



**HAL**  
open science

# Polarisation ultrarapide et mouvements vibrationnels dans la bactériorhodopsine étudiés par spectroscopie cohérente d'émission infrarouge.

Anne Colonna

► **To cite this version:**

Anne Colonna. Polarisation ultrarapide et mouvements vibrationnels dans la bactériorhodopsine étudiés par spectroscopie cohérente d'émission infrarouge.. Biophysique [physics.bio-ph]. Ecole Polytechnique X, 2005. Français. NNT : . pastel-00001534

**HAL Id: pastel-00001534**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00001534>**

Submitted on 28 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.

# Thèse de doctorat de l'Ecole Polytechnique

Spécialité :

Biophysique

présentée

par

**Anne Colonna**

pour obtenir le titre de Docteur de l'Ecole Polytechnique

Sujet :

## **Polarisation ultrarapide et mouvements vibrationnels dans la bactériorhodopsine étudiés par spectroscopie cohérente d'émission infrarouge**

soutenue le 19 Septembre 2005 devant le jury composé de

M.	Guy Buntinx	Rapporteur
Mme	Marie-Louise Groot	
M.	Stefan Haacke	Rapporteur
M.	Jean-Louis Martin	
M.	François Salin	
M.	Marten Vos	Directeur de Thèse



# Remerciements

*Ce travail a été effectué au Laboratoire d'Optique et Biosciences à l'Ecole Polytechnique. Je remercie vivement Jean-Louis Martin de m'avoir accueillie dans son laboratoire où il m'a permis de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions, en me faisant profiter à la fois de ses qualités humaines et de son expertise dans le domaine.*

*Merci à Guy Buntinx, Marie-Louise Groot, Stefan Haacke, Jean-Louis Martin et François Salin de m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse, et pour l'intérêt qu'ils ont manifesté lors de la soutenance. Merci à François Salin d'avoir de surcroît accepté de présider ce jury. Je suis très reconnaissante aux rapporteurs, Guy Buntinx et Stefan Haacke, pour leurs précieux conseils.*

*Ce travail ne serait rien sans mon directeur de thèse, Marten Vos, grâce à ses immenses qualités scientifiques, sa qualité d'écoute, son enthousiasme, sa patience sans fin...et tant d'autres qualités ! Je te remercie d'avoir été si disponible pendant ces trois années et d'avoir guidé ce travail avec tant de dynamisme. J'ai beaucoup appris en travaillant à tes côtés, mille fois merci !*

*Je remercie vivement Jean-Christophe Lambry, qui a permis à ce travail de porter ses fruits. Merci pour tes conseils avisés, ton aisance expérimentale impressionnante mais également pour ta gentillesse et ta patience. J'ai également usé (et abusé) de l'aide et du savoir inépuisable de Manuel Joffre, qui a très largement contribué au bon déroulement de cette thèse. Je suis très reconnaissante à François Hache pour ses nombreuses explications (utiles jusqu'à la dernière minute !) et à Ursula Liebl pour avoir guidé mes pas dans le dur monde de la biologie.*

*Many thanks to Géza Groma, who learned me how to "face" bacteriorhodopsin, and for all his calculations and advices on the experimental results. I have really appreciated that he and György Váró invited me in their lab in Hungary, and thank them for their help and kindness during this journey.*

*Merci à l'ensemble de l'équipe technique pour son efficacité, sa gentillesse et son incroyable disponibilité, que ce soit Xavier Solinas pour l'électronique, André Campos pour l'informatique, Marcel Bierry et Jean-Marc Sintès pour la mécanique ou Claude Hamel pour l'optique. Un grand merci également à Christelle Français, Laure Lachapelle et Françoise Pétrequin pour leur gestion remarquablement efficace du secrétariat.*

*Thank you to Professor T. Kobayashi and to his group for the time I have spent with them at Tokyo University.*

*J'ai été très heureuse de travailler dans ce laboratoire si accueillant, grâce à l'ensemble des membres du laboratoire, actuels et anciens, à leur soutien, scientifique ou non, et à leur bonne humeur. Merci donc à Antigoni Alexandrou, Wafa Amir, Emmanuel Beaurepaire, Adeline Bonvalet, Thierry Boulesteix, Latifa Bouzhir, Didier Casanova, Simona Cianetti, Adeline Darmon, Thibault Dartigalongue, Delphine Debarre, Frédéric Escartin, Guilhem Gallot, Clément Gautier, Sébastien Graziani, François Hache, Monica Hernest, Audrius Jasaitis, Manuel Joffre, Sergei Krüglík, Kevin Kubarych, Isabelle Lamarre, Jean-Christophe Lambry, Ursula Liebl, Gérard Lipowski, Andras Lukacs, Jean-Louis Martin, Jean-Baptiste Masson, Michel Négrerie, Claire Niezborala, Jennifer Ogilvie, Ana-Maria Pena, Eric Pilet, Martin-Pierre Sauviat, Marie-Claire Schanne-Klein, Anny Slama-Schwok, Andreea Sodolescu, Mathias Strupler, Willy Supatto, Johanne Treuffet, Cathie Ventalon.*

*Merci à Jennifer pour les nombreuses répétitions en anglais, à Sergei pour son aide et ses conseils expérimentaux, à Thibault pour les discussions et conseils avant chaque présentation et encore merci à Adeline pour son précieux manuscrit de thèse et ses nombreuses explications ! Merci à Eric, Gérard et Latifa, équipe de soutien en biologie remarquablement efficace et disponible ! Un clin d'œil spécial à mes "compagnons de sortie" les plus assidus, Blandine et Thierry, Clément, Delphine, Eric, Simona, Thibault et Wafa.*

*Un grand merci à mes parents et beaux-parents pour leur soutien, à Vincent et Florence pour l'organisation du pot (et d'avoir été si compréhensifs le week-end précédant la soutenance...), à Jean pour ses nombreux conseils et sa présence, à JB pour m'avoir accompagnée pendant ces trois années, et enfin à Kahina et Eric pour m'avoir soutenue pendant la dure période de la rédaction en me fournissant la matériel nécessaire à son bon déroulement...*

# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1 Les protéines à rétinol</b>	<b>3</b>
1.1 Les protéines impliquées dans le transport transmembranaire . . . . .	3
1.2 La famille des rhodopsines . . . . .	5
1.2.1 Les photorécepteurs visuels . . . . .	5
1.2.2 Les protéines de la bactérie <i>Halobacterium salinarium</i> . . . . .	7
1.3 La bactériorhodopsine . . . . .	9
1.3.1 Structure . . . . .	9
1.3.2 Le photocycle . . . . .	9
1.3.3 Les photoproduits . . . . .	11
1.3.4 Pourquoi étudier la bactériorhodopsine ? . . . . .	13
1.4 Controverse : quel est le premier processus photoinduit ? . . . . .	14
<b>2 Spectroscopie cohérente d'émission infrarouge</b>	<b>21</b>
2.1 Etude de mouvements de charges . . . . .	21
2.1.1 Etude de la séparation de charges . . . . .	22
2.1.1.1 Non linéarité du deuxième ordre et déplacement de charges . . . . .	22
2.1.1.2 Couplage électron-vibration . . . . .	23
2.2 Interaction laser-matière . . . . .	25
2.2.1 Représentation classique du champ exciteur et passage en notations complexes . . . . .	25
2.2.2 Modèle de l'oscillateur anharmonique à une dimension . . . . .	26
2.2.3 Calcul de la polarisation induite . . . . .	29
2.3 Source infrarouge femtoseconde par redressement optique . . . . .	32
2.3.1 Impulsion électromagnétique générée par variation rapide de la polarisation	32
2.3.2 Caractéristiques du champ rayonné associé à la polarisation induite . . . . .	33
2.3.2.1 Milieu plan infiniment mince . . . . .	35
2.3.2.2 Propagation dans un milieu épais . . . . .	38
2.3.3 Matériaux utilisés pour la génération d'infrarouge . . . . .	44

2.4	Détection interférométrique de l'émission infrarouge . . . . .	45
2.4.1	Méthode de détection du champ émis . . . . .	45
2.4.1.1	Détection électro-optique . . . . .	45
2.4.1.2	Interférométrie infrarouge/infrarouge . . . . .	45
2.4.2	Montage expérimental . . . . .	47
2.4.2.1	Oscillateur Titane-Saphir . . . . .	48
2.4.2.2	L'amplificateur . . . . .	51
2.4.2.3	L'oscillateur paramétrique optique non colinéaire (NOPA) . . . . .	51
2.4.2.4	Spectromètre infrarouge . . . . .	55
2.5	Génération d'infrarouge dans des cristaux non linéaires . . . . .	59
2.5.1	Source infrarouge à base de GaAs . . . . .	59
2.5.2	Source infrarouge à base d'AgGaS <sub>2</sub> . . . . .	60
2.5.2.1	Caractéristiques du champ infrarouge émis . . . . .	60
2.5.2.2	Mesure de la durée des impulsions visibles . . . . .	62
2.5.3	Résolution du système . . . . .	63
2.5.3.1	Limite par le générateur infrarouge . . . . .	63
2.5.3.2	Limite par l'interféromètre . . . . .	64
<b>3</b>	<b>Préparation et comparaison des échantillons</b>	<b>65</b>
3.1	Obtention de bactériorhodopsine . . . . .	67
3.1.1	Culture de la bactérie <i>Halobacterium salinarium</i> et isolement des membranes pourpres . . . . .	67
3.1.2	Spectres d'absorption caractéristiques . . . . .	68
3.2	Préparation des échantillons . . . . .	69
3.2.1	Echantillons orientés . . . . .	69
3.2.1.1	Déposition par électrophorèse . . . . .	69
3.2.1.2	Modification du photocycle avec l'humidité . . . . .	71
3.2.2	Echantillons à pH acide . . . . .	72
3.2.2.1	Principe de l'acidification . . . . .	72
3.2.2.2	Influence de l'environnement du rétinol sur les spectres d'absorption et le photocycle . . . . .	73
3.3	Comparaison des premiers photoproduits . . . . .	75
3.3.1	Expérience pompe-sonde . . . . .	75
3.3.1.1	Principe . . . . .	75
3.3.1.2	Description du montage expérimental . . . . .	76
3.3.1.3	Acquisition du signal . . . . .	77
3.3.1.4	Ajustement des données cinétiques . . . . .	77
3.3.2	Résultats sur l'échantillon liquide, adapté à la lumière, entraîné en mouvement . . . . .	78

3.3.2.1	Evolution de l'absorption transitoire . . . . .	78
3.3.2.2	Données cinétiques . . . . .	79
3.3.3	Résultats sur l'échantillon sec . . . . .	80
3.3.4	Contribution de la forme 13- <i>cis</i> du rétinol . . . . .	82
3.3.4.1	Variation des spectres d'absorption transitoire avec l'intensité excitatrice . . . . .	82
3.3.4.2	Variation des données cinétiques avec l'intensité excitatrice . . .	84
3.3.4.3	Pourcentage de forme 13- <i>cis</i> du rétinol à l'arrivée du faisceau pompe . . . . .	85
3.3.4.4	Obtention du spectre d'absorption transitoire de la forme 13- <i>cis</i> du rétinol . . . . .	87
3.3.5	Modification du pH . . . . .	88
3.3.5.1	Etude des échantillons déposés dans des gels . . . . .	88
3.3.5.2	Effet d'une diminution du pH . . . . .	89
3.3.6	Etude de l'influence de l'humidité sur le rendement quantique de la pho- toisomérisation . . . . .	92
3.3.6.1	Méthode de calcul . . . . .	92
3.3.6.2	Résultats . . . . .	93
3.3.7	Conclusions . . . . .	94
<b>4</b>	<b>Emission infrarouge et transfert de charges dans la bactériorhodopsine</b>	<b>95</b>
4.1	Allure des signaux émis par la bactériorhodopsine . . . . .	96
4.2	Réponse électronique : redressement optique dans la bactériorhodopsine . . . . .	98
4.2.1	Caractérisation de l'émission . . . . .	98
4.2.1.1	Vérification de la non linéarité du second ordre du signal . . . . .	98
4.2.2	Modèle du redressement optique dans la bactériorhodopsine : théorie et simulations . . . . .	105
4.2.2.1	Approche semi-classique des interactions laser/matière . . . . .	105
4.2.2.2	Calcul de la polarisation induite . . . . .	109
4.2.2.3	Simulation de la polarisation pour différents paramètres . . . . .	113
4.2.3	Mesure du changement dipolaire suite à une excitation lumineuse . . . . .	118
4.2.4	Conséquence sur les premiers processus photoinduits dans bR ? . . . . .	121
4.3	Etude de la réponse vibrationnelle . . . . .	123
4.3.1	Théorie . . . . .	123
4.3.1.1	Oscillation de paquets d'ondes vibrationnels . . . . .	123
4.3.1.2	Analogie avec un phénomène de différence de fréquences . . . . .	124
4.3.2	Analyse des données expérimentales . . . . .	125
4.3.2.1	Spectre de la partie vibrationnelle . . . . .	126
4.3.2.2	Spectrogramme . . . . .	128

4.3.2.3	Modèle d'analyse cinétique . . . . .	133
4.3.2.4	Résultats des ajustements . . . . .	135
<b>Conclusion et perspectives...</b>		<b>143</b>
<b>A Annexe A, Notations et conventions utilisées</b>		<b>147</b>
A.1	Transformée de Fourier . . . . .	147
A.1.1	Définitions . . . . .	147
A.1.2	Analyse par transformée de Fourier à fenêtre glissante . . . . .	148
A.2	Grandeurs physiques . . . . .	150
A.3	Abréviations biologiques . . . . .	151
<b>B Annexe B, Modèle d'une antenne dipolaire</b>		<b>153</b>
<b>C Annexe C, Protocoles</b>		<b>157</b>
C.1	Culture des bactéries <i>Halobacterium salinarium</i> et purification des membranes pourpres . . . . .	157
C.2	Echantillons déposés dans des gels d'acrylamide . . . . .	158
<b>D Annexe D, Applications biotechnologiques de la bactériorhodopsine</b>		<b>159</b>
D.1	Protection de papiers officiels . . . . .	159
D.2	Stockage de données : mémoire holographique . . . . .	159
D.3	Papier et encre électronique . . . . .	160
D.4	Photodétection et vision artificielle . . . . .	160
<b>Bibliographie</b>		<b>170</b>

# Introduction

Les impulsions ultra-brèves ont des champs d'application grandissants, allant du domaine industriel tel l'usinage de matériaux au domaine médical comme l'ophtalmologie. D'un point de vue plus fondamental, elles ont également ouvert une voie entièrement nouvelle dans l'interaction laser-matière en autorisant l'observation des mouvements atomiques et électroniques dans les matériaux à l'échelle de temps de la femtoseconde.

Pour la biologie, ces développements ont permis l'utilisation de techniques de spectroscopie résolue en temps, en particulier pour l'étude de la dynamique des protéines photoactivables. Une impulsion ultra-brève amène le système dans un état excité et initie la dynamique (vibration, transfert de charge, changements conformationnels...). La brièveté des impulsions utilisées est indispensable pour pouvoir espérer résoudre ces processus sur l'échelle de temps des mouvements atomiques. De telles impulsions lumineuses autorisent la caractérisation du système étudié dans un état cohérent, avant que son état quantique ne soit brouillé par des processus de relaxation.

La protéine étudiée dans ce travail, **la bactériorhodopsine**, peut être considérée comme l'analogue bactérien des protéines photoréceptrices humaines. La compréhension des processus de la vision est un domaine fascinant de la recherche, amenant de nombreuses questions et controverses aujourd'hui encore. Dans la vision, l'absorption de l'énergie lumineuse par une protéine (la rhodopsine) va donner lieu à une cascade complexe de processus acheminant le signal au cerveau. Il a été montré que suite à la réception d'un photon lumineux :

- la molécule photoréceptrice (le rétinale) qui fait partie de la protéine s'isomérisse en quelques centaines de femtosecondes ;
- une polarisation microscopique (déplacement de charges) s'établit au niveau du système rétinale/protéine.

Le rôle fonctionnel et la chronologie de ces deux phénomènes sont encore incertains. Il a été impossible de mesurer directement ces déplacements de charges, car les méthodes photovoltaïques "conventionnelles" sont limitées par le temps de réponse des appareils de mesure (quelques picosecondes). La nouvelle méthode spectroscopique présentée dans ce travail va en revanche

permettre d'étudier des déplacements de charges avec une résolution de 13 fs et ainsi de séparer temporellement isomérisation et polarisation ultrarapide pour apporter des pistes à leur compréhension.

Cependant, la fragilité de la rhodopsine *in vitro* rend difficile son étude spectroscopique. Nous étudions alors son analogue bactérien beaucoup plus résistant : la bactériorhodopsine.

Non seulement la bactériorhodopsine est importante pour servir de modèle à la compréhension des protéines à rétinal, mais elle est également une source d'étude à part entière pour ses applications biophotoniques grandissantes (cellules photovoltaïques, mémoires holographiques, encre électronique par exemple).

Dans cette thèse, la bactériorhodopsine est étudiée par spectroscopie cohérente d'émission infrarouge. Comme toute spectroscopie non-linéaire femtoseconde cohérente, elle consiste à faire une mesure cohérente du champ émis par un système non centrosymétrique excité en régime femtoseconde. Le phénomène utilisé ici est un phénomène non linéaire du deuxième ordre par différence de fréquences (redressement optique) dans des membranes orientées.

Cette méthode est bien adaptée pour comprendre les premiers processus photoinduits de la bactériorhodopsine :

- Le domaine spectral de l'infrarouge moyen (nous avons accès à la gamme 3  $\mu\text{m}$  - 15  $\mu\text{m}$ ) correspond aux transitions vibrationnelles des molécules. Nous pouvons donc espérer visualiser des changements conformationnels.
- La possibilité d'obtenir des films anhydres orientés à partir de membranes natives contenant de la bactériorhodopsine va permettre d'obtenir une polarisation caractérisable au niveau macroscopique.
- La forte polarisabilité non linéaire du second ordre du rétinal est favorable à la génération de redressement optique dans les films orientés.

Ce compte-rendu est présenté de la façon suivante :

- Le **chapitre 1** décrit la bactériorhodopsine et plus généralement les protéines à rétinal, en insistant sur les différentes hypothèses concernant le premier processus photoinduit.
- Le **chapitre 2** expose en détail la technique expérimentale de spectroscopie d'émission infrarouge, en donnant au préalable les éléments clefs nécessaires à la compréhension du dispositif expérimental.
- Le **chapitre 3** décrit les caractéristiques temporelles et spectrales des échantillons de bactériorhodopsine étudiés.
- Le **chapitre 4** présente les résultats expérimentaux obtenus et l'approche théorique utilisée pour la simulation des données.

# Chapitre 1

---

## Les protéines à rétinol

### 1.1 Les protéines impliquées dans le transport transmembranaire

Les protéines membranaires jouent un rôle fondamental dans des processus de conversion d'énergie, de transport, de transduction de signaux et de contacts intercellulaires. Il existe deux classes importantes de protéines impliquées dans le transport transmembranaire [1] :

1. Les protéines du transport passif : les protéines-canaux.

Le transport passif correspond au passage spontané d'un soluté à travers la membrane, dans le sens du gradient de potentiel chimique ou électrochimique.

Les protéines-canaux assurent directement le transport passif des ions (canaux ioniques) ; elles ont une structure tridimensionnelle qui délimite un pore aqueux au travers duquel passent sélectivement certains ions. Elles assurent elles-mêmes le passage des ions à travers la membrane. Leur ouverture est étroitement régulée :

- par un changement du potentiel de membrane : ce sont les canaux sensibles au voltage ;
- par la fixation d'un ligand (neurotransmetteur) : ce sont les récepteurs-canaux ;
- par l'interaction avec un composant intracellulaire par l'intermédiaire d'une protéine réceptrice.

2. Les protéines du transport actif : les pompes et les transporteurs.

Le transport actif correspond au passage d'un soluté à travers la membrane contre son gradient de potentiel chimique ou électrochimique. Ce transport nécessite la fourniture d'énergie et ne peut pas être spontané. On distingue :

- Les pompes, dont l'activité est fortement couplée à une source d'énergie telle l'hydrolyse de l'ATP (adénosine 5'-triphosphate, source d'énergie de la cellule) ou l'énergie lumineuse.
- Les transporteurs, qui assurent un transport actif, fonctionnent avec l'aide d'un gradient ionique constitué préalablement. Ce sont les systèmes de co-transport dans lesquels le transfert d'un soluté dépend du transfert simultané d'un second soluté.

Nous nous intéressons plus particulièrement aux protéines impliquées dans la transduction d'énergie à travers les protéines à rétinal, classe importante de protéines transmembranaires. Elles interviennent dans un large domaine de processus photoinduits, avec des rôles fonctionnels variés, par exemple comme pompe à ions mais aussi comme récepteur photoactivable couplé aux protéines G (protéine membranaire, intermédiaire important dans la voie de signalisation cellulaire). La protéine "modèle" de cette classe est la bactériorhodopsine, pompe à protons ancestrale permettant la survie de certaines bactéries évoluant dans des milieux extrêmes. Cette thèse concerne les premiers processus photoinduits dans cette protéine.

## 1.2 La famille des rhodopsines

La bactériorhodopsine est une protéine de la classe des rhodopsines. Cette classe contient deux grandes familles de protéines [2] :

- les rhodopsines localisées dans la rétine : ce sont des protéines photoréceptrices animales situées au niveau des yeux des vertébrés. Leur rôle inclut la vision [3] et le contrôle circadien [4].
- les archéorhodopsines. Trouvées dans des bactéries vivant dans un milieu très salin (halophiles extrêmes dites halobactéries), elles jouent le rôle de transducteur d'énergie lumineuse [5] comme pompe à protons (bactériorhodopsine), comme pompe à ions chlorure  $\text{Cl}^-$  (halorhodopsine), ou encore comme récepteur sensoriel (rhodopsine sensorielle utilisée pour diriger le mouvement flagellaire par exemple).

Ces deux familles ont une structure tridimensionnelle (ou conformation) similaire, caractérisée par sept hélices  $\alpha$  transmembranaires (apoprotéine appelée opsine). Un cofacteur photosensible, le chromophore rétinale (figure 1.1), est lié de façon covalente à une des hélices (l'hélice VII) par l'intermédiaire d'une base de Schiff (liaison  $-\text{CH}=\text{N}-$ ).

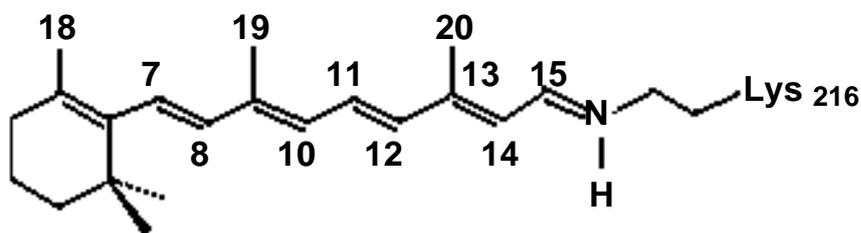


FIG. 1.1 : Rétinal tout-*trans*.

Décrivons brièvement les caractéristiques de ces deux familles de protéines.

### 1.2.1 Les photorécepteurs visuels

Les vertébrés ont deux types de cellules photoréceptrices, appelées bâtonnets et cônes. Les cônes fonctionnent en pleine lumière et, étant de 3 types, sont à l'origine de la vision des couleurs, tandis que les bâtonnets fonctionnent en faible éclaircissement (très grande sensibilité) mais étant d'un seul type ils ne peuvent assurer la vision des couleurs. On trouve au niveau de vésicules (disques) des bâtonnets (figure 1.2) la molécule photosensible rhodopsine, constituée d'une protéine opsine à rétinale. Le chromophore rétinale est sous forme 11-*cis* dans l'état fondamental [3, 6]. La structure tridimensionnelle de la rhodopsine a été déterminée par diffraction des rayons X il y a quelques années [7]. Les détériorations visuelles liées à une déficience en

vitamine A, dont la forme oxydée est le rétinal, illustrent le rôle important joué par le rétinal dans la vision [8].

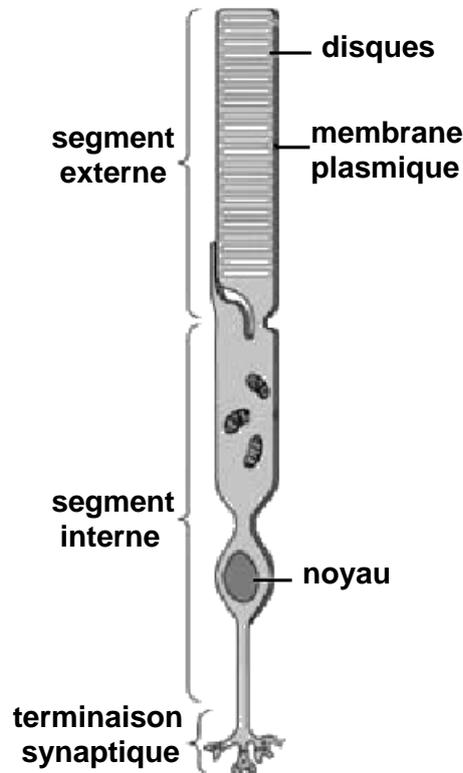


FIG. 1.2 : Cellule photoréceptrice de type bâtonnet, composée de segments interne et externe, un corps cellulaire et une zone synaptique par laquelle un signal chimique est transmis à une cellule nerveuse de la rétine. Les molécules de rhodopsine sont localisées dans les disques.

Dans l'obscurité, un courant entre les deux segments du bâtonnet est maintenu, dû à la présence d'ions sodium  $\text{Na}^+$ . L'absorption d'un photon par le rétinal conduit à un photocycle qui inclut l'isomérisation du rétinal (rendement quantique d'environ 67 %) vers l'état *trans* et le détachement du rétinal de la protéine, qui est alors constituée de l'opsine seule. La reconstitution de la rhodopsine s'effectue par un cycle biochimique complexe *in vivo* [3, 9]. Le photocycle est couplé à la fermeture de canaux  $\text{Na}^+$  localisés dans la membrane plasmique du segment externe, induisant une diminution du courant d'obscurité proportionnelle à l'intensité excitatrice. La transmission synaptique est inhibée et l'information est transmise dans un premier temps à une cellule nerveuse de la rétine puis tout au long de la voie de la vision jusqu'au cortex visuel. La rhodopsine ne convertit donc pas l'énergie lumineuse mais permet la signalisation en interrompant un processus alimenté lui-même par ailleurs.

L'environnement du rétinal agit comme un milieu diélectrique qui modifie le spectre d'absorption du rétinal, particulièrement au niveau de l'interaction avec la base de Schiff. Ce phénomène est très notable au niveau des rhodopsines des halobactéries. Il a également été

montré que le système visuel des poissons vivant en eau profonde s'est adapté aux conditions de faible éclairage en augmentant le nombre de ses récepteurs et en spécialisant leur spectre de réception dans une gamme spectrale plus étroite grâce à un environnement en acides aminés spécifique [10].

### 1.2.2 Les protéines de la bactérie *Halobacterium salinarium*

La bactérie *Halobacterium salinarium* (figure 1.3) est une bactérie très halophile (son milieu naturel contient 4-5 M de chlorure de sodium, NaCl) capable d'effectuer une forme unique et ancienne de photosynthèse très différente de celle des organismes qui utilisent la (bactéριο)chlorophylle.

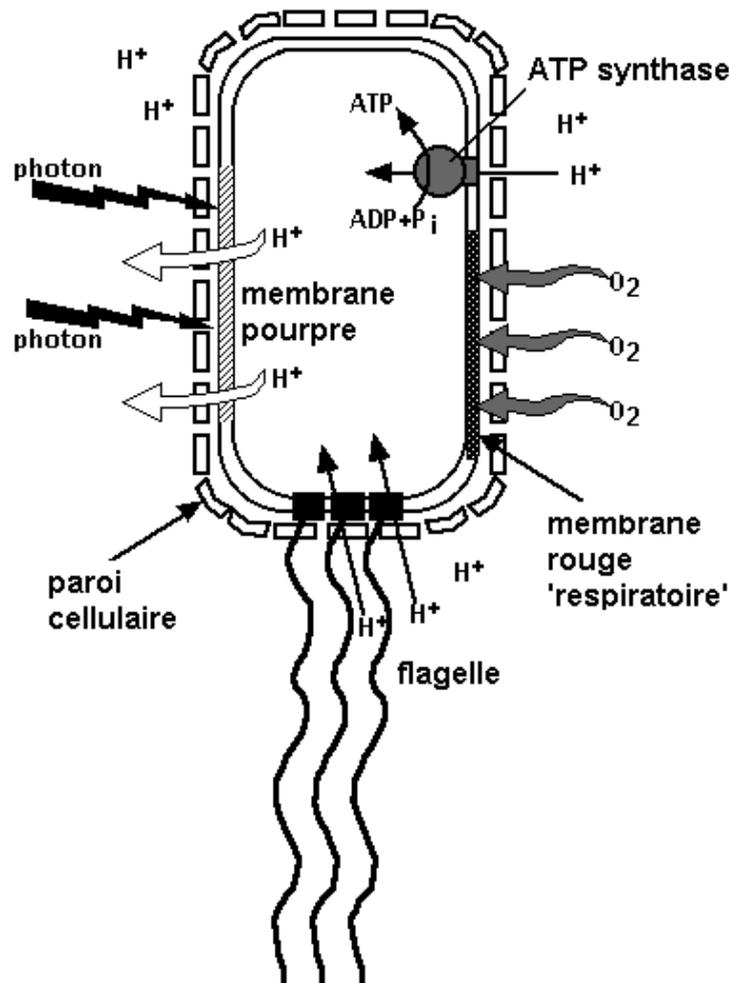


FIG. 1.3 : Respiration et photosynthèse dans la bactérie *Halobacterium salinarium*.

Cet organisme primitif de couleur pourpre colore fréquemment les milieux très salins dans lesquels il se développe. On distingue deux types de composants de la membrane cellulaire, la

membrane rouge et la membrane pourpre.

La membrane rouge est le site de la respiration, et doit sa couleur essentiellement à la présence de caroténoïdes. Durant la phase stationnaire de croissance cellulaire, la concentration en oxygène est trop faible pour utiliser la respiration comme source d'énergie, et une méthode alternative de production d'ATP est créée, en développant au niveau de la membrane rouge des zones de membranes pourpres. Ce type de membrane est constitué, outre de lipides, essentiellement de la protéine bactériorhodopsine.

La bactériorhodopsine est une pompe protonique photoactivable, permettant à la bactérie de survivre dans des conditions extrêmes en utilisant l'énergie solaire. Ce transfert de protons, de la face cytoplasmique à la face périplasmique de la membrane, permet l'établissement d'un gradient de protons qui entraîne la production d'ATP par une autre protéine (l'ATP synthase). En plus de la bactériorhodopsine, la bactérie contient une pompe à ions  $\text{Cl}^-$  (l'halorhodopsine) et deux rhodopsines sensorielles responsables de la phototaxie (phototaxie positive : attraction par la lumière ; phototaxie négative : répulsion par la lumière) [11].

En culture, durant la première phase de croissance exponentielle (voir annexe C), la bactérie est aérobie et la protéine sensorielle principale (phoborhodopsine ou SRII, maximum d'absorption à 490 nm) repousse la bactérie de la lumière. En revanche, quand la concentration en oxygène devient limitante et que la bactérie a besoin de lumière pour sa survie, la protéine sensorielle principale SRI (maximum d'absorption à 587 nm) génère un mouvement flagellaire vers la lumière [12]. La bactérie possède ainsi une forme de vision élémentaire. Suite à l'absorption d'un photon lumineux, les changements conformationnels des protéines sensorielles (dont on ignore encore aujourd'hui le fonctionnement exact) vont déclencher une cascade d'événements moléculaires propagés par la chaîne de transduction sensorielle jusqu'aux organes du mouvement.

L'halorhodopsine (maximum d'absorption à 578 nm) est également trouvée dans la membrane pourpre de la bactérie *Halobacterium salinarium*. Elle est principalement utilisée pour maintenir la balance osmotique durant la croissance cellulaire. La bactérie peut aussi utiliser cette autre protéine pour capter l'énergie lumineuse en condition de dioxygène limitant pour assurer sa photosynthèse. A la différence de la bactériorhodopsine, elle transporte des ions  $\text{Cl}^-$  vers l'intérieur de la cellule. Du fait de leur charge négative, en terme de potentiel transmembranaire, pomper les ions  $\text{Cl}^-$  vers l'intérieur est équivalent à pomper des protons vers l'extérieur. Ainsi l'halorhodopsine convertit l'énergie par l'établissement d'un gradient d'ions chlorures, mais avec une efficacité moins bonne que la bactériorhodopsine. Le rétinol, qui s'isomériserait tout-*trans*  $\rightarrow$  13-*cis* comme dans le cas de la bactériorhodopsine, est également relié à une hélice par l'intermédiaire d'une base de Schiff. Cependant lors du transfert d'ions  $\text{Cl}^-$ , la base de Schiff ne se déprotone pas et les acides aspartiques voisins (les équivalents de Asp85 et Asp96) sont absents. Un point marquant non élucidé : lorsque la bactériorhodopsine est plongée dans un milieu acide en présence d'ions chlorures (typiquement un milieu acidifié par HCl, voire chapitre 3), elle pompe des ions  $\text{Cl}^-$  et ses photoproduits sont très similaires à ceux de l'halorhodopsine [13].

## 1.3 La bactériorhodopsine

### 1.3.1 Structure

En général les protéines membranaires, amphiphiles, sont très difficiles à cristalliser. Les molécules de bactériorhodopsine présentent l'avantage de déjà former un réseau cristallin plan dans la membrane pourpre (réseau hexagonal de trimères). La structure tridimensionnelle de la bactériorhodopsine a pu être déterminée par cristallographie aux rayons X [14, 15] et par microscopie électronique [16, 17]. Elle se compose de 248 acides aminés organisés en sept hélices  $\alpha$  (structure appelée opsine) et d'un cofacteur, le rétinal, qui est la molécule photoréceptrice, lié à la lysine 216 qui fait partie d'une hélice de la protéine (figure 1.4). Les hélices de la bactériorhodopsine traversent la membrane approximativement à angle droit par rapport au plan de cette dernière, et le rétinal (en prenant comme direction caractéristique la ligne connectant  $C_5$  et  $C_{15}$ , figure 1.5) a une orientation de  $61^\circ \pm 7^\circ$  [18] par rapport à la normale à la membrane.

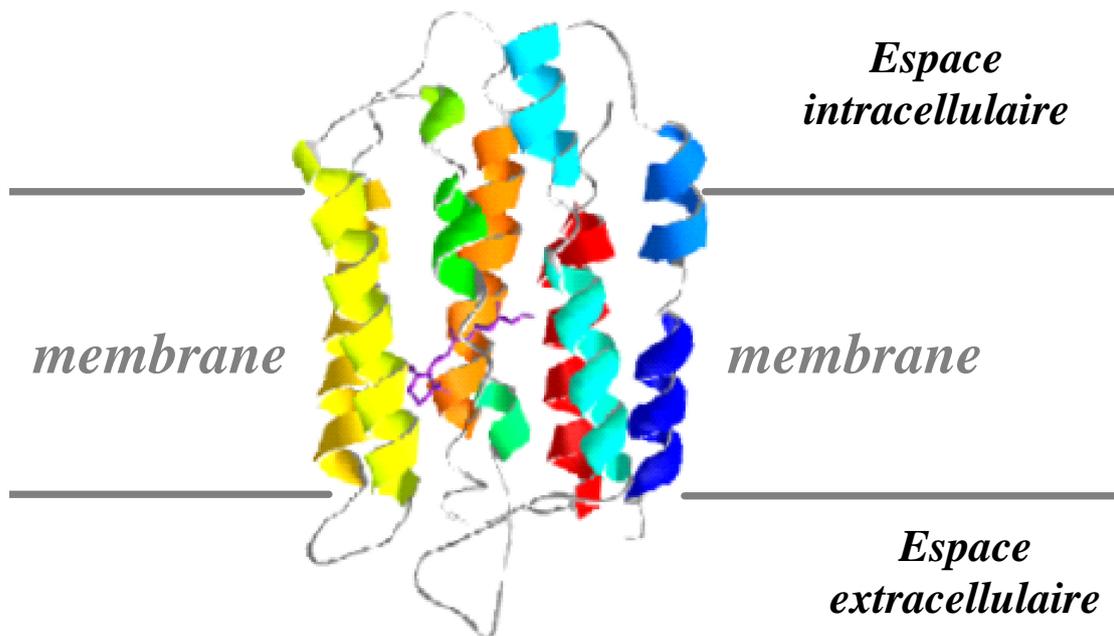


FIG. 1.4 : Les sept hélices constitutives de la protéine et le rétinal au centre (en mauve). Taille approximative  $3 \times 3 \times 5 \text{ nm}^3$ .

### 1.3.2 Le photocycle

Dans la bactériorhodopsine, le rétinal existe sous les formes *13-cis* et *tout-trans* (figure 1.5).

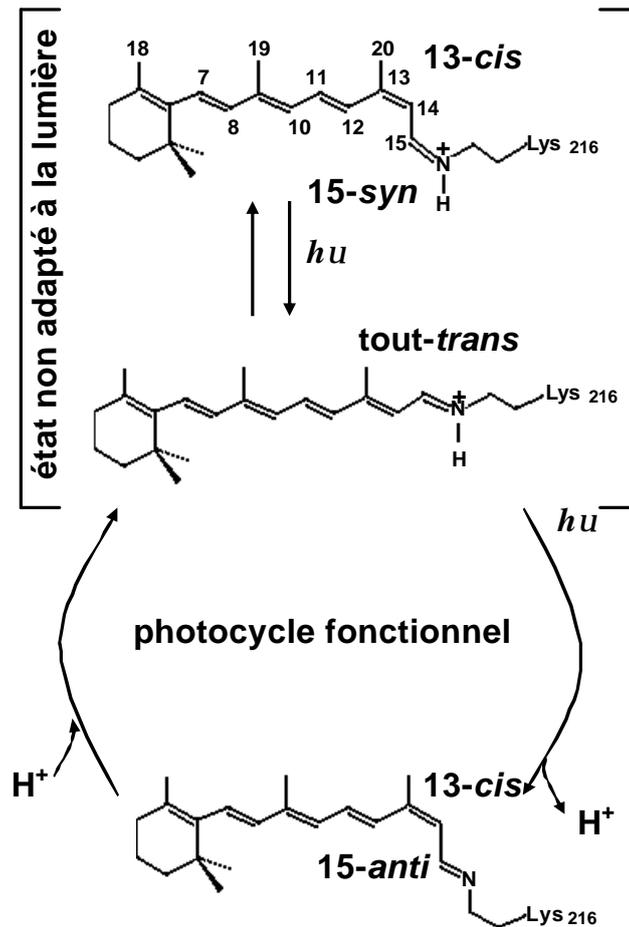


FIG. 1.5 : Configurations du rétinol dans l'état non adapté à la lumière et photocycle fonctionnel.

Suite à une illumination ambiante (quelques minutes suffisent pour un échantillon de bactériorhodopsine en solution), le rétinol adopte la forme *tout-trans*, et la protéine est alors sous une forme dite adaptée à la lumière (rétinol *tout-trans* uniquement). Comme c'est le cas dans la rhodopsine dans le système visuel des mammifères, une photoisomérisation du rétinol prend place. Néanmoins, dans le cas de la bactériorhodopsine, elle est *tout-trans* → *13-cis*, ce qui contraste avec le cas de la rhodopsine où elle est *11-cis* → *tout-trans*. Parmi les autres différences remarquables, nous mentionnons le fait que dans la bactériorhodopsine, pendant le photocycle, le rétinol reste incorporé dans la protéine. Cette propriété facilite l'étude de la bactériorhodopsine par rapport à la rhodopsine.

En revanche dans l'obscurité (forme dite non adaptée à la lumière), il y a un équilibre entre les formes (*13-cis*, *15-syn*) et (*tout-trans*, *15-anti*) du rétinol (figure 1.5) en proportion environ équimolaire [19, 20]. L'absorption d'un photon par le rétinol *tout-trans* entraîne le photocycle fonctionnel de la bactériorhodopsine, durant lequel un proton est pompé de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule.

### 1.3.3 Les photoproduits

Après absorption d'un photon, différents photoproduits de bR (bactériorhodopsine dans son état fondamental, maximum d'absorption à 568 nm) sont formés à travers un photocycle. Bien qu'un photocycle existe quelque soit l'isomère concerné, seul le photocycle (de durée 10-20 ms) provenant de l'excitation du rétinol tout-*trans* implique le transport de protons. Le photocycle donne naissance à de nombreux changements structuraux (isomérisation du rétinol), à des réactions de protonation ainsi qu'à des modifications électrostatiques (déplacement de charges), aussi bien au niveau de la protéine que du rétinol. Ces modifications sont décrites plus en détail dans la partie 1.4.

Les changements spectraux dans le visible et l'infrarouge [20, 21, 22, 23] ont permis de caractériser les photoproduits créés pendant le photocycle, notés bR, bR\*, I<sub>460</sub>, J<sub>625</sub>, K<sub>590</sub>, L<sub>550</sub>, M<sub>412</sub>, N<sub>540</sub>, O<sub>640</sub> (figure 1.6). Les indices indiquent les maxima d'absorption de chaque état en nanomètres. Leur durée de vie varie de plusieurs centaines de femtosecondes à quelques millisecondes.

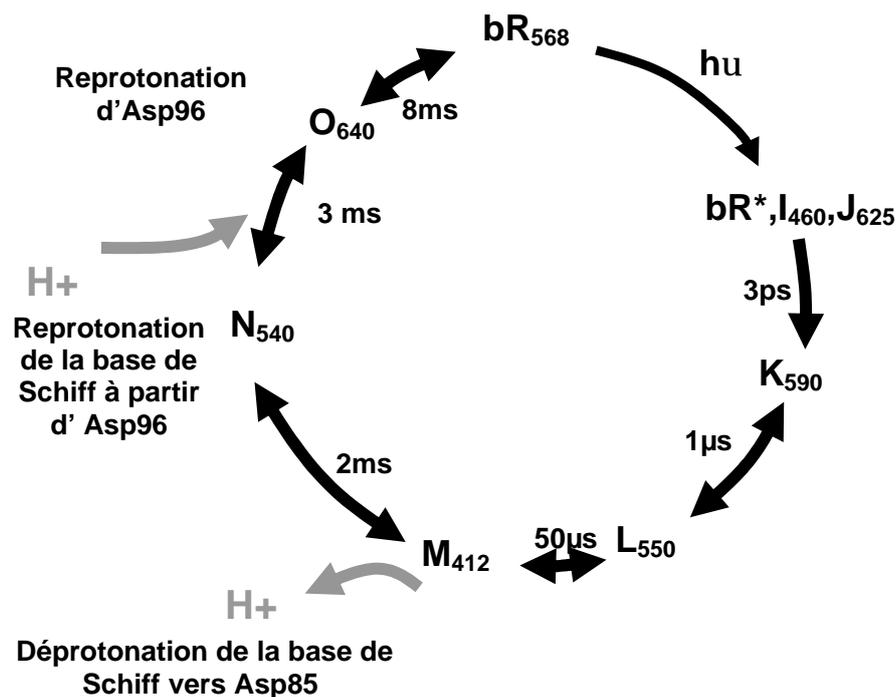


FIG. 1.6 : Photocycle de la bactériorhodopsine.

Aux différentes étapes du photocycle est associé un échange de protons ; le processus est décrit dans la figure 1.7.



### 1.3.4 Pourquoi étudier la bactériorhodopsine ?

La bactériorhodopsine est parmi les systèmes photosynthétiques les plus simples connus à ce jour. Elle présente une résistance très importante aux conditions extrêmes telles un pH très bas ou des variations d'humidité. Elle fait partie d'une importante famille de protéines membranaires, qui bien que variant dans leurs fonctions, ont des structures similaires, ce qui permet à la bactériorhodopsine de leur servir de modèle.

Du fait de sa grande robustesse elle est un candidat très intéressant pour des applications commerciales (annexe D). D'un point de vue pratique, cette robustesse, en particulier en comparaison d'avec la rhodopsine, facilite considérablement son étude, en particulier sous condition d'éclairage répété, comme c'est intrinsèquement le cas dans les études de type pompe-sonde femtoseconde, utilisées dans cette thèse.

## 1.4 Controverse : quel est le premier processus photoinduit ?

Partant de l'état fondamental bR, le rétinol se trouve dans l'état excité bR\* suite à l'absorption d'un photon (figure 1.6). La molécule est excitée électroniquement : d'après le principe de Franck-Condon, les noyaux sont initialement dans la configuration de l'état fondamental, tandis que la configuration électronique est celle de l'état excité. Ce principe est basé sur l'approximation que les changements électroniques, de l'ordre de quelques femtosecondes, sont beaucoup plus rapides que les changements nucléaires. Dans le schéma représentant les surfaces d'énergie potentielle (figures 1.10 et 1.11), la transition impliquée est verticale, et l'état créé est appelé zone de Franck-Condon.

Une question importante est ouverte : comment se fait le stockage ultrarapide d'énergie lumineuse, entraînant par la suite les photoconversions fonctionnelles caractéristiques de la protéine ? Ce mécanisme de transduction efficace et ultrarapide du signal électronique (absorption d'un photon) vers un signal structural (changement de conformation) est actuellement très controversé. Pour la bactériorhodopsine, deux grands modèles s'affrontent :

1. L'isomérisation *tout-trans* → *13-cis* (figure 1.8) est le premier processus photoinduit.
2. L'énergie lumineuse est emmagasinée grâce à un déplacement de charges ultrarapide (figure 1.9).

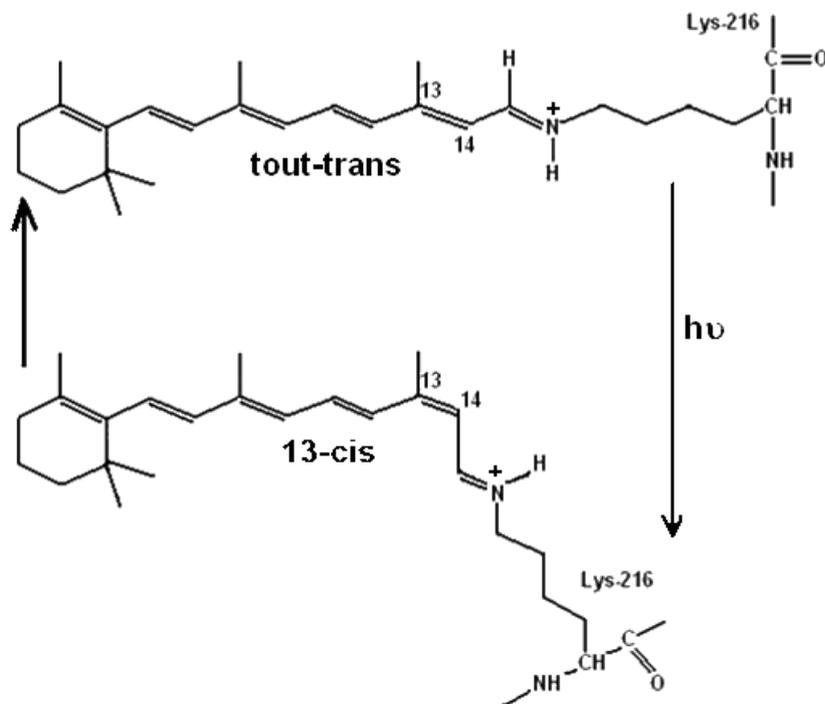


FIG. 1.8 : Isomérisation *tout-trans* → *13-cis* du rétinol suite à l'absorption d'un photon.

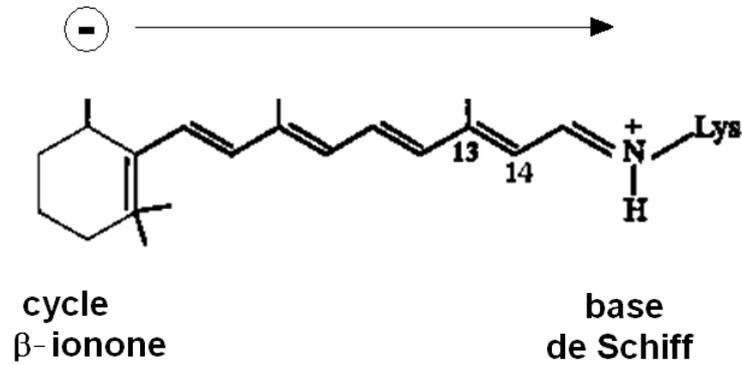


FIG. 1.9 : Déplacement de la charge négative vers la base de Schiff dans l'état excité. Ce transfert de charge se traduit par un changement dipolaire  $|\Delta\mu|$  entre moment dipolaire de l'état fondamental et moment dipolaire de l'état excité autour de 14 Debyes [25, 26].

Dans les années 70, basée sur des traitements théoriques, une polarisation ultrarapide du rétinale a été proposée comme premier processus, précurseur de l'isomérisation [26, 27, 28]. Néanmoins, l'hypothèse établie dans les années 80, basée sur les premières expériences d'absorption transitoire femtoseconde, est que le premier processus fonctionnel photoinduit est l'isomérisation autour de la double liaison  $C_{13} = C_{14}$  [21, 22]. Dans cette vision, les changements conformationnels au niveau de la protéine nécessitent et résultent de l'isomérisation ultrarapide tout-*trans*  $\rightarrow$  13-*cis* du rétinale (figure 1.8).

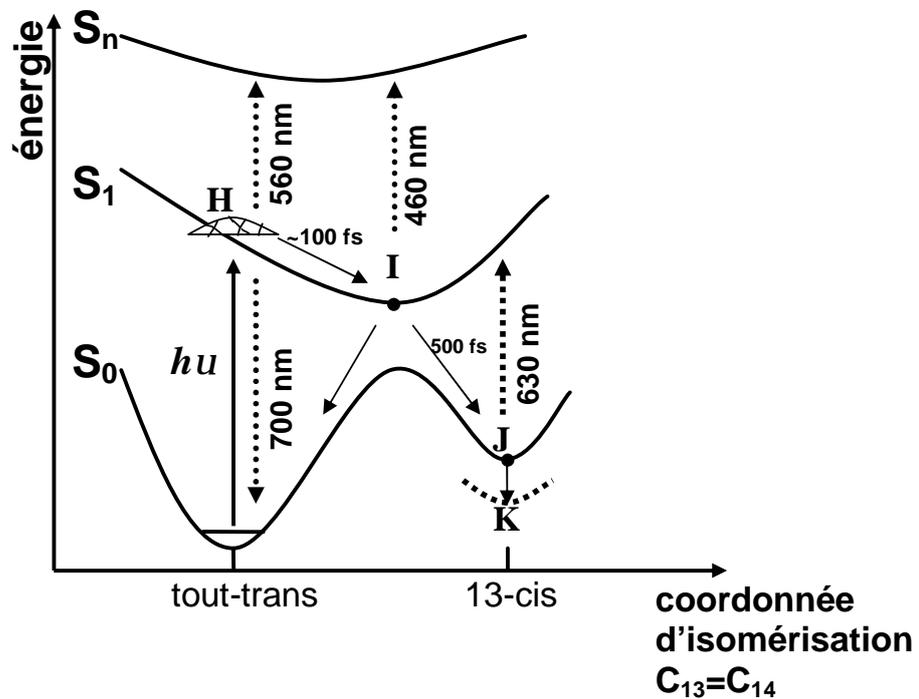


FIG. 1.10 : Surface d'énergie potentielle suivant la coordonnée nucléaire d'isomérisation, selon le modèle de [21]. Les longueurs d'ondes caractérisent les maxima d'absorption et d'émission.

Dans le modèle de la figure 1.10, l'isomérisation du rétinale est directement couplée au premier

processus photoinduit ; la distorsion autour de la double liaison  $C_{13}=C_{14}$  contrôle le départ hors de la zone de Franck-Condon. La dynamique des paquets d'onde les 100 premières femtosecondes est un processus essentiel dans l'isomérisation. Dans ce modèle, au niveau du photoproduit I, dans lequel le rétinol est proposé être partiellement ( $\approx 90^\circ$ ) isomérisé, deux cas sont possibles :

- Formation du photoproduit sous forme 13-*cis* (J), atteint après environ 500 fs avec un rendement quantique autour de 65%. Le photocycle est initié.
- Retour dans l'état fondamental tout-*trans* par des processus non radiatifs.

Un autre modèle, faisant intervenir trois états énergétiques (figure 1.11), a été proposé suite à des expériences d'absorption transitoire résolue temporellement [29] et des calculs théoriques des dynamiques moléculaires [30]. La coordonnée de réaction est là encore dominée par la torsion autour de la double liaison, mais celle-ci est indirectement couplée à la transition : l'énergie électronique est stockée dans d'autres modes vibrationnels du rétinol. La surface d'énergie potentielle autour de la zone de Franck-Condon est relativement plate et non répulsive, la population dans l'état excité reste localisée dans cette zone pendant quelques centaines de femtosecondes avant d'atteindre la zone "active" suivant la coordonnée d'isomérisation. D'autres modèles invoquent deux états excités, mais les surfaces sont traitées en plusieurs dimensions (c'est à dire deux voire plus de modes sont impliqués dans la réaction) [25,31].

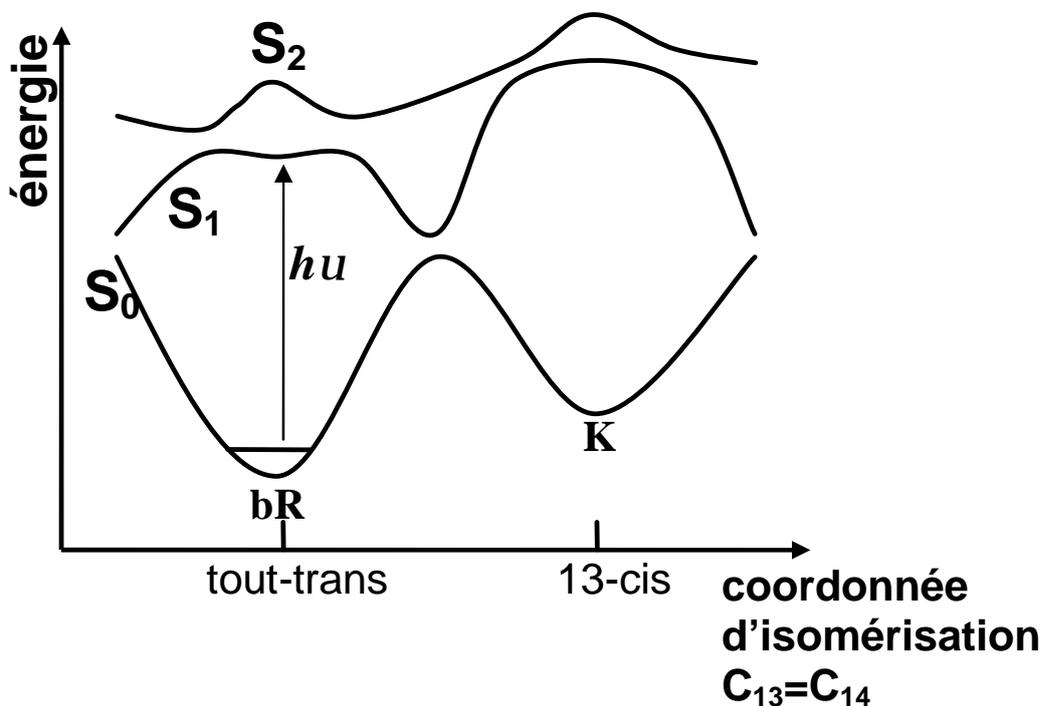


FIG. 1.11 : Modèle à trois états décrivant l'isomérisation de la bactériorhodopsine [29].

Plusieurs expériences ont été effectuées sur des rétinaux modifiés chimiquement, avec pour but d'étudier leur rôle fonctionnel :

- Les dynamiques photoinduites du rétinale en solution et au sein de la protéine ont été étudiées, dans des systèmes chimiquement modifiés où l'isomérisation autour de la double liaison  $C_{13}=C_{14}$  n'est pas possible [32, 33, 34, 35, 36, 37] (figure 1.12).

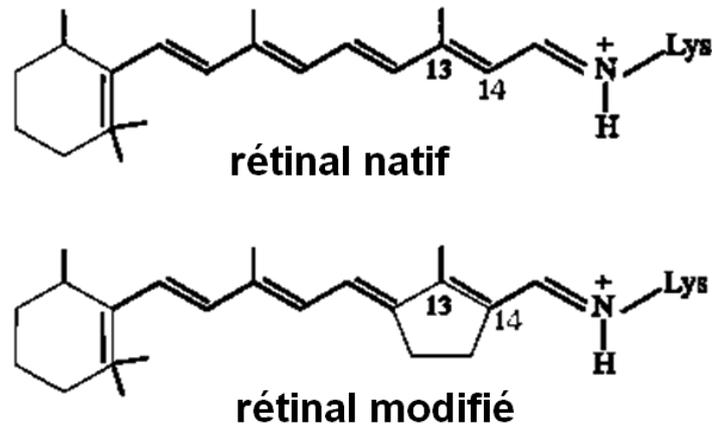


FIG. 1.12 : Rétinals natif et modifié utilisés pour sonder les phénomènes ultrarapides dans la bactériorhodopsine. L'isomérisation autour de la liaison  $C_{13}=C_{14}$  est bloquée par une liaison chimique additionnelle. Ce rétinale modifié peut être introduit dans des apoprotéines de bactériorhodopsine où le rétinale natif a été préalablement éliminé [38].

Des expériences pompe-sonde (principe décrit chapitre 3) ont été effectuées sur les deux types de rétinale [32, 34, 35, 36] présentés figure 1.12. Les spectres d'absorption transitoire montrent la formation d'un état fluorescent  $I_{460}$  dans les deux cas, avec un même rendement quantique, preuve que le rétinale ne peut pas être partiellement isomérisé dans cet état.

- Les changements conformationnels de la protéine ont été étudiés par l'utilisation d'un capteur à force atomique [39]. Cette méthode permet de sonder les mouvements de la protéine suite à une excitation visible (532 nm). La résolution temporelle est de 2  $\mu$ s. Dans les deux cas (protéine avec rétinale natif et protéine reconstituée avec le rétinale modifié), l'excitation lumineuse provoque des modifications conformationnelles de la protéine qui perdurent pendant plusieurs millisecondes. En revanche, ces modifications structurales donnent lieu à un gradient de pH seulement si le rétinale peut s'isomériser par la suite. La protéine avec un rétinale symétrisé (tout transfert de charge par non linéarité du second ordre peut être exclu) a également été étudiée [39] : aucun signal n'a pu être observé.

- Comme l'avaient montré des expériences de génération de seconde harmonique dès la fin des années 80 [40, 41, 42, 43], la susceptibilité non linéaire du rétinale est très élevée. Des expériences d'absorption transitoire couplées à des expériences de génération de seconde harmonique [43] sur des rétinals à chaîne polyénique modifiée chimiquement ont montré :

1. L'existence d'un transfert de charges est relié aux propriétés non linéaires du rétinale.
2. Suite à une excitation lumineuse, les rétinals modifiés ne présentent pas de variations caractéristiques d'absorption liées à un rôle fonctionnel, bien que l'isomérisation soit possible.

Ces études montrent que des changements conformationnels au niveau de la protéine peuvent être induits par une redistribution de charges. Bien que le couplage entre ce déplacement de charges et le transfert de protons n'ait pas été jusque-là établi, elles suggèrent la modification de l'hypothèse établissant l'isomérisation comme le premier processus photoinduit fonctionnel. Des modèles alternatifs à plusieurs dimensions ont été établis, tenant compte de l'importance du déplacement de charges et d'autres modes vibrationnels dans la relaxation du rétinol.

Comme déjà invoqué au milieu des années 70 [26, 27, 28], l'importance d'un transfert de charge suite à une excitation visible (figure 1.9) avait été mise en avant. Les expériences sur le rétinol "bloqué" et le développement de calculs ab-initio des propriétés du rétinol [25, 44] ont entamé une recrudescence de l'intérêt de cette polarisation. Les calculs ont permis de simuler le changement dipolaire associé à la population dans la zone de Franck-Condon de l'état excité et les degrés de liberté du rétinol impliqués dans la relaxation diélectrique du rétinol (figure 1.13).

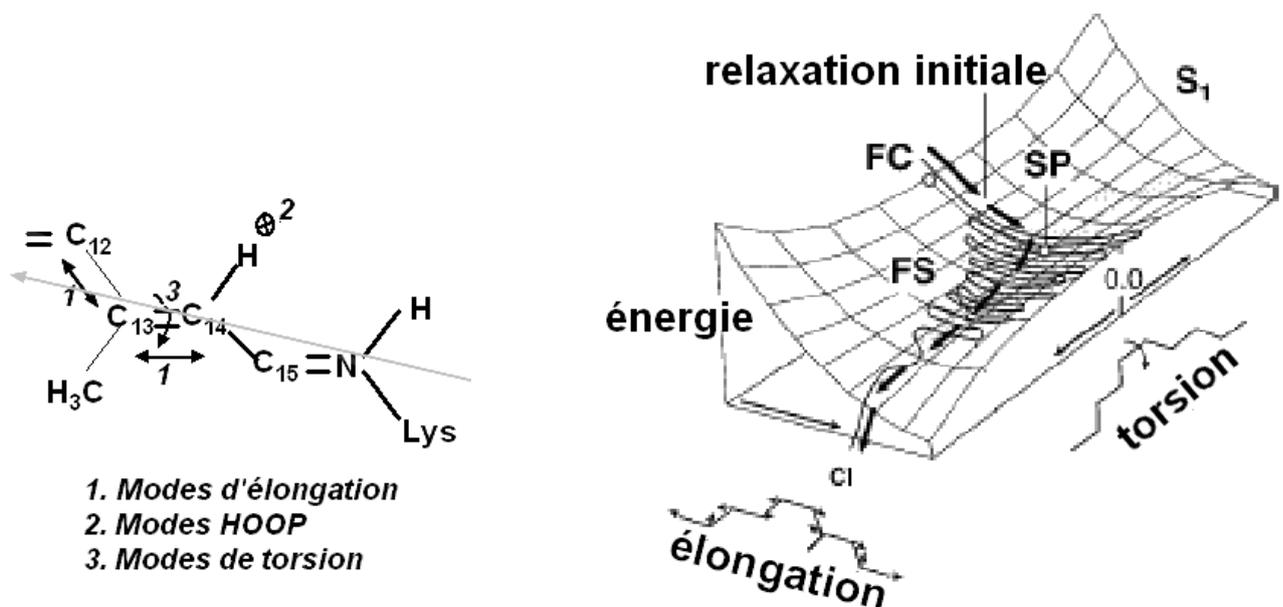


FIG. 1.13 : Partie droite : structure de la surface excitée S<sub>1</sub> du rétinol 11-*cis*, adaptée de [45]. On pense en particulier que dans la protéine, d'autres coordonnées interviennent, non représentées ici, suivant les modes HOOP. FC : zone de Franck Condon ; SP : point stationnaire ; FS : état fluorescent ; CI : intersection conique. Dans le cas du rétinol dans la protéine, le plateau présent en SP semble être diminué, voire disparaître [25]. Partie gauche : représentation d'une partie du rétinol et des modes vibrationnels successivement excités, suite à l'excitation optique selon le moment dipolaire qui fait un angle de 10° environ par rapport à l'axe de la chaîne carbonée [18] (flèche grise).

