysine centrale supplémentaire car la séquence comportant 4 Tryptophanes à la suite n'est pas soluble. Comme pour le tri-peptide, les spectres de fluorescence ont été effectués dans les mêmes conditions de concentration. Nous ne constatons tout d'abord aucun changement des spectres pour les quatre peptides. Par contre, l'augmentation de l'intensité maximale en fonction du nombre de Tryptophane présents dans le peptide suit bien la loi linéaire attendue. La pente de cette droite est cependant plus faible que prévu en considérant une simple addition des Tryptophanes. En effet, l'intensité obtenue au maximum de fluorescence pour W1 n'est pas quatre fois plus petite que l'intensité obtenue au maximum de fluorescence pour W4. Le rapport d'intensité au maximum pour ces deux spectres n'est que de 2.3.

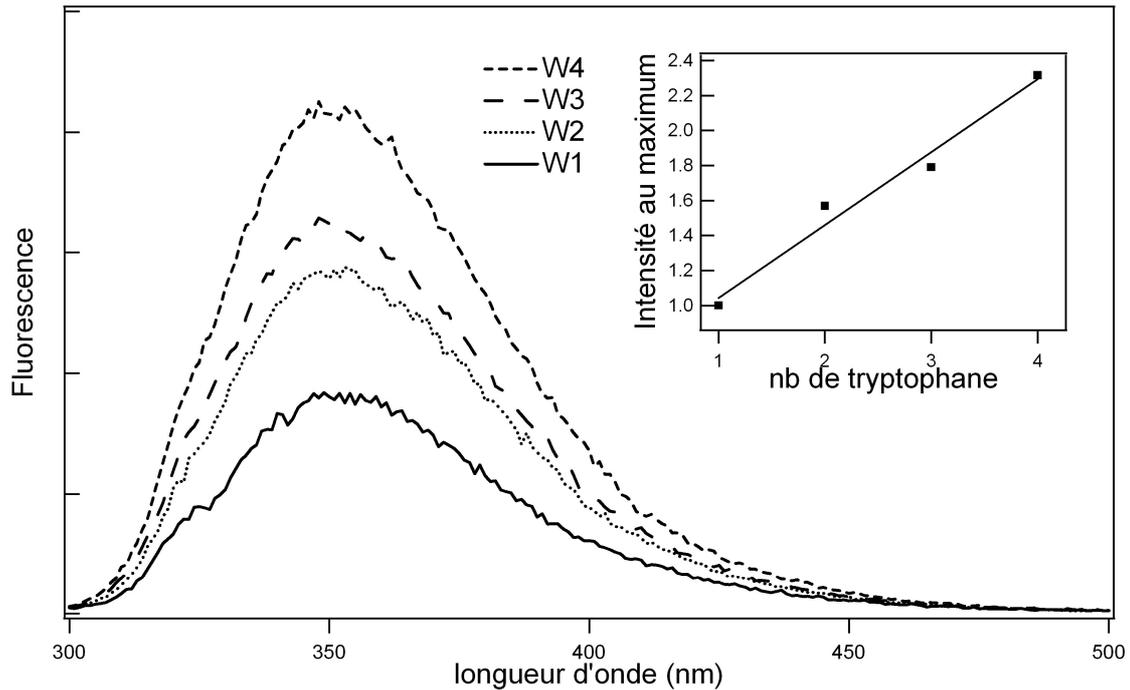


Figure 2-15 : Spectre de fluorescence des différents peptides pour une excitation à 290 nm.

Du point de vue de l'optique non linéaire, la construction de l'hyperpolarisabilité quadratique des petits peptides riches en Tryptophanes peut être estimée selon deux hypothèses, dans les deux cas le Tryptophane étant considéré comme une source non linéaire élémentaire. Dans la première hypothèse, les Tryptophanes d'un même petit peptide sont des sources élémentaires émettant des ondes harmoniques de phase indépendante aléatoire. Dans ce cas, le processus est incohérent, ce qui peut apparaître si l'orientation des Tryptophanes est totalement aléatoire malgré leur proximité. L'intensité à la fréquence harmonique est alors une fonction du nombre de Tryptophanes présents dans le peptide et par suite, en tenant compte d'une superposition incohérente au niveau de l'addition des ondes élémentaires émises par chacun des peptides présents dans la solution, cette intensité est aussi fonction du nombre total de Tryptophanes présents en solution. Dans la seconde hypothèse, les ondes harmoniques élémentaires émises par chacun des Tryptophanes d'un peptide s'ajoutent de manière cohérente, l'addition des ondes élémentaires émises par chacun des peptides restant elle incohérente. L'intensité est alors une fonction du produit entre le carré du nombre de Tryptophanes présents dans le peptide et la concentration de peptides en solution. Dans le premier cas, l'hyperpolarisabilité quadratique est une fonction de la racine carrée du nombre de Tryptophanes présents dans le peptide alors que dans le second cas c'est une fonction

directe du nombre de Tryptophanes. Ainsi par exemple, dans le cadre cohérent, l'hyperpolarisabilité du peptide W2 doit être égale à 2 fois celle du peptide W1. Dans le cas incohérent, le rapport n'est plus que $\sqrt{2}$. Dans tous les cas, ces deux hypothèses sont réalisées en négligeant les interactions des Tryptophanes entre eux. Les mesures d'hyperpolarisabilités de ces petits peptides riches en Tryptophanes montrent un comportement différent, voir Figure 2-16.

L'hyperpolarisabilité quadratique mesurée pour les petits peptides riches en Tryptophanes augmente de manière beaucoup plus forte avec le nombre de Tryptophanes présents dans la séquence que dans le cas du modèle cohérent, voir Tableau 8. Ce dernier modèle est par ailleurs celui qui conduit à la plus forte hyperpolarisabilité. Ces résultats expérimentaux sont donc en contradiction avec les prédictions théoriques ce qui nous conduit à rejeter les hypothèses initiales. En particulier, il est probable que les interactions entre Tryptophanes d'un même petit peptide ne puissent être négligées. Ces résultats sont intéressants à mettre en parallèle avec les résultats obtenus pour la fluorescence. Pour la fluorescence, l'intensité attendue pour le peptide W4 est supérieure de 2,3 fois à celle du peptide W1 alors que son hyperpolarisabilité est 10,7 fois plus grande et donc l'intensité HRS plus de 100 fois plus forte. L'effet observé en optique non linéaire est donc beaucoup plus violent que l'effet observé en optique linéaire. Ce résultat démontre une nouvelle fois dans quelle mesure la variabilité des paramètres du Tryptophane vis-à-vis de son environnement est importante ainsi que la plus grande sensibilité des paramètres non linéaires.

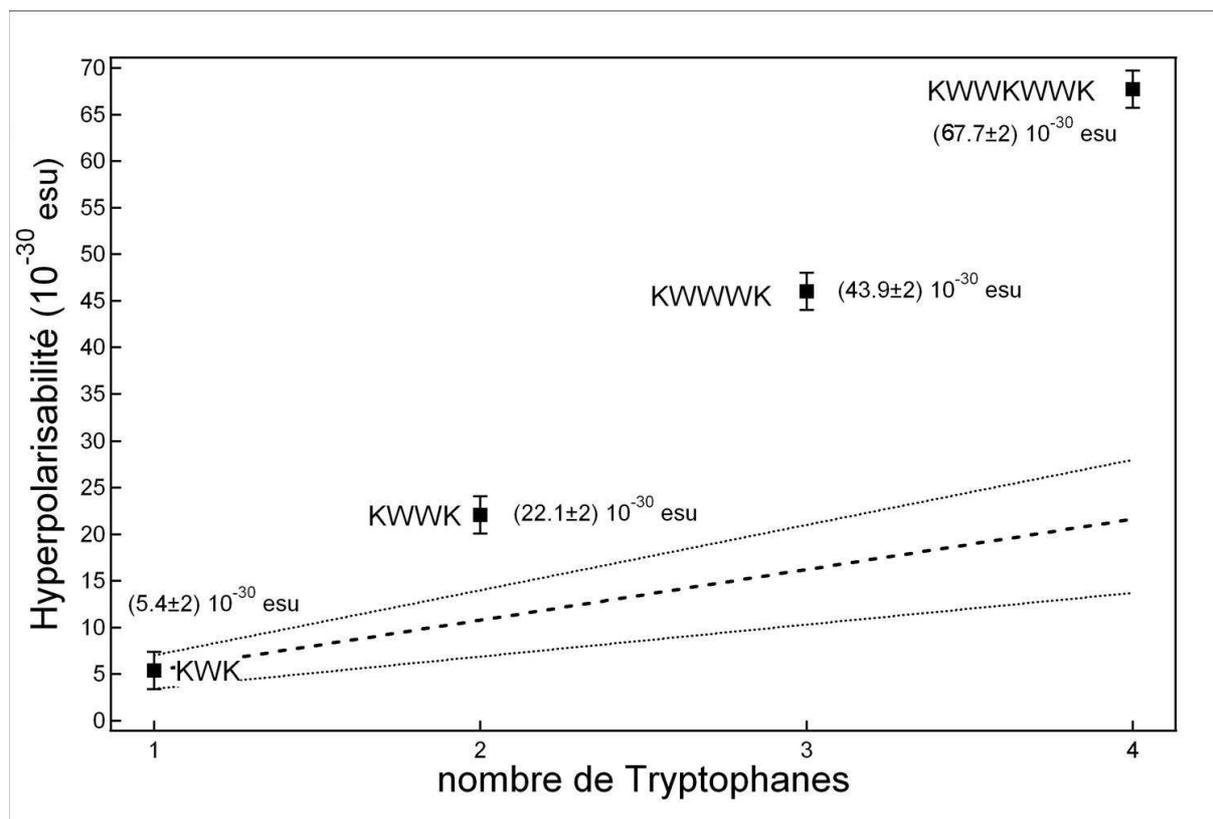


Figure 2-16 : Hyperpolarisabilité quadratiques des 4 peptides W_n , $n = 1 \dots 4$ (carrés noir). Construction cohérente de l'hyperpolarisabilité en considérant $W1$ comme brique élémentaire (ligne pointillée) ainsi que les valeurs extrêmes obtenues en tenant compte de l'erreur expérimentale.

L'environnement des Tryptophanes dans les différents peptides joue donc un rôle prédominant. Cet environnement proche est occupé par les Lysines qui solubilisent ces petits peptides au caractère hydrophobe en raison du caractère hydrophobe des Tryptophanes eux-mêmes. Ainsi, dans le peptide $W1$, la présence des Lysines fait fortement chuter l'hyperpolarisabilité effective du tryptophane. Nous avons déjà observé cette action des Lysines non greffées au Tryptophane. Pour le peptide $W2$, les deux Tryptophanes sont encadrés pour deux lysines. Malgré l'influence forte des Lysines et leur affinité pour les tryptophanes, ces interactions dans le peptide $W2$ seront moins prédominantes à la différence du $W1$, voir Figure 2-11, en raison de leur localisation en position extrême. Les Tryptophanes retrouvent donc un environnement moins perturbé par les Lysines bien que des interactions fortes entre les Tryptophanes puissent subsister. Il en résulte ainsi une augmentation importante de l'hyperpolarisabilité de $W2$ par rapport à celle de $W1$. Pour le peptide $W3$, les mêmes considérations sont valides, les Lysines étant tenues à l'écart des Tryptophanes. Leur

environnement est donc fortement découvert et il est probable que les interactions Tryptophane-Tryptophane dominant, si elles existent. Pour les peptides W2, W3 et W4, les simulations numériques ont cependant permis de montrer qu'il n'existe pas de conformation stable, contrairement au cas de W1 qui en possède 3, et les Tryptophanes explorent donc tout l'espace des conformations à leur disposition. L'hyperpolarisabilité calculée par Tryptophane présent dans chaque petit peptide se stabilise pour W3 et W4, indiquant que les Tryptophanes auraient rapidement un environnement sensiblement identique. Notons toutefois, que pour des raisons de solubilisation en milieu aqueux, il a été nécessaire de placer une lysine en position centrale dans la séquence du peptide W4.

	W1	W2	W3	W4
β (10^{-30} esu)	5.4 (2)	22.1 (2)	43.9 (2)	67.7 (2)
β (10^{-30} esu) / Nb	5.4	11.05	14.6	16.9

Tableau 9 : Valeurs de l'hyperpolarisabilité des peptides et de l'hyperpolarisabilité par Tryptophane présents dans le peptide.

L'intensité HRS des petits peptides riches en Tryptophanes est donc une fonction du nombre de Tryptophanes présents dans la séquence. Cette fonction n'est cependant pas une droite. De plus, l'augmentation de l'hyperpolarisabilité résultante avec ce nombre de Tryptophanes est largement plus forte que celle prédite par un modèle totalement cohérent de sources non linéaires élémentaires indépendantes. Avec les résultats précédents sur la variabilité de l'hyperpolarisabilité du Tryptophane vis-à-vis de son environnement, nos résultats démontrent clairement que des changements d'environnement, associés au remplacement progressif des Lysines comme plus proche voisins par des tryptophanes, sont responsables de la forte augmentation de l'hyperpolarisabilité de ces petits peptides riches en Tryptophanes.

2.1.5 Peptides membranaires

Après l'étude de petits peptides synthétiques riches en Tryptophanes, nous avons porté notre attention sur des petits peptides naturels contenant un nombre similaire de Tryptophanes, c'est-à-dire de un à quatre Tryptophanes. L'étude a été circonscrite aux peptides membranaires qui sont des petits peptides ayant une affinité importante pour les couches lipidiques. Ces peptides membranaires possèdent en général des tryptophanes pour des raisons d'hydrophobicité entre autres. Cependant, pour pouvoir dans un premier temps faire des mesures en diffusion hyper Rayleigh afin de déterminer les hyperpolarisabilités, ces peptides doivent d'abord être solubilisés. Malheureusement, la plupart d'entre eux ne sont pas solubles dans l'eau. Ainsi, l'étude de ces petits peptides a été réalisée dans un solvant différent, le Trifluoroéthanol (TFE). Nous avons mesuré l'hyperpolarisabilité de trois peptides naturels : la gramicidine, l'alaméthicine et la mélittine.

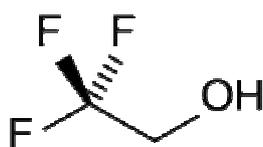
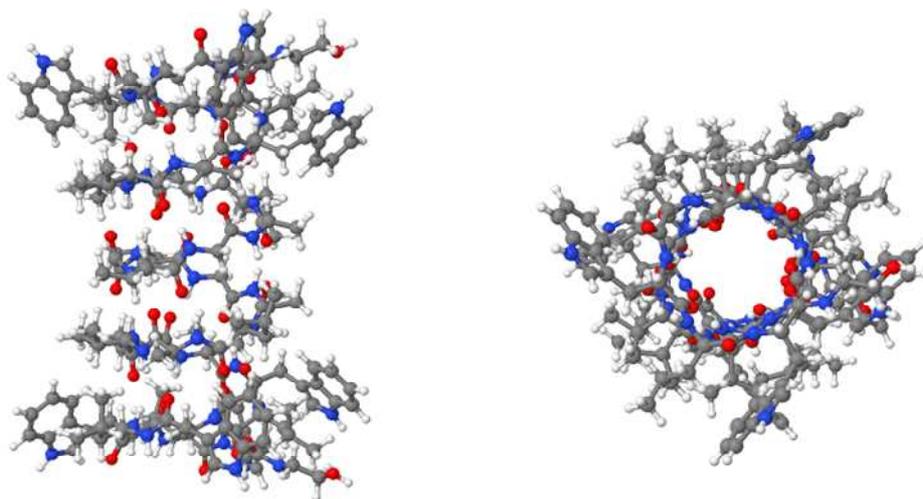


Figure 2-17 : trifluoroéthanol.

La gramicidine est un peptide hydrophobe dont la séquence est constituée de 15 acides aminés dont quatre sont des Tryptophanes. En milieu naturel dans les membranes, la gramicidine forme des tunnels permettant le passage des cations au travers de la membrane [25]. La séquence de la gramicidine est la suivante :



HCO-L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-**Trp**-D-Leu-L-**Trp**-D-Leu-L-**Trp**-D-Leu-L-**Trp**-NHCH₂CH₂OH

Figure 2-18 : dimère de gramicidine et sa séquence

Il est immédiat de constater que ces 4 Tryptophanes sont espacés de Leucines. Cependant, ce petit peptide contient le même nombre de Tryptophanes que le peptide synthétique W4 et il sera important de comparer son hyperpolarisabilité à celle de W4. L'hyperpolarisabilité du TFE a été mesurée tout d'abord par référence externe avec l'eau. Une valeur de $\beta = 0.63 \times 10^{-30}$ esu a été obtenue. De même, afin de pouvoir faire des comparaisons avec les résultats précédents obtenus en solution aqueuse, le Tryptophane et la Tyrosine ont été aussi solubilisés dans le TFE. Pour la Tyrosine, l'hyperpolarisabilité ne change presque pas puisque sa valeur est $\beta = (25.7 \pm 3) \times 10^{-30}$ esu dans le TFE. Pour le Tryptophane, il n'a malheureusement pas été possible de réaliser la mesure car celui-ci n'est pas soluble dans ce solvant. Il est fort probable que des agrégats se forment rendant la mesure impossible. Pour la gramicidine dissoute dans le TFE, une hyperpolarisabilité de $\beta = (48.5 \pm 3) \times 10^{-30}$ esu est mesurée.

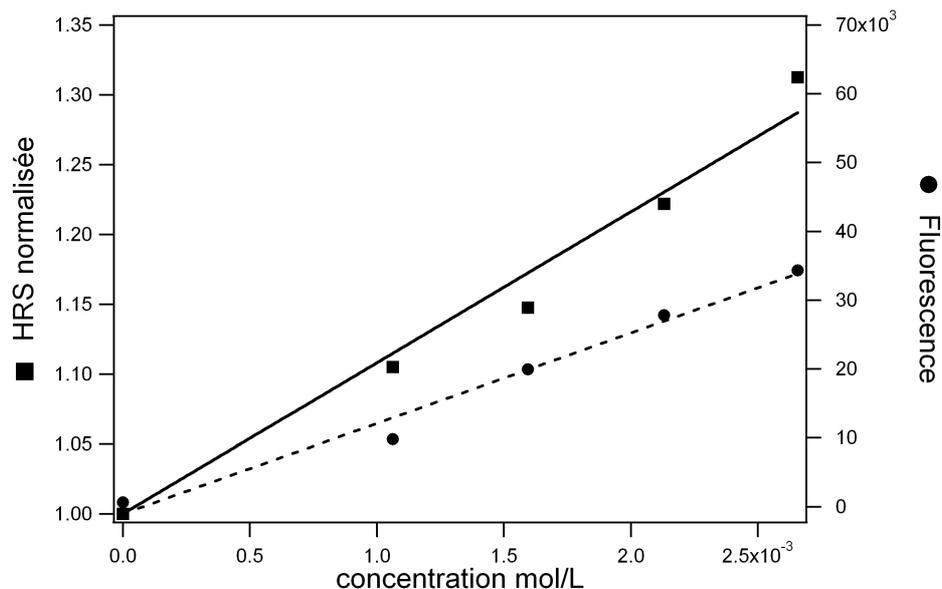
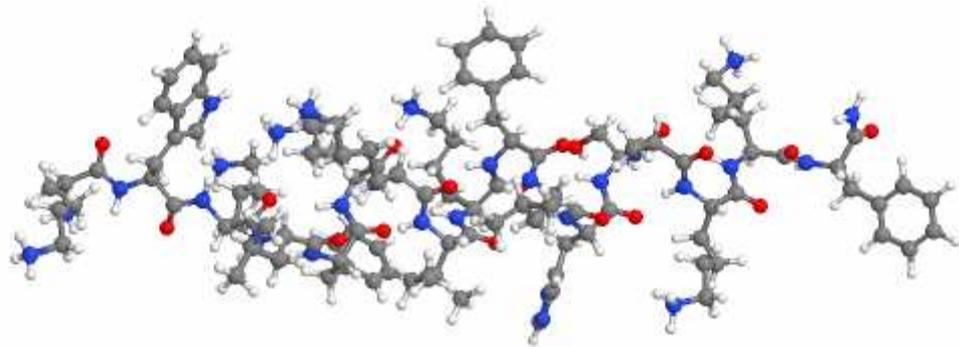


Figure 2-19 : Intensité HRS et fluorescence de la gramicidine en fonction de la concentration dans le TFE.

Nous remarquons que l'hyperpolarisabilité de la gramicidine est plus faible que la valeur de l'hyperpolarisabilité du petit peptide contenant 4 tryptophanes, W4. Même si le solvant est différent, nous pouvons quand même noter que pour la gramicidine, les Tryptophanes sont espacés par un acide aminé alors que dans le peptide synthétique les tryptophanes sont proches voisins, deux à deux. Comme déjà entrevu précédemment, cette proximité entre Tryptophanes peut affecter la réponse non linéaire et modifier l'hyperpolarisabilité. Néanmoins, d'autres paramètres sont susceptibles de perturber le système, conduisant à une hyperpolarisabilité différente, par exemple les structures secondaire ou tertiaire. Pour poursuivre cette étude, il faudrait donc en particulier connaître les conformations accessibles de ces peptides afin de déterminer l'environnement proche des Tryptophanes.

Nous avons ensuite étudié la mélittine, principal composant du venin d'abeille. Ce peptide est composé de 26 acides aminés et interagit fortement avec les membranes [26]. Ce peptide forme en effet des pores à la surface des membranes cellulaires, conduisant à la mort cellulaire [27]. La mélittine a déjà fait l'objet d'étude en Génération de Second Harmonique [28], mais dans le cadre d'étude en surface. L'étude en volume n'a cependant pas pu être menée à bien en raison du manque de signal, malgré une concentration maximale élevée.

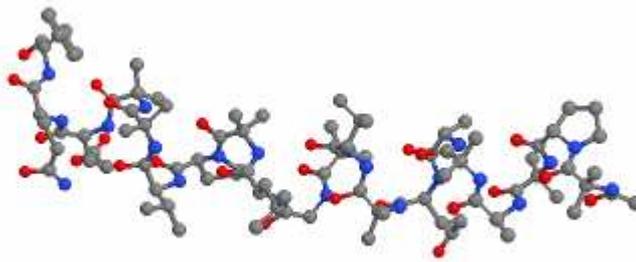
L'une des raisons pour cette absence de signal est lié au nombre de Tryptophanes présents dans la séquence, réduit à un seul.



Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-**Trp**-Ile-Lys-Arg- Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂

Figure 2-20 : mélittine et sa séquence d'acides aminés

L'alaméthicine est également un peptide membranaire qui en s'associant par 4 ou 6 unités forme des canaux dans les membranes. Ce peptide ne contient pas de Tryptophane et sans surprise aucun signal HRS n'a pu être mesuré.



Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phl

Figure 2-21 : alaméthicine et sa séquence d'acides aminés

De cette étude de petits peptides, nous pouvons donc conclure que l'hyperpolarisabilité d'acides aminés incorporés dans la séquence a pu être mesurée pour la première fois. Cependant, ces mesures restent difficiles comme le montrent les résultats infructueux sur la mélittine et l'alaméthicine. Dans tous les cas, un nombre suffisant de Tryptophanes combiné

à une solubilité suffisante sont nécessaires pour atteindre le seuil de sensibilité. Nos études montrent aussi que seuls certains acides aminés, en particulier le Tryptophane et la Tyrosine, sont de bons candidats comme sources non linéaires élémentaires endogènes. Il n'en reste pas moins que l'environnement proche de ces acides aminés est susceptible de considérablement modifier leur hyperpolarisabilité. De ce point de vue, le Tryptophane, très sensible à son environnement, est une excellente sonde endogène.

2.2 Génération de second harmonique du peptide W4

2.2.1 Introduction

La séquence d'acides aminés constituée par une succession de quelques Tryptophanes se rencontre régulièrement dans les protéines naturelles. De telles protéines de trois ou quatre tryptophanes séparés par une lysine ont ainsi des propriétés antimicrobiennes [20] ou participent à la pénétration des virus au travers des membranes [29, 30]. Les interactions de ces séquences peptidiques riches en Tryptophanes avec les membranes cellulaires, favorisées par le caractère hydrophobe des Tryptophanes, sont donc d'un très grand intérêt de manière générale. En collaboration avec l'équipe de biochimistes Organisation et Dynamique des Membranes Biologiques de l'Université Claude Bernard Lyon1, des mesures de génération de second harmonique sur des petits peptides riches en tryptophanes en interaction avec des membranes ont été effectuées.

La génération de second harmonique (SHG) est un outil optique supplémentaire adapté pour l'imagerie en biologie et plus particulièrement la caractérisation des interfaces telles que les membranes cellulaires. Le processus SHG est en effet un processus cohérent, correspondant à la conversion de deux photons de fréquence fondamentale en un photon de fréquence harmonique. L'intensité SHG dépend donc quadratiquement du nombre de sources non linéaires élémentaires. Cette intensité non linéaire est par conséquent très sensible à l'organisation des sondes à l'interface, contrairement à la microscopie de fluorescence à deux photons, qui est un processus non linéaire incohérent [31]. La génération de second harmonique a été observée pour la première fois dans du quartz cristallin dès 1962 par Franken *et coll.* [32] et peu de temps plus tard observée aussi aux interfaces par Bloembergen

et coll. [33]. Cette technique SHG est rapidement devenue ensuite une méthode classique de caractérisation des surfaces et les premières expériences sur des objets biologiques ont été menées par Freund dès 1986 sur des tendons de rat [34]. Afin d'obtenir une quantification de la réponse non linéaire des systèmes biologiques, Smiley et Vogel ont étudié des acides aminés aromatiques adsorbés en surface [5, 35-37]. Des dipeptides synthétiques à base de tryptophanes ont en particulier été étudiés et leur chiralité clairement observée [38], mettant ainsi en évidence la signature de la conformation de ces sondes moléculaires dans le signal SHG. Ces travaux ont été étendus à de plus grosses protéines comme la glucose oxydase ou le cytochrome c [39, 40]. Tous ces travaux ont permis d'obtenir des informations, au moins partielles, sur l'organisation de ces acides aminés et la conformation des protéines aux interfaces [9, 10].

2.2.2 Montage expérimental

2.2.2.1 Le puits

Afin de pouvoir étudier les peptides en interaction avec les couches lipidiques que constituent les membranes, ces dernières sont reconstituées et qualifiées de membranes biomimétiques. Pour reconstituer une telle membrane, les phospholipides sont déposés sur une interface liquide, usuellement l'interface air/eau. La densité surfacique en lipides est contrôlée par une mesure de pression de surface. Cette membrane est reconstituée dans un puits en Teflon d'une aire de 17 cm² et d'un volume total de 13 mL, voir Figure 2-22. Ce système est préféré à une cuve de Langmuir car le volume du puits est beaucoup moins important ce qui permet une utilisation moindre de produits chimiques ou biochimiques souvent onéreux. Une fois cette membrane reconstituée, le peptide est inséré dans le volume sous la membrane grâce à un trou dans le puits en Teflon afin de ne pas perturber la surface par une insertion à travers de la couche lipidique.

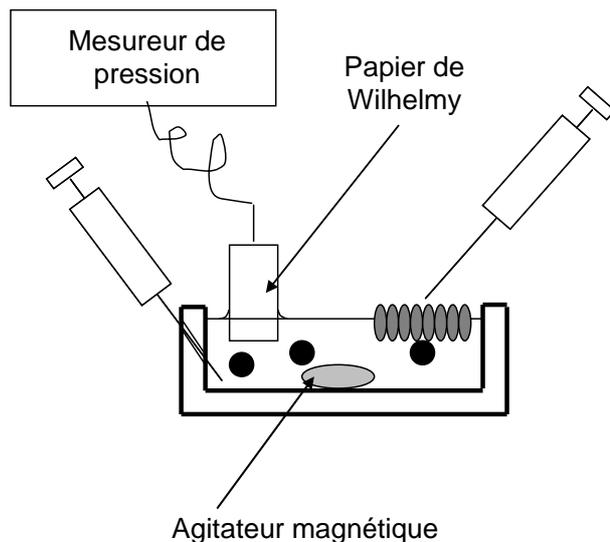


Figure 2-22 : Puits en Téflon d'une aire de 17 cm² et d'un volume total de 13 mL.

Un agitateur magnétique homogénéise le volume de la solution pour une obtention plus rapide d'un équilibre de la distribution volumique en peptide ajoutée. L'agitation est arrêtée lorsque le laser irradie la surface car elle produit des vibrations qui perturbent l'alignement des faisceaux. Le puits est rempli d'une solution aqueuse tris tamponnée à un pH de 8.5. La concentration de la solution en peptide injectée sous la surface est de 5.7 mM.

2.2.2.2 Le montage optique

L'interface est sondée par un faisceau Laser femtoseconde de grande puissance crête pour une intensité la plus grande possible à la fréquence harmonique. Pour pouvoir mesurer celle-ci avec une résolution en polarisation, un montage en incidence oblique est préféré, voir Figure 2-23.

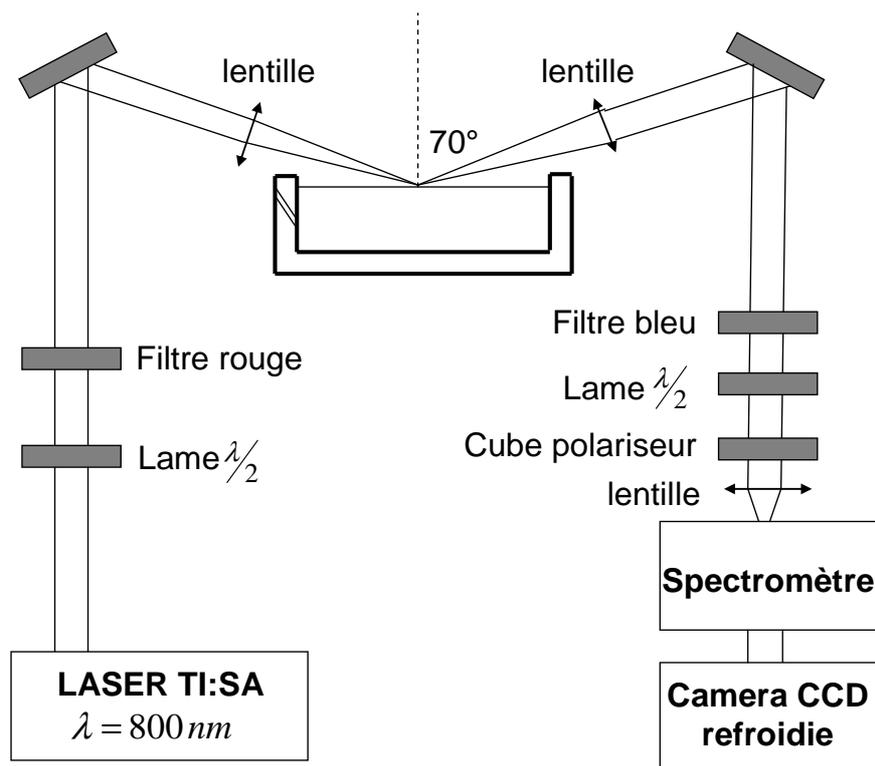


Figure 2-23 : montage expérimental de Génération de Second Harmonique de surface en incidence oblique.

La source Laser utilisée est un oscillateur femtoseconde Titane Saphir dont la longueur d'onde fondamentale a été fixée à 800 nm. Les impulsions sont de l'ordre de 100 femtosecondes pour un taux de répétition de 80 MHz. La polarisation du faisceau laser incident est linéaire, contrôlée par une lame demi-onde montée sur une platine motorisée pilotée par ordinateur. Un filtre rouge supprime les photons parasites provenant du laser de pompe ainsi que d'un fort signal de génération de second harmonique produit dans le quartz formant la lame demi-onde. Le faisceau Laser est focalisé sur la surface grâce à une lentille convergente de focale 10 cm et fait un angle d'environ 70° par rapport à la verticale. Cet angle d'incidence permet un optimum de l'intensité SHG produite sur une interface air-eau. La puissance laser au niveau de la surface est d'environ 0.5 W. Le faisceau harmonique est ensuite collecté par une autre lentille de distance focale égale à 10 cm. Un filtre bleu coupe la réflexion spéculaire du faisceau rouge toujours présent afin de ne pas avoir de phénomènes de doublage de fréquence dans les éléments optiques suivants, ceux-ci étant plutôt des éléments optiques ne pouvant soutenir les puissances crêtes à la fréquence fondamentale. Pour pouvoir sélectionner la polarisation du faisceau harmonique, une lame demi-onde et un cube

polariseur sont placés devant la lentille qui focalise le faisceau à l'entrée du spectromètre. Une caméra CCD permet l'enregistrement du spectre de l'intensité de second harmonique en fonction de la longueur d'onde, voir Figure 2-24.

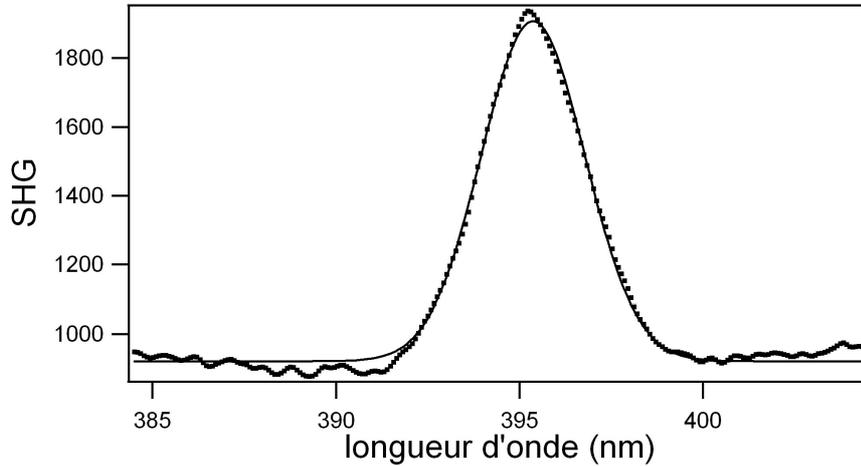


Figure 2-24 : spectre de seconde harmonique de l'interface air/eau, polarisation incidente : 0° . Analyseur : 0° . 60 secondes d'acquisition, puissance laser 0.5 W.

2.2.3 Théorie

Afin de calculer l'intensité du signal SHG réfléchi à l'interface, le modèle communément appelé le modèle de la feuille de polarisation [41] est utilisé. L'interface est représentée par un feuillet de polarisation non linéaire homogène situé à l'interface entre deux milieux isotropes linéaires, voir Figure 2-25. La polarisation non linéaire générée à la surface est de la forme :

$$\vec{P}(\vec{r}, 2\omega) = \epsilon_0 \vec{\chi} : \vec{E}(\vec{r}, \omega) \vec{E}(\vec{r}, \omega) \delta(z) \quad (2-1)$$

avec $\delta(z)$, fonction de Dirac indiquant que le feuillet de polarisation non linéaire est située en $z = 0$. $\vec{E}(\vec{r}, \omega)$ est le champ électrique de l'onde incidente au niveau de l'interface. Ce modèle permet d'introduire les propriétés linéaires du feuillet (milieu m) entre les deux phases volumiques (milieux 1 et 2) à travers les coefficients de Fresnel de passage des milieux 1 et 2 au feuillet m . Ainsi, les différentes réflexions et réfractions à chaque passage des ondes fondamentale et harmonique au travers du feuillet non linéaire sont prises en compte.

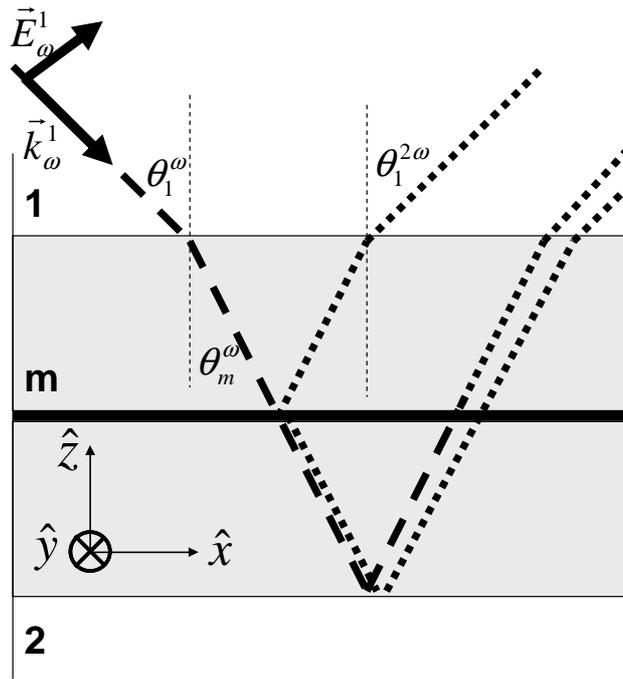


Figure 2-25 : Modélisation de l'interface.

L'intensité obtenue avec ce modèle est de la forme suivante [42]:

$$I_1^{2\omega} = \frac{1}{2} \frac{\omega^2}{\varepsilon_0 c^3} \frac{\text{Re} \sqrt{\varepsilon_1^{2\omega}}}{\text{Re} \sqrt{\varepsilon_1^\omega}} \frac{1}{\left| \sqrt{\varepsilon_m^{2\omega}} \cos \theta_m^{2\omega} \right|^2} |A|^2 (I_1^\omega)^2 \quad (2-2)$$

avec :

$$\begin{aligned} A = & a_1 \chi_{xxz} \sin 2\gamma \sin \Gamma \\ & + (a_2 \chi_{xxz} + a_3 \chi_{zxx} + a_4 \chi_{zzz}) \cos^2 \gamma \cos \Gamma \\ & + a_5 \chi_{zxx} \sin^2 \gamma \cos \Gamma \end{aligned} \quad (2-3)$$

où les coefficients a_1, a_2, a_3, a_4 et a_5 sont issus des angles d'incidence et des différents indices optiques, voir Tableau 10. L'angle γ est l'angle de polarisation de l'onde incidente. Lorsque $\gamma = 0$ la polarisation incidente est dite p et lorsque $\gamma = 90^\circ$ la polarisation incidente est dite s. L'angle Γ , angle de polarisation de l'onde harmonique, prend lui aussi les valeurs de 0° (polarisation P) ou 90° (polarisation S) selon les expériences.

coefficient	Valeur si l'indice de l'eau est non dispersif
a_1	0.342
a_2	-0.384
a_3	0.192
a_4	0.322
a_5	0.342

Tableau 10 : Valeurs des coefficients dans l'hypothèse d'une interface air/eau non dispersive

Les intensités harmoniques pour les polarisations usuelles P et S en fonction de la polarisation de l'onde incidente s'expriment donc sous la forme :

$$I_S^{2\omega} = K |a_1 \chi_{XXZ} \sin 2\gamma|^2 \quad (2-4)$$

$$I_P^{2\omega} = K |(a_2 \chi_{XXZ} + a_3 \chi_{ZXX} + a_4 \chi_{ZZZ}) \cos^2 \gamma + a_5 \chi_{ZXX} \sin^2 \gamma|^2 \quad (2-5)$$

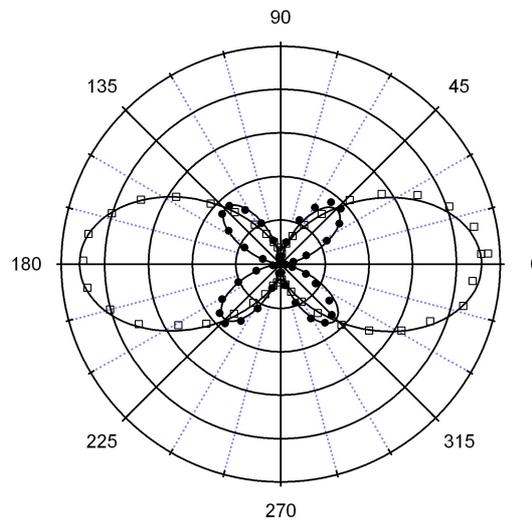


Figure 2-26 : courbes SHG résolues en polarisation de l'interface air/eau. Polarisation P (carrés vides) - Polarisation S (carrés pleins).

Pour l'interface air/eau pure, en l'absence de toute espèce en surface, l'intensité SHG possède deux maxima pour une courbe polaire en polarisation P et 4 maxima pour la courbe en polarisation S. L'ajustement des courbes expérimentales permet avec les formules (2-4) et (2-5) de remonter aux différents éléments du tenseur de susceptibilité χ , normalisés par rapport au coefficient le plus important, voir Tableau 11.

	Air/eau	Air/eau*
χ_{zzz}	1	1
χ_{zxx}	0.17±0.01	0.16
χ_{xxz}	0.38±0.01	0.39

Tableau 11 : valeurs des éléments du tenseur de susceptibilité pour l'interface air/eau -
* [43]

2.2.4 W4 à l'interface air/eau

2.2.4.1 Cinétique d'adsorption du peptide W4 à l'interface

Deux types de forces sont responsables de l'adsorption du peptide à une interface : les forces électrostatiques entre l'interface et le peptide et celles liées à son affinité hydrophile/hydrophobe pour l'un des deux milieux. Comme l'interface est initialement nue dans cette première étude, seule l'hydrophobicité du peptide W4 contribue à son adsorption. Une quantité de 60 μ L de solution contenant le peptide est insérée sous l'interface air/eau. L'agitateur homogénéise la solution pendant 10 secondes. Ensuite, l'intensité SHG est mesurée toutes les 60 secondes parallèlement à une mesure de la pression de surface. Les mesures sont effectuées dans la configuration de polarisation pP. Nous obtenons ainsi la cinétique de remontée du peptide à l'interface, voir Figure 2-27.

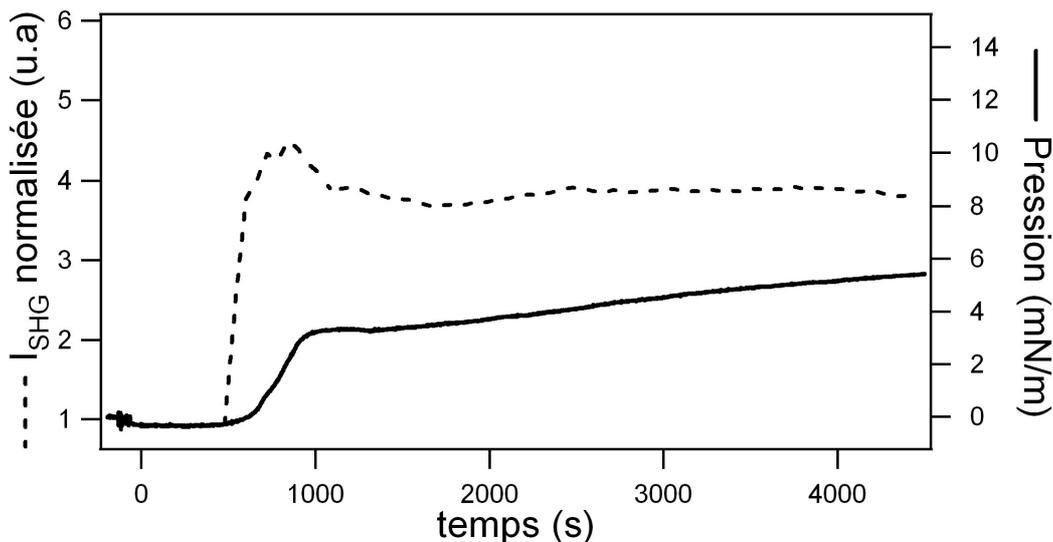


Figure 2-27 : Cinétique de la remontée du peptide W4 à l'interface air/eau pure

Lorsque le peptide est dans le volume, la pression est nulle et l'intensité SHG est celle de l'interface air/eau. Cette dernière est prise comme référence des intensités. Le peptide est initialement dans le volume de la phase aqueuse et la diffusion harmonique de lumière, ou HRS, est trop faible. L'angle solide de détection est peu adapté pour qu'un signal soit détecté, l'ouverture de spectromètre étant de quelques millimètres à une distance d'environ 2 m de l'interface. Seuls les photons émis par l'interface et répondant aux conditions de réflexion non linéaire peuvent atteindre le détecteur. Pendant les 500 premières secondes de l'expérience, le peptide se trouve exclusivement dans le volume puisque l'intensité SHG et la pression de surface sont identiques à celles mesurées à l'interface air/eau pure. Le signal SHG augmente ensuite d'un facteur 4 en moins de 120 secondes. Cette augmentation est associée au peptide qui remonte à l'interface par diffusion. Dans le même temps, la pression de surface augmente mais n'atteint un premier plateau qu'en 500 secondes. Pendant l'augmentation de la pression jusqu'à ce premier plateau, l'intensité SHG passe cependant par un maximum avant de diminuer et de se stabiliser à une valeur plateau. Nous remarquons donc que les comportements de l'intensité SHG et de la pression au cours du temps ne sont pas strictement corrélés.

Pour expliquer les résultats obtenus, nous proposons une approche microscopique. La susceptibilité quadratique de surface s'écrit en fonction du tenseur d'hyperpolarisabilité microscopique [42] :

$$\varepsilon_0 \chi_{IJK}^{(2)} = N \langle T_I^i T_J^j T_K^k \rangle \beta_{micro,ijk} \quad (2-6)$$

avec N le nombre de peptides à l'interface, T_I^i les éléments de la matrice d'Euler permettant le passage du référentiel microscopique au référentiel macroscopique et où les crochets $\langle \rangle$ représentent la moyenne sur toutes les orientations prises par les peptides à l'interface. L'hyperpolarisabilité intrinsèque d'un peptide est notée β . L'intensité SHG dépend donc quadratiquement du tenseur de susceptibilité. Lorsque que le peptide remonte à l'interface, le nombre de peptides N augmente et l'intensité augmente quadratiquement en N^2 . L'augmentation de l'intensité SHG est donc très rapide, plus rapide que l'augmentation de la pression qui dépend linéairement du nombre de peptides. Après un passage par un maximum, l'intensité SHG diminue sensiblement alors que la pression continue d'augmenter. Cette diminution ne peut donc pas être attribuée à la diminution du nombre N de peptides à l'interface. En revanche, une diminution de l'hyperpolarisabilité intrinsèque du peptide ou une réorientation à l'interface peut expliquer cette diminution. A ce stade, avec les résultats à notre disposition, il n'est pas possible de conclure à un scénario plutôt qu'un autre.

