

Transfert de ligand dans la cytochrome c oxydase observé par des expériences femtosecondes infrarouge intégrées et résolues spectralement.

Johanne Treuffet

▶ **To cite this version:**

Johanne Treuffet. Transfert de ligand dans la cytochrome c oxydase observé par des expériences femtosecondes infrarouge intégrées et résolues spectralement.. Autre [q-bio.OT]. Ecole Polytechnique X, 2006. Français. NNT : . pastel-00002200

HAL Id: pastel-00002200
https://pastel.hal.science/pastel-00002200

Submitted on 29 Jul 2010

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

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

ÉCOLE POLYTECHNIQUE

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Inserm
Institut national de la santé et de la recherche médicale

Thèse de doctorat de l'École Polytechnique

présentée par

Johanne TREUFFET

pour obtenir le titre de Docteur de l'École Polytechnique

Transfert de ligand dans la cytochrome *c* oxydase observé par des expériences femtosecondes infrarouge intégrées et résolues spectralement

Soutenue le 20 Décembre 2006 devant le jury composé de :

Claudine CREPIN-GILBERT	Rapporteur
Luca GUIDONI	Rapporteur
Monique MARTIN	Président
Jean TABOURY	Examinateur
Antigoni ALEXANDROU	Directrice de Thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Claudine Crepin-Gilbert, Luca Guidoni, Monique Martin et Jean Taboury d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Je remercie tout particulièrement Claudine Crepin-Gilbert et Luca Guidoni qui ont écrit les rapports de mon manuscrit.

Je remercie Jean-Louis Martin de m'avoir accueillie au Laboratoire d'Optique et Biosciences et offert ainsi un cadre de travail excellent, dynamique et interdisciplinaire.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, Antigoni Alexandrou, dont l'enthousiasme et le dynamisme m'ont permis de donner le meilleur de moi-même. Nous avons ainsi pu ensemble mener à bien un projet pointu et ambitieux.

Je remercie tous les membres du laboratoire, qui ont contribué à créer une ambiance chaleureuse.

Je remercie également tous ceux qui ont apporté leur contribution scientifique à mon travail. Sur le plan expérimental, je tiens à remercier Jennifer Ogilvie pour m'avoir transmis son savoir-faire. Je remercie également Manuel Joffre dont les compétences en mécanique quantique m'ont énormément aidée et grâce à qui j'ai pu travailler sur le dispositif kHz résolu spectralement qu'il a mis en œuvre avec Kevin Kubarych. Je tiens à remercier aussi Marten Vos, Eric Pilet et Ursula Liebl pour les journées passées ensemble à purifier la cytochrome *c* oxydase et pour leurs précieux conseils en biologie. Grand merci à Jean-Christophe Lambry pour la réalisation des simulations de dynamique moléculaire. Merci à Adeline Bonvalet pour les nombreux réglages de l'amplificateur kHz. Merci également à Xavier Solinas et Jean-Marc Sintes dont les compétences respectives en électronique et mécanique ont été indispensables à la mise en œuvre de mes expériences. Merci à Thomas Polack dont les apports théoriques ont été inestimables pour l'exploitation des mes expériences. Merci à François Hache, Michel Négrerie et Guilhem Gallot pour les discussions scientifiques enrichissantes que nous avons eues. Merci à Claude Hamel dont les connaissances techniques en optique m'ont beaucoup

aidée.

Je remercie Chris Meier et Catherine Heitz de l'Université de Toulouse pour la réalisation des calculs de DFT. Merci aussi à Michael Marden de l'Hôpital de Bicêtre pour les échantillons d'hémoglobine qu'il m'a gracieusement fournis.

Je remercie ensuite André Campos pour avoir résolu tous mes problèmes informatiques. Merci également à Laure Lachapelle et Christelle Français pour la gestion des questions administratives.

Je tiens à remercier Antonello De Martino avec qui j'ai découvert le plaisir d'enseigner.

Je termine en remerciant Jean-Baptiste, Claire, Didier, Mathias, Liêm et Alexander qui m'ont supportée au quotidien. Puissent nos chemins se croiser encore...

Table des matières

1 La cytochrome *c* oxydase **9**

1.1 La mitochondrie, siège du métabolisme cellulaire 10

1.1.1 La chaîne respiratoire mitochondriale 11

1.1.2 La phosphorylation oxydative 11

1.2 La cytochrome *c* oxydase, enzyme terminale de la chaîne respiratoire 15

1.2.1 Structure 16

1.2.2 Mécanismes fonctionnels 19

1.3 Etudes dynamiques de la cytochrome *c* oxydase 20

1.3.1 Transfert d'électrons 20

1.3.2 Cycle catalytique et pompage de protons 21

1.3.3 Transfert de ligands 24

2 Spectroscopie femtoseconde infrarouge et modélisation du signal **31**

2.1 L'expérience pompe-sonde 32

2.1.1 Principe 32

2.1.2 Transfert du ligand CO dans la cytochrome *c* oxydase 33

2.2 Modèle de Bloch 35

2.2.1 Résolution de l'équation de Bloch 36

2.2.2 Polarisation induite 38

2.3 Modélisation du signal pompe-sonde 41

2.3.1 Expression générale du signal pompe-sonde 41

2.3.2 Application à l'artefact de mesure à délai pompe-sonde nul 43

2.3.3 Application au signal du CO 48

2.3.4 Application à l'artefact de polarisation perturbée 56

3 Mise en œuvre expérimentale **59**

3.1 La sonde infrarouge et la pompe visible 60

3.1.1 Dispositifs 60

3.1.2 Modélisation du faisceau infrarouge 62

3.2 Caractérisation du faisceau infrarouge 71

3.2.1 Interférométrie par transformée de Fourier 71

3.2.2 Spectral Phase Interferometry for Direct Electric Field Reconstruction transposée à l'infrarouge 78

3.3 Détermination de la résolution temporelle et du délai pompe-sonde zéro 82

3.4 Préparation de la cytochrome *c* oxydase 87

3.4.1 Isolement des mitochondries 87

3.4.2 Purification de la cytochrome *c* oxydase 88

3.4.3 Préparation de l'échantillon 92

3.4.4 Difficultés avec la cytochrome *c* oxydase 92

3.5 Optimisation de l'expérience intégrée spectralement 95

3.5.1 Optimisation de la stabilité et la puissance de la sonde 96

3.5.2 Réglage de la taille du faisceau pompe 97

3.5.3 Amélioration de la résolution temporelle de l'expérience pompe-sonde . 98

3.5.4 Mesures d'anisotropie 100

3.5.5 Montage à deux échantillons 100

3.6 Mise en place de l'expérience résolue spectralement 105

3.6.1 Modifications au niveau de la sonde infrarouge 105

3.6.2 Mise en place de la pompe visible 107

3.6.3 Acquisition des signaux pompe sonde 107

4 Résultats expérimentaux et simulations **109**

4.1 Expériences intégrées spectralement 110

4.1.1 Effet Kerr 111

4.1.2 Absorption par les transitions de l'hème 117

4.1.3 Correction du signal pompe-sonde de la cytochrome *c* oxydase 121

4.1.4 Mesures d'anisotropie 127

4.2 Expériences résolues spectralement 131

4.2.1 Origines de bruit du signal différentiel 131
4.2.2 Transfert du CO dans la cytochrome *c* oxydase 135
4.2.3 Oscillations de cohérence dans l'hémoglobine 140
4.3 Simulations de dynamique moléculaire 143
4.3.1 Construction de la protéine 143
4.3.2 Modélisation du transfert de ligand 146
4.3.3 Résultats des simulations 148
4.4 Discussion 151

A Champ complexe et phase spectrale d'une impulsion 157
A.1 Notation complexe 157
A.2 Valeurs moyennes 158
A.3 Phase spectrale 159
A.4 Impulsion gaussienne 160

B Optique non linéaire 163
B.1 Effets non linéaires du second ordre 163
B.1.1 Doublage de fréquences 163
B.1.2 Différence de fréquence et amplification paramétrique 164
B.2 Effets non linéaires du troisième ordre 166
B.2.1 Effet Kerr optique 166
B.2.2 Effet Kerr croisé 167

Introduction

La cellule est un système extrêmement complexe dont le bon fonctionnement repose sur la régulation des nombreux processus biologiques vitaux qui s'y déroulent. Cette régulation est en grande partie assurée par les protéines. Une grande classe de protéines appelées hémoprotéines utilise une molécule prosthétique, l'hème, pour interagir avec des ligands diatomiques et remplir des fonctions essentielles et très diverses : le stockage, le transport et la détection de ligands, ou encore la catalyse enzymatique...

Les hémoprotéines ont été étudiées depuis plusieurs décennies avec une grande variété de techniques afin de comprendre les mécanismes complexes au sein de leurs sites actifs. La connaissance des structures statiques obtenues par rayons X ou diffraction de neutrons fut un grand pas en avant. Ces structures, qui permettent d'observer les atomes même de la protéine, suggèrent l'importance des mouvements internes de la protéine dans l'accomplissement de sa fonction. En effet, une protéine comme la myoglobine, qui sert au stockage de l'oxygène moléculaire, serait dans l'impossibilité de faire entrer un ligand dans son site actif si elle restait rigide dans la configuration obtenue par cristallographie aux rayons X.

Dès lors, l'étude dynamique des hémoprotéines est considérée comme indispensable à la compréhension du fonctionnement de leur site actif. L'idéal serait d'aboutir à un modèle moléculaire décrivant tous les changements structuraux de la protéine lors de l'arrivée du ligand dans le site, ou lors de son départ hors du site. Dans ce but, les études expérimentales et théoriques de transfert de ligands, centrées sur différentes hémoprotéines, se sont multipliées.

Grâce aux propriétés optiques de l'hème, les méthodes de spectroscopie d'absorption se sont avérées adaptées à l'observation des modifications structurales internes des protéines, induites par la photodissociation du ligand. La dissociation simultanée d'un ensemble d'hémoprotéines ligandées peut effectivement être déclenchée par une impulsion lumineuse de

longueur d'onde et d'énergie adéquates. Les changements structuraux engendrés sont alors suivis par enregistrement des caractéristiques d'absorption associées à des délais variables après la photodissociation. La spectroscopie dans le visible, par exemple, permet d'accéder aux modifications des transitions électroniques de l'hème qui reflètent le départ ou l'arrivée du ligand. La spectroscopie infrarouge, sur laquelle porte ce travail de thèse, permet d'analyser les caractéristiques vibrationnelles des molécules de ligand, leur transfert peut ainsi être directement suivi.

Les informations que les expériences de spectroscopie peuvent apporter sont donc riches et diverses, elles portent sur les cinétiques de dissociation ou de recombinaison du ligand, la structure électronique et conformationnelle de l'hémoprotéine photodissociée, le rôle de la structure protéique au niveau du site actif, la discrimination des différents ligands. De nombreux résultats ont été obtenus, tout d'abord dans le visible. Les expériences dans l'infrarouge ont été développées ensuite, mais les résultats obtenus ont longtemps été limités par la difficulté à observer des phénomènes aussi brefs. En effet, les mouvements les plus rapides, correspondant aux mouvements des atomes, se produisent à des échelles subpicosecondes ce qui nécessite des expériences de résolution femtoseconde.

C'est dans ce contexte scientifique que nous avons abordé l'étude du transfert de ligands par spectroscopie femtoseconde infrarouge dans la cytochrome *c* oxydase.

Cette hémoprotéine de la chaîne respiratoire catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau, tout en produisant à travers la membrane dans laquelle elle est insérée un transfert de protons servant à la production d'énergie dans la cellule. La réaction de réduction du ligand O_2 se produit au sein d'un site bimétallique (Fe, Cu). Notre but est d'étudier le processus de transfert de ligand à l'intérieur de ce site, du Fer, atome central de l'hème où se fixe le ligand, au Cuivre auquel on attribue en particulier un rôle de contrôle de l'entrée et sortie du ligand du site. Le ligand physiologique O_2 étant réduit dès sa fixation sur le Fer, il ne peut être étudié directement et on s'intéresse alors au transfert du ligand CO. Une meilleure connaissance de la dynamique de ce ligand CO pourra contribuer à comprendre les mécanismes d'arrivée, de sortie et de discrimination de ligands.

La cytochrome *c* oxydase est un candidat intéressant pour l'étude du transfert de ligands par spectroscopie femtoseconde infrarouge pour les raisons suivantes. Tout d'abord, deux atomes différents de fixation du ligand ont été identifiés au sein du site actif de la cytochrome

c oxydase : le Fer de l'hème et l'atome de Cuivre. La fréquence de vibration du ligand CO dépendant de l'atome auquel il est lié, le départ du CO du Fer de l'hème et son arrivée sur le Cuivre sont détectables par mesures d'absorption dans l'infrarouge. La dynamique de transfert du CO du Fer vers le Cuivre peut ainsi être suivie. D'autre part, un dispositif femtoseconde doit pouvoir résoudre ce transfert du CO, contrairement aux expériences précédentes dont la résolution picoseconde était insuffisante [1][2]. Des expériences de spectroscopie dans le visible ont déjà pu détecter au niveau des transitions électroniques de l'hème des changements rapides induits par la photodissociation du CO, à des échelles de quelques centaines de femtosecondes [3]. Si ces modifications sont effectivement liées au transfert du CO, on s'attend à mesurer en spectroscopie femtoseconde infrarouge des variations vibrationnelles sur les mêmes échelles de temps.

Dans ce travail de thèse, nous avons mis en œuvre deux expériences pompe-sonde de spectroscopie femtoseconde infrarouge pour étudier le transfert du ligand CO au sein du site actif de la cytochrome *c* oxydase : une expérience intégrée spectralement et une expérience résolue spectralement. Ces deux approches complémentaires ont pu être comparées entre elles. Pour compléter cette étude de transfert de ligand, nous avons également réalisé des calculs de dynamique moléculaire qui simulent le transfert du CO du Fer de l'hème à l'atome de Cuivre du site actif de la cytochrome *c* oxydase. Ces simulations donnent des informations sur les mouvements individuels de chaque atome et apportent ainsi des précisions supplémentaires qui permettent de mieux comprendre les résultats des mesures.

Dans le chapitre 1, nous décrivons la chaîne respiratoire dont la cytochrome *c* oxydase fait partie, la structure de la cytochrome *c* oxydase et les mécanismes fonctionnels liés à son rôle au sein de la chaîne respiratoire. Un état de l'art est ensuite dressé sur les études de dynamique intramoléculaire, en particulier les études de transfert ultra rapide de ligands qui font l'objet de cette thèse.

Dans le chapitre 2, le principe des expériences pompe-sonde sur les hémoprotéines ligandées avec CO est exposé et un modèle théorique basé sur les équations de Bloch est introduit afin de modéliser les différents signaux obtenus lors de ces expériences pompe-sonde. Le modèle est appliqué à l'étude d'artefacts de mesure et au calcul du signal pompe-sonde du CO.

Le chapitre 3 décrit les deux dispositifs pompe-sonde mis en œuvre pour nos études de transfert de ligand. Les mesures des caractéristiques importantes de ces montages sont expo-

sées, ainsi que les optimisations et améliorations réalisées. D'autre part, les différentes étapes de la préparation de la cytochrome *c* oxydase sont présentées, de sa purification à partir du cœur de bœuf, à son installation au niveau des dispositifs pompe-sonde.

Dans le chapitre 4, les résultats des expériences pompe-sonde intégrées et résolues spectralement sont présentés et exploités à l'aide du modèle basé sur les équations de Bloch introduit au chapitre 2. Les simulations de dynamique moléculaire réalisées pour modéliser le transfert du ligand CO dans la cytochrome *c* oxydase sont abordées ensuite. Les différents résultats obtenus dans ce travail de thèse sont alors confrontés entre eux et avec les travaux de spectroscopie infrarouge et visible existants présentés au chapitre 1.

Chapitre 1

La cytochrome *c* oxydase

La cytochrome *c* oxydase appartient à la super famille des oxydases respiratoires, enzymes membranaires ubiquitaires qui catalysent la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. La cytochrome *c* oxydase est une protéine membranaire, localisée dans la membrane interne des mitochondries chez les eucaryotes et dans la membrane cytoplasmique chez les procaryotes. Dans ce chapitre, nous nous concentrons plus particulièrement sur la description de la cytochrome *c* oxydase mitochondriale.

Nous présentons tout d'abord de façon générale les mécanismes de phosphorylation oxydative par lesquels les complexes de la chaîne respiratoire assurent la production d'énergie de la cellule. Nous décrivons ensuite tout particulièrement la structure de la cytochrome *c* oxydase ainsi que les mécanismes fonctionnels liés à son rôle au sein de la chaîne respiratoire. Un état de l'art est enfin dressé sur les études de dynamique intramoléculaire qui ont permis de relier la structure de la cytochrome *c* oxydase à son fonctionnement. Les études de transfert ultra rapide de ligands qui font l'objet de cette thèse sont plus particulièrement détaillées.

1.1 La mitochondrie, siège du métabolisme cellulaire

Tout organisme vivant fonctionne selon un métabolisme, c'est-à-dire un ensemble de réactions chimiques, par lequel il extrait de l'énergie de son environnement pour synthétiser ses propres constituants.

Chez les organismes eucaryotes, l'énergie est extraite par des mécanismes oxydatifs à partir de composés carbonés tels les sucres, les lipides et les protides. Ces macromolécules sont tout d'abord dégradées en éléments plus simples, les mono- et disaccharides dans le cas des sucres, les acides gras et le glycérol dans le cas des lipides et les acides aminés dans le cas des protides. Ces éléments simples sont ensuite dégradés par la glycolyse et le cycle de Krebs, ce qui entraîne la formation de dinucléotides réduits, le nicotinamide adénosine dinucléotide (NADH) et le flavine adénosine dinucléotide ($FADH_2$). Ces dinucléotides réduits délivrent des électrons dont le transfert à travers la chaîne respiratoire jusqu'à l'oxygène moléculaire est couplé à un pompage transmembranaire de protons. Le gradient de protons ainsi produit est utilisé pour la synthèse de molécules d'adénosine triphosphate (ATP). Ce sont ces molécules d'ATP hautement énergétiques qui, lors de l'hydrolyse de l'une de leurs liaisons phosphoanhydrides, fournissent l'énergie nécessaire aux réactions chimiques dans les cellules .

La phosphorylation oxydative constitue l'ensemble des processus orchestrés par la chaîne respiratoire, qui induit la synthèse de l'ATP à partir de l'oxygène moléculaire et des électrons issus des dinucléotides réduits NADH et $FADH_2$. Cette étape primordiale dans la production d'énergie de la cellule s'effectue au sein d'organelles appelées mitochondries, plus précisément au niveau de la membrane interne mitochondriale. Nous présentons donc plus en détail la mitochondrie et la phosphorylation oxydative.

1.1.1 La chaîne respiratoire mitochondriale

La mitochondrie est un organelle ovoïde comportant deux membranes, une membrane externe et une membrane interne (cf figure 1.1). Les protéines de la chaîne respiratoire, impliquées dans la phosphorylation oxydative, sont localisées au niveau de la membrane interne. Cette membrane est imperméable aux ions et aux molécules, les transferts transmembranaires sont contrôlés par des protéines de transport. On verra que les protéines de la chaîne respiratoire maintiennent ainsi le gradient de protons nécessaire à la synthèse de l'ATP. La membrane interne présente de nombreuses invaginations qui lui permettent d'adapter sa surface d'échange à l'activité respiratoire de la mitochondrie.

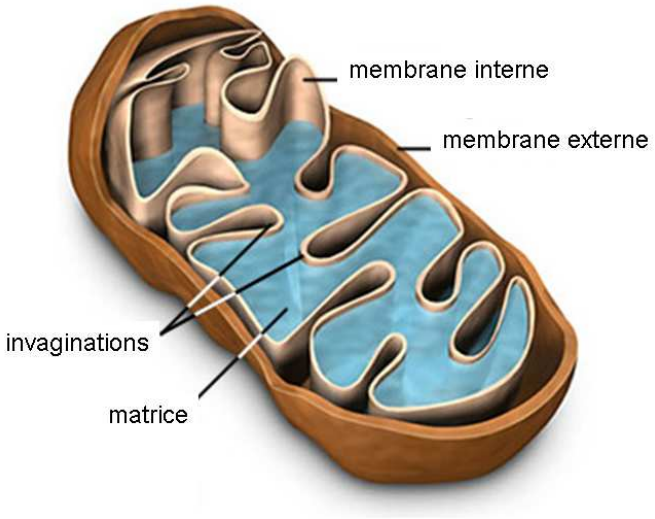


FIG. 1.1 – Schéma de mitochondrie

1.1.2 La phosphorylation oxydative

La chaîne respiratoire est formée de cinq complexes protéiques principaux (cf figure 1.2).

* la NADH déshydrogénase (Complexe I)
* la Succinate déshydrogénase (Complexe II)
* le complexe bc_1 (Complexe III)
* la cytochrome c oxydase (Complexe IV)
* l'ATP synthase (Complexe V)

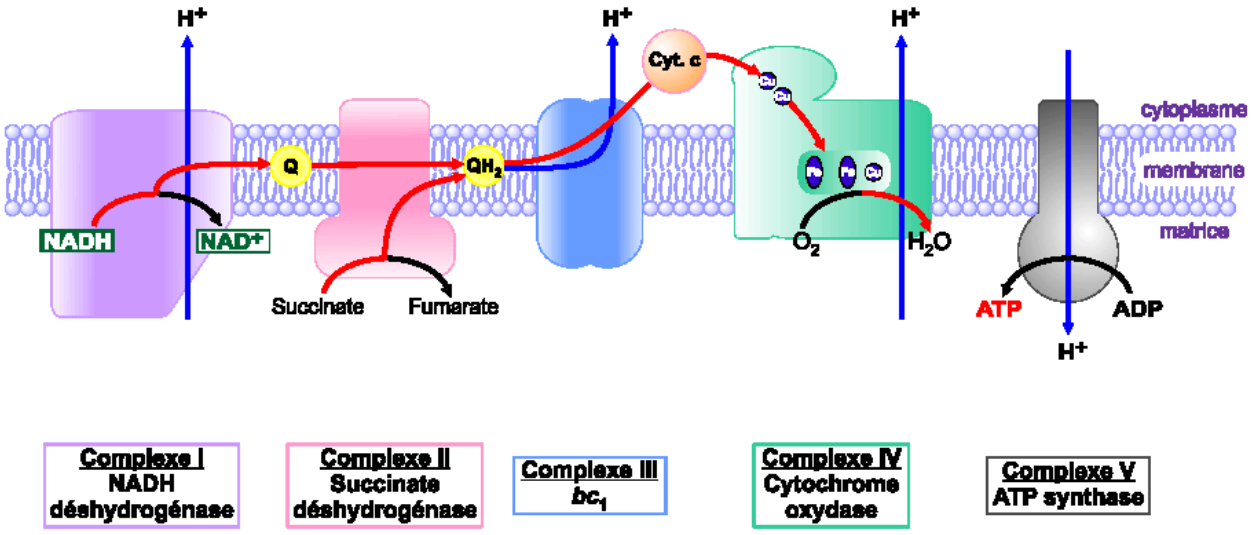


FIG. 1.2 – Chaîne respiratoire mitochondriale (d'après Saraste [4]). Le transfert d'électrons à travers les quatre premiers complexes est indiqué par les flèches rouges et le pompage de protons par les flèches bleues.

La phosphorylation oxydative est déclenchée au sein de cette chaîne protéique par la présence du dioxygène respiré et des électrons fournis par les dinucléotides réduits NADH et $FADH_2$. Les électrons transitent à travers la chaîne respiratoire, des complexes I et II jusqu'au complexe IV où ils sont consommés par réduction du dioxygène en eau. C'est pourquoi par ailleurs le complexe IV, la cytochrome c oxydase, est qualifié d'accepteur terminal d'électrons.

Le transfert d'électrons consiste en une cascade de réactions d'oxydoréduction catalysées par les différents complexes protéiques. Ces réactions d'oxydoréduction fournissent de l'énergie libre qui est utilisée, dans le cas des complexes I, III et IV, pour le transfert de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

L'encadré contant les "aventures de l'électron dans la chaîne respiratoire" explique que ces complexes I, III et IV sont à la fois des catalyseurs enzymatiques et de véritables pompes à protons, qui assurent le maintien d'un gradient de protons à travers la membrane. L'énergie contenue dans ce gradient de protons permet la synthèse d'ATP au niveau du complexe V, l'ATP synthase.

Les aventures de l'électron dans la chaîne respiratoire

Complexe I

La NADH-Déshydrogénase catalyse la réduction de l'ubiquinone (Q) par le nicotinamide adénosine dinucléotide NADH. L'énergie libérée par cette réaction, qui entraîne une chute de potentiel du NADH à l'ubiquinone, permet le pompage de 4 protons à travers la membrane. H^+_{mat} désigne les protons de la matrice et H^+_{inter} les protons de l'espace intermembranaire.

$$NADH + Q + 5H^+_{mat} \rightarrow NAD^+ + QH_2 + 4H^+_{inter}$$

L'ubiquinone, molécule soluble dans la membrane, assure le transfert diffusif de l'électron au complexe suivant, à savoir le complexe III.

Complexe II

La réduction de l'ubiquinone est également catalysée par ce complexe qui est la fusion de deux enzymes, une succinate déshydrogénase et une $FADH_2$ déshydrogénase. La succinate déshydrogénase intervient dans le cycle de Krebs pour former le $FADH_2$ lors de l'oxydation du succinate en fumarate. Le $FADH_2$ fournit alors à la $FADH_2$ déshydrogénase les électrons nécessaires à la réduction de l'ubiquinone.

$$\begin{aligned} Succinate + FAD &\rightarrow Fumarate + FADH_2 \\ FADH_2 + Q &\rightarrow FAD + QH_2 \end{aligned}$$

Complexe III

Cet oligomère, appelé complexe bc_1 en raison des cytochromes b et c qui le constituent, est la deuxième des trois pompes à protons de la chaîne respiratoire. Il transfert les électrons de l'ubiquinol UQH_2 au cytochrome c (Cc) soluble et utilise l'énergie libérée par cette réaction pour pomper des protons.

$$QH_2 + 2Cc^{ox} + 2H^+_{mat} \rightarrow Q + 2Cc^{red} + 4H^+_{inter}$$

Les cytochromes sont des protéines comportant un hème dont l'atome de Fer peut passer alternativement d'un état réduit ferreux Fe^{2+} à un état oxydé ferrique Fe^{3+}. La solubilité du cytochrome c permet à ce dernier de transporter un électron du complexe bc_1 à la cytochrome c oxydase en passant par l'espace intermembranaire.

Complexe IV

La cytochrome c oxydase, accepteur terminal d'électrons, catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau à partir des électrons fournis par le cytochrome c. Comme dans les complexes I et III, l'énergie libérée par la réaction induit un pompage transmembranaire de protons.

$$4Cc^{red} + O_2 + 8H^+_{mat} \rightarrow 4Cc^{ox} + 2H_2O + 4H^+_{inter}$$

Quatre vingt dix pourcents de la consommation d'oxygène de la cellule sont dus à cette réaction !

L'ATP synthase est un complexe protéique formé de deux parties F_0 et F_1 (cf figure 1.3). F_0 forme un pore de transport transmembranaire de protons, et F_1 est une véritable nanomachine, constituée d'un stator fixe et d'un rotor mobile ! Le gradient de protons maintenu par les complexes protéiques induit un transfert de protons par le pore F_0, de l'espace intermembranaire à la matrice de la mitochondrie. Ce flux de protons provoque la rotation du rotor de F_1, l'énergie mécanique ainsi produite est convertie en énergie chimique, par phosphorylation d'une molécule d'ADP en ATP.

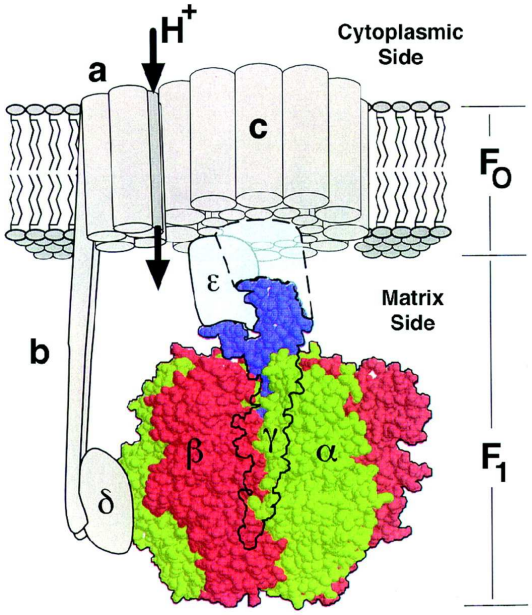


FIG. 1.3 – Structure de l'ATP synthase par H. Wang et G. Oster [5]. Le canal à protons est situé à l'interface des sous unités a et c, le rotor est constitué des sous-unités $c\gamma\epsilon$. Enfin, les sites catalytiques de production d'ATP sont à l'interface des sous-unités α et β.

1.2 La cytochrome c oxydase, enzyme terminale de la chaîne respiratoire

Au sein de la chaîne respiratoire, la cytochrome c oxydase catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau à partir des électrons du cytochrome c, et utilise l'énergie libérée par cette réaction pour réaliser le pompage transmembranaire de protons. La réduction de l'oxygène a lieu au niveau d'un site bimétallique hème-cuivre qui caractérise cette famille d'oxydases.

Les mécanismes qui régissent l'ensemble de ces réactions ont été en partie élucidés. La structure tridimensionnelle de la cytochrome c oxydase a été obtenue dans les années 90 et a permis aux nombreuses études de mutagénèse, de spectroscopie et de simulation, d'expliquer au niveau structural le fonctionnement de la protéine.

Dans un premier temps, la structure globale de la protéine obtenue par diffraction aux rayons X est décrite, le rôle des différents cofacteurs dans la catalyse enzymatique est ensuite abordé. Nous expliquons ainsi comment les électrons sont acheminés du cytochrome c au site bimétallique de réduction de l'oxygène et quels intermédiaires interviennent dans cette réaction. La manière dont le pompage de protons est couplé à l'énergie libre d'oxydo-réduction reste cependant à élucider.

1.2.1 Structure

Parmi les oxydases terminales à hème-Cuivre, une des mieux caractérisées est la cytochrome *c* oxydase aa_3 de *Paracoccus denitrificans*. Cette enzyme bactérienne comportant quatre sous unités a été tout d'abord isolée sous forme d'un sous-complexe fonctionnel de deux sous unités en 1980 [6], puis dans son ensemble de quatre sous unités en 1988 [7]. L'enzyme a ensuite été cristallisée et sa structure 3D à l'état oxydé est déterminée par diffraction aux rayons X dès 1995 à une résolution de 2,8 Å [8]. Le site actif est décrit avec plus de précision en 1997, à l'aide de nouvelles déterminations de structure avec une résolution de 2,4 Å [9].

La structure 3D de la cytochrome *c* oxydase aa_3 mitochondriale, purifiée à partir du cœur de bœuf, est obtenue peu après, tout d'abord à une résolution de 2,8 Å [10] [11], puis à une résolution de 2,3 Å dans différents états d'oxydoréduction et de ligandation [12].

Par la suite, d'autres oxydases à hème-Cuivre ont révélé leurs structures, à savoir la cytochrome *c* oxydase ba_3 de *Thermus thermophilus* en 2000 [13], et la cytochrome *c* oxydase aa_3 de *Rhodobacter sphaeroides* en 2002 [14]. Nous nous intéressons ici uniquement à l'enzyme mitochondriale, que nous étudions en spectroscopie infrarouge, et à l'enzyme de *P. denitrificans*, que nous utilisons dans les modélisations de dynamique moléculaire. En effet, cette protéine bactérienne, très bien caractérisée, est un modèle simplifié pour l'étude du fonctionnement catalytique de la protéine mitochondriale, comme nous l'expliquons par la suite.

La protéine bactérienne de *P. denitrificans* présente quatre sous-unités. La fonction catalytique enzymatique est assurée par les sous-unités I et II qui forment à elles seules un complexe fonctionnel. L'absence des sous-unités III et IV n'altère pas cette fonction catalytique, la sous-unité III, qui lie les lipides, semble plutôt impliquée dans l'assemblage de l'enzyme. Quant à la sous-unité IV, simple hélice en contact avec les sous-unités I et III, son rôle reste indéterminé.

La protéine du cœur de bœuf, beaucoup plus imposante que la protéine bactérienne, est un dimère de plus de 400 kDa dont chaque monomère présente treize sous-unités. Ces sous-unités ne sont pas synthétisées à partir du même matériel génétique, les trois premières sous-unités I, II et III sont codées par le génome mitochondrial, alors que les dix autres, IV à XIII, sont codées par le noyau de la cellule.

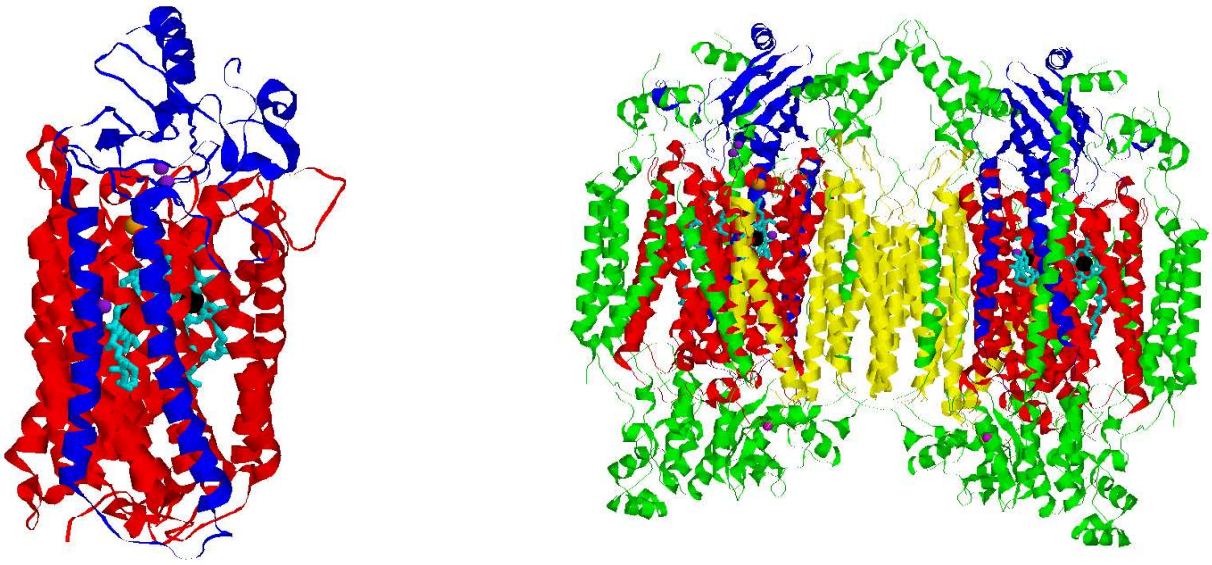


FIG. 1.4 – A gauche, structure de la cytochrome c oxydase aa_3 de *P. denitrificans* (fichier pdb : 1AR1 [9]). La sous-unité I est représentée en rouge, la sous-unité II en bleu, les hèmes a et a_3 en cyan avec les atomes centraux de Fer en noir, les atomes de Cuivre sont en violet et l'atome de Magnésium en orange. A droite, structure de la cytochrome c oxydase mitochondriale du cœur de bœuf à l'état oxydé (fichier pdb : 1OCC [11]). Les sous-unités I et II et leurs cofacteurs sont représentés dans les mêmes couleurs que leurs homologues bactériens, la sous-unité III est indiquée en jaune, les sous-unités IV à XIII en vert et l'atome de Zn en magenta.

Les trois sous-unités mitochondriales présentent une forte homologie avec les sous-unités I, II et III de *P. denitrificans*. Elles comportent des chaînes similaires, et surtout les mêmes cofacteurs, responsables du fonctionnement catalytique de l'enzyme (voir figure 1.4). Pour cette raison, la protéine bactérienne, limitée à ses sous-unités fonctionnelles parfaitement caractérisées, peut servir de modèle simplifié pour l'étude de ce cœur fonctionnel de l'enzyme mitochondriale. Nous avons ainsi utilisé le modèle bactérien (fichier pbB 1AR1 [9]) pour nos simulations de dynamique moléculaire (chapitre IV) portant sur le transfert du CO au sein du site catalytique localisé dans la sous-unité I. L'encadré ci après détaille la structure du "cœur fonctionnel de la cytochrome c oxydase", ainsi que les fonctions associées.

Les dix sous-unités codées par le noyau entourent le cœur fonctionnel de la cytochrome c oxydase mitochondriale. On attribue à ces sous-unités un rôle de régulation de l'activité enzymatique qui n'est pas observé chez la bactérie. Ces sous-unités comportent au moins une dizaine de sites de fixation de l'ATP qui induisent une modification du fonctionnement de l'enzyme selon le rapport ATP/ADP [15].

Le cœur fonctionnel de la cytochrome *c* oxydase

La description des trois sous-unités communes aux enzymes aa_3 de *P. denitrificans* et du cœur de bœuf s'est construite progressivement, les données structurales ont été couplées à des études de mutagénèse et de dynamique moléculaire afin de relier la structure de la protéine à son fonctionnement. L'apport des études dynamiques est abordé plus en détail à la partie 1.3.

Structure globale

La sous-unité I est constituée d'une douzaine d'hélices hydrophobes ancrées dans la membrane. Cette structure forme d'une part des canaux hydrophiles qui permettent le passage de protons, elle fixe d'autre part trois centres redox : l'hème *a* hexacoordonné lié à deux histidines, l'hème a_3 pentacoordonné lié à une histidine et l'atome de Cuivre (Cu_B) lié par trois histidines. Les hèmes *a* et a_3 sont des porphyrines de même composition chimique mais de noms différents afin de les distinguer [16]. Ils forment un angle de 108° et leurs atomes centraux de Fer sont distants de 13,2 Å. L'hème a_3 et le Cu_B constituent un centre bimétallique, la distance entre le Fer de l'hème a_3 et le Cu_B est de 5,2 Å. Chez la protéine mitochondriale, un changement de conformation a été observé entre l'état réduit et l'état oxydé, ainsi la distance du Fe_{a_3} au Cu_B n'est plus que de 4,9 Å à l'état oxydé. L'une des trois histidines fixées au Cu_B forme une liaison covalente inhabituelle avec une tyrosine (Y244 chez la protéine mitochondriale), cette liaison est retrouvée dans plusieurs oxydases à hème-cuivre.

La sous-unité II comporte deux hélices transmembranaires et un domaine carboxyterminal hydrophile à l'extérieur de la membrane. Ce domaine contient le centre Cuivre A (Cu_A) constitué de deux atomes de Cuivre distants de 2,6 Å. Le Fer de l'hème *a* est à 19,5 Å de l'atome de Cuivre A le plus proche.

La sous-unité III constituée de sept hélices membranaires ne présente pas de cofacteurs.

Mécanismes fonctionnels

Le site catalytique de réduction de l'oxygène est le site bimétallique constitué de l'hème a_3 et du Cu_B. L'hème a_3 pentacoordonné peut effectivement former une sixième liaison avec différents ligands, à savoir O_2, CO ou NO. Lors de la fixation du ligand O_2 sur le Fe_{a_3}, sa réduction est catalysée. Le Cu_B participe à la réaction, ainsi que la tyrosine Y244 qui présente un fort potentiel donneur d'électrons et de protons, grâce à la liaison particulière qu'elle forme avec l'histidine.

On attribue également au Cu_B un rôle de contrôle des entrées et sorties de ligands hors du site. Le ligand CO par exemple forme une liaison faible avec Cu_B avant de se fixer à Fe_{a_3}, la distance qui le sépare du Cu_B est alors de 2,5 Å.

La réduction de l'oxygène nécessite la présence de quatre électrons qui sont acheminés du cytochrome c au site bimétallique de la manière suivante. Tout d'abord, le cytochrome c se fixe par des liaisons électrostatiques et hydrophobes sur un site de la cytochrome *c* oxydase localisé au niveau de la sous-unité II essentiellement (quelques résidus de la sous-unité I interviennent également). L'entrée des électrons à l'intérieur de la cytochrome *c* oxydase se produit alors au niveau d'un résidu Tryptophane situé à 5 Å du Cu_A. Le Cu_A reçoit ainsi les électrons du cytochrome c et les transmet alors à l'hème *a*, qui assure à son tour le transfert vers le site (Fe_{a_3}, Cu_B).

La réaction de réduction de l'oxygène fait intervenir des protons ; quatre protons réagissent avec l'oxygène pour former le produit H_2O, quatre autres protons sont pompés à travers la membrane grâce à l'énergie libérée par la réaction. Ces protons peuvent se déplacer à l'intérieur de la structure protéique en empruntant des canaux hydrophiles au niveau de la sous-unité I : le canal D dont la porte d'entrée est un résidu aspartate assure ainsi le pompage des protons à travers la membrane et le canal K dont la porte d'entrée est un résidu lysine assure l'acheminement des protons réactifs vers le site catalytique.

1.2.2 Mécanismes fonctionnels

La figure 1.5 résume le rôle des différents cofacteurs des sous-unités I et II de la cytochrome c oxydase dans les mécanismes fonctionnels qui régissent la réduction de l'oxygène moléculaire, couplée au transfert d'électrons et au pompage de protons. Plus de détails sont donnés dans l'encadré décrivant le "cœur fonctionnel de la cytochrome c oxydase".

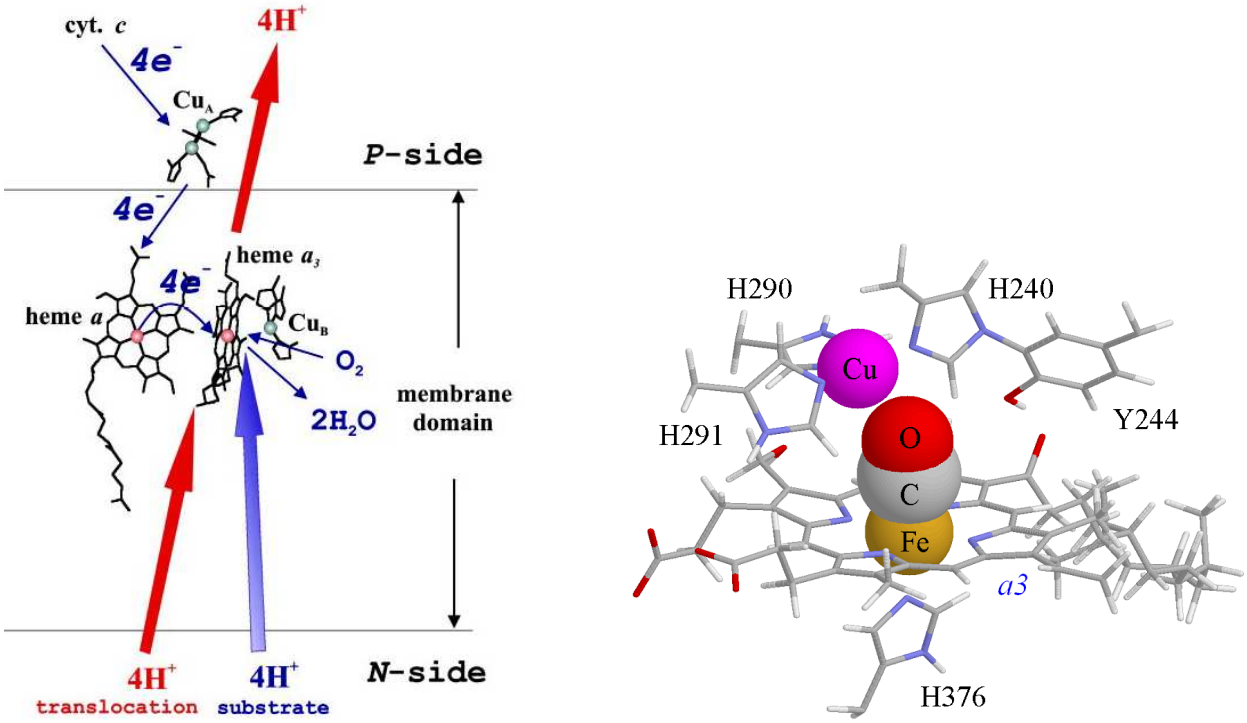


FIG. 1.5 – A gauche sont représentés les centres oxydoréducteurs de la cytochrome c oxydase et leur rôle dans la réduction de l'oxygène [17]. L'acheminement des réactifs (électrons, protons et dioxygène) vers le site bimétallique (hème a_3, Cu_B) de réduction de l'oxygène est indiqué par les flèches bleues, et les flèches rouges représentent le pompage transmembranaire de protons couplé à cette réaction. Ce pompage de protons charge le côté "$P-$side" de la membrane positivement et le côté "$N-$side" négativement. A droite est représenté le site bimétallique (hème a_3, Cu_B) de la cytochrome c oxydase avec le ligand CO fixé sur l'atome de Fer. L'histidine proximale H376 est liée au Fer de l'hème, les trois histidines H240, H290 et H291 sont liées à l'atome de Cuivre et la tyrosine Y244 forme une liaison covalente avec l'histidine H240.

1.3 Etudes dynamiques de la cytochrome c oxydase

Afin d'avancer vers la compréhension de l'ensemble des mécanismes fonctionnels décrits précédemment, des études dynamiques de la cytochrome c oxydase ont été indispensables. Les méthodes de spectroscopie en particulier, permettent de suivre les modifications structurales internes qui surviennent lorsque la protéine accomplit ses fonctions catalytiques. Ces processus dynamiques peuvent être déclenchés simultanément par photolyse sur un ensemble de protéines, généralement en solution, les changements structuraux engendrés sont alors suivis par enregistrement des caractéristiques spectrales associées.

Dans un premier temps, nous détaillons les expériences de spectroscopies décisives dans la caractérisation du cycle catalytique et des transferts d'électrons et de protons. Nous abordons ensuite le contexte dans lequel s'inscrit cette thèse, à savoir l'étude de la dynamique de transfert de ligands dans le site actif bimétallique, processus ultra rapide qui aide à comprendre le rôle "mécanique" du site catalytique.

1.3.1 Transfert d'électrons

Le transfert d'électrons à travers les différents sites d'oxydo-réduction, du cytochrome c au site catalytique bimétallique, a été abordé par deux types de méthodes complémentaires [18].

La première approche consiste à étudier le déplacement des électrons dans le sens physiologique, du cytochrome c au centre bimétallique. Ce transfert est initié soit par mélange rapide (stopped flow), soit en induisant la production d'électrons par radiolyse de l'eau ou à partir d'un réducteur photoactivable. Le passage des électrons du cytochrome c au Cu_A et du Cu_A à l'hème a est alors observé.

La seconde approche consiste à suivre le transfert des électrons dans le sens inverse, du site bimétallique au Cu_A, afin d'étudier le passage des électrons de l'hème a_3 à l'hème a. Ce transfert est initié par photodissociation du CO associé à la protéine de valence mixte. L'état à valence mixte correspond à un état d'oxydo-réduction particulier où seul le site bimétallique de fixation du ligand est réduit, la photodissociation du CO engendre ainsi un flux d'électrons de l'hème a_3 réduit à l'hème a oxydé [19].

Quelle que soit la méthode utilisée, le transfert des électrons peut être suivi par spectroscopie ; des mesures d'absorption dans les domaines UV, visible et proche IR permettent effectivement d'identifier les états d'oxydation des différents centres d'oxydo-réduction : hème a, hème a_3 et Cu_A. Ces expériences ont apporté une contribution importante à la détermination du trajet des électrons du cytochrome c au site bimétallique, et ont permis de mesurer les vitesses de transfert entre les différents sites d'oxydo-réduction de la cytochrome c oxydase (voir figure 1.6).

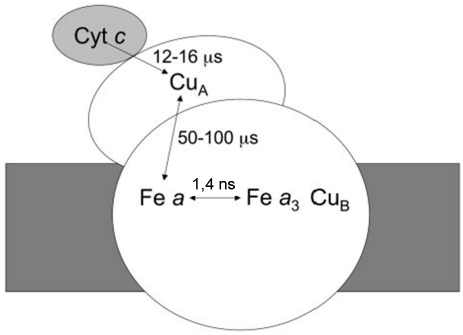


FIG. 1.6 – Transfert d'électrons du cytochrome c au site actif de la cytochrome c oxydase [19].

1.3.2 Cycle catalytique et pompage de protons

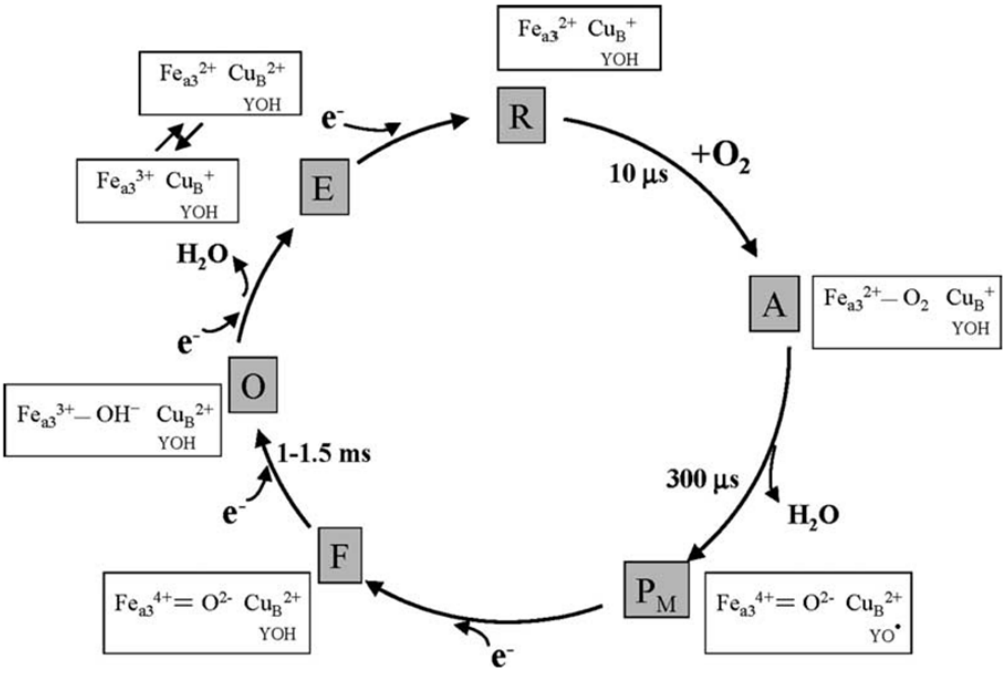
La méthode la plus utilisée jusqu'alors pour étudier la réaction très rapide de réduction de l'oxygène moléculaire en eau, catalysée par la cytochrome c oxydase, est le flow flash mis au point par Gibson [20]. Cette méthode consiste à photodissocier la protéine ligandée avec CO en présence d'oxygène pour induire la réaction. En effet, la photodissociation du CO libère le site catalytique de l'enzyme et permet ainsi à l'oxygène de s'y fixer pour être réduit. Les différents intermédiaires de réaction sont alors suivis et identifiés par différentes techniques. La spectroscopie d'absorption [17] permet de distinguer et de mesurer les passages d'un intermédiaire à l'autre, la spectroscopie Raman [21] [22] est utilisée ensuite afin d'identifier avec plus de précision ces intermédiaires. Le cycle catalytique de réduction du dioxygène au sein de la cytochrome c oxydase est ainsi obtenu, décomposé en deux étapes principales d'oxydation et de réduction du site catalytique (voir encadré "Le cycle catalytique de réduction de l'oxygène").

Le cycle catalytique de réduction de l'oxygène

Le cycle catalytique est décomposé en deux étapes :

Lorsque le dioxygène arrive au niveau du site bimétallique réduit, il se fixe sur le Fer pour former le composé A. Quatre électrons sont alors nécessaires à la réaction de réduction du dioxygène : deux proviennent de l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{4+}, un de l'oxydation du Cu^{+} en Cu^{2+}, et le dernier de la tyrosine 244. L'intervention de cette tyrosine dans la réduction est moins évidente : la tyrosine passerait d'une forme OH à une forme $O^{\bullet}$ en libérant un proton et un électron. O_2 est ainsi réduit en une seule étape ($A \rightarrow P_M$), ce qui évite par ailleurs la formation d'intermédiaires radicalaires toxiques [23].

A l'issue de cette première étape, quatre électrons, fournis par le cytochrome c, doivent être acheminés jusqu'au site bimétallique oxydé pour le réduire de nouveau (étapes F, O, E, R). Le pompage de protons serait couplé au cycle catalytique lors de cette phase de réduction du site.



Cycle de réduction du dioxygène, d'après [24]. Les états intermédiaires indiqués par les lettres sont les suivants : A, ligandé avec O_2 ; P, peroxy ; F, ferryl ; O, oxydé ; E, partiellement réduit : R, réduit.

Le cycle catalytique de réduction de l'oxygène est couplé à un pompage de protons par la cytochrome *c* oxydase. Afin de définir quelles étapes du cycle déclenchent ce pompage de protons, le dispositif peut être adapté pour mesurer le flux de protons qui traverse l'enzyme. Ces mesures ont été réalisées sur des échantillons de cytochrome *c* oxydase orientée et incrustée dans des protéoliposomes, par mesure de changement de pH au niveau de cette "membrane reconstituée" [25] [26]. Le mécanisme de couplage du pompage de protons à la réaction d'oxydo-réduction reste indéterminé.

La méthode de "flow-flash" utilisée pour étudier le cycle catalytique suppose que le CO photodissocié n'interfère pas avec la fixation et la réduction de l'oxygène. Les études de transfert de ligands au sein du site bimétallique, abordées dans la partie 1.3.3, suggèrent cependant que le passage du CO par le Cuivre B avant de quitter le site peut perturber la cinétique de fixation de l'oxygène. Une nouvelle méthode permettant d'induire la réaction sans présence de CO a donc été mise au point [27]. Elle consiste à déclencher la réduction de l'oxygène par photodissociation d'un complexe de Cobalt, qui produit directement O_2 in situ. Les premiers résultats sont en accord avec les expériences de "flow-flash" mais encore trop incomplets pour exlure l'interférence possible avec le CO.

1.3.3 Transfert de ligands

Le site bimétallique de la cytochrome c oxydase, qui catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau, a la capacité de fixer différents ligands compétitifs du ligand physiologique O_2 au niveau de son hème a_3 : le monoxyde de carbone CO, le monoxyde d'azote NO, ainsi que le cyanure CN. Le transfert de ligands jusqu'au site actif est une étape essentielle à l'initiation de la réduction de l'oxygène, l'étude du rôle structural du site actif dans ces mécanismes de transfert contribue donc à comprendre comment la protéine assure sa fonction catalytique.

Dans ce contexte, le ligand le plus étudié est le monoxyde de carbone car son transfert est plus facile à observer que celui du ligand physiologique O_2. Tout d'abord, le ligand CO forme un complexe stable avec l'enzyme, contrairement au ligand physiologique O_2 qui est réduit dès son arrivée sur le Fer de l'hème. L'existence du complexe stable de la protéine ligandée avec le CO permet d'induire la dissociation du CO par photolyse, et de suivre ensuite son transfert au sein du site actif, sa sortie de la protéine et sa recombinaison sur l'hème. Ce processus de photodissociation du CO a permis par ailleurs d'induire dans certaines conditions d'autres phénomènes. Le transfert des électrons et la réduction de l'oxygène ont ainsi pu être étudiés.

Le ligand CO est également bien choisi pour suivre la réaction de transfert de ligands par spectroscopie infrarouge. Sa force d'oscillateur est assez importante pour que son absorption dans l'infrarouge soit détectable, et sa fréquence de vibration est sensible à son état de ligation, ce qui permet de détecter les différents sites avec lesquels il interagit au cours de son déplacement dans le site actif. La formation, juste après photodissociation, d'une liaison entre le ligand CO et le Cuivre du site bimétallique a ainsi été mise en évidence par les premières expériences de spectroscopie infrarouge [28]. En plus de sa fonction réductrice, le Cuivre joue donc un rôle dans le transfert du CO, auquel il se lie lors de son entrée dans le site actif et de sa sortie hors du site.

Dès lors, deux questions attendent encore une réponse claire. Le contrôle des entrées et sorties du ligand CO par le Cuivre est-il un mécanisme général applicable aux autres ligands ? Le passage de CO par le Cuivre peut-il interférer avec la fixation et la réduction de l'oxygène lors de l'expérience de flow flash, abordée au 1.3.2, qui utilise la photodissociation du CO pour initier la réaction ? Dans un premier temps, nous détaillons les études portant sur le

transfert du ligand CO au sein du site bimétallique (Fe, Cu) de la cytochrome *c* oxydase, par spectroscopie dans les domaines infrarouge, ultra-violet et visible. Quelques résultats concernant les ligands O_2 et NO sont décrits ensuite.

Spectroscopie infrarouge

Les premières expériences, de spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier [28], ont été effectuées à basse température, en dessous de 180 K, car la recombinaison du CO sur l'hème s'effectuait trop rapidement pour être observée à température ambiante par cette méthode. Le spectre d'absorption de l'échantillon de protéines ligandées avec CO en solution est observé alternativement avec et sans illumination. Cette illumination, dans le domaine spectral visible, induit la photodissociation du CO (voir partie 2.1.2) et provoque ainsi la disparition de la bande d'absorption du CO lié au Fer, de fréquence 1963 cm^{-1}, et l'apparition d'une nouvelle bande à 2062 cm^{-1}, associée à la formation d'une liaison covalente du CO sur le Cuivre (voir figure 1.7). Le transfert du CO du Fer au Cuivre est ainsi mis en évidence.

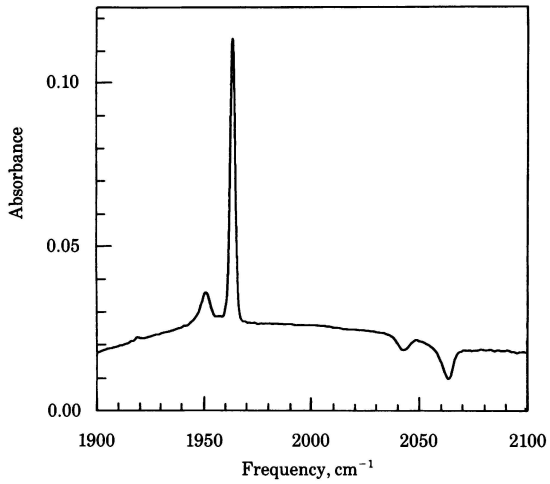


FIG. 1.7 – Spectre différentiel d'absorption (absorbance sans illunination moins absorbance avec illumination) [28]. Les deux bandes à 1952 cm^{-1} et 2043 cm^{-1} sont attribuées à des conformations minoritaires de la protéine.

Par la suite, des dispositifs de spectroscopie infrarouge résolue en temps ont été élaborés afin de mesurer les dynamiques de transfert de ligands à température ambiante. De nouveaux spectres différentiels d'absorption avec et sans photodissociation ont ainsi été enregistrés, à température ambiante [29]. Les fréquences de vibration du CO sur le Fer et sur le Cuivre sont

les mêmes qu'à basse température, à savoir 1963 et 2062 cm^{-1}, les largeurs respectives des raies d'absorption correspondantes sont de 4 et 8 cm^{-1} à température ambiante et l'absorption du CO lié au Cuivre est plus faible d'un facteur 7. Ces trois caractéristiques spectrales suggèrent que l'interaction du CO avec le Cuivre est plus faible qu'avec le Fer de l'hème.

La dynamique de détachement du CO du Cuivre après photodissociation et de recombinaison du CO sur le Fer a ensuite été étudiée (voir figure 1.8). Les variations d'absorption de l'échantillon de cytochrome *c* oxydase à la fréquence du CO sur le Cuivre (2062 cm^{-1}) ont été enregistrées afin d'observer le détachement du CO du Cuivre, qui se produit sur une échelle de 1,5 μs [29]. Le suivi de l'absorption de l'échantillon à la fréquence du CO sur le Fer (1963 cm^{-1}) a permis de mesurer le retour de l'enzyme à son état initial ligandé avec CO, qui survient au bout d'une dizaine de millisecondes lorsque la pression du CO dans l'échantillon est d'une atmosphère [32].