Selon ces études, le changement du moment dipolaire dans l'état excité (en d'autres termes la séparation de charges) a lieu presque parallèlement à l'axe du rétinol [18, 26] ; les modes

d'élongation du squelette carbonique, dirigés suivant l'axe du rétinol, sont directement couplés à l'excitation lumineuse et dominant ainsi la relaxation initiale hors de la zone de Franck-Condon (FC) vers un plateau (point stationnaire SP). L'énergie est ensuite au moins partiellement transmise aux modes de mouvement des atomes d'hydrogène hors du plan (modes HOOP : Hydrogen Out of Plane), donc indirectement couplés à l'excitation lumineuse. Selon ce modèle, la relaxation s'effectue alors suivant trois coordonnées : élongation de la chaîne carbonique, modes HOOP et modes de torsions autour de la double liaison critique  $C_{13}=C_{14}$ , pour atteindre la zone d'intersection des deux surfaces  $S_0$  et  $S_1$  (intersection conique CI) (figure 1.13), zone où le rétinol peut soit isomériser vers l'état 13-*cis*, soit retourner dans l'état fondamental tout-*trans*. Des variations de ces modèles avec un plus grand nombre de modes vibrationnels ont aussi été décrits [31, 46].

La transition  $S_0 \rightarrow S_1$  s'accompagne d'un changement important du moment dipolaire : la charge positive se déplace des parties  $C_{14}-N$  à  $C_{11}-C_{13}$  en passant de  $S_0$  à  $S_1$  [47], entraînant un changement dipolaire  $|\Delta\mu|$  important, qui a été calculé autour de 14 Debyes, et qui diminuerait dans la relaxation initiale (FC $\rightarrow$ SP) jusqu'à 6 Debyes. Cette relaxation diélectrique est accompagnée d'une réorganisation énergétique d'environ  $2500 \text{ cm}^{-1}$  [48, 49]. Puis il augmenterait jusqu'à 26 Debyes en atteignant CI. Il est à noter que les valeurs numériques sont calculées pour un analogue simplifié du rétinol [25].

La description des changements dipolaires subséquents à l'excitation lumineuse introduite dans ce modèle à deux dimensions nous mène à expliquer la deuxième hypothèse : l'énergie solaire est emmagasinée par une séparation de charges ultrarapide, ayant lieu avant l'isomérisation du rétinol. La protéine doit se réorganiser dans ce nouvel environnement de charges, ce qui va emmener par la suite des modifications conformationnelles.

Bien que des indications fortes d'une polarisation photoinduite et rapide existent donc, basées sur des considérations théoriques et des propriétés non linéaires du rétinol établies expérimentalement, une détection directe et quantifiée d'une polarisation n'a pas encore été possible. Il est possible de mesurer directement des déplacements de charges par détection photoélectrique [50, 51, 52]. Le principe de base est représenté sur la figure 1.14A. Suite à une illumination visible, une tension aux bornes de l'échantillon apparaît (figure 1.14B), caractéristique de déplacements de charges. Cependant les détections photoélectriques sont limitées par le temps de réponse des appareils de mesure, dans le meilleur cas autour de quelques picosecondes [50, 53]. Elles sont donc incapables de résoudre sur une échelle de temps inférieure à celle de l'isomérisation du rétinol, qui a lieu en quelques centaines de femtosecondes.

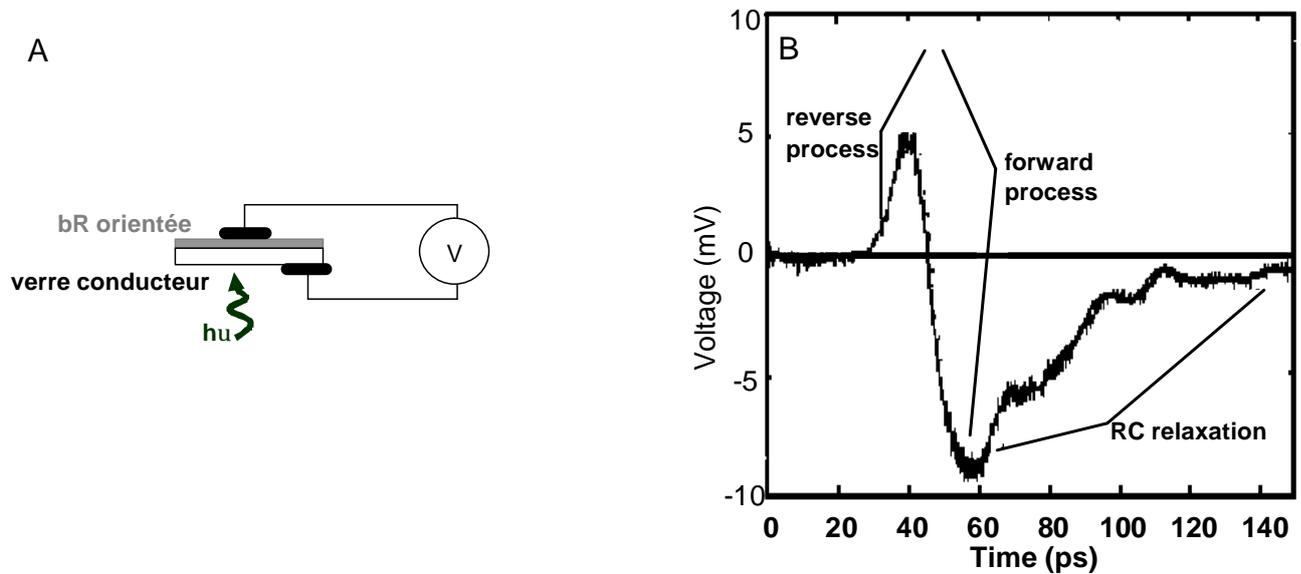


FIG. 1.14 : A. Schéma de principe de la détection photoélectrique. L'échantillon de bactériorhodopsine est orienté sur un verre conducteur (couche conductrice de SnO<sub>2</sub>). Nous décrivons la méthode d'orientation dans le chapitre suivant (partie 3.2.1.1). Suite à une illumination visible, un signal est détecté après amplification aux bornes d'un voltmètre. B. Signal électrique photoinduit en fonction du temps, suite à une excitation à 620nm, de [50]. La relaxation RC (RC relaxation) est déterminée par le circuit de mesure. La partie négative (forward process) correspond à la séparation de charges suite à l'excitation du rétinol tout-*trans*. Le pic positif (reverse process) s'explique par l'excitation d'un photoproduit.

Il est donc nécessaire de développer d'autres méthodes d'analyse. Une approche est d'étudier les effets électrochromiques des changements du moment dipolaire du rétinol sur l'absorption linéaire dans l'ultra-violet de certains acides aminés proches du rétinol [54,55]. Cette approche passe par la déconvolution d'un signal complexe qui inclut une contribution du rétinol même et une interprétation basée sur la structure tridimensionnelle de la protéine, et une quantification de la polarisation n'a pas encore été possible.

Dans ce travail de thèse, nous avons développé une méthode expérimentale, présentée dans le chapitre suivant, utilisant les propriétés non linéaires du rétinol. Elle permet d'étudier les déplacements de charges avec une résolution temporelle considérablement inférieure au temps d'isomérisation du rétinol.

# Chapitre 2

---

## Spectroscopie cohérente d'émission infrarouge

### 2.1 Etude de mouvements de charges

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'il est impossible de mesurer directement des déplacements de charges avec une résolution temporelle meilleure que quelques picosecondes. Cependant, afin d'établir si un déplacement de charges a effectivement lieu avant l'isomérisation du rétinol, une résolution temporelle meilleure que la centaine de femtosecondes est indispensable. En outre, il est important de connaître l'interaction entre les réponses électronique et conformationnelle et leur ordre chronologique.

L'approche développée dans ce travail de thèse tire profit des propriétés non linéaires du rétinol. En effet, la forte polarisabilité moléculaire du deuxième ordre  $\beta$  du rétinol permet de caractériser macroscopiquement la polarisation qui prend naissance dans des assemblages orientés de bactériorhodopsine.

## 2.1.1 Etude de la séparation de charges

### 2.1.1.1 Non linéarité du deuxième ordre et déplacement de charges

Des échantillons basés sur le rétinol tout-*trans* présentent un fort coefficient non linéaire du deuxième ordre  $\chi^{(2)}$  (autour de  $5 \cdot 10^{-10}$  esu dans des films secs excités hors résonance [41] ; autour de  $7 \cdot 10^{-15}$  esu dans des films monocouches, valeur inchangée que l'excitation soit résonante ou non [40, 41]). Le déplacement de charges produit une importante contribution à la polarisabilité non linéaire du deuxième ordre [56]. Le champ émis va ainsi refléter directement la différence entre les moments dipolaires de l'état fondamental et de l'état excité.

Le phénomène non linéaire du deuxième ordre le plus souvent utilisé est la génération de seconde harmonique ; il a été étudié dans le cas de la bactériorhodopsine [41, 42] en excitant l'échantillon hors résonance, et dans le cas du rétinol seul [40, 41] avec des excitations résonante et non résonante. Il est possible d'utiliser un autre phénomène non linéaire du second ordre, la génération d'une radiation basse fréquence par différence de fréquences : le redressement optique. Le déplacement préférentiel des charges dans un sens donné dans un matériau non centrosymétrique va créer une polarisation pointant toujours dans le même sens (figure 2.1).

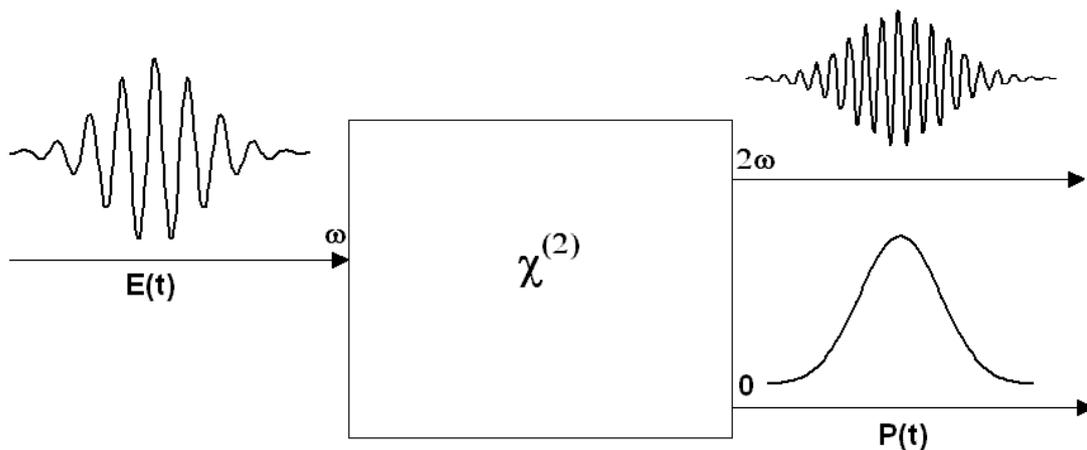


FIG. 2.1 : Suite à l'excitation d'un milieu présentant une non linéarité du deuxième ordre par un champ électrique de fréquence  $\omega$ , des polarisations non linéaires prennent naissance dans le milieu, à la fréquence  $2\omega$  (génération de seconde harmonique) et à la fréquence nulle (redressement optique).

Le redressement optique a été précédemment observé dans des semiconducteurs [57] et des matériaux organiques [58]. Nous l'appliquons ici à un matériau biologique : la bactériorhodopsine.

L'utilisation de cette approche permet :

- d'obtenir des informations temporelles directes, avec une résolution femtoseconde, sur la polarisation créée car l'excitation peut être résonante ;
- d'avoir accès à la dynamique de relaxation des vibrations moléculaires du système rétinol/protéine. L'émission par redressement optique se situe dans l'infrarouge, zone spectrale où appa-

raissent les transitions entre niveaux vibrationnels ; tout mouvement cohérent de charges sera détecté, même sans être directement couplé à la transition optique comme en spectroscopie Raman.

Une telle émission infrarouge qui perdure pendant plusieurs picosecondes a été observée sur des échantillons de myoglobine [58]. Dans la section suivante, nous développons brièvement les concepts sur lesquels ce type de spectroscopie repose.

### 2.1.1.2 Couplage électron-vibration

En cas de résonance électronique, l'interaction entre la lumière et la matière donne lieu à une transition entre l'état fondamental et l'état excité. La figure 2.2 représente la cas de couplage de la transition avec un seul mode vibrationnel, mais plusieurs modes peuvent être impliqués.

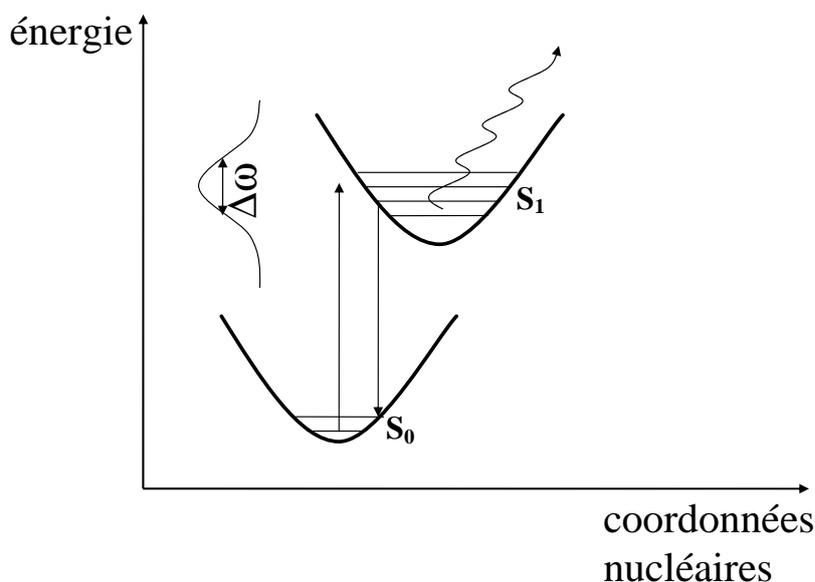


FIG. 2.2 : Excitation cohérente de niveaux vibrationnels par une impulsion gaussienne large bande (largeur  $\Delta\omega$ ), conduisant à une émission infrarouge. La surface de l'état excité  $S_1$  peut être déplacée dans plusieurs dimensions, donnant lieu à l'excitation de plusieurs modes.

La grande largeur spectrale des impulsions ultrabrèves permet l'excitation cohérente de plusieurs niveaux vibrationnels d'un mode. L'évolution de la superposition cohérente des fonctions d'ondes correspondant à ces niveaux se traduit par des mouvements cohérents des noyaux. Les mouvements de charges associés conduisent à une émission électromagnétique dans l'infrarouge moyen. Dans le domaine des fréquences, les structures contenues dans cette émission vibrationnelle seront d'autant plus fine que les temps de déphasage entre modes vibrationnels sont longues.

La spectroscopie visible-infrarouge va donc à priori permettre d'étudier les couplages électroniques et vibrationnels ; la détection simultanée des réponses électronique et vibrationnelle du système rétinale/protéine va permettre d'analyser l'établissement d'une polarisation dans le milieu et sa conversion en dynamique structurale.

## 2.2 Interaction laser-matière : étude des effets non linéaires

Lorsqu'un champ  $E(t)$  interagit avec un milieu diélectrique, les charges mises en mouvement oscillent à la fréquence du champ exciteur, tant que son intensité est suffisamment faible. A des intensités élevées, comme engendrées souvent avec des impulsions lasers ultrabrèves, la théorie d'une réponse uniquement linéaire des systèmes n'est plus suffisante. La matière est fortement affectée par l'impulsion laser incidente, et des contributions linéaires et non linéaires doivent être prises en compte. Dans cette partie nous allons tenter de comprendre l'origine de ces effets non linéaires et d'étudier les approches utilisées pour calculer la réponse non linéaire du milieu. Nous nous concentrerons essentiellement sur les effets non linéaires du deuxième ordre qui nous intéressent dans les chapitres qui suivent.

### 2.2.1 Représentation classique du champ exciteur et passage en notations complexes

Le champ électrique associé à une impulsion brève s'écrit typiquement sous la forme d'un champ polarisé linéairement  $E(t)$ , porté par un vecteur unitaire  $\vec{r}$ . Il peut se décomposer en produit d'une d'enveloppe  $A(t)$ , de porteuse  $\omega_o$  et de durée  $\tau$  (figure 2.3) :

$$\vec{E}(t) = E(t) \vec{r} \quad \text{et} \quad E(t) = A(t)\cos(\omega_o t) \quad (2.1)$$

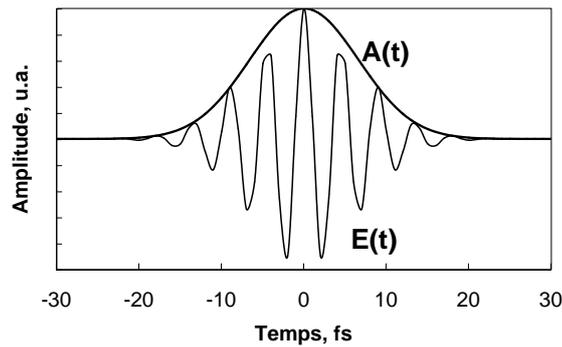


FIG. 2.3 : Représentation de l'amplitude  $A(t)$  et du champ  $E(t)$  d'une impulsion gaussienne de durée 11 fs.

Dans le domaine des fréquences, le champ s'écrit par transformée de Fourier :

$$E(\omega_o) = \int_{-\infty}^{+\infty} E(t)e^{i\omega_o t} dt = \frac{1}{2}(\underline{E}(\omega_o) + \underline{E}^*(-\omega_o)) \quad (2.2)$$

où  $\underline{E}(\omega_o)$  est le champ complexe défini par  $\underline{E}(\omega_o)=2E(\omega_o)H(\omega)$ .  $H(\omega)$  est la fonction de Heaviside définie par  $H(\omega) = 1$  si  $\omega \geq 0$ ;  $H(\omega)=0$  si  $\omega < 0$ .

Par transformée de Fourier inverse :

$$E(t) = \frac{1}{2}(\underline{E}(t) + \underline{E}^*(t)) = Re(\underline{E}(t)) \quad (2.3)$$

où le champ complexe  $\underline{E}(t)$  associé au champ réel  $E(t)$  vaut :

$$\underline{E}(t) = A(t)e^{-i\omega_o t} \quad (2.4)$$

L'intensité (ou densité de puissance) s'exprime alors :

$$I(t) = \frac{1}{2\eta_o} |\underline{E}(t)|^2 = \frac{1}{2\eta_o} |A(t)|^2 \quad et \quad I(\omega_o) = \frac{1}{2\eta_o} |\underline{E}(\omega_o)|^2 \quad (2.5)$$

avec  $\eta_o$  l'impédance du vide ( $= 377 \Omega$ ).

### 2.2.2 Modèle de l'oscillateur anharmonique à une dimension

Ce modèle simplifié va nous permettre d'esquisser les origines physiques des phénomènes non-linéaires générés dans notre expérience.

On modélise une molécule par un électron, de masse  $m$  et de charge  $e$ , élastiquement lié au noyau atomique, pouvant se déplacer suivant un axe  $\vec{x}$  (figure 2.4).

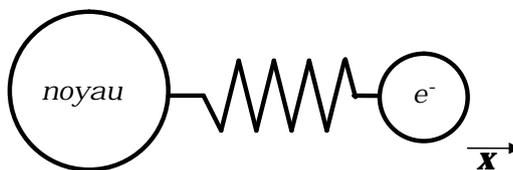


FIG. 2.4 : Modèle de l'électron élastiquement lié au noyau, pouvant se déplacer suivant l'axe  $\vec{x}$ .

Imaginons une onde électromagnétique de champ électrique  $E(t)$  incidente sur cette molécule. Le champ électrique de l'onde lumineuse induit dans le diélectrique des déplacements élémentaires de charges au niveau de la molécule, menant à l'induction dans le matériau de moments dipolaires. Une polarisation est créée.

Dans la suite nous faisons les hypothèses suivantes :

- Le modèle est unidimensionnel.
- Le noyau est fixe sous l'action du champ électrique.
- Les molécules sont alignées et isolées les unes par rapport aux autres et n'interagissent pas entre elles. Si  $p$  est la polarisation induite par une molécule, la polarisation induite par le milieu de  $N$  molécules est donc  $P = Np$ .
- Le champ électrique est supposé uniforme à l'échelle de la molécule. L'onde incidente est plane monochromatique, de fréquence  $\omega$ , d'amplitude  $E_o$  :  $E(t) = (E_o e^{-i\omega t} + E_o^* e^{i\omega t})$ .
- L'excitation est résonante, ce qui correspond à nos conditions expérimentales.
- Les effets magnétiques sont négligeables face aux effets électriques.

Faisons l'inventaire des forces auxquelles l'électron est soumis :

- la force de rappel :  $-m\omega_o^2 x$  où  $\omega_o$  dépend du matériau
- un terme d'anharmonicité du milieu, caractérisé par le terme  $\alpha$  intrinsèque au milieu :  $-m\alpha x^2$
- un terme d'amortissement  $-2m\Gamma \frac{dx}{dt}$ , avec  $\Gamma$  la constante de friction
- la force exercée par le champ électrique de l'onde :  $-eE(t)$ ,  $-e$  étant la charge négative de l'électron.

L'équation d'évolution de l'électron s'écrit :

$$\frac{d^2 x(t)}{dt^2} + 2\Gamma \frac{dx(t)}{dt} + \omega_o^2 x(t) + \alpha x^2(t) = -\frac{e}{m} E(t) \quad (2.6)$$

Pour trouver une solution générale à cette équation, on utilise un traitement perturbatif qui consiste à développer  $x(t)$  en série de puissance.

Au premier ordre de la perturbation, la réponse de l'électron au champ appliqué est linéaire (modèle de l'oscillateur harmonique), correspondant au cas  $\alpha=0$ .

$$\frac{d^2 x^{(1)}(t)}{dt^2} + 2\Gamma \frac{dx^{(1)}(t)}{dt} + \omega_o^2 x^{(1)}(t) = -\frac{e}{m} E(t) \quad (2.7)$$

Cette équation a pour solution :

$$x^{(1)}(\omega) = \frac{-e}{m} \frac{E(\omega)}{(\omega_o^2 - \omega^2 - 2i\Gamma\omega)}$$

soit en temporel  $x^{(1)}(t) = \frac{-e}{m} \frac{E_o e^{-i\omega t}}{(\omega_o^2 - \omega^2 - 2i\Gamma\omega)} + c.c.$  (2.8)

La polarisation linéaire  $P^{(1)}$  créée dans le milieu vaut

$$P^{(1)}(t) = -Nex^{(1)}(t) \quad (2.9)$$

et s'écrit en fonction de la susceptibilité linéaire  $\chi^{(1)}$ , en notant  $\epsilon_o$  la permittivité du vide :

$$P^{(1)}(t) = \epsilon_o \chi^{(1)} E(t) \quad (2.10)$$

Par identification on en déduit l'expression de  $\chi^{(1)}$  :

$$\chi^{(1)}(\omega) = \frac{Ne^2}{m\epsilon_o} \frac{1}{(\omega_o^2 - \omega^2 - 2i\Gamma\omega)} \quad (2.11)$$

Lorsque le champ électrique appliqué au système est suffisamment intense, le déplacement de l'électron ne peut plus être considéré comme linéaire. Au deuxième ordre de la perturbation (on se limite à cet ordre qui nous intéresse dans notre expérience), l'équation 2.6 devient :

$$\frac{d^2x^{(2)}(t)}{dt^2} + 2\Gamma \frac{dx^{(2)}(t)}{dt} + \omega_o^2 x^{(2)}(t) = -[\alpha x^{(1)}(t)]^2 \quad (2.12)$$

En remplaçant  $x^{(1)}(t)$  par sa valeur (équation 2.8), on trouve :

$$x^{(2)}(t) = -\frac{\alpha e^2}{m^2} \frac{E_o^2 e^{-2i\omega t}}{(\omega_o^2 - \omega^2 - 2i\Gamma\omega)^2 (\omega_o^2 - 4\omega^2 - 4i\Gamma\omega)} - \frac{\alpha e^2}{m^2} \frac{E_o}{\omega_o^2 (\omega_o^2 - \omega^2 - 2i\Gamma\omega) (\omega_o^2 - \omega^2 + 2i\Gamma\omega)} + c.c. \quad (2.13)$$

La polarisation du second ordre dans le milieu s'écrit :

$$P^{(2)}(t) = -Nex^{(2)}(t) \quad (2.14)$$

La polarisation est composée de deux termes, un oscillant à la fréquence  $2\omega$ , à l'origine de la génération de seconde harmonique, et un à la fréquence nulle (champ statique), à l'origine du

phénomène de différence de fréquences ou redressement optique.

Par définition, la susceptibilité non linéaire du deuxième ordre  $\chi^{(2)}$  du milieu exprime la polarisation  $P^{(2)}(t)$  en fonction du champ électromagnétique excitateur :

$$P^{(2)}(t) = \epsilon_o \chi^{(2)} E^2(t) \quad (2.15)$$

Ainsi,  $\chi^{(2)}$  peut être décomposé en deux termes, à la fréquence  $2\omega$  et à la fréquence nulle :

$$\chi^{(2)}(0, \omega, -\omega) = \frac{N\alpha e^3}{m^2 \epsilon_o} \frac{1}{\omega_o^2 (\omega_o^2 - \omega^2 - 2i\Gamma\omega) (\omega_o^2 - \omega^2 + 2i\Gamma\omega)} \quad (2.16)$$

$$\chi^{(2)}(2\omega, \omega, \omega) = \frac{N\alpha e^3}{m^2 \epsilon_o} \frac{1}{(\omega_o^2 - \omega^2 - 2i\Gamma\omega)^2 (\omega_o^2 - 4\omega^2 - 4i\Gamma\omega)} \quad (2.17)$$

Ce modèle simplifié permet de se rendre compte que la non-linéarité optique réside dans l'anharmonicité de la vibration représentant le mouvement de l'électron autour du noyau. Le champ excitateur provoque le mouvement lent de charges liées : une polarisation macroscopique est créée. Elle devient à son tour source d'un nouveau champ électromagnétique  $E_{NL}$ . Ce dernier a des caractéristiques spectrales et temporelles différentes fonction du phénomène non linéaire considéré.

### 2.2.3 Calcul de la polarisation induite par un champ excitateur

La polarisation reflète les propriétés optiques du système à étudier. Le principe de base pour calculer la polarisation d'ordre (n) créée dans un milieu diélectrique est le développement en série de  $E(t)$  (approche perturbative). On développe la polarisation en série jusqu'à l'ordre 2 :

$$P(t) = P^{(1)}(t) + P^{(2)}(t) \quad (2.18)$$

La polarisation linéaire  $P^{(1)}$  s'exprime par l'intermédiaire de la susceptibilité linéaire du milieu  $\chi^{(1)}$  :

$$P^{(1)}(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} \epsilon_o \chi^{(1)}(\omega) E(\omega) e^{-i\omega t} \frac{d\omega}{2\pi} \quad (2.19)$$

De la même façon la polarisation du deuxième ordre induite peut être exprimée à nouveau par

la susceptibilité non linéaire du deuxième ordre  $\chi^{(2)}$  [59] :

$$P^{(2)}(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \epsilon_o \chi^{(2)}(\omega_1, \omega_2) E(\omega_1) E(\omega_2) e^{-i(\omega_1 + \omega_2)t} \frac{d\omega_1}{2\pi} \frac{d\omega_2}{2\pi} \quad (2.20)$$

Dans le cas "instantané" ( $\chi^{(2)}$  indépendant de la fréquence), l'expression se simplifie et

$$P^{(2)}(t) = \epsilon_o \chi^{(2)} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} E(\omega_1) E(\omega_2) e^{-i(\omega_1 + \omega_2)t} \frac{d\omega_1}{2\pi} \frac{d\omega_2}{2\pi} \quad (2.21)$$

$$\text{soit } P^{(2)}(t) = \epsilon_o \chi^{(2)} E(t)^2 \quad (2.22)$$

Pour une impulsion gaussienne, ceci donne en reprenant l'expression 2.1 de  $E(t)$

$$P^2(t) = \epsilon_o \chi^{(2)} \left( \frac{A(t)^2}{2} + \frac{A(t)^2}{2} \cos(2\omega_o t) \right) \quad (2.23)$$

Cette polarisation non linéaire du deuxième ordre créée est représentée figure 2.5. Le deuxième terme, avec une fréquence porteuse de  $2\omega_o$ , représente la génération de seconde harmonique. Le premier terme, centré sur la fréquence nulle, a une largeur spectrale proportionnelle à l'auto-convolution du spectre incident, donc d'autant plus large que l'impulsion excitatrice est courte. Il est égal à la moyenne de la polarisation induite sur un cycle optique, non nul du fait de la non centrosymétrie du milieu. La polarisation créée par ce phénomène pointe toujours dans le même sens, d'où le nom de redressement optique; son amplitude est proportionnelle à l'intensité excitatrice, et donc au carré du champ exciteur.

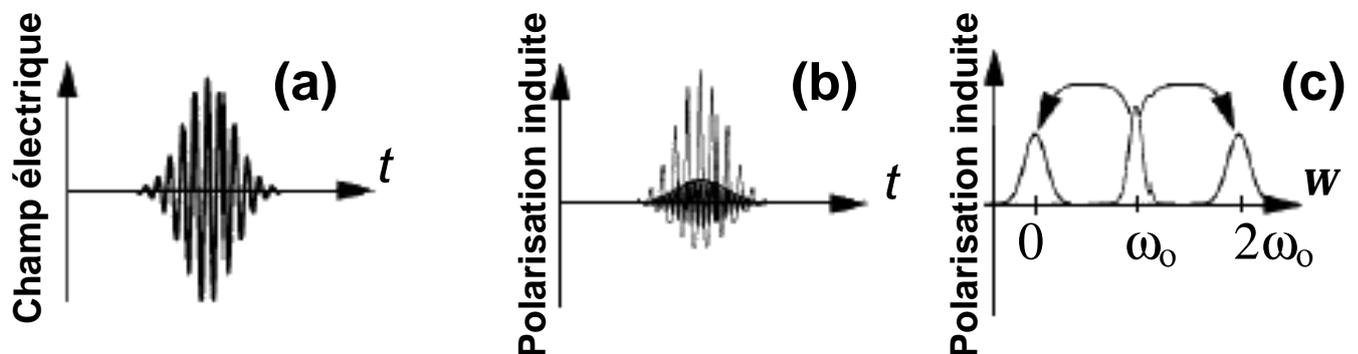


FIG. 2.5 : Champ électrique  $E(t)$  incident (a) et polarisation induite représentée temporellement (b) et spectralement (c). La polarisation présente une composante rapide et une composante lente, l'une centrée sur  $2\omega_o$  et l'autre sur la fréquence nulle, adapté de [60])

Dans notre expérience, l'échantillon de bactériorhodopsine étudié est excité en régime impulsionnel en résonance ; il est alors approprié d'utiliser le formalisme de l'opérateur densité (chapitre 4) pour obtenir  $\chi^{(2)}$  en fonction de la fréquence et ainsi une description complète de la dynamique.

## 2.3 Source infrarouge femtoseconde par redressement optique

Dans les parties qui suivent nous allons voir comment la polarisation créée par le phénomène de redressement optique va donner lieu à une émission infrarouge dans le domaine THz, et caractériser cette émission en fonction du milieu source choisi.

### 2.3.1 Impulsion électromagnétique générée par variation rapide de la polarisation

Nous allons montrer dans cette partie comment une variation rapide de polarisation peut permettre l'émission d'une onde électromagnétique [60] (figure 2.6). Ce phénomène fut déjà observé par Hertz au XIX<sup>ème</sup> siècle [61], à l'aide d'une étincelle dans un éclateur : une variation rapide de polarisation va agir comme un terme source dans les équations de Maxwell et permettre la génération d'une onde électromagnétique ; le champ émis aura un spectre large centré en une fréquence inversement proportionnelle à la durée  $T$  du transitoire. Les différentes composantes fréquentielles sont émises en phase, l'émission large bande ainsi émise est cohérente.

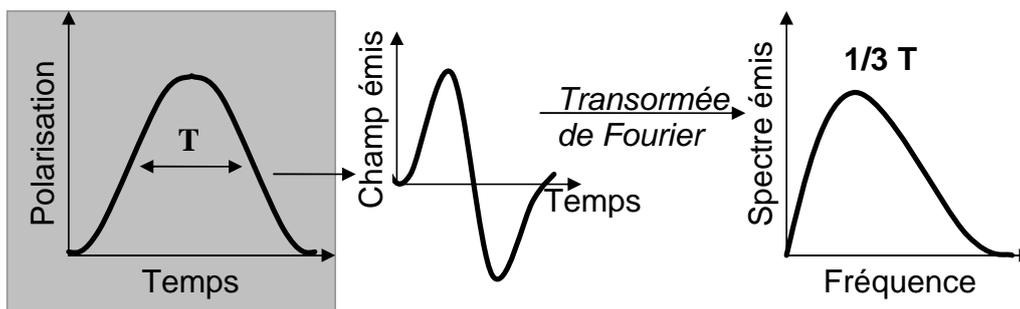


FIG. 2.6 : Variation rapide de polarisation de durée  $T$  et spectre électromagnétique émis, centré en  $\frac{1}{3T}$ .

Dans le cas de Hertz, la polarisation était obtenue par une variation de courant de durée de transitoire de l'ordre de la nanoseconde, amenant à la génération d'ondes hertziennes ou radio. Deux techniques existent pour obtenir des variations de polarisation rapide : la commutation photoconductrice et le redressement optique. Nous décrivons seulement brièvement la première solution car nous allons par la suite utiliser seulement le redressement optique pour la génération infrarouge.

La commutation photoconductrice [62, 63, 64] consiste à focaliser une impulsion lumineuse ultrabrève sur un commutateur optoélectronique alimenté par une tension continue. À l'arrivée de l'impulsion lumineuse, le commutateur initialement isolant devient conducteur et la tension à ses bornes diminue : une polarisation transitoire est créée. Les spectres obtenus avec cette méthode s'étendent au mieux à 3 THz car les temps de réponse des commutateurs utilisés sont

au mieux de 100fs.

Le redressement optique, dont le principe a été expliqué plus en détail dans le paragraphe 2.2.3, a d'abord été utilisé dans les années 70 par Yang et al. [65] en utilisant un matériau électro-optique ( $\text{LiNbO}_3$ ) avec des impulsions picosecondes. Ils ont obtenu des émissions dans l'infrarouge lointain. L'arrivée de lasers femtoseconde a permis, de par des durées de transitoire beaucoup plus faibles, des émissions à des fréquences bien plus élevées dans le domaine des THz à partir de semiconducteurs [66, 67, 68] et de matériaux organiques [69].

### 2.3.2 Caractéristiques du champ rayonné associé à la polarisation induite

Le champ rayonné suite à une variation rapide de polarisation par redressement optique n'aura pas les mêmes caractéristiques spectrales et temporelles en fonction du milieu source utilisé; deux approximations différentes et mutuellement exclusives peuvent être faites :

1. L'approximation dipolaire (figure 2.7) : dans ce cas le champ est étudié à grande distance du volume émetteur parcouru de charges en mouvement et les dimensions de l'émetteur sont faibles par rapport aux longueurs d'ondes d'émission.

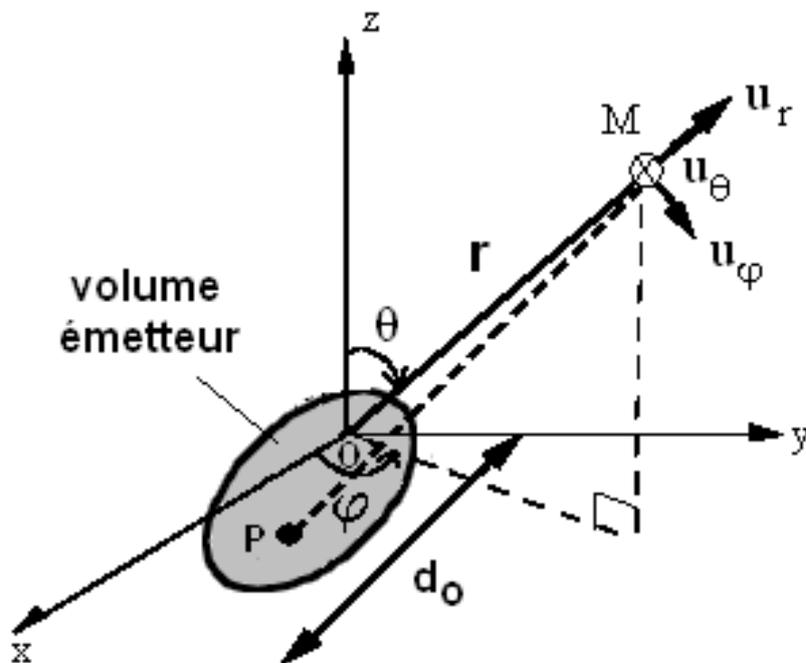


FIG. 2.7 : Représentation du volume émetteur. Le point d'observation est noté M tel que  $\|\vec{OM}\|=r$ . O est pris comme origine dans le volume. Dans l'approximation dipolaire,  $\|\vec{OM}\|\approx\|\vec{PM}\|$ , pour tout point P appartenant au volume source.  $d_0$  est un majorant de la distance  $\|\vec{OP}\|$ .

Cette approximation dipolaire impose  $r=OM \gg d_0$ ,  $d_0$  étant la plus grande dimension de l'antenne. La condition sur la dimension de la source impose que le mouvement de la charge est non relativiste, car dans ce cas la vitesse  $d_0\omega \ll c$ ,  $c$  étant la vitesse de la lumière, ou encore  $z_0 \ll \lambda$ .  $\lambda$  et  $\omega$  sont respectivement les longueurs d'onde et fréquences émises. L'émetteur prend le nom d'antenne émettrice. Le champ infrarouge émis est directement proportionnel à la dérivée seconde de la polarisation (calcul détaillé dans l'annexe B et tracé figure 2.8) soit en notation réelle :

$$\vec{E}_{IR}(\vec{r}, t) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{1}{rc^2} \frac{\partial^2 P(t-r/c)}{\partial t^2} \sin(\theta) \vec{u}_\theta \quad (2.24)$$

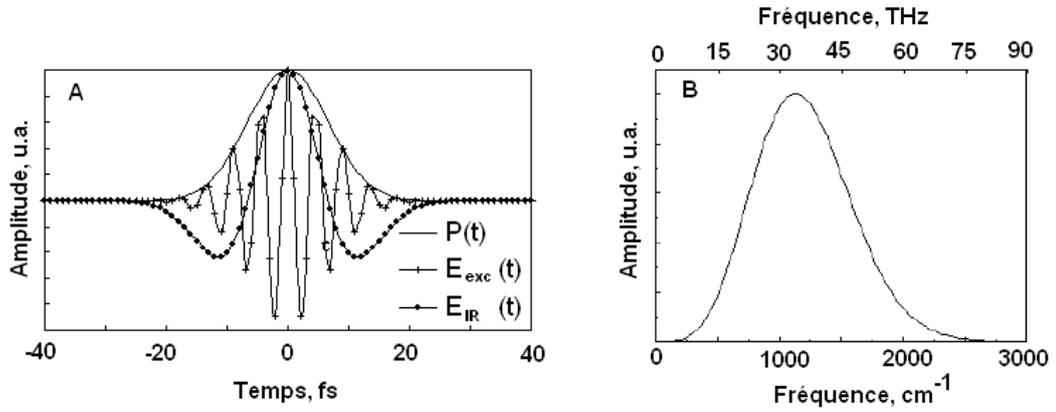


FIG. 2.8 : Champ infrarouge  $E_{IR}$  émis suite à une variation de polarisation  $P$  induite par l'excitation par une impulsion gaussienne  $E_{exc}$  ultrabrève (11 fs) d'un point source, dans le domaine temporel (A) et fréquentiel (B). On s'est placé dans le cas instantané, pour lequel la polarisation induite par redressement optique est proportionnelle à l'intensité  $I(t)$  de l'impulsion (équation 2.23).

2. L'approximation en ondes planes : on fait l'hypothèse d'une source répartie uniformément suivant un plan  $(x,y)$  (figure 2.9).

L'équation de propagation, découlant des équations de Maxwell dans un milieu diélectrique isotrope d'indice  $n(\omega)$  est :

$$\Delta \vec{E}(\vec{r}, t) - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}(\vec{r}, t)}{\partial t^2} = \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{P}^{(NL)}(\vec{r}, t)}{\partial t^2} \quad (2.25)$$

L'onde se propage suivant l'axe unitaire  $\vec{u}_z$ , donc l'équation de propagation se simplifie :

$$\Delta \underline{E}(z, t) - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \underline{E}(z, t)}{\partial t^2} = \mu_0 \frac{\partial^2 \underline{P}^{(NL)}(z, t)}{\partial t^2} \quad (2.26)$$

Par transformée de Fourier :

$$\frac{\partial^2 \underline{E}(z, \omega)}{\partial z^2} + k(\omega)^2 \underline{E}(z, \omega) = -\mu_o \omega^2 \underline{P}^{(NL)}(z, \omega) \quad (2.27)$$

avec  $k(\omega) = \frac{n(\omega)\omega}{c}$  le vecteur d'onde dans le milieu.

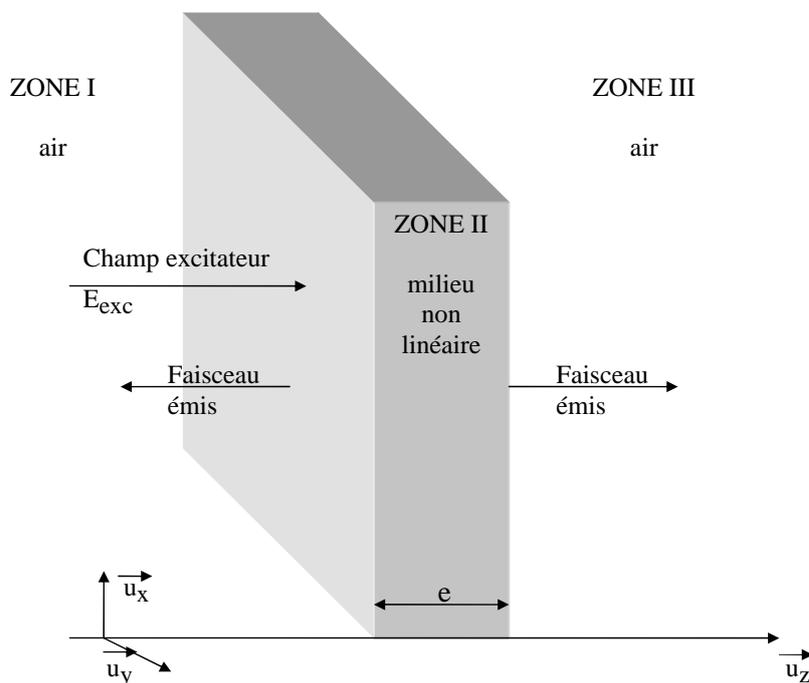


FIG. 2.9 : Milieu d'épaisseur  $e$ , excité par une impulsion femtoseconde de champ  $E_{exc}$ .

Maintenant que l'équation générale est établie, nous allons distinguer des sources de différentes géométries se rapprochant de nos conditions expérimentales. Nous allons considérer deux cas extrêmes facilement modélisables et proches de nos conditions expérimentales.

### 2.3.2.1 Milieu plan infiniment mince

Le milieu étant infiniment mince, on peut négliger les effets de dispersion. On est dans le cas  $e \ll \lambda$ ,  $\lambda$  étant la longueur d'onde d'émission. Le milieu est non centrosymétrique, nous ne nous intéressons qu'aux effets non linéaires du deuxième ordre. Nous allons calculer le champ émis dans les trois zones représentées sur la figure 2.9.

ZONE I ET III,  $|z| > \frac{e}{2}$  :

On prend l'indice de l'air  $n_{air} \approx 1$ . La polarisation  $P(z, \omega)$  est nulle en dehors de l'échantillon, donc l'équation 2.27 devient :

$$k^2 \underline{E}_{IR}(z, \omega) + \frac{\partial^2 \underline{E}_{IR}(z, \omega)}{\partial z^2} = 0 \quad (2.28)$$

Le milieu étant infiniment mince, l'émission est symétrique par rapport à  $z=0$ , le champ électrique est une fonction paire de  $z$ . Deux ondes progressives sont émises :

$$\text{Zone I : } \underline{E}_{IR}(z, \omega) = B' e^{(-i\frac{\omega}{c}z)} \quad (2.29)$$

$$\text{Zone III : } \underline{E}_{IR}(z, \omega) = B e^{(i\frac{\omega}{c}z)} \quad (2.30)$$

où  $B$  et  $B'$  dépendent de  $\omega$ .

ZONE II,  $-\frac{e}{2} < z < \frac{e}{2}$  :

Reprenons l'équation générale 2.27. Comme  $e \ll \lambda$ , la polarisation générée ne dépend pas de  $z$  et on peut écrire  $\underline{P}(z, \omega) \approx \underline{P}(0, \omega)$ , notée  $\underline{P}(\omega)$ , et on suppose  $k$  constant. Les phénomènes de propagation peuvent être négligés ( $k^2 \underline{E}_{IR}(z, \omega) \ll \frac{\partial^2 \underline{E}_{IR}(z, \omega)}{\partial z^2}$ ) donc l'équation 2.27 devient :

$$\frac{\partial^2 \underline{E}_{IR}(z, \omega)}{\partial z^2} = -\mu_o \omega^2 \underline{P}(\omega) \quad (2.31)$$

Par parité, la solution de cette équation est de la forme :

$$\underline{E}_{IR}(z, \omega) = -\mu_o \omega^2 \underline{P}(\omega) \left( \frac{z^2}{2} + A \right) \quad (2.32)$$

Les constantes  $A$ ,  $B$  et  $B'$  se calculent en écrivant la continuité du champ électrique et de sa dérivée en  $z = \pm \frac{e}{2}$ .

En utilisant les équations 2.29 et 2.30, la continuité du champ électrique en  $z = \pm \frac{e}{2}$  :

en  $z = \frac{e}{2}$  :  $-\mu_o \omega^2 \underline{P}(\omega) \left( \frac{e^2}{8} + A \right) = B e^{(i\frac{\omega e}{2c})} \approx B$  car  $e$  est supposé infiniment petit.

en  $z = -\frac{e}{2}$  :  $-\mu_o \omega^2 \underline{P}(\omega) \left( \frac{e^2}{8} + A \right) = B e^{-(i\frac{\omega e}{2c})} \approx B'$

Quant à la continuité de la dérivée du champ électrique en  $z = \pm \frac{e}{2}$  :

$$\text{en } z = \frac{e}{2} : -\mu_o \omega^2 \underline{P}(\omega) \frac{e}{2} = B i \frac{\omega}{c} \quad (2.33)$$

$$\text{en } z = -\frac{e}{2} : -\mu_o \omega^2 \underline{P}(\omega) \frac{e}{2} = B' i \frac{\omega}{c} \quad (2.34)$$

$$\text{donc } B = B' = \mu_o c i \omega \underline{P}(\omega) \frac{e}{2} = \frac{i \omega \underline{P}(\omega) e}{2 \epsilon_o c} \quad (2.35)$$

Pour  $z > \frac{e}{2}$ , l'expression de la transformée de Fourier du champ émis est donc

$$\underline{E}_{IR}(z, \omega) = \frac{i \omega \underline{P}(\omega) e}{2 \epsilon_o c} e^{-i \frac{\omega}{c} z} \quad (2.36)$$

Par transformée de Fourier inverse :

$$\underline{E}_{IR}(z, t) = -\frac{e}{2 \epsilon_o c} \frac{\partial \underline{P}}{\partial t} \left( t - \frac{z}{c} \right) \quad (2.37)$$

L'onde infrarouge qui se propage est donc proportionnelle à la dérivée première de la polarisation qui lui a donné naissance. Dans le cas d'une impulsion excitatrice gaussienne, le champ rayonné est alors un monocycle infrarouge (figure 2.10).

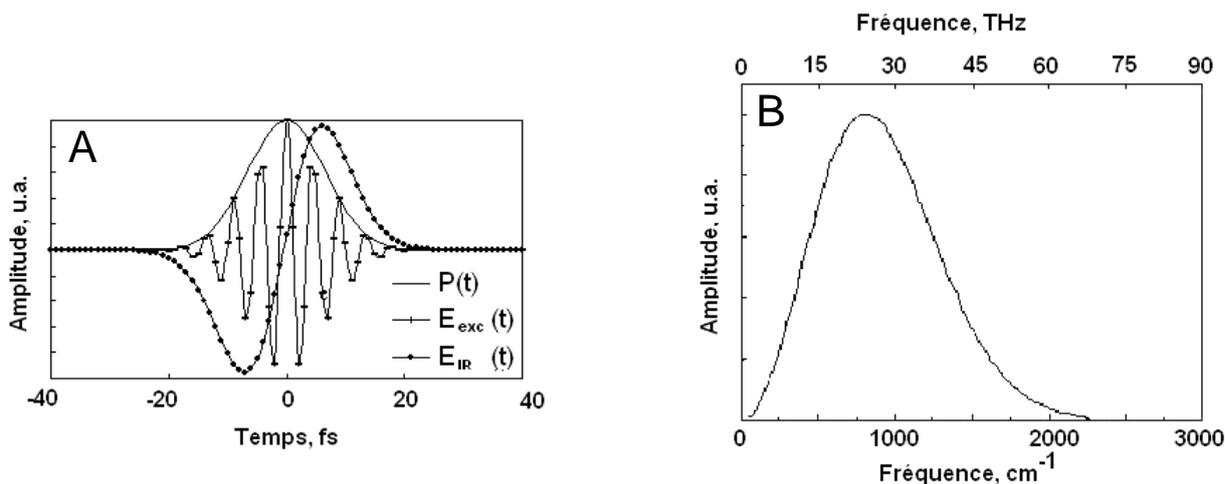


FIG. 2.10 : Champ infrarouge  $E_{IR}$  émis suite à une variation de polarisation  $P(t)$  (calculée dans le cas instantané) induite par l'excitation par une impulsion gaussienne ultrabrève (11fs) d'un échantillon infiniment mince non linéaire, non centrosymétrique. Représentation dans les domaines temporel (A) et fréquentiel (B).

### 2.3.2.2 Propagation dans un milieu épais

Nous allons maintenant considérer le cas d'un milieu épais sans accord de phase. L'épaisseur  $e$  du milieu est grande devant les longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Expliquons dans un premier temps les phénomènes à partir de la figure 2.11.

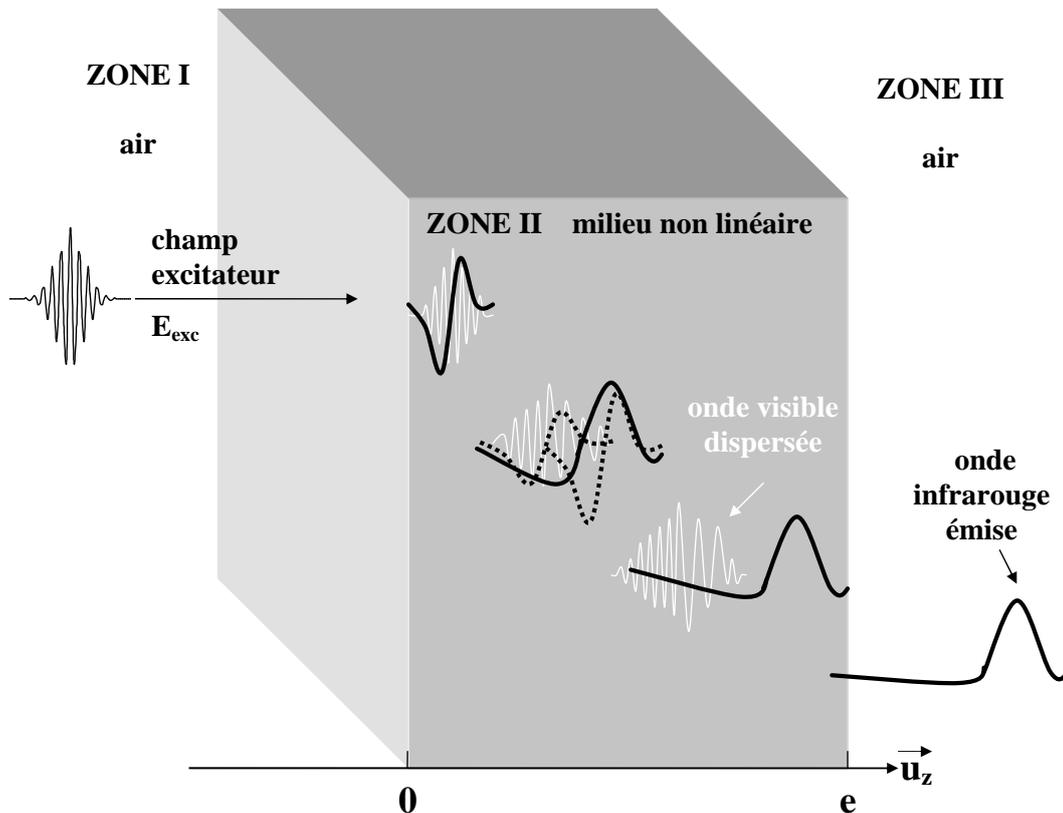


FIG. 2.11 : Modélisation des impulsions infrarouges générées après excitation par une impulsion femtoseconde de champ  $E_{exc}$  d'un milieu épais sans accord de phase.

Le faisceau visible excitateur génère dans le matériau, au niveau de la face d'entrée, une polarisation non linéaire qui émet un monocycle infrarouge. Cette émission infrarouge se propage dans le milieu à une vitesse différente de celle de l'onde visible. En se propageant, l'onde visible continue à générer un monocycle infrarouge ; le front avant de ce monocycle interfère destructivement avec le front arrière du monocycle infrarouge créé au niveau de la face d'entrée, sur une longueur  $L_{eff}$ , jusqu'à ce que la cohérence entre ces deux monocycles soit perdue ; il ne reste alors plus qu'un demi-cycle infrarouge qui, en tenant compte des facteurs de transmission de la face d'entrée pour une incidence normale, s'écrit [60]

$$E_{IR}(t) = \frac{1 + n_v}{\epsilon_o(n_v + n_{IR})(1 + n_{IR})} \frac{L_{eff}}{cT} P^{(2)}(t) \quad (2.38)$$

en notant  $n_{IR}$  et  $n_v$  les indices de réfraction dans l'infrarouge et le visible respectivement,  $T$  la

durée de l'impulsion visible excitatrice.  $P^{(2)}$  est la polarisation générée sur la face d'entrée et s'écrit dans le cas instantané (équation 2.23) :

$$P^{(2)}(t) = \epsilon_o \chi^{(2)} \frac{|\underline{E}(t)|^2}{2}$$

soit 
$$E_{IR}(t) = \frac{(1 + n_v) L_{eff} \chi^{(2)} |\underline{E}(t)|^2}{2c\Gamma(n_v + n_{IR})(1 + n_{IR})} \quad (2.39)$$

La durée de l'impulsion visible se propageant dans le milieu est fortement rallongée par le phénomène de dispersion, donc la génération d'infrarouge ne se fait que sur une épaisseur très faible. En sortie, le champ infrarouge généré est proportionnel à la polarisation qui lui a donné naissance, c'est à dire à l'enveloppe de l'impulsion excitatrice dans le cas d'un matériau instantané.

Passons maintenant au traitement formel du phénomène. Dans l'approximation en ondes planes, le champ électrique se décompose sous la forme d'une enveloppe  $A(z, \omega)$  et d'une porteuse  $e^{ik(\omega)z}$  :  $\underline{E}(z, \omega) = A(z, \omega) e^{ik(\omega)z}$ .

L'équation 2.27 devient :

$$\frac{\partial^2 A(z, \omega)}{\partial z^2} e^{ik(\omega)z} - 2ik(\omega) \frac{\partial A}{\partial z} e^{ik(\omega)z} = -\mu_o \omega^2 \underline{P}^{(NL)}(z, \omega) \quad (2.40)$$

L'approximation paraxiale revient à supposer que l'enveloppe du champ varie lentement selon  $z$  à l'échelle de la longueur d'onde ( $\frac{\partial^2 A}{\partial z^2} \ll k \frac{\partial A}{\partial z}$ ) ce qui simplifie l'équation précédente :

$$\frac{\partial \underline{A}(z, \omega)}{\partial z} = \frac{i\mu_o c}{2n(\omega)} \omega \underline{P}^{(NL)}(z, \omega) \quad (2.41)$$

Or  $\frac{\partial \underline{E}}{\partial z} = \frac{\partial A(z, \omega)}{\partial z} + ik(\omega) A(z, \omega) e^{ik(\omega)z}$ , donc on peut écrire l'équation 2.41 directement en fonction du champ complexe :

$$\frac{\partial \underline{E}(z, \omega)}{\partial z} - ik(\omega) \underline{E}(z, \omega) = \frac{i\mu_o c}{2n(\omega)} \omega \underline{P}^{(NL)}(z, \omega) \quad (2.42)$$

Le champ infrarouge émis va dépendre des non linéarités et des phénomènes de dispersion dans l'échantillon. Afin de pouvoir séparer ces deux contributions, on décompose à nouveau  $\underline{E}(z, t)$  en produit d'une enveloppe variant lentement  $A(z, t)$  et d'une porteuse centrée à la fréquence

$\omega_o$  et au vecteur d'onde  $k_o$  de l'onde incidente :

$$\underline{E}(z, t) = A(z, t)e^{(ik_o z - \omega_o t)} \quad (2.43)$$

Dans le domaine spectral, le champ s'écrit

$$\underline{E}(z, \omega) = A(z, \omega - \omega_o)e^{(ik_o z)} \quad (2.44)$$

En dérivant  $A(z, t)$  par rapport à  $z$ , et par le changement de variable  $\omega - \omega_o \rightarrow \omega_o$ , on obtient l'équation 2.45 :

$$\frac{\partial A(z, \omega)}{\partial z} = \underbrace{i(k(\omega + \omega_o) - k_o)A(z, \omega)}_{\text{effets dispersifs}} + \underbrace{\frac{i\mu_o c}{2n(\omega)}\omega P^{(N)}(z, \omega)}_{\text{effets non linéaires}} \quad (2.45)$$

L'équation de propagation s'écrit sous la forme

$$\frac{\partial A(z, \omega)}{\partial z} = (\hat{D} + \hat{N})A(z, \omega) \quad (2.46)$$

L'opérateur  $\hat{D}$  tient compte des effets de dispersion et d'absorption linéaire, tandis que  $\hat{N}$  prend en compte les effets non linéaires. Pour résoudre cette équation, nous avons utilisé la méthode dite de Split-Step (développé par M. Joffre dans le laboratoire).

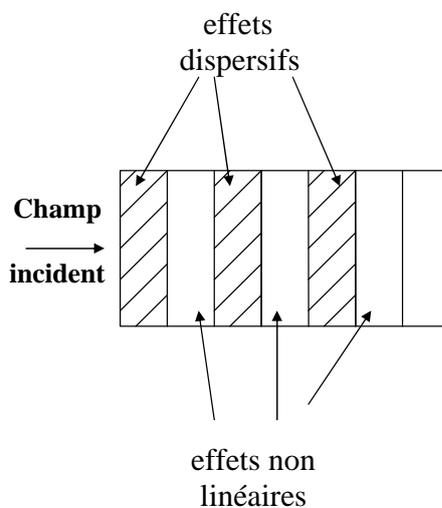


FIG. 2.12 : Principe de la méthode dite de Split-Step.

Cette méthode permet de modéliser les différents phénomènes d'interaction de l'onde avec le milieu de propagation et ainsi de calculer le champ en sortie des échantillons. Le principe à la base est l'utilisation des algorithmes de transformée de Fourier rapide pour calculer la propagation d'impulsions dans un milieu dispersif non linéaire, en découpant le milieu en tranches fines (d'épaisseur bien inférieure aux épaisseurs caractéristiques de variation des effets dispersifs et non linéaires) permettant de dissocier les effets dispersifs des effets non linéaires (figure 2.12). Les contributions des effets respectifs dans chaque tranche sont déterminées à partir des équations de propagation.

1. *Effets de la dispersion seule.* L'effet de la dispersion est évalué directement dans le domaine fréquentiel par la relation

$$\frac{\partial A(z, \omega)}{\partial z} = i(k(\omega + \omega_o) - k_o)A(z, \omega)$$

soit  $A(z, \omega) = \exp(i(k(\omega + \omega_o) - k_o)z)A(0, \omega)$  (2.47)

2. *Effets non linéaires seuls.* Le champ qui se propage dans les tranches est calculé de proche en proche :

$$A(z + dz, \omega) = A(z, \omega) + \frac{i\mu_o cdz}{2n(\omega)}\omega \underline{P}^{NL}(z, \omega)$$
 (2.48)

Dans nos échantillons, outre la présence de la non linéarité du deuxième ordre, il peut également y avoir des effets non linéaires du troisième ordre (effet Kerr et absorption à deux photons).