2.2.4.2 Etude en polarisation

Les intensités SHG obtenues en fonction des angles de polarisation dépendent de l'organisation des molécules à l'interface et de leur orientation [44]. En effet, si celles-ci se réorientent, les éléments du tenseur $\tilde{\chi}$ dans le référentiel du laboratoire changent et il est possible d'en déduire des indications relatives aux angles que font les molécules avec l'interface [45]. Une étude en polarisation a été effectuée sur l'interface lorsque le signal SHG est stabilisé, voir Figure 2-28. A partir de l'ajustement des courbes, nous avons extrait les éléments du tenseur de susceptibilité, voir Tableau 12. Ces éléments ne changent que très peu par rapport à l'interface air/eau pure. Il n'est donc pas possible d'en déduire une réorientation privilégiée des peptides à l'interface. En effet, une analyse fine de l'intensité détectée indique que celle-ci dépend à la fois de l'interface air/eau pure, des peptides adsorbés à l'interface et d'un terme d'interaction χ_I :

$$I_{SHG} \propto \left| N_{peptide} \chi_{peptide} + N_{air/eau} \chi_{air/eau} + \chi_I \right|^2 \quad (2-7)$$

En présence du peptide, le signal SHG augmente d'un facteur 4 par rapport à l'interface air/eau, indiquant que la contribution des peptides est largement du même ordre de grandeur que la contribution de l'interface pure. Toutefois, il est difficile de discuter de la séparation des termes propres aux peptides et d'interaction. Cette augmentation de l'intensité en présence des peptides reste cependant trop faible pour pouvoir négliger l'influence de la contribution de l'interface pure dans le signal SHG exprimé ci-dessus. Les courbes en polarisation décrites ci-dessous ne permettent donc malheureusement pas de dissocier les différentes contributions, celles de l'interface pure, des peptides et d'interaction, et donc ne permettent pas de déterminer avec plus de détails des phénomènes de réorientation particulière.

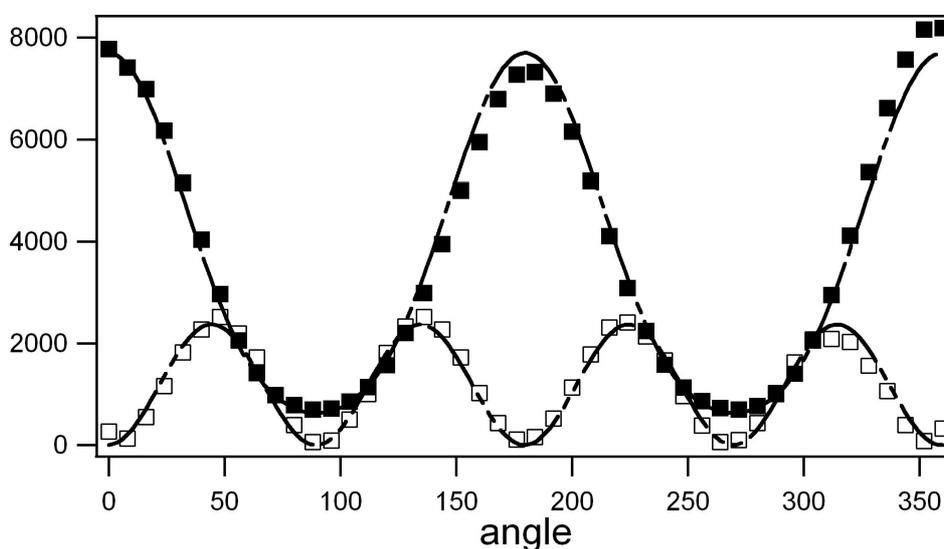


Figure 2-28 : Intensité SHG résolue en polarisation de l'interface air/eau + W4.

Polarisation P (carrés pleins) Polarisation S (carrés vides)

	Air/eau	Air/eau + W4
χ_{zzz}	1	1
χ_{zxx}	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.02
χ_{xxz}	0.38 ± 0.01	0.35 ± 0.02

Tableau 12 : éléments du tenseur de susceptibilité correspondant à la Figure 2-28

2.2.5 W4 aux interfaces lipidiques

2.2.5.1 Interfaces lipidiques

La présence de Tryptophanes, acides aminés hydrophobes, confère au peptide W4 des propriétés d'affinité avec l'interface air/eau. Ce peptide possède également 3 lysines. Ces lysines possèdent une chaîne carbonée terminée par un groupe amine, qui au pH de 8.5 est chargée positivement par protonation. Cette charge positive donne donc au peptide des propriétés électrostatiques qui peuvent être prédominantes dans l'interaction avec des membranes. Ces membranes sont constituées de cinq constituants différents en général : les acides gras, les triglycérides, les phosphoglycérides, les sphingolipides et les stérols [46]. Les lipides utilisés pour former les membranes sont composés de deux éléments, une tête hydrophile et une queue hydrophobe constituée de chaînes carbonées. La membrane cellulaire est donc formée par une bicouche de ces lipides dont la tête hydrophile est orientée vers l'extérieur et la queue hydrophobe vers l'intérieur de la membrane. Dans les membranes reconstituées, déposés à l'interface air-eau, une seule couche lipidique est présente avec la tête hydrophile pointant vers la phase aqueuse et la queue hydrophobe pointant dans l'air, voir Figure 2-29.

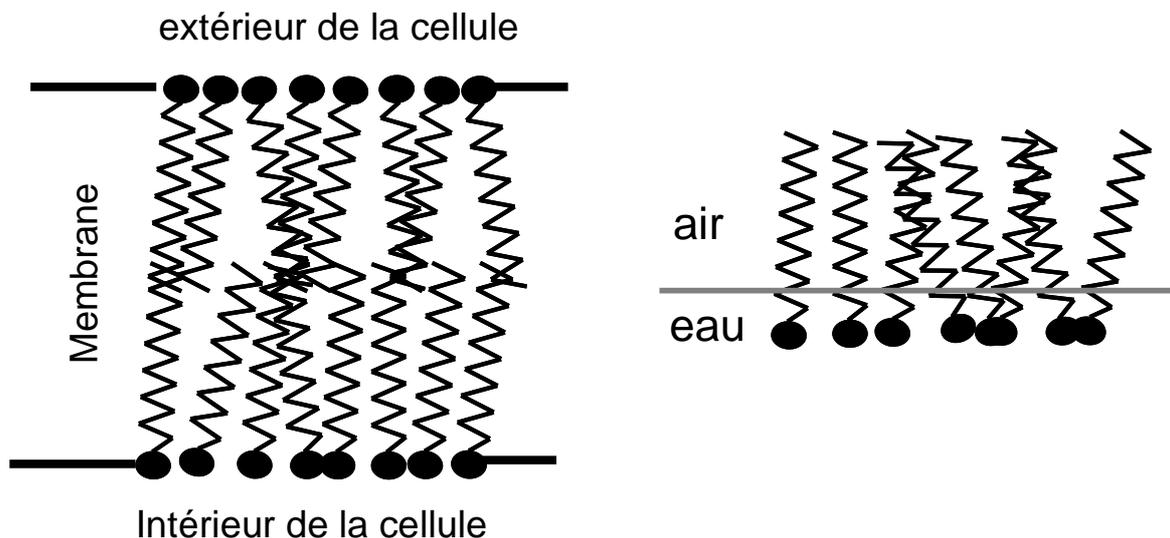


Figure 2-29 : schéma d'une membrane lipidique en cellule (gauche) et en dépôt à l'interface air/eau (droite)

Trois types de membranes biomimétiques ont été étudiés au cours de ce travail : (1) une membrane constituée de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), lipide chargé positivement, voir Figure 2-30, (2) une membrane de DPPG, lipide chargé négativement à pH 8.5, voir Figure 2-31, et (3) une membrane formée par un mélange de ces deux lipides dans les proportions de 30 % de DPPG et 70 % de DPPC. Pour obtenir des conditions similaires aux membranes, la concentration en lipides à l'interface a été ajustée afin d'obtenir une pression d'environ 24 mN/m, ce qui correspond à la pression présente dans ces membranes.

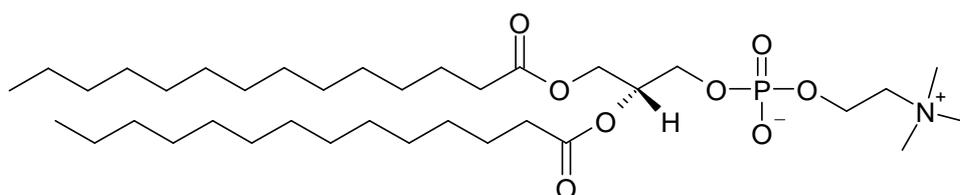


Figure 2-30 : lipide DPPC, zwitterionique.

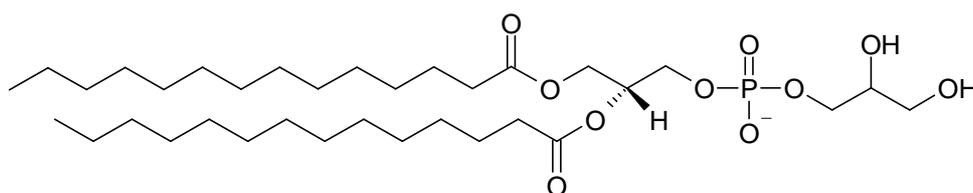


Figure 2-31 : lipide DPPG, anionique.

Avant d'incorporer le peptide sous la surface lipidique, une étude de l'intensité SHG résolue en polarisation a été effectuée sur les trois systèmes lipidiques. Les résultats sont donnés dans le Tableau 12.

	Air/eau	DPPG	DPPC	DPPG (30%) DPPC (70%)
χ_{zzz}	1	1	1	1
χ_{zxx}	0.17±0.01	0.14 ±0.02	0.15 ±0.02	0.11 ±0.02
χ_{xxz}	0.38±0.01	0.43 ±0.02	0.41 ±0.02	0.40 ±0.02

Tableau 13 : valeurs des composantes des tenseurs pour les trois interfaces lipidiques

Les différences d'intensité SHG relatives pour les interfaces lipidiques et l'interface air/eau sont nettes et peuvent être attribuées à la nature différente de l'interface puisque les molécules lipidiques s'orientent éventuellement différemment par rapport à l'interface. En revanche, entre les différents lipides, la charge lipidique ne modifie pas sensiblement le signal non linéaire. Notons enfin que ces résultats sont réalisés dans des expériences non résonantes.

2.2.5.2 Interaction entre W4 et les interfaces lipidiques

Une fois l'interface lipidique constituée, 8 μL de peptides W4 ont été incorporés sous la surface. La quantité de peptide utilisée est beaucoup moins importante que lors des précédentes expériences afin de préserver la couche lipidique. La première observation est que la remontée du peptide donne pour chaque interface des cinétiques très différentes. Pour l'interface DPPG, voir Figure 2-32, la remontée du peptide est très rapide, en raison probablement des charges négatives présentes dans la couche lipidique alors que les peptides sont chargés positivement à cause des lysines. Un plateau est atteint au bout de 1000 secondes environ.

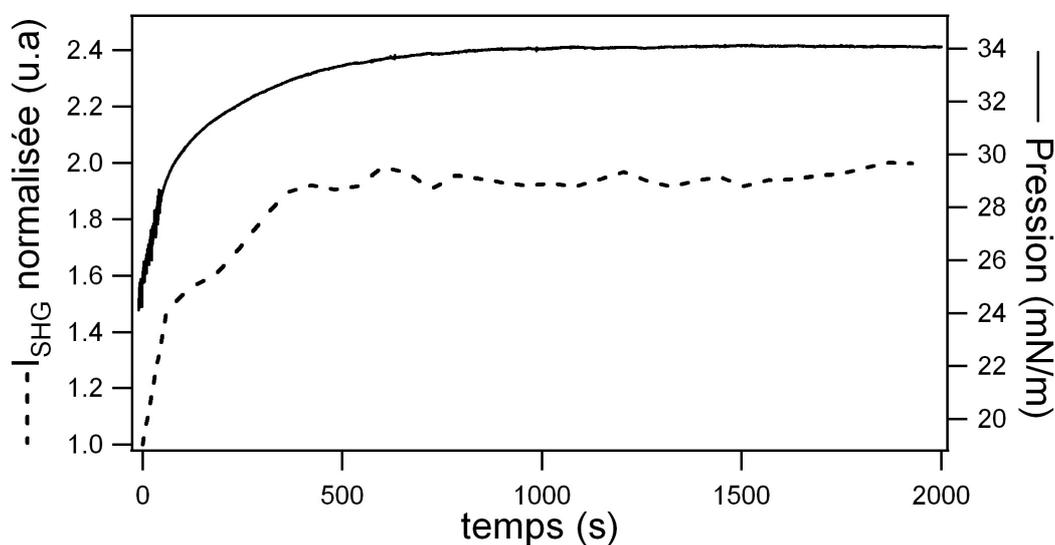


Figure 2-32 : cinétique de remontée du peptide à l'interface constitué de DPPG

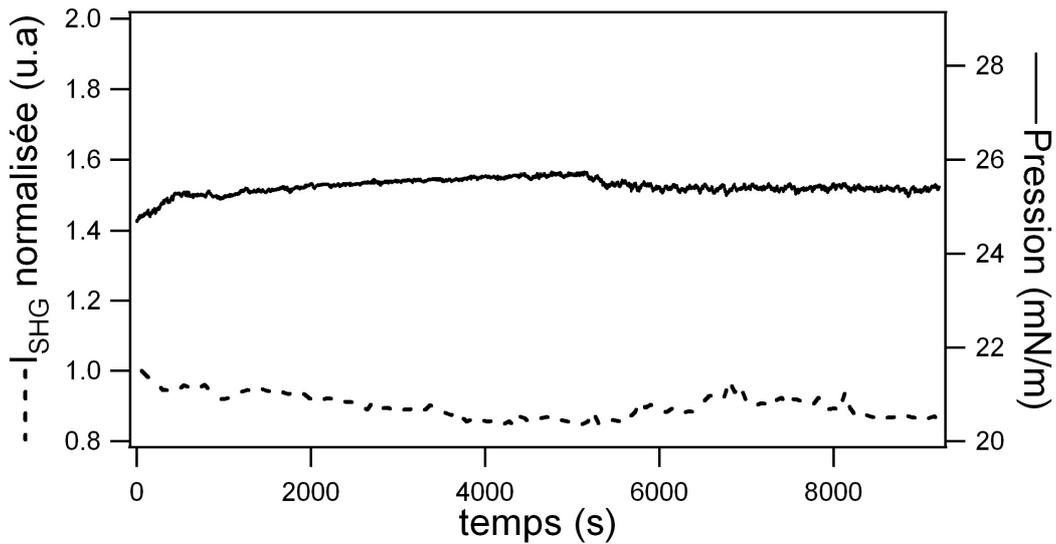


Figure 2-33 : cinétique de remontée du peptide à l'interface de DPPC

Pour l'interface DPPC, aucune augmentation du signal non linéaire ni aucune augmentation de pression ne sont observées, voir Figure 2-33. Le lipide neutre n'a pas d'affinité avec le peptide qui reste dans le volume de la sous-phase. Dans ces deux cas de membranes, nous observons une très bonne corrélation entre les mesures de pression de surface et d'intensité SHG. Nous pouvons raisonnablement attribuer la variation de l'intensité SHG à l'augmentation du nombre de peptides par unité de surface N , nombre de peptides à l'interface, voir équation (2-7).

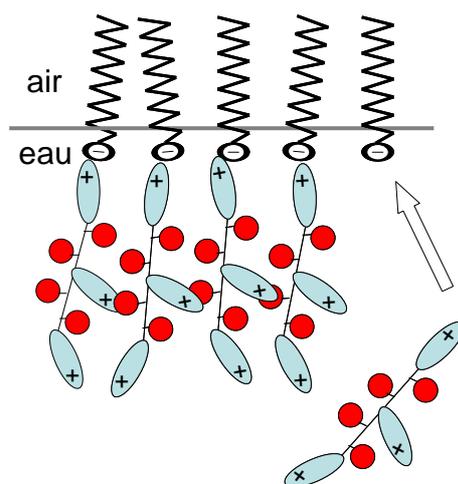


Figure 2-34 : Modèle de remontée du peptide à l'interface de DPPG. Sphère : tryptophane – Bâtonnet : lysine

Par contre, pour la membrane formée par un mélange lipidique, la pression n'augmente pas de manière continue et il existe visiblement des brisures de pentes. De plus, l'intensité SHG augmente dans un premier temps en suivant la pression puis diminue ensuite pour revenir à une valeur identique à celle obtenue pour l'interface lipidique pure, voir Figure 2-35, alors que la pression de surface reste à une valeur constante. Les comportements du signal SHG et de la pression ne sont donc pas corrélés comme dans les deux cas précédents.

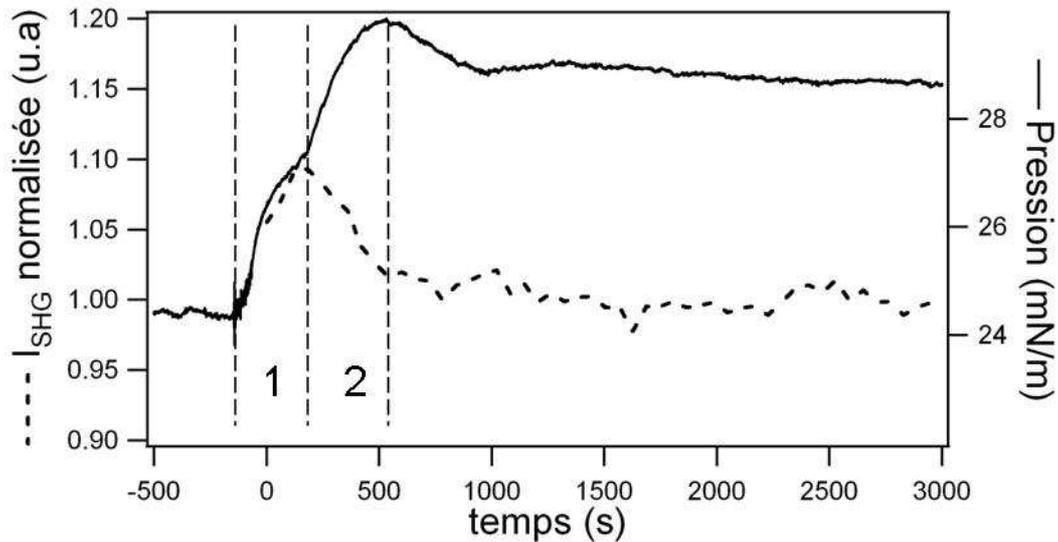


Figure 2-35 : Cinétique de remontée du peptide à l'interface constituée de 30% de DPPG et de 70% de DPPC

Dans la phase 1, la pression et l'intensité SHG augmentent simultanément. Si nous comparons à la cinétique de remontée avec l'interface de DPPG pure, la corrélation des deux mesures montre une augmentation du nombre N de peptides à l'interface. Toutefois, l'intensité SHG et la pression augmentent moins fortement pour la membrane mixte DPPG-DPPC car la présence d'une plus faible densité de charges électriques à la surface contribue moins efficacement à l'adsorption des peptides. Dans la phase 2, trois possibilités peuvent expliquer une telle diminution de l'intensité SHG. Tout d'abord, l'intensité diminue car le nombre N de peptides à l'interface diminue. Cette hypothèse est peu envisageable car l'augmentation de la pression au cours de cette phase démontre plutôt que les peptides sont toujours présents à l'interface. La diminution peut alors être attribuée soit à une réorientation particulière des peptides soit à une diminution de la valeur des composantes du tenseur d'hyperpolarisabilité intrinsèque du peptide. Dans l'hypothèse où un seul élément non nul de

l'hyperpolarisabilité est l'élément $\beta_{mic,zzz}$ d'un Tryptophane, alors nous pouvons exprimer l'élément prédominant du tenseur de susceptibilité en configuration pP, voir équation (2-5), en fonction de l'orientation du Tryptophane par rapport à l'interface :

$$\chi_{zzz}^{(2)} = \frac{N}{\epsilon_0} \langle \cos^3 \theta \rangle \beta_{mic,zzz} \quad (2-8)$$

où θ est l'angle entre l'axe z du référentiel microscopique du Tryptophane et l'axe Z du référentiel macroscopique du laboratoire, c'est-à-dire la normale à l'interface. La composante $\chi_{zzz}^{(2)}$ s'annule si tous les tryptophanes des peptides s'orientent parallèlement à la surface. Il est toutefois peu probable que la diminution observée de l'intensité SHG au cours de cette phase puisse être attribuée à une telle orientation collective des Tryptophanes. L'intensité peut enfin également diminuer si l'hyperpolarisabilité intrinsèque du tryptophane diminue. Si le tryptophane est dans un environnement hydrophobe son hyperpolarisabilité diminue d'un facteur 2, cf. paragraphe 2.1.3.2. Lorsque le Tryptophane s'insère dans la membrane lipidique hydrophobe, l'intensité SHG diminue effectivement pour cette raison. L'augmentation de la pression au cours de la phase 2 tend à montrer une pénétration des Tryptophanes dans la couche lipidique en accord avec cette origine de la diminution en intensité SHG.

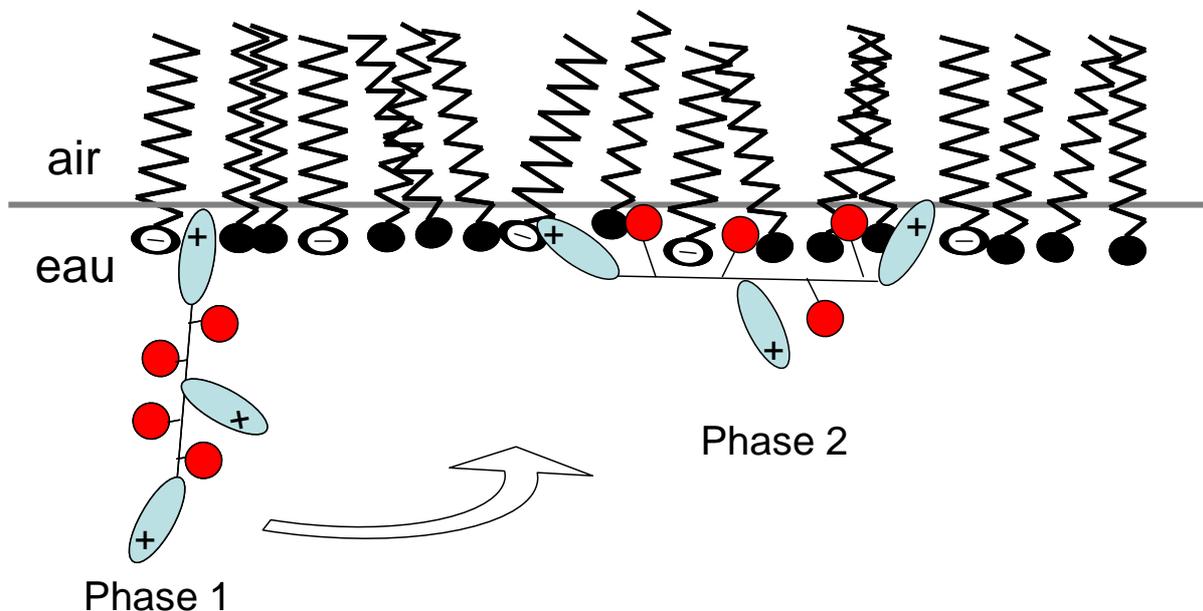


Figure 2-36 : modèle de l'arrangement du peptide à l'interface du mélange DPPG-DPPC.

Au cours de la phase 2, les lysines du peptide se rapprochent des lipides chargés et permettent aux Tryptophanes de pénétrer dans la couche lipidique. Cette opération n'est pas possible lorsque la membrane est uniquement composée de DPPC. En effet, il semblerait que l'affinité soit apportée par la charge électrostatique des DPPG en interaction avec les lysines peptidiques. L'encombrement différent entre les couches lipidiques pures DPPG et mixtes DPPG-DPPC impose de plus visiblement une forte réorganisation. A proximité des lipides hydrophobes, l'hyperpolarisabilité des Tryptophanes diminue fortement.

Nous avons ainsi clairement mis en évidence l'utilité de la technique SHG aux interfaces pour étudier l'environnement et l'organisation de petits peptides d'intérêt biologique riches en Tryptophanes en interaction avec une interface lipidique. Ajoutons de plus que les quantités de peptides mises en jeu dans ces expériences sont compatibles avec les contraintes des concentrations employées en biochimie.

2.3 Conclusions

Pour la première fois, les briques élémentaires constituant les protéines, les acides aminés, ont été caractérisés en diffusion hyper Rayleigh. Au delà de la simple mesure de l'hyperpolarisabilité, ces mesures ont montré qu'il existe une forte dépendance de la réponse non linéaire du Tryptophane en fonction de son environnement. Cette propriété permet d'envisager d'utiliser le Tryptophane comme sonde de son environnement en SHG et comprendre la construction de l'hyperpolarisabilité au sein de peptides. En effet, la diffusion hyper Rayleigh de peptides riches en tryptophanes dépend de l'environnement des tryptophanes et donc de manière forte de la conformation de ces peptides, que ce soit en solution ou bien à l'interface, en interaction avec une membrane. Comprendre la construction de la réponse non linéaire des biomolécules permettra de quantifier dans le futur les hyperpolarisabilités de protéines puis de protéines complexes. Toutes ces informations ont ensuite été mises à profit pour analyser le comportement du peptide W4 aux interfaces. Ainsi, l'utilisation conjointe de la génération de second harmonique et de la diffusion hyper Rayleigh a permis d'apporter les réponses aux questions fondamentales sur les processus de doublage de fréquence dans des biomolécules et également d'envisager des applications de ces techniques à des fins biochimiques.

2.4 Bibliographie

- [1] L. Moreaux, O. Sandre and J. Mertz, *J. Opt. Soc. Am. B*, **17**, (2000) 1685-1694
- [2] L. Moreaux, O. Sandre, M. Blanchard-Desce and J. Mertz, *Opt. lett.*, **25**, (2000) 320-322
- [3] J. Zyss, T. C. Van, C. Dhenaut and I. Ledoux, *J. Chem. phys.*, **177**, (1993) 281-296
- [4] K. Clays, E. Hendrickx, M. Triest and A. Persoons, *J. Mol. Liquids.*, **67**, (1995) 133-155
- [5] B. L. Smiley and V. Vogel, *J. Chem. Phys.*, **103**, (1995) 3140
- [6] K. E. Rieckhoff and W. L. Peticolas, *Science*, **147**, (1965) 610-611
- [7] G. Revillod, I. Russier-Antoine, E. Benichou, C. Jonin and P. Brevet, *Nonlinear Opt. Quantum Opt.*, **35**, (2006) 135-135
- [8] G. Revillod, I. Russier-Antoine, E. Benichou, C. Jonin and P. F. Brevet, *J. Phys. Chem. B*, **109**, (2005) 5383-5387
- [9] K. Clays, E. Hendrickx, M. Triest, T. Verbiest, A. Persoons, C. Dehu and J. L. Brédas, *Science*, **262**, (1993) 1419-1422
- [10] J. S. Salafsky, *J. Chem. phys.*, **125**, (2006) 074701-7
- [11] A. Srivastava and K. B. Eisenthal, *Chem. Phys. Lett.*, **292**, (1998) 345-351
- [12] J. L. Oudar and J. Zyss, *Phys. Rev. A*, **26**, (1982) 2016-2016
- [13] C. Barsu, R. Fortrie, K. Nowika, P. L. Baldeck, J. C. Vial, A. Barsella, A. Fort, M. Hissler, Y. Bretonnière and O. Maury, *Chem. Com.*, **2006**, (2006) 4744-4746
- [14] G. D. Fasman, *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Proteins*, 1976
- [15] J. Guthmuller and D. Simon, *J. Phys. Chem. A*, **110**, (2006) 9967-9973
- [16] J. Lorentzon, P. Malmqvist, M. Fölscher and B. O. Roos, *Theor. Chim. Act.*, **91**, (1995) 91-108
- [17] L. Serrano-Andres and B. O. Roos, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, (1996) 185-195
- [18] C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvét, S. Perun and A. L. Sobolewski, *J. Phys. Chem. Chem. Phys.*, **5**, (2003) 5118-5126
- [19] K. Y.-T. Zhang L. , Qiu W., Wang L. and Zhong D. , *J. Phys. Chem. B.*, **110**, (2006) 18097-18103

-
- [20] D. I. Chan, E. J. Prenner and H. J. Vogel, *BBA-Biomembranes*, **1758**, (2006) 1184-1202
- [21] D. Rativa, A. S. Gomes, S. Wachsmann-Hogiu, D. L. Farkas and R. E. de Araujo, *J. Fluoresc.*, (2008)
- [22] K. F. Willey, P. Y. Cheng, K. D. Pearce and M. A. Duncan, (2002)
- [23] R. Antoine, T. Tabarin, M. Broyer, P. Dugourd, R. Mitric and V. Bonacic-Koutecky, *J. Chem. phys.*, **7**, (2006) 524-8
- [24] A. S. Ladokhin and P. W. Holloway, *Biophys. J.*, **69**, (1995) 506–517-506–517
- [25] S. B. Hladky and D. A. Haydon, *Biochim. Biophys. Acta.*, **274**, (1972) 294-312
- [26] G. Schwarz and G. Beschiaschvili, *Biochim. Biophys. Acta.*, **979**, (1989) 82-90
- [27] S. Rex, *Biophys. chem.*, **58**, (1996) 75-85
- [28] K. M. A. Conboy John C., *An. Chim. Act.*, **496**, (2003) 143-153
- [29] F. Penin, V. Brass, N. Appel, S. Ramboarina, R. Montserret, D. Ficheux, H. E. Blum, R. Bartenschlager and D. Moradpour, *J. Bio. Chem.*, **279**, (2004) 40835-40835
- [30] D. Moradpour, F. Penin and C. M. Rice, *Nature Rev. Microbiol.*, **5**, (2007) 453-463
- [31] W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb, *Science*, **248**, (1990) 73-76
- [32] D. A. Kleinman, *Phys. Rev.*, **126**, (1962) 1977-1979
- [33] N. Bloembergen and P. S. Pershan, *Phys. Rev.*, **128**, (1962) 606-606
- [34] I. Freund, M. Deutsch and A. Sprecher, *Biophys. J.*, **50**, (1986) 693-712
- [35] V. Vogel and B. L. Smiley, Proceedings of SPIE, 1992
- [36] B. L. Smiley and V. Vogel, *J. Chem. phys.*, **103**, (1995) 3140-3140
- [37] B. L. Smiley and V. Vogel, Proceedings of SPIE, 1995
- [38] S. A. Mitchell and R. A. McAloney, *J. Phys. Chem. B*, **109**, (2005) 15178-15178
- [39] J. Rinuy, P. F. Brevet and H. H. Girault, *Biophys. J.*, **77**, (1999) 3350-3355
- [40] T. P. Petrali-Mallow, A. L. Plant, M. L. Lewis and J. M. Hickss, *Langmuir*, **16**, (2000) 5960-5966
- [41] V. Mizrahi and J. E. Sipe, *J. Opt. Soc. Am. B*, **5**, (1988) 660-667
- [42] P. F. Brevet, *Surface second harmonic generation*, Presses polytechniques et universitaires romandes, 1997

- [43] A. A. Tamburello Luca, P. Hébert, P. F. Brevet and H. H. Girault, *J. Chem. Soc.. Farad. trans.*, **91**, (1995) 1763-1768
- [44] G. Martin-Gassin, E. Benichou, G. Bachelier, I. Russier-Antoine, C. Jonin and P. F. Brevet, *J. Phys. Chem.*, **112**, (2008) 12958–12965
- [45] G. J. Simpson, S. G. Westerbuhr and K. L. Rowlen, *Anal. Chem.*, **72**, (2000) 887-898
- [46] D. Voet and J. G. Voet, *Biochemistry*, J. Wiley & Sons, 1995

Chapitre 3: Détection de particules uniques et cartographie HRS en 3 dimensions

3.1 Introduction

La détection d'objets uniques dont les dimensions sont beaucoup plus petites que la longueur d'onde de la lumière est devenue un grand défi technique dans le domaine des nano sciences. Les nano particules, dont les propriétés physiques sont très variées, sont synthétisées régulièrement dans les laboratoires et la nécessité d'outils pour leur caractérisation est devenue incontournable. Les mesures moyennes réalisées sur un grand nombre de nano-objets sont en effet insuffisantes pour donner une image exacte de l'échantillon produit. Une grande dispersion dans les propriétés physiques des nano-objets de synthèse est souvent rencontrée et, par conséquent, ces propriétés physiques doivent être précisément évaluées. Par exemple, les images de microscopie électronique en transmission (TEM) permettent d'avoir accès à la morphologie des particules métalliques de taille nanométrique ainsi que la taille. Cependant, une description exacte de la solution de l'échantillon exige des images TEM d'un grand nombre de ces particules. Néanmoins, les deux approches, à savoir d'une part la mesure sur des particules uniques répétées sur un grand nombre de particules et d'autre part la mesure sur de grands ensembles de particules, permettent d'obtenir des informations complémentaires. Récemment, les techniques de particules uniques ont été appliquées à l'observation de la partie linéaire des propriétés optiques des nano particules métalliques, en particulier les sections efficaces d'extinction et d'absorption qui ont pu être comparées à la spectroscopie d'absorption UV-Visible sur les grands ensembles de nanoparticules métalliques dispersées dans une matrice solide ou dans une solution liquide [1-3]. Avec ces techniques, des particules aussi petites que 1,5 nm de diamètre ont été observées [2, 4]. Ces petites particules ont également été observées dans le temps au cours du processus de diffusion. Dans ce cas, l'accent a été mis sur la localisation de la particule plutôt que sur ses propriétés optiques.

En SHG, les études sur des particules isolées sont rares [5] bien que l'intérêt pourrait être important en raison de la nature différente de l'origine de la réponse non linéaire par rapport à la réponse en optique linéaire. En effet, il a été rapporté que les propriétés de surface

plutôt que de volume peuvent être accessibles avec la génération de seconde harmonique (SHG) [6, 7]. Dans les milieux possédant un centre d'inversion, ce processus de conversion est interdit dans l'approximation dipolaire électrique. Ce processus ne peut donc se produire qu'à l'interface entre deux de ces milieux, comme c'est le cas pour les surfaces d'or ou d'argent. Ici, il est important de souligner que la forme des particules, centrosymétrique ou non, joue un rôle majeur dans le processus de SHG [6]. Il est toutefois difficile de réaliser la synthèse de particules sphériques, ou autres, parfaitement définies. Les synthèses de ces particules peuvent donc être caractérisées même lorsque celles-ci sont dispersées dans un milieu centrosymétrique comme une matrice d'alumine ou une phase liquide. Dans ces deux cas, un signal incohérent de HRS peut être émis, provenant des fluctuations d'orientation des particules dans la matrice [8, 9]. Cette technique a été largement utilisée pour déterminer l'hyperpolarisabilité de molécules en phase liquide dans le passé [10] et a conduit à l'observation de très grandes valeurs de l'hyperpolarisabilité pour des particules métalliques dont le diamètre varie entre quelques nanomètres et une centaine de nanomètres [11].

Dans ce chapitre, nous avons pour la première fois réalisé une série d'expériences où la détection d'une seule nano particule d'argent d'un diamètre de 80 nm dispersée dans une solution aqueuse est obtenue par diffusion Hyper Rayleigh. Bien que le dispositif expérimental soit classique, cette détection a nécessité des temps d'acquisition longs et le développement d'un modèle statistique. Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous décrirons un nouveau montage expérimental où les particules métalliques sont dispersées dans une matrice de gélatine transparente, les particules étant alors immobiles à l'échelle des dimensions du volume sondé et des temps d'acquisition. La position de l'échantillon est contrôlée par 3 platines de translation micrométriques et il est ainsi possible de faire des cartographies en trois dimensions de la diffusion harmonique de nano particules uniques. La technique a préalablement été expérimentée sur des billes fluorescentes de latex. Cette méthode devrait ouvrir la voie à des études plus raffinées sur les systèmes de nano objets uniques. La détection de molécules uniques a déjà été réalisée avec des techniques axées sur l'émission de lumière, par exemple par fluorescence [12], la diffusion Raman [13] ou la spectrométrie d'absorption [14]. Avec les techniques d'optique non linéaire, seule la génération de deuxième harmonique de particules uniques déposées sur un substrat [15] et de génération de troisième harmonique (THG) [16] ont été étudiées.

3.2 Détection dynamique HRS de nano particules d'argent d'un diamètre de 80 nm

3.2.1 Résultats expérimentaux

La procédure standard dans la détermination de l'hyperpolarisabilité de nano particules métallique par diffusion Hyper Rayleigh consiste à mesurer de l'intensité non linéaire en fonction de la concentration. Cette intensité s'écrit :

$$I_{HRS} = G' I_{\omega}^2 (N_{\text{solvant}} \beta_{\text{solvant}}^2 + N_{\text{part}} \beta_{\text{part}}^2) \quad (3-1)$$

où G' est une constante prenant en compte la géométrie du système expérimental, cf. Chapitre 1. Aux fortes concentrations en particules, le nombre de photons provenant des particules est nettement supérieur au nombre provenant du solvant. Il est ainsi facile d'extraire la valeur de l'hyperpolarisabilité après normalisation par la méthode de la référence interne ou externe. En revanche, à de faibles concentrations en particules métalliques, la contribution de l'intensité HRS des particules est seulement une petite fraction de la contribution du solvant seul et par conséquent il est nécessaire de faire de longues acquisitions afin d'améliorer la statistique de la mesure. Dans le but de détecter une seule particule, le principe de la mesure consiste à compter les photons harmoniques au cours d'un bref intervalle de temps, un très grand nombre de fois. La diffusion HRS est cependant généralement faible et une haute sensibilité de détection doit être utilisée. Un autre problème présent pour la détection des particules est le problème de la réponse du solvant. Il est en effet généralement plus commode de travailler sur un fond sombre, c'est-à-dire en l'absence de photons produit par l'environnement. Malheureusement, comme pour les particules, les molécules de solvant produisent un signal HRS. Cette contribution peut facilement dominer la réponse attendue par une seule particule en raison du grand nombre de molécules de solvant présentes dans le volume sondé. La principale difficulté dans cette mesure à faible concentration réside donc aussi dans la définition appropriée de la durée de ces petits intervalles de temps pendant lesquels la mesure est réalisée. Le mouvement brownien des particules dans la phase liquide les fait entrer et sortir du volume sondé au cours de l'expérience. À forte concentration, à savoir lorsque le nombre de particules est élevé dans le volume d'excitation, le nombre de photons harmoniques émis correspond au nombre de photons émis par un nombre moyen de particules

présentes dans le volume. Les fluctuations du nombre de photons comptés dans un intervalle donné dues aux fluctuations du nombre de particules dans le volume sondé sont négligeables devant les fluctuations propres du taux de comptage liées à la statistique même de l'opération de comptage. Cependant, pour un petit nombre de particules présentes dans le volume sondé, et de manière ultime lorsqu'une seule particule est présente dans le volume, le nombre de photons comptés correspond à la somme du nombre de photons comptés lorsque la particule est présente dans le volume et lorsque la particule en est absente. Il s'agit donc d'une valeur moyenne de ces deux configurations, pondérée par le ratio de la durée totale des deux types de périodes : lorsque la particule est présente et lorsque celle-ci est absente. Il est clair que les meilleures conditions de mesure sont obtenues lorsque la durée d'acquisition est proche de la durée du temps de résidence de la particule dans le volume sondé, voire inférieure. En supposant que le mouvement brownien donne une limite supérieure pour le temps de résidence, en phase liquide sans précaution particulière la convection est aussi présente, cette durée a été fixée à 0,5 seconde. Cette valeur est basée sur une estimation du coefficient de diffusion de la particule par la relation de Stoke-Einstein pour des particules de 80 nm de diamètre en phase aqueuse.

Les expériences ont été menées sur des particules d'argent de 80 nm de diamètre (BBI international) car elles ont une très forte hyperpolarisabilité lorsqu'elles sont irradiées aux alentours de 800 nm. Leur réponse HRS est en effet exaltée par la résonance de plasmon de surface située autour de 420 nm [7, 17]. Ensuite, les intensités résolues en polarisation pour des particules de grands diamètres montrent qu'il est plus favorable de prendre une polarisation de l'onde incidente à 45° de la direction verticale, voir Figure 3-1. Au cours du processus SHG, un dipôle non linéaire est excité par le faisceau fondamental. Ce dernier oscille à la fréquence harmonique et radie une onde à la fréquence harmonique. L'origine de l'existence de ce dipôle non linéaire a été établie comme provenant de la surface de la particule pour les plus petites particules. Pour les plus grandes, lorsque le diamètre n'est plus négligeable devant la longueur d'onde, les effets retardés des champs électromagnétiques doivent être pris en compte et l'hyperpolarisabilité dépend alors du volume de la particule au lieu de la surface. Dans ce cas, un rayonnement de nature quadripolaire est émis, à l'origine de ces courbes en 4 lobes observées, voir Figure 3-1. Enfin, aucune sélection de polarisation n'a été utilisée sur le faisceau harmonique afin de favoriser la sensibilité du système expérimental.

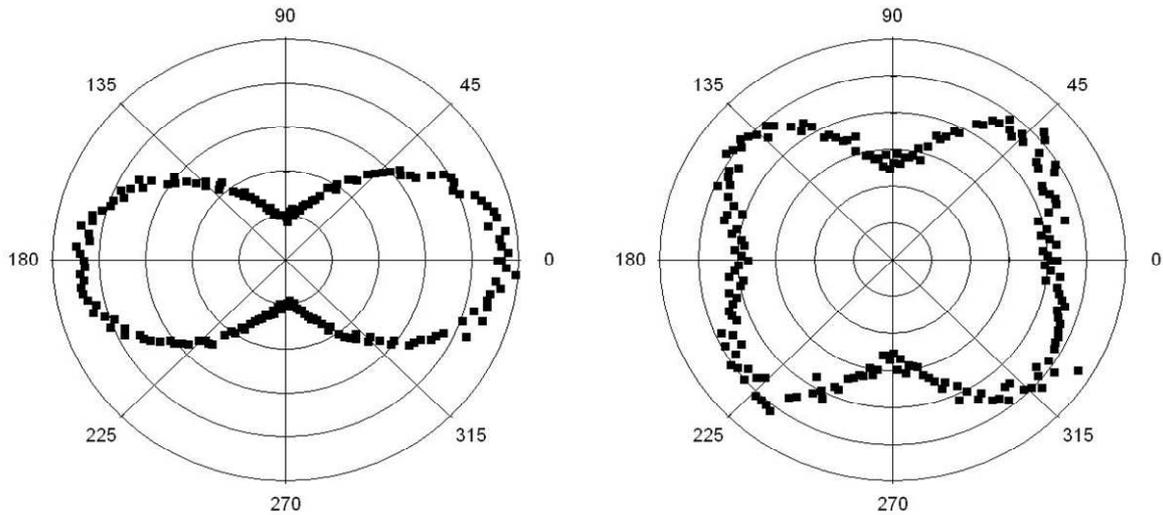
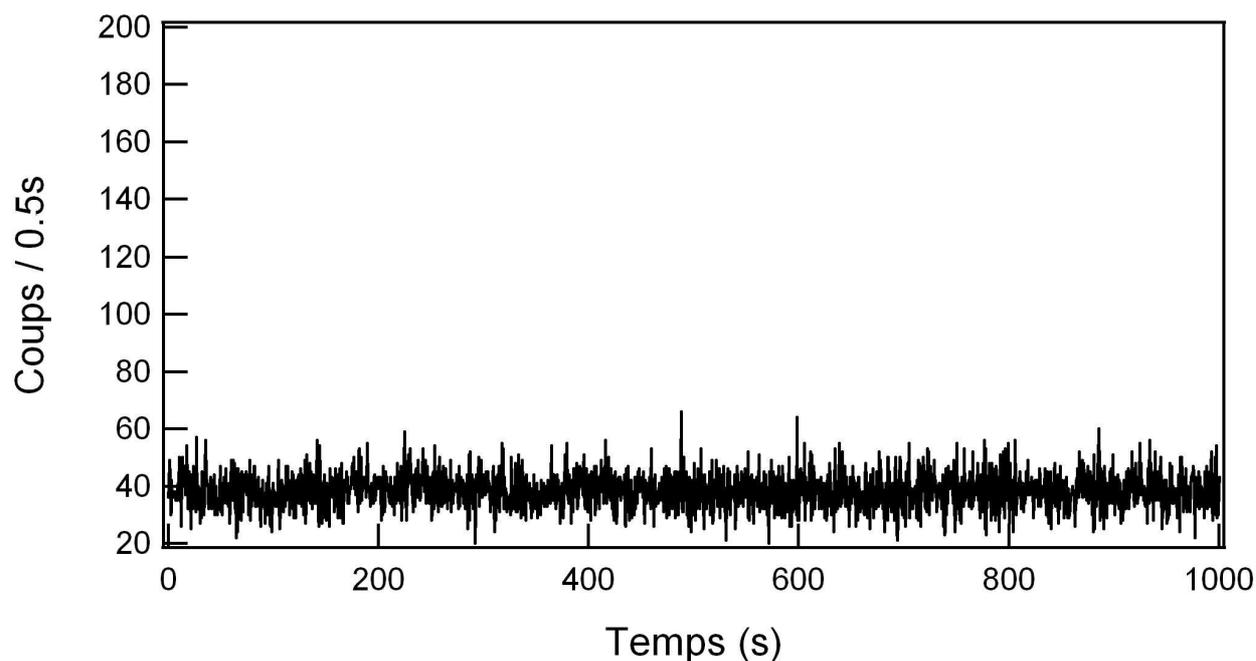


Figure 3-1 : Intensité ($I_V + I_H$) résolue en polarisation pour une cellule d'eau pure et une cellule contenant une solution aqueuse de nanoparticules d'argent de 80 nm de diamètre.

Pendant la durée d'acquisition de durée 0.5 seconde, le nombre moyen de photons harmoniques mesuré pour l'eau pure est environ de 38, soit 76 photons/s. La répétition d'un très grand nombre de ces petites acquisitions de périodes de 0,5 secondes, permet une grande précision sur la distribution des photons obtenus. Le bruit est considéré comme un bruit blanc et gaussien et la distribution mesurée expérimentalement peut donc être ajustée par une distribution de Gauss dont l'écart type est égal à la racine carrée de la moyenne. Si la période d'acquisition de 0.5 seconde avait été plus courte, la distribution serait passée à une distribution de Poisson, avec un rapport signal sur bruit défavorable, puisque le nombre de photons comptés au cours de la période aurait été très faible.