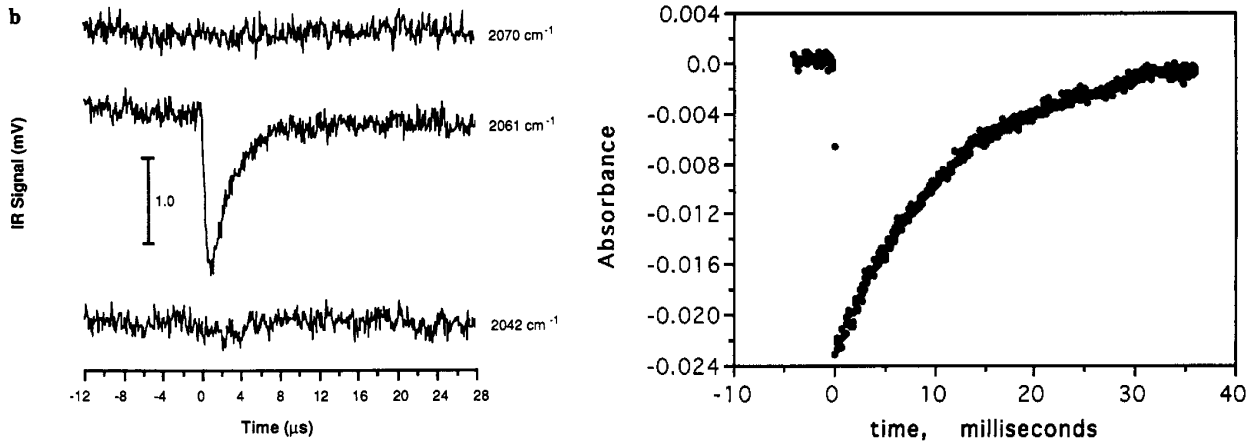


FIG. 1.8 – A gauche, la sonde transmise par l'échantillon après photodissociation, à la fréquence de vibration du CO sur le Cuivre, montre la dynamique de dissociation du CO du Cuivre [29]. A droite, la sonde absorbée à la fréquence de vibration du CO sur le Fer met en évidence la dynamique de recombinaison du CO sur le Fer [32].

La dynamique de transfert du CO du Fer vers le Cuivre a également été abordée [1], mais ce transfert est tellement rapide qu'il n'a pas pu être suivi par un dispositif de résolution picoseconde (voir figure 1.9) . L'objectif de cette thèse est d'étudier ce processus ultra rapide de transfert de ligand à l'aide d'un dispositif de spectroscopie femtoseconde infrarouge dont la résolution est suffisante pour observer des phénomènes de quelques centaines de femtoseconde.

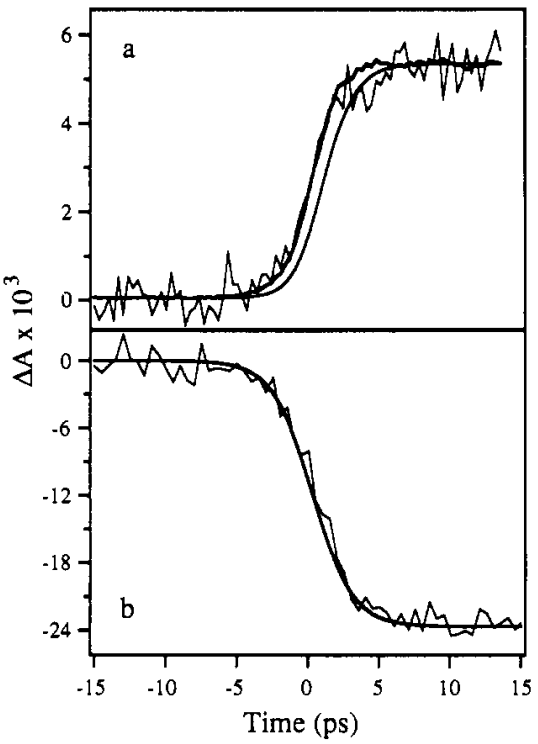


FIG. 1.9 – Absorption différentielle d'un échantillon de cytochrome c oxydase suite à la photodissociation du CO, d'après [1]. (b) Absorption d'une sonde centrée à 1963 cm^{-1} afin de suivre le départ du CO du Fer. La courbe lisse est la fonction de réponse de l'instrument. (a) Absorption d'une sonde centrée à 2062 cm^{-1} afin de suivre l'arrivée du CO sur le Cuivre. La courbe lisse de gauche est la fonction de réponse de l'instrument et la courbe lisse de droite est la convolution de cette fonction avec une exponentielle de 1 ps. Ce temps caractéristique est la résolution temporelle de l'expérience.

La direction du CO par rapport à la normale à l'hème a pu être évaluée, avant et après photodissociation, à l'aide de mesures de dichroïsme linéaire [2]. L'axe du CO lié au Fer de l'hème fait ainsi un angle de 20° avec la normale à l'hème, il passe à un angle de 55° quand il se fixe au Cuivre.

Deux conclusions principales peuvent être tirées de ces résultats quantitatifs. Le transfert ultra rapide du CO du Fer vers le Cuivre se produit en moins d'une picoseconde. Ce temps semble trop court pour que le CO dissocié se trouve à l'état "libre" et diffuse aléatoirement vers le Cuivre. Le mouvement dans la poche de l'hème doit être restreint et déterminé, la structure protéique impose entre autre l'orientation du CO sur ses deux sites de fixation, elle

doit faciliter le transfert vers le Cuivre par un mécanisme concerté qui permette la formation de la liaison Cu-CO quasi-simultanément avec la rupture de la liaison Fe-CO.

Une fois fixé sur le Cuivre, le CO se dissocie au bout de 1,5 μs, alors que la recombinaison sur le Fer ne survient qu'après un temps caractéristique de 10 ms. Le CO ne se recombine donc pas de manière géminée sur le Fer. Après son passage sur le Cuivre, il a une très grande probabilité d'être éjecté à l'extérieur de la protéine, et ce n'est qu'au bout d'une dizaine de millisecondes qu'une nouvelle molécule de CO parvient à se fixer de nouveau sur le Fer de l'hème.

Spectroscopie dans le domaine UV-Visible

Les expériences de spectroscopie dans les domaines UV-visible ont apporté une grande contribution à l'étude des phénomènes subpicosecondes. Ces méthodes ne détectent pas directement le ligand CO, mais permettent d'accéder aux modifications des transitions électroniques au niveau de l'hème. Elles sont donc adaptées à l'étude des processus de transfert de ligands dont certaines étapes influent sur l'état électronique de l'hème.

La photodissociation du CO dans la cytochrome c oxydase induit des modifications du spectre d'absorption UV-visible sur différentes échelles de temps. La dissociation du CO qui survient en moins de 100 femtosecondes [30] est clairement identifiée, ainsi que sa recombinaison sur le Fer avec une constante de temps de 11 millisecondes, pour une pression de CO d'une atmosphère [31]. Par la suite, un délai qui pourrait correspondre à un transfert du CO du Fer vers le Cuivre en 300 fs [3] a aussi été mesurée.

Afin de confirmer le rôle du Cu_B^+ dans le mécanisme de transfert du CO au sein du site actif de la cytochrome c oxydase, la recombinaison du CO sur l'hème a_3 est suivie à différentes pression en CO [32], et les constantes de réaction de recombinaison correspondantes sont calculées.

La variation hyperbolique de la constante de réaction selon la pression en CO, illustée par la figure 1.10, suggère une cinétique de transfert bimoléculaire impliquant le rôle du Cuivre. Lors de sa recombinaison sur le Fer de l'hème, un quasi-équilibre s'installe entre le CO en solution et le CO lié au Cuivre, selon le schéma suivant avec $K_1 = 87\,M^{-1}$ et $k_2 = 1030\,s^{-1}$:

$$Fe^{2+}, Cu^{+} + CO \overset{K_1}{\rightleftharpoons} Fe^{2+}, Cu^{+} - CO \overset{k_2}{\rightarrow} Fe^{2+} - CO, Cu^{+} \tag{1.1}$$

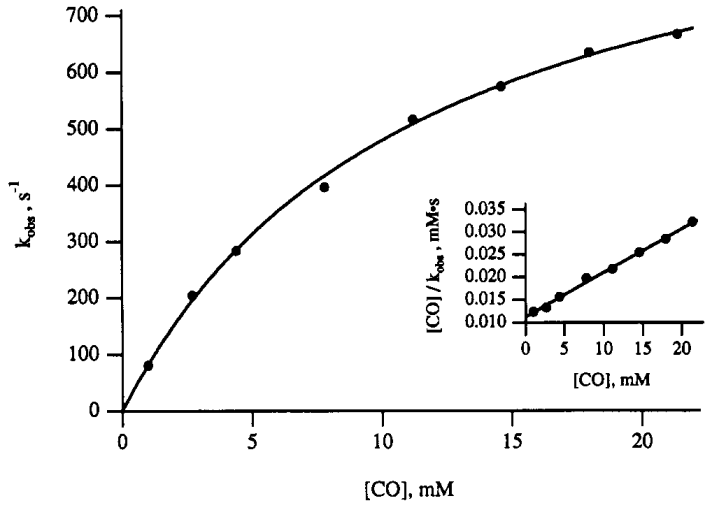


FIG. 1.10 – Constante de réaction de recombinaison de CO sur le Fer de l'hème, mesurée à différentes concentrations en CO [32].

La constante de recombinaison k_{obs} observée varie alors bien de manière hyperbolique avec la pression en CO. A haute pression, la vitesse de transfert est limitée à la valeur de k_2 :

$$k_{obs}(P_{CO}) = k_2 \frac{[CO]}{[CO] + 1/K_1} \tag{1.2}$$

Comparaison avec d'autres ligands (NO et O_2)

Il a été proposé que le ligand NO ait un rôle physiologique d'inhibiteur compétitif réversible de la cytochrome c oxydase [33], car il se lie à l'hème et se dissocie très rapidement, empêchant ou permettant ainsi la catalyse. Il peut de plus interagir avec le site actif oxydé, contrairement aux ligands CO et O_2 qui ne se fixent qu'au site complètement réduit.

Les trois ligands CO, NO et O_2 ne sont pas équivalents au niveau de leurs fonctions au sein du site actif bimétallique de la cytochrome c oxydase, leurs dynamiques de transfert peuvent par conséquent présenter des différences. Il convient donc de se demander si le contrôle de l'entrée et sortie du ligand CO par le Cuivre est un mécanisme général de l'enzyme, applicable aux autres ligands. Les expériences menées jusqu'alors n'apportent pas de réponse claire.

Le rôle éventuel du Cuivre dans la cinétique de transfert du ligand NO peut être mis en évidence par les mêmes expériences que celles effectuées sur le CO [32]. La recombinaison du NO sur le Fer de l'hème après photodissociation a ainsi été étudiée à différentes pressions de

NO par spectroscopie dans le visible [34]. La dépendance de la constante de recombinaison mesurée est linéaire en fonction de la pression en NO, alors qu'une variation hyperbolique serait attendue pour une cinétique bimoléculaire faisant intervenir l'interaction du ligand avec le Cuivre. Cependant, ce résultat n'exclut pas un rôle éventuel du Cuivre dans le mécanisme de transfert de ce ligand. La recombinaison n'a probablement pas été étudiée à une pression en NO assez élevée pour atteindre le palier de l'hyperbole.

Le ligand physiologique O_2, qui réagit dès sa fixation sur le Fer de l'hème, ne peut pas être étudié de la même manière que les ligands NO et CO, dont le transfert est initié par photodissociation du complexe stable qu'ils forment avec l'enzyme. Deux méthodes exposées au 1.3.2 permettent cependant d'initier la fixation du dioxygène sur le Fer de l'hème, et d'envisager ainsi l'étude de cette réaction de ligation à différentes pressions en O_2. Les limites intrinsèques des expériences réalisées ne permettent malheureusement pas d'observer l'éventuel caractère bimoléculaire de la cinétique de cette réaction. D'une part, la méthode de "flow-flash" qui induit la fixation de l'oxygène sur le Fer par photodissociation du CO [35] mesure des temps de formation de l'intermédiaire Fe-O_2 similaires à la durée de vie du complexe Cu-CO. Il n'est donc pas exclu que la fixation du CO sur le Cuivre interfère avec le O_2, limitant ainsi la formation du composé Fe-O_2. D'autre part, la technique récente [27] de production d'oxygène in situ permettant d'induire la réaction de ligation de O_2 sans présence de CO, ne génère pas des pressions en O_2 assez élevées pour étudier la dépendance de la cinétique en concentration de ligands O_2.

Chapitre 2

Spectroscopie femtoseconde infrarouge et modélisation du signal

Le transfert de ligands (CO, NO) dans les hémoprotéines est étudié par des méthodes de spectroscopie dans le domaine infrarouge, dont le but est d'enregistrer l'interaction entre les transitions vibrationnelles du CO et un champ excitateur infrarouge. L'évolution des états vibrationnels du CO permet alors de suivre la dynamique de transfert du CO au sein du site actif de l'hémoprotéine. Les expériences dites "pompe-sonde", mises en œuvre dans ce travail de thèse, utilisent ainsi un faisceau infrarouge appelé "sonde" qui suit le transfert du CO induit par une impulsion dans le visible appelée "pompe".

Ces expériences pompe-sonde peuvent présenter des artefacts de mesure qui se superposent au signal étudié et rendent l'interprétation des résultats plus compliquée. De même que le signal étudié, ces artefacts correspondent à des réponses du troisième ordre du milieu faisant intervenir une fois le champ sonde et deux fois le champ pompe.

Dans cette partie, le principe des expériences pompe-sonde sur les hémoprotéines ligandées avec CO est exposé, et un modèle théorique basé sur les équations de Bloch est introduit afin de modéliser les différents signaux obtenus lors de ces expériences pompe-sonde. Le modèle est appliqué dans un premier temps à l'étude des artefacts de mesure du troisième ordre, puis au calcul du signal pompe-sonde du CO selon l'évolution de ses principales caractéristiques vibrationnelles, à savoir, sa fréquence de résonance et sa force d'oscillateur. Le traitement des artefacts pouvant apparaître dans une expérience pompe-sonde n'est pas exhaustif. Nous nous sommes concentrés ici sur les artefacts qui interviennent dans nos expériences.

2.1 L'expérience pompe-sonde

2.1.1 Principe

L'expérience pompe-sonde est l'une des méthodes de spectroscopie les plus couramment employées pour étudier les processus très rapides se produisant à des échelles subpicosecondes. Deux impulsions de durée femtoseconde sont focalisées sur l'échantillon à étudier, la première impulsion appelée "pompe" déclenche le processus photoexcitable à étudier au sein de l'échantillon, le transfert du CO dans notre cas. La seconde impulsion appelée "sonde" est transmise par l'échantillon puis détectée : soit par un détecteur intégrateur qui mesure la puissance transmise par l'échantillon, les mesures sont alors intégrées spectralement, soit par un spectromètre et une caméra CCD qui enregistre le spectre de la sonde transmise, les mesures sont alors résolues spectralement. L'impulsion sonde arrive sur l'échantillon à un instant τ variable après excitation par la pompe. Ce délai τ est balayé à l'aide d'une ligne à retard qui permet ainsi de suivre l'évolution de la transmission de la sonde par l'échantillon pendant toute la durée de la réaction.

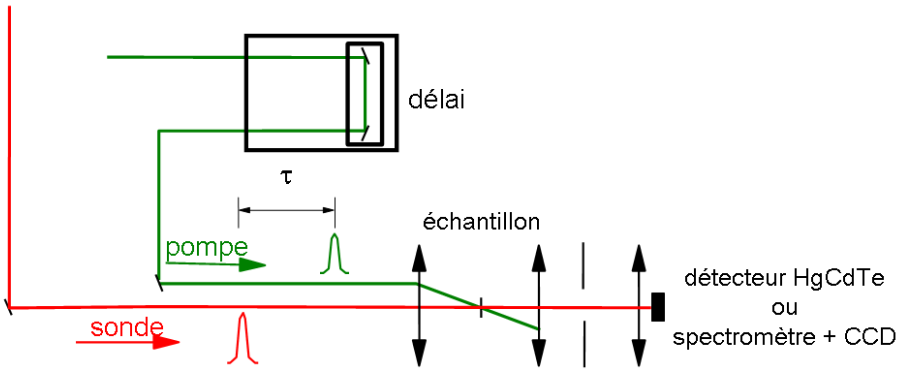


FIG. 2.1 – Dispositif pompe-sonde

Dans le cas où le signal pompe-sonde est intégré spectralement, la résolution n'est limitée que par les durées des impulsions pompe et sonde, ce qui permet d'observer des processus femtoseconde impossibles à résoudre à l'aide de détecteurs rapides. Lors d'expériences résolues spectralement, des effets de cohérence peuvent induire des artefacts qui se manifestent à délai pompe-sonde négatif et nul, et empêchent ainsi d'accéder aux premières étapes de la réaction.

Cette configuration apporte cependant des renseignements supplémentaires sur la structure des bandes d'absorption de l'échantillon.

Dans ce travail de thèse, les deux approches sont abordées car elles apportent des précisions complémentaires sur le phénomène étudié, à savoir le transfert du ligand CO dans le site actif de la cytochrome *c* oxydase.

2.1.2 Transfert du ligand CO dans la cytochrome *c* oxydase

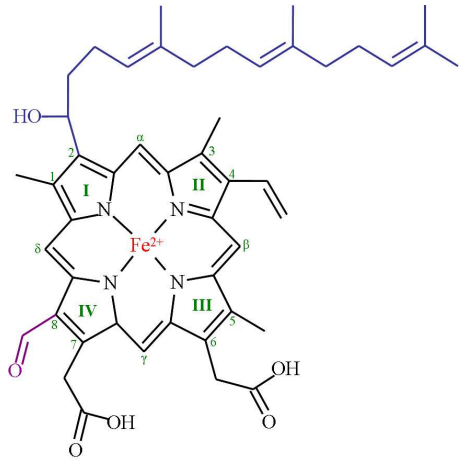
L'expérience pompe-sonde est parfaitement adaptée à l'étude de transferts ultra rapides de ligands dans les hémoprotéines. Nous appliquons cette méthode au transfert du ligand CO au sein du site actif de la cytochrome *c* oxydase, du Fer de l'hème a_3 à l'atome de Cuivre B, comme nous le décrivons au chapitre I. Rappelons que ce processus très rapide s'effectue en moins d'une picoseconde [1] [2] et nécessite l'emploi d'une méthode de résolution femtoseconde.

Dans le cadre de nos expériences pompe-sonde dans le domaine infrarouge, destinées à suivre le transfert du CO dans les hémoprotéines, une impulsion pompe femtoseconde de longueur d'onde 400 nm dans le domaine visible est utilisée afin d'initier le transfert du CO par rupture de la liaison Fer-Carbone, selon le processus expliqué dans l'encadré intitulé "Propriétés spectrales de l'hème dans le domaine UV-Visible".

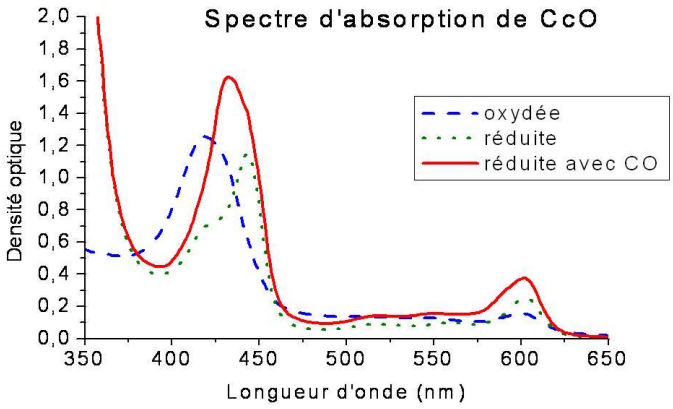
Comme nous l'avons vu au chapitre I, les caractéristiques vibrationnelles du CO dépendent de son site de fixation et de son environnement protéique. Ainsi lors de son transfert du Fer vers le Cuivre dans la cytochrome *c* oxydase, la fréquence de la transition vibrationnelle du CO passe de 1963 à 2062 cm^{-1}, sa largeur spectrale passe de 4 à 8 cm^{-1} et son absorption diminue d'un facteur 7 [32]. Afin d'accéder directement à ces variations, une impulsion sonde dans le domaine infrarouge est utilisée. Lors des expériences intégrées spectralement, cette impulsion accordable en fréquence est réglée soit à 1963 cm^{-1}, soit à 2062 cm^{-1} afin de pouvoir suivre séparément la dynamique de départ du CO du Fer et son arrivée sur le Cuivre. Dans les expériences résolues spectralement, une impulsion centrée vers 2010 cm^{-1} est assez large pour voir les deux fréquences de vibrations 1963 et 2062 cm^{-1} et détecter ainsi simultanément le départ du CO du Fer et son arrivée sur le Cuivre.

Propriétés spectrales de l'hème dans le domaine UV-Visible

L'hème est une porphyrine, molécule plane au cœur de laquelle se trouve un atome métallique, le Fe_{a_3} dans le cas de la cytochrome c oxydase, entouré de quatre atomes d'azote. Cette molécule comporte un système d'électrons π délocalisés qui interviennent dans les processus d'oxydoréduction et de ligation de l'atome métallique central. L'hème est ainsi très réactif et à même d'assurer son rôle au sein de la protéine. La figure ci-dessous montre l'hème a de la cytochrome c oxydase :



Les deux bandes d'absorption de l'hème dans le visible, la bande de Soret autour de 400 nm et la bande Q autour de 500 - 600 nm, correspondent à des transitions électroniques $\pi - \pi^*$ [36] [37]. Le profil de ces bandes, mesuré ci dessous dans le cas de la cytochrome c oxydase, est très sensible à l'état d'oxydation et de ligation de l'atome central.



Ces caractéristiques spectrales de l'hème sont exploitées en spectroscopie à deux niveaux :

* L'état d'oxydation et de ligation de l'hème peut être identifié à l'aide de spectres d'absorption dans le domaine UV-Visible au niveau de la bande de Soret ou de la bande Q.
* L'hème ligandé peut être photodissocié par une impulsion assez intense absorbée par la bande de Soret ou la bande Q. Cette impulsion porte l'hème dans un état excité dissociatif pour la liaison Fer-Carbone qui est alors rompue [38].

Des expériences pompe-sonde ont suivi l'évolution du spectre d'absorption [39] [40] [3] dans les domaines UV-Visible pendant la photodissociation par une pompe visible et ont déterminé que la rupture de la liaison Fer-Carbone était quasi instantanée, achevée en moins de 100 fs.

2.2 Modèle de Bloch

L'équation de Bloch permet de décrire l'interaction entre un système matériel et un champ excitateur électromagnétique. Le système matériel est modélisé par un système quantique à N niveaux d'énergie discrets, couplé à un bain thermique. Ce couplage au bain traduit l'ensemble des phénomènes aléatoires d'interaction du système quantique avec son environnement, qui induisent après excitation la relaxation du système vers son état fondamental.

Le système quantique est décrit par son opérateur densité ρ, représenté par une matrice hermitienne de dimension (N,N) dont les termes diagonaux ρ_{nn} correspondent à la population des niveaux n, et les termes non diagonaux ρ_{nm} à la cohérence entre les niveaux n et m. L'interaction de ce système quantique avec le champ excitateur classique est décrit par l'équation de Bloch, découlant directement de l'équation de Schrödinger :

$$i\hbar\frac{d\rho}{dt} = [H_0, \rho] + [W(t), \rho] + i\hbar \left.\frac{d\rho}{dt}\right|_{relax} \tag{2.1}$$

L'hamiltonien H_0 du système dans son état fondamental décrit l'évolution libre de ce système en l'absence d'interactions avec le bain et le champ excitateur. Il s'agit d'une matrice hermitienne de dimensions (N,N) de valeurs propres $\hbar\omega_n$, correspondant aux énergies des états n du système.

L'opérateur $W(t) = -\mu E(t)$ décrit l'interaction dipolaire du système avec le champ électrique $E(t)$ de l'impulsion laser, μ étant l'opérateur dipolaire électrique du système. On se place dans le cadre de l'approximation dipolaire électrique qui consiste à négliger les effets du champ magnétique.

Le terme de relaxation correspond au couplage avec le bain thermique. Le modèle de Bloch se limite aux processus de relaxation markoviens, c'est à dire sans effet de mémoire. Dans ces conditions, la relaxation de ρ_{nm} est exponentielle de taux de relaxation Γ_{nm} :

$$\left.\frac{d\rho_{nm}}{dt}\right|_{relax} = -\Gamma_{nm}\left(\rho_{nm} - \rho_{nm}^{(0)}\right) \tag{2.2}$$

Le temps de relaxation $T_{nn} = 1/\Gamma_{nn}$ représente le temps de vie de la population à l'état excité n et décrit comment cette population relaxe vers le niveau fondamental. Pour $n \neq m$, $T_{nm} = 1/\Gamma_{nm}$ est le temps de déphasage qui décrit l'amortissement de la cohérence entre les niveaux n et m. On verra dans la partie (2.2.2) que ce temps correspond aussi à la durée de

vie de la polarisation induite dans le milieu par le champ excitateur.

L'équation de Bloch ainsi écrite permet de calculer la matrice densité ρ du système soumis au champ électrique excitateur E, et d'en déduire la polarisation P induite dans le système par le champ E, puis le signal pompe-sonde engendré par la polarisation P. Ces calculs, résumés dans les parties 2.2.1, 2.2.2 et 2.3.1, sont décrits plus en détails dans la référence [41].

2.2.1 Résolution de l'équation de Bloch

A l'état initial, avant toute excitation, le système est dans son état fondamental. Effectivement, seul l'état fondamental est peuplé dans l'hypothèse où l'effet de l'agitation thermique peut être négligé. Dans ces conditions $\rho_{00}^{(0)} = 1$, et les autres éléments de matrice sont nuls.

L'évolution du système à partir de cet état initial est calculé alors à l'aide de l'équation de Bloch (2.1), écrite pour chaque élément ρ_{nm} de la matrice densité :

$$\left(i\frac{d}{dt} - \omega_{nm} + i\Gamma_{nm}\right)\rho_{nm}(t) = -\frac{E(t)}{\hbar}\sum_{l}\left(\mu_{nl}\,\rho_{lm}(t) - \rho_{nl}(t)\;\mu_{lm}\right) \tag{2.3}$$

La fréquence $\omega_{nm} = \omega_n - \omega_m$ correspond à la transition nm, dans le cas où $n \neq m$.

Afin de résoudre cette équation (2.3), on introduit la fonction de Green $G_{nm}(t)$, définie comme étant solution de l'équation (2.3) dans le cas où le terme d'excitation $E(t)$ est une distribution de dirac $\delta(t)$:

$$\left(i\frac{d}{dt} - \omega_{nm} + i\Gamma_{nm}\right)\rho_{nm}(t) = -\frac{\delta(t)}{\hbar} \tag{2.4}$$

La solution retenue est la suivante :

$$G_{nm}(t) = \frac{i}{\hbar}\Theta(t)\,e^{-i\omega_{nm}t - \Gamma_{nm}t} \tag{2.5}$$

où la fonction d'Heaviside $\Theta(t)$ prend la valeur 0 pour $t < 0$ et la valeur 1 pour $t \geq 0$.

L'élément $\rho_{nm}(t)$ de la matrice densité peut alors s'exprimer à l'aide de la fonction de Green $G_{nm}(t)$:

$$\rho_{nm}(t) = G_{nm}(t) \otimes \left(E(t)\sum_{l}\left(\mu_{nl}\,\rho_{lm}(t) - \rho_{nl}(t)\;\mu_{lm}\right)\right) \tag{2.6}$$

La théorie des perturbations est parfaitement adaptée à la résolution de cette expression de l'équation de Bloch. Nous nous plaçons donc dans le cas où le champ E est assez faible pour pouvoir développer $\rho(t)$ comme suit :

$$\rho\left(t\right)=\rho^{(1)}\left(t\right)+\rho^{(2)}\left(t\right)+\rho^{(3)}\left(t\right)+... \tag{2.7}$$

où $\rho^{(p)}\left(t\right)$ est d'ordre p par rapport au champ électrique E.

En utilisant cette expression dans l'équation (2.6), nous pouvons exprimer le terme d'ordre $p+1$ en fonction du terme d'ordre p :

$$\rho_{nm}^{(p+1)}\left(t\right)=G_{nm}\left(t\right)\otimes\left(E\left(t\right)\sum_{l}\left(\mu_{nl}\,\rho_{lm}^{(p)}\left(t\right)-\rho_{nl}^{(p)}\left(t\right)\,\mu_{lm}\right)\right) \tag{2.8}$$

Connaissant la solution d'ordre 0 correspondant au système à l'état initial en l'absence de champ excitateur, nous pouvons calculer ainsi de manière itérative l'expression des éléments de la matrice densité aux ordres successifs de perturbation.

Calculons les trois premiers ordres de la matrice densité dans le cas important d'un système à deux niveaux, a et b. Considérons de plus un système centrosymétrique. Dans ces conditions, seuls les termes μ_{ab} et μ_{ba} sont non nuls.

A l'ordre 1, les seuls termes non nuls sont les termes de cohérence :

$$\rho_{ba}^{(1)}\left(t\right)=\mu_{ba}\,G_{ba}\left(t\right)\otimes E\left(t\right)=\left(\rho_{ab}^{(1)}\left(t\right)\right)^{*} \tag{2.9}$$

A l'ordre 2, les seuls termes non nuls sont les termes de population :

$$\rho_{bb}^{(2)}\left(t\right) = -\left|\mu_{ba}\right|^{2}G_{bb}\left(t\right)\otimes\left[E\left(t\right)\left(\left(G_{ba}\left(t\right)+G_{ab}\left(t\right)\right)\otimes E\left(t\right)\right)\right] \tag{2.10}$$

$$\rho_{aa}^{(2)}\left(t\right) = -\rho_{bb}^{(2)}\left(t\right)\quad\text{car}\quad\mathrm{Tr}\rho=1 \tag{2.11}$$

De même que les termes d'ordre 1, les termes d'ordre 3 sont des termes de cohérence :

$$\rho_{ba}^{(3)}\left(t\right)=2\,\mu_{ba}\,\mu_{ab}\,\mu_{ba}\,G_{ba}\left(t\right)\otimes\left[E\left(t\right)\left(G_{bb}\left(t\right)\otimes\left[E\left(t\right)\left(\left(G_{ba}\left(t\right)+G_{ab}\left(t\right)\right)\otimes E\left(t\right)\right)\right]\right)\right] \tag{2.12}$$

On constate plus généralement que dans un milieu centrosymétrique, les termes d'ordre pair sont des termes de population qui peuplent les niveaux, et les termes d'ordre impair sont des termes de cohérence qui induisent une polarisation. Le calcul de la polarisation induite est abordé dans la partie suivante (2.2.2).

2.2.2 Polarisation induite

L'interaction du champ excitateur E avec le milieu induit une polarisation P. En modélisant le milieu par K systèmes quantiques identiques et indépendants par unité de volume, la polarisation P induite par unité de volume peut s'exprimer à l'aide de la matrice densité ρ qui décrit chaque système quantique :

$$P(t) = K\langle\mu\rangle = K\,Tr\big(\mu\rho(t)\big) = K\sum_{nm}\mu_{mn}\,\rho_{nm}(t) \tag{2.13}$$

Cette polarisation admet un développement en puissances du champ E similaire à celui de la matrice densité :

$$P(t) = P^{(1)}(t) + P^{(2)}(t) + P^{(3)}(t) + ... \tag{2.14}$$

A l'aide de l'équation (2.13) le terme d'ordre p de la polarisation se déduit du terme d'ordre p de la matrice densité :

$$P^{(p)}(t) = K\sum_{nm}\mu_{mn}\,\rho^{(p)}_{nm}(t) \tag{2.15}$$

Cette polarisation à chaque ordre de perturbation peut s'écrire sous la forme suivante :

$$P^{(p)}(t) = \epsilon_0\int_{-\infty}^{+\infty}dt_1...\int_{-\infty}^{+\infty}dt_p\,\mathcal{R}^{(p)}(t-t_1,...,t-t_p)\,E(t_1)...E(t_p) \tag{2.16}$$

Dans cette expression apparait $\mathcal{R}^{(p)}$, la réponse d'ordre p du système. La susceptibilité $\chi^{(p)}$ d'ordre p du matériau est définie à partir de cette réponse $\mathcal{R}^{(p)}$ comme étant sa transformée de Fourier.

Étudions la polarisation induite dans le cas du système centrosymétrique à deux niveaux. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente (2.2.1), μ_{aa} et μ_{bb} sont nuls, ainsi seuls

les termes de cohérences ρ_{ab} et ρ_{ba} induisent la polarisation, qui s'écrit alors de la manière suivante :

$$P^{(p)}(t) = K\left(\mu_{ba}\,\rho_{ab}^{(p)}(t) + \mu_{ab}\,\rho_{ba}^{(p)}(t)\right) \tag{2.17}$$

De plus, d'après (2.2.1), les termes $\rho_{ba}^{(p)}(t)$ d'ordre p pair sont nuls, ainsi seuls les termes de polarisation $P^{(p)}(t)$ d'ordre p impair sont non nuls.

La notation complexe, définie dans l'Annexe A, est utilisée pour simplifier les calculs. La polarisation complexe $\mathcal{P}^{(p)}(t)$ d'ordre p s'écrit alors, d'après l'équation (2.17) :

$$\mathcal{P}^{(p)}(t) = 2\,K\,\mu_{ab}\,\rho_{ba}^{(p)}(t) \tag{2.18}$$

La polarisation $\mathcal{P}^{(1)}(t) = 2\,K\,\mu_{ab}\,\rho_{ba}^{(1)}(t)$ d'ordre 1 est calculée à titre d'exemple. Il convient d'exprimer $\rho_{ba}^{(1)}(t)$ en fonction du champ complexe $\mathcal{E}(t)$, ainsi si on reprend l'équation (2.9) :

$$\rho_{ba}^{(1)}(t) = \mu_{ba}\,G_{ba}(t) \otimes \frac{\mathcal{E}(t) + \mathcal{E}^{*}(t)}{2} \tag{2.19}$$

Dans le cadre de l'approximation de l'onde tournante, appliquée à l'expression de la matrice densité :

$$\rho_{ba}^{(1)}(t) = \frac{\mu_{ba}}{2}\,G_{ba}(t) \otimes \mathcal{E}(t) \tag{2.20}$$

Approximation de l'onde tournante

Le champ excitateur réel $E(t)$ peut se décomposer en deux champs complexes, $\mathcal{E}(t)$ associé aux fréquences positives et $\mathcal{E}^{*}(t)$ associé aux fréquences négatives. Ces deux ondes "tournantes" (dans le plan complexe) n'excitent pas le système avec la même efficacité. L'approximation de l'onde tournante consiste à ne conserver que celle qui excite plus intensément le système. Cette approximation est utilisée lors du calcul de la réponse du système à l'excitation afin de réduire le nombre de termes à calculer.

Dans notre cas, si la fréquence du champ excitateur est proche de la fréquence de la transition ab, $G_{ba}(t)$ forme un meilleur recouvrement spectral avec $\mathcal{E}(t)$ qu'avec $\mathcal{E}^{*}(t)$. Dans l'expression de la densité $\rho_{ba}^{(1)}(t)$, seul le terme $G_{ba}(t) \otimes \mathcal{E}(t)$ est donc conservé.

L'équation (2.18) permet alors d'obtenir la polarisation complexe à l'ordre 1 :

$$\mathcal{P}^{(1)}(t) = K\ |\mu_{ba}|^2\ G_{ba}(t) \otimes \mathcal{E}(t) \tag{2.21}$$

Notons que cette polarisation $\mathcal{P}^{(1)}(t)$ d'ordre 1 peut s'écrire sous la forme donnée par l'équation (2.16) :

$$\mathcal{P}^{(1)}(t) = \epsilon_0 \int dt_1\, \mathcal{R}^{(1)}(t - t_1)\, \mathcal{E}(t_1) \tag{2.22}$$

avec la réponse linéaire $\mathcal{R}^{(1)}(t)$ du matériau suivante :

$$\mathcal{R}^{(1)}(t) = \frac{K\,|\mu_{ba}|^2}{\epsilon_0}\, G_{ba}(t) \tag{2.23}$$

Cette réponse $\mathcal{R}^{(1)}(t)$ correspond à la polarisation linéaire induite dans le matériau par une excitation impulsionnelle $\delta(t)$. Elle est représentée par la figure (2.2) pour une fréquence de résonance $\omega_{ba}/2\pi = 60THz$ et un temps de déphasage $T_{ba} = 50fs$:

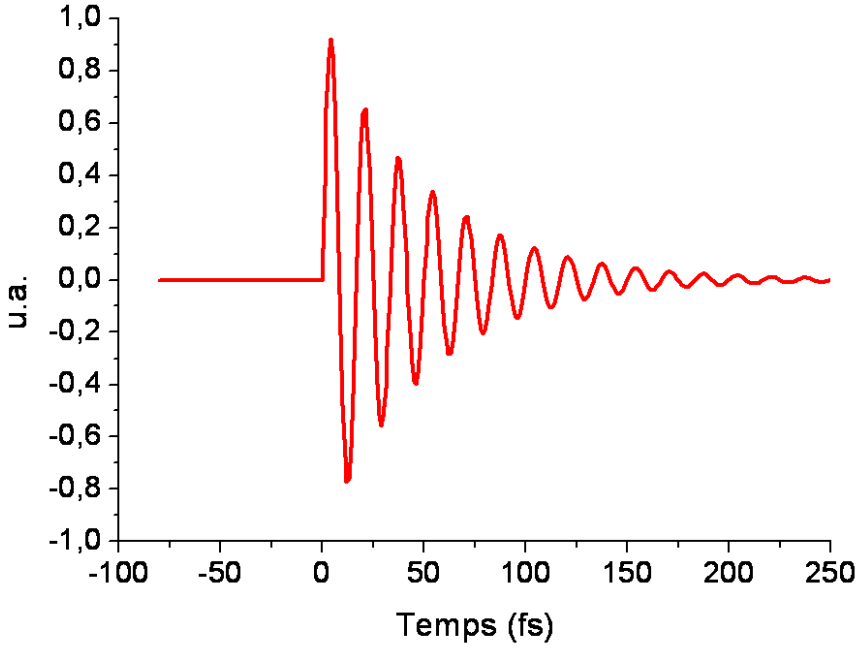


FIG. 2.2 – Partie réelle de la réponse linéaire $\mathcal{R}^{(1)}(t)$ d'un système à deux niveaux correspondant à une transition de fréquence de résonance 60 THz et de temps de déphasage 50 fs.

2.3 Modélisation du signal pompe-sonde

2.3.1 Expression générale du signal pompe-sonde

Maintenant que nous savons calculer la polarisation induite par l'interaction d'un champ électrique E avec un milieu matériel, nous pouvons exprimer le signal obtenu lors d'expériences pompe-sonde, décrites dans la partie (2.1).

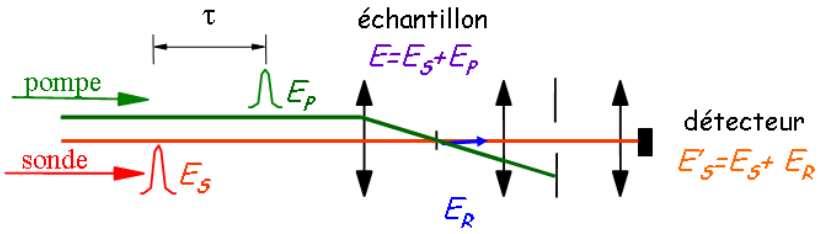


FIG. 2.3 – Dispositif pompe-sonde

Dans une expérience pompe-sonde, deux faisceaux excitent l'échantillon, le faisceau pompe se propageant dans la direction $\vec{k_P}$ et le faisceau sonde se propageant dans la direction $\vec{k_S}$. Supposons l'échantillon optiquement mince, ce qui est le cas dans nos expériences. Le champ électrique incident E est alors la somme des champs pompe E_P et sonde E_S, exprimé à l'aide des champs complexes de la manière suivante :

$$E(t) = \frac{1}{2}\left(\mathcal{E}_P(t) + \mathcal{E}_P^*(t) + \mathcal{E}_S(t) + \mathcal{E}_S^*(t)\right) \tag{2.24}$$

Le champ incident E induit dans l'échantillon une polarisation $\mathcal{P}$ qui peut être calculée à l'aide du formalisme de Bloch exposé précédemment. L'échantillon rayonne alors un champ $\mathcal{E}_R$ exprimé à partir de la polarisation $\mathcal{P}$. En utilisant les équations de Maxwell dans le cadre de l'approximation paraxiale, de l'enveloppe lentement variable, et en supposant l'échantillon optiquement mince (voir référence [41]) :

$$\mathcal{E}_R(\omega) = \frac{i\,\omega L}{2\,n(\omega)\epsilon_0 c}\,\mathcal{P}(\omega) \tag{2.25}$$

Le détecteur reçoit le champ total transmis par l'échantillon qui se propage dans la direction $\vec{k_S}$ de la sonde. Il s'agit donc de la superposition du champ rayonné $\mathcal{E}_R$ dans la direction de la sonde avec le champ sonde $\mathcal{E}_S$. Dans le cas d'une expérience résolue spectralement, l'intensité de chaque composante spectrale du signal détecté est la suivante :

$$I(\omega) = \frac{1}{2\eta_0} \left| \mathcal{E}_S(\omega) + \mathcal{E}_R(\omega) \right|^2 \tag{2.26}$$

où η_0 est l'impédance du vide. Dans nos expériences, le champ rayonné est négligeable devant le champ sonde, ainsi :

$$I(\omega) \propto \left| \mathcal{E}_S(\omega) \right|^2 + 2\, Re\big(\mathcal{E}_S^*(\omega)\, \mathcal{E}_R(\omega)\big) \tag{2.27}$$

Nous nous intéressons de plus à la variation $\Delta I(\omega)$ engendrée par la pompe du signal $I(\omega)$ mesuré :

$$\Delta I(\omega) = I_{pompe}^{avec}(\omega) - I_{pompe}^{sans}(\omega) \propto 2\, Re\big(\mathcal{E}_S^*(\omega)\, \Delta\mathcal{E}_R(\omega)\big) \tag{2.28}$$

où $\Delta\mathcal{E}_R(\omega)$ est la variation du champ rayonné induite par la pompe.

En utilisant l'expression du champ rayonné (2.25), le signal $\Delta I(\omega)$ s'exprime en fonction de la polarisation induite $\mathcal{P}(\omega)$ dans la direction de la sonde $\vec{k_S}$:

$$\Delta I(\omega) = \frac{\omega L}{n\epsilon_0 c}\, Im\big(\mathcal{E}_S^*(\omega)\ \Delta\mathcal{P}(\omega)\big) \tag{2.29}$$

Les mêmes calculs peuvent être menés dans le cas d'une expérience intégrée spectralement à partir de l'expression du champ rayonné donné par la référence [41] dans le cadre de l'approximation de l'enveloppe lentement variable par rapport au temps :

$$\mathcal{E}_R(t) = \frac{i\,\omega_0 L}{2\, n(\omega_0)\epsilon_0 c}\, \mathcal{P}(t)$$

La variation engendrée par la pompe de la densité d'énergie totale J transmise par l'échantillon est alors mesurée :

$$\Delta J \propto \frac{\omega_0 L}{n\epsilon_0 c}\, Im \int_{-\infty}^{+\infty} dt\, \mathcal{E}_S^*(t)\, \Delta\mathcal{P}(t) \tag{2.30}$$

Dans le cas d'un milieu centrosymétrique, la variation de la polarisation induite dans l'échantillon $\Delta\mathcal{P}$ se propageant dans la direction de la sonde $\vec{k_S}$ se limite à la polarisation du troisième ordre $\mathcal{P}^{(3)}$ dans la direction $\vec{k_S}$. En effet, la polarisation linéaire induite dans la direction $\vec{k_S}$ se restreint à l'ordre 1 en champ sonde $\mathcal{E}_S$ qui est le même avec et sans pompe, et la polarisation d'ordre 2 est nulle car le milieu est centrosymétrique.

La polarisation $\mathcal{P}^{(3)}(\omega)$ d'ordre 3 est la somme des termes qui se propagent dans la direction de la sonde $k_P - k_P + k_S = k_S$ et sont détectés, c'est à dire les termes qui font intervenir les champs complexes $\mathcal{E}_P$, $\mathcal{E}_P^*$ et $\mathcal{E}_S$.

Lors des expériences pompe-sonde sur les hémoprotéines, un signal positif à délai pompe-sonde nul apparaît, quel que soit l'état d'oxydation ou de ligation de l'hème de la protéine. Cet artefact de mesure dû à l'interaction des champs $\mathcal{E}_P$, $\mathcal{E}_P^*$ et $\mathcal{E}_S$ avec les transitions de l'hème peut être directement interprété par les calculs menés dans cette partie 2.3.1.

2.3.2 Application à l'artefact de mesure à délai pompe-sonde nul

Lors des expériences pompe-sonde sur les hémoprotéines, les champs $\mathcal{E}_P$, $\mathcal{E}_P^*$ et $\mathcal{E}_S$ interagissent avec les transitions de l'hème et créent de ce fait un artefact de mesure à délai pompe-sonde nul. Afin d'exprimer le signal pompe-sonde dû à cette interaction, l'hème est modélisé par un système à trois niveaux a, b et c.

* La transition ab est résonante avec le champ $\mathcal{E}_P$ et correspond à la bande de Soret de l'hème. Les états a et b sont deux états électroniques de l'hème.
* La transition bc est résonante avec le champ sonde $\mathcal{E}_S$. L'état c est soit un autre état électronique excité, soit un état vibrationnel de la bande de Soret.

L'équation (2.8) permet de calculer de manière itérative l'expression de la matrice densité ρ de ce système à trois niveaux aux ordres successifs de perturbation. Nous nous intéressons au terme d'ordre 3, responsable de la polarisation induite du troisième ordre qui génère le signal pompe-sonde que nous voulons calculer.

A l'ordre 1, le champ pompe $\mathcal{E}_P$ interagit avec la transition ab et établit la cohérence $\rho_{ba}^{(1)}$ entre les états électroniques a et b :

$$\rho_{ba}^{(1)}(t) = \frac{\mu_{ba}}{2} G_{ba}(t) \otimes \mathcal{E}_P(t) \tag{2.31}$$

A l'ordre 2, le champ pompe $\mathcal{E}_P^*$ interagit de nouveau avec la transition ab et crée ainsi la population $\rho_{bb}^{(2)}$ à l'état b :

$$\rho_{bb}^{(2)}(t) = G_{bb}(t) \otimes \left[\frac{\mu_{ba}}{2} \mathcal{E}_P(t) \rho_{ab}^{(1)}(t) - \frac{\mu_{ab}}{2} \mathcal{E}_P^*(t) \rho_{ba}^{(1)}(t) \right] \tag{2.32}$$

Un deuxième terme d'ordre 2 est dû à l'interaction du champ sonde $\mathcal{E}_S$ avec la transition bc pour établir la cohérence $\rho^{(2)}_{ca}$ entre les états c et a :

$$\rho^{(2)}_{ca}(t) = \frac{\mu_{cb}}{2} G_{ca}(t) \otimes \mathcal{E}_S(t)\, \rho^{(1)}_{ba}(t) \tag{2.33}$$

A l'ordre 3, la cohérence obtenue $\rho^{(3)}_{cb}$ est due, d'une part au champ sonde $\mathcal{E}_S$ qui interagit avec la transition bc, et d'autre part au champ pompe $\mathcal{E}^*_P$ qui interagit avec la transition ab :

$$\rho^{(3)}_{cb}(t) = G_{cb}(t) \otimes \left[\frac{\mu_{cb}}{2}\, \mathcal{E}_S(t)\, \rho^{(2)}_{bb}(t) - \frac{\mu_{ab}}{2}\, \mathcal{E}^*_P(t)\, \rho^{(2)}_{ca}(t)\right] \tag{2.34}$$

Ce terme de cohérence $\rho^{(3)}_{cb}$ induit la polarisation non linéaire $\mathcal{P}^{(3)}$ d'ordre 3, qui s'exprime d'après l'équation (2.13) de la manière suivante :

$$\mathcal{P}^{(3)}(t) = 2\, K\, \mu_{bc}\, \rho^{(3)}_{cb}(t) \tag{2.35}$$

Dans cette expression de la polarisation, le terme $\rho^{(3)}_{cb}$ de la matrice densité est somme de trois termes, deux termes issus de la population $\rho^{(2)}_{bb}$ et un terme issu de la cohérence $\rho^{(2)}_{ca}$. Chacun de ces termes est un double produit de convolution qui fait intervenir $\mathcal{E}_P$, $\mathcal{E}^*_P$ et $\mathcal{E}_S$, et qui peut donc s'écrire sous la forme donnée par l'équation (2.16).

Les termes issus de $\rho^{(2)}_{bb}$, appelés termes de population, s'expriment ainsi de la manière suivante :

$$\begin{aligned}\mathcal{P}^{(3)}_{pop}(t) = {} & \epsilon_0 \int\int\int dt_1\, dt_2\, dt_3\, \mathcal{R}^{(3)}_{pop}(t-t_1, t-t_2, t-t_3)\, \mathcal{E}_S(t_1)\, \mathcal{E}^*_P(t_2)\, \mathcal{E}_P(t_3) \\ & + \epsilon_0 \int\int\int dt_1\, dt_2\, dt_3\, \mathcal{R}'^{(3)}_{pop}(t-t_1, t-t_2, t-t_3)\, \mathcal{E}_S(t_1)\, \mathcal{E}_P(t_2)\, \mathcal{E}^*_P(t_3)\end{aligned} \tag{2.36}$$

avec les deux composantes $\mathcal{R}^{(3)}_{pop}$ et $\mathcal{R}'^{(3)}_{pop}$ de la réponse non linéaire d'ordre 3 définies ainsi :

$$\mathcal{R}^{(3)}_{pop}(t-t_1, t-t_2, t-t_3) = \frac{|\mu_{cb}|^2\, |\mu_{ba}|^2}{4}\, G_{cb}(t-t_1)\, G_{bb}(t-t_2)\, G_{ba}(t-t_3) \tag{2.37}$$

$$\mathcal{R}'^{(3)}_{pop}(t-t_1, t-t_2, t-t_3) = \frac{|\mu_{cb}|^2\, |\mu_{ba}|^2}{4}\, G_{cb}(t-t_1)\, G_{bb}(t-t_2)\, G_{ab}(t-t_3) \tag{2.38}$$

Le terme issu de $\rho^{(2)}_{ca}$, appelé terme de cohérence, se met de même sous la forme :

$$\mathcal{P}^{(3)}_{coh}(t) = \epsilon_0 \int\int\int dt_1\, dt_2\, dt_3\, \mathcal{R}^{(3)}_{coh}(t-t_1, t-t_2, t-t_3)\, \mathcal{E}^*_P(t_1)\, \mathcal{E}_S(t_2)\, \mathcal{E}_P(t_3)$$

où la réponse non linéaire $\mathcal{R}^{(3)}_{coh}$ d'ordre 3 s'écrit :

$$\mathcal{R}^{(3)}_{coh}(t-t_1, t-t_2, t-t_3) = \frac{|\mu_{cb}|^2\, |\mu_{ba}|^2}{4}\, G_{cb}(t-t_1)\, G_{ca}(t-t_2)\, G_{ba}(t-t_3) \tag{2.39}$$

Dans le cas des transitions électroniques nm de l'hème, le temps de déphasage T_{mn} est faible devant les durées des impulsions pompe et sonde. Ce temps est de l'ordre de grandeur de l'inverse de la largeur spectrale de la transition électronique. La bande de Soret de la cytochrome c oxydase, représentée dans l'encadré de la partie 2.1, présente une largeur spectrale d'environ 30 nm, centrée autour de 400 nm. Le temps de déphasage est alors de l'ordre de quelques femtosecondes. Dans ces conditions, la fonction de Green $G_{mn}(t)$ correspondante peut être simplifiée de la manière suivante :

$$G_{mn}(t) \approx \frac{i}{\hbar}\, T_{nm}\, \delta(t)\, e^{-i\omega_{mn}t} \tag{2.40}$$

L'équation (2.30) permet alors d'obtenir, dans le cas d'une expérience pompe-sonde intégrée spectralement, les signaux pompe-sonde S_{pop} et S_{coh} engendrés par les polarisations $\mathcal{P}^{(3)}_{pop}$ et $\mathcal{P}^{(3)}_{coh}$:

$$S_{pop} \propto -\frac{\omega_0 L}{2\, n\hbar^3 c}\, |\mu_{cb}|^2\, |\mu_{ba}|^2\, T_{cb} T_{ba} \int_{-\infty}^{+\infty} dt\, \left|\mathcal{E}_S(t)\right|^2 \int_{-\infty}^{t} dt'\, \left|\mathcal{E}_P(t')\right|^2 e^{-\frac{t-t'}{T_{bb}}} \tag{2.41}$$

$$S_{coh} \propto -\frac{\omega_0 L}{4\, n\hbar^3 c}\, |\mu_{cb}|^2\, |\mu_{ba}|^2\, T_{cb} T_{ca} T_{ba} \int_{-\infty}^{+\infty} dt\, \left|\mathcal{E}_S(t)\right|^2 \left|\mathcal{E}_P(t)\right|^2 \tag{2.42}$$

Ces signaux S_{pop} et S_{coh} sont mesurés en fonction du délai pompe-sonde τ qui intervient dans l'expression du champ sonde de la manière suivante :

$$\left|\mathcal{E}_S(t)\right|^2 = \left|\mathcal{E}'_S(t-\tau)\right|^2 \tag{2.43}$$

Notons $I_P(t)$ et $I_S(t)$ les intensités des champs pompe et sonde. Les signaux pompe-sonde $S_{pop}(\tau)$ et $S_{coh}(\tau)$ de l'expérience intégrée temporellement s'écrivent ainsi :

$$S_{coh}(\tau) \propto -\frac{\omega_0 L}{4\,n\hbar^3 c}\,|\mu_{cb}|^2\,|\mu_{ba}|^2\,T_{cb}T_{ca}T_{ba}\int_{-\infty}^{+\infty} dt\,I_S(t-\tau)\,I_P(t) \tag{2.44}$$

$$S_{pop}(\tau) \propto -\frac{\omega_0 L}{2\,n\hbar^3 c}\,|\mu_{cb}|^2\,|\mu_{ba}|^2\,T_{cb}T_{ba}\int_{-\infty}^{+\infty} dt\,I_S(t-\tau)\int_{-\infty}^{t} dt'\,I_P(t')\,e^{-\frac{t-t'}{T_{bb}}} \tag{2.45}$$

Le signal pompe-sonde total engendré par le système à trois niveaux est la somme $S(\tau)$:

$$S(\tau) = S_{pop}(\tau) + S_{coh}(\tau) \tag{2.46}$$

Ce signal est tracé dans la figure 2.4 dans le cas d'impulsions pompe et sonde gaussiennes (voir Annexe A) de durées respectives 270 et 150 fs et de transitions électroniques de temps de déphasage 10 fs, pour différentes durées de vie T_{bb} de la population à l'état b.

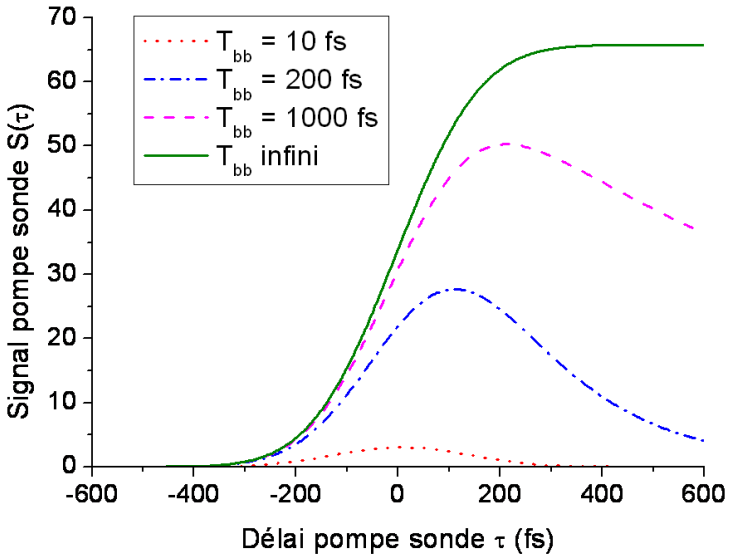


FIG. 2.4 – Simulation du signal pompe-sonde d'un système à 3 niveaux dans le cas de temps de vie de 10, 200, 1000 fs et infini pour le niveau intermédiaire. Les impulsions pompe et sonde sont gaussiennes de largeurs à mi-hauteur respectives 270 et 150 fs.

La figure 2.5 représente l'évolution temporelle des signaux $S(\tau)$, $S_{pop}(\tau)$ et $S_{coh}(\tau)$ dans le cas d'un temps de vie T_{bb} très court de 10 fs (choisi égal aux temps de déphasage) et d'un temps de vie infini.

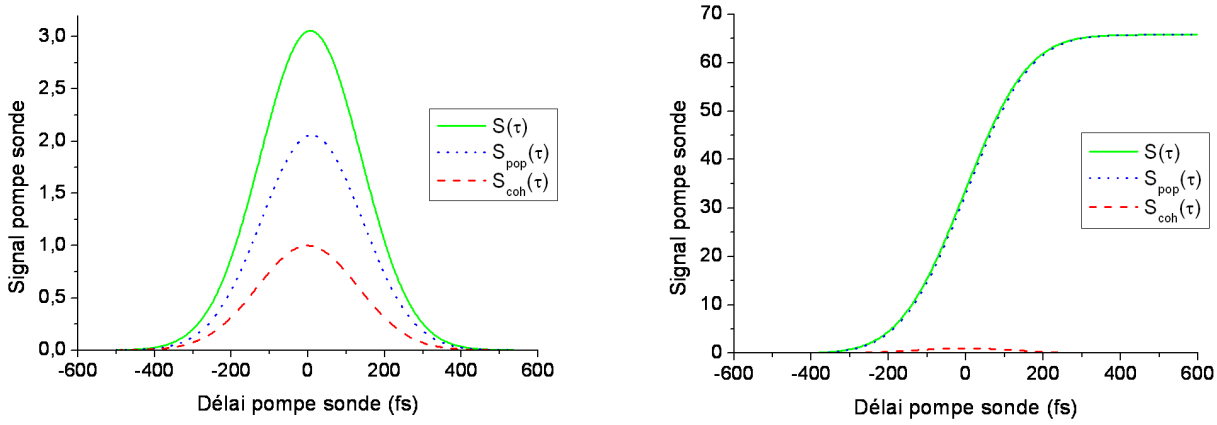


FIG. 2.5 – Simulation du signal pompe-sonde d'un système à 3 niveaux, dans le cas d'un temps de vie du niveau intermédiaire négligeable à gauche, et infini à droite. Les impulsions pompe et sonde sont gaussiennes de largeurs à mi-hauteur respectives 270 et 150 fs.

Dans le cas d'un temps de vie infini, le terme de cohérence $S_{coh}(\tau)$ est négligeable devant le terme de population $S_{pop}(\tau)$ quel que soit le délai τ. A délai pompe-sonde nul où $S_{coh}(\tau)$ prend sa valeur maximale, le rapport $S_{coh}(\tau)/S_{pop}(\tau)$ vaut environ 0,03. Dans ce cas, on peut considérer que le signal pompe-sonde total $S(\tau)$ correspond au terme de population $S_{pop}(\tau)$ donné par la relation 2.45 :

$$S(\tau) = -\frac{\omega_0 L}{2\,n\hbar^3 c}\,|\mu_{cb}|^2\,|\mu_{ba}|^2\,T_{cb}T_{ba}\int_{-\infty}^{+\infty} dt\,I_S(t-\tau)\int_{-\infty}^{t} dt'\,I_P(t') \tag{2.47}$$

Dans le cas d'un temps de vie très court, le terme de cohérence n'est plus négligeable. L'équation 2.45 permet de montrer que le terme de population $S_{pop}(\tau)$ s'écrit dans ce cas en fonction de la corrélation croisée des impulsions pompe et sonde de la manière suivante :

$$S_{pop}(\tau) = -\frac{\omega_0 L}{2\,n\hbar^3 c}\,|\mu_{cb}|^2\,|\mu_{ba}|^2\,T_{cb}T_{ba}T_{bb}\int_{-\infty}^{+\infty} dt\,I_S(t-\tau)\,I_P(t) \tag{2.48}$$

Quel que soit le délai pompe-sonde τ, le rapport $S_{coh}(\tau)/S(\tau)$ vaut donc $1/3$, ce que nous constatons également au niveau de la figure 2.5.

