



Dynamique conformationnelle de la myoglobine suivie par dichroïsme circulaire résolu temporellement.

Thibault Dartigalongue

► To cite this version:

Thibault Dartigalongue. Dynamique conformationnelle de la myoglobine suivie par dichroïsme circulaire résolu temporellement.. Optique [physics.optics]. Ecole Polytechnique X, 2005. Français. NNT : . pastel-00002115

HAL Id: pastel-00002115

<https://pastel.hal.science/pastel-00002115>

Submitted on 29 Jul 2010

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

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



THÈSE DE DOCTORAT DE PHYSIQUE

Spécialité : Laser et Matière

Présentée par

Thibault DARTIGALONGUE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'ÉCOLE POLYTECHNIQUE

Dynamique conformationnelle de la myoglobine
suivie par dichroïsme circulaire résolu
temporellement

Soutenue le 27 septembre 2005 devant le jury composé de :

Mme	Chantal ANDRAUD	Rapporteur
M.	Thomas GUSTAVSSON	Rapporteur
M.	R.J. Dwayne MILLER	
M.	Jean-Louis MARTIN	
M.	François HACHE	Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire d'Optique et Biosciences à l'Ecole Polytechnique. Je remercie Jean-Louis Martin pour toutes ces longues discussions sémantiques, mais aussi parfois scientifiques, tard le samedi et le dimanche. Ce fut un réel plaisir que de passer ces 3 années au LOB

Merci à Chantal Andraud et Thomas Gustavsson d'avoir accepté la lourde tâche d'écrire un rapport mon manuscrit. Un très grand merci à Dwayne Miller d'avoir suivi mon travail pendant cette dernière année de thèse, et de m'accueillir dans son laboratoire pour mon post-doc.

Je suis infiniment reconnaissant à François Hache de m'avoir permis de travailler avec lui sur le sujet de recherche qui est devenu mon sujet de thèse. Je tire une pleine satisfaction de cette collaboration, tant d'un point de vue scientifique que personnel. François, encore merci pour ta disponibilité, ta qualité d'écoute, et ta gentillesse, mais surtout pour le soutien que tu m'as apporté pendant les moments difficiles...

Je remercie vivement Anny Slama-Schwok, Guilhem Gallot, Michel Négrerie et Maten Vos, pour toutes les discussions passionnantes, suggestions pertinentes. J'ai énormément appris à leurs contacts.

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 Wachtweil and to his group for the time I have spent with them in Francfort.

Merci à l'équipe de Toulouse, Bertrand Girard, Béatrice Chatel et Jean-christophe Delagnes de m'avoir si gentiment accueilli. Leur aide précieuse m'a permis de monter très rapidement ma source laser.

Merci Antigoni Alexandrou, Wafa Amir, Emmanuel Beaurepaire, Nadia Bellabas, Adeline Bonvalet, Thierry Boulesteix, Latifa Bouzahir, Didier Casanova, Simona Cianetti, Anne Colonna, Anthony Colas, Adeline Darmon, 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, Jean-Louis Martin, Jean-Baptiste Masson, Michel Négrerie, Claire Niezborala, Jennifer Ogilvie, Ana-Maria Pena, Eric Pilet, Thomas Polack, Martin-Pierre Sauviat, Marie-Claire Schanne-Klein, Anny Slama-Schwok, Andreea Sodolescu, Mathias Strupler, Willy Supatto, Johanne Treuffet, Cathie Ventalon.

Et maintenant, les mentions spéciales. Un très grand merci à Hugues Mesnil de m'avoir passé le flambeau il y a 4 ans, et d'avoir eu la gentillesse de suivre mon travail. Un grand merci à Wafa Amir, pendant plus de deux ans, nous avons souffert ensemble sur le même système laser, et je la remercie pour sa gentillesse et sa simplicité.

Merci à Marie-Claire et Ana-Maria de m'avoir associé à l'aventure du Collagène...

Un très grand merci à mes proches camarades de thèse, qui sont à présent devenus mes amis, Anne Colonna, Delphine Debarre, Thierry Boulesteix, Eric Pilet, et Clément Gauthier. J'ai partagé énormément de choses avec cette fine équipe. Une pensée particulière pour Anne et Clément, qui ont commencé et fini leur thèse en même temps que moi, nous avons enduré les mêmes épreuves, au même moment, et je les remercie vivement du soutien psychologique qu'ils m'ont apporté pendant ces trois années.

Un grand merci à mes proches amis, Jean-Christophe, Patrick, Christophe, Jacques, Pierre, Sébastien, Sylvain E. , Sylvain R., Blandine, Benoit, Benjamin, Francois ...

Un grand merci à ma famille, Maman, Suzanne, Rémi, Joël... Pour tout... Mais en particulier, pour la relecture de ma thèse, l'organisation de mon pot, et le soutien constant pendant ces vingt-huit dernières années, encore merci !

Table des matières

Introduction	5
1 Le dichroïsme circulaire	7
1.1 L'activité optique	7
1.2 La mesure du dichroïsme circulaire	10
1.3 La chiralité à un électron	12
1.4 Le modèle des oscillateurs couplés	15
1.5 La spectroscopie UV-visible des protéines	18
1.6 Le dichroïsme circulaire résolu temporellement	21
2 La photodissociation de MbCO	25
2.1 L'effet allostérique	25
2.2 Les sondes globales possibles	29
2.2.1 Le mouvement des électrons	29
2.2.2 Le mouvement des noyaux	31
2.2.3 Les sondes structurales	35
3 Un calcul de spectre de CD	39
3.1 Des notions de spectroscopie	39
3.1.1 La force d'oscillateur et les spectres d'absorption	39
3.1.2 La force de rotation et les spectres de dichroïsme circulaire	44
3.2 La théorie de la polarisabilité	47
3.2.1 Le couplage de n chromophores	47
3.2.2 La pseudodiagonalisation	50
3.2.3 La détermination des modes normaux	51
3.2.4 Le calcul de l'absorption	52
3.2.5 La détermination du dichroïsme circulaire	53
3.2.6 Le résumé du calcul	56
3.3 Le couplage de deux chromophores	57
3.3.1 Le cas dégénéré	57
3.3.2 Le cas non dégénéré	61
3.3.3 Le rôle de l'anisotropie	63
3.4 Le dichroïsme circulaire dans la myoglobine	66
3.4.1 Le calcul historique de Woody	66
3.4.2 Les paramètres du système	67
3.4.3 Le calcul des spectres de la myoglobine	70

3.4.4	Les configurations intermédiaires	74
4	L'expérience et les résultats	77
4.1	L'artefact et sa résolution	77
4.1.1	Le dichroïsme circulaire induit	78
4.1.2	La génération de polarisations circulaires	81
4.1.3	La procédure d'alignement	87
4.1.4	D'autres moyens de contrôle de l'artefact	91
4.2	L'expérience visible	93
4.2.1	Le principe	93
4.2.2	Les résultats	100
4.2.3	La discussion	107
4.2.4	L'interprétation	110
4.3	L'expérience dans l'ultra-violet	113
4.3.1	La construction d'un laser UV	113
4.3.2	Les résultats dans le ruthénium trisbipyridyl	120
4.3.3	Les résultats préliminaires dans MbCO	123
5	Les perspectives	127
5.1	L'étude d'autres hémoprotéines	127
5.1.1	Le cytochrome c	127
5.1.2	La guanylate cyclase	128
5.1.3	La protéine HRI	129
5.2	L'expérience dans l'ultraviolet	130
5.2.1	L'étude de MbCO	130
5.2.2	Les expériences modèles de repliement des protéines	131
	Conclusion	136
	Annexes	136
A	Le formalisme tensoriel et la moyenne isotrope	137
B	Le couplage quadripolaire électrique	141
C	Les règles de somme de Thomas-Kuhn-Reiche	143
	Bibliographie	151

Table des figures

1.1	Une illustration de deux énantiomères	7
1.2	La mesure du dichroïsme circulaire	10
1.3	La structure de MbCO et RuTB	11
1.4	Le mouvement électronique hélicoïdal	13
1.5	Le dipôle magnétique effectif	16
1.6	La liaison peptidique	18
1.7	La signature des hélices α et des feuillets β secondaires	21
1.8	Le dichroïsme circulaire résolu temporellement	21
2.1	La myoglobine et l'hémoglobine	26
2.2	L'effet allostérique	27
2.3	Les spectres d'absorption et de CD visibles de MbCO et Mb	30
2.4	Une illustration d'un résultat de transmission transitoire dans MbCO	31
2.5	La figure de diffraction d'un cristal de lysosime	36
2.6	La structure de MbCO 100 ps après la dissociation	37
3.1	La schématisation de deux oscillateurs couplés	57
3.2	La structure excitonique	59
3.3	L'anisotropie dans une base de Tröger	65
3.4	Les résidus aromatiques importants	68
3.5	Les spectres d'absorption et de CD	70
3.6	L'influence d'une rotation de l'histidine proximale	75
3.7	L'importance dynamique des résidus	76
4.1	Le dichroïsme linéaire induit	78
4.2	L'ellipsoïde des indices	83
4.3	La croix noire	87
4.4	Le plan k_x, k_y	89
4.5	Une illustration de l'artefact	90
4.6	La comparaison des résultats obtenus pour les 2 énantiomères	92
4.7	L'effet de la polarisation de la pompe	93
4.8	Le spectre d'un continuum bleu	94
4.9	Le schéma de l'expérience visible	96
4.10	L'évolution du spectre de CD sur une échelle de temps d'une nanoseconde	101
4.11	Les spectres expérimentaux de MbCO et Mb	102
4.12	L'évolution du CD sur une échelle de temps de 100 ps	103
4.13	La comparaison entre l'hémoglobine et la myoglobine	105

4.14	La simulation d'une cinétique à deux temps	107
4.15	Le dichroïsme circulaire anisotrope dans MbCO	108
4.16	La représentation des mouvements de l'histidine proximale	110
4.17	Le schéma de la source laser amplifiée	114
4.18	Le schéma de la source laser ultraviolette	117
4.19	Le spectre des impulsions NOPA+400	119
4.20	Le spectre d'absorption transitoire de RuTB	121
4.21	Le spectre d'absorption de RuTB	121
4.22	Le spectre de CD de RuTB	122
4.23	Le spectre de CD transitoire de RuTB	123
4.24	Le spectre d'absorption transitoire de MbCO dans l'ultraviolet	124
4.25	Une cinétique de photodissociation de MbCO à 222nm	125
5.1	Les spectres de CD du cytochrome c	128
5.2	Les spectres de CD de MbCO et de Mb dans l'UV	130
5.3	La formule de l'azobenzène	131
5.4	Les spectres de CD du système RB100	133
A.1	La définition des angles d'Euler	138

Introduction

Un des grands défis scientifiques actuels est de comprendre la dynamique structurelle des protéines. Il y a plus de cinquante ans, grâce à la diffraction des rayons X, on découvrait la double hélice de l'ADN, et depuis quelques décennies, on trouve de nouvelles structures de protéines chaque jour. Nous avons donc aujourd'hui une connaissance "énorme" de la structure du vivant, mais nous n'avons que très peu de données sur la dynamique de cette dernière.

Cependant, c'est bien en terme de dynamique que se pose une grande partie des problématiques biologiques essentielles. Comment une protéine se replie-t-elle, comment l'information de sa structure tridimensionnelle est-elle intrinsèquement contenue dans l'enchaînement des acides aminés qui la constitue ? Ce problème est tellement complexe que, avec la puissance actuelle des ordinateurs, il n'est pas envisageable de répondre à cette question en utilisant des méthodes de simulation.

En enzymologie, se pose la question de l'effet allostérique : comment la fixation d'un substrat sur une sous-unité à un endroit précis d'une protéine, peut-elle créer une cascade de changements de géométrie ayant pour conséquence l'activation d'une fonction chimique à un autre endroit de la protéine.

Ou bien alors, comment une même protéine peut-elle se retrouver sous deux conformations différentes, l'une pathogène, l'autre non pathogène, et que la forme non pathogène puisse devenir pathogène au contact de la première : c'est le mode de développement de la maladie de Creutzfeld-Jacob.

Le but de ce travail de thèse est de développer une technique permettant de suivre des changements de structure très rapides : le dichroïsme circulaire résolu temporellement. Cette méthode permet d'accéder à des échelles de temps sub-picoseconde. Nous avons appliqué cette technique à l'étude d'une réaction biophysique modèle : la photodissociation de la carboxymyoglobine.

Cette réaction a été très étudiée, avec des méthodes diverses. On dispose actuellement de beaucoup d'informations, y compris sur les toutes premières étapes du mécanisme. On peut donc s'interroger sur la pertinence d'étudier ce système avec une méthode de plus...

L'objectif de ce travail est donc double : il s'agit d'une part de montrer que le dichroïsme circulaire peut apporter des informations conformationnelles nouvelles sur la photodissociation de la carboxymyoglobine, et d'autre part de montrer que cette technique permet effectivement d'observer des changements de conformation très rapides.

- Le **premier chapitre** de ce manuscrit sera consacré à la description du dichroïsme circulaire. Après avoir rappelé les diverses définitions et unités, nous détaillerons les deux modèles à l'origine de l'activité optique, c'est à dire la chiralité à un électron et le modèle des oscillateurs couplés. Nous verrons de plus les signaux de dichroïsme circulaire caractéristiques dans les protéines. Ce chapitre se terminera avec l'explication du principe d'une expérience de dichroïsme circulaire résolu temporellement
- Le but du **deuxième chapitre** est de faire un bilan non exhaustif des connaissances sur la photodissociation de la carboxymyoglobine : dans un premier temps, nous expliquerons dans quelle mesure cette réaction peut modéliser l'effet allostérique dans l'hémoglobine, et dans un deuxième temps, nous présenterons les différentes méthodes utilisées jusqu'à présent pour étudier cette réaction.
- A l'occasion du **troisième chapitre**, nous exposerons une méthode de calcul de dichroïsme circulaire pour un système d'oscillateurs couplés. Après avoir fait le lien entre le monde des opérateurs quantiques et le monde des spectres expérimentaux, nous rappellerons la théorie de la polarisabilité. Nous l'appliquerons tout d'abord au cas simple d'un système constitué de deux chromophores avant de proposer un calcul dans la myoglobine.
- Les expériences et les résultats seront présentés dans le **quatrième chapitre** de ce manuscrit. Nous reviendrons en détail sur l'artefact intrinsèque d'une expérience de dichroïsme circulaire résolu temporellement, avant de présenter les expériences réalisées dans le visible et dans l'ultraviolet.
- Quelques perspectives seront présentées dans le **cinquième chapitre**

Chapitre 1

Le dichroïsme circulaire

1.1 L'activité optique

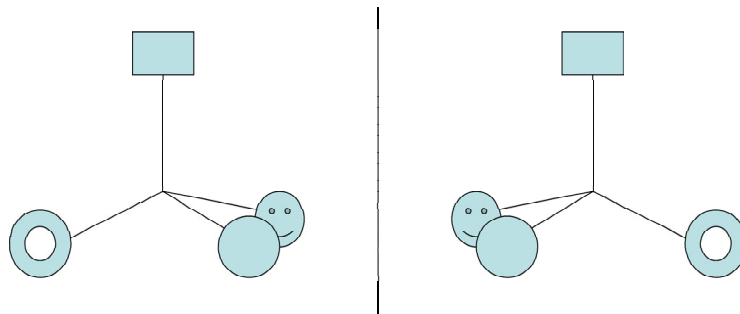


FIG. 1.1 – Une illustration de deux énantiomères

Le terme chiral vient du mot grec "cheiros", qui signifie main. La main droite et la main gauche sont deux objets différents, symétriques l'un par rapport à l'autre. Une molécule est dite chirale si elle n'est pas superposable à son image dans un miroir [1]. Ainsi, les molécules possédant un carbone asymétrique (carbone relié à quatre substituants différents) sont chirales (Fig. 1.1).

Elles existent alors sous 2 formes différentes, image l'une de l'autre dans un miroir. On parle de deux énantiomères nommés Levogyre et Dextrogyre, Gauche et Droite, Γ et Δ , + ou -, etc... La chiralité peut également être visible à une échelle plus grande que le simple atome asymétrique. Ainsi, si l'on considère l'ADN, en forme d'hélice, et que l'on prend son image dans un miroir, on obtient 2 hélices différentes, une gauche et une droite. Dans ce cas, c'est l'arrangement relatif des bases en hélice qui est responsable de la chiralité. La chiralité d'une molécule peut donc s'observer à différentes échelles.

Lorsque l'on considère le champ électromagnétique, il existe plusieurs états de polarisation possibles. Si l'on écrit le champ électrique sous sa forme complexe :

$$\vec{E}e^{-(i\omega t - kz)},$$

les polarisations linéaires, circulaires gauche et droite s'obtiennent pour

$$\vec{E}_{\parallel} = E_0 \vec{x} \quad \vec{E}_{G,D} = \frac{E_0}{\sqrt{2}} (\vec{x} \pm i\vec{y})$$

Les deux ondes polarisées circulaires gauche et droite, sont deux objets chiraux, image l'une de l'autre dans un miroir. On observe en effet que le champ électrique va tourner et décrire une hélice au cours de la propagation. Une molécule chirale peut donc interagir différemment avec une onde polarisée gauche et une onde polarisée droite [2]. On parle alors **d'activité optique**. Les vitesses de propagation de l'onde droite et gauche seront différentes, ainsi que leurs absorptions.

La différence de vitesse de propagation aura pour conséquence le pouvoir rotatoire. Lorsque l'on envoie une onde polarisée linéairement sur un échantillon contenant une solution de molécule chirale, la lumière se décompose en une composante droite et une composante gauche qui ne vont pas à la même vitesse, et qui redonnent après propagation une onde polarisée linéairement, mais dont le plan de polarisation aura tourné d'un angle α .

La différence d'absorption des deux ondes est le dichroïsme circulaire, noté CD [3]. La loi de Beer-Lambert s'écrit :

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-DO} \quad DO = \epsilon.C.L$$

où DO est la densité optique (sans dimension), C est la concentration molaire de l'échantillon en $M = mol.l^{-1}$, et ϵ la constante d'extinction molaire, en $M^{-1}cm^{-1}$.

Le dichroïsme circulaire étant la différence d'absorption, il désigne indistinctement

$$\Delta(DO) = DO_{gauche} - DO_{droite} \quad \Delta(\epsilon) = \epsilon_{gauche} - \epsilon_{droite}$$

Dans la suite, les spectres de CD seront le plus souvent exprimés en $\Delta\epsilon$. Mais il peut être utile à ce niveau d'introduire l'unité de dichroïsme circulaire utilisée par tous les chimistes et biologistes : le millidegré. Il s'agit d'une unité d'angle, mais qui n'a rien à voir avec le pouvoir rotatoire, il s'agit bien de CD ! Si l'on considère une onde linéaire que l'on propage dans un échantillon chiral, en plus de la rotation de polarisation, la polarisation va devenir légèrement elliptique sous l'effet du dichroïsme circulaire. Soit P et E le petit axe et le grand axe de l'ellipse, on a :

$$\tan(CD) = \frac{P}{E}$$

Si maintenant on considère la polarisation linéaire incidente, elle se décompose en une polarisation droite et une polarisation gauche :

$$\vec{E}_{||} = \vec{E}_g + \vec{E}_d$$

Sous l'effet du dichroïsme circulaire, la polarisation à la sortie s'écrit :

$$\vec{E} = G\hat{e}_g + D\hat{e}_d$$

où D et G sont les transmissions en champs, ie $D^2 \propto 10^{-DO_d}$, soit $D \propto 10^{-\frac{DO_d}{2}}$ (idem pour G). Le CD en radian s'écrit

$$CD \approx \tan(CD) = \frac{P}{E} = \frac{G - D}{G + D} \approx \frac{\ln(10)}{4} \Delta DO$$

Finalement le CD en millidegré s'écrit :

$$CD = \frac{180 \ln(10)}{4\pi} 1000. \Delta DO = 32982. \Delta DO$$

Donc un ordre de grandeur typique de $\Delta(DO)$ de 10^{-3} correspond à une valeur de 32,982 mdeg. On introduit alors naturellement l'éllicité spécifique $[\theta]$, de la manière suivante :

$$CD(deg) = [\theta]\hat{C}\hat{L}$$

où les unités employées sont elles loin d'être naturelles : $\hat{C}$ est la concentration massique en g.cm^{-3} , et le trajet optique $\hat{L}$ est cette fois-ci exprimée en dm...