- L'effet de la non-linéarité du troisième ordre sur la propagation du faisceau visible est évalué dans le domaine temporel. On suppose  $\chi^{(3)}$  instantané et  $\frac{\omega}{n(\omega)} \approx \frac{\omega_o}{n(\omega_o)}$ . La polarisation du troisième ordre créée dans le milieu s'écrit :

$$P^{(3)}(z, t) = \epsilon_o \chi^{(3)} E(z, t)^3$$
 (2.49)

Le champ incident se décompose sur les axes du cristal, respectivement selon ses composantes ordinaire  $\underline{E}_o$  et extraordinaire  $\underline{E}_e$  (dans toute la suite de ce paragraphe, les indices o et e correspondent aux directions ordinaires ou extraordinaire respectivement).

$$P^{(3)}(z, t) = \epsilon_o \chi^{(3)} (\underline{E}_o(z, t) + \underline{E}_o(z, t)^* + \underline{E}_e(z, t) + \underline{E}_e(z, t)^*)^3$$
 (2.50)

En supposant que la susceptibilité non linéaire du troisième ordre est isotrope, on obtient [70] :

$$\underline{P}_e^{(3)}(z, t) = \frac{3\epsilon_o \chi^{(3)}}{4} (2|\underline{E}_o(z, t)|^2 + |\underline{E}_e(z, t)|^2)\underline{E}_e$$
 (2.51)

pour la polarisation induite selon l'axe extraordinaire et

$$\underline{P}_o^{(3)}(z, t) = \frac{3\epsilon_o\chi^{(3)}}{4}(2|\underline{E}_e(z, t)|^2 + |\underline{E}_o(z, t)|^2)\underline{E}_o \quad (2.52)$$

pour la polarisation induite selon l'axe ordinaire.

On en déduit par l'équation 2.45, en notant  $\mathbf{F}$  la transformée de Fourier :

$$\frac{\partial A_o(z, \omega)}{\partial z} = (-\gamma' + i\gamma'')\mathbf{F} [ |A_o(z, t)|^2 + 2|A_e(z, t)|^2 ] A_o(z, t) \quad (2.53)$$

$$\frac{\partial A_e(z, \omega)}{\partial z} = (-\gamma' + i\gamma'')\mathbf{F} [ |A_e(z, t)|^2 + 2|A_o(z, t)|^2 ] A_e(z, t) \quad (2.54)$$

avec

$$-\gamma' + i\gamma'' = i\frac{3\omega_o\chi^{(3)}}{8n(\omega_o)c} \quad (2.55)$$

$\gamma'$  est associé à l'absorption à deux photons et  $\gamma''$  à l'effet Kerr.

L'équation 2.54 se résout directement par un changement de variable  $A = Be^{i\phi}$  ( $B$  et  $\phi$  réels) et a pour solution :

$$A_e(z) = A(0, t)\exp\left\{\left(-\frac{1}{2} + i\frac{\gamma''}{2\gamma'}\right)\ln(1 + 2\gamma' [ |A_e(0, t)|^2 + 2|A_o(0, t)|^2 ] z)\right\} \quad (2.56)$$

$$A_o(z) = A(0)\exp\left\{\left(-\frac{1}{2} + i\frac{\gamma''}{2\gamma'}\right)\ln(1 + 2\gamma' [ |A_o(0, t)|^2 + 2|A_e(0, t)|^2 ] z)\right\} \quad (2.57)$$

pour les polarisations respectivement extraordinaire et ordinaire.

- L'effet de la non-linéarité du deuxième ordre sur la propagation du faisceau visible est évalué dans les domaines temporel et fréquentiel pour simplifier les calculs. En ne conservant que les termes correspondant au redressement optique et dans le cas d'un accord de phase de type II (configuration eoe), la polarisation s'écrit

$$\begin{aligned} P^{(2)}(z, t) &= \frac{\epsilon_o\chi^{(2)}}{2} |\underline{E}_e + \underline{E}_o + c.c|^2 \\ &= \epsilon_o\chi^{(2)} [ \underline{E}_e(z, t)\underline{E}_o(z, t)^* + c.c ] \end{aligned} \quad (2.58)$$

Par transformée de Fourier inverse on repasse dans le domaine spectral et on applique l'équation

2.48 :

$$\underline{E}(z + dz) = \underline{E}(z, \omega) + \frac{i\omega dz}{2n(\omega)\epsilon_0 c} P^{(2)}(z, \omega) \quad (2.59)$$

Nous avons calculé le champ infrarouge émis par un cristal d'AgGaS<sub>2</sub> (Sulfure d'Argent et de Gallium ou Thiogallate d'Argent), utilisé dans nos expériences. Le champ obtenu avec cette méthode (figure 2.13) est en très bon accord avec l'explication physique donnée plus haut. Le champ infrarouge émis est proportionnel à la polarisation créée. Nous avons également vérifié l'effet des non linéarités du troisième ordre dans le cas de l'AgGaS<sub>2</sub> (évaluées expérimentalement chapitre 4) sur les caractéristiques spectrale et temporelle du champ émis : il reste négligeable dans nos conditions expérimentales.

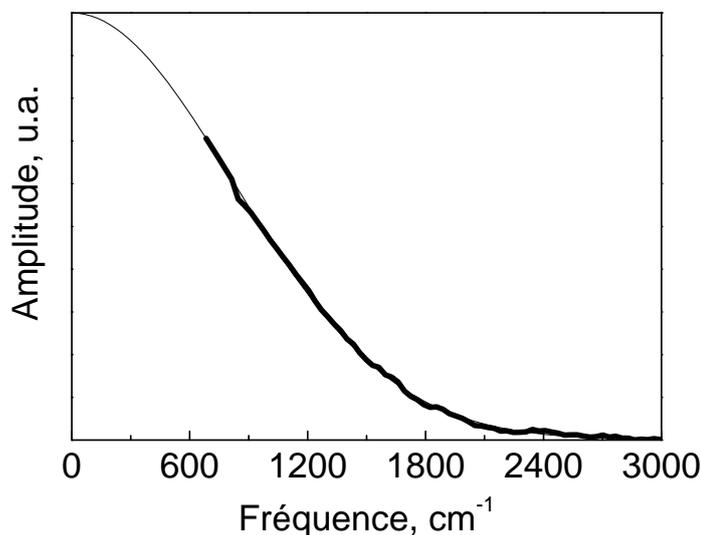


FIG. 2.13 : Trait fin : spectre de la polarisation induite dans le matériau pour un faisceau supposé gaussien, de durée 11 fs. On s'est placé dans le cas instantané (la polarisation est proportionnelle à l'enveloppe du champ excitateur). Trait épais : modélisation dans la zone spectrale qui nous intéresse du champ infrarouge émis par un cristal d'AgGaS<sub>2</sub> d'épaisseur 1 mm, en utilisant la méthode du Split-Step avec un nombre de pas de 800. L'échantillon est supposé excité par une impulsion gaussienne de 11 fs centrée à 560 nm (les caractéristiques du milieu correspondent à celles de l'AgGaS<sub>2</sub> utilisé dans nos expériences). On voit que le champ émis calculé se superpose à la polarisation non linéaire induite. Le champ infrarouge émis est donc proportionnel à la polarisation induite dans le milieu.

En résumé le champ émis  $E_{IR}$  peut être proportionnel à  $P(t)$ ,  $\frac{\partial P(t)}{\partial t}$ , ou  $\frac{\partial^2 P(t)}{\partial t^2}$ , suivant les approximations expérimentales. En pratique, nous focalisons les faisceaux excitateurs au minimum sur un diamètre de 50  $\mu\text{m}$  : comme la longueur d'onde émise vaut autour de 10  $\mu\text{m}$ , l'approximation dipolaire n'est donc pas valable et seuls les deux premiers cas sont applicables.

### 2.3.3 Matériaux utilisés pour la génération d'infrarouge

Les parties précédentes de ce chapitre ont exposé le principe de la génération d'une impulsion infrarouge par variation rapide de la polarisation. Cette méthode va nous permettre de créer une émission infrarouge :

- dans des semiconducteurs et cristaux non linéaires (cristal d'Arseniure de Gallium-GaAs- et de Sulfure d'Argent et de Gallium -AgGaS<sub>2</sub>-) : cette émission infrarouge, bien caractérisée, va servir d'onde de référence (voir partie 2.4.1.2) ;
- dans des échantillons de bactériorhodopsine orientés (chapitre 4) : elle va également émettre dans l'infrarouge par redressement optique. C'est cette émission infrarouge, détectée entre 3 et 15  $\mu\text{m}$ , que l'on va chercher à caractériser.

## 2.4 Détection interférométrique de l'émission infrarouge

### 2.4.1 Méthode de détection du champ émis

La première contrainte expérimentale est d'utiliser une méthode de détection de résolution temporelle inférieure à la centaine de femtosecondes afin de pouvoir résoudre la polarisation sur une échelle de temps plus courte que l'isomérisation du rétinol (paragraphe 2.1). Deux méthodes spécifiques de détection de champs térahertz peuvent être utilisées [66]. Nous allons les passer en revue pour comprendre le choix expérimental effectué. Chacune de ces méthodes étant directement sensible au champ, l'émission infrarouge est complètement caractérisée.

#### 2.4.1.1 Détection électro-optique

Le champ émis par la bactériorhodopsine peut être détecté en utilisant directement un échantillonnage par effet électro-optique ou effet Pockels [53, 71]. Cet effet consiste en une variation des indices de réfraction du matériau électro-optique proportionnelle à un champ statique le traversant [72]. Suite à l'arrivée d'un faisceau visible exciteur, le photovoltage créé dans un échantillon de bactériorhodopsine orienté est transmis à un cristal électro-optique, dont les indices de réfraction sont modifiés proportionnellement au champ statique le traversant [72]. Une autre partie du faisceau visible, parfaitement synchronisée avec la première, est utilisée pour la détection (faisceau sonde) : sa direction de polarisation est modifiée lors de sa traversée du matériau, proportionnellement aux variations du champ incident. En utilisant un analyseur, la variation de polarisation est directement convertie en variation de puissance optique qui permet ainsi de remonter aux caractéristiques du champ infrarouge, tant que la durée du faisceau visible utilisé pour l'échantillonnage est courte devant l'échelle de temps de variation du faisceau infrarouge.

Cette méthode n'est pas optimale dans notre cas :

- Les conditions expérimentales sont très critiques pour obtenir un rapport de conversion suffisant (stabilité des faisceaux visibles, homogénéité de l'échantillon étudié).
- La résolution temporelle du milieu est limitée par la largeur de l'impulsion et le temps de passage de l'impulsion sonde dans le matériau électro-optique, c'est à dire autour de quelques centaines de femtosecondes pour un matériau électro-optique de 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur.

En revanche, l'avantage de cette méthode est la possibilité de détecter de très basses fréquences.

#### 2.4.1.2 Interférométrie infrarouge/infrarouge

Cette méthode est celle retenue. Le principe est de créer deux émissions térahertz qui vont interférer au niveau d'un détecteur. La bande passante de détection est déterminée par la fenêtre de sensibilité du détecteur aux basses fréquences, et par la largeur spectrale effective des faisceaux générateurs d'infrarouge de l'autre côté.

Le signal infrarouge  $E_{signal}$  émis par la bactériorhodopsine (bR) est détecté en le faisant interférer avec un signal infrarouge de référence  $E_{réf}$ , généré par du GaAs ou de l'AgGaS<sub>2</sub> (figure 2.14).

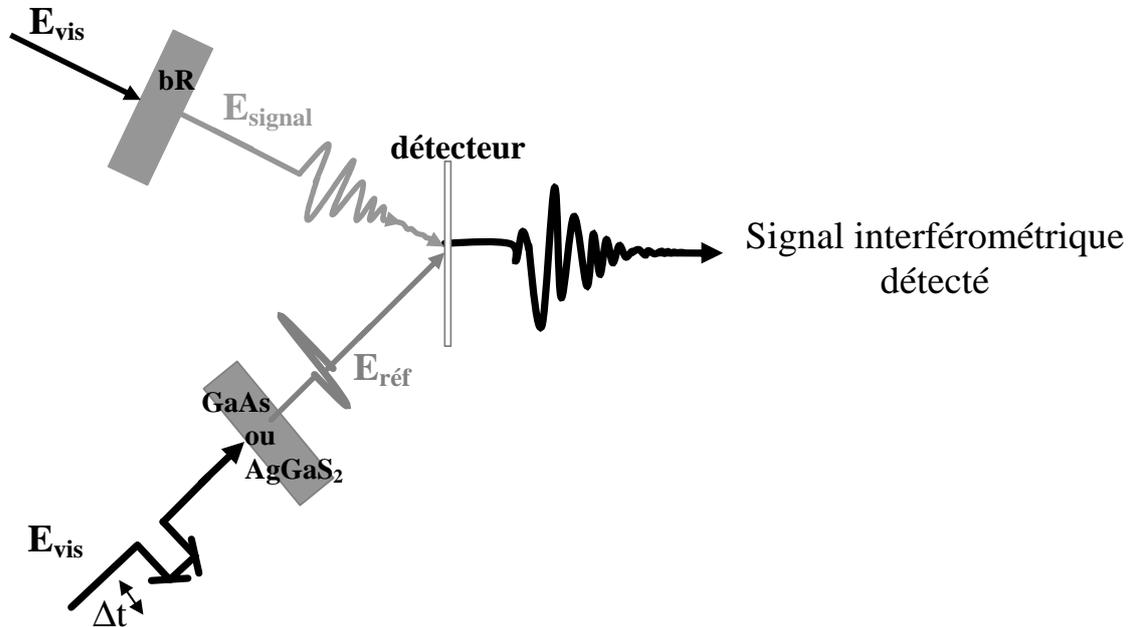


FIG. 2.14 : Schéma de principe de l'expérience.

Les deux faisceaux infrarouges interfèrent en variant le délai  $\Delta t$  entre les deux impulsions visibles qui leur ont donné naissance. Elles sont en configuration légèrement non colinéaire pour s'affranchir de termes croisés indésirables [60, 73].

Les faisceaux visibles sont supposés gaussiens, et les notations complexes utilisées sont celles du paragraphe 2.2.1. Le signal mesuré au niveau du détecteur vaut :

$$\begin{aligned}
 S(\Delta t) &= \frac{1}{2} \int_{-\infty}^{+\infty} | \vec{E}_{réf}(t - \Delta t) + \vec{E}_{signal}(t) |^2 dt \\
 &= I_{réf} + I_{signal} + Re \left( \int_{-\infty}^{+\infty} \vec{E}_{réf}^*(t - \Delta t) \vec{E}_{signal}(t) dt \right)
 \end{aligned}
 \tag{2.60}$$

Le signal utile  $S_{utile}$  détecté est le dernier terme d'interférence. Les deux faisceaux visibles étant polarisés parallèlement, les produits vectoriels peuvent être remplacés par des produits scalaires. Le champ de référence est ultrabref, on peut le remplacer par une fonction de Dirac  $\delta(t - \Delta t)$ . En principe, le signal détecté donne directement accès au champ émis par la bactériorhodopsine :

$$\begin{aligned}
 S_{utile}(\Delta t) &= \text{Re} \left( \int_{-\infty}^{+\infty} \underline{E}_{réf}^*(t - \Delta t) \underline{E}_{signal}(\Delta t) dt \right) \\
 &= \text{Re} \left( \int_{-\infty}^{+\infty} \delta(t - \Delta t) \underline{E}_{signal}(\Delta t) dt \right) \\
 &= E_{signal}(\Delta t)
 \end{aligned} \tag{2.61}$$

En réalité, le caractère non instantané du champ de référence et la sensibilité spectrale du détecteur vont compliquer le signal et une procédure de déconvolution est nécessaire (chapitre 4).

### 2.4.2 Montage expérimental

Dans la suite de ce chapitre, nous allons décrire le montage expérimental et ses caractéristiques. La représentation schématique de l'expérience est donnée figure 2.15.

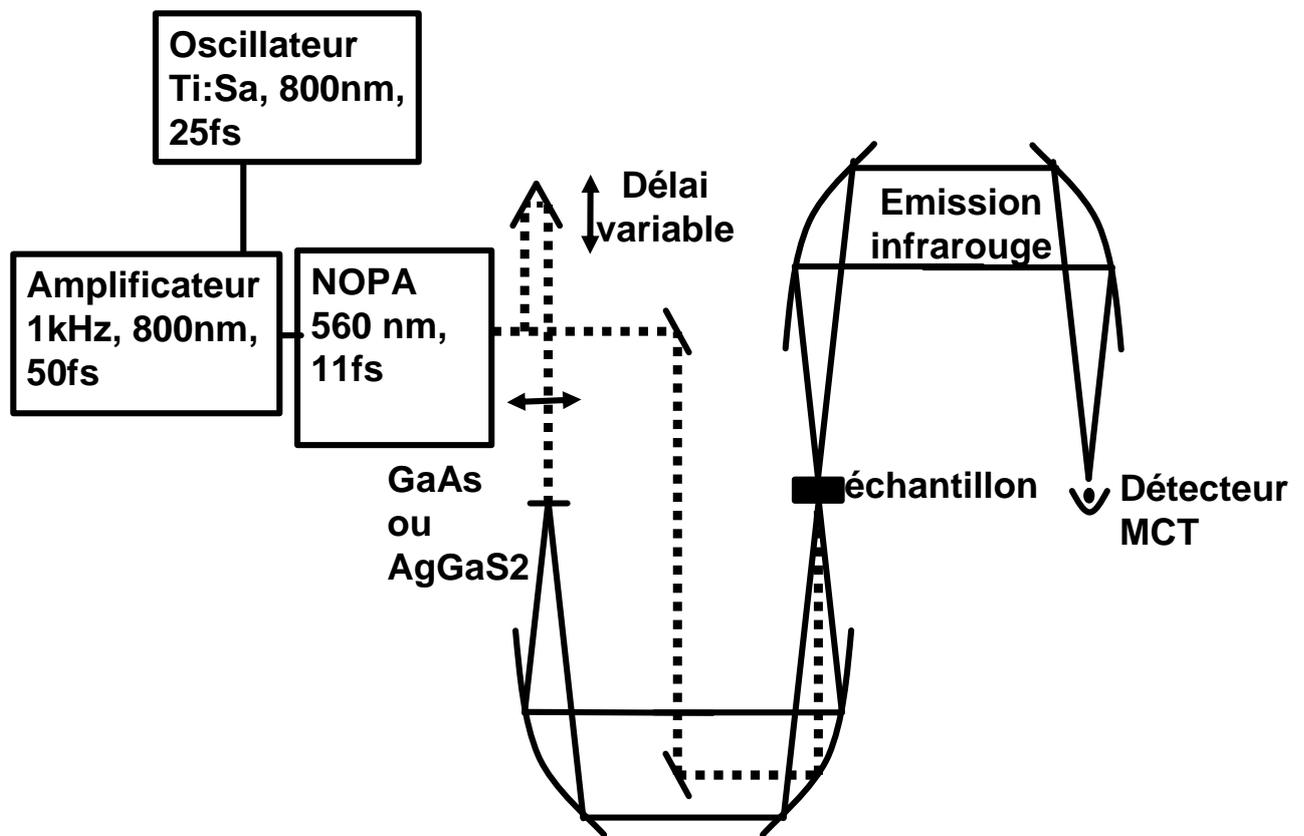


FIG. 2.15 : Schéma général du montage expérimental.

L'oscillateur Titane-Saphir (réalisé par A. Bonvalet [60] selon le design de [74]), pompé par un laser Nd : YVO<sub>4</sub> (Vanadate d'Yttrium dopé aux ions Neodyme) doublé en fréquence (Millennia, Spectra-Physics), injecte un amplificateur régénératif à 1 kHz qui délivre des impulsions centrées à 800 nm, de durée 50 fs et d'énergie 0.6 mJ. Cette impulsion est utilisée pour alimenter un oscillateur paramétrique optique non linéaire (NOPA) (réalisé par M.-L. Groot [58]) réglé à 560 nm. La sortie ( $\approx 1 \mu\text{J}$ ) est divisée en deux parties. Une partie ( $\approx 100 \text{ nJ}$ ) est focalisée sur un semiconducteur (GaAs ou AgGaS<sub>2</sub>) qui émet dans l'infrarouge (impulsion de référence). L'autre partie, utilisée à des intensités maximales de 80 nJ, est focalisée sur un échantillon (GaAs, AgGaS<sub>2</sub> ou bR), qui va émettre à son tour dans l'infrarouge par redressement optique. Les deux émissions interfèrent au niveau du détecteur MCT (Mercure Cadmium Telluride) en variant le délai temporel entre les impulsions visibles.

Nous allons décrire plus en détail chaque partie du montage dans les paragraphes suivants.

#### 2.4.2.1 Oscillateur Titane-Saphir

L'obtention d'une émission infrarouge nécessite l'utilisation d'une source d'impulsions visibles femtosecondes. Un oscillateur à milieu amplificateur solide est utilisé comme source primaire (figure 2.16).

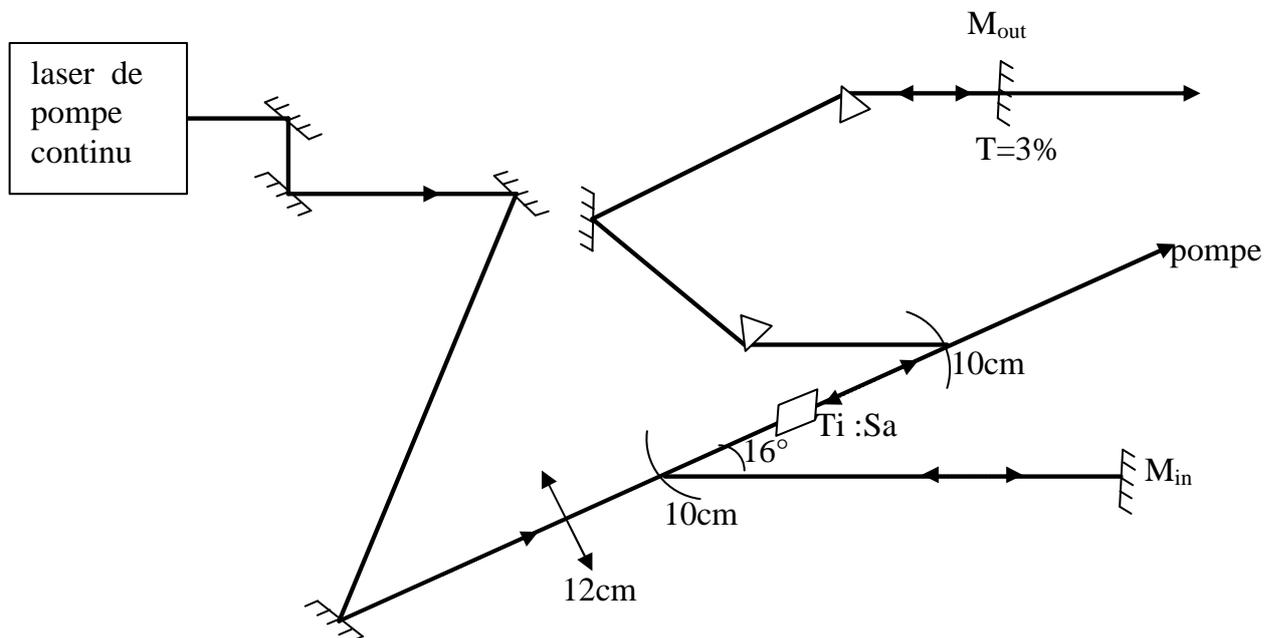


FIG. 2.16 : Schéma de l'oscillateur Titane-Saphir. Les miroirs sphériques ont des rayons de courbure de 10 cm, la lentille de focalisation du faisceau pompe a une focale de 12 cm.

Afin d'obtenir des impulsions femtosecondes, il est en premier lieu important de choisir un cristal amplificateur de largeur spectrale importante. Le cristal Ti : Sa (cristal de saphir dopé au titane) est bien adapté (largeur spectrale 100 THz). Le régime impulsionnel est obtenu par

un phénomène d'auto-blocage de modes (blocage de modes passif par effet Kerr [75]), avec un taux de répétition autour de 100 MHz.

Le laser de pompe (longueur d'onde 532 nm) est focalisé sur le cristal Ti : Sa, de longueur 4.5 mm, taillé à l'angle de Brewster autour de 800 nm pour minimiser les pertes. La cavité laser est limitée par le miroir d'entrée ( $M_{in}$ ) totalement réfléchissant et le miroir de sortie ( $M_{out}$ ) de coefficient de transmission de 3%. L'angle de repli ( $16^\circ$ ) de la cavité est choisi pour compenser l'astigmatisme introduit par le cristal Ti : Sa. Les prismes de silice intracavité compensent la dispersion de vitesse de groupe [76].

La puissance en régime continu est de 220 mW, pour une longueur d'onde autour de 800 nm.

#### 2.4.2.1.a. Passage en régime impulsionnel

Le phénomène de blocage de modes va permettre de passer en régime impulsionnel. Il existe des méthodes dites de blocage actif de modes, pour lesquelles un élément externe (modulateur piloté par un signal externe) bloque la phase relative entre les différents modes, et une méthode passive pour laquelle le blocage se fait grâce à des caractéristiques intrinsèques aux éléments constitutifs de la cavité. Ce dernier est retenu pour l'oscillateur Ti : Sa : le passage en régime impulsionnel est permis par le phénomène de blocage de modes provoqué par une modification par effet Kerr du cristal amplificateur [77]. L'indice de réfraction varie avec l'intensité excitatrice par effet Kerr instantané :

$$n(t) = n_0 + n_2 I(t) \quad (2.62)$$

où  $n_0$  et  $n_2$  sont respectivement les indices de réfraction linéaire et non linéaire du milieu.

La variation d'indice produit un effet de lentille de focale variable avec l'intensité, qui se traduit dans le cas de faisceaux gaussiens par une autofocalisation du faisceau (figure 2.17).

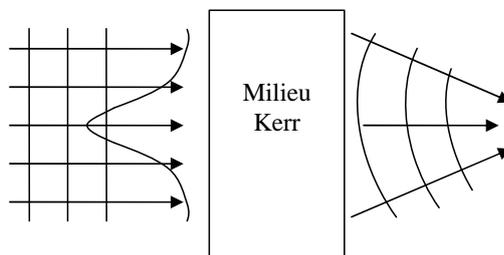


FIG. 2.17 : Phénomène d'autofocalisation d'un faisceau gaussien traversant un milieu Kerr. Au centre d'une impulsion gaussienne, l'indice de réfraction augmente plus que sur les bords (pour  $n_2 > 0$ ) : création d'une lentille d'indice dans le matériau (lentille Kerr), de focale dépendant de l'intensité maximale.

La cavité laser est alignée de telle façon que les pertes durant le fonctionnement en régime

continu soient supérieures à celles durant le régime impulsionnel, ce qui revient à favoriser l'oscillation en présence de lentille Kerr [78]. Le faisceau qui traverse le cristal est plus amplifié lorsqu'il passe par le centre du cristal : l'amplification du faisceau ayant subi l'autofocalisation est favorisée ce qui force le laser à opérer à des intensités crêtes les plus élevées possibles, le régime impulsionnel est favorisé.

L'initiation de l'auto-blocage de modes se fait en introduisant une légère perturbation dans la cavité (en l'occurrence une légère vibration sur un miroir de la cavité). Certains modes présents dans la cavité avant la perturbation seront en phase avec les nouveaux modes créés suite à la perturbation, et pourront ainsi continuer à se propager dans la cavité. Des modes à forts gains, capables d'induire le phénomène d'autofocalisation dans le cristal Ti : Sa, vont donc être favorisés et induire le phénomène d'autoblocage de modes.

#### 2.4.2.1.b. Compensation de la dispersion de vitesse de groupe

Le blocage de modes par effet Kerr utilisé seul ne permet pas d'avoir des impulsions sous-picoseconde, en particulier à cause du problème de dispersion de vitesse de groupe introduite par la traversée du cristal, dont la longueur est choisie courte pour minimiser cet inconvénient. La dispersion de vitesse de groupe d'ordre 2 peut être compensée par la présence d'une paire de prismes intracavités utilisés en aller-retour. La distance entre les prismes est déterminée dans ce but. Des prismes peu dispersifs sont choisis (silice) pour limiter la dispersion d'ordre supérieur introduite par les prismes eux-mêmes, et leur angle au sommet est calculé pour un minimum de déviation à l'angle de Brewster afin de minimiser les pertes.

#### 2.4.2.1.c. Caractéristiques des impulsions obtenues

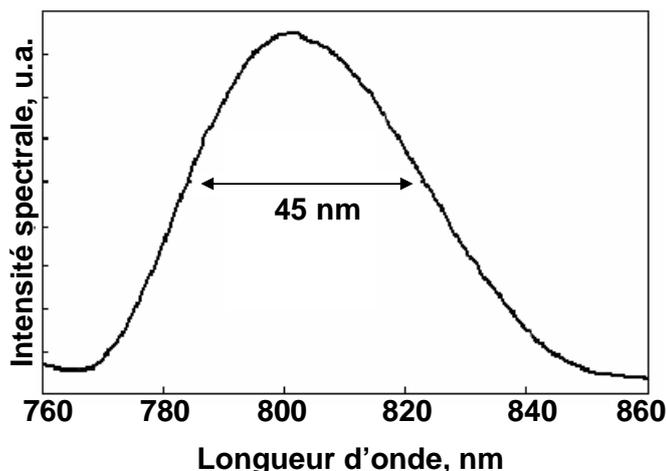


FIG. 2.18 : Intensité spectrale obtenue en sortie de l'oscillateur Ti : Sa.

Avec un tel montage expérimental, des durées d'impulsions de 12 fs peuvent être obtenues [60]. Nous réglons la cavité pour être mieux adaptée au fonctionnement de l'amplificateur décrit partie 2.4.2.2. Les impulsions en sortie ont une durée de 25 fs, mesurée par autocorrélation en intensité dans un cristal de BBO ( $\beta$ -Borate de Barium) et ajustement des données par une sécante hyperbolique. La largeur spectrale vaut autour de 45 nm (figure 2.18). L'énergie moyenne en sortie est de 170 mW pour des impulsions centrées à 800 nm.

### 2.4.2.2 L'amplificateur

L'oscillateur nous permet de générer des impulsions courtes, mais leur puissance crête n'est pas suffisante pour obtenir les effets non linéaires requis pour la génération d'un continuum et l'amplification paramétrique nécessaires au NOPA.

L'amplification des impulsions est faite au moyen d'un amplificateur régénératif commercial (Spitfire, Spectra-Physics) à 1 kHz, basé sur l'amplification d'impulsions chirpées. Brièvement, les impulsions en sortie de l'oscillateur sont injectées dans une seconde cavité, le milieu amplificateur étant à nouveau un cristal Ti : Sa, pompé par un laser Nd : YLF (Merlin, Spectra-Physics, centré à 527 nm, 1 kHz, 10 mJ, 250 ns), synchronisé avec l'impulsion en sortie de l'oscillateur. Le nombre de passages dans la cavité est contrôlé activement par deux cellules de Pockels permettant de contrôler l'état de polarisation des impulsions, et ainsi de les injecter ou les extraire de la cavité.

Les impulsions ultrabrèves ne peuvent pas être directement amplifiées, car leurs puissances crêtes sont nettement supérieures aux seuils de dommage des milieux amplificateurs. La solution retenue [79] est de fortement diminuer la puissance crête en étirant temporellement les impulsions, puis à les recompresser à leur durée initiale en utilisant des réseaux dans les deux cas [80].

Les impulsions en sortie, centrées à 800 nm, ont une énergie moyenne de 600  $\mu$ J pour une durée d'impulsion autour de 50 fs, et sont polarisées horizontalement. La stabilité en énergie par impulsion est autour de 2%.

Les expériences sur la bactériorhodopsine requièrent des impulsions plus courtes ( $\approx$  13 fs) et centrées autour de 560 nm, maximum d'absorption du rétinol. Pour cette raison un NOPA est utilisé.

### 2.4.2.3 L'oscillateur paramétrique optique non colinéaire (NOPA)

Le faisceau en sortie de l'amplificateur est divisé en deux. Une partie est focalisée sur une lame de saphir d'épaisseur 1 mm, permettant la génération d'un continuum dans le visible. L'énergie est ajustée pour obtenir un continuum stable et spectralement lisse. L'autre partie est doublée en fréquence après traversée d'un cristal de BBO. Le gain paramétrique est également obtenu dans un cristal de BBO.

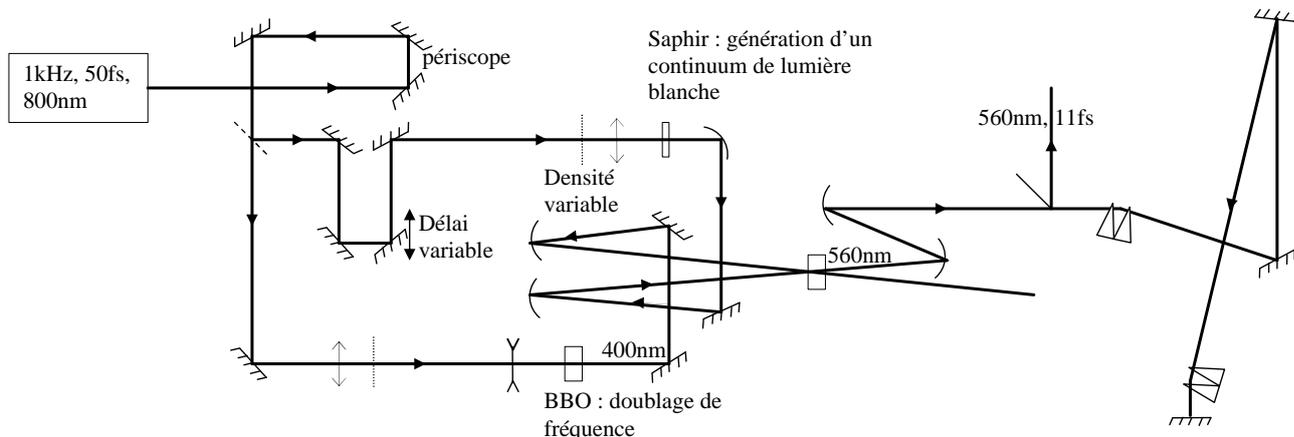


FIG. 2.19 : Représentation schématique de l'oscillateur paramétrique optique non colinéaire.

#### 2.4.2.3.a. Génération d'un continuum de lumière blanche par automodulation de phase

Lorsqu'une impulsion laser intense (d'intensité notée  $I(t)$  et centrée en  $\omega_o$ ) traverse un milieu non linéaire d'épaisseur  $l$ , d'indice non linéaire  $n_2$ , elle acquiert une phase additionnelle due à la modulation de l'indice par effet Kerr (équation 2.62). Pour une impulsion laser de fréquence centrale  $\omega_o$ , ce déplacement en phase s'écrit [81] :

$$\phi_{nl} = -\frac{\omega_o}{c} n_2 l I(t) \quad (2.63)$$

La fréquence instantanée, définie comme la dérivée temporelle de la phase, vaut alors :

$$\omega_{ins} = \omega_o - \frac{\omega_o}{c} n_2 l \frac{dI(t)}{dt} \quad (2.64)$$

soit une variation de fréquence :  $\Delta\omega \propto -\frac{dI(t)}{dt}$ .

Les variations en fréquences sont représentées sur la figure 2.20 pour des durées d'impulsions gaussiennes variables. On voit que plus l'impulsion est courte, plus l'effet de modulation de phase est important. Les matériaux transparents dans le visible ont un  $n_2$  positif. Pour les temps négatifs, la modulation se fait vers les basses fréquences (partie rouge du spectre) et vers les hautes fréquences (partie bleue du spectre) pour les temps positifs. L'onde transmise a ainsi un spectre en fréquence élargi.

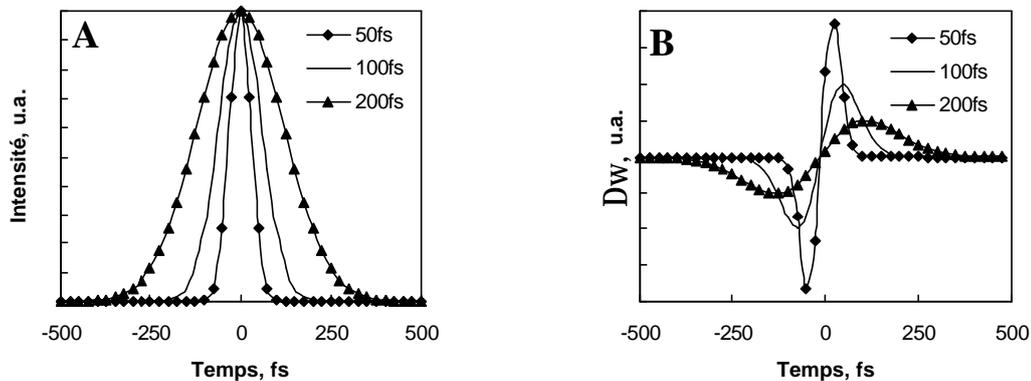


FIG. 2.20 : Impulsions gaussiennes de durée variable (A) et automodulation en fréquence correspondant à ces impulsions (B).

#### 2.4.2.3.b Faisceau pompe : doublage de fréquence

Le faisceau pompe à 400 nm est obtenu par doublage de fréquence dans un cristal de BBO, d'épaisseur 0,5 mm, d'accord de phase de type I et d'angle d'accord de phase de 28°.

Afin d'éviter les problèmes d'autofocalisation, nous éloignons légèrement le cristal du point focal.

#### 2.4.2.3.c Amplification paramétrique optique

L'amplification paramétrique [72] résulte de l'interaction de trois champs dans un milieu non centrosymétrique ( $\chi^2 \neq 0$ ). On peut généraliser le processus de génération de seconde harmonique dans le cas pour lequel les trois photons ont des fréquences différentes :

$$\omega_3 = \omega_2 \pm \omega_1 \quad (2.65)$$

Un faisceau pompe à  $\omega_3$  suffisamment intense se propageant dans un milieu non centrosymétrique va générer dans le milieu deux faisceaux de fréquences plus faibles, de pulsations  $\omega_1$  (signal) et  $\omega_2$  (complémentaire), si la condition d'accord de phase est vérifiée (transfert d'énergie efficace) (figure 2.21). Ce phénomène est appelé fluorescence paramétrique. Dans notre cas, compte-tenu du cristal de BBO utilisé (accord de phase de type I, angle d'accord de phase=26°, 2 mm d'épaisseur), les signaux sonde et complémentaire générés sont polarisés perpendiculairement au faisceau pompe, donc verticalement ; le faisceau signal est visible et le faisceau complémentaire est proche-infrarouge.

Il se propage, en plus du faisceau pompe intense, le faisceau d'injection visible, continuum de lumière blanche de faible intensité. Superposée temporellement au faisceau pompe, la composante fréquentielle du continuum égale à celle du faisceau signal verra son intensité augmenter.

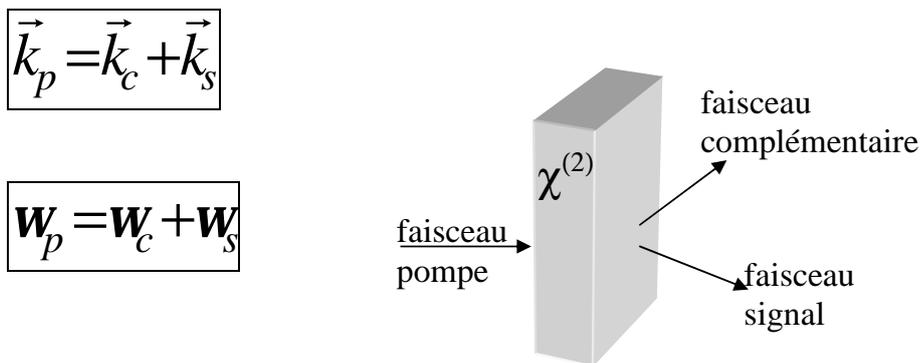


FIG. 2.21 : Principe de fluorescence paramétrique dans un cristal non centrosymétrique. L'accord de phase est réalisé lorsque le vecteur d'onde du faisceau pompe  $\vec{k}_p$  (fréquence  $\omega_p$ ) est égale à la somme des vecteurs d'onde signal  $\vec{k}_s$  (fréquence  $\omega_s$ ) et complémentaire  $\vec{k}_c$  (fréquence  $\omega_c$ ). La conservation énergétique impose  $\omega_p = \omega_s + \omega_c$ .

En pratique l'accord de phase est réalisé entre faisceaux signal et complémentaire lorsqu'un anneau de superfluorescence visible apparaît [82, 83]. Le faisceau sonde (continuum de lumière blanche) est alors superposé au faisceau signal lorsque l'angle entre faisceaux pompe et sonde vaut le demi-angle au sommet du cône de fluorescence ( $6,4^\circ$  dans notre cas, figure 2.22). En ajustant le délai temporel entre pompe et sonde, un gain visible ultralarge est permis dans la zone spectrale souhaitée.

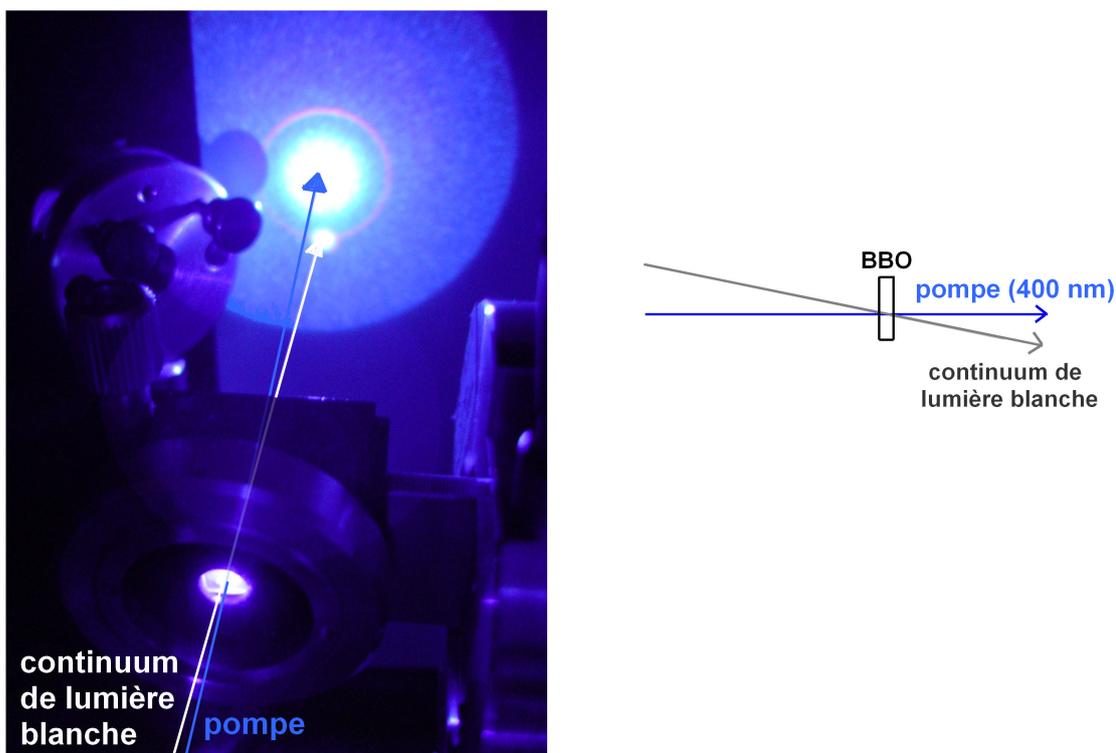


FIG. 2.22 : Photographie du dispositif expérimental utilisé pour l'amplification paramétrique optique. L'angle entre pompe (faisceau à 400 nm) et continuum de lumière blanche est égal au demi-angle au sommet du cône de superfluorescence pour obtenir un gain large bande.

L'impulsion visible générée est transportée à l'aide d'optiques réfléchissantes ; pour obtenir des impulsions de durée suffisamment faible, il convient de compenser le chirp introduit par le continuum et la dispersion du deuxième ordre introduite par le cristal de BBO. Nous utilisons des prismes en silice à angle faible [84] plutôt que des prismes de Brewster, pour diminuer au maximum la dispersion d'ordre supérieur.

Le NOPA est réglé sur des impulsions centrées à 560 nm, afin d'avoir une excitation résonante de la bactériorhodopsine. A cette longueur d'onde, la durée de l'impulsion est de 11 fs (la mesure est expliquée par la suite, partie 2.5.2.2) et son énergie vaut 1  $\mu$ J.

#### 2.4.2.4 Spectromètre infrarouge par interférométrie

Le principe général du spectromètre utilisé pour caractériser l'émission infrarouge générée par la bactériorhodopsine est décrit en début de ce chapitre (partie 2.4.1.2).

Les cristaux utilisés pour la génération d'infrarouge doivent être transparents dans l'infrarouge, posséder un coefficient non linéaire du deuxième ordre important et un seuil de dommage élevé. Deux cristaux sont utilisés dans le montage : le Gallium d'Arsenide (GaAs) et le Sulfure d'Argent et de Gallium ( $\text{AgGaS}_2$ ). Leurs caractéristiques sont accessibles avec SNLO [85]

- L' $\text{AgGaS}_2$  est utilisé pour caractériser la durée de l'impulsion visible, caractériser la fonction de transfert du système de détection et déterminer la valeur du changement de moment dipolaire  $\Delta\mu$  de la bactériorhodopsine. Il est transparent de 0,6 à 13  $\mu\text{m}$ , donc dans la zone d'émission comme dans la zone d'excitation, ce qui permet de facilement modéliser son émission infrarouge (cas instantané). Son coefficient non linéaire  $d_{eff}$  vaut 10 pm/V.

- Le GaAs est un semiconducteur qui possède un coefficient non linéaire plus important ( $d_{eff} = 100$  pm/V) et il est transparent dans l'infrarouge (de 0,9 à 17  $\mu\text{m}$ ), mais pas dans la zone d'excitation. Nous utilisons son émission infrarouge comme référence pour détecter le signal infrarouge émis par la bactériorhodopsine. Il est en effet préféré à l' $\text{AgGaS}_2$  de par son coefficient non linéaire très élevé et sa gamme de transparence dans l'infrarouge plus large. Par contre, dû à sa forte absorption dans le visible, une polarisation non instantanée contribue à la réponse du deuxième ordre, et la modélisation fiable n'est pas possible.

##### 2.4.2.4.a. Autocorrélation dans l' $\text{AgGaS}_2$

Afin de caractériser les impulsions visibles, nous détectons le signal d'autocorrélation entre deux faisceaux émis par l' $\text{AgGaS}_2$ . Le schéma de la figure 2.23 montre que c'est une caractérisation par différence de fréquences et non par la génération de deuxième harmonique plus habituelle. Les deux faisceaux générés dans l' $\text{AgGaS}_2$  vont interférer au niveau du détecteur MCT, en faisant varier le délai temporel entre les deux faisceaux visibles excitateurs.

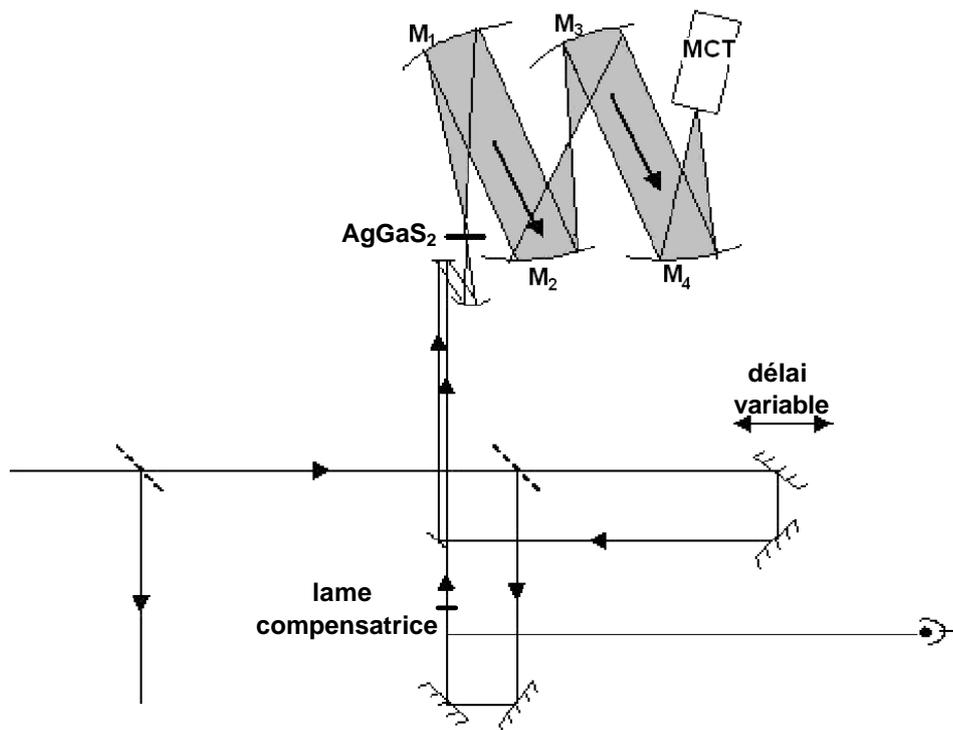


FIG. 2.23 : Montage interférométrique. Deux faisceaux visibles, séparés en deux parties, sont focalisés sur un semiconducteur ( $\text{AgGaS}_2$ ) qui émet dans l'infrarouge par redressement optique. Les émissions infrarouges sont focalisées par des miroirs recouverts d'une couche d'or sur le détecteur MCT, où elles interfèrent en faisant varier le délai temporel entre les deux impulsions visibles.

### *L'interféromètre*

Le retard dans le visible est varié en utilisant un interféromètre de Michelson. Une lame séparatrice large bande sépare le faisceau incident issu du NOPA en deux parties. La platine de translation motorisée modèle MM2500F, Micro-Contrôle, groupe Newport) possède une résolution de  $0.1 \mu\text{m}$ .

### *Pas d'échantillonnage*

Pour ne pas perdre d'information, la fréquence d'échantillonnage doit être au minimum supérieure au double de la fréquence maximale contenue dans le signal mesuré (critère de Nyquist). Le pas d'échantillonnage est fixé à 4 fs (correspondant à un écart fréquentiel d'environ  $8300 \text{ cm}^{-1}$ ).

### *Détection de l'émission infrarouge*

Les signaux infrarouges vont interférer au niveau du détecteur MCT (modèle J15D12-M204-S100U, Judson) refroidi à  $77^\circ\text{K}$  (azote liquide). La taille du pixel de détection vaut  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ ; il est recouvert d'une fenêtre en germanium. Sa sensibilité s'étend de 3 à  $15 \mu\text{m}$ . Le signal provenant du détecteur est préamplifié (gain variable  $\times 10$  ou  $\times 100$ , modèle PA101, Judson). Ce signal est à nouveau amplifié, suivi d'un échantillonneur-bloqueur puis filtré par un amplificateur à détection synchrone (modèle 5209, EGG) synchronisé sur le faisceau visible excitateur.

Les optiques de collimation utilisées pour le transport des faisceaux infrarouges jusqu'au détecteur sont des miroirs paraboliques plaqués d'or, et donc dénués d'aberration pour des conjugaisons infini/foyer et sans dispersion. Les miroirs utilisés ont un diamètre de 76 mm, avec des focales respectivement de 178 mm ( $M_1$ ) et 89 mm ( $M_2$ ,  $M_3$  et  $M_4$ ). L'ouverture maximale permise est ainsi de  $35^\circ$ , sachant que l'angle entre les faisceaux incidents et réfléchis par un miroir est de  $45^\circ$ . La divergence importante des faisceaux infrarouges à la longueur d'onde  $\lambda_{IR}$  vaut [60]

$$\theta_{IR} = 2 \frac{\sqrt{\lambda_{IR}}}{\pi w_o}, \quad w_o \text{ est le col (waist) du faisceau visible excitateur} \quad (2.66)$$

La tache focale dans le plan du générateur infrarouge mesure  $50 \mu\text{m}$  de diamètre. L'ouverture maximale à  $15 \mu\text{m}$  (coupure du détecteur MCT) est donc de  $31^\circ$  et les miroirs choisis permettent bien de collecter tout le flux capté par le détecteur.

#### 2.4.2.4.b. Intercorrélation entre signaux émis par bR et par GaAs

Dans ce cas, le montage est légèrement modifié (figure 2.24). Cette fois les émissions infrarouges qui vont interférer proviennent de l'émission de bR et de GaAs, en variant le délai temporel 1.

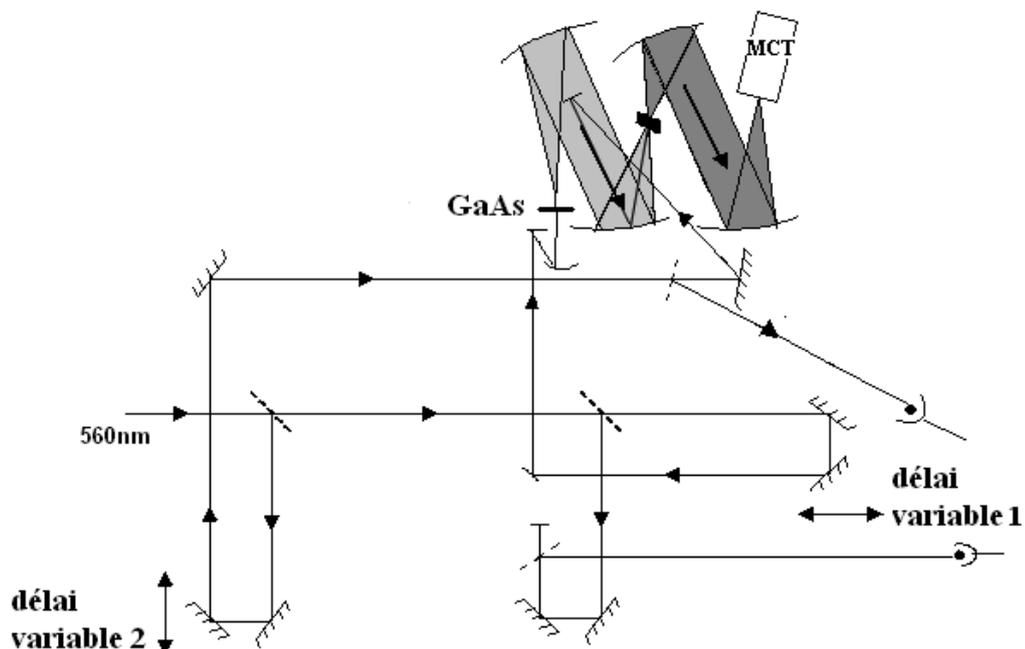


FIG. 2.24 : Montage interférométrique dans le cas de l'intercorrélation entre signaux émis par la bactériorhodopsine et par GaAs. Le principe de détection et les platines utilisées sont identiques au cas de l'autocorrélation dans un semiconducteur.

Le retard nul entre ces deux faisceaux est obtenu en cherchant un signal de transmission

différentielle pompe/sonde de référence dans le germanium, support de la bactériorhodopsine, permis en focalisant les deux faisceaux visibles sur l'échantillon décalé en dehors de la zone recouverte par la bactériorhodopsine. Le faisceau visible étant complètement absorbé par la bactériorhodopsine, ce signal de transmission différentielle qui pourrait être gênant pour notre étude disparaît lorsqu'on étudie la bactériorhodopsine.

L'interférogramme peut être mesuré jusqu'à un délai temporel de 5 ps, correspondant à une résolution spectrale d'environ  $6 \text{ cm}^{-1}$ . Un balayage complet correspond dans ce cas à 2048 points, et prend environ 4 minutes. Un signal complet est constitué d'une moyenne de 20 balayages (permettant un rapport signal à bruit autour de  $3.10^{-4}$ ). Afin de corriger pour une variation lente du délai pompe sonde ( $\approx 10 \mu\text{m/h}$ ), les balayages sont recalés à l'origine des temps. La correction des fluctuations lentes du laser est permise en disposant un modulateur mécanique (chopper) à 200 Hz sur le faisceau visible focalisé sur le semiconducteur (émission infrarouge de référence). L'échantillon de bactériorhodopsine peut être entraîné en rotation (6 Hz) afin de s'assurer qu'à chaque nouvel impact laser, la bactériorhodopsine est dans son état fondamental tout-*trans*. Une photographie de la dernière partie du montage expérimental (génération et transport du faisceau infrarouge) est donnée figure 2.25.

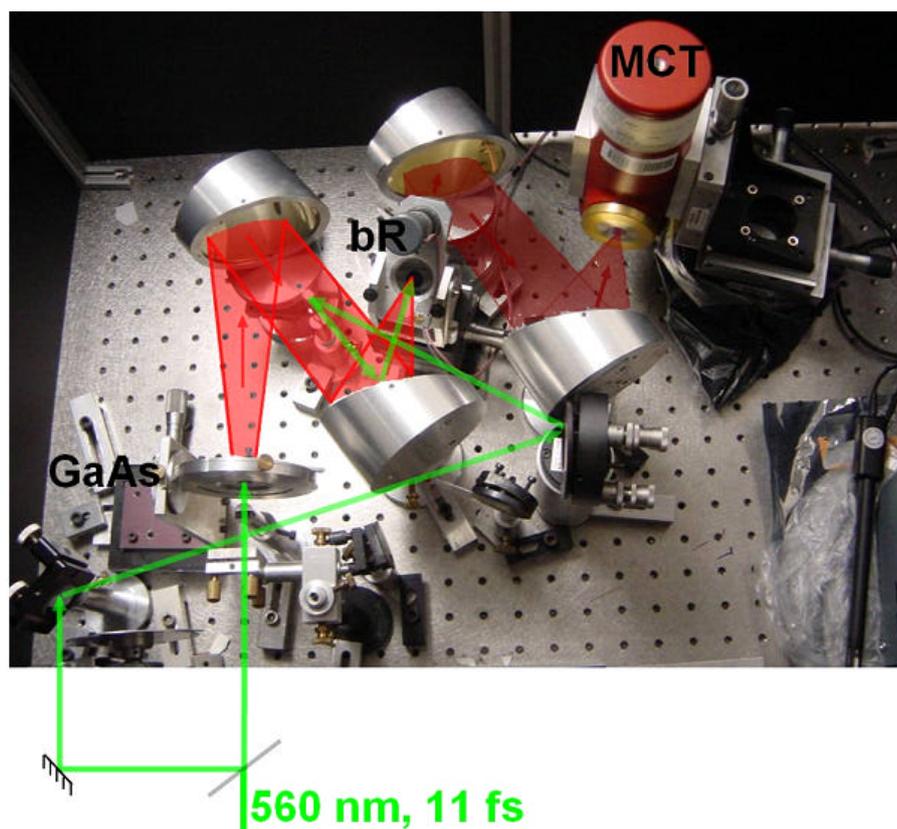


FIG. 2.25 : Photographie de la dernière partie du montage expérimental, montrant le cristal de GaAs et la bactériorhodopsine sur son support tournant. Les émissions infrarouges (surimposées en rouge sur la photo) sont focalisées sur le détecteur MCT par des miroirs en or.

## 2.5 Génération d'infrarouge dans des cristaux non linéaires : expérience et simulation

### 2.5.1 Source infrarouge à base de GaAs

Deux cristaux de GaAs ont été utilisés, un de type  $\langle 1, \bar{1}, 0 \rangle$  d'épaisseur  $110 \mu\text{m}$  et un cristal de type  $\langle 1, \bar{1}, 0 \rangle$  de  $700 \mu\text{m}$  d'épaisseur [60], car l'emploi d'un échantillon plus épais est utile pour augmenter la résolution de l'interféromètre (paragraphe 2.5.3). Le rendement de conversion de chacun de ces cristaux, fortement absorbants dans le visible, est égal.

L'émission obtenue est représentée figure 2.26 :

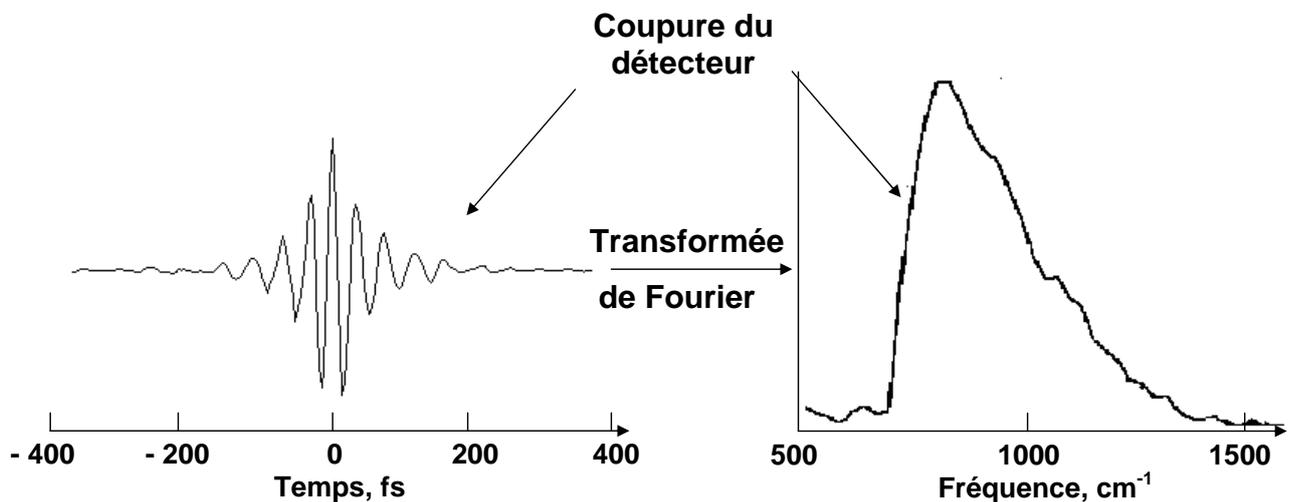


FIG. 2.26 : Signal d'autocorrélation obtenu dans le GaAs. Par transformée de Fourier, on obtient le spectre de l'émission infrarouge générée. La coupure du détecteur à  $15 \mu\text{m}$  explique les oscillations de part et d'autre du signal d'autocorrélation et la coupure brutale au niveau du spectre.

Nous utilisons ces cristaux essentiellement à cause de leur grand rendement. Pour une puissance moyenne incidente de  $100 \mu\text{W}$ , la puissance moyenne infrarouge émise vaut environ  $100 \text{ pW}$ , donc l'efficacité de conversion visible/infrarouge est de  $10^{-6}$ .

Le GaAs étant absorbant dans le visible, seule une faible épaisseur va générer de l'infrarouge, on est proche du modèle du matériau infiniment mince. Néanmoins, du fait de son absorption, des composantes non instantanées contribuent au redressement optique, ce qui rend difficile la modélisation de l'émission infrarouge. En revanche, en utilisant un cristal transparent dans le visible, ce problème n'apparaît plus. La génération d'infrarouge dans un matériau transparent dans le visible est étudiée ci-après expérimentalement.