*Figure 3-2 : Intensité HRS mesurée au cours du temps pour une cellule d'eau pure.
Chaque point correspond à un intervalle de temps d'acquisition de 0.5 s.*

Des mesures identiques ont été réalisées sur des solutions de nano-particules de différentes concentrations, voir Figure 3-3. Tout d'abord, il est constaté que la valeur moyenne pour chaque histogramme augmente linéairement avec la concentration de particules comme prévu, voir Figure 3-4 et Figure 3-5. Plus les particules sont nombreuses dans le volume sondé, plus le nombre de photons harmoniques augmente en moyenne. L'utilisation de la méthode de référence interne permet de déterminer la valeur de l'hyperpolarisabilité des nano particules d'argent de 80 nm de diamètre. La valeur mesurée de $\beta = (171 \pm 20) \times 10^{-30}$ esu est en parfait accord avec la valeur mesurée à des concentrations beaucoup plus élevées [11].

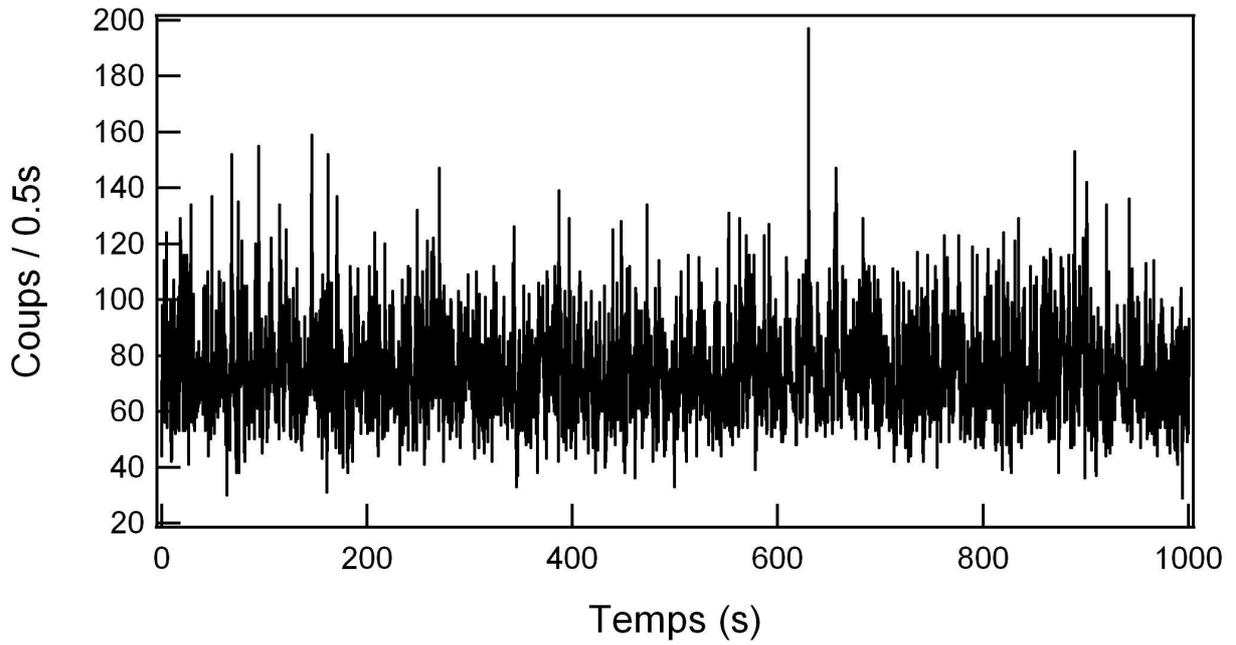


Figure 3-3 : Intensité HRS mesurée au cours du temps pour une cellule aqueuse de concentration 31 fM en particules métalliques. Chaque point correspond à un intervalle de temps d'acquisition de 0.5 s.

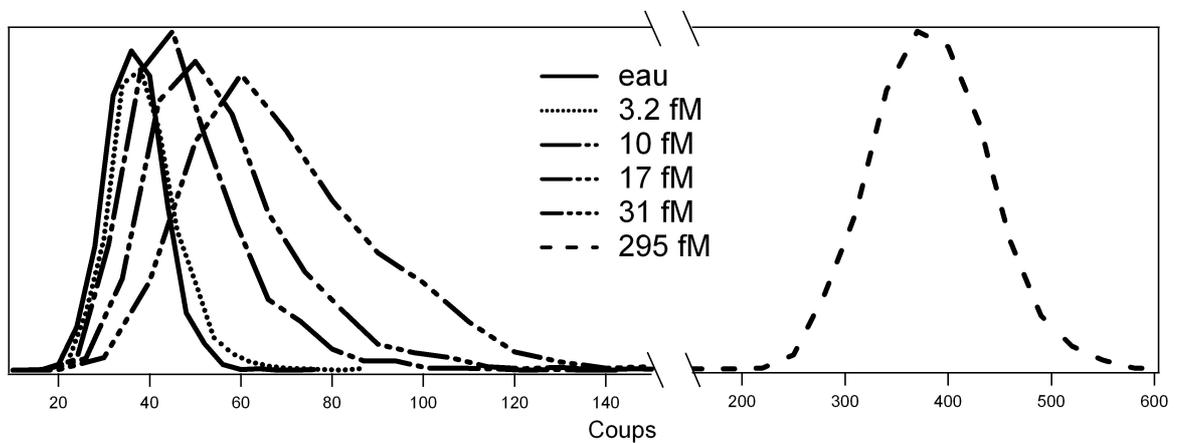


Figure 3-4 : Histogrammes des nombres de coups comptés en 0.5 secondes en fonction de la concentration en nano-particules métalliques.

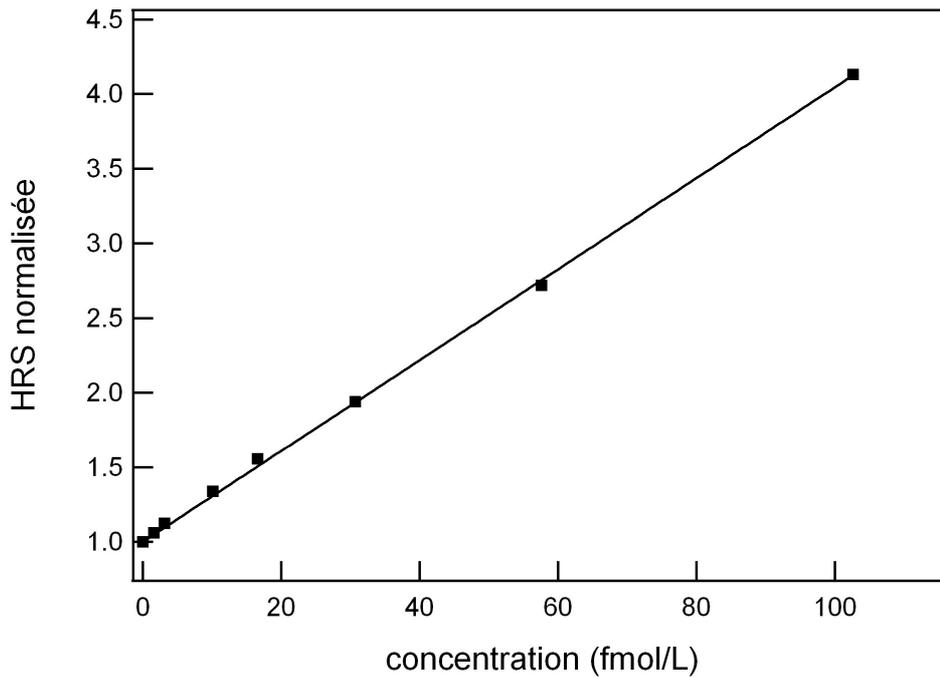


Figure 3-5 : Valeur moyenne des distributions précédentes en fonction de la concentration en nano-particules métalliques.

Toutefois, pour des concentrations faibles correspondant à un nombre discret de particules dans le volume sondé, la valeur moyenne de la distribution n'est plus le paramètre le plus intéressant. En effet, une modification de la distribution est observée, celle-ci passant d'un profil de Gauss à un profil différent. Dans le régime des concentrations extrêmement faibles, la distribution est déformée vers les plus grandes valeurs. Il s'agit de la distribution correspondant à un régime où une seule particule est présente ou absente dans le volume sondé. Par conséquent, parmi les différents paramètres de la distribution, la valeur moyenne n'est plus le paramètre le plus intéressant. Il faut plutôt s'attacher aux moments d'ordre supérieur, à savoir l'écart type, ou moment de second ordre de la distribution, et la dissymétrie ou skewness, moment du troisième ordre. L'écart type de la distribution de l'eau est tout simplement la racine carrée du nombre de photons moyen. Pour les solutions en nano-particules, l'analyse des distributions des petites concentrations montre que l'écart type augmente plus vite que la racine carrée de la moyenne. Nous pouvons donc introduire un paramètre $r = \sigma / \sqrt{\mu}$, rapport entre l'écart-type σ de la distribution et la racine carrée de sa valeur moyenne μ , égal à l'unité pour les solutions d'eau pure. Nous observons que r

augmente en fonction de la concentration de particules de manière non linéaire, voir Figure 3-6. Cela indique en particulier qu'une autre contribution que la statistique propre de comptage est à l'origine des fluctuations du nombre de photons harmoniques détectés pendant les courtes périodes de 0,5 secondes. L'origine de cette contribution est la fluctuation au cours du temps du nombre de particules séjournant dans le volume sondé. La dissymétrie de la distribution du nombre de photons harmoniques possède également un comportement différent de celui observé pour l'eau pure. Dans le cas de l'eau pure, la distribution est gaussienne et sa dissymétrie est donc nulle. Pour les solutions de nano particules, la dissymétrie augmente avec la concentration de particules, atteint un maximum puis tend ensuite lentement vers zéro à nouveau. Ce retour vers une valeur nulle indique un retour à une distribution gaussienne lorsque le nombre de particules dans le volume sondé est suffisant.

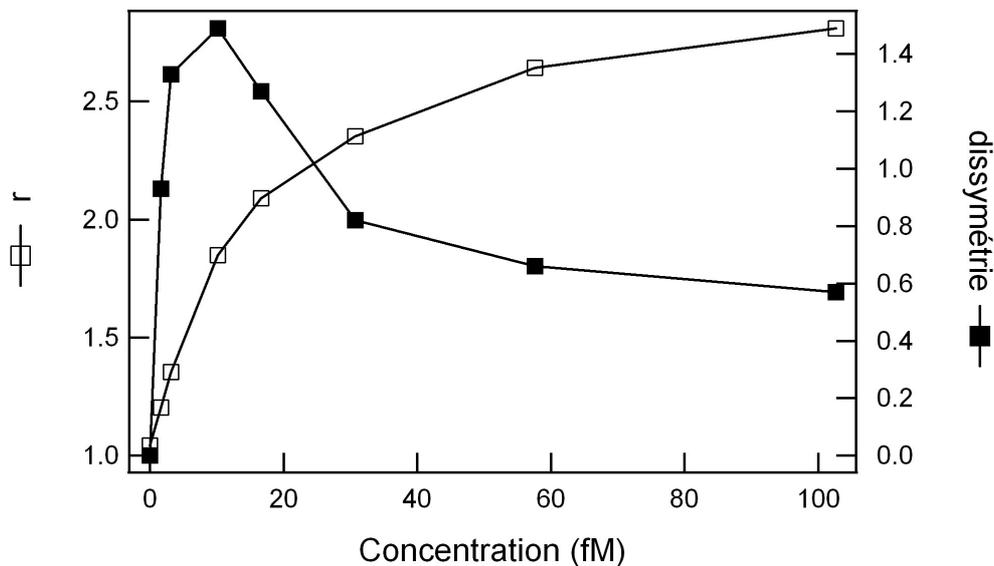


Figure 3-6 : Paramètre r et dissymétrie des distributions de comptage en fonction de la concentration en nano particules

3.2.2 Modélisation

Afin de compléter ces observations et d'en extraire des informations quantitatives, une approche microscopique de la procédure de comptage de photons a été développée. Pour l'eau pure, une distribution de Gauss, dont le nombre moyen de photons harmoniques détectés est de 38 par 0,5 secondes et l'écart-type est égal à la racine carrée de la valeur moyenne, est obtenue. Pour les autres distributions, la probabilité de trouver une particule dans le volume

de l'échantillon peut être obtenue par une analyse détaillée de la dynamique des particules dans la phase aqueuse. Mais étant donné que le nombre de particules dans ce volume est très faible, la probabilité de trouver la particule dans le volume sondé pendant un laps de temps de 0.5 secondes est décrite par une distribution de Poisson.

$$P_p(k, \lambda) = e^{-\lambda} \frac{\lambda^k}{k!} \quad (3-2)$$

avec λ la valeur moyenne du nombre de particule dans le volume sondé et k le nombre de particules dans le volume. Si une particule est présente dans le volume sondé, la distribution de l'intensité mesurée est la somme de deux distributions gaussiennes. La première distribution est celle correspondant à la distribution obtenue pour l'eau pure. La seconde correspond à celle de la nano particule seule. La somme de ces deux distributions gaussiennes conduit à une nouvelle gaussienne dont la valeur moyenne est la valeur moyenne obtenue pour l'eau plus la valeur moyenne obtenue pour une particule, inconnue ici, et dont l'écart-type est la racine carrée de la valeur moyenne.

$$N(\mu = \mu_{eau} + \mu_{part}, \sigma^2 = \sigma_{eau}^2 + \sigma_{part}^2) = N(\mu_{eau}, \sigma_{eau}^2) + N(\mu_{part}, \sigma_{part}^2) \quad (3-3)$$

avec $\mu_{eau} = 38$ pour 0.5 seconde et μ_{part} est la moyenne de la distribution obtenue pour une particule considérée dans le vide. Cependant, au cours des 2000 acquisitions de 0,5 secondes réalisées, le nombre de particules dans le volume varie et la probabilité de trouver un nombre donné de particules dans le volume sondé est pondérée par la probabilité de Poisson correspondante. Par conséquent, la distribution finale est un mélange de distributions de Gauss pondérées par la probabilité de présence des particules, voir Figure 3-7.

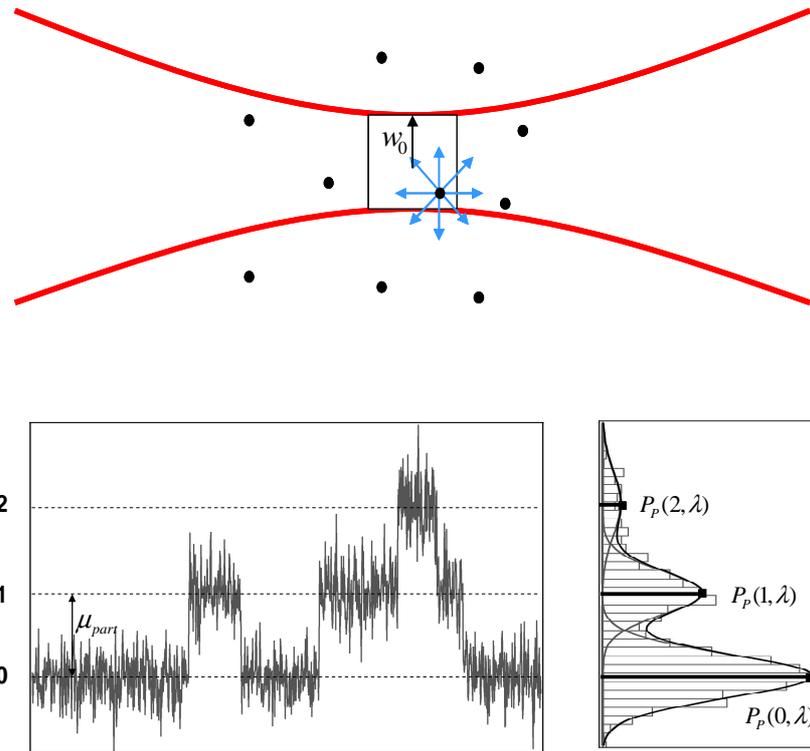


Figure 3-7 : (haut) Schéma du faisceau laser en présence de nano particules. Seules les particules dans le volume sondé (carré) participent à l'émission de photons harmoniques. (Bas) Principe de construction de la distribution finalement observée pour le taux de comptage en fonction de l'intensité d'une particule et de son temps de présence dans le volume sondé.

Pour rendre compte du comportement observé lors des expériences, plusieurs simulations pour lesquelles μ_{part} varie ont été effectuées. Le paramètre r et la dissymétrie ont été extraits en fonction de λ , nombre moyen de particules dans le volume sondé, voir Figure 3-8 et Figure 3-9.

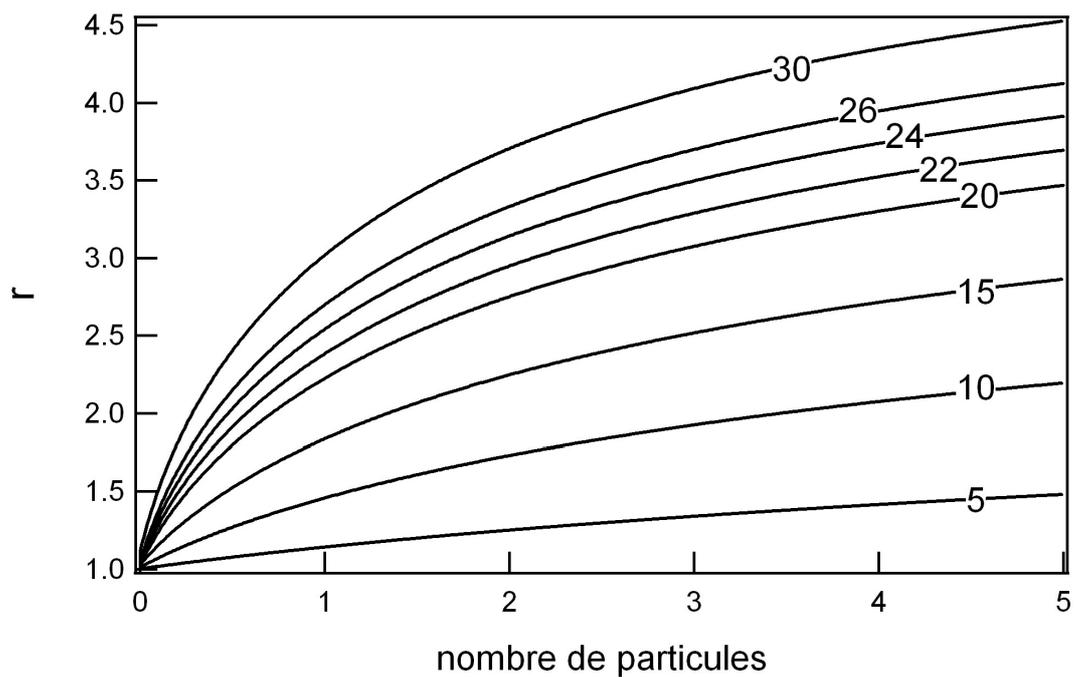


Figure 3-8 : paramètre r pour différentes valeurs de μ_{part} en fonction de λ , le nombre moyen de particules dans le volume sondé.

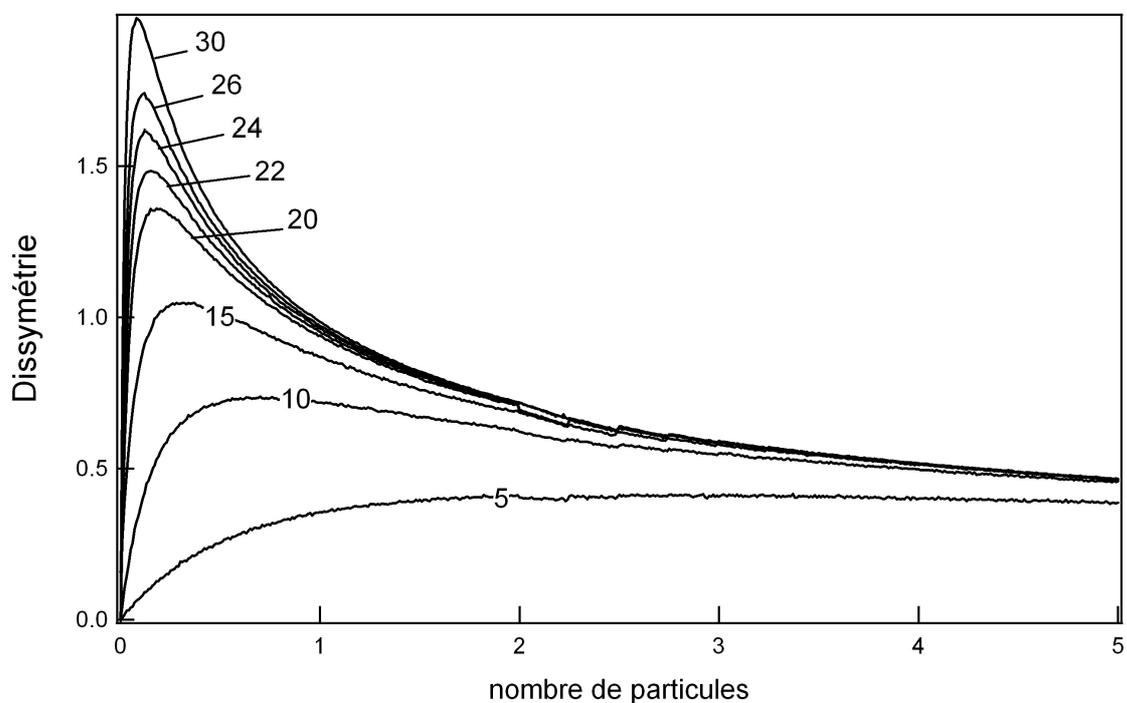


Figure 3-9 : dissymétrie pour différentes valeurs de μ_{part} en fonction de λ , le nombre moyen de particules dans le volume sondé.

Lorsque la concentration en particules augmente, la variation du nombre de particules dans le volume augmente également. Cela conduit à une augmentation de l'écart-type en fonction de la concentration ainsi que du paramètre r . De même, la dissymétrie de la distribution est une conséquence de la dissymétrie de la distribution de Poisson lorsque λ est faible. Pour un nombre de particules inférieur à 1 dans le volume sondé au cours d'une période, la distribution de Poisson est très dissymétrique alors que pour un grand nombre de particules, la distribution de Poisson tend vers une distribution de Gauss symétrique. La dissymétrie tend donc vers 0 aux plus grandes concentrations.

3.2.3 Comparaison théorie et expérience

Après avoir obtenu expérimentalement le paramètre r et la dissymétrie en fonction de la concentration en mol/L des particules, ces mêmes paramètres ont été obtenus théoriquement en fonction du nombre de particules dans le volume sondé. Nous devons maintenant réaliser une correspondance entre ces deux échelles pour remonter à des informations quantitatives sur le nombre de particules présentes dans le volume sondé.

L'ajustement entre les distributions expérimentales et calculées a été effectué en utilisant un test de minimisation du paramètre χ^2 . Le meilleur ajustement a été trouvé pour une valeur $\mu_{part} = 24 \pm 4$ coups en 0.5 secondes. Pour faire correspondre l'échelle expérimentale en mol/L et l'échelle du modèle en particules/volume sondé, un facteur d'échelle doit être introduit. Afin de déterminer la valeur de ce facteur d'échelle, un test de minimisation du paramètre χ^2 a permis de trouver la concentration correspondant à la présence d'une seule particule, en moyenne, dans le volume de l'échantillon. Ce paramètre est $\alpha = 29 fM$, voir Figure 3-10 et Figure 3-11. Un accord parfait pour la dissymétrie et le paramètre r n'est pas parfaitement obtenu. Toutefois, plusieurs améliorations pourraient être apportées au modèle, en particulier la prise en compte du profil de l'intensité du faisceau fondamental dans la cellule.

À l'aide des deux paramètres α et μ_{part} , l'hyperpolarisabilité des particules d'argent métalliques dont le diamètre est de 80 nm peut être déterminé. L'intensité HRS mesurée pour

le solvant est $I_{eau}^{HRS} = N_{eau} \beta_{eau}^2$ et est égal à 38 coups en 0.5 secondes pour une polarisation d'entrée de 45° . Pour une seule particule métallique dans le volume sondé, l'intensité HRS est $I_{part}^{HRS} = \alpha \beta_{part}^2$ et est égale à 24 coups en 0.5 secondes pour la même configuration de polarisation. En utilisant la référence pour l'eau pure et la valeur du paramètre α , l'hyperpolarisabilité obtenue pour les particules est $\beta = (206 \pm 20) \times 10^{-25}$ esu, ce qui est en bon accord avec la valeur $\beta = (171 \pm 20) \times 10^{-25}$ esu obtenue précédemment.

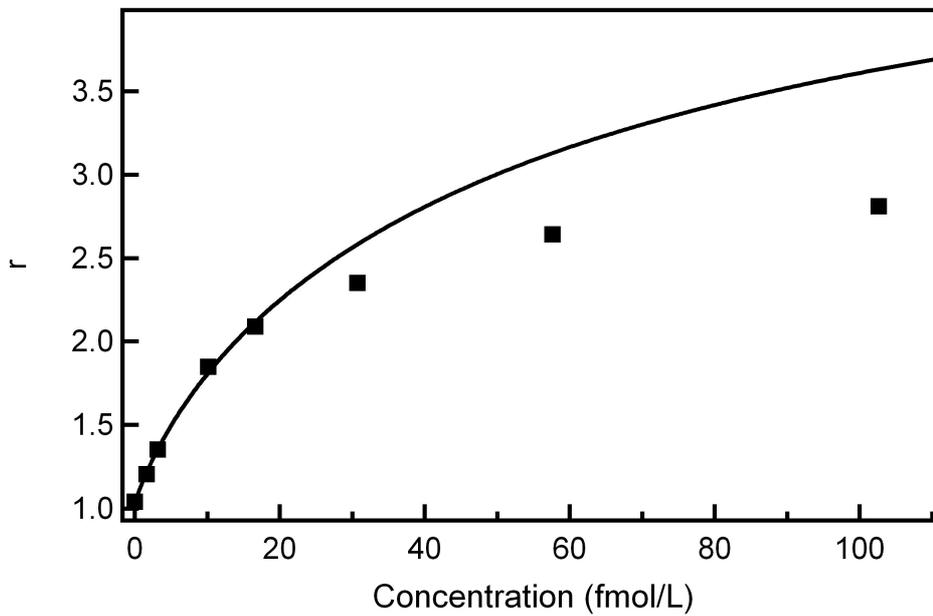


Figure 3-10 : Paramètre r expérimental (points) et calculé (ligne) en fonction de la concentration en nanoparticules métalliques

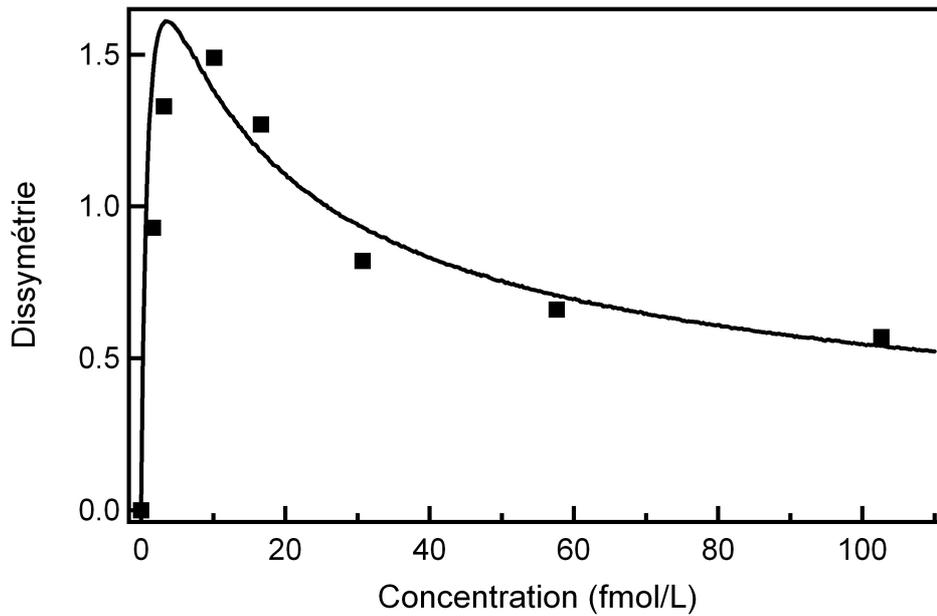


Figure 3-11 : dissymétrie expérimentale (points) et calculée (ligne) en fonction de la concentration en nanoparticules métalliques.

Enfin, le volume sondé au cours de l'expérience peut aussi être estimé :

$$V_{eff} = \frac{1}{\alpha N_a} \approx (40 \mu m)^3$$

avec N_a le nombre d'Avogadro. Cette valeur est en bon accord avec la puissance de l'objectif du microscope égale à $\times 16$.

En conclusion, nous avons démontré que la diffusion Hyper Rayleigh, technique d'optique non linéaire largement utilisée pour caractériser les nano-objets à l'échelle des grands ensembles, est assez sensible pour être utilisée au niveau de la particule unique. Le signal résultant de la présence d'une seule particule dans le volume sondé a été obtenu à l'aide de la référence à un signal de fond connu et grâce à l'analyse statistique des données, en particulier des deuxième et troisième moments des distributions des taux de comptage. L'utilisation d'une procédure d'ajustement entre les données expérimentales et celles du modèle a permis d'obtenir l'hyperpolarisabilité de particules d'argent d'un diamètre de 80 nm. La valeur absolue de 24 coups par 0.5 secondes obtenue pour une particule est relativement importante par rapport au solvant pur mais le temps de diffusion des particules dans le faisceau laser ne permet pas d'étudier la même particule au cours de l'expérience. Dans le but

d'étudier une seule et même particule il est nécessaire de la figer dans la solution. Plusieurs possibilités sont envisageables, nous proposons d'évaluer une première méthode dans la suite de ce chapitre.

3.3 Cartographie 3D de micro et nano particules en HRS et Fluorescence

3.3.1 Montage expérimental

3.3.1.1 La matrice de Gélatine

Pour figer les nano particules dans la cellule et continuer les études optiques sur une seule d'entre elles, il est nécessaire de rechercher un matériau transparent aux longueurs d'onde d'excitation à 800 nm et d'émission harmonique à 400 nm, ayant de plus une faible efficacité non linéaire pour ne pas masquer le signal provenant des nano particules et suffisamment rigide pour éviter la diffusion des particules au cours du temps. Notre choix s'est porté sur des gels organiques, faciles d'utilisation plutôt que des matrices cristallines dont nous ne maîtrisons pas les procédés de fabrication. Parmi les gels organiques, le gel Agar-Agar constitué d'agarose, un polymère non ramifié, le Carageenan constitué de polysaccharides extrait de l'algue rouge ainsi que la gélatine BLOOM 250, parmi les plus rigides des gélatines, ont été caractérisés en HRS et en absorption linéaire, voir Figure 3-12. Les gels sont obtenus en portant la température du mélange eau-gel au-delà de la température de liquéfaction, environ 70°C, pendant 20 minutes et en laissant refroidir à 4°C pendant 12 heures.

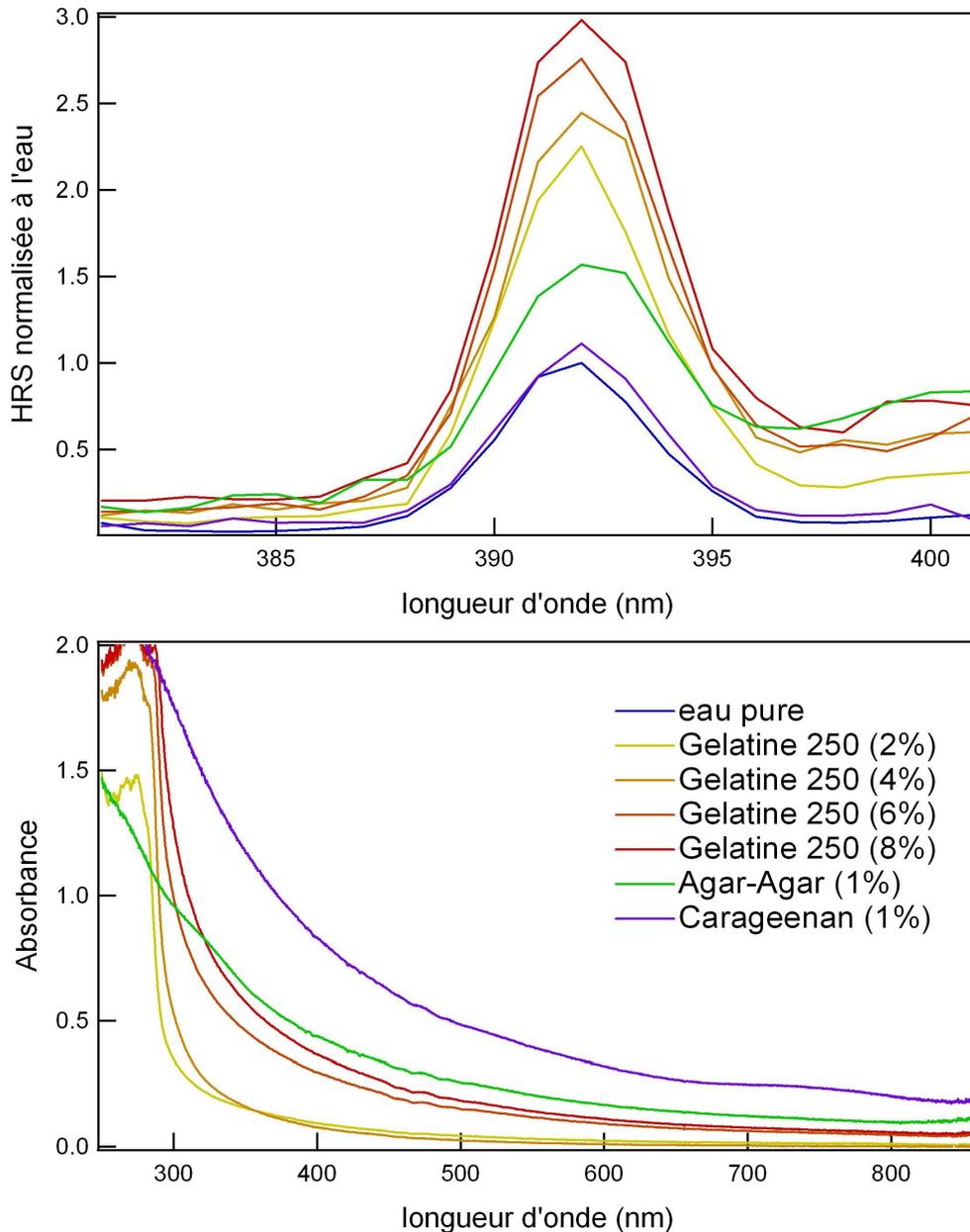


Figure 3-12 : Spectre HRS et absorption linéaire des différents gels

La forte diffusion Rayleigh des deux gels végétaux, l'Agar-Agar et le Carageenan, à 400 nm ne permet pas leur utilisation dans nos expériences bien que ceux-ci aient un signal HRS relativement faible. Le signal provenant des nano particules serait en effet perdu par diffusion à la fréquence harmonique. En revanche la gélatine faiblement concentrée est très transparente à 400 nm. Les intensités HRS sont entre 2 et 3 fois plus importantes par rapport à l'eau mais ces valeurs restent raisonnables. En effet, l'eau pure produit 38 coups en 0.5 secondes et, d'après la Figure 3-12, la gélatine entre 76 et 114 coups en 0.5 secondes, à

comparer à une particule qui produit 24 coups seulement. L'augmentation de signal provenant d'une particule reste dans ces conditions toujours visible si nous considérons que la sensibilité est plus proche de 10%. Des expériences qualitatives de diffusion d'encre dans les différentes solutions de gélatine ont montrées que la solution dont la concentration en gélatine est de 2% est encore trop liquide. Notre choix s'est porté alors naturellement sur la solution de gélatine 4%.

3.3.1.2 Le porte-cellule motorisé

Afin de pouvoir trouver une nano particule dans la solution de gélatine, il est nécessaire de déplacer l'échantillon devant le point de focalisation du laser. Pour cela, la cellule contenant la solution est supportée par 3 platines de translation micrométrique (platine MFA-CC Newport) afin de pouvoir déplacer l'échantillon dans toutes les directions. Chaque platine a une répétabilité relative de 1 μm et une répétabilité absolue de 5 μm .

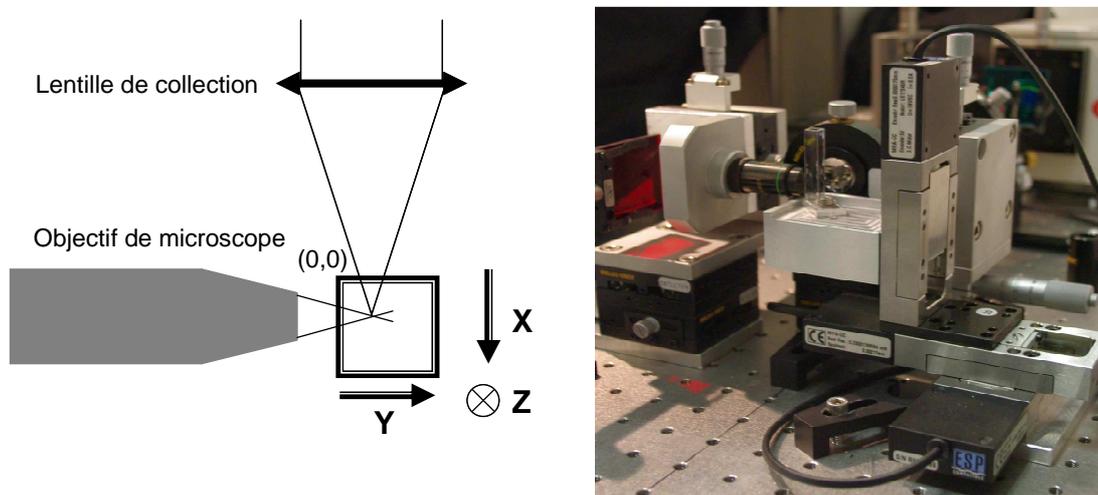


Figure 3-13 : schéma du montage expérimental avec les axes X, Y et Z de déplacement de la cellule.

Le déplacement de la cellule dans les trois directions perturbe toutefois le signal HRS détecté. En effet, les déplacements selon les directions X et Y sont réalisés dans le référentiel du laboratoire par modification de la position du point de focalisation. A cause de la variation

de l'épaisseur de gélatine traversée, l'alignement est modifié ce qui engendre une perte de signal. En revanche, le déplacement selon la direction Z n'engendre aucune modification. Afin de définir l'intensité HRS en fonction de la position de la cellule, une cartographie selon les directions X et Y sur une cellule d'eau pure a été menée.

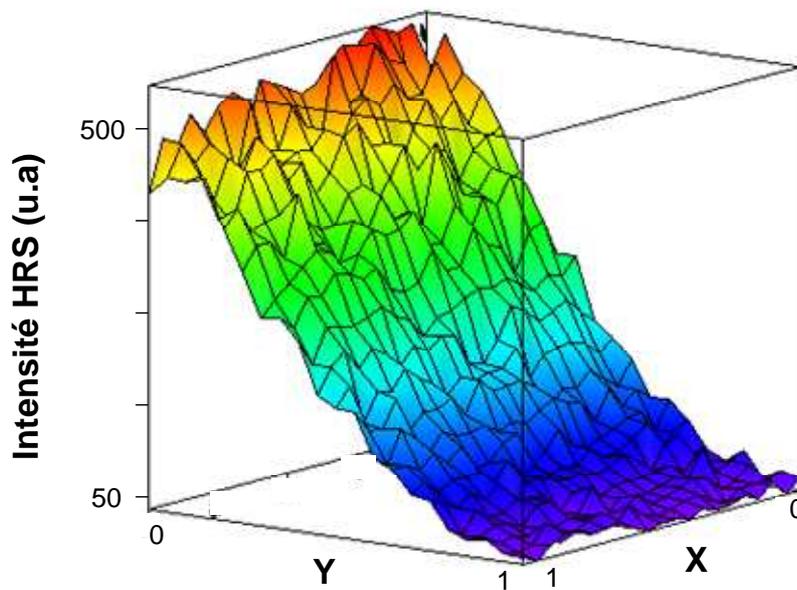


Figure 3-14 : Intensité HRS d'une cellule d'eau pure selon les directions X et Y variant entre 0 et 1 mm avec un pas de 50 μm .

L'éloignement de la cellule de l'objectif de microscope lorsque la position selon la direction Y augmente entraîne une diminution importante du signal à cause du désalignement du point de focalisation. Cependant, entre $Y = 0$ et $Y = 500 \mu\text{m}$, le signal HRS reste suffisant pour avoir un bon rapport signal à bruit. Dans la suite, les expériences se dérouleront le plus souvent possible dans ce domaine où le signal reste fort.

3.3.2 Bille de latex en fluorescence

La caractérisation du montage expérimental a été effectuée avec des billes de polystyrène dopées en colorant organique dont la fluorescence permet d'obtenir un signal beaucoup plus important que le signal de diffusion non linéaire d'une nano particule d'argent. Les billes de polystyrène ont un diamètre de 300 nm et sont dopées par de la fluorescéine. L'excitation à 800 nm des billes produit une fluorescence multiphotonique dont le maximum d'émission est à 486 nm, voir Figure 3-15. Les billes sont très petites devant la taille du col du faisceau au point de focalisation et peuvent donc encore être considérées comme ponctuelles. La cartographie des billes de polystyrène dopées permet ainsi de cartographier le profil du faisceau laser.

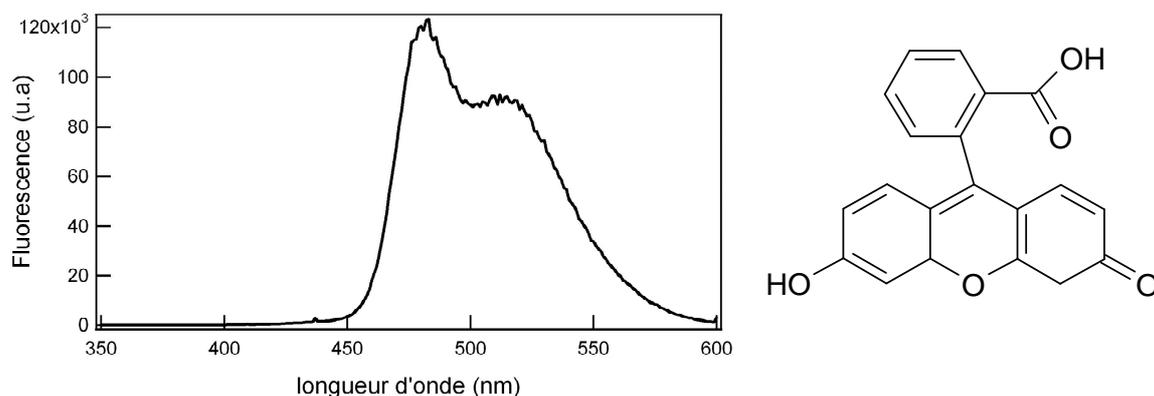


Figure 3-15 : Spectre de fluorescence excitée à 800 nm (gauche) et formule développée de la fluorescéine (droite).

La solution est composée de gélatine BLOOM 250 à 4% et d'une concentration de 1.22×10^5 billes/mL. La détection est réalisée au maximum d'émission de la fluorescence, à 486 nm. Pour obtenir la taille du col du faisceau transverse, une cartographie en deux dimensions, selon les directions X et Z a été effectuée avec des pas de 3 μm , voir Figure 3-16.

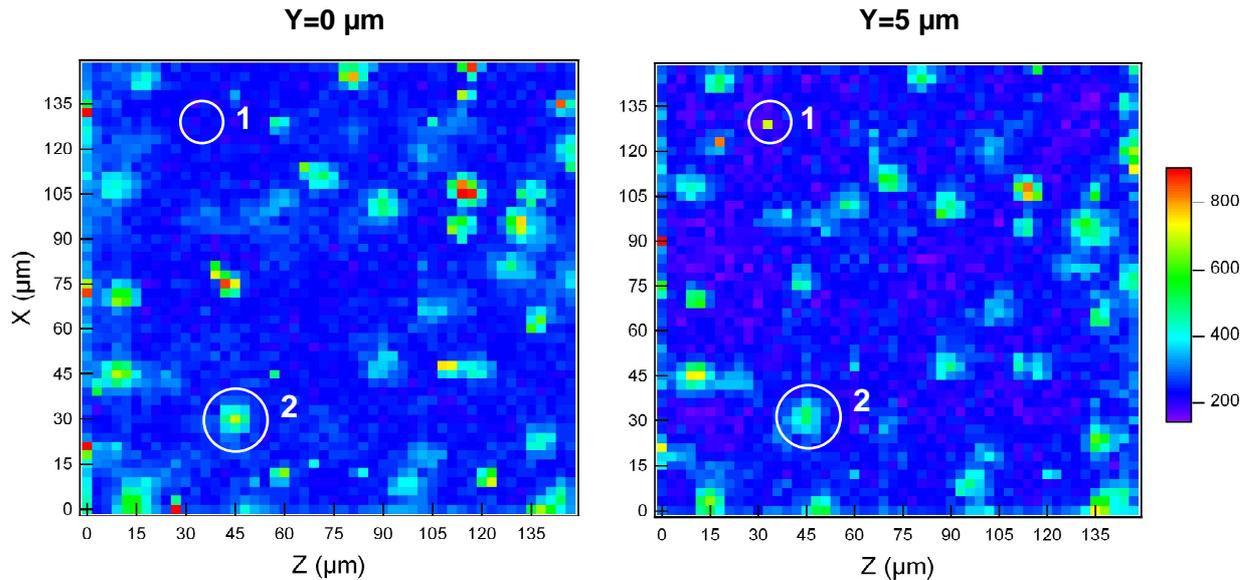


Figure 3-16 : cartographie de 2 plans $Y = Cte$ d'une solution 1.22×10^5 billes/mL de billes de polystyrène dopées en fluoresceine dans un gel de gélatine. Pas de $3 \mu m$. Acquisition de 2 s par pixel. Zone 1 : pixel de bruit absent d'un plan à l'autre – Zone 2 : bille de polystyrène.