2.3.3 Application au signal du CO

Le but de nos expériences pompe-sonde dans l'infrarouge est de suivre le transfert du CO dans les hémoprotéines par l'intermédiaire des modifications de ses caractéristiques vibrationnelles. Lors de ces expériences, l'impulsion sonde interagit avec le CO et son absorption par le CO évolue avec les changements qui interviennent durant le transfert au niveau de la fréquence de vibration et de la force d'oscillateur du CO. Le signal pompe-sonde engendré correspond aux variations de l'intensité sonde transmise, dues à l'ensemble des molécules de CO subissant le transfert.

L'approche présentée ici a été proposée par Thomas Polack [42] [43] pour modéliser le signal du CO dans la myoglobine. Afin de calculer le signal dû au CO, il s'agit de trouver la réponse à l'excitation par le champ sonde de l'ensemble des molécules de CO transférées. La réponse $\mathcal{R}$ recherchée présente les caractéristiques suivantes :

* $\mathcal{R}$ dépend linéairement du champ sonde excitateur $\mathcal{E}_S$ car ce champ est de faible intensité,
* $\mathcal{R}$ est non stationnaire car les caractéristiques vibrationnelles du CO varient au moment du transfert,
* $\mathcal{R}$ est tensorielle car la polarisation peut être induite selon une direction différente de la polarisation du champ sonde excitateur.

Dans le domaine temporel, la réponse $\mathcal{R}(t, t_S)$ vérifie la relation suivante :

$$\vec{\mathcal{P}}(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} dt_S \, \mathcal{R}(t, t_S) \, \vec{\mathcal{E}}_S \, (t_S) \tag{2.49}$$

L'interaction du CO avec le terme de pompe $\mathcal{E}_P \, \mathcal{E}_P^*$ n'est pas explicite au niveau de cette expression, car la pompe n'agit pas sur la cohérence des états vibrationnels du CO. Le rôle de la pompe est de provoquer au même instant, à la durée de l'impulsion pompe près, la photodissociation d'un ensemble de molécules de CO et d'induire ainsi leur transfert au sein des hémoprotéines. La proportion de molécules de CO dissociées est proportionnelle à l'intensité de pompe $\mathcal{E}_P \, \mathcal{E}_P^*$, en supposant que la saturation n'est pas atteinte. Le terme $\mathcal{E}_P \, \mathcal{E}_P^*$ intervient donc dans l'expression de la réponse $\mathcal{R}(t, t_S)$ des molécules dissociées.

Notons $r(t, t_S)$ la réponse due à une pompe infiniment brève d'intensité normalisée arrivant à l'instant 0. La réponse à une pompe d'intensité I_P s'obtient par la convolution suivante :

$$\mathcal{R}(t,t_S) = \int_{-\infty}^{+\infty} dt_P\, r(t-t_P, t_S-t_P)\, I_P\,(t_P) \tag{2.50}$$

En introduisant cette expression de $\mathcal{R}(t,t_S)$ dans l'équation 2.49, nous obtenons la polarisation dont résulte le signal pompe-sonde :

$$\vec{\mathcal{P}}(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} dt_S \int_{-\infty}^{+\infty} dt_P\, r(t-t_P, t_S-t_P)\, \mathcal{E}_P\,(t_P)\, \mathcal{E}_P^*\,(t_P)\, \vec{\mathcal{E}}_S\,(t_S) \tag{2.51}$$

Il est intéressant de remarquer que cette polarisation fait intervenir les champs $\mathcal{E}_P$, $\mathcal{E}_P^*$ et $\mathcal{E}_S$, comme nous l'annonçons dans le partie 2.3.1.

Dans le cadre d'expériences différentielles visant à mesurer les modifications engendrées par la pompe, la variation de la polarisation induite est considérée :

$$\Delta\vec{\mathcal{P}}(t) = \vec{\mathcal{P}}^{avec}_{pompe}(t) - \vec{\mathcal{P}}^{sans}_{pompe}(t) \tag{2.52}$$

Le signal pompe-sonde engendré par la variation de la polarisation $\Delta\vec{\mathcal{P}}(t)$ s'écrit alors, d'après 2.30 :

$$\begin{aligned} S(\tau) &\propto Im \int_{-\infty}^{+\infty} dt\, \vec{\mathcal{E}}_S^*(t-\tau)\, \Delta\vec{\mathcal{P}}(t-\tau) \\ &\propto Im \int\int\int dt\, dt_S\, dt_P\, \vec{\mathcal{E}}_S^*(t-\tau)\, \Delta r(t-t_P, t_S-t_P)\, I_P\,(t_P)\, \vec{\mathcal{E}}_S\,(t_S-\tau) \end{aligned} \tag{2.53}$$

Afin de calculer la réponse r linéaire au champ excitateur $\mathcal{E}_S(t)$ de l'ensemble des molécules de CO dissociées, chaque molécule de CO est modélisée par un système quantique à deux niveaux vibrationnels a et b, en interaction avec le champ excitateur classique incident $\mathcal{E}_S$. Ce système quantique est décrit par son opérateur densité ρ qui vérifie l'équation de Bloch (2.1), dans laquelle :

* L'hamiltonien H_0 du CO dans son état fondamental admet comme valeurs propres $\hbar\omega_a$ et $\hbar\omega_b$. La fréquence $\omega_{ba} = \omega_b - \omega_a$ d'absorption du CO, visualisée par l'impulsion sonde, varie durant le transfert du CO dans le site actif de la cytochrome c oxydase. Le nombre d'onde associé passe de 1963 cm^{-1} à 2062 cm^{-1}, lorsque le CO passe du Fer de l'hème à l'atome de Cuivre [32].
* L'interaction dipolaire du CO avec le champ $\mathcal{E}_S(t)$ est décrit par $W(t) = -\mu\mathcal{E}_S(t)$, où μ

est l'opérateur dipolaire électrique du CO. Cet opérateur μ est également modifié par le transfert du CO, son module au carré $|\mu|^2$ est diminué d'un facteur 7 [32].

* Le terme de relaxation s'écrit, dans le cas de la cohérence, $-\Gamma_{ba}(\rho_{ba} - \rho^0_{ba})$. Le temps de déphasage $T_{ba} = 1/\Gamma_{ba}$ est de l'ordre de grandeur de l'inverse de la largeur spectrale de la raie d'absorption du CO. Cette largeur spectrale vaut 4 cm^{-1} quand le CO est fixé sur le Fer et 8 cm^{-1} quand le CO est fixé sur le Cuivre dans la cytochrome c oxydase [32], d'où un temps de déphasage T_{ba} de l'ordre de la picoseconde.

A l'équilibre thermique et à température ambiante, seul le niveau vibrationnel fondamental a est peuplé : pour une transition se situant à 5 μm, $\hbar\omega_{ba}/kT \approx 10$. La sonde infrarouge est supposée trop faible pour peupler de manière notable le niveau b, c'est pourquoi nous pouvons nous restreindre à un système à deux niveaux dont la matrice densité vérifie $\rho_{bb} << 1$ à tout instant t. La sonde n'agit qu'à travers la cohérence ρ_{ba}, qui d'après l'équation (2.18), engendre la réponse linéaire d'un milieu centrosymétrique à deux niveaux a et b. Ce terme ρ_{ba} peut se calculer à l'aide de l'équation de Bloch (2.1).

Dans notre cas, les états propres $|\,a\rangle$ et $|\,b\rangle$ dépendent du temps, ce qui modifie l'équation de Bloch (2.1). Cette équation est cependant utilisable dans le cas d'un système à deux niveaux a et b pour lequel la variation des états propres est assez lente pour pouvoir négliger le terme $-\frac{d\langle a|}{dt}\,|\,b\rangle$ par rapport à $\frac{1}{\hbar}\,\vec{\mu}_{ba}(t)\,\vec{E}(t)$ (voir l'Annexe C de la référence [42]). L'évolution de la cohérence ρ_{ba} est ainsi décrite par l'équation suivante :

$$\frac{\mathrm{d}\rho_{ba}(t)}{\mathrm{d}t} + i\omega(t)\rho_{ba}(t) = \frac{i}{\hbar}\,\vec{\mu}_{ba}(t)\cdot\vec{E}(t) \tag{2.54}$$

avec $\omega(t) = \omega_{ba}(t) - i\Gamma_{ba}(t)$. La cohérence $\rho_{ba}(t)$, solution de cette équation, est la suivante :

$$\rho_{ba}(t) = \frac{i}{\hbar}\int_{-\infty}^{+\infty}\mathrm{d}t_S\,\theta(t-t_S)\exp\left(-i\int_{t_S}^{t}\mathrm{d}t'\omega(t')\right)\,\vec{\mu}_{ba}(t_S)\cdot\vec{E_S}(t_S) \tag{2.55}$$

D'après l'équation (2.18), la polarisation induite par une molécule de CO de cohérence $\rho_{ba}(t)$ calculée ainsi s'écrit :

$$\vec{\mathcal{P}}_{1CO}(t) = \frac{i}{\hbar}\int_{-\infty}^{+\infty}\mathrm{d}t_S\,\theta(t-t_S)\exp\left(-i\int_{t_S}^{t}\mathrm{d}t'\omega(t')\right)\,\left(\vec{\mu}^{\,*}(t_S)\cdot\vec{\mathcal{E}_S}(t_S)\right)\,\vec{\mu}(t) \tag{2.56}$$

La polarisation induite par l'ensemble des molécules de CO dissociées s'obtient alors en

moyennant les contributions des différentes polarisations microscopiques selon leurs orientations moléculaires :

$$\vec{\mathcal{P}}(t) = \frac{i}{\hbar} \int_{-\infty}^{+\infty} \mathrm{d}t_S \, \theta(t - t_S) \exp\left(-i \int_{t_S}^{t} \mathrm{d}t' \omega(t')\right) \left\langle \left(\vec{\mu}^{\,*}(t_S) \cdot \vec{\mathcal{E}_S}(t_S)\right) \, \vec{\mu}(t) \right\rangle \tag{2.57}$$

Le principe du calcul de la moyenne macroscopique $\langle\,\rangle$ est exposé à la fin de cette partie 2.3.3, et mis en application dans le cas d'une impulsion sonde très brève.

Le signal pompe-sonde est alors obtenu à partir de $\Delta\vec{\mathcal{P}}(t) = \vec{\mathcal{P}}^{avec}_{pompe}(t) - \vec{\mathcal{P}}^{sans}_{pompe}(t)$ à l'aide de l'équation (2.30). Le signal pompe-sonde $s(\tau)$, correspondant à une impulsion pompe infiniment brève d'intensité normalisée arrivant à l'instant 0, est tout d'abord calculé :

$$s(\tau) \propto \Delta \, Im \left\{ \frac{i}{\hbar} \int_{-\infty}^{+\infty} \mathrm{d}t \int_{-\infty}^{t} \mathrm{d}t_S \exp^{-i\int_{t_S}^{t} \mathrm{d}t' \omega(t')} \left\langle \left(\vec{\mu}^{\,*}(t_S) \cdot \vec{\mathcal{E}_S}(t_S - \tau)\right) \left(\vec{\mu}(t) \, \vec{\mathcal{E}_S}^{\,*}(t - \tau)\right) \right\rangle \right\} \tag{2.58}$$

Ce signal est ensuite convolué avec le profil de l'intensité de pompe $I_P(t)$:

$$S(\tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} \mathrm{d}t_P \, I_P(t_P) \, s(\tau - t_P) \tag{2.59}$$

Nous pouvons alors calculer à partir des équations 2.58 et 2.59 le signal pompe-sonde $S(\tau)$ dans différentes conditions d'expérience définies par les paramètres suivants :

- Les caractéristiques des impulsions pompe et sonde : durées et fréquence centrale pour l'impulsion sonde.
- L'angle entre les polarisations des impulsions pompe et sonde.
- L'évolution des caractéristiques de la transition vibrationnelle du CO pendant son transfert : sa fréquence de vibration $\frac{\omega_{ba}}{2\pi}$, sa largeur spectrale Γ_{ba} et son moment dipolaire μ.

A titre d'exemple, la figure 2.6 représente le signal pompe-sonde induit par la cytochrome c oxydase pour un transfert du CO sur un temps caractéristique de 600 fs, dans le cas d'une sonde centrée à la fréquence initiale du CO lié au Fer (1963 cm^{-1}) et dans le cas d'une sonde centrée à la fréquence finale du CO lié au Cuivre (2062 cm^{-1}). Les impulsions pompe et

sonde sont gaussiennes de durées respectives 270 fs et 150 fs et l'angle entre les polarisations des impulsions pompe et sonde est de 54,7 degrés. La fréquence de vibration du CO varie de 58,89 THz à 61,86 THz (correspondant respectivement à 1963 cm^{-1} et 2062 cm^{-1}), sa largeur spectrale passe de 4 à 8 cm^{-1} et le carré de son moment dipolaire est divisé par 7 [32]. L'évolution de ces paramètres du CO est considérée progressive et exponentielle de temps caractéristique τ_{car} égal au temps de transfert du CO, fixé à 600 fs dans cet exemple : si on note f le paramètre (ω_{ba}, Γ_{ba} ou μ^2) de valeurs initiale et finale respectives f_{init} et f_{fin} :

$$f(t) = f_{init} + (f_{fin} - f_{init}) \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{car}}}\right) \tag{2.60}$$

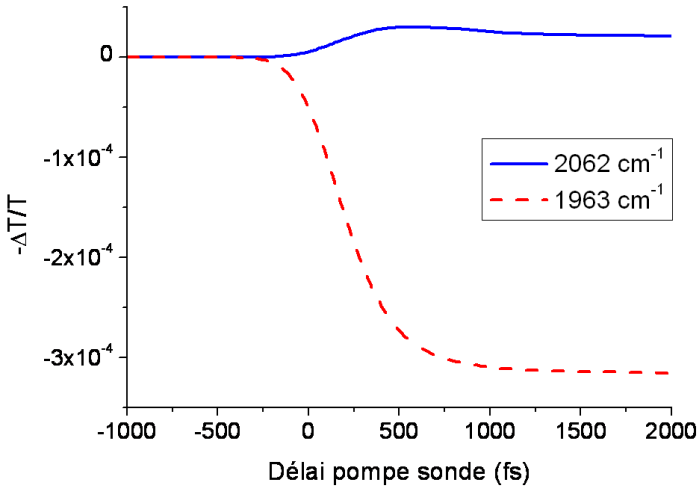


FIG. 2.6 – Simulation du signal pompe-sonde dû au CO, au sein de la cytochrome *c* oxydase. La courbe rouge est le signal obtenu avec une sonde centrée à la fréquence initiale du CO (1963 cm^{-1}) et la courbe bleue avec une sonde centrée à la fréquence finale du CO (2062 cm^{-1}). Les impulsions pompe et sonde sont gaussiennes de durées respectives 270 fs et 150 fs, l'angle entre les polarisations des impulsions pompe et sonde est de 54,7° et le transfert du CO s'effectue en 600 fs.

Dans la figure 2.6, $\Delta T = T^{avec}_{pompe} - T^{sans}_{pompe}$, où T désigne la densité d'énergie transmise par l'échantillon, intégrée temporellement par le détecteur. Lorsque la mesure est réalisée avec une impulsion sonde centrée sur la fréquence initiale du CO, l'absorption du CO sort du spectre de la sonde à délais positifs et la transmission augmente, d'où un signal $-\Delta T/T$ négatif. Au contraire, lorsque la mesure est réalisée avec une impulsion sonde centrée sur la fréquence finale du CO, l'absorption du CO entre dans le spectre de la sonde à délais positifs, la transmission diminue et $-\Delta T/T$ est positif.

Calcul de la moyenne macroscopique dans le cas d'une sonde très brève

Pour moyenner les contributions microscopiques, on définit deux repères illustrés dans la figure 2.7, le repère du laboratoire $(\vec{X}, \vec{Y}, \vec{Z})$ et celui lié à la protéine $(\vec{X'}, \vec{Y'}, \vec{Z'})$.

Les champs pompe et sonde sont fixes dans le repère du laboratoire, la pompe est orientée selon l'axe $\vec{Z}$, et la sonde dans le plan $(\vec{X}, \vec{Z})$ fait un angle γ avec la direction de la pompe.

Le plan de l'hème de la protéine, fixe dans le repère $(\vec{X'}, \vec{Y'}, \vec{Z'})$, correspond au plan $(\vec{X'}, \vec{Y'})$, la normale à l'hème coincïde donc avec le vecteur $\vec{Z'}$. L'orientation de la molécule de CO est donnée par ses coordonnées sphériques (α, x) dans le repère lié à la protéine. L'angle α que forme le CO avec la normale à l'hème est le même à chaque instant pour toutes les molécules considérées, par contre l'angle de précession x varie d'une molécule à l'autre.

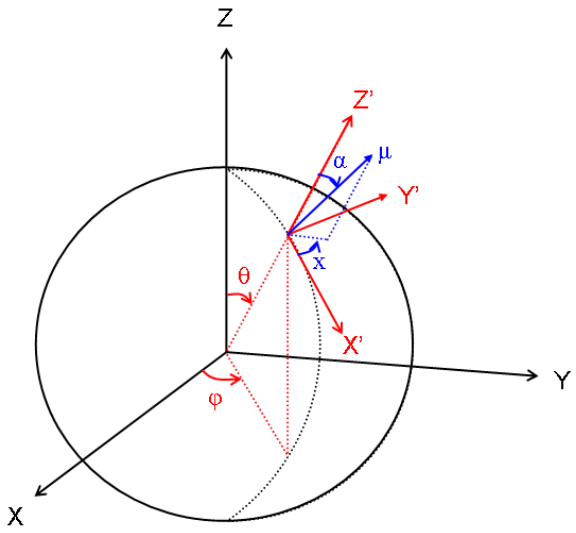


FIG. 2.7 – Repères $(\vec{X}, \vec{Y}, \vec{Z})$ et $(\vec{X'}, \vec{Y'}, \vec{Z'})$ reliés par les coordonnées sphériques (θ, φ).

On mesure le signal dû à la polarisation différentielle $\Delta\vec{\mathcal{P}}(t)$ liée aux dipôles des molécules dissociées par une pompe $\vec{u_P}$ infiniment brève d'intensité normalisée arrivant à l'instant 0. La polarisation différentielle est proportionnelle à la probabilité de dissociation. Dans le cas du CO, l'absorption d'un photon conduit à une probabilité de dissociation du CO supérieure à 90% [44] [45]. Cette absorption est maximale pour un champ pompe polarisé dans le plan de l'hème, quelle que soit son orientation dans ce plan : ceci est le cas lorsque la longueur d'onde utilisée est de 400 nm, l'hème est alors un absorbeur circulaire [37]. La probabilité de

dissociation est donc proportionnelle à l'intensité de la projection de la pompe sur le plan de l'hème, c'est à dire à $\left|\vec{u_P} \wedge \vec{Z'}\right|^2$. On calcule cette valeur dans le repère du laboratoire :

$$\vec{u_P} = u_P \, \vec{Z} \tag{2.61}$$

$$\vec{Z'} = sin\theta \, cos\varphi \, \vec{X} + sin\theta \, sin\varphi \, \vec{Y} + cos\theta \, \vec{Z} \tag{2.62}$$

$$\left|\vec{u_P} \wedge \vec{Z'}\right|^2 = u_P^2 \, sin^2\theta \tag{2.63}$$

La moyenne à calculer $\left\langle \left(\vec{\mu}^{\,*}(t_S) \cdot \vec{\mathcal{E}_S}(t_S)\right) \left(\vec{\mu}(t) \cdot \vec{\mathcal{E}_S}^{\,*}(t)\right) \right\rangle$, qui intervient dans l'expression du signal pompe-sonde (2.58), est non nulle uniquement pour des instants t et t_S contenus tous les deux dans la durée de l'impulsion sonde $\mathcal{E}_S$. En supposant que la sonde est assez brève pour que la direction du dipôle $\vec{\mu}$ varie peu entre les instants t et t_S, la moyenne s'exprime de la manière suivante :

$$\left\langle \left(\vec{\mu}^{\,*}(t_S) \cdot \vec{\mathcal{E}_S}(t_S)\right) \left(\vec{\mu}(t) \cdot \vec{\mathcal{E}_S}^{\,*}(t)\right) \right\rangle = \mu^{\,*}(t_S) \, \mathcal{E}_S(t_S) \, \mu(t) \, \mathcal{E}_S^{\,*}(t) \left\langle (\vec{u} \cdot \vec{u_S})^2 \right\rangle \tag{2.64}$$

où $\vec{u}$ et $\vec{u_S}$ sont les vecteurs unitaires directeurs de $\vec{\mu}$ et $\vec{\mathcal{E}_S}$ supposés inchangés durant la sonde.

La moyenne $\left\langle (\vec{u} \cdot \vec{u_S})^2 \right\rangle$ sur toutes les orientations (θ, φ) de la protéine par rapport au référentiel lié aux champs pompe et sonde, et sur toutes les orientations de la précession x du CO par rapport à la protéine, s'exprime alors en pondérant avec la probabilité $\left|\vec{u_P} \wedge \vec{Z'}\right|^2$ de dissocier une molécule de CO donnée :

$$\left\langle (\vec{u} \cdot \vec{u_S})^2 \right\rangle \propto \frac{1}{8\pi^2} \int_{x=0}^{2\pi} \int_{\varphi=0}^{2\pi} \int_{\theta=0}^{\pi} \left|\vec{u_P} \wedge \vec{Z'}\right|^2 (\vec{u} \cdot \vec{u_S})^2 \; sin\theta \, d\theta \, d\varphi \, dx \tag{2.65}$$

$(\vec{u} \cdot \vec{u_S})^2$ est calculé dans le repère $(\vec{X'}, \vec{Y'}, \vec{Z'})$ lié à la protéine :

$$\vec{u} = cosx\, sin\alpha\, \vec{X'} + sinx\, sin\alpha\, \vec{Y'} + cos\alpha\, \vec{Z'} \tag{2.66}$$

$$\begin{aligned} \vec{u_S} &= sin\gamma\, sin\varphi\, \vec{X'} + (sin\gamma\, cos\varphi\, cos\theta - cos\gamma\, sin\theta)\, \vec{Y'} \\ &+ (sin\gamma\, cos\varphi\, sin\theta + cos\gamma\, cos\theta)\, \vec{Z'} \end{aligned} \tag{2.67}$$

$$\begin{aligned} \vec{u} \cdot \vec{u_S} &= cosx\, sin\alpha\, sin\gamma\, sin\varphi + sinx\, sin\alpha\, (sin\gamma\, cos\varphi\, cos\theta - cos\gamma\, sin\theta) \\ &+ cos\alpha\, (sin\gamma\, cos\varphi\, sin\theta + cos\gamma\, cos\theta) \end{aligned} \tag{2.68}$$

La moyenne $\left\langle (\vec{u} \cdot \vec{u_S})^2 \right\rangle$ s'exprime alors en utilisant (2.63), (2.65) et (2.68)

$$\left\langle (\vec{u} \cdot \vec{u_S})^2 \right\rangle \propto \frac{1}{60\pi^2} \left[\left(2 + 2\, sin^2\gamma\right) + sin^2\alpha \left(2 - 3\, sin^2\gamma\right) \right] \tag{2.69}$$

Rappelons que, d'après l'expression 2.58, le signal pompe-sonde du CO s'exprime :

$$s(\tau) = \Delta\, Im \left\{ \frac{i}{\hbar} \int_{-\infty}^{+\infty} \mathrm{d}t \int_{-\infty}^{t} \mathrm{d}t_S \exp^{-i \int_{t_S}^{t} \mathrm{d}t' \omega(t')}\, \mu^*(t_S)\, \mu(t)\, \mathcal{E}_{\mathcal{S}}(t_S)\, \mathcal{E}_{\mathcal{S}}{}^*(t) \left\langle (\vec{u} \cdot \vec{u_S})^2 \right\rangle \right\} \tag{2.70}$$

D'après cette expression, le signal pompe-sonde dépend non seulement de la fréquence ω et du dipole μ, mais également de la moyenne $\left\langle (\vec{u} \cdot \vec{u_S})^2 \right\rangle$ qui varie selon l'orientation α du CO par rapport à la normale à l'hème et l'angle γ entre la pompe et la sonde.

Afin de s'affranchir du phénomène de rotation du CO par rapport à la normale à l'hème, on peut choisir l'angle γ entre la pompe et la sonde de sorte à annuler le terme de l'équation (2.69) en $sin^2\alpha$. Cet angle γ appelé "angle magique" vérifie $sin^2\gamma = 2/3$ et vaut donc $54,74°$. La moyenne $\left\langle (\vec{u} \cdot \vec{u_S})^2 \right\rangle$ est alors indépendante de α.

Dans le but de déterminer l'angle α du CO par rapport à la normale à l'hème, l'expérience pompe-sonde peut être réalisée avec différents angles γ entre les polarisations pompe et sonde. En choisissant par exemple les angles 0 et $\pi/2$ correspondant à des polarisations pompe et sonde parallèles et perpendiculaires, les signaux pompe-sonde associés $s_{\gamma=0}$ et $s_{\gamma=\pi/2}$ dépendent de α de la manière suivante :

$$s_{\gamma=\pi/2} \propto \frac{1}{60\pi^2}\left[4 - sin^2\alpha\right] \tag{2.71}$$

$$s_{\gamma=0} \propto \frac{1}{60\pi^2}\left[2 + 2\,sin^2\alpha\right] \tag{2.72}$$

$$\tag{2.73}$$

L'angle α du CO par rapport à la normale à l'hème peut alors se déduire du rapport entre les signaux pompe-sonde $s_{\gamma=\pi/2}$ et $s_{\gamma=0}$:

$$R = \frac{s_{\gamma=\pi/2}}{s_{\gamma=0}} = \frac{4 - sin^2\alpha}{2 + 2\,sin^2\alpha} \tag{2.74}$$

$$sin^2\alpha = \frac{4 - 2R}{1 + 2R} \tag{2.75}$$

2.3.4 Application à l'artefact de polarisation perturbée

Dans la partie 2.3.3, nous décrivons le signal pompe-sonde engendré par la variation des caractéristiques vibrationnelles du CO. Ce signal déclenché par la photodissociation du CO par la pompe apparaît à délai pompe-sonde positif. La raie d'absorption fine du CO est responsable également d'un signal pompe-sonde à délai négatif, qui n'est observable que dans les expériences résolues spectralement. Cet artefact est dû à la perturbation par la pompe de la polarisation linéaire induite par la sonde. Nous pouvons l'expliquer qualitativement de la manière suivante.

Avant l'arrivée de la pompe, la sonde interagit avec le CO modélisé par un système à deux niveaux a et b. La polarisation linéaire induite $\mathcal{P}^{(1)}(t)$, donnée par l'équation 2.21, décroît exponentiellement avec le temps de déphasage T_{ba}, de l'ordre de la picoseconde dans le cas de la transition du CO.

La pompe arrive ensuite à un délai $|\tau|$ après la sonde et modifie le système qui change principalement de fréquence de vibration et de force d'oscillateur. Pour les délais pompe-sonde $|\tau|$ inférieurs au temps de déphasage T_{ba}, ces modifications ont pour principal effet de perturber la polarisation linéaire induite. Ainsi, la polarisation différentielle $\Delta\mathcal{P}(t)$, tracée dans la figure 2.8, est non nulle à partir de l'instant $|\tau|$ et jusqu'au déclin de la polarisation induite par l'excitation sonde, au bout de quelques T_{ba}.

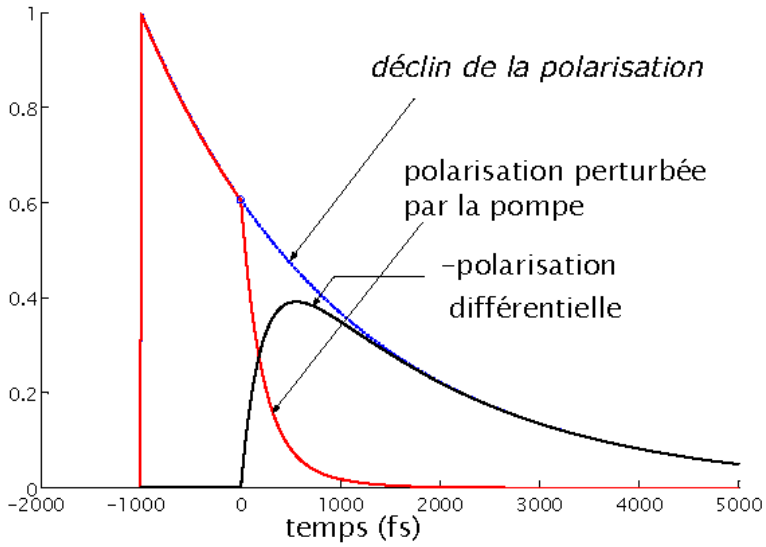


FIG. 2.8 – Déclin de la polarisation avec un temps de déphasage de 2 ps, polarisation perturbée par la pompe qui arrive à un délai de 1 ps après la sonde et polarisation différentielle, représentés dans le référentiel tournant à la fréquence de résonance ω_{ba}. L'effet de la pompe considéré ici est une modification du temps de déphasage en 1 ps, de la valeur initiale de 2 ps à une valeur finale de 400 fs. D'après [42].

Dans le domaine temporel, la polarisation différentielle $\Delta\mathcal{P}(t)$ est décalée du temps $|\tau|$ par rapport à la sonde. Dans le domaine des fréquences, $\Delta\mathcal{P}(\omega)$ présente donc des oscillations centrées autour de la fréquence de résonance ω_{ba} de période inversement proportionnelle au délai pompe-sonde $|\tau|$. Le signal pompe-sonde résolu spectralement, proportionnel à $\Delta\mathcal{P}(\omega)$ d'après l'équation 2.29, présente ainsi ces mêmes oscillations. La référence [46] montre les oscillations induites dans le cas de l'excitation résonante d'états exitoniques dans le semiconducteur GaAs (voir figure 2.9).

Dans le cas de la vibration du CO dans les hémoprotéines, le temps de déphasage, de l'ordre de la picoseconde, est assez long pour que les oscillations apparaissent sur une large plage temporelle de délais pompe-sonde négatifs.

Cet artefact de polarisation perturbée qui s'exprime à délais pompe-sonde négatifs n'apparaît pas dans les expériences intégrées spectralement [47]. En effet, la polarisation différentielle $\Delta\mathcal{P}(t)$, non nulle à partir du délai $|\tau|$ après la sonde, n'a pas de recouvrement temporel avec l'impulsion sonde $\mathcal{E}_S^*(t)$. Le signal pompe-sonde, proportionnel à l'intégrale de $\mathcal{E}_S^*(t)\,\Delta\mathcal{P}(t)$ d'après l'équation 2.30, est donc nul.

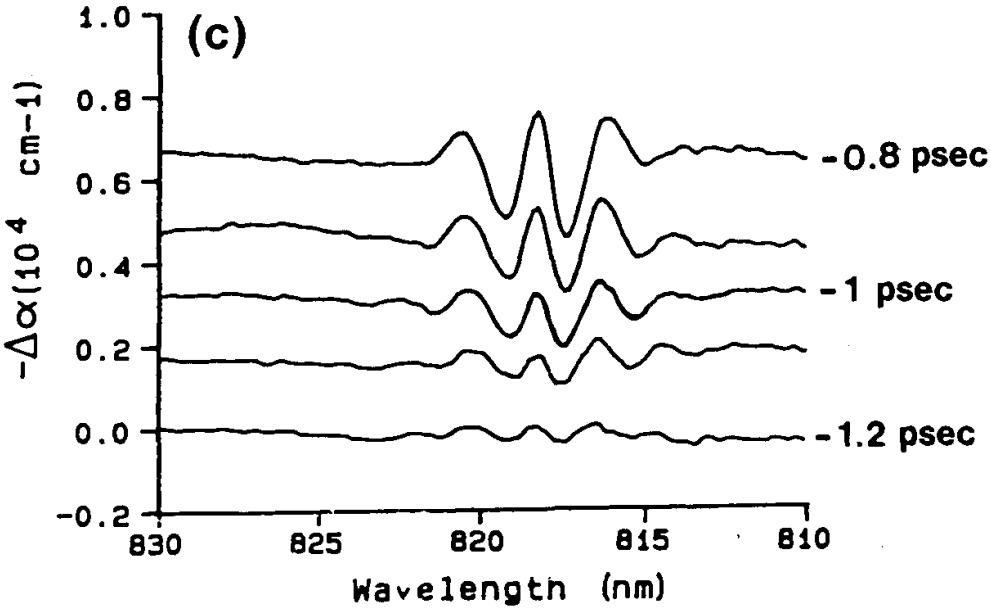


FIG. 2.9 – Spectres d'absorption différentielle de GaAs à différents délais pompe-sonde. Figure extraite de la référence [46].

Chapitre 3

Mise en œuvre expérimentale

La mise en œuvre d'expériences pompe-sonde intégrées et résolues spectralement sur la cytochrome *c* oxydase nécessite l'emploi de techniques expérimentales variées et a donné lieu à l'optimisation et l'adaptation de deux dispositifs de spectroscopie.

Dans une première partie 3.1, les dispositifs pompe-sonde sont décrits, la génération par différence de fréquence du faisceau sonde dans le domaine infrarouge est détaillée tout particulièrement. Les mesures des caractéristiques importantes de ces montages sont exposées ensuite dans la partie 3.2. Nous mesurons le spectre de la sonde infrarouge nécessaire au réglage du faisceau et à l'acquisition du signal pompe-sonde dans le cas des expériences résolues spectralement, et la corrélation croisée des impulsions pompe et sonde qui permet le réglage du signal pompe-sonde et apporte des informations sur les caractéristiques temporelles de l'expérience.

Dans la partie 3.4, les différentes étapes de la préparation de la cytochrome *c* oxydase sont présentées, de sa purification à partir du cœur de bœuf, à son installation au niveau du dispositif pompe-sonde.

Le dispositif qui réalise les expériences pompe-sonde intégrées spectralement a été amélioré au niveau de la puissance de la sonde et la durée de la pompe, et de nouveaux systèmes ont été mis en place pour effectuer des mesures d'anisotropie et des comparaisons entre différents échantillons. Ces optimisations sont présentées dans la partie 3.5. La mise en œuvre de l'expérience résolue spectralement au niveau du second dispositif est exposée dans la partie 3.6, principalement la mise en place du faisceau pompe à 400 nm et de la détection synchrone à 500 Hz qui permet d'acquérir les spectres différentiels pompe-sonde à cette cadence.

3.1 La sonde infrarouge et la pompe visible

3.1.1 Dispositifs

Deux dispositifs ont été exploités lors de ce travail de thèse, le premier dispositif, nommé "montage 1" dans ce manuscrit, est utilisé pour les expériences pompe-sonde intégrées spectralement et le second, nommé "montage 2", permet d'effectuer les expériences pompe-sonde résolues spectralement.

Les montages optiques réalisés pour mener à bien ces expériences sont effectués à partir de faisceaux provenant de sources commerciales différentes :

Le montage 1 est basé sur une source commerciale Cohérent qui délivre des impulsions de longueur d'onde 800 nm, de durée 150 femtosecondes à une cadence de 100 kHz. L'énergie par impulsion est de 6 μJ ce qui correspond à une puissance moyenne de 600 mW.

Ce dispositif est centré sur un oscillateur à verrouillage de modes (Vitesse, Coherent) de Saphir dopé au Titane, qui délivre des impulsions à 800 nm de quelques nJ et de durée d'environ 100 fs à une cadence de 80 MHz. Cet oscillateur est pompé par un laser Nd :YVO_4 doublé à 532 nm (Verdi 2 Watts, Coherent), puis il est amplifié par un amplificateur régénératif (RegA, Coherent) [48] dont le cristal de Saphir dopé au Titane est également pompé en continu à 532 nm (Verdi 10 Watt, Coherent). La cadence est abaissée par un dispositif acousto-optique qui sélectionne les impulsions à injecter dans la cavité de l'amplificateur.

Le montage 2 est construit à partir d'un laser (Hurricane, Spectra Physics) qui délivre des impulsions à 800 nm de durée 160 fs à une cadence de 1 kHz. Le laser Hurricane comprend un oscillateur de Saphir dopé au Titane (MaïTaï) et un amplificateur régénératif de taux de répétition de 1 kHz et son laser de pompe (Evolution 10 W), un étireur et un compresseur.

L'énergie de ce dispositif est divisée entre différentes expériences, nous disposons pour la nôtre d'environ 300 mW, soit 300 μJ par impulsion. On dispose également dans ce montage d'un faisceau étiré prélevé avant le compresseur de l'amplificateur, ce faisceau sert à la mesure du spectre infrarouge par la méthode de conversion de fréquence vers le visible.

Dans les deux cas, le faisceau sonde infrarouge à 5 μm et le faisceau pompe à 400 nm sont générés à partir du faisceau à 800 nm en sortie de nos dispositifs commerciaux à l'aide

de processus non linéaires. Le faisceau à 800 nm est divisé en deux parties par une lame séparatrice (montage 1) ou un cube polariseur précédé d'une lame demi-onde (montage 2) :

La pompe à 400 nm est obtenue à partir du premier faisceau à 800 nm par doublage de fréquence dans un cristal biréfringent de BBO utilisé en configuration de type I. La platine de translation permettant de faire varier le délai temporel entre la pompe et la sonde est installée sur le trajet du faisceau à 800 nm juste avant le doublage de fréquence.

La sonde est générée en deux temps à partir du second faisceau : tout d'abord une partie de ce second faisceau est focalisée dans une lame de saphir pour créer un continuum spectral par automodulation de phase. La longueur d'onde 1,4 μm de ce continuum est alors amplifiée à travers un amplificateur paramétrique optique (OPA) à deux étages, pompés par le reste du faisceau à 800 nm. Ces deux étages d'amplification sont mis en œuvre dans le même cristal non linéaire dans le montage 2, et dans deux cristaux différents dans le montage 1. Dans les deux cas, le cristal utilisé est un cristal de BBO en configuration de type II .

Les faisceaux "signal" à 1,4 μm et "complémentaire" à 1,9 μm en sortie de l'OPA ainsi générés sont alors séparés, puis recombinés après un délai pompe-sonde variable par des lames dichroïques en assurant leur superposition temporelle et spatiale dans un cristal biréfringent où ils sont focalisés afin d'induire par différence de fréquence le faisceau sonde infrarouge vers 5 μm. Le cristal biréfringent utilisé est un cristal de $AgGaS_2$ en configuration de type II dans le premier montage, et un cristal de GaSe en configuration de type I dans le second montage.

L'OPA et la différence de fréquence dans le cristal $AgGaS_2$ sont décrits avec plus de détails dans la référence [49].

Dans le premier montage, l'OPA et la génération d'infrarouge ont été réalisés par Emmanuel Péronne et Jean-François Lampin, puis remontés et stabilisés par Thomas Polack. Dans le second montage, l'OPA et la génération d'infrarouge ont été réalisés par Kevin J. Kubarych et Manuel Joffre.

Ces dispositifs donnent la possibilité d'accorder la fréquence du faisceau infrarouge sur une large plage spectrale, uniquement en modifiant les angles d'accord de phase des cristaux de l'OPA et de la différence de fréquence. La fréquence infrarouge peut ainsi être ajustée à la

résonance de l'échantillon à étudier.

La génération du continuum spectral est due à l'effet Kerr optique. Ce processus non linéaire du troisième ordre est décrit dans la partie B.2.1 de l'Annexe B. Le doublage de fréquence permettant de générer la pompe, l'amplification paramétrique qui intervient au niveau de l'OPA et la différence de fréquence qui produit l'infrarouge sont des processus non linéaires d'ordre 2. Les calculs aboutissant à l'expression des champs générés aux nouvelles fréquences sont exposés dans la partie B.1 pour des champs monochromatiques.

3.1.2 Modélisation du faisceau infrarouge

Le calcul de la puissance du faisceau infrarouge généré par différence de fréquence est donné dans la partie B.1.2 de l'Annexe B pour des ondes monochromatiques. A partir de ce calcul généralisé pour des impulsions large-bande, le faisceau infrarouge obtenu dans nos expériences est modélisé.

Données

Les cristaux biréfringents utilisés pour générer l'infrarouge par différence de fréquence ne sont pas les mêmes dans les deux expériences. L'expérience intégrée spectralement comporte un cristal d'$AgGaS_2$ en type II, et l'expérience résolue spectralement, un cristal de GaSe en type I. L'épaisseur du cristal biréfringent utilisé est notée L et ses indices ordinaire et extraordinaire sont notés n_o^i et n_e^i. En inclinant l'axe extraordinaire du cristal par rapport à la polarisation du faisceau d'un angle θ, on peut avoir accès à des indices de valeurs intermédiaires $n_e^i(\theta)$.

Les faisceaux signal et complémentaire sont modélisés par des gaussiennes, de fréquences centrales ω_{s0} et ω_{c0}, de largeurs spectrales à mi-hauteur $\Delta\omega_s$ et $\Delta\omega_c$, et de phase quadratique Φ_s" et Φ_c" (définies dans la partie A.3 de l'Annexe A). En ce qui concerne l'expérience intégrée spectralement, ces caractéristiques, déterminées à l'aide des mesures d'interférométrie exposées dans la partie 3.2.1, prennent les valeurs suivantes :

* $\sigma_{s0} = 7250\,cm^{-1}$ et $\sigma_{c0} = 5250\,cm^{-1}$.
* $\Delta\sigma_s = \Delta\sigma_c = 150\,cm^{-1}$
* $\Phi_s" = \Phi_c" = 4000\,fs^2$

Dans le cas de l'expérience résolue spectralement, on peut considérer que le dispositif est assez similaire et délivre des impulsions signal et complémentaire de caractéristiques semblables.

A partir de ces données, la fréquence centrale ω_{IR0}, la largeur spectrale $\Delta\omega_{IR}$ et la phase quadratique $\Phi_{IR}"$ de l'impulsion infrarouge sont calculées. L'effet de la phase quadratique des impulsions signal et complémentaire est étudié et les deux type d'accord de phase I et II sont comparés.

Accord de phase

Considérons la différence de fréquence entre les composantes de fréquences centrales ω_{s0} et ω_{c0} des faisceaux signal et complémentaire. Ce processus génère une composante infrarouge monochromatique de fréquence $\omega_{IR0} = \omega_{s0} - \omega_{c0}$. Le désaccord de phase correspondant $\Delta k(\omega_{IR0}, \omega_{c0}, \theta)$ est calculé selon le type d'accord de phase considéré.

En type I, les faisceaux infrarouge et complémentaire sont polarisés selon l'axe ordinaire du cristal et le faisceau signal est polarisé selon l'axe extraordinaire, le désaccord de phase $\Delta k_{ooe}(\omega_{IR0}, \omega_{c0}, \theta)$ s'écrit :

$$\Delta k_{ooe}(\omega_{IR0}, \omega_{c0}, \theta) = \frac{1}{c}\left(n_e^{s0}(\theta).\,(\omega_{IR0} + \omega_{c0}) - n_o^{c0}.\omega_c - n_o^{IR0}.\omega_{IR0}\right) \tag{3.1}$$

En type II, le faisceau complémentaire est polarisé selon l'axe ordinaire du cristal, et les faisceaux signal et infrarouge sont polarisés selon l'axe extraordinaire, le désaccord de phase $\Delta k_{eoe}(\omega_{IR0}, \omega_{c0}, \theta)$ s'écrit :

$$\Delta k_{eoe}(\omega_{IR0}, \omega_{c0}, \theta) = \frac{1}{c}\left(n_e^{s0}(\theta).\,(\omega_{IR0} + \omega_{c0}) - n_o^{c0}.\omega_{c0} - n_e^{IR0}(\theta).\omega_{IR0}\right) \tag{3.2}$$

Les désaccords de phase Δk_{eoe} et Δk_{ooe} dans les cristaux de $AgGaS_2$ et GaSe sont tracés à la figure 3.1. Dans chaque cas, l'angle pour lequel la condition d'accord de phase $\Delta k = 0$ est réalisée est calculé.

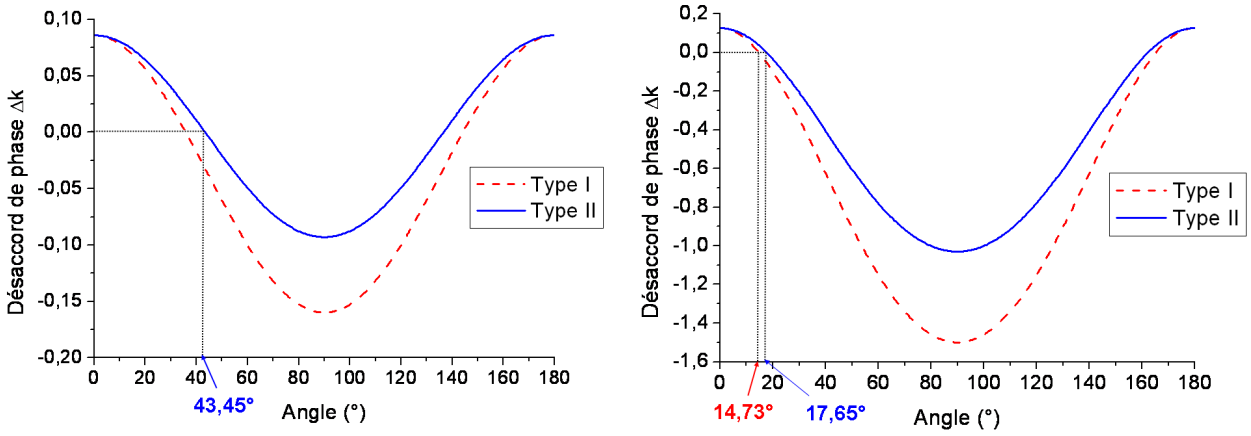


FIG. 3.1 – Désaccord de phase calculé dans le cas de la différence de fréquence, dans les cristaux biréfringents de $AgGaS_2$ à gauche et GaSe à droite, entre deux faisceaux monochromatiques signal et complémentaire de nombres d'onde respectifs 7250 cm^{-1} et 5250 cm^{-1} . Les courbes en pointillés correspondent à la configuration de type I et les courbes en traits pleins à la configuration de type II. Les angles d'accord de phase sont donnés pour les cas étudiés par la suite.

Pour les calculs qui suivent, l'orientation du cristal θ est choisie de manière à réaliser l'accord de phase pour la différence de fréquence entre les composantes monochromatiques centrales des faisceaux signal et complémentaire, et $\Delta k(\omega_{IR}, \omega_c)$ désigne le désaccord de phase correspondant à cet angle θ pour les composantes spectrales ω_{IR} et ω_c des faisceaux infrarouge et complémentaire.

Champ infrarouge

Chaque composante spectrale du champ infrarouge à la fréquence ω_{IR} est générée par l'ensemble des composantes spectrales d'amplitudes $\mathcal{A}_s(\omega_s)$ et $\mathcal{A}_c(\omega_c)$ des faisceaux signal et complémentaire, dont les fréquences ω_s et ω_c vérifient $\omega_{IR} = \omega_s - \omega_c$.

Dans le cas de non déplétion des faisceaux incidents, chaque couple de composantes monochromatiques $\mathcal{A}_s(\omega_{IR}+\omega_c)$ et $\mathcal{A}_c(\omega_c)$ génère, d'après l'équation B.14, la composante infrarouge suivante :

$$\mathcal{A}_{IR}^{mon}(\omega_{IR}) \propto \chi^{(2)}\, \omega_{IR}\, \mathcal{A}_s(\omega_{IR}+\omega_c)\, \mathcal{A}_c^*(\omega_c)\, \frac{e^{i\Delta k(\omega_{IR},\omega_c)L} - 1}{i\Delta k(\omega_{IR},\omega_c)} \tag{3.3}$$

L'efficacité de la différence de fréquence est donnée par le facteur d'accord de phase $\chi(\omega_{IR}, \omega_c)$ défini de la manière suivante :

$$\chi(\omega_{IR},\omega_c) = \chi^{(2)}\,\frac{e^{i\Delta k(\omega_{IR},\omega_c)L}-1}{i\Delta k(\omega_{IR},\omega_c)} \tag{3.4}$$

En intégrant sur tous les couples de fréquences $\omega_{IR}+\omega_c$ et ω_c pouvant engendrer la fréquence ω_{IR}, l'amplitude $\mathcal{A}_{IR}(\omega_{IR})$ de la composante ω_{IR} du spectre infrarouge s'écrit :

$$\mathcal{A}_{IR}(\omega_{IR}) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} \chi^{(2)}\,\omega_{IR}\,\mathcal{A}_s(\omega_{IR}+\omega_c)\,\mathcal{A}_c^*(\omega_c)\,\frac{e^{i\Delta k(\omega_{IR},\omega_c)L}-1}{i\Delta k(\omega_{IR},\omega_c)}\,d\omega_c \tag{3.5}$$

On en déduit ainsi l'intensité spectrale de l'impulsion infrarouge, $I_{IR}(\omega_{IR})$, et la phase quadratique, $\Phi"(\omega_{IR})$, définies de la manière suivante :

$$I_{IR}(\omega_{IR}) = \mathcal{A}_{IR}(\omega_{IR})\mathcal{A}_{IR}^*(\omega_{IR}) \tag{3.6}$$

$$\Phi"(\omega_{IR}) = \frac{d^2\varphi_{IR}(\omega_{IR})}{d\omega_{IR}^2} \tag{3.7}$$

où la phase φ_{IR} est définie à partir de l'amplitude $\mathcal{A}_{IR}$ par la relation $\mathcal{A}_{IR} = |\mathcal{A}_{IR}|\ e^{i\varphi_{IR}}$.

Effet de la phase quadratique des faisceaux signal et complémentaire

Dans l'expérience pompe-sonde intégrée spectralement, la différence de fréquence est produite au niveau d'un cristal de $AgGaS_2$ d'épaisseur 1 mm, taillé en configuration de type II. Le facteur d_{eff} (correspondant à $\chi^{(2)}/2$) donné par le logiciel SNLO pour ce type d'accord de phase présente un facteur de 15,3 pm/V, supérieur à celui de l'accord de phase de type I qui vaut 9,54 pm/V. Le faisceau infrarouge généré, d'intensité proportionnelle à $\left|\chi^{(2)}\right|^2$, est donc plus intense en configuration de type II. D'après la figure 3.1, la condition d'accord de phase est réalisée pour un angle de 43,45°. Le champ infrarouge est calculé pour cet angle en utilisant les paramètres des faisceaux signal et complémentaire donnés dans la partie 3.1.2.

Dans un premier temps, le facteur d'accord de phase $\chi(\omega_{IR},\omega_c)$ défini par la relation 3.4 est représenté dans la figure 3.2. L'efficacité de conversion est maximale sur la droite correspondant à la condition d'accord de phase $\Delta k = 0$, et chute quand on s'éloigne de cette droite. Pour une fréquence ω_c fixée, la plage spectrale sur laquelle l'infrarouge peut être généré est déterminée par la largeur de la zone en rouge.

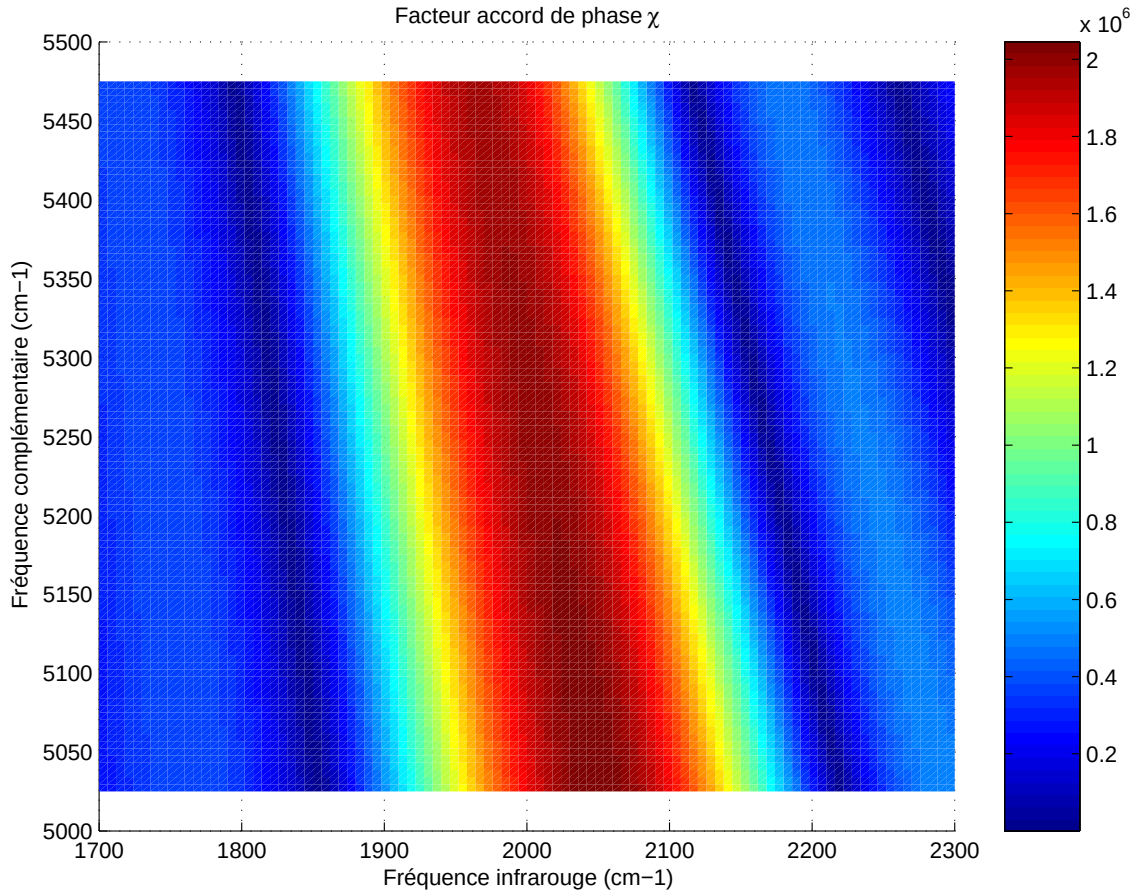


FIG. 3.2 – Facteur d'accord de phase calculé pour un cristal de $AgGaS_2$ taillé à l'angle de 43,45°, selon la fréquence du faisceau complémentaire et du faisceau infrarouge généré.

Le spectre du faisceau infrarouge ainsi que sa phase quadratique sont ensuite calculés. La largeur spectrale à mi-hauteur du faisceau infrarouge,mesurée à la figure 3.3, est de 100 cm^{-1}, et sa phase quadratique est d'environ 300 fs^2. Ces caractéristiques permettent d'évaluer, à l'aide de la relation A.23 de l'Annexe A, la durée de l'impulsion infrarouge à 147 fs. Cette durée est égale à moins d'une femtoseconde près à la durée de l'impulsion limitée par transformée de Fourier. La phase quadratique de 300 fs^2 est effectivement très faible et n'a que très peu d'influence.

L'effet des phases quadratiques Φ_s" et Φ_c" des impulsions signal et complémentaire est étudié en calculant le champ infrarouge pour les valeurs de phases quadratiques $\Phi_s" = \Phi_c" = 0\, fs^2$ et $\Phi_s" = \Phi_c" = 20000\, fs^2$. Les spectres infrarouges obtenus dans ces deux cas sont également tracés sur la figure 3.3.

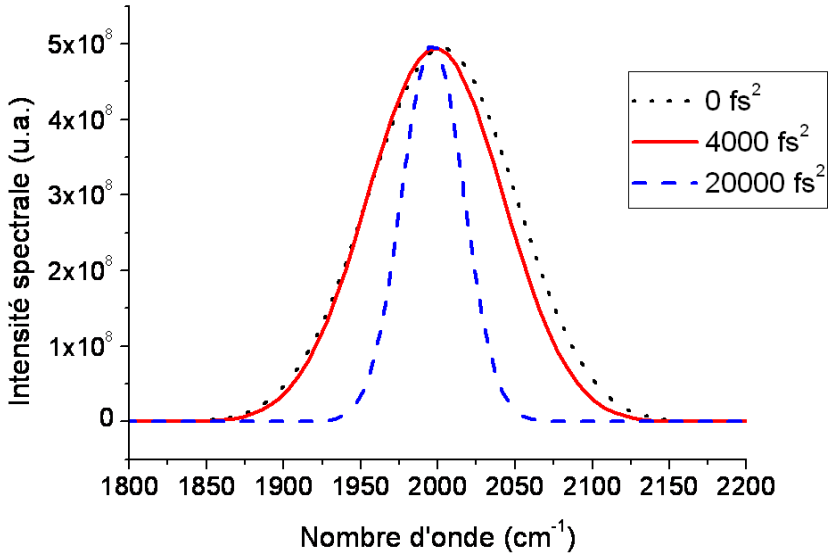


FIG. 3.3 – Spectre calculé de l'impulsion infrarouge obtenue par différence de fréquence entre les impulsions signal et complémentaire pour des valeurs de la phase quadratique des impulsions signal et complémentaire suivantes : 0, 4000 et 20 000 fs^2. La largeur spectrale de l'impulsion infrarouge obtenue vaut respectivement 112 cm^{-1}, 102 cm^{-1} et 47 cm^{-1}.

L'impulsion infrarouge générée par des faisceaux signal et complémentaire de phase quadratique nulle a quasiment les mêmes caractéristiques que l'impulsion calculée précédemment à partir de faisceaux de phase quadratique 4000 fs^2. La largeur de cette impulsion est de 110 cm^{-1} et sa phase quadratique de 65 fs^2 est également négligeable. L'impulsion générée par des faisceaux de phase quadratique 20000 fs^2 est en revanche beaucoup plus étroite spectralement avec une largeur de 47 cm^{-1}, et plus chirpée avec une phase quadratique de 1700 fs^2. Ce chirp reste cependant assez faible, la durée de l'impulsion calculée à l'aide de la relation A.23 donne une valeur de 312 fs, pratiquement identique à la durée limitée par transformée de Fourier.

Une phase quadratique importante au niveau des impulsions signal et complémentaire a pour effet d'affiner la largeur spectrale de l'impulsion infrarouge. Un tel affinement permettrait d'augmenter l'amplitude des signaux pompe-sonde intégrés spectralement, mais dégraderait la résolution temporelle de l'expérience. Dans notre cas, la phase de 4000 fs^2 a très peu d'influence sur le faisceau infrarouge généré, la résolution temporelle est donc peu affectée.

Effet du type d'accord de phase

Dans le cas de l'expérience pompe-sonde résolue spectralement, la différence de fréquence est produite au niveau d'un cristal de GaSe d'épaisseur 1 mm. Ce cristal ne peut pas être taillé à l'angle d'accord de phase à cause de sa friabilité, il doit donc être incliné par rapport au faisceau incident extraordinaire de sorte à ce que l'angle entre la polarisation du faisceau et l'axe extraordinaire du cristal soit égal à l'angle d'accord de phase. Dans les deux configurations possibles d'accord de phase, le facteur d_{eff} est semblable, de valeur 56,6 pm/V en type I et 51,3 pm/V en type II. Ces deux configurations sont donc étudiées. D'après la figure 3.1, l'angle d'accord de phase est de 14,73° pour la configuration de type I et 17,65° pour la configuration de type II.

Les facteurs d'accord de phase $\chi(\omega_{IR}, \omega_c)$ calculés dans les deux configurations sont représentés sur les figures 3.4 et 3.5.