## 2.5.2 Source infrarouge à base d'AgGaS<sub>2</sub>

### 2.5.2.1 Caractéristiques du champ infrarouge émis

Nous utilisons des cristaux d' AgGaS<sub>2</sub> de type II, d'épaisseur 1 mm. Il est transparent dans le visible et correspond au cas du matériau épais présenté partie 2.3.2.2. Ces cristaux sont utilisés pour caractériser l'impulsion visible excitatrice et l'émission infrarouge de la bactériorhodopsine à temps court car leur émission infrarouge est facilement modélisable. A 560nm, l'AgGaS<sub>2</sub> ne peut pas vérifier la condition d'accord de phase, l'efficacité de conversion sera faible (trois fois plus faible que dans le cas du GaAs), et c'est pourquoi nous utilisons le GaAs pour obtenir un meilleur rapport signal à bruit.

Le signal d'autocorrélation obtenu dans ce cristal suite à une excitation à 560 nm est donné figure 2.27 avec le spectre associé.

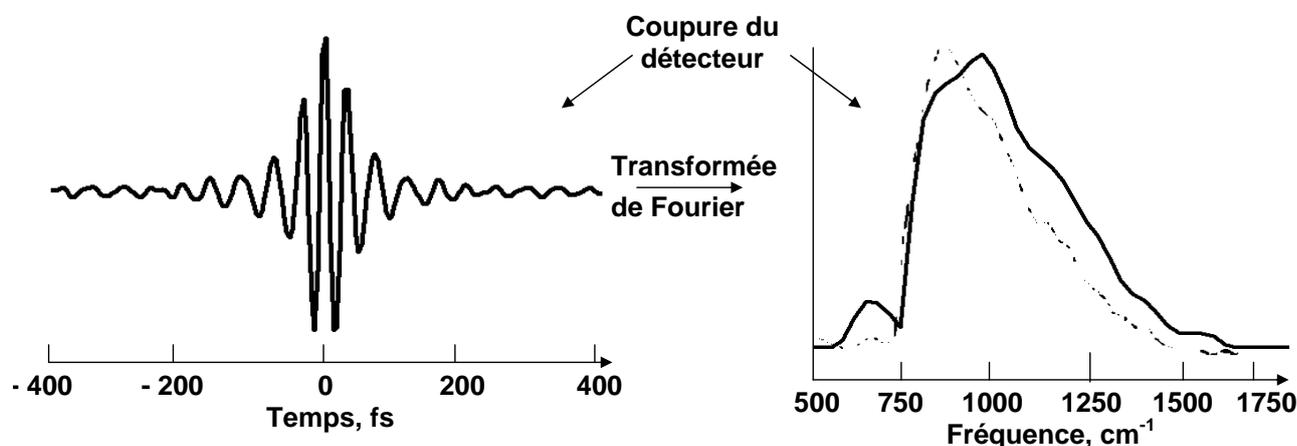


FIG. 2.27 : Signal d'autocorrélation obtenu par excitation visible du cristal d'AgGaS<sub>2</sub> et spectre correspondant obtenu par transformée de Fourier en trait plein. Le spectre d'émission du GaAs est rappelé en pointillés.

Le spectre obtenu dans le cas de l'utilisation d'un cristal d'AgGaS<sub>2</sub> est légèrement plus large que celui obtenu en utilisant du GaAs.

L'AgGaS<sub>2</sub> présente de l'absorption à deux photons, que nous quantifions expérimentalement en traçant la courbe de dépendance de l'intensité visible transmise par l'échantillon en fonction de l'intensité en entrée (figure 2.28). Cette courbe est obtenue dans les conditions expérimentales de génération d'infrarouge en focalisation sur la face d'entrée du cristal.

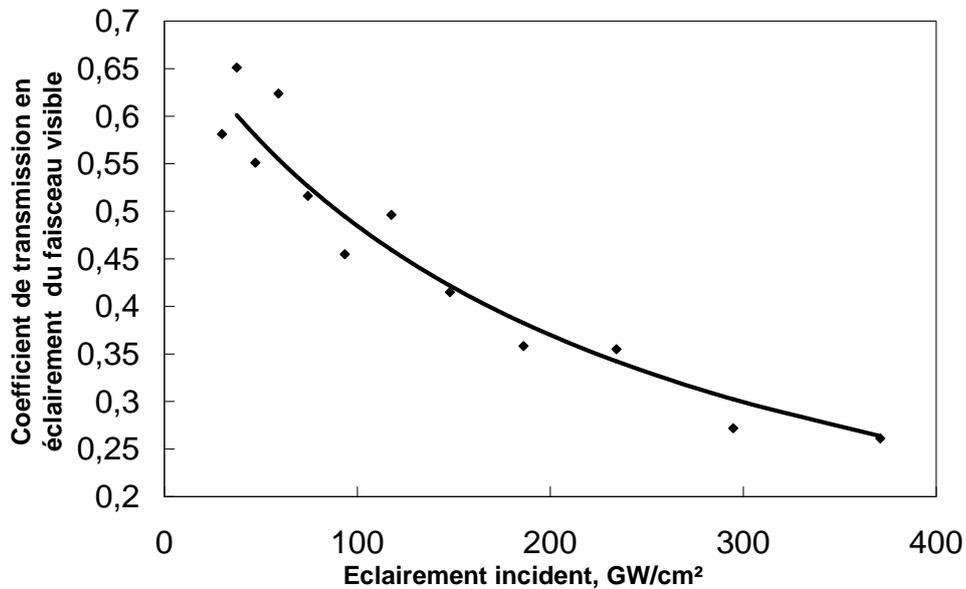


FIG. 2.28 : Coefficient de transmission de l'impulsion visible excitatrice en fonction de la puissance crête incidente sur l'échantillon par unité de surface. La courbe en trait plein est obtenue théoriquement en supposant uniquement la présence d'absorption à deux photons. Cette courbe est indépendante de l'orientation de l'échantillon, puisque l'absorption à deux photons se fait sur une épaisseur bien inférieure à l'épaisseur totale de 1 mm de l'échantillon. En effet, en défocalisant de  $200\ \mu\text{m}$  le faisceau exciteur en avant de l'échantillon, le coefficient de transmission reste constant.

Néanmoins, l'effet de l'absorption à deux photons n'apparaît pas lorsqu'on mesure l'intensité du champ infrarouge émis, qui est linéaire avec l'intensité excitatrice (figure 2.29).

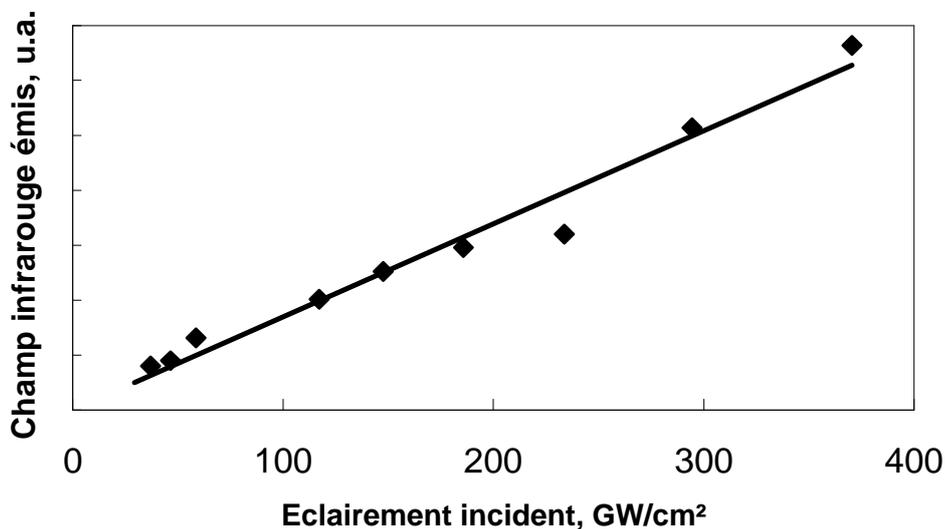


FIG. 2.29 : Linéarité du champ infrarouge émis par l'AgGaS<sub>2</sub> en fonction de l'intensité visible excitatrice. La position de l'échantillon est optimisée pour maximiser le signal infrarouge émis.

Comme attendu dans un processus non linéaire du deuxième ordre (voir Chapitre 4), le champ infrarouge émis par l'AgGaS<sub>2</sub> varie linéairement avec l'intensité excitatrice. L'absence de l'effet de l'absorption à deux photons suggère que seule une épaisseur faible de l'échantillon

contribue à la génération d'infrarouge. Plus précisément, en incluant la valeur d'absorption à deux photons évaluée expérimentalement au programme basée sur la méthode du Split-Step (paragraphe 2.3.2.2), on peut calculer la longueur à partir de laquelle l'émission infrarouge reste inchangée : elle correspond à la longueur sur laquelle l'infrarouge est généré et vaut autour de  $12 \mu\text{m}$  dans notre cas.

En défocalisant de  $200 \mu\text{m}$  le faisceau excitateur en avant de l'échantillon, le coefficient de transmission reste constant ( $\approx 0,6$ ), même à intensité maximale.

Nous concluons que l'absorption à deux photons joue un rôle dans une épaisseur caractéristique comprise entre  $12 \mu\text{m}$  et  $200 \mu\text{m}$ .

La simplicité de la modélisation du signal infrarouge émis par ce cristal permet de caractériser temporellement la durée des impulsions visibles, comme détaillé au paragraphe suivant.

### 2.5.2.2 Mesure de la durée des impulsions visibles

En simulant le signal d'autocorrélation obtenu à partir de l'AgGaS<sub>2</sub>, on peut facilement remonter à la durée de l'impulsion visible excitatrice. Les faisceaux visibles sont supposés gaussiens, et l'émission infrarouge proportionnelle à la polarisation qui lui a donné naissance, c'est à dire proportionnelle à l'enveloppe de l'impulsion visible excitatrice. Par transformée de Fourier, nous remontons au spectre de l'émission infrarouge. Nous modifions la durée des impulsions jusqu'à obtenir une largeur spectrale identique au spectre de l'émission infrarouge de l'AgGaS<sub>2</sub> (figure 2.30).

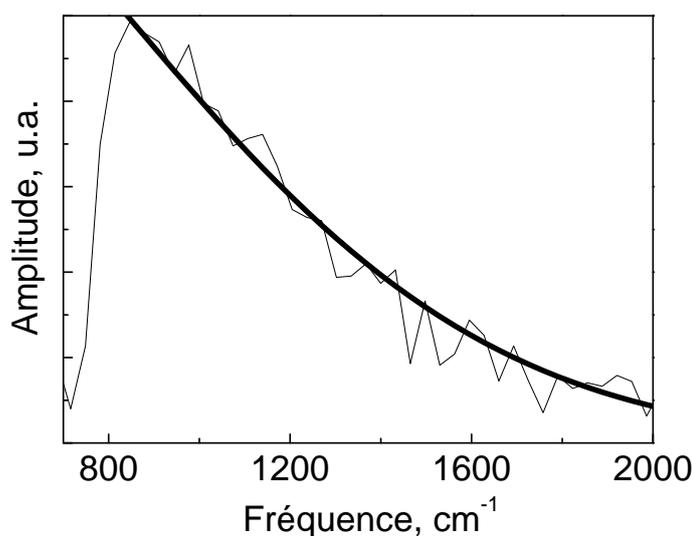


FIG. 2.30 : En trait fin, spectre infrarouge émis par l'AgGaS<sub>2</sub> après correction par la réponse de transfert du détecteur au dessus de la coupure du détecteur vers  $700 \text{ cm}^{-1}$ . En trait plein, spectre infrarouge calculé théoriquement pour une impulsion visible gaussienne de 11 fs.

Dans notre expérience, nous utilisons des impulsions visibles de durée comprise entre 11 et 13 fs à 560 nm, pour un profil d'intensité gaussien. Plus précisément, la durée de l'impulsion visible incidente sur le semiconducteur vaut 11 fs, et celle focalisée sur la bactériorhodopsine 13 fs.

### 2.5.3 Résolution du système

#### 2.5.3.1 Limite par le générateur infrarouge

Le faisceau infrarouge généré par le semiconducteur va réfléchir partiellement à l'interface cristal/air. Chaque faisceau visible va donc générer deux répliques (figure 2.31).

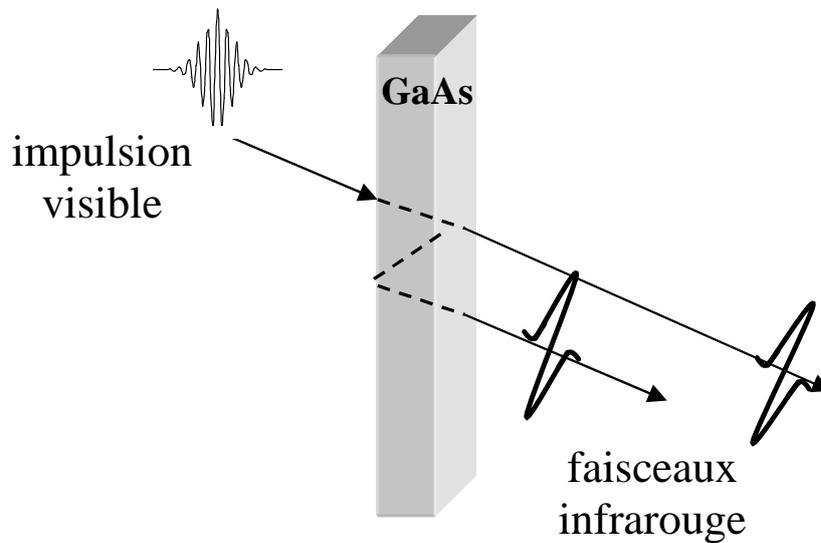


FIG. 2.31 : Réflexion du faisceau infrarouge à l'interface cristal/air. Les faisceaux arrivent perpendiculairement à la face d'entrée de l'échantillon. Le léger angle introduit sur le schéma n'est pas conforme à la disposition physique, et est uniquement utile pour clarifier la figure.

Le cristal fait  $110 \mu\text{m}$  d'épaisseur. Le faisceau réfléchi a un retard temporel  $\Delta t$  par rapport au faisceau directement transmis :

$$\Delta t = \frac{2n_{IR}^g e}{c} \approx 2.93 \text{ ps} \quad (2.67)$$

où  $\frac{c}{n_{IR}^g}$  est la vitesse de groupe de l'infrarouge dans le GaAs ( $n_{IR}^g = 4$  étant l'indice de groupe du GaAs dans l'infrarouge et  $c$  la célérité de la lumière). La résolution de l'interféromètre est donc dans ce cas au mieux d'environ  $11 \text{ cm}^{-1}$ .

Le signal d'autocorrélation obtenu dans le cas du GaAs est donné figure 2.32. La distance entre l'interférogramme principal à l'origine et ses répliques vaut bien 2.93 ps. Leur amplitude maximale varie comme le facteur de réflexion en champ élevé au carré :  $r^2 = \left[ \frac{n_{IR}^\phi - 1}{n_{IR}^\phi + 1} \right]^2$  avec  $n_{IR}^\phi = 3.5$

l'indice de phase du GaAs. On calcule  $r^2 \approx 3$ , en bon accord avec les données expérimentales. Nous disposons également d'un échantillon de GaAs de  $700 \mu\text{m}$  d'épaisseur, dans ce cas les échos se situent à 20 ps soit une résolution autour de  $2 \text{ cm}^{-1}$ .

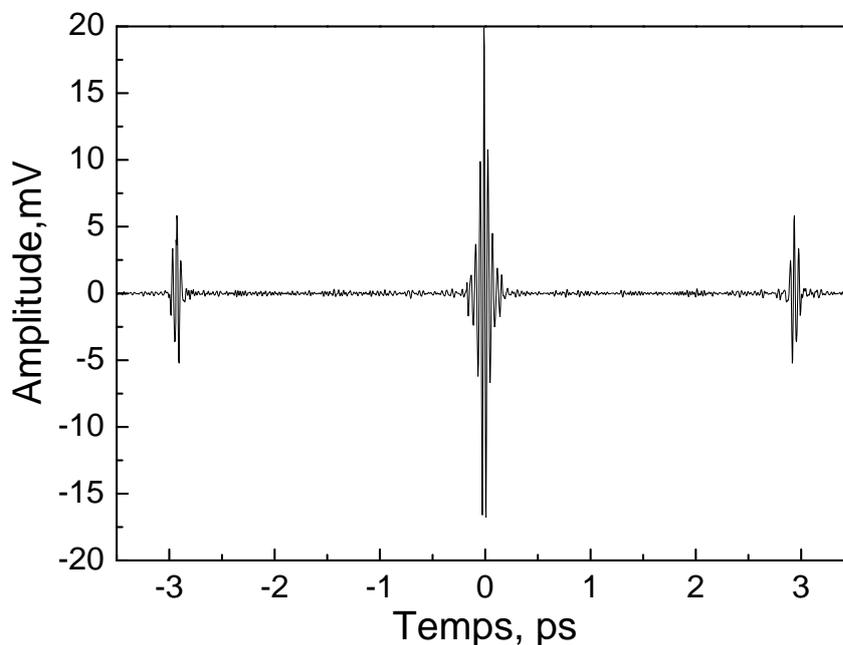


FIG. 2.32 : Signal interférométrique obtenu par autocorrélation des faisceaux infrarouges émis par un seul cristal de GaAs.

La résolution du spectromètre n'est pas limitée par des réflexions dans l'échantillon de bactériorhodopsine : l'épaisseur du germanium est de 1 mm, supérieure à celle de l'échantillon de GaAs, et les réflexions au niveau de la couche de bactériorhodopsines transmises ensuite par le germanium sont négligeables car inférieures à 0,3%.

### 2.5.3.2 Limite par l'interféromètre

En supposant que seul l'interféromètre est limitant, la résolution spectrale de l'interféromètre dépend directement du retard maximal de la ligne à retard. Ce retard maximal est supérieur à 20 ps, nous serons donc en théorie tout le temps limité par l'épaisseur du cristal produisant l'onde de référence.

En pratique, le retard maximal accessible avec un rapport signal sur bruit suffisant est de 5 ps (résolution de  $7 \text{ cm}^{-1}$ ).

# Chapitre 3

---

## Préparation et comparaison des échantillons

Dans ce chapitre, nous allons caractériser les échantillons de bactériorhodopsine que nous étudions dans notre expérience de spectroscopie cohérente d'émission infrarouge, dont les résultats sont présentés chapitre 4.

1. Dans une première partie (paragraphe 3.1 et 3.2), nous décrivons comment nous obtenons des échantillons de bactériorhodopsine (culture, purification des membranes, puis préparation d'échantillons secs orientés) et indiquons leurs caractéristiques spectrales et fonctionnelles.

2. Nous caractérisons ensuite spectralement et temporellement les premiers photoproduits de différents échantillons de bactériorhodopsine (paragraphe 3.3). Pour cela nous utilisons une méthode plus "classique" d'absorption transitoire femtoseconde.

Nous étudions :

- Des échantillons dits "secs" (ils sont en fait à humidité ambiante, soit  $\approx 50\%$  d'humidité). Ce sont ces types d'échantillons à la fois macroscopiquement orientés et transparents dans l'infrarouge (dans le cas où le substrat utilisé est le germanium) qui permettent d'obtenir une émission mesurable dans les expériences de spectroscopie cohérente d'émission infrarouge (chapitres 2 et 4).

- Des échantillons en suspension pour étudier l'influence de l'environnement aqueux sur les processus primaires et établir si les premiers processus photoinduits des échantillons secs sont représentatifs de ceux de la bactériorhodopsine dans son milieu d'hydratation naturelle.
- Des échantillons ayant été immergés dans des solutions à pH très bas (autour de 1-2), ce qui a pour conséquence de varier les caractéristiques spectrales, temporelles et fonctionnelles de la bactériorhodopsine, sans pour autant la détruire. Ils vont nous aider à l'analyse de la bactériorhodopsine native.

## 3.1 Obtention de bactériorhodopsine

Dans les parties suivantes, nous ne donnons que les grandes lignes d'obtention de la bactériorhodopsine après culture de la bactérie *Halobacterium salinarium*. Pour une description plus détaillée, se reporter à l'annexe C.

### 3.1.1 Culture de la bactérie *Halobacterium salinarium* et isolement des membranes pourpres

La culture et purification suivent de près le protocole de [86]. Les bactéries *H. salinarium* sont cultivées dans 6 litres de milieu très salin (description du milieu en annexe C), éclairées en permanence par des tubes fluorescents reproduisant la lumière du jour. Les membranes des bactéries sont isolées par des étapes successives de lyse, lavage et centrifugation en gradient de densité.

Nous avons vu (chapitre 1) que la membrane cellulaire est physiquement séparée en membrane pourpre et membrane rouge. Nous rappelons qu'avec les conditions de culture et avec la souche d'*H. salinarium* utilisées, la bactériorhodopsine est la protéine presque exclusive contenue dans la membrane pourpre. En revanche d'autres protéines colorées sont présentes dans la membrane rouge, il est donc important de séparer les deux types de membrane. Pour cela nous déposons les membranes recueillies sur un gradient de sucrose. Après centrifugation (figure 3.1), les deux membranes se séparent du fait de densités différentes et ainsi deux importantes bandes apparaissent :

- une bande pourpre (membrane pourpre),
- une bande rouge (restes de membrane rouge n'ayant pas encore été éliminés par les centrifugations successives).

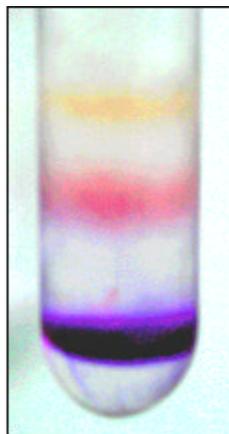


FIG. 3.1 : Séparation des membranes pourpres et rouges par gradient de sucrose. Le léger surnageant jaune observé est probablement un artefact dû au sucrose.

Les bandes pourpres sont récupérées et lavées de tout sucrose ; à partir de 6 litres de culture, nous obtenons en moyenne 6 mL de membrane pourpre avec un densité optique par millimètre à 568 nm de 2,5 (concentration en bactériorhodopsine de 400  $\mu\text{M}$ ).

### 3.1.2 Spectres d'absorption caractéristiques

La purification est facilement vérifiable en mesurant le spectre d'absorption visible des suspensions de membranes (figure 3.2).

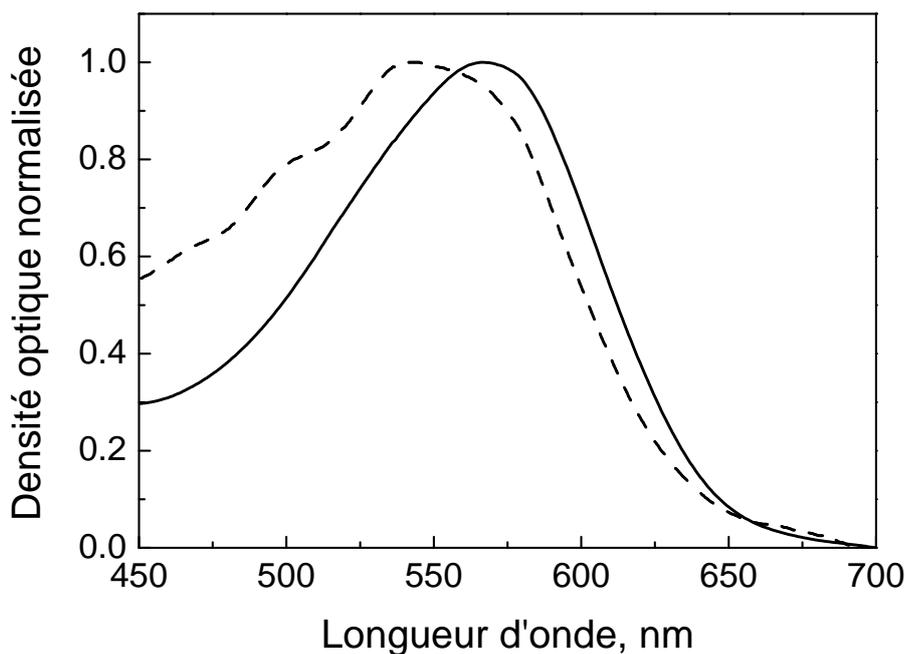


FIG. 3.2 : En pointillés le spectre d'absorption des membranes récoltées, composées d'un mélange de membranes pourpre et rouge. Les modulations du spectre côté bleu sont caractéristiques des caroténoïdes. En trait plein, spectre d'absorption de la membrane pourpre, centré à 568 nm.

## 3.2 Préparation des échantillons

### 3.2.1 Echantillons orientés

Une caractéristique importante du rétinale (chapitre 1) est sa polarisabilité du deuxième ordre élevée, et nous allons chercher à comprendre son rôle dans les premiers processus photoinduits. Suite à une excitation optique, si l'échantillon est organisé de façon non centrosymétrique, il va émettre une onde infrarouge (chapitre 2) permettant en principe de remonter aux caractéristiques de la polarisabilité du deuxième ordre. Il est donc indispensable d'orienter les échantillons pour les rendre non centrosymétriques et ainsi obtenir une émission infrarouge mesurable.

Une des remarquables propriétés de la bactériorhodopsine est la possibilité de préparer des échantillons secs orientés et extrêmement stables pendant plusieurs années. Ici, des membranes (environ 2000 couches) sont empilées avec la même orientation, le rétinale est orienté dans un cône de demi-angle au sommet proche de  $61^\circ$  par rapport à la normale aux échantillons [17] et l'orientation macroscopique dans le plan est aléatoire (figure 3.3).



FIG. 3.3 : Echantillons orientés de membrane pourpre. Les membranes sont orientées par leur moment dipolaire permanent. Les rétinals sont orientés dans un cône de demi-angle au sommet d'environ  $61^\circ$ .

#### 3.2.1.1 Dépôt par électrophorèse

Les échantillons de membranes pourpres sont orientés par électrophorèse [51], en appliquant un champ électrique statique à une suspension de membranes pourpres contenue dans de l'eau. Les échantillons sont orientés par le moment dipolaire permanent des membranes ( $(6 \pm 1) \cdot 10^{-23}$  C.m, [87]).

Afin de préparer la suspension pour la dépôt par électrophorèse, la première étape est d'éliminer les ions libres contenus dans la suspension de membrane pourpre récoltée (paragraphe 3.1.1), par des lavages successivement acide et basique (pH des solutions fixé à l'aide d'acide chlorhydrique HCl et d'hydroxyde de sodium NaOH). La suspension est ensuite purifiée par des lavages dans de l'eau distillée de très faible conductivité ( $< 50 \mu\text{S}/\text{cm}$ ).

200  $\mu\text{L}$  de suspension de densité optique comprise entre 1 et 1.5 / mm (correspondant à environ 240  $\mu\text{M}$  de bactériorhodopsine) est déposée sur une plaque de verre recouverte d'une couche conductrice ( $\text{SnO}_2$ ) ou sur du germanium, elles-mêmes insérées dans le dispositif de la

figure 3.4, puis la déposition par électrophorèse se fait comme indiqué dans la légende de la figure 3.5.

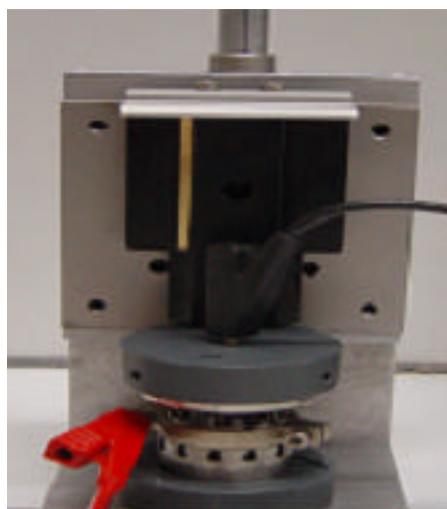


FIG. 3.4 : Dispositif expérimental utilisé pour l'orientation des échantillons par électrophorèse.

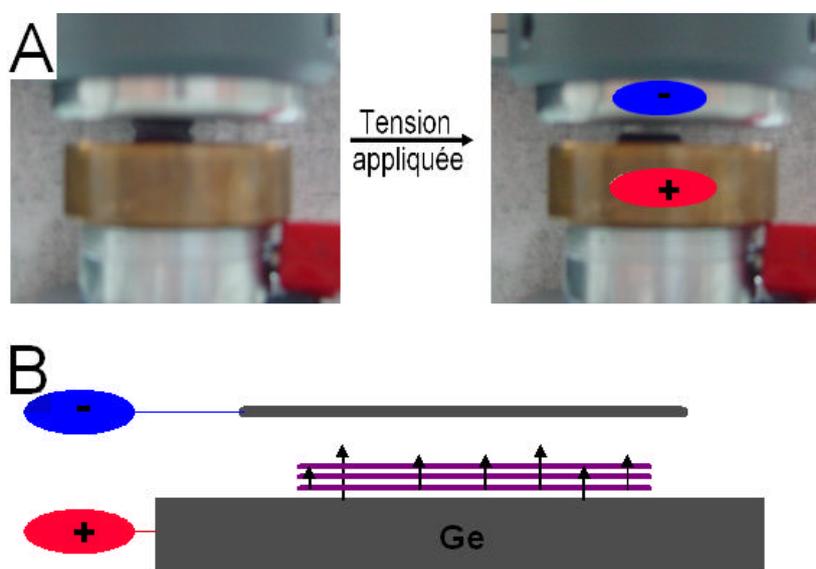


FIG. 3.5 : La plaque de germanium (ou de verre conducteur) déposée dans le dispositif de la figure 3.4 est reliée à l'anode. La suspension de membranes pourpres est déposée sur la plaque, et la cathode est descendue jusqu'à obtenir une distance de 2 mm entre les deux électrodes. Une tension de 3 à 5 V est alors appliquée pendant 3 secondes : les membranes pourpres descendent pendant ce temps vers la plaque de germanium (ou de verre conducteur) reliée à l'électrode positive (A) du fait de leur charge négative. Les membranes sont ainsi orientées par leur moment dipolaire permanent parallèlement à la tension appliquée (B). L'eau présente en surface est enlevée, et les échantillons sont séchés pendant une nuit à humidité ambiante.

Une fois séchés, les échantillons sont très résistants et stables pour plusieurs années.



FIG. 3.6 : Echantillons anhydres de bactériorhodopsine sur plaque de germanium, densité optique  $\approx 2$  à 565 nm.

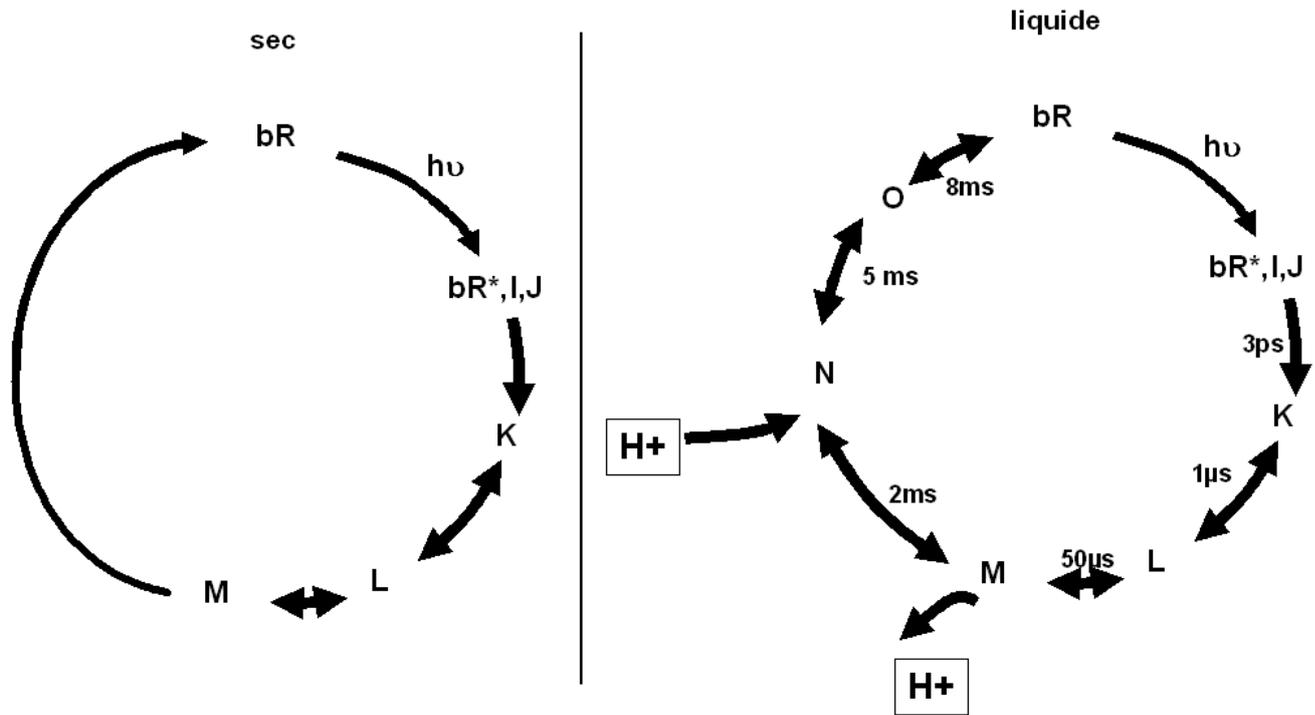
Le germanium (figure 3.6) est choisi comme substrat pour deux raisons :

- Sa conductance est suffisante pour qu'il soit utilisé comme électrode lors de la déposition électrophorétique.
- Il est transparent de 3 à 15  $\mu\text{m}$ , et permet donc de mesurer l'émission infrarouge subséquente à l'excitation visible des échantillons de bactériorhodopsine en transmission.

Le verre conducteur est quant à lui utilisé pour des expériences d'absorption transitoire dans le visible. L'homogénéité des échantillons déposés par électrophorèse est meilleure qu'en déposition par séchage seul.

#### 3.2.1.2 Modification du photocycle avec l'humidité

Les échantillons "secs" sont à humidité ambiante (50% d'humidité). Nous avons vu au chapitre 1 le photocycle fonctionnel de la bactériorhodopsine adaptée à la lumière dans ses conditions d'humidité physiologique, c'est à dire à 100 % d'humidité. Le photocycle de l'échantillon sec est modifié et fortement ralenti ( $\approx 100$  ms) [88], comme représenté figure 3.7. A faible humidité, l'adaptation à la lumière est gênée (à 50% d'humidité, mélange 8 : 2 des deux isomères *trans* et 13-*cis,syn* [51]), alors que la relaxation thermique de la forme adaptée à la lumière vers la forme non adaptée n'est pas affectée [89, 90]. Le photocycle de l'échantillon sec s'arrête à un intermédiaire ressemblant à l'état M. Le transfert de protons qui suit en milieu aqueux n'a pas lieu dans l'environnement déshydraté [51, 90]. La raison évoquée le plus souvent pour comprendre pourquoi les étapes subséquentes à l'état M sont beaucoup plus affectées par l'état d'hydratation du milieu, est que les étapes au-delà de l'état M impliquent des échanges de protons avec le milieu [52].


 FIG. 3.7 : Photocycle de  $bR_{neutre}$ , liquide et sec.

## 3.2.2 Echantillons à pH acide

### 3.2.2.1 Principe de l'acidification

Grâce à leur très grande résistance aux conditions extrêmes, les échantillons de bactériorhodopsine secs peuvent être relativement facilement acidifiés par immersion dans une solution très acide pendant quelques minutes suivie par une nouvelle phase de séchage [13, 91]. Par contre l'acidification des solutions de bactériorhodopsine est inadéquate, car elle va provoquer une agrégation importante qui rend les échantillons trop diffusants pour des expériences d'absorption transitoire. La solution retenue est alors de déposer la bactériorhodopsine native dans des gels d'agarose (voir annexe C pour la composition des gels), et l'acidification est obtenue en utilisant les mêmes solutions que pour les échantillons secs, mais le temps de diffusion dans les gels impose de les laisser immergés toute une nuit.

Deux solutions sont utilisées pour l'acidification :

- une solution autour de pH 1 obtenue en utilisant de l'acide sulfurique  $H_2SO_4$ , donnant de la bactériorhodopsine dite "acide bleue" (notée  $bR_{bleu}$ ).
- une solution, toujours autour de pH 1, à base cette fois d'acide chlorhydrique HCl. On obtient alors de la bactériorhodopsine dite "acide pourpre" (notée  $bR_{pourpre}$ ).

Cette acidification résulte en la modification des composantes cinétiques des échantillons (durée de vie de l'état excité en particulier), ce qui va nous permettre une meilleure compréhension des données obtenues sur  $bR_{neutre}$ .

### 3.2.2.2 Influence de l'environnement du rétinale sur les spectres d'absorption et le photocycle

L'environnement du rétinale a une grande influence sur les spectres d'absorption et sur les dynamiques fonctionnelles du rétinale. En particulier, le rétinale en solution a un maximum d'absorption à 445 nm, et à 568 nm pour le rétinale dans la structure en sept hélices du complexe protéique (figure 1.4). Ce déplacement ("opsin-shift") s'explique par la présence de charges négatives à proximité de la base de Schiff chargée positivement [92].

L'immersion dans un milieu très acide provoque l'introduction d'ions dans l'environnement du rétinale qui modifient la charge des acides aminés environnants (se reporter à la figure 1.7). Les spectres des trois types d'échantillons secs sont donnés dans la figure 3.8 :

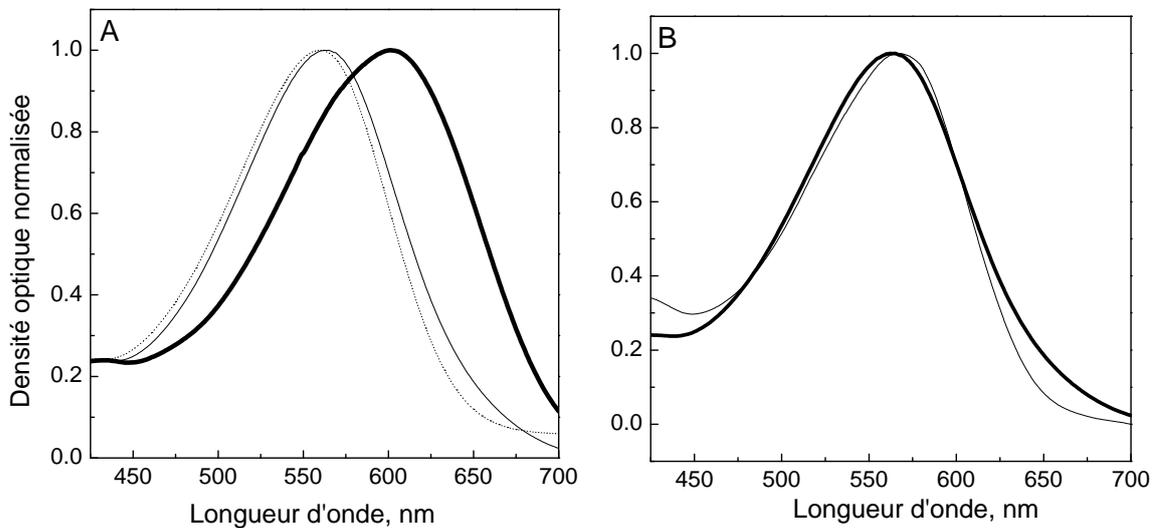


FIG. 3.8 : A. Spectres d'absorption des différents échantillons secs :  $bR_{neutre}$  (trait plein, fin),  $bR_{pourpre}$  (trait en pointillés),  $bR_{bleu}$  (trait plein, épais) ayant un maximum d'absorption à 564 nm, 560 nm et 603 nm respectivement. B. Comparaison entre spectres d'absorption de  $bR_{neutre}$  liquide (trait fin) et sec (trait épais). Contrairement au cas de cristaux 3D de bactériorhodopsine [54,93], l'hydratation ne modifie que légèrement les spectres d'absorption des échantillons de  $bR_{neutre}$ , avec un faible déplacement du maximum d'absorption vers le bleu avec la déshydratation.

La différence obtenue en utilisant  $H_2SO_4$  ou  $HCl$  pour l'acidification à pH 1 provient de la différence de taille entre les ions  $SO_4^{2-}$  et  $Cl^-$ . Les ions  $SO_4^{2-}$  sont trop volumineux pour pénétrer dans la protéine, à la différence des ions  $Cl^-$ . Dans le cas de  $bR_{bleu}$ , les acides aminés Asp85 (accepteur de protons) et Asp96 sont protonés [94] et le photocycle ne produit pas d'intermédiaire M. Dans le cas de  $bR_{pourpre}$ , les ions chlorure fournissent des contre-charges pour les protons et la charge nette des acides aminés est proche de la condition à pH neutre, d'où la ressemblance des spectres d'absorption de  $bR_{neutre}$  et de  $bR_{pourpre}$ , figure 3.8. La protéine transporte alors des ions chlorures et son photocycle est proche de celui de l'halorhodopsine [13]. Le photocycle

de l'échantillon de  $bR_{pourpre}$  ne présente, suite au photoproduit J, que des photoproduits spectralement proches de K [88,91].

L'adaptation à la lumière de  $bR_{bleu}$  est imparfaite et la concentration en rétinol tout-*trans* est au mieux de 60% [95], tandis que  $bR_{pourpre}$  même sec peut être complètement adapté à la lumière [88].

### 3.3 Comparaison des premiers photoproduits

Dans les parties précédentes de ce chapitre nous avons vu que l'acidité et l'humidité entraînent d'importantes modifications fonctionnelles de la protéine. La spectroscopie d'absorption transitoire étendue au domaine femtoseconde va permettre d'avoir accès aux caractéristiques temporelles et spectrales des premiers photoproduits de la bactériorhodopsine, en variant les conditions expérimentales (humidité, pH). On rappelle qu'il a été montré (chapitre 1) dans le cas de  $\text{bR}_{\text{neutre}}$  en milieu liquide qu'après absorption d'un photon, les premiers photoproduits sont formés suivant les transitions suivantes :



Plusieurs échantillons vont être étudiés [96] :

- Echantillon liquide déplaçable transversalement afin d'assurer son renouvellement entre chaque impact du faisceau sonde. Ainsi à chaque nouvelle impulsion le rétinale est sous conformation tout-*trans*.
- Echantillons secs et déposés dans des gels d'agarose, à différents pH, non déplaçables à cause de leur inhomogénéité.

#### 3.3.1 Expérience pompe-sonde

Nous ne donnons que les grandes lignes de l'expérience, décrite en détail dans la référence [97].

##### 3.3.1.1 Principe

Les détecteurs ont un temps de réponse trop long pour mesurer directement des changements spectroscopiques inférieurs à quelques picosecondes. Les expériences d'absorption transitoire de type pompe-sonde permettent d'observer les modifications ultrarapides induites par une perturbation en utilisant trois faisceaux laser : pompe, sonde et référence (provenant du faisceau sonde séparé en deux) (figure 3.9). Le principe de base est de faire varier le retard entre impulsions pompe et sonde afin de contrôler les modifications d'absorption induites par l'arrivée du faisceau sonde.

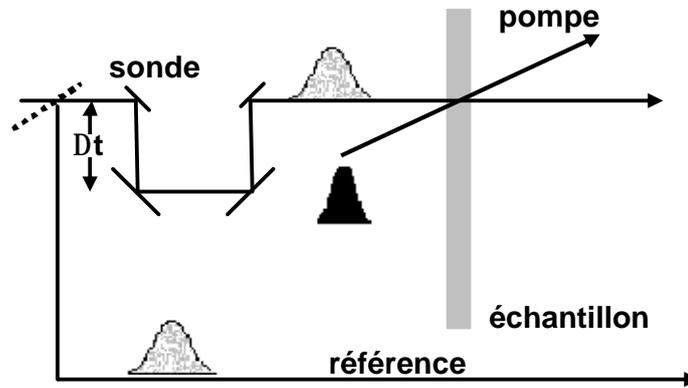


FIG. 3.9 : Schéma de l'expérience pompe-sonde.

Le faisceau pompe excitant l'échantillon initie la réaction. Le faisceau sonde, d'intensité plus faible, traverse la zone de l'échantillon excitée, tandis que le faisceau de référence ne traverse pas l'échantillon. Les faisceaux sonde et référence proviennent dans notre cas du même continuum de lumière blanche afin de pouvoir mesurer simultanément des spectres d'absorption transitoire. Faisceaux sonde et référence sont alors dispersés par un spectromètre à réseau permettant à une caméra CCD (Charge Coupled Device) de mesurer tir à tir leurs intensités spectrales  $I_S(\lambda, \Delta t)$  et  $I_R(\lambda, \Delta t)$  respectives, où  $\Delta t$  est le retard variable imposé à la sonde par rapport à l'arrivée de l'impulsion pompe. Ce retard est contrôlé en faisant varier le chemin optique entre ces deux impulsions par un moteur pas à pas de pas d'échantillonnage  $e=1 \mu\text{m}$  (correspondant à un retard temporel de  $\frac{2e}{c}$ ). Les faisceaux sont polarisés parallèlement et les taches focales valent  $60 \mu\text{m}$ .

L'absorption transitoire  $\Delta A(t)$  mesurée à l'instant  $t$  est définie par :

$$\Delta A(t) = \log\left(\frac{I_R(\lambda)}{I_S(\lambda, t)}\right) - \log\left(\frac{I_R(\lambda)}{I_S(\lambda, -\infty)}\right).$$

Le bruit par tir est inférieur à  $2 \cdot 10^{-2}$  et les absorptions transitoires sont détectées à une précision supérieure à  $4 \cdot 10^{-3}$  après une seconde de moyennage (à une fréquence de 30 Hz). Les échantillons liquides peuvent être translats perpendiculairement aux faisceaux laser à une fréquence d'environ 1 Hz afin d'assurer leur renouvellement à chaque nouvelle impulsion pompe. En revanche, du fait d'une homogénéité insuffisante, les échantillons déposés dans des gels et les échantillons secs ne peuvent pas être déplacés.

### 3.3.1.2 Description du montage expérimental

Le schéma de principe est donné figure 3.10.

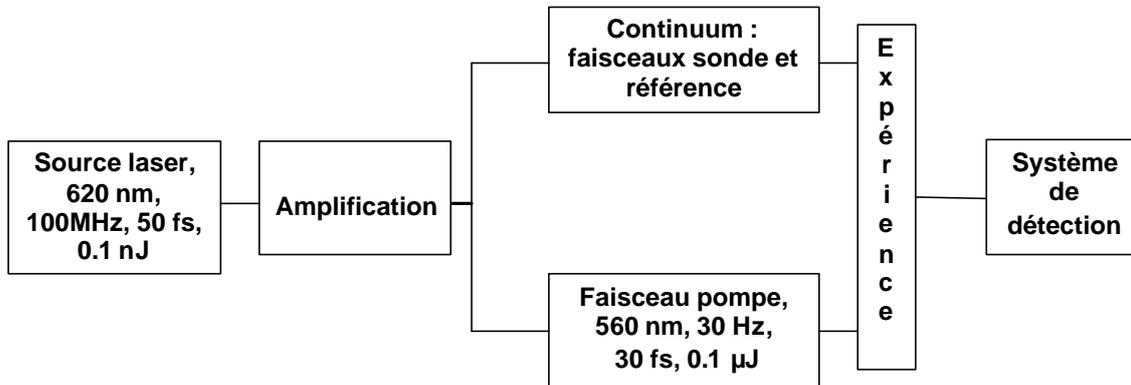


FIG. 3.10 : Schéma de principe de la chaîne laser utilisée.

Des impulsions générées dans une cavité en anneaux (100 MHz, 50 fs, énergie moyenne de 0.1 nJ) sont amplifiées à quelques centaines de microjoules, avec un taux de répétition plus faible (30 Hz). Cette impulsion amplifiée est focalisée sur une cuve d'eau de 8 mm pour générer un continuum de lumière blanche. Une partie du continuum, filtrée spectralement dans le plan de Fourier du faisceau généré afin de compenser la dispersion de vitesse de groupe, est le faisceau sonde, tandis que l'autre partie du continuum est réamplifiée dans la zone spectrale souhaitée et directement utilisée comme faisceau pompe.

### 3.3.1.3 Acquisition du signal

Les spectres d'absorption sont enregistrés dans deux régions spectrales distinctes : 448-552 nm et 657-832 nm. Dans le bleu, la dispersion de vitesse de groupe est précompensée pour être optimisée. Dans les spectres transitoires montrés par la suite, le chirp restant (< 100 fs entre 435 nm et 550 nm) est corrigé dans le bleu à  $\pm 50$ fs. Dans la région rouge, la dispersion de vitesse de groupe est optimisée à 700nm et le chirp résiduel n'est pas corrigé car à moins de 60 fs.

### 3.3.1.4 Ajustement des données cinétiques

Les données sont ajustées en utilisant une décroissance multiexponentielle. La fonction utilisée pour l'analyse des données cinétiques est de la forme

$$\Delta A(t) = \sum_{i=0}^{i \leq 4} (A_i \cdot \exp(-\frac{t}{\tau_i})) \quad (3.1)$$

$$(3.2)$$

convoluée à la fonction de corrélation croisée entre impulsions pompe et sonde. Les amplitudes  $A_i$  représentent la fraction de population qui décroît à un taux  $\tau_i$ .  $t$  est le retard temporel entre pompe et sonde.

Tous nos échantillons sont adaptés à la lumière par illumination à une lumière blanche. L'intensité excitatrice maximale, notée  $I_{exc}$ , correspond à environ 10% de molécules photoexcitées dans le cas de l'échantillon liquide.

### 3.3.2 Résultats sur l'échantillon liquide, adapté à la lumière, entraîné en mouvement

#### 3.3.2.1 Evolution de l'absorption transitoire

Les spectres différentiels d'absorption transitoire sont obtenus expérimentalement pour des longueurs d'ondes inférieures à 550 nm et supérieures à 650 nm. Il est interpolé dans la zone spectrale manquante à partir de spectres de référence [35].

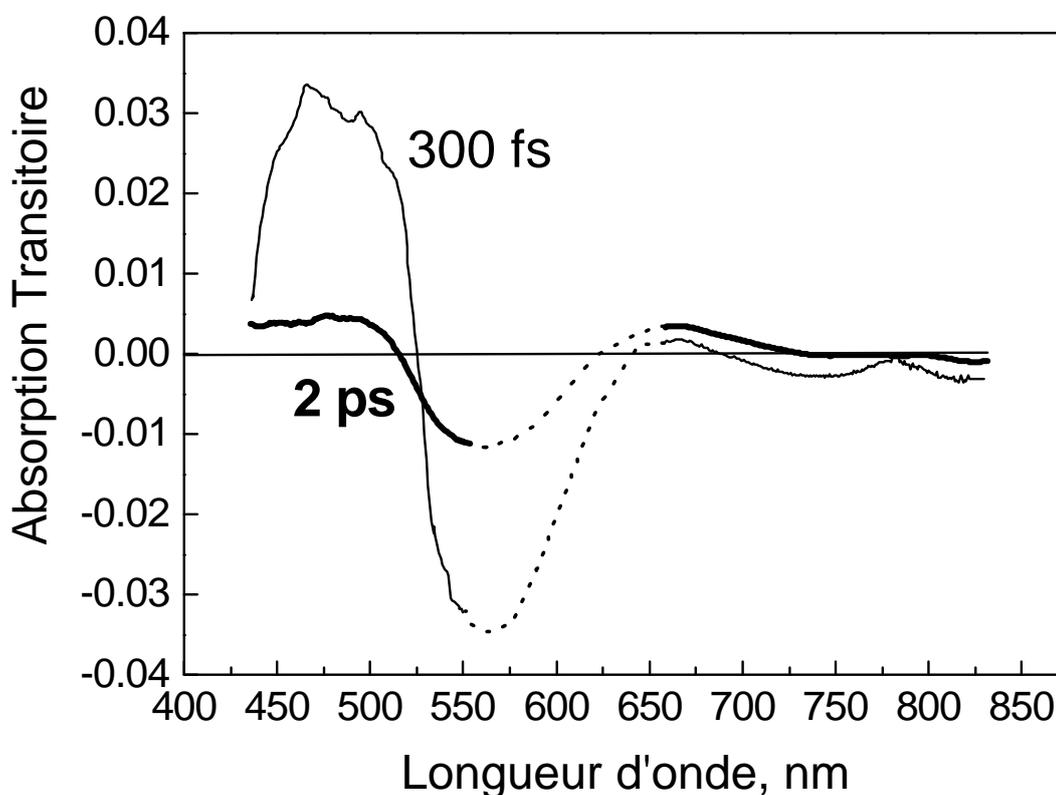


FIG. 3.11 : Spectres d'absorption transitoire à  $t=300$  fs et  $t=2$  ps de l'échantillon liquide de  $bR_{568}$ , adapté à la lumière, entraîné en rotation, excité à  $0,32.I_{exc}$ . Les données sont lissées dans le bleu pour éliminer les oscillations provenant de la correction du chirp.

Les principales caractéristiques des spectres sont :

- Forte diminution de l'absorption autour de 570 nm qui correspond au photoblanchiment de l'état fondamental.
- Absorption dans le bleu accompagnée d'une émission stimulée dans le proche infrarouge au-

dessus de 800 nm, possédant toutes deux la même évolution temporelle. La diminution apparente de l'absorption dans le proche infrarouge correspond à la contribution de l'émission stimulée de l'état excité puisque l'état fondamental n'y absorbe pas [98]. Ces variations caractéristiques sont donc attribuées à l'état fluorescent I.

-Augmentation avec le temps de l'absorption autour de 625 nm décrivant la formation du photoproduit J/K.

### 3.3.2.2 Données cinétiques

Les données cinétiques à quelques longueurs d'onde sont données ci-après (figure 3.12 et résultats des ajustements regroupés dans le tableau 3.1). Ils sont en accord avec ceux donnés dans la littérature [21, 98].

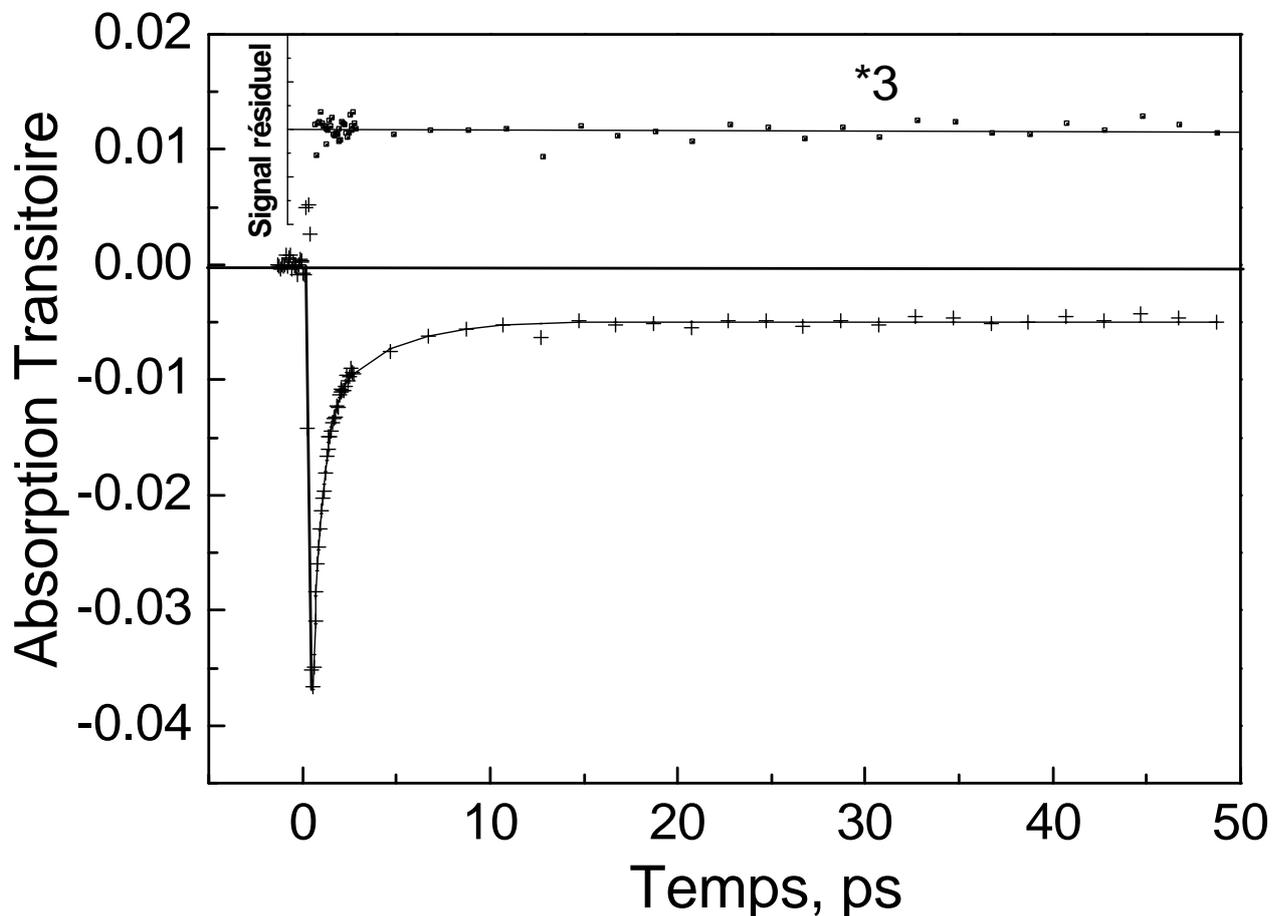


FIG. 3.12 : Evolution de l'absorption à 547 nm de l'échantillon liquide de  $\text{Br}_{\text{neutre}}$  en mouvement, pour une intensité pompe de  $0,32.I_{\text{exc}}$ . Les constantes de temps utilisées sont 0.5 ps et 3.3 ps.

Les cinétiques aux longueurs d'ondes individuelles présentent toutes une composante rapide (de moyenne 450 fs), attribuée à la décroissance de l'état excité lié à l'isomérisation tout-*trans*→13-*cis* vers l'état fondamental tout-*trans* [21]. La composante plus lente additionnelle

(3.3ps) à 547nm est attribuable à la formation du photoproduit K, absorbant à cette longueur d'onde [99].

TAB. 3.1 – Paramètres d'ajustement des données cinétiques d'absorption transitoire de l'échantillon liquide de  $bR_{neutre}$  excité à 560 nm (intensité de  $0,32.I_{exc}$ ) à trois longueurs d'onde sonde (471 nm, 547 nm et 825 nm).

$\lambda$ , nm	$A_0$ , mOD	$A_1$ , mOD	$\tau_1$ , ps	$A_2$ , mOD	$\tau_2$ , ps
471		48	0.5		
547	-5	-29	0.5	-10	3.3
825		-9	0.5		

### 3.3.3 Résultats sur l'échantillon sec

La figure 3.13 compare les spectres transitoires des échantillons de  $bR_{neutre}$  respectivement liquide, entraîné en mouvement et sec, immobile, pour un délai pompe sonde de 300 fs.

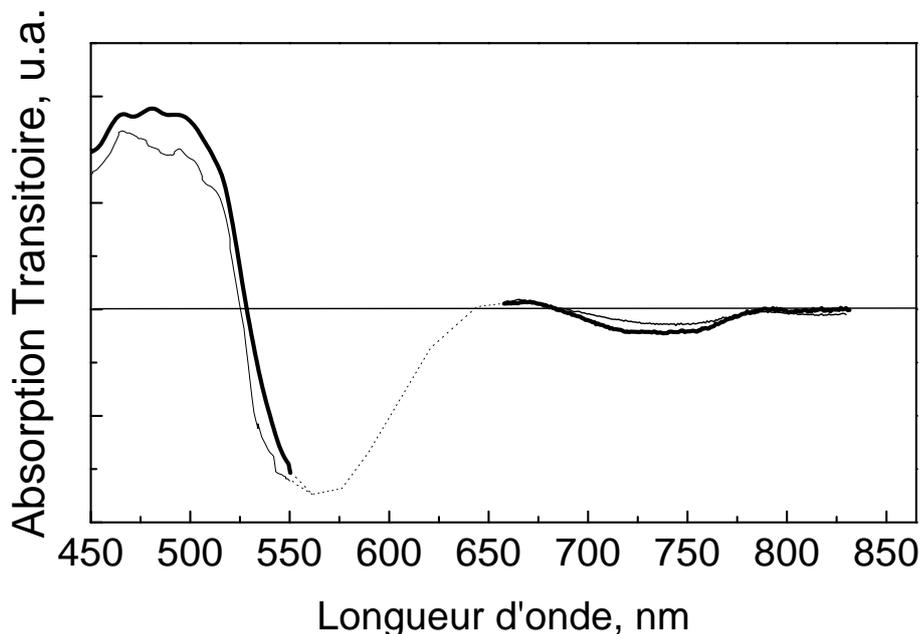


FIG. 3.13 : Comparaison entre les spectres d'absorption transitoire normalisés à  $t=300$  fs des échantillons solide (ligne épaisse) et liquide (ligne fine) de  $bR_{neutre}$ . Les spectres entre 550 nm et 650 nm sont interpolés d'après [35].

La forme des spectres est similaire, avec un photoblanchiment autour de 560 nm, l'absorp-

tion de l'état excité dans le bleu, et une faible absorption négative dans le proche infrarouge attribuée à de l'émission stimulée. Dans le bleu, le spectre transitoire de l'échantillon sec a une intensité plus élevée, liée à un changement du spectre d'absorption de l'état excité tout-*trans* avec l'hydratation, ou à des contributions d'un processus additionnel, ce que nous déterminons par la suite.

Nous avons aussi analysé les cinétiques à quelques longueurs d'ondes caractéristiques (figure 3.14 et tableau 3.2).