1.2 La mesure du dichroïsme circulaire

Le principe d'une mesure de dichroïsme circulaire est donc de générer une polarisation circulaire gauche, une polarisation circulaire droite, et de mesurer la différence de transmission au travers un échantillon (Fig. 1.2). On dispose d'une source lumineuse accordable. La génération des polarisations se fait habituellement avec un modulateur photo-élastique. La polarisation passe alors de gauche à droite avec une fréquence de 50 kHz. La transmission de l'échantillon est mesurée grâce à un photomultiplicateur. En effectuant une détection synchrone à la fréquence du modulateur, on mesure le dichroïsme circulaire.

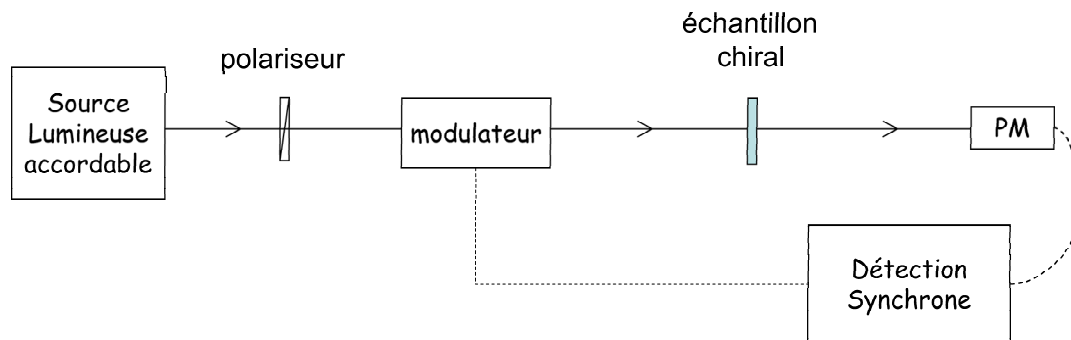


FIG. 1.2 – La mesure du dichroïsme circulaire

Notons PM le signal du photomultiplicateur, LI le signal de la détection synchrone, et I_0 l'intensité lumineuse initiale

$$PM = I_0 \cdot 10^{-DO} \quad LI = \Delta(PM) = \ln(10) \cdot \Delta(DO) \cdot PM \quad \frac{LI}{PM} = \frac{\Delta(DO)}{\ln 10}$$

Donc, après une mesure de référence pour connaître I_0 , une seule mesure permet d'obtenir **simultanément** la densité optique et le dichroïsme circulaire d'un échantillon. Il est alors naturel d'introduire le rapport gyrotropique γ (sans dimension) :

$$\gamma = \frac{\Delta(DO)}{DO} = \frac{\Delta(\epsilon)}{\epsilon}$$

γ a deux avantages : d'une part, il ne dépend plus que de la protéine ou de la molécule d'étude (contrairement à $\Delta(DO)$ qui dépend aussi de la concentration et du trajet optique), et d'autre part, il permet d'exprimer le dichroïsme circulaire par rapport à l'absorption. Dans le visible, γ peut valoir selon les systèmes entre quelques 10^{-4} et quelques 10^{-3} , alors que lorsque l'on descend dans l'UV, il peut valoir de quelques 10^{-3} à 10^{-2} .

Nous donnons (Tab. 1.1) des ordres de grandeur pour γ , évalués au maximum de certaines transitions, pour deux systèmes différents : la carboxymyoglobine (MbCO) et le [ruthénium (1,1) tris-bipyridyl²⁺] (RuTB). Nous avons effectué ces mesures avec un appareil commercial (CD 6 Jobin-Yvon). MbCO et RuTB sont les deux principaux systèmes étudiés lors de ce travail de thèse (Fig. 1.3).

système	λ (nm)	γ
RuTB	420	2.10^{-3}
	276	2.10^{-2}
MbCO	424	3.10^{-4}
	260	$1,5.10^{-3}$
	222	4.10^{-2}

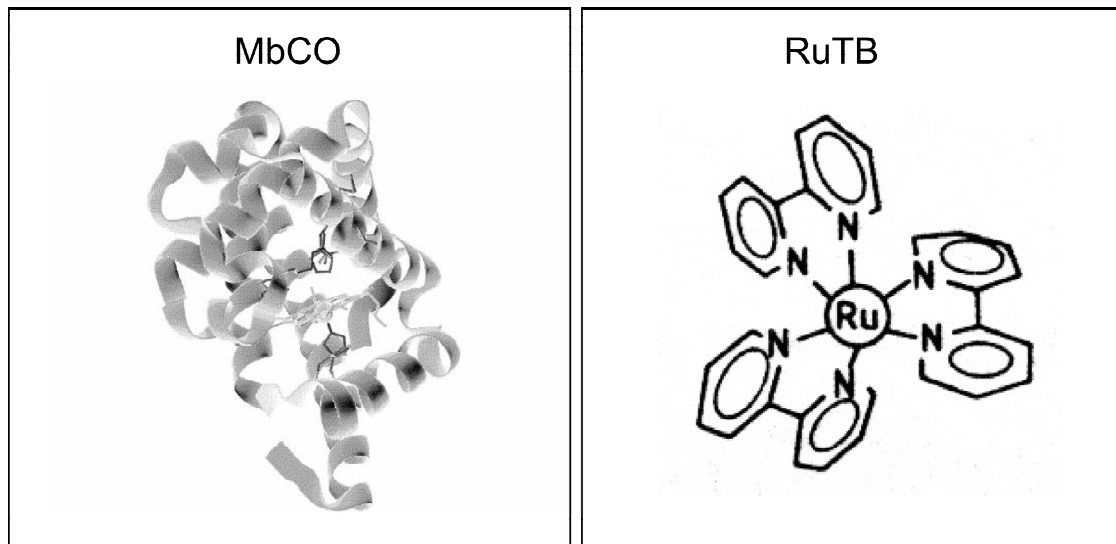
TAB. 1.1 – ordre de grandeur de γ 

FIG. 1.3 – La structure de MbCO et RuTB

RuTB est chiral car en forme d'hélice de bateau. C'est un système extrêmement étudié car sous l'absorption d'un photon, il a la particularité de transférer un électron vers les ligands (MLCT, metal ligand charge transfer).

La myoglobine (Mb) est décrite dans la partie 2.1. C'est une hémoprotéine, ce qui signifie que l'on trouve un hème au centre de la protéine, susceptible de fixer certains ligands comme le dioxygène ou le monoxyde de carbone (on note alors le complexe MbCO). Elle est chirale à cause de l'arrangement tridimensionnel des éléments qui la composent.

1.3 L'interaction lumière matière non locale : chiralité à un électron

Il est important de comprendre que la chiralité est une propriété géométrique. Elle dépend donc de l'arrangement spatial des différents atomes. Si l'on observe la molécule de la figure 1.1, on s'aperçoit que la chiralité n'existe que parce que l'on sait discerner la position relative de l'atome "rond" et de l'atome "couronne". Si l'on décide d'intervertir leurs positions, on passe alors d'un énantiomère à l'autre ; ce qui revient à changer le signe du CD tout en laissant l'absorption inchangée.

Pour que la lumière puisse venir sonder cette asymétrie, il faut autoriser le champ électrique à être légèrement différent d'un endroit à l'autre de la molécule. Prenons l'exemple de 3 baigneurs dans l'océan, se donnant la main et formant un rond. Si les vagues sont très longues par rapport au groupe, tous les 3 montent et descendent en même temps, et tout se passe comme si il n'y avait qu'un seul baigneur. En revanche, si la longueur de la vague devient moins grande par rapport au petit groupe, les trois personnes ne vont plus monter et descendre en même temps, et à présent, l'interaction "vague-baigneur" vient lire l'arrangement relatif des baigneurs.

On retrouve exactement la même problématique dans l'interaction lumière-matière. Si l'on considère que le champ électrique reste constant (à un instant donné) sur toute la molécule, on ne peut plus discerner la position relative des atomes, l'énantiomère gauche se comporte alors comme l'énantiomère droit. Tout se passe comme si tous les atomes étaient ramenés au centre de la molécule, c'est l'approximation dipolaire électrique

$$\vec{E}(\vec{r}) = cste = \vec{E}(\vec{0}) \quad (1.1)$$

Sous cette hypothèse de constance du champ électrique, le Hamiltonien du couplage champ-matière se limite au terme dipolaire électrique

$$\hat{H}_{int} = -\hat{\vec{d}} \cdot \vec{E} \quad (1.2)$$

où l'on a introduit l'opérateur dipolaire électrique $\hat{\vec{d}} = -e \sum_i \hat{\vec{r}}_i$ (somme sur tous les électrons du système).

Les équations 1.1 et 1.2 ne peuvent en aucun cas expliquer l'activité optique. Autorisons maintenant le champ électrique à varier un petit peu, ce qui revient à faire un développement limité au premier ordre.

$$\vec{E}(\vec{r}) = \vec{E}(\vec{0}) + (\vec{r} \cdot \vec{\nabla}) \vec{E} \quad (1.3)$$

Ceci revient à considérer dans le Hamiltonien d'interaction les termes dipolaires magnétiques et quadripolaires électriques. Sachant que les termes quadripolaires s'annulent en phase liquide à cause de la moyenne isotrope (détail en annexe), l'Hamiltonien d'interaction se résume alors à

$$\hat{H}_{int} = -\hat{\vec{d}} \cdot \vec{E} - \hat{\vec{m}} \cdot \vec{B} \quad (1.4)$$

avec $\hat{\vec{m}} = \frac{-e}{2m} \sum_i \hat{\vec{r}}_i \times \hat{\vec{p}}_i$. La conclusion de ces considérations de non localité est que, pour trouver un signal de dichroïsme circulaire, il faut que le système possède à la fois une transition dipolaire électrique et une transition dipolaire magnétique.

Essayons donc de visualiser, de manière classique, le mouvement des électrons correspondant à une transition dipolaire électrique ou magnétique. Si $\hat{\vec{d}}$ n'est pas nul, les électrons vont pouvoir bouger de manière linéaire. Mais un mouvement linéaire est plan, donc identique à lui même lors d'une symétrie plane (plan du mouvement). Ce mouvement n'est alors pas chiral : il ne peut rendre compte de l'activité optique.

Il est donc nécessaire d'introduire une transition magnétique. Supposons ici $\hat{\vec{d}} = \vec{0}$, mais $\hat{\vec{m}} \neq \vec{0}$ le mouvement est désormais circulaire. Mais là encore, le mouvement est plan, donc non chiral. Considérons maintenant $\hat{\vec{d}} \neq \vec{0}$ et $\hat{\vec{m}} \neq \vec{0}$ mais choisissons les deux orthogonaux. Le mouvement est alors elliptique, donc toujours non chiral. L'activité optique vient donc de **l'existence simultanée d'une transition dipolaire électrique, d'une transition dipolaire magnétique, à condition que les deux moments ne soient pas orthogonaux**.

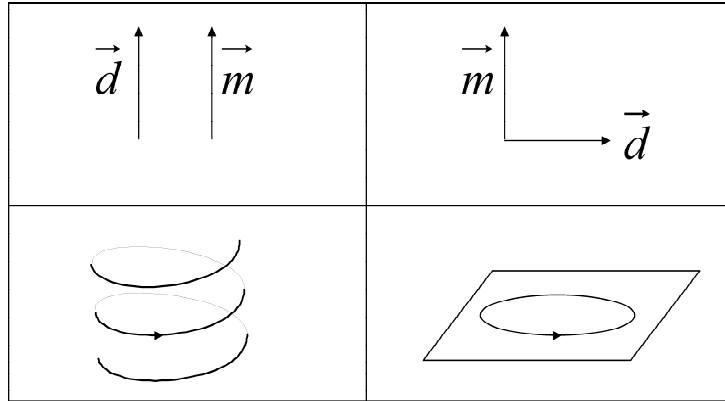


FIG. 1.4 – Le mouvement électronique hélicoïdal

Ceci amène à deux remarques. Tout d'abord, le fait de prendre les deux moments parallèles donne un mouvement en hélice (Fig. 1.4) qui est le mouvement électronique chiral par excellence. Il s'agit du modèle de Kauzman [4]. Ensuite on peut énoncer ici de manière intuitive que **la force de rotation** (c'est à dire l'intensité du dichroïsme circulaire) est directement reliée au produit scalaire du moment transition électrique et magnétique. Ceci est l'équation de Rosenfeld :

$$R_{ef} = \text{Im}(\vec{d}_{fe} \cdot \vec{m}_{ef}) \quad (1.5)$$

où l'on a considéré 2 niveaux d'énergie : un niveau fondamental f et un niveau excité e. On a également noté :

$$\vec{d}_{fe} = \langle f | \hat{\vec{d}} | e \rangle \quad \vec{m}_{ef} = \langle e | \hat{\vec{m}} | f \rangle$$

et R_{ef} désigne la force de rotation de la transition (e-f). Nous démontrerons en détail cette équation dans le troisième chapitre. Une propriété remarquable des forces de rotation est qu'elles peuvent être positives ou négatives, et que pire encore, on a la règle de somme des forces de

rotation [5] (redémontrée en annexe C.2)

$$\sum_e R_{ef} = 0$$

Contrairement à l'absorption où les effets de toutes les transitions se cumulent, ici 2 transitions différentes vont avoir tendance à se compenser.

Cette chiralité que nous venons de présenter se retrouve dans la nature chaque fois que le mouvement des électrons peut être hélicoïdal, c'est le modèle de Kauzman. C'est ce phénomène qui explique le dichroïsme circulaire du carbone asymétrique. La mesure d'une telle activité optique ne peut pas, en général, donner de renseignements intéressants sur la structure globale d'une molécule car tout le signal provient d'un mouvement électronique local, autour de quelques atomes.

Les choses sont différentes dans un système d'oscillateurs couplés, où l'activité optique vient de l'agencement spatial chirale de plusieurs unités non chirales.

1.4 Le modèle des oscillateurs couplés

Dans le paragraphe précédent, nous avons vu que pour observer du dichroïsme circulaire, il fallait nécessairement avoir des transitions dipolaires magnétiques. Le but de cette section est de montrer qu'un système composé de deux chromophores A et B, peut présenter du dichroïsme circulaire, même si ni A, ni B ne possèdent de transition magnétique. On supposera que A et B sont des chromophores absolument identiques. On parle alors de couplage de deux transitions dégénérées. Le modèle que l'on présente dans ce paragraphe a été formulé par Kuhn [6]. Considérons donc les opérateurs dipolaires électriques de A et B.

$$\widehat{D}_a = -e \sum_{i \in A} \widehat{r}_i \quad \widehat{D}_b = -e \sum_{i \in B} \widehat{r}_i$$

Les deux chromophores ne possèdent pas de transition dipolaire magnétique :

$$\sum_{i \in A, B} \widehat{r}_i \times \widehat{p}_i = \vec{0}$$

Il s'agit désormais d'écrire les opérateurs pour le système complet. Prenons pour origine le chromophore A et notons $\vec{r}_{a,b}$ le vecteur liant les deux chromophores. On suppose que la distance entre les deux chromophores est fixe : $\vec{r}_{a,b}$ n'est pas un opérateur, il n'agit pas sur l'espace de Hilbert contrairement au $\widehat{r}_i$. L'opérateur dipolaire électrique total s'écrit donc

$$\widehat{D} = \widehat{D}_a + \widehat{D}_b$$

Et par contre, on obtient un opérateur dipolaire magnétique non nul :

$$\begin{aligned} \widehat{M} &= \frac{-e}{2m} \sum_{i \in A} \widehat{r}_i \times \widehat{p}_i + \frac{-e}{2m} \sum_{i \in B} (\vec{r}_{a,b} + \widehat{r}_i) \times \widehat{p}_i \\ \widehat{M} &= \frac{-e}{2m} \vec{r}_{a,b} \times \sum_{i \in B} \widehat{p}_i \end{aligned}$$

Soit, en posant l'opérateur impulsion du chromophore B $\widehat{P}_b$

$$\widehat{M} = \frac{-e}{2m} \vec{r}_{a,b} \times \widehat{P}_b$$

Donc, un système composé de deux chromophores non magnétiques, peut posséder une transition dipolaire magnétique. Nous donnons une représentation classique de cette propriété (Fig. 1.5) .

Un mouvement linéaire d'électron sur le chromophore B, vu depuis le chromophore A, peut être perçu comme un mouvement circulaire, donc comme une transition magnétique. La question est maintenant de savoir si cette transition magnétique va se traduire par du dichroïsme circulaire. Ecrivons donc la force de rotation 1.5 d'une transition entre un niveau fondamental F et un niveau excité E :

$$R_{EF} = \text{Im}(\vec{D}_{FE} \cdot \frac{-e}{2m} \vec{r}_{a,b} \times \vec{P}_{bEF})$$

Il faut être conscient que désormais, E et F désignent un niveau fondamental et un niveau excité du système total.

En faisant les remarques suivantes :

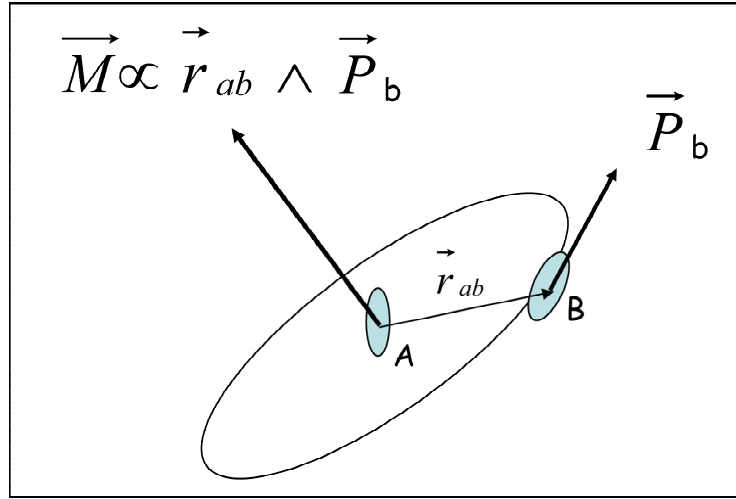


FIG. 1.5 – Le dipôle magnétique effectif

1. $\vec{P}_{bEF} = im\omega_{EF}\vec{D}_{bEF}$ (voir en annexe C.1)
 2. pour des fonctions d'onde choisies réelles, $\vec{D}_{FE}$ est réel, $\vec{P}_{bEF}$ est imaginaire pur
 3. l'expression de R_{EF} relève d'un calcul vectoriel, il n'y a plus d'opérateur, tout commute,
- la force d'oscillateur d'un système d'oscillateurs couplés s'écrit donc de la manière suivante :

$$R_{EF} = \frac{e\omega_{EF}}{2} \vec{r}_{a,b} \cdot (\vec{D}_{aFE} \times \vec{D}_{bEF}) \quad (1.6)$$

Il est intéressant de voir comment la force de rotation est directement reliée à une information purement géométrique. On note de plus que $\vec{r} \cdot (\vec{D}_a \times \vec{D}_b)$ est un volume, ce qui confirme bien que l'activité optique, non locale, est un effet volumique. Le point frappant ici est que plus r_{ab} est grand, plus la force de rotation est grande, alors que l'on s'attendrait à ce qu'il n'y ait plus de dichroïsme circulaire lorsque les deux chromophores sont trop éloignés. Le paradoxe vient de la définition des niveaux E et F :

$$|F\rangle = |A = f\rangle |B = f\rangle$$

$$|E_+\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}} (|A = e\rangle |B = f\rangle + |A = f\rangle |B = e\rangle)$$

$$|E_-\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}} (|A = e\rangle |B = f\rangle - |A = f\rangle |B = e\rangle)$$

Ce qui signifie simplement qu'il n'y a qu'un état fondamental possible pour le système (A et B dans l'état fondamental), mais deux états excités $|E_+\rangle$ et $|E_-\rangle$. Lorsque l'on remplace dans 1.6 :

$$R_{E_+F} = -R_{E_-F}$$

Donc si les deux dipôles sont trop éloignés, A et B ne sont plus couplés, il y a dégénérescence : les fréquences des transitions (FE_+) et (FE_-) sont identiques. Les deux forces de rotation sont alors peut-être très grandes, mais elles se compensent exactement. Vu que la force du couplage, de type électrostatique est en $\frac{1}{r_{ab}^3}$, le terme de dichroïsme circulaire va bien décroître fortement si on éloigne trop les deux chromophores.