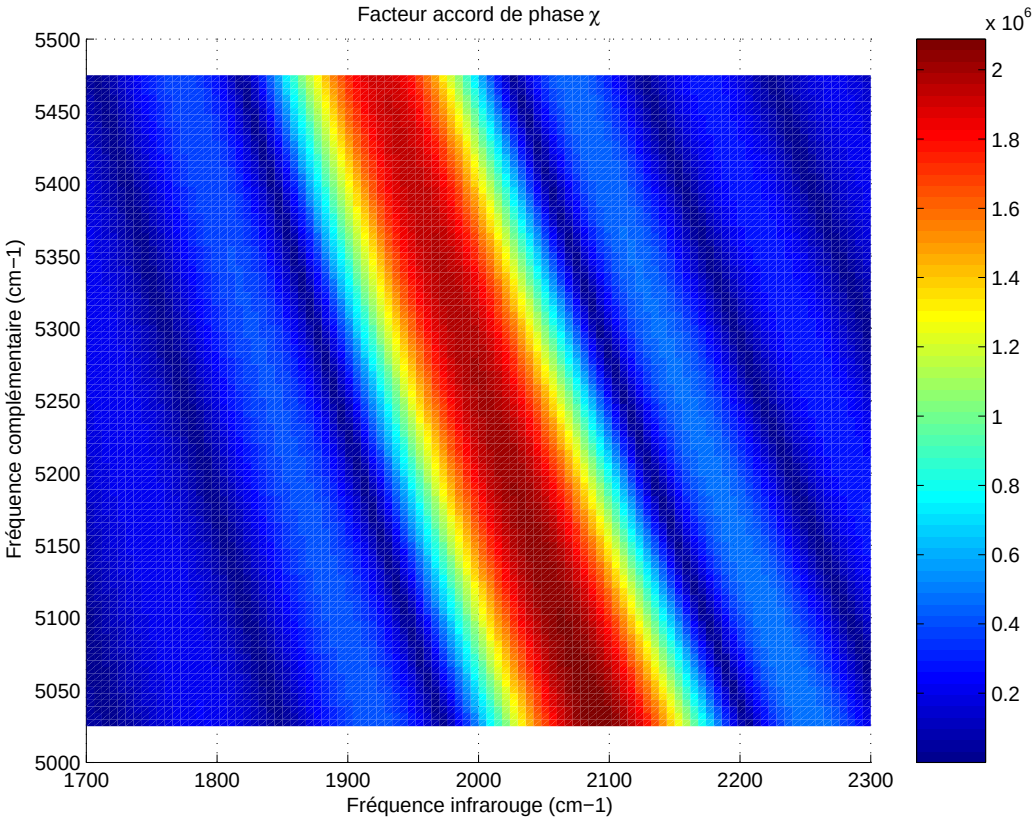


FIG. 3.4 – Facteur d'accord de phase calculé pour un cristal de GaSe selon la fréquence du faisceau complémentaire et du faisceau infrarouge généré. Le cristal est à l'angle d'accord de phase 14,73° en configuration de type I.

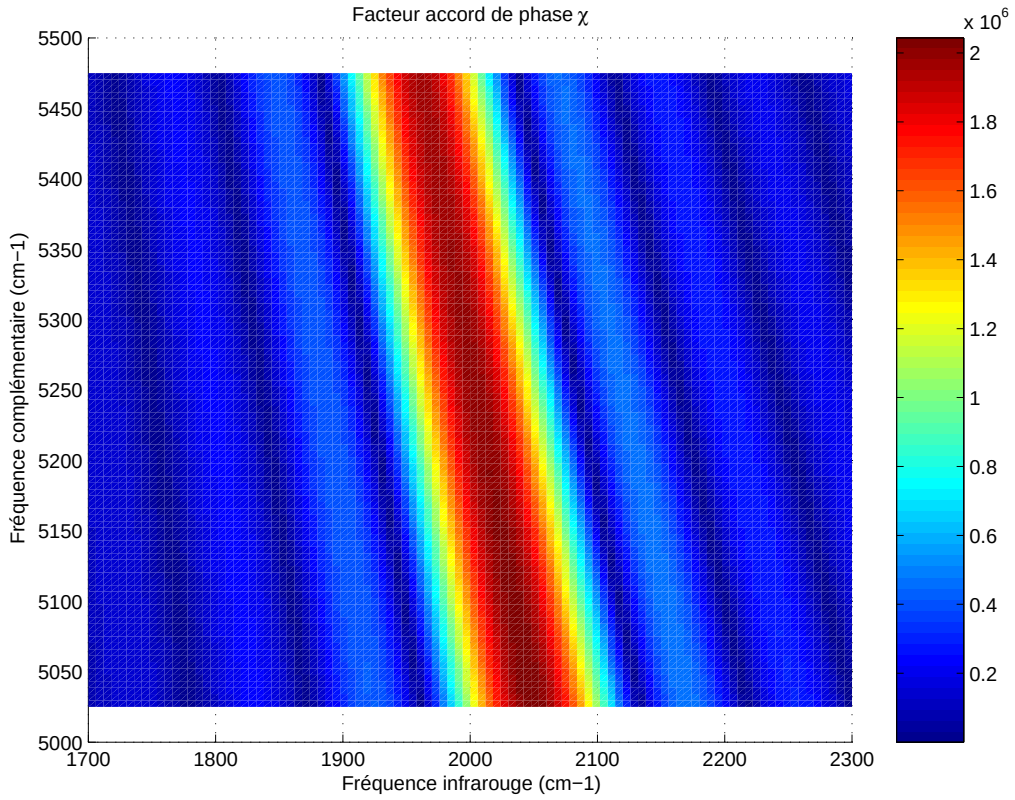


FIG. 3.5 – Facteur d'accord de phase calculé pour un cristal de GaSe selon la fréquence du faisceau complémentaire et du faisceau infrarouge généré. Le cristal est à l'angle d'accord de phase 17,65° en configuration de type II.

Les spectres des faisceaux infrarouges sont tracés dans les deux cas sur la figure 3.6, qui montre que le faisceau infrarouge est plus large spectralement dans la configuration de type I : la largeur spectrale $\Delta\sigma_{IR}$ est de 95 cm^{-1} en type I, et 70 cm^{-1} en type II. La phase quadratique est d'environ -1400 fs^2 dans les deux cas, ainsi, de même que dans les exemples traités dans la partie précédente, on peut montrer que l'impulsion est quasiment limitée par transformée de Fourier et que sa durée est de 163 fs en type I et 220 fs en type II.

La configuration de type I est choisie car le spectre plus large du faisceau infrarouge généré permet de mesurer la transmission de l'échantillon étudié sur une plus large plage spectrale dans le domaine infrarouge. De plus, la durée plus faible de cette impulsion peut laisser espérer une meilleure résolution temporelle, à condition que les mesures ne soient pas dégradées par les artefacts de cohérence décrits dans la partie 2.3.4 du chapitre 2.

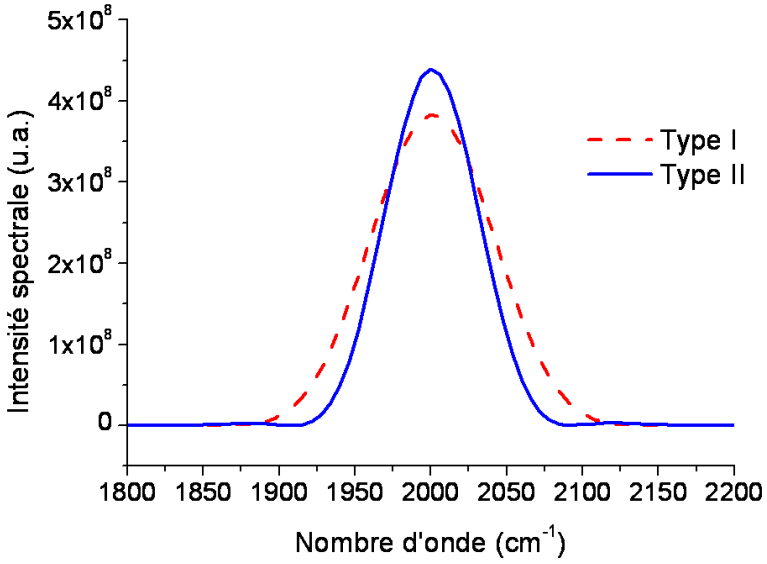


FIG. 3.6 – Spectre calculé de l'impulsion infrarouge obtenue par différence de fréquence dans le cristal de GaSe pour les configuration de type I et II. La largeur spectrale vaut 90 cm^{-1} en type I et 67 cm^{-1} en type II.

3.2 Caractérisation du faisceau infrarouge

La mesure du spectre d'une impulsion dans le domaine infrarouge peut être réalisée selon différentes méthodes : à l'aide d'un montage d'interférométrie par transformée de Fourier et d'un détecteur infrarouge HgCdTe, en utilisant un détecteur multicanal HgCdTe derrière un spectromètre, ou encore par une nouvelle technique mise au point au laboratoire utilisant la somme de fréquence entre le faisceau infrarouge et un faisceau visible étiré pour détecter le faisceau visible obtenu avec un détecteur CCD [50].

L'interférométrie par transformée de Fourier, utilisée pour régler la sonde de l'expérience intégrée spectralement, est exposée dans la partie 3.2.1. Le montage de conversion de fréquence vers le visible, mis en place dans l'expérience résolue spectralement, est abordée ensuite dans la partie 3.2.2.

3.2.1 Interférométrie par transformée de Fourier

Principe de base de l'interférométrie temporelle par transformée de Fourier

Un dispositif d'interférométrie temporelle par transformée de Fourier, destiné à mesurer le spectre d'une impulsion de champ $\mathcal{E}(t)$, est composé d'un interféromètre dont le délai τ entre les deux bras est variable, et d'un détecteur intégrateur qui mesure l'intensité lumineuse à la sortie de l'interféromètre en fonction du délai τ. Ce signal est proportionnel à l'autocorrelation du champ électrique $\mathcal{E}(t)$:

$$s(\tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} |\,\mathcal{E}(t-\tau)+\mathcal{E}(t)|^2\,dt \tag{3.8}$$

$$= 2\int_{-\infty}^{+\infty} |\mathcal{E}(t)|^2\,dt + \int_{-\infty}^{+\infty} \big(\mathcal{E}^*(t-\tau)\mathcal{E}(t)+\mathcal{E}(t-\tau)\mathcal{E}^*(t)\big)dt \tag{3.9}$$

La transformée de Fourier de ce signal s'écrit :

$$s(\omega) = 4\pi\,\delta(\omega)\int_{-\infty}^{+\infty} |\mathcal{E}(t)|^2\,dt + |\,\mathcal{E}(\omega)|^2 + |\,\mathcal{E}(-\omega)|^2 \tag{3.10}$$

Cette transformée de Fourier est somme de trois composantes centrées aux fréquences 0, $-\omega_0$ et ω_0, où ω_0 est la fréquence centrale du champ $\mathcal{E}(t)$ à caractériser. Le spectre $|\,\mathcal{E}(\omega)|^2$ à mesurer est donné par la composante centrée à ω_0.

Principe

Dans l'expérience intégrée spectralement, le spectre infrarouge de la sonde est mesuré par interférométrie temporelle par transformée de Fourier. Cette méthode permet l'acquisition de spectres sur une vaste plage spectrale et ne nécessite que l'emploi d'un détecteur intégrateur placé en sortie d'un interféromètre.

Dans notre cas, le champ infrarouge à caractériser, obtenu à partir du cristal biréfringent de $AgGaS_2$, est très divergent, ce qui rend la mise en œuvre d'un interféromètre dans ce domaine de longueurs d'onde très délicate. L'interféromètre destiné à mesurer le spectre de l'onde infrarouge n'est donc pas directement monté au niveau du faisceau infrarouge, mais juste avant le cristal $AgGaS_2$, au niveau des faisceaux signal et complémentaire. L'intensité infrarouge détectée résulte des figures d'interférences de ces faisceaux.

Afin de calculer le spectre infrarouge, notons $\mathcal{E}_s(t)$ le champ du signal et $\mathcal{E}_c(t)$ le champ du complémentaire. Le champ total $\mathcal{E}(t)$ en sortie de l'interféromètre est la somme de quatre termes, correspondant aux faisceaux signal et complémentaire divisés entre les deux voies de l'interféromètre :

$$\mathcal{E}(t) = \mathcal{E}_c(t) + \mathcal{E}_c(t-\tau) + \mathcal{E}_s(t) + \mathcal{E}_s(t-\tau) \tag{3.11}$$

Ce champ $\mathcal{E}(t)$ arrive sur le cristal $AgGaS_2$ qui génère le champ infrarouge $\mathcal{E}_{IR}(t)$ par différence de fréquence entre onde signal et onde complémentaire :

$$\mathcal{E}_{IR}(t,\tau) \propto \mathcal{E}_c^*(t)\mathcal{E}_s(t) + \mathcal{E}_c^*(t-\tau)\mathcal{E}_s(t-\tau) + \mathcal{E}_c^*(t-\tau)\mathcal{E}_s(t) + \mathcal{E}_c^*(t)\mathcal{E}_s(t-\tau) \tag{3.12}$$

où le facteur d'accord de phase a été négligé.

L'intensité infrarouge mesurée par le détecteur s'écrit alors :

$$s(\tau) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} |\,\mathcal{E}_{IR}(t,\tau)|^2\, dt \tag{3.13}$$

L'intensité $s(\tau)$ est somme de cinq termes qui oscillent avec le délai τ :

$$s_0(\tau) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} \left(|\mathcal{E}_c^*(t-\tau)\mathcal{E}_s(t)|^2 + |\mathcal{E}_c^*(t)\mathcal{E}_s(t-\tau)|^2 \right) dt \tag{3.14}$$

$$s_{\omega_s}(\tau) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} \mathcal{E}_s(t)\mathcal{E}_s^*(t-\tau) \left(|\mathcal{E}_c(t)|^2 + |\mathcal{E}_c(t-\tau)|^2 \right) dt + c.c. \tag{3.15}$$

$$s_{\omega_c}(\tau) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} \mathcal{E}_c(t)\mathcal{E}_c^*(t-\tau) \left(|\mathcal{E}_s(t)|^2 + |\mathcal{E}_s(t-\tau)|^2 \right) dt + c.c. \tag{3.16}$$

$$s_{\omega_{IR}}(\tau) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} \mathcal{E}_c^*(t)\mathcal{E}_s(t)\mathcal{E}_c(t-\tau)\mathcal{E}_s^*(t-\tau)\, dt + c.c. \tag{3.17}$$

$$s_{\omega_s+\omega_c}(\tau) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} \mathcal{E}_c^*(t-\tau)\mathcal{E}_c(t)\mathcal{E}_s^*(t-\tau)\mathcal{E}_s(t)\, dt + c.c. \tag{3.18}$$

où *c.c.* désigne le complexe conjugué de l'expression précédente.

Le terme $s_0(\tau)$ correspond à la correlation croisée en intensité entre signal et complémentaire, les termes $s_{\omega_s}(\tau)$, $s_{\omega_c}(\tau)$ et $s_{\omega_{IR}}(\tau)$ sont proportionnels aux autocorrelations des champs respectifs signal, complémentaire et infrarouge, et le terme $s_{\omega_s+\omega_c}(\tau)$ correspond à l'autocorrelation du produit des champs signal et complémentaire.

La transformée de Fourier de $s(\tau)$ comporte ainsi du côté des fréquences positives les cinq composantes spectrales $s_0(\omega)$, $s_{\omega_s}(\omega)$, $s_{\omega_c}(\omega)$, $s_{\omega_{IR}}(\omega)$ et $s_{\omega_s+\omega_c}(\omega)$, centrées respectivement aux fréquences 0, ω_s, ω_c, ω_{IR} et $\omega_s+\omega_c$. La composante spectrale centrée autour de la fréquence infrarouge ω_{IR} correspond au spectre de l'onde infrarouge. Les spectres des faisceaux signal et complémentaire sont également obtenus à partir des composantes respectives centrées à ω_s et ω_c.

Le délai τ entre les bras de l'interféromètre est contrôlé par un moteur à courant continu dont la position est déterminée à l'aide des franges d'interférence d'un laser He-Ne qui se propage dans l'interféromètre superposé aux faisceaux signal et complémentaire.

Échantillonnage

Il convient de choisir astucieusement le pas d'échantillonnage afin d'éviter les problèmes de recouvrement de spectre [51].

Échantillonnage

La transformée de Fourier d'un signal $S(t)$ échantillonné avec un pas $\Delta\tau$ correspond à la convolution de son spectre $S(\omega)$ avec un peigne de Dirac de période $\Delta\Omega = 2\pi/\Delta\tau$. Afin de récupérer le spectre $S(\omega)$, le pas d'échantillonnage doit être judicieusement choisi afin d'éviter tout recouvrement entre deux répliques de ce spectre.

Dans le cas d'un signal optique réel de largeur spectrale $\Delta\omega$ centré autour de ω_0, la condition pour que deux répliques successives du spectre ne se superposent pas est donnée par le critère de Nyquist :

$$\Delta\Omega \geq 2\Delta\omega \tag{3.19}$$

Le recouvrement entre les répliques positives et négatives du spectre doit être également évité. Cette condition est satisfaite s'il n'existe aucun entier relatif k tel que :

$$|k\Delta\Omega - \omega_0| < \frac{\Delta\omega}{2} \tag{3.20}$$

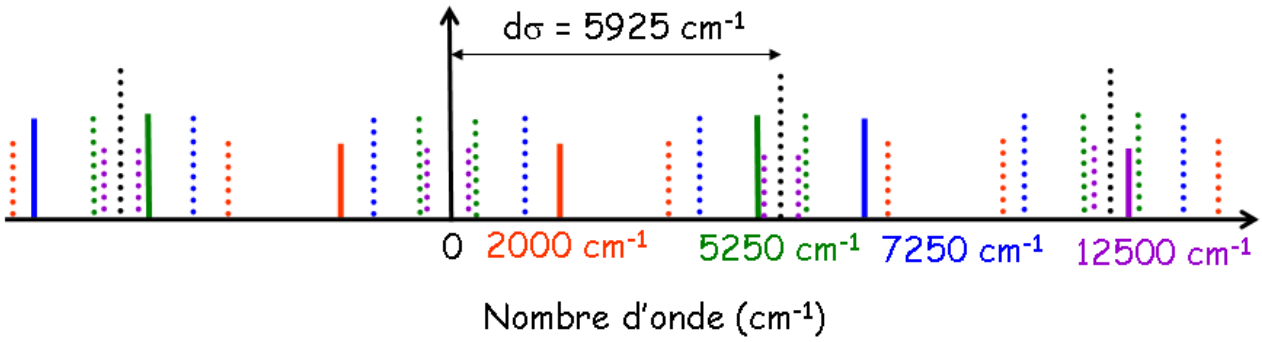


FIG. 3.7 – Les différentes composantes spectrales correspondant aux nombres d'onde 0 cm^{-1} en noir, 2000 cm^{-1} en rouge, 5250 cm^{-1} en vert, 7250 cm^{-1} en bleu et 12500 cm^{-1} en violet sont représentées en traits gras et leurs répliques en traits pointillés pour une fréquence d'échantillonnage $\Delta\sigma = 5925 cm^{-1}$ correspondant à un pas d'échantillonnage $\Delta\tau = 5,6 fs$.

Dans notre cas, le spectre du signal échantillonné comporte cinq composantes spectrales centrées aux fréquences 0, ω_{IR}, ω_c, ω_s et $\omega_s + \omega_c$, correspondant respectivement aux nombres d'onde 0 cm^{-1}, 2000 cm^{-1}, 5250 cm^{-1}, 7250 cm^{-1} et 12500 cm^{-1}. Nous voulons récupérer la composante à 2000 cm^{-1} qui donne le spectre du faisceau infrarouge. Pour cela, le pas d'échantillonnage doit vérifier les critères (3.19) et (3.20) de l'encadré, et le recouvrement entre les spectres des différentes composantes doit de plus être évité.

Le pas d'échantillonnage choisi $\Delta\tau = 5,6fs$ correspond à une période $\Delta\sigma = 5925cm^{-1}$ dans le domaine spectral, exprimée en nombre d'onde. Les deux critères (3.19) et (3.20) sont ainsi vérifiés pour le terme centré à 2000 cm^{-1} qui donne le spectre de l'impulsion infrarouge. D'après la figure (3.7), les signaux qui apparaissent dans la plage spectrale qui s'étend de 0 à 3000 cm^{-1} sont les suivants :

* Le spectre du faisceau infrarouge à 2000 cm^{-1}.
* La composante spectrale à 0.
* Une réplique de la composante spectrale à 7250 cm^{-1}, centrée à $\sigma_{sr} = \sigma_s - \Delta\sigma = 1325cm^{-1}$.
* Une réplique de la composante à -5250 cm^{-1} centrée à $\sigma_{cr} = -\sigma_c + \Delta\sigma = 675cm^{-1}$. Cette réplique se superpose à la réplique de la composante à 12500 cm^{-1} qui apparaît autour de $\sigma_{(c+s)r} = \sigma_s + \sigma_c - 2\Delta\sigma = 650cm^{-1}$.

Ainsi, le spectre du faisceau infrarouge, centré à 2000 cm^{-1}, ne se superpose à aucune des répliques des autres composantes spectrales et peut donc être récupéré. Nous pouvons de plus par cette méthode récupérer la réplique centrée à 1325 cm^{-1}, qui correspond au spectre du faisceau signal. La composante à fréquence nulle correspondant à la corrélation croisée en intensité entre signal et complémentaire peut également être exploitée afin de déterminer la durée des impulsions signal et complémentaire.

Exploitation du spectre mesuré

La figure 3.8 montre le signal infrarouge $s(\tau)$ mesuré par le détecteur en fonction du délai τ de l'interféromètre. Le spectre obtenu par transformée de Fourier de ce signal est représenté à la figure 3.9.

Ce spectre présente bien les composantes attendues, les caractéristiques des spectres infrarouge et signal sont ainsi déterminées. Le faisceau infrarouge est centré autour de 1960 cm^{-1} et a une largeur spectrale d'environ 110 cm^{-1}. Le signal est centrée autour de 5925 + 1275 = 7200 cm^{-1} et a une largeur spectrale d'environ 150 cm^{-1}.

Le signal à fréquence nulle permet de calculer la corrélation croisée en intensité des impulsions signal et complémentaire. Dans ce but, la composante spectrale à fréquence nulle est extraite du spectre complexe obtenu par transformée de Fourier. La transformée de Fou-

rier inverse de cette composante extraite donne alors la corrélation croisée en intensité des impulsions signal et complémentaire.

La corrélation croisée ainsi calculée, représentée à la figure 3.10, a une durée à mi-hauteur Δt_{cc} de 210 fs. Dans le cas d'impulsions gaussiennes, cette durée est reliée aux durées Δt_c et Δt_s des impulsions signal et complémentaire par la relation suivante :

$$\Delta t_{cc}^2 = \Delta t_s^2 + \Delta t_c^2 \tag{3.21}$$

En supposant que les faisceaux signal et complémentaire, générés au cours du même processus d'amplification paramétrique, sont de même durée, $\Delta t_c = \Delta t_s \approx 150\, fs$.

Cette durée est plus longue que la durée $\Delta t_{1/2}^{\varphi=0}$ de l'impulsion limitée par transformée de Fourier. D'après la partie A.4 de l'Annexe A, la durée $\Delta t_{1/2}^{\varphi=0}$ d'une impulsion gaussienne de largeur spectrale $\Delta\sigma_{1/2}$ de 150 cm^{-1} vaut 98 fs. Les impulsions signal et complémentaire de durée 150 fs présentent donc un retard de groupe non négligeable. La phase quadratique correspondante calculée à partir de la relation A.23 de l'Annexe A s'élève à environ 4000 fs^2.

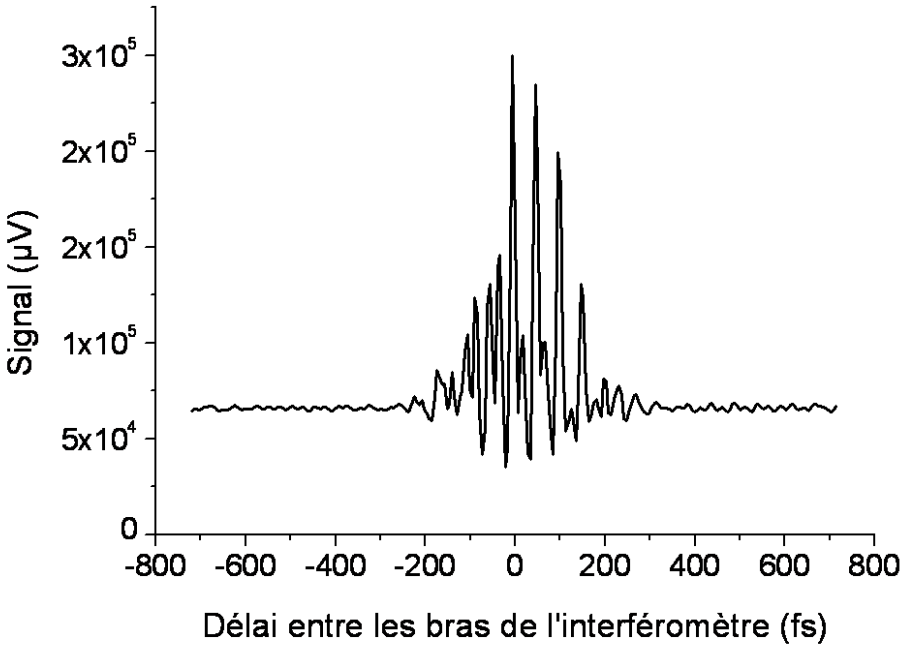


FIG. 3.8 – Signal infrarouge mesuré par le détecteur HgCdTe en fonction du délai de l'interféromètre. 256 points ont été mesurés avec un pas de 5,6 fs.

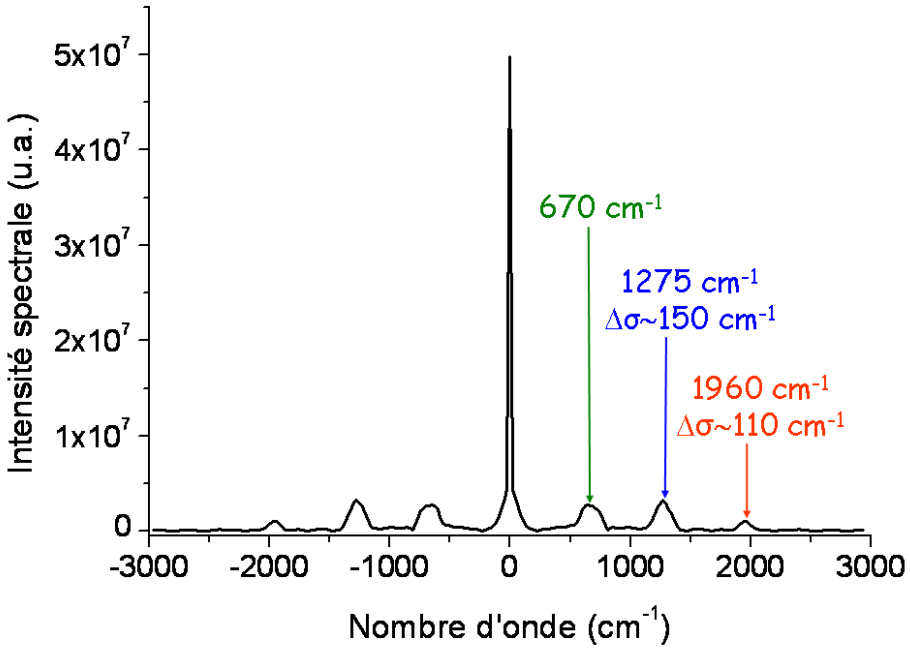


FIG. 3.9 – Spectre infrarouge mesuré par interférométrie par transformée de Fourier avec un pas d'échantillonnage $\Delta\tau = 5,6fs$. La composante spectrale à 1960 cm^{-1} est le spectre de l'impulsion infrarouge, la composante à 1275 cm^{-1} est le spectre de l'impulsion signal et la composante à fréquence nulle correspond à la corrélation croisée en intensité entre signal et complémentaire. La composante à 670 cm^{-1}, superposition de deux répliques, n'est pas exploitable.

Ces caractéristiques des impulsions signal et complémentaire sont utilisées dans la partie 3.1.2 pour modéliser le champ infrarouge généré par différence de fréquence. Le spectre de l'impulsion infrarouge ainsi calculé a une largeur spectrale d'environ 100 cm^{-1}, qui est en bon accord avec la largeur mesurée par interférométrie. Le modèle prédit également une phase quadratique négligeable, l'impulsion est donc limitée par transformée de Fourier et sa durée est d'environ 150 fs.

Les deux caractéristiques importantes du faisceau infrarouge utilisé comme sonde dans notre expérience sont ainsi évaluées, à savoir, sa durée d'environ 150 fs, et sa largeur spectrale entre 100 et 110 cm^{-1}.

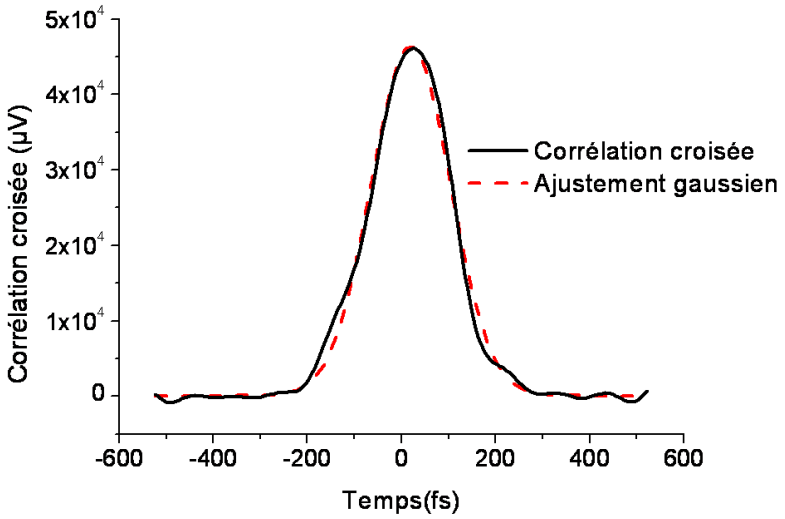


FIG. 3.10 – Corrélation croisée en intensité entre les impulsions signal et complémentaire, calculée par transformée de Fourier inverse à partir de la composante spectrale à fréquence nulle du signal. L'ajustement gaussien a une durée à mi-hauteur de 210 fs.

3.2.2 Spectral Phase Interferometry for Direct Electric Field Reconstruction transposée à l'infrarouge

Principe

La mesure du spectre infrarouge par conversion de fréquence vers le visible présente les avantages suivants qui la rendent plus adaptée aux expériences pompe-sonde résolues spectralement. Tout d'abord, elle permet une mesure simultanée de tout le spectre, contrairement à l'interférométrie temporelle. Ensuite, le détecteur CCD utilisé dans le visible présente plus de pixels (1340 pixels) qu'un détecteur multicanal HgCdTe dans l'infrarouge (au maximum 64 à 128 pixels) et permet d'obtenir ainsi une meilleure résolution. Il est par ailleurs moins onéreux.

La mesure du spectre infrarouge de l'expérience résolue spectralement est réalisée à partir du ZAP (Zero Additional Phase) SPIDER (Spectral Phase Interferometry for Direct Electric Field Reconstruction [52]) mis au point par Kevin Kubarych et Manuel Joffre [50] [53]. Le but du dispositif, représenté dans la figure 3.11, est de mesurer non seulement le spectre d'une impulsion infrarouge, mais également sa phase spectrale. Le principe consiste à décaler le spectre infrarouge vers le visible pour pouvoir le détecter avec un spectromètre et un détecteur CCD dans le visible. Ce décalage de fréquence vers le visible est réalisé par somme de

fréquence, dans un cristal non linéaire de MgO :$LiNbO_3$ en configuration de type I, de l'impulsion infrarouge à caractériser avec une impulsion étirée centrée à 800 nm. Dans le montage initial, cette impulsion étirée provient de l'ordre de diffraction 0 au niveau du compresseur de l'amplificateur régénératif du laser Hurricane. La phase spectrale est déterminée à partir de deux impulsions visibles ainsi construites, décalées en fréquence l'une par rapport à l'autre. Le principe de cette mesure de phase est exposé dans l'encadré intitulé "Mesure de phase avec le ZAP-SPIDER".

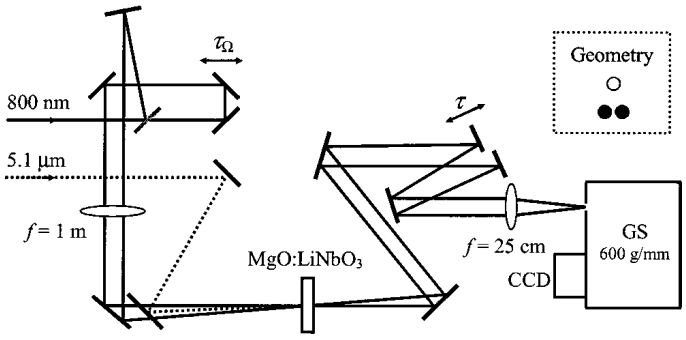


FIG. 3.11 – Montage du ZAP-SPIDER, d'après [50].

Mesure de phase avec le ZAP-SPIDER [50]

Le faisceau infrarouge $\mathcal{E}(\omega_{IR})$ de phase $\varphi(\omega)$ à caractériser est mélangé, dans un cristal non linéaire de MgO :$LiNbO_3$ en configuration de type I, à deux impulsions étirées autour de 800 nm, non colinéaires et décalées d'un délai τ_Ω. L'accord de phase est réglé de manière à engendrer une somme de fréquence entre le faisceau infrarouge et les impulsions centrées à 800 nm. Ces impulsions sont assez étirées pour que leurs fréquences soient constantes pendant l'impulsion infrarouge, on les note respectivement ω_1 et ω_2. La différence $\Omega = \omega_2 - \omega_1$ est déterminée par le délai τ_Ω.

Les deux impulsions résultantes en sortie du cristal s'écrivent alors $\mathcal{E}(\omega_{IR} + \omega_1)$ et $\mathcal{E}(\omega_{IR} + \omega_2)$. Dans le cas d'un faisceau infrarouge autour de ω_{IR} correspondant à 5 μm, les fréquences $\omega = \omega_{IR} + \omega_1$ et $\omega + \Omega = \omega_{IR} + \omega_2$ appartiennent au domaine visible vers 700 nm. Ces deux impulsions visibles sont ensuite décalées temporellement d'un délai τ puis superposées à l'entrée d'un spectromètre équipé d'un détecteur CCD. Le spectre mesuré est le suivant :

$$I(\omega) = \left|\mathcal{E}(\omega)\, e^{i\omega\tau} + \mathcal{E}(\omega + \Omega)\right|^2 \tag{3.22}$$

La phase $\Phi(\omega)$ peut être extraite de l'interférogramme résultant [54] :

$$\Phi(\omega) = \varphi(\omega + \Omega) - \varphi(\omega) + \omega\tau \approx \Omega\, \frac{d\varphi}{d\omega}(\omega) + \omega\tau \tag{3.23}$$

Le délai $\omega\tau$, mesuré à partir de l'interférogramme entre deux impulsions étirées, est soustrait de la phase $\Phi(\omega)$, la dérivée de la phase spectrale $\varphi(\omega)$ de l'impulsion infrarouge est ainsi obtenue.

Nous utilisons ce dispositif uniquement pour mesurer le spectre de l'impulsion infrarouge. Un seul faisceau étiré est alors superposé au faisceau infrarouge dans le cristal non linéaire de MgO :$LiNbO_3$. Le faisceau résultant de la somme de fréquence est ensuite directement envoyé dans le spectromètre. Le spectre mesuré correspond au spectre infrarouge décalé de ω_{et} vers le visible, où ω_{et} est la fréquence du faisceau étiré se superposant temporellement avec le faisceau infrarouge au niveau du cristal de somme de fréquence.

Étalonnage

L'étalonnage des fréquences infrarouges mesurées dans le visible est effectué en utilisant la transition vibrationnelle connue du monoxyde de carbone lié à la myoglobine (MbCO), centrée à $\sigma_{IR} = 1945 cm^{-1}$ et de largeur spectrale très étroite ($\approx 10\, cm^{-1}$). Le faisceau infrarouge transmis par un échantillon (200 μm d'épaisseur) de carboxy-myoglobine (10 mM) placé sur son trajet, produit par notre méthode de mesure le spectre visible présenté à la figure (3.12).

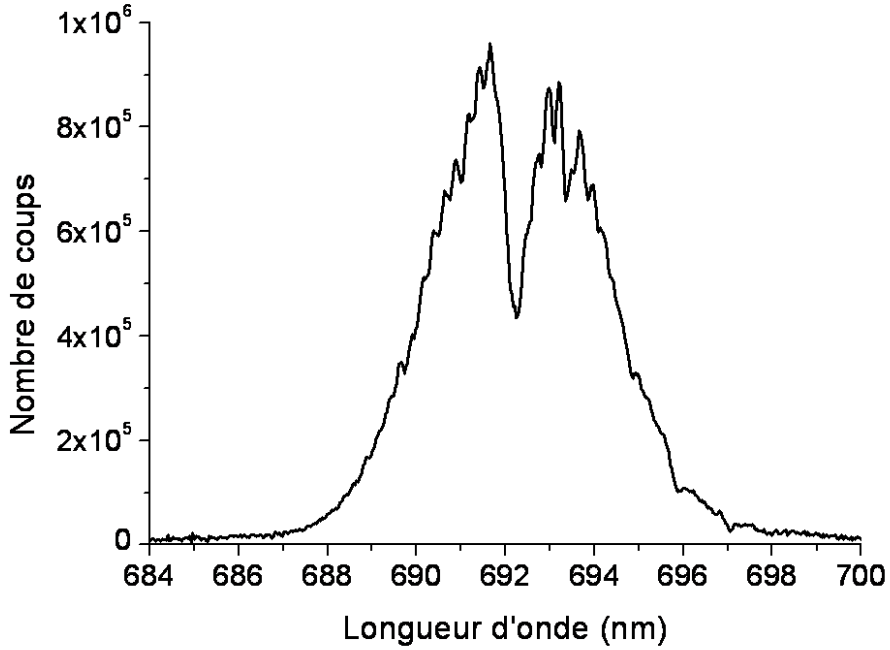


FIG. 3.12 – Spectre visible correspondant au faisceau infrarouge transmis par un échantillon de carboxy-myoglobine 10 mM d'épaisseur 200 μm. La bande d'absorption du CO à 1945 cm^{-1} apparaît à la longueur d'onde de 692,2 nm. La largeur de la fente du spectromètre est de 100 μm. Les pics d'absorption fins sont dus aux raies d'absorption de l'eau dans l'air ambiant.

La raie fine d'absorption du CO apparaît à la longueur d'onde $\lambda_{vis} = 692,2nm$ du spectre visible, correspondant au nombre d'onde $\sigma_{vis} = 1/\lambda_{vis} = 14\,447\,cm^{-1}$, le spectre infrarouge est donc décalé de la quantité $\sigma_{et} = \sigma_{vis} - \sigma_{IR} = 12\,502\,cm^{-1}$, qui correspond à la longueur d'onde de 800 nm du faisceau étiré.

A l'aide de cet étalonnage, valable tant que le faisceau infrarouge traverse des fenêtres de même épaisseur que celles entre lesquelles l'échantillon de MbCO est placé, le spectre infrarouge est déduit du spectre visible en convertissant l'échelle horizontale des longueurs d'onde visibles en fréquences correspondantes σ_{vis}, puis en fréquences infrarouge σ_{IR} par soustraction de la constante σ_{et}. La figure (3.13) montre le spectre infrarouge ainsi obtenu. La largeur de ce spectre, de 85 cm^{-1}, est en bon accord avec la modélisation de la partie 3.1.2 qui calcule une largeur de 90 cm^{-1}.

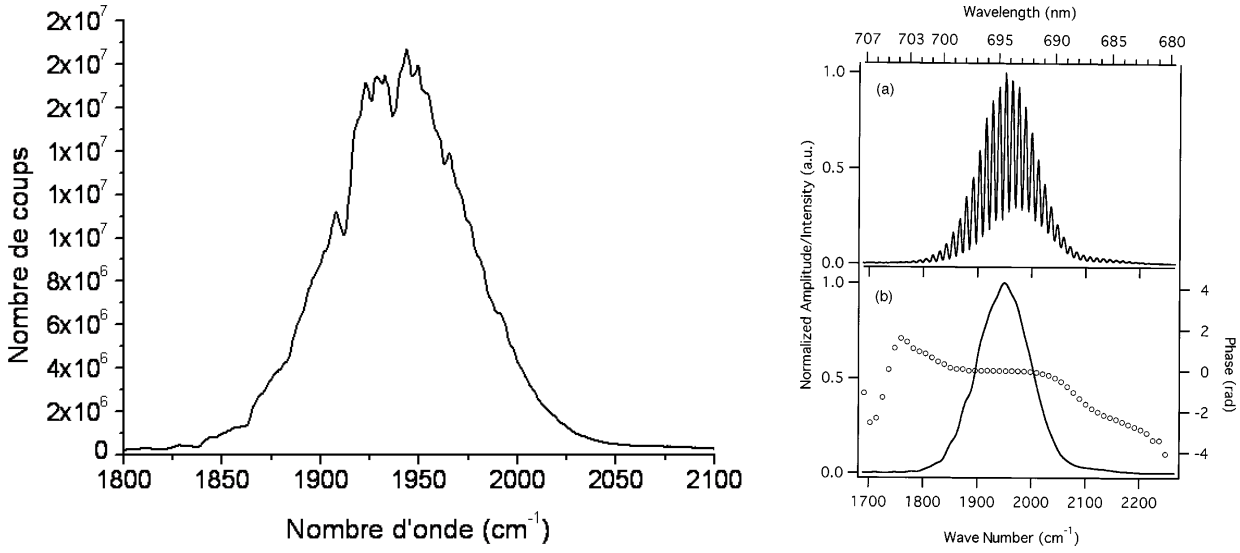


FIG. 3.13 – A gauche, spectre infrarouge déduit du spectre visible obtenu par somme de fréquence entre le faisceau infrarouge à caractériser et une impulsion étirée. La largeur de la fente du spectromètre est de 100 μm. A droite, caractérisation de l'impulsion infrarouge par SPIDER, d'après [50].

La caractérisation de la phase de l'impulsion infrarouge, présentée dans la figure 3.13 tirée de la référence [50] indique que l'impulsion est très peu chirpée, comme nous l'avons prédit dans la partie 3.1.2. La durée de l'impulsion, limitée par transformée de Fourier, vaut donc environ 170 fs.

3.3 Détermination de la résolution temporelle et du délai pompe-sonde zéro

Le signal pompe-sonde induit par le CO dans les hémoprotéines est trop faible pour être observé en temps réel sans accumulation. L'impulsion pompe est ainsi modulée pour une détection synchrone du signal pompe-sonde et les mesures sont moyennées afin d'améliorer suffisamment le rapport signal sur bruit. Le bruit dû aux fluctuations du laser est en général inversement proportionnel à la fréquence de modulation. Nous avons donc pour chaque montage choisi la fréquence de modulation maximale correspondant à la moitié du taux de répétition de la chaîne laser. Ainsi, dans le cas des expériences intégrées spectralement avec une chaîne laser 100 kHz, une détection synchrone à 50 kHz a été mise en place par Thomas Polack [42] afin de mesurer des variations relatives de l'ordre de 10^{-6}. Dans l'expérience résolue spectralement avec une chaîne 1 kHz, nous avons réalisé une détection synchrone à 500 Hz.

Signal pompe-sonde GaAs et corrélation croisée pompe-sonde

Le signal pompe-sonde du GaAs peut être calculé en modélisant le GaAs par un système à trois niveaux a, b et c. La transition ab correspond à l'excitation par la pompe des électrons de la bande de valence à la bande de conduction, et la transition bc entre deux états de la bande de conduction est résonante avec la sonde.

Ce cas a déjà été traité dans la partie 2.3.2 du chapitre II afin d'expliquer l'artefact à délai pompe-sonde nul. En supposant les temps de déphasage très courts et le temps de vie de la population dans la bande de conduction très grand, le terme de cohérence est négligeable devant le terme de population et le signal pompe-sonde s'écrit en fonction du délai pompe-sonde τ de la manière suivante :

$$I_{pop}(\tau) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} dt\, I_S(t-\tau) \int_{-\infty}^{t} dt'\, I_P(t') = \int_{-\infty}^{\tau} dv \int_{-\infty}^{+\infty} du\, I_S(u-v)\, I_P(u) \tag{3.24}$$

La dérivée de ce signal correspond à la corrélation croisée entre les impulsions pompe et sonde :

$$\frac{dI_{pop}}{d\tau}(\tau) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} du\, I_S(u-\tau)\, I_P(u) \tag{3.25}$$

Pour optimiser le réglage de l'expérience pompe-sonde et calibrer le délai, nous avons besoin d'un signal plus intense qui puisse être observable sans accumulation. L'Arséniure de Gallium (GaAs) produit un signal $-\Delta T/T$ d'environ 0,02 exploitable dans ce but. Dans ce semi conducteur, l'impulsion pompe induit instantanément le passage des électrons de la bande de valence à la bande de conduction, le faisceau infrarouge est alors absorbé par les électrons de la bande de conduction. Le signal pompe-sonde résultant est décrit dans l'encadré "Signal pompe-sonde GaAs et corrélation croisée pompe-sonde".

Le signal pompe-sonde du GaAs permet tout d'abord de régler la phase du chopper synchronisé au laser et d'optimiser la superposition spatiale des faisceaux pompe et sonde. Ce signal est ensuite utilisé pour calculer la corrélation croisée des impulsions pompe et sonde.

La corrélation croisée des impulsions pompe et sonde apporte des informations importantes sur les caractéristiques de l'expérience. Le maximum de cette corrélation croisée détermine la position de la platine de translation correspondant au délai pompe-sonde nul, et sa largeur temporelle Δt_{cc} permet, dans le cas d'impulsions gaussiennes, de relier les durées Δt_p et Δt_s des impulsions pompe et sonde de la manière suivante :

$$\Delta t_{cc}^2 = \Delta t_p^2 + \Delta t_s^2 \tag{3.26}$$

Dans le cas de l'expérience intégrée spectralement, la durée de la corrélation croisée de l'impulsion pompe avec l'impulsion sonde donne également la résolution temporelle de l'expérience. Lors des expériences résolues spectralement, des artefacts de cohérence, présentés au chapitre 2, se manifestent à délai pompe-sonde nul et limitent ainsi la résolution temporelle. Dans ce cas, la corrélation croisée pompe-sonde indique juste la résolution de l'expérience en l'absence de ces artefacts.

Expérience pompe-sonde intégrée spectralement

Dans le cas de l'expérience intégrée spectralement, le signal pompe-sonde mesuré dans le GaAs et la corrélation croisée calculée à partir de ce signal sont représentés dans la figure 3.14. La durée de cette corrélation est $\Delta t_{cc} = 306\, fs$. Or, d'après la partie 3.2.1, la durée de l'impulsion sonde est $\Delta t_s = 150\, fs$. On en déduit donc à l'aide de la relation 3.26 que la durée de l'impulsion pompe est $\Delta t_p = 270\, fs$.

Pour ces valeurs des durées à mi-hauteur des impulsions pompe et sonde gaussiennes, le signal pompe-sonde du GaAs est calculé à l'aide de l'équation 3.24 ainsi que la corrélation croisée des impulsions pompe et sonde. Les courbes obtenues tracées dans la figure 3.14 sont en très bon accord avec les données provenant du signal GaAs mesuré.

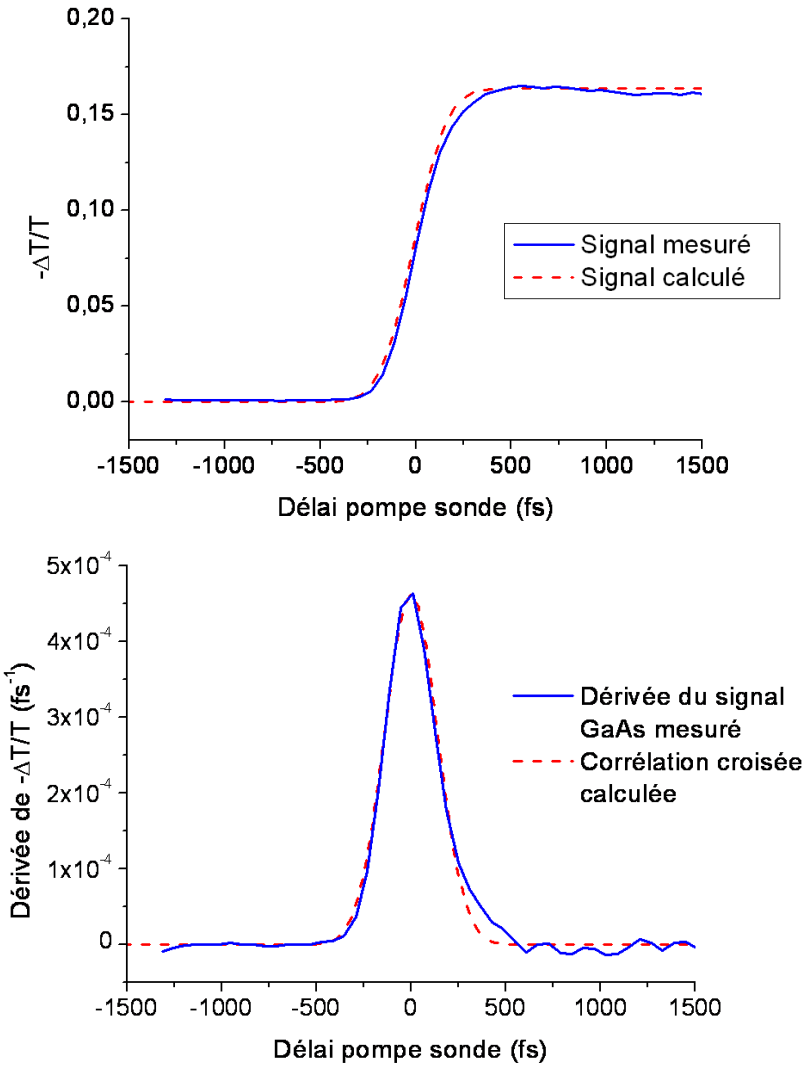


FIG. 3.14 – En haut, signal pompe-sonde du GaAs mesuré et calculé dans le cas d'impulsions pompe et sonde gaussiennes de largeurs à mi-hauteur respectives 270 et 150 fs. En bas, dérivée du signal pompe-sonde du GaAs, comparée à la corrélation croisée des impulsions pompe et sonde calculée dans le cas d'impulsions pompe et sonde gaussiennes de largeurs à mi-hauteur respectives 270 et 150 fs.

Expérience pompe-sonde résolue spectralement

Dans le cas de l'expérience résolue spectralement, le signal pompe-sonde du GaAs est tracé dans la figure 3.15. Les différentes courbes correspondent aux spectres infrarouge transmis par le GaAs à différents délais pompe-sonde.

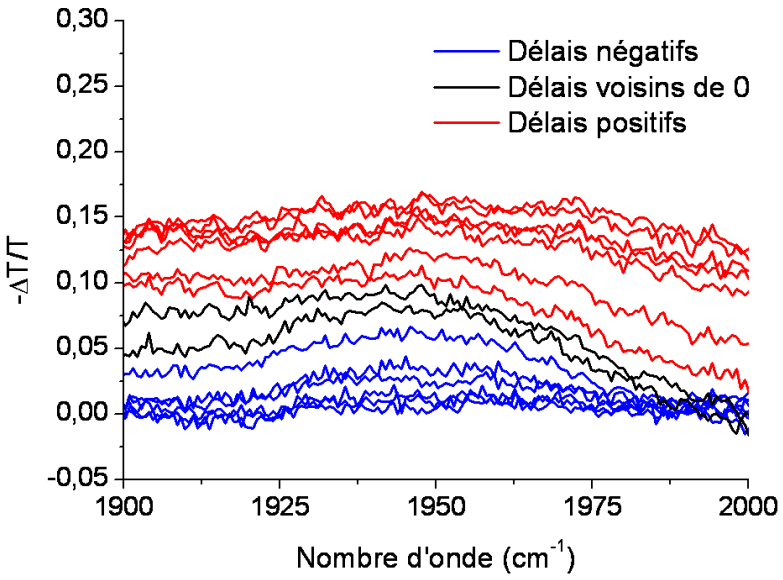


FIG. 3.15 – Signal pompe-sonde du GaAs résolu spectralement, mesuré à des délais pompe-sonde espacés de 37,5 fs.

A partir de ces spectres, la corrélation croisée des impulsions pompe et sonde peut être définie à chaque longueur d'onde de la sonde. Il suffit de tracer le signal du GaAs à la longueur d'onde choisie à partir des spectres de la figure 3.15 et de calculer la dérivée de ce signal. A titre d'exemple, la figure 3.16 représente le signal du GaAs mesuré à 1945 cm^{-1} et la corrélation croisée à ce nombre d'onde. Le nombre de points étant trop limité pour obtenir une corrélation croisée facilement exploitable, nous avons ajusté le signal du GaAs par une sigmoïde (avec Origin) dont nous calculons la dérivée.

La corrélation croisée ainsi obtenue définit le zéro du délai pompe-sonde entre les spectres tracés en noir dans la figure 3.15. La durée de cette corrélation croisée est d'environ 300 fs. La durée de l'impulsion sonde, déterminée au 3.2.2, étant de 170 fs, on en déduit une durée de l'impulsion pompe de 250 fs. Les caractéristiques temporelles de cette expérience résolue spectralement sont donc très proches de celles de l'expérience intégrée spectralement.

La position du zéro pompe-sonde selon la longueur d'onde infrarouge diffère de moins de 50 fs, ce qui confirme que le faisceau infrarouge est peu chirpé.

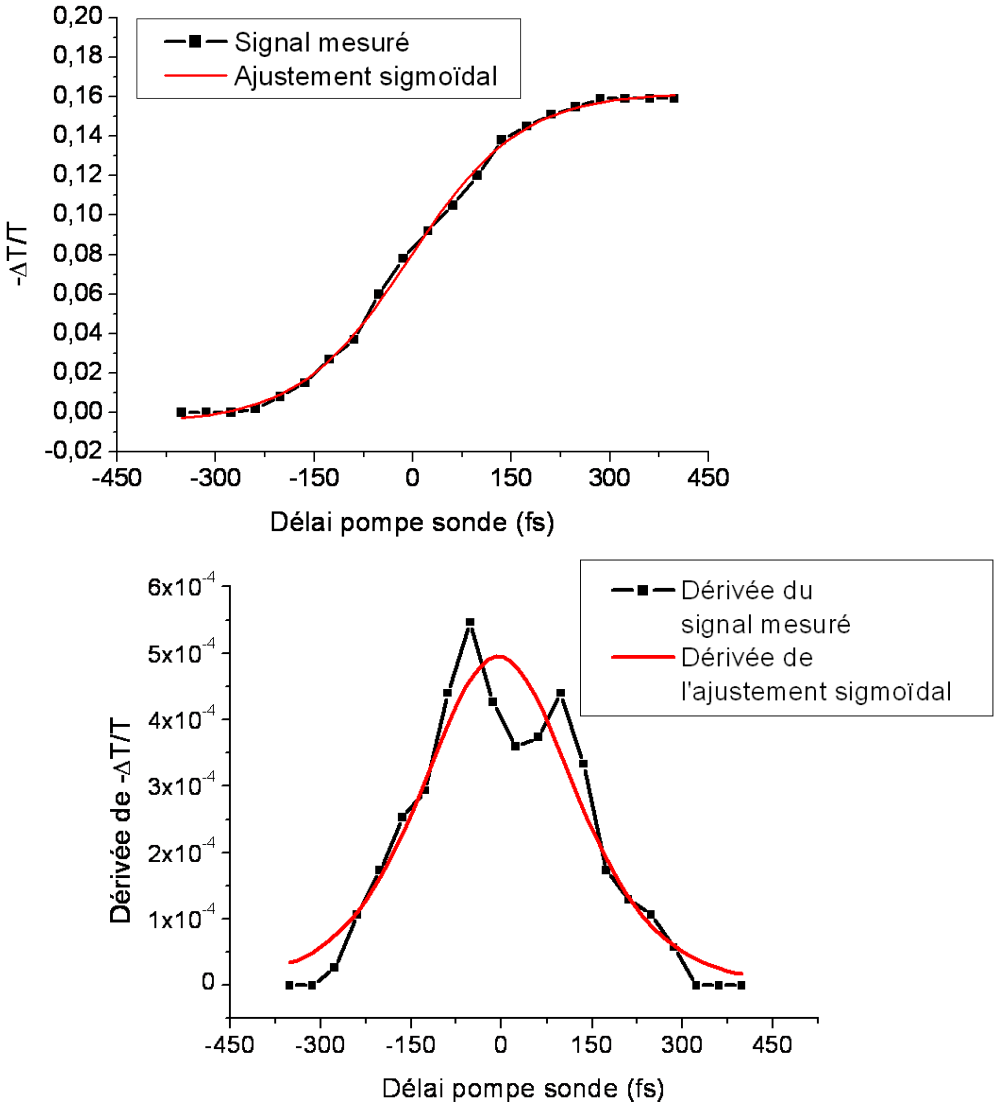


FIG. 3.16 – En haut, signal pompe-sonde du GaAs mesuré à 1945 cm^{-1} ajusté par une sigmoïde. En bas, dérivées du signal pompe-sonde du GaAs et de la sigmoïde. La corrélation croisée des impulsions pompe et sonde, donnée par la dérivée de la sigmoïde, a une largeur à mi-hauteur de 300 fs.

3.4 Préparation de la cytochrome c oxydase

Les échantillons de cytochrome c oxydase en solution, utilisés dans nos expériences de spectroscopie, sont obtenus par purification à partir de cœurs de bœuf frais provenant de l'abattoir de l'INRA (Theix / Clermont-Ferrand). La purification de la cytochrome c oxydase s'effectue en deux étapes principales : tout d'abord les mitochondries sont extraites des cellules du cœur frais, puis le complexe enzymatique est purifié à partir de ces mitochondries isolées. Ces deux étapes sont détaillées dans les parties 3.4.1 et 3.4.2.

La cytochrome c oxydase est ensuite réduite et ligandée avec le monoxyde de carbone en vue d'être étudiée par spectroscopie ; cette opération est abordée dans la partie 3.4.3. La partie 3.4.4 mentionne enfin les difficultés particulières rencontrées lors des expériences pompe sonde sur ce complexe protéique.

3.4.1 Isolement des mitochondries

Le cœur prélevé sur l'animal est transporté depuis l'abattoir sur glace dans un tampon adéquat (sucrose : 0.3 M, MOPS pH 7.4 : 5 mM, KH_2PO_4 : 5 mM, BSA : 0,1% + PMSF 1 mM). Le potassium dihydrogéno-phosphate (KH_2PO_4) et l'acide N-morpholino-3-propane sulfonique (MOPS) maintiennent le pH entre 7 et 8, le sucrose règle la pression osmotique des mitochondries, l'albumine bovine sérique (BSA) les stabilise, et l'antiprotéase PMSF empêche la dégradation des protéines. Les mitochondries doivent en effet rester fonctionnelles durant toute la préparation. Différentes antiprotéases (Leupeptin, pepstatin, pefabloc et PMSF) seront par la suite ajoutées jusqu'à la fin de la préparation. Le protocole décrit ici est tiré de la référence [56].

Dans un premier temps, le cœur est débarrassé du tissu adipeux et du péricarde, puis il est découpé, haché et resuspendu dans le tampon. Les cellules sont ensuite séparées sous l'action de la collagénase à 70 mg/L, qui lyse la matrice extracellulaire. L'action de la collagénase est arrêtée par ajout d'EGTA (acide éthylène glycol-tétraacétique) au bout de 40 minutes, le mélange obtenu est filtré pour éliminer la myoglobine et la collagénase, puis resuspendu dans le tampon.

La solution diluée de cellules est passée au potter Elvehjem qui détruit les cellules et permet d'extraire les mitochondries. L'homogénat obtenu est centrifugé pendant 10 minutes

à 1500 g afin d'éliminer les cellules non lysées et les débris tissulaires dans le culot. Une seconde centrifugation plus rapide du surnageant récupéré, pendant 10 minutes à 10000 g, permet d'éliminer les mitochondries endommagées, ainsi que les protéines solubles et les restes de collagénase. Les mitochondries récupérées dans le culot peuvent être congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°.