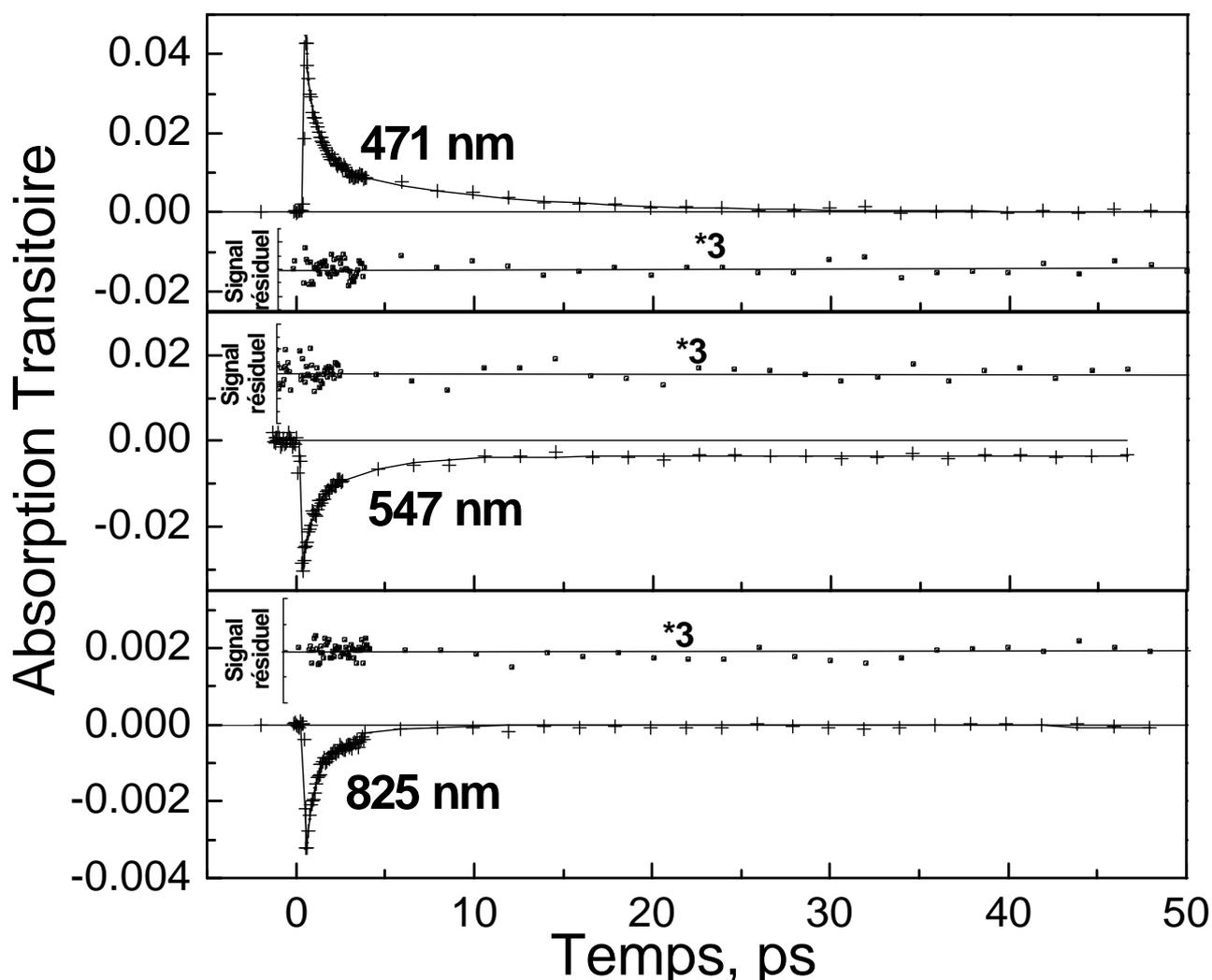


FIG. 3.14 : Courbes caractéristiques d'absorption transitoire de l'échantillon sec de  $bR_{neutre}$  montrant l'absorption (471 nm) et l'émission stimulée (825 nm) de l'état fluorescent I et le photoblanchiment à 547 nm, pour une intensité pompe de  $0,32.I_{exc}$ . Les constantes de temps utilisées sont entre 0.4-0.5 ps pour la composante rapide et entre 3-3.5 ps pour la composante lente.

TAB. 3.2 – Paramètres d’ajustement des données cinétiques d’absorption transitoire de l’échantillon sec de  $bR_{neutre}$  excité à 560 nm (intensité de 0,32.I<sub>exc</sub>) à trois longueurs d’onde sonde (471 nm, 547 nm et 825 nm).

$\lambda$ (nm)	$A_0$ , mOD	$A_1$ , mOD	$\tau_1$ , ps	$A_2$ , mOD	$\tau_2$ , ps
471		26	0.4	14	3.5
547	-4	-28	0.4	-9	3.1
825		-1	0.5	-1	3.4

On retrouve la composante rapide autour de 400-500 fs, comme dans le cas de l’échantillon sec, mais une composante additionnelle plus lente (3.5 ps) est présente à toutes les longueurs d’onde. Deux hypothèses concernant l’origine de cette composante sont à envisager :

1. La relaxation de la forme tout-*trans* du rétinale est modifiée par la diminution de l’humidité.
2. L’échantillon sec reste immobile durant toute l’expérience empêchant le renouvellement de l’échantillon à chaque nouvelle impulsion (nous utilisons des intensités excitatrices suffisamment faibles pour ne pas endommager l’échantillon), donc les protéines peuvent être dans l’état 13-*cis* à l’arrivée du faisceau sonde. De plus, l’adaptation à la lumière des échantillons secs est moins efficace que celle des échantillons liquides, et une fraction des molécules de l’échantillon sec est sous forme 13-*cis* dans l’état fondamental. De ces remarques on peut supposer que la composante lente est attribuable à la relaxation de la forme 13-*cis* du rétinale [100] et elle expliquerait également les différences observées dans les spectres d’absorption transitoire entre échantillons sec et en solution, figure 3.13. Dans ce cas, sa contribution devrait augmenter en augmentant l’intensité excitatrice, puisque cela revient à une plus grande accumulation des photoproduits. Nous allons étudier cette hypothèse dans le paragraphe suivant.

### 3.3.4 Contribution de la forme 13-*cis* du rétinale

Pour explorer la deuxième possibilité, nous allons varier les conditions d’excitation de deux manières :

- sur  $bR_{neutre}$  dans l’état liquide, mais à la différence de la première partie, l’échantillon est immobile, ce qui revient à augmenter la cadence effective d’excitation.
- sur  $bR_{neutre}$ , en variant l’intensité excitatrice.

#### 3.3.4.1 Variation des spectres d’absorption transitoire avec l’intensité excitatrice

La forme des spectres d’absorption transitoire sont modifiés avec l’intensité excitatrice. Ils sont représentés figure 3.15 pour un délai pompe-sonde de 300 fs.

##### 3.3.4.1.a. Echantillon liquide, immobile

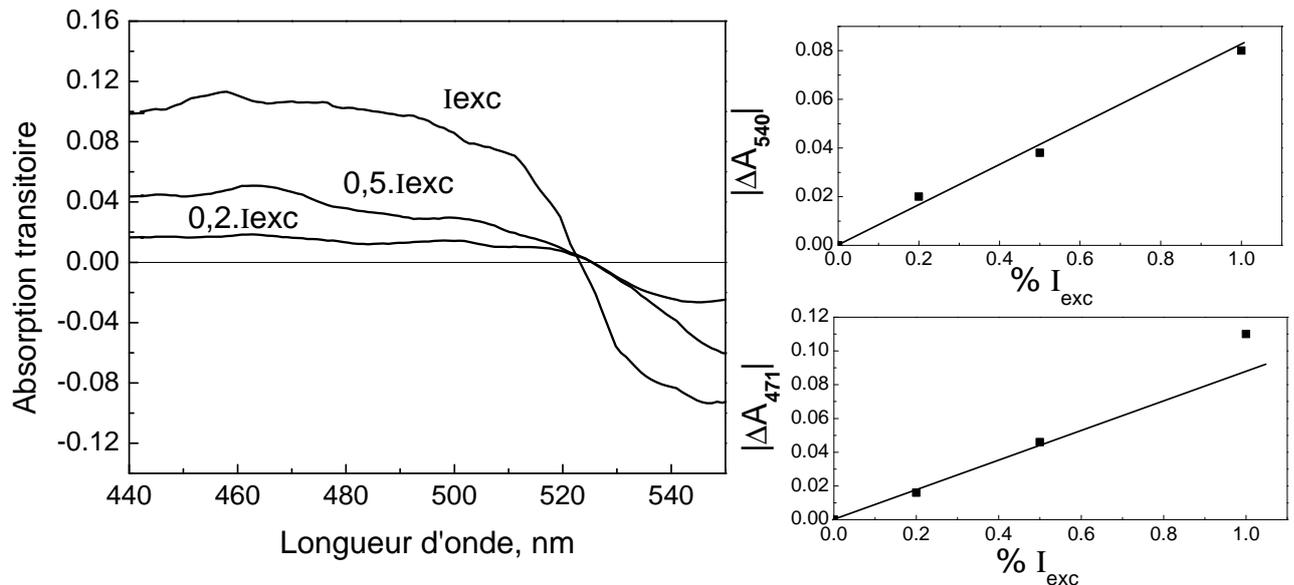


FIG. 3.15 : Spectre d'absorption transitoire à  $t=300$  fs de l'échantillon en solution, immobile, à différentes intensités excitatrices ( $0,2.I_{exc}$ ,  $0,5.I_{exc}$  et  $I_{exc}$ ). Les dépendances en intensité de l'absorption transitoire avec l'intensité excitatrice à 540 nm et 471 nm pour un délai pompe sonde de 300 fs sont également représentées. A 540 nm, les coefficients d'extinction molaire sont égaux pour les deux isomères tout-*trans* et 13-*cis* [90], d'où la linéarité du signal avec l'intensité excitatrice à cette longueur d'onde. A 471 nm, la linéarité n'est plus vérifiée.

### 3.3.4.1.b. Echantillon sec, immobile

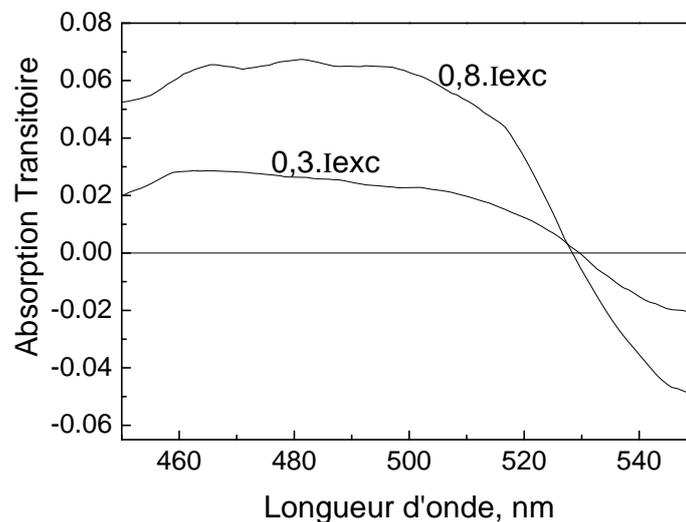


FIG. 3.16 : Spectre d'absorption transitoire pour un délai pompe sonde de 300 fs de l'échantillon solide à différentes intensités excitatrices.

Le rapport entre absorption induite dans le bleu et photoblanchiment autour de 540nm augmente avec l'intensité excitatrice, ce qui va dans le sens de la contribution d'un photoproduit dont le spectre transitoire est différent de celui de l'isomère tout-*trans*.

Pour compléter cette analyse, nous étudions les cinétiques à 471 nm, longueur d'onde à laquelle les contributions des composantes lentes et rapides sont bien séparées.

### 3.3.4.2 Variation des données cinétiques avec l'intensité excitatrice

Nous avons exploité les cinétiques à 471 nm, en variant l'intensité excitatrice, tout en nous assurant de ne pas saturer le signal. La figure 3.17 montre les courbes représentatives et le tableau 3.3 les paramètres d'ajustement associées.

TAB. 3.3 – Paramètres d'ajustement des données cinétiques d'absorption transitoire des échantillons liquide et sec de bR<sub>neutre</sub> excités à 560 nm et sondés à 471 nm. Dans les deux cas les échantillons étaient immobiles.

Cas de l'échantillon liquide, immobile.	I <sub>exc</sub>	A <sub>1</sub> , mOD	τ <sub>1</sub> , ps	A <sub>2</sub> , mOD	τ <sub>2</sub> , ps
	100	120	0.5	36	3.5
	50	51	0.4	13	3.4
	20	32	0.5		

Cas de l'échantillon sec, immobile.	I <sub>exc</sub>	A <sub>1</sub> , mOD	τ <sub>1</sub> , ps	A <sub>2</sub> , mOD	τ <sub>2</sub> , ps
	80	45	0.5	35	3.8
	32	26	0.4	14	3.5

On voit clairement une augmentation relative de la composante lente avec l'intensité excitatrice. Dans le cas de l'échantillon liquide immobile à faible intensité excitatrice, seule la composante rapide est présente et les résultats sont semblables à ceux obtenus dans le cas de l'échantillon liquide en mouvement (pour lequel il n'y a aucune dépendance avec l'intensité excitatrice). Il est important de rappeler (partie 3.2.1.2) que la durée du photocycle dans le cas de l'échantillon liquide est de quelques millisecondes. Compte tenu de la cadence du laser, à chaque nouvel impact du faisceau pompe, l'échantillon est à plus de 85% [101] dans son état fondamental tout-*trans* à saturation de l'intensité excitatrice, donc la contribution de l'isomère 13-*cis* reste très faible à basse intensité pompe. En augmentant l'intensité excitatrice, la contribution de l'isomère 13-*cis* devient plus importante (tout en restant inférieure à 15%), liée à une accumulation plus importante des photoproduits dans le photocycle.

Nous concluons que la composante lente correspond à la relaxation d'un intermédiaire du photocycle, c'est à dire à la forme 13-*cis* du rétinale. Nos études suggèrent que la relaxation de la forme 13-*cis*, *syn* (correspondant aux molécules non adaptées à la lumière) a une constante

de relaxation équivalente à la forme 13-*cis*, *anti* du rétinol (forme photoactivée du rétinol tout-*trans*) voisine de 3.5 ps.

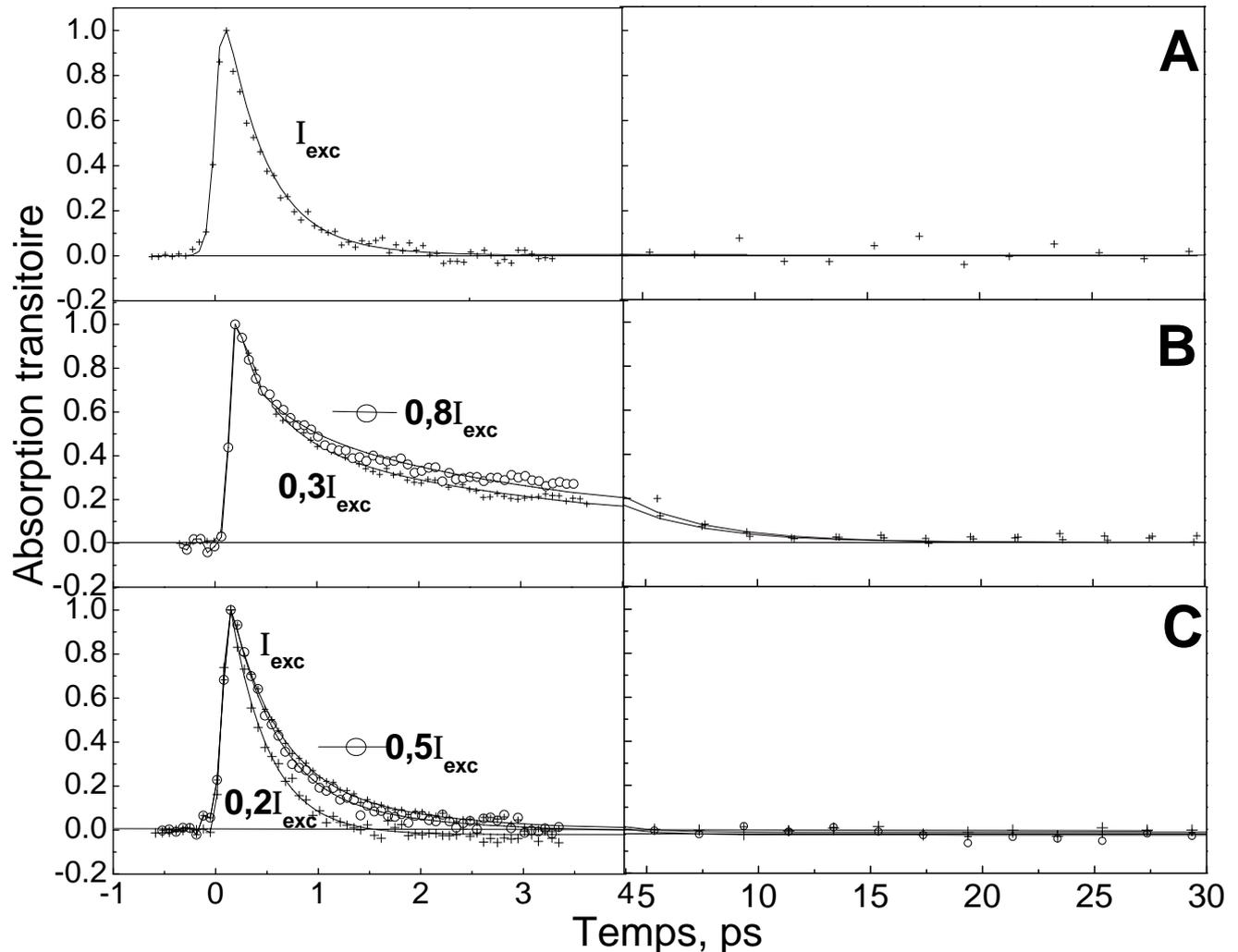


FIG. 3.17 : Variation de l'absorption normalisée à 471 nm de l'échantillon de  $bR_{neutre}$  à différentes intensités excitatrices. A. liquide et en mouvement ; B. sec et immobile ; C. liquide et immobile.

En conclusion, les vitesses des processus primaires  $bR^* \rightarrow J/K$  sont très similaires dans le cas des échantillons sec et liquide. Néanmoins, il est impossible de s'affranchir complètement de la contribution de la forme 13-*cis* du rétinol : pour l'échantillon sec, l'adaptation à la lumière est moins efficace (partie 3.2.1.2).

### 3.3.4.3 Pourcentage de forme 13-*cis* du rétinol à l'arrivée du faisceau pompe

Dans les parties qui vont suivre, nous supposons l'égalité des coefficients d'extinction des états fondamentaux des formes liquide et sec des échantillons, supposition justifiée par la proche similitude des spectres d'absorption dans l'état fondamental (figures 3.2 et 3.8).

Nous évaluons la contribution relative  $c_{cis}$  de la forme 13-*cis* du rétinol :

$$c_{cis} = \frac{N_{cis}}{N_{trans} + N_{cis}} = \frac{N_{cis}}{N_{total}} \quad (3.3)$$

avec  $N_{trans}$  et  $N_{cis}$  les quantités de molécules photoexcitées (exprimée en moles) initialement sous forme tout-*trans* et 13-*cis* respectivement. La quantité totale de molécules photoexcitées est noté  $N_{total}=N_{trans} + N_{cis}$ .

Pour évaluer les différents paramètres de cette équation, nous allons utiliser les résultats obtenus dans la partie précédente qui montrent que la contribution de la relaxation de l'isomère 13-*cis* entraîne une modification du rapport à temps court entre photoblanchiment à 540 nm (nous avons choisi de prendre la valeur d'absorption transitoire à 540 nm car les coefficients d'absorption molaire de l'état fondamental à cette longueur d'onde sont identiques pour les deux isomères tout-*trans* et 13-*cis* [90]) et absorption induite à 471 nm pour laquelle les contributions relatives des formes 13-*cis* et tout-*trans* du rétinol sont bien séparées. On connaît la valeur  $\alpha_{trans}$  de ce rapport dans le cas du rétinol tout-*trans* grâce aux données obtenues avec l'échantillon liquide entraîné en mouvement.

A 471 nm, nous avons vu que, dans les tableaux 3.2 et 3.3,  $A_1$  (amplitude de la composante rapide) et  $A_2$  (amplitude de la composante lente) sont respectivement les amplitudes relatives à la relaxation des isomères tout-*trans* et 13-*cis* du rétinol. Toute variation  $\Delta\alpha$  du rapport  $\frac{\Delta A_{540}(0)}{A_1}$  autour de la valeur de référence  $\alpha_{trans}$  sera représentative de la contribution du rétinol sous forme 13-*cis* :

$$\begin{aligned} \frac{\Delta A_{540,m}(0)}{A_{1,m}} &= \alpha_{trans} \\ \frac{\Delta A_{540,i}(0)}{A_{1,i}} &= \alpha_{trans} + \Delta\alpha \end{aligned} \quad (3.4)$$

L'indice  $i$  signifie qu'il s'agit des paramètres associés à l'échantillon immobile, et l'indice  $m$  à l'échantillon mobile.

En supposant qu'à  $t=0$  les données à 540nm sont uniquement représentatives du photoblanchiment de l'état fondamental [102], on peut écrire :

$$\Delta A_{540}(0) = N_{total}\epsilon_{g,540} = (N_{trans} + N_{cis})\epsilon_{g,540} \quad (3.5)$$

et  $c_{cis}$  s'écrit immédiatement :

$$c_{cis} = \frac{\Delta\alpha}{\Delta\alpha + \alpha_{trans}} \quad (3.6)$$

Les valeurs de  $c_{cis}$  sont données dans le tableau 3.4 pour différentes intensités excitatrices.

A intensité excitatrice équivalente, la contribution de la forme 13-*cis* du rétinol est supérieure dans le cas de l'échantillon sec : à intensité de pompe égale, le nombre de protéines dont le photocycle n'est pas terminé à l'arrivée du prochain faisceau pompe est plus important dans le cas de l'échantillon sec. Nous pouvons évoquer deux raisons pour expliquer cela :

- L'échantillon sec ne peut pas être complètement adapté à la lumière (mélange 8 : 2 des formes tout-*trans* et 13-*cis* à 50% d'humidité, [51]).
- Le photocycle de l'échantillon solide est ralenti par rapport à celui de l'échantillon liquide [88].

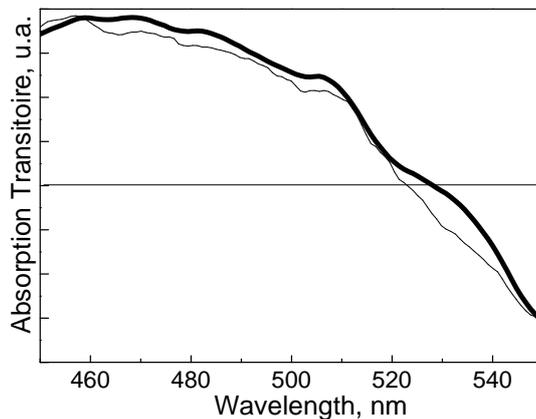
TAB. 3.4 – Variation de la concentration relative de rétinol dans l'état 13-*cis* à l'arrivée du faisceau sonde.

	% I <sub>exc</sub>	c <sub>cis</sub> (en %)
échantillon	100	17
liquide	50	14
immobile	20	≤5
échantillon	80	34
sec	32	24

#### 3.3.4.4 Obtention du spectre d'absorption transitoire de la forme 13-*cis* du rétinol

A partir des données expérimentales obtenues dans le cas des échantillons immobiles, il est possible de remonter au spectre transitoire à temps court du rétinol 13-*cis*. Pour cela, nous soustrayons la contribution relative de la forme tout-*trans* du rétinol aux spectres transitoires obtenus dans le cas des échantillons immobiles. La forme du spectre transitoire de l'isomère tout-*trans* correspond à celle obtenue pour l'échantillon de bR<sub>neutre</sub> liquide, en mouvement, qui n'a pas de contribution de la forme 13-*cis*. L'amplitude de la contribution tout-*trans* s'évalue en normalisant sur la contribution de la phase rapide (amplitude A<sub>1</sub> de la phase à 400-500 fs) à 471 nm. Les spectres transitoires obtenus sont représentés figure 3.18.

La forme des spectres obtenus est indépendante de l'intensité excitatrice (non montré), validation à posteriori de la méthode utilisée. Les spectres sont similaires pour les échantillons sec et liquide, en accord avec l'idée qu'il s'agit dans les deux cas de la forme 13-*cis*. Le spectre associé à la forme excitée 13-*cis* présente une absorption dans le bleu plus importante que l'état tout-*trans*. Ces différences spectrales confirment que l'hétérogénéité des cinétiques dans le cas de l'échantillon sec est associée à la contribution de différentes formes du rétinol plutôt qu'à des constantes de temps de photoisomérisation différentes de la forme tout-*trans* du rétinol.


 FIG. 3.18 : Spectre transitoire de l'état *cis*, échantillon sec (trait gras) et liquide (trait fin).

### 3.3.5 Modification du pH

#### 3.3.5.1 Etude des échantillons déposés dans des gels

Comme l'utilisation de gels est indispensable pour l'acidification sous des conditions d'hydratation (paragraphe 3.2.2), nous allons dans un premier temps vérifier qu'à pH neutre, les échantillons déposés dans des gels ont une cinétique identique aux échantillons liquides. Les données sont répertoriées dans le tableau 3.5.

TAB. 3.5 – Paramètres d'ajustement des données cinétiques d'absorption transitoire des échantillons de  $bR_{neutre}$  liquide et déposé dans des gels, excités à 560 nm et sondés à 547 nm et 471 nm. Les échantillons étaient immobiles.

Les constantes de temps et spectres (non représentés) caractéristiques sont identiques, ce qui indique que le gel est un bon modèle pour caractériser un environnement aqueux.

échantillon	$\lambda$ (nm)	$A_0$ , mOD	$A_1$ , mOD	$\tau_1$ , ps	$A_2$ , mOD	$\tau_2$ , ps	% <i>cis</i>
liquide	471		49	0.4	3	3.4	10
	547	-5	-30	0.4	-14	3.1	
gel	471		38	0.4	4	3.5	11
	547	-4	-32	0.4	-11	3.1	

## 3.3.5.2 Effet d'une diminution du pH

Les spectres d'absorption transitoire pour les échantillons secs de  $bR_{bleu}$  et  $bR_{pourpre}$  sont qualitativement similaires à ceux trouvés pour  $bR_{neutre}$ . Ils sont en bon accord avec ceux obtenus dans des gels [99]. L'augmentation de l'absorption à 480nm en parallèle à l'émission stimulée dans le proche infrarouge représente la formation du photoproduit I.

L'évolution cinétique des spectres transitoires de  $bR_{pourpre}$  et  $bR_{bleu}$  est ralentie par rapport au cas de l'échantillon neutre. Nous étudions plus en détail ces cinétiques pour quelques longueurs d'onde (figure 3.19 et résultats présentés tableau 3.7).

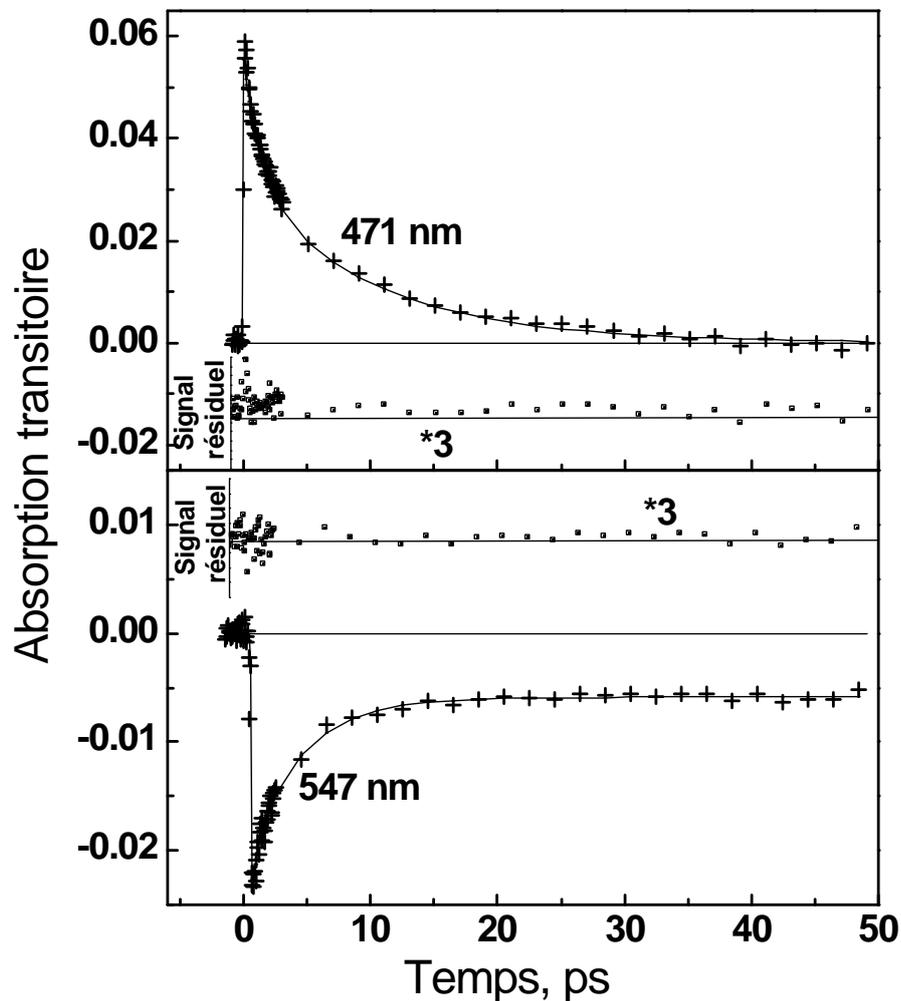


FIG. 3.19 : Courbes caractéristiques d'absorption transitoire de l'échantillon sec de  $bR_{bleu}$  montrant l'absorption (471 nm) de l'état fluorescent  $I_{460}$  et le photoblanchiment de l'état fondamental. L'intensité pompe vaut 0,80.Iexc. Les constantes de temps utilisées sont entre 0.4 et 0.5 ps pour la composante rapide, et entre 3 et 3.5 ps pour la composante lente.

Les cinétiques sont plus complexes dans le cas des échantillons acides. D’abord nous analysons les cinétiques à 471 nm, longueur d’onde pour laquelle les cinétiques sont caractérisées par les relaxations des états excités des formes tout-*trans* et 13-*cis*. Une dépendance en intensité des paramètres (tableau 3.6) permet de distinguer les deux isomères : comme dans le cas de l’échantillon neutre, on s’attend à ce que la contribution de l’isomère 13-*cis* augmente avec l’intensité excitatrice du fait d’une plus grande accumulation des photoproduits.

TAB. 3.6 – Variation des paramètres de fit à 471 nm avec l’intensité excitatrice. Les trois dernières colonnes indiquent la contribution relative des différentes composantes.

échantillon	%Iexc	A <sub>0</sub> ,	A <sub>1</sub> ,	τ <sub>1</sub> ,	A <sub>2</sub> ,	τ <sub>2</sub> ,	A <sub>3</sub> ,	τ <sub>3</sub> ,	%A <sub>1</sub>	%A <sub>2</sub>	%A <sub>3</sub>
		OD	OD	ps	OD	ps	OD	ps			
pourpre sec	80		0.030	0.9	0.019	5.2	0.0076	0.2	53	33	14
	32		0.018	0.9	0.007	5.2	0.005	0.2	60	23	17
bleu sec	80		0.022	1.9	0.029	17.3	0.014	0.2	34	44	22
	32		0.013	1.7	0.009	18.0	0.0061	0.2	46	32	22

La contribution relative de l’amplitude A<sub>2</sub> (des composantes à 18 ps et 5 ps) augmente avec l’intensité excitatrice dans le cas de bR<sub>bleu</sub> et bR<sub>pourpre</sub> ; cette dernière est donc attribuable à la relaxation de la forme 13-*cis* du rétinale.

Les cinétiques à 547 nm sont d’abord ajustées en imposant les constantes de temps des cinétiques à 471 nm et une composante additionnelle à 3 ps. Après une première convergence, tous les ajustements sont optimisés. Les résultats des ajustement sont donnés tableau 3.7.

Les différents processus sont ralentis par rapport aux échantillons neutres, conformément aux résultats trouvés sur des échantillons hydratés [98, 99]. bR<sub>bleu</sub> est composé dans son état fondamental d’un mélange 6 : 4 des deux isomères tout-*trans* et 13-*cis* de rétinale [98, 99]. La contribution de la forme 13-*cis*, dont la relaxation s’effectue plus lentement que celle de la forme tout-*trans*, est plus importante et complexifie les données. A 471 nm, les données sont composées de deux exponentielles, de constantes de temps égales à 1.7 et 18 ps correspondant respectivement à la contribution de la forme tout-*trans* et 13-*cis*. A 547 nm, la composante supplémentaire à 3 ps est attribuable à la formation de l’intermédiaire K. Comme montré dans la partie précédente, la formation des premiers photoproduits dans le cas de l’échantillon sec à pH neutre est similaire au cas de l’échantillon déposé dans des gels d’agarose, et par extrapolation semblable aux échantillons liquides. Les cinétiques sont également ralenties dans le cas de bR<sub>pourpre</sub>, les constantes de temps de relaxation des formes 13-*cis* et tout-*trans* valent cette

fois autour de 5 et 1 ps respectivement (contre 3,5 et 0,5 pour  $bR_{neutre}$ ).

Quelle que soit la forme de bR (neutre, acide bleu, acide pourpre), nous pouvons ajuster les données de sorte que la formation du photoproduit K a une constante de temps de 3,3 ps. Ceci est en accord général avec l'idée que K est une forme relaxée thermiquement de J [48,103].

Dans les deux cas les cinétiques sont invariantes avec l'humidité, seule la contribution de la forme 13-*cis* augmente pour la même raison que dans le cas de l'échantillon neutre (ralentissement du photocycle et rétinale sous forme 13-*cis* en quantité plus importante dans le cas de l'échantillon sec).

Pour obtenir un ajustement optimal des données cinétiques pour  $bR_{bleu}$  et  $bR_{pourpre}$ , une composante additionnelle de 200 fs est nécessaire à toutes les longueurs d'onde. Cette composante, qui reflète certainement des dynamiques dans l'état excité [98], est contenue dans la composante autour de 400-500 fs dans le cas de  $bR_{neutre}$ .

TAB. 3.7 – Paramètres d'ajustement à 0,32.I<sub>exc</sub> à 547 nm et 470 nm pour les échantillons  $bR_{pourpre}$  et  $bR_{bleu}$  secs et déposés dans des gels.

échantillon	$\lambda$ , nm	$A_0$ , mOD	$A_1$ , mOD	$\tau_1$ , ps	$A_2$ , mOD	$\tau_2$ , ps	$A_3$ , mOD	$\tau_3$ , ps	$A_4$ , mOD	$\tau_4$ , ps
neutre sec	471		26	0.4	14	3.5				
	547	-4	-28	0.5	-9	3.1				
bleu sec	471		13	1.7	9	18.0	6.1	0.2		
	547	-3	-4	1.6	-1	18.1	-4	3.4	-1	0.2
bleu gel	471		11	1.7	6.8	18.3	4	0.2		
	547	-4	-5	1.7	-1	18.0	-6	3.2	-1	0.2
pourpre sec	471		18	0.9	7	5.2	5.1	0.2		
	547	-0.004	-12	0.8	-1.4	5.2	-7.1	3.3	-3.9	0.2
pourpre gel	471		2.4	0.9	1.1	5.6	5.6	0.2		
	547	-3.6	-9.6	1.0	-1	5.1	-5	3.7	-3.8	0.2

### 3.3.6 Etude de l'influence de l'humidité sur le rendement quantique de la photoisomérisation

#### 3.3.6.1 Méthode de calcul

Le rendement quantique de photoisomérisation associé à l'isomère tout-*trans*,  $\phi_q$ , correspond au rapport entre la quantité de molécules photoisomérisées  $N_i$  (en moles) et la quantité totale de molécules tout-*trans* photoexcitées  $N_{trans}$  (en moles) :

$$\phi_q = \frac{N_i}{N_{trans}} \quad (3.7)$$

*Calcul de  $N_i$*  : A 547 nm, la composante notée  $A_0$  dans les ajustements des données (tableaux 3.1, 3.5, 3.7) représente le changement de l'absorption à temps long (délai pompe-sonde  $\Delta t > 30$  ps) dû à la formation de photoproduits (contribution de l'état K), diminuée par le photoblanchiment de l'état fondamental, d'où l'expression :

$$\Delta A_{547}(\Delta t > 30 \text{ ps}) = N_i \cdot (\epsilon_{g,547} - \epsilon_{K,547})$$

( $\epsilon_{K,547}$  est le coefficient d'extinction molaire de l'état K à 547 nm [95, 104, 105],  $\epsilon_{g,547}$  celui de l'état fondamental de la forme tout-*trans* du rétinol [95, 104].

On a fait l'hypothèse que le signal à temps long ( $t = 30$  ps) est uniquement lié à la contribution de la forme tout-*trans* du rétinol, hypothèse habituelle [99] et dans notre cas justifiée à posteriori par la flagrante similitude des spectres transitoires à temps long des échantillons (figure 3.20) : s'il y avait une contribution significative d'un photoproduit de l'état 13-*cis*, on suppose que le spectre de ce produit serait différent.

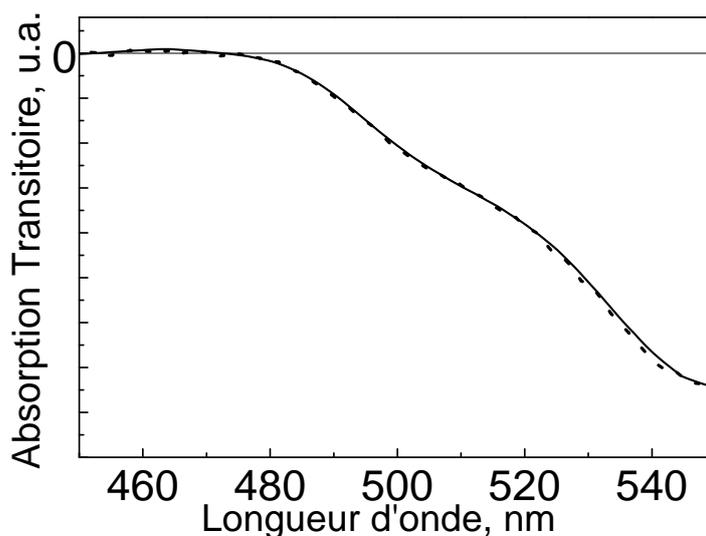


FIG. 3.20 : Similitude des spectres d'absorption transitoire des échantillons de  $bR_{neutre}$  solide (trait plein) et liquide en mouvement (trait pointillé) à temps long (délai pompe-sonde=30 ps).

Calcul de  $N_{trans}$  : La méthode de calcul de  $N_{total}$  s'obtient directement par la formule [99]

$$\Delta A_{547}(0) = N_{total} \cdot \epsilon_g$$

utilisant le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_g$  de l'état fondamental à 547 nm.

On souhaite obtenir le rendement quantique associé uniquement à l'isomère tout-*trans*, donc il ne faut conserver que la contribution de cet isomère à temps court :

$$\Delta A_{547,trans}(0) = N_{trans} \cdot \epsilon_{g,547}$$

En définitive le rendement quantique s'écrit

$$\phi_q = \frac{N_i}{N_{trans}} = \frac{\Delta A_{547}(\Delta t > 30ps)}{\Delta A_{547,trans}(0ps) \cdot (1 - \epsilon_K / \epsilon_{g,547})}. \quad (3.8)$$

Dans le cas des échantillons de bR<sub>neutre</sub>, nous construisons les spectres d'absorption transitoire auxquels a été enlevée la contribution des spectres relatifs à la forme 13-*cis* comme ci-dessus (paragraphe 3.3.4.4). On a directement la valeur de  $\Delta A_{547,trans}(0ps)$ .

Dans le cas des échantillons bR<sub>bleu</sub> et bR<sub>pourpre</sub>, le calcul est simplifié car la contribution de la relaxation de l'isomère tout-*trans* aux données à 547nm est facilement séparable dans ce cas, la constante de temps  $\tau_1$  (d'amplitude associée  $A_1$ ) dans les ajustements des données cinétiques à 547nm étant différente de celle de la formation de l'état K. On la note  $A_{1,547}$ .

Le calcul des rendements quantiques s'obtient par la formule :

$$\phi_q = \frac{\Delta A_{547}(\Delta t > 30ps)}{A_{1,547}(1 - \epsilon_{K,547} / \epsilon_{g,547})}. \quad (3.9)$$

### 3.3.6.2 Résultats

Le tableau 3.8 résume les résultats. Il est clair qu'en variant l'humidité et le pH, le rendement quantique reste constant (valeur moyenne 65%). Les valeurs de rendement quantiques trouvées pour les échantillons hydratés sont en bon accord avec la littérature qui rapporte des valeurs de rendement quantique allant de 58 à 70% [99, 102, 104, 106]. Il s'avère donc que le rendement quantique est inchangé en environnement sec pour les échantillons neutre, acide bleu et acide pourpre.

TAB. 3.8 – Rendement quantique

échantillon	$\epsilon_{K,547}/\epsilon_{g,547}$ , [99, 102, 104, 106]	rendement quantique (%) à $\pm 5\%$
neutre, liquide	0.80	66
neutre, solide	0.80	63
acide bleu, gel	0.64	69
acide bleu, solide	0.64	69
acide pourpre, gel	0.73	64
acide pourpre, solide	0.73	60

### 3.3.7 Conclusions

1. Bien que la présence d'eau soit indispensable au transfert complet de protons, nous avons montré que l'isomérisation a lieu avec le même rendement quantique.

2. En modifiant l'humidité, les constantes de temps de l'isomérisation *trans*  $\rightarrow$  *13-cis* ( $bR^* \rightarrow J$ ) et la relaxation  $J \rightarrow K$  sont inchangées, à la différence des processus plus lents qui sont tous affectés par l'état d'hydratation ambiante. Pendant les processus primaires du photocycle, la communication avec l'environnement extra-membranaire de la protéine ne joue pas de rôle.

3. Lorsque les échantillons sont immobiles, la relaxation du rétinol *13-cis* contribue aux données. Pour éliminer cette contribution, il faut donc pouvoir déplacer l'échantillon entre chaque impulsion laser excitatrice, ce qui est moins contraignant du point de vue rapport signal à bruit pour des méthodes expérimentales "background-free" comme la méthode d'émission infrarouge (chapitre 2).

4. Les études développées dans ce chapitre indiquent que quant aux processus primaires, les échantillons secs de bactériorhodopsine sont aussi valables pour obtenir des informations sur la bactériorhodopsine dans ses conditions natives.

# Chapitre 4

---

## Emission infrarouge et transfert de charges dans la bactériorhodopsine : théorie et résultats expérimentaux

L'utilisation du montage de spectroscopie cohérente d'émission infrarouge (chapitre 2) va nous permettre de détecter et de caractériser la polarisation macroscopique générée par redressement optique dans des échantillons orientés de bactériorhodopsine [69]. Les impulsions excitatrices (centrées à 560 nm) sont en résonance avec la transition optique.

Nous utilisons un modèle à deux niveaux basé sur les équations de Bloch pour décrire les phénomènes observés.

En plus de la réponse électronique "instantanée" de l'échantillon nous détectons une émission infrarouge qui dure sur plusieurs picosecondes, reflétant des mouvements de charges associés aux mouvements vibrationnels. Elle est analysée en fréquence et en phase. La détection simultanée des réponses électronique et vibrationnelle permet d'ouvrir des pistes sur le rôle fonctionnel de la polarisation initiale en étudiant la dynamique structurale qui lui est subséquente.

## 4.1 Allure des signaux émis par la bactériorhodopsine

Les échantillons de bactériorhodopsine orientés sur plaque de germanium sont insérés dans le montage expérimental décrit figure 2.15. L'interférogramme associé au signal émis par la bactériorhodopsine est montré figure 4.1.

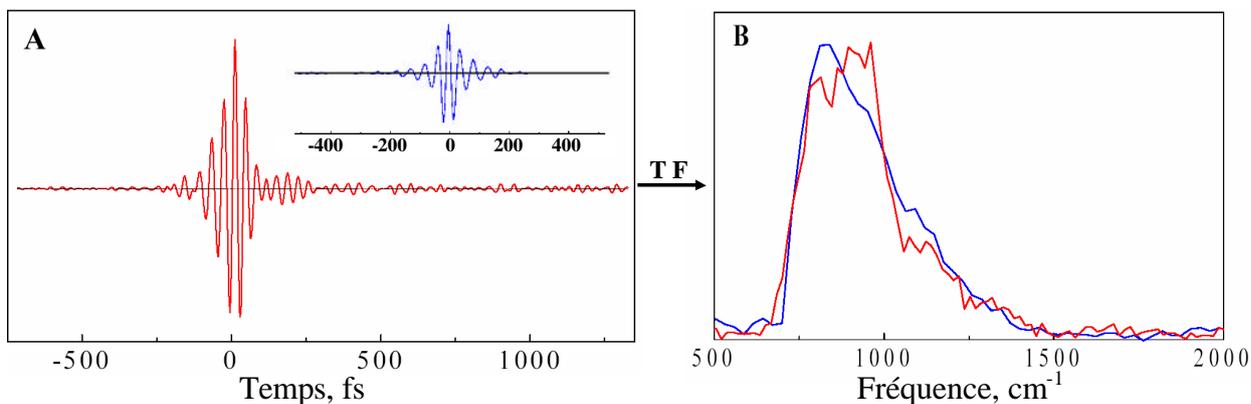


FIG. 4.1 : Interférogramme entre les signaux infrarouge émis par la bactériorhodopsine entraînée en rotation (6 Hz, sur un rayon de 50 mm) et le signal de référence émis par le GaAs en rouge. Le signal d'intercorrélacion (noté GaAs/GaAs) entre les signaux infrarouges issus du GaAs est rappelé en bleu. Les signaux laissent apparaître deux parties : un important signal à  $t=0$  ( $\approx 70\%$  du signal émis par le GaAs sous les mêmes conditions) en grande partie dû à la réponse électronique, et un signal à temps positif (partie vibrationnelle) qui reflète des modes vibrationnels du système rétinale/protéine. Par transformée de Fourier (TF), on obtient le spectre de l'interférogramme de l'émission de GaAs/GaAs en bleu, et celui de bR/GaAs en rouge.

Le signal émis autour de  $t=0$  est très similaire à celui observé dans le cas de l'autocorrélacion dans un cristal de GaAs. On observe en plus un signal aux temps positifs, attribué aux modes vibrationnels du système rétinale/protéine. Par transformée de Fourier, on remonte aux spectres infrarouges émis. On rappelle que la coupure à  $700\text{ cm}^{-1}$  est liée au détecteur MCT, et la largeur du spectre émis est directement liée à la durée de l'impulsion visible excitatrice.

Nous vérifions qu'à chaque nouvelle impulsion excitatrice l'échantillon est dans son état fondamental tout-*trans* (figure 4.2). Pour cela nous utilisons les échantillons orientés sur la plaque en verre recouverte d'une couche conductrice ( $\text{SnO}_2$ ). L'échantillon est posé au niveau du porte échantillon de la bactériorhodopsine dans le dispositif expérimental de la figure 2.15, donc dans les mêmes conditions expérimentales que pour les expériences d'émission cohérente, mais aucun semiconducteur n'est inséré. Ainsi deux faisceaux visibles sont focalisés sur la même zone de l'échantillon, un faisceau pompe intense (correspondant à l'énergie utilisée dans les expériences d'émission cohérente) et une sonde de très faible énergie. Nous mesurons alors les variations d'absorption du faisceau sonde en avance temporelle (équivalente à  $-2\text{ ps}$  dans l'expérience d'émission cohérente) lorsque seul le faisceau sonde est incident et lorsque les deux faisceaux

sont incidents.

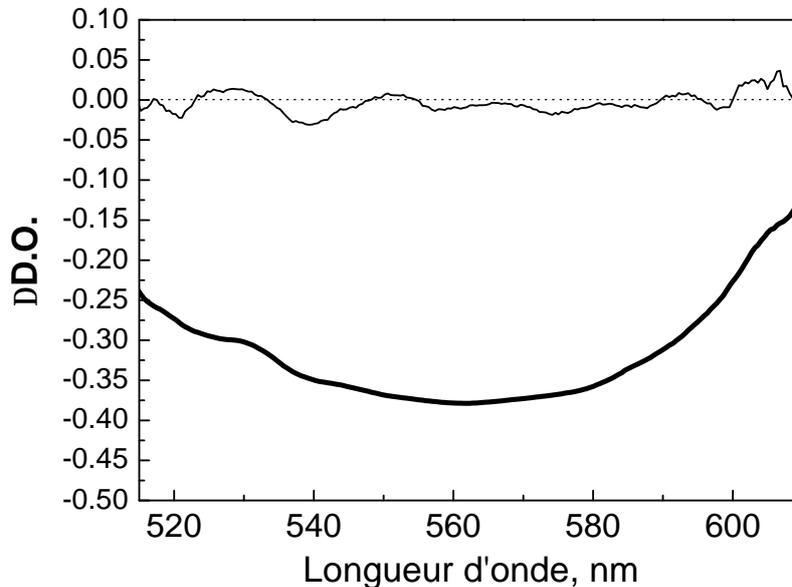


FIG. 4.2 : Différence d'absorption visible à  $t = -2$  ps avec échantillon entraîné en rotation à 6 Hz (trait fin) et immobile (trait épais).

Dans le cas de l'échantillon entraîné en rotation, il n'y a aucune différence d'absorption que le faisceau pompe soit incident sur l'échantillon ou pas : la vitesse de rotation est suffisante pour que la grande majorité des molécules soient dans leur état fondamental tout-*trans* avant l'arrivée de chaque nouvelle impulsion excitatrice. En revanche, lorsque l'échantillon est immobile (trait épais), les variations d'absorption suite à la présence du faisceau pompe traduisent la présence de molécules dans des états intermédiaires du photocycle à chaque nouvelle impulsion sonde. Le spectre différentiel indique en effet une disparition du spectre de l'état fondamental à 560 nm. La zone spectrale couverte par le faisceau sonde n'est pas assez étendue pour analyser en détail la nature des états intermédiaires accumulés.

Nous allons, dans les paragraphes qui suivent, analyser successivement les deux parties, "électronique" et "vibrationnelle", avec pour but d'obtenir des informations sur les premiers processus photoinduits de la bactériorhodopsine et sur leur rôle fonctionnel.

## 4.2 Réponse électronique : redressement optique dans la bactériorhodopsine

### 4.2.1 Caractérisation de l'émission

#### 4.2.1.1 Vérification de la non linéarité du second ordre du signal

Le but de cette partie est de vérifier que l'émission infrarouge est bien attribuable à un phénomène non linéaire du deuxième ordre. Plusieurs expériences de vérification ont été effectuées. Nous avons (1) comparé échantillons orientés et non orientés, (2) mesuré l'amplitude du signal en faisant varier l'intensité visible excitatrice, et (3) en faisant varier l'orientation de l'échantillon par rapport à l'axe perpendiculaire aux faisceaux. Finalement nous avons (4) mesuré la polarisation et l'amplitude du signal émis en choisissant une polarisation s ou p pour le faisceau excitateur.

##### 4.2.1.1.a. Importance de la non-centrosymétrie du milieu

Pour obtenir des phénomènes non linéaires du deuxième ordre, il est indispensable d'avoir des échantillons non centrosymétriques, ce qui revient dans notre cas à orienter les échantillons (paragraphe 3.2.1). Nous avons vérifié qu'il n'y avait pas d'émission infrarouge dans le cas d'échantillons non orientés (figure 4.3).

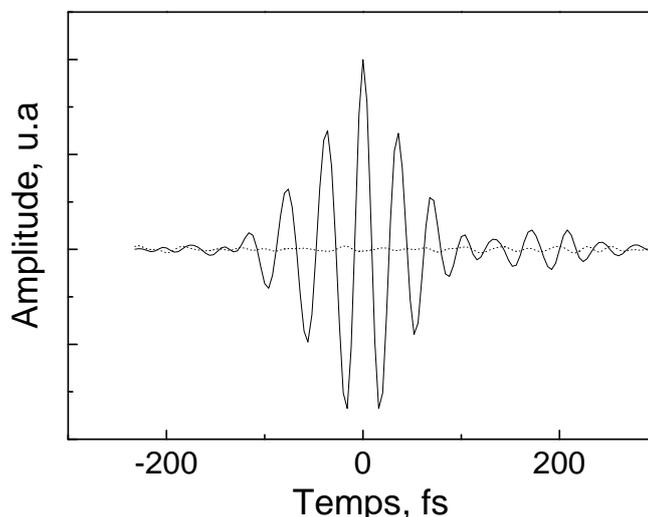


FIG. 4.3 : En trait plein, interférogramme entre signal émis par un échantillon orienté de  $bR_{neutre}$  et signal émis par GaAs. En pointillés, même interférogramme mais avec un échantillon non orienté de  $bR_{neutre}$ . L'absence de signal dans le cas d'un échantillon non orienté est un argument fort en faveur d'un phénomène non linéaire du deuxième ordre.

#### 4.2.1.1.b. Dépendance en intensité

Pour cette mesure nous plaçons successivement plusieurs densités optiques sur le trajet du faisceau visible excitateur de la bactériorhodopsine. Notre méthode de détection étant directement sensible au champ émis par la bactériorhodopsine, l'amplitude de l'interférogramme des émissions bR/GaAs (figure 4.1 ou 4.3) donne directement l'amplitude relative du champ infrarouge émis par bR, dans la mesure où la largeur des spectres infrarouges reste constante. La figure 4.4 montre que le signal infrarouge émis par la bactériorhodopsine (champ infrarouge) varie linéairement avec l'intensité excitatrice (ou encore avec le nombre de photons reçus), c'est à dire avec le carré du champ électrique visible, comme attendu dans un processus non linéaire du deuxième ordre.

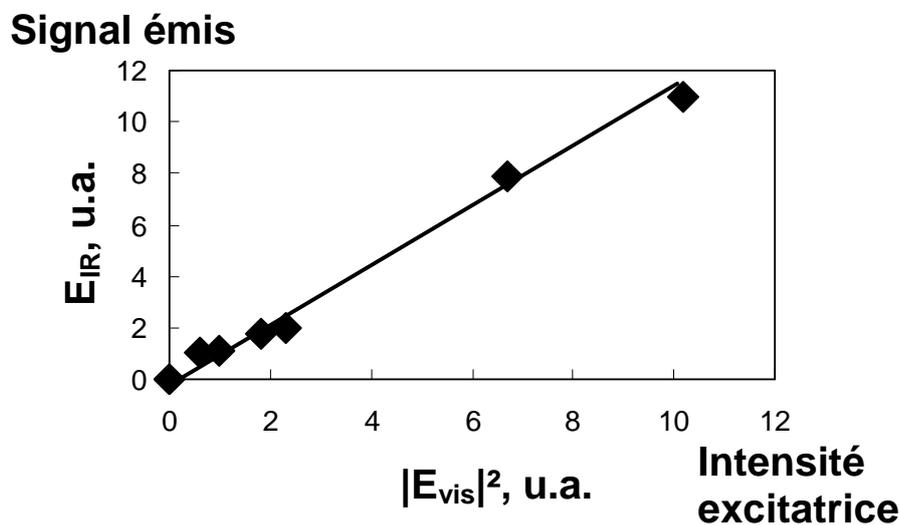


FIG. 4.4 : Dépendance en intensité du signal infrarouge émis, pour un échantillon de bR<sub>neutre</sub> entraîné en rotation à 6 Hz.

La même expérience sur un échantillon de bR<sub>neutre</sub> immobile montre une dépendance non linéaire du champ émis avec l'intensité excitatrice à forte intensité excitatrice. Cet effet peut s'expliquer par le changement de la distribution des états dans le photocycle avec le faisceau excitateur (figure 4.2).

#### 4.2.1.1.c. Etude de la polarisation des faisceaux excitateurs et infrarouge

Théorie. Nous varions la polarisation de l'onde excitatrice incidente. Les définitions des polarisations s ou p sont représentées figure 4.5. Le repère (p,s,k) est lié aux ondes incidentes et émises, le repère (x,y,z) à l'échantillon.

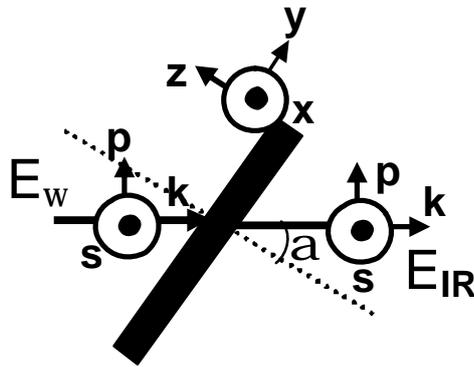


FIG. 4.5 : Polarisation s ou p du champ incident excitateur  $E_w$  et du champ infrarouge émis  $E_{IR}$ . Le repère (p,s,k) est lié aux ondes incidentes et émises, le repère (x,y,z) est lié à la surface. On note  $\alpha$  l'angle entre l'axe  $\vec{k}$  (vecteur d'onde) et la normale à l'échantillon.

Le champ infrarouge émis par la bactériorhodopsine s'écrit en fonction des projections des polarisations  $P_x^{(2)}$ ,  $P_y^{(2)}$ ,  $P_z^{(2)}$  respectivement sur les axes  $\vec{u}_x$ ,  $\vec{u}_y$ ,  $\vec{u}_z$  :

$$E_{s,IR} \propto P_x^{(2)} \quad (4.1)$$

$$E_{p,IR} \propto P_y^{(2)} \cos \alpha + P_z^{(2)} \sin \alpha \quad (4.2)$$

( $E_{j,IR}$  et  $E_{k,IR}$  sont les composantes du champ émis suivant les axes  $\vec{j}$  et  $\vec{k}$  respectivement).

### Distribution des moments dipolaires du rétinale



FIG. 4.6 : Echantillons orientés de membrane pourpre. Les dipôles sont orientés suivant l'axe  $\vec{u}_\beta$  dans un cône de demi-angle au sommet  $\zeta \approx 71^\circ$  par rapport à l'axe  $\vec{u}_z$  [18].

Nous rappelons figure 4.6 la disposition des rétinals dans les films orientés de bactériorhodopsine. L'échantillon est fortement absorbant à 560 nm et tous les photons sont donc absorbés par le film et contribuent à l'émission infrarouge. Cette condition de résonance est très importante car elle va permettre des simplifications qui ne seraient pas valables hors résonance [41].

Compte tenu de l'orientation des rétinals (aléatoire dans le plan perpendiculaire à  $\vec{u}_z$ , figure 4.6), les projections de la polarisation suivant les axes  $\vec{u}_x$  et  $\vec{u}_y$  seront nulles donc d'après

l'équation 4.1 :

$$E_{s,IR} = 0$$

Par invariance rotationnelle, l'amplitude  $E_{p,IR}^1$  du champ émis pour une onde incidente polarisée p sera identique à l'amplitude  $E_{p,IR}^2$  du champ émis pour une polarisation s, au facteur de transmission des faisceaux visibles près. Le rapport entre ces deux amplitudes vaut donc, en fonction de  $t_{p,IR}$  et  $t_{s,IR}$ , facteurs de transmission air/bactériorhodopsine du champ visible, supposés égaux aux facteurs de transmission de Fresnel à  $45^\circ$ , définis dans l'annexe A :

$$\frac{E_{p,IR}^1}{E_{p,IR}^2} = \frac{t_{p,IR}}{t_{s,IR}} \approx 1,1 \quad (4.3)$$

Expérience. La polarisation du faisceau d'excitation de la bactériorhodopsine pouvait être ajustée à l'aide d'une lame  $\lambda/2$ . La polarisation émise par le GaAs pouvait être variée à l'aide d'une deuxième  $\lambda/2$  et par la rotation du cristal. Un polariseur infrarouge était placé avant le détecteur afin de s'assurer de la polarisation détectée. Ainsi l'effet de la polarisation du faisceau incident sur la bactériorhodopsine et la polarisation du champ émis peuvent être suivis. Les résultats obtenus sont représentés figure 4.7.

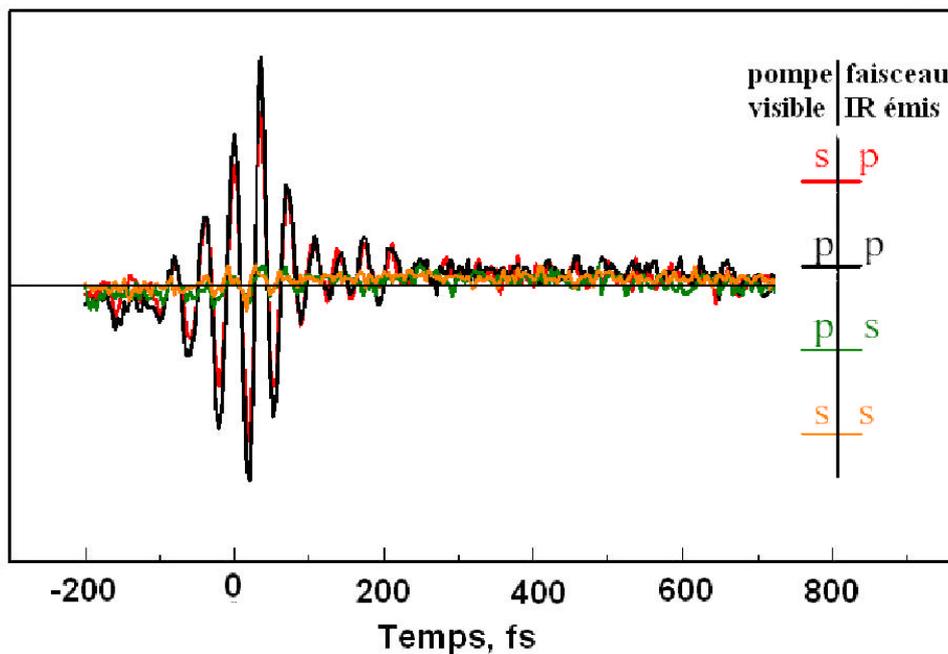


FIG. 4.7 : Etude de l'amplitude du signal infrarouge émis pour chaque polarisation p ou s (faisceau IR émis) en fonction de la polarisation du faisceau excitateur (pompe visible).

Le faisceau infrarouge émis par la bactériorhodopsine est polarisé p, quelle que soit la polarisation du faisceau incident. D'après l'équation 4.2, l'intensité du champ infrarouge émis est bien la même que le faisceau incident soit polarisé s ou p car nous travaillons en résonance. Hors résonance, ce comportement est différent et l'émission non linéaire du deuxième ordre dépend fortement de la polarisation du faisceau incident, comme montré par Lewis et coll. dans le cas de la génération de seconde harmonique d'échantillons excités à 1064 nm [41].