La cartographie de deux plans $Y = Cte$ a été effectuée dans le but de discriminer le signal provenant d'une bille de polystyrène de celui provenant d'un artefact. Sur la Figure 3-16, la zone 1 présente ainsi un pixel dont l'intensité est très différente sur les deux plans. Il s'agit d'un pixel pour lequel un bruit anormal a été enregistré. La zone 2 représente par contre un objet qui est présent sur les deux plans aux mêmes positions en X et Z. Il s'agit d'une bille de polystyrène. En effet, le signal de fluorescence des billes de polystyrène s'étend sur plusieurs pixels selon la direction Y en raison de la longueur de Rayleigh du faisceau laser focalisé. Pour déterminer précisément la taille de ce col, la fonction d'auto corrélation entre les deux plans a été obtenue, voir Figure 3-17.

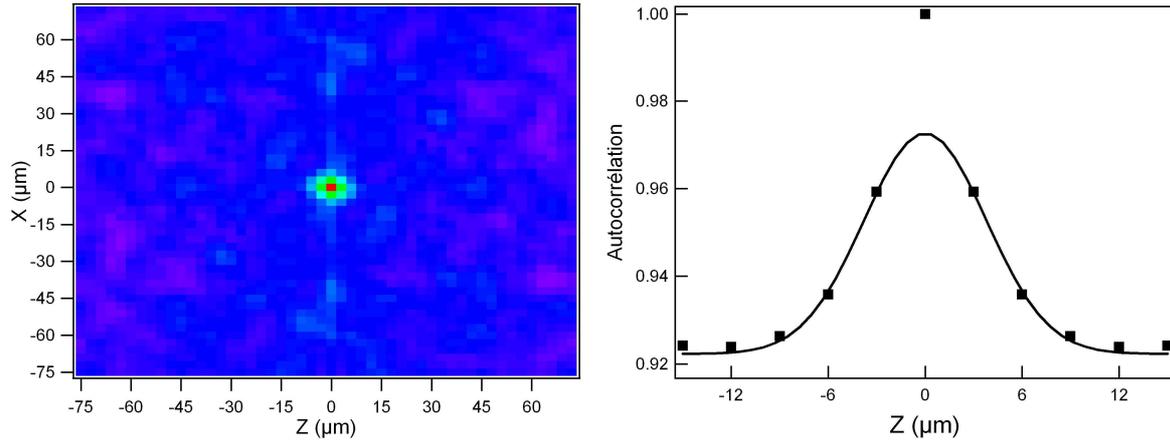


Figure 3-17 : (Gauche) Auto corrélation en 2 dimensions du plan $Y = 0$. (Droite) Auto corrélation en $X = 0$ (points) ajustée par une fonction gaussienne (ligne). La largeur à mi-hauteur vaut $5.35 \mu\text{m}$.

Deux longueurs de corrélation contribuent à la fonction d'auto corrélation : les corrélations du bruit dont la longueur caractéristique est de l'ordre de la taille d'un pixel, le pixel en $(0, 0)$ possède donc une valeur très élevée, et les corrélations provenant de la largeur du profil du laser. Le profil du laser est de forme gaussienne. Sa fonction d'autocorrélation est donc également une fonction gaussienne dont l'écart-type est 2 fois la taille du col du faisceau. Nous obtenons ainsi $w_{0,nl} = 2.67 \mu\text{m}$. Il s'agit là de la taille du col du faisceau non linéaire puisque le processus d'émission est un processus de fluorescence à deux photons. Pour obtenir le col du profil du laser, le col non linéaire est multiplié par $\sqrt{2}$. Nous obtenons donc $w_0 = 3.77 \mu\text{m}$ pour le faisceau fondamental. Pour déterminer la taille caractéristique du profil longitudinal du laser, plusieurs cartographies des billes pour des profondeurs Y différentes ont été effectuées.

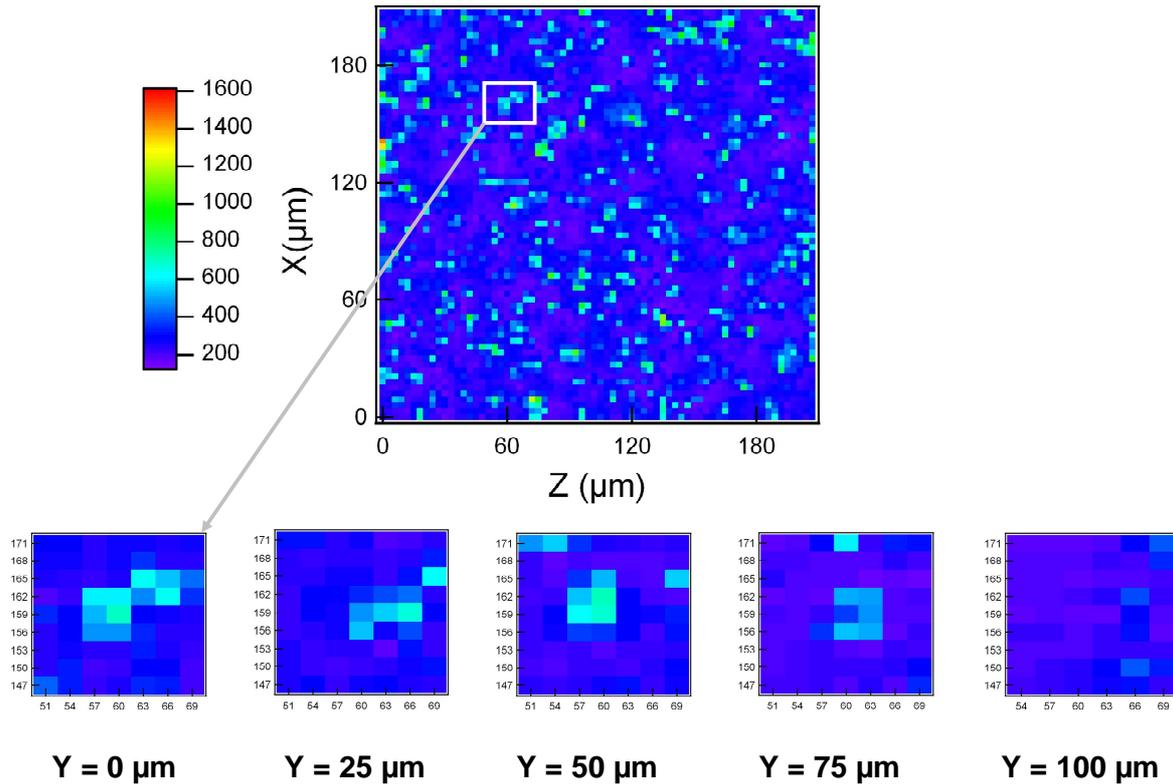


Figure 3-18 : Cartographie de fluorescence de billes de polystyrène pour plusieurs plans $Y = Cte$.

La position de la bille sur les différentes cartographies en Y n'est pas strictement identique car la précision absolue de 5 μm des platines ne le permet pas. L'intensité des pixels au centre de chaque zoom reste approximativement identique sur les trois premiers plans avant de décroître pour être nulle sur le plan $Y=100$ μm. Cette mesure permet d'estimer la taille caractéristique du profil longitudinal de laser. Celui-ci possède une longueur d'au moins 75 μm. Connaissant la dimension transverse du col, la relation suivante permet de donner aussi une longueur caractéristique [18] :

$$l = kw_0^2 \quad (3-4)$$

avec k le vecteur d'onde. La longueur l obtenue est de l'ordre de 150 μm, compatible avec la mesure. Cependant, la réalisation de cartographies sur des distances aussi longues n'est pas possible à cause de la perte de signal causée par le désalignement de la mesure. De plus,

notons aussi que la mesure réalisée est peut être entachée d'erreur en raison du photo-blanchiment des billes de polystyrène au cours du temps. Ce blanchiment conduit à une perte de signal. Malgré ces restrictions, les expériences décrites ici ont permis d'obtenir une caractérisation du profil du faisceau laser au niveau du point de focalisation.

Lors des expériences sur les nano particules métalliques, une valeur de $(40\mu m)^3$ pour le volume sondé a été déterminé en paragraphe 3.2.3. Grâce aux cartographies, le volume non linéaire du col est :

$$V = w_{nl}^2 l_{nl} \approx (18\mu m)^3 \quad (3-5)$$

Cette valeur plus faible du volume V peut s'expliquer par le fait que les nano particules d'argent situées au-delà d'une distance égale à la valeur du col de l'axe du faisceau participent à la production de photons harmoniques. Le volume déterminé à l'aide du col est alors égal au volume sondé si les particules participant au processus HRS sont situées à une distance maximale de $2w_{0,nl}$ de l'axe optique du faisceau. Ainsi, les particules d'argent devraient être visibles sur au moins 4 pixels.

3.3.3 Particule d'argent de diamètre 80 nm en diffusion Hyper Rayleigh

Les nano particules d'argent de 80 nm de diamètre ont une forte hyperpolarisabilité et les expériences précédentes en solution liquide montrent que la détection d'une particule unique est possible. De la même manière que les billes de polystyrène, une solution de nano particules a été gélifiée. Les signaux plus faibles sur les nano particules nécessitent de compter plus longtemps sur chaque pixel, environ 5 secondes au lieu de 1 à 2 secondes pour les billes, afin d'augmenter le rapport signal sur bruit. Il faut compter d'autant plus longtemps que la puissance du laser a été diminuée pour ne pas endommager la gélatine, en passant à environ 150 mW au lieu de 400 mW de puissance moyenne en sortie de source laser. Sur la cartographie, voir Figure 3-19, un pic de signal harmonique est présent à la même position sur deux plans successifs et la tache mesurée sur le plan occupe plusieurs pixels. L'intensité au maximum est de 500 coups alors que le fond de gélatine est de 200 coups environ. Ce signal est plus important que le signal observé dans les expériences en solution liquide où il s'agit

d'une moyenne sur un grand nombre de particules. Ici, l'émission de photons harmoniques dépend de l'orientation et de la taille exacte de la particule unique ; Il est donc possible que cette intensité résolue en polarisation d'un objet unique soit assez différente des valeurs moyennes obtenues pour des grands ensembles, voir Figure 3-1. Dans les cartographies Figure 3-19, il est attendu environ 5 nano particules sur le plan. Or une seule particule est observée sans ambiguïté. Il est possible que les autres particules soient plus petites que 80 nm de diamètre et que leur signal soit donc trop faible pour être détecté ici. Leur orientation peut aussi être telle que pour la polarisation d'excitation à 45°, elles ne soient pas très visibles. Les expériences devant apporter la preuve irréfutable de la présence d'une nano particule n'ont pas encore pu être menées à bien et sont en cours. En particulier, une étude en fonction de la longueur d'onde pour mettre en évidence les effets de résonance ou une étude en polarisation doit être entreprise.

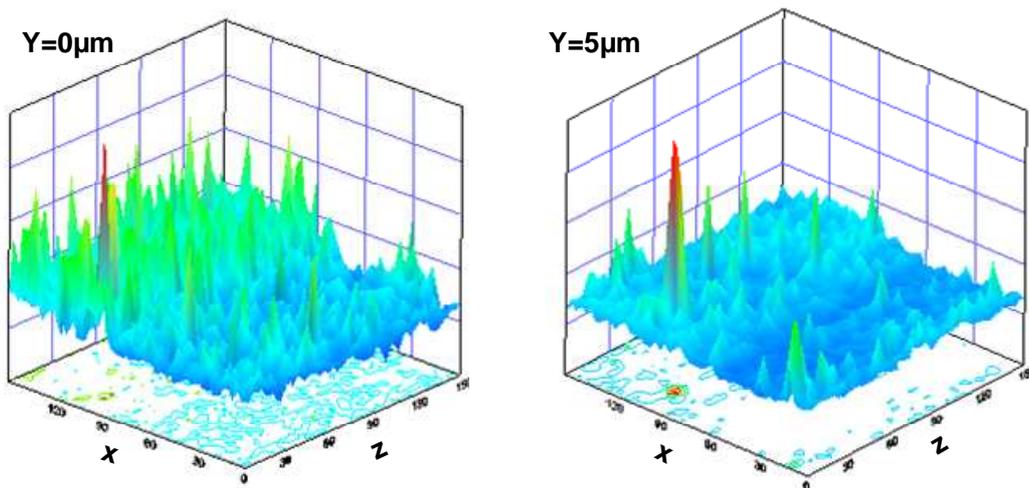


Figure 3-19 : Cartographie 3D de diffusion Hyper Rayleigh d'une solution de nano particules d'argent de 80 nm de diamètre. Les plans sont espacés de 5 µm et font 120 µm X 120 µm. Présence probable d'une nano particule (rouge) sur les deux plans.

3.4 Conclusions

Nous avons démontré que la diffusion Hyper Rayleigh, technique optique non linéaire largement utilisée pour caractériser les nano-objets à l'échelle des grands ensembles, est assez sensible pour être utilisée au niveau de la particule unique. Dans les expériences en solution

liquide, une concentration de 29 fM en particules d'argent de 80 nm de diamètre permet d'obtenir une seule particule présente en moyenne dans le volume d'excitation. Le signal résultant de la présence d'une seule particule dans le volume a été comparé à un modèle statistique simulant en particulier les deuxième et troisième moments de la distribution de photons harmoniques. L'utilisation d'une procédure d'ajustement entre les données expérimentales et le modèle a permis ensuite de déterminer l'hyperpolarisabilité des nano particules. Ces expériences en solution liquide ont montré la faisabilité d'études de particules uniques figées dans une matrice de gélatine transparente. Les cartographies obtenues dans ce chapitre sont les premiers pas vers des expériences de diffusion Hyper Rayleigh sur des nano particules uniques et des études complémentaires doivent être menées afin d'apporter de nouvelles informations montrant la pertinence de telles expériences.

3.5 Bibliographie

- [1] A. Arbouet, D. Christofilos, N. Del Fatti, F. Vallée, J. R. Huntzinger, L. Arnaud, P. Billaud and M. Broyer, *Phys. Rev. Lett.*, **93**, (2004) 127401-127401
- [2] J. Nappa, I. Russier-Antoine, E. Benichou, C. Jonin and P. F. Brevet, *Chem. Phys. Lett.*, **415**, (2005) 246-250
- [3] P. Billaud, S. Marhaba, E. Cottancin, L. Arnaud, G. Bachelier, C. Bonnet, N. D. Fatti, J. Lermé, F. Vallée, J.-L. Vialle, M. Broyer and M. Pellarin, *J. Phys. Chem. C*, **112**, (2008) 978
- [4] I. Russier-Antoine, G. Bachelier, V. Sablonière, J. Duboisset, E. Benichou, C. Jonin, F. Bertorelle and P. F. Brevet, *Phys. Rev. B*, **78**, (2008) 35436-35436
- [5] B. K. Canfield, H. Husu, J. Laukkanen, B. Bai, M. Kuittinen, J. Turunen and M. Kauranen, *Nano Lett.*, **7**, (2007) 1251
- [6] G. Bachelier, I. Russier-Antoine, E. Benichou, C. Jonin and P. F. Brevet, *J. Opt. Soc. Am. B*, **25**, (2008) 955-960
- [7] J. I. Dadap, J. Shan, K. B. Eisenthal and T. F. Heinz, *Phys. Rev. Lett.*, **83**, (1999) 4045-4048
- [8] K. Clays and A. Persoons, *Phys. Rev. Lett.*, **66**, (1991) 2980-2983
- [9] S. J. Cyvin, J. E. Rauch and J. C. Decius, *J. Chem. Phys.*, **43**, (2004) 4083-4083
- [10] S. Brasselet and J. Zyss, *J. Opt. Soc. Am. B*, **15**, (1998) 257-288
- [11] I. Russier-Antoine, E. Benichou, G. Bachelier, C. Jonin and P. F. Brevet, *J. Phys. Chem. C*, **111**, (2007) 9044-9048
- [12] J. Mertz, C. Xu and W. W. Webb, *Opt. Lett.*, **20**, (1995) 2532
- [13] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari and M. S. Feld, *Phys. Rev. Lett.*, **78**, (1997) 1667-1670
- [14] O. L. Muskens, N. Del Fatti, F. Vallée, J. R. Huntzinger, P. Billaud and M. Broyer, *Appl. Phys. Lett.*, **88**, (2006) 063109-3
- [15] R. Jin, J. E. Jureller, H. Y. Kim and N. F. Scherer, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, (2005) 12482-12483
- [16] M. Lippitz, M. A. van Dijk and M. Orrit, *Nano Lett.*, **5**, (2005) 799-802-799-802
- [17] E. Hao and G. C. Schatz, *J. Chem. Phys.*, **120**, (2003) 357-357

[18] L. W. Davis, *Phys. Rev A*, **19**, (1979) 1177-1179

Chapitre 4: Arrangements moléculaires centrosymétriques

4.1 Introduction

Jusqu'à présent, la majeure partie des études SHG a porté sur des systèmes moléculaires considérés comme des sources ponctuelles. Néanmoins, récemment, ces études ont évolué vers des systèmes de plus grandes dimensions, assemblages de molécules ou structures similaires comme les nano-particules métalliques [1] ou des petits peptides [2]. L'intensité SHG émise par ces ensembles de sources est une somme incohérente des intensités de second harmonique de chacune de ces sources si aucune relation de phase ne les lie. Dans le cas de la réponse d'assemblages moléculaires, l'intensité SHG est également la somme incohérente de la réponse SHG de chaque assemblage. En revanche, pour ces systèmes, à l'intérieur de chaque assemblage, la réponse de second harmonique ne provient pas d'une seule source mais de plusieurs sources, corrélées entre elles. Ainsi, la réponse SHG de l'assemblage est la somme cohérente des champs émis par les différentes sources de l'assemblage. Il est ainsi possible de reconstruire la réponse SHG d'un objet comme la somme de plusieurs éléments arrangés spatialement. Cette réponse dépend alors fortement de cet arrangement spatial. Ainsi, si les assemblages sont centrosymétriques, la réponse SHG est nulle dans l'approximation dipolaire électrique. Toutefois, lorsque les assemblages ont une taille suffisante par rapport à la longueur d'onde, le formalisme théorique montre que l'approximation dipolaire électrique ne suffit plus. Comme les assemblages ne sont plus ponctuels, il faut en effet prendre en compte la variation spatiale du champ à l'échelle de l'assemblage. Les termes associés sont appelés les termes retardés.

Dans ce chapitre nous allons développer la théorie de la diffusion hyper Rayleigh afin de mettre en évidence les termes retardés. Le formalisme utilisé ici est basé sur le formalisme utilisé au Chapitre 1 pour la réponse dipolaire électrique uniquement. Dans un premier temps nous nous intéresserons à des assemblages moléculaires simples où les termes retardés ne sont pas prépondérants, pour poser le cadre général du formalisme. Ensuite nous étudierons des systèmes centrosymétriques, pour lesquels, dans l'approximation dipolaire électrique, il ne

peut y avoir de génération de second harmonique, pour mettre en évidence uniquement les termes retardés. Nous développerons deux types d'assemblages centrosymétriques. D'abord, les assemblages centrosymétriques ordonnés à symétrie sphérique dont les micelles sont un modèle de répartition. Ensuite, nous verrons des systèmes macroscopiquement centrosymétriques comme les liquides purs tels les solvants où l'organisation au niveau moléculaire entraîne des brisures locales de centrosymétrie rendant possible la génération de seconde harmonique. La présence de ces effets retardés nécessitera des études expérimentales résolues en polarisation pour mettre en évidence ces structures à grande échelle.

4.2 Diffusion non linéaire d'assemblages : formalisme

4.2.1 Rappel sur la réponse dipolaire électrique

Le problème de la diffusion non linéaire peut être décrit dans le cadre des ondes planes. Dans ce cas, le milieu est excité par une onde plane polarisée rectilignement de la forme suivante :

$$\vec{E}(\vec{r}', \omega) = E_\omega (\hat{X} \cos \gamma + \hat{Y} \sin \gamma) e^{i(\vec{k}\vec{r}' - \omega t)} \quad (4-1)$$

avec comme vecteur d'onde à la fréquence fondamentale $\vec{k} = k\hat{Z} = n^\omega \omega/c \hat{Z}$. Le dipôle induit par ce champ électromagnétique peut s'écrire en fonction du tenseur d'hyperpolarisabilité dans le référentiel du laboratoire mais également en fonction du tenseur d'hyperpolarisabilité dans le référentiel microscopique (référentiel du composé) à condition d'effectuer un changement de référentiel grâce à la matrice de transformation des angles d'Euler :

$$\vec{P}(\vec{r}', 2\omega) = \vec{\beta}_L : \vec{E}(\vec{r}', \omega) \vec{E}(\vec{r}', \omega) \quad (4-2)$$

$$\vec{P}(\vec{r}', 2\omega) = T(\theta, \varphi, \psi) \vec{\beta}_{mic} : \vec{E}(\vec{r}', \omega) \vec{E}(\vec{r}', \omega) \quad (4-3)$$

Dans la configuration expérimentale choisie, le champ émis en zone lointaine de radiation par le dipôle rayonnant se met sous la forme :

$$\vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) = \left(\frac{2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^2 \left[(\hat{Y} \times \vec{P}(\vec{r}', 2\omega)) \times \hat{Y} \right] \frac{e^{i\vec{K}(\vec{r}-\vec{r}')}}{|\vec{r}-\vec{r}'|} \quad (4-4)$$

avec $K = 2n^{2\omega} \omega/c$, le vecteur d'onde à la fréquence harmonique. Si pendant la durée d'interaction, il existe une relation de phase entre les différents dipôles élémentaires, alors le champ total émis par le milieu est la somme des champs émis par chaque dipôle. Dans ce cas, l'onde émergente est cohérente. Au contraire si les phases entre les différents dipôles sont aléatoires, alors seules les intensités sont sommées : il n'y a pas de cohérence entre les sources et l'onde émergente est dite incohérente. Dans le cadre de la somme cohérente de dipôles rayonnant, le champ émis au second harmonique se met sous la forme :

$$\vec{E}_{tot}(\vec{r}, 2\omega) = \sum_i \vec{E}(\vec{r}, \vec{r}_i', 2\omega) = \left(\frac{2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^2 \sum_i \left[(\hat{Y} \times \vec{P}(\vec{r}_i', 2\omega)) \times \hat{Y} \right] \frac{e^{i\vec{K}(\vec{r}-\vec{r}_i')}}{|\vec{r}-\vec{r}_i'|} \quad (4-5)$$

Le champ harmonique dépend désormais de la somme des champs générés par chaque dipôle élémentaire. Pour pouvoir exprimer le tenseur d'hyperpolarisabilité de l'assemblage, c'est-à-dire la collection d'un nombre donné de dipôles élémentaires ayant une relation de phase entre eux fixée, il est utile d'introduire un référentiel intermédiaire entre le référentiel microscopique et le référentiel macroscopique, attaché à l'assemblage.

4.2.2 Référentiel mésoscopique

Précédemment, la diffusion non linéaire a été définie comme la diffusion d'une onde harmonique par N objets ne présentant pas de relation phase entre eux. L'onde diffusée est donc incohérente. Désormais, il s'agit d'assembler de manière cohérente dans un référentiel intermédiaire, le référentiel dit mésoscopique, m objets ou dipôles élémentaires microscopiques en q objets mésoscopiques. Evidemment, $m \gg q$. Le nombre total de dipôles dans la solution est de $N = m q$ et l'intensité totale incohérente est la somme des intensités provenant des q assemblages. Le champ provenant d'un assemblage est par contre la superposition cohérente des champs provenant des m objets constituant les assemblages.

$$I_{HRS} = \frac{\epsilon_0 c}{n^{2\omega}} q \left\langle \sum_{i,j=1}^m \vec{E}_i(\vec{r}, 2\omega) \vec{E}_j^*(\vec{r}, 2\omega) \right\rangle \quad (4-6)$$

Ainsi, l'intensité HRS contient donc des informations sur l'organisation de l'assemblage. Pour calculer le tenseur d'hyperpolarisabilité dans le référentiel mésoscopique de cet assemblage, la somme des tenseurs d'hyperpolarisabilité microscopique doit être réalisée en prenant en compte l'orientation et la position de chacun des dipôles élémentaires microscopiques. Puisque ces travaux sont réalisés en milieu liquide, le théorème d'ergodicité impose ensuite d'effectuer la somme sur toutes les orientations possibles de l'assemblage, voir Figure 4-1.

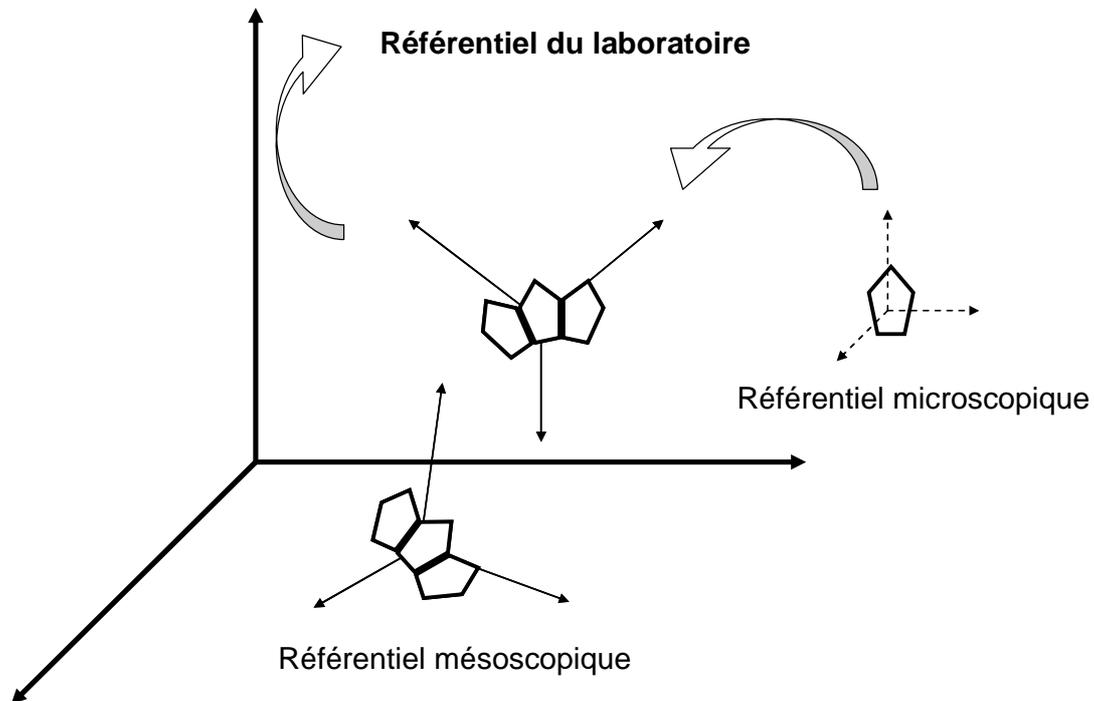


Figure 4-1 : Les différents référentiels pour le calcul de l'intensité HRS diffusée en fonction des assemblages.

4.2.3 Exemple : le Cristal Violet

Nous présentons en guise d'application l'exemple du cristal violet [3, 4]. Cette molécule est composée de 3 cycles aromatiques équivalents permettant une délocalisation de la charge

négative sur l'ensemble de la molécule. Ces trois cycles sont des systèmes d'électrons π délocalisés ayant chacun de part et d'autre un système donneur et un système accepteur d'électrons. Le système accepteur est constitué du carbone central alors que les groupes donneurs sont les groupes amines à l'extérieur. Cette molécule correspond à la symétrie D_{3h} puisque c'est une molécule plane en étoile où les trois cycles forment des angles de 120° [5], voir Figure 4-2.

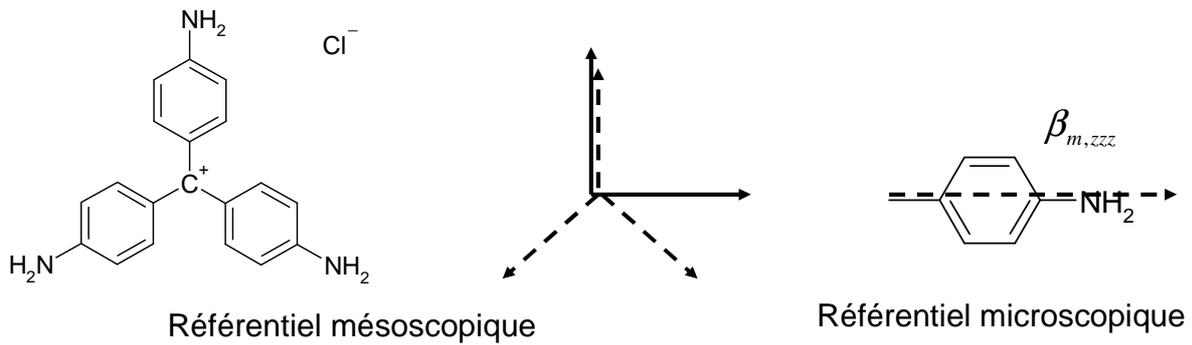


Figure 4-2 : molécule de Cristal Violet

Pour construire le tenseur d'hyperpolarisabilité du Cristal Violet, ce dernier peut être découpé en trois parties. Chaque partie est constituée d'un seul cycle aromatique et du groupe amine. A cette partie est attribué un tenseur d'hyperpolarisabilité microscopique dont le seul élément non nul est l'élément β_{zzz} selon l'axe C-N, en première approximation. Comme les trois parties de la molécule sont fixes entre elles, les relations de phase de chaque dipôle rayonnant sont fixes aussi. De plus, la distance entre chaque dipôle est très faible comparée aux longueurs d'onde fondamentale ou harmonique. Il n'y a donc pas de déphasage entre les champs rayonnés par les différentes parties de la molécule. Alors, le tenseur du Cristal Violet est la somme tensorielle des trois tenseurs microscopiques $\vec{\beta}_{mic}$ ramenés dans le référentiel mésoscopique. Ainsi :

$$\beta_{meso,IJK} = T_I'^z T_J'^z T_K'^z \beta_{m,zzz} + T_I''^z T_J''^z T_K''^z \beta_{m,zzz} + T_I'''^z T_J'''^z T_K'''^z \beta_{m,zzz} \quad (4-7)$$

$$\begin{aligned} \beta_{meso,ZZZ} &= (\cos 0^\circ)^3 \beta_{m,zzz} + (\cos 120^\circ)^3 \beta_{m,zzz} + (\cos 240^\circ)^3 \beta_{m,zzz} \\ &= 0.75 \beta_{m,zzz} \end{aligned} \quad (4-8)$$

$$\begin{aligned}
\beta_{meso,ZXX} = \beta_{meso,XXZ} = \beta_{meso,XXX} &= (\cos 0^\circ)(\sin 0^\circ \cos 0^\circ)^2 \beta_{m,zzz} \\
&+ (\cos 120^\circ)(\sin 120^\circ \cos 0^\circ)^2 \beta_{m,zzz} \\
&+ (\cos 240^\circ)(\sin 240^\circ \cos 0^\circ)^2 \beta_{m,zzz} \\
&= -0.75 \beta_{m,zzz}
\end{aligned} \tag{4-9}$$

Les autres éléments de tenseurs mésoscopiques sont nuls par raison de symétrie. Nous obtenons ainsi les valeurs du tenseur du Cristal Violet. Ces valeurs du tenseur correspondent aux valeurs d'un objet répondant à la symétrie D_{3h} [5]. A partir de là, nous calculons les éléments dans le référentiel du laboratoire. Nous insistons ici sur le caractère géométrique de cette description et non pas sur la détermination quantitative de l'hyperpolarisabilité du Crystal Violet. En effet, les trois parties du composé moléculaire ne sont pas indépendantes et des corrélations électroniques peuvent avoir lieu. Numériquement, la valeur des éléments de l'hyperpolarisabilité totale n'est pas dépendante de la valeur des éléments de l'hyperpolarisabilité de chaque partie mais plutôt d'une quantité tenant compte de ces interactions.

Si l'assemblage moléculaire n'est pas de taille négligeable devant la longueur d'onde, alors les relations de phase entre les dipôles rayonnant au sein de l'assemblage dépendent de leurs positions respectives et il n'est plus possible de faire la somme tensorielle des tenseurs d'hyperpolarisabilité. Il faut développer en effet un formalisme qui tient compte de la taille des assemblages.

4.3 Assemblages centrosymétriques

4.3.1 Prise en compte des effets retardés

Le champ électrique émis par un ensemble de dipôles cohérents s'écrit ainsi :

$$\vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) = \left(\frac{E_\omega 2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^2 \left[\left(\hat{Y} \times \left(\beta_L(\vec{r}') e^{2i\vec{k} \cdot \vec{r}'} : \hat{e}\hat{e} \right) \right) \times \hat{Y} \right] \frac{e^{i\vec{k}(\vec{r}-\vec{r}')}}{|\vec{r}-\vec{r}'|} \tag{4-10}$$

avec, dans la configuration expérimentale choisie :

$$\hat{e}\hat{e} = \hat{X}\hat{X} \cos^2 \gamma + 2\hat{X}\hat{Y} \cos \gamma \sin \gamma + \hat{Y}\hat{Y} \sin^2 \gamma \quad (4-11)$$

L'indice L du tenseur d'hyperpolarisabilité indique que le référentiel du laboratoire est utilisé. Or ce tenseur est la somme des tenseurs microscopiques dans le référentiel mésoscopique. Ensuite, une moyenne sur toutes les orientations est effectuée dans le cadre d'un processus de diffusion en milieu liquide. Par exemple, un assemblage composé de deux éléments élémentaires placés symétriquement par rapport à un centre d'inversion possède un tenseur dont toutes les composantes sont nulles en raison de la centrosymétrie. Or plusieurs expériences, en particulier sur les micelles [6] et les sphères métalliques [7], ont montré que ces systèmes centrosymétriques ont toutefois une réponse non linéaire importante. Il est donc nécessaire d'aller plus loin que l'approximation dipolaire électrique.

Dans l'expression (4-10), nous pouvons faire l'approximation du champ lointain $r \gg r'$:

$$|\vec{r} - \vec{r}'| \approx r - \hat{Y} \cdot \vec{r}' \quad (4-12)$$

Il vient donc :

$$\frac{e^{iK|\vec{r}-\vec{r}'|}}{|\vec{r}-\vec{r}'|} e^{2i\vec{k} \cdot \vec{r}'} \approx \frac{e^{iKr}}{r} e^{-i\vec{k} \cdot \vec{r}'} e^{2i\vec{k} \cdot \vec{r}'} = \frac{e^{iKr}}{r} e^{i\Delta\vec{k} \cdot \vec{r}'} \quad (4-13)$$

avec :

$$\Delta\vec{k} = 2\vec{k} - \vec{K} = 2k\hat{Z} - K\hat{Y} = \frac{2\omega}{c} (n^\omega \hat{Z} - n^{2\omega} \hat{Y}) \quad (4-14)$$

Nous obtenons ainsi le champ rayonné par un dipôle élémentaire :

$$\vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) = \left(\frac{E_\omega 2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^2 \left[(\hat{Y} \times (\beta_L : \hat{e}\hat{e})) \times \hat{Y} \right] e^{i\Delta\vec{k} \cdot \vec{r}'} \frac{e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}}}{r} \quad (4-15)$$

Les assemblages usuellement considérés ont des tailles caractéristiques n'excédant pas quelques dizaines de nanomètres, ce qui reste petit devant la longueur d'onde d'excitation de 800 nm. Dans ce cas, il est possible de développer l'exponentielle dans l'expression (4-13) :

$$e^{i\Delta\vec{k}\cdot\vec{r}'} = 1 + i\Delta\vec{k}\cdot\vec{r}' + \dots \quad (4-16)$$

L'ordre zéro de ce développement correspond à une réponse dipolaire de l'objet. En effet, aucun déphasage n'est pris en compte entre les différents dipôles rayonnants. L'ordre suivant, correspondant au premier terme retardé, dépend alors de la taille de l'objet par rapport à la longueur d'onde. En effet, pour cet ordre suivant, chaque dipôle à un instant t n'est pas excité par le même champ électrique incident et de plus ne radie pas une onde de même phase que celle de son voisin dans la direction de collection. Pour un objet centrosymétrique, la symétrie est rompue et les dipôles répartis de manière opposée de part et d'autre du centre d'inversion de l'objet ne s'annulent plus parfaitement. Ce terme prend donc en compte des effets retardés du champ électromagnétique à l'excitation ainsi qu'à la réémission.

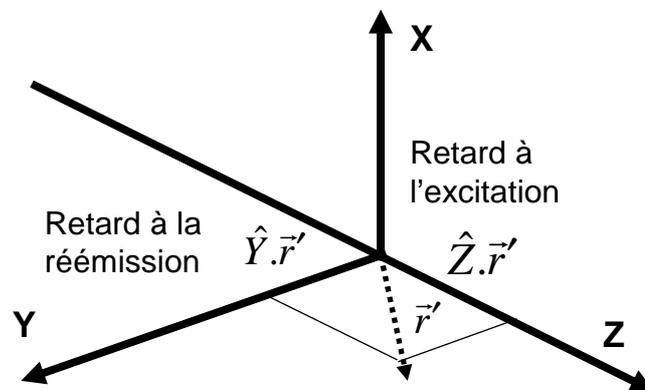


Figure 4-3 : géométrie des effets retardés

L'expression du champ émis par un dipôle, en prenant en compte le développement de l'exponentielle, devient donc :

$$\begin{aligned}\bar{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) &= \left(\frac{E_\omega 2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^2 \left[\left(\hat{Y} \times \left((1 + \Delta\vec{k} \cdot \vec{r}') \beta_L : \hat{e}\hat{e} \right) \right) \times \hat{Y} \right] \frac{e^{ikr}}{r} \\ &= \left(\frac{E_\omega 2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^2 \left\{ \left[\left(\hat{Y} \times (\beta_L : \hat{e}\hat{e}) \right) \times \hat{Y} \right] + \left[\left(\hat{Y} \times (i\Delta\vec{k} \cdot \vec{r}' \beta_L : \hat{e}\hat{e}) \right) \times \hat{Y} \right] \right\} \frac{e^{ikr}}{r}\end{aligned}\quad (4-17)$$

Le champ émis est composé de deux parties : la première partie est de nature purement dipolaire électrique alors que la seconde partie contient les termes retardés qui peuvent exciter tous les multipôles. Cette seconde partie est pondérée en particulier par le produit scalaire $\Delta\vec{k} \cdot \vec{r}'$. Plus l'objet est grand devant la longueur d'onde incidente et plus les effets retardés seront prépondérants dans la réponse totale. Pour un objet purement centrosymétrique, en particulier, le premier terme dipolaire électrique est nul. Ainsi, un objet centrosymétrique peut donc bien diffuser des photons harmoniques à condition de ne pas être trop petit devant la longueur d'onde afin que les effets retardés soient mesurables.

4.3.2 Assemblages résolus en polarisation

La partie dipolaire résolue en polarisation a déjà été traitée dans le Chapitre 1. Il s'agit désormais d'étudier la réponse en polarisation d'un système dont la taille n'est plus négligeable devant la longueur d'onde. La partie contenant les termes retardés dans l'équation (4-17) s'écrit :

$$\bar{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) = \left(\frac{E_\omega 2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^2 \left[\left(\hat{Y} \times (\Delta\vec{k} \cdot \vec{r}' \beta_L : \hat{e}\hat{e}) \right) \times \hat{Y} \right] \frac{e^{ikr}}{r} \quad (4-18)$$

Pour plus de lisibilité, nous introduisons le tenseur d'ordre 4 :

$$\vec{\Gamma}_L(\vec{r}') = \hat{r}' \cdot \vec{\beta}_L(\vec{r}') \quad (4-19)$$

et le moment retardé s'exprime de la manière suivante :

$$\vec{Q} = \Delta\vec{k} \cdot \vec{\Gamma}_L : \hat{e}\hat{e} \quad (4-20)$$

avec $\Delta\hat{k} = \Delta\vec{k}/\Delta k = (\hat{Z} - \hat{Y})/\sqrt{2}$, à condition que $n(\omega) \approx n(2\omega)$. En utilisant les équations précédentes et la géométrie du système expérimental, le moment retardé s'exprime encore de la manière suivant :

$$\bar{Q} = \frac{1}{\sqrt{2}} (\hat{Z} - \hat{Y}) \tilde{\Gamma}_L : (\hat{X}\hat{X} \cos^2 \gamma + 2\hat{X}\hat{Y} \cos \gamma \sin \gamma + \hat{Y}\hat{Y} \sin^2 \gamma) \quad (4-21)$$

Le tenseur d'ordre 4 $\tilde{\Gamma}_L$ n'a pas besoin d'être entièrement connu car la géométrie du système ne nous donne accès qu'à une partie de ses éléments. En effet, les deux derniers indices du tenseur ne peuvent être que XX , XY ou YY en raison de la géométrie du champ électrique fondamental. Le premier indice en revanche ne peut être que Z ou Y ce qui correspond aux effets retardés à l'excitation selon Z et à l'émission selon Y . Le deuxième indice, qui dépend des polarisations de l'analyseur, ne peut être que selon les axes X ou Z en raison de la géométrie du système expérimental détaillée précédemment. Ainsi la composante I (X ou Z) du moment quadripolaire s'exprime comme :

$$\begin{aligned} Q_{L,I} &= \frac{1}{\sqrt{2}} [\Gamma_{L,ZIXX} \cos^2 \gamma + 2\Gamma_{L,ZIXY} \cos \gamma \sin \gamma + \Gamma_{L,ZIYY} \sin^2 \gamma] \\ &+ \frac{1}{\sqrt{2}} [\Gamma_{L,YIXX} \cos^2 \gamma + 2\Gamma_{L,YIXY} \cos \gamma \sin \gamma + \Gamma_{L,YIYY} \sin^2 \gamma] \\ &= \tilde{\Gamma}_{L,IXX} \cos^2 \gamma + \tilde{\Gamma}_{L,IXY} \cos \gamma \sin \gamma + \tilde{\Gamma}_{L,IYY} \sin^2 \gamma \end{aligned} \quad (4-22)$$

avec :

$$\tilde{\Gamma}_{L,IXX} = \frac{1}{\sqrt{2}} [\Gamma_{L,ZIXX} + \Gamma_{L,YIXX}] \quad (4-23)$$

$$\tilde{\Gamma}_{L,IXY} = \sqrt{2} [\Gamma_{L,ZIXY} + \Gamma_{L,YIXY}] \quad (4-24)$$

$$\tilde{\Gamma}_{L,IYY} = \frac{1}{\sqrt{2}} [\Gamma_{L,ZIYY} + \Gamma_{L,YIYY}] \quad (4-25)$$

et le champ harmonique réémis :

$$\vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) = \left(\frac{E_\omega 2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^2 (i\Delta k.r') \frac{e^{ikr}}{r} \begin{pmatrix} Q_{L,X} \\ 0 \\ Q_{L,Z} \end{pmatrix} \quad (4-26)$$

Le champ total émis, prend lui en compte le terme dipolaire, cf. Chapitre 1, et le terme retardé ci-dessus :

$$\begin{aligned} \vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) &= \frac{e^{ikr}}{r} \left(\frac{E_\omega 2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^2 \left[\begin{pmatrix} P'_{L,X} \\ 0 \\ P'_{L,Z} \end{pmatrix} + (i\Delta k.r') \begin{pmatrix} Q_{L,X} \\ 0 \\ Q_{L,Z} \end{pmatrix} \right] \\ &= \vec{E}_{nr}(\vec{r}, 2\omega) + \vec{E}_r(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) \end{aligned} \quad (4-27)$$

Le champ retardé est donc finalement bien pondéré par le facteur $i\Delta k.r'$. L'intensité totale émise est le module du champ total et la somme des intensités du champ non retardé et du champ retardé. Il n'y a pas d'interférence entre ces deux champs en raison du déphasage entre le dipôle et le terme retardé, non complexe. Cette distinction n'est possible que si l'objet est hors résonance et que le tenseur d'hyperpolarisabilité est réel ou imaginaire pur. Nous pouvons alors exprimer les intensités de manière indépendante. Les intensités harmoniques rayonnées à 90° polarisées selon la direction V ou H du champ retardé sont :

$$\begin{aligned} I_{HRS, \text{retardé}}^V &= \frac{\epsilon_0 c}{n^{2\omega} r^2} \left(\frac{2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^4 (E_\omega E_\omega^*)^2 (\Delta k.r')^2 \langle Q_{L,X} Q_{L,X}^* \rangle \\ &= a^V \cos^4 \gamma + b^V \cos^2 \gamma \sin^2 \gamma + c^V \sin^4 \gamma \end{aligned} \quad (4-28)$$

$$\begin{aligned} I_{HRS, \text{retardé}}^H &= \frac{\epsilon_0 c}{n^{2\omega} r^2} \left(\frac{2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^4 (E_\omega E_\omega^*)^2 (\Delta k.r')^2 \langle Q_{L,Z} Q_{L,Z}^* \rangle \\ &= a^H \cos^4 \gamma + b^H \cos^2 \gamma \sin^2 \gamma + c^H \sin^4 \gamma \end{aligned} \quad (4-29)$$

Les différents coefficients fonction des composantes du tenseur d'ordre 4 sont tels que :

$$a^V = \frac{\epsilon_0 c}{n^{2\omega} r^2} \left(\frac{2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^4 (E_\omega E_\omega^*)^2 (\Delta k.r')^2 \langle \tilde{\Gamma}_{L,XXX} \tilde{\Gamma}_{L,XXX}^* \rangle \quad (4-30)$$

$$b^V = \frac{\varepsilon_0 c}{n^{2\omega} r^2} \left(\frac{2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^4 (E_\omega E_\omega^*)^2 (\Delta k \cdot r')^2 \langle 2\tilde{\Gamma}_{L,XXX} \tilde{\Gamma}_{L,YYY}^* + \tilde{\Gamma}_{L,XXY} \tilde{\Gamma}_{L,XXY}^* \rangle \quad (4-31)$$

$$c^V = \frac{\varepsilon_0 c}{n^{2\omega} r^2} \left(\frac{2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^4 (E_\omega E_\omega^*)^2 (\Delta k \cdot r')^2 \langle \tilde{\Gamma}_{L,XXY} \tilde{\Gamma}_{L,XXY}^* \rangle \quad (4-32)$$

$$a^H = \frac{\varepsilon_0 c}{n^{2\omega} r^2} \left(\frac{2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^4 (E_\omega E_\omega^*)^2 (\Delta k \cdot r')^2 \langle \tilde{\Gamma}_{L,ZXX} \tilde{\Gamma}_{L,ZXX}^* \rangle \quad (4-33)$$

$$b^H = \frac{\varepsilon_0 c}{n^{2\omega} r^2} \left(\frac{2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^4 (E_\omega E_\omega^*)^2 (\Delta k \cdot r')^2 \langle 2\tilde{\Gamma}_{L,ZXX} \tilde{\Gamma}_{L,ZYY}^* + \tilde{\Gamma}_{L,ZXY} \tilde{\Gamma}_{L,ZXY}^* \rangle \quad (4-34)$$

$$c^H = \frac{\varepsilon_0 c}{n^{2\omega} r^2} \left(\frac{2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^4 (E_\omega E_\omega^*)^2 (\Delta k \cdot r')^2 \langle \tilde{\Gamma}_{L,ZYY} \tilde{\Gamma}_{L,ZYY}^* \rangle \quad (4-35)$$

Les intensités HRS s'expriment donc en fonction du tenseur d'ordre 4 lorsque l'objet diffusant n'est pas trop petit devant la longueur d'onde. Comme pour les assemblages dans l'approximation dipolaire électrique, les composantes de ce tenseur s'expriment en fonction du tenseur d'ordre 4 dans les référentiels mésoscopique et microscopique.