3.4.2 Purification de la cytochrome *c* oxydase

Les mitochondries obtenues à partir du cœur de bœuf comportent de nombreuses protéines membanaires. Nous voulons extraire uniquement la cytochrome *c* oxydase, localisée au niveau de la membrane interne des mitochondries, comme nous le décrivons au chapitre I. Le protocole choisi pour purifier ainsi la cytochrome *c* oxydase a été mis au point par van Buuren [55]. Cette méthode utilise dans un premier temps la différence de solubilité entre les protéines membranaires, puis la précipitation sélective au sulfate d'ammonium. La qualité de la purification lors de ces étapes est suivie à l'aide des spectres d'absorption dans le visible entre 350 et 700 nm, qui permettent de mesurer les concentrations en hèmes *a* et a_3 de la cytochrome *c* oxydase, et en hèmes *b* et *c* des cytochromes *b* et c_1 qui doivent être éliminés.

Solubilisation des protéines

Cette première étape consiste à séparer les protéines membranaires en utilisant leur différence de solubilité.

Dans un premier temps, la concentration en protéines totale est mesurée par un dosage BCA (acide bicinchoninique) pour être ajustée à 23 g/mL avec un tampon Tris-HCl : 50 mM pH 7.8, sucrose 0.66 M. Le détergent désoxycholate est ajouté à 0,8% de concentration finale à la suspension obtenue, afin de rendre la membrane externe des mitochondries perméable, et de solubiliser ainsi toutes les protéines de cette membrane externe, ainsi que certaines protéines faiblement ancrées à la membrane interne. Les protéines solubilisées et les protéines de l'espace intermembranaire sont alors éliminées par centrifugation du surnageant. L'ajout de chlorure de potassium (KCl) fait précipiter les membranes et facilite la séparation entre le culot et le surnageant. Le nom de "red-green split" donné à cette étape est dû à la couleur rouge du surnageant et à la couleur verte du culot, qui contient l'oxydase (voir figure 3.17).

Le culot est récupéré et resuspendu dans le tampon décrit ci-dessus. Le détergent cholate

est ajouté à 3% afin de dissoudre la membrane interne et solubiliser ainsi la cytochrome c oxydase ; d'autres protéines de la membrane interne sont solubilisées également. Certaines de ces protéines, ainsi que les membranes restantes, sont précipitées par une solution saturante de sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$ ajoutée à 25%. Une centrifugation permet alors de récupérer dans le surnageant les protéines encore solubilisées, entre autre la cytochrome c oxydase et les cytochromes b et c_1.

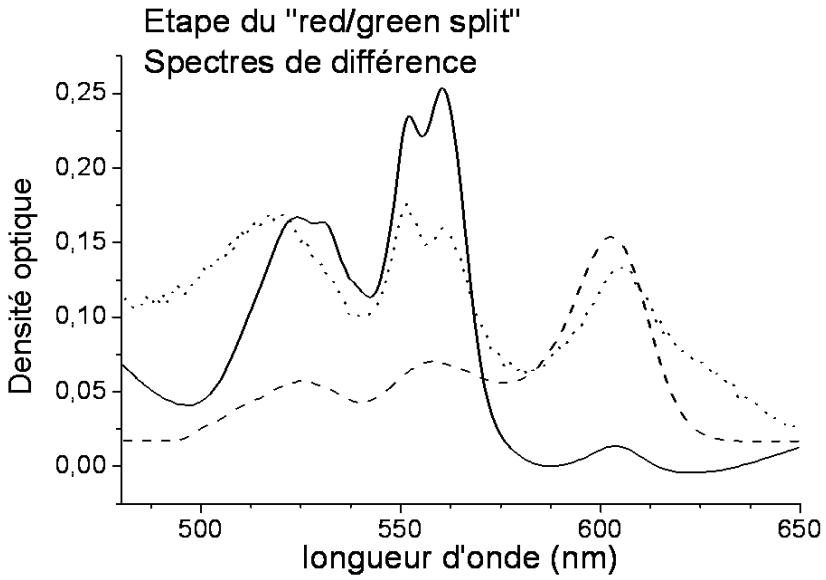


FIG. 3.17 – D'après [56], spectres de différence réduit moins oxydé avant (....) et après la première étape de séparation, surnageant (——) et culot (− − −). Le pic à 605 nm indique la présence de l'hème a de la cytochrome c oxydase dans le culot. Les pics vers 520 et 560 nm sont dus aux hèmes b et c des cytochromes b et c_1 dans le surnageant.

Précipitation sélective

Le sulfate d'ammonium fait précipiter les protéines de manière sélective : le cytochrome b précipite à partir de 28% de saturation en sulfate d'ammonium, la cytochrome c oxydase à partir de 40% et le cytochrome c_1 au delà de 45%. Cette propriété est exploitée pour isoler la cytochrome c oxydase des autres protéines par précipitations successives.

Une précipitation à 35% de saturation, suivie d'une centrifugation, permet d'éliminer le cytochrome b dans le culot. Une précipitation à 42% de saturation du surnageant, suivie d'une centrifugation, élimine ensuite le cytochrome c_1 dans le surnageant. Ce cycle peut être réitéré plusieurs fois afin d'améliorer la pureté de l'échantillon. Au final, la cytochrome c oxydase est

récupérée dans le culot (voir figure 3.18).

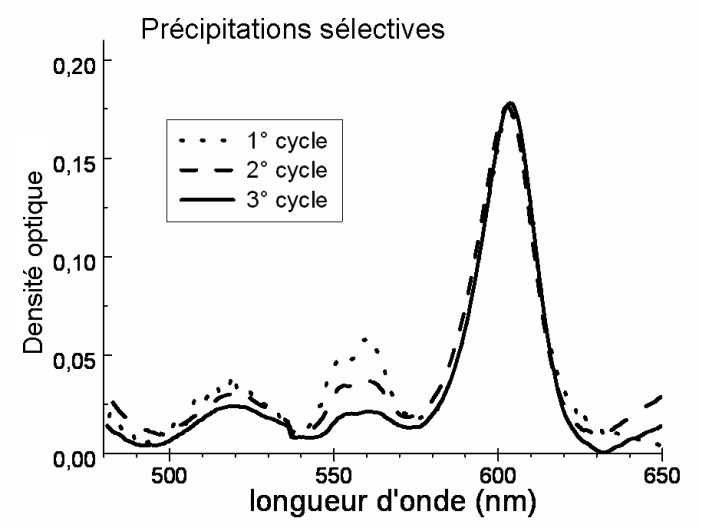


FIG. 3.18 – D'après [56], spectres de différence réduit moins oxydé des culots à 42% de saturation en sulfate d'ammonium, obtenus après 1, 2 et 3 cycles. Ces spectres sont normalisés à 605 nm correspondant au pic d'absorption de la cytochrome *c* oxydase. Au cours des cycles, la proportion de cytochromes *b* et c_1, indiqués par les pics d'absorption à 520 et 560 nm, diminue par rapport à la quantité de cytochrome *c* oxydase.

Dialyse

Le cholate inhibe l'activité de la cytochrome *c* oxydase en se fixant sur un site de fixation de l'ATP. Ce détergent doit donc être remplacé par un autre détergent qui ne modifie pas l'activité de l'enzyme, le beta-dodecyl-maltoside ($\beta-$DM). De plus, nos expériences de spectroscopie dans le domaine infrarouge nécessitent de remplacer l'eau H_2O par de l'eau lourde D_2O, dont l'absorption est plus faible dans la plage spectrale étudiée (voir figure 3.21).

La cytochrome *c* oxydase récupérée dans le culot est donc resuspendue dans un nouveau tampon (Tris-HCl 50 mM, $\beta-$DM 0,1% complété avec D_2O), et subit deux étapes de dialyse dans ce même tampon.

Concentration

Nos expériences de spectroscopie nécessitent des concentrations très élevées en protéines (500 μM), la solution récupérée dans le sac de dialyse doit donc être concentrée par centrifugation.

Les concentrateurs Amicon Ultra-4 (Millipore) utilisés comportent une membrane de cellulose de coupure 100 000 g.mol^{-1}, qui retient la cytochrome *c* oxydase mitochondriale (masse moléculaire supérieure de 400 000 g.mol^{-1}) et laisse passer le tampon lors de la centrifugation. Afin d'éviter que la protéine membranaire n'obstrue les pores de la membrane lors de ce processus, la membrane est préalablement trempée dans le tampon (Tris-HCl 50 mM, $\beta-$DM 0,1%, D_2O) pendant au moins une heure, et la centrifugation qui suit est fractionnée en sessions de 20 minutes entre lesquelles la protéine est remuée.

La concentration en protéines est mesurée au cours de cette étape de concentration à partir des spectres d'absorption dans le visible. Effectivement, cette concentration c est reliée à la densité optique $DO(\lambda)$ de l'échantillon de protéines par la loi de Beer Lambert :

$$DO(\lambda) = \epsilon(\lambda)\, l\, c \tag{3.27}$$

où l est l'épaisseur de l'échantillon et $\epsilon(\lambda)$ son coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde λ.

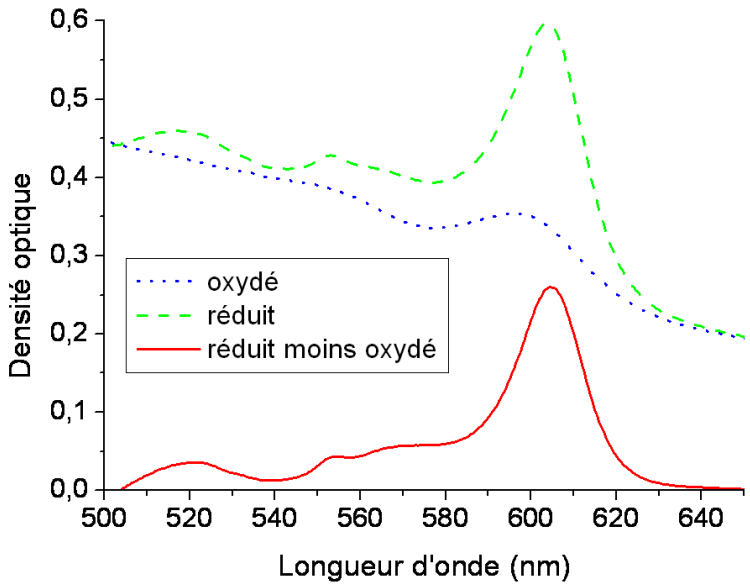


FIG. 3.19 – Spectres d'absorption d'un échantillon de cytochrome *c* oxydase de 1 mm d'épaisseur à l'état réduit et à l'état oxydé, lors de l'étape de concentration.

Dans l'exemple présenté dans la figure 3.19, nous avons préparé un échantillon dilué d'un facteur 5, d'épaisseur 1 mm, et mesuré ses spectres d'absorption à l'état oxydé, puis à l'état réduit. Le spectre de différence réduit moins oxydé est alors calculé, la différence de densité

optique à 605 nm est de 0,24. Sachant que le coefficient d'absorption molaire à cette longueur d'onde vaut 23400 $M^{-1}.cm^{-1}$, la concentration de l'échantillon mesuré s'élève à 103 μM, et celle de l'échantillon d'origine à 515 μM.

Lorsque la concentration atteint au moins 500 μM, la cytochrome *c* oxydase est aliquotée en fractions de 150 μL, congelée dans l'azote liquide et stockée à -80°.

3.4.3 Préparation de l'échantillon

Les échantillons d'hémoprotéines utilisés lors des expériences pompe sonde destinées au suivi du transfert de ligand doivent être réduits (Fer de l'hème sous forme Fe^{2+}) afin de pouvoir fixer le ligand.

Dans un premier temps, la protéine est placée dans une cuve étanche dégazée et maintenue sous atmosphère d'argon pour que le dioxygène de l'air ne puisse pas se fixer sur l'hème et l'oxyder selon le processus catalytique décrit dans la partie 1.3.2. Le Fer de l'hème est alors réduit par du dithionite en excès d'un facteur 10, puis la protéine est exposée à un flux de CO pendant une dizaine de minutes.

L'échantillon de protéines ligandées avec CO ainsi obtenu est placé au niveau du dispositif pompe sonde entre deux fenêtres de CaF_2 espacées d'une couronne de téflon de 50 à 200 μm d'épaisseur.

Cette procédure de préparation de l'échantillon est la même pour toutes les protéines ligandées avec CO étudiées : la myoglobine, l'hémoglobine et la cytochrome *c* oxydase.

3.4.4 Difficultés avec la cytochrome *c* oxydase

La cytochrome *c* oxydase présente deux difficultés supplémentaires par rapport aux protéines non membranaires de taille plus faible (myoglobine, hémoglobine, cytochrome *c*) : ces protéines peuvent être obtenues à des concentrations plus élevées, jusqu'à 10 mM. Le signal pompe sonde produit par la cytochrome *c* oxydase, de concentration 500 μM, est donc plus faible. Cet inconvénient peut être compensé en augmentant l'épaisseur de l'échantillon, mais une seconde difficulté survient alors...

L'échantillon de cytochrome *c* oxydase absorbe de manière plus importante la sonde infrarouge que les autres protéines non membranaires étudiées.

La figure 3.20 représente les spectres de transmission dans l'infrarouge d'échantillons de cytochrome *c* oxydase et de myoglobine de même concentration 500 μM et de même épaisseur 25 μm. Le spectre de transmission de la myoglobine est très proche de celui de l'eau lourde D_2O présenté à la figure 3.21, utilisé comme solvant à la place de l'eau H_2O en raison de sa meilleure transmission dans les plages infrarouge étudiées. La cytochrome *c* oxydase présente une transmission plus faible globalement sur tout le spectre, et des bandes d'absorption particulières vers 1650, 1560 et 1450 cm^{-1} beaucoup plus prononcées que celles de l'échantillon de myoglobine.

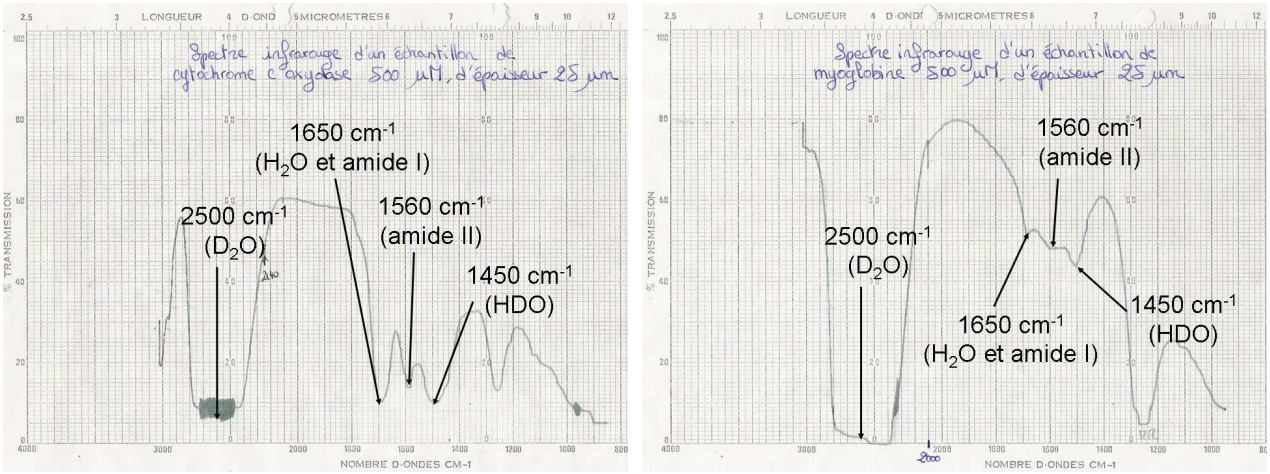


FIG. 3.20 – Transmission dans l'infrarouge d'échantillons de même concentration 500 μM et de même épaisseur 25 μm de cytochrome *c* oxydase à gauche, et de myoglobine à droite.

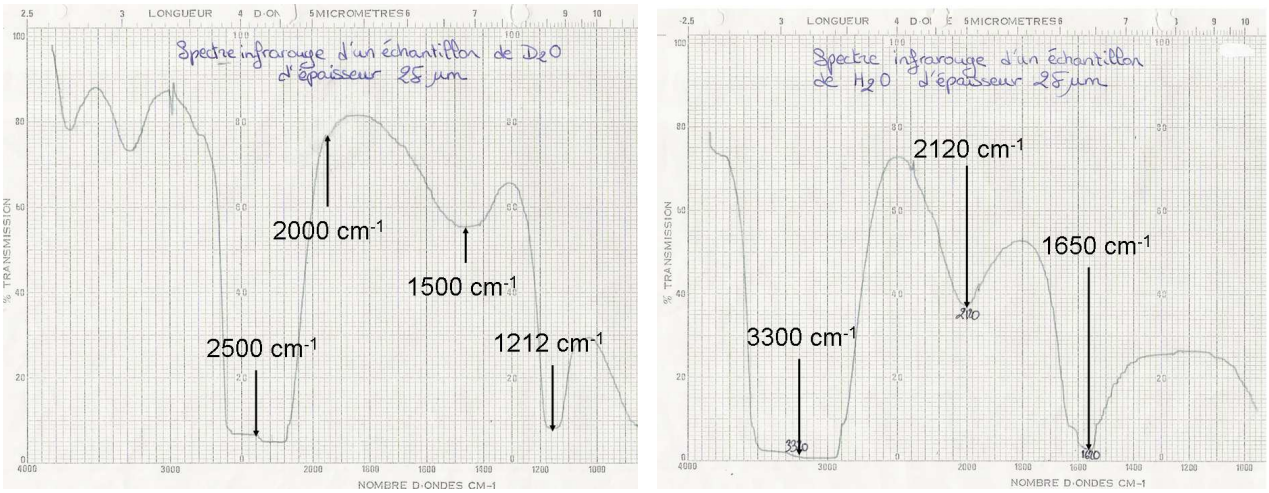


FIG. 3.21 – Transmission dans l'infrarouge d'échantillons d'épaisseur 25 μm, de D_2O à gauche, et de H_2O à droite.

Les bandes d'absorption vers 1650 et 1560 cm^{-1} peuvent correspondre aux bandes amide I et II, plus intenses chez la cytochrome *c* oxydase en raison du nombre d'acides aminés plus important de cette protéine. Les bandes à 1650 et 1450 cm^{-1}, ainsi que la baisse de transmission globale sur tout le spectre, peuvent être dues à la présence d'eau H_2O résiduelle qui n'a pas pu être échangée par de l'eau lourde D_2O lors des étapes de dialyse et de concentration, ou qui a remplacé progressivement l'eau lourde à la suite de ces étapes. Nous avons effectué des mesures de transmission dans le domaine infrarouge d'échantillons d'eau lourde D_2O comportant différentes quantités d'eau H_2O. Les mesures présentées par la figure 3.22 montrent ainsi qu'un échantillon de D_2O qui comporte 30% de H_2O présente un spectre de profil similaire à celui de la cytochrome *c* oxydase (excepté dans la plage où s'expriment les bandes amides).

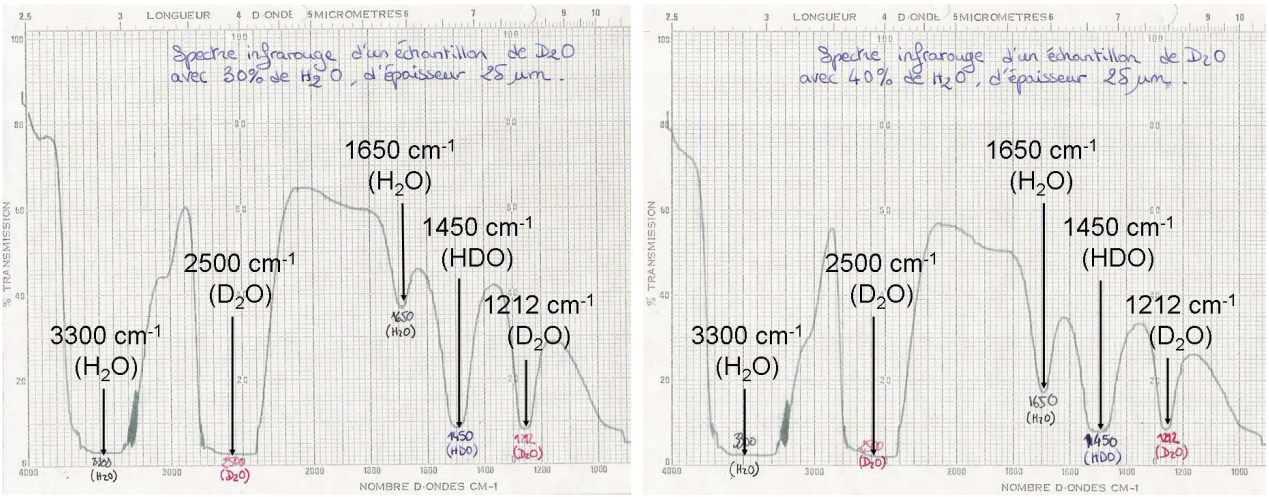


FIG. 3.22 – Transmission dans l'infrarouge d'échantillons d'épaisseur 25 μm de D_2O comportant 30% de H_2O à gauche, et 40% de H_2O à droite.

En conclusion, l'échantillon de cytochrome *c* oxydase produit un signal pompe sonde plus faible en raison de sa concentration moins importante. D'autre part, cet échantillon transmet moins bien le faisceau sonde, ce qui nous empêche d'augmenter son épaisseur pour compenser sa concentration plus faible. La mise en œuvre de l'expérience pompe sonde sur la cytochrome *c* oxydase nécessite donc l'optimisation du signal pompe sonde et l'augmentation de la puissance infrarouge.

3.5 Optimisation de l'expérience intégrée spectralement

L'expérience pompe-sonde intégrée spectralement a déjà été mise en œuvre par Thomas Polack [43] pour suivre le transfert de ligands dans la myoglobine. Cependant, le dispositif ne peut pas s'adapter directement à l'étude de l'échantillon de cytochrome *c* oxydase qui est moins concentré et plus absorbant dans l'infrarouge, comme nous le mentionnons dans la partie 3.4.4. Le signal pompe-sonde mesuré est ainsi beaucoup plus faible et extrêmement bruité, d'autant plus que la sonde transmise est peu intense.

Pour compenser ces difficultés, le dispositif a donc été optimisé à deux niveaux : d'une part, la puissance du faisceau infrarouge, initialement de 40 pJ par impulsion, a été augmentée afin de pouvoir utiliser des échantillons plus épais. D'autre part, le réglage de la focalisation du faisceau pompe sur l'échantillon est affiné pour intensifier le signal pompe-sonde. Ces deux points sont abordés dans les parties 3.5.2 et 3.5.1.

La résolution temporelle du dispositif a également été optimisée en rendant l'impulsion pompe plus brève. Cette amélioration est présentée dans la partie 3.5.3.

Enfin, deux fonctionnalités supplémentaires, exposées dans les parties 3.5.4 et 3.5.5, ont été mises en place :

Un système de rotation de la lame demi-onde placée sur le trajet du faisceau pompe permet l'acquisition simultanée d'expériences pompe-sonde à deux angles différents entre les polarisations pompe et sonde. L'angle du CO par rapport à la normale à l'hème peut être déterminé à partir de ces mesures d'anisotropie.

La monture qui porte l'échantillon a été remplacée par une monture qui peut fixer deux échantillons et les faire passer successivement devant les faisceaux. L'acquisition simultanée de deux signaux pompe-sonde sur deux échantillons différents permet ainsi de comparer ces deux signaux avec la rigueur nécessaire à la résolution du problème de l'artefact abordé au chapitre 4.

Le dispositif est présenté dans son ensemble par les photographies des figures 3.26 et 3.27 à la fin de cette partie.

3.5.1 Optimisation de la stabilité et la puissance de la sonde

La stabilité et la puissance du dispositif de génération du faisceau infrarouge dépendent sensiblement des réglages de la focalisation des faisceaux au niveau du cristal de saphir qui génère le continuum par automodulation de phase et des cristaux de BBO de l'OPA.

Le continuum dans la lame de saphir

Le continuum généré par automodulation de phase dans la lame de saphir fournit la composante spectrale à 1,4 μm destinée à être amplifiée par l'OPA. La qualité du continuum est extrêmement sensible à l'intensité du faisceau à 800 nm, donc à sa focalisation dans la lame de saphir.

Effectivement, d'après l'équation B.22 de l'Annexe B, l'écart des nouvelles fréquences créées par le phénomène d'automodulation de phase est proportionnel à l'opposé de la dérivée temporelle de l'intensité du champ. La focalisation du faisceau, qui influe sur son intensité, a donc un effet direct sur la largeur spectrale du continuum. Si le faisceau n'est pas assez focalisé, le glissement de fréquences engendré n'est pas assez important pour produire une composante à 1,4 μm de puissance suffisante.

Un autre problème se pose lorsque le faisceau est focalisé trop intensément. Dans ce cas, le continuum généré est composé de plusieurs filaments très instables, les faisceaux en sortie d'OPA sont alors très intenses, mais de puissance très instable qui varie rapidement.

Afin d'obtenir des faisceaux signal et complémentaire stables et assez intenses, et ce pour des puissances du faisceau à 800 nm pouvant varier, il convient de pouvoir régler avec finesse la focalisation sur la cristal de saphir. Une monture pour le cristal de saphir et les deux lentilles de focalisation et recollimation, comportant un réglage fin du cristal en translation selon la direction de propagation du faisceau, a ainsi été construite. Cette monture est représentée à la figure 3.23.

Les cristaux de BBO de l'OPA

Au niveau des deux cristaux de BBO de l'OPA, le problème est similaire. Si les faisceaux incidents de continuum et de pompe à 800 nm ne sont pas assez focalisés, les faisceaux signal et complémentaire générés sont moins intenses. A l'opposé, si les faisceaux incidents sont trop focalisés, un continuum est généré dans le BBO par automodulation de phase et rend

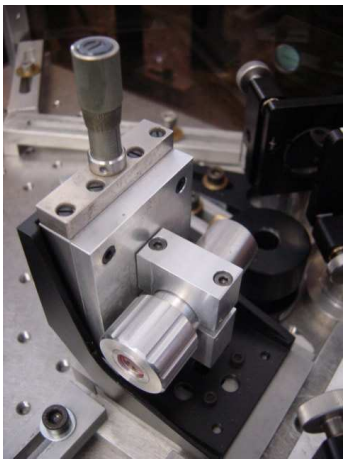


FIG. 3.23 – Monture permettant de régler la focalisation du faisceau sur le cristal de saphir par rotation de la bague externe qui déplace longitudinalement le cristal.

les faisceaux signal et complémentaire en sortie d'OPA instables. Ce continuum "parasite" provient en partie de la composante intense à 800 nm du continuum spectral issu de la focalisation sur la lame de saphir.

Un filtre RG1000 a été placé sur la trajet du continuum afin de couper entre autres sa composante à 800 nm tout en laissant passer le signal à amplifier à 1,4 μm. Ce signal peut alors être focalisé plus fortement dans les cristaux de BBO et être ainsi mieux amplifié.

Suite aux améliorations décrites dans cette partie 3.5.1, la puissance totale de l'infrarouge généré par différence de fréquence à partir des faisceaux signal et complémentaire en sortie d'OPA a été multipliée par 20 !

3.5.2 Réglage de la taille du faisceau pompe

Afin de rendre le signal pompe-sonde optimal pour la puissance de pompe à 400 nm disponible (environ 200 nJ par impulsion), il convient de bien régler la taille du faisceau pompe au niveau de l'échantillon.

Si la taille du faisceau pompe est inférieure à la taille du faisceau sonde, toute une couronne d'échantillon sondé ne contribue pas au signal pompe-sonde. Le centre de l'échantillon sondé reçoit une intensité de pompe plus importante mais le signal n'est pas proportionnellement augmenté. L'amplitude du signal pompe-sonde est donc plus faible. Inversement, si la taille du faisceau pompe est supérieure à la taille du faisceau sonde, le volume d'échantillon sondé reçoit

une intensité de pompe plus faible, ce qui diminue également l'amplitude du signal pompe-sonde. Nous avons donc choisi des tailles de faisceaux pompe et sonde égales, d'environ 70 μm de diamètre.

3.5.3 Amélioration de la résolution temporelle de l'expérience pompe-sonde

Les caractéristiques spatiales et temporelles du faisceau pompe à 400 nm ont été améliorées en réalisant deux principaux changements : le faisceau à 800 nm destiné à la génération de la pompe à 400 nm est prélevé sur un faisceau de meilleure qualité, et l'épaisseur du cristal de BBO utilisé pour le doublage est optimisée.

Prélèvement du faisceau à 800 nm

Auparavant, le faisceau à 800 nm en sortie d'OPA était utilisé pour générer la pompe à 400 nm par doublage de fréquence. Cependant, ce faisceau présente un spectre très dégradé par son passage dans l'OPA à travers les deux cristaux de BBO au niveau desquels il amplifie les faisceaux signal et complémentaire. La figure 3.24 montre les spectres de ce faisceau à 800 nm avant son passage dans l'OPA et en sortie d'OPA où il est utilisé pour la pompe à 400 nm.

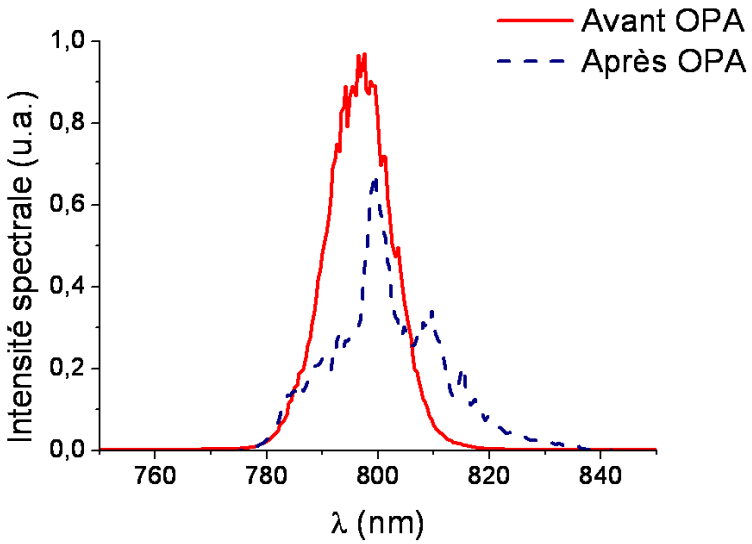


FIG. 3.24 – Spectre du faisceau pompe à 800 nm de l'OPA avant et après son passage dans l'OPA.

La dégradation du spectre de l'impulsion à 800 nm et l'accumulation d'une phase spectrale dans l'OPA ont pour effet d'augmenter la durée de l'impulsion : effectivement, cette durée, mesurée par autocorrélation en intensité, est d'environ 150 fs à l'entrée de l'OPA et de 260 fs en sortie d'OPA. L'impulsion de pompe à 400 nm générée à partir du faisceau à 800 nm en sortie d'OPA est donc également rallongée.

Pour générer la pompe à 400 nm, nous prélevons maintenant le faisceau à 800 nm, avant le premier étage de l'OPA. La lame séparatrice utilisée prélève 25 % de la puissance de ce faisceau à 800 nm : l'OPA n'est pas perturbé par cette perte et le faisceau pompe obtenu à 400 nm est de durée plus courte. Lorsque le faisceau était prélevé en sortie d'OPA, la correlation croisée mesurée à l'aide du signal pompe-sonde du GaAs avait une durée d'environ 530 fs, ce qui correspond à une durée de l'impulsion pompe de 510 fs. En prélevant le faisceau avant l'OPA, la corrélation croisée ne dure plus que 430 fs, obtenue avec une impulsion pompe de durée 405 fs.

Épaisseur du cristal doubleur

L'épaisseur du cristal de BBO utilisé pour générer la pompe à 400 nm par doublage du faisceau à 800 nm doit être choisie avec soin pour obtenir une pompe à la fois assez intense et de durée courte.

Les impulsions à 800 nm et 400 nm se propagent à des vitesses différentes à travers le cristal. Le faisceau à 400 nm généré après une distance de propagation L dans la cristal du faisceau à 800 nm est décalé temporellement par rapport à l'impulsion à 400 nm générée à l'entrée du cristal. Au delà d'une certaine distance L_{max}, les deux faisceaux ne se superposent plus, ce qui a pour effet de rallonger la durée de l'impulsion à 400 nm. La distance L_{max} est donnée par la relation suivante :

$$L_{max} = \frac{\tau}{\frac{1}{v_{g,400}} - \frac{1}{v_{g,800}}} \tag{3.28}$$

où τ est la durée de l'impulsion à 800 nm, et $v_{g,400}$ et $v_{g,800}$ sont les vitesses de groupe respectives des impulsions à 400 nm et 800 nm.

L'épaisseur du cristal doit être de l'ordre de grandeur de L_{max}, afin de générer une impulsion à 400 nm de puissance optimale tout en évitant que cette impulsion ne soit allongée par la dispersion de vitesse de groupe. Tant que les faisceaux à 800 nm et 400 nm restent

superposés et que le faisceau à 800 nm est non dépleté, la puissance de l'impulsion à 400 nm est proportionnelle au carré de l'épaisseur du cristal (voir l'équation B.5).

Dans le cas d'un cristal de BBO et d'une impulsion à 800 nm de durée 150 fs, la longueur L_{max} est de 0,78 mm. Il convient donc d'utiliser un cristal doubleur de 0,5 à 1 mm d'épaisseur. Le cristal de BBO de 2 mm d'épaisseur utilisé jusqu'alors a été remplacé par un cristal de 0,5 mm. Cette optimisation réduit encore la durée de l'impulsion pompe et améliore la résolution temporelle. La corrélation croisée mesurée dans le GaAs est raccourcie à 306 fs, ce qui correspond à une impulsion pompe de durée 270 fs !

3.5.4 Mesures d'anisotropie

Le signal du CO dans les hémoprotéines dépend de l'orientation du CO par rapport à l'hème, lorsque l'expérience pompe-sonde est réalisée avec un angle entre les polarisations pompe et sonde différent de l'angle magique de 54,7° (voir la partie 2.3.3 du chapitre 2). L'angle α du CO par rapport à la normale à l'hème peut être mesurée en effectuant deux expériences pompe-sonde, l'une avec une pompe de polarisation parallèle et l'autre avec une pompe de polarisation perpendiculaire à la polarisation de la sonde. L'angle α est alors donné par la relation 2.75.

Afin de procéder à ces mesures d'anisotropie avec rigueur, les deux expériences doivent être réalisées simultanément. Un dispositif de rotation de la lame demi-onde placé sur le trajet de la pompe a ainsi été mis en place afin de pouvoir modifier la polarisation de la pompe en cours d'acquisition. La lame demi-onde passe d'une position à l'autre entre deux balayages du délai pompe-sonde, et les deux signaux pompe-sonde correspondants sont enregistrés séparément. Ces mesures sont ainsi réitérées plusieurs dizaines de fois pour être moyennées.

3.5.5 Montage à deux échantillons

Afin de réaliser des expériences pompe-sonde sur deux échantillons simultanément pour pouvoir les comparer, une nouvelle monture a été réalisée. Cette monture peut porter deux échantillons et les faire passer successivement au niveau du point de focalisation des faisceaux pompe et sonde. En cours d'acquisition, les deux échantillons sont échangés entre deux balayages du délai pompe-sonde et les deux signaux pompe-sonde sont enregistrés séparément, puis moyennés pendant plusieurs dizaines de cycles semblables.

La monture doit impérativement placer les deux échantillons rigoureusement dans la même position. De plus, le volume d'échantillon qui vient d'être sondé ne doit pas être réexposé au faisceau durant une dizaine de millisecondes (temps de recombinaison du CO sur l'hème). La cadence du laser étant très forte (100 kHz), la monture doit animer l'échantillon d'un mouvement rapide composé d'une oscillation en translation et d'une rotation, dans le plan transverse à la direction de propagation de la sonde. Les caractéristiques de ce mouvement sont données dans l'encadré.

Caractéristiques du mouvement de l'échantillon

L'échantillon est animé d'un mouvement de rotation de fréquence f_R et d'une oscillation en translation de fréquence f_T et d'amplitude $r = 3mm$. Le faisceau laser de cadence $f = 100\,kHz$ est fixe et est focalisé sur celui-ci en un point de diamètre $d = 70\mu m$. Ce point décrit ainsi sur l'échantillon mobile une couronne, dont le rayon intérieur R, déterminé par la hauteur de la monture par rapport au faisceau, est de 6 mm.

Le faisceau ne doit pas revenir au même point avant la durée T = 10 ms correspondant au temps de recombinaison du CO sur l'hème. Trois conditions doivent être vérifiées afin d'assurer cette contrainte.

Tout d'abord, deux impulsions laser successives ne doivent pas atteindre l'échantillon au même point, le mouvement rapide de rotation doit déplacer l'échantillon d'une distance au moins d pendant la durée $1/f$:

$$2\pi R\frac{f_R}{f} \geq d \tag{3.29}$$

Ensuite, le mouvement de translation doit déplacer l'échantillon d'au moins le diamètre d pendant une rotation de l'échantillon, afin que le faisceau traverse une partie différente de l'échantillon lors de la rotation suivante :

$$2r\frac{f_T}{f_R} \geq d \tag{3.30}$$

Enfin, il doit s'écouler une durée T avant de décrire de nouveau la couronne, qui est parcourue au bout d'une période d'oscillation en translation :

$$\frac{1}{f_T} \geq T \tag{3.31}$$

Un système spécifique a été développé au LOB par Jean-Marc Sintes et Xavier Solinas pour répondre à ce cahier des charges. Ce système comporte deux moteurs à commutation électronique. Le premier moteur induit la rotation des échantillons, et le second assure l'échange entre les deux échantillons ainsi que l'oscillation en translation. Le fait que les mouvements des moteurs soient entièrement gérés par l'électronique permet au premier moteur de faire tourner l'échantillon à 20000 tours/minute, et au second d'effectuer des accélérations et décélérations brutales, induisant l'oscillation de l'échantillon avec une amplitude jusqu'à 5 mm et une cadence pouvant atteindre $8\,Hz$. La photo du système est présentée à la figure 3.25.

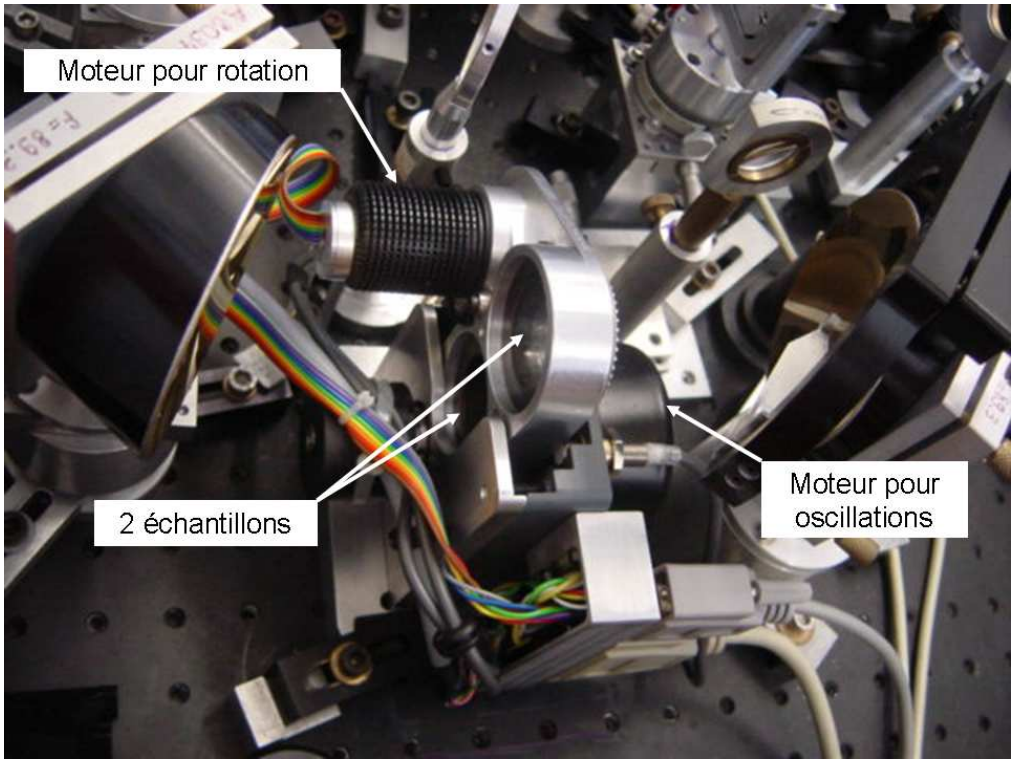


FIG. 3.25 – Monture des deux échantillons.

Au cours de nos expériences, les oscillations sont réglées à 5 Hz pour ne pas induire trop de vibrations à la table et une vitesse de 10000 tours/minute est utilisée car la protéine est éjectée par force centrifuge au delà de cette vitesse. Ces paramètres choisis vérifient les trois conditions 3.29, 3.30 et 3.31 énumérées dans l'encadré portant sur les caractéristiques du mouvement de la monture.

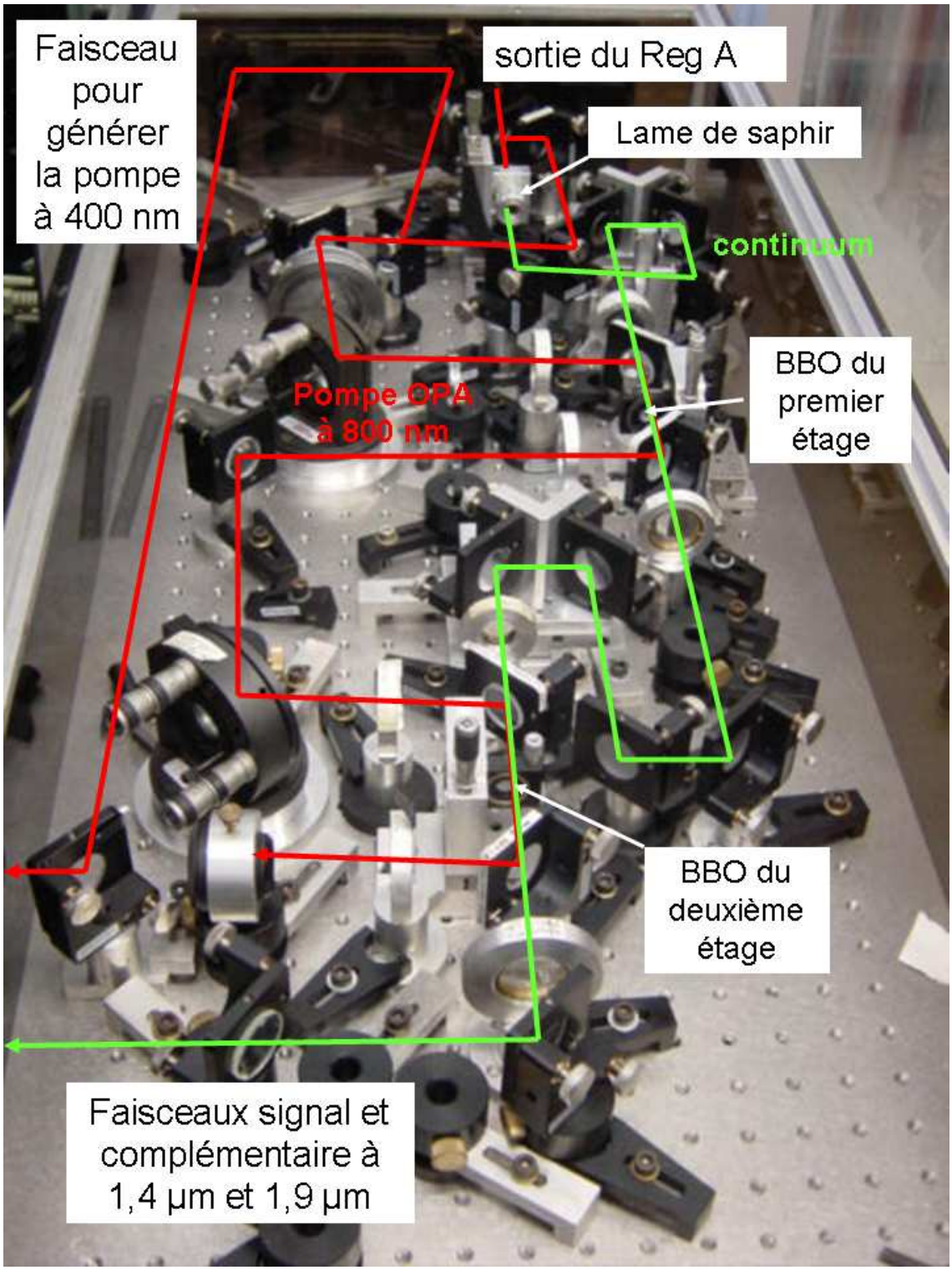


FIG. 3.26 – OPA de l'expérience pompe-sonde intégrée spectralement. En sortie de l'amplificateur régénératif, le faisceau à 800 nm est divisé en 3 parties. Un premier faisceau sert à générer la pompe à 400 nm, un deuxième faisceau est focalisé dans la lame de saphir pour produire le continuum (en vert) qui est amplifié par le troisième faisceau au niveau des deux cristaux de BBO de l'OPA. Les faisceaux signal à 1,4 μm et complémentaire à 1,9 μm sont obtenus en sortie d'OPA.

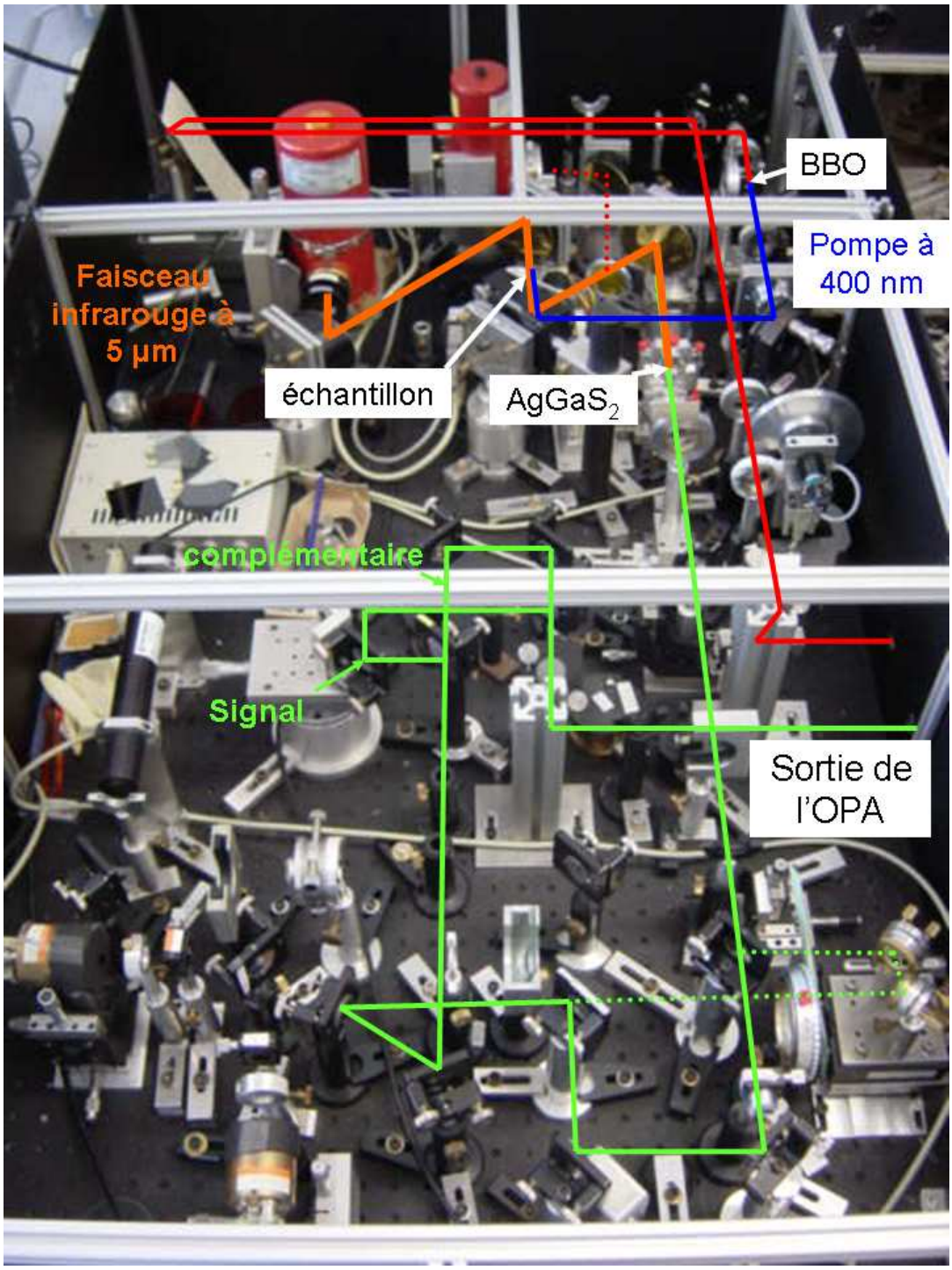


FIG. 3.27 – Génération de la pompe à 400 nm et la sonde vers 5 μm. Le faisceau à 800 nm prélevé avant l'OPA est doublé au niveau d'un cristal de BBO pour générer la pompe à 400 nm (en bleu). Les faisceaux signal et complémentaire (en vert) sont séparés dans un interféromètre pour être superposés spatialement et temporellement, puis focalisés dans le cristal de $AgGaS_2$ pour générer la sonde vers 5 μm. L'interféromètre qui permet de mesurer le spectre infrarouge est installé sur le trajet des faisceaux signal et complémentaire, le second bras est indiqué en pointillés verts. Les faisceaux pompe et sonde sont focalisés sur l'échantillon et la puissance infrarouge transmise est mesurée par le détecteur MCT.

3.6 Mise en place de l'expérience résolue spectralement

3.6.1 Modifications au niveau de la sonde infrarouge

Le montage élaboré par Kevin Kubarych et Manuel Joffre est destiné à des expériences de spectroscopie multidimentionnelle, et comporte ainsi deux faisceaux infrarouge générés à partir de deux OPA identiques. Nos expériences pompe sonde unidimensionnelles ne nécessitent qu'un seul faisceau infrarouge. Afin d'utiliser toute la puissance du faisceau à 800 nm mis à notre disposition en sortie du Hurricane, le montage est adapté pour n'alimenter qu'un seul OPA et générer ainsi un seul faisceau infrarouge, plus puissant (1 μJ par impulsion).

En sortie d'OPA, les impulsions signal et complémentaire sont séparées par des lames dichroïques dans deux bras pour être superposées temporellement et spatialement dans le cristal de GaSe qui génère l'infrarouge par différence de fréquence. Cependant, la lame dichroïque ne sépare pas parfaitement les deux longueurs d'onde, une impulsion résiduelle du signal dans le bras du complémentaire produit au niveau du cristal de GaSe une impulsion infrarouge résiduelle qui se superpose à l'impulsion principale et provoque de l'instabilité. Afin de supprimer cette impulsion parasite, une lame de calcite a été placée avant la lame dichroïque. En se propageant dans cette lame de calcite qui est biréfringente, les faisceaux signal et complémentaire polarisés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre se propagent à des vitesses différentes. Ainsi, l'impulsion résiduelle du signal dans le bras du complémentaire ne se superpose plus à l'impulsion complémentaire, et ne perturbe plus l'impulsion infrarouge générée par les impulsions signal et complémentaire provenant de chacun des deux bras.

Le faisceau infrarouge est superposé à un faisceau à 800 nm étiré dans le cristal de MgO :$LiNbO_3$ pour générer le faisceau visible envoyé dans le spectromètre. Le faisceau étiré utilisé jusqu'alors, qui provient de l'ordre 0 du compresseur de l'amplificateur régénératif, était limité à 10 μJ par impulsion. Nous avons décidé de prélever à la place une partie du faisceau avant le compresseur afin de pouvoir disposer de plus de puissance. De plus, un réglage en translation a été installé sur la ligne à retard du faisceau étiré pour permettre un ajustement plus précis de la superposition temporelle des deux faisceaux. Ce réglage offre également la possibilité de mesurer la phase quadratique de l'impulsion étirée (voir encadré).

Mesure de la phase quadratique de l'impulsion étirée et de la résolution spectrale

Lorsque le délai temporel entre l'impulsion étirée et l'impulsion infrarouge à caractériser est modifié de $\Delta\tau$, la fréquence de l'impulsion étirée qui se superpose spatialement avec l'impulsion infrarouge varie d'une valeur $\Delta\omega$ et le spectre de l'impulsion infrarouge converti vers le visible est décalé de cette valeur. La phase quadratique Φ" de l'impulsion étirée s'exprime en fonction de la variation du délai $\Delta\tau$ et du décalage $\Delta\omega$ de la manière suivante :

$$\Phi" = \frac{\Delta\tau}{\Delta\omega} \tag{3.32}$$

Afin de déterminer la phase quadratique Φ", nous mesurons au niveau du spectre de la carboxy-myoglobine converti vers le visible (voir figure 3.12) le déplacement $\Delta\lambda$ de la fréquence de la raie d'absorption du CO selon le déplacement Δx de la translation du faisceau étiré : un déplacement aller retour $2\Delta x$ de 32 mm induit ainsi un changement du délai $\Delta\tau$ de 1,1 10^{-10} s et une variation $\Delta\lambda$ de 6,62 nm. Cette variation correspond, pour un faisceau centré à 800 nm, à une valeur de $\Delta\omega$ de 1,95 10^{13} s^{-1}. La phase quadratique Φ" calculée à partir de ces valeurs à l'aide de l'équation 3.32 s'élève alors à 5,47 10^6 fs^2.

Pour une impulsion étirée de largeur spectrale $\Delta\sigma$ d'environ 150 cm^{-1}, la durée de l'impulsion vaut $\Phi"2\pi\Delta\sigma \approx 150ps$.

La résolution du système spectromètre-CCD est déterminée par la taille d'un pixel de la CCD qui correspond à 0,07 nm à 693 nm, c'est à dire 1,4 cm^{-1} dans l'infrarouge. Cependant, dans notre cas, c'est la phase quadratique de l'impulsion étirée, utilisée pour convertir le spectre infrarouge vers le visible par somme de fréquence, qui détermine la résolution dans l'infrarouge des spectres mesurés. On peut montrer qu'une raie infrarouge de largeur spectrale $\Delta\omega_{IR}$ et de durée Δt_{IR} induit par somme de fréquence avec l'impulsion étirée de phase quadratique Φ" une raie spectrale dans le domaine visible de largeur $\Delta\omega_{SFG}$ vérifiant :

$$(\Delta\omega_{SFG})^2 = (\Delta\omega_{IR})^2 + \left(\frac{\Delta t_{IR}}{\Phi"}\right)^2 \tag{3.33}$$

Nous pouvons calculer la résolution dans l'infrarouge $\Delta\omega_{IR}^{res}$ en considérant qu'un élargissement d'un facteur 2 à cause de la conversion vers le visible est tolérable :

$$(\Delta\omega_{SFG})^2 = 2\,(\Delta\omega_{IR}^{res})^2 \tag{3.34}$$

Dans le cas d'une impulsion infrarouge limitée par transformée de Fourier :

$$(\Delta\omega_{SFG})^2 = (\Delta\omega_{IR})^2 + \left(\frac{1}{2\Delta\omega_{IR}\Phi"}\right)^2 \tag{3.35}$$

$$\Delta\omega_{IR}^{res} = \frac{1}{\sqrt{2\Phi"}} \approx 3.10^{11} s^{-1} \tag{3.36}$$

Cette valeur de $\Delta\omega_{IR}^{res}$ correspond à une résolution de 1,6 cm^{-1}. Les raies spectrales de largeur supérieure à 1,6 cm^{-1} sont élargies d'un facteur de moins de 2.

La mesure de la phase quadratique Φ" de l'impulsion étirée a ainsi permis d'évaluer la résolution de l'expérience résolue spectralement à 1,6 cm^{-1}.

3.6.2 Mise en place de la pompe visible

En vue de générer le faisceau pompe à 400 nm de nos expériences pompe sonde, un faisceau à 800 nm est prélevé au niveau du deuxième faisceau de pompe de l'OPA, à l'aide d'un cube séparateur précédé d'une lame demi-onde qui permet par rotation de régler la puissance prélevée. Ce faisceau passe dans une ligne à retard, puis il est doublé dans un cristal de BBO en configuration de type I, d'épaisseur 0,5 mm (voir la partie 3.5.3). Le faisceau à 400 nm généré, de puissance d'environ 300 nJ par impulsion, est alors focalisé par une lentille de distance focale 15 mm au niveau du point de focalisation du faisceau infrarouge où se place l'échantillon. Comme préconisé dans la partie 3.5.2, les faisceaux pompe à 400 nm et sonde infrarouge sont de tailles égales au niveau du plan focal, leur diamètre vaut environ 90 μm.

Un chopper est placé sur le faisceau à 800 nm. L'acquisition des signaux-pompe sonde est abordée dans la partie 3.6.3. L'ensemble du dispositif est présenté à la figure 3.28.

3.6.3 Acquisition des signaux pompe sonde

Afin de diminuer au maximum le bruit dû aux fluctuations du laser, la cadence d'acquisition des spectres doit être maximale, égale à la fréquence de 1 kHz du laser. Dans ces conditions, le chopper doit tourner à 500 Hz pour enregistrer successivement un spectre en présence de pompe et un spectre en l'absence de pompe. Cette cadence d'acquisition implique qu'en moins de 1 ms, la caméra CCD doit lire le spectre et le transférer pour être traité, et le moteur doit déplacer le faisceau pompe. Cela s'est avéré impossible dans un premier temps. Nous avons donc décidé de lire les spectres par paquets de 40 à une cadence de 25 Hz et de faire tourner le chopper à 12,5 Hz pour enregistrer successivement 40 spectres en présence de pompe puis 40 spectres en l'absence de pompe.

L'acquisition à 1 kHz a ensuite été réalisée en optimisant le fonctionnement de la caméra CCD (Princeton Instruments, puce EEV de 1340×100 pixels illuminée par l'arrière, contrôleur ST-133, 2 MHz) au niveau de la lecture et du transfert des données vers le programme d'acquisition. D'une part, la lecture en moins de 1 ms est rendue possible en n'utilisant que 20 lignes de la caméra lues de manière groupées et en minimisant le temps de déplacement vertical des charges. D'autre part, comme le transfert des données vers le programme d'acquisition Labview dure 3 ms, les spectres lus sont stockés au niveau de la carte de la CCD. Ils sont ensuite transférés par paquets de 100 vers le programme d'acquisition.