#### 4.2.1.1.d. Influence de l'orientation de l'échantillon

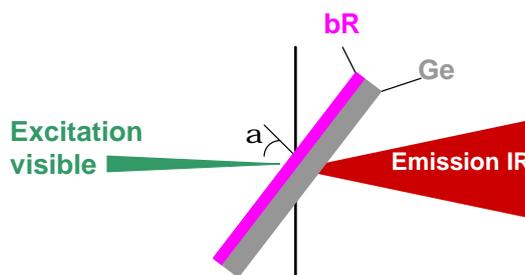


FIG. 4.8 : Orientation du film de bactériorhodopsine déposé sur plaque de germanium. L'angle  $\alpha$  est l'angle entre l'axe des faisceaux et la normale à l'échantillon.

Nous faisons varier l'angle  $\alpha$  entre l'axe des faisceaux et la normale au film (figure 4.8). La forme du signal interférométrique est indépendante de l'angle d'inclinaison. Ceci est en accord avec le fait que l'échantillon est orienté sur un seul axe.

L'intensité est mesurée en fonction de l'angle d'orientation. La figure 4.9 montre que l'intensité varie, nulle pour  $\alpha=0^\circ$  (et  $\alpha=90^\circ$ , techniquement immesurable), elle passe par un maximum situé autour de  $45^\circ$ .

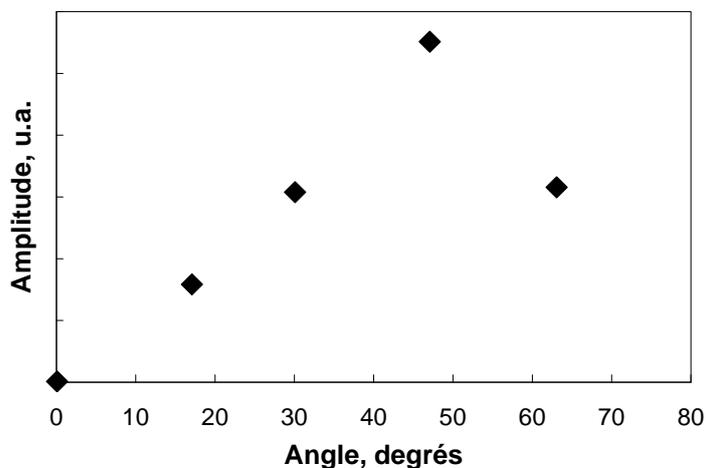


FIG. 4.9 : Variation de l'intensité du signal émis en fonction de l'angle d'inclinaison de l'échantillon, correspondant à l'angle  $\alpha$  entre l'axe des faisceaux et la normale au film (figure 4.8).

Montrons que cette dépendance angulaire concorde avec un phénomène non linéaire du deuxième ordre. Les notations utilisées sont décrites figure 4.10.

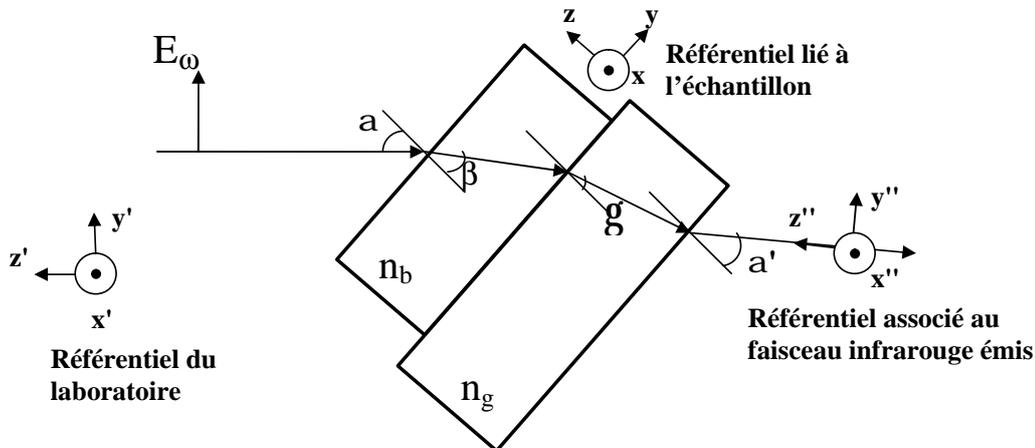


FIG. 4.10 : Faisceau visible incident sur l'échantillon de bactériorhodopsine déposé sur du germanium.  $n_b$  est l'indice de réfraction de la bactériorhodopsine et  $n_g$  celui du germanium. Les angles entre les faisceaux (faisceau visible incident et faisceau infrarouge dans l'échantillon) et la normale à l'échantillon sont définis dans la figure.

L'indice de groupe de la bactériorhodopsine dans l'infrarouge vaut 1,7 [107], et l'indice de phase dans le visible 1,44 [108]. Les angles  $\alpha$  et  $\alpha'$  sont donc différents.

On utilise le repère  $(\vec{x}, \vec{y}, \vec{z})$  lié à l'échantillon défini sur la figure 4.10. On note  $\vec{u}_x, \vec{u}_y, \vec{u}_z$  les axes unitaires associés. Le repère du laboratoire est défini sur la figure par  $R' = (\vec{x}', \vec{y}', \vec{z}')$ , d'axes unitaires  $\vec{u}'_x, \vec{u}'_y, \vec{u}'_z$

Plaçons-nous dans notre cas, où l'onde excitatrice est polarisée p. Le champ incident se propageant suivant l'axe  $-\vec{z}'$  a les composantes :

$$E_{x'} = 0 \quad (4.4)$$

$$E_{y'} = E_o \quad (4.5)$$

$$E_{z'} = 0 \quad (4.6)$$

où  $E_o$  est l'amplitude du champ visible incident.

$t_{p,ab}^{vis}$  et  $t_{s,ab}^{vis}$  sont les coefficients de transmission de Fresnel en amplitude du faisceau visible à l'interface air/bactériorhodopsine pour les polarisations p et s respectivement.  $t_{p,bg}^{GaAs}$  est le coefficient de transmission de Fresnel du faisceau infrarouge émis par le GaAs à l'interface bactériorhodopsine/germanium et  $t_{p,ga}^{GaAs}$  le coefficient de transmission de Fresnel du faisceau infrarouge émis par le GaAs à l'interface germanium/air, également pour la polarisations p [72]. De même on utilise les notations  $t_{p,bg}^{bR}$  et  $t_{p,ga}^{bR}$  pour le faisceau infrarouge émis par la bactériorhodopsine.

Après réfraction à l'interface air/échantillon, le champ visible vaut :

$$E_x = E_{x'} t_{s,ab}^{vis} = 0 \quad (4.7)$$

$$E_y = E_{y'} t_{p,ab}^{vis} \cos\beta = E_o t_{p,ab}^{vis} \sqrt{1 - \frac{\sin^2\alpha}{n_b^2}} \quad (4.8)$$

$$E_z = E_{y'} t_{p,ab}^{vis} \sin\beta = E_o t_{p,ab}^{vis} \frac{\sin\alpha}{n_b} \quad (4.9)$$

La polarisation non linéaire induite dans la bactériorhodopsine s'écrit :

$$\begin{aligned} P_x^{(2)} &= 0 \\ P_y^{(2)} &= 0 \\ P_z^{(2)} &\propto E_o^2 (t_{p,ab}^{vis})^2 \end{aligned} \quad (4.10)$$

Après réfraction aux interfaces bactériorhodopsine/germanium et germanium/air, le champ infrarouge émis vaut :

$$\begin{aligned} E_{x''}^{IR} &= A t_{s,bg}^{bR} t_{s,ga}^{bR} P_x^{(2)} = 0 \\ E_{y''}^{IR} &= B t_{p,bg}^{bR} t_{p,ga}^{bR} (P_y^{(2)} \cos\alpha' + P_z^{(2)} \sin\alpha') = B t_{p,bg}^{bR} t_{p,ga}^{bR} P_z^{(2)} \sin\alpha' \\ E_{z''}^{IR} &= 0 \end{aligned} \quad (4.11)$$

A et B sont des constantes.

Nous mesurons ce champ infrarouge en le faisant interférer avec le champ infrarouge émis par le GaAs, polarisé p. La puissance infrarouge mesurée est donc :

$$S^{IR} \propto t_{p,ab}^{GaAs} t_{p,bg}^{GaAs} t_{p,ga}^{GaAs} E_{y''}^{IR} \quad (4.12)$$

Théorie et expérience sont en bon accord (figure 4.11) : le signal passe par un maximum légèrement supérieur à 45°. Le faisceau émis a une intensité nulle en cas d'incidence dans la direction de l'axe de symétrie du système, donc il faut incliner l'échantillon pour obtenir un signal. Dans toute la suite, nous l'inclinons à 45°, proche du maximum du signal émis.

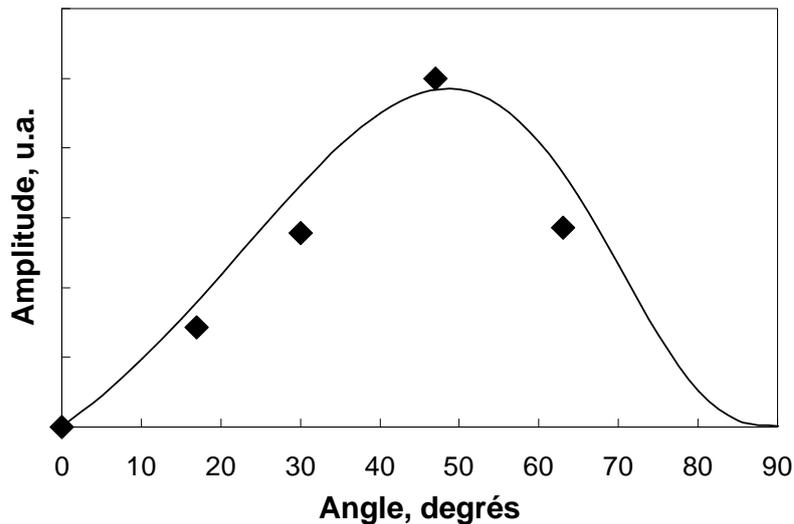


FIG. 4.11 : Champ infrarouge émis par la bactériorhodopsine en fonction de l'angle  $\alpha$  entre l'axe perpendiculaire à l'axe de propagation des faisceaux et la normale au film. Le faisceau incident est polarisé p. Résultats théoriques (trait plein) et points expérimentaux.

En conclusion, ces quatre vérifications successives montrent qu'il s'agit d'un signal non linéaire du deuxième ordre ; ainsi la polarisation créée dans la bactériorhodopsine provient du phénomène de redressement optique. Nous allons la modéliser en prenant le cas simple d'un système à deux niveaux.

## 4.2.2 Modèle du redressement optique dans la bactériorhodopsine : théorie et simulations

### 4.2.2.1 Approche semi-classique des interactions laser/matière

Afin de pouvoir décrire l'interaction laser/matière au niveau quantique, nous devons dans un premier temps introduire un degré de description quantique de la matière. Cette description va permettre d'étudier la réponse d'un système à une excitation lumineuse, lorsque certains temps caractéristiques du milieu sont plus grands que les temps caractéristiques de l'excitation (durée de l'état excité, temps de déphasage).

Nous allons brièvement rappeler les différentes étapes permettant d'aboutir à l'équation d'évolution de la matrice densité [70]. Pour cela nous nous plaçons dans un modèle de Bloch, qui repose sur plusieurs hypothèses :

- Le champ excitateur est représenté classiquement (2.2.1).
- L'interaction est décrite dans l'approximation dipolaire électrique, qui consiste à supposer le champ uniforme sur toute la molécule, soit des dimensions source bien inférieures à la longueur d'onde émise. L'effet du champ magnétique de l'impulsion laser est négligé.
- L'échantillon est placé au col du faisceau (waist) de rayon  $\omega$  et la distance de Rayleigh  $\pi\omega^2/\lambda$

est très supérieure à l'épaisseur  $e$  de l'échantillon.

- Les fréquences de transition ne varient pas au cours du temps.
- Les différents processus de relaxation (émission spontanée, interaction élastique ou inélastique avec l'environnement) sont décrits phénoménologiquement par des taux fixes.

#### 4.2.2.1.a. Hamiltonien du système en interaction avec le champ

On considère un système constitué d'un niveau fondamental  $|g\rangle$  et de  $k$  niveaux excités  $|e_i\rangle$  ( $i \in \{1, \dots, k\}$ ). Les états  $|m\rangle$  et  $|n\rangle$  ( $(m,n) \in \{g, e_1, \dots, e_k\}$ ) désignent les états propres d'énergies  $E_m$  et  $E_n$  associées :

$$H_o |n\rangle = E_n |n\rangle \quad (4.13)$$

décrivant une molécule en interaction avec la matrice. Les deux états sont reliés par une transition dipolaire électrique de fréquence  $\omega_{mn}$  telle que :

$$E_n - E_m = \hbar\omega_{mn}. \quad (4.14)$$

Le couplage du champ électrique  $\vec{E}$  au dipôle de transition est décrit par un hamiltonien d'interaction

$$H_1 = -e \vec{r} \cdot \vec{E} \quad (4.15)$$

où  $\vec{r}$  est le vecteur position local et  $-e$  la charge de l'électron. Seule la valeur moyenne de  $\vec{r}$  est accessible, et on définit la matrice hermitienne  $\vec{\mu}$  des moments dipolaires

$$\vec{\mu} = -e \langle \vec{r} \rangle. \quad (4.16)$$

L'hamiltonien d'interaction s'écrit finalement :

$$H_1 = -\vec{\mu} \cdot \vec{E} \quad (4.17)$$

et l'hamiltonien décrivant l'évolution du système sera :

$$H = H_o + H_1. \quad (4.18)$$

#### 4.2.2.1.b. Fonction d'onde et matrice densité

On décrit le système quantique par sa fonction d'onde ou vecteur d'état  $\psi(r,t)$  et le produit scalaire associé dans l'espace de Hilbert complexe :

$$\langle \phi | \psi \rangle = \int \phi^* \psi d^3r. \quad (4.19)$$

En l'absence d'excitation, le système est dans l'état fondamental  $|g\rangle$  soit

$$|\psi(0)\rangle = |g\rangle. \quad (4.20)$$

L'excitation optique prépare le système dans un état de superposition cohérente  $|\psi(0)\rangle = \sum_n c_n |n\rangle$ ,  $c_n$  complexe. La probabilité de trouver le système dans l'état  $|n\rangle$  s'écrit :

$$\rho_{nn} = \langle n | \rho | n \rangle, \quad (4.21)$$

$\rho_{nn}$  étant la population de l'état  $|n\rangle$  et  $\rho$  l'opérateur densité. Cet opérateur s'écrit sous forme de matrice (par abus de langage nous emploierons indifféremment les termes matrice densité ou opérateur densité) dans la base des états propres de  $H_o$ .

Les termes non- diagonaux

$$\rho_{nm} = \langle n | \rho | m \rangle \quad \text{avec } n \neq m, \quad (4.22)$$

sont appelés cohérences car ils tiennent compte de la phase relative des composantes correspondant aux états  $|n\rangle$  et  $|m\rangle$ .

#### 4.2.2.1.c. Evolution de la matrice densité

L'équation d'évolution de l'opérateur densité d'un système isolé est :

$$\frac{d\rho}{dt} = \frac{1}{i\hbar} [H, \rho] + \left. \frac{\partial \rho}{\partial t} \right|_{relaxation} \quad \text{avec } H = H_o + H_1 \quad (\text{voir } 4.18). \quad (4.23)$$

On note  $\rho_{mn}^{(0)}$  l'opérateur densité avant l'arrivée de l'impulsion laser. Le terme  $\left. \frac{\partial \rho}{\partial t} \right|_{relaxation}$

contient les phénomènes de relaxation de la population de l'état excité  $|n\rangle$  (de durée de vie  $T_{nn}$ ) vers l'état fondamental :

$$\left. \frac{\partial \rho_{nn}}{\partial t} \right|_{relaxation} = -\frac{\rho_{nn} - \rho_{nn}^{(0)}}{T_{nn}}, \quad (4.24)$$

et la perte de cohérence entre les états  $|m\rangle$  et  $|n\rangle$  sur un temps de déphasage  $T_{mn}$  ( $m \neq n$ ) :

$$\left. \frac{\partial \rho_{mn}}{\partial t} \right|_{relaxation} = -\frac{\rho_{mn} - \rho_{mn}^{(0)}}{T_{mn}}. \quad (4.25)$$

Quant aux autres termes :

$$1. \quad \langle m | \frac{d\rho}{dt} | n \rangle = \frac{d\rho_{mn}}{dt} \quad (4.26)$$

$$2. \quad \langle m | [H_o, \hat{\rho}] | n \rangle = \langle m | \hbar\omega_m \hat{\rho} - \hbar\omega_n \hat{\rho} | n \rangle = \hbar\omega_{mn} \rho_{mn} \quad (4.27)$$

$$\begin{aligned} 3. \quad \langle m | [H_1, \hat{\rho}] | n \rangle &= \langle m | H_1 \rho | n \rangle \langle m | \rho H_1 | n \rangle \\ &= \sum_l \langle m | H_1 | l \rangle \langle l | \rho | m \rangle - \langle m | \rho | l \rangle \langle l | \hat{H}_1 | m \rangle \\ &= -E(t) \sum_l (\mu_{ml} \rho_{ln} - \rho_{nl} \mu_{ln}). \end{aligned} \quad (4.28)$$

Donc l'équation d'évolution des termes de la matrice densité s'écrit :

$$\left( \frac{d}{dt} + \frac{1}{T_{mn}} + i\omega_{mn} \right) (\rho_{mn} - \rho_{mn}^{(0)}) = -\frac{1}{i\hbar} E(t) \sum_l (\mu_{ml} \rho_{ln} - \rho_{nl} \mu_{ln}). \quad (4.29)$$

En négligeant l'énergie d'agitation thermique à température ambiante par rapport à l'énergie de transition, nous pouvons considérer que toute la population est initialement dans l'état fondamental :  $\rho_{gg}^{(0)}=1$  est le seul terme non nul de la matrice densité.

Nous définissons la fonction de Green  $G_{mn}$  telle que :

$$\begin{aligned} \left( \frac{d}{dt} + \frac{1}{T_{mn}} + i\omega_{mn} \right) G_{mn}(t) &= -\frac{\delta(t)}{i\hbar}, \quad \text{avec } \delta(t) \text{ la fonction de Dirac} \\ \text{soit } G_{mn}(t) &= \frac{i}{\hbar} H(t) e^{(-i\omega_{nm}t - \frac{t}{T_{mn}})}, \quad \text{avec } H(t) \text{ la fonction de Heavyside.} \end{aligned} \quad (4.30)$$

La transformée de Fourier  $\mathbf{F}$  de l'équation 4.29 s'écrit :

$$(\omega + i\omega_{mn} + \frac{i}{T_{mn}})\rho_{mn}(\omega) = -\mathbf{F}(-\frac{1}{i\hbar}E(t) \sum_l (\mu_{ml}\rho_{ln}(t) - \rho_{nl}(t)\mu_{ln}))$$

ce qui donne en introduisant  $G_{mn}(\omega)=\mathbf{F}(G_{mn}(t))$

$$\rho_{mn}(\omega) = G_{mn}(\omega)\mathbf{F}(E(t) \sum_l (\mu_{ml}\rho_{ln}(t) - \rho_{nl}(t)\mu_{ln}))$$

et par transformée de Fourier inverse :

$$\rho_{mn}(t) = G_{mn}(t) \otimes (E(t) \sum_l (\mu_{ml}\rho_{ln}(t) - \rho_{nl}(t)\mu_{ln})). \quad (4.31)$$

#### 4.2.2.1.d. Développement perturbatif

L'opérateur densité s'écrit comme un produit de convolution de la fonction de Green et d'un terme dépendant du champ électrique. Nous développons l'opérateur densité jusqu'au deuxième ordre :

$$\rho = \rho^{(0)} + \rho^{(1)} + \rho^{(2)}. \quad (4.32)$$

En reportant dans l'équation 4.31, en respectant les puissances du champ électrique dans le développement perturbatif :

$$\rho_{mn}^{i+1} = G_{mn}(t) \otimes (E(t) \sum_l (\mu_{ml}\rho_{ln}^{(i)}(t) - \rho_{nl}^{(i)}(t)\mu_{ln})) \quad \text{avec } i = 0, 1. \quad (4.33)$$

Remarque : nous nous intéressons uniquement aux phénomènes non linéaires du deuxième ordre, mais cette expression reste valable pour les ordres supérieurs.

#### 4.2.2.2 Calcul de la polarisation induite

La polarisation induite  $p$  par un dipôle quantique est donnée par [109] :

$$p(t) = \langle \mu \rangle = Tr(\mu\rho). \quad (4.34)$$

On considère une densité volumique  $N$  de molécules indépendantes entre elles. La polarisation par unité de volume s'exprime donc de la façon suivante :

$$P(t) = Np(t) = NTr(\mu\rho(t)). \quad (4.35)$$

Dans le régime perturbatif, on développe la polarisation en série jusqu'à l'ordre 2 qui nous intéresse :

$$\begin{aligned} P(t) &= NTr(\mu\rho(t)) \quad \text{avec} \quad \rho(t) = \rho^{(0)} + \rho^{(1)}(t) + \rho^{(2)}(t) \\ \text{soit} \quad P(t) &= P^{(1)}(t) + P^{(2)}(t) \quad \text{avec} \quad P^{(n)} = NTr(\mu\rho^{(n)}). \end{aligned} \quad (4.36)$$

Plaçons nous dans le cas simple d'un modèle à deux niveaux : le fondamental noté  $|g\rangle$  et l'état excité noté  $|e\rangle$ . Nous allons nous concentrer sur le calcul détaillé de  $P^{(1)}$  et  $P^{(2)}$  grâce à l'équation 4.31.

#### 4.2.2.2.a. Calcul de $P^{(1)}$

$$\begin{aligned} P^{(1)} &= NTr(\mu\rho^{(1)}(t)) = N \sum_{m,n} \mu_{mn} \rho_{nm}^{(1)}(t) \\ \text{avec} \quad \rho_{mn}^{(1)}(t) &= G_{mn}(t) \otimes [ E(t) \sum_l (\mu_{ml} \rho_{ln}^{(0)}(t) - \rho_{nl}^{(0)}(t) \mu_{ln}) ]. \end{aligned} \quad (4.37)$$

Calculons successivement les différents éléments, en supposant le système initialement dans l'état fondamental.

$$\rho_{gg}^{(0)} = 1 \quad (4.38)$$

$$\rho_{ee}^{(0)} = 0 \quad (4.39)$$

$$\rho_{nm}^{(1)}(t) = \rho_{eg}^{(1)}(t) = \mu_{eg} G_{eg}(t) \otimes E(t) \quad \text{ou} \quad \rho_{ge}^{(1)}(t) = -\mu_{ge} G_{ge}(t) \otimes E(t) = (\rho_{ge}^{(1)}(t))^* \quad (4.40)$$

On en déduit :

$$P^{(1)} = N(\mu_{eg} \rho_{ge}^{(1)}(t) + \mu_{ge} \rho_{eg}^{(1)}(t)) = N(-\mu_{eg} \mu_{ge} G_{eg}(t) + \mu_{eg} \mu_{ge} G_{ge}(t)) \otimes E(t)$$

$$\text{donc} \quad P^{(1)}(t) = N |\mu_{eg}|^2 (G_{eg}(t) + G_{ge}(t)) \otimes E(t). \quad (4.41)$$

En notation complexe et en introduisant la susceptibilité non linéaire  $\chi^{(1)}(\omega)$  dont la partie imaginaire est le coefficient d'absorption :

$$P^{(1)}(\omega) = N |\mu_{eg}|^2 (G_{eg}(\omega) + G_{ge}(\omega))E(\omega)$$

soit  $P^{(1)}(\omega) = N |\mu_{eg}|^2 (G_{eg}(\omega) + G_{ge}(\omega))E(\omega) = \epsilon_o \chi^{(1)}(\omega)E(\omega)$  (4.42)

où les différentes fonctions de Green s'écrivent :

$$G_{ee}(t) = \frac{i}{\hbar} H(t) e^{-\frac{t}{T_1}} \quad (4.43)$$

$$G_{eg}(t) = \frac{i}{\hbar} H(t) e^{(-i\omega_{eg}t - \frac{t}{T_2})} \quad (4.44)$$

$$G_{ge}(t) = \frac{i}{\hbar} H(t) e^{(i\omega_{eg}t - \frac{t}{T_2})} \quad (4.45)$$

$$(4.46)$$

Dans un modèle à deux niveaux, deux taux de relaxation apparaissent :

-  $\Gamma_{eg} = \frac{1}{T_2}$  où  $T_2$  est le temps de déphasage entre les deux niveaux,

-  $\Gamma_{ee} = \frac{1}{T_1}$  où  $T_1$  est le temps de relaxation de la population dans l'état excité.

Après excitation en  $|e\rangle$ , le système revient dans le fondamental  $|g\rangle$  avec un taux de relaxation  $T_1$ . Cependant, même à valeurs constantes des populations en  $|e\rangle$  et  $|g\rangle$ , les cohérences peuvent être détruites par interaction avec l'environnement soit  $T_1 \geq \frac{T_2}{2}$ . Dans le cas où la seule cause de relaxation est le déclin de l'état excité, nous avons  $T_1 = \frac{T_2}{2}$ .

#### 4.2.2.2.b. Calcul de $P^{(2)}$

$$P^{(2)}(t) = N Tr(\mu \rho^{(2)}(t)) = N \sum_{m,n} \mu_{mn} \rho_{nm}^{(2)}(t)$$

avec  $\rho_{mn}^{(2)}(t) = G_{mn}(t) \otimes [ E(t) \sum_l (\mu_{ml} \rho_{ln}^{(1)}(t) - \rho_{nl}^{(1)}(t) \mu_{ln}) ]$ . (4.47)

D'après les valeurs obtenues à l'ordre 1 pour le calcul de  $P^{(1)}(t)$ ,  $\rho_{mn}^{(2)}(t)$  peut être calculé :

$$\begin{aligned} \rho_{mn}^{(2)}(t) &= \rho_{ee}^{(2)}(t) = G_{ee}(t) \otimes [ E(t) (\mu_{eg} \rho_{ge}^{(1)}(t) - \rho_{eg}^{(1)}(t) \mu_{ge}) ] \\ &= - |\mu_{eg}|^2 G_{ee}(t) \otimes [ E(t) (G_{ge}(t) + G_{eg}(t)) \otimes E(t) ] \end{aligned} \quad (4.48)$$

On reconnaît dans cette expression la polarisation du premier ordre :

$$\rho_{ee}^{(2)}(t) = \frac{1}{N} G_{ee}(t) \otimes (E(t).P^{(1)}(t)). \quad (4.49)$$

Comme  $\text{Tr}(\rho)=1$ , on a directement  $\text{Tr}(\rho^{(2)})=0$  soit  $\rho_{gg}^{(2)}=-\rho_{ee}^{(2)}$  La polarisation du deuxième ordre vaut donc :

$$P^{(2)}(t) = N(\mu_{ee}\rho_{ee}^{(2)}(t) + \mu_{gg}\rho_{gg}^{(2)}(t))$$

$$\text{soit } P^{(2)}(t) = N\Delta\mu\rho_{ee}^{(2)}(t) \quad (4.50)$$

$$\text{et } P^{(2)}(t) = \Delta\mu G_{ee}(t) \otimes (E(t).P^{(1)}(t)) \quad (4.51)$$

en notant  $\Delta\mu=\mu_{ee}-\mu_{gg}$ .

$$P^{(2)}(t) = \Delta\mu G_{ee}(t) \otimes (E(t).P^{(1)}(t)). \quad (4.52)$$

La polarisation sera donc dépendante du recouvrement spectral entre le spectre d'absorption et du champ excitateur.

Cette expression de la polarisation contient à la fois les termes correspondant à la génération de seconde harmonique, et ceux correspondant au redressement optique. Afin de les séparer, utilisons le champ complexe  $\underline{E}(t)$  (défini paragraphe 2.2.1) tel que  $E(t)=\frac{1}{2}(\underline{E}(t)+\underline{E}^*(t))$ . La polarisation du deuxième ordre peut alors s'écrire comme la somme de huit termes. En ne conservant que ceux correspondant au redressement optique, on obtient une première simplification :

$$P^{(2)}(t) = -N\Delta\mu \frac{|\mu_{eg}|^2}{4} G_{ee}(t) \otimes [\underline{E}(t) (G_{ge}(t) \otimes \underline{E}^*(t)) + \underline{E}(t)(G_{eg}(t) \otimes \underline{E}^*(t))$$

$$+ \underline{E}^*(t)(G_{eg}(t) \otimes \underline{E}(t)) + \underline{E}^*(t)(G_{eg}(t) \otimes \underline{E}(t)) ] \quad (4.53)$$

Parmi ces produits de convolutions, les seuls significatifs sont ceux ayant un recouvrement spectral, c'est à dire les termes de fréquence proche de la fréquence optique excitatrice. Cela revient à appliquer l'approximation des ondes tournantes : nous conservons les termes proches de la résonance.

Uniquement deux termes subsistent :

$$P^{(2)}(t) = -N\Delta\mu \frac{|\mu_{eg}|^2}{4} G_{ee}(t) \otimes [\underline{E}(t) (G_{ge}(t) \otimes \underline{E}^*(t)) + \underline{E}^*(t)(G_{eg}(t) \otimes \underline{E}(t)) ]$$

$$= -N\Delta\mu \frac{|\mu_{eg}|^2}{4} G_{ee}(t) \otimes [\underline{E}^*(t) (G_{eg}(t) \otimes \underline{E}(t)) - \underline{E}(t)(G_{eg}^*(t) \otimes \underline{E}^*(t)) ]$$

$$= -iN\Delta\mu \frac{|\mu_{eg}|^2}{2} G_{ee}(t) \otimes \text{Im} [\underline{E}^*(t') (G_{eg}(t') \otimes \underline{E}(t')) ] \quad (4.54)$$

correspondant à une population dans l'état excité

$$\rho_{ee}^{(2)}(t) = -\frac{i|\mu_{eg}|^2}{2} G_{ee}(t) \otimes \text{Im} [\underline{E}^*(t') (G_{eg}(t') \otimes \underline{E}(t')) ]. \quad (4.55)$$

Maintenant que l'expression générale est établie, nous allons voir dans la partie suivante l'influence des différents paramètres, en particulier la valeur de la fréquence excitatrice et la durée de vie de l'état excité.

### 4.2.2.3 Simulation de la polarisation pour différents paramètres

Les calculs de polarisation sont effectués en utilisant le programme expliqué au paragraphe 4.3.2.3 et développé par G. Groma, qui utilise le formalisme dans lequel la polarisation est exprimée dans l'espace de Liouville [110]. Après introduction des temps de relaxation équivalents à  $T_1$  et  $T_2$ , ce formalisme donne des résultats équivalents à ceux du traitement ci-dessus basé sur les équations de Bloch [111]. Nous choisissons un matériau absorbant à 564 nm (soit une fréquence  $\omega_{eg} = 532$  THz), correspondant à la longueur d'onde d'absorption des échantillons secs de bR<sub>neutre</sub>. Toujours pour cet échantillon, les valeurs de  $T_1$ , durée de vie du niveau excité, sont comprises entre 200 fs et 500 fs (chapitre 3).

#### 4.2.2.3.a. Influence de la résonance

On se place dans un premier temps hors résonance, par exemple l'impulsion excitatrice est centrée dans le proche infrarouge, avec une fréquence  $\omega_o=375$  THz (figure 4.12).

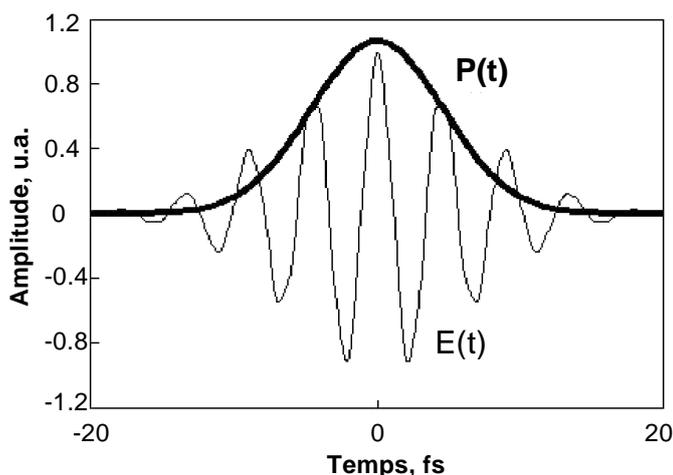


FIG. 4.12 : Polarisation  $P(t)$  normalisée générée par différence de fréquence pour une excitation  $E(t)$  gaussienne de durée 11 fs, non résonante. Les paramètres choisis sont les suivants :  $T_1=450$  fs,  $T_2=900$  fs (aucun déphasage pur),  $\omega_{eg}=532$  THz,  $\omega_o=375$  THz.

En reprenant l'équation 4.54, dès que le champ visible est éteint,  $P^{(2)}$  est nulle. On retrouve le résultat obtenu dans le cas classique décrit chapitre 2 pour  $\chi^{(2)}$  indépendant de la fréquence :  $P^{(2)}(t)$  suit l'enveloppe de l'impulsion excitatrice. Dans ce modèle simplifié, la largeur de résonance est liée à  $T_2$  : diminuer sa valeur revient à élargir le spectre d'absorption des échantillons, ce qui se traduit par une sensibilité moins grande au déplacement loin de la fréquence de résonance.

En se plaçant proche de la résonance, les phénomènes ne sont plus instantanés. Nous nous plaçons en résonance (figure 4.13), ce qui correspond à nos conditions expérimentales lorsqu'on étudie  $bR_{neutre}$  ou  $bR_{pourpre}$ . Nous étudions successivement l'influence du temps de vie de l'état excité  $T_1$  (figure 4.14), et d'une variation progressive de la fréquence excitatrice, tout en restant proche de la résonance (figure 4.15). Nous ne varions pour l'instant pas le terme de déphasage et imposons  $T_2 = 2T_1$ .

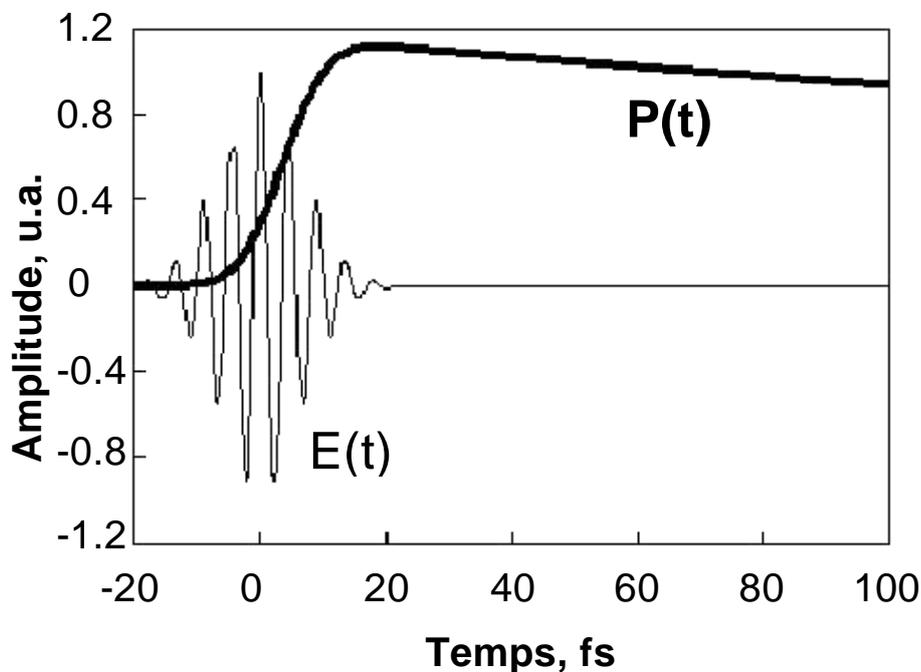


FIG. 4.13 : Polarisation  $P(t)$  générée par différence de fréquence pour une excitation  $E(t)$  gaussienne de durée 11 fs, résonante. Les paramètres sont les suivants :  $T_1=450$  fs,  $T_2=900$  fs (aucun déphasage pur),  $\omega_{eg}=532$  THz,  $\omega_o=536$  THz

Dans le cas d'une excitation en résonance, le second terme du produit de convolution de l'équation 4.54  $[\underline{E}(t)(G_{ge}(t) \otimes \underline{E}^*(t)) + \underline{E}^*(t)(G_{eg}(t) \otimes \underline{E}(t))]$  oscille aux environs de la fréquence optique. Sa durée est très brève du fait de l'utilisation d'impulsions ultrabrèves. La polarisation va donc avoir une évolution temporelle et fréquentielle proche de la fonction  $G_{ee}(t)$ , qui décroît comme la population de l'état excité. Ce résultat se rapproche de celui obtenu en mécanique classique : à la résonance, l'état excité est pompé par l'impulsion lumineuse et décroît avec le temps de vie de l'état excité. Ainsi en première approximation, le nombre de molécules dans

l'état excité est proportionnel à la convolution de l'enveloppe de l'intensité du faisceau incident et de la relaxation : la polarisation créée va évoluer comme la population de l'état excité, Elle augmente avec l'intensité absorbée par l'échantillon, et décroît avec la durée de vie  $T_1$  de l'état excité. L'équation 4.54 montre que la polarisation créée est proportionnelle à  $\Delta\mu$ . Le rétinale excité subit un important changement dipolaire. Ce changement dipolaire se manifeste comme un phénomène de polarisation, caractérisable macroscopiquement dans le cas des échantillons orientés.

Pour vérifier la dépendance de la partie décroissante avec la durée de vie de l'état excité, on varie  $T_1$  (figure 4.14) : comme prévu, le temps de décroissance de la polarisation varie avec  $T_1$ .

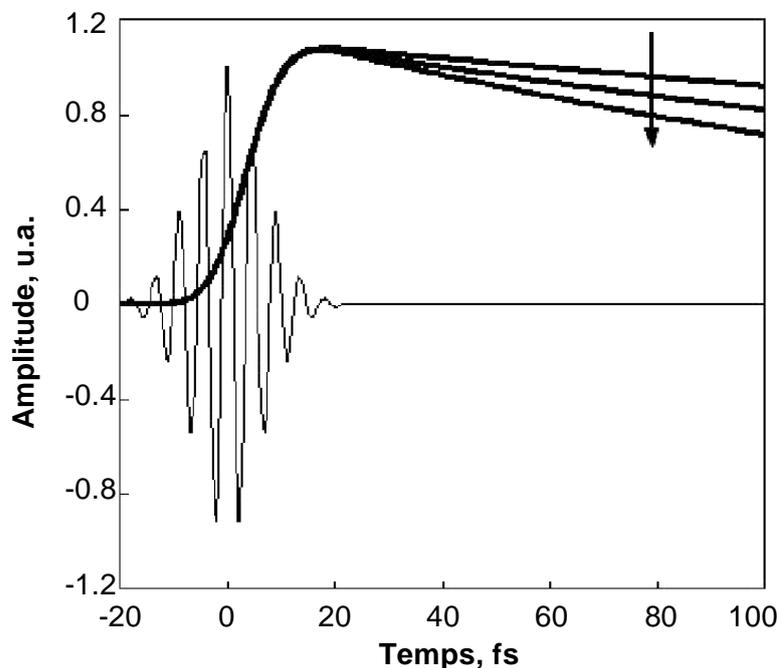


FIG. 4.14 : Polarisation  $P(t)$  générées par différence de fréquence pour une excitation  $E(t)$ , pour des temps de cohérence  $T_1$  valant 200, 300 et 500 fs. La flèche indique les temps  $T_1$  décroissants. On a à chaque fois  $T_2=2T_1$ .

Nous étudions également l'évolution de la polarisation en s'éloignant progressivement de la résonance (figure 4.15). En résonance, une population réelle est créée dans l'état excité (équation 4.52), et la polarisation qui s'établit dans le milieu dure même après l'arrêt de l'impulsion excitatrice. En s'éloignant progressivement de la résonance, le nombre de molécules réellement dans l'état excité diminue progressivement. On trouve un mélange entre cas résonant et cas non résonant : plus on s'éloigne de la résonance, plus la polarisation suit l'enveloppe de l'impulsion excitatrice.

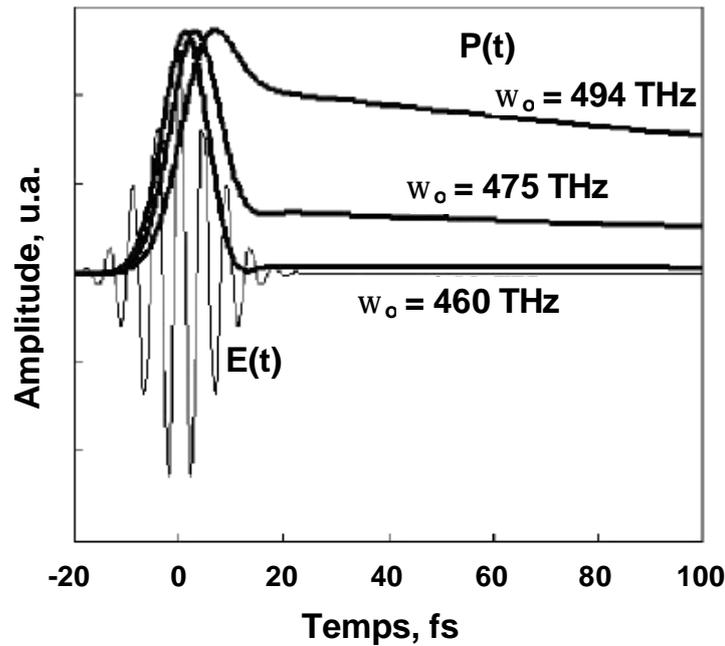


FIG. 4.15 : Polarisation  $P(t)$  générée par différence de fréquences pour une excitation  $E(t)$  gaussienne de durée 11 fs, de fréquences angulaires centrées en 460, 475 et 494 THz. Les données sont normalisées. Les paramètres sont :  $T_1=450$  fs,  $T_2=900$  fs,  $\omega_{eg}=532$  THz.

#### 4.2.2.3.b. Influence de la cohérence

Pour traiter ce problème formellement, nous supposons que la durée de vie de l'impulsion visible est très inférieure au temps de relaxation  $T_1$  de la population dans l'état excité. Cette supposition est proche de nos conditions expérimentales.

Dans ce cas  $G_{ee}(t)$  (équation 4.43) s'écrit :

$$G_{ee}(t) = \frac{i}{\hbar} H(t). \quad (4.56)$$

L'équation 4.54 se simplifie :

$$\rho_{ee}^{(2)}(t) = \frac{|\mu_{eg}|^2}{2\hbar} \text{Im} \int_{-\infty}^t \underline{E}^*(t') (G_{eg}(t') \otimes \underline{E}(t')) dt' \quad (4.57)$$

$$\text{et } P^{(2)}(t) = N\Delta\mu \frac{|\mu_{eg}|^2}{2\hbar} \text{Im} \int_{-\infty}^t \underline{E}^*(t') (G_{eg}(t') \otimes \underline{E}(t')) dt'. \quad (4.58)$$

La contribution des termes de cohérence est complètement négligeable en résonance (figure 4.16) tant que l'on reste dans un régime cohérent ou partiellement cohérent (la largeur spectrale de l'impulsion excitatrice  $\Delta\omega$  est respectivement supérieure ou du même ordre de grandeur que le taux de déphasage  $\frac{1}{T_2}$ ), et seule l'amplitude de la polarisation générée varie : l'augmentation du temps de déphasage conduit à un rétrécissement du spectre de la bactériorhodopsine, ce qui conduit à un meilleur recouvrement entre spectre excitateur et spectre d'absorption.

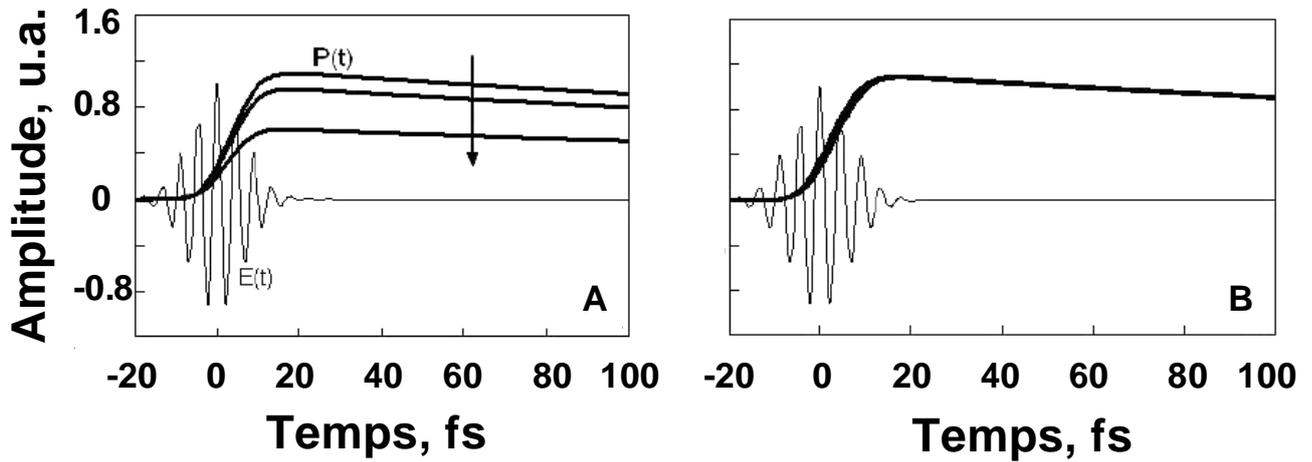


FIG. 4.16 : A. Polarisation  $P(t)$  générée par différence de fréquences pour une excitation  $E(t)$ , pour des valeurs  $T_2$  variables (1000 fs, 500 fs, 20 fs), la flèche indiquant des valeurs de  $T_2$  décroissantes. La valeur de 20 fs correspond à une limite inférieure pour l'échantillon de  $bR_{neutre}$  [49, 112] B. Données normalisées.

En revanche, lorsqu'on se place dans un régime incohérent ( $\Delta\omega \ll \frac{1}{T_2}$ ), la forme de la polarisation est modifiée (figure 4.17). Cela revient à supposer que le spectre du champ incident n'est pas modifié par le spectre d'absorption de l'échantillon. L'équation 4.57 devient, en notant  $\eta$  la probabilité d'excitation d'une molécule donnée :

$$\rho_{ee}^{(2)}(t) = \eta \int_{-\infty}^t |\underline{E}(t')|^2 dt' \quad (4.59)$$

$$\text{et } P^{(2)}(t) = \eta N \Delta\mu \int_{-\infty}^t |\underline{E}(t')|^2 dt'. \quad (4.60)$$

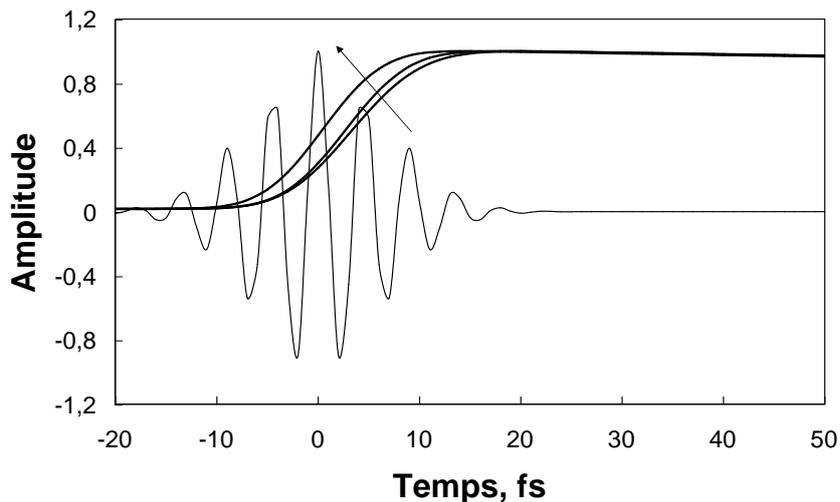


FIG. 4.17 : Variation de la polarisation en fonction de la valeur de  $T_2$  (égale à 100 fs, 5 fs et 1 fs). La flèche indique des valeurs de  $T_2$  décroissantes. La valeur de  $T_1$  est constante, prise égale à 1 ps. L'impulsion incidente est supposée gaussienne, de durée 11 fs.

### 4.2.3 Mesure du changement dipolaire suite à une excitation lumineuse

Dans cette partie nous allons déterminer le changement dipolaire  $\Delta\mu$  entre état fondamental et premier état excité associé à l'excitation lumineuse de cette transition.

Pour cela nous comparons l'interférogramme provenant de l'interférence entre émission infrarouge de l'AgGaS<sub>2</sub> et de bR<sub>neutre</sub> auquel on a enlevé la contribution des modes vibrationnels par la méthode de l'analyse cinétique présentée plus loin (Modèle d'analyse cinétique, paragraphe 4.3.2.3) et celui provenant de l'interférence entre deux faisceaux infrarouge émis par des cristaux d'AgGaS<sub>2</sub>. Dans le cas de l'interférogramme AgGaS<sub>2</sub>|AgGaS<sub>2</sub>, on place le deuxième échantillon d'AgGaS<sub>2</sub> à la même position que la bactériorhodopsine, tandis que l'échantillon de bactériorhodopsine déposé sur plaque de germanium est placé devant le détecteur MCT (voir figure du dispositif expérimental partie 2.4.2) afin de compenser les facteurs de transmissions des faisceaux infrarouges entre les deux interférogrammes. De même dans le cas de l'interférogramme bR<sub>neutre</sub>|AgGaS<sub>2</sub>, on place un cristal d'AgGaS<sub>2</sub> devant le détecteur MCT. Les deux cristaux d'AgGaS<sub>2</sub> utilisés sont de type II.

Les spectres de ces interférogrammes sont identiques (figure 4.18) mais l'amplitude des signaux générés est différente (1,4 fois plus importante dans le cas de l'interférogramme AgGaS<sub>2</sub>|bR<sub>neutre</sub> à intensité excitatrice équivalente). La similitude de ces spectres va permettre de remonter à la valeur de  $\Delta\mu$  en comparant les amplitudes respectives des interférogrammes, ce qui était impossible en utilisant du GaAs.

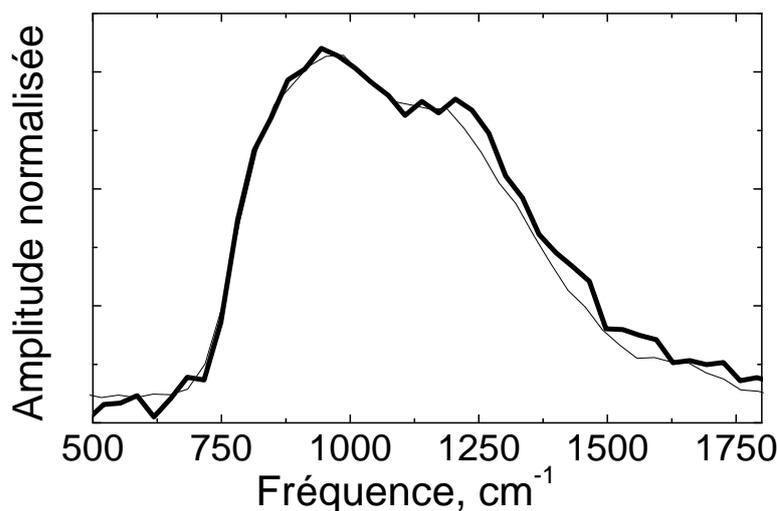


FIG. 4.18 : Trait épais : spectre de l'interférogramme AgGaS<sub>2</sub>|AgGaS<sub>2</sub> filtré par le spectre d'absorption de la bactériorhodopsine. Trait fin : spectre de l'interférogramme AgGaS<sub>2</sub>|bR<sub>neutre</sub>, filtré par un cristal d'AgGaS<sub>2</sub>.

On se place dans l'approximation paraxiale, on note  $E_{AgGaS_2} = A_{AgGaS_2} e^{ikz}$  le champ infra-

rouge généré par l'AgGaS<sub>2</sub> et  $E_{bR} = A_{bR}e^{ikz}$  celui généré par la bactériorhodopsine. Dans les deux cas les distances de propagation sont très faibles ( $\ll \frac{2\pi}{k}$ ) et on peut écrire  $A_{bR} \approx \underline{E}_{AgGaS_2}$ .  $E$  est le champ visible excitateur.

Nous allons calculer les champs générés par le cristal d'AgGaS<sub>2</sub> et par bR<sub>neutre</sub>.

- Calculons dans un premier temps le champ généré par un cristal d'AgGaS<sub>2</sub>. D'après l'équation 2.39 du chapitre 2, le champ généré en sortie du cristal d'AgGaS<sub>2</sub> s'écrit, en notant  $n_{v,AgGaS_2}$  et  $n_{IR,AgGaS_2}$  les indices de réfraction dans l'infrarouge et le visible de l'AgGaS<sub>2</sub>,  $L_{eff}$  la longueur caractéristique sur laquelle a lieu la génération d'infrarouge,  $T$  la durée de l'impulsion visible :

$$E_{IR}(t) = \frac{(1 + n_v)L_{eff}(\omega)\chi^{(2)} |\underline{E}(t)|^2}{2cT(n_v + n_{IR})(1 + n_{IR})}. \quad (4.61)$$

Pour une épaisseur d'échantillon très faible, correspondant au cas d'un matériau infiniment mince, le champ infrarouge émis par redressement optique s'exprime d'après l'équation 2.37 :

$$\begin{aligned} E_{IR}(z, t) &= -\frac{L}{2n_{IR}\epsilon_0 c} \frac{\partial P}{\partial t}(z, t) \\ &= -\chi^{(2)} \frac{L}{4n_{IR}\epsilon_0 c} \frac{\partial |\underline{E}|^2}{\partial t}(z, t). \end{aligned} \quad (4.62)$$

En utilisant le programme développé dans le paragraphe 2.3.2.2 dans le domaine fréquentiel, on calcule numériquement  $L_{eff}(\omega)$  en comparant les amplitudes des champs générés en fonction de la longueur  $L$ . Elle vaut 12  $\mu\text{m}$  pour une longueur d'onde émise de 10  $\mu\text{m}$ .

- Concernant le champ infrarouge émis par la bactériorhodopsine, l'équation 2.41 permet de directement obtenir l'expression du champ infrarouge

$$\frac{\partial E_{bR}(z, \omega)}{\partial z} = \frac{i\mu_0 c}{2n_{IR,bR}} \omega \underline{P}^{(2)}(\omega). \quad (4.63)$$

L'échantillon est très mince, le champ infrarouge généré s'écrit alors

$$\underline{E}_{bR}(\omega) = \frac{i\mu_0 c}{2n_{IR,bR}} \omega \underline{P}^{(2)}(\omega) l_o \quad (4.64)$$

$l_o$  représente la longueur effective sur laquelle la génération d'infrarouge a lieu et  $n_{IR,bR}$  est l'indice de la bactériorhodopsine dans l'infrarouge.

En repassant dans le domaine temporel :

$$E_{bR}(z, t) = \frac{\mu_0 c}{2n_{IR,bR}} \frac{\partial \underline{P}^{(2)}(z, t)}{\partial t} l_o. \quad (4.65)$$

$$(4.66)$$

Nous utilisons l'expression de la polarisation induite dans l'échantillon déterminée équation 4.60; nous faisons donc plusieurs hypothèses :

- La durée de vie de l'impulsion visible est très inférieure au temps de relaxation  $T_1$  de la population dans l'état excité ( $\approx 450$  fs, chapitre 3) ce qui est bien vérifié dans notre cas.
- On se place dans un régime incohérent, ce qui n'est qu'une approximation dans notre cas puisque les largeurs spectrales de l'impulsion visible et du spectre d'absorption de la bactériorhodopsine sont du même ordre de grandeur. Cependant, la figure 4.19 montre que l'influence de  $T_2$  sur l'allure du spectre infrarouge émis reste très faible. En particulier  $T_2 > 20$  fs correspond au spectre établi par des techniques de hole burning [112] et d'écho de photon [49].

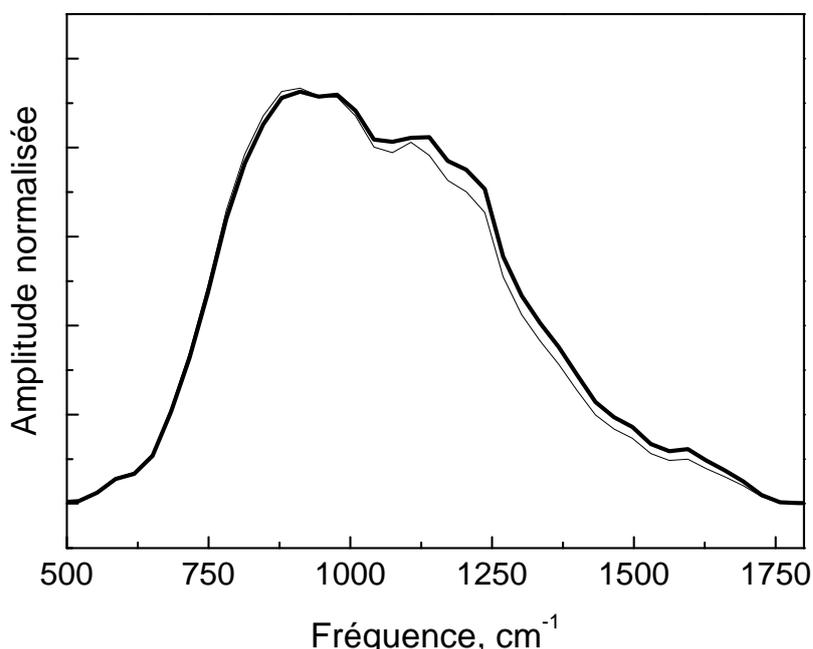


FIG. 4.19 : Calcul des spectres infrarouges détectés par interférence d'un monocycle infrarouge et de l'émission de la bactériorhodopsine dans nos conditions expérimentales. Trait fin : calcul du spectre infrarouge émis en prenant comme paramètres pour calculer la polarisation dans la bactériorhodopsine  $T_1 = 460$  fs et  $T_2 = 20$  fs. Ce spectre reste inchangé si on augmente  $T_2$  dû à l'invariance de la polarisation montrée figure 4.16. Trait épais : calcul du spectre infrarouge émis en prenant  $T_1 = 460$  fs et  $T_2 = 1$  fs. La valeur précise de  $T_1$  est déterminée figure 4.34.

- Les coefficients de transmission utilisés sont obtenus par les formules de Fresnel. Cependant l'épaisseur de la couche de  $bR_{neutre}$  étant très faible, ils peuvent être affectés par la présence du substrat de germanium qui lui est accolée.

En regroupant les différents paramètres, le champ émis par la bactériorhodopsine s'écrit, sans tenir compte des facteurs de transmission aux interfaces :

$$E_{bR}(t) = \frac{\mu_0 c}{2n_{bR,IR}} \eta N l_o \Delta\mu |E|^2 \quad (4.67)$$

$\eta N l_o$  est la densité surfacique de dipôles excités. La totalité des photons incidents est absorbée par l'échantillon, donc cette valeur est égale au nombre de photons incidents sur l'échantillon. Nous tenons compte uniquement des facteurs de transmission du faisceau visible aux interfaces air/bR<sub>neutre</sub> et air/AgGaS<sub>2</sub> et de la présence supplémentaire d'un échantillon de bR ou AgGaS<sub>2</sub> au niveau du détecteur, qui va affecter la transmission du faisceau infrarouge, qui sont les seuls à ne pas avoir été compensés entre les deux dispositifs expérimentaux correspondant aux interférogrammes bR<sub>neutre</sub>/AgGaS<sub>2</sub> et AgGaS<sub>2</sub>/AgGaS<sub>2</sub>.

D'après les équations 4.61 et 4.67, on voit que le rapport  $\frac{E_{bR}(t)}{E_{AgGaS_2}}$  va nous permettre de remonter à la valeur de  $\Delta\mu$ .

Ainsi nous obtenons une valeur de changement de moment dipolaire de l'état excité  $\Delta\mu \approx 10$  Debye, en projection sur l'axe de symétrie des membranes. En supposant que le changement de moment dipolaire se fait suivant une direction qui fait un angle de 71° avec l'axe de symétrie des membranes [18], on obtient  $\Delta\mu \approx 32$  D. Pour comparaison, une valeur de 15 D est obtenue grâce à des expériences de génération de seconde harmonique dans le cas du rétinol en monocouche excitée en résonance [40], valeur inchangée pour une excitation hors résonance [41]. Dans le cas du rétinol dans le complexe protéique excitée hors résonance, une valeur de 21 D a été obtenue [41], du même ordre de grandeur que la valeur que nous obtenons. L'ensemble de ces expériences suggère donc que le changement de moment dipolaire est environ 2 fois plus élevé dans le cas du rétinol dans le complexe protéique que dans le cas du rétinol en solution.

#### 4.2.4 Conséquence sur les premiers processus photoinduits dans la bactériorhodopsine ?

Nous avons vu jusqu'ici qu'une polarisation non linéaire, découlant directement d'importants changements dipolaires, s'établit dans le milieu avec un temps de montée inférieur à 13 fs, qui est la résolution temporelle de l'expérience. Nous avons pu quantifier le changement dipolaire associé, qui est de l'ordre de 30 D. Elle apparaît donc avant l'isomérisation, ce qui peut être considéré comme un premier résultat. Néanmoins, rien ne prouve qu'elle a réellement un rôle fonctionnel dans la séparation de charge primaire.

Pour tenter de donner des éléments de réponse à cette importante problématique, nous allons analyser dans le paragraphe suivant la partie vibrationnelle avec les buts ultimes :

- Déterminer les modes contribuant à la partie "vibrationnelle" de l'émission.
- Déterminer les surfaces électroniques associées à ces différents modes. Il est important de rappeler qu'avec notre dispositif expérimental, nous pouvons observer tous les modes "infrarouge-actifs" cohérents du système protéine/rétinol, aussi bien les modes appartenant à l'état excité

qu'à l'état fondamental et l'état produit. Nous devons donc essayer de discriminer ces différents modes.

-Pour le cas des modes actifs dans l'état excité, établir si ces modes sont directement activés par la séparation de charges ultrarapides.