4.4 Le paramètre η

Deux types de rayonnement ont été identifiés dans les chapitres précédents : le rayonnement dipolaire des molécules et le rayonnement quadripolaire des arrangements sphériques. Dans le premier cas $a^V + c^V = b^V$ et dans le deuxième cas seul b^V est non nul. Nous introduisons donc le paramètre η pour rendre compte du caractère dipolaire ou quadripolaire du champ émis :

$$\eta = \frac{a^V + c^V}{b^V} = 1 - \xi^V \quad (4-1)$$

avec ξ^v utilisé par la communauté des scientifiques travaillant sur les particules métalliques notamment [19] alors que le paramètre η est utilisé par la communauté travaillant sur les composés moléculaires [3]. Pour un objet purement dipolaire ce paramètre est égal à 1 alors que pour un objet purement quadripolaire ce paramètre est égal à zéro. Pour un assemblage quelconque, ce paramètre prend une valeur différente et quantifie le poids de chaque contribution.

4.5 Assemblage centrosymétrique ordonné : la répartition sphérique

Les micelles sphériques peuvent être considérées comme un bon exemple de répartition sphérique des molécules. Les micelles sphériques sont des objets nanométriques composées de molécules le plus souvent amphiphiles. Ces molécules ont donc une partie hydrophile et une partie hydrophobe, voir Figure 4-4. Lorsque la concentration de ces molécules dans une solution aqueuse devient supérieure à une certaine concentration appelée concentration micellaire critique (CMC) [8], ces molécules s'organisent en petites sphères de manière à protéger leur partie hydrophobe au centre de la micelle et présenter vers l'extérieur leur partie hydrophile, voir Figure 4-4.

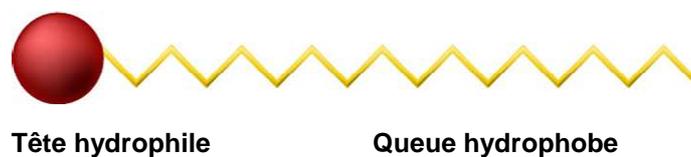


Figure 4-4 : représentation d'une molécule amphiphile

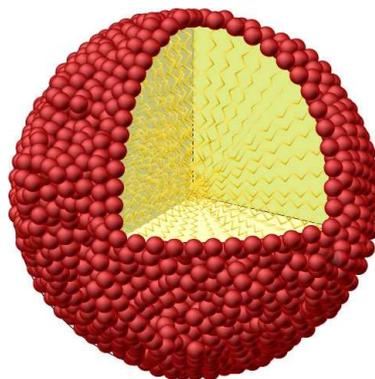


Figure 4-5 : micelle composée de molécules amphiphiles

Nous considérons que la réponse de chaque molécule amphiphile, formant un dipôle élémentaire, est dipolaire électrique et que le tenseur d'hyperpolarisabilité peut être réduit à une seule composante $\beta_{m,zzz}$ selon l'axe z de la molécule, cf. Chapitre 1 décrivant la molécule de Dia. L'extension au cas de plusieurs composantes $\beta_{m,ijk}$ ne pose toutefois aucune difficulté. Dans le cadre de l'approximation dipolaire électrique, il est évident que la réponse dipolaire d'une micelle sphérique est nulle en raison de sa centrosymétrie. Pour obtenir l'intensité HRS diffusée par un tel objet, il faut introduire les effets retardés. Le tenseur d'ordre 4 microscopique est de la forme :

$$\vec{\Gamma}_m = \hat{r}'_m \cdot \vec{\beta}_m$$

avec comme seul élément non nul du tenseur $\vec{\beta}_m$ la composante $\beta_{m,zzz}$. De plus, \hat{r}'_m est le vecteur directeur de la position de la molécule le long de l'axe Oz du référentiel microscopique à une distance a . Ainsi :

$$\vec{r}'_m = a \cdot \hat{z}$$

Le tenseur d'ordre 4 possède donc une seule composante non nulle $\Gamma_{m,zzzz}$. Pour le calcul du tenseur d'ordre 4 dans le référentiel mésoscopique nous introduisons la densité surfacique de molécules $\rho_s = m/S$ où m est le nombre de molécules présentes dans l'assemblage et $S = 4\pi a^2$ est la surface de la sphère. Le calcul du tenseur mésoscopique se fait par intégration continue pour un grand nombre de molécules dans la micelle. Cette intégrale est réalisée sur la surface de la sphère.

$$\Gamma_{mésos,ZIJK} = \int_S \rho_s T_Z^z T_I^z T_J^z T_K^z \Gamma_{m,zzzz} dS \quad (4-36)$$

$$\Gamma_{\text{més},YIJK} = \int_S \rho_S T_Y^z T_I^z T_J^z T_K^z \Gamma_{m,zzzz} dS \quad (4-37)$$

avec :

$$dS = a^2 \sin \theta d\theta d\phi \quad (4-38)$$

L'intégration sur la sphère donne :

$$\begin{aligned} \Gamma_{\text{més},ZXXX} &= \Gamma_{\text{més},ZXXY} = \Gamma_{\text{més},ZXYX} \\ &= \Gamma_{\text{més},YXXX} = \Gamma_{\text{més},YXXY} = \Gamma_{\text{més},ZXXY} \\ &= \Gamma_{\text{més},YZXX} = \Gamma_{\text{més},YZXY} = \Gamma_{\text{més},YZYX} = 0 \end{aligned} \quad (4-39)$$

$$\Gamma_{\text{més},YXXY} = \Gamma_{\text{més},ZZXX} = \Gamma_{\text{més},ZZYY} = \frac{1}{15} m \cdot \beta_{m,zzz} \quad (4-40)$$

Pour obtenir le tenseur dans le référentiel du laboratoire, nous devons effectuer une transformation du tenseur mésoscopique vers le référentiel du laboratoire. La symétrie sphérique des micelles implique cependant que la matrice de passage du référentiel mésoscopique au référentiel du laboratoire est la matrice unité. On obtient donc :

$$\vec{\Gamma}_L = \vec{\Gamma}_{\text{més}} \quad (4-41)$$

Les seuls éléments non nuls du tenseur dans le référentiel du laboratoire sont ceux exprimés en (4-40). En utilisant l'expression des coefficients $a^V, b^V, c^V, a^H, b^H, c^H$ en fonction des éléments du tenseur, on obtient :

$$a^V = c^V = 0 \quad (4-42)$$

$$b^V = \frac{\epsilon_0 c}{n^2 \omega r^2} \left(\frac{2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^4 (E_\omega E_\omega^*)^2 (\Delta k \cdot a)^2 \frac{m^2}{225} |\beta_{m,zzz}^2| \quad (4-43)$$

$$a^H = c^H = \frac{b^H}{2} = \frac{\varepsilon_0 c}{n^{2\omega} r^2} \left(\frac{2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^4 (E_\omega E_\omega^*)^2 (\Delta k \cdot a)^2 \frac{m^2}{225} |\beta_{m,zzz}^2| \quad (4-44)$$

et les intensités rayonnées pour un tel objet centrosymétrique sphérique sont :

$$I_{HRS}^V = b^V \cos^2 \gamma \sin^2 \gamma \quad (4-45)$$

$$I_{HRS}^H = a^H \quad (4-46)$$

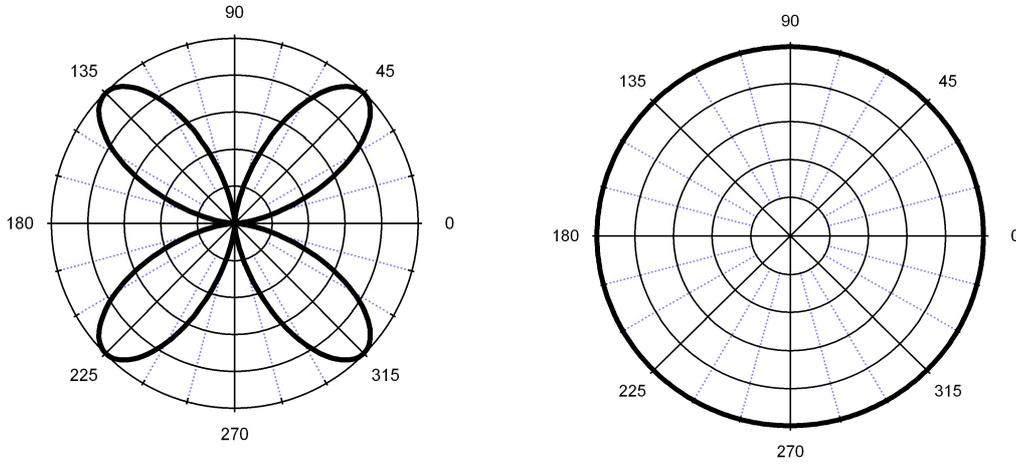


Figure 4-6 : graphe polaire de l'intensité HRS totale d'un assemblage sphérique détectée selon une polarisation verticale (gauche) et horizontale (droite).

Ces résultats conduisent à observer que les relations (1-33), (1-34), (1-36) et (1-37) entre les coefficients $a^V, b^V, c^V, a^H, b^H, c^H$ développées dans le Chapitre 1 ne sont plus vérifiées. Une manière simple de déterminer si la réponse d'un tel assemblage provient en partie des effets retardés est alors de vérifier si les relations entre ces coefficients obéissent aux règles de l'approximation dipolaire électrique. Pour cela, nous introduisons le coefficient ξ^V :

$$\xi^V = \left| \frac{b^V - (a^V + c^V)}{b^V} \right| \quad (4-47)$$

Si $\xi^V = 0$, alors la règle initiale $a^V + c^V = b^V$ est vérifiée et le rayonnement observé est purement dipolaire. Au contraire si $\xi^V \neq 0$, le rayonnement observé provient en partie des effets retardés. Ce type de graphes polaires a ainsi été plusieurs fois observé pour des objets aussi différents que des micelles, voir Figure 4-7 [6] ou des nano particules métalliques d'or et d'argent [7].

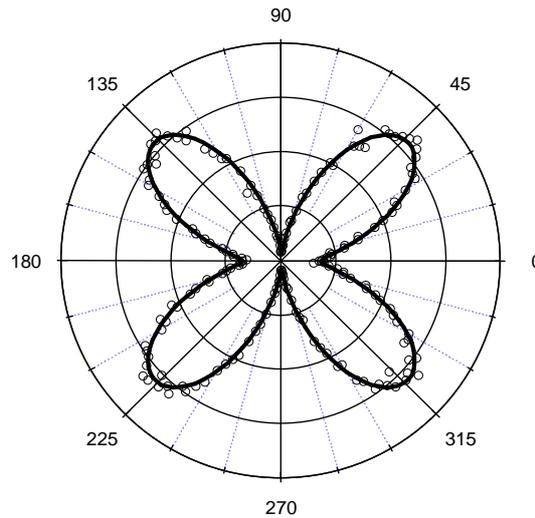


Figure 4-7 : Intensité HRS polarisée verticalement en fonction de la polarisation incidente de micelles - 12.5 μM de Dia et de 3 mM de surfactant SDS dilué dans une solution de 5 :1 eau – méthanol.

4.6 Assemblages centrosymétriques désordonnés : les solvants

4.6.1 Description

Les mesures de l'hyperpolarisabilité de composés moléculaires ou d'assemblages en diffusion Hyper Rayleigh sont usuellement effectuées en présence de solvants. Les objets étudiés sont alors suffisamment dilués pour être sans interaction entre eux. Les molécules de solvant peuvent toutefois induire un champ de polarisation autour de la molécule. En effet, des mesures d'hyperpolarisabilité de molécules en phases liquide et gazeuse ont démontré ce phénomène [9]. De même, une molécule solubilisée dans différents solvants présente une hyperpolarisabilité différente pour chacun d'eux [10]. Le solvant peut également être à

l'origine de la réponse non linéaire d'une molécule de structure centrosymétrique en induisant un champ de polarisation autour de celle-ci [11].

Dans un milieu liquide, la concentration en molécules de solvant reste très forte et l'environnement d'une molécule de solvant est majoritairement occupé par le solvant lui-même. Cela rend l'étude des solvants purs différente des études de composés dilués puisque les positions et les orientations des molécules ne sont pas indépendantes les unes des autres.

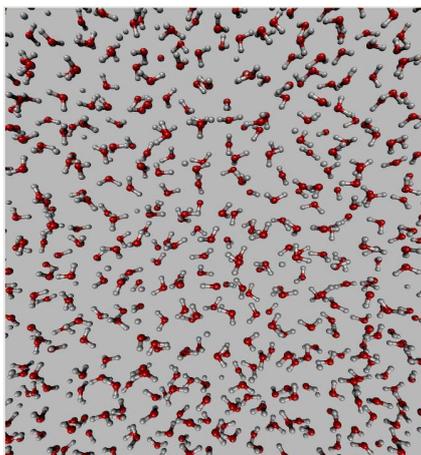


Figure 4-8 : Image extraite d'un calcul de dynamique moléculaire de molécules d'eau

Les interactions entre molécules de solvant, le plus souvent à courte portée, peuvent en effet induire des corrélations d'orientation. L'acétonitrile, par exemple, possède un fort moment dipolaire. Ce moment dipolaire tend à orienter les molécules voisines de proche en proche. L'eau possède également un fort moment dipolaire et les liaisons hydrogènes tendent aussi à orienter les molécules. Des expériences de dynamique moléculaire ont mis ce phénomène en évidence [12]. Les molécules d'eau, en prenant pour référence une molécule d'origine, ont des orientations privilégiées allant jusqu'à 0.5 nm, voir Figure 4-9. Au-delà, il n'y a plus d'orientation privilégiée et celles-ci deviennent aléatoires. Ces propriétés d'orientation ne sont pas présentes chez tous les solvants. Chez ceux qui ne possèdent pas de moment dipolaire fort ou de liaison hydrogène par exemple, comme le chloroforme ou l'hexane, aucune orientation privilégiée n'a été rapportée.

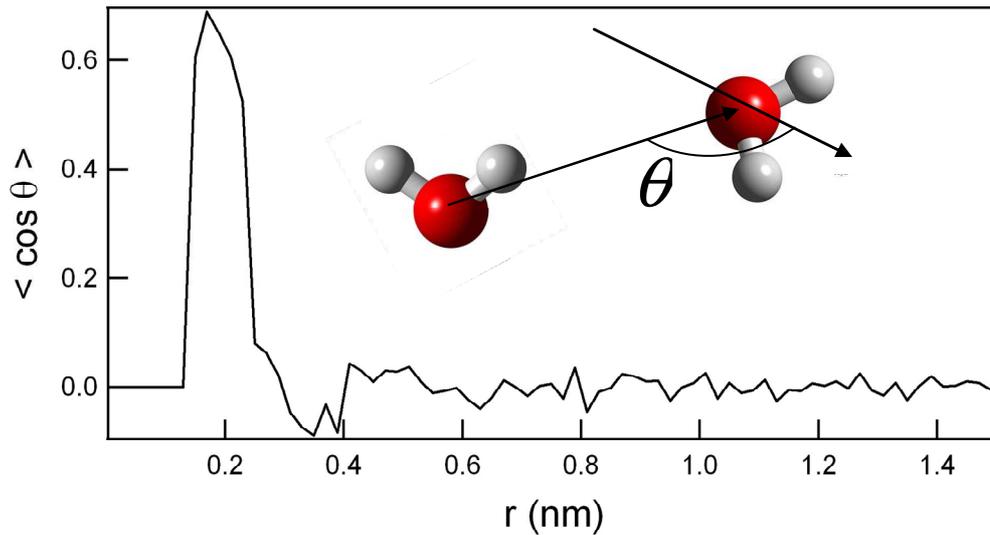


Figure 4-9 : simulation avec Gromac3 [13] utilisant le modèle SPC [14] sur 4500 molécules d'eau et 50 ps. Simulation réalisée par C. Loison (LASIM).

La différence entre un liquide et un cristal ou un solide amorphe est le changement de position et d'orientation des molécules au court du temps. Pour un liquide comme l'eau, plusieurs techniques comme la spectroscopie terahertz [15] ou la résonance magnétique nucléaire [16] ont permis d'étudier la dynamique des mouvements de réorientation. Ainsi dans l'eau liquide les temps de réorientation vont de 1 picoseconde à 10 picosecondes [17]. Ces réorientations continues dans les liquides font que ceux-ci ne sont pas toujours centrosymétriques. Localement, des fluctuations sont à l'origine de ruptures de centrosymétrie.

4.6.2 HRS de solvant : eau, acétonitrile et chloroforme

Les liquides sont macroscopiquement centrosymétriques. Cependant, les fluctuations d'orientation propres aux fluides rompent localement la centrosymétrie et un signal de diffusion HRS peut être généré [18, 19]. P.D. Maker a mis également en évidence que ces fluctuations d'orientation sont également responsables de l'élargissement spectral de la lumière diffusée [20]. Cette diffusion inélastique permet de plus de mettre en évidence les modes de réorganisation moléculaire [21]. Les temps caractéristiques de réorientation obtenus sont typiquement de 10 picosecondes, en accord avec les autres techniques expérimentales. Ces modes de réorganisation sont aussi visibles par la diffusion Hyper Rayleigh résolue en polarisation [22, 23].

Une étude HRS résolue en polarisation de l'eau, de l'acétonitrile et du chloroforme a été menée afin d'obtenir des informations complémentaires sur les phénomènes d'émission microscopique.

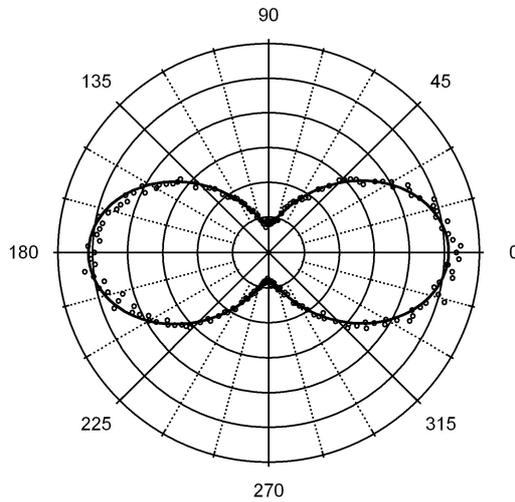


Figure 4-10 : Intensité non linéaire de l'eau (u.a) en fonction de l'angle de polarisation du champ incident (point) pour une détection verticale. Fit (ligne) : $a^V = 1545 \pm 7$, $b^V = 1576 \pm 25$, $c^V = 243 \pm 7$.

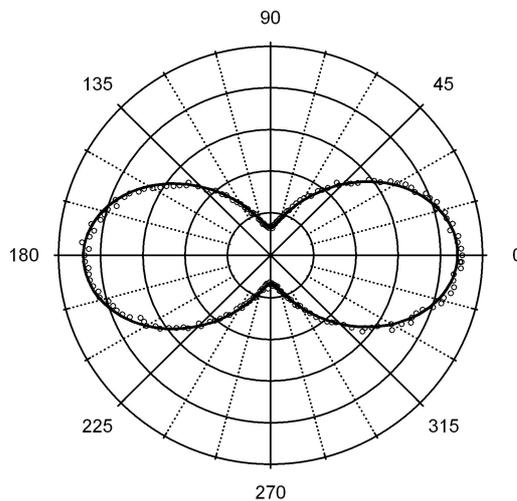


Figure 4-11: Intensité non linéaire de l'acétonitrile (u.a) en fonction de l'angle de polarisation du champ incident (point) pour une détection verticale. Fit (ligne) : $a^V = 2216 \pm 5$, $b^V = 2179 \pm 22$, $c^V = 341 \pm 5$.

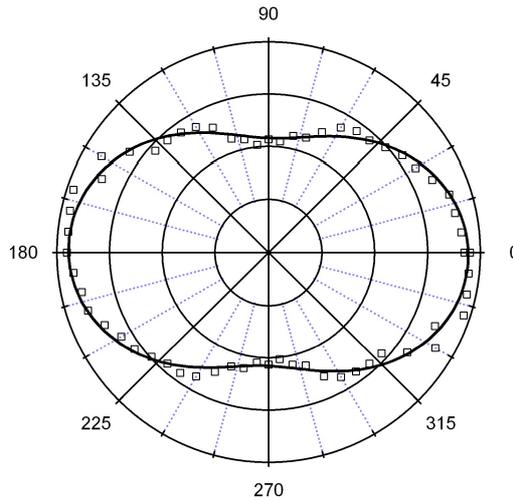


Figure 4-12: Intensité non linéaire du chloroforme (u.a) en fonction de l'angle de polarisation du champ incident (point). Fit (ligne) : $a^V = 1896 \pm 15$, $b^V = 3005 \pm 63$, $c^V = 1086 \pm 16$.

Tout d'abord, le rapport de dépolarisation, rapport entre l'intensité diffusée lorsque l'excitation est polarisée à 0° et 90° , renseigne sur les différentes valeurs des composantes du tenseur microscopique d'hyperpolarisabilité du solvant [2]. Pour l'eau nous obtenons une valeur du rapport de dépolarisation $D = 0.15 \pm 0.01$ et pour l'acétonitrile un rapport de dépolarisation $D = 0.15 \pm 0.01$. Ces valeurs sont en bon accord avec la valeur obtenue par P.D. Maker en 1965 : $D = 0.12 \pm 0.02$ sur l'eau et $D = 0.11 \pm 0.02$ sur l'acétonitrile. Ces valeurs du rapport de dépolarisation permettent de déterminer le rapport des composantes microscopiques du tenseur d'hyperpolarisabilité. En faisant l'hypothèse que les deux composantes majoritaires pour l'eau et l'acétonitrile sont β_{zzz} et β_{zxx} , nous obtenons $\beta_{zzz} \approx 3\beta_{zxx}$ pour ces deux solvants. Ces valeurs sont peu en accord avec les valeurs théoriques pour l'eau où les deux composantes sont du même ordre de grandeur [24]. L'environnement des molécules peut expliquer l'écart entre la mesure expérimentale et le calcul théorique réalisé pour une seule molécule dans le vide. Pour le chloroforme, nous obtenons un rapport de dépolarisation $D = 0.57 \pm 0.03$ [3] ce qui donne $\beta_{zzz} \approx \beta_{zxx}$.

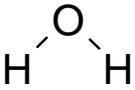
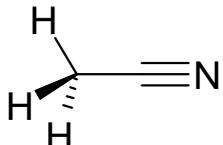
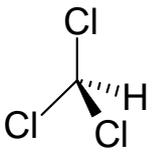
<u>EAU</u>	<u>ACETONITRILE</u>	<u>CHLOROFORME</u>
		
$D = 0.15 \pm 0.01$	$D = 0.15 \pm 0.01$	$D = 0.57 \pm 0.03$
$\xi = 0.134 \pm 0.03$	$\xi = 0.174 \pm 0.02$	$\xi = 0.008 \pm 0.01$

Tableau 14 : Mesures expérimentales du rapport de dépolarisation et de ξ^V pour l'eau, l'acétonitrile et le chloroforme.

En plus du rapport de dépolarisation, le paramètre ξ^V a été extrait des courbes en polarisation. Pour le chloroforme on obtient une valeur de $\xi^V = 0.008 \pm 0.01$. Cette valeur correspond, aux erreurs expérimentales près, à un cas d'émission de nature strictement dipolaire. Comme pour une molécule dans un milieu dilué, il n'y a donc pas de corrélation entre les molécules de chloroforme. En revanche, dans le cas de l'eau pure, nous mesurons une valeur de $\xi^V = 0.13 \pm 0.03$ et pour l'acétonitrile de $\xi^V = 0.17 \pm 0.02$. Ces deux mesures mettent en évidence la présence d'effets retardés. Ceux-ci ont été déjà mis en évidence sur l'acétonitrile [25]. En effet Shelton *et coll.* ont mesuré des écarts entre les coefficients c^V et a^H qui dans l'approximation dipolaire doivent être strictement égaux. Parallèlement à ces mesures résolues en polarisation, des mesures spectrales ont également été menées par cette même équipe [23]. Un élargissement de la raie de second harmonique pour différentes polarisations d'entrée et de sortie a été observé. Ces deux modes de mesure différents mettent en évidence des modes non locaux de rotations moléculaires des dipôles appelés librons. Ceux-ci se traduisent par un élargissement de la raie HRS à cause de la diffusion quasi-élastique des photons et par des écarts au rayonnement dipolaire dû à la corrélation longue portée des molécules d'eau et d'acétonitrile. Ces librons correspondent à la propagation d'une onde de moments dipolaires au même titre qu'il existe des ondes de spin. Tout d'abord mis en évidence sur l'acétonitrile qui a un fort moment dipolaire, ce phénomène l'a également été sur l'eau [22].

La manière dont la mesure est effectuée ici permet une meilleure sensibilité. En effet lorsque nous comparons les paramètres c^V et a^H [23], nous devons modifier la position de l'analyseur. Or toute manipulation peut entraîner des erreurs expérimentales sur l'intensité absolue de la mesure, qui peut aussi provenir de la réponse en polarisation des appareils de détection. En revanche, en comparant directement les coefficients a^V , b^V et c^V , la direction de l'analyseur n'est pas modifiée et la mesure est auto calibrée, évitant ainsi les erreurs possibles.

4.6.3 Etude de l'eau salée

Pour mettre en évidence la présence des librons et obtenir des informations complémentaires, une étude en polarisation de l'eau salée a été menée. L'eau est une molécule polaire et la présence d'ions engendre des modifications de ses propriétés macroscopiques comme la viscosité [26]. Du point de vue microscopique, les molécules d'eau s'orientent autour des ions de manière à minimiser l'énergie d'interaction coulombienne. En effet, les oxygènes de l'eau se placent au plus près autour des cations alors que les hydrogènes se placent au plus près autour des anions. Plusieurs techniques ont permis d'apporter des informations sur l'effet des ions sur la liaison hydrogène. En effet, les rayons X et la diffraction de neutrons ont permis de déterminer les distances moyennes entre les ions et les molécules d'eau dans la première couronne de solvation [27] mais sans rendre compte de la dynamique. La dynamique moléculaire a permis de montrer que le nombre moyen de liaison hydrogène tend à diminuer quand la concentration en sel dépasse 1 mol/L [28]. Des mesures optiques du type pompe-sonde infrarouge et de diffraction de neutrons ont également démontré que les sels n'ont pas d'influence sur l'organisation moléculaire au-delà de la deuxième couronne de solvation, c'est-à-dire au-delà de 0.5 nm [29-31].

Nous avons cherché à obtenir une signature optique non linéaire des modifications d'organisation de l'eau autour des ions, des mesures en polarisation de l'eau ont été effectuées avec différentes concentrations de sels, allant de la mol/L à la centaine de nano mol/L. Aucune augmentation des intensités absolues en fonction de la concentration de sel n'a été observée, autre que les effets de polarisation, ce qui tend à démontrer que les sels n'ont pas de réponse non linéaire propre. Ainsi, la seule origine du signal provient de l'eau. Pour chaque

concentration, les coefficients a^V, b^V, c^V ont été extraits des différentes courbes en polarisation et le coefficient ξ^V a été calculé selon l'équation (4-47), voir Figure 4-13. L'observation de la Figure 4-13 nous permet de distinguer deux régimes distincts. Tout d'abord, aux concentrations faibles en sels, le coefficient ξ^V est très proche du coefficient mesuré pour l'eau pure. Ensuite, pour les concentrations fortes en sels le coefficient ξ^V est proche de zéro. Pour ce régime de concentrations, il est possible d'affirmer que la réponse de l'eau est proche d'un comportement purement dipolaire. La transition entre ces deux régimes a lieu entre 10 $\mu\text{mol/L}$ et 100 $\mu\text{mol/L}$. Afin d'essayer d'apporter des éléments complémentaires, l'expérience a été réalisée avec deux types de sels, le chlorure de sodium et le chlorure de potassium afin d'observer d'éventuels effets en fonction de la taille des ions. Aucune différence de comportement entre les deux types de sel, NaCl et KCl, n'a été observée. L'ion K^+ est en effet plus gros que l'ion Na^+ mais l'effet n'est pas suffisant pour être visible.

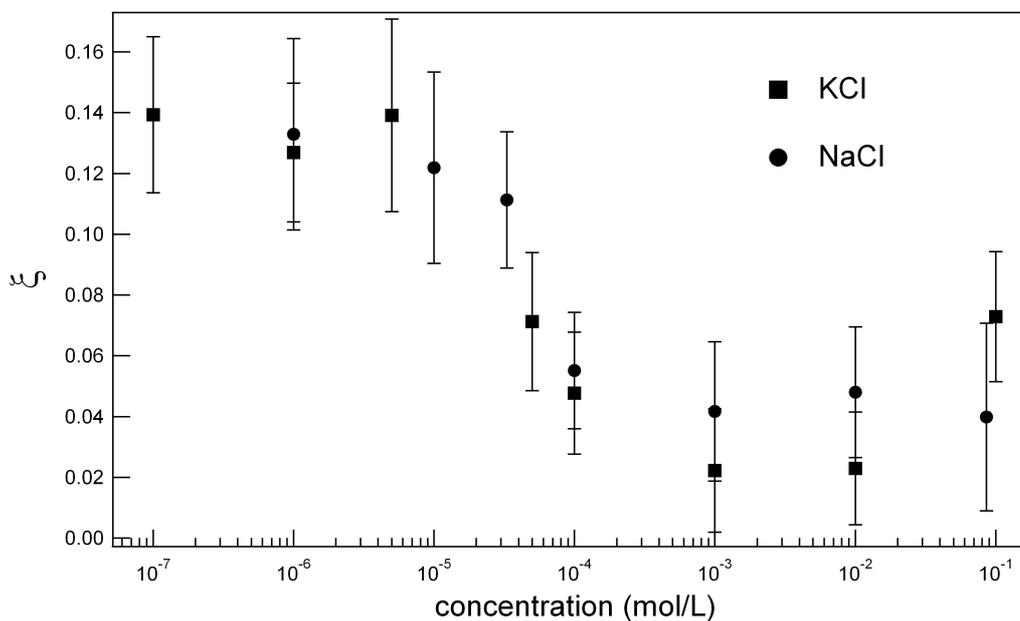


Figure 4-13 : ξ^V en fonction de la concentration en sel pour KCl et NaCl

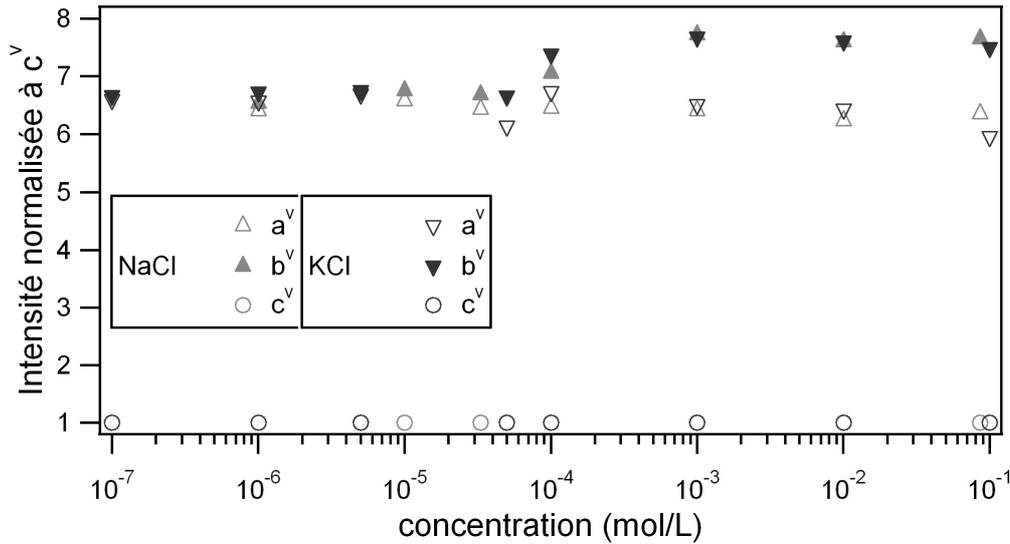


Figure 4-14 : coefficients en fonction du sel et de la concentration

L'augmentation du paramètre ξ^v lorsque la concentration en sel diminue est due à la diminution du coefficient b^v par rapport aux coefficients a^v et c^v . Cette diminution intervient autour de $100 \mu\text{mol/L}$ et le coefficient b^v est alors du même ordre que a^v , voir Figure 4-14. L'effet des sels sur la modification locale de l'organisation de l'eau n'est pas visible par la diffusion non linéaire. En effet, les échelles des perturbations sont en deçà de la longueur d'onde visible. A cette distance, le terme des effets retardés est pondéré par le facteur $(\Delta \bar{k} \cdot \vec{r}')^2$ qui est de l'ordre de 0.1% par rapport au terme dipolaire, voir (4-17). Pour que la signature sur les coefficients de diffusion HRS soit importante, les corrélations doivent être de taille plus importante. Cependant, le changement de comportement de ξ^v a lieu autour de $100 \mu\text{mol/L}$ de sel. A cette concentration, la distance caractéristique entre les ions est d'environ 20 nm. Une structure de 20 nm peut par contre être visible puisque le terme retardé est de l'ordre de 15% par rapport au terme dipolaire. Par ailleurs, la corrélation orientationnelle des molécules d'eau influe sur la diminution du coefficient b^v .

Shelton *et coll.* ont récemment rapporté qu'il existe deux types de librons. Des librons provenant des fluctuations transverses dont les temps de relaxation sont de l'ordre de 10 ps et également des librons provenant des fluctuations longitudinales et dont les temps de relaxation sont supérieurs à 50 ns. Ces ondes de relaxations longitudinales correspondent à des longueurs d'onde de l'ordre de 280 nm [21]. Il existe donc des structures dans l'eau qui

sont de taille importante devant les longueurs d'onde optiques. La présence du sel joue alors un rôle destructif vis-à-vis de ces structures à longues portées. Si la concentration est inférieure à 10 $\mu\text{mol/L}$, les ions sont espacés d'au minimum 40 nm en moyenne. Dans ce cas, les molécules d'eau peuvent s'organiser et présenter une orientation privilégiée. En revanche lorsque la concentration est supérieure à 100 $\mu\text{mol/L}$, la distance maximum chute à 20 nm ce qui ne permet pas aux molécules d'eau de développer ces modes longitudinaux de réorganisation.

4.7 Conclusions

L'introduction du référentiel mésoscopique dans la construction du tenseur d'hyperpolarisabilité permet d'obtenir une relation entre la géométrie d'un assemblage et l'intensité de seconde harmonique diffusée. Il est ainsi possible de construire à partir de briques simples dans le référentiel microscopique un tenseur dans le référentiel mésoscopique. Si l'objet est petit devant la longueur d'onde, le cadre de l'approximation dipolaire électrique est suffisant. En revanche si l'objet possède une taille trop importante devant la longueur d'onde, ou si cet objet est centrosymétrique, il est alors nécessaire de prendre en compte les effets retardés. La signature des effets retardés sur les intensités résolues en polarisation peut dans ce cas être quantifiée par l'étude du paramètre ξ^V . Cependant pour différents systèmes centrosymétriques, nous remarquons que les courbes de polarisation peuvent être très différentes. Pour une symétrie sphérique, nous obtenons plutôt des courbes à 4 lobes alors que pour les solvants, les courbes restent proches des courbes à deux lobes des systèmes dipolaires purs.

4.8 Bibliographie

- [1] T. Klar, M. Perner, S. Grosse, G. von Plessen, W. Spirkl and J. Feldmann, *Phys. Rev. Lett.*, **80**, (1998) 4249-4249
- [2] S. Brasselet and J. Zyss, *J. Opt. Soc. Am. B*, **15**, (1998) 257-288
- [3] J. Zyss, T. C. Van, C. Dhenaut and I. Ledoux, *Chem. phys.*, **177**, (1993) 281-296
- [4] G. Revillod, I. Russier-Antoine, E. Benichou, C. Jonin and P. F. Brevet, *J. Phys. Chem. B*, **109**, (2005) 5383-5387
- [5] R. W. Boyd, *Nonlinear Optics*, Academic Press, 2003
- [6] G. Revillod, J. Duboisset, I. Russier-Antoine, E. Benichou, G. Bachelier, C. Jonin and P.-F. Brevet, *J. Phys. Chem. C*, **112**, (2008) 2716-2723
- [7] J. Nappa, I. Russier-Antoine, E. Benichou, C. Jonin and P. F. Brevet, *Chem. Phys. Lett.*, **415**, (2005) 246-250
- [8] S. Ghosh, A. Krishnan, P. K. Das and S. Ramakrishnan, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, (2003) 1602-1606
- [9] P. Kaatz, E. A. Donley and D. P. Shelton, *J. Chem. Phys.*, **108**, (1998) 849-849
- [10] M. Stähelin, D. M. Burland and J. E. Rice, *Chem. Phys. Lett.*, **191**, (1992)
- [11] S. Kielich, J. R. Lalanne and F. B. Martin, *Phys. Rev. Lett.*, **26**, (1971) 1295-1298
- [12] M. Sharma, R. Resta and R. Car, *Phys. Rev. Lett.*, **98**, (2007) 247401-247401
- [13] E. Lindahl, B. Hess and D. van der Spoel, *J. Mol. Mod.*, **7**, (2001) 306-317
- [14] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren and J. Hermans, *In Intermolecular Forces; Pullman, B*, 1981
- [15] J. T. Kindt and C. A. Schmuttenmaer, *J. Phys. Chem.*, **100**, (1996) 10373-10379
- [16] B. M. Fung and T. W. McGaughy, *J. Chem. Phys.*, **65**, (1976) 2970-2970
- [17] S. Woutersen, U. Emmerichs and H. J. Bakker, *Science*, **278**, (1997) 658-658
- [18] J. A. Giordmaine, *Phys. Rev.*, **138**, (1965) 1599-1606
- [19] D. L. Weinberg, *J. Chem. Phys.*, **47**, (1967) 1307-1307

-
- [20] P. D. Maker, *Phys. Rev. A*, **1**, (1970) 923-951
- [21] D. P. Shelton, *Phys. Rev. B*, **72**, (2005) 20201-20201
- [22] D. P. Shelton, *J. Chem. Phys.*, **121**, (2002) 3349-3349
- [23] D. P. Shelton and P. Kaatz, *Phys. Rev. Lett.*, **84**, (2000) 1224-1227
- [24] G. Maroulis, *J. Chem. Phys.*, **94**, (1991) 1182-1182
- [25] D. P. Shelton, *Chem. Phys. Lett.*, **325**, (2000) 513-516
- [26] P. Schuster, G. Zundel and C. Sandorfy, *Hydrogen bond; recent developments in theory and experiments*, 1976
- [27] T. Yamaguchi, M. Niihara, T. Takamuku, H. Wakita and H. Kanno, *J. Chem. Phys. Lett.*, **274**, (1997) 485-490
- [28] S. Chowdhuri and A. Chandra, *J. Chem. Phys.*, **115**, (2001) 3732-3741
- [29] R. Mancinelli, A. Botti, F. Bruni, M. A. Ricci and A. K. Soper, *J. Phys. Chem. Chem. Phys.*, **9**, (2007) 2959-2967
- [30] A. W. Omta, M. F. Kropman, S. Woutersen and H. J. Bakker, *J. Chem. Phys.*, **119**, (2003) 12457-12457
- [31] A. W. Omta, M. F. Kropman, S. Woutersen and H. J. Bakker, *Science*, **301**, (2003) 347-349

Chapitre 5: Origine de la réponse non linéaire du collagène triple hélice

5.1 Introduction

Le collagène est la protéine la plus abondante chez les mammifères et joue un rôle central dans la formation de réseaux fibrillaires et microfibrillaires, les fondations des membranes, ainsi que d'autres structures du tissu conjonctif [1, 2]. Beaucoup de types génétiquement distincts de collagène ont été décrits à ce jour. Leur caractéristique commune est une structure en triple hélice, dont trois chaînes polypeptidiques, appelées chaînes α et caractérisées par un (Gly-X-Y) (Gly=Glycine, X et Y étant deux autres acides aminés) répétée n fois, sont enveloppées dans une super-hélice droite [3, 4]. La plupart des collagènes sont assemblés pour former des fibrilles de diamètre allant de 10 nm à 300 nm. Ces fibrilles sont organisées dans les fibres et les faisceaux de façon spécifique pour chaque tissu. Une des principales fibrilles du collagène est le collagène I, dont le domaine en hélice est continu sur environ 1000 acides aminés. Elle se trouve dans de nombreux tissus comme la peau, les tendons, les os, les ligaments, la cornée ou les parois artérielles. D'autres types de collagènes ne sont pas fibrillaires et leur structure en super hélice contient de nombreuses interruptions des domaines collagéniques. En particulier, les molécules de collagène IV forment un réseau à deux dimensions que l'on trouve principalement dans les membranes.

Comme une brique de l'architecture des tissus, le collagène est crucial dans la réponse adaptative des tissus aux blessures, telles que les infections, l'hypertension, le stress mécanique, l'ischémie (diminution de l'apport sanguin à un organe), le cancer, l'agression immunologique et les brûlures. Dans ce cas, la distribution en trois dimensions du collagène dans la matrice extracellulaire est modifiée, ce qui par contre-coup modifie aussi la structure des organes atteints, conduisant à leur défaut de fonctionnement. La caractérisation de la quantité de collagène et de la distribution au cours du remodelage tissulaire est donc d'un intérêt considérable. Toutefois, les techniques classiques telles que les colorations histologique et immuno-chimique sont très envahissantes, manquent de résolution

tridimensionnelle et ne fournissent que des indications phénoménologiques semi quantitatives.

Dans ce contexte, la génération de second harmonique [5] en microscopie apparaît comme une technique permettant de visualiser l'architecture 3D du collagène. L'observation SHG à partir de fibres de collagène a été signalée pour la première fois dans les années 80 sur un tendon de rat [6]. Ensuite, la combinaison avec la microscopie à deux photons [7-19] et la génération de troisième harmonique [20] a permis de visualiser en 3D la morphologie des tissus sans endommagement. La microscopie SHG intrinsèque présente un grand pouvoir de résolution à l'instar des autres types de microscopies non linéaires et permet d'améliorer la profondeur de pénétration dans les tissus par rapport à la microscopie confocale. Plus important encore, la grande spécificité des fibrilles de collagène permet de prendre des mesures de réseaux collagéniques avec un bruit de fond très faible [17, 21]. De plus, la reproductibilité des mesures est assurée par l'absence de coloration exogène, ainsi la microscopie SHG permet l'évaluation de la progression de fibroses pathologiques [16]. Toutefois, ces mesures sont fondées sur une approche phénoménologique et la mesure quantitative de fibrilles de collagène dans les tissus est déterminée en comptant le nombre de voxels, volumes élémentaires d'une cartographie tridimensionnelle, présentant un signal SHG. En effet, la SHG est un processus cohérent, où l'intensité à l'échelle moléculaire dépend de la densité au carré. Cependant, l'intensité non linéaire est très sensible à l'organisation des molécules dans le volume. L'hétérogénéité d'organisation tridimensionnelle du collagène à l'échelle micrométrique rend donc la relation entre l'intensité du signal et le nombre de molécules de collagène complexe. Par conséquent, la microscopie SHG ne fournit aucune mesure de la quantité de molécules de collagène pour le moment. La principale limitation de ces études est le manque de données quantitatives sur la réponse optique de seconde harmonique du collagène à l'échelle moléculaire.

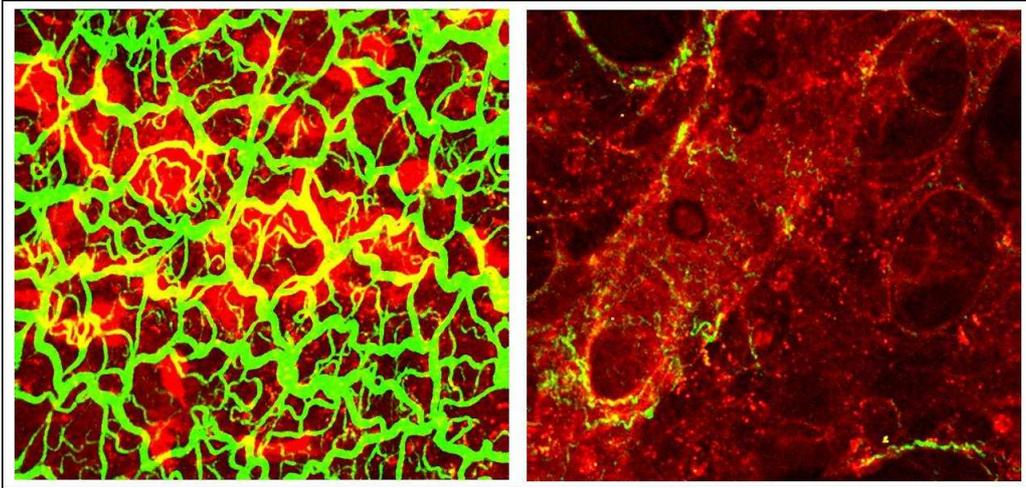


Figure 5-1 : vue longitudinale d'une bronchiole de souris au niveau de la plèvre (gauche) et au dessus de la plèvre (droite). En vert : SHG du collagène type I. En rouge : fluorescence des fibres élastiques.