Le dichroïsme circulaire dépend alors doublement de la géométrie du système : d'une part le produit mixte de 1.6 détermine la force de rotation, d'autre part le couplage électrostatique entre les deux dipôles crée une levée de dégénérescence qui convertit la force de rotation en CD effectif.

Des précisions s'imposent cependant. Il est surprenant de constater que l'on observe une force de rotation non nulle, alors qu'il n'y a pas de couplage entre les chromophores. Ceci n'est vrai que dans **le cas particulier de deux chromophores identiques**. Le traitement quantique complet dans un système d'oscillateurs a été développé par Tinoco [7]. Le terme analogue à l'équation 1.6 dans le cas non dégénéré s'écrit :

$$R \approx \frac{V}{\omega_a^2 - \omega_b^2} \vec{r}_{a,b} \cdot (\vec{D}_a \times \vec{D}_b)$$

où ω_a^2 et ω_b^2 désigne les fréquences des transitions, et où le couplage V apparaît explicitement.

Contrairement au cas dégénéré, l'éloignement entre les dipôles annule ici directement les forces de rotation. Cela n'a donc pas de sens de parler de force de rotation dans le cas dégénéré.

Nous reviendrons sur le cas de deux transitions dégénérées (section 3.3.1) et non dégénérées (section 3.3.2) en faisant un traitement classique.

La quasi-totalité du dichroïsme circulaire étudié en biologie provient de ce mécanisme d'oscillateurs couplés [8]. Si l'on prend l'exemple de l'ADN, la plus grande partie du dichroïsme circulaire provient du couplage entre les différentes bases Adénine, Thymine, Guanine et Cytosine. Le dichroïsme circulaire de l'ADN est très étudié aussi bien d'un point de vue expérimental que théorique. Dans la section suivante, nous étudierons le cas des protéines.

1.5 La spectroscopie UV-visible des protéines

Une protéine est un enchaînement d'acides aminés.

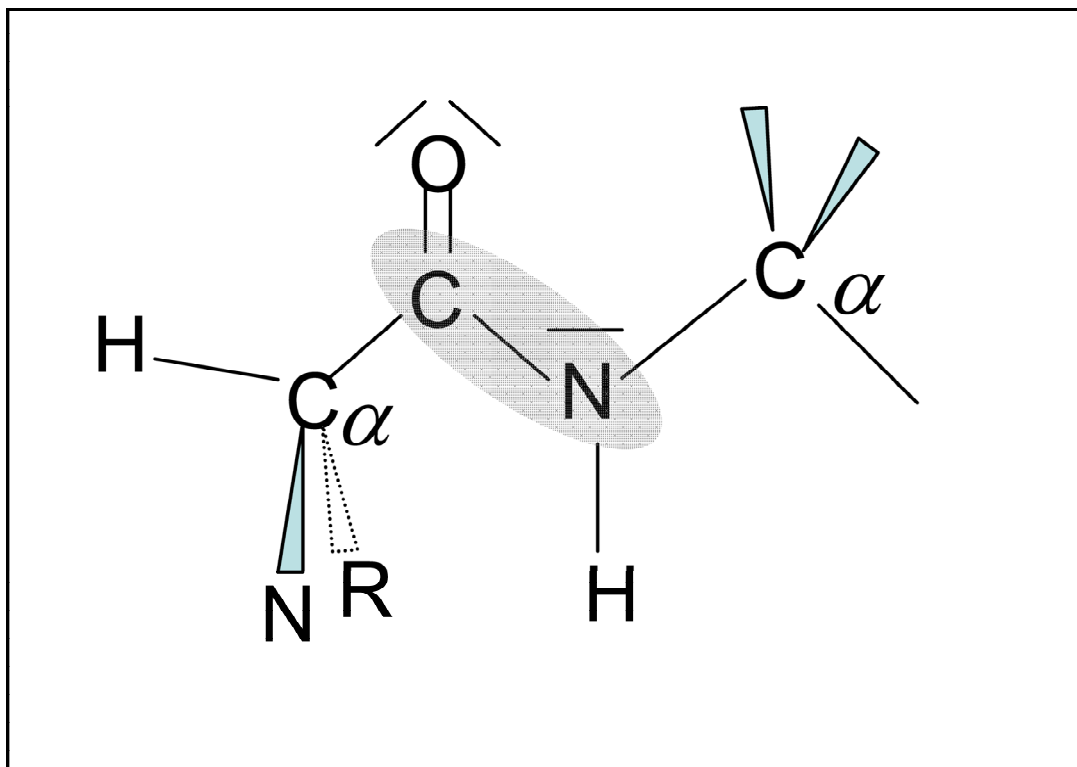


FIG. 1.6 – La liaison peptidique

Les acides aminés sont des éléments chiraux à cause du carbone α qui est chiral. Tous les acides aminés présents dans la nature sont sous la forme de l'énantiomère L, (à l'exception de la glycine qui n'est pas chirale car $R=H$). La liaison C-N est appelée la liaison peptidique (Fig. 1.6), c'est elle qui est créée lors de la polymérisation des acides aminés. Elle a la particularité d'être rigide : le doublet disponible de l'azote participe au système conjugué $O=C-N$, ce qui empêche la rotation C-N. Tous les atomes situés entre deux carbones α consécutifs sont dans le même plan (C_α , $C=O$, N, H, C_α). On change donc de plan à chaque carbone α .

Les deux principales transitions électroniques de la liaison peptidique sont notées $n - \pi^*$ et $\pi - \pi^*$ [8].

- la transition $n - \pi^*$ est très faible. Elle correspond à une rotation des électrons autour de l'axe $C=O$. On peut remarquer que dans le cas d'une cétone, cette transition est purement magnétique. Dans le cas des acides aminés, elle est principalement magnétique, il existe cependant une faible contribution dipolaire électrique le long de l'axe $C=O$
- la transition $\pi - \pi^*$ est beaucoup plus forte. Elle correspond à une modification du nuage électronique π délocalisé sur les 3 atomes $O-C-N$. Il existe donc un moment de transition dipolaire électrique le long de l'axe N-O

Une protéine absorbe également à cause des substituants R : on parle alors de l'absorption de la chaîne latérale. Lorsqu'il s'agit de résidu aromatique, on observe des pics d'absorption dès l'ultraviolet moyen. On rapporte (Tab. 1.2) les pics d'extinction molaire des résidus les plus absorbants, ainsi que les deux transitions de la liaison peptidique. Il est important de noter que les résidus aromatiques ont également des transitions électroniques dans l'UV plus lointain, mais que les spectres d'absorption sont complètement dominés par la liaison peptidique dès que l'on passe en dessous de 230 nm.

système	λ (nm)	$\epsilon_{max} M^{-1}cm^{-1}$
hème MbCO	424	100000
tryptophane	279	5000
tyrosine	274	1400
phénylalanine	258	190
cystéine (S-S)	≈ 260	300
liaison peptidique $n\pi^*$	210-230	100
liaison peptidique $\pi - \pi^*$	190	7000

TAB. 1.2 – Les principaux éléments absorbants d'une protéine

Nous rapportons également ici l'extinction molaire maximale de l'hème dans le complexe MbCO. La comparaison des ϵ_{max} est tout à fait instructive, mais il faut être conscient que ces chiffres sont rapportés à une unité. Si l'on prend l'exemple de la Myoglobine, il y a un hème, une vingtaine de résidus aromatiques et 153 acides aminés (soit 152 liaisons peptidiques).

Examinons à présent le cas du dichroïsme circulaire, et prenons comme exemple la myoglobine. Résumons l'ensemble des couplages possibles (Tab. 1.3).

	liaison peptidique	résidus aromatiques	hème
liaison peptidique	A	B	C
résidus aromatiques		D	E
hème			F

TAB. 1.3 – Les couplages possibles

Excepté le cas ambigu de **A**, tous les autres termes **B**, **C**, **D**, **E** et **F** se rapportent au couplage de deux oscillateurs situés sur des chromophores différents (2 liaisons peptidiques, un aromatique et une liaison peptidique...). Dans le cas de A il ne faut pas oublier le caractère magnétique de la transition $n\pi^*$. Le CD à 190 nm s'explique par le couplage dipôle électrique-dipôle électrique entre des transitions $\pi\pi^*$ alors qu'à 220 nm, il s'agit d'un autre mécanisme : le dipôle magnétique de la transition $n\pi^*$ est couplé avec d'autres dipôles électriques $\pi\pi^*$.

Les interactions de types dipôle électrique-dipôle électrique peuvent être traitées avec la théorie de la polarisabilité (chapitre 3.2) [9] [10], alors que les interactions de type dipôle électrique dipôle magnétique ne peuvent être traitées que dans le cadre de la théorie des matrices [11]. Ce dernier cas n'est pas abordé dans ce travail de thèse.

Il s'agit de pouvoir évaluer si le couplage entre deux transitions dipolaires électriques va être conséquent. Voici quelques critères qualitatifs :

- la force du CD sera d'autant plus grande que les transitions initiales sont fortes
- la force du CD sera d'autant plus grande que les deux transitions ont des fréquences proches. Un couplage dégénéré **A** l'emporte sur un couplage non dégénéré **B** (sauf que les résidus aromatiques ont aussi des transitions dans l'UV lointain...) En revanche **C** est négligeable
- la force du CD sera d'autant plus grande que les deux transitions initiales sont situées sur des chromophores pas trop éloignés dans l'espace

Le dichroïsme circulaire dans l'UV lointain *i.e.* de 190 nm à 230 nm, dans une première approximation, s'explique principalement par **A**. Le dichroïsme circulaire à ces longueurs d'onde est donc extrêmement sensible à la structure secondaire de la protéine, c'est à dire aux hélices α et autres feuillets β . On observe des signatures spectrales caractéristiques pour ces différentes structures (Fig. 1.7). Le dichroïsme circulaire est même très utilisé pour doser la quantité d'hélice α dans une protéine. Cependant, dans certaines protéines contenant beaucoup de résidus aromatiques, le terme **B** devient vite important [12].

Le dichroïsme circulaire dans l'UV moyen *i.e.* de 230 nm à 350 nm dépend à priori de **B**, **D** et **E**. Bien que **B** soit non dégénéré, la proximité et le nombre des liaisons peptidiques entourant les résidus aromatiques font que sa contribution est loin d'être négligeable, surtout dans le cas d'un tryptophane. **D**, bien que dégénéré n'est pas si énorme que cela, car les acides aminés aromatiques ne sont souvent qu'une petite fraction, et il est rare d'en avoir deux extrêmement proches. Dans le cas des hémoprotéines, le poids relatif de **B**, **D** et **E** est donc loin d'être tranché. Le dichroïsme circulaire a donc une sensibilité indéniable à la position relative des résidus aromatiques, mais c'est tout simplement impossible d'en tirer une information tant soit peu quantitative.

Le dichroïsme circulaire dans la bande de Soret *i.e.* 400 nm 500 nm est quant à lui uniquement dû à **E**. Il dépend donc uniquement du couplage entre l'hème et les différents résidus aromatiques [13]. Nous y reviendrons amplement dans le troisième chapitre de ce manuscrit. (nous précisons que **F** n'a pas de sens dans la myoglobine car il n'y a qu'un seul hème, et dans l'hémoglobine, les hèmes sont trop éloignés pour être couplés).

Ce travail de thèse se limite, d'un point de vue théorique, à l'étude du dichroïsme circulaire de la myoglobine dans la bande de Soret, en considérant le terme **F**, c'est à dire le couplage entre l'hème et les résidus aromatiques aux alentours de l'hème.

D'un point de vue expérimental, ce travail de thèse a principalement consisté à mesurer les changements de dichroïsme circulaire dans le complexe MbCO, juste après le départ du monoxyde de carbone dans la bande de Soret. Il s'agit maintenant de comprendre le principe qui permet de mesurer des changements de dichroïsme circulaire.

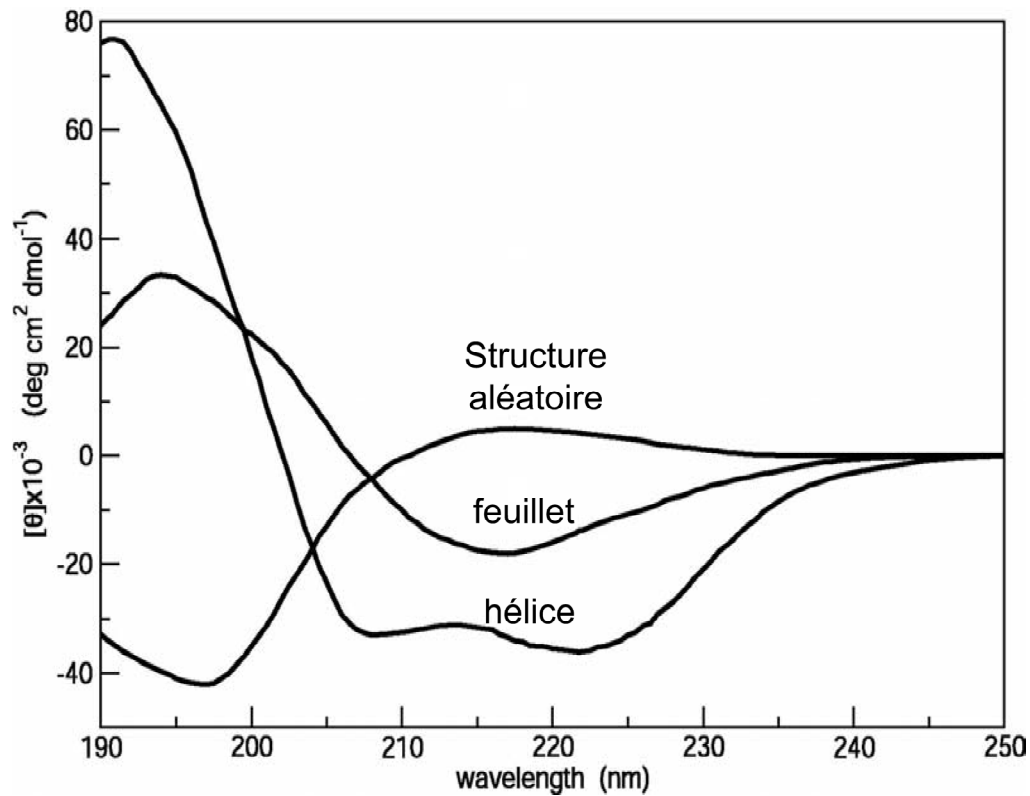


FIG. 1.7 – La signature des hélices α et des feuillets β secondaires

1.6 Le dichroïsme circulaire résolu temporellement

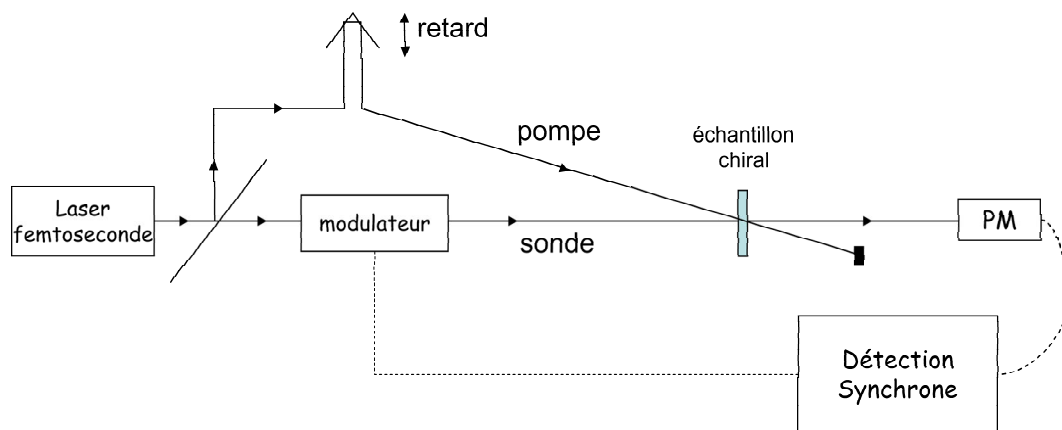


FIG. 1.8 – Le dichroïsme circulaire résolu temporellement

Avant d'expliquer le principe d'une expérience de dichroïsme circulaire résolue temporellement, nous rappelons celui d'une expérience pompe-sonde.

Le principe est d'utiliser un laser pulsé, (dans le cas de ce travail de thèse, des impulsions d'une

centaine de femtosecondes) et de séparer chacune des impulsions en deux (Fig. 1.8).

Une partie est appelée pompe, elle sert à exciter le système étudié, ou de manière plus générale, à amorcer une réaction photophysique. La deuxième impulsion est appelée sonde, elle sert à mesurer l'absorption du système après l'excitation. A l'aide d'une ligne à retard, on peut faire varier le délai entre les deux impulsions, et remonter ainsi à l'évolution du spectre d'absorption après l'excitation, avec comme résolution temporelle la durée des impulsions du laser. Dans notre système, nous avons une résolution sub-picoseconde.

Le principe d'une expérience de dichroïsme circulaire est rigoureusement identique, à ceci près que l'on rajoute un modulateur sur le trajet de la sonde, afin de générer alternativement une polarisation droite et une polarisation gauche.

On mesure donc le dichroïsme circulaire du système après l'excitation par la pompe. De manière analogue à la mesure de dichroïsme circulaire statique, une seule mesure permet de mesurer simultanément le dichroïsme circulaire et la transmission.

Le but est d'avoir une meilleure sensibilité à la géométrie du système. En effet, nous avons vu lors de ce premier chapitre que l'on était très sensible aux couplages entre les différents constituants d'une molécule, ou à la structure secondaire des protéines. L'objectif est d'induire optiquement avec le faisceau pompe une réaction photophysique où les changements de structure sont suffisants pour pouvoir être observés par dichroïsme circulaire. Nous verrons dans la partie 2.1 que le complexe MbCO est un excellent candidat. Nous présenterons également dans la partie 5 d'autres candidats possibles.