## 4.3 Etude de la réponse vibrationnelle

Jusqu'à présent nous avons séparé réponse vibrationnelle et réponse électronique comme deux phénomènes physiques distincts. Avant de passer à l'analyse proprement dite des modes vibrationnels, nous allons brièvement expliquer la réponse vibrationnelle dans le cadre des phénomènes de génération de rayonnement par différence de fréquences.

### 4.3.1 Théorie

#### 4.3.1.1 Oscillation de paquets d'ondes vibrationnels

Nous allons considérer un système à deux niveaux, l'état fondamental noté  $S_0$  et l'état excité noté  $S_1$ . La figure 4.20 représente le cas d'une seule coordonnée nucléaire, mais plusieurs coordonnées peuvent être impliquées. L'excitation par une impulsion large bande de la transition  $S_0 \rightarrow S_1$  va peupler une superposition cohérente de niveaux vibrationnels de l'état  $S_1$ . Son évolution dans le temps avec la fréquence propre du système va donner lieu à des oscillations des coordonnées nucléaires. Dans une représentation classique nous pouvons visualiser cette dynamique comme l'évolution d'un paquet d'ondes dans un puits harmonique initialement hors-équilibre.

Il est également possible d'exciter les modes vibrationnels de l'état fondamental par effet Raman impulsif stimulé avec deux interactions avec le faisceau pompe (figure 4.20). La deuxième interaction de l'impulsion résonante avec la transition  $S_0 \rightarrow S_1$  va transférer le système vers une position hors-équilibre sur la surface  $S_0$ .

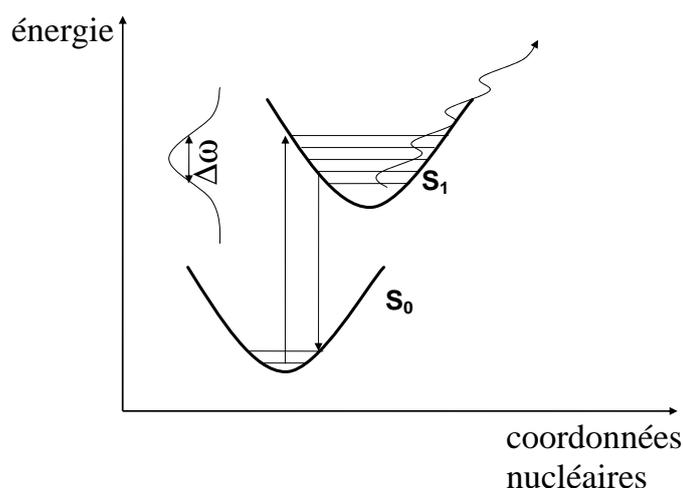


FIG. 4.20 : Excitation cohérente impulsif de niveaux vibrationnels dans les états excité et fondamental par effet Raman stimulé.

Les modes de l'état fondamental auront une phase différente des modes dans l'état excité [113]. Pour une analyse complète des modes vibrationnels, il est donc important d'obtenir des informations sur la phase des modes.

Dans cette vision, les mouvements de charges associés aux mouvements nucléaires donnent lieu à une émission macroscopique, en cas d'alignement des émetteurs. On détecte donc les modes "Raman actifs" (couplés à la transition) et "infrarouge-actifs" (associés à un changement de dipôle).

#### 4.3.1.2 Analogie avec un phénomène de différence de fréquences

L'émission infrarouge qui est associée à l'oscillation d'un paquet d'onde peut également être vue comme un phénomène de différence de fréquence.

Voyons ce qui se passe dans le cas d'un milieu pour lequel deux niveaux vibrationnels  $|e_1\rangle$  et  $|e_2\rangle$  sont excités simultanément (les conclusions restent les mêmes pour un plus grand nombre de niveaux excités).

D'après 4.47, la polarisation s'écrit cette fois :

$$P^{(2)}(t) = \underbrace{N [\mu_{e_1e_1}\rho_{e_1e_1}^{(2)}(t) + \mu_{e_2e_2}\rho_{e_2e_2}^{(2)}(t)]}_{P_1^{(2)}(t)} + \underbrace{N [\mu_{e_1e_2}\rho_{e_2e_1}^{(2)}(t)]}_{P_2^{(2)}(t)} \quad (4.68)$$

La partie  $P_1^{(2)}(t)$  correspond à la réponse électronique du milieu décrite dans la section 4.2. Seul le terme  $P_2^{(2)}(t)$  nous intéresse ici, correspondant à la cohérence entre les niveaux excités. Il vaut d'après 4.53 :

$$\rho_{e_2e_1}^{(2)}(t) = -\frac{\mu_{e_2g}\mu_{ge_1}}{4}G_{e_1e_2}(t) \otimes [E(t)(G_{ge_1}(t) \otimes E^*(t)) + E^*(t)(G_{e_2g}(t) \otimes E(t))] \quad (4.69)$$

et la polarisation associée :

$$P^{(2)}(t) = -N\frac{\mu_{e_1e_2}\mu_{e_2g}\mu_{ge_1}}{4}G_{e_1e_2}(t) \otimes [E(t)(G_{ge_1}(t) \otimes E^*(t)) + E^*(t)(G_{e_2g}(t) \otimes E(t))] \quad (4.70)$$

pour laquelle nous rappelons l'expression de  $G_{e_2g}(t)$  (équation 4.30) :

$$G_{e_2e_1}(t) = \frac{i}{\hbar}H(t)e^{(-i\omega_{e_2e_1}t - \frac{t}{T_{e_1e_2}})} \quad (4.71)$$

qui oscille à la fréquence infrarouge  $\omega_{e_2e_1}$  et décroît avec le temps de cohérence  $T_{e_1e_2}$  entre ces deux niveaux.

Comme vu équation 4.54, le terme  $[E(t)(G_{ge_1}(t) \otimes E^*(t)) + E^*(t)(G_{e_2g}(t) \otimes E(t))]$  a une durée très brève et la polarisation va avoir une évolution temporelle et fréquentielle proche de la fonction  $G_{e_2e_1}$ . Elle va osciller à la fréquence infrarouge  $\omega_{e_2e_1}$  et décroître avec le temps de cohérence  $T_{e_1e_2}$ .

L'excitation ultrabrève des niveaux excités va donc conduire à une émission infrarouge, phénomène caractéristique d'une différence de fréquences. Cette fréquence correspond à la fréquence entre deux niveaux vibrationnels de l'état excité, et va donc nous permettre de caractériser les modes vibrationnels mis en mouvement par l'interaction avec l'impulsion visible dans la bactériorhodopsine. Une telle réponse vibrationnelle a été observée par Groot et coll. dans des cristaux orientés de myoglobine, en utilisant le même montage expérimental [58]. Dans ce cas aucune réponse électronique n'a été observée liée à l'absence d'un fort  $\chi^{(2)}$  électronique de l'hème, le chromophore dans cette protéine.

La figure 4.21 montre l'émission infrarouge calculée, subséquente à l'excitation de deux niveaux vibrationnels, détectée par interférence avec un monocycle infrarouge de référence.

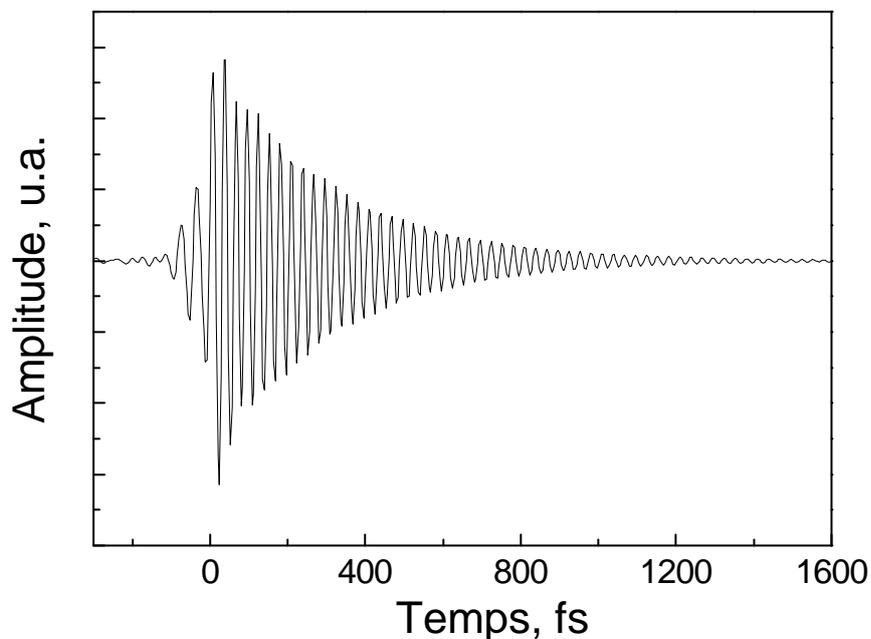


FIG. 4.21 : Calcul de l'interférogramme obtenu entre la polarisation induite dans le système suite à l'excitation de deux états excités (espacés de  $1167 \text{ cm}^{-1}$ , en phase avec l'impulsion excitatrice, temps de vie 300 fs) et un monocycle infrarouge généré instantanément par une impulsion visible de durée 11 fs en utilisant nos paramètres expérimentaux. Les oscillations à temps négatif sont encore provoquées par la coupure du détecteur.

### 4.3.2 Analyse des données expérimentales

Nous allons utiliser plusieurs méthodes pour analyser la contribution de la cohérence vibrationnelle au  $\chi^{(2)}$  dans les données expérimentales obtenues :

- Transformée de Fourier de l'ensemble de la réponse vibrationnelle.
- Analyse par transformée de Fourier à fenêtre glissante.
- Analyse cinétique complète en modélisant la réponse électronique dans le cas d'un modèle à deux niveaux, et les modes vibrationnels par des exponentielles.

La complexité du signal est telle que seul l'ensemble de ces méthodes peut donner une vision complète.

#### 4.3.2.1 Spectre de la partie vibrationnelle

Le signal interférométrique entre l'émission infrarouge de  $bR_{neutre}$  et celle du GaAs est enregistrée en faisant varier le délai entre les deux impulsions visibles excitatrices jusqu'à 5 ps (figure 4.22).

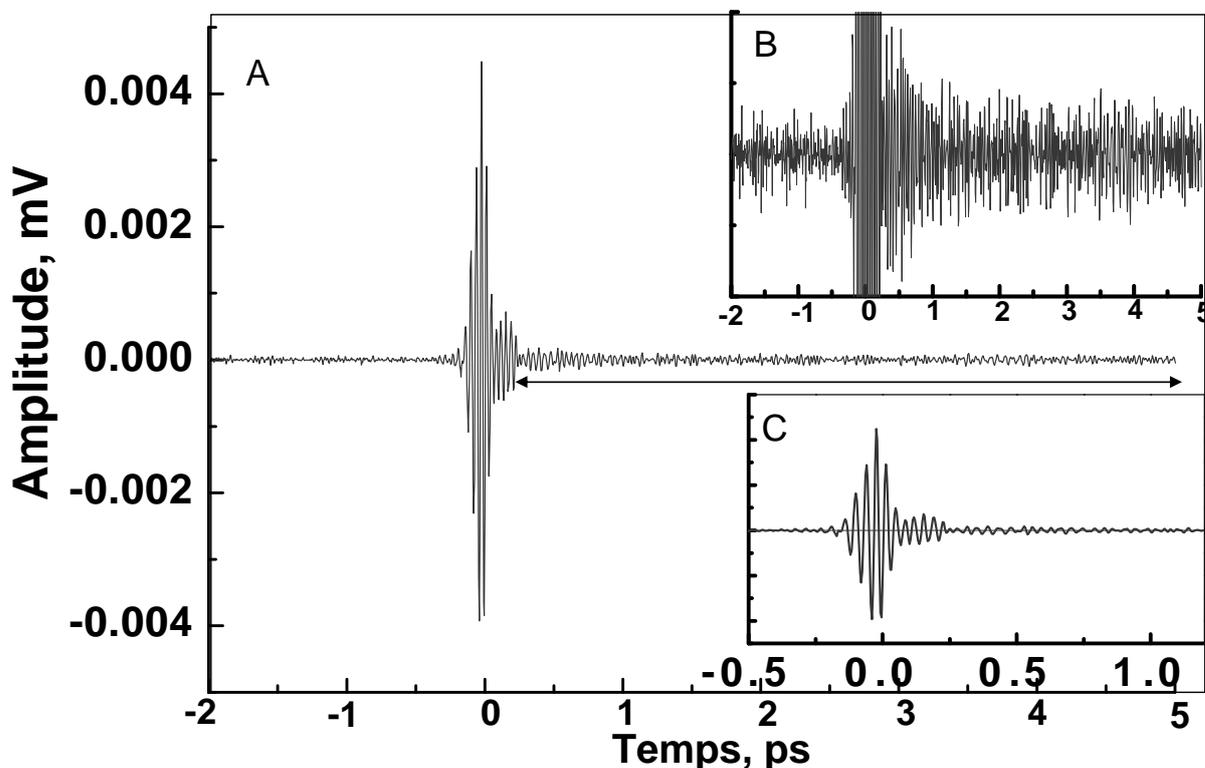


FIG. 4.22 : A. Interférogramme entre les signaux infrarouge émis par la bactériorhodopsine et le signal de référence émis par le GaAs en fonction du délai entre les deux impulsions (voir paragraphe 2.4.2). Les signaux laissent apparaître deux parties : un important signal à  $t=0$  (réponse électronique) et un signal à temps positif contenant des informations sur les modes vibrationnels du système protéine/rétinal (réponse vibrationnelle). La flèche indique la zone sur laquelle est effectuée une transformée de Fourier figure 4.23. La figure B est un élargissement en amplitude du signal, et la figure C un zoom temporel.

Par transformée de Fourier après  $t = 300$  fs (on s'affranchit donc de la partie électronique),

on obtient un spectre très riche en pics significatifs et reproductibles dans la zone spectrale investiguée :

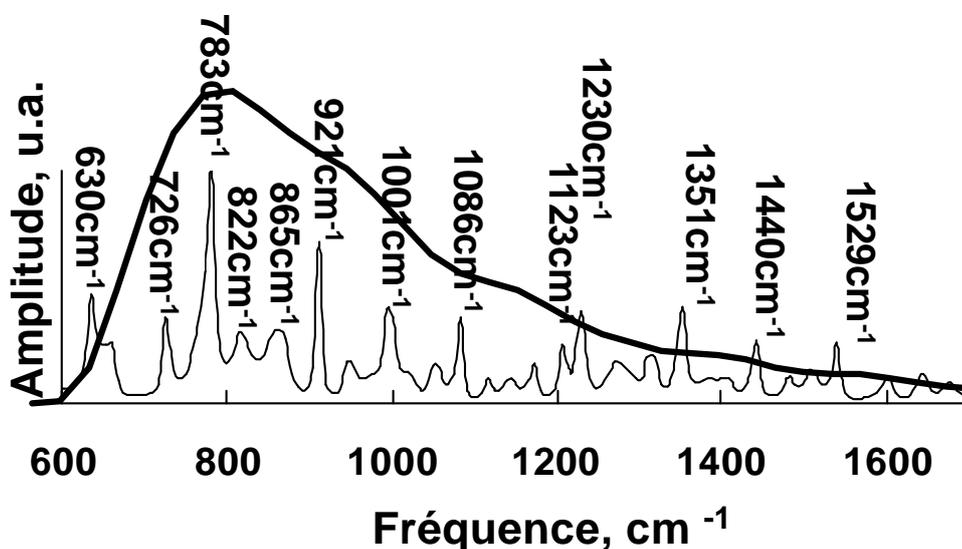
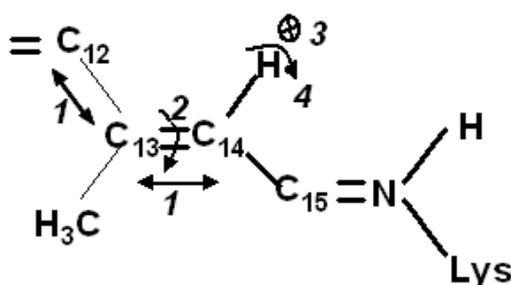


FIG. 4.23 : Transformée de Fourier de la partie vibrationnelle, non corrigée par la réponse du détecteur (trait continu surimposé au spectre). La résolution est de  $6,5 \text{ cm}^{-1}$ .

La “bande” à  $630 \text{ cm}^{-1}$  est due à la coupure du détecteur.

Ce spectre laisse apparaître les fréquences caractéristiques associées aux modes de vibration du rétinol, mais certains modes peuvent à priori être associées à toute autre vibration cohérente du système protéine/rétinol. Rappelons les modes caractéristiques du rétinol (figure 4.24) [114, 115, 116].



1. Modes d'élongation C-C
2. Modes de torsion C=C
3. Modes de balancement hors du plan (HOOP) des atomes d'hydrogène
4. Modes de balancement dans le plan des atomes d'hydrogène

FIG. 4.24 : Représentation des modes vibrationnels associés au rétinol. Seule la partie autour de la double liaison  $\text{C}_{13}=\text{C}_{14}$  est représentée.

Les modes caractéristiques de vibration du rétinol sont :

- Les vibrations hors du plan :

- Les modes de balancement des atomes d'hydrogène hors du plan (modes HOOP : hydrogène hors du plan ou "hydrogen out of plane") sont observés entre 750 et 1050  $\text{cm}^{-1}$

- Les modes de torsion autour de la double liaison C=C (isomérisation) ne peuvent pas être directement observés avec notre méthode d'analyse (fréquence autour de 250  $\text{cm}^{-1}$  [25]). En revanche, comme vu dans le chapitre 1, ils sont probablement couplés au modes HOOP et d'élongation de la chaîne carbonée.

Ces modes ne sont pas observés dans les expériences Raman résonantes de l'état fondamental tout-*trans* car la transition électronique est dans le plan dans le cas du rétinol tout-*trans* [113]. Par contre ils sont observés dans les spectres de l'état produit [103] où le rétinol n'est pas plan, comme dans l'état fondamental du rétinol de la rhodopsine qui est 11-*cis* [117].

- Les vibrations dans le plan :

- Les modes (1) d'élongation de la chaîne carbonée, avec des fréquences caractéristiques entre 1500 et 1650  $\text{cm}^{-1}$  (C=C et C=N) et entre 1100 et 1400  $\text{cm}^{-1}$  (C-C et C-C-H).

- Les modes (4) de balancement des atomes d'hydrogène dans le plan, couplés avec les modes d'élongation C-C, sont observables dans la zone 1150-1250  $\text{cm}^{-1}$ .

Ces modes-ci sont en revanche observés dans le spectre Raman résonant de l'état fondamental. Par comparaison avec les spectres vibrationnels Raman, ces modes peuvent appartenir à l'état fondamental ou à l'état excité de bR [118] mais en principe également à des modes vibrationnels des photoproduits J/K [115]. Dans l'analyse par transformée de Fourier de nos données, beaucoup de ces modes sont très proches. Ceci peut être dû à l'activation simultanée de plusieurs mouvements harmoniques avec des fréquences très proches (peut-être mêmes modes dans l'état excité et dans l'état fondamental) ou à des variations fréquentielles dans le temps des différents modes vibrationnels, par exemples dues à une surface anharmonique ou à des transitions d'états électroniques. Pour tester ces possibilités, nous avons dans la partie suivante appliqué une analyse par transformée de Fourier à fenêtre glissante ou "spectrogramme".

### 4.3.2.2 Analyse par transformée de Fourier à fenêtre glissante (spectrogramme)

#### 4.3.2.2.a. Principe

L'analyse par transformée de Fourier est effectuée avec une fenêtre de Hanning  $F(t) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos\left(\frac{\pi \cdot t}{2\Delta t}\right)$  où la largeur à mi-hauteur  $\Delta t$  est ajustée en fonction des résolutions temporelles et spectrales souhaitées. Une fenêtre de Hanning est choisie pour limiter les artefacts de coupure aux bords de la fenêtre. Des détails sur la méthode d'analyse sont donnés dans l'annexe A.

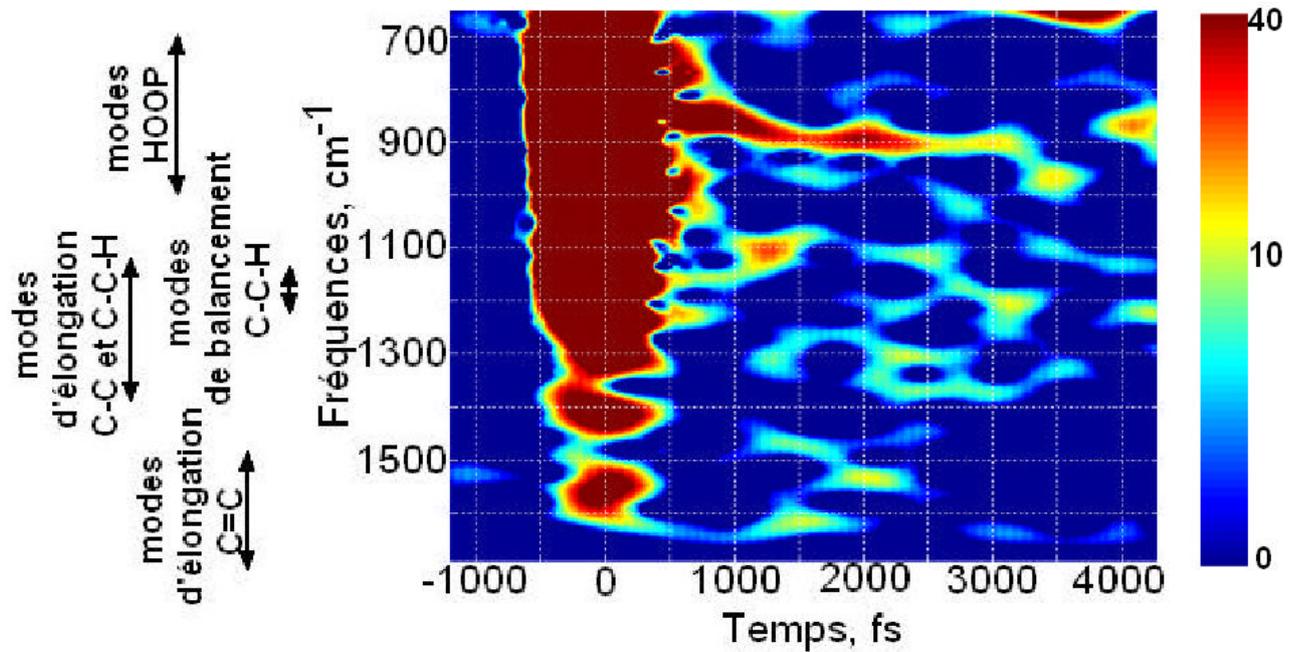


FIG. 4.25 : Spectrogramme de l'échantillon de  $bR_{neutre}$  de -1300 à 4300 fs. La fenêtre utilisée est une fenêtre de Hanning de largeur à mi-hauteur  $\Delta t = 350$  fs, soit une résolution spectrale autour de  $110 \text{ cm}^{-1}$ . L'amplitude croît du bleu au rouge (échelle logarithmique, fausses couleurs).

Les modes vibrationnels caractéristiques apparaissent. La partie électronique (redressement optique autour de  $t=0$ ) de large bande spectrale domine le signal dans les premières centaines de femtosecondes.

L'analyse par transformée de Fourier à fenêtre glissante donne une vision avec moins de modes propres que la transformée de Fourier "totale" (figure 4.23), mais des modes dont la fréquence change dans le temps, en particulier avec des mouvements entre  $800$  et  $1100 \text{ cm}^{-1}$  (région des modes HOOP) et entre  $1100$  et  $1400 \text{ cm}^{-1}$  (région des modes C-C et C-H). Ces résultats correspondent bien d'une manière générale aux résultats d'expériences d'absorption transitoire [114] où des changements de fréquence ont aussi été observés et de calculs *ab-initio* [47] qui indiquent une surface de l'état excité anharmonique, bien que l'on ne puisse pas comparer quantitativement les résultats (la sélection spectrale et la durée temporelle analysées sont différentes). Bien que l'amplitude diminue fortement après environ 500 fs, ces oscillations paraissent continuer après l'isomérisation du rétinol.

Comme vu dans la figure 1.13, dans une analyse théorique, la relaxation vers l'isomérisation est dominée par les modes d'élongation de la chaîne carbonique, les modes de torsion C=C et les modes HOOP dans le cas du rétinol dans la matrice protéique. Dans notre cas, nous voyons principalement les modes HOOP avec une intensité très importante, car ils sont situés dans la zone de sensibilité maximale de détection (figure 4.23). A cela s'ajoute le fait que nous regardons la projection de la polarisation sur l'axe de symétrie des films. En tenant compte de l'orientation des dipôles dans les échantillons (qui font un angle  $\zeta \approx 71^\circ$  par rapport à la normale aux films, [18] et voir figure 4.6), les amplitudes des modes d'élongation vont être entachées d'un facteur de projection proportionnel à  $\cos \zeta \approx 0.3$ , tandis que les amplitudes

des modes HOOP, qui sont approximativement perpendiculaires à la chaîne carbonique et dans un plan incliné d'un angle  $\gamma$  variant entre  $30^\circ$  et  $40^\circ$  [18], seront entachées d'un facteur de projection supérieur car proportionnel à  $\sin \zeta \cos \gamma \approx 0.8$ .

Néanmoins nous rappelons que les modes HOOP ne sont pas "Raman-actifs" dans l'état fondamental tout-*trans*, ce qui suggère qu'ils ne sont pas associés avec des mouvements de cet état fondamental, ni par couplage électron-photon direct de l'état excité.

#### 4.3.2.2.b. Comparaison de la durée des fenêtres d'analyse

Le choix de la fenêtre d'analyse provient d'un compromis à adopter entre résolutions spectrale et temporelle. Améliorer la résolution temporelle revient à diminuer la résolution spectrale d'autant et réciproquement. Deux exemples l'illustrent figure 4.26.

Avec une fenêtre temporelle de 100 fs, la résolution spectrale correspondante vaut environ  $400 \text{ cm}^{-1}$  et environ  $110 \text{ cm}^{-1}$  avec une fenêtre temporelle de 350 fs.

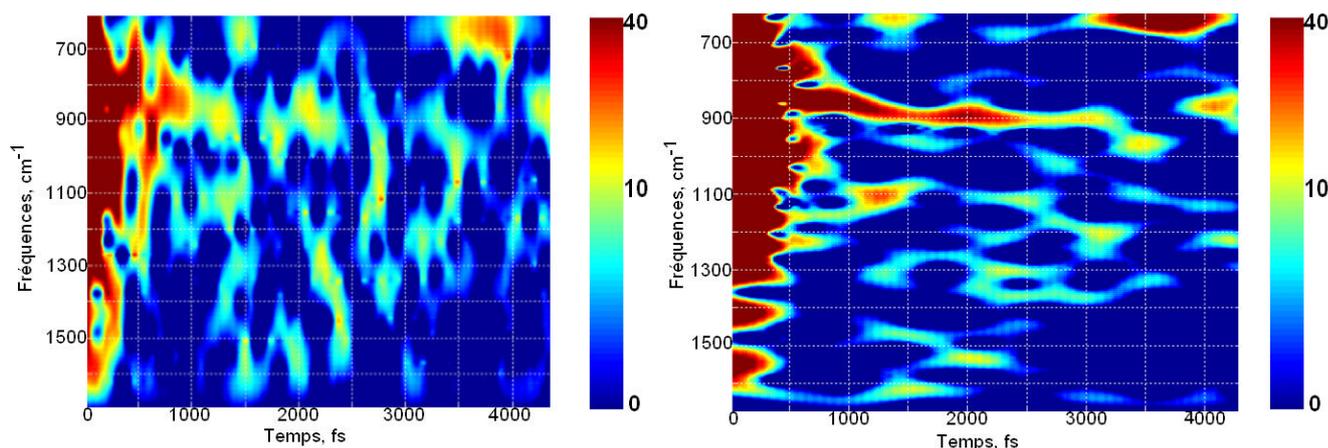


FIG. 4.26 : Spectrogramme de l'échantillon de  $\text{bR}_{\text{neutre}}$  de 0 à 4500 fs. Les fenêtres utilisées sont des fenêtres de Hanning de largeur à mi-hauteur  $\Delta t = 100 \text{ fs}$  (gauche) et  $\Delta t = 350 \text{ fs}$  (droite). L'amplitude donnée en échelle logarithmique croît du bleu au rouge.

L'analyse par spectrogramme ne donne pas directement accès à la phase des modes excités, il est donc impossible de discriminer directement entre modes appartenant à l'état excité et modes dans l'état fondamental. Nous devons passer par l'utilisation d'un autre échantillon : l'échantillon sec de bactériorhodopsine acide bleu ( $\text{bR}_{\text{bleu}}$ ), dont les cinétiques sont présentées chapitre 3. Nous utilisons la propriété particulière de cet échantillon qui est d'avoir une durée de vie de l'état excité plus longue (partie 3.3.5.2) : elle est prolongée jusqu'à 1,5-2 ps (elle est de 400-500 fs dans l'échantillon  $\text{bR}_{\text{neutre}}$ ).

#### 4.3.2.2.c. Discrimination entre modes de l'état fondamental et modes des états excité et produit par l'étude de l'échantillon de $\text{bR}_{bleu}$

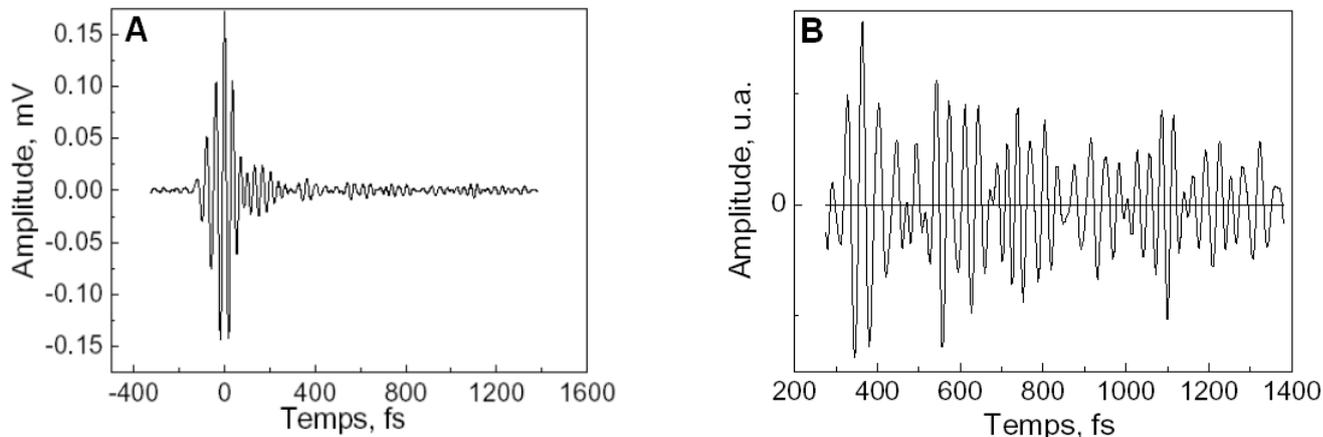


FIG. 4.27 : A. Interférogramme entre les signaux infrarouge émis par  $\text{bR}_{bleu}$  et le signal de référence émis par le GaAs, en fonction du délai entre les deux impulsions visibles excitatrices. B. Zoom temporel de la partie vibrationnelle.

Le signal interférométrique entre  $\text{bR}_{bleu}$  et GaAs est montré figure 4.27. La partie vibrationnelle est complexe et les noeuds et ventres observés traduisent la présence d'interférences entre les différents modes vibrationnels [119].

L'analyse temporelle des modes par transformée de Fourier à fenêtre glissante est représentée figure 4.28 pour  $\text{bR}_{bleu}$ .

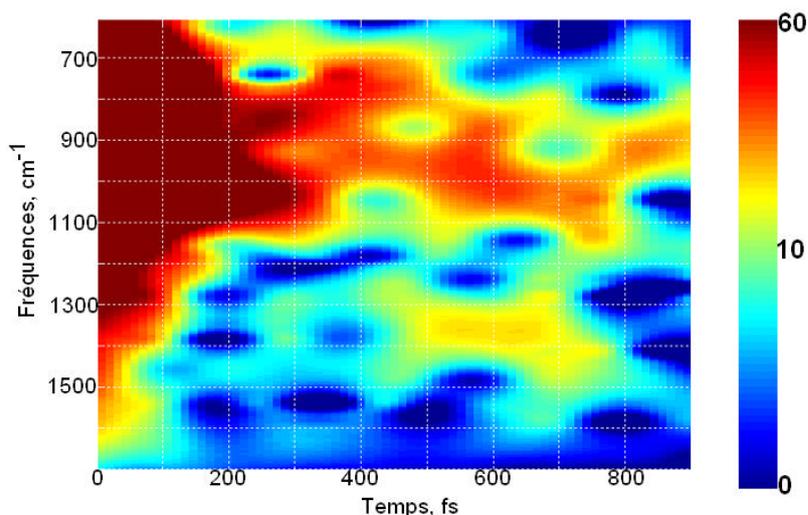


FIG. 4.28 : Spectrogramme de l'échantillon de  $\text{bR}_{bleu}$ , données normalisées. La fenêtre utilisée est une fenêtre de Hanning de largeur à mi-hauteur  $\Delta t = 100$  fs. L'amplitude croît du bleu au rouge (échelle logarithmique).

Nous utilisons la même fenêtre d'analyse pour  $bR_{neutre}$  (figure 4.29) afin de pouvoir les comparer ; les données sont normalisées.

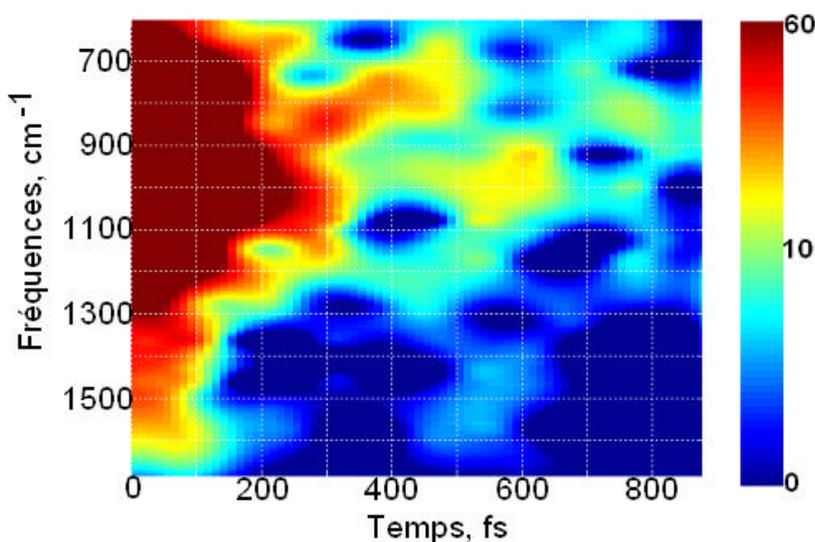


FIG. 4.29 : Spectrogramme de l'échantillon de  $bR_{neutre}$ , données normalisées, avec une fenêtre de Hanning de largeur à mi-hauteur  $\Delta t = 100$  fs également. L'amplitude croît du bleu au rouge (échelle logarithmique).

Les modes entre  $750$  et  $1050\text{ cm}^{-1}$  (modes HOOP) sont prolongés dans le cas de l'échantillon  $bR_{bleu}$ . Nous concluons qu'ils appartiennent essentiellement à l'état excité. Des modes entre  $1300$  et  $1400\text{ cm}^{-1}$  apparaissent dans le spectrogramme de  $bR_{bleu}$ , ils n'étaient pas présents pour  $bR_{neutre}$ . Nous rappelons que  $bR_{bleu}$  est composé dans son état fondamental d'un mélange 6 :4 de rétinals tout-*trans* et 13-*cis* (chapitre 3), ainsi le spectrogramme peut être complexifié du fait de la présence de la relaxation de la forme 13-*cis* du rétinale dont certains modes pourraient se trouver dans la zone  $1300 - 1400\text{ cm}^{-1}$ .

Pour vérifier cette hypothèse, nous étudions l'échantillon  $bR_{neutre}$  immobile figure 4.30. Des modes dans la zone  $1300 - 1400\text{ cm}^{-1}$  apparaissent également. Comme sous ces conditions, une fraction de l'échantillon est sous forme 13-*cis* (chapitre 3), les modes centrés en  $1300-1400\text{ cm}^{-1}$  sont en grande partie attribuables au rétinale 13-*cis* [117]. Ces analyses montrent aussi que dans le cas de l'échantillon entraîné en rotation, les contributions de la forme 13-*cis* sont négligeables.

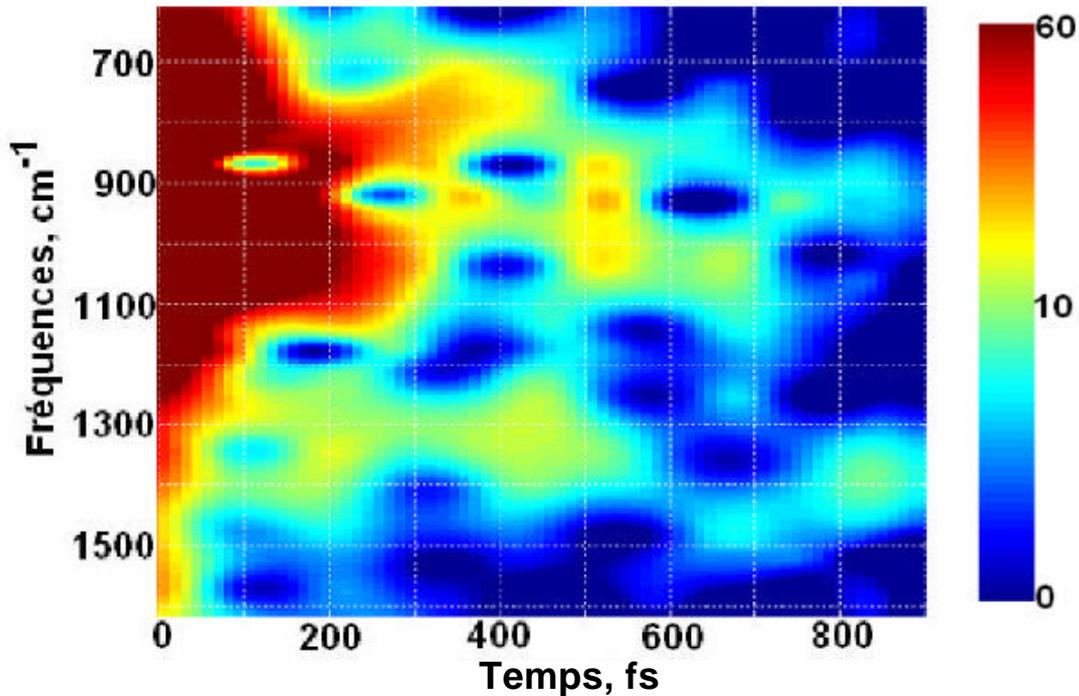


FIG. 4.30 : Spectrogramme de l'échantillon de  $bR_{neutre}$  immobile, données normalisées. La fenêtre utilisée est une fenêtre de Hanning de largeur à mi-hauteur  $\Delta t = 100$  fs. L'amplitude croît du bleu au rouge (échelle logarithmique).

Cette méthode d'analyse nous a permis de discriminer entre modes dans l'état fondamental et modes des états excité ou produit. Par contre autour de  $t=0$ , le signal électronique domine le signal, et nous ne pouvons donc pas savoir si ces modes sont directement couplés à la polarisation initiale. Une autre méthode d'analyse, développée par G. Groma (Institut de Biophysique, Szeged, Hongrie), permet de séparer réponses vibrationnelle et électronique à temps court et de résoudre fréquentiellement et temporellement la partie vibrationnelle.

#### 4.3.2.3 Modèle d'analyse cinétique

Ce programme décompose le signal en réponse électronique et vibrationnelle [120] et la simulation des données s'effectue en quatre points :

I. Calcul de la fonction de transfert du système de détection. Le signal infrarouge émis par l'AgGaS<sub>2</sub> est simulé par un monocycle infrarouge (paragraphe 2.3.2.2), fonction de la durée de l'impulsion visible excitatrice. La transformée de Fourier du signal d'intercorrélation de référence GaAs/AgGaS<sub>2</sub> ( $F_{exp}$ ) est divisée par celle de l'autocorrélation de deux monocycles infrarouges ( $F_{th}$ ). La fonction de transfert ( $T$ ) ainsi obtenue tient compte de la réponse du détecteur MCT, mais également de la réponse du GaAs qui n'est pas strictement la dérivée première de l'enveloppe de l'impulsion visible puisque le GaAs n'est pas instantané (paragraphe 2.5.1).

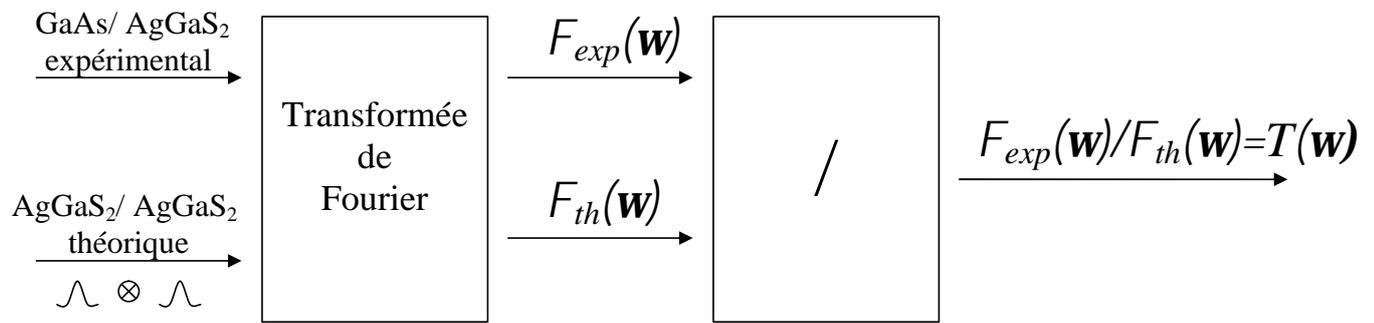


FIG. 4.31 : Détermination de la fonction de transfert  $T(\omega)$  du système de détection, qui tient compte de la réponse du système de détection et de la non instantanéité de la réponse du GaAs.

II. Modélisation de la réponse électronique. La polarisation non linéaire du second ordre  $P_{bR,th}^{(2)}$  est calculée en utilisant un modèle à deux niveaux comme en 4.2.2.2. Le modèle développé permet de donner l'expression de la susceptibilité non linéaire dans le cas résonant en se plaçant dans l'espace de Liouville [110]. Le champ infrarouge  $E_{IR}^{bR}$  émis suite à l'établissement de cette polarisation peut être calculé comme la dérivée première (modèle du plan source, paragraphe 2.3.2) ou seconde (modèle du point source, paragraphe 2.3.2 également) de cette polarisation non linéaire (figure 4.32).

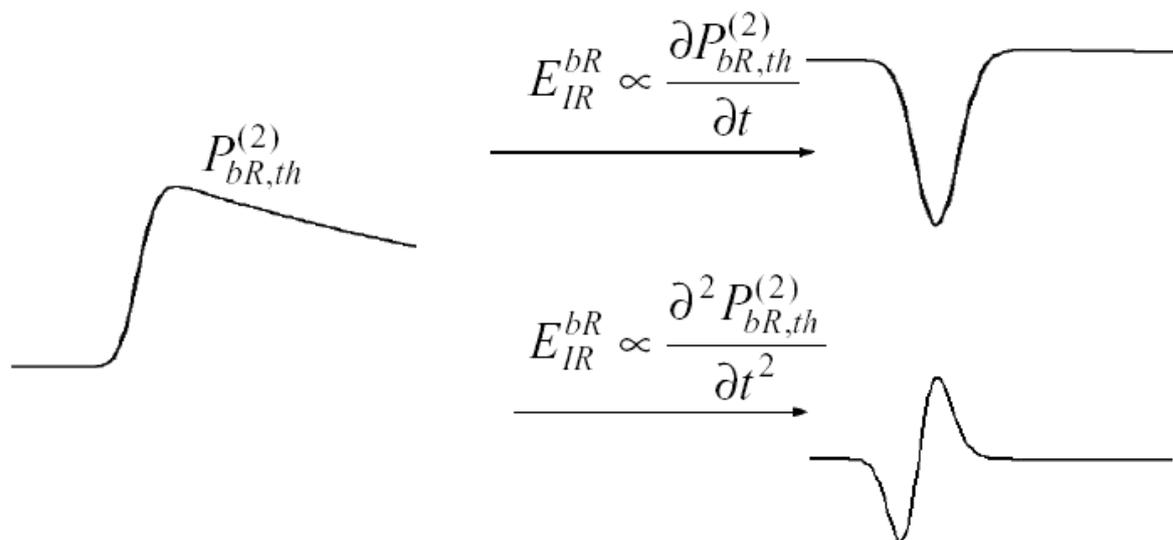


FIG. 4.32 : Modélisation de la réponse électronique de la bactériorhodopsine, comme une dérivée première ou seconde de la polarisation du deuxième ordre créée dans l'échantillon.

Ce champ infrarouge interfère avec le champ infrarouge émis par le GaAs, qui est simulé comme la dérivée première de l'enveloppe de l'impulsion visible filtrée par la fonction de transfert  $T$ .

III. Modélisation de la réponse vibrationnelle. Les vibrations sont modélisées par des exponentielles  $Ae^{-i(\omega t + \phi)}$  où  $A$  est l'amplitude,  $\omega$  la fréquence,  $\phi$  la phase,  $\tau$  le temps de vie du

mode de vibration au moment de l'excitation. Cette méthode ne tient pas compte des variations de fréquences au cours du temps, assomption justifiable pour des temps d'analyse courts. On suppose également que les modes commencent tous à  $t=0$  : les informations concernant le couplage des modes à l'excitation lumineuse sont donc contenues dans leur phase. Cette réponse est également convoluée à la fonction de transfert du système de détection.

IV. L'optimisation se fait par la méthode des moindres carrés Levenberg-Marquardt [121].

La durée de l'impulsion incidente sur l'échantillon de bactériorhodopsine vaut 13 fs, celle incidente sur l'AgGaS<sub>2</sub> vaut 11 fs.

#### 4.3.2.4 Résultats des ajustements

##### 4.3.2.4.a. Modèle de la réponse électronique de la bactériorhodopsine

Dans cette partie nous allons développer des arguments basés sur l'analyse des données expérimentales concernant le choix de la modélisation à utiliser pour représenter la réponse électronique des échantillons de bactériorhodopsine. En principe elle peut être modélisée comme la dérivée première (modèle du plan source) ou seconde (modèle du point source) de la polarisation (chapitre 2).

Nous étudions dans un premier temps les échantillons de  $bR_{neutre}$ , en supposant une réponse électronique égale à la dérivée première de la polarisation créée dans le milieu. Les résultats des ajustements sont donnés dans le tableau 4.1 et l'ajustement obtenu est représenté sur la figure 4.33.

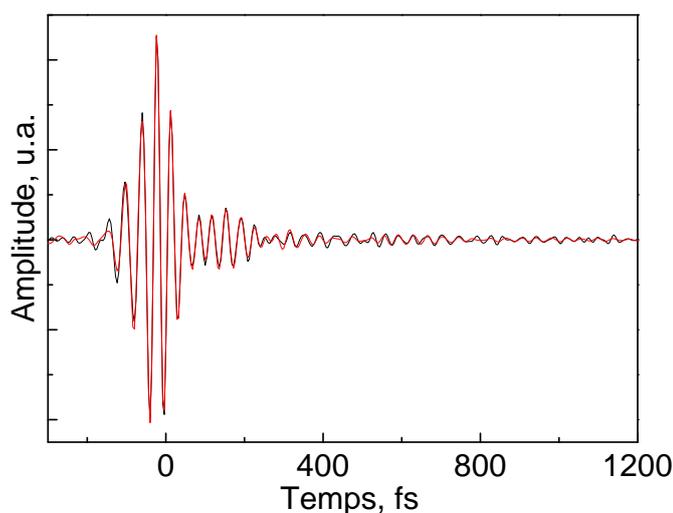


FIG. 4.33 : Interférogramme entre signal émis par l'échantillon sec de  $bR_{neutre}$  et signal émis par le GaAs. En noir signal expérimental et en rouge signal calculé.

TAB. 4.1 – Paramètres d’ajustement du signal interférométrique entre émission infrarouge de  $bR_{neutre}$  et de GaAs. Les amplitudes des modes vibrationnels et de la réponse électronique sont normalisées par leur contribution relative à l’amplitude maximale du signal interférométrique. Les paramètres utilisés pour le calcul de la polarisation dans  $bR_{neutre}$  sont  $T_1=460$  fs et  $T_2=920$  (aucun déphasage pur), où  $T_1$  et  $T_2$  sont définis paragraphe 4.2.2.1. La durée de l’impulsion incidente sur  $bR_{neutre}$  vaut 13 fs, celle de l’impulsion incidente sur  $AgGaS_2$  vaut 11 fs, mesurées par autocorrélation dans un cristal d’ $AgGaS_2$  comme expliqué partie 2.5.2.2.

réponse électronique :		amplitude	105		
modes vibrationnels :		frequence, $cm^{-1}$	A, u.a.	$\tau$ , fs	phase, $^\circ$
		778	2	580	48
		850	5	489	68
		887	9	198	75
		982	12	211	-110
		1128	5	119	-144
		1230	2	298	-133
		1613	6	84	76

La durée de vie de l’état excité  $T_1$  est choisie pour minimiser l’erreur d’ajustement (somme des carrés des résiduels entre données d’ajustement et données expérimentales), comme tracé figure 4.34. L’effet de  $T_2$  est négligeable. Les résultats trouvés dans la partie 3.3 du chapitre 3 sont en accord avec la valeur de  $T_1$  trouvée ici.

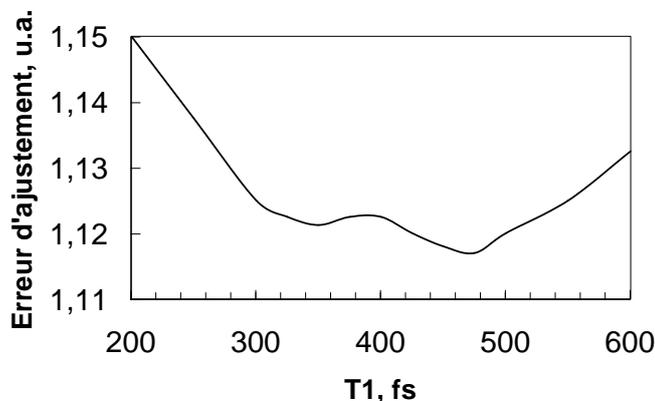


FIG. 4.34 : Dépendance de l’erreur d’ajustement (somme des carrés résiduels) en fonction de la valeur donnée à  $T_1$  dans le cas de l’étude de  $bR_{neutre}$ .

Si nous ajustons les données en n'incluant pas la réponse électronique, un mode vibrationnel ultrarapide se rajoute aux données (tableau 4.2) autour de la fréquence nulle : nous confirmons qu'une polarisation ultrarapide s'établit bien dans le milieu suite à une excitation lumineuse.

TAB. 4.2 – Mode “vibrationnel” ultrarapide apparaissant en plus des modes du tableau 4.1 dans le cas où on n'inclut aucune réponse électronique dans les paramètres d'ajustement. La qualité du fit est moins bonne ( $\chi^2$  environ 10 fois supérieur).

frequence, $\text{cm}^{-1}$	A, u.a.	$\tau$ , fs	phase, $^\circ$
0	95	1	2

Nous avons essayé d'utiliser le modèle de la dérivée seconde de la polarisation pour modéliser la réponse électronique de la bactériorhodopsine (tableau 4.3). Lorsqu'on utilise le point source comme modèle pour la bactériorhodopsine, c'est à dire la dérivée seconde de la polarisation, les temps de décroissance de certains modes deviennent ultrarapides, inférieurs à 10 fs, ce qui est incompatible avec une réponse vibrationnelle. La qualité de l'ajustement est considérablement moins bonne ( $\chi^2$  environ 110 fois augmenté) que dans le cas du tableau 4.1.

TAB. 4.3 – Paramètres d'ajustement du signal interférométrique entre émission infrarouge de  $\text{bR}_{neutre}$  et de GaAs, pour une réponse électronique représentée par la dérivée seconde de la polarisation émise. Les valeurs d'ajustement données sont d'abord celles trouvées tableau 4.1, puis elles sont optimisées. Les valeurs d'amplitude données respectent les conventions du tableau 4.1.

réponse électronique :	amplitude	106			
modes vibrationnels :		frequence, $\text{cm}^{-1}$	A, u.a.	$\tau$ , fs	phase, $^\circ$
		778	31	464	106
		846	8	531	78
		885	5	41	96
		992	13	73	-114
		1147	3	1	5
		1256	38	8	-8
		1528	8	5	1

D'un point de vue expérimental, le modèle à utiliser pour la bactériorhodopsine est donc

celui du plan source, pour lequel le champ émis est la dérivée première de la polarisation. Ce modèle s'avère plus raisonnable théoriquement aussi, car la surface de la tache focale est supérieure à la longueur d'onde d'émission (voir paragraphe 2.3.2).

#### 4.3.2.4.b. Comparaison des échantillons neutre et acide bleu

Deux groupes de modes ressortent du tableau 4.1, ceux associés à une phase autour de  $70^\circ$  [ $180^\circ$ ], et ceux ayant une phase proche de  $-140^\circ$  [ $180^\circ$ ]. Le terme de  $180^\circ$  s'explique par le sens du dipôle relativement à la polarisation du champ électrique incident. Chacun de ces modes appartient à l'état excité, à l'état produit ou à l'état fondamental. En particulier, ces résultats indiquent que les modes ne sont pas directement activés à  $t=0$ , sinon le déphasage devrait être de  $0^\circ$  [ $180^\circ$ ]. Comme vu dans la figure 1.13 du chapitre 1, on pense que la relaxation initiale se fait suivant les modes d'élongation de la chaîne carbonique les premières dizaines de femtosecondes, et seulement ensuite commence la relaxation suivant les autres coordonnées vibrationnelles, ce qui est donc en accord avec le déphasage observé dans nos ajustement. En revanche, nous ne voyons aucun mode avec un temps de déphasage de l'ordre de quelques dizaines de femtosecondes comme attendu par des études théoriques [45]. Plusieurs raisons peuvent être évoquées :

- La sensibilité de détection est très faible dans cette zone spectrale.
- Comme rappelé dans l'analyse par transformée de Fourier à fenêtre glissante, nous regardons la projection de la polarisation sur l'axe de symétrie des films. Les amplitudes des modes d'élongation de la chaîne carbonée sont donc expérimentalement moins intenses du fait d'un facteur de projection faible.
- Ces modes surdampés peuvent être au moins partiellement cachés dans la partie électronique et dans les contributions des autres modes.

Afin d'obtenir des indications sur la surface énergétique à laquelle les modes vibrationnels appartiennent, nous avons ajusté les données obtenues dans le cas de  $bR_{bleu}$ .

Certains modes ( $850$ ,  $887$ ,  $982$ , et  $1230\text{ cm}^{-1}$  dans  $bR_{neutre}$ ) paraissent significativement prolongés dans le cas de  $bR_{bleu}$ . Il est donc raisonnable de les attribuer à l'état excité.

- Le déphasage (environ  $600\text{ fs}$ ) du mode à  $778\text{ cm}^{-1}$  n'est pas significativement prolongé dans le cas de  $bR_{bleu}$  : ce mode pourrait donc être attribué à l'état fondamental. Néanmoins, comme dans l'état fondamental il n'y a pas de modes "Raman-actifs" dans cette zone spectrale [115], nous ne pouvons pas exclure qu'il s'agisse d'un mode de l'état excité et que le déphasage soit déterminé par d'autres paramètres que la durée de vie de l'état excité de  $bR_{neutre}$ .
- Le mode à  $1128\text{ cm}^{-1}$  déphase en environ  $120\text{ fs}$  dans les deux types de  $bR$ , valeur dans les deux cas plus courte que  $T_1$  : il pourrait s'agir de modes dans l'état fondamental comme de modes dans l'état excité.
- Nous n'avons pas trouvé l'équivalent du mode à  $1613\text{ cm}^{-1}$  dans  $bR_{bleu}$ .

En conclusion, la plupart des modes, en particulier ceux dans la région basses fréquences HOOP,

peuvent être attribuables à des mouvements dans l'état excité ; certains modes pourraient provenir de l'état fondamental. Aucune phase n'est proche de  $0^\circ$  [ $180^\circ$ ], ce qui semble indiquer, pour les modes que nous attribuons à l'état excité, qu'ils ne sont pas directement couplés à la relaxation hors de la zone de Franck Condon.

TAB. 4.4 – Paramètres d'ajustement obtenus dans le cas de l'étude des signaux émis par des échantillons secs de  $bR_{neutre}$  et  $bR_{bleu}$ , jusqu'à 1,2 ps. Les conditions initiales d'ajustement sont celles obtenues pour  $bR_{neutre}$ . Nous vérifions que l'erreur relative d'ajustement est bien minimale dans ce cas, en partant de conditions initiales complètement différentes. Les paramètres utilisés pour le calcul de la polarisation créée dans  $bR_{bleu}$  sont  $T_1 = 930$  fs et  $T_2 = 1860$  fs.

réponse électronique :	amplitude	105		
modes vibrationnels :	frequence, $\text{cm}^{-1}$	A, u.a.	$\tau$ , fs	phase, $^\circ$
	778	2	580	48
	850	5	489	68
	887	9	198	75
<u>échantillon</u>	982	12	211	-110
	1128	5	119	-144
<u><math>bR_{neutre}</math></u>	1230	2	298	-133
	1613	6	84	76
réponse électronique :	amplitude	113		
modes vibrationnels :	frequence, $\text{cm}^{-1}$	A,u.a.	$\tau$ , fs	phase, $^\circ$
	772	2	607	41
	841	4	664	72
	878	3	572	73
<u>échantillon</u>	931	8	145	-108
	966	3	823	-113
<u><math>bR_{bleu}</math></u>	1106	3	134	-145
	1253	3	740	72
	1313	3	935	71

La valeur de  $T_1$  donnée pour le calcul de la polarisation est déterminé figure 4.35 comme dans le cas de l'échantillon de  $bR_{neutre}$  en optimisant l'erreur relative d'ajustement en fonction

de  $T_1$ , pour des valeurs comprises entre 400 fs et 2400 fs. On trouve  $T_1 = 1860$  fs, en très bon accord avec la valeur obtenue par spectroscopie pompe sonde visible chapitre 3.

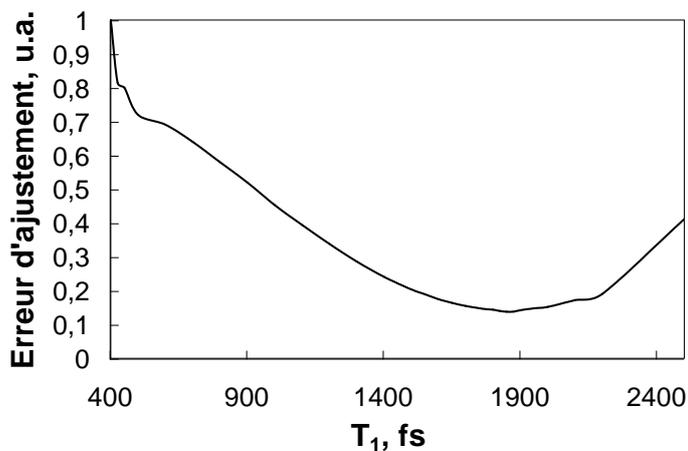


FIG. 4.35 : Dépendance de l'erreur d'ajustement (somme des carrés résiduels) en fonction de la valeur donnée à  $T_1$  dans le cas de l'étude  $bR_{neutre}$ .

Cette méthode permet de séparer réponse électronique et réponse vibrationnelle, mais même en optimisant avec sept modes de vibration, le signal résiduel entre données expérimentales et données calculées est encore supérieur au niveau de bruit à temps négatif (figure 4.36). Néanmoins l'ajout de modes vibrationnels n'améliore pas considérablement l'ajustement. Nous pensons que la limite atteinte par cette méthode provient du fait que dans ce programme les fréquences ne peuvent pas varier.

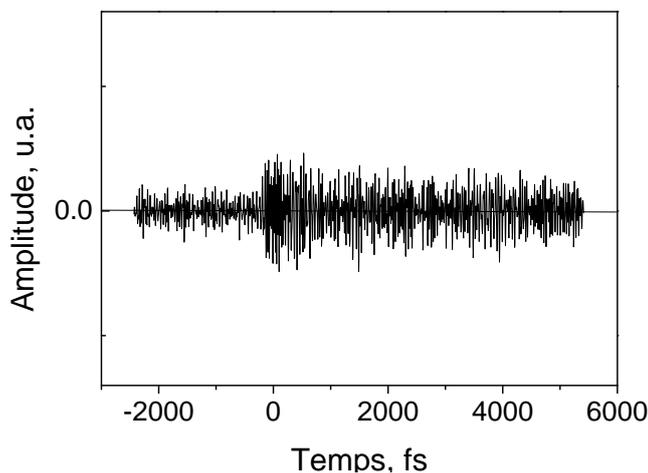


FIG. 4.36 : Signal résiduel obtenu par différence entre signal modélisé et signal expérimental dans le cas de  $bR_{neutre}$ .

Cependant l'analyse par transformée de Fourier à fenêtre glissante (spectrogramme) a montré un déplacement des fréquences dans le temps (paragraphe 4.3.2.2). Il est donc indispensable d'utiliser les deux méthodes pour une analyse complète des signaux interférométriques.

Il est utile de comparer notre analyse dans le domaine de fréquences avec les résultats obtenus par d'autres techniques vibrationnelles résolues dans le temps.