Par conséquent, le premier objectif de cette étude est de mesurer l'hyperpolarisabilité de la triple hélice de collagène en utilisant la diffusion Hyper Rayleigh [22-25]. Le deuxième objectif de cette étude est de mieux comprendre l'origine physique de la génération de second harmonique du collagène et de comprendre le rôle de sa structure en triple hélice dans la construction de la réponse en optique non linéaire. À cette fin, nous allons comparer la réponse non linéaire du collagène de type I de queue de rat en triple hélice et ce même collagène dénaturé. De plus, l'effet de la longueur de la triple hélice sera étudié en comparant la réponse non linéaire du collagène à un petit peptide collagénique qui servira de modèle à la construction de la réponse non linéaire du collagène I en triple hélice.

5.2 Construction de la réponse non linéaire du collagène natif

5.2.1 Structure du collagène

Le collagène type I queue de rat est une super hélice composée de trois chaînes α . Chaque chaîne α est composée d'un enchaînement de trois acides aminés dont le premier est la glycine. Les deux autres acides aminés sont en général des prolines ou hydroxiprolines, mais ils peuvent être remplacés par d'autres acides aminés. La chaîne α a un rayon de 1.5 Å. Pour faire un tour de cette hélice, 3.33 acides aminés sont nécessaires. La chaîne α a une

structure différente de l'hélice α puisque pour celle-ci, 3.6 acides aminés sont nécessaires pour réaliser un tour. La chaîne α est donc plus compacte. L'hélice α est également renforcée par les liaisons hydrogènes qui ne peuvent avoir lieu avec la chaîne α à cause de l'encombrement stérique des prolines. La super hélice est l'enroulement gauche de trois chaînes α . Son rayon est de 2.8 Å et 85.5 Å sont nécessaires pour faire un tour. La structure en hélice gauche de trois chaînes dont l'enroulement est droit confère ainsi au collagène une très grande rigidité. Pour le collagène de type I de queue de rat, la longueur de l'hélice est de 290 nm et possède 1000 acides aminés [26].

Le collagène triple hélice est usuellement considéré comme un bâtonnet rigide [27]. Sa conformation a été déduite d'expériences de diffraction de rayons X sur un peptide en triple hélice [(Pro-Pro-Gly)₁₀]₃ (acronyme PPG10) [28-30] qui nous servira également de modèle. Ce peptide, ainsi que le collagène, appartient au groupe de symétrie C₃ dans l'hypothèse où les chaînes α sont identiques. Cependant le groupe de symétrie du collagène est souvent réduit à la symétrie C_{∞v} car il y a ainsi moins de composantes indépendantes dans le tenseur d'hyperpolarisabilité [15, 31, 32]. Nous avons également utilisé un peptide collagénique synthétique dans le but de comparer sa réponse à celle du collagène natif. Ce peptide est composé comme le collagène de type I de trois chaînes α dont chacune est un enchaînement de dix fois le motif Glycine-Proline-Proline. Ce peptide a une taille d'environ 8.6 nm [28, 33]. Lorsque le collagène est chauffé à une température supérieure à sa température de fusion, entre 20°C et 40°C, le collagène se dénature. La température de fusion du collagène est déterminée par le nombre de ponts hydrogènes formés dans le collagène. En général, les ponts hydrogènes sont plus nombreux quand le collagène est hydroxylisé, c'est-à-dire que des groupements OH sont rajoutés sur les acides aminés, notamment la proline. On parle alors d'hydroxiproline. Cette dénaturation du collagène est causée par la désolidarisation irréversible des trois chaînes α . Le composé formé est communément appelé la gélatine.

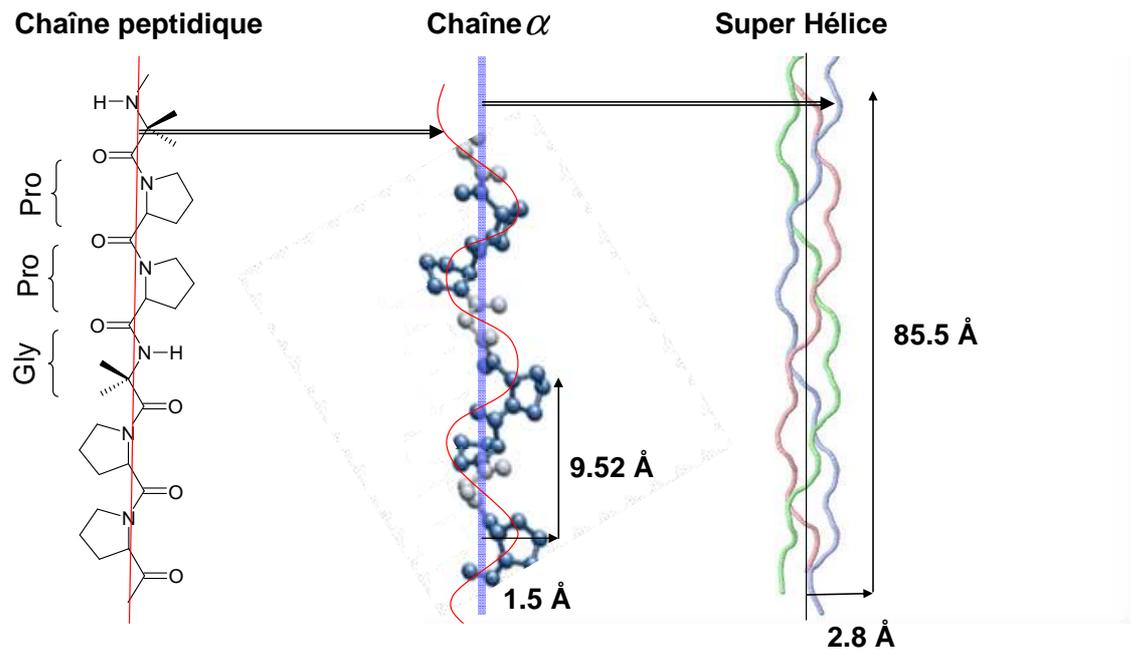


Figure 5-2 : structure du collagène

5.2.2 Résultats expérimentaux

Pour étudier le collagène type I de queue de rat (Sigma Aldrich produit C7661), nous avons solubilisé le collagène dans une solution aqueuse de 0,5 mM d'acide acétique en vue d'obtenir une solution de 10 mg/mL. Le caractère acide de la solution, son pH est 2,5, empêche alors la fibrillogénèse, c'est-à-dire la formation de fibrilles, de sorte que le collagène en triple hélice peut être considéré comme une seule tige rigide [27]. Les solutions de 0,97 mg/ml à 4,9 mg/mL, soit respectivement de 3,4 à 17,4 μ M, ont été préparées par pesée du solvant et de la solution à cause de la grande viscosité des solutions de collagène. Toutefois, les concentrations sont restées suffisamment faibles pour éviter toute organisation des triples hélices. Les solutions peuvent donc être considérées comme des solutions isotropes [34]. Le peptide collagénique PPG10 a été fourni par Peptides International (OPG produit-4006). Il est de pureté supérieure à 95% et est auto-organisé pour former des triples hélices. Il a également été solubilisé dans une solution aqueuse de 0,05 mM d'acide acétique pour obtenir une solution de 3,3 mg/mL, puis dilué de 1,2 à 3,3 mg/mL, respectivement de 0,49 à 1,32 mM. Toutes les solutions ont été laissées à 4°C pendant 24 heures avant utilisation. Le peptide GGG (Sigma Aldrich), utilisé pour des comparaisons, a été solubilisé dans de l'eau pure dans des concentrations variant de 25 à 40 mmol/L.

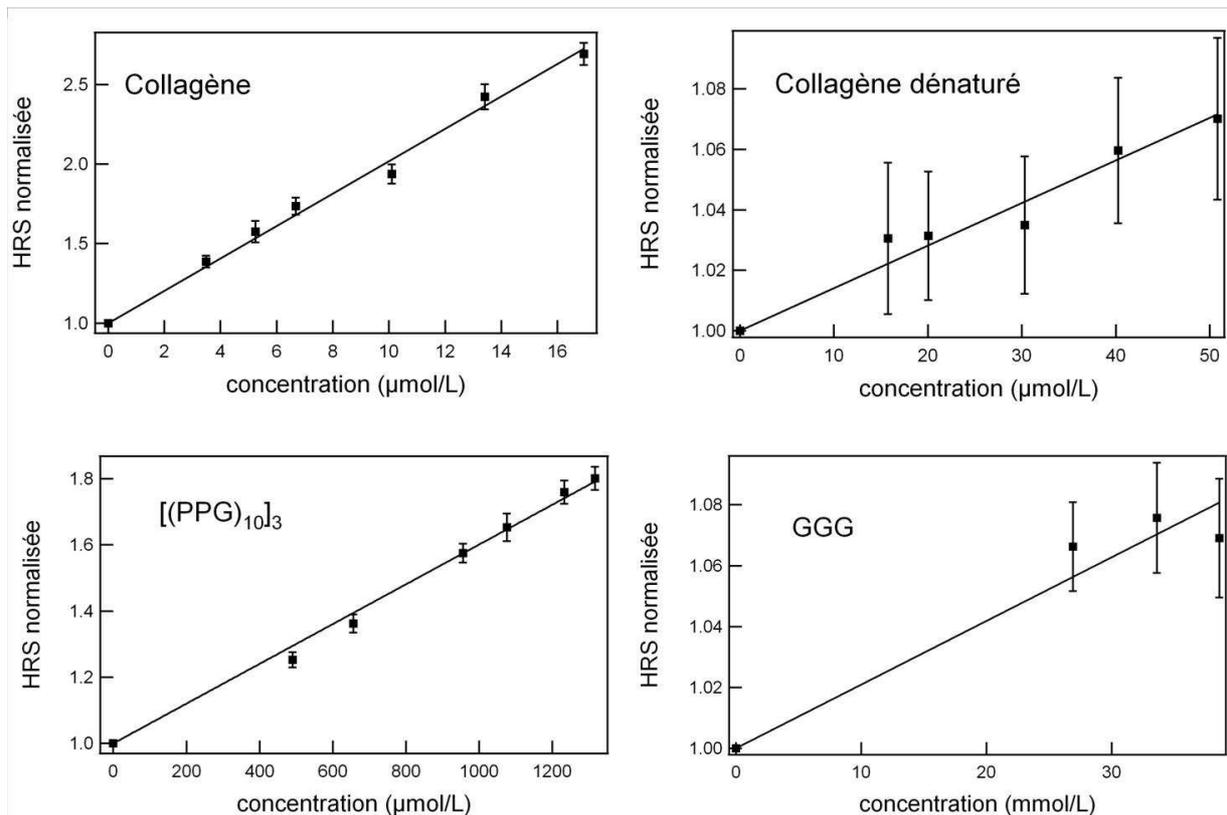


Figure 5-3 : HRS normalisée en fonction de la concentration

Pour mesurer l'hyperpolarisabilité des quatre composés, un spectre en longueur d'onde a été effectué autour de la fréquence double du laser. Sur le spectre, aucun fond de fluorescence n'a été observé. L'hyperpolarisabilité a ensuite été mesurée en utilisant la méthode de la référence interne. À cette fin, nous avons vérifié que l'acide acétique présente la même réponse HRS que l'eau dont l'hyperpolarisabilité est connue [23]. Sur la Figure 5-3, les intensités HRS sont normalisées par rapport à l'intensité du solvant. L'augmentation du signal présente bien un comportement linéaire indiquant l'absence d'artefacts causés par des interactions moléculaires. En ajustant les points expérimentaux, nous avons obtenu la valeur de l'hyperpolarisabilité absolue du collagène: $\beta_{coll} = (1250 \pm 20) \times 10^{-30}$ esu. Pour le peptide collagénique, des concentrations plus élevées ont été nécessaires pour obtenir des intensités HRS supérieures à celle produite par le solvant pur. Nous avons déterminé une hyperpolarisabilité du petit peptide PPG10 de $\beta_{PPG10} = (98.9 \pm 3) \times 10^{-30}$ esu ce qui est 12,6 fois plus faible celle du collagène. Enfin, l'hyperpolarisabilité du tripeptide à base de glycine GGG a été mesurée à $\beta_{GGG} = (6.0 \pm 1.5) \times 10^{-30}$ esu. Cette mesure est fortement entachée d'erreurs, à cause de la faiblesse du signal non linéaire.

	Collagène	$[(PPG)_{10}]_3$	GGG
β (10^{-30} esu)	1250 ± 20	98.9 ± 3	6.0 ± 1.5

Tableau 15 : valeur des hyperpolarisabilités

5.2.3 Construction cohérente

La triple hélice de collagène est longue de 290 nm et fait 1,5 nm de diamètre [26]. Compte tenu d'un indice de réfraction de $n = 1,37$, indice de la cornée collagénique [35], la longueur du chemin optique pour la molécule de collagène n'est pas négligeable devant la longueur d'onde. Le formalisme qui a été développé pour des molécules dont les dimensions sont beaucoup plus petites que la longueur d'onde doit donc être corrigé. Pour cela, nous avons considéré une fraction élémentaire de la molécule de collagène, beaucoup plus petite que la longueur d'onde, et lui avons attribué un tenseur d'hyperpolarisabilité microscopique élémentaire. Cette fraction élémentaire pourrait être plusieurs unités $[(Gly-X-Y)]_3$ dont la taille est inférieure au nanomètre, voir Figure 5-4. Nous avons supposé aussi que l'hyperpolarisabilité β de cette fraction élémentaire est indépendante de la nature exacte de la séquence peptidique. En effet, des expériences en SHG ont démontré des niveaux d'intensité similaires pour différents types de collagènes fibrillaires. Ensuite, nous avons considéré que la réponse non linéaire de la triple hélice du collagène résulte de l'addition cohérente de toutes les réponses non linéaires des fractions élémentaires. Ce choix est basé sur les deux hypothèses suivantes: la cohérence de la réponse SHG est maintenue à l'intérieur de la triple hélice du collagène et il n'y a pas d'effets de transferts entre les différentes fractions élémentaires. Dans ce cadre, l'intensité HRS est la somme cohérente des fractions élémentaires en plus de la somme incohérente des molécules de collagène. L'hyperpolarisabilité mesurée du collagène est 12.6 fois plus importante que celle du peptide collagénique. En considérant une sommation cohérente des hyperpolarisabilités du peptide, l'hyperpolarisabilité du collagène devrait être 29 fois plus importante. La propagation du champ électrique le long de la molécule de collagène doit être donc bien prise en compte en raison de la longueur non négligeable devant la longueur d'onde de la molécule. Nous avons développé un modèle prenant en compte tout les ordres multipolaires.

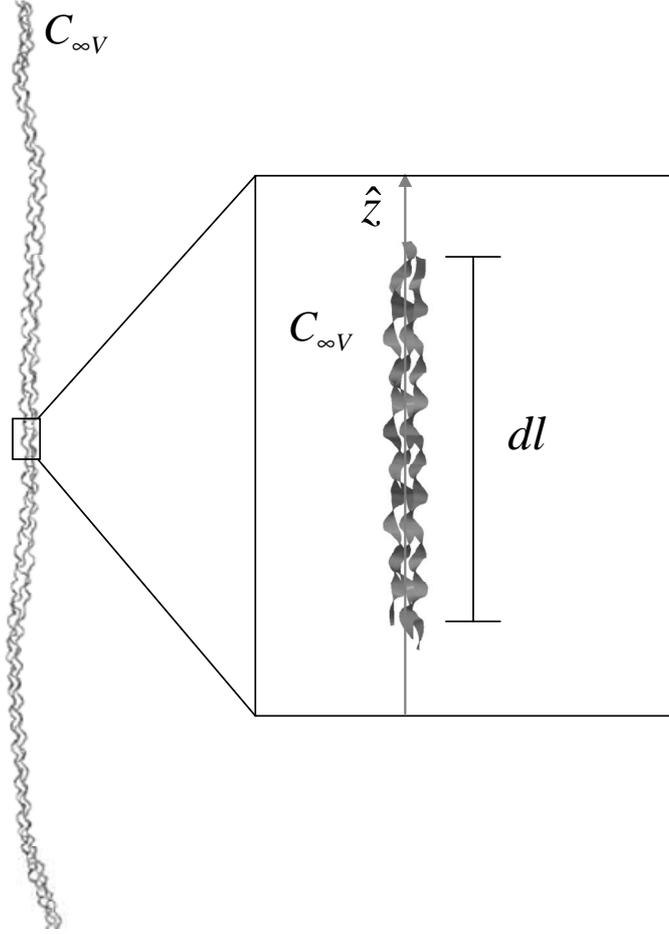


Figure 5-4 : découpage du collagène en éléments infinitésimaux

Le champ rayonné par un dipôle infinitésimal est de la forme, cf. Chapitre 4 :

$$\begin{aligned}
 d\vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) &\propto \left[(\hat{Y} \times d\vec{P}) \times \hat{Y} \right] \frac{e^{i\vec{k}(\vec{r}-\vec{r}')}}{|\vec{r}-\vec{r}'|} \\
 &\propto \left[(\hat{Y} \times \vec{\beta} : \hat{e}\hat{e}) \times \hat{Y} \right] E_{\omega} E_{\omega}^* \frac{e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}}}{r} e^{i\Delta\vec{k} \cdot d\vec{r}'}
 \end{aligned} \tag{5-1}$$

Si la dispersion de l'indice aux fréquences fondamentale et harmonique est négligée, alors:

$$\begin{aligned}
 \Delta\vec{k} &= 2\vec{k} - \vec{K} \\
 &= \frac{4\pi n^{(\omega)}}{\lambda} \hat{Z} - \frac{4\pi n^{(2\omega)}}{\lambda} \hat{Y} \\
 &= \frac{4\pi n}{\lambda} (\hat{Z} - \hat{Y})
 \end{aligned} \tag{5-2}$$

En considérant l'orientation $d\vec{r}'$ de la brique infinitésimale de collagène dans le référentiel microscopique, nous écrivons :

$$d\vec{r}' = \hat{z}dl \quad (5-3)$$

Ainsi nous obtenons :

$$\begin{aligned} e^{i\Delta\vec{k} \cdot d\vec{r}'} &= e^{\frac{i4\pi n}{\lambda} dl (\hat{z} - \hat{Y}) \cdot \hat{z}} \\ &= e^{\frac{i4\pi n}{\lambda} dl (\cos\theta - \sin\theta \sin\varphi)} \end{aligned} \quad (5-4)$$

Pour obtenir le champ effectif pour le brin de collagène entier, les réponses des éléments infinitésimaux sont ajoutées sur toute la longueur du collagène. Le champ diffusé s'écrit alors:

$$\begin{aligned} \vec{E}_{eff}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) &\propto \left[(\hat{Y} \times \vec{\beta} : \hat{e}\hat{e}) \times \hat{Y} \right] E_{\omega} E_{\omega}^* \frac{e^{iK \cdot r}}{r} \int_{-\frac{L}{2}}^{\frac{L}{2}} e^{\frac{i4\pi n}{\lambda} l (\cos\theta - \sin\theta \sin\varphi)} dl \\ &\propto \left[(\hat{Y} \times \vec{\beta} : \hat{e}\hat{e}) \times \hat{Y} \right] E_{\omega} E_{\omega}^* \frac{e^{iK \cdot r}}{r} \frac{L}{2} \text{sinc} \left[\frac{2\pi n L}{\lambda} (\cos\theta - \sin\theta \sin\varphi) \right] \end{aligned} \quad (5-5)$$

Le signal HRS est finalement obtenu en effectuant une sommation incohérente sur toutes les molécules, ce qui revient à faire la somme sur toutes les orientations en utilisant le théorème d'ergodicité. Cette dernière étape est nécessaire car les mesures sont réalisées en milieu aqueux isotrope.

$$I_{HRS} = G.N. \left\langle \left(\beta_{L,XXX}^2 + \beta_{L,ZXX}^2 \right) \left(\frac{L}{2} \right)^2 \text{sinc}^2 \left[\frac{2\pi n L}{\lambda} (\cos\theta - \sin\theta \sin\varphi) \right] \right\rangle I_{\omega}^2 \quad (5-6)$$

Le signal HRS dépend de la taille de la molécule à cause du facteur L et de la fonction *sinc* dans l'équation ci-dessus. Une hypothèse sur la valeur des composantes du tenseur d'hyperpolarisabilité microscopique est donc nécessaire pour obtenir l'expression complète

de l'intensité HRS. Pour cela, compte tenu de la symétrie $C_{\infty V}$ adoptée, nous introduisons le rapport microscopique $u = \beta_{m,zzx} / \beta_{m,zzz}$ et l'intensité HRS diffusée en fonction de u s'écrit:

$$I_{HRS} = G.N \left\langle \left(\left(T_X^z T_X^z T_X^z \beta_{m,zzz} + T_X^z T_X^x T_X^x u \beta_{m,zzz} \right)^2 + \left(T_Z^z T_X^z T_X^z \beta_{m,zzz} + T_Z^z T_X^x T_X^x u \beta_{m,zzz} \right)^2 \right) \left(\frac{L}{2} \right)^2 \sin^2 c^2 \left[\frac{2\pi mL}{\lambda} (\cos \theta - \sin \theta \sin \varphi) \right] \right\rangle I_{\omega}^2 \quad (5-7)$$

avec maintenant comme hyperpolarisabilité effective :

$$\beta_{eff} = K(L, u) \beta_{m,zzz} \quad (5-8)$$

et

$$K^2(L, u) = \left\langle \left(\left(T_X^z T_X^z T_X^z + T_X^z T_X^x T_X^x u \right)^2 + \left(T_Z^z T_X^z T_X^z + T_Z^z T_X^x T_X^x u \right)^2 \right) \left(\frac{L}{2} \right)^2 \sin^2 c^2 \left[\frac{2\pi mL}{\lambda} (\cos \theta - \sin \theta \sin \varphi) \right] \right\rangle \quad (5-9)$$

L'intensité HRS s'écrit alors simplement :

$$I_{HRS} = G.N.\beta_{eff}^2 I_{\omega}^2 \quad (5-10)$$

L'expression (6-8) a été calculée numériquement en fonction de différentes longueurs L. Les calculs ont été effectués pour différentes valeurs de u . La Figure 6-5 présente l'hyperpolarisabilité effective β_{eff} normalisée par l'hyperpolarisabilité $\beta_{8.6nm}$ d'un élément d'une taille de 8.6 nm correspondant à la taille du peptide collagénique PPG10.

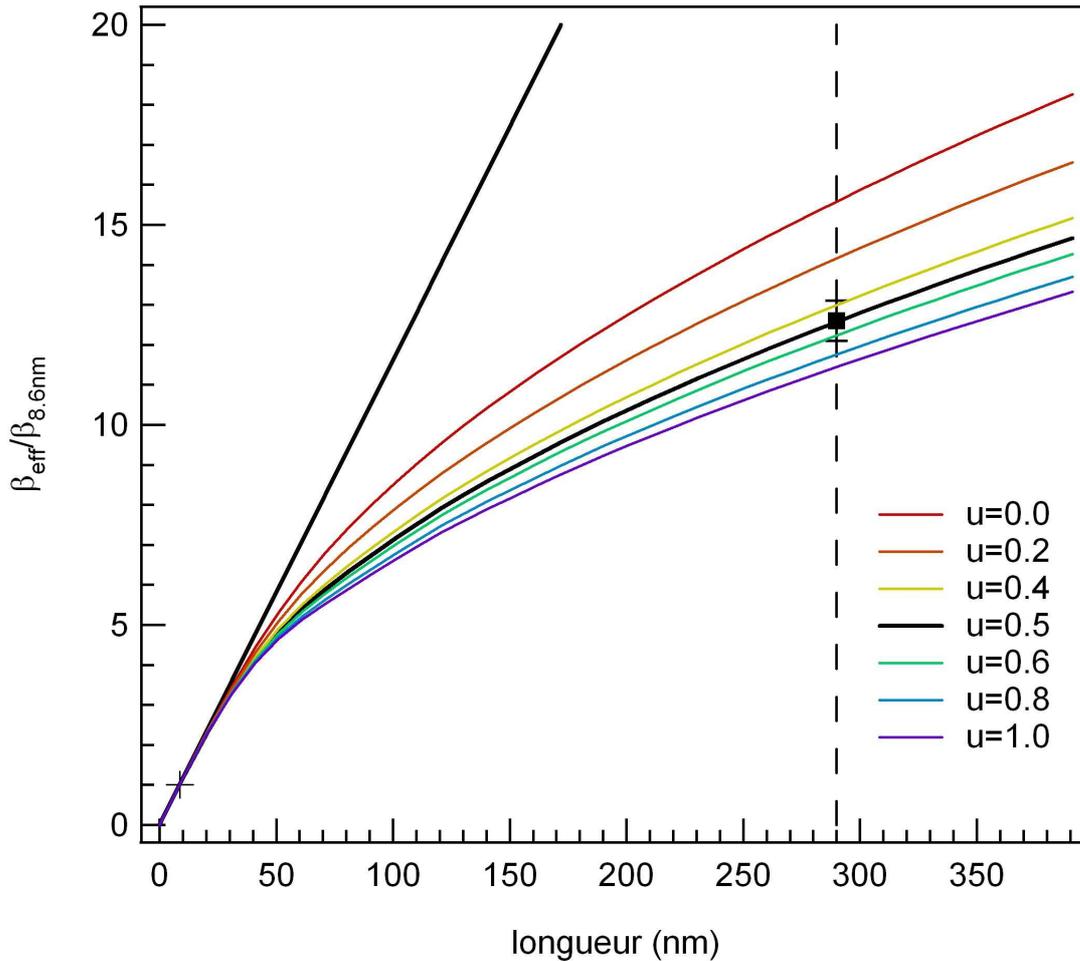


Figure 5-5 : Calcul théorique de l'hyperpolarisabilité effective normalisée par l'hyperpolarisabilité du peptide collagénique pour différentes valeurs de u – somme cohérente sans prendre en compte les effets retardés (droite noire).

Il est possible de comparer la réponse non linéaire mesurée pour le collagène de type I de queue de rat et le peptide collagénique. Le rapport des hyperpolarisabilités est de 12,6 et doit être comparé au calcul théorique pour une longueur $L = 290$ nm normalisé à celui de $L = 8,6$ nm. Ces calculs dépendent de la symétrie du tenseur d'hyperpolarisabilité microscopique et le meilleur accord est obtenu pour $u = 0,5$, en excellent accord avec des travaux antérieurs de SHG qui ont également obtenu un rapport microscopique $u = 0,5$ [32, 36-40]. La comparaison de nos données expérimentales à des calculs théoriques démontre ainsi que la triple hélice de collagène peut être décrite par une somme cohérente si la prise en compte des effets retardés est correctement réalisée. Dans ce modèle, les éléments infinitésimaux appartiennent au groupe de symétrie $C_{\infty v}$ et le rapport de dépolarisation aboutit à $u = 0,5$, c'est-à-dire $\beta_{m,zzz} = 2\beta_{m,zzx}$. Toutefois, le calcul théorique doit être considéré avec soin, pour

les raisons suivantes. Tout d'abord, la molécule de collagène ne relève pas strictement de la symétrie $C_{\infty v}$ et certaines composantes, par exemple les composantes chirales [21], sont négligées dans ce développement. Ensuite, bien que le collagène soit généralement considéré comme une tige rigide, il s'agit plutôt d'un polymère semi-flexible [27] dont les déformations peuvent introduire des incertitudes dans le calcul. De plus, le peptide collagénique utilisé comme modèle de référence n'est pas totalement organisé en triple hélice ce qui peut se traduire par une efficacité non linéaire moindre. Enfin, nous ne pouvons pas conclure définitivement sur la valeur exacte du rapport $u = 0.5$. Toutefois, un rapport proche de 0,5 est obtenu et l'hyperpolarisabilité du collagène n'est pas limitée à une seule composante non nulle. Il est également possible de comparer le peptide collagénique au tripeptide à base de glycine, voir Figure 5-6. Les tailles de ceux-ci étant petites devant la longueur d'onde, les effets retardés n'ont quasiment pas d'effet. Le peptide collagénique est la somme de trois chaînes α alors que le tripeptide est juste l'enchaînement de trois acides aminés. Pour normaliser l'hyperpolarisabilité du tripeptide, nous avons pris en compte l'hyperpolarisabilité d'une seule chaîne α et donc divisé l'hyperpolarisabilité du peptide collagénique par trois. Cette opération est possible à condition de faire l'hypothèse qu'il n'existe pas de contribution supplémentaire lorsque les trois chaînes α sont associées. Dans la suite nous verrons que cette hypothèse sur la somme des hyperpolarisabilités des trois chaînes α pour obtenir l'hyperpolarisabilité du collagène est justifiée. Pour la taille du tripeptide, nous avons aussi fait également l'hypothèse que celle-ci est 10 fois inférieure à celle du peptide collagénique, c'est-à-dire 0.86 nm, même si la conformation du tripeptide est sûrement différente de celle d'un enroulement en chaîne α . Nous obtenons une valeur expérimentale 5.3 fois plus faible alors que nous attendions une valeur 10 fois plus faible. L'hyperpolarisabilité du tripeptide est donc 2 fois plus importante que prévu. La conformation du tripeptide est très différente de la conformation d'un enchaînement de trois acides aminés au sein d'une chaîne α , ce qui peut modifier sa longueur ou modifier les éléments du tenseur d'hyperpolarisabilité microscopique. L'écart obtenu pour le tripeptide par rapport au modèle de sommation cohérente est dû à une conformation différente qui aboutit à des éléments d'hyperpolarisabilité microscopiques différents. Nous pouvons conclure ainsi sur l'importance de la structure de la molécule dans la réponse SHG. Pour pouvoir réaliser cette comparaison de l'hyperpolarisabilité du tripeptide, un modèle microscopique, prenant en compte les conformations des peptides, est nécessaire.

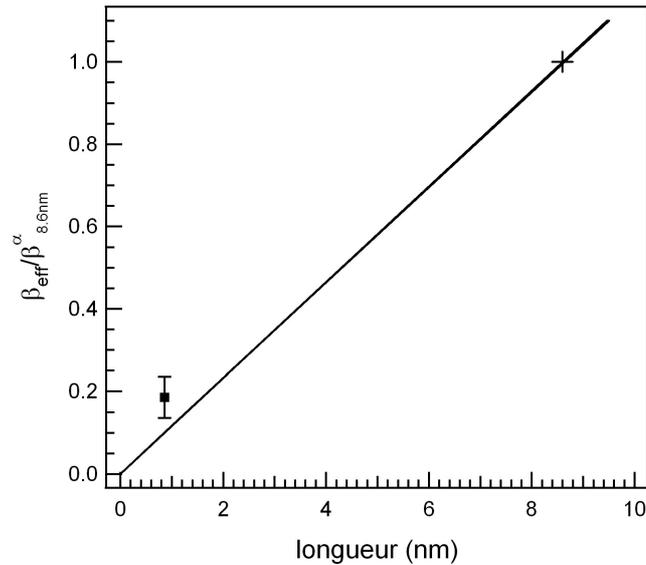


Figure 5-6 : hyperpolarisabilité du tripeptide GGG normalisé par rapport à l'hyperpolarisabilité d'une chaîne α (hyperpolarisabilité du peptide collagénique divisé par trois)

La réponse non linéaire SHG du collagène provient donc de la réponse non linéaire d'éléments infinitésimaux, rigides et indépendants possédant une hyperpolarisabilité intrinsèque propre, sommés de manière cohérente en prenant en compte les effets retardés à cause de la grande taille de la molécule par rapport à la longueur d'onde. La précision du modèle nous permet également de conclure sur les composantes majoritaires présentes au sein du collagène, dans l'hypothèse d'une symétrie $C_{\infty v}$. Mais pour obtenir plus d'informations sur l'origine physique de la réponse non linéaire, des études sur le collagène dénaturé et des études en polarisation ont été menées.

5.3 Origine de la réponse

5.3.1 Comparaison collagène / gélatine

Le collagène ne contient pas, dans sa séquence en acides aminés, d'harmonophores importants tel que le tryptophane ou la tyrosine. Or le collagène possède une réponse non linéaire très importante. Pour identifier les composés ou les structures responsables de la forte efficacité de la réponse non linéaire, le collagène a été dénaturé afin de connaître les hyperpolarisabilités des chaînes α individuelles et de déterminer s'il existe des effets

coopératifs entre celles-ci. Les solutions de collagène ont été chauffées à 50°C pendant 10 minutes ce qui provoque la destruction de la triple hélice en trois chaînes α . La concentration en chaînes α est alors le triple de la concentration initiale en collagène. Nous avons alors obtenu une hyperpolarisabilité $\beta_{gel} = (170 \pm 20) \times 10^{-30}$ esu ce qui est 7.4 fois plus faible que celle du collagène. Ensuite, des mesures d'intensité HRS résolue en polarisation ont été effectuées pour apporter des informations sur les éléments de tenseurs d'hyperpolarisabilité microscopique, voir Figure 5-7. A partir de ces courbes résolues en polarisation, le rapport de dépolarisation et le paramètre η [41], cf. Chapitre 5, ont été extraits, voir Tableau 16.

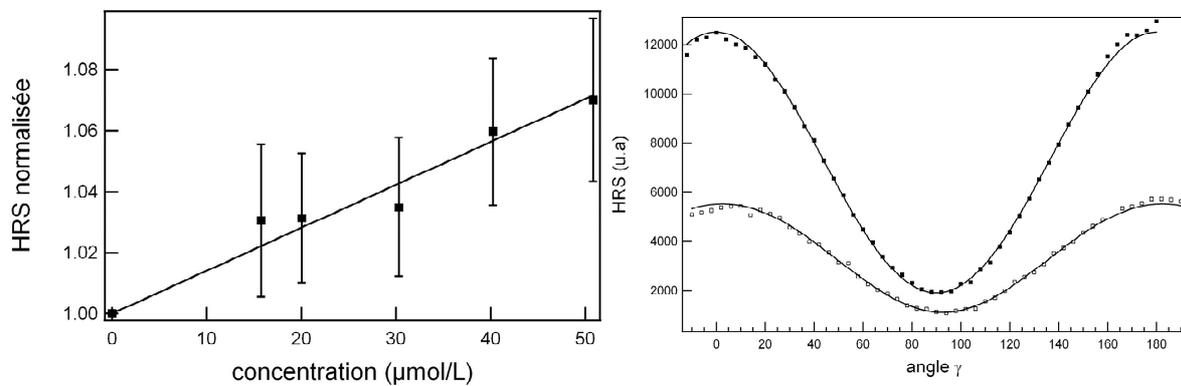


Figure 5-7 : (gauche) Intensité HRS, polarisée verticalement, normalisée du collagène dénaturé. (droite) Intensité HRS résolue en polarisation du collagène (carrés noirs) et du collagène dénaturé (carrés vides) à la même concentration de 5mg/L.

	Collagène	Collagène dénaturé
β (10^{-30} esu)	1250 ± 20	170 ± 20
$\eta = \frac{a^V + c^V}{b^V}$	1.08 ± 0.06	0.89 ± 0.24
$D = \frac{c^V}{a^V}$	0.13 ± 0.015	0.26 ± 0.08

Tableau 16 : mesures expérimentales du collagène et du collagène dénaturé

L'hyperpolarisabilité d'une chaîne α est 7.4 fois plus faible que l'hyperpolarisabilité du collagène. Si l'hyperpolarisabilité du collagène est la somme cohérente des trois chaînes α , une chaîne α doit avoir une hyperpolarisabilité seulement 3 fois plus faible. Si l'hyperpolarisabilité du collagène provient de la réunion des trois chaînes α et d'un effet coopératif supplémentaire, lors de la dénaturation l'hyperpolarisabilité diminuerait ainsi d'un facteur supérieur à trois. Cependant il est difficile de conclure avec certitude sur un effet coopératif des chaînes α . En effet, le facteur de cohérence et le rapport de dépolarisation du collagène et de la gélatine sont différents ce qui met en évidence un changement de structure de la molécule. Les chaînes α en solution n'ont pas la même rigidité que le collagène en triple hélice et ne peuvent plus être considérées comme de petits bâtonnets. La construction de l'hyperpolarisabilité au sein d'une chaîne α seule comme il a été fait pour le collagène n'est donc plus valide. En effet, les champs harmoniques émis par toutes les fractions élémentaires de la chaîne α peuvent alors intervenir dans un mode de destruction. Il est alors normal que dans ces conditions l'hyperpolarisabilité d'une chaîne α soit plus faible que prévu à cause de sa structure non rigide.

5.3.2 Etude en polarisation de PPG10

5.3.2.1 Rapport de dépolarisation

L'intensité non linéaire résolue en polarisation a été mesurée pour le peptide collagénique PPG10 afin d'accéder aux éléments du tenseurs microscopiques d'hyperpolarisabilité. Le rapport de dépolarisation ne peut être étudié que dans le cas où l'intensité provient d'un objet considéré comme ponctuel devant la longueur d'onde. En effet le collagène est une molécule trop grande et les effets retardés qui y sont présents modifient le sens et la formulation du rapport de dépolarisation. C'est pourquoi, l'étude du rapport de dépolarisation est pertinente uniquement sur le peptide collagénique où les effets retardés sont absents.

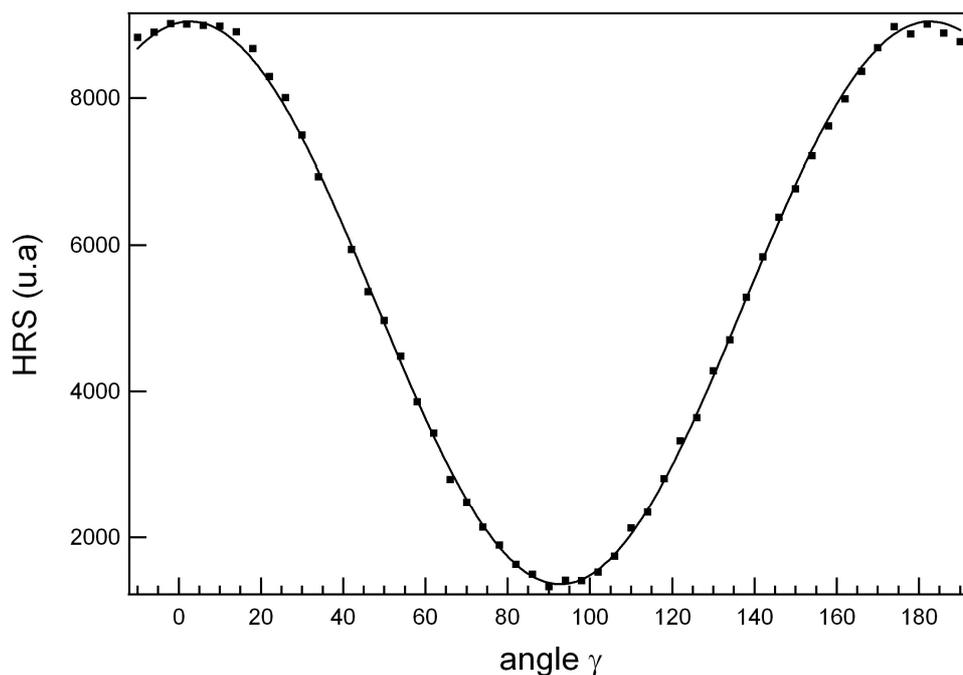


Figure 5-8 : Intensité HRS, polarisée verticalement, résolue en polarisation du peptide PPG10

	PPG10
$\eta = \frac{a^v + c^v}{b^v}$	0.98 ± 0.03
$D = \frac{c^v}{a^v}$	0.115 ± 0.015

Tableau 17 : valeur du rapport de dépolarisation et du rapport de cohérence du peptide PPG10

La valeur obtenue pour le paramètre de cohérence, $\eta \approx 1$, confirme bien que le peptide peut être considéré comme une molécule ponctuelle devant la longueur d'onde. Cela justifie donc pleinement l'étude du rapport de dépolarisation. Le peptide collagénique PPG10 peut être considéré comme une partie élémentaire de la molécule de collagène. Le peptide appartient rigoureusement au groupe de symétrie C_3 mais il est possible de le modéliser selon une symétrie $C_{\infty v}$, comme pour le collagène. En considérant ce groupe de symétrie et l'hypothèse de Kleinmann, les seuls éléments non nuls du tenseur d'hyperpolarisabilité

microscopique sont les éléments : β_{zzz} et $\beta_{zxx} = \beta_{zyy} = \beta_{xxz} = \beta_{yyz} = \beta_{xzx} = \beta_{yzy}$. Le rapport de dépolarisation du peptide collagénique en fonction du rapport microscopique $u = \beta_{zxx} / \beta_{zzz}$ est calculé. Dans le cas général, le rapport de dépolarisation s'écrit [42]:

$$D = \frac{\frac{1}{35} \sum_i \beta_{iii}^2 - \frac{2}{105} \sum_{i \neq j} \beta_{iii} \beta_{ijj} + \frac{11}{105} \sum_{i \neq j} \beta_{ijj}^2 - \frac{2}{105} \sum_{i \neq j \neq k} \beta_{ijj} \beta_{ikk} + \frac{8}{35} \sum_{i \neq j \neq k} \beta_{ijk}^2}{\frac{1}{7} \sum_i \beta_{iii}^2 + \frac{6}{35} \sum_{i \neq j} \beta_{iii} \beta_{ijj} + \frac{9}{35} \sum_{i \neq j} \beta_{ijj}^2 + \frac{6}{35} \sum_{i \neq j \neq k} \beta_{ijj} \beta_{ikk} + \frac{12}{35} \sum_{i \neq j \neq k} \beta_{ijk}^2} \quad (5-11)$$

En utilisant les éléments de tenseur présents en symétrie $C_{\infty V}$, nous obtenons le rapport de dépolarisation en fonction de u :

$$D = \frac{3 - 4u + 20u^2}{15 + 36u + 72u^2} \quad (5-12)$$

Le rapport de dépolarisation a été tracé en fonction du paramètre u et l'intersection du rapport théorique et de la valeur expérimentale permet de déterminer la valeur de u , aux erreurs expérimentales près, voir Figure 5-9. Nous constatons qu'il y a une intersection pour $u = 0.24$ et $u = 0.46$ mais qu'à cause de l'erreur sur la mesure il est seulement possible de fournir un encadrement de cette valeur : $0.15 < u < 0.66$ correspondant à $1.5\beta_{zxx} < \beta_{zzz} < 6.6\beta_{zxx}$. Ces valeurs du rapport de dépolarisation sont en accord avec les valeurs de la littérature [15, 32, 36, 37, 39, 40] et confirment la valeur obtenue par le modèle de la somme cohérente du collagène.

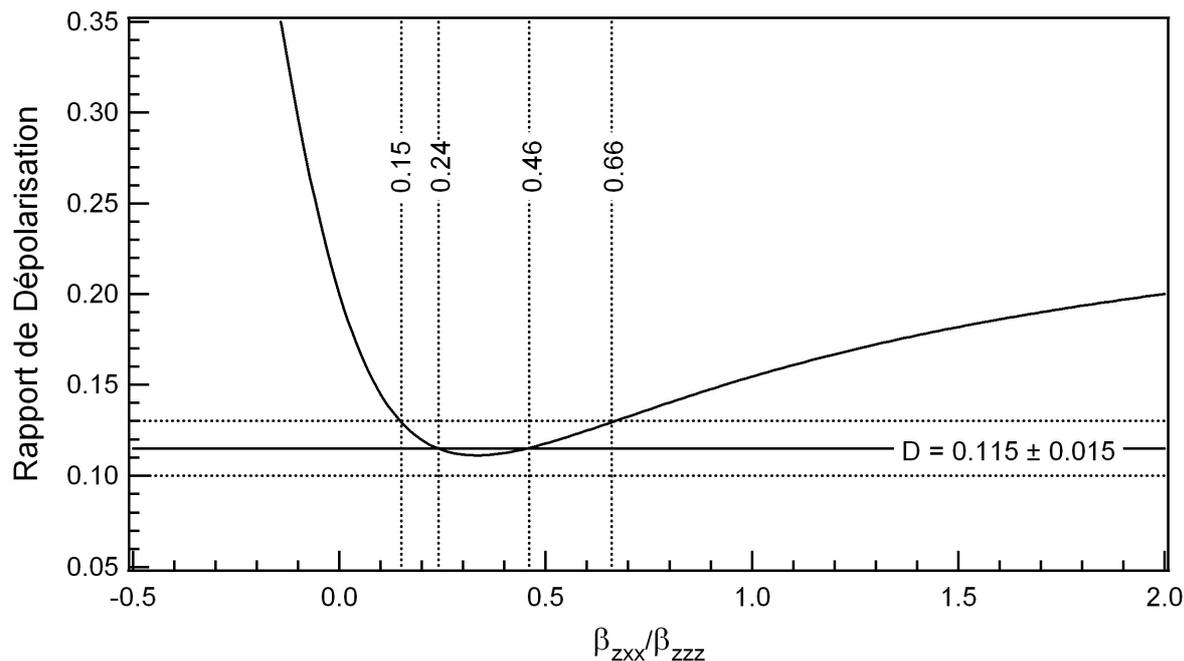


Figure 5-9 : rapport de dépolarisation théorique et valeur expérimentale du peptide PPG10

5.3.2.2 Origine du rapport de dépolarisation.

Grâce à la structure connue du collagène [43, 44] voir Figure 5-2, il est possible de déterminer les angles $\theta_1, \varphi_1, \theta_2, \varphi_2$, définis sur la Figure 5-10. Pour la chaîne α et la super hélice, les angles φ_1 et φ_2 varient entre 0 et 2π , alors que les angles θ_1 et θ_2 sont fixes :

$$\theta_1 = \operatorname{tg}^{-1}\left(\frac{2\pi r_1}{h_1}\right) = \operatorname{tg}^{-1}\left(\frac{2\pi \cdot 2.8}{85.5}\right) \approx 12^\circ \quad (5-13)$$

$$\theta_2 = \operatorname{tg}^{-1}\left(\frac{2\pi r_2}{h_2}\right) = \operatorname{tg}^{-1}\left(\frac{2\pi \cdot 1.5}{9.52}\right) \approx 45^\circ \quad (5-14)$$

A partir du rapport u obtenu sur le collagène et sur le peptide, l'origine de la réponse non linéaire a pu être déterminée. Pour cela, nous avons fait l'hypothèse que le seul élément non nul du tenseur d'hyperpolarisabilité est l'élément β_{iii} parallèle à la direction des enchaînements des acides aminés [37, 39, 45]. Ensuite, nous avons calculé en fonction des angles $\theta_1, \varphi_1, \theta_2, \varphi_2$ les éléments du tenseur microscopique dans le référentiel de la super

hélice. Les éléments du tenseur microscopique dépendent des angles $\theta_1, \varphi_1, \theta_2, \varphi_2$ et de la composante β_{ttt} .