Replaçons les expériences réalisées lors de ce travail de thèse, dans le contexte plus général des expériences de CD résolues temporellement [14] (TRCD). Pour toutes ces expériences, la démarche reste identique : il faut perturber le système puis venir mesurer le CD ultérieurement. Ces techniques diffèrent donc par le mode d'excitation et par les échelles de temps qu'elles permettent d'étudier.

Commençons par une expérience de TRCD où l'échelle de temps est le mois. Nous illustrons les travaux de Drake [15] sur le désordre de l'hème dans la myoglobine. La perturbation consiste à reconstituer la myoglobine à partir d'une solution d'hémine et d'apo-myoglobine (myoglobine qui a perdu son hème). L'équivalent de la ligne à retard est ici la montre, voire même le calendrier du laboratoire. A un instant t , on vient mesurer le CD de l'échantillon afin de doser la proportion d'hème se fixant dans le mauvais sens. L'étude de CD au cours du temps montre que cette proportion évolue sur deux mois.

Examinons à présent d'autres expériences où l'échelle de temps est plus courte, de la seconde à l'heure. Tous les spectromètres de CD sont équipés d'une fonction cinétique. Plutôt que de mesurer un spectre, on se place à une longueur d'onde et on mesure l'évolution du CD. L'excitation du système est là encore physicochimique, typiquement une intervention de l'expérimentateur (mise en solution, saut de pH ou de température). La mesure du temps entre l'excitation et le sondage se fait grâce au chronomètre de l'appareil de mesure.

Si l'on souhaite passer en dessous de la seconde, il faut avoir une excitation plus rapide, donc plus sophistiquée. On utilise alors une autre génération de spectromètre de CD, permettant de

faire des sauts de température rapides (échauffement laser) ou de mélanger très rapidement deux solutions (stop-flow). La résolution temporelle est alors limitée par la diffusion thermique dans le cas du saut de température et par la diffusion des molécules (loi de Fick) dans le cas du stopflow, donc entre 1 μ s et 1 ms.

On commence ici à voir poindre (expérience du saut de température) la nécessité d'une excitation optique. C'est effectivement le seul moyen actuel pour descendre en dessous de la μ s. L'énorme inconvénient de cette excitation est que l'on restreint d'un coup le champ des systèmes que l'on peut étudier. La liste des systèmes biologiques photo-activables est effectivement courte. Risquons-nous à formuler une liste des grandes familles de ces systèmes.

- les hémoprotéines : on détache le ligand fixé sur l'hème lorsqu'un photon est absorbé.
- les systèmes possédant un chromophore isomérisable (la bactériorhodopsine, la protéine jaune PYP, les polypeptides greffés sur un azobenzène (système **AMPB** décrit à la partie perspective [16])
- les systèmes possédant un transfert de charge (système photosynthétique, polypeptide greffé sur un ruthénium tribipyridyl)

On constate qu'il y a tout de même un certain nombre de systèmes à étudier, surtout que cette liste n'a pas la prétention d'être exhaustive. Dans les expériences tout optique, la résolution temporelle dépend de la durée de l'excitation, de la durée de la détection, et de la précision du système de retard.

Nous décrivons à présent la première expérience de TRCD tout optique : il s'agit des travaux de Kliger sur la myoglobine [17]. L'excitation se fait avec un laser nanoseconde. Le CD est mesuré avec une lumière continue, un PM et un oscilloscope très rapide. Le retard est électronique, c'est le balayage horizontal de l'oscilloscope. La résolution de l'expérience est de quelques nanosecondes.

Si l'on souhaite passer en dessous de la nanoseconde, il faut que la sonde soit elle aussi pulsée, et que le retard ne soit plus électronique, **mais optique**. Il existe un problème très connu avec les lasers pulsés appelé jitter (gigue d'une impulsion par rapport à l'autre). Il est donc très dur de synchroniser un laser par rapport à l'autre. En revanche si l'on prend un seul laser, qu'on le sépare en deux, les deux répliques (pompe et sonde) sont parfaitement synchronisées, il n'y a plus de problème. Citons les travaux de Simon dans MbCO [18] [19]. Il a obtenu une résolution temporelle de 50 picosecondes, ce qui lui a permis d'observer une dynamique sur 300 ps.

Si l'on souhaite arriver au domaine de la picoseconde, ou sub-picoseconde, il faut utiliser la technologie des lasers femtoseconde, et c'est dans ce cadre que se situe ce travail de thèse. Nous avons utilisé un système laser kHz amplifié délivrant des impulsions de 200 fs, nous permettant d'avoir une résolution subpicoseconde et d'observer une dynamique temporelle que nous présenterons à l'occasion du quatrième chapitre.

Le grand problème des retards optiques est que l'on est limité si l'on souhaite faire des expériences sur des temps plus grands que quelques nanosecondes (soit quelques mètres de ligne à retard). La démarche actuelle des biophysiciens est de dédoubler l'expérience : une série est effectuée sur un système femtoseconde, et une deuxième série est effectuée sur un système à délai électronique, la difficulté étant ensuite de raccorder les deux.

Cependant, dans un futur proche, il sera possible de synchroniser entre eux différents laser femtoseconde, (en contrôlant le problème du jitter). On aura alors la possibilité dans une même expérience d'étudier le phénomène sur une picoseconde et sur plusieurs microsecondes [20].

Nous sommes donc partis du mois, pour arriver à la picoseconde...

Chapitre 2

La photodissociation du complexe MbCO

Le but de ce chapitre est d'expliquer pourquoi nous avons choisi d'étudier la réaction de photodissociation du complexe MbCO. Nous verrons qu'il s'agit en fait d'une réaction modèle de l'effet allostérique dans l'hémoglobine. Nous décrirons donc dans la première section la myoglobine, l'hémoglobine et l'effet allostérique. Dans la deuxième section, nous présenterons les différentes méthodes utilisées pour étudier cette réaction. Notre objectif est de mieux cerner quelles informations spécifiques une expérience de dichroïsme circulaire peut apporter.

2.1 L'effet allostérique

La myoglobine (Mb) et l'hémoglobine (Hb) font partie d'une famille importante de protéines appelées les hémoprotéines. Il s'agit de protéines possédant un ou plusieurs hèmes. L'hème est une molécule plane possédant un atome de fer en son centre relié à quatre atomes d'azote. Le fer ayant la possibilité d'être 6 fois coordonné, avec au moins une des liaisons axiales réservée par la protéine, l'hème peut fixer différents ligands (CO, O₂, NO). La diversité des états chimiques du fer est très grande : état de valence, d'oxydation, de spin. Ceci est à l'origine du rôle physiologique clef des hémoprotéines dans le transport et le stockage de ligands, ainsi que dans le transfert d'électrons.

La myoglobine est impliquée dans le stockage de l'oxygène au niveau des muscles et des tissus de l'organisme. L'hémoglobine est, elle, responsable du transport d'oxygène depuis les poumons jusqu'aux muscles. L'hémoglobine est un tétramère : elle est constituée de deux sous unités α et de deux sous unités β qui possèdent chacune une géométrie très similaire à celle de la myoglobine.

Nous représentons (Fig. 2.1) la structure de l'hémoglobine ainsi qu'une représentation schématique de la structure de la myoglobine, avec et sans CO [21].

Décrivons donc, dans un premier temps, la myoglobine : cette protéine comporte 153 acides aminés. Sa structure secondaire est très riche en hélices α , elles sont au nombre de 8, indicées de A à H. L'atome de fer de l'hème est relié de manière covalente à l'hélice F au niveau de l'histidine 93 (histidine proximale). Pour toutes les hémoprotéines, on distingue deux parties dans l'environnement de l'hème :

- un côté **proximal** : c'est de ce côté que l'hème est accroché au reste de l'hémoprotéine via une liaison covalente à un résidu (une histidine dans le cas de Mb ou Hb)
- un côté **distal** : c'est de ce côté que vient se fixer le ligand

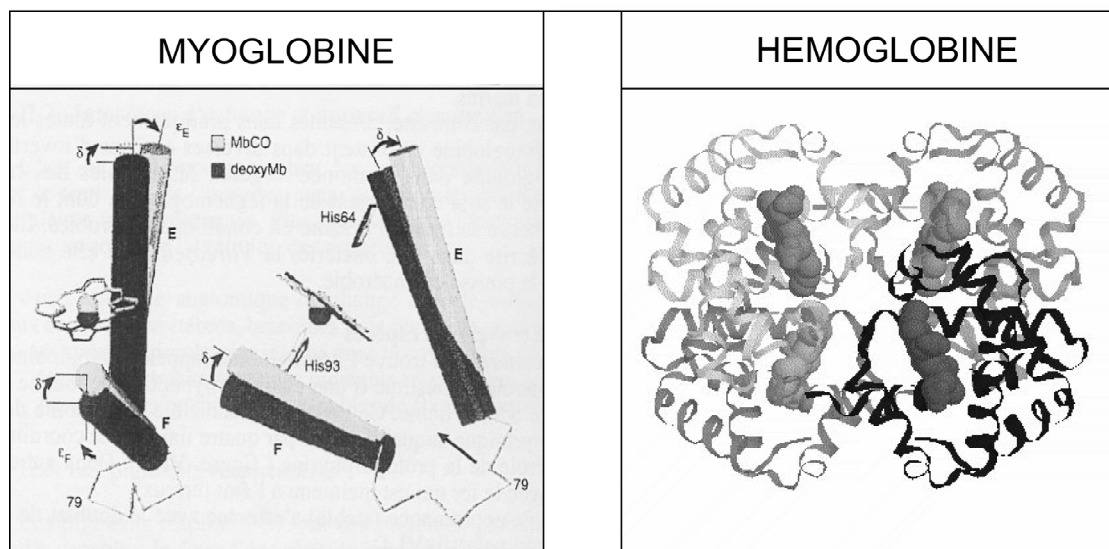


FIG. 2.1 – La myoglobine et l'hémoglobine

On constate (Fig. 2.1) que lorsque le CO est fixé sur l'hème, (fer 6 fois coordonné) le fer est situé dans le plan de l'hème. En revanche, lorsqu'il n'y a pas de ligand (fer 5 fois coordonné), le fer sort du plan. On parle alors de "doming de l'hème", le fer se déplace effectivement d'environ 0.5 Angstrom [22]. Ceci s'explique par le fait que le fer 6 fois coordonné est dans un état de bas spin alors que le fer 5 fois coordonné est dans un état $S=2$.

L'histidine proximale est alors le point de pivot des changements de conformation de la protéine : en effet, le déplacement de l'atome de fer se répercute grâce à l'histidine proximale vers l'hélice F et le reste de la protéine. Un écart de 0.5 Angstrom sur la position du seul atome de fer est donc à l'origine des différences entre les deux structures (avec et sans ligand). On note alors qu'un milliard d'atomes se déplacent d'un dixième d'Angstrom en moyenne, la structure protéique se relaxant vers un état d'énergie minimale.

Perutz a proposé le mécanisme qui suit la dissociation [23] [24] suivant :

1. la liaison hème ligand se casse, l'hème se "dome"
2. le mouvement du fer en dehors du plan pousse l'histidine proximale, mais simultanément la force de répulsion entre l'hème et l'hélice F diminue. L'histidine est donc "prise en sandwich" : elle se tourne et s'incline.
3. le déplacement de l'histidine vient pousser l'hélice F, la contrainte se relâche vers le reste de la protéine

Passons à présent de l'autre côté du plan de l'hème, du côté distal donc. On trouve alors le site de fixation du ligand, entre l'hème et l'histidine distale (His 64, fixée sur l'hélice E). Celle-ci joue un rôle physiologique important : elle peut venir gêner grâce à son encombrement stérique la fixation du ligand sur l'atome de fer. Ceci permettrait de faire une discrimination entre la fixation de O_2 et CO [21]

L'hème est donc encapsulé entre l'hélice F et l'hélice E, et une modification de l'ouverture de

"cette tenaille" peut modifier l'affinité de la myoglobine pour le ligand. Les deux histidines distale et proximale ont donc un rôle physiologique capital.

Examinons à présent le cas de l'hémoglobine. Les quatre sous-unités sont reliées par des liaisons électrostatiques, et la fixation d'un oxygène sur une des sous-unités peut venir modifier l'affinité des autres sites pour l'oxygène. Ceci est une illustration de **l'effet allostérique homotrope**.

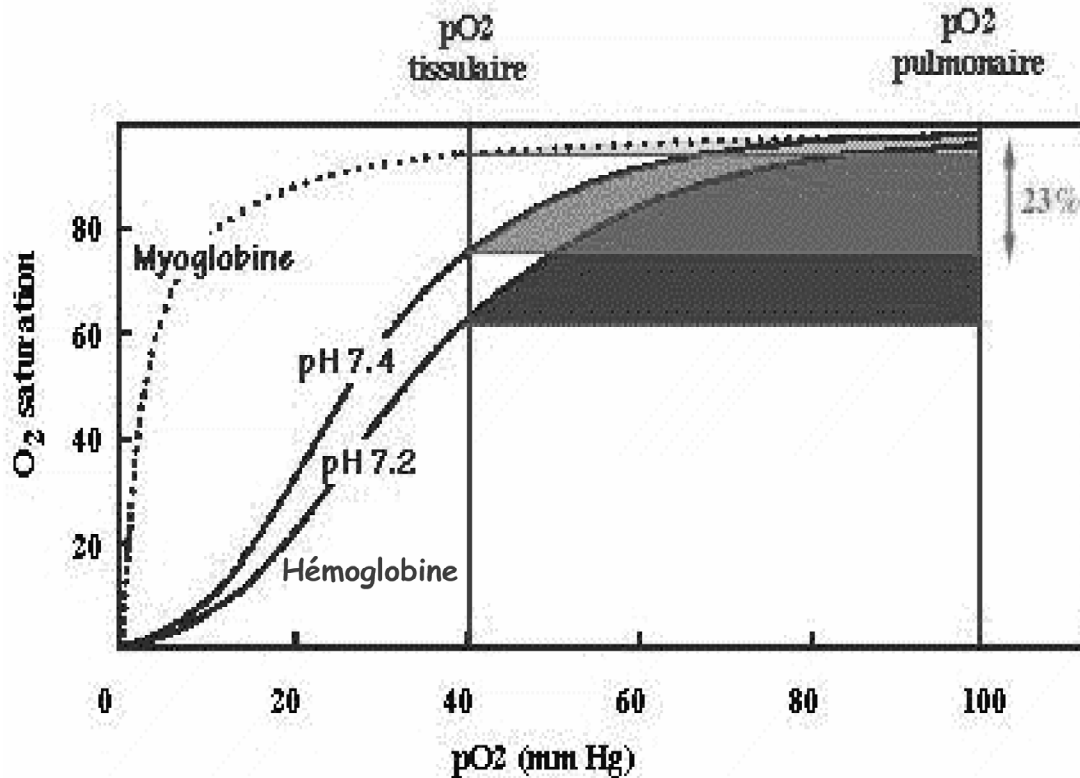


FIG. 2.2 – L'effet allostérique

On représente (Fig. 2.2) la saturation en O_2 en fonction de la pression partielle en Oxygène. Le résultat connu est le suivant :

- Dans le cas de la myoglobine, dès les très faibles pressions partielles d'oxygène, il y a fixation.
- Dans les cas de l'hémoglobine, le profil est sigmoïdale : la première molécule de O_2 est plus difficile à fixer que les trois suivantes

Ceci s'explique de la manière suivante : la première molécule de O_2 se fixe sur une des quatre sous unités, l'histidine proximale correspondante se recule et engendre une succession de modifications. La protéine va passer de l'état T à l'état R :

- l'état T, Tendue, possède une faible affinité pour O_2 (60 fois plus faible que pour l'état R). Dans cette configuration, l'hème ne parvient pas à adopter sa géométrie plane. Ceci gêne considérablement la fixation d'un ligand.
- l'état R, Relaxé, possède une forte affinité pour O_2 .

Autant la différence de structure entre MbCO et Mb est minime, autant la différence entre l'état T et l'état R est très grande : on observe des déplacements de plusieurs Angstroms. Ce changement se fait donc sur des temps long, $1 \mu s$

Faisons un petit récapitulatif des ordres de grandeur caractéristiques :

- taille d'un atome ≈ 1 Angstrom
- taille de Mb ≈ 30 Angstroms
- diamètre de l'hème 9 Angstroms
- déplacement du fer ≈ 0.5 Angstroms
- déplacement caractéristique entre MbCO et Mb ≈ 0.1 Angstrom
- déplacement caractéristique entre R et T dans l'hémoglobine ≈ 5 Angstroms

Ce profil sigmoïdal obtenu pour la saturation de Hb est capital d'un point de vue physiologique. On souhaite en effet que l'hémoglobine ait une différence maximale d'affinité pour l'oxygène entre le moment où elle est dans les poumons et le moment où elle est dans les tissus. Le transport d'O₂ n'est en effet rentabilisé que si l'hémoglobine se remplit complètement au niveau des alvéoles pulmonaires et se vide complètement au niveau des muscles. L'effet allostérique rend donc le processus de transport de l'oxygène très rentable.

Bien que le passage de R à T soit long, 1 μ s, [25] il est important de comprendre le mouvement initial qui suit la dissociation du ligand. Ainsi, on peut se restreindre par souci de simplification à la myoglobine. On retrouve en effet dans ce système modèle tous les éléments nécessaires à la compréhension des premières étapes de l'effet allostérique dans l'hémoglobine (un hème, un site de fixation du ligand, une histidine proximale, une hélice F etc...). Notons cependant que l'effet allostérique en lui même ne peut exister que dans un système possédant plusieurs sites, comme l'hémoglobine. Le problème modèle posé est donc **le changement initial de la structure de la myoglobine après la fixation ou la dissociation d'un ligand**. On portera une attention particulière à l'histidine proximale ainsi qu'aux résidus les plus proches de l'hème.

Une expérience de type pompe sonde sur le complexe MbCO peut tout à fait apporter des réponses à cette problématique. On peut en effet reproduire expérimentalement le départ du ligand : si l'hème absorbe un photon de pompe visible, on observe la photodissociation du complexe MbCO avec un rendement quantique égale à 1. Le monoxyde de carbone est ensuite piégé dans un "docking site" pendant quelques centaines de nanosecondes avant de quitter la protéine [26]. On peut ensuite venir sonder l'état du système avec un autre processus physique. Notons cependant que cette réaction modèle n'est pas rigoureusement physiologique, vu que l'on passe par l'absorption d'un photon et un état électronique excité pour dissocier le ligand.

On doit cependant remarquer que l'énergie déposée dans le milieu par le photon pompe se transforme en énergie thermique après la disparition de l'état excité. La relaxation de cette énergie a largement été étudiée tant sur un plan théorique qu'expérimental [27] [28]. De plus, le changement global de géométrie de MbCO à Mb implique le déplacement de milliers d'atomes. On peut donc concevoir que l'aspect déterministe de ce phénomène l'emporte sur les fluctuations thermiques, aléatoires.

2.2 Les sondes globales possibles

La deuxième section de ce chapitre est un panorama de quelques techniques permettant de sonder la structure d'un tel système. Ce panorama comprendra bien sûr les expériences de dichroïsme circulaire résolu temporellement. Pour chacune des techniques abordées, on s'attachera à exposer les réponses apportées à la question du mouvement initial des atomes juste après le départ du CO. Il y a principalement trois moyens de venir sonder l'état d'un système :

- on peut tout d'abord étudier le mouvement des électrons du système. Les transitions électroniques sont situées dans la partie visible ou ultraviolet du spectre électromagnétique.
- on peut également regarder le mouvement des noyaux des atomes. Le procédé le plus direct est l'étude des vibrations, rotations ou modes globaux. Il s'agit alors respectivement de spectroscopie infrarouge proche, lointain et THz.
- on peut également étudier directement la structure du système, par diffraction des rayons X ou RMN2D.