Des modulations du spectre d'absorption transitoire ont été observées dans plusieurs études [114,122]. Les études de Dexheimer et coll. [122] ne montraient pas de cohérences en dessous de  $1000\text{ cm}^{-1}$  et ces modes ont été interprétés comme des signaux de l'état fondamental, peuplé par Raman stimulé [113]. Par contre la provenance des signaux obtenus par Kobayashi et coll. [114], qui utilisaient un faisceau pompe très court ( $<5\text{ fs}$ ), a été attribuée à l'état excité, comme dans notre cas. Ils ont analysé leurs signaux par transformée de Fourier à fenêtre glissante. Dans le domaine des fréquences plus élevées ( $> 1000\text{ cm}^{-1}$ ) des fréquences similaires à celles de nos expériences ont été trouvées, ainsi que des variations de fréquences avec une période d'environ  $200\text{ fs}$  (période observée de façon plus 'isolée' dans des études de résolution temporelle inférieure) [49,123] que nous observons également (figure 4.29). L'évolution des modes autour de  $1100\text{ cm}^{-1}$  est similaire dans les deux expériences, mais le mode HOOP autour de  $900\text{ cm}^{-1}$  est beaucoup plus fort dans nos expériences, et contrairement à [114], il persiste au-delà de  $500\text{ fs}$ . Cette différence est probablement due aux sélections spectrales dans les expériences d'absorption où la visualisation des mouvements dépend du couplage avec la (les) transition(s) sondé(es), qui est complexe dans le cas de la bactériorhodopsine. Nous rappelons que dans nos expériences un tel filtrage n'a pas lieu : après absorption d'un photon, toute oscillation de charges ayant une composante perpendiculaire à la membrane est observée.

Néanmoins, notre observation que les modes HOOP sont activés dans l'état excité après une relaxation initiale de quelques dizaines de femtosecondes est en accord avec les travaux de Kobayashi et coll [114]. Les modes de balancement hors du plan des atomes d'hydrogènes (HOOP) ne sont pas directement couplés à la transition électronique  $S_0 \rightarrow S_1$  [45], et donc non visibles dans le spectre de résonance Raman de l'état fondamental tout-*trans* ; il le sont dans les états produits J et K, où la conformation du rétinale n'est plus plane [103,124,125]. Contrairement à nos résultats, les modes HOOP n'apparaissent pas ou peu dans les spectres Raman attribués à l'état excité [124,126]. Cette différence est encore attribuable à la sélection des modes par la transition de résonance, qui est  $S_0 \rightarrow S_1$  au moins dans le cas de [124].

Notre méthode de détection, dans laquelle aucun filtrage spectral n'intervient, accentue l'activation des modes HOOP autour de  $900\text{ cm}^{-1}$  dans l'état excité. La diminution forte de l'amplitude de ces modes après environ  $400\text{-}500\text{ fs}$  (figure 4.29) dans  $\text{bR}_{\text{neutre}}$  contraste avec la prolongation d'une amplitude élevée dans le cas de  $\text{bR}_{\text{bleu}}$  (figure 4.28). Ceci montre que l'isomérisation *trans*  $\rightarrow$  *cis* perturbe le cours de ses mouvements, ce qui suggère un couplage avec la coordonnée d'isomérisation. Néanmoins, une cohérence détectable persiste après  $t=500\text{ fs}$ , qui n'est pas attribuable à l'état fondamental. Nous concluons qu'une partie de la cohérence initiée par l'activation (indirecte) de ces modes dans l'état excité est transmise à l'état produit. Ceci suggère que l'isomérisation est un processus non stochastique, sinon quasi-balistique.

Cette suggestion est en accord avec une analyse récente des mesures d'absorption transitoire dans l'ultraviolet [54].

Dans l'ensemble, notre analyse indique une transduction de la polarisation ultrarapide ( $< 13$  fs) initiale à l'activation des modes HOOP, par couplage anharmonique, en moins d'une période d'oscillation, avec les modes d'élongation, suivi par l'isomérisation tout-*trans*  $\rightarrow$  13-*cis* du rétinol, encore par couplage anharmonique avec des modes incluant les modes HOOP, en plusieurs centaines de femtosecondes. En grandes lignes ce résultat est en accord avec des modèles théoriques développés les dernières années (chapitre 1, [25, 31, 47], bien que dans [31] l'isomérisation est modélisée seulement dans la transition J $\rightarrow$ K). Néanmoins l'implication des modes HOOP  $< 1000$  cm<sup>-1</sup> ne ressort pas en première ligne de ces modèles, possiblement parce qu'ils ne prennent pas en compte l'influence de l'environnement protéique du rétinol.

En conclusion, nous avons détecté et quantifié la polarisation 'subite' du rétinol dans la direction transmembranaire et analysé les mouvements cohérents de charges engendrés en relation avec la réaction d'isomérisation du rétinol. La présente méthode permet de visualiser la projection des mouvements dans l'axe de la membrane par l'utilisation de membranes orientées. En principe, les mouvements peuvent être résolus en trois dimensions en utilisant des cristaux de bactériorhodopsine. Néanmoins, dans les cristaux décrits actuellement [15, 127], l'arrangement des protéines dans la maille cristalline est en trimère, en pratique proche de la configuration dans la membrane.

# Conclusion et perspectives...

Ce travail de thèse se place dans le cadre général de l'étude de la dynamique primaire des protéines et du rôle fonctionnel de celle-ci. Nous avons étudié la bactériorhodopsine, protéine membranaire bactérienne, utilisant la lumière comme source d'énergie pour établir un gradient de protons autour de la membrane. Elle contient un photorécepteur, le rétinol, identique à celui présent dans les protéines photoréceptrices des vertébrés. De par entre autres sa résistance aux conditions extrêmes, elle est une protéine modèle pour l'étude des protéines à rétinol.

L'isomérisation du rétinol est considérée comme l'événement précurseur d'une cascade de transfert de charges capable d'établir un gradient électrochimique. Cependant ce mécanisme de transduction efficace du signal électronique et ultrarapide (absorption d'un photon) vers un signal structural (changement de conformation) est actuellement très controversé. Nous avons alors développé une méthode d'analyse permettant d'étudier le rôle des propriétés électroniques non-linéaires du deuxième ordre du rétinol.

La technique utilisée est une spectroscopie femtoseconde non linéaire dans le domaine moyen infrarouge, développée dans le laboratoire pour l'étude de semiconducteurs et de cristaux de protéines. Le dispositif expérimental a été adapté pour l'étude d'échantillons anhydres orientés de bactériorhodopsine. L'ensemble des mouvements de charge induits par une excitation ultra-brève (autour de 13 fs) de ce type d'échantillon donne lieu à une émission directionnelle infrarouge par le phénomène de redressement optique. Nous la détectons entre 4 et 14  $\mu\text{m}$  par interférométrie avec un champ large bande de référence. Cette émission permet à la fois de caractériser la polarisation ultrarapide qui prend naissance dans les échantillons avec une résolution de 13 fs (partie électronique du signal), mais également d'obtenir des informations sur les modifications structurales du système rétinol/protéine (partie vibrationnelle) en donnant plus d'informations que les spectroscopies vibrationnelles transitoires plus conventionnelles puisque toute émission cohérente "infrarouge active" peut être détectée.

Le travail effectué durant la thèse peut se décrire en plusieurs parties :

- Préparation des échantillons orientés anhydres de bactériorhodopsine incluant la culture des bactéries, la purification des membranes puis la déposition par électrophorèse.
- Caractérisation des échantillons par spectroscopie d'absorption transitoire, afin de valider

que les premiers processus photoinduits des échantillons secs sont représentatifs de ceux de la bactériorhodopsine dans son milieu d'hydratation naturelle.

- Optimisation du dispositif expérimental pour l'étude des échantillons orientés.
- Développement de programmes d'analyse de l'émission infrarouge émise par la bactériorhodopsine.

L'analyse des signaux émis par la bactériorhodopsine est complexe et a nécessité l'utilisation de trois approches complémentaires :

- Une analyse par transformée de Fourier directe donne accès au spectre vibrationnel. Cette méthode est loin d'être optimale dans notre cas, car les fréquences détectées paraissent varier dans le temps.

- L'analyse par transformée de Fourier à fenêtre glissante donne des informations sur l'évolution temporelle des modes vibrationnels après environ 300 fs. A temps court, la réponse électronique domine le signal, et une méthode d'analyse plus fine s'impose.

- Afin de séparer à temps court réponse électronique et réponse vibrationnelle et d'obtenir des informations sur leur couplage à l'excitation lumineuse, nous avons développé une méthode d'analyse cinétique complète. La réponse électronique de la bactériorhodopsine est calculée dans le cas simple d'un système à deux niveaux, excité en résonance. Les modes vibrationnels sont ajustés par des exponentielles décroissantes, permettant de les caractériser en amplitude et en phase.

Nous avons ainsi pu démontrer la présence de redressement optique "électronique" dans nos échantillons orientés de bactériorhodopsine, d'amplitude comparable à celle générée par un cristal semiconducteur de référence, l'Arseniure de Gallium (GaAs). Afin de relier cet importante polarisation ultrarapide ( $< 13$  fs) à la valeur du changement dipolaire de l'état excité, il a fallu utiliser un autre cristal non linéaire (le Sulfure d'Argent et de Gallium,  $\text{AgGaS}_2$ ) dont l'émission infrarouge générée par redressement optique a les mêmes caractéristiques spectrales que celle des échantillons de bactériorhodopsine. Nous avons ainsi pu quantifier le changement de moment dipolaire subit, et il vaut autour de 30 D. Cette valeur est supérieure, quoique du même ordre de grandeur, aux valeurs estimées par des mesures non linéaires plus indirectes sur le rétinale isolé, et par des traitements théoriques du rétinale. Il paraît donc que la polarisation est favorisée par la présence du complexe protéique.

Un autre résultat important est la détection des modes de vibration du rétinale, et la possibilité d'identifier à quelle surface énergétique ils appartiennent (état fondamental ou états excité/produit) en étudiant un autre type d'échantillon de bactériorhodopsine (dit acide bleu) dont la durée de vie de l'état excité est prolongée. Des modes caractéristiques ressortent des analyses, en particulier les modes dits HOOP (modes de vibration des atomes d'hydrogène hors du plan), impliqués dans la transduction de l'énergie électronique vers l'isomérisation du rétinale. Il ressort de nos analyses que ces modes sont indirectement couplés à l'excitation lumineuse et ils varient dans le temps, en bon accord avec des modèles théoriques développés par d'autres groupes.

La présente méthode se limite vers les basses fréquences à  $\approx 20$  THz. Cependant certaines théories mettent en avant le rôle des déplacements de charges à l'échelle de plusieurs centaines de femtosecondes. Pour caractériser la réponse électronique de la bactériorhodopsine sur des échelles de temps plus longues, il faudrait pouvoir détecter une émission dans le domaine térahertz. Une telle expérience est en cours dans le laboratoire, utilisant des antennes photoconductrices à base de semiconducteurs pour détecter des monocycles de l'ordre de 400 fs (soit un spectre s'étendant de 0 à 2,5 THz).

Nous avons montré que suite à une excitation lumineuse, une importante polarisation, à l'origine de modes vibrationnels spécifiques, prend naissance dans nos échantillons sur une échelle de temps de l'ordre d'une dizaine de femtosecondes. Nous avons suggéré qu'il existe un lien entre polarisation ultrarapide et isomérisation du rétinale ; pour étudier leur rôle fonctionnel respectif, l'expérience à réaliser qui semblerait la plus adaptée est l'étude de la bactériorhodopsine qui incorpore un rétinale modifié pour lequel l'isomérisation *trans-cis* ne peut pas avoir lieu. Pour cela, des difficultés techniques concernant les charges surfaciques nécessaires pour l'orientation par électrophorèse sont à surmonter.



# Annexe A

## Notations et conventions utilisées

### A.1 Transformée de Fourier

#### A.1.1 Définitions

La transformée de Fourier, notée  $\mathbf{F}$ , d'une fonction dépendant du temps  $f(t)$  est notée  $f(\omega)$ , définie par :

$$f(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)e^{i\omega t} dt = \mathbf{F}[f(t)] \quad (\text{A.1})$$

et par transformée de Fourier inverse  $\mathbf{F}^{-1}$

$$f(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} f(\omega)e^{-i\omega t} dt = \mathbf{F}^{-1}[f(\omega)]. \quad (\text{A.2})$$

La transformée de Fourier du complexe conjugué est

$$\mathbf{F}[f^*(t)] = f^*(-\omega) \quad (\text{A.3})$$

Les transformées de Fourier des dérivées temporelles valent

$$\mathbf{F}\left[\frac{d^{(n)}f(t)}{dt}\right] = (-i\omega)^n f(\omega). \quad (\text{A.4})$$

La transformée de Fourier directe et inverse de la fonction de Dirac  $\delta(t)$  s'écrit :

$$\mathbf{F}[\delta(t - t_0)] = e^{i\omega t_0}. \quad (\text{A.5})$$

Si  $f$  et  $g$  sont deux fonctions dépendant du temps, la convolution  $f \otimes g$  se définit par

$$f \otimes g(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t')g(t - t')dt' \quad (\text{A.6})$$

$$\text{et } \mathbf{F}[f \otimes g(t)] = f(\omega)g(\omega) \quad (\text{A.7})$$

### A.1.2 Analyse par transformée de Fourier à fenêtre glissante

La transformée de Fourier à fenêtre glissante est un outil très efficace pour étudier des signaux contenant des fréquences variant dans le temps. Elle permet de morceler le signal à étudier en petits segments dans lesquels les signaux sont supposés stationnaires, et une transformée de Fourier est appliquée. Pour cela, on utilise une fenêtre normalisée  $f$  translatée temporellement et fréquentiellement (figure A.1) par la formule

$$h_{t_o, \omega_o}(t) = h(t - t_o)e^{i\omega_o t} \quad (\text{A.8})$$

soit par transformée de Fourier

$$h_{t_o, \omega_o}(\omega) = h(\omega - \omega_o)e^{-it_o(\omega - \omega_o)}. \quad (\text{A.9})$$

L'énergie de  $h_{t_o, \omega_o}(t)$  est concentrée autour de  $t_o$ , dans un intervalle  $\sigma_t$  mesuré par la variance [128] :

$$\sigma_t^2 = \int_{-\infty}^{+\infty} (t - t_o)^2 |h(t)|^2 dt. \quad (\text{A.10})$$

De même celle de  $h_{t_o, \omega_o}(\omega)$  est concentrée autour de  $\omega_o$  sur un intervalle  $\sigma_\omega$  tel que :

$$\sigma_\omega^2 = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} (\omega - \omega_o)^2 |h(\omega)|^2 d\omega. \quad (\text{A.11})$$

D'après le principe d'incertitude d'Heisenberg, ces intervalles sont liés par la relation :

$$\sigma_t \sigma_\omega \geq \frac{1}{2}. \quad (\text{A.12})$$

La transformée de Fourier à fenêtre glissante  $W$  d'une fonction  $f$  vaut

$$W_f(t_o, \omega_o) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)h(t - t_o)e^{-i\omega_o t} dt. \quad (\text{A.13})$$

La densité d'énergie, définie par

$$|W_f(t_o, \omega_o)|^2 = \left| \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)h(t - t_o)e^{-i\omega_o t} dt \right|^2 \quad (\text{A.14})$$

est appelée spectrogramme.

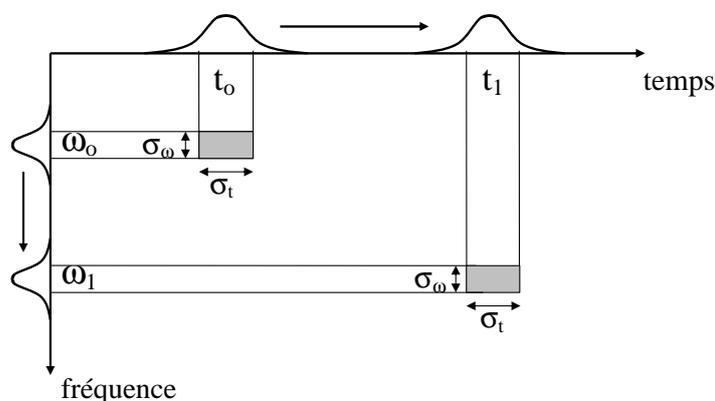


FIG. A.1 : Principe de la transformée de Fourier à fenêtre glissante. La taille du rectangle d'analyse d'aire  $\sigma_t \sigma_\omega$  est indépendante du couple  $(t_o, \omega_o)$ , la résolution est donc constante dans le plan temps-fréquence.

Les fenêtres d'analyse les plus couramment utilisées, définies pour  $t \leq |\Delta t|$  et nulles en dehors, sont :

Rectangle :  $f(t) = \frac{1}{\Delta t}$

Gaussienne :  $f(t) = e^{-\frac{50\pi t^2}{8\Delta t^2}}$

Hamming :  $f(t) = 0,54 + 0,46\cos(\frac{2\pi t}{\Delta t})$

Hanning :  $f(t) = 0,5(1 + \cos(\frac{2\pi t}{\Delta t}))$

Blackman :  $0,42 + 0,5\cos(\frac{2\pi t}{\Delta t}) + 0,08\cos(\frac{4\pi t}{\Delta t})$

La figure A.2 permet de comprendre comment s'effectue le choix de la fenêtre d'analyse.

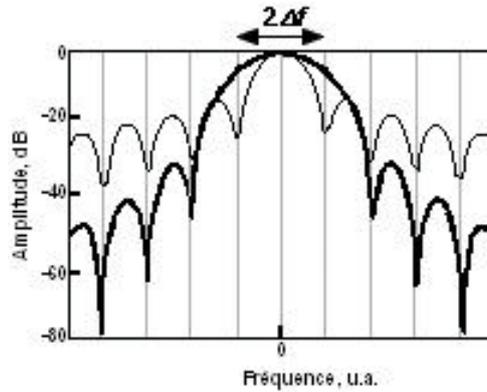


FIG. A.2 : Comparaison des spectres en puissance d'une fenêtre Rectangle (trait fin) et d'une fenêtre de Hanning (trait épais).  $\Delta f = \frac{1}{\Delta t}$ .

La troncature du signal par une fenêtre rectangulaire a pour conséquence d'introduire des oscillations à haute fréquence dans le domaine fréquentiel. L'application d'une fonction de pondération bien adaptée permet d'atténuer l'introduction de fréquences indésirables, donnant ainsi lieu à une représentation plus fidèle du contenu fréquentiel des données. Dans la figure A.2, on voit que l'amplitude des modes secondaires est diminuée d'un facteur 3 en passant d'une fenêtre Rectangle à une fenêtre de Hanning. En contrepartie, le lobe principal est élargi dans le cas d'une fenêtre de Hanning, la sélectivité fréquentielle sera moins bonne [129]. Un compromis est donc à adopter entre résolution spectrale et atténuation des hautes fréquences. En particulier la fenêtre de Hanning offre le meilleur compromis.

## A.2 Grandeurs physiques

-  $c$  : vitesse de la lumière dans le vide ( $\approx 3 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

-  $\eta_o$  : impédance du vide ( $= 377 \Omega$ ).

-  $\mu_o$  : perméabilité du vide ( $= 4\pi \cdot 10^{-7} \text{ kg} \cdot \text{m} / \text{A}^2 \cdot \text{s}^2$ ).

-  $\epsilon_o$  : permittivité diélectrique du vide ( $= \frac{1}{\mu_o c^2}$ ).

Ces trois grandeurs sont liées par la relation  $\eta_o = \frac{\epsilon_o}{\mu_o}$ .

-  $H(\omega)$  : fonction de Heaviside, définie par  $H(\omega) = 1$  si  $\omega \geq 0$ ;  $H(\omega) = 0$  si  $\omega < 0$ .

-  $\delta(t)$  : fonction de Dirac centrée à l'origine des temps.

-  $E$  le champ électrique réel.

-  $\underline{E}$  le champ complexe associé :  $E(t) = \text{Re}(\underline{E}(t))$ .

- On note  $t_p$  et  $t_s$  les coefficients de transmission de Fresnel :

$$t_p = \frac{2n_i \cos \theta_i}{n_i \cos \theta_t + n_t \cos \theta_i} \text{ et } t_s = \frac{2n_i \cos \theta_i}{n_i \cos \theta_i + n_t \cos \theta_t}$$

$n_i$  et  $n_t$  sont les indices de réfraction du milieu incident et du milieu de l'onde transmise.  $\theta_i$  est l'angle d'incidence par rapport à la normale au milieu, et  $\theta_t$  l'angle transmis.

### A.3 Abréviations biologiques

- ATP : adénosine 5'-triphosphate.

#### Différentes formes de bactériorhodopsine

-  $\text{bR}_{\text{neutre}}$  : bactériorhodopsine à pH neutre, adaptée à la lumière. Maximum d'absorption des échantillons secs après adaptation à la lumière = 564 nm .

-  $\text{bR}_{\text{bleu}}$  : bactériorhodopsine à pH acide dite acide bleue. Maximum d'absorption des échantillons secs = 603 nm.

-  $\text{bR}_{\text{pourpre}}$  : bactériorhodopsine à pH acide dite acide pourpre. Maximum d'absorption des échantillons secs = 560 nm.

#### Acides aminés

Lys : Lysine.

Asp : Acide Aspartique.



# Annexe B

## Modèle d'une antenne dipolaire

Dans cette annexe nous allons détailler les calculs permettant de montrer que dans l'approximation dipolaire, le champ émis par une antenne est proportionnelle à la dérivée seconde de la polarisation (paragraphe 2.3.2 et figure 2.7). On rappelle que l'approximation dipolaire est valable dans le cas où le champ est étudié à grande distance du volume émetteur parcouru de charges en mouvement et les dimensions de l'émetteur sont faible par rapport aux longueurs d'ondes d'émission. Pour comprendre le principe de cette émission, l'approche la plus simple consiste à partir d'un dipôle électrique variable, et chercher le champ électrique compatible avec les équations de Maxwell [130]. Au niveau macroscopique, la polarisation sera  $P(t)=Np(t)$  où  $N$  est la densité de dipôles parallèles entre eux qui sont supposées ne pas interagir entre eux. On introduit une densité de charge  $\rho(t)$  fictive définie par  $\rho(t)=-\nabla(p(t).\delta(\vec{r}))$ .

A partir de l'équation de conservation des charges, on introduit les courants fictifs  $j(\vec{r},t)$  tels que

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{j}(\vec{r},t) + \frac{\partial}{\partial t} \rho(\vec{r},t) = 0 \quad (\text{B.1})$$

$$\text{soit } \vec{j}(\vec{r},t) = \frac{d}{dt} [p(t)] \delta(r). \quad (\text{B.2})$$

Les expressions des potentiels retardés, associés au dipôle variable  $p(t)$ , s'écrivent en intégrant sur le volume d'analyse  $\tau$  pour chaque élément de volume  $d\tau$  :

$$V(\vec{r},t) = \frac{1}{4\pi\epsilon_o} \int_{\tau} \frac{\rho(\vec{r}',t - |\vec{r} - \vec{r}'|/c)}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\tau \quad (\text{B.3})$$

$$\text{et } \vec{A}(\vec{r},t) = \frac{\mu_o}{4\pi} \int_{\tau} \frac{j(\vec{r}',t - |\vec{r} - \vec{r}'|/c)}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\tau. \quad (\text{B.4})$$

En remplaçant la valeur de la densité de courant (équation B.2), l'expression du potentiel vecteur en M devient :

$$\vec{A}(\vec{r}, t) = \frac{\mu_o}{4\pi} \int_{\tau} \frac{\{d/dt(\vec{p}_o(t - |\vec{r} - \vec{r}'|/c)\delta(r'))\}}{|\vec{r} - \vec{r}'| d\tau} \quad (\text{B.5})$$

$$\text{donc } \vec{A}(\vec{r}, t) = \frac{\mu_o}{4\pi r} \frac{d}{dt} [\vec{p}(t - r/c)]. \quad (\text{B.6})$$

Les équations se simplifient en tenant compte de la dépendance temporelle du dipôle, en notant  $\vec{p} = p_o e^{i\omega(t-r/c)}$  :

$$\vec{A}(\vec{r}, t) = -\frac{\mu_o}{4\pi r} \omega \vec{p}_o e^{i\omega(t-r/c)}. \quad (\text{B.7})$$

Le potentiel scalaire est obtenu en utilisant la jauge de Lorentz :

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{A} + \frac{1}{c^2} \frac{\partial V}{\partial t} = 0 \quad (\text{B.8})$$

soit l'expression suivante du potentiel scalaire :

$$V(\vec{r}, t) = \frac{1}{4\pi\epsilon_o} \left[ \frac{1}{r^3} + \frac{i\omega}{r^2 c} \right] \cdot \vec{p}_o \cdot \vec{r} e^{i\omega(t-r/c)}. \quad (\text{B.9})$$

L'expression du champ rayonné s'obtient d'après :

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = -\vec{\nabla} V - \frac{\partial \vec{A}}{\partial t} \quad (\text{B.10})$$

donc le champ rayonné par le dipôle vaut :

$$\vec{E}_e(\vec{r}, t) = \frac{1}{4\pi\epsilon_o} \left[ \left( \frac{2}{r^3} + \frac{2i\omega}{r^2 c} \right) \cos(\theta) \vec{u}_r + \left( \frac{1}{r^3} + \frac{i\omega}{r^2 c} - \frac{\omega^2}{rc^2} \right) \sin(\theta) \vec{u}_\theta \right] p_o e^{i\omega(t-r/c)}. \quad (\text{B.11})$$

Le champ rayonné s'observe en champ lointain, nous ne conservons donc que les termes en  $\frac{1}{r}$  et

le champ rayonné s'écrit finalement :

$$\vec{E}_e(\vec{r}, t) = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{\omega^2}{rc^2} \sin(\theta) p_o e^{i\omega(t-r/c)} \vec{u}_\theta \quad (\text{B.12})$$

soit en notation réelle au niveau macroscopique :

$$\vec{E}_e(\vec{r}, t) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{1}{rc^2} \frac{\partial^2 P(t-r/c)}{\partial t^2} \sin(\theta) \vec{u}_\theta \quad (\text{B.13})$$

$$\text{soit } E(r, t) \propto \frac{\partial^2 P(t-r/c)}{\partial t^2}. \quad (\text{B.14})$$



# Annexe C

## Protocoles

### C.1 Culture des bactéries *Halobacterium salinarium* et purification des membranes pourpres

Les conditions de culture et de purifications suivent le protocole décrit par Oesterhelt et coll. [86]. La souche R1 de *Halobacterium salinarium* (obtenue auprès de l'IGM, Université d'Orsay), se développe dans des conditions de forte salinité et exprime la bactériorhodopsine en microaérobie et sous illumination. La composition du milieu (NaCl : 250 g/L, MgSO<sub>4</sub> : 20 g/L, citrate de trisodium : 3 g/L, KCl : 2 g/L, peptone bactériologique : 10 g/L) est spécifique aux espèces halophiles extrêmes. Avant inoculation, le milieu est stérilisé sur filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  (Stéricup, Millipore). Des cultures de 75 mL, dans des erlenmeyers de 250 mL, sont placées à 39°C, sous agitation (200 rpm) et forte illumination. La bactériorhodopsine s'exprimant préférentiellement dans la phase stationnaire, les cultures sont effectuées sur 3 à 4 semaines. Les bactéries sont recueillies par centrifugation à 10000 G pendant 15 minutes.

La purification s'effectue en 3 étapes : lyse des bactéries par choc osmotique et action mécanique, lavage des membranes, séparation des types membranaires par centrifugation en gradient de densité.

1. Lyse des bactéries par choc osmotique et action mécanique. Les culots bactériens sont resuspendus dans le tampon 1 (NaCl : 250 g/L, MgSO<sub>4</sub> : 20 g/L, citrate de trisodium : 3 g/L, KCl : 2 g/L), 125 mL par litre de culture. Puis, cette suspension est mise à dialyser la nuit contre le tampon 2 (NaCl 0,1 M soit environ 6 g/L) et DNase (50 mg). Ce changement de pression osmotique brutal va provoquer l'éclatement des bactéries. Le lysat est ensuite centrifugé 40 minutes à 40000 G. Afin de s'assurer de l'efficacité de la lyse, les culots sont resuspendus dans le tampon 2 à l'aide d'un homogénéisateur à piston, ou potter, puis à nouveau centrifugés. Ces étapes sont renouvelées jusqu'à ce que le surnageant soit incolore (en pratique 2 à 3 fois).

2. Lavage des membranes. Les membranes sont alors lavées deux à trois fois dans de l'eau déionisée et finalement resuspendues dans un petit volume d'eau.

3. Séparation des types membranaires par centrifugation en gradient de densité. Afin de séparer les membranes rouges, contenant les caroténoïdes, des membranes pourpres, contenant la bactériorhodopsine, cette solution est déposée sur un gradient linéaire de 30 % à 50 % avec un 'coussin' à 60 % de saccharose et centrifugée 17 heures à 100000 G (photo 3.1 du chapitre 3).

## C.2 Echantillons déposés dans des gels d'acrylamide

La composition des gels est décrite dans [91]. Les récipients contenant les gels sont composés de lamelles de microscope collées afin d'obtenir des épaisseurs de gel de 1 mm. La solution de polyacrylamide contient 7.9% d'acrylamide, 0.2% de bisacrylamide et 0.03% de tétraméthylammonium, 0.04 M Tris et 70 unités de membrane pourpre à pH 7, où 1 unité=1 mL de suspension, densité optique de 1 /cm. Après ajout de 0.024% de persulfate d'ammonium, la solution versée dans les récipients polymérise pendant 1 heure avant utilisation. Une des deux lamelles de microscope est enlevée afin de permettre une excitation directe par les impulsions laser dans l'expérience pompe sonde (chapitre 3).

# Annexe D

## Applications biotechnologiques de la bactériorhodopsine

La bactériorhodopsine est une protéine très intéressante pour des applications biotechnologiques. Deux propriétés intrinsèques sont utilisées : le photocycle et le déplacement de charges photoinduit.

Se reporter aux chapitres 1 et 3 pour les notations des photoproduits.

### D.1 Protection de papiers officiels

Des chercheurs allemands ont développé un procédé permettant de sécuriser les papiers officiels et billets de banque [131]. Ils ont utilisé de la bactériorhodopsine modifiée afin de prolonger le temps de vie de l'état M (photoproduit de la bactériorhodopsine, chapitre 1). Suite à un éclairage lumineux, la bactériorhodopsine va changer de conformation et passer du violet (état fondamental) au jaune (état M). Le retour dans l'état fondamental n'aura lieu qu'en éloignant la source lumineuse. Ainsi les documents recouverts d'une telle encre seront facilement détectables par leur changement de couleur photoinduit.

### D.2 Stockage de données : mémoire holographique

Les mémoires holographiques permettent d'enregistrer des données dans un volume tridimensionnel, permettant à la fois d'augmenter la rapidité et la capacité de stockage [132]. Une méthode prometteuse [133] permet le stockage de données dans un matériau de bactériorhodopsine en phase aqueuse. Les solutions sont contenues dans des cuvettes et orientées sous champ électrique. Le principe de base est d'exciter l'échantillon avec deux lasers orthogonaux, définissant un volume dans l'échantillon.

Pendant la phase d'écriture, deux lasers centrés à 1140 nm sont utilisés pour exciter la bactériorhodopsine au départ dans son état fondamental bR. Suite à l'excitation lumineuse, la bactériorhodopsine passe dans l'état M qui dure pour quelques millisecondes avant de revenir dans l'état fondamental. La stabilité de cet état peut être augmentée par modification génétique. En contrôlant l'intensité excitatrice, des volumes contiennent un ratio bR : M de 6 : 4 (bits 0) et d'autres un ratio 4 : 6 (bits 1).

Pour la phase de lecture, quatre lasers sont utilisés : deux centrés à 1140 nm qui exciteront l'état bR pour peupler l'état M et deux centrés à 820 nm conduisant la réaction de M vers bR. La tension détectée aux bornes de l'échantillon sera modifiée avec le sens de la réaction  $bR \rightleftharpoons M$  (paragraphe 1.4) ; cette caractéristique va permettre de savoir si la majorité des protéines étaient dans l'état M (bits 1) ou dans l'état bR (bits 0).

La phase de lecture est critique, en particulier à cause du changement d'indice de réfraction de la bactériorhodopsine suite à une illumination qui, bien que très faible, peut produire des microlentilles dans le matériau qui va réfracter la lumière et entraîner des imprécisions sur les emplacements des volumes irradiés.

### D.3 Papier et encre électronique

Sous l'effet d'un fort champ électrique, une bactériorhodopsine modifiée génétiquement peut changer d'état et passer de la couleur violette à jaune. En plaçant un film de bactériorhodopsine entre deux plaques transparentes sur lesquelles est appliqué un maillage d'électrodes, il est possible d'appliquer des voltages appropriés en certains points du film et ainsi de faire apparaître des lettres.

### D.4 Photodétection et vision artificielle

La bactériorhodopsine peut être utilisée comme photodétecteur rapide. Le principe utilisé est le déplacement de charges dans la bactériorhodopsine suite à une excitation lumineuse. Afin de pouvoir détecter directement un photocourant, il est nécessaire de transformer la tension détectée en utilisant une jonction bactériorhodopsine-semiconducteur [134, 135]. L'utilisation de la bactériorhodopsine comme photodétecteur ouvre des pistes intéressantes de détection d'objets en temps réel [134].

En utilisant des bactériorhodopsines modifiées, il est même envisageable de pouvoir obtenir des reconnaissances de couleur [136].

# Bibliographie

- [1] B. ALBERTS, D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, et J. D. WATSON, *Biologie moléculaire de la cellule*, 3<sup>ème</sup> édition, Médecine-Sciences Flammarion, 1986.
- [2] K. BRYL, Visual and archaeal rhodopsins : similarities, differences and controversy, *Cellular and Molecular Biology Letters* **8**, 285 (2003).
- [3] I. M. PEPE, Recent advances in our understanding of rhodopsin and phototransduction, *Prog. Ret. Eye Res.* **20**, 733 (2001).
- [4] I. PROVENCIO, I. R. RODRIGUEZ, G. JIANG, W. P. HAYES, E. F. MOREIRA, et M. D. ROLLAG, A novel human opsin in the inner retina, *The journal of Neuroscience* **20**, 600 (2000).
- [5] J. K. LANYI, Bacteriorhodopsin, *Int. Rev. Cytol.* **187**, 161 (1999).
- [6] J. NATHANS, Rhodospin : structure, function, and genetics, *Biochemistry* **31**, 4923 (1992).
- [7] K. PALCZEWSKI, T. KUMASAKA, T. HORI, C. A. BEHNKE, H. MOTOSHIMA, B. A. FIX, I. LE TRONG, D. C. TELLER, T. OKADA, R. E. STENKAMP, M. YAMAMOTO, et M. MIYANO, Crystal structure of rhodopsin : a G protein-coupled receptor, *Science* **289**, 739 (2000).
- [8] D. S. KLIGER et E. L. MENGER, Vision : an overview, *Acc. of Chem. Res.* **8**, 81 (1975).
- [9] T. D. LAMB et E. N. PUGH JR, Dark adaptation and the retinoid cycle of vision, *Prog. Ret. Eye Res.* **23**, 307 (2004).
- [10] D. M. HUNT, K. S. DULAI, J. C. PARTRIDGE, P. COTTRILL, et J. K. BOWMAKER, The molecular basis for spectral tuning of rod visual pigments in deep-sea fish, *J. of Exp. Bio.* **204**, 3333 (2001).
- [11] I. LUTZ, A. SIEG, A. WEGENER, M. ENGELHARD, I. BOCHE, M. OTSUKA, D. OESTERHELT, J. WACHTEITL, et W. ZINTH, Primary reactions of sensory rhodopsins, *PNAS* **98**, 962 (2001).
- [12] J. SASAKI et J. L. SPUDICH, Proton circulation during the photocycle of sensory rhodopsin II, *Biophys. J.* **77**, 2145 (1989).
- [13] G. VARO et J. K. LANYI, Photoreactions of bacteriorhodopsin at acid pH, *Biophys. J.* **56**, 1143 (1989).

- [14] J. K. LANYI, X-Ray cristallography of bacteriorhodopsin and its photointermediates : insights into the mechanism of proton transport, *Biochem. (Moscow)* **66**, 1192 (2001).
- [15] E. PEBAY-PEYROULA, G. RUMMEL, J. P. ROSENBUSCH, et E. LANDAU, High resolution X-ray structure of bacteriorhodopsin from microcrystals grown in lipidic cubic phases, *Science* **277**, 1676 (1997).
- [16] R. HENDERSON et P. N. UNWIN, Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy, *Nature* **257**, 28 (1975).
- [17] N. GRIGORIEFF, T. CESKA, K. H. DOWNING, J. M. BALDWIN, et R. HENDERSON, Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin, *J. Mol. Biol.* **259**, 393 (1996).
- [18] B. S. HUDSON et R. R. BIRGE, Angular orientation of the retynil chromophore of Bacteriorhodopsin : reconciliation of  $^2\text{H}$  NMR and optical measurements, *J. Phys. Chem. A* **103**, 2274 (1998).
- [19] G. S. HARBINSON, S. O. SMITH, J. A. PARDOEN, C. WINKEL, J. LUGTENBERG, J. HERZFELD, R. A. MATHIES, et R. G. GRIFFIN, Dark-adapted bacteriorhodopsin contains 13-cis, 15-syn and all-trans, 15-anti retinal Schiff bases, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **81**, 1706 (1984).
- [20] J. W. PETRICH, J. BRETON, J.-L. MARTIN, et A. ANTONETTI, Femtosecond absorption spectroscopy of light-adapted and dark-adapted bacteriorhodopsin, *Chem. Phys. Lett.* **137**, 369 (1987).
- [21] R. A. MATHIES, C. H. BRITO CRUZ, W. T. POLLARD, et C. V. SHANK, Direct observation of the femtosecond excited state cis-trans isomerization of bacteriorhodopsin, *Science* **240**, 777 (1988).
- [22] J. DOBLER, W. ZINTH, W. KAISER, et D. OESTERHELT, Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.* **144** (1988).
- [23] J. HERBST, K. HEYNE, et R. DILLER, Femtosecond infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin chromophore isomerization, *Science* **297**, 822 (2002).
- [24] W. KÜHLBRANDT, Bacteriorhodopsin — the movie, *Nature* **406**, 569 (2000).
- [25] R. GONZALEZ-LUQUE, M. GARAVELLI, F. BERNARDI, M. MERCHAN, M. A. ROBB, et M. OLIVUCCI, Computational evidence in favor of a two-state, two-mode model of the retinal chromophore photoisomerization, *PNAS* **97**, 9379 (2000).
- [26] R. A. MATHIES et L. STRYER, Retinal has a highly dipolar vertically excited singlet state : implications for vision, *PNAS* **73**, 2169 (1976).
- [27] L. SALEM, The sudden polarization effect and its possibl role in vision, *Acc. of Chem. Res.* **12**, 87 (1979).

- [28] A. LEWIS, The molecular mechanism of excitation in visual transduction and bacteriorhodopsin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**, 549 (1978).
- [29] K. C. HASSON, F. GAI, et P. A. ANFINRUD, The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin : Experimental evidence for a three-state model, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**, 15124 (1996).
- [30] W. HUMPHREY, H. LU, I. LOGUNOV, H. WERNER, et K. SCHULTEN, Three electronic state model of the primary phototransformation of bacteriorhodopsin, *Biophys. J.* **75**, 1689 (1998).
- [31] H. ABRAMCZYK, Femtosecond primary events in bacteriorhodopsin and its retinal modified analogs : revision of commonly accepted interpretation of electronic spectra of transient intermediates in the bacteriorhodopsin photocycle, *J. Chem. Phys.* **120**, 11120 (2004).
- [32] A. AHARONI, B. HOU, N. FRIEDMAN, M. OTTOLENGHI, I. ROUSSO, S. RUHMAN, M. SHEVES, T. YE, et Q. ZHONG, Non-isomerizable artificial pigments : implications for the primary light-induced events in bacteriorhodopsin, *Biochem. (Moscow)* **66**, 1210 (2001).
- [33] A. AHARONI, M. OTTOLENGHI, et M. SHEVES, Light-induced hydrolysis and rebinding of nonisomerizable bacteriorhodopsin pigment, *Biophys. J.* **82**, 2617 (2002).
- [34] B. HOU, N. FRIEDMAN, S. RUHMAN, M. SHEVES, et M. OTTOLENGHI, Ultrafast spectroscopy of the protonated Schiff bases of free and C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub> locked retinals, *J. Phys. Chem. B* **105**, 7042 (2001).
- [35] T. YE, N. FRIEDMAN, Y. GAT, G. H. ATKINSON, M. SHEVES, M. OTTOLENGHI, et S. RUHMAN, On the nature of the primary light-induced events in Bacteriorhodopsin : ultrafast spectroscopy of the native and C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub> locked pigments, *J. Phys. Chem. B* **103**, 5122 (1999).
- [36] Q. ZHONG, S. RUHMAN, et M. OTTOLENGHI, Reexamining the primary light-induced events in bacteriorhodopsin using a synthetic C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub> locked chromophore, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 12828 (1996).
- [37] H. J. POLLAND, M. A. FRANZ, W. ZINTH, W. KAISER, E. KÖLLING, et D. OESTERHELT, Optical picosecond studies of bacteriorhodopsin containing a sterically fixed retinal, *Biochimica et Biophysica Acta* **767**, 635 (1984).
- [38] D. OESTERHELT, L. SCHUMMAN, et H. GRUBER, Light-dependent reaction of bacteriorhodopsin with hydroxylamine in cell suspensions of *Halobacterium salinarum* : demonstration of an apo-membrane, *FEBS Letters* **44**, 257 (1974).
- [39] I. ROUSSO, E. KHACHATRYAN, Y. GAT, I. BRODSKY, M. OTTOLENGHI, M. SHEVES, et A. LEWIS, Microsecond atomic force sensing of protein conformational dynamics : Implications for the primary light-induced events in bacteriorhodopsin, *PNAS* **94**, 7937 (1997).

- [40] J. Y. HUANG, A. LEWIS, et T. H. RASING, Second-harmonic generation from Langmuir-Blodgett films of retinal and retinal Schiff bases, *J. Phys. Chem.* **92**, 1756 (1988).
- [41] J. Y. HUANG, Z. CHEN, et A. LEWIS, Second-harmonic generation in purple membrane-poly(vinyl alcohol) films : probing the dipolar characteristics of the bacteriorhodopsin chromophore in bR570 and M412, *J. Phys. Chem.* **93**, 3314 (1989).
- [42] Z. CHEN, M. SHEVES, A. LEWIS, et O. BOUEVITCH, A comparison of the second harmonic generation from light-adapted, dark-adapted, blue, and acid purple membrane, *Biophys. J.* **67**, 1155 (1994).
- [43] U. ZADOK, A. KHATCHATOURIANTS, A. LEWIS, M. OTTOLENGHI, et M. SHEVES, Light-induced redistribution in the retinal chromophore is required for initiating the Bacteriorhodopsin photocycle, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 11844 (2002).
- [44] M. GARAVELLI, C. S. PAGE, P. CELANI, M. OLIVUCCI, W. E. SCHMID, S. A. TRUSHIN, et W. FUSS, Reaction path of a sub-200 fs photochemical electrocyclic reaction, *J. Phys. Chem. A* **105**, 4458 (2001).
- [45] M. GARAVELLI, F. NEGRI, et M. OLIVUCCI, Initial Excited-State Relaxation of the Isolated 11-cis Protonated Schiff Base of Retinal : Evidence for in-Plane Motion from ab Initio Quantum Chemical Simulation of the Resonance Raman Spectrum, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1023 (1999).
- [46] M. BEN-NUN, F. MOLNAR, K. SCHULTEN, et T. J. MARTÍNEZ, The role of intersection topography in bond selectivity of cis-trans photoisomerization, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **99**, 1769 (2002).
- [47] S. HAYASHI, E. TAJKHORSHID, et K. SCHULTEN, Molecular dynamics simulation of Bacteriorhodopsin's photoisomerization using ab initio forces for the excited chromophore, *Biophys. J.* **85**, 1440 (2003).
- [48] D. XU, C. MARTIN, et K. SCHULTEN, Molecular dynamics study of early picosecond events in the bacteriorhodopsin photocycle : dielectric response, vibrational cooling and the J, K intermediates, *Biophys. J.* **70**, 453 (1996).
- [49] J. T. M. KENNIS, D. S. LARSEN, K. OHTA, M. T. FACCIOTTI, R. M. GLAESER, et G. R. FLEMING, Ultrafast protein dynamics of bacteriorhodopsin probed by photon echo and transient absorption spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* **106**, 6067 (2002).
- [50] G. I. GROMA, J. HEBLING, C. LUDWIG, et J. KUHL, Charge displacement in bacteriorhodopsin during the forward and reverse bR-K transition, *Biophys. J.* **69**, 2060 (1995).
- [51] G. VARO et L. KESZTHELYI, Photoelectric signals from dried oriented purple membranes of Halobacterium Halobium, *Biophys. J.* **43**, 47 (1983).
- [52] L. KESZTHELYI et P. ORMOS, Electric signals associated with the photocycle of bacteriorhodopsin, *FEBS Letters* **109**, 189 (1980).

- [53] J. XU, A. STICKRATH, P. BATTACHARYA, J. NEES, G. VARO, J. HILLEBRECHT, L. REN, et R. BIRGE, Direct measurement of the photoelectric response time of bacteriorhodopsin via electro-optic sampling, *Biophys. J.* **85**, 1128 (2003).
- [54] S. SCHENKL, Influence of the protein environment on spectroscopy and ultrafast dynamics of retinal in bacteriorhodopsin, *Thèse Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne* (2004).
- [55] S. SCHENKL, F. VAN MOURIK, G. VAN DER ZWAN, S. HAACKE, et M. CHERGUI, Probing the ultrafast charge translocation of photoexcited retinal in bacteriorhodopsin, *Science* **309**, 917 (2005).
- [56] J. L. OUDAR et D. S. CHEMLA, Hyperpolarizabilities of the nitroanilines and their relations to the excited state dipole moment, *J. Chem. Phys.* **66**, 2664 (1977).
- [57] N. J. BONVALET, A. AND, V. BERGER, A. MIGUS, J.-L. MARTIN, et M. JOFFRE, Femtosecond infrared emission resulting from coherent charge oscillations in quantum wells, *Phys. Rev. Lett.* **76**, 4392 (1996).
- [58] M.-L. GROOT, M. H. VOS, I. SCHLICHTING, F. VAN MOURIK, J.-C. LAMBRY, et J.-L. MARTIN, Coherent infrared emission from myoglobin crystals : an electric field measurement, *Prot. Nat. Acad. Sci. USA* **99**, 1323 (2001).
- [59] P. BUTCHER et D. COTTER, *The elements of nonlinear optics*, Cambridge studies in modern optics, Cambridge University Press, 1990.
- [60] A. BONVALET, Spectroscopie infrarouge femtoseconde : étude, développement et applications, *Laser et Matière* (1997).
- [61] H. R. HERTZ, Die Prinzipien der Mechanik, *Gesammelte Werke*, Leipzig, Barth, III (1894).
- [62] D. H. AUSTON, Picosecond optoelectronic switching and gating in silicon, *Appl. Phys. Lett.* **26**, 101 (1975).
- [63] B. I. GREENE, J. F. FEDERICI, D. R. DYKAAR, R. R. JONES, et P. H. BUCKSBAUM, Interferometric characterization of 160 fs far-infrared light pulses, *Appl. Phys. Lett.* **59**, 893 (1991).
- [64] S. E. RALPH et D. GRISCHKOWSKY, THz spectroscopy and source characterization by optoelectronic interferometry, *Appl. Phys. Lett.* **60**, 1070 (1992).
- [65] K. H. YANG, P. L. RICHARDS, et Y. R. SHEN, Generation of far-infrared radiation by picosecond light-pulses in LiNbO<sub>3</sub>, *Appl. Phys. Lett.* **19**, 320 (1971).
- [66] A. BONVALET et M. JOFFRE, Femtosecond laser pulses, Springer, Claude Rullière (1998).
- [67] G. MOUROU, C. V. STANCAMPIANO, A. ANTONETTI, et A. ORSZAG, Picosecond microwave pulses generated with a subpicosecond laser driven semiconductor switch, *Appl. Phys. Lett.* **39**, 284 (1981).
- [68] C. FATTINGER et D. GRISCHKOWSKY, Terahertz beams, *Appl. Phys. Lett.* **54**, 490 (1989).

- [69] G. I. GROMA, A. COLONNA, J.-C. LAMBRY, J. W. PETRICH, G. VARO, M. JOFFRE, M. H. VOS, et J.-L. MARTIN, Resonant optical rectification in bacteriorhodopsin, *Prot. Nat. Acad. Sci. USA* **101**, 7971 (2004).
- [70] M. JOFFRE, *Optique non-linéaire*, Ecole Polytechnique (2003).
- [71] Q. WU, T. D. HEWITT, et X. C. ZHANG, Two-dimensional electro-optic imaging of THz beams, *Appl. Phys. Lett.* **69**, 1026 (1996).
- [72] R. L. SUTHERLAND, *Handbook of nonlinear optics*, Marcel dekker, Inc., 1996.
- [73] M. JOFFRE, A. BONVALET, A. MIGUS, et J.-L. MARTIN, Femtosecond diffracting Fourier-transform infrared interferometer, *Opt. Lett.* **21**, 964 (1996).
- [74] M. S. PSHENICHNIKOV, W. P. DE BOEIJ, et D. A. WIERSMA, Generation of 13-fs, 5-MW, pulses from a cavity-dumped Ti :sapphire laser, *Opt. Lett.* **19**, 572 (1994).
- [75] D. MESCHEDE, *Optics, light and lasers*, Wiley-Vch Verlag, 1999.
- [76] R. L. FORK, O. E. MARTINEZ, et J. P. GORDON, Negative dispersion using a pair of prisms, *Opt. Lett.* **9**, 150 (1984).
- [77] D. SPENCE, P. KEAN, et W. SIBBETT, 60-fs pulse generation from a self modelocked Ti-sapphire laser, *Opt. Lett.* **16**, 42 (1991).
- [78] T. BRABEC, C. SPIELMAN, P. F. CURLEY, et F. KRAUSZ, Kerr-lens modelocking, *Opt. Lett.* **17**, 1292 (1992).
- [79] D. STRICKLAND et G. MOUROU, Compression of amplified chirped optical pulses, *Opt. Commun.* , 219 (1985).
- [80] O. E. MARTINEZ, 3000 times grating compressor with positive group velocity dispersion : application to fiber compenstion in 1.3-1.6  $\mu\text{m}$  region, *IEEE Journal of Quantum Electronics* **23**, 59 (1987).
- [81] R. R. ALFANO et S. L. SHAPIRO, Emission in the region 4000-7000 A via four-photon coupling in nglass, *Phys. Rev. Lett.* **24**, 584 (1970).
- [82] A. SHIRAKAWA et T. KOBAYASHI, Noncollinearly phase-matched femtosecond optical parametric amplification with a 2000  $\text{cm}^{-1}$  bandwidth, *Appl. Phys. Lett.* **72**, 147 (1998).
- [83] V. KRYLOV, O. OLLIKAINEN, J. GALLUS, U. WILD, A. REBANE, et A. KALINSTEV, Efficient noncollinear parametric amplification of weak femtosecond pulses in the visible and near-infrared spectral range, *Opt. Lett.* **23**, 100 (1998).
- [84] G. CERULLO, M. NISOLI, S. STAGIRA, et S. DE SILVESTRI, Sub-8-fs pulses from an ultrabroadband optical parametric amplifier in the visible, *Opt. Lett.* **23**, 1283 (1998).
- [85] SNLO, SNLO Nonlinear optics code available from A. V. Smith, Sandia National Laboratories, Albuquerque, NM 87185-1423, <http://www.sandia.gov/imrl/XWEB1128/xxtal.html> .

- [86] D. OESTERHELT et W. STOECKENIUS, Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane, *Methods in enzymology*, 667 (1974).
- [87] L. KESZTHELYI, Orientation of membrane fragments by electric field, *Biochimica et Biophysica Acta* **598**, 429 (1980).
- [88] G. I. GROMA, L. KELEMEN, A. KULCSAR, M. LAKATOS, et G. VARO, Photocycle of dried acid purple form of Bacteriorhodopsin, *Biophys. J.* **81**, 3432 (2001).
- [89] G. VARO et J. K. LANYI, Distorsions in the photocycle of bacteriorhodopsin at moderate dehydration, *Biophys. J.* **59**, 313 (1991).
- [90] R. KORENSTEIN et B. HESS, Hydration effects on cis-trans isomerization of bacteriorhodopsin, *FEBS Letters* **82**, 7 (1977).
- [91] P. C. MOWERY, R. H. LOZIER, Q. CHAE, Y.-W. TSENG, M. TAYLOR, et W. STOECKENIUS, Effect of acid pH on the absorption spectra and photoreactions of bacteriorhodopsin, *Biochem.* **18**, 4100 (1979).
- [92] V. BALOGH-NAIR, J. D. CARRIKER, B. HONIG, V. KAMAT, M. G. MOTTO, K. NAKANISHI, R. SHEN, M. SHEVES, M. A. TANIS, et K. TSUJIMOTO, The 'opsin shift' in bacteriorhodopsin : Studies with artificial bacteriorhodopsins, *Photochem. Photobiol.* **33**, 483 (1981).
- [93] S. SCHENKL, E. PORTUONDO, G. ZGRABLIC, M. CHERGUI, W. SUSKE, M. DOLDER, E. M. LANDAU, et S. HAACKE, Compositional heterogeneity reflects partial dehydration in three-dimensional crystals of bacteriorhodopsin, *J. Mol. Biol.* **329**, 711 (2003).
- [94] T. MOGI, L. J. STERN, T. MARTI, B. H. CHAO, et G. H. KHORANA, Aspartic acid substitutions affect proton translocation by bacteriorhodopsin, *Prot. Nat. Acad. Sci. USA* **85**, 4148 (1988).
- [95] H. OHTANI, T. KOBAYASHI, J. IWAI, et A. IKEGAMANI, Picosecond and nanosecond spectroscopies of the photochemical cycles of acidified bacteriorhodopsin., *Biochem.* **25**, 3356 (1986).
- [96] A. COLONNA, G. GROMA, et M. VOS, Retinal isomerization dynamics in dry bacteriorhodopsin films, *Chem. Phys. Lett.*, sous presse (2005).
- [97] J.-L. MARTIN et M. H. VOS, Femtosecond measurements of geminate recombination in heme proteins, *Methods in Enzymology* **232**, 416 (1994).
- [98] T. KOBAYASHI, M. TERAUCHI, T. KOUYAMA, M. YOSHIKAWA, et M. TAIJI, Femtosecond spectroscopy of acidified and neutral bacteriorhodopsin, *SPIE laser Applications in Life Science* **1403**, 407 (1990).
- [99] S. L. LOGUNOV, M. A. EL-SAYED, L. SONG, et J. K. LANYI, Photoisomerization quantum yield and apparent energy content of the K intermediate in the photocycles of

- bacteriorhodopsin, its mutants D85N, R82Q, and D212N, and deionized blue bacteriorhodopsin, *J. Phys. Chem.* **100**, 2391 (1996).
- [100] J. WANG, S. LINK, C. D. HEYES, et M. A. EL-SAYED, Comparison of the dynamics of the primary events of bacteriorhodopsin in its trimeric and monomeric states, *Biophys. J.* **83**, 1557 (2002).
- [101] G. VARO et J. K. LANYI, Pathways of the rise and decay of the M photointermediate(s) of Bacteriorhodopsin, *Biochem.* **29**, 2241 (1990).
- [102] S. L. LOGUNOV, L. SONG, et M. A. EL-SAYED, pH Dependence of the Rate and Quantum Yield of the Retinal Photoisomerization in Bacteriorhodopsin, *J. Phys. Chem.* **98**, 10674 (1994).
- [103] S. J. DOIG, P. J. REID, et R. A. MATHIES, Picosecond Time-resolved Resonance Raman Spectroscopy of Bacteriorhodopsin-J, Bacteriorhodopsin-K, Bacteriorhodopsin-KL Intermediates, *J. Phys. Chem.* **95**, 6372 (1991).
- [104] M. ROHR, W. GARTNER, G. SCHWEITZER, et S. E. BRASLAUVSKY, Quantum yield of the photochromic equilibrium between bacteriorhodopsin and its bathointermediate K. Femto- and nanosecond optoacoustic spectroscopy., *J. Phys. Chem.* **96**, 6055 (1992).
- [105] C. GERGELY, L. ZIMANYI, et G. VARO, Bacteriorhodopsin intermediate spectra determined over a wide pH range., *J. Phys. Chem.B* **101**, 9390 (1997).
- [106] J. TITTOUR et D. OESTERHELT, The quantum yield of bacteriorhodopsin, *FEBS Letters* **263**, 269 (1990).
- [107] J. WANG, Vectorially oriented purple membrane : characterization by photocurrent measurement and polarized-Fourier transform infrared spectroscopy, *Thin Solid Films* **379**, 224 (2000).
- [108] M. MÉTHOT, F. BOUCHER, C. SALESSE, M. SUBIRADE, et M. PÉZOLET, Determination of bacteriorhodopsin orientation in monolayers by infrared spectroscopy, *Thin Solid Films* **284-285**, 627 (1996).
- [109] M. JOFFRE, Coherent effects in femtosecond spectroscopy, in *Femtosecond laser pulses*, edited by C. RULLIÈRE, volume 9, pp. 261–284, Springer, 1998.
- [110] S. MUKAMEL, *Principles of Nonlinear Optical Spectroscopy*, Oxford University Press, New York, 1995.
- [111] G. I. GROMA, M. VOS, et J.-L. MARTIN, Theory of resonant optical rectification in bacteriorhodopsin, *en préparation* .
- [112] V. F. KAMALOV, T. M. MASCIANGIOLI, et M. A. EL-SAYED, Homogeneous line width of the different vibronic bands of retinal absorption in bacteriorhodopsin by the hole-burning technique, *J. Phys. Chem.* **100**, 2762 (1996).
- [113] W. T. POLLARD, S. L. DEXHEIMER, Q. WANG, L. A. PETEANU, C. V. SHANK, et R. A. MATHIES, Theory of dynamic absorption spectroscopy of nonstationary states.

4. Application to 12-fs resonant impulsive Raman spectroscopy of bacteriorhodopsin, *J. Phys. Chem.* **96**, 6147 (1992).
- [114] T. KOBAYASHI, T. SAITO, et H. OHTANI, Real-time spectroscopy of transition states in bacteriorhodopsin during retinal isomerization, *Nature* **414**, 531 (2001).
- [115] B. CURRY, A. BROEK, J. LUGTENBURG, et R. A. MATHIES, Vibrational analysis of all-trans retinal, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 5274 (1982).
- [116] E. L. TERPUGOV et O. V. DEGTYAREVA, FTIR emission spectra of bacteriorhodopsin in a vibrational excited state, *Biochemistry (Moscow)* **66**, 1315 (2001).
- [117] S. J. SMITH, J. A. PARDOEN, J. LUGTENBURG, et R. A. MATHIES, Vibrational analysis of the 13-cis-retinal chromophore in dark adapted bacterio-rhodopsin, *J. Phys. Chem.* **91**, 804 (1987).
- [118] G. H. ATKINSON, L. UJI, et Y. ZHOU, Vibrational spectrum of the J-625 intermediate in the room temperature bacteriorhodopsin photocycle, *J. Phys. Chem. A* **104**, 4130 (2000).
- [119] R. VENKATRAMANI et S. MUKAMEL, Dephasing-induced vibronic resonances in difference frequency generation spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* **109**, 8132 (2005).
- [120] G. I. GROMA, A. COLONNA, M. JOFFRE, M. H. VOS, et J.-L. MARTIN, *Resonant optical rectification. Theory and application to bacteriorhodopsin*, Transient structure in dense media, Paris, France, 2005.
- [121] W. H. PRESS, B. P. FLANNERY, S. A. TEUKOLSKY, et W. T. VETTERLING, *Numerical recipes in C*, The art of scientific computing, Cambridge university press, 1990.
- [122] S. L. DEXHEIMER, Q. WANG, L. A. PETEANU, W. T. POLLARD, R. A. MATHIES, et C. V. SHANK, Femtosecond impulsive excitation of nonstationary vibrational states in bacteriorhodopsin, *Chem. Phys. Lett.* **188** (1992).
- [123] B. HOU, N. FRIEDMAN, M. OTTOLENGHI, M. SHEVES, et S. RUHMAN, Comparing photoinduced vibrational coherences in bacteriorhodopsin and in native and locked retinal protonated Schiff bases, *Chem. Phys. Lett.* **381**, 549 (2003).
- [124] D. W. MCCAMANT, P. KUKURA, et R. A. MATHIES, Femtosecond stimulated Raman Study of excited-state evolution in bacteriorhodopsin, *J. Phys. Chem. B* **109**, 10449 (2005).
- [125] A. C. TERENTIS, L. UJI, H. ABRAMCZYK, et G. H. ATKINSON, Primary events in the bacteriorhodopsin photocycle : torsional vibrational dephasing in the first excited electronic state, *Chem. Phys.* **313**, 51 (2005).
- [126] L. SONG et M. A. EL-SAYED, Primary step in bacteriorhodopsin photosynthesis : bond stretch rather than angle twist of its retinal excited-state structure, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 8889 (1998).

- [127] V. BALOGH-NAIR, J. D. CARRIKER, B. HONIG, V. KAMAT, M. G. MOTTO, K. NAKANISHI, R. SHEN, M. SHEVES, M. A. TANIS, et K. TSUJIMOTO, Protein, lipid and water organization in bacteriorhodopsin crystals : a molecular view of the purple membrane at 1.9 angstroms, *Structure* **7**, 909 (1999).
- [128] S. MALLAT, *A wavelet tour of signal processing*, Scientific Academic Presss, 1998.
- [129] P. WICKRAMARACHI, Effects of Windowing on the Spectral Content of a Signal, *Sound and Vibration* **105**, 10 (2003).
- [130] J. D. JACKSON, *Classical Electrodynamics*, John Wiley and Sons, Inc., third edition edition, 1998.
- [131] B. E. ALLEMAGNE, Un colorant biologique pour lutter contre les faussaires, (27 Août 2003).
- [132] M. HATCHER, Photonics finds a natural solution, *Biophotonics* , 28 (2001).
- [133] R. R. BIRGE, Protein-based three-dimensional memory, *American Scientist* **82**, 348 (1994).
- [134] T. MIYASAKA, K. KOYAMA, et I. ITOH, Quantum conversion and image detection by a bacteriorhodopsin-based artificial photoreceptor, *Science* **255**, 342 (1992).
- [135] C. H. MARTIN, Z. P. CHEN, et R. R. BIRGE, Towards a bacteriorhodopsin-silicon neuromorphic photosensor, 1997.
- [136] M. FRYDRYCH, P. SILFSTEN, S. PARKKINEN, J. PARKKINEN, et T. JAASKELEINEN, Color recognition with bacteriorhodopsin, *Pac. Symp. Biocomput.* , 523 (1998).