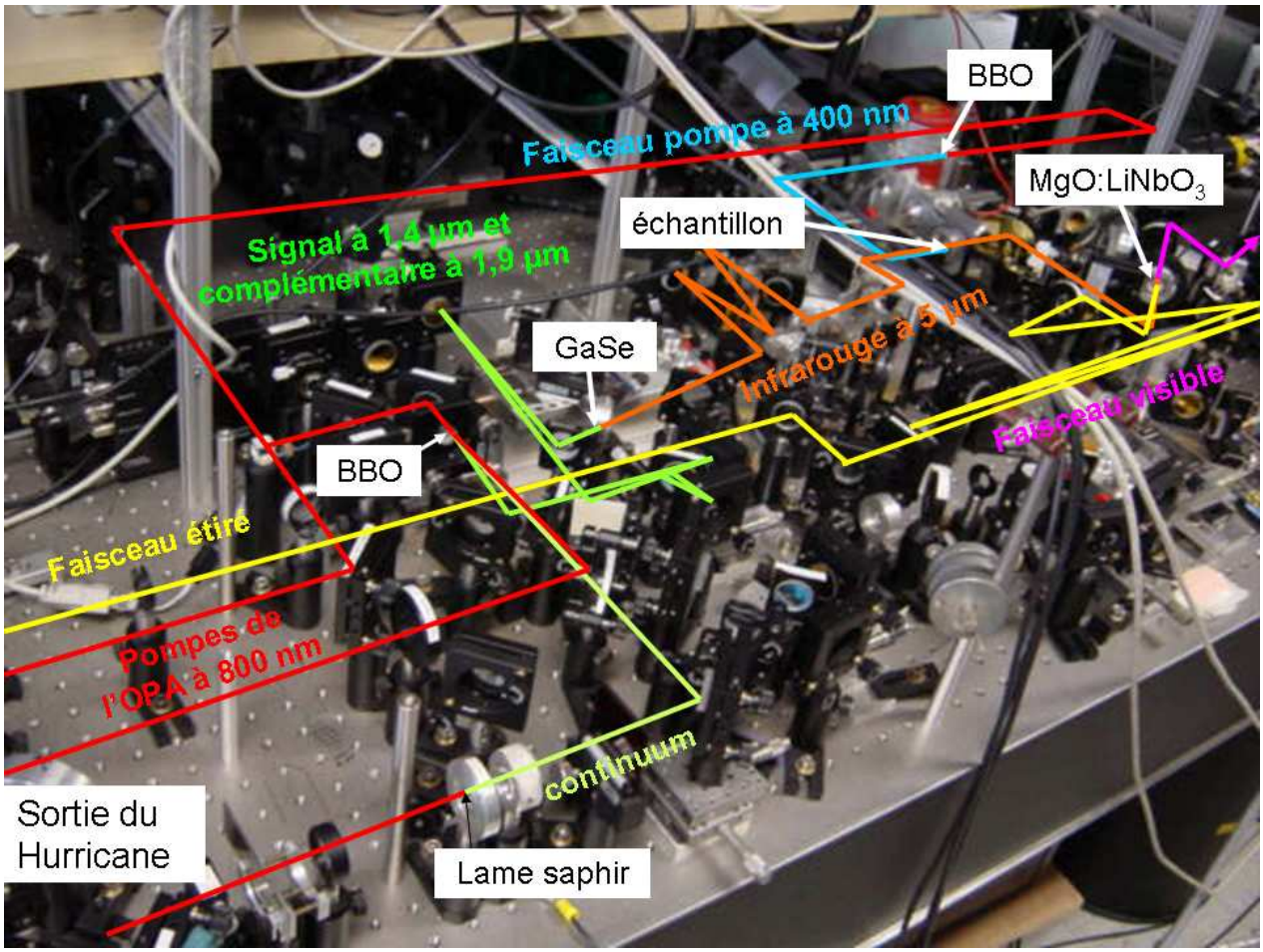


FIG. 3.28 – Dispositif de l'expérience pompe sonde résolue spectralement. Le faisceau à 800nm en sortie du laser Hurricane est divisé en trois faisceaux (rouges). Le premier faisceau est focalisé dans la lame de saphir pour générer le continuum (en vert) et les deux autres faisceaux amplifient ce continuum lors de ses deux passages dans le cristal de BBO de l'OPA. Les faisceaux signal et complémentaire en sortie d'OPA (en vert) sont superposés dans le cristal de GaSe pour générer l'infrarouge (en orange) par différence de fréquence. Après son passage à travers l'échantillon, l'infrarouge est mélangé au faisceau étiré (en jaune) au niveau du cristal de MgO :$LiNbO_3$. Le faisceau visible (en rose) qui en résulte est envoyé dans le spectromètre (qui n'apparaît pas sur cette photographie). La faisceau à 800 nm destiné à la pompe de l'expérience pompe sonde est prélevé au niveau de la deuxième pompe de l'OPA. Ce faisceau est doublé dans un cristal de BBO et le faisceau à 400 nm ainsi généré (en bleu) est focalisé au niveau de l'échantillon.

Chapitre 4

Résultats expérimentaux et simulations

Le transfert du ligand CO au sein de la cytochrome *c* oxydase, introduite au chapitre 1, est étudié dans ce chapitre 4. Ce transfert subpicoseconde, du Fer de l'hème à l'atome de Cuivre du site bimétallique de l'hémoprotéine, peut être suivi directement par l'intermédiaire de la signature vibrationnelle du ligand CO dans le domaine infrarouge. Deux dispositifs pompe-sonde femtoseconde infrarouge, décrits au chapitre 3, ont ainsi été mis en œuvre en vue de réaliser des mesures intégrées spectralement et des mesures résolues spectralement.

Les parties 4.1 et 4.2 présentent les résultats de ces expériences pompe-sonde : les artefacts de mesure ont été étudiés et les signaux induits par le transfert du CO ont été confrontés à des simulations basées sur les équations de Bloch introduites dans la partie 2.3.3 du chapitre 2.

D'autre part, des simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées pour modéliser le transfert du ligand CO dans la cytochrome *c* oxydase. Ces calculs sont décrits dans la partie 4.3.

La partie 4.4 confronte les différents résultats obtenus dans ce travail entre eux et avec les travaux de spectroscopie infrarouge et visible réalisés précédemment.

4.1 Expériences intégrées spectralement

La difficulté principale des expériences pompe-sonde intégrées spectralement dans le domaine infrarouge réside dans la faiblesse du signal pompe-sonde du CO. Les pics d'absorption différentiels observés lors de ces expériences ont des amplitudes relatives de 10^{-3} à 10^{-2} (voir partie 4.2). Ces pics d'une dizaine de cm^{-1} de large mesurés par une sonde de largeur 100 cm^{-1} induisent des signaux d'amplitude relative 10 fois plus faible encore, de 10^{-4} à 10^{-3}, puisque l'on mesure l'intensité transmise en intégrant sur 100 cm^{-1}.

D'autre part, comme nous l'expliquons dans la partie 3.4.4 du chapitre 3, l'échantillon de cytochrome *c* oxydase ne peut pas être obtenu à des concentrations aussi importantes que les protéines de taille plus faible et le signal pompe-sonde induit est alors plus faible. Cet inconvénient a dû être compensé en utilisant des échantillons plus épais mais il a alors fallu augmenter la puissance de la sonde qui était trop absorbée par le solvant de l'échantillon (partie 3.5.1 du chapitre 3). Nous avons alors pu ajuster l'intensité de sonde transmise juste en dessous de la saturation du détecteur HgCdTe de sorte à minimiser le bruit de photons.

Les expériences pompe-sonde intégrées spectralement sur la cytochrome *c* oxydase ligandée avec CO réalisées avec une sonde centrée à différentes fréquences donnent ainsi les signaux représentés à la figure 4.1. Rappelons que la fréquence de vibration du CO lié au Fer de l'hème est de 1963 cm^{-1} et la fréquence du CO lié au Cuivre est de 2062 cm^{-1}. Chaque cinétique pompe-sonde a été obtenue au bout d'un temps d'accumulation de 1 h, ce qui correspond à 100 cycles de délais pompe-sonde avec un temps d'acquisition de 300 ms par délai.

Nous avons constaté en réalisant l'expérience sur la protéine déligandée qu'un artefact de mesure apparaît autour du délai pompe-sonde nul et se superpose, dans le cas de la protéine ligandée, au signal du CO. Cet artefact complique l'accès aux premières étapes de transfert du CO du Fer vers le Cuivre, car il faut le séparer du signal.

Dans un premier temps, nous avons étudié les différentes contributions des phénomènes non linéaires susceptibles de donner cet artefact. Tout d'abord, l'effet Kerr optique a été suspecté, et mis en évidence par plusieurs expériences, présentées dans la partie 4.1.1. Le phénomène prépondérant cependant, est un phénomène d'absorption de deux photons par l'hème. Ce phénomène est étudié et modélisé dans la partie 4.1.2.

Afin d'isoler le signal du CO induit par sa photodissociation et son transfert, nous avons envisagé de soustraire l'artefact au signal de la protéine. Les résultats sont présentés à la partie 4.1.3. Enfin, dans la partie 4.1.4, des mesures d'anisotropie ont été réalisées afin de mesurer l'orientation du CO lié au Fer et au Cuivre.

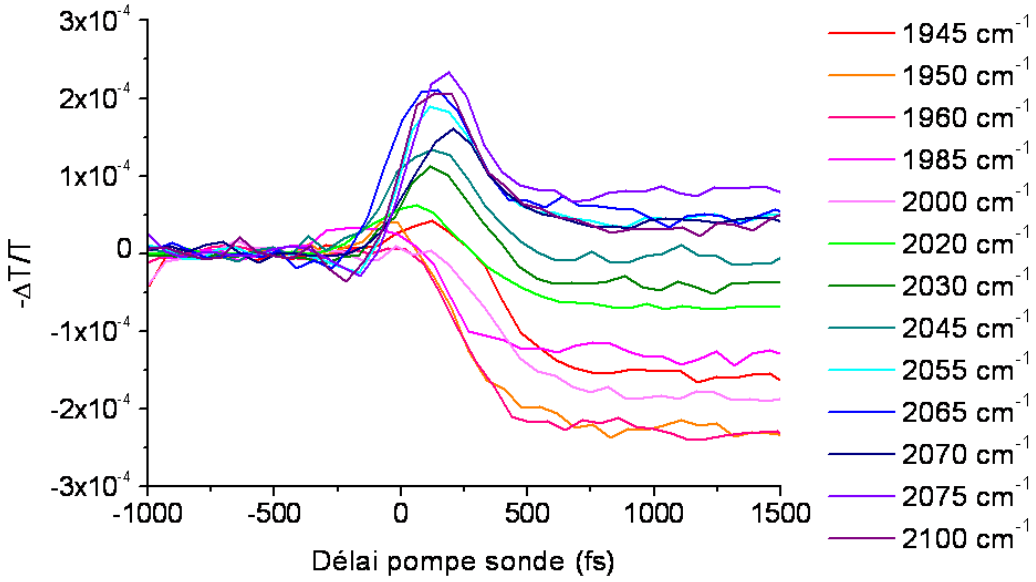


FIG. 4.1 – Expérience pompe-sonde intégrée spectralement sur un échantillon de cytochrome *c* oxydase 500 μM d'épaisseur 200 μm, pompe de 60 nJ par impulsion, angle de 54,7° entre les polarisations pompe et sonde.

4.1.1 Effet Kerr

L'effet Kerr est un phénomène non linéaire du troisième ordre qui s'exprime lorsqu'un faisceau très intense traverse un milieu non linéaire. Cet effet, décrit dans la partie B.2 de l'Annexe B, correspond à une modification de l'indice du milieu proportionnellement à l'intensité du faisceau.

Lors de l'expérience pompe-sonde, un effet Kerr est provoqué par la focalisation du faisceau pompe sur les fenêtres de CaF_2 et l'échantillon liquide entre ces fenêtres. Les phénomènes d'autofocalisation, de biréfringence et de modulation de phase du faisceau sonde induits par cet effet Kerr ont été mis en évidence.

La modification de l'indice de réfraction de l'échantillon par la pompe produit dans le domaine spatial la focalisation du faisceau sonde. Cette focalisation peut être détectée en diaphragmant le faisceau sonde. L'intensité de la sonde transmise par le diaphragme se voit alors modifiée pendant la durée de l'impulsion pompe qui provoque sa focalisation par effet Kerr.

Le faisceau sonde transmis par l'échantillon est focalisé sur le détecteur MCT qui mesure sa puissance. La surface de détection étant déterminée par la taille du détecteur (100×100 μm^2), il suffit de déplacer longitudinalement le détecteur par rapport au point focal de la sonde (de 70 μm de diamètre) pour diaphragmer le faisceau. Le signal pompe-sonde transmis par l'échantillon de CaF_2 est donc mesuré dans un premier temps en focalisant correctement le faisceau sonde sur le détecteur MCT, puis en déplaçant longitudinalement le détecteur pour le placer en dehors du plan focal de la sonde. Dans le deuxième cas, le détecteur ne détecte pas l'intégralité du faisceau sonde car la taille du faisceau sonde est supérieure à la surface du détecteur. La figure 4.2 montre alors que le signal pompe-sonde différentiel est nettement plus intense dans ce dernier cas : la focalisation de la sonde sur le détecteur est bien modifiée par l'effet Kerr induit par la pompe, la fraction détectée du faisceau sonde augmente.

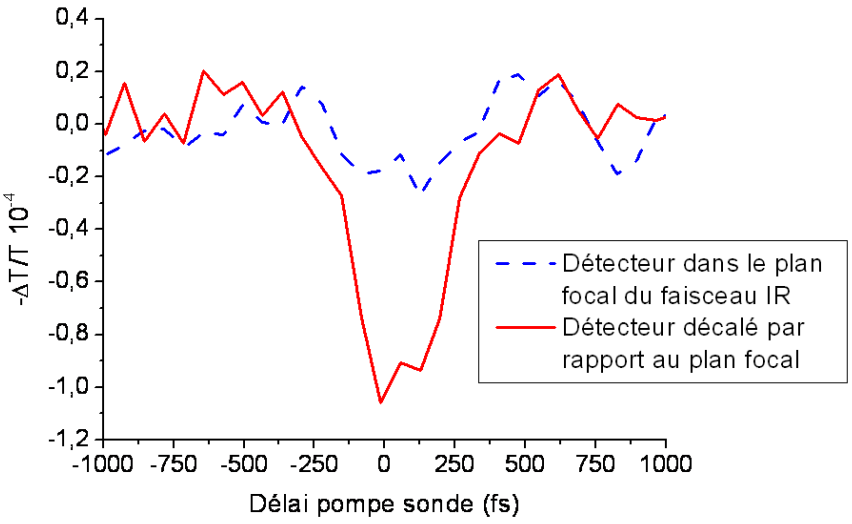


FIG. 4.2 – Signal pompe-sonde dû à deux fenêtres de CaF_2 de 2 mm d'épaisseur au niveau de l'échantillon, selon la focalisation de la sonde sur le détecteur, pompe de 200 nJ par impulsion.

La modification de l'indice de réfraction par effet Kerr est différente dans la direction de la polarisation de la pompe et dans la direction orthogonale, ce qui induit un phénomène de

biréfringence dans l'échantillon. En traversant l'échantillon, la sonde acquiert un déphasage entre la projection de sa polarisation sur la direction de la polarisation de la pompe et la projection orthogonale, ce déphasage $\Delta\varphi$ s'exprime de la manière suivante :

$$\Delta\varphi = \frac{\omega}{c} L \, \Delta n \, I_P \tag{4.1}$$

La distance L est l'épaisseur de l'échantillon, ω est la fréquence de la sonde, Δn est la différence entre les indices de réfraction selon les directions parallèle et perpendiculaire à la polarisation de la pompe, et I_P est l'intensité de la pompe.

Ce déphasage n'a pas de conséquence sur le signal pompe-sonde dans les conditions usuelles d'expérience. Par contre, la présence d'éléments polarisants sur le trajet de la sonde après l'échantillon peut induire une dépendance de la puissance de sonde mesurée selon le déphasage $\Delta\varphi$.

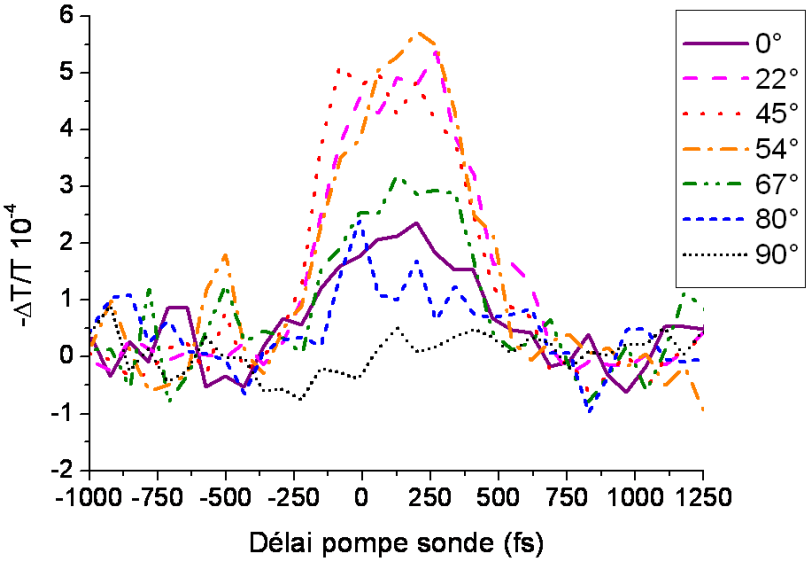


FIG. 4.3 – Signal pompe-sonde dû à deux fenêtres de CaF_2 de 2 mm d'épaisseur au niveau de l'échantillon selon l'angle entre les polarisations de la pompe et de la sonde détectée, pompe de 200 nJ par impulsion.

Pour mettre en évidence le déphasage $\Delta\varphi$ dû à la biréfringence induite par la pompe, nous avons placé un polariseur devant le détecteur, parallèlement à la polarisation de la sonde. La modification de la transmission de la sonde par le déphasage $\Delta\varphi$ est alors proportionnelle à $sin^2(\Delta\varphi/2)\ sin^2(2\alpha)$, où α est l'angle entre les polarisations de la pompe et de la sonde. Le signal pompe-sonde mesuré pour différentes valeurs de α est représenté à la figure 4.3.

L'amplitude de ce signal pompe-sonde est maximale lorsque α est proche de 45 ° ce qui est en accord avec une variation en $sin^2(2\alpha)$.

Les deux phénomènes d'autofocalisation et de biréfringence produisent très peu de signal dans les conditions d'étude des protéines. Il suffit de bien focaliser la sonde infrarouge sur le détecteur, et de ne pas ajouter d'éléments polarisants après l'échantillon. Le phénomène de modulation de phase dû à l'effet Kerr induit en revanche un signal plus important lorsque l'échantillon présente des bandes d'absorption dans le domaine spectral couvert par le faisceau sonde : le changement d'indice provoqué par l'intensité de la pompe produit, d'après l'équation B.25 de l'Annexe B, un élargissement spectral du faisceau sonde. Le spectre de la sonde est élargi et son absorption par les bandes de l'échantillon est ainsi modifiée.

Dans notre cas, le solvant, essentiellement constitué de D_2O, présente une large bande d'absorption qui s'étend de 2000 à 2800 cm^{-1} (voir figure 3.21 au chapitre III). La transmission d'une sonde centrée vers 2000 cm^{-1}, au bord de la bande d'absorption, est donc très sensible à la création de nouvelles fréquences. Quand une telle sonde arrive à délai négatif au niveau du front montant de l'impulsion pompe, des fréquences plus faibles sont générées et le spectre de la sonde est décalé vers la plage de transmission plus élevée du solvant et le signal $-\Delta T/T$ est négatif. Inversement, quand la sonde arrive à délai positif superposée au front descendant de l'impulsion pompe, des fréquences plus grandes sont créées et le spectre de la sonde est décalé vers la bande d'absorption du solvant et le signal $-\Delta T/T$ est positif.

Nous avons séparé les phénomènes de génération de nouvelles fréquences et d'absorption par le solvant à l'aide de l'expérience suivante : au niveau du point de focalisation des faisceaux pompe et sonde, nous positionnons un échantillon de D_2O de 200 μm entre deux lames de CaF_2, dans lequel la pompe induit des nouvelles fréquences au niveau du faisceau sonde. Le faisceau sonde est alors absorbé par un autre échantillon de 200 μm placé devant le détecteur qui mesure le signal pompe-sonde. Par la suite, nous appelons "filtre" l'échantillon devant le détecteur, par opposition à l'échantillon sur lequel les faisceaux sont focalisés, et nous étudions l'influence de la bande d'absorption de ce "filtre" sur le signal pompe-sonde.

L'influence de la bande d'absorption entre 2000 à 2800 cm^{-1} est étudiée en utilisant des filtres de bandes d'absorption différentes : un filtre vide composé uniquement des deux fenêtres de CaF_2, un filtre de solvant D_2O, et un filtre de myoglobine MbCO 10 mM qui est un peu

plus absorbant que le D_2O. L'expérience pompe-sonde est réalisée avec une sonde centrée à 2075 cm^{-1} au bord de la bande d'absorption, puis avec une sonde centrée à 1950 cm^{-1} plus éloignée de la bande d'absorption.

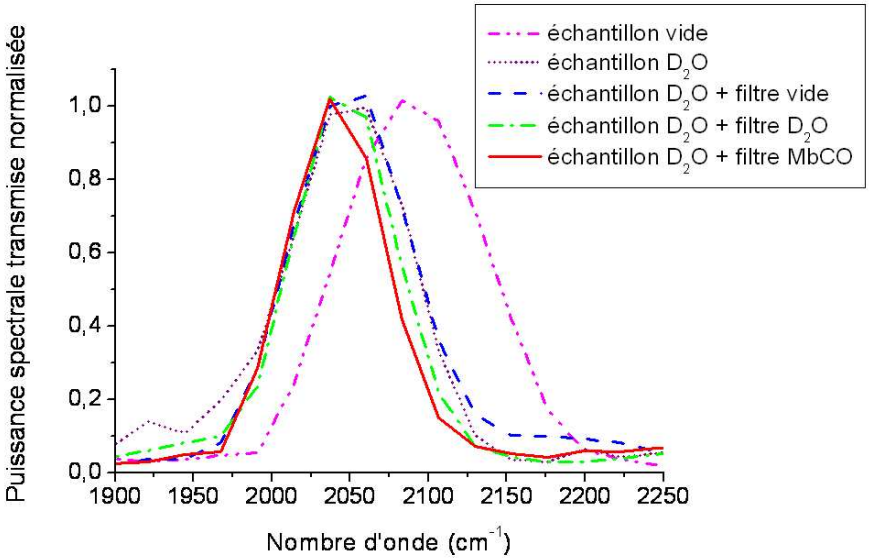


FIG. 4.4 – Spectres infrarouges de la sonde centrée à 2075 cm^{-1}, transmis par différents échantillons d'épaisseur 200 μm, suivis de filtres d'épaisseur 200 μm également. Le solvant a une forte absorption dans cette plage spectrale. Une modification du spectre infrarouge induit donc une modification de l'absorption par le solvant. L'"échantillon vide" correspond aux lames de CaF_2.

Le spectre infrarouge de la sonde centrée à 2075 cm^{-1}, transmise par l'échantillon suivi des différents filtres, est très influencé par la bande d'absorption du filtre utilisé (voir figure 4.4). Le signal de cinétique pompe-sonde qui en résulte (voir figure 4.5) présente les variations attendues : il est négatif au niveau du front montant de la pompe et positif au niveau du front descendant. De plus, l'amplitude de ce signal est d'autant plus importante que la transmission de l'échantillon est affectée par la bande d'absorption (voir figure 4.4).

Lorsque la sonde est centrée à 1950 cm^{-1}, le signal pompe-sonde représenté à la figure 4.5 dépend très peu du filtre utilisé. Effectivement, le spectre de la sonde est alors plus éloigné de la bande d'absorption du solvant, et l'élargissement du spectre de la sonde modifie donc très peu l'absorption de la sonde. On constate cependant que l'échantillon seul produit tout de même un faible signal, plus important que celui du filtre de même nature ajouté. Il est possible que la pompe chauffe le solvant de l'échantillon et élargit ainsi la bande d'absorption du D_2O.

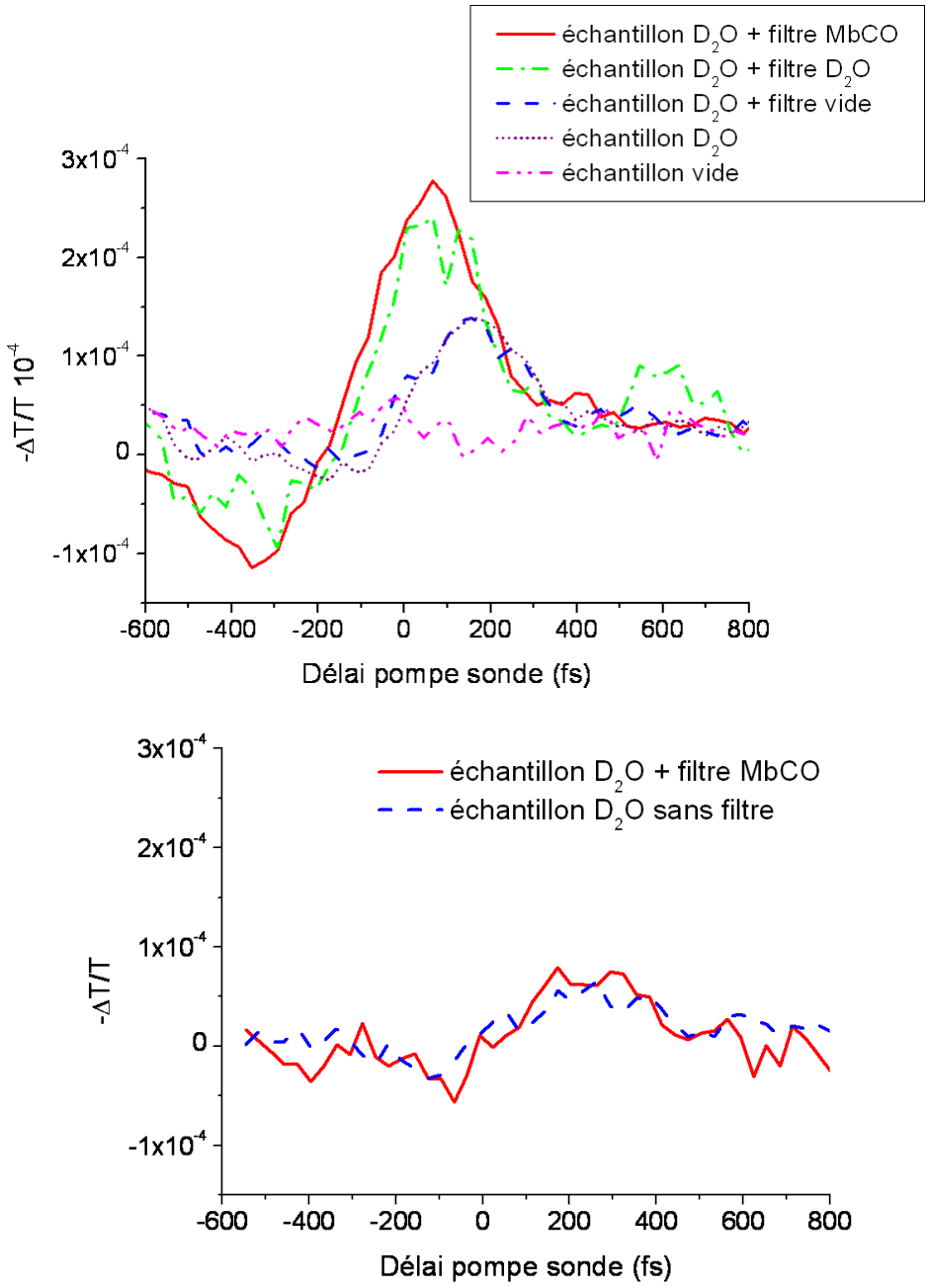


FIG. 4.5 – Signal pompe-sonde d'un échantillon de D_2O d'épaisseur 200 μm, transmis par différents filtres, d'épaisseur 200 μm également, pompe de 120 nJ par impulsion. La sonde est centrée à 2075 cm^{-1} en haut, et à 1950 cm^{-1} en bas.

En conclusion, lors de nos expériences pompe-sonde sur les hémoprotéines, l'effet Kerr induit par modulation de phase un signal pendant le recouvrement temporel pompe-sonde, lié au déplacement du spectre de la sonde par rapport à la bande d'absorption de l'échantillon. Ce signal reste cependant négligeable devant le signal d'absorption par les deux hèmes de la protéine, décrit dans la partie 4.1.2.

4.1.2 Absorption par les transitions de l'hème

Nous avons enregistré le signal pompe-sonde de trois hémoprotéines réduites déligandées : la cytochrome *c* oxydase, la myoglobine et le cytochrome *c*. Le même signal autour du délai pompe-sonde nul, évoluant selon la même cinétique, apparaît dans les trois cas (voir figure 4.6).

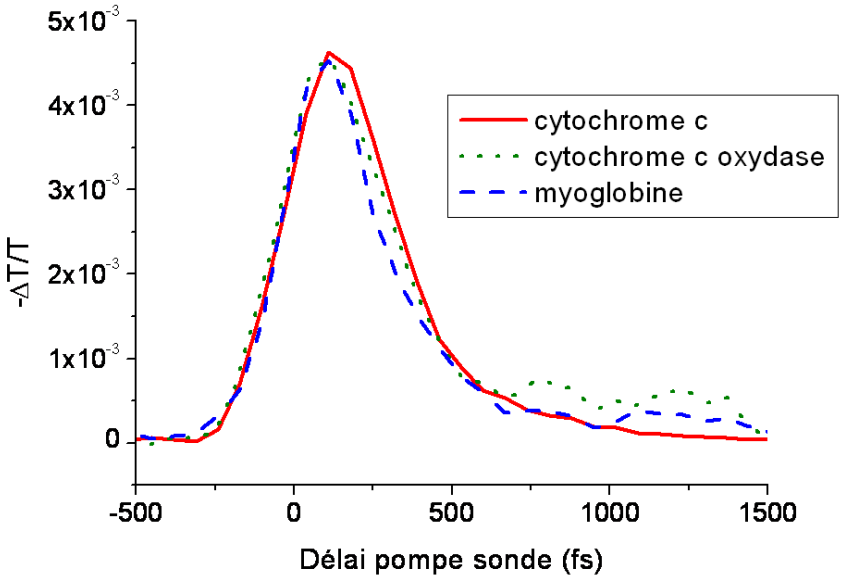


FIG. 4.6 – Signaux pompe-sonde de différentes hémoprotéines réduites sans ligands, normalisés sur le signal du cytochrome *c*. Pompe de 214 nJ par impulsion.

Ce signal est d'autant plus important que l'échantillon est concentré en protéines. De plus, il apparaît sur une très large plage spectrale : nous l'avons détecté pour une sonde entre 1780 et 2100 cm^{-1}. Enfin, il est proportionnel à l'intensité de la pompe. La figure 4.7 représente le signal induit par un échantillon de cytochrome *c* avec des puissances de pompe différentes, ainsi que l'évolution de l'amplitude de ce signal en fonction de l'intensité de pompe.

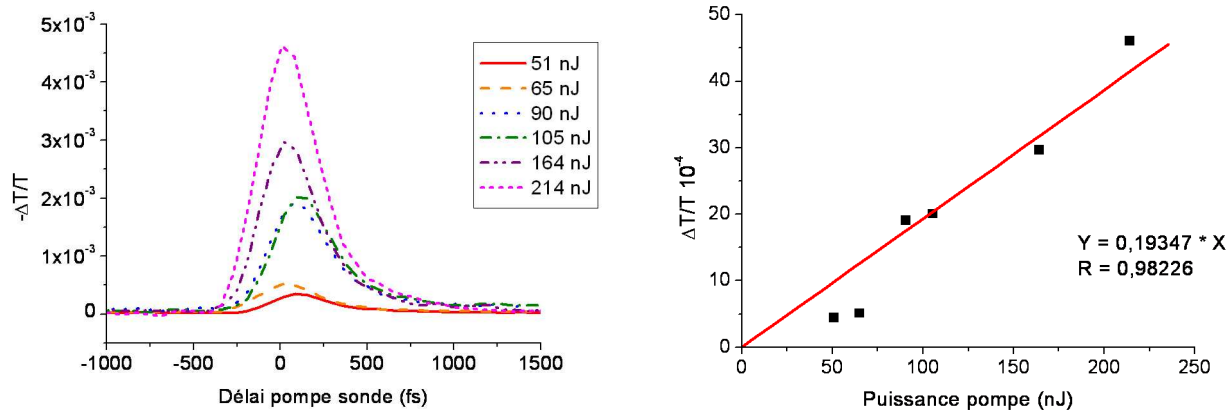


FIG. 4.7 – A gauche, signaux pompe-sonde induits dans un échantillon de cytochrome *c* de concentration 500 μM et d'épaisseur 270 μm pour différentes puissances de pompe. A droite, amplitude maximale du signal pompe-sonde induit dans le cytochrome *c* selon la puissance de pompe. Le zéro du délai pompe-sonde est déterminé à $\pm$50 fs.

Les références [57], [58] et [59] mentionnent l'existence de ce signal dans la myoglobine et l'hémoglobine et proposent un phénomène d'absorption à deux photons sans participation d'état intermédiaire pour l'expliquer. Effectivement, la bande d'absorption de Soret de l'hème est assez large, d'environ 40 nm ce qui correspond à 2500 cm^{-1}, pour absorber simultanément un photon pompe et un photon sonde. Cette absorption à deux photons nécessite la présence simultanée des impulsions pompe et sonde, le signal pompe-sonde obtenu correspondrait donc dans ce cas à la corrélation croisée des impulsions pompe et sonde.

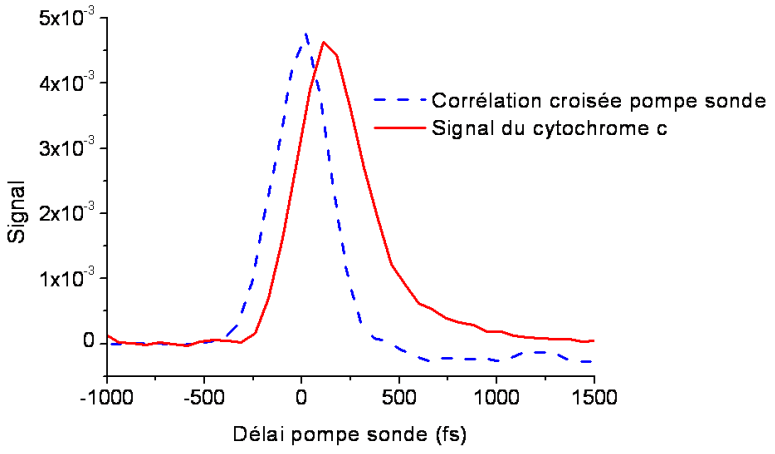


FIG. 4.8 – Signal pompe-sonde mesuré dans le cytochrome *c* comparé à la corrélation croisée entre les impulsions pompe et sonde, mesurée à partir du signal du GaAs. Pompe de 214 nJ par impulsion.

Notre expérience pompe-sonde, de résolution temporelle meilleure que l'expérience de la référence [57], présente cependant un signal légèrement retardé par rapport à la corrélation croisée pompe-sonde, et de décroissance plus lente (voir figure 4.8).

Ce signal pompe-sonde s'explique mieux en considérant une absorption successive d'un photon pompe par une transition correspondant à la bande de Soret, puis d'un photon sonde à partir de l'état excité (voir figure 4.9).

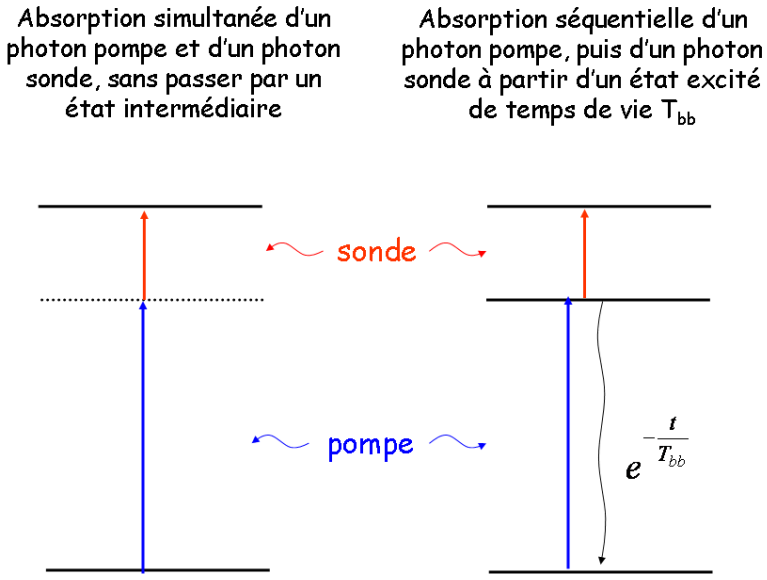


FIG. 4.9 – Absorption simultanée (à gauche) et séquentielle (à droite) d'un photon pompe et un photon sonde par l'hème modélisé par un système à deux ou trois niveaux.

La partie 2.3.2 du chapitre 2 traite le cas de ce système à trois niveaux, et donne l'expression du signal pompe-sonde suivante dans le cas de l'hème dont les temps de déphasage sont très courts devant les durées des impulsions pompe et sonde :

$$I(\tau) \propto T_{ca} \int_{-\infty}^{+\infty} dt\, I_S(t-\tau)\, I_P(t) + 2 \int_{-\infty}^{+\infty} dt\, I_S(t-\tau) \int_{-\infty}^{t} dt'\, I_P(t')\, e^{-\frac{t-t'}{T_{bb}}} \qquad (4.2)$$

I_P et I_S sont les intensités respectives des impulsions pompe et sonde, T_{bb} est le temps de vie de la population à l'état intermédiaire b et T_{ca} est le temps de déphasage de la transition ca (10 fs).

Ce signal $I(\tau)$ est proportionnel à I_P comme le décrivent nos expériences sur le cytochrome c réduit, et son allure temporelle se superpose au signal expérimental pour une valeur de T_{bb} de 200±50 fs (voir figure 4.10). Ce temps de vie est en bon accord avec le temps de vie de l'état excité de l'hème, de 300 à 400 fs, déduit d'expériences pompe-sonde dans le visible [40] [60] [61].

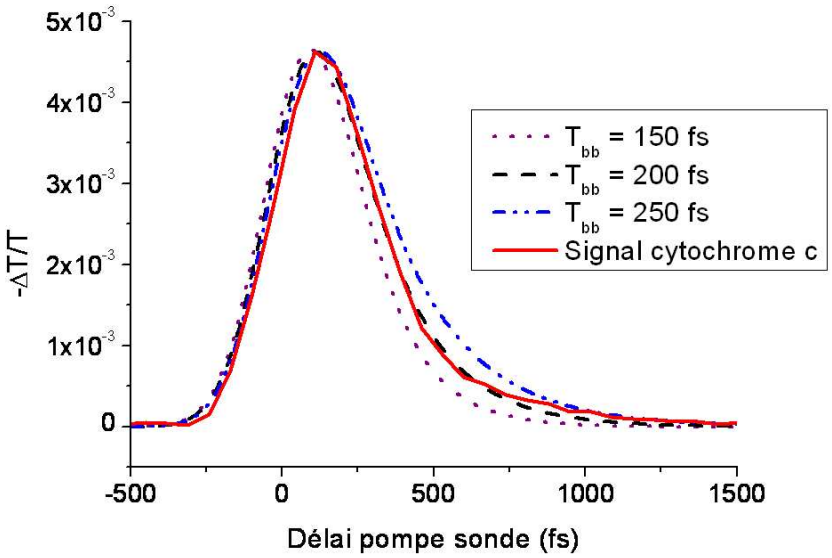


FIG. 4.10 – Signal pompe-sonde mesuré dans le cytochrome c réduit comparé au signal d'un système à trois niveaux calculé pour différentes valeurs du temps de vie T_{bb} du niveau intermédiaire.

En conclusion, nos expériences pompe-sonde intégrées spectralement présentent une contribution induite par une transition de l'hème. L'impulsion pompe porte l'hème à un état excité à partir duquel l'impulsion sonde est absorbée. Le temps de vie de cet état excité de 200 fs d'après nos mesures. Dans la cytochrome c oxydase, ce signal dû à la photophysique des deux hèmes a et a_3 de la protéine est non négligeable par rapport au signal du CO étudié qui se ne se fixe que sur l'hème a_3.

Des calculs de DFT (Density Functional Theory) ont été réalisés par Chris Meier et Catherine Heitz (Université Paul Sabatier, Toulouse) afin d'identifier les états impliqués, la précision des résultats n'est cependant pas suffisante.

4.1.3 Correction du signal pompe-sonde de la cytochrome *c* oxydase

Dans cette partie, le signal du CO seul est extrait du signal pompe-sonde de la cytochrome *c* oxydase ligandée avec CO en soustrayant le signal autour du délai pompe-sonde nul, principalement dû à l'absorption par les transitions électroniques de l'hème. Dans un premier temps, cet artefact est mesuré simultanément dans la protéine déligandée. Dans un second temps, nous utilisons le signal modélisé dans la partie 4.1.2 pour soustraire l'artefact.

A l'aide de la monture décrite dans la partie 3.5.5 du chapitre 3, l'expérience pompe-sonde a été réalisée simultanément sur deux échantillons de cytochrome *c* oxydase de même épaisseur et de même concentration, l'un est réduit et ligandé avec le monoxyde de carbone, l'autre est réduit et sans ligand. Dans un premier temps, les mesures ont été réalisées avec une sonde dont le spectre est assez éloigné des fréquences de vibration du CO (1963 et 2062 cm^{-1}) afin de pouvoir comparer les artefacts des deux échantillons sans signal d'absorption dû au CO. La figure 4.11 représente le résultat des mesures lorsque la sonde est centrée à 1780 cm^{-1}.

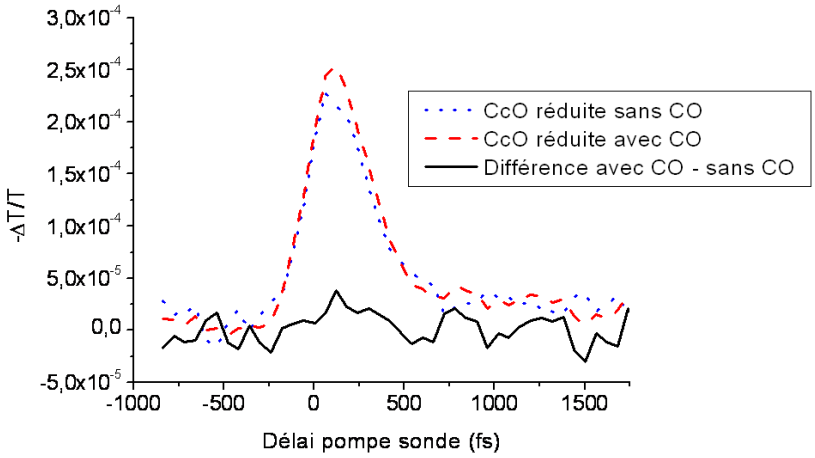


FIG. 4.11 – Cinétiques mesurées dans un échantillon de cytochrome *c* oxydase de concentration 500 μM et d'épaisseur 200 μm à l'état réduit, dans les cas déligandé et ligandé avec CO. La sonde est centrée à 1780 cm^{-1}, la puissance de pompe est de 115 nJ par impulsion et l'angle entre les polarisations pompe et sonde est de 54,7°.

Les deux échantillons présentent des artefacts de même profil temporel et d'amplitudes semblables. Nous avons considéré que le rapport des signaux des deux échantillons dû à cet artefact reste constant sur toute la plage spectrale étudiée. Lors d'expériences pompe-sonde réalisées avec une sonde dont le spectre recouvre les fréquences de vibration du CO, le signal

pompe-sonde de la protéine déligandée correspond au signal de l'artefact dans la protéine ligandée. Il suffit alors de soustraire le signal de la protéine déligandée au signal de la protéine ligandée pour isoler le signal du CO seul. Le départ du CO du Fer est ainsi observé en centrant la sonde sur la fréquence du CO sur le Fer (1963 cm^{-1}), et l'arrivée sur le Cuivre est détectée en centrant la sonde sur la fréquence du CO sur le Cuivre (2062 cm^{-1}). Les résultats de ces mesures sont présentés à la figure 4.12.

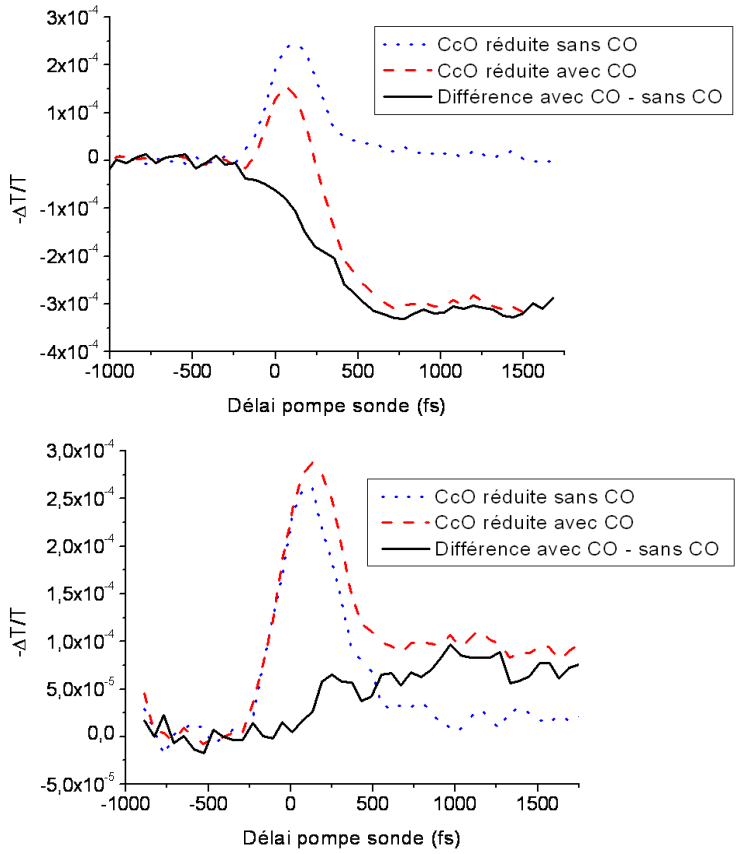


FIG. 4.12 – Cinétiques mesurées dans un échantillon de cytochrome *c* oxydase de concentration 500 μM et d'épaisseur 200 μm à l'état réduit, dans les cas déligandé et ligandé avec CO. La différence entre ces deux signaux correspond au signal induit par le CO. La sonde est centrée à 1967 cm^{-1} en haut et à 2095 cm^{-1} en bas. La puissance de pompe est de 115 nJ par impulsion et l'angle entre les polarisations pompe et sonde est de 54,7°.

Ces résultats expérimentaux sont confrontés aux simulations basées sur les équations de Bloch présentées dans la partie 2.3.3 du chapitre 2. A l'aide de ces simulations, nous calculons les signaux pompe-sonde dans le cas de sondes centrées à 1967 cm^{-1} et 2095 cm^{-1}, pour différents temps caractéristiques de transfert du CO du Fer vers le Cuivre : 200 fs, 400 fs, 600 fs et 800 fs. Nous avons utilisé les paramètres suivants : les impulsions pompe et sonde

sont gaussiennes de durées respectives 270 fs et 150 fs, l'angle entre les polarisations des impulsions pompe et sonde est de 54,7 degrés. Durant le transfert du CO du Fer vers le Cuivre, le nombre d'onde central de la vibration du CO varie de 1963 à 2062 cm^{-1}, sa largeur spectrale passe de 4 à 8 cm^{-1} et le carré de son moment dipolaire est divisé par 7. Ces caractéristiques vibrationnelles du CO varient de manière progressive et exponentielle selon son temps caractéristique de transfert.

Les cinétiques pompe-sonde calculées pour les temps caractéristiques de transfert 200 fs, 400 fs, 600 fs et 800 fs, sont superposées aux résultats expérimentaux dans la figure 4.13. Les amplitudes des signaux expérimentaux, très dépendantes des conditions de l'expérience, ont été normalisées sur celles des signaux calculés.

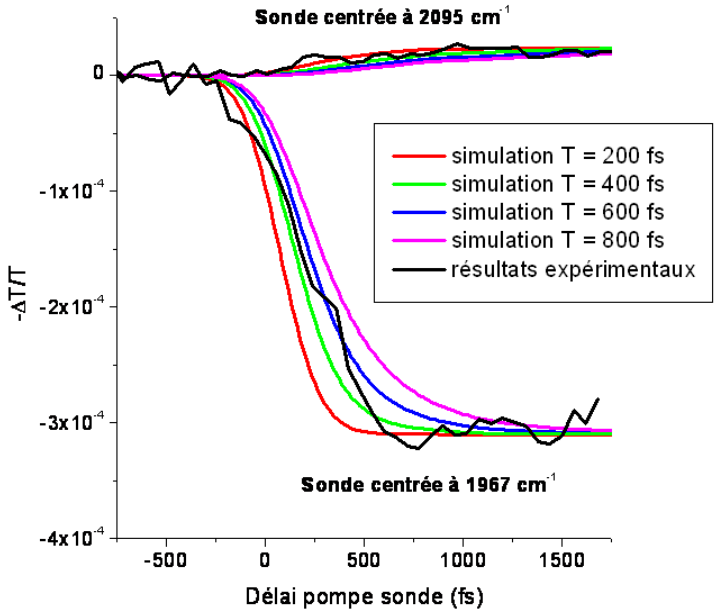


FIG. 4.13 – Cinétiques induites par un échantillon de cytochrome *c* oxydase à 500 μM d'épaisseur 200 μm, avec une pompe de puissance 115 nJ par impulsion et de durée 270 fs, et des sondes de durée 150 fs et de fréquences centrales 1967 cm^{-1} et 2095 cm^{-1}. L'angle entre les polarisations pompe et sonde est de 54,7°. Simulation des signaux pompe-sonde avec différentes constantes de temps T de transfert du CO.

Les cinétiques pompe-sonde de la figure 4.13 sont normalisées à 1 au niveau de leurs valeurs finales dans la figure 4.14 afin de visualiser plus aisément, dans les deux cas de fréquence de la sonde, les positions des courbes expérimentales par rapport aux signaux calculés. La cinétique mesurée avec une sonde centrée à 1967 cm^{-1} se situe entre les signaux calculés correspondant à des temps de transfert 400 et 600 fs. La cinétique mesurée avec une sonde centrée à 2095

cm^{-1} se situe plutôt entre les simulations correspondant à des temps de transfert 200 et 400 fs. Le temps de transfert du CO du Fer vers le Cuivre peut donc être évalué à 400 ± 200 fs.

L'incertitude sur cette mesure a plusieurs origines. Tout d'abord, la détermination du zéro pompe-sonde est réalisée à ± 50 fs près. Une erreur sur ce zéro décale temporellement le signal pompe-sonde. Ensuite, une erreur évaluée à environ 10% intervient au niveau de l'amplitude de l'artefact soustrait, ce qui induit également un décalage du signal pompe-sonde d'environ ± 50 fs. Cette erreur provient du fait que nos échantillons ne "vieillissent" pas de la même manière, le signal de la protéine déligandée se dégrade plus rapidement que celui de la protéine ligandée avec CO. Afin d'effectuer nos mesures aux différentes fréquences de sonde dans les mêmes conditions, nous avons limité le temps d'accumulation à 20 minutes pour que la protéine n'ait pas le temps de se dégrader de manière notable. Le bruit des signaux pompe-sonde est alors d'environ 2.10^{-5}, ce qui induit sur un signal d'amplitude 3 10^{-4} une incertitude d'environ 10%.

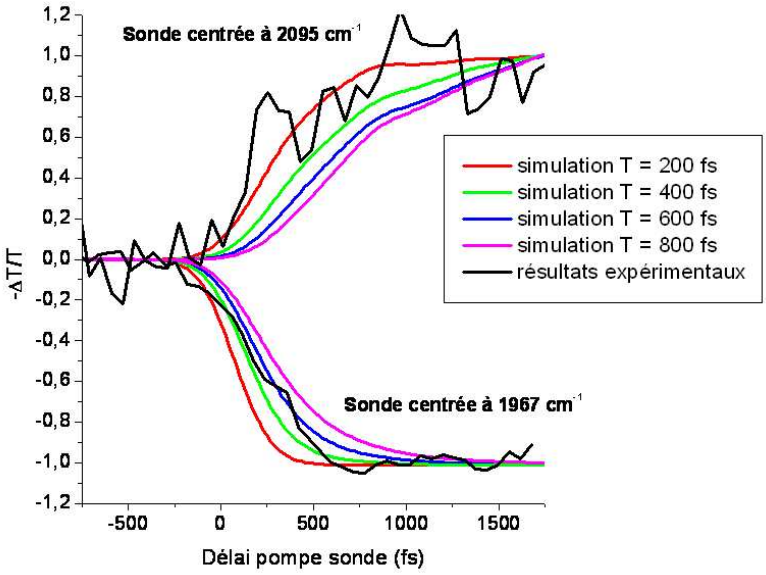


FIG. 4.14 – Cinétiques induites par un échantillon de cytochrome *c* oxydase à 500 μM d'épaisseur 200 μm normalisés à 1. Les durées des impulsions pompe et sonde sont respectivement de 270 fs et 150 fs, et la sonde est centrée autour de 1967 cm^{-1} et 2095 cm^{-1}. L'angle entre les polarisations pompe et sonde est de 54,7°. Simulation des signaux pompe-sonde avec différentes constantes de temps T de transfert du CO.

Le bon accord entre le signal calculé dans la partie 4.1.2 selon un modèle à trois niveaux et les signaux expérimentaux (voir figure 4.10) nous permet de soustraire l'artefact calculé aux

signaux pompe-sonde présentés par la figure 4.1. Ces signaux sont moins bruités car ils ont pu être réalisés pour une plus grande accumulation de balayages du délai pompe-sonde : le bruit est de 10^{-5} au bout d'une durée de 1h00, correspondant à 100 cycles de délais pompe-sonde avec un temps d'acquisition de 300 ms par délai. De plus, ces signaux ont été mesurés par des sondes de fréquence intermédiaire entre la fréquence du CO lié au Fer et la fréquence du CO lié au Cuivre.

Nous appliquons la soustraction de l'artefact calculé aux signaux pompe-sonde obtenus à partir des sondes centrées à 1950, 2020 et 2065 cm^{-1}. Tout d'abord, les signaux pompe-sonde attendus pour ces fréquences de sonde et un temps de transfert du CO de 400 fs sont calculés. Les signaux expérimentaux sont normalisés sur ces signaux calculés au niveau de leur valeurs finales, uniquement dues à la contribution du CO.

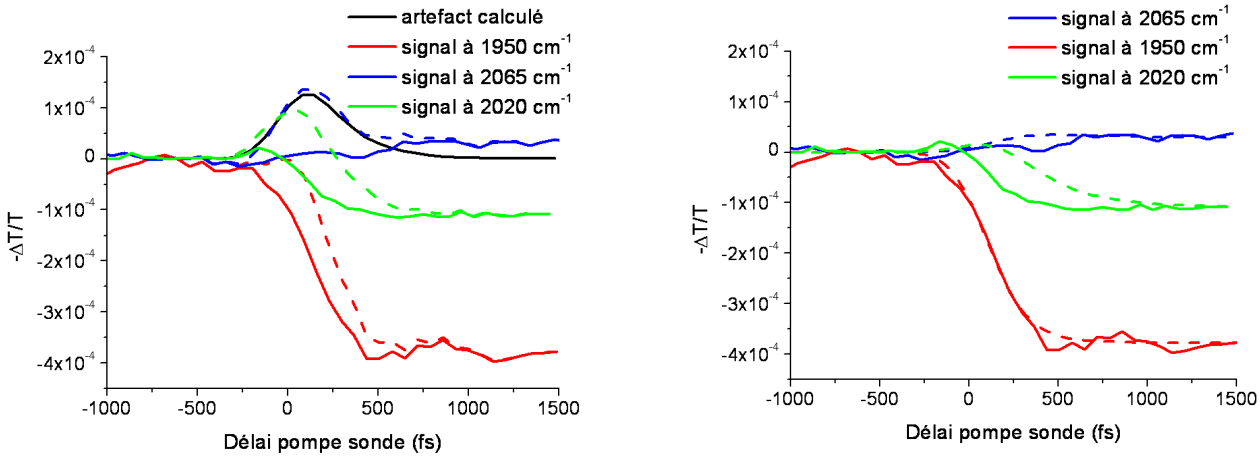


FIG. 4.15 – Cinétiques induites par un échantillon de cytochrome *c* oxydase 500 μM d'épaisseur 200 μm, avec une pompe de puissance 60 nJ par impulsion et de durée 270 fs, et des sondes de durée 150 fs centrées à différentes fréquences. L'angle entre les polarisations pompe et sonde est de 54,7°. A gauche, l'artefact calculé est soustrait aux signaux mesurés (en pointillés) afin d'obtenir les signaux dus au CO (en traits pleins). A droite, ces signaux dus au CO (en traits pleins) sont confrontés aux signaux pompe-sonde calculés (en pointillés) dans le cas d'une durée de transfert du CO de 400 fs.

Il s'agit maintenant de soustraire l'artefact calculé dans la partie 4.1.2. L'amplitude de cet artefact est approximativement la même pour les trois fréquences de la sonde (voir les figures 4.11 et 4.12). Cette amplitude est déterminée à partir du signal à la fréquence sonde du CO fixé au Cuivre : d'après la mesure simultanée sur les deux échantillons réduits déligandé et ligandé avec CO représentés à la figure 4.12, le rapport entre l'amplitude maximale du signal de la protéine ligandée et l'amplitude maximale de l'artefact est de 1,1. L'artefact, dont l'amplitude

est ainsi calculée, est soustrait aux trois signaux pompe-sonde mesurés (figure 4.15).

Les signaux pompe-sonde obtenus avec les sondes centrées à 1950 et 2065 cm^{-1} sont en bon accord avec le calcul et avec les expériences réalisées simultanément sur les deux échantillons, ligandé et déligandé. En revanche, le signal mesuré à la fréquence intermédiaire de 2020 cm^{-1} de la sonde s'écarte du signal calculé. Cet écart peut provenir du fait que les deux fréquences de départ et d'arrivée du CO recouvrent le spectre de la sonde de manière semblable au niveau des pentes de ce spectre. Le signal pompe-sonde, qui résulte des contributions relatives des espèces Fe-CO et Cu-CO, est donc beaucoup plus sensible à la moindre incertitude sur le spectre de la sonde. Ce fait est illustré par la figure 4.16 qui représente les variations des signaux pompe-sonde induits par un décalage de 5 cm^{-1} du spectre de la sonde.

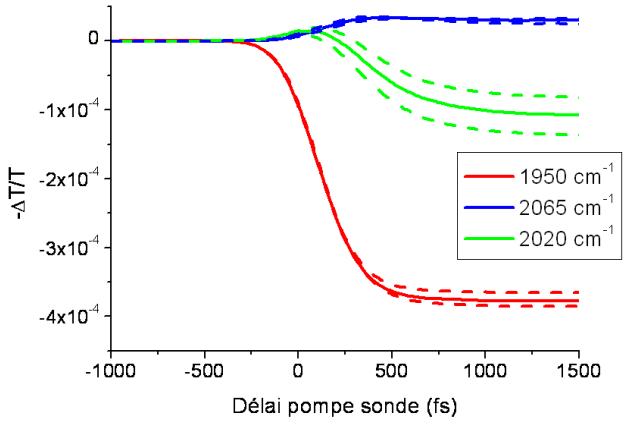


FIG. 4.16 – Simulation des signaux pompe-sonde de la cytochrome *c* oxydase avec une durée de transfert du CO de 400 fs, des impulsions pompe et sonde de durées respectives 270 fs et 150 fs. Les sondes centrées aux fréquences 1950, 2020 et 2065 cm^{-1} donnent les signaux pompe-sonde représentés en traits pleins. L'effet d'un décalage du spectre de sonde de 5 cm^{-1} est observé en calculant les signaux pompe-sonde avec des sondes décalées de $\pm$ 5 cm^{-1} par rapport aux trois fréquences 1950, 2020 et 2065 cm^{-1}. Ces signaux sont représentés en pointillés. Le signal obtenu avec une sonde centrée à 2020 cm^{-1} est beaucoup plus sensible à un décalage du spectre de la sonde.

L'amplitude du signal à 1963 cm^{-1} dû aux molécules de CO dissociées de l'atome de Fer est d'environ 3.10^{-4}. Cette valeur permet de déterminer le pourcentage de dissociation du CO. Sachant que la raie d'absorption du CO sur le Fer a une largeur spectrale de 4 cm^{-1} et que la sonde infrarouge a une largeur spectrale de 100 cm^{-1}, l'amplitude du pic d'absorption différentielle du CO sur le Fer dû aux molécules dissociées est de $7{,}5.10^{-3}$. Le coefficient d'absorption correspondant étant de 4480 $M^{-1}.cm^{-1}$, l'épaisseur de l'échantillon de 200 μm et sa concentration de 500 μM, le taux de dissociation est évalué à 16%.

4.1.4 Mesures d'anisotropie

L'orientation du CO par rapport à la normale au plan de l'hème de la protéine peut être déterminé à partir de mesures d'anisotropie réalisées à l'aide de la monture de la lame demi-onde présentée dans la partie 3.5.4 du chapitre 3. Cette monture permet d'effectuer l'expérience pompe-sonde simultanément dans le cas d'une pompe de polarisation parallèle et dans le cas d'une pompe de polarisation perpendiculaire à la polarisation de la sonde. Le rapport R des deux signaux pompe-sonde obtenus est alors relié à l'angle du CO par rapport à la normale au plan de l'hème par l'équation 2.75 rappelée ici :

$$sin^2\alpha = \frac{4-2R}{1+2R}$$

De telles mesures ont déjà été réalisées, tout d'abord dans d'autres hémoprotéines [62] [63] [64], et spécifiquement dans la cytochrome c oxydase à une résolution de 1 ps [2]. L'orientation du CO lié à l'atome de Fer et lié à l'atome de Cuivre a ainsi été mesurée. Nos expériences de meilleure résolution temporelle permettent d'obtenir l'angle du CO sur le Cuivre à des délais pompe-sonde inférieurs à la picoseconde, plus précisément à partir du délai pompe-sonde de 500 fs à partir duquel l'artefact décrit dans la partie 4.1.2 devient négligeable.