2.2.1 Le mouvement des électrons

Il est très judicieux d'étudier les hémoprotéines dans le domaine du visible : en effet, l'hème est le seul élément absorbant de la protéine entre 390 et 800 nm. Un spectre d'absorption visible donne donc des informations sur l'état électronique de l'hème, et dans une moindre mesure, sur le couplage de l'hème avec son environnement. La sensibilité à la structure globale, ou au proche environnement de l'hème reste limitée.

Si l'on souhaite venir sonder les transitions électroniques dans le domaine UV on se heurte très vite à une difficulté d'interprétation : comme nous l'avons vu lors de la section 1.5, toute la protéine absorbe dans l'UV, et il est alors très difficile de pouvoir déterminer à quelle partie nous sommes sensibles.

Le complexe MbCO a été largement étudié par des techniques d'absorption résolue temporellement, mais les résultats se limitent le plus souvent au domaine visible.

On représente dans l'encart de droite de la figure 2.3 les spectres d'absorption statiques de MbCO et Mb. On constate que les spectres sont suffisamment différents pour que l'on puisse suivre la dissociation en mesurant l'absorption. Le spectre d'absorption transitoire a été étudié en détail [29]. Ces études ont permis de montrer que le spectre de l'espèce photo-dissociée est celui de la myoglobine.

Sur des échelles de temps de l'ordre de la picoseconde (ou plus long), aucune dynamique n'est observée, mis à part le déclin rapide de l'état excité en quelques picosecondes [30]. La figure 2.4 illustre ce phénomène. On représente l'évolution de la transmission de la sonde à 421 nm et 435 nm. On observe une marche correspondant au changement d'absorption. La décroissance rapide au retard zéro est dû à l'état excité.

Il peut néanmoins s'avérer intéressant de suivre l'absorption de la bande III de l'hème (à 763 nm). Il s'agit d'un transfert de charge, fer-histidine, et il a été proposé [22] que cette transition était sensible au déplacement du fer en dehors de son plan. Les conclusions de cette étude sont les suivantes : la plus grande partie du doming (80%) se fait très rapidement (50 fs), le reste (20%) se

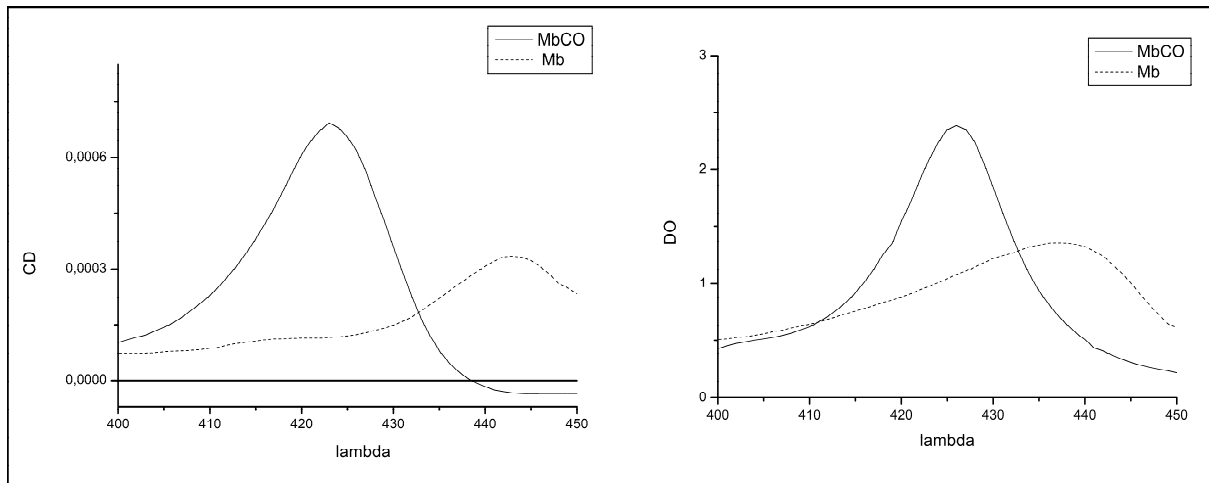


FIG. 2.3 – Les spectres d’absorption et de CD visibles de MbCO et Mb. $CD - \Delta DO$

fait sur des échelles de temps plus longues (décroissance multi-exponentielle 3.5 ps, 83 ps, et 3.3 ns). Cette évolution lente de la position du fer rend compte du réarrangement de la protéine.

Nous avons également reporté sur la figure 2.3, encart de gauche, les spectres de CD. On constate que les différences obtenues entre MbCO et Mb, sont tout à fait comparables avec les spectres d’absorption. Il apparaît donc faisable de suivre la photodissociation de MbCO en mesurant le dichroïsme circulaire. On regarde, là encore, le mouvement des électrons de l’hème (on retrouve d’ailleurs logiquement du CD aux longueurs d’onde où l’absorption est importante). Mais ici, ce mouvement électronique est affecté par l’environnement.

Nous avons en effet vu lors du premier chapitre, d’une manière assez générale, que le dichroïsme circulaire était sensible aux couplages de l’hème avec les résidus aromatiques environnants. Nous verrons à l’occasion du troisième chapitre, de manière assez précise, que le CD est très sensible aux mouvements de l’histidine proximale. Une expérience de TRCD pourrait donc permettre d’augmenter la sensibilité aux changements de structure, comparée à la sensibilité d’une expérience d’absorption.

Cette expérience a été réalisée dans le passé [17] et il n’a pas été observé de dynamique sur plusieurs nanosecondes (*i.e.*, on passe directement du spectre de CD MbCO à celui de Mb). En revanche, sur des échelles de temps plus courtes [18] une dynamique temporelle de 300 ps a été observée. Le but de ce travail de thèse, d’un point de vue expérimental est donc de confirmer et d’étendre ces résultats en utilisant la nouvelle technologie des sources laser femtoseconde amplifiées. Ceci permet d’avoir une résolution subpicoseconde. Nous proposerons également une interprétation précise de ce signal en terme de changement de conformation de la protéine.

Continuons à présent notre panorama des différentes sondes possibles : passons à l’étude du mouvement des noyaux.

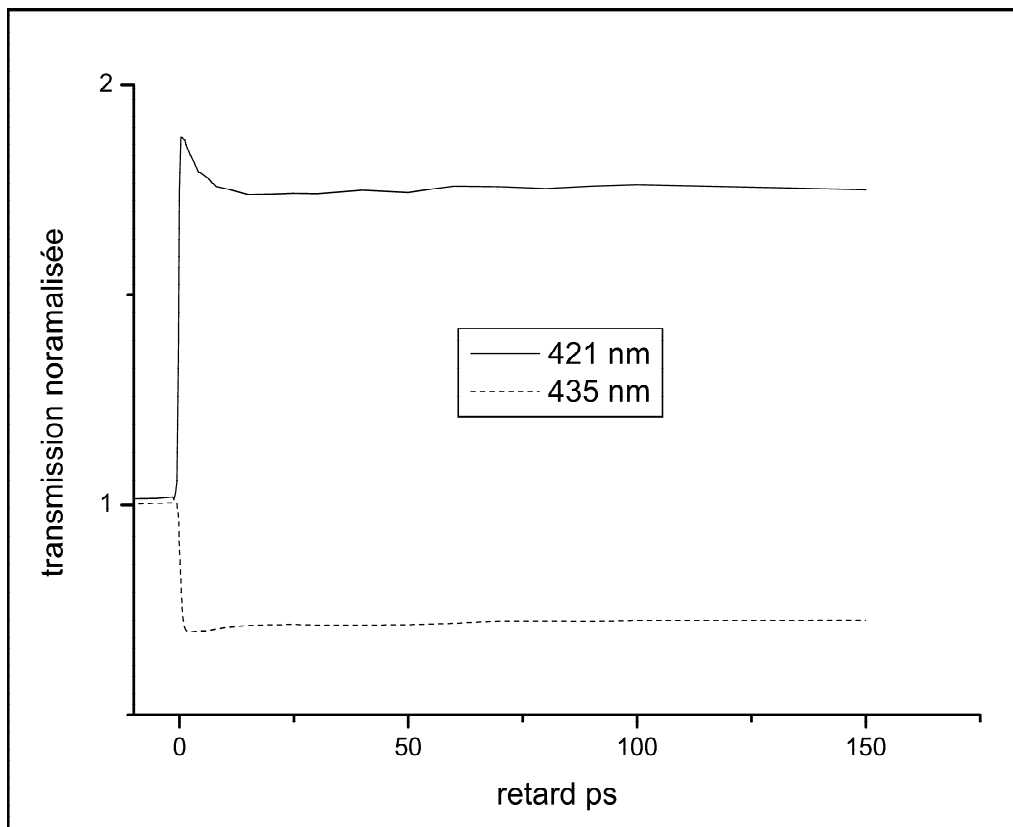


FIG. 2.4 – Une illustration d'un résultat de transmission transitoire dans MbCO

2.2.2 Le mouvement des noyaux

La manière directe pour étudier le mouvement des noyaux consiste à utiliser des photons dans l'infrarouge afin de sonder directement les transitions vibrationnelles du système. Il est également possible d'accéder indirectement à ces transitions. Nous montrerons ensuite que la spectroscopie par réseau de phase résolu temporellement permet d'appréhender la relaxation de l'énergie vibrationnelle et le mouvement global d'un grand nombre d'atomes.

Spectroscopie infrarouge résolue temporellement

Le but est de produire des impulsions laser pulsées, directement dans le domaine infrarouge, et de s'en servir comme sonde. L'état de l'art actuel permet d'avoir des impulsions de 3 à 30 μm : génération d'un Amplificateur Paramétrique Optique (OPA), suivi d'une différence de fréquences entre l'impulsion signal et l'impulsion complémentaire. Ceci permet d'accéder à quelques transitions vibrationnelles.

On peut, entre autre, accéder à la fréquence de vibration du CO. Une idée a été de suivre les caractéristiques de cette vibration lorsque le CO passe de sa position sur le fer, à sa position dans le docking site. Ceci constitue une sonde indirecte de la géométrie de la partie de la protéine proche du monoxyde de carbone [31].

D'autres vibrations sont également accessibles comme la bande amide I, par exemple. Il reste cependant très difficile d'avoir des informations sur la structure du système avec de telles techniques. Il faudrait pour cela avoir accès aux couplages entre les différents vibreurs. En effet, si l'on excite spécifiquement un vibreur de la protéine, et que l'on vient mesurer l'énergie transférée sur un autre vibreur, on obtient des informations sur la distance et l'angle entre ces deux vibreurs, donc sur la structure du système. Ceci est le principe de la spectroscopie infrarouge bidimensionnelle [32]. L'interprétation de telles expériences restent néanmoins extrêmement complexe, surtout dans les systèmes biologiques où l'on couple un grand nombre de vibreurs.

Spectroscopie indirecte des transitions infrarouge

Il est difficile de générer des impulsions infrarouge, surtout lorsque l'on souhaite aller au delà de la dizaine de μm . Notons de plus que les détecteurs MCT deviennent aveugles au-delà de 15 μm . Or, le domaine spectral compris entre 200 et 1000 cm^{-1} contient énormément d'informations sur les vibrations de l'hème et de l'histidine proximale. Rappelons que $1\mu\text{m}=10000\text{ cm}^{-1}=300\text{ THz}=333\text{ fs}=0.9\text{ eV}$). Il existe globalement trois procédés pour venir sonder ces transitions, sans passer par une impulsion infrarouge :

- lorsque l'on sonde le système dans le visible, on regarde essentiellement les transitions électroniques. Cependant le système des noyaux va lui aussi se réarranger, car le "ciment moléculaire" que constitue le nuage électronique change brutalement d'état. Ces mouvements nucléaires vont moduler le signal pompe sonde électronique : on appelle cela "**l'oscillation de paquet d'onde vibrationnel**". Les bons systèmes pompe sonde peuvent descendre à une résolution temporelle de 10 fs. On résout alors toutes les modulations plus lentes que 10 fs et on peut ainsi théoriquement obtenir des informations sur tous les modes de vibration inférieurs à 3000 cm^{-1} [33]. C'est ainsi que l'on a mis en évidence l'implication des oscillations du doming de l'hème lors d'une réaction de transfert de ligand [34]. Une autre piste consiste à venir exciter le système de manière équivalente (pompe visible ultracourte), mais cette fois venir détecter de manière cohérente le champ infra rouge émis par la protéine [35]. Dans ce cas, on est à nouveau limité par la coupure du détecteur.
- La spectroscopie Raman que nous décrivons à présent permet d'étudier l'émission et l'absorption des modes de vibration et de rotation d'un système, en n'utilisant aucun photon infra rouge [36].

Il suffit en effet d'envoyer un faisceau visible à la fréquence ω_{elec} très étroit spectralement. La diffusion inélastique du système va générer des photons à la fréquence $\omega_{elec} \pm \omega_{vib}$.

Le + correspond à l'émission d'un photon IR par le vibreur ω_{vib} . On parle de diffusion anti-Stokes

Le - correspond à l'absorption d'un photon IR par le vibreur ω_{vib} . On parle de diffusion Stokes

Ce phénomène est d'autant plus important que ω_{elec} est résonnant avec une transition électronique de l'hème : on parle alors de **diffusion Raman résonnante** [36] [37].

Revenons donc au cas de la photodissociation de MbCO. La pompe visible photodissocie la liaison fer CO, l'hème se dôme, la symétrie plane de l'hème est brisée. Ceci change complètement les règles de sélection Raman : des transitions vibrationnelles interdites dans MbCO, sont autorisées

dans Mb. Le principe est donc de suivre les vibrations de l'hème en utilisant comme sonde une impulsion Raman proche de la bande de Soret (430 nm). Il s'agit de mesurer le spectre Raman du système après la photodissociation. Cette expérience est donc une mesure directe de la coordination du fer et de la planéité de l'hème.

Si l'on souhaite avoir une sonde globale de la protéine, il faut étudier des vibrations basses fréquences. Par exemple, l'élongation de la liaison fer-histidine proximale (220 cm^{-1}) est très sensible aux changements de géométrie du système. Mizutani et Kitagawa [38] ont étudié en détail le déplacement spectral et les changements d'intensité de cette bande. Cette étude a permis de mettre en évidence une constante de temps de 100 ps que les auteurs attribuent à un changement de conformation de la protéine.

Spectroscopie par réseau de phase résolu temporellement

Nous présentons dans ce paragraphe la technique de spectroscopie par réseau de phase résolu temporellement, développée par l'équipe de Dwayne Miller [39] [40]. Comme pour les techniques précédentes, l'observable est l'énergie de vibration du système, mais cette fois-ci l'esprit est légèrement différent : comprendre comment l'énergie thermique passe de l'hème au reste de la protéine, c'est aussi appréhender par quel chemin passent les changements de conformation.

L'excitation du système est ici réalisée avec deux impulsions pompes, envoyées simultanément et en phase sur l'échantillon. Ces deux impulsions pompe vont alors interférer et créer un réseau de franges. L'excitation n'est alors pas uniforme, on grave un réseau sur l'échantillon. Le principe est ensuite de venir lire ce réseau avec une impulsion sonde retardée. La longueur d'onde est prise très éloignée de toutes les transitions de la protéine : la sonde n'est alors sensible qu'aux changements d'indice de réfraction, eux même directement reliés aux changements de densité volumique $\Delta\rho$ du milieu.

Cette méthode est donc sensible sélectivement aux changements minimes de densité du milieu. La sonde se diffracte sur le réseau gravé. On mesure l'intensité de la tache diffractée en fonction du retard entre la pompe (double) et la sonde. Ceci permet d'observer en temps réel l'évolution du réseau de densité.

Deux phénomènes sont *a priori* à l'origine de ce réseau : l'expansion thermique, et les changements de volume de la protéine.

Commençons par décrire l'expansion thermique. Les deux pompes déposent de l'énergie dans le système. Dans notre cas il s'agit de l'excès d'énergie absorbée par l'hème au moment de la photodissociation. Cette énergie va se convertir en énergie vibrationnelle, et être redistribuée sur l'ensemble de la protéine (IVR : intramolecular vibrational relaxation) l'échantillon sera donc "chaud".

- Au niveau des franges brillantes (interférence constructive des deux pompes) le milieu est chauffé, on observe donc une dilatation et une baisse locale de la densité volumique
- Au niveau des franges sombres, il n'y a pas d'échauffement. Le milieu sera comprimé par la dilatation des franges brillantes voisines. On obtient alors une augmentation de la densité.

Le temps d'établissement de ce réseau de densité, (donc d'indice) est limité par le temps que met le son pour parcourir un interfrange. Il est donc souhaitable de réduire l'interfrange au maximum.

Si l'on adopte une géométrie contra-propagative pour les deux faisceaux pompe, ce temps est de 20 ps. Donc si l'excès d'énergie que l'on place dans l'hème met plus de 20 ps pour se thermaliser et chauffer localement l'échantillon, on le verra. Il n'en est rien. Le transfert d'énergie de l'hème vers l'extérieur de la protéine est donc plus rapide que 20 ps.

La densité du milieu peut également changer à cause d'un changement de volume de la protéine, ou plutôt d'un mouvement global des résidus extérieurs comparés aux résidus intérieurs à la protéine. On constate alors dans le cas de MbCO un temps d'établissement du réseau de densité **plus rapide** que les 20 ps obtenues dans le cas purement thermique (Mb). On montre effectivement que ce temps est de l'ordre de 10 ps.

En faisant l'expérience proche de 0°C, on annihile complètement les phénomènes d'expansion thermique. Ceci élimine le signal dans Mb, en revanche le résultat dans MbCO est inchangé. Le réseau de densité obtenu dans MbCO est donc bien lié à la photodissociation.

Cette étude a permis de montrer qu'une déformation globale de la protéine se développe en une dizaine de picosecondes après le départ du ligand.

2.2.3 Les sondes structurales

Deux méthodes sont aujourd'hui couramment employées pour déterminer directement la structure des molécules : la RMN 2D (résonance magnétique nucléaire du proton à deux dimension) et la diffraction de rayons X.

Comparons les avantages et les inconvénients des deux techniques.

la **diffraction de rayons X** permet de déterminer directement la structure de n'importe quel système à partir du moment où l'on sait le cristalliser. C'est d'ailleurs de cette façon que Max Perutz a déterminé la structure de l'Hémoglobine [41] et John Kendrew celle de la myoglobine. Les deux hommes ont reçus conjointement le prix Nobel en 1962. La cristallisation de certaines protéines est parfois problématique. De plus, l'arrangement cristallin n'est pas forcément physiologique et ceci peut perturber la réaction que l'on cherche à étudier. Ceci est à apprécier au cas par cas, en fonction du système. Ainsi, la photodissociation de MbCO peut légitimement être suivie par cette technique : les atomes ne bougent presque pas entre l'état final et initial [42] . En revanche, les formes R et T de HbCO ne cristallisent pas dans le même groupe de symétrie [43]. Il est même amusant de noter que les cristaux de HbCO cassent quand on cherche à effectuer la photodissociation.