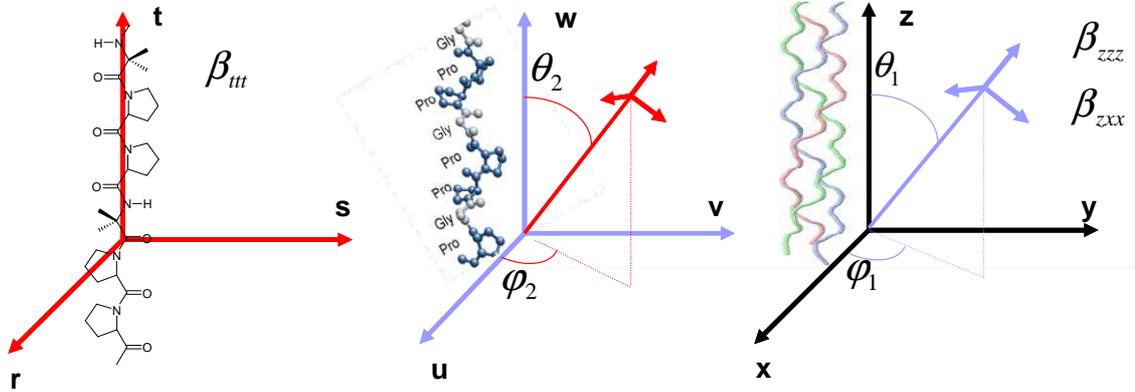


Figure 5-10 : (gauche) référentiel des acides aminés – (centre) référentiel de la chaîne α – (droite) référentiel de la super hélice.

Nous avons exprimé dans le référentiel $\{u,v,w\}$ les autres vecteurs directeurs \hat{x}, \hat{z} et \hat{t} :

$$\hat{t} = \begin{pmatrix} \sin \theta_2 \cos \varphi_2 \\ \sin \theta_2 \sin \varphi_2 \\ \cos \theta_2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{u} \\ \hat{v} \\ \hat{w} \end{pmatrix} \quad (5-15)$$

$$\hat{x} = \begin{pmatrix} \cos \theta_1 \cos \varphi_1 \\ -\sin \varphi_1 \\ \sin \theta_1 \cos \varphi_1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{u} \\ \hat{v} \\ \hat{w} \end{pmatrix} \quad (5-16)$$

$$\hat{z} = \begin{pmatrix} -\sin \theta_1 \\ 0 \\ \cos \theta_1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{u} \\ \hat{v} \\ \hat{w} \end{pmatrix} \quad (5-17)$$

la projection du vecteur directeur \hat{t} sur les vecteurs \hat{x}, \hat{z} dans le référentiel $\{u,v,w\}$ s'exprimant alors comme :

$$\hat{z} \cdot \hat{t} = \cos \theta_1 \cos \theta_2 - \sin \theta_1 \sin \theta_2 \cos \varphi_2 \quad (5-18)$$

$$\hat{x} \cdot \hat{t} = \cos \theta_1 \cos \varphi_1 \sin \theta_2 \cos \varphi_2 - \sin \varphi_1 \sin \varphi_2 \sin \theta_2 + \cos \theta_2 \sin \theta_1 \cos \varphi_1 \quad (5-19)$$

Les composantes du tenseur d'hyperpolarisabilité sont maintenant :

$$\beta_{zzz} = \langle (\hat{z} \cdot \hat{t})^3 \rangle \beta_{ttt} \quad (5-20)$$

$$\beta_{zxx} = \langle (\hat{z} \cdot \hat{t})(\hat{x} \cdot \hat{t})^2 \rangle \beta_{ttt} \quad (5-21)$$

où les crochets $\langle \rangle$ correspondent à la somme sur les angles θ et φ . Pour la chaîne α et la super hélice les angles θ_1 et θ_2 sont fixes et les angles φ_1 et φ_2 sont aléatoires, compris entre 0 et 2π . Il est alors possible de simplifier les formules précédentes en remplaçant $\langle \cos^n \varphi \rangle$ et $\langle \sin^n \varphi \rangle$ par 0 lorsque n est impair et $1/2$ lorsque n est pair (avec $n < 4$). Nous obtenons alors :

$$\beta_{zzz} = N \left(\cos^3 \theta_1 \cos^3 \theta_2 + \frac{3}{2} \cos \theta_1 \cos \theta_2 \sin^2 \theta_1 \sin^2 \theta_2 \right) \beta_{ttt} \quad (5-22)$$

$$\beta_{zxx} = N \cos \theta_1 \cos \theta_2 \left(\frac{\sin^2 \theta_1}{2} + \frac{\sin^2 \theta_2}{2} - \frac{5}{4} \sin^2 \theta_1 \sin^2 \theta_2 \right) \beta_{ttt} \quad (5-23)$$

avec N le nombre d'acides aminés concernés. Le rapport microscopique $u = \beta_{zxx} / \beta_{zzz}$ en fonction de θ_1 et θ_2 est représenté Figure 5-11.

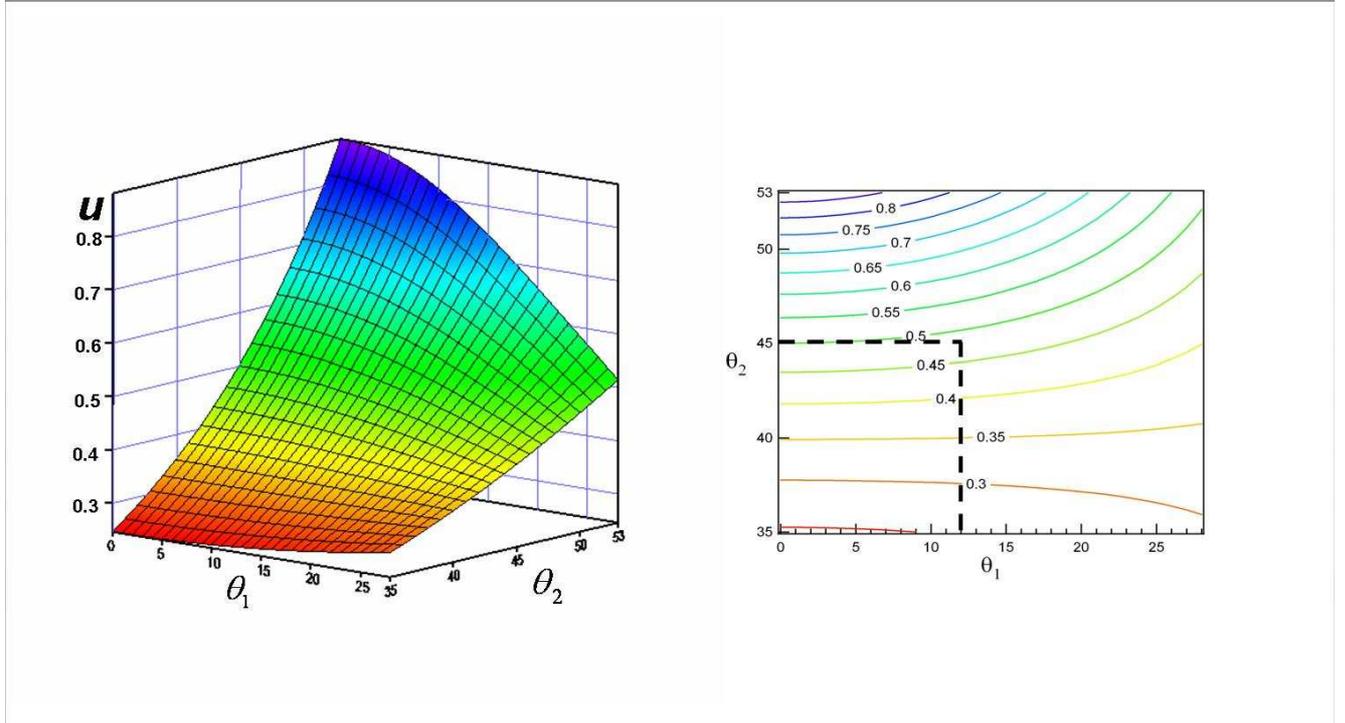


Figure 5-11 : Rapport microscopique en fonction des angles θ_1 et θ_2

Le rapport $u=0.5$ mesuré pour le collagène et le peptide est tout à fait compatible avec les résultats du modèle où $\theta_1=12^\circ$ et $\theta_2=45^\circ$. Cela tend à confirmer que l'hyperpolarisabilité est bien localisée sur la chaîne peptidique et que la seule composante β_{iii} suffit à rendre compte du rapport de dépolarisation observé sur le collagène et le peptide.

5.3.2.3 Valeur absolue de β_{iii} .

A partir de la géométrie du peptide et de la valeur de son hyperpolarisabilité, l'intensité absolue de la brique élémentaire a été calculée. La valeur de la composante $\beta_{L,XXX}$ s'exprime en fonction du rapport de dépolarisation et de la valeur de la mesure expérimentale :

$$\beta^2 = \beta_{L,XXX}^2 + \beta_{L,ZXX}^2 = \beta_{L,XXX}^2 (1 + D^2) \quad (5-24)$$

la composante $\beta_{L,XXX}$ s'exprimant également en fonction des composantes du tenseur d'hyperpolarisabilité microscopique [42] :

$$\beta_{L,XXX}^2 = \frac{1}{7}\beta_{zzz}^2 + \frac{12}{35}\beta_{zzz}\beta_{zxx} + \frac{24}{35}\beta_{zxx}^2 \quad (5-25)$$

en remplaçant les composantes microscopique par la composante β_{iii} d'après les équations (5-22) et (5-23) et en prenant $\theta_1=12^\circ$ et $\theta_2 = 45^\circ$:

$$\beta_{iii} = \frac{\beta}{N^2(1+D^2) 5.7310^{-2}} = (4.5 \pm 0.2)10^{-30} esu \quad (5-26)$$

avec $N = 90$, le nombre d'acides aminés présents dans la séquence du peptide. La valeur obtenue ne dépend pas de la nature des acides aminés présents dans la structure et la mesure permet de donner la valeur de l'hyperpolarisabilité absolue d'un acide aminé dans une séquence ne contenant pas de groupe harmonophores. Cependant, le vecteur \hat{i} n'a pas de réalité physique au sein de l'enchaînement des acides aminés et la composante β_{iii} est elle-même la résultante de la somme des hyperpolarisabilités au sein de chaque acide aminé. Il n'est pas possible avec ces expériences d'apporter une réponse sur la localisation exacte de la non linéarité au sein des acides aminés, ni même quelles sont les valeurs des composantes des tenseurs. Pour cela des calculs de chimie théorique sont nécessaires pour pouvoir attribuer à chaque acide aminé un tenseur d'hyperpolarisabilité qui lui est propre.

5.4 Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons mesuré l'hyperpolarisabilité du collagène de type I de queue de rat ainsi que l'hyperpolarisabilité du collagène dénaturé, du peptide collagénique PPG10 et du tripeptide GGG. De plus, nous avons pu déterminer l'origine physique de la très forte hyperpolarisabilité du collagène. En effet, celle-ci provient de la somme cohérente d'éléments qui correspondent vraisemblablement aux liaisons peptidiques possédant une faible réponse non linéaire. La compacité et la rigidité de la triple hélice assurent un bon alignement de ces harmonophores le long de l'axe moléculaire ce qui aboutit à une sommation efficace des hyperpolarisabilités microscopiques. Ainsi la forte réponse non linéaire du collagène n'est pas liée à la présence de forts harmonophores mais plutôt à la parfaite organisation d'un grand nombre de petits harmonophores.

Les mesures résolues en polarisation ont permis de déterminer les composantes du tenseur d'hyperpolarisabilité majoritaires au sein de la triple hélice. Ainsi, ces informations microscopiques devraient permettre à la communauté étudiant le collagène dans les tissus humains et animaux d'obtenir des informations quantitatives sur les orientations et les concentrations en collagène. Nous pouvons également constater toute la pertinence des expériences de diffusion Hyper Rayleigh pour obtenir des informations sur la conformation et la structure des protéines.

5.5 Bibliographie

- [1] D. J. Hulmes, *J Struct Biol*, **137**, (2002) 2-10
- [2] K. E. Kadler, C. Baldock, J. bella and R. P. Boot-Handford, *J. Cell. Sci.*, **120**, (2007) 1955-1958
- [3] G. N. Ramachandran and G. Kartha, *Nature*, **176**, (1955) 593-5
- [4] A. Rich and F. H. Crick, *J. Mol. Biol.*, **3**, (1961) 483-506
- [5] Y. R. Shen, *The principles of nonlinear optics*, Wiley, 1984
- [6] I. Freund, M. Deutsch and A. Sprecher, *Biophys J*, **50**, (1986) 693-712
- [7] A. M. P. Boulesteix T. , N. Pages, G. Godeau, M.-P. Sauviat, E. Beaurepaire and M. C. Schanne-Klein, *Cytometry*, **69A**, (2006) 20-26
- [8] E. T. Brown, E. Ditomasso, A. Pluen, B. Seed, Y. Boucher and R. K. Jain, *Nat. Med.*, **9**, (2003) 796-800
- [9] P. J. Campognola, A. C. Millard, M. Terasaki, P. E. Hoppe, C. J. Malone and W. A. Mohler, *Biophys. J.*, **82**, (2002) 493-508
- [10] G. Cox, E. Kable, A. Jones, I. Fraser, K. Marconi and M. D. Gorrel, *J. Struct. Biol.*, **141**, (2003)
- [11] N. D. Kirkpatrick, S. Andreou, J. B. Hoying and U. Utzinger, *AM. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **292**, (2007) H3198-3206
- [12] K. Köning and I. Riemann, *J. Biomed. Opt.*, **8**, (2003) 432-439
- [13] M. B. Lilledahl, O. A. Haugen, C. d. L. Davies and L. O. Svaasand, *J. Biomed. Opt.*, **12**, (2007) 044005
- [14] A.-M. Pena, A. Fabre, D. Débarre, J. Marchal-Somm, B. Crestani, J.-L. Martin, E. beaurepaire and M.-C. Schanne-Klein, *Microsc. Res. Tech.*, **70**, (2007) 162-170
- [15] P. Stoller, K. M. Reiser, P. M. Celliers and A. M. Rubenchik, *Biophys. J.*, **82**, (2002) 3330-3342
- [16] M. Strupler, M. Hernest, C. Fligny, J.-L. Tharaux and M.-C. Scanne-Klein, *J. Biomed. Opt.*, **13**, (2008) 054041
- [17] M. Strupler, A.-M. Pena, M. Hernest, J.-L. Tharaux, J.-L. Martin, E. Beaurepaire and M.-C. Scanne-Klein, *Opt. Express.*, **15**, (2007) 4054-4065

- [18] W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman and W. W. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, (2003) 7075-7080
- [19] A. Zoumi, A. Yeh and B. J. Tromberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, (2002) 11014-11019
- [20] D. Débarre, W. Suppato, A. M. Pena, A. Fabre, T. Tordjmann, L. Combettes, M.-C. Schanne-Klein and E. Beaurepaire, *Nat. Med.*, **3**, (2006) 47-53
- [21] A.-M. Pena, T. Boulesteix, T. Dartigalongue and M. C. Schanne-Klein, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, (2005) 10314-10322
- [22] K. Clays and A. Persoons, *Phys. Rev. Lett*, **66**, (1991) 2980-2983
- [23] R. Bersohn, Y. H. Pao and H. L. Frisch, *J. Chem. Phys.*, **45**, (1966) 3184
- [24] T. Verbiest, K. Clays, A. Persoons, F. Meyers and J. L. Brédas, *Opt. Lett.*, **18**, (1993) 525
- [25] J. Zyss, T. C. van, C. Dhenaut and I. Ledoux, *J. Chem. Phys.*, **177**, (1993) 281
- [26] M. V. D. Rest and P. Bruckner, *Cur. Op. Struct. Biol.*, **3**, (1993) 430-436
- [27] S. T. Li, *Biologic Biomaterials: Tissue-Derived Biomaterials (collagen)*, CRC Press, 1995
- [28] K. Beck and B. Brodsky, *J. Struct. Biol.*, **122**, (1998) 17-29
- [29] J. Bella, J. Liu, R. Kramer, B. Brodsky and H. M. Berman, *J Mol Biol*, **362**, (2006) 298-311
- [30] K. Okuyama, S. Arnott, M. Takayanagi and M. Kakudo, *J Mol Biol*, **152**, (1981) 427-43
- [31] I. Rocha-Mendoza, D. R. Yankelevich, M. Wang, K. M. Reiser, C. W. Frank and A. Knoesen, *Biophys. J.*, **93**, (2007) 4433-44
- [32] S. Roth and I. Freund, *J. Chem. Phys.*, **70**, (1979) 1637-1643
- [33] R. D. Fraser, T. P. MacRae and E. Suzuki, *J. Mol. Biol*, **129**, (1979) 463-81
- [34] F. Gobeaux, E. Belamie, G. Mosser, P. Davidson, P. Panine and M.-M. Giraud-Guille, *Langmuir*, **23**, (2007) 6411-6417
- [35] D. M. Maurice, *J. Physiol.*, **136**, (1957) 263-286
- [36] A. Erikson, J. Örtengren, T. Hompland, C. d. d. Davies and M. Lindgren, *J. Biomed. Opt.*, **12**, (2007) 044002

-
- [37] X. Han, R. M. Burke, M. L. Zettel, P. Tang and E. B. Brown, *Opt. Express*, **16**, (2008) 1846-1859
- [38] P. Stoller, B.-M. Kim, A. M. Rubenchik, K. M. Reiser and L. B. D. Silva, *J. Biomed. Opt.*, **7**, (2002) 205-214
- [39] F. Tiaho, G. Recher and D. Rouède, *Opt. Express*, **15**, (2007) 12286-12295
- [40] R. M. Williams, W. R. Zipfel and W. W. Webb, *88*, (2005)
- [41] G. Revillod, J. Duboisset, I. Russier-Antoine, E. Benichou, G. Bachelier, C. Jonin and P. F. Brevet, *J. Phys. Chem. C*, **112**, (2008) 2716-2723
- [42] S. Brasselet and J. Zyss, *J. Opt. Soc. Am. B*, **15**, (1998) 257-288
- [43] B. Brodsky and A. V. Persikov, *Adv Protein Chem*, **70**, (2005) 301-39
- [44] B. Brodsky, G. Thiagarajan, B. Madhan and K. Kar, *Biopolymers*, **89**, (2008) 345-53
- [45] S. V. Plotnikov, A. C. Millard, P. J. Campagnola and W. A. Mohler, *Biophys. J.*, **90**, (2006) 328-339

Chapitre 6: Symétrie et Arrangement

6.1 Introduction

La diffusion harmonique de lumière ou diffusion hyper Rayleigh par des objets de taille nanométrique peut apporter des informations sur la morphologie et plus particulièrement la forme de ces objets [1]. Pour des molécules, objets que nous pouvons considérer sans extension spatiale donc ponctuels, l'analyse des courbes de l'intensité HRS résolue en polarisation permet d'obtenir le rapport de dépolarisation qui renseigne directement sur les composantes majoritaires du tenseur d'hyperpolarisabilité [2] et ainsi sur sa symétrie spatiale. Pour des objets de taille non négligeable devant la longueur d'onde, ces mêmes courbes d'intensité HRS résolue en polarisation renseignent sur le caractère dipolaire ou multipolaire dominant de la réponse, par exemple sur la répartition spatiale des sources élémentaires qui le composent [3]. Dans les chapitres précédents, la diffusion Hyper Rayleigh a été étudiée dans deux cas extrêmes : les molécules dont la taille est très inférieure à la longueur d'onde et les arrangements moléculaires de répartition sphérique. Ces deux répartitions extrêmes aboutissent à des intensités HRS résolues en polarisation très différentes mais quantifiées par le nouveau paramètre ξ^V . La diffusion HRS permet donc d'obtenir de précieuses informations sur ces objets de taille nanométrique pour des géométries particulières telles que les géométries sphériques ou linéaires.

Dans ce chapitre, nous allons étendre le problème de manière empirique aux autres géométries accessibles, en plus de la symétrie sphérique. Nous étudierons en particulier les différents détails pouvant être observés. Pour cela, la réponse HRS de différents assemblages moléculaires ayant des géométries particulières a été simulée. Ces géométries correspondent finalement à l'arrangement spatial des sources élémentaires. Nous avons donc choisis de nous intéresser aux solides de Platon ou aux répartitions qui répondent à des problèmes de distributions de points à la surface d'une sphère. D'autres répartitions seraient bien entendu envisageables. Contrairement à la répartition de points à la surface d'un disque, voir Figure 6-1, la répartition de points à la surface d'une sphère est un problème non trivial qui nécessite des critères de répartition. Un des critères de répartition les plus courants est un critère

énergétique. La répartition finale est alors la répartition qui minimise l'énergie d'interaction entre les points. Ce problème de répartition est connu sous le nom de problème de Thomson. Il existe d'autres critères de répartition telle que la répartition de Tammes pour laquelle il s'agit de minimiser l'encombrement stérique des points répartis. Ces problèmes de répartition d'objet à la surface d'une sphère correspondent à des questions très importantes dans de nombreuses disciplines, en particulier la biologie [4] ou la chimie [5].

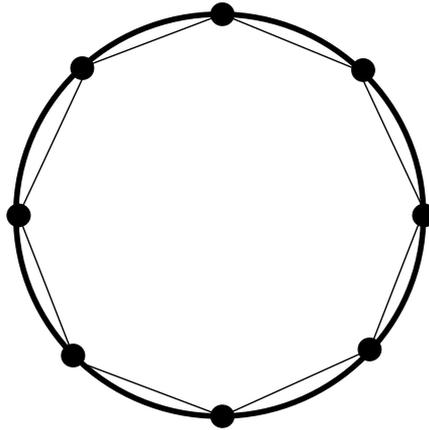


Figure 6-1 : répartition de 8 points sur un cercle

Après avoir obtenu la réponse de diffusion Hyper Rayleigh de ces assemblages moléculaires ayant des géométries particulières, nous avons développé un nouveau montage expérimental dans le but d'apporter de nouvelles informations. En effet, plusieurs géométries aboutissent souvent aux mêmes intensités résolues en polarisation et pour cela de nouvelles mesures sont nécessaires pour lever cette indétermination. Un montage de diffusion Hyper Rayleigh en transmission a ainsi été mis au point et des mesures préliminaires ont démontrées l'avantage de la combinaison de deux angles différents en excitation pour la détermination de l'arrangement spatial dans les assemblages moléculaires.

6.2 Répartition de n points sur une sphère

6.2.1 Solides de Platon

Une première solution répondant à la répartition homogène de points sur une sphère est la répartition selon les solides de Platon. Ces solides, dont l'introduction et l'étude remontent aux premiers temps de l'homme moderne, grec en particulier d'où leur nom, ont été pour la

première fois construit par Théétète d'Athènes au IV^{ème} siècle avant Jésus Christ. Par la suite, Platon utilisera ces solides comme support pour sa philosophie en les associant aux éléments de la nature [6, 7].

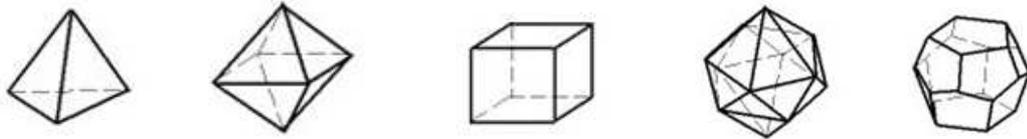


Figure 6-2 : les 5 solides de Platon : le tétraèdre, l'octaèdre, le cube, l'icosaèdre et le dodécaèdre.

Pour qu'un solide réponde à la définition d'un solide de Platon, il doit remplir certaines propriétés :

- Toutes les faces du solides doivent être des polygones réguliers, c'est à dire que chaque face doit être un polygone dont les angles entre les cotés de ce polygone sont identiques.
- Le même nombre de faces doit se rejoindre en chaque sommet.
- Les faces ne se coupent qu'au niveau des arrêtes.

Par conséquent, il n'existe ainsi que cinq solides de Platon en trois dimensions :

- Le tétraèdre : il est composé de 4 sommets, 6 arrêtes et 4 faces. Il réponde au groupe de symétrie T_d . Si on remplace chaque centre de chaque face par un sommet on obtient à l'intérieur du solide un autre solide, on parle alors de solide dual. Le solide dual du tétraèdre est le tétraèdre lui-même. Le tétraèdre est donc un solide auto-dual.
- L'octaèdre : il est composé de 6 sommets, 12 arrêtes et 8 faces. Il réponde au groupe de symétrie O_h . Le solide dual de l'octaèdre est le cube.
- Le cube : il est composé de 8 sommets, 12 arrêtes et 6 faces. Il réponde au groupe de symétrie O_h . Le solide dual du cube est l'octaèdre.

- L'icosaèdre : il est composé de 12 sommets, 30 arêtes et 20 faces. Il répond au groupe de symétrie I_h . Le solide dual de l'icosaèdre est le dodécaèdre.
- Le dodécaèdre : il est composé de 20 sommets, 30 arêtes et 12 faces. Il répond au groupe de symétrie I_h . Le solide dual du dodécaèdre est l'icosaèdre.

Les sommets des solides de Platon se distribuent à la surface d'une sphère. Ainsi, ces solides répondent au problème des répartitions homogènes de 4, 6, 8, 12 et 20 points à la surface d'une sphère. Les critères de répartition sont dans ce cas esthétiques puisqu'ils répondent à la formation de formes tridimensionnelles ayant des propriétés géométriques atypiques.

6.2.2 Répartition de Thomson

Parmi les critères de répartition de n points à la surface d'une sphère, l'un des plus intéressants est le critère énergétique. En effet, si nous attribuons à chaque point une charge électrostatique de même signe, ces points à la surface de la sphère se distribuent de manière à minimiser l'énergie d'interaction. J. J. Thomson (1856-1940), physicien anglais découvreur de l'électron, avait encore une vision non aboutie de l'atome. Il pensait que les atomes étaient composés d'éléments électrisés négativement enfermés dans une sphère uniforme d'électrification positive. Avec ce modèle d'atome, J.J. Thomson s'est posé la question de savoir comment est réparti l'ensemble de ces électrons à la surface de cette sphère chargée positivement en fonction de leur nombre [8]. Ainsi pour chaque atome différent, le nombre d'électrons est différent et leur répartition change. C'est le problème que nous appellerons de Thomson, ou problème des électrons ou encore problème du potentiel Coulombien. Même si aujourd'hui le modèle de l'atome a évolué, le problème de la répartition des charges de même signe à la surface d'une sphère reste un problème très complexe ayant suscité d'importantes recherches, notamment dans le domaine des mathématiques et de la chimie. La répartition des électrons à la surface d'une sphère répond à la minimisation du potentiel coulombien :

$$U_P \propto \sum_{i < j} \frac{1}{|r_i - r_j|} \quad (6-1)$$

avec r_i et r_j les positions sur la sphère des électrons i et j . Pour chaque configuration, il est possible de calculer ce potentiel et de trouver la configuration qui le minimise. La formulation

physique de problème est assez simple mais la difficulté réside dans l'obtention de solutions qui convergent. Pour cela plusieurs méthodes ont été utilisées par le passé : les algorithmes génétique [9], la marche aléatoire ou les contraintes d'optimisation globale [10].

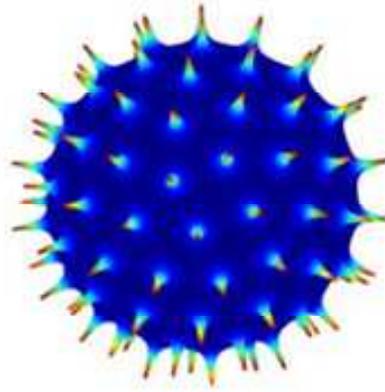


Figure 6-3 : Répartition de 100 électrons à la surface d'une sphère. En code couleur, le potentiel électrostatique.

Pour un nombre d'électrons allant de 2 à 112, les mêmes répartitions ont été trouvés par différentes méthodes numériques [11] ou théoriques [12], suggérant que les meilleures configurations minimisant l'énergie ont bien été trouvées. Pour un nombre d'électrons supérieur à 112, l'obtention de solutions uniques reste difficile. Par contre, pour des configurations allant de 3 à 18 électrons, voir Tableau 18, l'arrangement géométrique peut prendre la forme de polyèdres connus. En effet, de 3 à 12 et 14 électrons, les résultats obtenus sont des polyèdres réguliers lorsque l'on considère que chaque charge est placée sur un sommet. En revanche pour certaines configurations, par exemple 13, 15, 16, ..., les répartitions ne sont pas des polyèdres simples et, de manière générale, le degré de symétrie de ces objets est moins important. Par exemple, lorsque que nous plaçons 20 électrons à la surface d'une sphère, ceux-ci ne s'organisent pas sous la forme d'un dodécaèdre de Platon mais sous une forme non régulière.

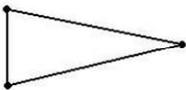
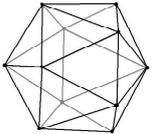
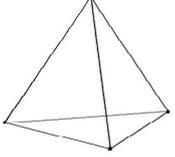
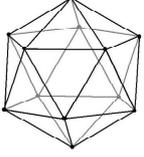
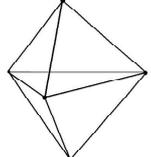
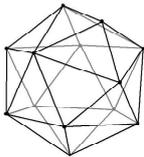
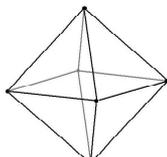
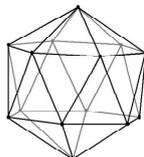
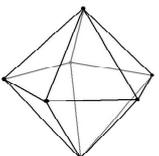
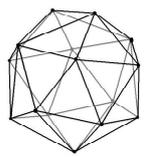
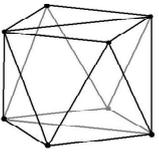
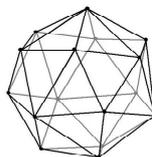
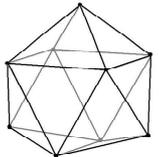
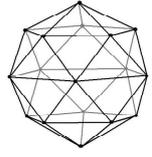
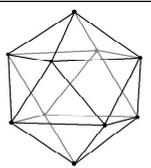
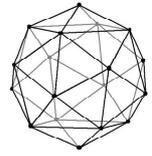
3		Triangle équilatéral Symétrie D_{3h}	11		Symétrie C_{2v}
4		Tétraèdre Symétrie T_d	12		Icosaèdre Symétrie I_h
5		Bipyramide triangulaire Symétrie D_{3h}	13		Symétrie C_{2v}
6		Octaèdre Symétrie O_h	14		Symétrie D_{6d}
7		Bipyramide pentagonale Symétrie D_{5h}	15		Symétrie D_3
8		Antiprisme Symétrie D_{4d}	16		Symétrie T
9		tétradécadeltaèdre Symétrie D_{3h}	17		Symétrie D_{5h}
10		hexadécadeltaèdre Symétrie D_{4d}	18		Symétrie C_{4v}

Tableau 18 : Répartition de 3 à 18 électrons à la surface d'une sphère répondant à la minimisation de l'énergie d'interaction Coulombienne [13, 14].

6.2.3 Répartition de Tammes

Parmi les autres manières d'organiser des points à la surface d'une sphère, il existe aussi la répartition de Tammes. En 1930, le botaniste néerlandais J.M.L. Tammes a décrit l'arrangement de trous sphériques à la surface de nombreux grains de pollens. Ces trous permettent aux éléments reproducteurs de sortir lors de la fertilisation. La répartition de ces points est assez régulière et leur nombre dépend de l'espèce végétale. Tammes a constaté que la distance entre ces trous sur un même grain est approximativement constante et que le nombre de trous est proportionnel à la surface du grain de pollen. Tammes se posa la question suivante, énoncé comme étant le problème de Tammes : « en fixant une distance minimale entre chaque trou, combien de trous puis-je répartir à la surface d'une sphère de rayon donné » [15]. Ce problème est également connu sous le nom du problème des dictateurs ennemis. Le problème s'énonce alors de la manière suivante : considérant des dictateurs à la surface de la Terre, comment ceux-ci se répartissent-ils pour que chacun ait un territoire circulaire maximum tout en étant à une distance maximale des autres dictateurs [16]. Tammes a essayé de répondre à cette question de manière empirique.

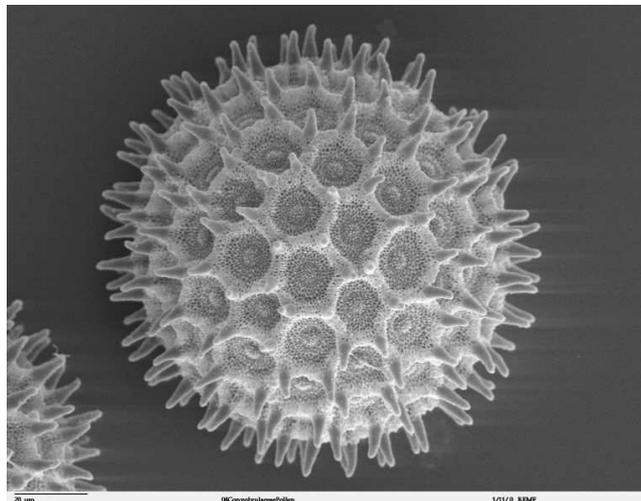


Figure 6-4 : Image de microscopie électronique d'un grain de pollen de l'espèce *Ipomoea Purpurea*.

La répartition de Tammes, c'est-à-dire la répartition de petits disques non superposables à la surface d'une sphère, aboutit à des configurations stables pour 2 à 12 et 24 disques, les

configurations 6 et 12 ayant été trouvées par Tammes lui-même. Pour un grand nombre de disques à placer sur une sphère, le problème devient rapidement plus compliqué. En effet, placer des disques à la surface d'une sphère revient à minimiser un potentiel d'interaction entre chaque centre de disque. Ce potentiel d'interaction, pour le problème de Tammes, est de la forme :

$$U_{Tammes} \propto \sum_{i < j} \frac{1}{|r_i - r_j|^n}, \quad n \rightarrow \infty \quad (6-2)$$

Nous remarquons que ce potentiel est de la même forme que celui du problème de Thomson, seule change la puissance de la distance entre deux points. Pour le problème de Thomson, cette puissance est égale à $n = 1$, alors que pour Tammes cette puissance tend vers l'infini.



Figure 6-5 : Répartition de 100 disques à la surface d'une sphère

Il reste mathématiquement impossible de modéliser un potentiel dont la puissance tend vers moins l'infini. Cependant, il suffit de prendre une puissance suffisamment grande pour que la répartition ne dépende plus de cette puissance. Dans la pratique, une puissance supérieure à $n = 12$ permet d'obtenir, pour un nombre de trous pas trop important, les bonnes configurations. Ainsi, une configuration à 7 points correspond à une bipyramide pentagonale lorsque que la puissance du potentiel est $n = 1$. Si cette puissance augmente, un changement de configuration apparaît lorsque la puissance devient égale à $n = 12$, voir Tableau 19. Pour un nombre de point allant jusqu'à 6, ainsi que pour 8 et 12, la répartition de Tammes est identique à celle de Thomson. Pour les autres configurations les deux répartitions donnent des

résultats différents. Nous pouvons également remarquer que les configurations de 1 à 6 et 12 sont des configurations qui ne dépendent pas du potentiel choisi, ces configurations étant appelées configurations universelles [17].

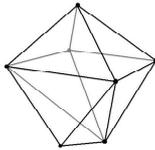
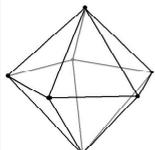
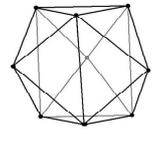
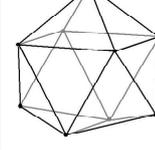
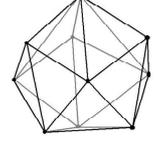
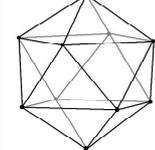
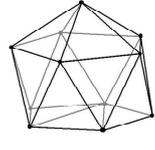
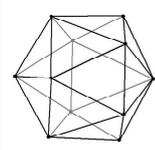
	Répartition de Tammes	Répartition de Thomson
7	 <p>Symétrie C_{3v}</p>	 <p>bipyramide pentagonale Symétrie D_{5h}</p>
9		 <p>tétradécadeltaèdre Symétrie D_{3h}</p>
10		 <p>hexadécadeltaèdre Symétrie D_{4d}</p>
11		 <p>Symétrie C_{2v}</p>

Tableau 19 : Répartitions différentes dans le cas de Tammes et de Thomson. Au-delà de 13 toutes les configurations sont différentes mais il devient difficile de faire la distinction à cause du grand nombre de points

Lorsque le critère de répartition des points sur la sphère est le critère de Thomson, nous parlons de répartition Coulombienne. Pour la répartition de Tammes, nous pourrions parler de répartition stérique. La valeur élevée de la puissance impose en effet que les points correspondent au centre de disques impénétrables. Il est intéressant de faire le lien avec le potentiel de Lennard-Jones pour un modèle diatomique. En effet, le potentiel de répulsion est souvent modélisé par un potentiel du type r^{-12} . Cette puissance de -12 n'a pas de véritable fondement théorique si ce n'est de rendre compte de la répulsion due au principe de Pauli qui peut être associée à une répulsion stérique. Cette puissance de -12 correspond exactement à la

puissance du changement de configuration entre une répulsion Coulombienne et une répulsion stérique.

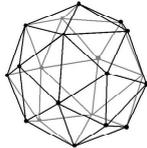
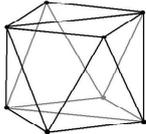
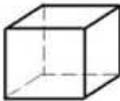
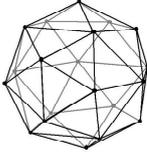
	Répartition de Tammes	Répartition de Thomson	Solide de Platon
8			
20			

Tableau 20 : différence entre les répartitions de Tammes, Thomson et Platon pour un nombre de points de 8 et 20.

6.3 Diffusion non linéaire détectée à 90°

6.3.1 Théorie

Les intensités harmoniques HRS diffusées dans la direction \hat{Y} , résolues en polarisation, ont été calculées numériquement pour des assemblages moléculaires dont les répartitions spatiales correspondent aux différentes distributions de Tammes, de Thomson et de Platon. Pour passer d'une répartition de points sur une sphère à un assemblage moléculaire, nous avons choisi de placer des molécules de type push-pull axiale à la surface de la sphère, orientées du centre vers l'extérieur. Ce type de molécule se rapproche des molécules amphiphiles formant des micelles, voir Figure 6-6. La seule composante non nulle du tenseur d'hyperpolarisabilité de ces molécules est la composante $\beta_{m,zzz}$. De plus, chaque molécule se trouve à une distance r'_z du centre de la sphère sur laquelle elle est répartie.

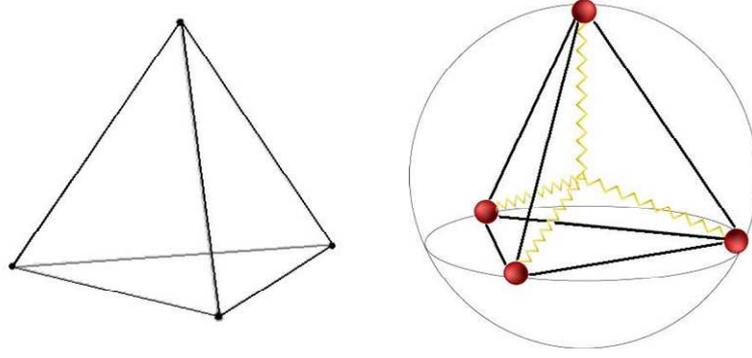


Figure 6-6 : tétraèdre et répartition des molécules amphiphiles.

Un programme numérique, développé en langage C [18], calcule à partir de l'orientation de chaque molécule le tenseur $\vec{\beta}$ d'ordre 3 et $\vec{\Gamma}$ d'ordre 4 dans le référentiel mésoscopique comme suit :

$$\beta_{\text{més},IJK} = \sum_i T_I^z(\theta_i, \varphi_i, \psi_i) T_J^z(\theta_i, \varphi_i, \psi_i) T_K^z(\theta_i, \varphi_i, \psi_i) \beta_{m,zzz} \quad (6-1)$$

$$\Gamma_{\text{més},IJKL} = \sum_i T_I^z(\theta_i, \varphi_i, \psi_i) T_J^z(\theta_i, \varphi_i, \psi_i) T_K^z(\theta_i, \varphi_i, \psi_i) T_L^z(\theta_i, \varphi_i, \psi_i) r'_z \beta_{m,zzz} \quad (6-2)$$

avec T la matrice des angles d'Euler. Une fois les tenseurs mésoscopiques définis, une moyenne sur toutes les orientations de l'assemblage est effectuée numériquement pour obtenir les tenseurs dans le référentiel du laboratoire. Cette étape rend alors compte d'une répartition des assemblages dans une solution liquide par exemple. L'intensité HRS résolue en polarisation est alors :

$$a^V = G' NI_\omega^2 \left[\langle \beta_{L,XXX} \beta_{L,XXX}^* \rangle + (\Delta k \cdot r')^2 \langle \tilde{\Gamma}_{L,XXX} \tilde{\Gamma}_{L,XXX}^* \rangle \right] \quad (6-3)$$

$$b^V = G' NI_\omega^2 \left[\langle 4\beta_{L,XXY} \beta_{L,XXY}^* + 2\beta_{XXY} \beta_{XXY}^* \rangle + (\Delta k \cdot r')^2 \langle 2\tilde{\Gamma}_{L,XXX} \tilde{\Gamma}_{L,XXY}^* + \tilde{\Gamma}_{L,XXY} \tilde{\Gamma}_{L,XXY}^* \rangle \right] \quad (6-4)$$

$$c^V = G' NI_\omega^2 \left[\langle \beta_{L,XYX} \beta_{L,XYX}^* \rangle + (\Delta k \cdot r')^2 \langle \tilde{\Gamma}_{L,XYX} \tilde{\Gamma}_{L,XYX}^* \rangle \right] \quad (6-5)$$

$$a^H = G' NI_{\omega}^2 \left[\langle \beta_{L,ZXX} \beta_{L,ZXX}^* \rangle + (\Delta k.r')^2 \langle \tilde{\Gamma}_{L,ZXX} \tilde{\Gamma}_{L,ZXX}^* \rangle \right] \quad (6-6)$$

$$b^H = G' NI_{\omega}^2 \left[\langle 4\beta_{L,ZXY} \beta_{L,ZXY}^* + 2\beta_{ZXY} \beta_{ZXY}^* \rangle + (\Delta k.r')^2 \langle 2\tilde{\Gamma}_{L,ZXX} \tilde{\Gamma}_{L,ZYY}^* + \tilde{\Gamma}_{L,ZXY} \tilde{\Gamma}_{L,ZXY}^* \rangle \right] \quad (6-7)$$

$$c^H = G' NI_{\omega}^2 \left[\langle \beta_{L,ZYY} \beta_{L,ZYY}^* \rangle + (\Delta k.r')^2 \langle \tilde{\Gamma}_{L,ZYY} \tilde{\Gamma}_{L,ZYY}^* \rangle \right] \quad (6-8)$$

Les intensités dépendent d'une partie non retardée et d'une partie retardée. Dans le chapitre 4, suivant les intensités résolues en polarisation, nous avons étudié indépendamment : les intensités non retardées avec les exemples des molécules de Dia et de Cristal Violet, les intensités retardées avec comme exemple les micelles à répartition sphérique. La symétrie des champs rayonnés dans ces deux cas permet de déterminer le type d'émission observé. Pour les objets ponctuels comme les molécules, il s'agit d'une émission dipolaire. En revanche pour une répartition sphérique de taille non négligeable devant la longueur d'onde, il s'agit d'une émission quadripolaire. Pour un objet ponctuel, les émissions au-delà du terme dipolaire, c'est-à-dire quadripolaire, octupolaire, etc... ne sont pas possible car l'extension spatiale des sources ne permet pas l'excitation de ces modes d'émission. Il est toutefois usuel de donner le qualificatif d'octupolaire à des molécules dont la symétrie est D_{3h} comme le Cristal Violet. Il faut cependant faire ici la distinction entre la symétrie des sources et la symétrie des champs. Une molécule octupolaire comme le Cristal Violet émet un champ non linéaire dipolaire car sa taille ponctuelle à l'échelle des champs ne permet pas l'excitation du mode octupolaire. De plus, pour un objet ponctuel la symétrie quadripolaire n'est pas admise car elle correspond à une répartition centrosymétrique des sources. Les champs retardés contiennent en revanche tout les ordres : dipolaire, quadripolaire, octupolaire, etc. Le caractère de l'émission dépend alors de la symétrie de la source.

$$\vec{E}(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega) = \underbrace{\vec{E}_{nr}(\vec{r}, 2\omega)}_{\substack{\text{Dipolaire} \\ \text{Quadripolaire} \\ \text{Octupolaire} \\ \dots}} + \underbrace{\vec{E}_r(\vec{r}, \vec{r}', 2\omega)}_{\substack{\text{Dipolaire} \\ \text{Quadripolaire} \\ \text{Octupolaire} \\ \dots}}$$

Figure 6-7 : répartition du type d'émission en fonction de la taille de l'objet diffusant

Le champ dipolaire émis par un objet diffusant provient soit du terme non retardé soit du terme retardé à la fréquence fondamentale. Les termes supérieurs ne proviennent que des termes retardés à la fréquence harmonique. Pour quantifier ces contributions dipolaire et quadripolaire ainsi que la contribution des ordres supérieurs dans la diffusion à 90° par un objet de taille nanométrique, nous avons introduit le paramètre η .

6.3.2 Résultats

6.3.2.1 Répartition de Thomson

Pour chaque configuration de Thomson, les coefficients a^V , b^V et c^V ont été calculés ainsi que le coefficient η . Ce travail a été réalisé pour différentes tailles des assemblages car ce paramètre détermine aussi le rapport entre les contributions dipolaire et quadripolaire.