Pour mesurer l'orientation du CO lié au Fer de l'hème, il est essenciel d'effectuer les mesures d'anisotropie avec une sonde dont le spectre recouvre la vibration du CO lié au Fer (1963 cm^{-1}) sans recouvrir la vibration du CO lié au Cuivre (2062 cm^{-1}). Le rapport entre les deux signaux pompe-sonde mesurés est représenté à la figure 4.17, ainsi que l'angle calculé à partir de ce rapport, qui correspond à l'angle que les molécules de CO dissociées avaient avant leur dissociation. Il s'agit donc bien de l'angle du CO lié au Fer.

Afin d'obtenir l'angle du CO lié au Cuivre, la même expérience est menée avec une sonde dont le spectre recouvre la vibration du CO lié au Cuivre (2062 cm^{-1}) sans recouvrir la vibration du CO lié au Fer (1963 cm^{-1}). L'angle obtenu, représenté à la figure 4.18, correspond alors à l'angle des molécules de CO dissociées qui se sont fixées sur l'atome de Cuivre.

Dans le cas du CO sur le Fer, le signal ΔT_{perp} est plus important que le signal ΔT_{para}. Si l'on s'approche d'une dissociation à 100%, le signal ΔT_{perp} sature plus que ΔT_{para} et les deux signaux ΔT_{perp} et ΔT_{para} tendent vers la même valeur. Le rapport $R = \Delta T_{perp}/\Delta T_{para}$ tend alors vers 1 et ne correspond plus à l'anisotropie attendue [64]. Afin de vérifier que l'angle mesuré n'est pas perturbé par ce phénomène, les mesures d'anisotropie ont été réalisées avec différentes puissances de pompe. L'indépendance de l'angle obtenu selon la puissance de la pompe prouve que la mesure n'est pas affectée.

Le rapport $\Delta T_{perp}/\Delta T_{para}$ permet d'obtenir la direction de la molécule de CO par rapport à la normale au plan de l'hème, mais ne donne aucune indication sur le sens de cette molécule. Il n'est par exemple pas possible de détecter la différence entre une configuration où les atomes sont alignés dans l'ordre Fe...O-C, correspondant à un angle du CO de 0° par rapport à la normale à l'hème, et une configuration où les atomes sont alignés dans l'ordre Fe...C-O, correspondant à un angle du CO de 180°. A partir d'un rapport mesuré, deux angles α et $\pi - \alpha$ sont possibles (voir équation 2.75). Nous avons déduit le bon angle en nous basant sur les structures aux rayons X et les simulations de dynamique moléculaire présentées dans la partie 4.3.

Les trois mesures de l'angle du CO lié au Fer par rapport à la normale à l'hème donnent les valeurs de 160±3°, 162±3° et 157±3° pour les intensités de pompe respectives de 60 nJ, 80 nJ et 200 nJ par impulsion. L'angle du CO lié au Fer calculé à partir de ces trois mesures est de 160±4°.

L'angle du CO lié au Cuivre ne change pas de manière significative après 500 fs. Ce fait est en bon accord avec les résultats des calculs de dynamique moléculaire présentés dans la partie 4.3 qui montrent que l'angle final du CO sur le Cuivre est atteint à ce délai de 500 fs. Les valeurs de l'angle du CO lié au Cuivre mesurées sont de 56±12°, 55±4° et 59±11° pour les intensités de pompe respectives de 77 nJ, 100 nJ et 135 nJ par impulsion. L'angle du CO lié au Cuivre par rapport à la normale à l'hème vaut donc 57±10°.

Ces résultats sont en bon accord avec ceux de la référence [2], qui propose un angle du CO lié au Cuivre par rapport à la normale à l'hème de 55±3° et un angle du CO lié au Fer α de 20±3°, correspondant à l'angle $\pi - \alpha$ de 160±3°.

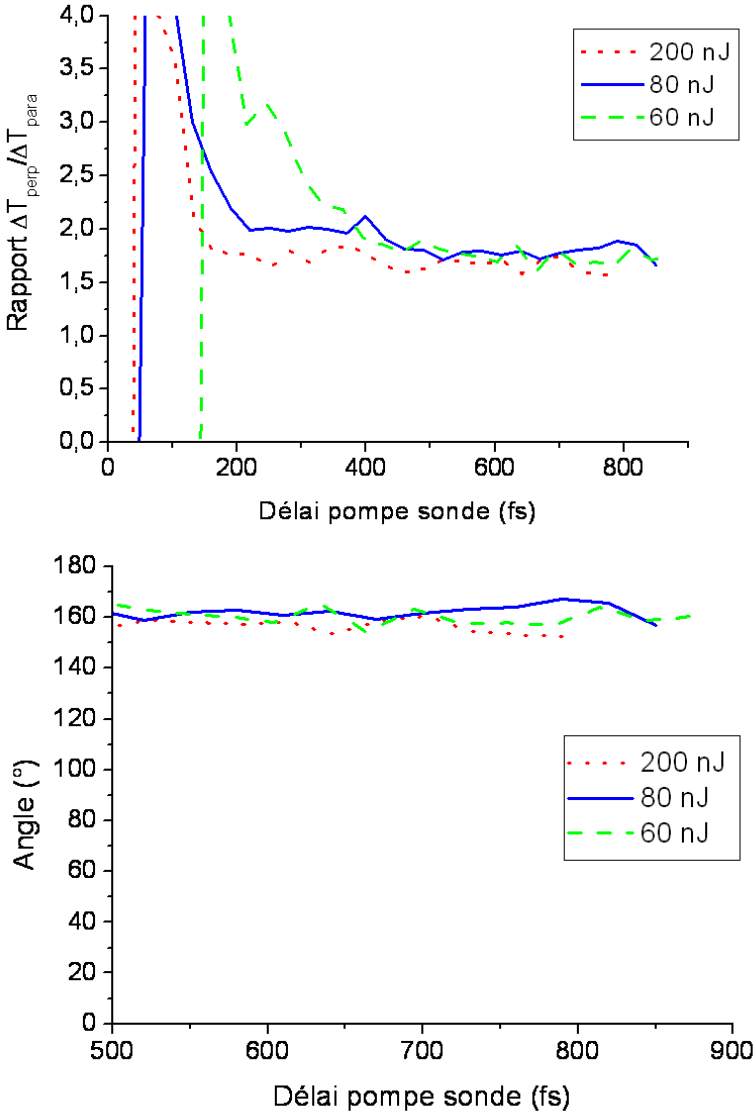


FIG. 4.17 – Rapport $\Delta T_{perp}/\Delta T_{para}$ en haut et angle du CO par rapport à la normale à l'hème en bas. Ces mesures ont été réalisées dans un échantillon de cytochrome c oxydase 500 μM d'épaisseur 200 μm avec une sonde centrée vers 1950 cm^{-1} et des impulsions pompe d'énergies différentes. Avant le délai pompe-sonde de 500 fs, le rapport est perturbé par l'artefact. L'angle correspond à l'angle du CO sur le Fer de l'hème.

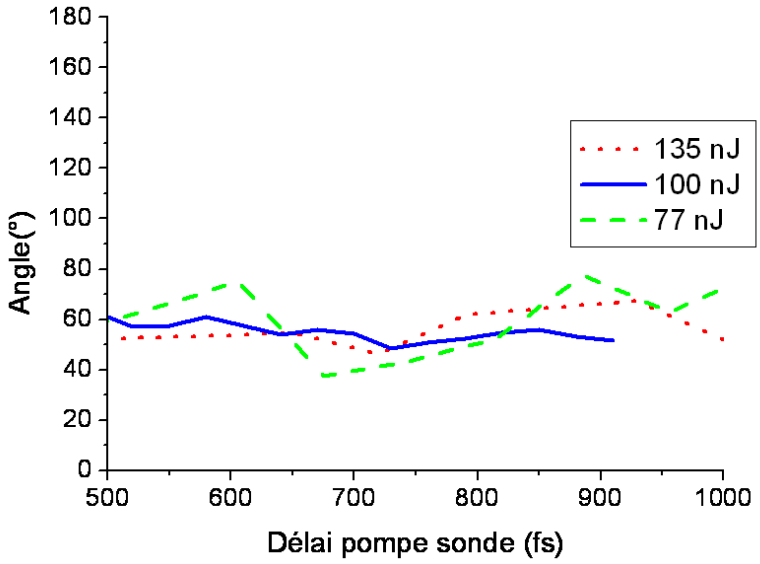


FIG. 4.18 – Angle du CO par rapport à la normale à l'hème dans un échantillon de cytochrome *c* oxydase 500 μM d'épaisseur 200 μm, mesuré avec une sonde centrée vers 2080 cm^{-1} ou une sonde transmise par un filtre passe bande à 2062 cm^{-1} de largeur 30 cm^{-1} qui coupe à 1963 cm^{-1}. Les impulsions pompe sont d'énergies différentes. Cet angle correspond à l'angle du CO sur l'atome de Cuivre.

4.2 Expériences résolues spectralement

Nous avons réalisé les premières expériences pompe-sonde résolues spectralement sur différentes hémoprotéines, en utilisant la technique de conversion du spectre infrarouge vers le visible (voir partie 3.6 du chapitre 3). Pour obtenir d'avantage d'informations sur le transfert du CO de l'hème vers le Cuivre dans la cytochrome *c* oxydase, nous devons effectivement reproduire les expériences précédemment décrites avec une résolution spectrale. Ces expériences résolues spectralement utilisent un détecteur de type CCD sur lequel l'énergie de l'impulsion sonde convertie vers le visible est répartie sur l'ensemble des pixels. Dans ce type de détection, les variations de pixel à pixel et de tir à tir déterminent le rapport signal sur bruit, c'est pourquoi nous commençons par une étude exhaustive des différentes sources de bruit et leur incidence (partie 4.2.1).Les résultats des mesures réalisées sur la cytochrome *c* oxydase sont ensuite présentés et analysés (partie 4.2.2). Enfin, l'expérience la mieux échantillonnée au niveau du délai pompe-sonde, réalisée sur l'hémoglobine, est décrite (partie 4.2.3). Les résultats de cette expérience seront exploités pour l'étude des oscillations de cohérence décrites dans la partie 2.3.4 du chapitre 2.

4.2.1 Origines de bruit du signal différentiel

Le bruit des spectres infrarouge enregistrés lors des expériences résolues spectralement a trois origines :

* le bruit de lecture au niveau de la caméra CCD,
* le bruit de photons,
* les fluctuations du laser.

Dans un premier temps, la contribution de ces trois origines de bruit est étudiée dans le cas de la modulation à 500 Hz. Ainsi, par la suite, nous utilisons le terme "un spectre" pour désigner le spectre associé à une impulsion et "N spectres" pour désigner le spectre associé à N impulsions.

Bruit de lecture et bruit de photons

Lors des expériences pompe-sonde, nous nous intéressons au signal différentiel $\Delta T/T$, où ΔT est la différence de deux spectres transmis successifs et T l'amplitude du spectre transmis. Dans toute cette partie 4.2, T est donné en nombre de coups N_{coups} correspondant à un nombre de photons de $N_{coups}/2\eta$, où le rendement quantique η de la CCD est proche de 90%. Le bruit du signal différentiel $\Delta T/T$ lié au bruit de lecture σ_{lect} et au bruit de photons σ_{phot} est liés au nombre N_s de spectres accumulés et à l'amplitude du spectre T. Si on note $\sigma^{(1)}_{lect}$ et $\sigma^{(1)}_{phot}$ les bruits de lecture et de photon d'un seul spectre d'amplitude 1 :

$$\sigma_{lect} = \frac{\sigma^{(1)}_{lect}}{T\sqrt{N_s}} \tag{4.3}$$

$$\sigma_{phot} = \frac{\sigma^{(1)}_{phot}}{\sqrt{T.N_s}} \tag{4.4}$$

Afin de limiter ces bruits, il convient d'accumuler un nombre de spectres suffisant et d'avoir un faisceau transmis assez intense.

Nous pouvons remarquer que le rapport $\sigma_{lect}/\sigma_{phot}$ ne dépend pas du nombre d'accumulations mais uniquement de l'amplitude T du spectre :

$$\frac{\sigma_{lect}}{\sigma_{phot}} = \frac{\sigma^{(1)}_{lect}/\sigma^{(1)}_{phot}}{\sqrt{T}} \tag{4.5}$$

Pour un faisceau transmis assez intense, le bruit de lecture est négligeable.

En l'absence de faisceau infrarouge, le bruit du signal enregistré correspond au bruit de lecture. La figure 4.19 représente le signal mesuré dans ces conditions au bout de 100 lectures.

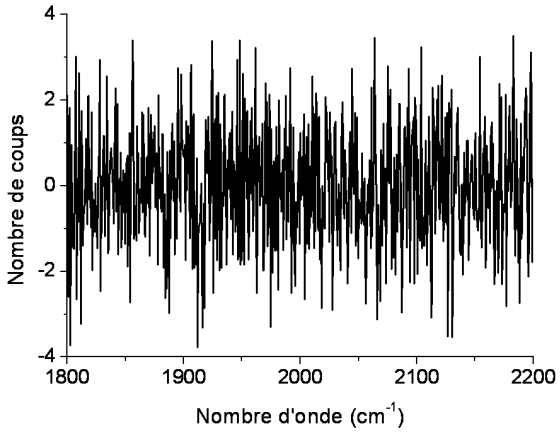


FIG. 4.19 – Signal enregistré entre 1800 et 2200 cm^{-1} en l'absence de faisceau laser moyenné sur 100 lectures. Le bruit de ce signal, défini comme l'écart type des valeurs mesurées sur cette plage spectrale, vaut 1,4 coups.

Le bruit de ce signal s'élève à 1,4 coups. Le bruit de lecture d'un signal obtenu à partir d'un seul spectre vaut donc $\sigma_{lect}^{(1)} = 1,4\sqrt{100} = 14$ coups.

En présence du faisceau sonde et en l'absence du faisceau pompe, le signal différentiel $\Delta T/T$ enregistré au bout d'une accumulation de 100 spectres est représenté à la figure 4.20. Le spectre du faisceau infrarouge, représenté également à la figure 4.20, est centré vers 1970 cm^{-1}. Nous étudions donc le bruit du signal différentiel sur la plage spectrale allant de 1930 à 2010 cm^{-1}. Sur cette plage, la valeur moyenne de l'intensité spectrale T du faisceau infrarouge est d'environ 11 000 coups et le bruit vaut $\sigma_{tot} = 2.10^{-3}$, ce qui correspond pour un seul spectre à $\sigma_{tot,1} = \sigma_{tot}\sqrt{100} = 2.10^{-2}$.

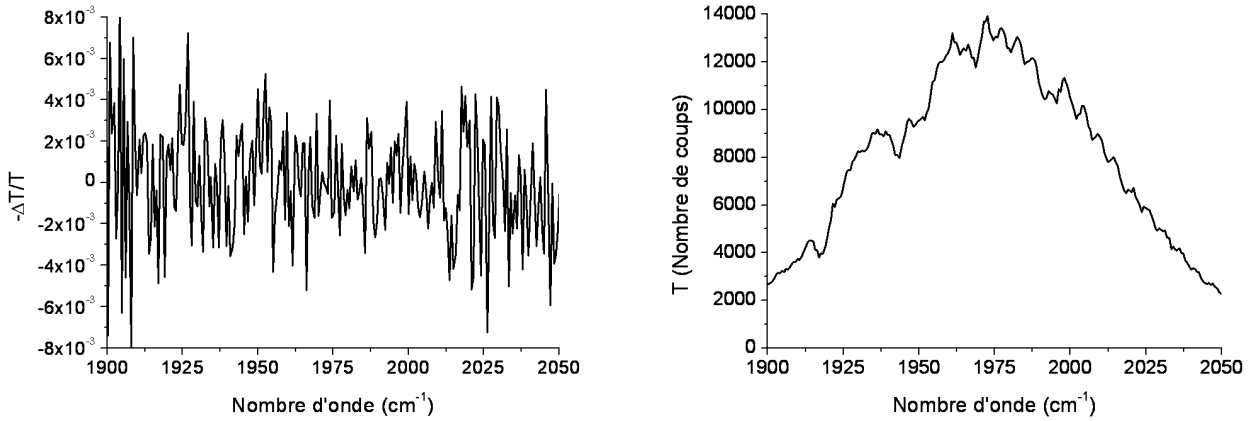


FIG. 4.20 – A gauche, signal différentiel $\Delta T/T$ enregistré au bout d'une accumulation de 100 spectres en présence du faisceau sonde et en absence du faisceau pompe. A droite, spectre T de l'impulsion pour laquelle le signal différentiel $\Delta T/T$ est enregistré.

Étudions dans le cas du signal $\Delta T/T$ de la figure 4.20 la contribution des différentes origines de bruit.

Le signal $\Delta T/T$ varie autour d'une valeur moyenne nulle de manière régulière sur toute la plage spectrale étudiée. Le bruit augmente progressivement quand on sort de cette plage car le signal infrarouge T diminue alors. Un tel bruit ne peut pas être dû aux fluctuations du laser qui engendreraient au niveau du spectre différentiel des variations de la moyenne du signal de manière différente selon la longueur d'onde.

D'autre part, le bruit de lecture contribue très peu au bruit du signal. Effectivement, à une intensité spectrale moyenne de 11000 coups, le bruit de lecture s'élève à $\sigma_{lect}^{(1)}/T \approx 10^{-3}$, ce qui est négligeable devant le bruit total de 2.10^{-2}.

A cette intensité spectrale moyenne de 11000 coups, la principale cause de bruit est donc le bruit de photons qui s'élève à $\sigma_{phot} \approx \sigma_{tot} = 2.10^{-2}$. Dans le cas d'une intensité spectrale T de 1, le bruit de photons vaut donc $\sigma^{(1)}_{phot} = \sigma_{phot,1}\sqrt{11000} \approx 2$, d'après l'équation 4.4.

A partir de ces valeurs de $\sigma^{(1)}_{lect} \approx 14$ et $\sigma^{(1)}_{phot} \approx 2$, nous pouvons constater à l'aide de l'équation 4.5 que le bruit de lecture est inférieur au bruit de photons dès que l'amplitude du signal T dépasse 49, ce qui est le cas dans nos expériences.

Dans nos conditions d'expérience, lors de l'étude d'échantillons peu absorbants comme l'hémoglobine présentée dans la partie 4.2.3, l'intensité transmise par les échantillons vaut entre 10000 et 30000 coups, le bruit est donc essentiellement dû au bruit de photons. Nous pouvons effectuer des acquisitions sur 3h40 avant que le signal ne se dégrade par dérive du laser et dégradation de la protéine. Cette durée correspond à 75 cycles de 35 délais pompe-sonde avec une accumulation de 2000 spectres par cycle et par délai. Le nombre de spectres accumulés vaut donc $N_s = 150000$. Le bruit de photons attendu sur le signal différentiel $\Delta T/T$, donné par l'équation 4.4, s'élève alors à environ 4.10^{-5}.

Ce bruit a été évalué dans le cas d'une modulation à 500 Hz (acquisition à 1 kHz). A la fréquence de modulation 12,5 Hz (acquisition à 25 Hz), les contributions des différentes causes de bruit sont différentes.

Le bruit de lecture est $\sqrt{40}$ fois plus faible, car les spectres sont lus 40 par 40. Cela ne modifie quasiment pas le bruit total dans nos conditions d'expérience.

Le bruit induit par les fluctuations du laser, a priori inversement proportionnel à la fréquence de modulation, est plus important dans le cas de la modulation à 12,5 Hz. Ce bruit négligeable à 500 Hz apparaît à 12,5 Hz.

Le bruit de photons est le même à 500 Hz et 12,5 Hz, à intensités spectrales infrarouge T égales. Cependant, l'intensité T d'un spectre est limitée lors de l'acquisition à 25 Hz, car la lecture par paquets de 40 augmente d'un facteur 40 le nombre de coups lu par la caméra CCD. La caméra est alors saturée à 65536 coups (caméra de 16 bits) si l'intensité transmise par l'échantillon est assez intense et l'emploi de densités optiques est donc nécessaire pour empêcher cette saturation. Par conséquent, l'amplitude T du faisceau est limitée et le bruit de photons est plus élevé.

Dans le cas de l'échantillon de cytochrome *c* oxydase qui est très absorbant dans l'infrarouge (voir la partie 3.4.4 du chapitre 3) la caméra n'est pas saturée lors de l'acquisition à 25 Hz. Le bruit de photons est donc le même aux deux fréquences de modulation 25 Hz et 1 kHz. Par contre, le problème de saturation à 25 Hz se pose dans le cas d'échantillons peu absorbants comme la myoglobine ou l'hémoglobine. L'acquisition à 1 kHz permet alors de gagner sur le bruit de photons.

4.2.2 Transfert du CO dans la cytochrome *c* oxydase

Les expériences pompe-sonde sur la cytochrome *c* oxydase ayant le meilleur rapport signal sur bruit ont été réalisées lorsque l'intensité spectrale du faisceau infrarouge transmis par l'échantillon était maximale. Comme nous l'avons constaté dans la partie 4.2.1, le bruit de photons qui contribue principalement au bruit de l'expérience est alors minimal. Dans un premier temps, l'expérience a été réalisée à une cadence d'acquisition de 25 Hz.

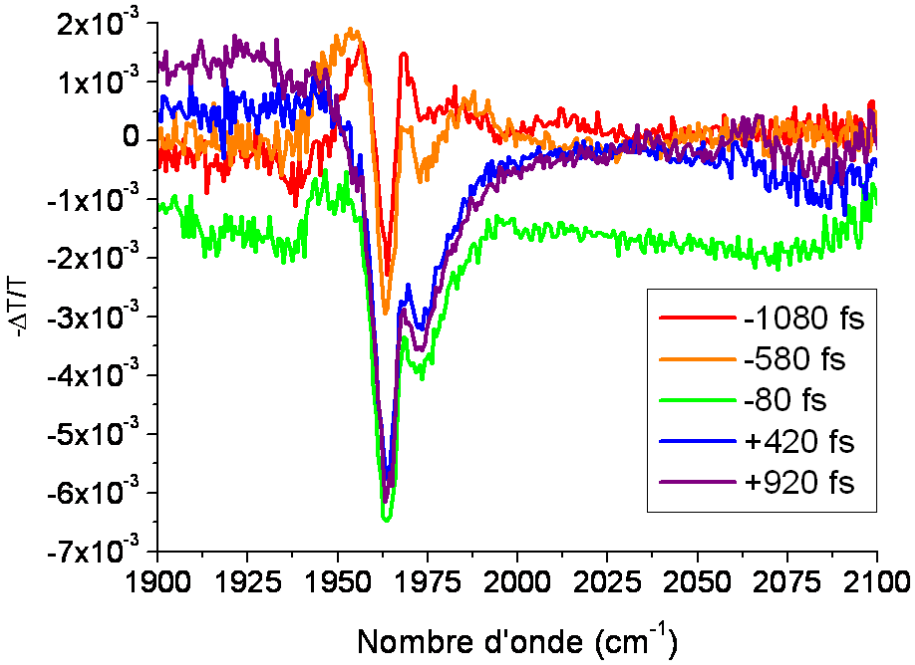


FIG. 4.21 – Spectres transitoires induits par un échantillon de cytochrome *c* oxydase 500 μM d'épaisseur 200 μm à différents délais pompe-sonde. Les délais pompe-sonde sont donnés à 2062 cm^{-1} à $\pm$50 fs, les délais pompe-sonde à 1963 cm^{-1} sont décalés de +50 fs par rapport aux délais à 2062 cm^{-1}. Pompe de 300 nJ par impulsion, angle de 54,7° entre les polarisations pompe et sonde, accumulation pendant 30 minutes.

Le spectre différentiel a été mesuré à 5 délais pompe-sonde espacés de 500 fs. Ces délais ont été balayés 70 fois avec une accumulation de 50 paquets de 40 spectres par délai, ce qui correspond à 30 minutes d'acquisition. Les résultats de ces mesures sont tracés dans la figure 4.21. Nous avons constaté que l'échantillon de cytochrome *c* oxydase se dégradait en cours d'expérience, et que le signal pompe-sonde commence à être affecté par cette dégradation au delà de 30 minutes d'acquisition. Les signaux pompe-sonde $-\Delta T/T$ mesurés bruts (figure 4.21) présentent un bruit de photons d'environ 10^{-4} et un bruit dû aux fluctuations du laser d'environ 10^{-3}.

Pour évaluer la dégradation de la protéine, nous avons utilisé le même échantillon pour mesurer plusieurs fois le même spectre transitoire. La figure 4.22 montre ainsi le signal différentiel dû au départ du CO de l'atome de Fer pour un délai pompe-sonde de 920 fs, enregistré successivement trois fois après 30, 60 et 90 minutes d'acquisition continue. Un pic secondaire apparaît à 1972 cm^{-1} à côté du pic d'absorption principal du CO à 1963 cm^{-1}. Il peut s'agir d'une autre conformation de la protéine induite par la photodissociation, qui se forme au cours de l'expérience. L'amplitude de ce pic secondaire augmente au cours du temps, suggérant une lente évolution de la conformation de la protéine.

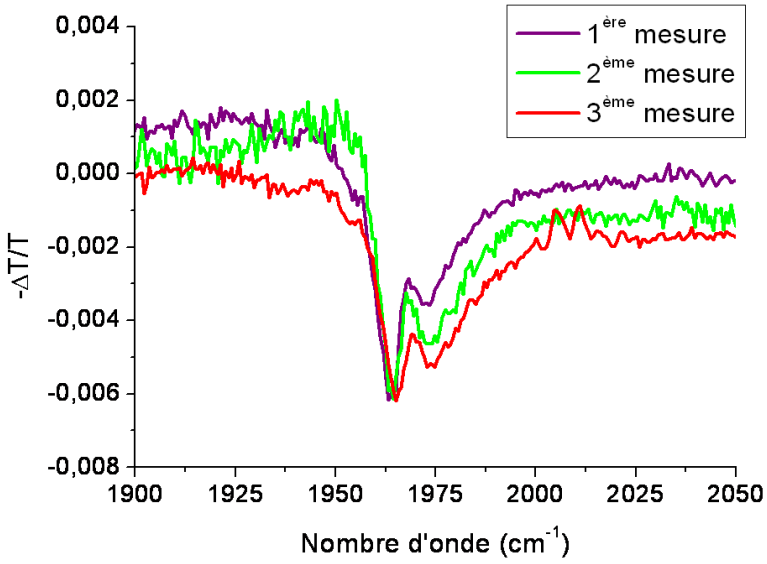


FIG. 4.22 – Spectres différentiels pompe-sonde induits par un échantillon de cytochrome *c* oxydase 500 μM d'épaisseur 200 μm au délai pompe sonde 920±50 fs. Ces spectres correspondent chacun à 30 minutes d'acquisition et ont été normalisés sur le pic principal à 1963 cm^{-1}. L'amplitude du second pic augmente au cours du temps. La pompe a une puissance de 300 nJ par impulsion, et l'angle entre les polarisations pompe et sonde est de 54,7°.

Afin de diminuer au maximum le bruit dû aux fluctuations du laser, la cadence d'acquisition a été augmentée à 1 kHz. Dans ces nouvelles conditions, le spectre différentiel a été mesuré à 10 délais pompe-sonde espacés de 200 fs. Ces délais ont été balayés 100 fois avec une accumulation de 2000 spectres par délai, ce qui correspond à une heure d'acquisition. Les résultats de ces mesures sont tracés dans la figure 4.23.

Le bruit de l'expérience qui vaut 8.10^{-5} est diminué. A délai pompe-sonde négatif, les oscillations de cohérence, décrites dans la partie 2.3.4 du chapitre 2, apparaissent. A délai positif, un pic négatif correspondant au départ du CO de l'atome de Fer est observé à 1963 cm^{-1} et un pic positif correspondant à l'arrivée du CO sur le Cuivre apparaît vers 2062 cm^{-1}. L'amplitude de 6.10^{-3} du signal à 1963 cm^{-1}, dû aux molécules de CO dissociées de l'atome de Fer, correspond à un taux de dissociation du CO de 14 %.

Afin d'analyser la dynamique d'arrivée du CO sur le Cuivre, l'absorption de la raie vibrationnelle du CO lié au Cuivre est évaluée en calculant la surface sous la courbe $-\Delta T/T$ entre 2058 et 2068 cm^{-1} et son évolution en fonction du délai pompe-sonde est tracé dans la figure 4.24. La cinétique de la raie d'absorption est ensuite ajustée par différentes fonctions : la fonction de l'instrument décalée d'un délai pompe-sonde de 500 fs, une variation exponentielle de temps caractéristique 1200 fs convoluée avec la fonction de l'instrument et une variation exponentielle de temps caractéristique 450 fs décalée d'un délai pompe-sonde de 200 fs, convoluée avec la fonction de l'instrument.

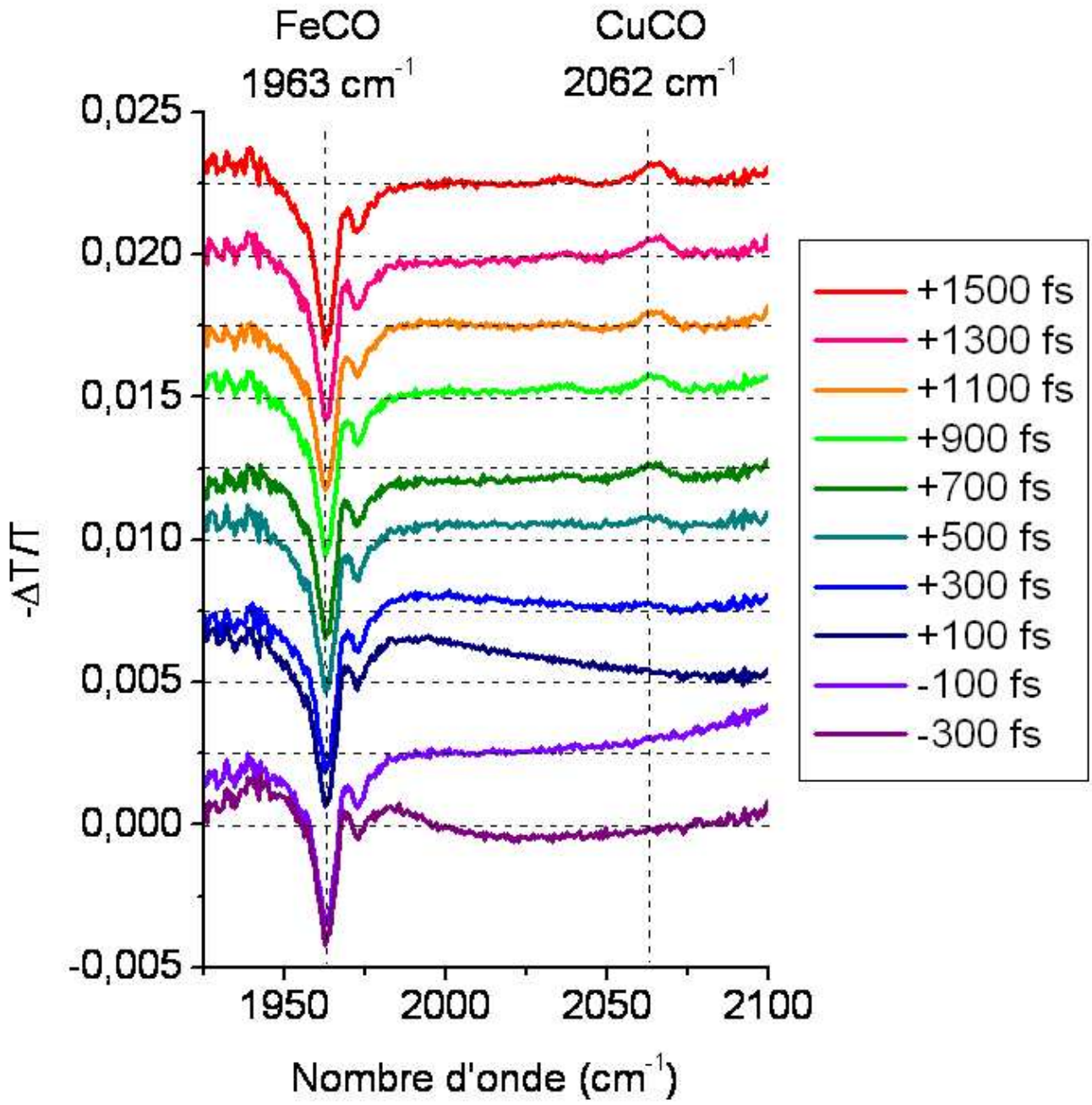


FIG. 4.23 – Spectres transitoires induits par un échantillon de cytochrome *c* oxydase 500 μM d'épaisseur 200 μm à différents délais pompe-sonde. Les spectres différentiels ont été décalés l'un par rapport à l'autre de $2{,}5.10^{-3}$ en ordonnée. Les délais pompe-sonde sont donnés à 2062 cm^{-1} à $\pm$50 fs, les délais pompe-sonde à 1963 cm^{-1} sont décalés de +20 fs par rapport aux délais à 2062 cm^{-1}. Pompe de 300 nJ par impulsion, faisceau étiré de 150 μJ par impulsion, angle de 54,7° entre les polarisations pompe et sonde, accumulation pendant 1h (100 cycles de 2000 spectres par cycle et par délai).

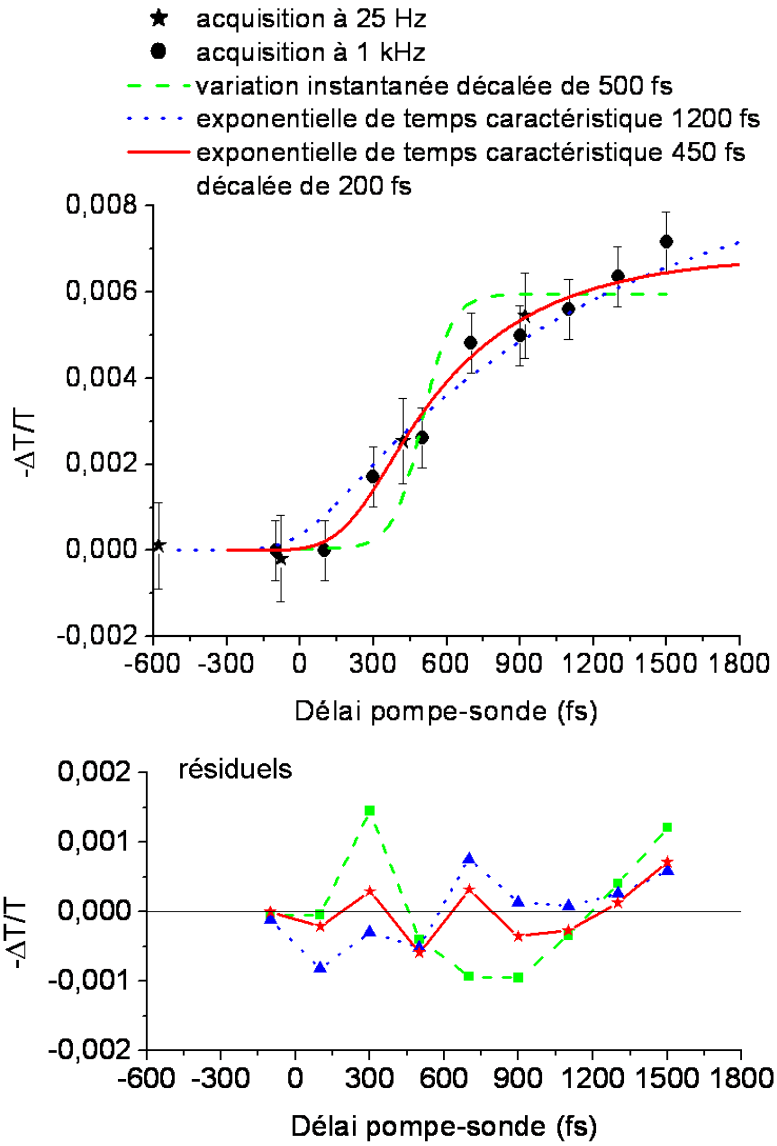


FIG. 4.24 – Le graphique du haut représente l'absorption différentielle de la raie du CO lié au Cuivre mesurée lors des deux expériences réalisées aux cadences d'acquisition de 25 Hz et 1 kHz. Nous avons superposé la fonction de l'instrument décalée d'un délai pompe-sonde de 500 fs en tiretés, une variation exponentielle de temps caractéristique 1200 fs convoluée avec la fonction de l'instrument en pointillés et, en traits pleins, une variation exponentielle de temps caractéristique 450 fs décalée d'un délai pompe-sonde de 200 fs, convoluée avec la fonction de l'instrument. Les résiduels de ces trois ajustements sont tracés dans le graphique du bas.

La fonction de l'instrument varie plus rapidement que la cinétique mesurée, ce qui prouve que le transfert du CO est résolu par l'expérience. Cette augmentation progressive de la raie d'absorption du CO sur le Cuivre montre que dans l'ensemble des protéines sondées, les molécules de CO n'arrivent pas toutes au même instant sur l'atome de Cuivre. Le transfert du CO comporte donc une composante aléatoire.

Un transfert aléatoire peut être décrit par une variation exponentielle. L'exponentielle, convoluée avec la fonction de l'instrument, qui ajuste le mieux nos mesures a un temps caractéristique de 1200 fs. Cet ajustement donne cependant une courbe de résiduel négative puis positive.

Le meilleur ajustement est obtenu avec une variation exponentielle de temps caractéristique 450 fs décalée d'un délai pompe-sonde de 200 fs. Intermédiaire entre la variation instantanée et la variation exponentielle non décalée, cette évolution suggère l'existence d'une composante balistique dans le transfert du CO du Fer de l'hème à l'atome de Cuivre dans la cytochrome *c* oxydase. D'autre part, la durée de ce transfert est compatible avec le temps caractéristique de 400±200 fs déterminé par les expériences intégrées spectralement.

4.2.3 Oscillations de cohérence dans l'hémoglobine

Une nouvelle technique de filtrage des oscillations de cohérence a été publiée récemment [65]. Cette technique nécessite de disposer des spectres différentiels pour un ensemble de délais pompe-sonde couvrant la plage sur laquelle les oscillations de cohérences apparaissent, avec un espacement déterminé par la résolution temporelle. Un grand nombre de spectres doit ainsi être enregistré avec un rapport signal sur bruit suffisant.

Dans ce but, l'expérience pompe-sonde résolue spectralement a été réalisée à la fréquence de modulation de 500 Hz sur un échantillon d'hémoglobine, qui permet d'obtenir des signaux beaucoup moins bruités que ceux obtenus avec l'échantillon de cytochrome *c* oxydase pour les raisons suivantes. Tout d'abord, l'échantillon d'hémoglobine, moins absorbant, transmet une sonde d'intensité spectrale plus importante, le signal sonde transmis est de 13000 coups à 1951 cm^{-1}. Le bruit de photons, qui contribue principalement au bruit de l'expérience, est donc moins important, surtout lors d'acquisitions à la fréquence de modulation de 1 kHz permettant d'enregistrer la totalité du signal transmis sans saturer la CCD (voir la partie

4.2.1). Ensuite, l'échantillon d'hémoglobine se dégrade moins vite et donne ainsi la possibilité d'accumuler les mesures pendant plus de trois heures.

Ainsi, le spectre différentiel a pu être mesuré à un grand nombre de délais pompe-sonde : 35 délais espacés de 200 fs. Ces délais ont été balayés 75 fois avec une acquisition de 2000 spectres pour chaque délai, ce qui correspond à 3h40 d'acquisition. La figure 4.25 représente un spectre sur deux. Ces 18 spectres différentiels obtenus à des délais pompe-sonde espacés de 400 fs sont décalés en ordonnée l'un par rapport à l'autre de $2{,}5.10^{-3}$. Le bruit de cette expérience est de 6.10^{-5}, de l'ordre de grandeur du bruit évalué à 4.10^{-5} dans la partie 4.2.1.

Les oscillations de cohérence, décrites dans la partie 2.3.4 du chapitre 2, apparaissent à délai pompe-sonde négatif. Le pic d'absorption du CO qui se détache de l'atome de Fer est observé à délai positif à 1951 cm^{-1}.

Les spectres différentiels enregistrés couvrent toute la plage sur laquelle les oscillations de cohérences apparaissent, avec un espacement correspondant à la résolution temporelle. Cela n'aurait probablement pas été possible avec les techniques habituelles d'enregistrement de spectres infrarouge dont le bruit est plus important. En effet, c'est grâce à la détection du spectre infrarouge par conversion de fréquence vers le visible et à la modulation du signal à 500 Hz, que nous avons pu obtenir 35 spectres différentiels avec un rapport signal sur bruit suffisant pour l'ensemble de ces délais. L'application de la technique de filtrage [65] à nos résultats donne déjà des résultats très prometteurs qui devraient permettre de valider expérimentalement cette technique.

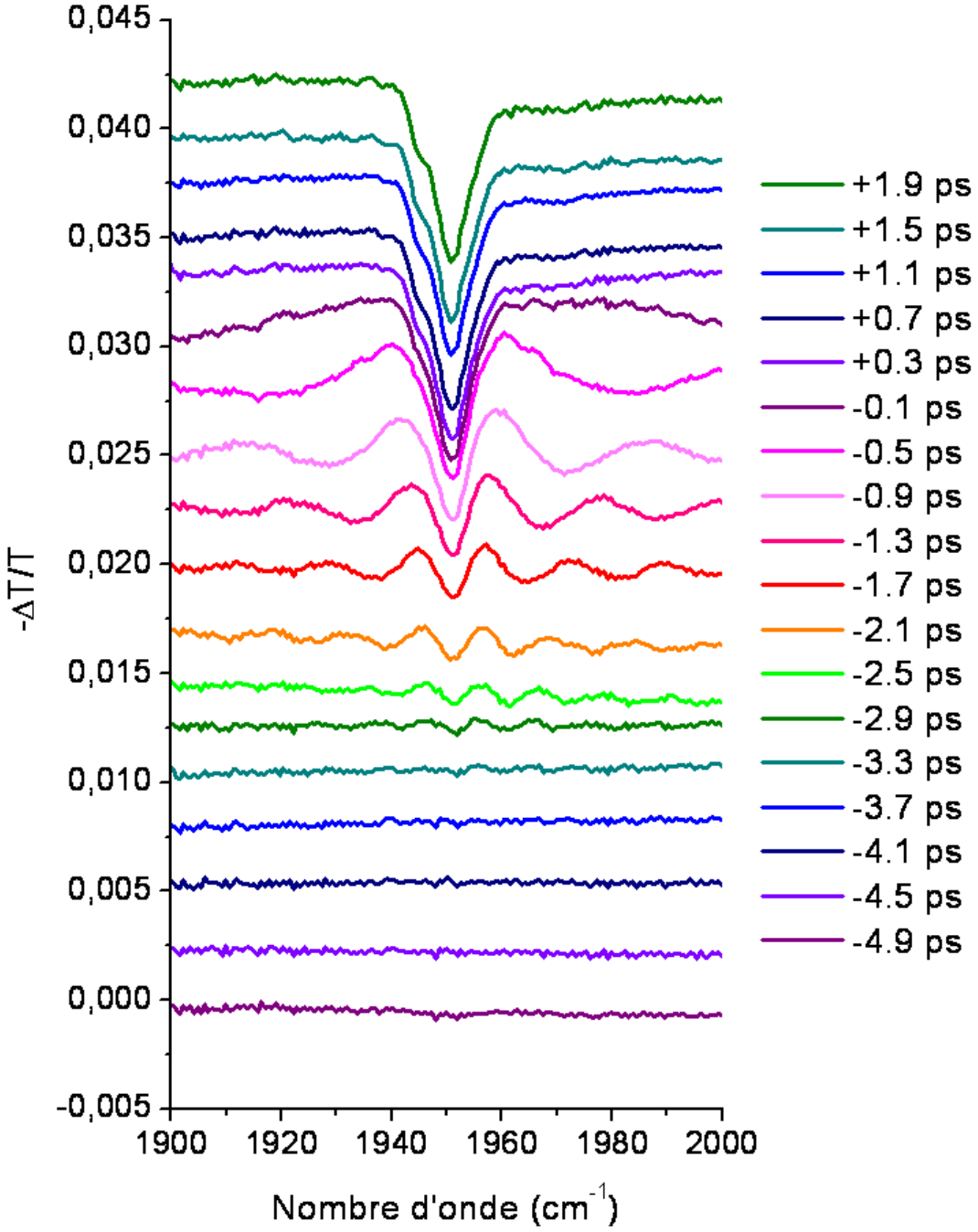


FIG. 4.25 – Spectres transitoires induits par un échantillon d'hémoglobine 8 mM d'épaisseur 50 μm à différents délais pompe-sonde (délais donnés à 1950 cm^{-1} à $\pm$50 fs). Les spectres différentiels ont été décalés en ordonnée l'un par rapport à l'autre de $2{,}5.10^{-3}$. Pompe de 350 nJ par impulsion, angle de 54,7° entre les polarisations pompe et sonde, accumulation pendant 3h40 (75 cycles de 2000 spectres par cycle et par délai).

4.3 Simulations de dynamique moléculaire

Les simulations de dynamique moléculaire permettent de calculer les mouvements individuels de chaque atome d'une protéine afin de connaître sa structure tridimensionnelle à un instant donné pour comprendre son fonctionnement dynamique. Nous utilisons ces simulations pour modéliser le transfert du ligand CO dans la cytochrome *c* oxydase.

Les coordonnées tridimensionnelles des atomes de la protéine sont obtenues par cristallographie aux rayons X. Ces coordonnées représentent la moyenne spatiale des différentes conformations présentes dans la protéine cristallisée et la moyenne temporelle des mouvements dus à l'agitation thermique.

A partir des positions et des vitesses initiales des atomes, ainsi que des forces qui agissent sur eux, les équations du mouvement permettent d'accéder aux trajectoires des atomes dans le cadre de la mécanique classique. Ces calculs sont réalisés numériquement au LOB par J.-C. Lambry [66] [67] à l'aide du programme de modélisation CHARMM.

4.3.1 Construction de la protéine

Dans un premier temps, la structure de la protéine dans certaines conditions de température et solvatation est générée à partir du fichier 1AR1.pdB (Protein Data Bank) qui donne la structure cristallographique de la cytochrome *c* oxydase de *P. denitrificans*. Comme nous l'avons vu au chapitre I, cette protéine présente deux sous unités similaires aux sous-unités I et II de la protéine mitochondriale, avec le même site actif de fixation des ligands. La taille plus petite de la protéine bactérienne permet de réaliser les calculs numériques plus rapidement.

La membrane et le solvant, absents de la structure cristallographique, sont simulés par l'ajout de 14 phospholipides membranaires au niveau des chaînes hydrophobes de la protéine, et de molécules d'eau au niveau des parties hydrophiles. En ce qui concerne la protéine, les atomes d'hydrogène, absents dans le fichier pdB, sont générés, et les paramètres angulaires du ligand CO fixé au Fer sont déterminés.

Le champ de forces qui permet de calculer les mouvements des atomes à partir de leurs vitesses et coordonnées tridimensionnelles est alors construit. Ces forces se divisent en deux groupes. Les interactions liées caractérisent les liaisons covalentes, angulaires et de torsion, dont les énergies respectives e_b, e_θ et e_φ sont définies de la manière suivante :

$$\begin{aligned} e_b &= K_b \left(r - r_0\right)^{\,2} \\ e_\theta &= K_\theta \left(\theta - \theta_0\right)^{\,2} \\ e_\varphi &= K_\varphi \left[1 + cos(n\phi - \delta)\right] \end{aligned} \tag{4.6}$$

où K_b, K_θ, K_φ sont les constantes de force, r est la longueur de la liaison et r_0 la longueur à l'équilibre, θ est l'angle entre deux liaisons et θ_0 l'angle à l'équilibre, ϕ est l'angle de torsion, n sa multiplicité et δ sa phase.

Les interactions non liées englobent les interactions électrostatiques et de van der Waals, dont les énergies respectives e_c et e_{vdw} s'écrivent sous la forme :

$$\begin{aligned} e_c &= \frac{1}{4\pi\epsilon_0}\frac{q_1 q_2}{\epsilon r} \\ e_{vdw} &= \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} \end{aligned} \tag{4.7}$$

Dans l'expression de e_c, q_1 et q_2 sont les charges partielles en interaction, r est leur séparation et ϵ est la constante diélectrique du milieu. Dans l'expression de e_{vdw}, A et B sont des constantes qui dépendent des atomes en interaction et r est la distance interatomique.

Afin d'éviter par la suite une divergence des solutions calculées à partir des équations du mouvement, l'énergie de la protéine est minimisée à l'aide d'algorithmes appropriés.

A ce stade, les positions des atomes sont connues, ainsi que les forces auxquelles ils sont soumis. Afin de pouvoir appliquer les équations du mouvement, il ne manque que la connaissance des vitesses initiales de chaque atome. Ces vitesses sont attribuées aléatoirement parmi une distribution gaussienne $P_T(v)$ correspondant à la température T de la protéine :

$$P_T(v) = C.e^{-\frac{1}{2}\frac{mv^2}{k_B T}} \tag{4.8}$$

Les équations du mouvement permettent alors de calculer les trajectoires de chaque atome à partir de ces vitesses et des positions initiales des atomes.

Afin d'étudier la protéine à la température ambiante de 300 K, l'énergie cinétique des atomes de la protéine est augmentée périodiquement par l'intermédiaire de leurs vitesses. Chaque changement des vitesses est suivi d'une phase de relaxation, au cours de laquelle les trajectoires des atomes sont recalculées à l'aide des équations du mouvement, à partir des nouvelles conditions initiales de vitesses et de positions.

La protéine subit ensuite une phase d'équilibration. Les vitesses des atomes sont ajustées à 300 K à intervalles réguliers suivis de phases de relaxation, afin de répartir la température et l'énergie cinétique de manière homogène au sein de la protéine. La stabilité du modèle est enfin vérifiée lors d'une simulation de dynamique libre exempte de contraintes, à l'issue de laquelle le transfert du ligand peut être simulé.

La figure 4.26 représente l'évolution de l'énergie de la protéine au cours des étapes de chauffage, d'équilibration et de dynamique libre, ainsi que l'écart rms ("root mean square") de la position des atomes par rapport à la structure initiale. L'énergie et l'écart rms augmentent pendant les 30 ps de chauffage, puis ces grandeurs se stabilisent lors des 250 ps d'équilibration et des 150 ps de dynamique libre. La structure de la protéine ainsi obtenue à 300 K est stable.

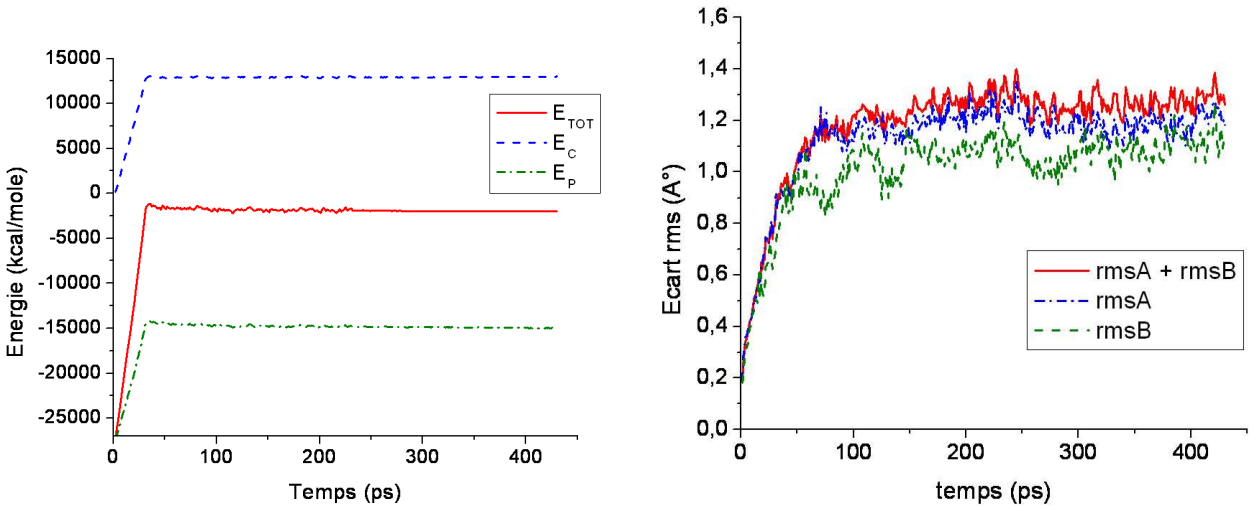


FIG. 4.26 – Phases de chauffage (30 ps), d'équilibration (250 ps) et de dynamique libre (150 ps). A gauche, évolution de l'énergie cinétique E_C et de l'énergie potentielle E_P de la protéine. A droite, évolution de l'écart rms par rapport à la structure initiale des deux sous-unités A et B de la protéine.

4.3.2 Modélisation du transfert de ligand

A partir de la protéine stable à 300 K, obtenue à l'issue de la phase de dynamique libre, le transfert du ligand CO, du Fer de l'hème vers l'atome de Cuivre, est modélisé.

La photodissociation du ligand s'effectue en un temps inférieur à la résolution temporelle de nos expériences pompe-sonde. Dans le modèle, la liaison entre le ligand CO et l'hème est ainsi supprimée instantanément en supprimant le potentiel de la liaison covalente et en changeant les paramètres relatifs à l'état ligandé de l'hème, qui passe d'un état hexa-coordonné à un état penta-coordonné. D'autre part, la distribution de charges du ligand CO est modifiée : cette distribution de charges se limite à un moment dipolaire lorsque le CO est fixé sur le Fer. Un moment quadripolaire s'ajoute au moment dipolaire dans le CO libre, après photodissociation.

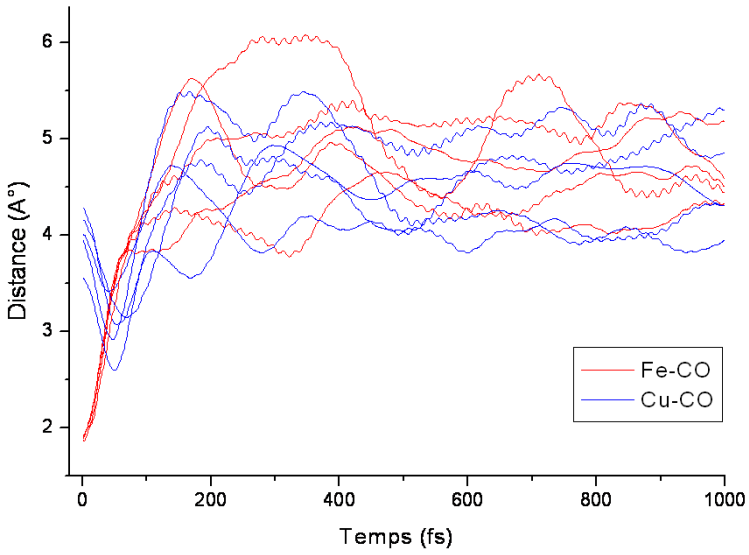


FIG. 4.27 – Simulation des distances de l'atome de carbone du ligand CO à l'atome de Fer et à l'atome de Cuivre du site bimétallique de la cytochrome *c* oxydase, après rupture de la liaison Fer-carbone à l'instant t=0.

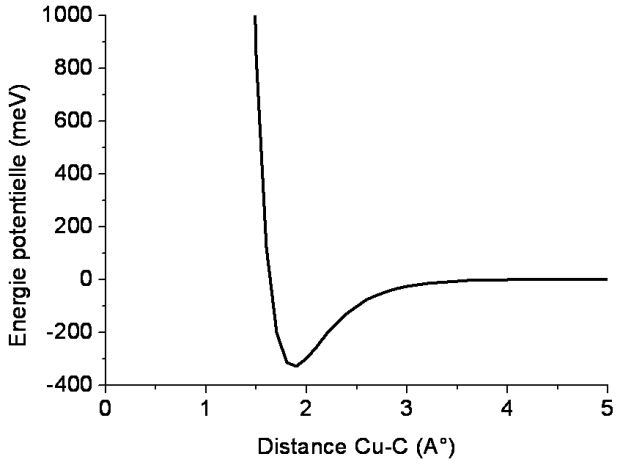
La photodissociation ainsi induite est suivie d'une phase exempte de contraintes, au cours de laquelle le ligand CO libre se déplace dans le site actif (voir figure 4.27). Des calculs de dynamique moléculaire de ce déplacement ont été effectués dans la référence [67]. Ces calculs n'incluaient pas de potentiel de liaison covalente Cuivre-Carbone et ne pouvaient donc pas modéliser l'arrivée du CO sur le Cuivre. Ici, nous avons voulu rajouter un potentiel de liaison covalente Cuivre-Carbone afin de modéliser la recombinaison du CO sur le Cuivre. Cette recombinaison ne peut pas avoir lieu si la liaison covalente Cuivre-Carbone est approximée

de la même manière que les autres liaisons covalentes par des potentiels paraboliques (voir équations 4.6). Nous avons donc choisi de modéliser la liaison covalente Cuivre-Carbone par un potentiel de Morse. Le potentiel de Morse et le choix des paramètres associés à la liaison Cu-C sont décrits dans l'encadré ci-dessous.

Détermination du potentiel de Morse de la liaison Cu-C

Le potentiel de Morse est couramment utilisé pour décrire l'énergie potentielle d'une liaison covalente car il reproduit assez fidèlement l'anharmonicité du potentiel et plus particulièrement les énergies des niveaux vibrationnels [68]. Il est donné par l'équation 4.9 où r_0 est la distance d'équilibre entre les deux atomes, $-D$ l'énergie potentielle à $r = r_0$ et α un paramètre déterminant l'anharmonicité.

$$V(r) = D\left(e^{-2\alpha(r-r_0)} - 2e^{-\alpha(r-r_0)}\right) \tag{4.9}$$



Des calculs de DFT réalisés par Chris Meier et Catherine Heitz (Base B3LYP) à l'Université Paul Sabatier (Toulouse) donnent une valeur de r_0 de 1,87 Å (en bon accord avec des valeurs expérimentales obtenues dans des molécules contenant des carbonyles de Cu^+ [69][70]) et une valeur de fréquence ν de 380 cm^{-1}. D'autre part, le paramètre D est déterminé à partir de l'énergie d'activation correspondant au départ du CO du Cuivre donnée dans la référence [71]. Cette énergie d'activation E_a vaut environ 315 meV. La constante D s'élève donc à $E_a + \hbar\omega/2 \approx 340meV$. La constante α, donnée par la relation $\omega = \alpha\sqrt{2D/m}$, où m est la masse réduite des atomes C et Cu, vaut alors 2,87 $Å^{-1}$.

Il s'avère que le spin de l'atome de Cuivre est le même à l'état dissocié et à l'état ligandé avec CO. Les deux états dissocié et ligandé sont donc décrits par la même courbe de potentiel. Par comparaison, l'atome de Fer change de spin quand il passe de l'état dissocié à l'état ligandé avec CO [72]. Ces deux états sont alors décrits par deux courbes d'énergie potentielle différentes et le passage d'un état à l'autre dans la zone de croisement des deux courbes est décrit par le formalisme Landau-Zener.

4.3.3 Résultats des simulations

Plusieurs simulations ont été réalisées à partir de conditions initiales différentes au moment de la dissociation du CO. L'évolution pendant le transfert du CO de la distance de l'atome de Carbone du CO à l'atome de Fer et à l'atome de Cuivre, ainsi que l'évolution de l'angle entre le CO et la normale à l'hème, ont été obtenus. Les résultats des différentes simulations sont représentés à la figure 4.28. Rappelons qu'un angle 0° correspond à l'alignement des atomes Fe...O-C et un angle de 180° à l'alignement Fe...C-O.