L'énorme avantage de la **spectroscopie RMN 2D** est qu'elle peut se faire en phase liquide [44]. On s'affranchit donc des problèmes précédents. En revanche, elle ne permet de résoudre directement que les structures simples, (petit brin d'ADN, polypeptides plus petits que 20 acides aminés). Pour des systèmes plus gros, des déterminations indirectes sont néanmoins possibles en s'appuyant sur des structures homologues connues. Le désavantage "éliminatoire" de cette technique est que l'on ne peut pas faire d'expérience résolue temporellement avec une résolution meilleure que la milliseconde. Il s'agit en effet d'une spectroscopie extrêmement fine dans le domaine spectral. Le processus "sonde RMN 2D" est donc forcément très long.

Concentrons nous à présent sur la diffraction de rayons X. Un cristal est obtenu en plaçant périodiquement dans les trois directions de l'espace un groupement d'atomes appelé motif. La donnée de ce motif et du réseau permet de connaître complètement le cristal.

Lorsque l'on fait diffracter un faisceau de rayons X sur un cristal, on obtient un ensemble de taches de diffraction. La position relative de ces taches permet de connaître précisément la structure du réseau, *i.e* la position relative des différents motifs. L'intensité relative des taches permet de cartographier la densité électronique d'un motif. Et c'est là l'information très intéressante qui permet de remonter à la structure 3D du motif.

La résolution de cette technique est limitée par le nombre de taches que l'on est capable de collecter. La figure 2.5 montre la figure de diffraction d'un cristal de lysozyme, et permet de donner une idée du nombre de taches nécessaires à l'obtention d'une structure suffisamment bien résolue. On rappelle la formule de Bragg.

$$\sin(\theta_n) = \frac{n\lambda}{2d}$$

θ_n détermine la position de la tache d'ordre n , d est la distance entre deux plans du cristal et λ la longueur d'onde du faisceau diffracté. Donc, si l'on veut détecter un nombre correct de taches -jusqu'à l'ordre $n=100$ -, il faut que $\lambda \sim d/100$. Dans le cas d'un cristal de myoglobine, d

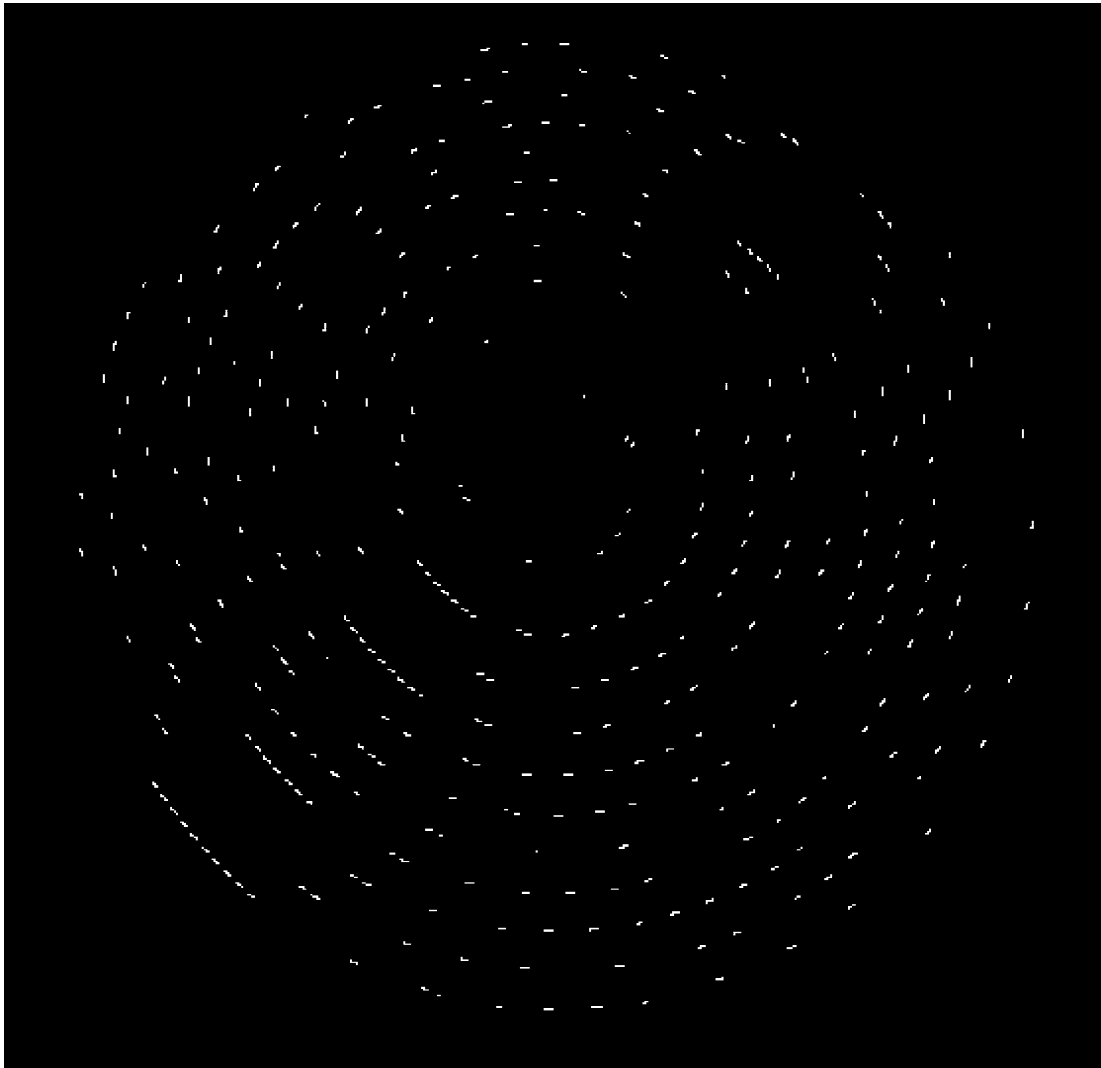


FIG. 2.5 – La figure de diffraction d'un cristal de lysosime

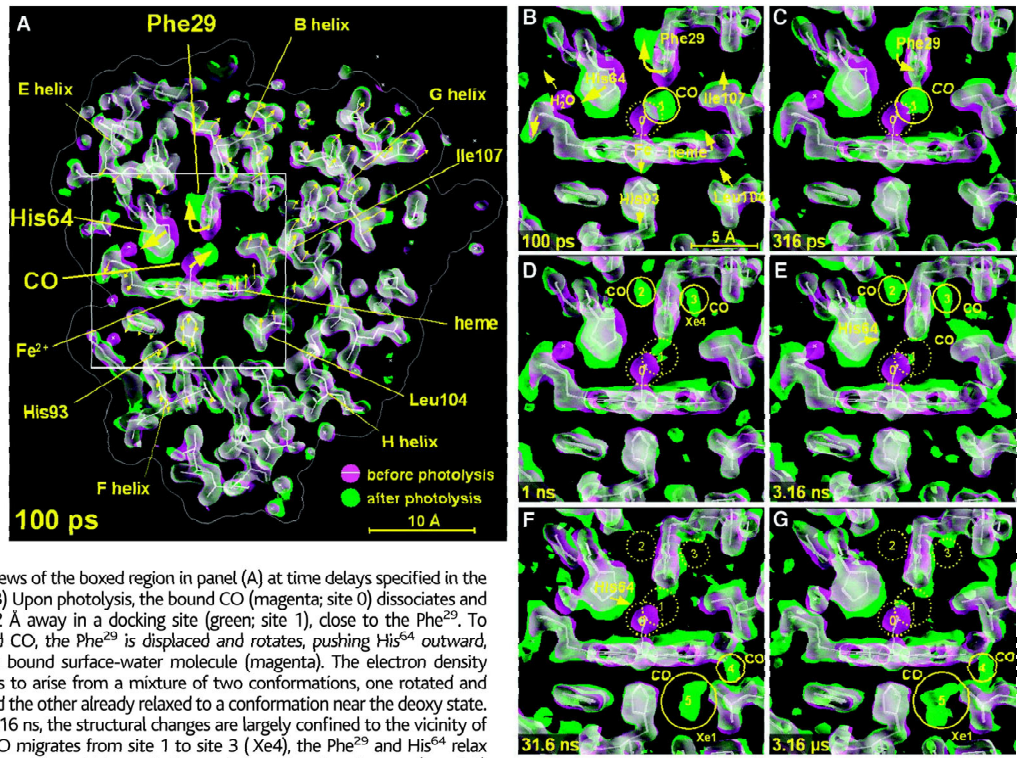
est de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Si l'on veut résoudre correctement la structure de la myoglobine, il faut $\lambda \sim 0.1nm \sim 10keV$. Ceci donne une résolution spatiale de $\lambda = 0,1nm = 1$ Angstrom. On résoud donc bien la position de chaque atome.

Il n'est pas évident de produire de telles longueurs d'onde, et surtout de manière pulsée. Le rayonnement synchrotron permet de produire des rayons X à la bonne longueur d'onde. En utilisant l'accélération d'un paquet d'électrons suffisamment court, on peut réaliser des impulsions X d'environ 50 picosecondes.

Nous représentons (Fig. 2.6) la structure d'un mutant de myoglobine obtenue 100 ps après la photodissociation [45], par diffraction de rayons X résolue temporellement. Ceci constitue "la photographie" de la protéine la plus rapide que l'on ait jamais réalisée après le décrochement du ligand. Arrêtons nous sur ce résultat très intéressant. On constate qu'au bout de 100 ps, tous les résidus proches de l'hème ont bougé et atteint leur position finale. En revanche, certains résidus plus éloignés de l'hème continuent d'évoluer sur des échelles de temps plus longues. Ceci permet donc de dire que la partie intéressante de la photodissociation de MbCO - en tant que modèle de

REPORTS

Fig. 4. (A) Experimentally determined electron densities within a 6.5-Å-thick slice through the myoglobin molecule before (magenta) and 100 ps after (green) photolysis. Where these densities overlap, they blend to white. The white-stick model corresponds to the unphotolyzed structure and is included to guide the eye. The direction of molecular motion follows the magenta-to-green color gradient. Three large-scale displacements near the CO-binding site (large arrows) are accompanied by more subtle correlated rearrangements throughout the entire protein (small arrows; not drawn to scale).



(B to G) Enlarged views of the boxed region in panel (A) at time delays specified in the lower left of each panel. (B) Upon photolysis, the bound CO (magenta; site 0) dissociates and becomes trapped about 2 Å away in a docking site (green; site 1), close to the Phe²⁹. To accommodate the docked CO, the Phe²⁹ is displaced and rotates, pushing His⁶⁴ outward, which in turn dislodges a bound surface-water molecule (magenta). The electron density surrounding Phe²⁹ appears to arise from a mixture of two conformations, one rotated and displaced toward His⁶⁴ and the other already relaxed to a conformation near the deoxy state. (C to E) From 316 ps to 3.16 ns, the structural changes are largely confined to the vicinity of the binding site. As the CO migrates from site 1 to site 3 (Xe4), the Phe²⁹ and His⁶⁴ relax toward their deoxy conformations, which are similar to their unphotolyzed states. (F and G) Structures acquired after nanosecond photolysis of a second protein crystal. By 31.6 ns, CO has migrated to sites 4 and 5, where it remains trapped for microseconds. The magenta and green maps were contoured at the same absolute level (1.5 σ of the unphotolyzed density) using O 7.0, author A. Jones. [See Movie S1 to view the time-dependent electron density changes.]

FIG. 2.6 – La structure de MbCO de 100 ps à 3,16 μ s après la dissociation [45]

l'effet allostérique dans HbCO- se passe en moins de 100 ps.

Pour passer en dessous de la barre des 100 ps, plusieurs stratégies sont à l'étude. Tout en gardant la technologie synchrotron, une des idées est de réduire au maximum la taille du paquet d'électrons afin de diminuer la durée temporelle de l'impulsion X générée.

Une autre possibilité est de changer de type de source de rayonnement X. Au Laboratoire d'Optique et Biosciences, une source secondaire plasma X a été développée. Le principe est de focaliser des impulsions 800 nm, 150 fs très intense dans un fil de cuivre. On obtient alors des impulsions X (~ 200 fs) ayant la bonne longueur d'onde (8 keV). Un tel système peut permettre *a priori* de suivre l'évolution de la structure de la myoglobine avec une résolution sub-picoseconde.

La diffraction de rayons X a également permis d'accéder à des structures intermédiaires entre Mb et MbCO. Le principe est d'utiliser la cryogénie pour refroidir un cristal de MbCO (par exemple), et de l'illuminer de manière à photodissocier le CO, qui se retrouve alors piégé dans le docking site [46] [47] [48]. Le système reste alors dans cette configuration, et le but est de réaliser une expérience de diffraction de rayons X. Les structures obtenues sont très proches de celles de Mb.

Chapitre 3

Une méthode de calcul de spectre de CD

Le but de ce chapitre est d'exposer les calculs théoriques de dichroïsme circulaire effectués lors de ce travail de thèse. Lors de la première section, nous expliquerons comment se fait le lien entre les moments de transition et les spectres expérimentaux. Nous développerons dans la deuxième section la théorie de la polarisabilité d'Appelquist [10], pour pouvoir l'appliquer au couplage de deux chromophores dans la troisième section, et au cas de la myoglobine dans la quatrième section.

3.1 Des notions de spectroscopie

3.1.1 La force d'oscillateur et les spectres d'absorption

Le but de cette partie est de comparer le modèle classique de l'absorption (électron élastiquement lié), avec le modèle quantique (expression de la polarisabilité) afin d'introduire la force d'oscillateur. On fera ensuite le lien entre la polarisabilité et l'extinction molaire.

Soit e et m la charge et la masse de l'électron. On considère que l'électron est lié avec une raideur k , il subit un terme dispersif Γ , et il est soumis à un champ électrique complexe $\vec{E}e^{-i\omega t}$ de pulsation ω . Il est astreint à se déplacer sur une direction $\vec{u}$, sa position est $r\vec{u}$. L'équation classique du mouvement s'écrit alors :

$$m\frac{d^2r}{dt^2} + \Gamma\frac{dr}{dt} + kr = -e\vec{E}.\vec{u}$$

Il apparaît alors un dipôle complexe $\vec{d} = -e\vec{r}$ ($e > 0$) oscillant à la pulsation ω ,

$$\vec{d} = \frac{e^2/(m)}{\omega_0^2 - \omega^2 - i\Gamma\omega}(\vec{E}.\vec{u})\vec{u}$$

où l'on a noté $\omega_0^2 = \frac{k}{m}$. Il est alors commode d'utiliser la notation tensorielle (voir les détails en annexe). On note la polarisabilité tensorielle $\underline{\alpha}$ et l'on a :

$$\vec{d} = \underline{\alpha}\vec{E} \quad \text{avec} \quad \underline{\alpha} = \frac{e^2}{m} \frac{\vec{u} \otimes \vec{u}}{\omega_0^2 - \omega^2 - i\Gamma\omega}$$

Pour une meilleure description de la réalité microscopique, l'introduction d'ingrédients quantiques est indispensable. Le système a plusieurs niveaux d'énergie : le niveau fondamental f , et plusieurs niveaux excités e . Le système est supposé froid, le niveau f est donc plein ($\rho_f = 1$) et

les niveaux excités sont vides ($\rho_e = 0$). Le passage d'un niveau fondamental à un niveau excité correspond donc à une transition électronique ($f - e$).

L'électron considéré classiquement n'est donc que "partiellement" disponible à une transition ($f - e$). On note donc la force d'oscillateur f_{fe} la grandeur physique rendant compte de la disponibilité relative des électrons du système à la transition $f - e$, donc du poids relatif de cette transition dans un spectre d'absorption. La polarisabilité peut alors se réécrire :

$$\underline{\alpha} = \frac{f_{ef}.e^2}{m} \frac{\vec{u} \otimes \vec{u}}{\omega_0^2 - \omega^2 - i\Gamma\omega} \quad (3.1)$$

De plus, il y a N électrons impliqués dans la polarisabilité de l'unité, on obtient la règle de somme suivante :

$$\sum_e f_{fe} = N \quad (3.2)$$

La force d'oscillateur est une grandeur purement quantique. L'introduction d'un minimum de mécanique quantique est nécessaire pour la calculer. On considère le système à plusieurs niveaux décrit ci-dessus. E_e et E_f sont les énergies des niveaux, $\hat{H}$ est le Hamiltonien d'interaction. Soit $\hat{\vec{x}}$ un opérateur vectoriel. Nous notons :

$$\langle f | \hat{\vec{x}} | e \rangle = \vec{x}_{fe} = x_{fe} \vec{u}_{fe} \quad \langle f | \hat{H} | e \rangle = H_{fe}$$

où l'on a introduit le vecteur unitaire $\vec{u}_{fe}$. La théorie standard des perturbations au premier ordre permet de calculer la matrice densité, et donc le vecteur $\vec{x} = tr(\hat{\rho}\hat{\vec{x}})$:

$$\vec{x} = -\frac{1}{\hbar} \sum_e \left(\frac{\vec{x}_{fe} H_{ef}}{\omega_{ef} - \omega - i\Gamma_{ef}} + \frac{\vec{x}_{ef} H_{fe}}{\omega_{ef} + \omega + i\Gamma_{ef}} \right) \quad (3.3)$$

où $\hbar\omega_{ef} = E_e - E_f$ et Γ_{ef} est la largeur de la transition.