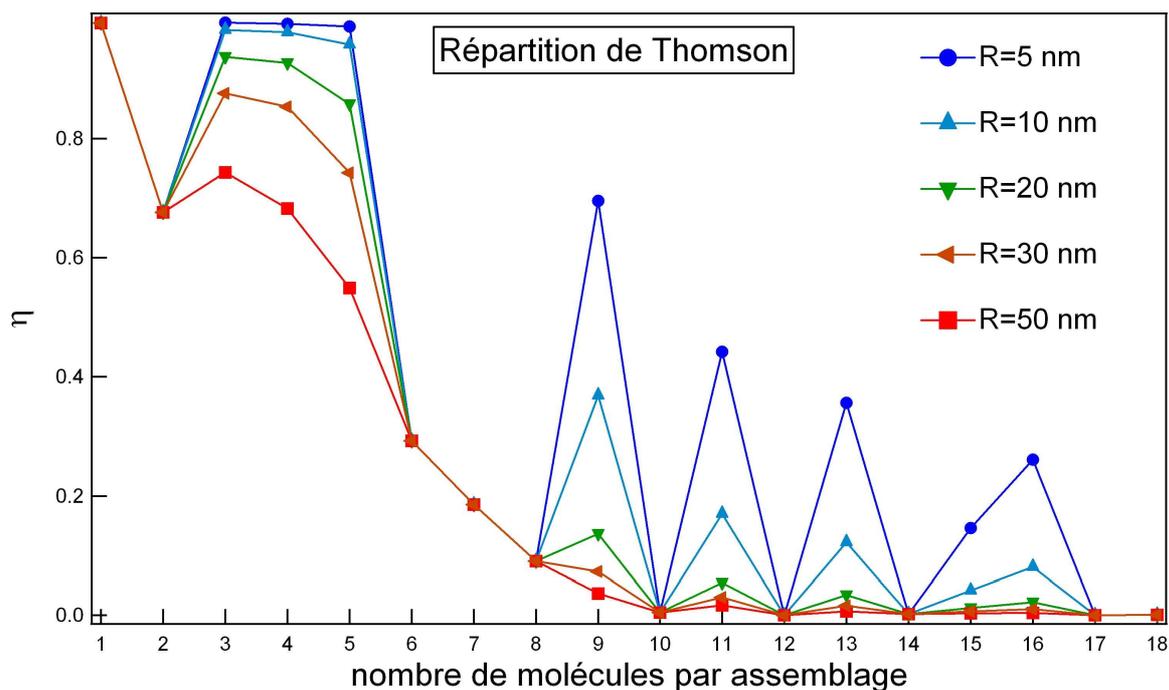


Figure 6-8 : η pour les différentes répartitions de Thomson entre 1 et 18 objets pour différent rayon de la sphère.

Pour les répartitions centrosymétriques, le paramètre η ne dépend pas de la taille (à l'exception des répartitions $n = 7$ et $n = 17$ discutées par la suite mais qui ne sont pas centrosymétriques) car l'émission est uniquement due au terme retardé. Lorsque la répartition est non centrosymétrique, il existe une émission dipolaire due aux effets non retardés et une émission dipolaire et quadripolaire due aux effets retardés. Si la taille de la sphère correspondante est trop faible devant la longueur d'onde, alors les effets quadripolaires ne sont pas prédominants et l'objet répond majoritairement de manière dipolaire. Le paramètre η est alors proche de 1. Lorsque les assemblages sont gros, la réponse possède un caractère quadripolaire dominant et η tend vers 0. De manière générale pour les répartitions selon le problème de Thomson, le paramètre η diminue de 1 à 0 au fur et à mesure que le nombre de molécules par assemblage augmente. En effet, cette augmentation entraîne naturellement une évolution vers des assemblages de plus en plus proche d'une répartition uniforme et par conséquent vers une contribution quadripolaire dominante. De même, nous remarquons l'alternance pair-impair. Les répartitions à nombre pair sont centrosymétriques et cela conduit à des valeurs de paramètres η plus faibles que pour les assemblages de nombre impair. Enfin, se superposent 4 exceptions : $n = 4$ et $n = 16$ où la contribution dipolaire est forte et $n = 7$ et $n = 17$ où au contraire la contribution dipolaire est absente.

Discutons quelques répartitions particulières : $n = 1, 2, 4, 7, 16$ et 17 , présentes sur la Figure 6-8.

- $n=1$. Pour un assemblage comportant une seule molécule, la réponse en polarisation d'un tel objet est purement dipolaire et $\eta = 1$. Le rapport de dépolarisation dépend des éléments de tenseur de l'objet, ici $\beta_{m,zzz}$, et vaut dans ce cas 0.2.

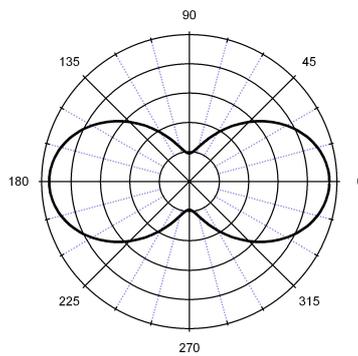


Figure 6-9: Intensité HRS, polarisée verticalement, résolue en polarisation

- $n=2$. Cet assemblage est purement centrosymétrique et ce type d'assemblage n'a pas de réponse dipolaire pure. L'intensité non linéaire émise provient des effets retard et le paramètre η de l'objet ne dépend pas de sa taille.

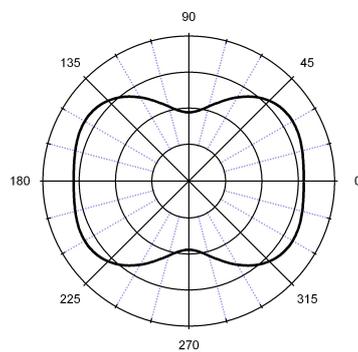


Figure 6-10 : Intensité HRS, polarisée verticalement, résolue en polarisation

- n=4. Dans la répartition de Thomson, cet assemblage est un tétraèdre. Cette géométrie est une des rares géométries comportant un nombre pair de molécules tout en restant non centrosymétrique. Il y a donc dans la réponse HRS à la fois une partie dipolaire et une partie quadripolaire. Comme ces deux parties sont présentes, la taille de l'assemblage va jouer un rôle dans la valeur du paramètre η .
- n=7. Il s'agit d'un assemblage comportant un nombre impair de molécules. A ce titre, il ne peut pas être centrosymétrique, mais la partie dipolaire de cet assemblage est strictement nulle. Un calcul du tenseur d'hyperpolarisabilité permet de comprendre ce comportement. L'assemblage est constitué de 5 molécules dans le plan et de 2 molécules perpendiculaires à ce plan, voir Tableau 18. Les deux molécules hors du plan forment un ensemble centrosymétrique comme pour l'assemblage $n = 2$. Pour les 5 molécules du plan, le calcul du tenseur d'hyperpolarisabilité, chaque molécule possédant un tenseur d'hyperpolarisabilité dont la seule valeur non nulle est la composante $\beta_{m,zzz}$, donne :

$$\begin{aligned}\beta_{\text{més},ZZZ} &= \beta_{m,zzz} + T_Z^z T_Z^z T_Z^z \beta_{m,zzz} \\ &= (1 + \cos(72))^3 + \cos(144)^3 + \cos(216)^3 + \cos(288)^3 \beta_{m,zzz} \\ &= 0\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\beta_{\text{més},ZXX} &= \beta_{m,zzz} + T_Z^z T_X^z T_X^z \beta_{m,zzz} \\ &= (0 + \cos(72)\sin(72))^2 + \cos(144)\sin(144)^2 \\ &\quad + \cos(216)\sin(216)^2 + \cos(288)\sin(288)^2 \beta_{m,zzz} \\ &= 0\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\beta_{\text{més},XXX} &= \beta_{m,zzz} + T_X^z T_X^z T_X^z \beta_{m,zzz} \\ &= (0 + \sin(72))^3 + \sin(144)^3 + \sin(216)^3 + \sin(288)^3 \beta_{m,zzz} \\ &= 0\end{aligned}$$

Le tenseur mésoscopique d'un tel assemblage est donc nul et par conséquent, le terme non retardé est strictement nul aussi.

- Inversion 16-17. Pour $n = 16$, η est fort alors que l'assemblage est pair, et au contraire pour $n = 17$ possède un η proche de 0 alors qu'il est impair. Il s'agit de la présence juxtaposée de deux symétries particulières. La configuration $n = 17$

dans la répartition de Thomson est de symétrie D_{5h} , identique à la répartition de l'assemblage $n = 7$ dont les termes non retardés sont nuls. Le groupe de symétrie D_{5h} ne génère pas dans l'approximation dipolaire électrique. La répartition $n = 16$ possède une forte réponse dipolaire pure malgré la parité du nombre de molécules. Cet assemblage n'est pas centrosymétrique et fait partie du groupe de symétrie T, comme l'assemblage $n = 4$ qui fait partie du groupe de symétrie T_d . Pour ces deux types d'assemblage, la non centrosymétrie de l'assemblage entraîne une forte réponse dipolaire.

6.3.2.2 Comparaison entre les différentes répartitions

Le même travail a été effectué pour la répartition de Tammes et pour les solides de Platon, en particulier pour un assemblage de rayon $R = 10$ nm, pour pouvoir comparer les différentes répartitions.

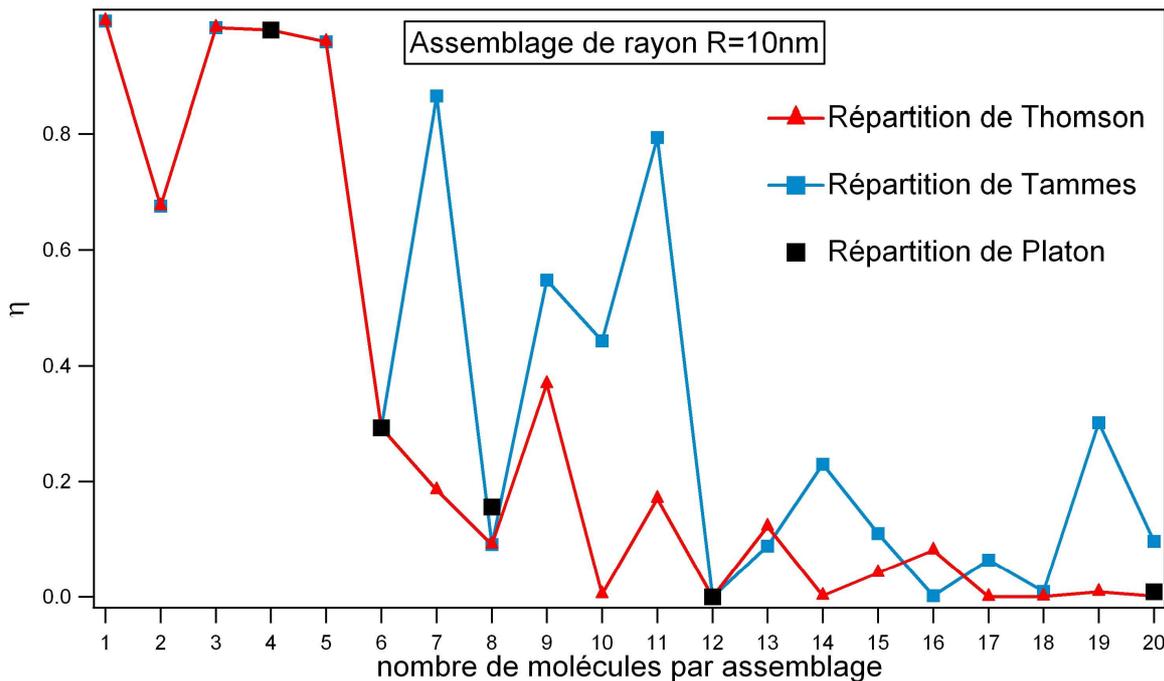


Figure 6-11 : répartition de Thomson, Tammes et Platon pour un assemblage de rayon 10nm

Lorsque les répartitions n'aboutissent pas aux mêmes configurations, les valeurs de η sont différentes. L'assemblage $n = 7$ selon Tammes n'appartient ainsi pas au groupe de symétrie D_{5h} et une forte partie dipolaire est présente par rapport à la répartition de Thomson.

Les configurations $n = 9, 10$ et 11 possèdent un degré de symétrie moindre que leur contrepartie selon Thomson. Il en résulte des configurations plus dipolaires.

6.4 Combinaison de la diffusion à 90° et 180°

6.4.1 Théorie

Une mesure expérimentale de paramètre η permet de déterminer, grâce à l'intermédiaire des graphes précédents, voir Figure 6-8 et Figure 6-11, la géométrie particulière de l'assemblage si la taille de celui-ci est connu. Cependant, une valeur de ce paramètre η aboutit à plusieurs géométries possibles. Par exemple, une valeur de η aux alentours de 1, pour une taille de 5 nm, correspond à des géométries linéaires, $n = 1$, triangulaires, $n = 3$, tétraédriques $n = 4$ ou encore bipyramidales triangulaires $n = 5$. Pour permettre la levée de dégénérescence sur la géométrie rencontrée, le principe d'une deuxième mesure expérimentale a été développé.

Dans l'équation (5-4), le champ harmonique est composé de deux termes : le terme non retardé et le terme retardé qui dépend du facteur $i\Delta\vec{k}\cdot\vec{r}'$. Ce dernier terme est en partie déterminé par la géométrie du montage expérimental. Le vecteur $\Delta\vec{k}$ est en effet la différence entre le vecteur d'onde de l'excitation et le vecteur d'onde de la réémission, aux indices optiques près :

$$\Delta\vec{k} = 2\vec{k} - \vec{K} = \frac{2\omega}{c} (n^\omega \hat{k} - n^{2\omega} \hat{K}) \quad (6-9)$$

Si pour la matrice du milieu contenant les assemblages, par exemple de l'eau ou de l'éthanol pour des matrices liquides, la dispersion peut être négligée alors $n^\omega = n^{2\omega}$. La configuration pour laquelle \hat{k} et \hat{K} sont colinéaires rend donc $\Delta\vec{k}$ nul et il ne peut y avoir d'émission des ordres supérieur au dipôle. Une mesure de diffusion à 0° permet ainsi d'obtenir uniquement la partie non retardée d'un assemblage puisque la partie multipolaire possède un nœud dans son diagramme de diffusion dans cette direction.

En reprenant l'expression (1-7) du champ radié par un dipôle dans la direction \hat{Z} :

$$\vec{E}_{180^\circ}(\vec{r}, 2\omega) = \left(\frac{2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^2 \left[(\hat{Z} \times \vec{P}(2\omega)) \times \hat{Z} \right] \frac{e^{iK \cdot r}}{r} \quad (6-3)$$

$$\vec{E}_{180^\circ}(\vec{r}, 2\omega) = \left(\frac{2\omega n^{2\omega}}{c} \right)^2 E_\omega E_\omega^* \frac{e^{iK \cdot r}}{r} \begin{pmatrix} P'_X \\ P'_Y \\ P'_Z \end{pmatrix} \quad (6-4)$$

avec :

$$\begin{pmatrix} P'_X \\ P'_Y \\ P'_Z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \beta_{L,XXX} \cos^2 \gamma + 2\beta_{L,XXY} \cos \gamma \sin \gamma + \beta_{L,XXY} \sin^2 \gamma \\ \beta_{L,YYX} \cos^2 \gamma + 2\beta_{L,YYX} \cos \gamma \sin \gamma + \beta_{L,YYX} \sin^2 \gamma \\ 0 \end{pmatrix} \quad (6-5)$$

Les intensités diffusées par un dipôle dans ces deux directions sont les mêmes pour une intensité harmonique polarisée verticalement V. Par ailleurs, l'intensité polarisée horizontalement H diffusée à 90° ne dépend pas de l'angle γ , cf. Chapitre 1. L'intensité H par contre diffusée à 180° est juste une rotation de $\pi/2$ de l'intensité HRS polarisée V.

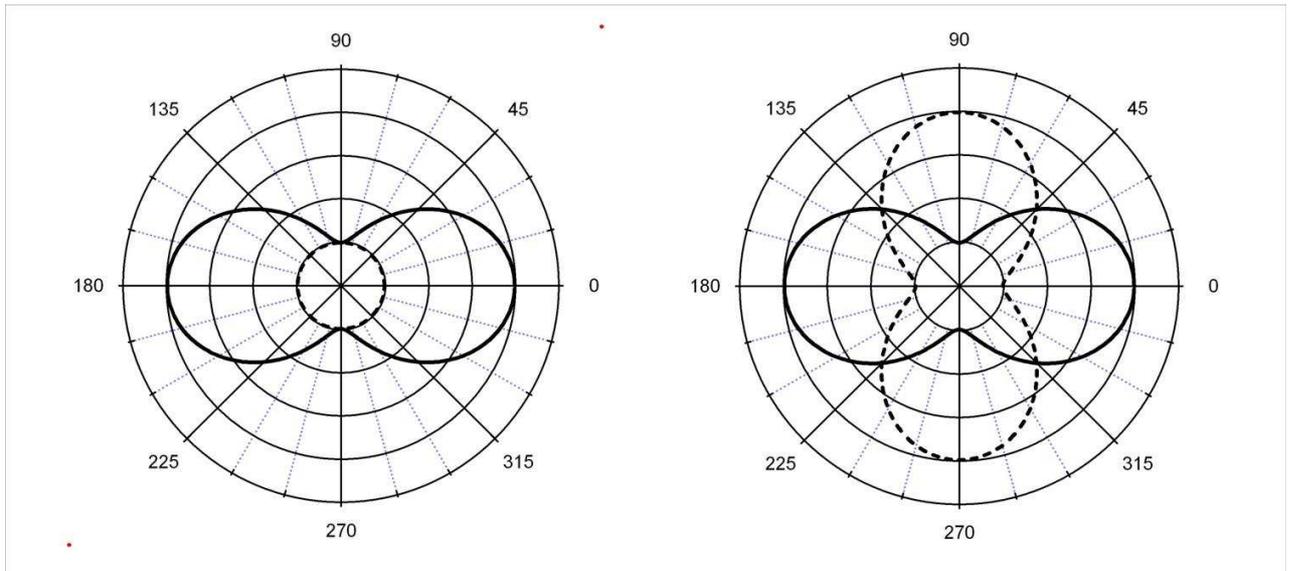


Figure 6-12 : intensités, en fonction de l'angle γ de polarisation de l'onde incidente, détectée selon la polarisation verticale (ligne pleines) et horizontale (lignes en pointillées) – A gauche intensité diffusé à 90° - A droite diffusé à 180° .

L'observation des courbes en H à 90° et à 180° n'apporte pas de supplément d'information sur le processus d'émission. En revanche, l'intensité V à 180° est l'intensité dipolaire provenant uniquement du terme non retardé. Cette intensité est un supplément d'information car en la combinant avec la courbe en V diffusée à 90° , qui est la somme des termes non retardé et retardé, le poids retardé/non retardé est accessible par l'expérience. Pour pouvoir tirer profit de cette distinction dans la différenciation de géométries particulières, un nouveau paramètre η_r est introduit.

$$\eta_r = \frac{a_{90}^V - a_{180}^V + c_{90}^V - c_{180}^V}{b_{90}^V - b_{180}^V} \quad (6-10)$$

Ce paramètre quantifie la répartition entre la partie dipolaire et la partie quadripolaire provenant du terme retardé, alors que η quantifie la répartition entre la partie dipolaire totale, des termes retardé et non retardé, et la partie quadripolaire.

$$\eta = \frac{a_{90}^V + c_{90}^V}{b_{90}^V} \quad (6-11)$$

Un graphe de η_r en fonction de η est tracé ci-dessous pour les assemblages selon la répartition de Thomson, voir Figure 6-13. La distinction entre plusieurs configurations où η est similaire est maintenant rendue possible, sans ambiguïté. Cependant, pour les assemblages possédant plus de la douzaine de molécules à leur surface, la seule mesure de ces deux paramètres n'est plus suffisante et la diffusion non linéaire ne permet pas de résoudre des géométries plus complexes, malgré l'apport d'une nouvelle mesure.

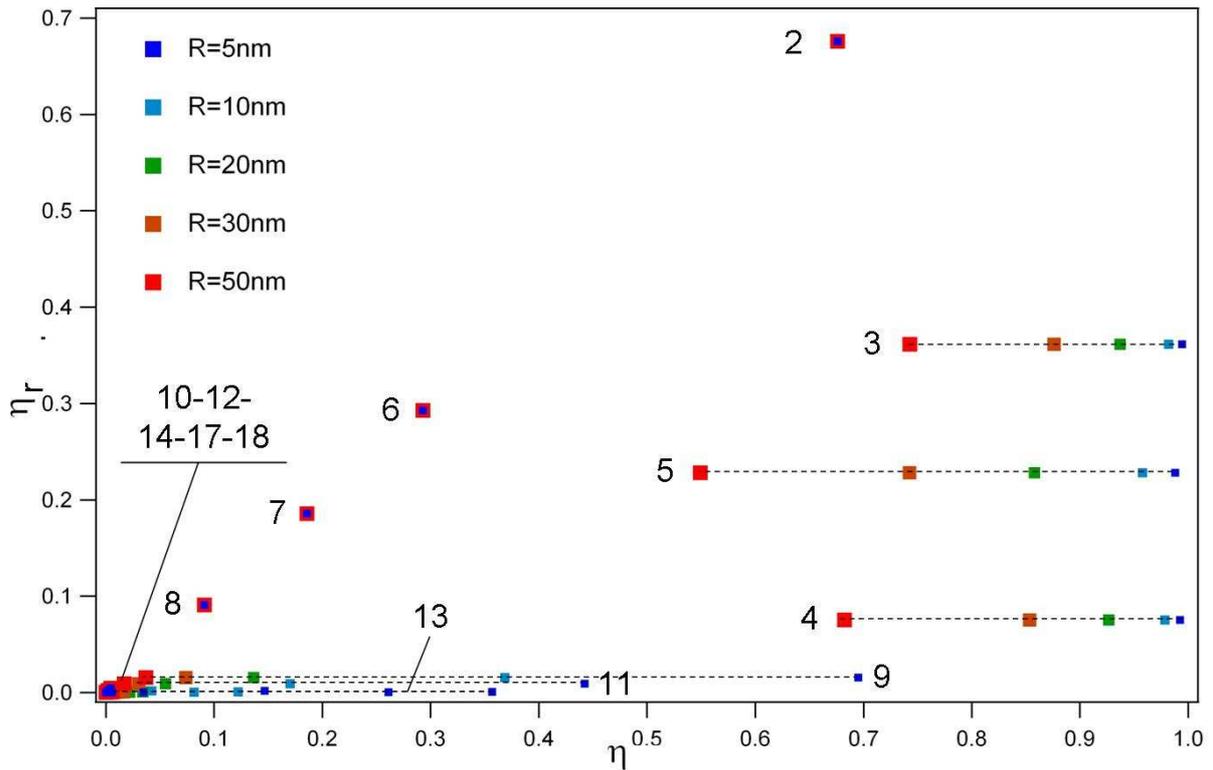


Figure 6-13 : graphe $\eta_r = f(\eta)$ pour une répartition de Thomson de différentes tailles.

6.4.2 Montage expérimental

Pour pouvoir réaliser les mesures en diffusion HRS avec deux directions d'excitation différentes, des modifications ont été apportées au montage décrit dans le Chapitre 1. Le choix a été fait de réaliser les deux mesures à 90° et à 180° , quasi-simultanément pour éviter des manipulations entre les deux mesures pouvant entraîner toute comparaison absolue impossible. Pour cela, juste après la lame demi-onde, voir Figure 6-14, le faisceau fondamental est séparé en deux par une lame séparatrice 50%-50%. Le faisceau transmis par la lame suit la même direction que dans le précédent montage. Le deuxième faisceau, réfléchi par la lame, est envoyé vers un second objectif de microscope qui focalise le faisceau dans la cellule avec une direction colinéaire à la direction de détection. Pour limiter toute pollution des photons harmoniques générés par la lame demi-onde ou le cube polariseur, le filtre bleu est placé en amont de ces deux éléments. Afin de faire la mesure quasi-simultanément, le hacheur optique est placé sur les deux faisceaux et coupe alternativement un faisceau quand l'autre passe. Ainsi sur la voie A du compteur de photon, on obtient le signal diffusé à 90° et sur la voie B la diffusion à 180° . L'inconvénient de cette méthode de quasi-simultanéité est la

diminution de l'intensité à la fréquence fondamentale et de l'abandon de la mesure simultanée du bruit. En passant par la séparatrice, le faisceau voit son intensité divisée par 2, entraînant une division par 4 de l'intensité de diffusion non linéaire. Pour des assemblages dont la section efficace de diffusion non linéaire est faible, il est préférable de faire les mesures séparément afin d'avoir toute la puissance du laser sur un faisceau.

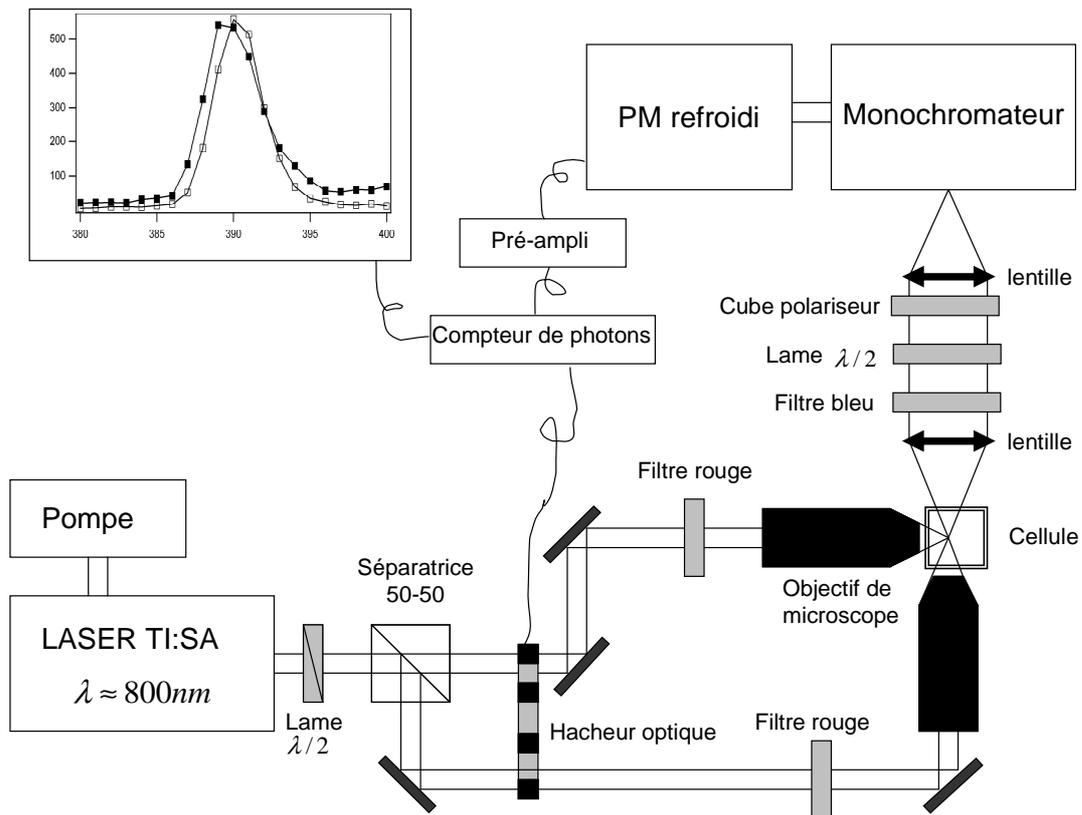


Figure 6-14 : montage expérimental de diffusion à 90° et à 180°

6.4.3 Résultats préliminaires

L'expérience a été effectuée sur deux types d'objets afin de démontrer la faisabilité de l'expérience. Le premier objet est la molécule de Dia. Cette molécule push-pull axiale est très petite devant la longueur d'onde et rayonne de manière dipolaire uniquement puisque les effets retardés sont négligeables. Ce composé permet de calibrer le montage expérimental car il peut y avoir des différences d'intensité absolue entre les deux voies, provenant des

différents éléments optiques traversés. Tout d'abord, l'intensité en fonction de la longueur d'onde est enregistrée, voir Figure 6-15.

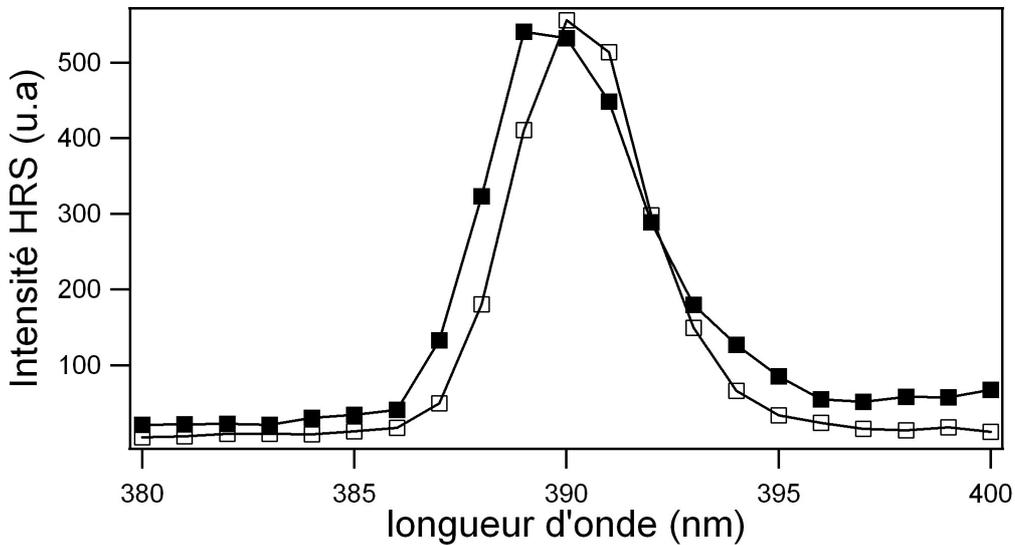


Figure 6-15 : spectre HRS du Dia pour deux directions de diffusion quasi-simultanées – (carrés pleins) 90° - (carrés vides) 180°

L'intensité sur les deux voies est approximativement la même ce qui permet de conclure à la bonne symétrie du montage. Un petit décalage spectral du maximum est dû à la superposition imparfaite des deux points de focalisation dans la cellule issus des deux voies. Comme ces deux points ne sont pas situés exactement au même endroit, les photons harmoniques n'entrent pas avec exactement la même incidence dans le spectromètre et cette différence engendre une différence sur la longueur d'onde harmonique lue. Nous remarquons également que la largeur spectrale de l'intensité diffusée à 180° est plus faible que celle diffusée à 90° . Cette différence n'a pas été approfondie et il est possible que des effets réels apparaissent dans une direction plutôt qu'une autre. Comme il est directement possible de comparer les deux voies de manière absolue, une étude en polarisation sur le Dia a été menée afin de vérifier si les courbes polarisées V, obtenues Figure 6-12, sont bien identiques, voir Figure 6-16. Ensuite, une étude en polarisation sur un objet de taille non négligeable devant la longueur d'onde, des particules d'argent de 80 nm de diamètre, a été menée. Comme cet objet est grand devant la longueur d'onde incidente, sa réponse HRS est composée d'une partie non retardée et d'une partie retardée, voir Figure 6-17.

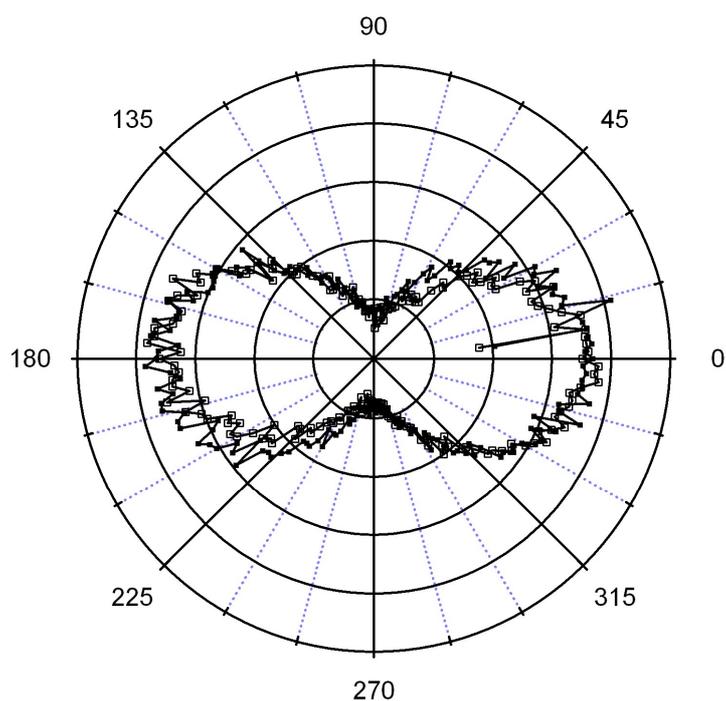


Figure 6-16 : Intensité résolue en polarisation du Dia – (carrés pleins) 90° -(carrés vides) 180° .

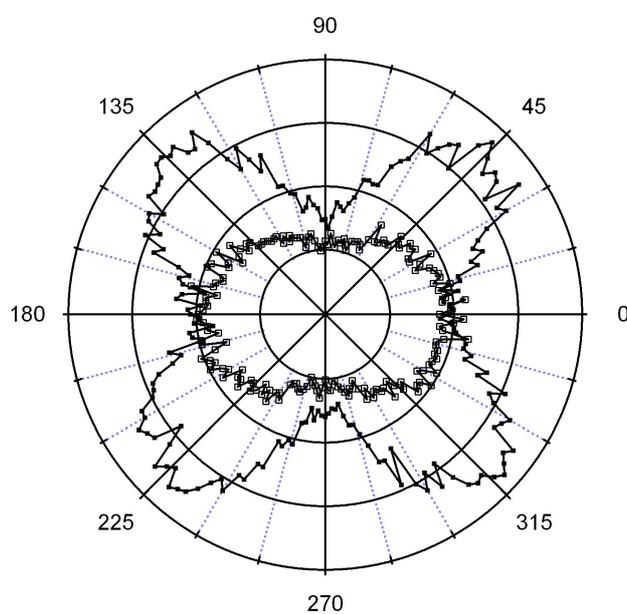


Figure 6-17 : Intensité HRS résolue en polarisation de particules d'argent de 80 nm de diamètre – (carrés pleins) 90° -(carrés vides) 180° .

Les diagrammes résolus en polarisation de la diffusion à 90° et à 180° des nano particules d'argent donnent des résultats très différents : la diffusion à 90° donne un diagramme de rayonnement selon 4 lobes alors que la diffusion à 180° donne un diagramme selon 2 lobes. En effet, les particules d'argent de 80 nm de diamètre peuvent être considérées en première approximation comme sphériques. Comme les micelles, cette géométrie conduit à une réponse quadripolaire selon 4 lobes [19]. Pour calculer les deux paramètres η , les courbes expérimentales ont été ajustées afin d'obtenir les différents coefficients : $a_{90}^V, b_{90}^V, c_{90}^V, a_{180}^V, b_{180}^V, c_{180}^V$. Ensuite, nous avons placé le point expérimental sur le graphique $\eta_r = f(\eta)$ pour des assemblages calculés de rayon 40 nm.

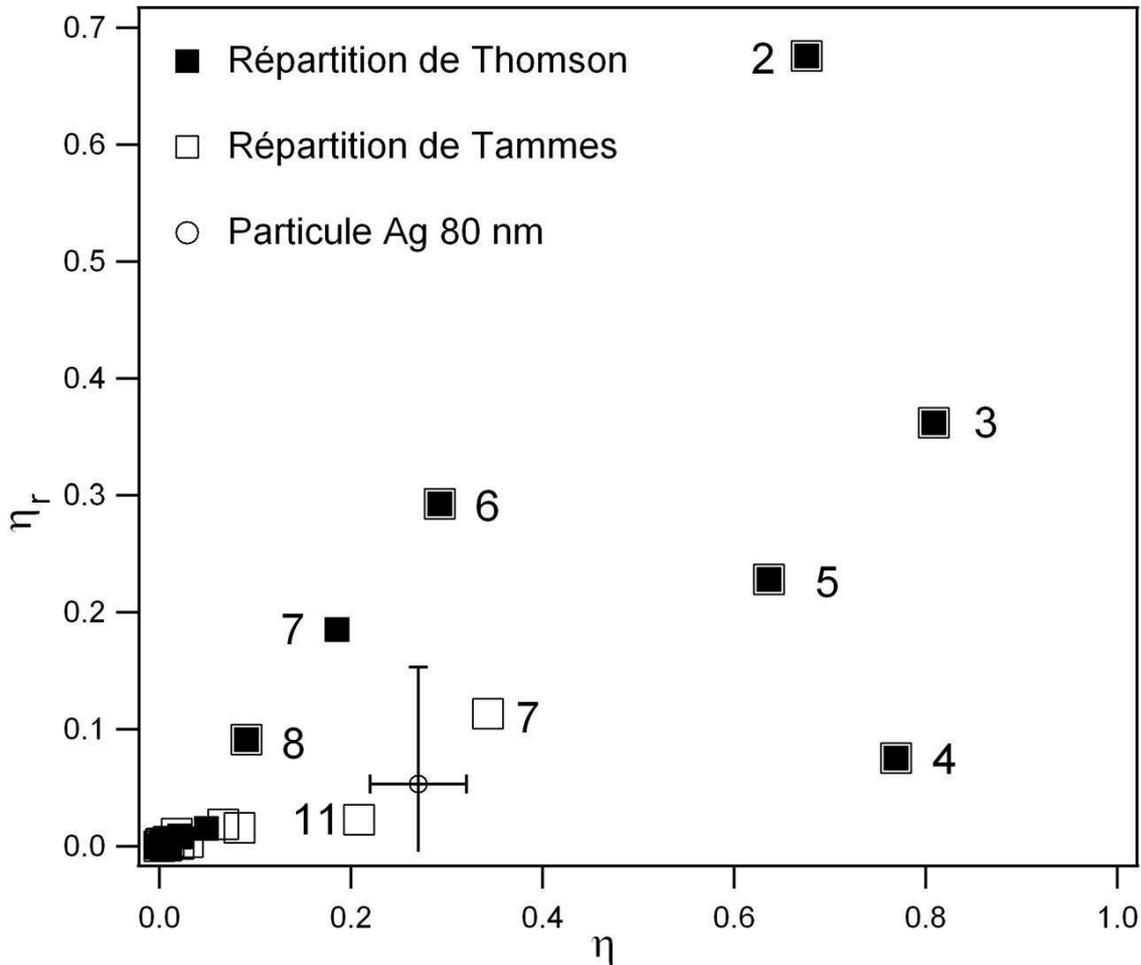


Figure 6-18 : graphe $\eta_r = f(\eta)$ pour une répartition $R=40nm$

Le point expérimental se place en position (0.27, 0.053). Cette position ne correspond pas à une géométrie particulière précisément calculée mais la valeur des deux paramètres

permet de déterminer l'origine de la réponse. Le paramètre η permet en effet de quantifier les effets non retardés et les effets retardés. Dans la partie provenant des effets retardés, η_r indique que la majorité de l'émission provient d'une contribution quadripolaire. Cette quantification permet aussi d'affirmer que l'objet présente une contribution dipolaire importante : cet objet est donc non centrosymétrique. Dans un deuxième temps, nous constatons que l'écart à la forme sphérique parfaite de la forme des nano particules est assez similaire aux objets à une dizaine de facettes. Ces particules ressemblent donc fortement à des sphères cabossées sans qu'une forme régulière particulière n'émerge. Il faut cependant rester extrêmement prudent dans l'interprétation de ces résultats concernant les particules métalliques. Tout d'abord cette analogie avec les assemblages moléculaires repose sur le passage à l'espace dual en assimilant la réponse d'une facette des particules à la réponse du centre de cette face, normale à la surface. La réponse SHG d'une surface métallique est en effet dominée par cette contribution mais ce n'est pas la seule, d'autres contribution dans le plan de la facette interviennent, même si elles sont de moindre importance. Le caractère métallique aussi a été négligé. Ce caractère influe sur le champ électrique incident. En effet, les champs locaux sont très dépendants de la forme des particules, en particulier au plus grosses tailles, alors que les calculs développés ici ne sont plus valables que pour un champ local identique au champ externe appliqué. Enfin, les résonances plasmon de surface des nano particules utilisées rendent les éléments du tenseur d'hyperpolarisabilité complexes et la dissociation des effets non retardés et retardés n'est plus possible. Toutefois, les particules d'argent 80 nm étudiées ici sont de bonnes candidates pour une étude préliminaire d'objet à symétrie sphérique. A cause des arguments précédents, il est difficile d'aller plus loin et de conclure par exemple à une répartition selon Tamme à 11 éléments. Pour une validation plus précise, cette nouvelle technique de caractérisation des objets de taille nanométrique doit être effectuée sur des objets de forme connue.

6.5 Conclusions

Nous avons montré que la diffusion Hyper Rayleigh permet d'obtenir la géométrie spatiale d'objets malgré les orientations aléatoires de ceux-ci. Grâce à la mise en place du système à deux directions d'excitation, il a été possible de quantifier la partie dipolaire et la partie quadripolaire émise. L'obtention des deux paramètres η renseigne sur la nature dipolaire de la réponse et sur la symétrie de l'objet. Avec ces deux informations importantes,

il est possible de les combiner pour obtenir la géométrie de l'objet à condition que sa taille ne soit pas trop petite auquel cas seul la diffusion dipolaire prédomine. Cependant, il existe des limites à l'obtention de l'information. Lorsque les symétries sont trop proches, ou que le nombre de sources élémentaires dans un objet dépasse la dizaine, alors il n'est plus possible de résoudre les symétries dans le détail.

6.6 bibliographie

- [1] S. Ghosh, A. Krishnan, P. K. Das and S. Ramakrishnan, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, (2003) 1602-1606
- [2] S. Brasselet and J. Zyss, *J. Opt. Soc. Am. B*, **15**, (1998) 257-288
- [3] G. Revillod, J. Duboisset, I. Russier-Antoine, E. Benichou, G. Bachelier, C. Jonin and P.-F. Brevet, *J. Phys. Chem. C*, **112**, (2008) 2716-2723
- [4] D. L. D. Caspar and A. Klug, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1962
- [5] H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl and R. E. Smalley, *Nature*, **318**, (1985) 162-163
- [6] L. Brisson, *Le même et l'autre dans la structure ontologique du Timée de Platon: un commentaire systématique du Timée de Platon: un commentaire systématique*, Editions Klincksieck, 1974
- [7] L. Brisson, *Platon, les mots et les mythes*, F. Maspero, 1982
- [8] J. J. Thomson, *Philosophical Magazine Series 6*, **7**, (1904) 237-265
- [9] J. R. Morris, D. M. Deaven and K. M. Ho, *Phys. Rev. B*, **53**, (1996) 1740-1740
- [10] E. L. Altschuler, T. J. Williams, E. R. Ratner, F. Dowla and F. Wooten, *Phys. Rev. Lett.*, **72**, (1994) 2671-2671
- [11] E. L. Altschuler and A. Pérez-Garrido, *Phys. Rev. E*, **71**, (2005) 047703-047703
- [12] J. R. Edmundson, *Foundations of Crystallography*, **49**, (1993) 7673-7673
- [13] N. J. A. Sloane, *IEEE Trans. Information Theory*, (1981) 327
- [14] N. J. A. Sloane, 2009; <http://www.research.att.com/~njas/>
- [15] P. M. L. Tammes, *Recueil des Travaux Botanique Neerlandais*, **27**, (1930) 1-84
- [16] M. Berger, *La Recherche*, **346**, (2001) 38-44
- [17] P. T. Aste and D. Weaire, *The Pursuit of Perfect Packing*, Taylor & Francis, 2008
- [18] J. Duboisset and S. Carrazza, 2009; <http://hrscomputing.sourceforge.net/>

[19] J. Nappa, G. Revillod, I. Russier-Antoine, E. Benichou, C. Jonin and P. F. Brevet, *Phys. Rev. B*, **71**, (2005) 165407-165407

Conclusion

Le cœur de ce travail de thèse est constitué de l'étude de biomolécules en optique non linéaire et du développement de nouvelles techniques optiques pour les sciences du vivant.

Pour la première fois, les hyperpolarisabilités des acides aminés, nécessaires à la compréhension de la construction du signal non linéaire au sein des protéines, ont pu être mesurées. Les hyperpolarisabilités des acides aromatiques ont été mesurées directement en solution et ont montré des valeurs relativement fortes compte tenu de leur composition. L'hyperpolarisabilité des acides aminés non aromatiques a elle aussi pu être déterminée de manière indirecte grâce aux mesures réalisées sur le peptide collagénique.

Durant ce travail, il a également été démontré qu'un modèle de sommation cohérente, prenant en compte les dimensions spatiales des champs, permet de déterminer l'efficacité non linéaire et la symétrie du collagène, molécule structurée en triple hélice. En revanche, la sommation des hyperpolarisabilités des acides aminés aromatiques, au sein d'un peptide, n'est plus valable car l'environnement du tryptophane joue alors un grand rôle dans la réponse non linéaire ce qui fait de cet acide aminé une excellente sonde de son environnement.

L'étude du peptide composé de quatre tryptophanes en interaction avec les interfaces des membranes a nécessité l'utilisation des connaissances préalablement acquises sur le tryptophane et son environnement. De plus, la séquence en tryptophane de ce peptide est une séquence très fréquente dans les protéines membranaires, rendant ainsi cette étude très prometteuse pour des applications futures.

Les problématiques rencontrées ont nécessité le développement de nouveaux outils expérimentaux ouvrant un champ extrêmement large dans le domaine de l'optique non linéaire. Pour la première fois, des cartographies en 3 dimensions en diffusion Hyper Rayleigh de nano particules uniques ont pu être effectuées. Cette nouvelle technique ouvre la voie à l'étude des propriétés non linéaires d'objets uniques même s'il s'agit ici que des premiers pas. La deuxième innovation expérimentale est le montage à deux voies d'excitation qui permet d'enrichir l'observation de la simple diffusion à 90°. Il devient alors possible de

déterminer la symétrie d'un assemblage moléculaire dont la taille est bien inférieure aux longueurs d'onde utilisées.

Ainsi ce travail de thèse a répondu à des questions fondamentales dans le domaine de la génération de second harmonique des biomolécules et a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives dans le recouvrement des symétries sub-longueurs d'onde et dans l'étude de nano objets uniques.