Les résultats des différentes simulations sont similaires. Les trajectoires se superposent, aussi bien au niveau des distances que de l'angle calculé. Le trajet emprunté par le CO pour aller du Fer de l'hème à l'atome de Cuivre est reproductible. On peut donc en déduire que ce transfert est balistique, imposé par la structure du site actif bimétallique de la protéine. En un temps très court d'environ 120 fs, le CO s'éloigne du Fer, se rapproche du Cuivre et effectue une rotation. Il a alors quasiment le bon angle pour se lier au Cuivre mais sa position n'est pas la bonne. Il subit alors une répulsion de l'environnement qui le rapproche à nouveau du Fer et provoque des rebonds de la distance Cu-C et de l'angle entre le CO et la normale à l'hème. Nous n'avons pas observé ces rebonds au niveau des signaux d'absorption différentielle mesurés lors de nos expériences pompe-sonde. La fréquence de vibration du CO n'est probablement pas assez sensible à ce phénomène et le bruit de l'expérience n'est pas suffisamment faible pour mettre en évidence d'aussi petites variations.

Nous avons ajusté par des exponentielles l'évolution de la distance moyenne Cu-CO (figure 4.29) et l'évolution de l'angle moyen du CO par rapport à la normale à l'hème (figure 4.30). La rotation du CO s'effectue plus rapidement, selon un temps caractéristique de 170 fs. La migration du CO jusqu'à sa position liée au Cuivre, correspondant à une distance moyenne d'environ 2 Å, se produit sur un temps caractéristique plus long de 580 fs.

La distance Cu-C suit une dynamique similaire à celle des signaux d'absorption différentielle mesurés lors des expériences pompe-sonde, aussi bien au niveau des temps caractéristiques de transfert qu'au niveau de la composante balistique observée lors des expériences résolues spectralement.

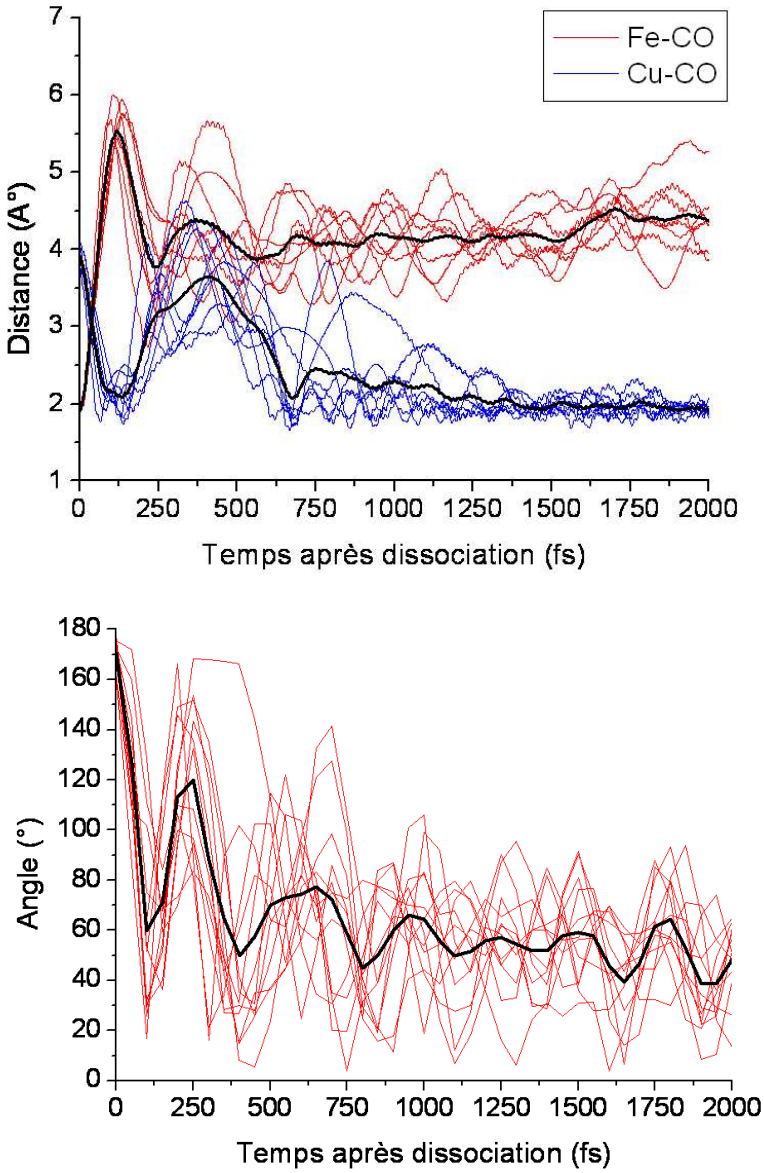


FIG. 4.28 – En haut, distances de l'atome de Carbone du ligand CO à l'atome de Fer et à l'atome de Cuivre du site bimétallique de la cytochrome *c* oxydase, après rupture de la liaison Fer-Carbone. En bas, angle entre le ligand CO et la normale au plan de l'hème a_3, après rupture de la liaison Fer-Carbone. La moyenne des différentes simulations est tracée en traits plus épais noirs.

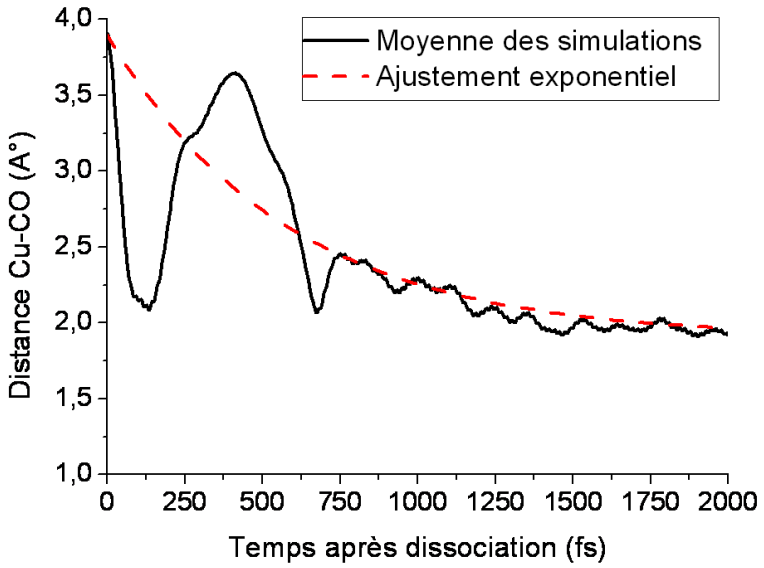


FIG. 4.29 – Évolution de la distance moyenne de l'atome de Carbone du ligand CO à l'atome de Cuivre du site bimétallique de la cytochrome *c* oxydase, ajustée par une exponentielle de temps caractéristique 580 fs.

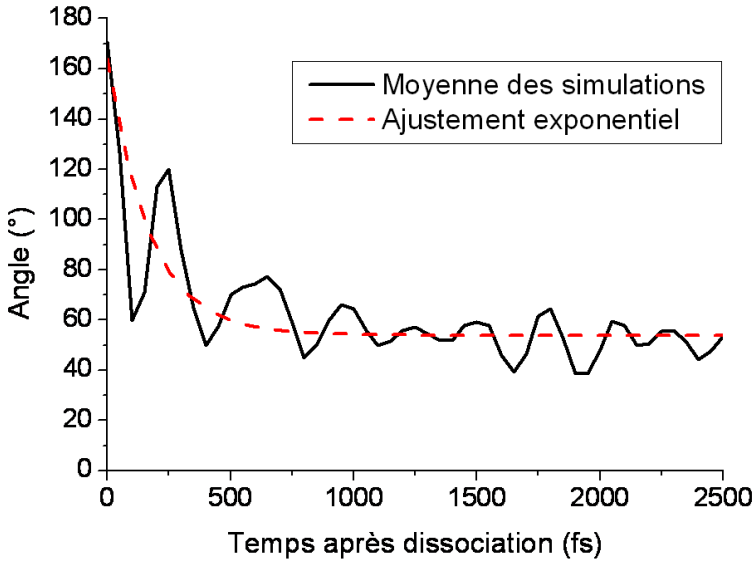


FIG. 4.30 – Évolution de l'angle moyen entre le ligand CO et la normale au plan de l'hème a_3 de la cytochrome *c* oxydase, ajusté par une exponentielle de temps caractéristique 170 fs.

4.4 Discussion

Le transfert du ligand CO au sein de la cytochrome *c* oxydase a été étudié par différentes méthodes complémentaires, à savoir des expériences pompe-sonde intégrées spectralement et résolues spectralement et des simulations de dynamique moléculaire.

Il est nécessaire de comparer les informations apportées par les deux dispositifs expérimentaux.

L'expérience intégrée spectralement présente un rapport signal sur bruit meilleur. Lors de cette expérience, la totalité du faisceau infrarouge transmis par l'échantillon est envoyée sur le même détecteur : le signal est atténué par le fait que le spectre de la sonde est plus large que la raie d'absorption du CO, mais le détecteur reçoit assez de photons pour que ce faible signal soit mesuré avec un bruit de l'ordre de 10^{-5}. Cette approche présente également l'avantage de s'affranchir des oscillations de cohérence qui nous empêcheraient d'observer les premières étapes de transfert du ligand. Un signal d'absorption de l'hème apparaît en revanche, mais ce signal a pu être modélisé et soustrait au signal total de la protéine afin d'en extraire le signal du CO. Le temps de transfert du CO au sein du site bimétallique de la cytochrome *c* oxydase, du Fer de l'hème vers l'atome de Cuivre, a ainsi pu être évalué à 400±200 fs.

L'expérience pompe-sonde résolue spectralement apporte plus d'informations puisqu'elle offre en plus des données spectrales qui suggèrent une composante balistique dans le transfert du CO. Les oscillations de cohérence qui se superposent aux premières étapes de transfert du ligand devront être éliminées par la technique exposée dans la référence [65]. Le bruit de l'expérience, de 6.10^{-5} à 1.10^{-4}, est plus important que celui des mesures intégrées spectralement du fait que l'intensité spectrale est distribuée sur un grand nombre de pixels. Cependant, les performances de ce dispositif, qui utilise la technique de conversion du spectre infrarouge vers le visible, sont meilleures que celles d'un dispositif de mesure de spectre à l'aide d'une barrette HgCdTe [73] dont la résolution spectrale limitée par le nombre de pixels est de 6 cm^{-1} et le bruit au bout de 14 minutes de 2.10^{-4} pour une plage spectrale observée d'environ 150 cm^{-1}. Dans notre cas, la résolution spectrale déterminée dans la partie 3.6 du chapitre 3 est de 1,6 cm^{-1} et le bruit est de 6.10^{-5} dans le cas optimal de l'hémoglobine au bout de 3 minutes pour un délai pompe-sonde (ce qui a permis de faire des mesures sur 35 délais pompe-sonde en 3h40).

Les temps caractéristiques de transfert du ligand CO du Fer de l'hème à l'atome de Cuivre, au sein du site bimétallique de la cytochrome *c* oxydase, évalués lors des différentes études exposées dans ce travail de thèse, sont en bon accord entre eux. L'apparition dans les spectres d'absorption différentielle du pic correspondant au ligand CO lié sur le Cuivre et la distance du Cuivre au Carbone du CO calculée à l'aide des simulations suivent des dynamiques similaires.

Ces temps de transfert sont également compatibles avec les résultats des expériences de spectroscopie picoseconde infrarouge [1][2] qui détectent un transfert plus rapide que la picoseconde, et avec les expériences dans le visible [3] à partir desquelles un transfert du CO du Fer vers le Cuivre en 300 fs a été déduit.

La composante balistique suggérée par les expériences résolues spectralement est observée également lors des simulations de dynamique moléculaire qui montrent que le trajet emprunté par la molécule de CO pour aller du Fer de l'hème à l'atome de Cuivre est reproductible. On peut donc en déduire que ce transfert balistique est imposé par la structure du site actif bimétallique de la protéine.

Conclusion

L'étude dynamique de transfert de ligands dans les hémoprotéines est indispensable à la compréhension du fonctionnement de leur site actif. Ainsi, le transfert de ligands au sein du site actif de la cytochrome *c* oxydase a déjà fait l'objet de plusieurs expériences de spectroscopie visible et infrarouge. La spectroscopie infrarouge est particulièrement bien adaptée à l'étude du transfert du ligand CO, du Fer de l'hème à l'atome de Cuivre, car elle permet de suivre directement ce transfert par l'intermédiaire de la signature vibrationnelle du CO. Cependant, les expériences existantes [1][2] n'avaient pas la résolution suffisante pour résoudre ce processus ultra rapide qui se produit à des échelles de quelques centaines de femtosecondes.

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié le transfert du CO dans la cytochrome *c* oxydase par différentes approches de spectroscopie d'absorption femtoseconde infrarouge. Deux dispositifs pompe-sonde femtoseconde infrarouge ont ainsi été mis en œuvre en vue de réaliser des mesures intégrées spectralement et des mesures résolues spectralement.

Le signal pompe-sonde du ligand CO dans l'infrarouge est très faible. La cytochrome *c* oxydase apporte une difficulté supplémentaire par rapport aux protéines non membranaires de tailles plus petites, car elle ne peut pas être obtenue à des concentrations importantes et induit donc un signal pompe-sonde plus faible. Cet inconvénient a dû être compensé en utilisant des échantillons plus épais, mais la sonde est alors absorbée par le solvant et moins de photons infrarouge sont transmis.

Dans le cas des expériences intégrées spectralement, j'ai dû optimiser le dispositif pour augmenter la puissance de la sonde qui était trop absorbée par le solvant de l'échantillon et j'ai amélioré la résolution temporelle du dispositif. J'ai constaté en réalisant l'expérience sur la cytochrome *c* oxydase déligandée qu'un signal supplémentaire apparaît autour du délai

pompe-sonde nul. Dans le cas de la protéine ligandée, ce signal se superpose au signal du CO et complique ainsi l'accès aux premières étapes de transfert du CO du Fer vers le Cuivre.

J'ai mené une étude approfondie de ce signal parasite et de ses différentes origines. Il s'est avéré que la cause principale est une absorption par les transitions électroniques des hèmes de la cytochrome *c* oxydase. J'ai modélisé le signal d'absorption différentielle induit par ce phénomène en appliquant le formalisme de Bloch à l'interaction des champs pompe et sonde avec un système à trois niveaux correspondant aux niveaux électroniques de l'hème.

Afin d'extraire le signal induit par le transfert du CO, j'ai soustrait ce signal dû à la photophysique des hèmes, tout d'abord en réalisant des mesures simultanées sur des échantillons avec et sans ligand, puis en utilisant la modélisation du signal d'absorption des transitions de l'hème. Grâce à cette méthode de soustraction, les expériences pompe-sonde nous ont permis d'évaluer le temps caractéristique de transfert du ligand CO du Fer vers le Cuivre à 400±200 fs.

Les expériences résolues spectralement sont plus riches que les expériences intégrées spectralement, car elles nous donnent des informations sur le profil spectral des raies d'absorption du ligand. Cependant, des oscillations spectrales de cohérence apparaissent aux délais pompe-sonde négatifs dans le cas de bandes d'absorption fines et compliquent l'interprétation des résultats à délais négatifs.

J'ai réalisé les premières expériences pompe-sonde résolues spectralement utilisant une nouvelle technique de mesure du spectre infrarouge développée au laboratoire [50]. Cette technique, qui consiste à convertir le spectre infrarouge vers le visible, offre une meilleure résolution spectrale et un meilleur rapport signal sur bruit qu'un dispositif de mesure de spectre à l'aide d'une barrette de détecteurs HgCdTe. Dans le cas d'un échantillon d'hémoglobine très concentré (8 mM), ce bon rapport signal sur bruit nous a permis d'enregistrer un grand nombre de spectres à des délais pompe-sonde couvrant la plage sur laquelle les oscillations de cohérence apparaissent. Ces oscillations ont été traitées à l'aide d'une nouvelle technique de filtrage des oscillations de cohérence [65] qui pourra ainsi être validée expérimentalement.

Dans le cas de l'échantillon de cytochrome *c* oxydase, le nombre de délais pompe-sonde pouvant être enregistrés est encore limité, mais l'évolution de l'amplitude des raies d'absorption du CO selon le délai pompe-sonde a permis de déceler un décalage de 200 fs qui suggère une composante balistique dans le transfert du CO. Ce décalage est suivi d'une variation exponentielle de temps caractéristique 450 fs.

La technique de conversion du spectre infrarouge vers le visible présente ainsi un grand intérêt pour les expériences pompe-sonde résolues spectralement et sera utilisée pour réaliser des expériences dans d'autres hémoprotéines ainsi que des expériences d'ascension vibrationnelle [74] et de spectroscopie bidimensionnelle dans l'infrarouge [75][76].

Les deux approches expérimentales abordées dans ce travail de thèse apportent ainsi des résultats complémentaires qui se confirment et sont compatibles avec les résultats des expériences précédentes de spectroscopie picoseconde infrarouge [1][2] et de spectroscopie dans le visible [3].

Les résultats de nos expériences pompe-sonde femtoseconde infrarouge ont été confrontés à des simulations de dynamique moléculaire qui modélisent le transfert du CO du Fer vers le Cuivre. Les mouvements individuels de chaque atome donnés par ces simulations apportent des précisions supplémentaires qui peuvent aider à interpréter les résultats des expériences pompe-sonde. En particulier, l'étude des déplacements de la molécule de CO par rapport aux atomes de Fer et de Cuivre du site bimétallique de la cytochrome *c* oxydase montre que le trajet emprunté par le CO lors de son transfert du Fer de l'hème vers l'atome de Cuivre est reproductible et suggère ainsi que ce transfert est balistique, comme l'indiquent les expériences résolues spectralement. Ces résultats laissent croire que le site bimétallique de la cytochrome *c* oxydase doit soumettre le ligand CO à des forces qui le guident rapidement vers le Cuivre après photodissociation.

Annexe A

Champ complexe et phase spectrale d'une impulsion

A.1 Notation complexe

La transformée de Fourier d'une fonction $f(t)$ dépendant du temps est notée $f(\omega)$. Ces deux fonctions sont liées par les relations suivantes :

$$f(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} dt\, f(t)\, e^{i\omega t} \tag{A.1}$$

$$f(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{d\omega}{2\pi}\, f(\omega)\, e^{-i\omega t} \tag{A.2}$$

Ainsi, le champ électrique réel noté $E(t)$ peut s'écrire à l'aide d'une transformation de Fourier :

$$E(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{d\omega}{2\pi}\, E(\omega)\, e^{-i\omega t} \tag{A.3}$$

Ce champ $E(t)$ étant réel, son spectre $E(\omega)$ présente la propriété $E(-\omega) = E^*(\omega)$. Il suffit donc de connaître le champ $E(\omega)$ pour les valeurs positives de la fréquence. On associe ainsi au champ réel $E(t)$ le champ complexe $\mathcal{E}(t)$ qui ne comporte que les composantes spectrales de fréquences positives :

$$\mathcal{E}(t) = 2\int_0^\infty \frac{d\omega}{2\pi} E(\omega)\, e^{-i\omega t} \tag{A.4}$$

Le champ réel $E(t)$ se déduit alors du champ complexe $\mathcal{E}(t)$ par la relation suivante :

$$E(t) = \frac{1}{2}\left(\mathcal{E}\,(t) + \mathcal{E}^*\,(t)\,\right) = Re\big(\mathcal{E}(t)\big) \tag{A.5}$$

La polarisation complexe $\mathcal{P}(t)$ associée à la polarisation réelle $P(t)$ est définie de la même façon.

L'intensité temporelle $I(t)$ et l'intensité spectrale $I(\omega)$ du champ sont définies à partir du champ complexe $\mathcal{E}$ de la manière suivante :

$$I(t) = \frac{1}{2\eta_0}\,\mathcal{E}(t)\mathcal{E}^*(t) \tag{A.6}$$

$$I(\omega) = \frac{1}{2\eta_0}\,\mathcal{E}(\omega)\mathcal{E}^*(\omega) \tag{A.7}$$

où $\eta_0 = \sqrt{\mu_0/\epsilon_0}$ est l'impédance du vide. Remarquons que $I(\omega)$ n'est pas la transformée de Fourier de $I(t)$.

Dans le cadre de l'approximation paraxiale, $\mathcal{E}$ et $\mathcal{P}$ sont assimilés à des ondes planes qui se propagent selon la direction z, leur composante de fréquence ω s'écrit ainsi sous la forme :

$$\mathcal{E}(z,\omega) = \mathcal{A}(z,\omega)\, exp\left(i\, k(\omega) z\right) \tag{A.8}$$

$$\mathcal{P}(z,\omega) = \mathcal{B}(z,\omega)\, exp\left(i\, k(\omega) z\right) \tag{A.9}$$

A.2 Valeurs moyennes

Soit une impulsion décrite par son champ complexe $\mathcal{E}(t)$ supposé normalisé, c'est à dire :

$$\int_{-\infty}^{+\infty} dt\ |\,\mathcal{E}(t)|^{\,2} = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{d\omega}{2\pi}\ |\,\mathcal{E}(\omega)|^{\,2} = 1 \tag{A.10}$$

Le carré $|\mathcal{E}(t)|^2$ de la norme de $\mathcal{E}(t)$ est utilisé comme densité de probabilité pour définir les valeurs moyennes temporelles de $\mathcal{E}(t)$. Ainsi, le centre de l'impulsion est :

$$\langle t \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} t \, |\mathcal{E}(t)|^2 \, dt \tag{A.11}$$

Et l'écart quadratique moyen est :

$$\Delta t = \sqrt{\langle t^2 \rangle - \langle t \rangle^2} \tag{A.12}$$

Dans le domaine des fréquences, les valeurs moyennes sont définies de la même façon avec la densité de probabilité $|\mathcal{E}(\omega)|^2/2\pi$:

$$\langle \omega \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} \omega \, |\mathcal{E}(\omega)|^2 \, \frac{d\omega}{2\pi} \tag{A.13}$$

$$\Delta\omega = \sqrt{\langle \omega^2 \rangle - \langle \omega \rangle^2} \tag{A.14}$$

Les écarts quadratiques moyens Δt et $\Delta\omega$ sont liés par l'inégalité $\Delta t \, \Delta\omega \geq 1/2$. L'égalité n'est atteinte que dans le cas d'une impulsion gaussienne (voir partie A.4).

A.3 Phase spectrale

Le champ $\mathcal{E}$ peut s'écrire sous la forme suivante :

$$\mathcal{E}(\omega) = |\mathcal{E}(\omega)| \, e^{i\varphi(\omega)} \tag{A.15}$$

où $\varphi(\omega)$ est la phase spectrale du champ $\mathcal{E}(\omega)$. A partir de cette phase est défini le retard de groupe $\tau(\omega)$ qui donne l'instant d'arrivée des différentes composantes spectrales :

$$\tau(\omega) = \frac{d\varphi(\omega)}{d\omega} \tag{A.16}$$

L'écart quadratique moyen Δt est lié au retard de groupe τ par la relation suivante :

$$(\Delta t)^2 = (\Delta t_{\varphi=0})^2 + (\Delta\tau)^2 \tag{A.17}$$

où $\Delta t_{\varphi=0}$ est l'écart quadratique de l'impulsion qui se propagerait avec une phase nulle. Si la phase est linéaire, le retard de groupe est constant ($\Delta\tau = 0$) et l'impulsion n'est pas allongée. Si la phase est quadratique, le retard de groupe est linéaire et l'impulsion est allongée par rapport à l'écart quadratique moyen minimal possible $\Delta t_{\varphi=0}$.

Une phase quadratique est quantifiée par son coefficient Φ" à partir duquel $\varphi(\omega)$ et $\tau(\omega)$ sont définis de la manière suivante :

$$\varphi(\omega) = (\omega - \omega_0)^2 \frac{\Phi"}{2} \tag{A.18}$$

$$\tau(\omega) = (\omega - \omega_0)\Phi" \tag{A.19}$$

L'équation A.17 permet de relier dans ce cas l'écart quadratique moyen Δt à $\Delta\omega$ et Φ" :

$$(\Delta t)^2 = (\Delta t_{\varphi=0})^2 + (\Delta\omega\,\Phi")^2 \tag{A.20}$$

A.4 Impulsion gaussienne

Le champ électrique $\mathcal{E}(t)$ d'une impulsion d'enveloppe gaussienne centrée à l'instant t_0 et de fréquence de porteuse ω et est défini ainsi :

$$\mathcal{E}(t) = \mathcal{E}_0\, e^{-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}}\, e^{-i\omega t} \tag{A.21}$$

L'intensité temporelle $I(t)$ de cette impulsion est donc :

$$I(t) = I_0\, e^{-\frac{(t-t_0)^2}{\sigma^2}} \tag{A.22}$$

L'impulsion a un écart quadratique moyen de $\Delta t_{\varphi=0} = \sigma/\sqrt{2}$, et une largeur à mi-hauteur de $\Delta t_{1/2}^{\varphi=0} = 2\sqrt{2ln(2)}\,\Delta t_{\varphi=0}$. Dans tout ce manuscrit, la durée de l'impulsion gaussienne est définie comme étant la largeur à mi-hauteur de son intensité temporelle.

Dans le domaine spectral, l'impulsion est une gaussienne d'écart quadratique moyen $\Delta\omega$ tel que $\Delta t_{\varphi=0}\,\Delta\omega = 1/2$. L'égalité écrite pour les largeurs à mi-hauteur correspondantes donne la relation $\Delta t_{1/2}^{\varphi=0}\,\Delta\omega_{1/2} = 4\,ln(2)$.

Cette égalité est valable pour les impulsions gaussiennes de phase linéaire. Ces impulsions sont dites limitées par transformée de Fourier.

Dans le cas d'une impulsion gaussienne présentant une phase quadratique Φ" définie par la relation A.19, les largeurs à mi hauteur $\Delta t_{1/2}$ et $\Delta\omega_{1/2}$ sont reliées à l'aide de l'équation A.20 de la manière suivante :

$$\left(\Delta t_{1/2}\right)^2 = \frac{16(ln2)^2}{\left(\Delta\omega_{1/2}\right)^2} + \left(\Delta\omega_{1/2}\Phi"\right)^2 \tag{A.23}$$

Annexe B

Optique non linéaire

Les calculs abordés dans cette partie sont décrits plus en détails dans la référence [41].

B.1 Effets non linéaires du second ordre

Un champ $E(t)$ se propageant dans un matériau transparent non linéaire de susceptibilité du second ordre $\chi^{(2)}$ donne lieu à une polarisation non linéaire $P^{(2)}(t)$ d'ordre 2 relié à $E(t)$ de la manière suivante :

$$P^{(2)}(t) = \epsilon_0 \, \chi^{(2)} \, E(t)^2 \tag{B.1}$$

Cette polarisation $\mathcal{P}$ non linéaire génère alors un champ à de nouvelles fréquences, dont l'enveloppe lentement variable $\mathcal{A}$ s'écrit :

$$\frac{\partial \mathcal{A}}{\partial z} = \frac{i \, \omega}{2 \, n(\omega) \epsilon_0 c} \, \mathcal{P}(z, \omega) exp^{-i \, k(\omega) z} \tag{B.2}$$

B.1.1 Doublage de fréquences

Le doublage de fréquence à partir d'un champ monochromatique $E(t)$ de fréquence ω consiste en la génération d'un champ $E_2(t)$ de fréquence $\omega_2 = 2\omega$. En écrivant le champ $E(t)$ à l'aide de ses composantes complexes $\mathcal{E}(t)$ et $\mathcal{E}^*(t)$, on fait apparaître le terme de la polarisation linéaire $\mathcal{P}^{(2)}$ responsable du doublage de fréquence :

$$\mathcal{P}^{(2)} = \frac{\epsilon_0 \chi^{(2)}}{2} \mathcal{E}^2(t) \tag{B.3}$$

En déduisant de la relation ($B.2$) le champ $\mathcal{E}_2(t)$ et en exprimant les champs $\mathcal{E}(t)$ et $\mathcal{E}_2(t)$ à l'aide de leur enveloppe supposée lentement variable, on obtient l'équation différentielle suivante :

$$\frac{d\mathcal{A}_2}{dz} = \frac{i\omega_2 \chi^{(2)}}{4n_2 c} \mathcal{A}(z)^2 \, e^{i\Delta k z} \tag{B.4}$$

où $\Delta k = 2k - k_2$. Dans le cas où la génération de seconde harmonique est faible, le champ $\mathcal{E}$ peut être considéré d'amplitude constante lors de sa propagation dans le cristal, ainsi $\mathcal{A}(z) \approx \mathcal{A}$. L'équation (B.4) donne pour $\mathcal{A}_2$ la solution suivante :

$$\mathcal{A}_2(z) = \frac{i\omega_2 \chi^{(2)}}{4n_2 c} \mathcal{A}^2 \, \frac{e^{i\Delta k z} - 1}{i\Delta k} \tag{B.5}$$

B.1.2 Différence de fréquence et amplification paramétrique

Deux faisceaux $\mathcal{E}_1$ et $\mathcal{E}_2$ de fréquences ω_1 et ω_2 se propageant dans un cristal non-linéaire du second ordre génèrent une troisième onde $\mathcal{E}_3$ de fréquence ω_3 correspondant à une somme ou une différence de fréquence selon les conditions d'accord de phase du cristal. Dans le cas de la différence de fréquence, le processus est efficace lorsque $\Delta k = k_1 - k_2 - k_3 = 0$. Les processus de reconversion vers les fréquences ω_1 et ω_2 sont alors également possibles. Les polarisations non-linéaires $\mathcal{P}_1^{(2)}$, $\mathcal{P}_2^{(2)}$ et $\mathcal{P}_3^{(2)}$ qui génèrent les fréquences respectives ω_1, ω_2 et ω_3 s'écrivent :

$$\mathcal{P}_1^{(2)} = \epsilon_0 \chi^{(2)} \mathcal{E}_2 \mathcal{E}_3 = \epsilon_0 \chi^{(2)} \mathcal{A}_2 \mathcal{A}_3 e^{i(k_2+k_3)z} \tag{B.6}$$

$$\mathcal{P}_2^{(2)} = \epsilon_0 \chi^{(2)} \mathcal{E}_1 \mathcal{E}_3^* = \epsilon_0 \chi^{(2)} \mathcal{A}_1 \mathcal{A}_3^* e^{i(k_1-k_3)z} \tag{B.7}$$

$$\mathcal{P}_3^{(2)} = \epsilon_0 \chi^{(2)} \mathcal{E}_1 \mathcal{E}_2^* = \epsilon_0 \chi^{(2)} \mathcal{A}_1 \mathcal{A}_2^* e^{i(k_1-k_2)z} \tag{B.8}$$

En reliant ces polarisations au champs générés à l'aide de l'équation ($B.2$), le système suivant est obtenu :

$$\frac{d\mathcal{A}_1}{dz} = \frac{i\omega_1\,\chi^{(2)}}{2n_1c}\mathcal{A}_2\mathcal{A}_3\,e^{-i\Delta kz} \tag{B.9}$$

$$\frac{d\mathcal{A}_2}{dz} = \frac{i\omega_2\,\chi^{(2)}}{2n_2c}\mathcal{A}_1\mathcal{A}_3^*\,e^{i\Delta kz} \tag{B.10}$$

$$\frac{d\mathcal{A}_3}{dz} = \frac{i\omega_3\,\chi^{(2)}}{2n_3c}\mathcal{A}_1\mathcal{A}_2^*\,e^{i\Delta kz} \tag{B.11}$$

Dans le cas de l'amplification paramétrique, on n'injecte dans le cristal qu'un faisceau pompe et un faisceau signal, ainsi $\mathcal{A}_3(0) = 0$. De plus, le faisceau pompe $\mathcal{E}_1$ est très intense devant les faisceaux signal $\mathcal{E}_2$ et complémentaire $\mathcal{E}_3$ lors de toute la propagation dans le cristal. La déplétion du faisceau pompe peut être négligée et son intensité $\mathcal{A}_1(z)$ peut être considérée constante lors de la propagation : $\mathcal{A}_1(z) = \mathcal{A}_1$. Dans ce cas, les champs $\mathcal{A}_2(z)$ et $\mathcal{A}_3(z)$ obtenus s'écrivent :

$$\mathcal{A}_2(z) = \mathcal{A}_2(0)\,cosh(gz) \tag{B.12}$$

$$\mathcal{A}_3(z) = \sqrt{\frac{n_2\omega_3}{n_3\omega_2}}\mathcal{A}_2^*(0)\,sinh(gz) \tag{B.13}$$

où le gain $g = \frac{\chi^{(2)}}{2c}\sqrt{\frac{\omega_2\omega_3}{n_2n_3}}\,\mathcal{A}_1$.

Le faisceau pompe $\mathcal{E}_1$ amplifie le faisceau signal $\mathcal{E}_2$ et génère un faisceau complémentaire $\mathcal{E}_3$ centré autour de la fréquence ω_3 telle que $\omega_3 = \omega_1 - \omega_2$.

En sortie d'OPA, les faisceaux signal et complémentaire subissent une différence de fréquence pour générer le faisceau infrarouge. Dans le cas de la génération de l'infrarouge, on suppose que les champs signal $\mathcal{E}_1$ et complémentaire $\mathcal{E}_2$ ne sont pas atténués par leur propagation dans le cristal. La résolution de l'équation B.11 suffit alors à donner l'expression du champ infrarouge $\mathcal{E}_3$ produit sur une distance z :

$$\mathcal{A}_3(z) = \frac{i\omega_3\,\chi^{(2)}}{2n_3c}\mathcal{A}_1\mathcal{A}_2^*\,\frac{e^{i\Delta kz} - 1}{i\Delta k} \tag{B.14}$$

Cette équation est généralisée au cas d'impulsions brèves présentant un ensemble de fréquences dans le chapitre 3.

B.2 Effets non linéaires du troisième ordre

Un champ $E(t)$ se propageant dans un matériau transparent non linéaire de susceptibilité du troisième ordre $\chi^{(3)}$ donne lieu à une polarisation non linéaire $P^{(3)}(t)$ d'ordre 3 relié à $E(t)$ de la manière suivante :

$$P^{(3)}(t) = \epsilon_0 \, \chi^{(3)} \, E(t)^3 \tag{B.15}$$

B.2.1 Effet Kerr optique

L'effet Kerr optique est dû aux termes non linéaires du troisième ordre $\mathcal{E}^* \mathcal{E}^2$ et $\mathcal{E}^{*\,2} \mathcal{E}$. Ces termes sont responsables d'une polarisation non linéaire $\mathcal{P}^{(3)}$ de même phase que le champ électrique. L'accord de phase est donc automatiquement vérifié :

$$\mathcal{P}^{(3)} = \frac{3\epsilon_0 \, \chi^{(3)}}{4} \, |\, \mathcal{E}|^{\,2} \, \mathcal{E} \tag{B.16}$$

Toujours en utilisant la relation $(B.2)$, l'équation différentielle vérifiée par un champ monochromatique est obtenue :

$$\frac{d\mathcal{A}}{dz} = \frac{3i\omega \, \chi^{(3)}}{8nc} \, |\, \mathcal{A}|^{\,2} \, \mathcal{A} \tag{B.17}$$

Il est intéressant de remarquer en utilisant cette équation (B.17) que $\frac{d|\,\mathcal{A}|^2}{dz} = 0$: l'intensité du faisceau $I = 1/2\eta_0 \, |\, \mathcal{A}|^{\,2}$ reste constante. L'équation différentielle (B.17) admet donc la solution suivante :

$$\mathcal{A}(z) = \mathcal{A}(0) e^{i\varphi_{Kerr}(z)} \tag{B.18}$$

avec

$$\varphi_{Kerr}(z) = \frac{6\eta_0 \omega \chi^{(3)}}{8nc} \, Iz \tag{B.19}$$

Le champ $\mathcal{E}(z)$ se met alors sous la forme :

$$\mathcal{E}(z) = \mathcal{E}(0) exp\left(i \, \frac{\omega}{c} \, (n + n_2 I) \, z\right) \tag{B.20}$$

Le champ $\mathcal{E}(z)$ se propage dans un milieu dont l'indice de réfraction dépend de son intensité. Dans le domaine spatial, cet effet produit un phénomène d'autofocalisation. Une

impulsion de profil gaussien voit un indice plus élevé, et parcourt donc un chemin optique plus long, en son centre que sur ses bords. L'impulsion est donc focalisée comme elle le serait en traversant une lentille convergente.

Dans le domaine spectro-temporel, la dépendance de l'indice de réfraction en fonction de l'intensité du champ est à l'origine de la création de nouvelles fréquences. Ainsi, en notant $\Phi(z,t)$ la phase temporelle du champ $\mathcal{E}$ définie par la relation $\mathcal{E}(z,t) = |\mathcal{E}(z,t)|\, e^{i\,\Phi(z,t)}$ et en utilisant l'équation de propagation non-linéaire pour une impulsion brève de fréquence centrale ω_0, on obtient :

$$\Phi(z,t) = \frac{\omega_0}{c}\,(n + n_2 I)\, z - \omega_0 t \tag{B.21}$$

La fréquence instantanée est la suivante :

$$\omega(z,t) = -\frac{\partial \Phi}{\partial t} = \omega_0 \left(1 - \frac{n_2 z}{c}\frac{\partial I}{\partial t}\right) \tag{B.22}$$

Ce phénomène d'automodulation de phase induit dans le domaine spectral la création de nouvelles fréquences autour de ω_0. L'écart des nouvelles fréquences par rapport à la fréquence centrale ω_0 est proportionnel à la dérivée temporelle de l'intensité du champ. La création des nouvelles fréquences est accompagnée d'un glissement de fréquence : en effet, les fréquences plus faibles sont créées pendant le front montant de l'impulsion et les fréquences plus grandes pendant le front descendant.

B.2.2 Effet Kerr croisé

Dans le cas de deux faisceaux incidents non colinéaires, le faisceau sonde $\mathcal{E}_S$ et le faisceau pompe $\mathcal{E}_P$ d'une expérience pompe sonde, un terme du troisième ordre du type $\mathcal{E}_P \mathcal{E}_P^* \mathcal{E}_S$ se propage dans la direction du faisceau sonde. La polarisation induite par ce terme s'écrit :

$$\mathcal{P}^{(3)} = \frac{6\epsilon_0\, \chi^{(3)}}{4}\, |\, \mathcal{E}_P|^{\,2}\, \mathcal{E}_S \tag{B.23}$$

Cette relation est similaire à l'équation B.16 qui exprime la polarisation induite par effet Kerr optique dans le cas d'un seul faisceau incident. On peut alors calculer de la même manière la phase $\Phi(z,t)$ du champ $\mathcal{E}_S$:

$$\Phi(z,t) = \frac{\omega_0}{c}\,(n + 2n_2 I_P)\,z - \omega_0 t \tag{B.24}$$

Le faisceau sonde subit un déphasage proportionnel à l'intensité de la pompe. La fréquence instantanée qui résulte de ce phénomène s'écrit alors :

$$\omega(z,t) = \omega_0 \left(1 - \frac{2n_2 z}{c}\,\frac{\partial I_P(t-\tau)}{\partial t}\right) \tag{B.25}$$

où τ est le délai pompe-sonde.

De même qu'à la partie B.2.1, le faisceau sonde est soumis à une focalisation dans le domaine spatial et à la création de nouvelles fréquences dans le domaine spectro-temporel, ces phénomènes n'étant pas induits par sa propre intensité, mais par l'intensité du faisceau pompe de puissance plus élevée. L'écart des nouvelles fréquences générées par rapport à la fréquence centrale est proportionnel à la dérivée temporelle de l'intensité du faisceau pompe. Des fréquences sonde plus faibles sont donc générées pour des délais pompe-sonde tels que la sonde se superpose au front montant de l'impulsion pompe et des fréquences plus grandes pour des délais pompe-sonde tels que la sonde se superpose au front descendant.

Bibliographie

[1] R. B. Dyer, K.A. Peterson, P.O. Stoutland, W.H. Woodruff, *Ultrafast Photoinduced Ligand Transfer in Carbonmonoxy Cytochrome c Oxidase. Observation by Picosecond Infrared Spectroscopy*, J. Am. Chem. Soc. **113**, 6276 (1991).

[2] R. B. Dyer, K. A. Peterson, P. O. Stoutland, W. H. Woodruff, *Picosecond Infrared Study of the Photodynamics of Carbonmonoxy-Cytochrome c Oxidase*, Biochemistry **33**, 500 (1994).

[3] U. Liebl, G. Lipowski, M. Négrerie, J.-C. Lambry, J.-L. Martin, M. H. Vos, *Coherent reaction dynamics in a bacterial cytochrome c oxidase*, Nature **40**, 181 (1999).

[4] M. Saraste, *Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle*, Science **283**, 1488 (1999).

[5] H. Wang, G. Oster, *Energy transduction in the F_1 motor of ATP synthase*, Nature **396**, 279 (1998).

[6] B. Ludwig, G. Schatz, *A two-subunit cytochrome c oxidase (cytochrome aa_3) from Paracoccus denitrificans*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 196 (1980).

[7] T. Haltia, A. Puustinen, M. Finel, *The Paracoccus denitrificans cytochrome aa_3 has a third subunit*, Eur. J. Biochem. **172**, 543 (1988).

[8] S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig, H. Michel, *Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans*, Nature **376**, 660 (1995).

[9] C. Ostermeier, A. Harrenga, U. Ermler, H. Michel, *Structure at 2.7 Å resolution of the Paracoccus denitrificans two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 10547 (1997).

[10] T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, *Structure of metal sites of oxidised cytochrome c oxidase at 2.8 Å* , Science **269**, 1069 (1995).

[11] T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, *The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å* , Science **272**, 1136 (1996).

[12] S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. J. Fie, C. P. Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki, T. Tsukihara, *Redox-Coupled Crystal Structural Changes in Bovine Heart Cytochrome c Oxidase*, Science **280**, 1723 (1998).

[13] T. Soulimane, G. Buse, G.P. Bourenkov, H.D. Bartunik, R. Huber, M.E. Than, *Structure and mecanism of the aberrant ba_3 Cytochrome c oxidase from Thermus thermophilus*, EMBO J. **19**, 1766 (2000).

[14] M. Svensson-Ek, J. Abramson, G. Larsson, S. Törnroth, P. Brzezinski, S. Iwata, *The X-ray crystal structure of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome c oxidase from Rhodobacter sphaeroides*, J. Mol. Biol. **321**, 329 (2002).

[15] J. Napiwotzki, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, B. Kadenbach, *ATP and ADP bind to cytochrome c oxidase and regulate its activity*, Biol. Chem. **378**, 1013 (1997).

[16] L. Sryer, *Biochemistry Fourth Edition*, W.H. Freeman and Company, New York (1995).

[17] M.I. Verkhovsky, J.E. Morgan, M. Wikström, *Oxygen binding and activation : early steps in the reaction of oxygen with cytochrome c oxidase*, Biochemistry **33**, 3079 (1994).

[18] O. Einarsdottir, *Fast reactions of cytochrome oxidase*, BBA **1229**, 129 (1994).

[19] E. Pilet, A. Jasaitis, U. Liebl, M. H. Vos, *Electron transfer between hemes in mammalian cytochrome c oxidase*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**, 16198 (2004).

[20] Q. H. Gibson, C. Greenwood, *Reactions of Cytochrome Oxidase with Oxygen and Carbon Monoxide*, Biochem. J. **86**, 541 (1963).

[21] D.A. Proshlyakov, M. A. Pressler, G. T. Babcock, *Dioxygen activation and bond cleavage by mixed-valence cytochrome c oxidase*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 8020 (1998).

[22] S. Han, S. Takashi, D. L. Rousseau, *Time dependence of the catalytic intermediates in Cytochrome c Oxidase*, J. Biol. Chem. **275**, 1910 (2000).

[23] O.-M. H. Richter, B. Ludwig, *Cytochrome c oxidase - structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine*, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol **147**, 47 (2003).

[24] M. Brunori, A. Giuffrè, P. Sarti, *Cytochrome c oxidase, ligands and electrons*, J. Inorg. Biochem. **99**, 324 (2005).

[25] M. I. Verkhovsky, A. Jasaitis, M. L. Verkhovskaya, J. E. Morgan , M. Wikström, *Proton translocation by cytochrome c oxidase*, Nature **400**, 480 (1999).

[26] D. Bloch, I. Belevich, A. Jasaitis, C. Ribacka, A. Puustinen, M. I. Verkhovsky, M. Wikström, *The catalytic cycle of cytochrome c oxidase is not the sum of its two halves*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**, 529 (2004).

[27] N. Van Eps, I. Szundi, O. Einarsdottir, *A new approach to study fast biological reactions involving dioxygen : the reaction of fully reduced cytochrome c oxidase with O_2*, Biochemistry **39**, 14576 (2000).

[28] J.O. Alben, P.P. Moh, F.G. Fiamingo, R.A. Altschuld, *Cytochrome oxidase (a_3) heme and copper observed by low-temperature Fourier transform infrared spectroscopy of the CO complex*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 234 (1981).

[29] R. B. Dyer, O. Einarsdottir, P. M. Killough, J.J. Lopez-Garriga, W.H. Woodruff, *Transient of Photodissociated CO to Cu_B^+ of Eukaryotic Cytochrome Oxidase at Ambiant Temperature. Direct Evidence from Time-Resolved Infrared Spectroscopy*, J. Am. Chem. Soc. **111**, 7657 (1989).

[30] P.O. Stoutland, J.-C. Lambry, J.-L. Martin, W.H. Woodruff, *Femtosecond Dynamics of Reduced Cytochrome Oxidase and Its CO Derivative*, J. Phys. Chem. **95**, 6406 (1991).

[31] K.E. Georgiadis, N.-I. Jhon, O. Einarsdottir, *Time-Resolved Optical Absorption Studies of Intramolecular Electron Transfer in Cytochrome c Oxidase*, Biochemistry **33**, 9245 (1994).

[32] O. Einarsdottir, R. B. Dyer, D.D. Lemon, P. M. Killough, S.M. Hubig, S.J. Atherton, J.J. Lopez-Garriga, G. Palmer, W.H. Woodruff, *Photodissociation and Recombination of Carbonmonoxy Cytochrome Oxidase : Dynamics from Picosecons to Kilosecons*, Biochem. **32**, 12013 (1993).

[33] P. Sarti, A. Giuffré, M.C. Barone, E. Forte, D. Mastonicola, M. Brunori, *Nitric oxide and cytochrome oxidase : reaction mechanisms from the enzyme to the cell*, Free Radic. Biol. Med. **34**, 509 (2003).

[34] R.S. Blackmore, C. Greenwood, Q.H. Gibson, *Studies of the Primary Oxygen Intermediate in the Reaction of Fully Reduced Cytochrome Oxidase*, J. Biol. Chem. **266**, 19245 (1991).

[35] J. A. Bailey, C. A. James, W. H. Woodruff, *Flow-Flash Kinetics of O_2 Binding to Cytochrome c Oxidase at Elevated [O_2] : Observations Using High-Pressure Stopped-Flow for Gaseous Reactants*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **220**, 1055 (1996).

[36] M. Gouterman, *The Porphyrins Vol III, Physical Chemistry Part A.*, D. Dolphin (Academic Press, New York, 1978).

[37] W.A. Eaton, J. Hofrichter, *Polarised Absorption and linear Dichroism Spectroscopy of Hemoglobin*, Methods in enzymology vol. 76 pp 175-261 (E. Antonini, L. Rossi-Bernardi, E. Chiancone, Academic Press, New York, 1981).

[38] B.D. Dunietz, A. Dreuw, M. Head-Gordon, *Initial steps of the Photodissociation of the CO Ligated Heme Group*, J. Phys. Chem. B **107**, 5623 (2003).

[39] J.L. Martin, A. Migus, C. Poyart, Y. Lecarpentier, R. Astier, A. Antonetti, *Femtosecond photolysis of CO-ligated protoheme and hemoproteins : Appearance of deoxy species with a 350-fsec time constant*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 173 (1983).

[40] J. W. Petrich, C. Poyart, J. L. Martin, *Photophysics and Reactivity of Heme Proteins : A Femtosecond Absorption Study of Hemoglobin, Myoglobin, and Protoheme*, Biochem. **27**, 4049 (1988).

[41] M. Joffre, *Optique non-linéaire du continu au régime femtoseconde*, http ://www.enseignement.polytechnique.fr/profs/physique/Manuel.Joffre/dea/index.htm, Master de Physique Quantique (2005).

[42] T. Polack, *Spectroscopie infrarouge impulsionnelle appliquée au transfert de ligands dans les hémoprotéines*, Thèse de doctorat, Ecole Polytechnique (2003).

[43] T. Polack, J. P. Ogilvie, S. Franzen, M. H. Vos, M. Joffre, J.-L. Martin, A. Alexandrou, *CO Vibration as a Probe of Ligand Dissociation and Transfer in Myoglobin*, Phys. Rev. Lett. **93**, 018102 (2004).

[44] T. Bücher, J. Kaspers, *Photochemische spaltung des kohlenoxydmyoglobins durch ultraviolette strahlung (wirksamkeit der durch die proteinkomponente des pigments absorbierten quanten)*, Biochem. Biophys. Acta **1**, 21 (1947).

[45] W.A. Saffran, Q.H. Gibson, *Photodissociation of Ligands from Heme and Heme Proteins*, J. Biol. Chem. **252**, 7955 (1977).

[46] M. Joffre, D. Hulin, A. Migus, A. Antonetti, C. Benoit à la Guillaume, N. Peyghambarian, M. Lindberg, S. W. Koch, *Coherent effects in pump-probe spectroscopy of excitons*, Opt. Lett **13**, 276 (1988).

[47] M. Joffre, *Comment on "Coherent Nonlinear Optical Response of Single Quantum Dots Studied by Ultrafast Near-Field Spectroscopy"*, Phys. Rev. Lett. **90**, 139701 (2003).

[48] T.B. Norris, *Femtosecond pulse amplification at 250 kHz with a Ti :sapphire regenerative amplifier and application to continuum generation*, Opt. Lett. **17**, 1009 (1992).

[49] M.K. Reed, M.K.S. Shepard, *Tunable Infrared Generation Using a femtosecond 250 kHz Ti :Sapphire Regenerative Amplifier*, IEEE J. Quant. Elec. **32**, 1273 (1996).

[50] K. J. Kubarych, M. Joffre, A. Moore, N. Belabas, D. M. Jonas, *Mid-infrared electric field characterization using a visible charge-coupled-device-based spectrometer*, Opt. Lett **30**, 1228 (2005).

[51] N. Belabas, *Spectroscopie femtoseconde coherente bidimentionnelle dans l'infrarouge*, Thèse de doctorat, Ecole Polytechnique (2002).

[52] C. Iaconis, I.A. Walmsley *Spectral phase interferometry for direct electric-field reconstruction of ultrashort optical pulses*, Opt. Lett **23**, 792 (1998).

[53] P. Baum, S. Lochbrunner, *Zero-additional-phase SPIDER : full characterization of visible and sub-20-fs ultraviolet pulses*, Opt. Lett. **29**, 210 (2004).

[54] L. Lepetit, G. Chériaux, M. Joffre, *Linear techniques of phase measurement by femtosecond spectral interferometry for applications in spectroscopy*, J. Opt. Soc. Am. B **12**, 2467 (1995).

[55] Van Buuren K., *Binding of cyanide to cytochrome* aa_3, Thèse de doctorat, Université d'Amsterdam (1972).

[56] E. Pilet, *Purification et caractérisation spectroscopique de cytochrome c oxydases*, Thèse de doctorat, Ecole Polytechnique (2004).

[57] T. Lian, B. Locke, Y. Kholodenko, R. M. Hochstrasser, *Energy Flow from Solute to Solvent Probed by Femtosecond IR Spectroscopy : Malachite Green and Heme Protein Solutions*, J. Phys. Chem. **98**, 11648 (1994).

[58] T. Lian, Y. Kholodenko, B. Locke, R. M. Hochstrasser, *Third-Order Nonlinearities Studied by Femtosecond Infrared Methods*, J. Phys. Chem. **99**, 7272 (1995).

[59] M. Lim, T. A. Jackson, P. A. Anfinrud, *Femtosecond Near-IR Absorbance Study of Photoexcited Myoglobin : Dynamics of Electronic and Thermal Relaxation*, J. Phys. Chem. **100**, 12043 (1996).

[60] S. Franzen, L. Kiger, C. Poyart, J.-L. Martin, *Heme Photolysis Occurs by Ultrafast Excited State Metal-to-Ring Charge Transfer*, Biophys. J. **80**, 2372 (2001).

[61] M. Negrerie, S. Cianetti, M. H. Vos, J.-L. Martin, S. G. Kruglik, *Photoinduced coordination dynamics of cytochrome c : ferrous versus ferric species studied by time-resolved resonance Raman and transient absorption spectroscopies*, J. Phys. Chem. B. **110**, 12766 (2006).

[62] M. Lim, T. A. Jackson, P. A. Anfinrud, *Binding of CO to Myoglobin from a Heme Pocket Docking Site to Form Nearly Linear Fe-C-O*, Science **269**, 962 (1995).

[63] M. Lim, T. A. Jackson, P. A. Anfinrud, *Ultrafast rotation and trapping of carbon monoxide dissociated from myoglobin*, Nature Struct. Biol. **4**, 209 (1997).

[64] M. Lim, T.A. Jackson, P.A. Anfinrud, *Orientational Distribution of CO before and after Photolysis of MbCO and HbCO : A Determination Using Time-Resolved Polarised Mid-IR Spectroscopy*, J. Am. Chem. Soc. **126**, 7946 (2004).

[65] T. Polack, *A filtering procedure for systematic removal of pump-pertured polarization artifacts*, Opt. Exp. **14**, 5823 (2006).

[66] J.-C. Lambry, *Approches expérimentales et théoriques de la dynamique fonctionnelle de la myoglobine et de l'hémoglobine : spectroscopie femtoseconde et simulation de la dynamique moléculaire.*, Thèse de doctorat, Université Paris XI Orsay (1997).

[67] J.-C. Lambry, M. H. Vos, J.-L. Martin, *Molecular Dynamics Simulations of Carbon Monoxide Dissociation from Heme a_3 in cytochrome c oxidase from Paracoccus Denitrificans*, J. Phys. Chem. A **103**, 10132 (1999).

[68] H.Li, R. Elbert, J.E. Staub, *Molecular Dynamics Simulation of NO Recombination to Myoglobin Mutants*, J. Biol. Chem. **268**, 17908 (1993).

[69] S. Imai,K. Fujisawa, T. Kobayashi, N. Shirasawa, H. Fujii, T. Yoshimura, N. Kitajima, Y. Moro-oka, *^{63}Cu NMR Study of Copper(I) Carbonyl Complexes with Various Hydrotris(pyrazolyl)borates : Correlation between ^{63}Cu Chemical Shifts and CO Stretching Vibrations*, Inorg. Chem. **37**, 3066 (1998).

[70] M. Hakansson, S. Jagner, *Preparation and Structural Characterization of Cu(C0)CI*, Inorg. Chem. **29**, 5241 (1990).

[71] A. Jasaitis, F. Rappaport, E. Pilet, U. Liebl, M. H. Vos, *Activationless electron transfer through the hydrophobic core of cytochrome c oxidase*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**, 10882 (2005).

[72] S. Franzen, *Spin-dependent mecanism for diatomic ligand binding to heme*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 16754 (2001).

[73] L.J.G.W. van Wilderen, M.A. van der Horst, I.H.M. van Stokkum, K.J. Hellingwerf, R. van Grondelle, M.L. Groot, *Ultrafast infrared spectroscopy reveals a key step for successful entry into the photocycle for photoactive yellow protein*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**, 15050 (2006).

[74] C. Ventalon, J. M. Fraser, M. H. Vos, A. Alexandrou, J.-L. Martin, M. Joffre, *Coherent vibrational climbing in carboxyhemoglobin*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**, 13216 (2004).

[75] I.V. Rubtsov, J. Wang, R.M. Hochstrasser, *Dual-frequency 2D-IR spectroscopy heterodyned photon echo of the peptide bond*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**, 5601 (2003).

[76] N. Belabas, M. Joffre, *Visible-infrared two-dimensional Fourier-transform spectroscopy*, Opt. Lett. **27**, 2043 (2002).

Ligand transfer in cytochrome *c* oxidase observed with spectrally integrated and spectrally resolved infrared femtosecond experiments

Dynamic experiments on hemoproteins, in particuliar spectroscopy experiments, are essential to understand how these proteins accomplish their function. In this context, we have employed infrared femtosecond spectroscopy in order to study the transfer of carbon monoxide in cytochrome *c* oxidase, from the iron to the copper atom of its bimetallic active site. Infrared experiments are sensitive to the CO vibrational frequency changes and enable us to follow directly the dynamics of the CO transfer. This transfer from the iron to the copper atom takes place on a subpicosecond scale, this is why femtosecond resolution is needed.

We developped two infrared femtosecond experiments : a spectrally integrated experiment and a spectrally resolved experiment. In the spectrally integrated experiment, we identified a signal due to the heme absorption. This signal was subtracted from the cinetics in order to extract the signal induced by the CO transfer. A caracteristic time of 400 fs was determined for this transfer. In the spectrally resolved experiment, we observed the evolution of the absorption bands of CO. This evolution shows a delay of 200 fs suggesting a ballistic contribution in the CO transfer.

The spectrally resolved experiment uses a new technique recently developped in the laboratory for the characterization of the infrared pulse through upconversion. The signal-to-noise ratio and the resolution accessible with this technique enable the acquisition of an ensemble of differential spectra that is sufficient to validate a new filtering procedure for systematic removal of oscillations due to the pump-perturbed polarization artifacts.

Molecular dynamic simulations were performed to model the transfer of CO in cytochrome *c* oxidase, from the iron to the copper atom of its bimetallic site. These simulations are in good agreement with the experimental results and show that the path from the iron to the copper atom is reproducible. This corroborates the presence of a ballistic component in the transfer.

Keywords

hemoprotein
ligand
cytochrome *c* oxidase
infrared femtosecond experiments
coherent oscillations
molecular dynamics

Transfert de ligand dans la cytochrome *c* oxydase observé par des expériences femtosecondes infrarouge intégrées et résolues spectralement

L'étude dynamique des hémoprotéines, indispensable à la compréhension du fonctionnement de leur site actif, a considérablement progressé grâce aux expériences de spectroscopie. Nous avons étudié dans ce cadre le transfert du ligand CO au sein du site actif bimétallique de la cytochrome *c* oxydase, du Fer de l'hème à l'atome de Cuivre, par spectroscopie femtoseconde infrarouge. Les expériences dans l'infrarouge permettent d'analyser les caractéristiques vibrationnelles des molécules et de suivre ainsi directement le transfert du ligand par l'intermédiaire de sa signature vibrationnelle. Afin de résoudre le transfert étudié, qui se produit sur une échelle subpicoseconde, l'expérience doit avoir une résolution femtoseconde.

Deux expériences pompe-sonde femtoseconde dans le domaine infrarouge, une expérience intégrée spectralement et une expérience résolue spectralement, ont été mises en place. Ces deux expériences ont apporté des informations complémentaires sur le transfert du ligand CO au sein du site actif de la cytochrome *c* oxydase. Dans le cas de l'expérience intégrée spectralement, un signal supplémentaire dû à l'absorption des molécules d'hème a été identifié et soustrait aux cinétiques afin d'isoler le signal induit par le transfert du CO. Le temps caractéristique de ce transfert a ainsi pu être évalué à 400 fs. Lors de l'expérience résolue spectralement, l'évolution des raies d'absorption du CO présente un décalage de 200 fs qui suggère une composante balistique dans le transfert.

L'expérience résolue spectralement a été réalisée à l'aide d'une nouvelle technique de mesure du spectre infrarouge par conversion vers le visible, développée au laboratoire. Cette technique, qui offre un meilleur rapport signal sur bruit et une meilleure résolution que les approches concurrentes, a permis d'acquérir un ensemble de spectres différentiels suffisant pour valider expérimentalement une nouvelle technique de filtrage des oscillations de cohérence.

Nous avons réalisé des simulations de dynamique moléculaire qui modélisent le transfert du ligand CO dans la cytochrome *c* oxydase, du Fer de l'hème vers l'atome de Cuivre. Ces simulations sont en bon accord avec les résultats expérimentaux et ont montré que le trajet emprunté par le CO lors de son transfert est reproductible, ce qui corrobore un transfert balistique.

Mots clés

hémoprotéine
ligand
cytochrome *c* oxydase
spectroscopie femtoseconde infrarouge
oscillations de cohérence
dynamique moléculaire