Le principe est d'appliquer cette relation à $\hat{\vec{x}} = \hat{\vec{d}}$, pour l'Hamiltonien d'interaction local $\hat{H} = -\hat{\vec{d}} \cdot \vec{E}$ où l'opérateur dipolaire électrique est celui introduit dans le premier chapitre. On a donc :

$$\vec{d} = \frac{1}{\hbar} \sum_e \left(\frac{\vec{d}_{fe} (\vec{d}_{ef} \cdot \vec{E})}{\omega_{ef} - \omega - i\Gamma_{ef}} + \frac{\vec{d}_{ef} (\vec{d}_{fe} \cdot \vec{E})}{\omega_{ef} + \omega + i\Gamma_{ef}} \right) \quad (3.4)$$

Les deux numérateurs sont égaux, et il vient :

$$\langle \vec{d} \rangle = \underline{\alpha} \cdot \vec{E}$$

où l'on a introduit l'expression quantique du tenseur de polarisabilité :

$$\underline{\alpha} = \frac{1}{\hbar} \sum_e \frac{2\omega_{ef} |d_{fe}|^2}{\omega_{ef}^2 - \omega^2 - 2i\omega\Gamma_{ef} + \Gamma_{ef}^2} \vec{u}_{fe} \otimes \vec{u}_{fe} \quad (3.5)$$

On remarque que le modèle classique 3.1 permet d'obtenir presque la même expression que le modèle quantique, sauf pour le terme en Γ^2 dont la justification classique est plus délicate. En identifiant 3.5 et 3.1, la définition naturelle pour la force d'oscillateur est :

$$f_{fe} = \frac{2\omega_{cf}m}{e^2\hbar} |d_{fe}|^2$$

Il est montré en annexe (règle de somme de Thomas-Kuhn-Reiche) qu'avec cette expression de la force d'oscillateur, on retrouve la bonne expression 3.2. Cependant, il est à noter que l'on trouve systématiquement dans la littérature un facteur $1/3$ dans la définition de la force d'oscillateur, qui n'a pas de signification physique : en effet, on identifie deux données tensorielles, donc non isotropes. Par conséquent, s'il y a un facteur $1/3$ de moyenne isotrope, il doit apparaître dans 3.1 et dans 3.5, et se simplifier dans l'expression de f_{fe} . Cependant, pour rester cohérent avec les autres définitions, nous notons :

$$f_{fe} = \frac{4\pi\nu_{cf}m}{3e^2\hbar} d_{fe}^2 \quad (3.6)$$

$$\begin{aligned} \sum_e f_{fe} &= \frac{N}{3} \\ \underline{\alpha} &= \frac{3.e^2}{4\pi^2m} \sum_e \frac{f_{fe}}{\nu_{ef}^2 - \nu^2 - 2i\nu\Gamma_{ef}} \vec{u}_{fe} \otimes \vec{u}_{fe} \end{aligned} \quad (3.7)$$

où l'on a utilisé l'expression 3.5 en négligeant les Γ^2 . Pour simplifier les notations, j'introduis le paramètre c_{fe} que j'appellerai force de polarisation

$$c_{fe} = \frac{3f_{fe}.e^2}{4\pi^2m}$$

Le but est maintenant de faire le lien entre cette polarisabilité tensorielle et l'extinction molaire ϵ d'un échantillon où les molécules sont distribuées de manière isotrope. La moyenne isotrope (détail en annexe) permet d'obtenir pour tout vecteur, $\vec{x}$, $\vec{y}$

$$\vec{x} \otimes \vec{y} \rightarrow \frac{1}{3} \vec{x} \cdot \vec{y}$$

$$\underline{\alpha} \rightarrow \frac{\alpha}{3}$$

$$\alpha = \sum_e \frac{c_{fe}}{\nu_{ef}^2 - \nu^2 - 2i\nu\Gamma_{ef}}$$

La polarisation $\vec{P}$ apparaissant dans le milieu est alors parallèle au champ électrique, et l'on a $\vec{P} = \frac{N\alpha}{3} \vec{E}$, où N est la concentration moléculaire. Il s'agit à présent de réécrire les équations de Maxwell dans le système SI :

$$\text{div} \vec{D} = \rho \quad , \quad \text{div} \vec{B} = 0 \quad , \quad \text{rot} \vec{H} = \vec{j} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad , \quad \text{rot} \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}$$

où l'on a introduit les différents vecteurs

- $\vec{E}$ le champ électrique
- $\vec{B}$ le champ magnétique
- $\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P}$ le déplacement électrique
- $\vec{H} = \vec{B}/\mu_0 - \vec{M}$ l'excitation magnétique

On se place dans un milieu non magnétique vide de tout porteur libre, $\vec{j} = \vec{M} = \vec{0}$, $\rho = 0$. De plus on a :

$$\vec{D} = (\epsilon_0 + \frac{N\alpha}{3})\vec{E} = \epsilon_0\epsilon_r\vec{E}$$

On se retrouve avec les mêmes équations de Maxwell que dans le vide où l'on a remplacé ϵ_0 par $\epsilon_0\epsilon_r$:

$$\text{div}\vec{E} = \text{div}\vec{B} = 0 \quad , \quad r\vec{\partial}t\vec{B} = \epsilon_0\epsilon_r\mu_0\frac{\partial\vec{E}}{\partial t} \quad , \quad r\vec{\partial}t\vec{E} = -\frac{\partial\vec{B}}{\partial t}$$

Les solutions sont de la forme

$$\vec{E} = \vec{E}_0 e^{-i(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{r})}$$

où l'on trouve directement

$$k^2 = \omega^2 \epsilon_0 \epsilon_r \mu_0 \quad d'ou \quad k \approx \frac{\omega}{c} (1 + \frac{N\alpha}{6\epsilon_0})$$

La partie réelle du α va modifier l'indice de réfraction de l'onde alors que la partie imaginaire va contribuer à l'absorption : en effet, on trouve si l'on se propage selon z

$$|\vec{E}|^2 = E_0^2 e^{-\left(\frac{N\omega}{3\epsilon_0 c} \text{Im}(\alpha) z\right)}$$

On vérifie que la partie imaginaire de α est bien positive. L'énergie électromagnétique décroît quand le phénomène est dissipatif :

$$\text{Im}(\alpha) = \sum_c c_{fe} \frac{\nu \Gamma_{ef}}{(\nu_{ef}^2 - \nu^2)^2 + (\Gamma_{ef} \nu)^2}$$

Comparons cette expression à la loi de Beer-Lambert

$$I(z) = 10^{-\epsilon C \cdot \frac{z}{10}} = e^{-\ln 10 \epsilon C \cdot \frac{z}{10}}$$

Où l'extinction molaire ϵ reste $M^{-1} cm^{-1}$, d'où le facteur 10, C est la concentration molaire. Il vient en utilisant ces trois dernières relations :

$$\epsilon = \kappa \nu \cdot \text{Im}(\alpha) \quad avec \quad \kappa = \frac{20\pi \mathcal{N}_a}{3 \ln(10) \epsilon_0 c} \quad (3.8)$$

Le but est de calculer la force d'oscillateur à partir de l'intégrale d'un spectre d'absorption. On a :

$$\frac{\nu^2 \Gamma}{(\nu_{ef}^2 - \nu^2)^2 + (\Gamma \nu)^2} \approx \frac{\nu_{ef}^2 \Gamma}{(\nu_{ef} - \nu)^2 (2\nu_{ef})^2 + (\Gamma \nu_{ef})^2} = \frac{1/\Gamma}{1 + (2\Delta\nu/\Gamma)^2} \quad (3.9)$$

où l'on s'est placé proche de la résonance ($e - f$). Cette intégrale donne une valeur de $\pi/2$. On trouve donc que la force de bande I_{fe} est directement reliée à la force d'oscillateur :

$$I_{fe} = \int_{fe} \epsilon(\nu) d\nu = \kappa c_{fe} \frac{\pi}{2}$$

On peut aussi lier l'énergie déposée dans le milieu δ à ϵ . Dans le cas isotrope, on a

$$\delta = \text{Im}(\vec{D} \cdot \vec{E}^*) = \text{Im} \alpha |\vec{E}|^2$$

où l'on a omis le facteur $\frac{\epsilon_0}{2}$. C'est cette quantité physique δ que l'on obtiendra naturellement lors des sections suivantes et qu'il s'agit de relier rigoureusement à l'extinction molaire ϵ . Dans le cas non isotrope, on a :

$$\delta = \text{Im}(\vec{E}^* \underline{\underline{\alpha}} \vec{E})$$

Cette expression s'arrange en utilisant que $\underline{\underline{\alpha}}$ est un tenseur symétrique, il vient :

$$\delta = \vec{u} \cdot \text{Im}(\underline{\underline{\alpha}}) \vec{u} |\vec{E}|^2$$

On montre alors de manière équivalente à ce qui précède que le lien entre δ et ϵ se fait de la manière suivante :

$$\epsilon = \kappa \nu \left(\frac{\delta}{|\vec{E}|^2} \right)$$

Nous résumons alors cette section dans la table suivante (Tab. 3.1) qui permet de passer des moments de transition au spectre d'absorption.

Applications numériques :

$$e = 1,610^{-19} C \quad \mathcal{N}_a = 6,02.10^{23} \quad c = 3.10^8 m.s^{-1} \quad \hbar = 1,05.10^{-34} J.s \quad \epsilon_0 = 8,85.10^{-12} C^2 J^{-1} m^{-1}$$

$$m = 9,11.10^{-31} kg$$

Grandeurs physiques	symbole	expression
force de dipôle	$ < f \hat{\mathbf{d}} e > ^2$	détermination quantique
force d'oscillateur	f_{fe}	$\frac{4\pi.m.\nu_{ef}}{3e^2\hbar} < f \hat{\mathbf{d}} e > ^2$
force de polarisation	c_{fe}	$\frac{3f_{fe}.e^2}{4\pi^2 m}$
polarisabilité isotrope	α	$c_{fe} \frac{1}{\nu_{ef}^2 - \nu^2 - i\Gamma\nu}$
partie imaginaire	$\text{Im}(\alpha)$	$c_{fe} \frac{\nu\Gamma}{(\nu_{ef}^2 - \nu^2)^2 + (\Gamma\nu)^2}$
constante de passage	κ	$\frac{20\pi\mathcal{N}_a}{3\ln(10)\epsilon_0 c}$
extinction molaire	ϵ	$\kappa.\nu.\text{Im}(\alpha)$
force de bande	$I_{fe} = \int \epsilon(\nu) d\nu$	$\kappa.c_{fe} \frac{\pi}{2}$

TAB. 3.1 – résumé

grandeurs physiques	unité	valeur
f_{fe}	sans dimension	$\frac{1}{3}$
c_{fe}	$C^2 kg^{-1}$	$2,13.10^{-9} f_{fe}$
κ	$C^2 J^{-1} s^{-1}$	$1,45.10^{30}$
I	$M^{-1} cm^{-1} s^{-1}$	$4,35.10^{21} f_{fe}$

TAB. 3.2 – valeur numérique

Nous donnons également (Tab. 3.2) les ordres de grandeur obtenus pour une force d'oscillateur typique de 1/3. La valeur de I amène à un commentaire : si l'on considère une transition dans l'ultraviolet, à 100 nm de 10 nm de large soit en fréquence $\Gamma = 3.10^{17}$ Hz , on obtient alors pour $\epsilon_{max} = \frac{c_{fe}\kappa}{\Gamma} \approx 10000 M^{-1} cm^{-1}$ qui est un ordre de grandeur correct.

3.1.2 La force de rotation et les spectres de dichroïsme circulaire

Il s'agit dans cette section de voir comment la force de rotation (eq. 1.5) est reliée au spectre de dichroïsme circulaire. Même si la rédaction de cette section est très similaire à la précédente, les objectifs sont strictement opposés. Ici, ce que l'on souhaite, c'est pouvoir obtenir la valeur d'une force de rotation à partir d'un spectre de dichroïsme circulaire donné, et non construire un spectre à partir des opérateurs quantiques.

Cependant, partons de l'équation 3.3 appliquée à $\hat{\vec{x}} = \hat{\vec{m}}$, mais également à $\hat{\vec{x}} = \hat{\vec{d}}$. De plus, on considère l'hamiltonien d'interaction complet, avec les termes locaux et non locaux $\hat{H} = -\hat{\vec{d}} \cdot \vec{E} - \hat{\vec{m}} \cdot \vec{B}$. On note que l'on ne prend pas en compte le terme quadripolaire électrique car il s'annule à cause de la moyenne isotrope (résultat montré en annexe). Il vient alors

$$\begin{aligned}\vec{d} &= \vec{d}^{elec} + \frac{1}{\hbar} \sum_e \left(\frac{\vec{d}_{fe} (\vec{m}_{ef} \cdot \vec{B})}{\omega_{ef} - \omega - i\Gamma_{ef}} + \frac{\vec{d}_{ef} (\vec{m}_{fe} \cdot \vec{B})}{\omega_{ef} + \omega + i\Gamma_{ef}} \right) \\ \vec{m} &= \frac{1}{\hbar} \sum_e \left(\frac{\vec{m}_{fe} (\vec{d}_{ef} \cdot \vec{E})}{\omega_{ef} - \omega - i\Gamma_{ef}} + \frac{\vec{m}_{ef} (\vec{d}_{fe} \cdot \vec{E})}{\omega_{ef} + \omega + i\Gamma_{ef}} \right)\end{aligned}$$

où l'on a négligé le terme magnétique-magnétique, et regroupé le terme électrique-électrique dans $\vec{d}^{elec}$ et qui est donné dans 3.4. On observe ici 3 phénomènes :

- un dipôle électrique induit par le champ électrique $\vec{d}^{elec}$
- un dipôle magnétique induit par le champ électrique $\vec{m}^{elec}$
- un dipôle électrique induit par le champ magnétique $\vec{d}^{mag}$

Le premier phénomène, local, est responsable de l'absorption. Les deux derniers vont donner du dichroïsme circulaire. On note que si les fonctions d'onde sont choisies réelles, les éléments de matrice de l'opérateur dipolaire électrique sont réels symétriques, alors que ceux de l'opérateur dipolaire magnétique sont hermitiens imaginaires purs ($\hat{m} = \frac{-e}{2m} \hat{r} \hbar / i \hat{\nabla}$). Ceci permet d'arranger les expressions : en effet, on a $\hat{m}_{fe} = -\hat{m}_{ef}$ et $\hat{d}_{fe} = \hat{d}_{ef}$. Si on néglige les termes non résonnants, il vient

$$\vec{m}^{elec} = -\underline{\underline{\chi}} \vec{E} \quad \vec{d}^{mag} = \underline{\underline{\chi}} \vec{B}$$

$$\underline{\underline{\chi}} = \frac{1}{\hbar} \sum_e \frac{\vec{d}_{fe} \otimes \vec{m}_{ef}}{\omega_{ef} - \omega - i\Gamma_{ef}}$$

On effectue ici la moyenne isotrope qui donne :

$$\begin{aligned}\vec{d}_{fe} \otimes \vec{m}_{ef} &\rightarrow \frac{1}{3} \vec{d}_{fe} \cdot \vec{m}_{ef} \\ \underline{\underline{\chi}} &\rightarrow \chi = \frac{1}{3\hbar} \sum_e \frac{iR_{ef}}{\omega_{ef} - \omega - i\Gamma_{ef}}\end{aligned}$$

où l'on a fait apparaître la force de rotation introduite dans le premier chapitre :

$$R_{ef} = \text{Im}(\vec{d}_{fe} \cdot \vec{m}_{ef})$$

On note δ_1 , δ_2 l'énergie laissée par la lumière à travers, $\vec{m}^{elec}$ et $\vec{d}^{mag}$

$$\delta_1 = Im(\vec{d}^{mag} \cdot \vec{E}^*) = Im(\chi \vec{B} \cdot \vec{E}^*)$$

$$\delta_2 = Im(\vec{m}^{el} \cdot \vec{B}^*) = -Im(\chi \vec{E} \cdot \vec{B}^*)$$

Le champ électrique est celui d'une onde polarisée circulairement

$$\vec{E}_{G,D} = \frac{E_0}{\sqrt{2}} (\vec{x} \pm i\vec{y})$$

$$\vec{B}_{G,D} = \frac{1}{c} \vec{z} \times \vec{E} = \frac{E_0}{\sqrt{2}c} (\vec{y} \mp i\vec{x})$$

$$\vec{E}_{G,D} \cdot \vec{B}_{G,D}^* = \pm i \frac{E_0^2}{c} = -\vec{E}_{G,D}^* \cdot \vec{B}_{G,D}$$

Finalement, on obtient que $\delta_1 = \delta_2$. De plus l'expression de la différence d'énergie laissée par l'onde droite et l'onde gauche s'écrit

$$\delta_G - \delta_D = \frac{4E_0^2}{3\hbar c} \frac{R_{ef}\Gamma_{ef}}{(\omega_{ef} - \omega)^2 + \Gamma_{ef}^2}$$

Or d'après la section précédente, on sait lier une extinction molaire à une énergie cédée. Il vient donc

$$\Delta\epsilon = \frac{4\kappa}{\hbar c} \frac{\nu}{2\pi} \frac{R_{ef}\Gamma_{ef}}{(\nu_{ef} - \nu)^2 + \Gamma_{ef}^2} \quad \kappa = \frac{20\pi\mathcal{N}_a}{3\ln(10)\epsilon_0 c}$$

où l'on a renormalisé les Γ_{ef} . Il s'agit alors de lier cette expression à un spectre expérimental. L'intégration très facile est la suivante :

$$J = \int \frac{\Delta\epsilon(\nu)}{\nu} d\nu = \frac{2\kappa}{\hbar c} R_{ef} \quad (3.10)$$

Et ceci est la conclusion importante de ce paragraphe : si l'on a un spectre théorique ou expérimental de $\Delta\epsilon(\nu)$ la force de rotation se retrouve grâce à 3.10.

On peut alors estimer le facteur gyrotropique γ introduit lors du premier chapitre comme étant le rapport entre le dichroïsme circulaire et l'absorption :

$$\epsilon_{max} = \frac{c_{fe}\kappa}{\Gamma_{ef}} = \frac{\nu_{ef}\kappa}{\pi\hbar\Gamma_{ef}} |< f|d|e >|^2$$

$$\Delta\epsilon_{max} = \frac{2\kappa\nu_{ef}}{\pi\hbar c} \frac{R_{ef}}{\Gamma}$$

$$\gamma = \frac{\Delta\epsilon_{max}}{\epsilon_{max}} = \frac{2R_{ef}}{c |< f|d|e >|^2} = \frac{2}{c} \left| \frac{m_{ef}}{d_{ef}} \right|$$

Ce qui signifie que le rapport gyrotropique est directement lié au rapport de l'effet des transitions magnétique et électrique.

Etudions un peu les ordres de grandeur : déplacer 1 électron sur une distance de 0,1 Angstrom revient à créer un dipôle électrique de $1,6 \cdot 10^{-30} C.m$ et c'est l'ordre de grandeur du dipôle électrique. On note

$$1Debye = 3,336 \cdot 10^{-30} C.m$$

Examinons à présent le dipôle magnétique : $|m_{ef}|$ est de la forme $\frac{e\hbar}{2m} \int r \psi_e \frac{\partial \psi_f}{\partial r}$ où l'on a introduit les fonctions d'onde correspondant aux états e et f . L'ordre de grandeur pour un moment magnétique est donc le magnéton de Bohr μ_b avec

$$1BM = \mu_b = \frac{e\hbar}{2m} = 9,273.10^{-24} m^2 s^{-1} C$$

L'ordre de grandeur et l'unité pour la force de rotation sont le DBM (Debye-magnéton de Bohr) pour un système où $d_{ef} = 1$ Debye et $|m_{ef}| = 1.\mu_b$

$$R_{ef} = 1DBM = 3.09.10^{-53} m^3 C^2 s^{-1}$$

Pour un tel système, le rapport gyrotropique vaut approximativement 2.10^{-2} .

3.2 La théorie de la polarisabilité

La théorie de la polarisabilité formulée par DeVoe [9] et généralisée par Applequist [10] consiste à décomposer un système en plusieurs sous unités polarisables [49], appelées **chromophores**. On suppose que chaque électron du système n'est localisé que sur un seul chromophore. Le transfert de charge d'un chromophore à l'autre est donc supposé impossible. Sous cette hypothèse, on peut traiter l'interaction entre chromophores de manière parfaitement classique. Ceci nous permet alors de mener l'étude de manière simple, comparativement au traitement quantique complet qui est lui beaucoup plus lourd [50]. La détermination des moments de transition sur chaque sous unité reste quant à elle quantique et constitue le point de départ de nos calculs.

Il reste à savoir si l'interaction entre deux chromophores peut se réduire à un couplage de type dipôle-dipôle. Si l'on considère en effet deux chromophores très proches l'un de l'autre, sans qu'il puisse néanmoins y avoir transfert de charge, c'est alors une interaction monopôle-monopôle qui va dominer l'interaction des deux chromophores. Dans ce cas, le traitement exposé dans ce chapitre n'est plus valable, il faut utiliser la théorie des matrices [11] qui couple entre eux les monopôles, et non les dipôles.

3.2.1 Le couplage de n chromophores

Considérons donc une molécule, composée de n chromophores, que l'on repèrera avec l'indice i . Pour chaque unité i , on considère un certain nombre p_i de moments de transition dipolaires électriques, indicés is . On considère donc qu'il y a $N = \sum p_i$ transitions dans le système. Soit $\vec{u}_{is}$, le vecteur unitaire définissant la direction de la transition is . Sous l'action d'un champ électrique $\vec{E}$, cette transition va faire apparaître un dipôle $\vec{d}_{is}$, directement proportionnel au projeté orthogonal de $\vec{E}$ sur $\vec{u}_{is}$. On a donc

$$\vec{d}_{is} = a_{is} \left(\vec{E} \cdot \vec{u}_{is} \right) \vec{u}_{is} \quad (3.11)$$

où a_{is} est une fonction complexe de la fréquence du champ électrique excitateur, que l'on écrira d'après la section précédente :

$$a_{is} = \frac{c_{is}}{\nu_{is}^2 - \nu^2 - i\Gamma_{is}\nu},$$

ν_{is} est la fréquence de la transition associée au moment is , Γ_{is} est la largeur, c_{is} est la force de polarisation : $c_{is} = \frac{3f_{is}e^2}{4\pi^2m}$

Le dipôle total $\vec{d}_i$ apparaissant alors sur le chromophore i s'écrit alors

$$\vec{d}_i = \underline{\underline{\alpha}}^i \cdot \vec{E} \quad \underline{\underline{\alpha}}^i = \sum_{s=1}^{p_i} \frac{c_{is} \cdot \vec{u}_{is} \otimes \vec{u}_{is}}{\nu_{is}^2 - \nu^2 - i\Gamma_{is}\nu}$$

où $\underline{\underline{\alpha}}^i$ est la polarisabilité tensorielle du chromophore i

L'idée est maintenant de dire que chaque chromophore voit non seulement le champ électrique extérieur (*i.e.* de l'onde électromagnétique), mais également le champ électrique créé par tous les dipôles électriques instantanés situés sur les autres chromophores. Je rappelle donc l'expression du champ électrique $\vec{F}$ créé en un point M, par un dipôle $\vec{d}$ situé en 0, avec $\vec{OM} = r\vec{u}$

$$\vec{F} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0 r^3} \left(3\vec{d} \cdot \vec{u} - \vec{d} \right) \quad (3.12)$$

Il s'agit encore une fois d'utiliser la puissance de la notation tensorielle, en introduisant $\underline{\underline{T}}$ le tenseur d'interaction dipolaire,

$$\underline{\underline{T}}^{OM} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0 r^3} (\underline{\underline{I}} - 3\vec{u} \otimes \vec{u}) \quad (3.13)$$

l'équation 3.12 se réécrit donc plus synthétiquement.

$$\vec{F} = -\underline{\underline{T}}^{OM} \cdot \vec{d}$$

où la notation OM en exposant est là pour rappeler que T dépend explicitement de OM . Il s'agit à présent d'écrire le champ électrique local réellement vu par le chromophore i , que je note $\vec{E}_i^{loc}$

$$\vec{E}_i^{loc} = \vec{E} - \sum_{j \neq i} \sum_{t=1}^{p_j} \underline{\underline{T}}^{\vec{r}_{ji}} \cdot \vec{d}_{jt} \quad (3.14)$$

où le deuxième terme rend bien compte du champ créé par chaque dipôle $\vec{d}_{jt}$ sur le chromophore i . Conceptuellement, il est nécessaire de rappeler pourquoi on ne considère pas l'effet du champ créé par un dipôle sur un autre, lorsque les deux sont situés sur le même chromophore. Ceci a en effet déjà été pris en compte par les calculs de chimie quantique, qui ont permis la détermination de ces mêmes moments. Cela serait redondant de considérer cet effet "classiquement".

En réintroduisant l'expression de $\vec{E}_i^{loc}$ dans 3.11 il vient

$$\vec{d}_{is} = a_{is} (\vec{E} \cdot \vec{u}_{is}) \vec{u}_{is} - a_{is} \left(\sum_{j \neq i} \sum_{t=1}^{p_j} \vec{u}_{is} \cdot \underline{\underline{T}}^{\vec{r}_{ji}} \cdot \vec{d}_{jt} \right) \vec{u}_{is}$$

Soit, en notant $E_{is} = \vec{E} \cdot \vec{u}_{is}$

$$E_{is} = \frac{d_{is}}{a_{is}} + \sum_{j \neq i} \sum_{t=1}^{p_j} (\vec{u}_{is} \cdot \underline{\underline{T}}^{\vec{r}_{ji}} \cdot \vec{u}_{jt}) d_{jt}$$

Ceci est un système linéaire de $N = \sum p_i$ équations à N inconnues, il s'agit de déterminer les N scalaires d_{is} connaissant les N scalaires E_{is} , c'est à dire comprendre comment la matière se polarise en réponse au champ électrique extérieur. Ce système peut se réécrire sous forme matricielle

$$\underline{\underline{A}} \cdot \underline{\underline{D}} = \underline{\underline{E}} \quad (3.15)$$

où $\underline{\underline{E}}$ et $\underline{\underline{D}}$ sont les vecteurs comprenant les N E_{is} et les N d_{is} tandis que $\underline{\underline{A}}$ est une matrice contenant N^2 scalaires notés $A_{is,jt}$. Il s'agit de distinguer les termes diagonaux et non diagonaux

– sur la diagonale, $A_{is,is} = \frac{1}{a_{is}} = \frac{1}{c_{is}} (\nu_{is}^2 - \nu^2 - i\Gamma_{is}\nu)$, on retrouve le spectre d'absorption correspondant à chaque transition

– dans les termes non diagonaux, non nuls seulement pour $i \neq j$, on retrouve les termes de couplage dipolaire électrique $A_{is,jt} = \vec{u}_{is} \cdot \underline{\underline{T}}^{\vec{r}_{ji}} \cdot \vec{u}_{jt}$

Le but est de pouvoir exprimer les d_{is} en fonction des E_{is} , il faut pour cela inverser cette matrice. La technique usuelle adoptée est de décomposer $\underline{\underline{A}}$ en trois matrices, c'est à dire en développant par rapport à la diagonale.

$$\underline{\underline{A}} = \underline{\underline{S}} - \nu^2 \cdot \underline{\underline{\Delta}}^a - i\nu \cdot \underline{\underline{\Delta}}^b \quad (3.16)$$

où l'on a noté

- $\underline{\underline{S}}$ la matrice ayant sur la diagonale les termes $\frac{\nu_{is}^2}{c_{is}}$, les termes non diagonaux comprenant tous les couplages électriques. Une analyse rapide de 3.13 montre la symétrie du couplage électrique lors de la permutation des deux vecteurs ; le r du dénominateur étant une norme, il reste positif. Donc $\underline{\underline{S}}$ est bien **une matrice symétrique**
- $\underline{\underline{\Delta}}^a$ matrice diagonale composée des $\frac{1}{c_{is}}$
- $\underline{\underline{\Delta}}^b$ matrice diagonale composée des $\frac{f_{is}}{c_{is}}$

L'inversion de $\underline{\underline{A}}$ est basée sur la pseudo-diagonalisation de $\underline{\underline{S}}$. J'en rappelle brièvement le principe mathématique dans la section suivante.

3.2.2 La pseudodiagonalisation

Soient une matrice symétrique $\underline{\underline{S}}$, (et donc diagonalisable) et une matrice diagonale $\underline{\underline{\Delta}}$. Le but du problème est d'inverser la matrice $(\underline{\underline{\Delta}} + \underline{\underline{S}})$. On appelle pseudo vecteur propre $\underline{t}_n$ avec la valeur propre ν_n^2 , le vecteur vérifiant

$$\underline{\underline{S}}.\underline{t}_n = \nu_n^2 \underline{\underline{\Delta}}.\underline{t}_n$$

En écrivant ensuite, pour $n \neq m$

$${}^t \underline{t}_m . \underline{\underline{S}} . \underline{t}_n = \nu_n^2 . {}^t \underline{t}_m . \underline{\underline{\Delta}} . \underline{t}_n$$

$${}^t \underline{t}_n . \underline{\underline{S}} . \underline{t}_m = \nu_m^2 . {}^t \underline{t}_n . \underline{\underline{\Delta}} . \underline{t}_m$$

Il vient alors par symétrie de $\underline{\underline{\Delta}}$ et de $\underline{\underline{S}}$ que toutes les quantités ci-dessus sont égales, donc nulles car $\nu_n \neq \nu_m$. On peut donc pseudo-normaliser la base des $\underline{t}_n$ et obtenir une base pseudo-orthonormale, c'est à dire,

$${}^t \underline{t}_n . \underline{\underline{\Delta}} . \underline{t}_m = \delta_{nm} \quad (3.17)$$

$${}^t \underline{t}_m . \underline{\underline{S}} . \underline{t}_n = \nu_n^2 \delta_{nm}$$

Ces deux équations peuvent se réécrire matriciellement. On note $\underline{\underline{T}}$ la matrice des vecteurs colonnes $\underline{t}_n$, on a

$${}^t \underline{\underline{T}} . \underline{\underline{\Delta}} . \underline{\underline{T}} = \underline{\underline{1}} \quad (3.18)$$

Et, de manière analogue ${}^t \underline{\underline{T}} . \underline{\underline{S}} . \underline{\underline{T}}$ est la matrice diagonale des ν_n^2 . L'inversion de $\underline{\underline{\Delta}} + \underline{\underline{S}}$ se fait ensuite tout naturellement en posant $\underline{\underline{D}}_\nu$ la matrice diagonale des $1 + \nu_n^2$. L'équation 3.17 donne :

$${}^t \underline{\underline{T}} . (\underline{\underline{\Delta}} + \underline{\underline{S}}) . \underline{\underline{T}} = \underline{\underline{D}}_\nu$$

Soit en inversant cette équation, puis en multipliant à gauche par $\underline{\underline{T}}$, et à droite par ${}^t \underline{\underline{T}}$ il vient

$$(\underline{\underline{\Delta}} + \underline{\underline{S}})^{-1} = \underline{\underline{T}} . \underline{\underline{D}}_\nu^{-1} . {}^t \underline{\underline{T}} \quad (3.19)$$

Les coefficients $b_{i,j}$ de la matrice $(\underline{\underline{\Delta}} + \underline{\underline{S}})^{-1}$ s'expriment alors en fonction des composantes t_n^j des vecteurs $\underline{t}_n$

$$b_{i,j} = \sum_n \frac{t_n^i t_n^j}{1 + \nu_n^2}$$

Si l'on inverse 3.18 et que l'on multiplie à gauche par $\underline{\underline{T}}$, et à droite par ${}^t \underline{\underline{T}}$ il vient :

$$\underline{\underline{\Delta}}^{-1} = \underline{\underline{T}} . {}^t \underline{\underline{T}} \quad (3.20)$$

Cette formule nous sera utile par la suite pour démontrer les règles de fermeture pour les modes normaux.

3.2.3 La détermination des modes normaux

Le principe étant exposé, on peut à présent revenir à l'équation 3.16. Une première approche serait de poser naïvement $\underline{\underline{A}} = -\nu^2 \cdot \underline{\underline{A}}^a - i\nu \cdot \underline{\underline{A}}^b$ puis de dérouler la pseudo-diagonalisation. Ceci conduirait à une dépendance en fréquence extrêmement compliquée. Le but étant de construire de manière qualitative des spectres de dichroïsme circulaire, il s'agit de faire des hypothèses simplificatrices. Supposons que les Γ_{is} soient égaux. Dans ce cas, l'équation 3.16 se simplifie en :

$$\underline{\underline{A}} = \underline{\underline{S}} - (\nu^2 + i\nu\Gamma) \underline{\underline{A}}^a$$

Alors $\underline{\underline{A}}$ s'inverse de manière très simple. En effectuant la pseudo-diagonalisation par rapport à $\underline{\underline{A}} = \underline{\underline{A}}^a$ on obtient en utilisant 3.19, $\underline{\underline{B}} = \underline{\underline{A}}^{-1}$ de la forme :

$$B_{is,jt} = \sum_n \frac{t_n^{is} t_n^{jt}}{\nu_n^2 - \nu^2 - i\Gamma\nu} \quad (3.21)$$

où les t_n^{is} sont les N composantes du vecteur t_n .

Deux remarques s'imposent ici :

- 3.21 permet de comprendre l'interaction lumière matière en terme de modes normaux (n, t^n, ν_n). L'énergie est absorbée dans ces "modes globaux" de la molécule, et les transitions dipolaires électriques isolées n'ont plus de sens réel.
- le fait que les Γ_{is} soient tous différents n'est pas un problème en soi. Ces derniers correspondent en effet aux transitions isolées. Ils n'ont donc plus aucun sens dès que l'on a plongé les chromophores dans le bain constitué des autres chromophores. Il est clair que les interactions électrostatiques vont profondément modifier ces largeurs, et d'une façon compliquée. L'idée est donc de réintroduire de manière phénoménologique des largeurs Γ_n dans 3.21

On prendra donc pour expression de $\underline{\underline{B}}$:

$$B_{is,jt} = \sum_n \frac{t_n^{is} t_n^{jt}}{\nu_n^2 - \nu^2 - i\Gamma_n \nu}$$

En notant que 3.15 peut se réécrire $\underline{\underline{D}} = \underline{\underline{B}} \cdot \underline{\underline{E}}$. On peut alors remonter directement au dipôle électrique $\vec{d}$ créé dans la molécule :

$$\vec{d} = \sum_{is} d_{is} \vec{u}_{is} = \sum_{is,jt,n} \frac{t_n^{is} t_n^{jt}}{\nu_n^2 - \nu^2 - i\Gamma_n \nu} \vec{u}_{is} E_{jt}$$

Cette équation peut s'arranger alors de manière parfaitement compréhensible :

$$\vec{d} = \sum_n \vec{d}_n \quad \text{avec} \quad \vec{d}_n = \underline{\underline{\alpha}}^n \vec{E}$$

où l'on a introduit le dipôle électrique partiel $\vec{d}_n$ et la polarisabilité partielle $\underline{\underline{\alpha}}^n$ du mode normal n . On a donc :

$$\underline{\underline{\alpha}}^n = \sum_{is,jt} \frac{t_n^{is} t_n^{jt}}{\nu_n^2 - \nu^2 - i\Gamma_n \nu} \vec{u}_{is} \otimes \vec{u}_{jt}$$

la polarisabilité totale de la molécule s'écrivant :

$$\underline{\underline{\alpha}} = \sum_n \underline{\underline{\alpha}}^n$$

3.2.4 Le calcul de l'absorption

La détermination de ces modes normaux va désormais nous permettre de remonter de manière très directe à l'expression des spectres d'absorption. Je pose δ^n l'énergie électromagnétique déposée dans le mode n . D'après la première section, on a :

$$\delta^n = \vec{E}^* \text{Im}(\underline{\underline{Q}}^n) \vec{E} = \mathcal{L}_n(\nu) \vec{E}^* \underline{\underline{Q}}^n \vec{E} \quad (3.22)$$

$$\text{avec } \underline{\underline{Q}}^n = \sum_{is,jt} t_n^{is} t_n^{jt} (\vec{u}_{is} \otimes \vec{u}_{jt}) \quad , \quad \mathcal{L}_n(\nu) = \frac{\nu \Gamma_n}{(\nu_n^2 - \nu^2)^2 + \nu^2 \Gamma_n^2}$$

Après une moyenne isotrope, et en utilisant la première section, il vient

$$\epsilon = \kappa \sum_n \nu \mathcal{L}_n(\nu) O_n$$

$$O_n = \sum_{is,jt} t_n^{is} t_n^{jt} (\vec{u}_{is} \cdot \vec{u}_{jt})$$

Il s'agit à présent de vérifier la conservation de la règle de fermeture des forces d'oscillateurs. En effet, tous les électrons impliqués dans le système découplé interviennent encore après couplage. Les forces d'oscillateur du système découplé s'écrivaient, $f_{is} = \frac{c_{is} 4\pi^2 m}{3e^2}$, on introduit alors naturellement la force d'oscillateur du mode normal n :

$$f_n = \frac{O_n 4\pi^2 m}{3e^2}$$

Je rappelle que 3.20 nous donne $(\underline{\underline{\Delta}}^a)^{-1} = \underline{\underline{T}} \cdot {}^t \underline{\underline{T}}$. Ceci permet de dire que

$$\sum_n t_n^{is} t_n^{jt} = c_{is} \delta_{is,jt} \vec{u}_{is} \cdot \vec{u}_{jt} \quad (3.23)$$

il vient alors

$$\sum_n f_n = \frac{4\pi^2 m}{3e^2} \sum_{n,is,jt} t_n^{is} t_n^{jt} \vec{u}_{is} \cdot \vec{u}_{jt} = \sum_{is,jt} f_{is} \vec{u}_{is} \cdot \vec{u}_{jt} \delta_{is,jt}$$

Or les $\vec{u}_{is}$ ont été choisis normés, on a bien conservation de la règle de fermeture entre le système couplé et le système découplé :

$$\sum_n f_n = \sum_{is} f_{is}$$

3.2.5 La détermination du dichroïsme circulaire

Il s'agit à présent de calculer le dichroïsme circulaire. On introduit la polarisation circulaire droite (D) et gauche (G) de la lumière. Dans le repère du laboratoire $(\vec{x}, \vec{y}, \vec{z})$ ces polarisations s'écrivent :

$$\vec{E}_{G,D} = \frac{E_0}{\sqrt{2}} (\vec{x} \pm i\vec{y})$$

où la lumière se propage selon la direction $\vec{z}$. On étudie l'absorption de l'onde gauche par le mode normal n. D'après 3.22, il vient :

$$\delta_G^n = \mathcal{L}_n(\nu) \vec{E}_G^* \underline{\underline{Q}}^n \vec{E}_G$$

$$\delta_G^n = \mathcal{L}_n(\nu) \frac{|E_0|^2}{2} \sum_{is,jt} t_n^{is} t_n^{jt} (\vec{x} - i\vec{y}) (\vec{u}_{is} \otimes \vec{u}_{jt}) (\vec{x} + i\vec{y})$$

$$\delta_G^n = \mathcal{L}_n(\nu) \frac{|E_0|^2}{2} \sum_{is,jt} t_n^{is} t_n^{jt} [(u_{is}^x u_{jt}^x + u_{is}^y u_{jt}^y) + i(u_{is}^x u_{jt}^y - u_{is}^y u_{jt}^x)]$$

Le terme dans la deuxième parenthèse est antisymétrique dans l'interversion (is, jt) contrairement à $t_n^{is} t_n^{jt}$ qui est, lui, symétrique. Donc lorsque l'on effectue la somme sur tous les is, jt , le deuxième terme disparaît et il reste :

$$\delta_G^n = \mathcal{L}_n(\nu) \frac{|E_0|^2}{2} \sum_{is,jt} t_n^{is} t_n^{jt} (u_{is}^x u_{jt}^x + u_{is}^y u_{jt}^y) \quad (3.24)$$

Un traitement analogue pour l'onde droite donne $\delta_D^n = \delta_G^n$. Il n'y a donc pas de dichroïsme circulaire à ce niveau d'approximation. Ceci est logique, car pour le moment le champ électrique ne change pas d'un point à l'autre du système : ceci ne peut donc pas expliquer un signal de CD, d'après les considérations de la section 1.3. Il faut autoriser le champ électrique à varier d'un point à l'autre de la molécule

$$E_0 = \mathcal{I} e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}} \simeq \mathcal{I} (1 + i\vec{k} \cdot \vec{r})$$

Il peut apparaître illégitime de faire cette approximation non locale si tardivement dans le traitement. Afin de m'assurer que tout est correct, je reviens à l'équation 3.14

$$\vec{E}_i^{loc} = \vec{E}(r_i) - \sum_{k \neq i} \sum_{t=1}^{p_k} \underline{\underline{T}}^{\vec{r}_{ki}} \cdot \vec{d}_{kt}$$

où nous avons exprimé le champ local effectivement vu par le chromophore i . Si l'on autorise $\vec{E}$ à varier, il faut aussi autoriser le champ créé par les autres dipôles à varier, ce qui est synonyme de "**prendre des potentiels retardés**". Lorsque l'on va passer d'un chromophore i à j , la variation du premier terme va être $E i \vec{k} \cdot \vec{r}_{ij}$ alors que le deuxième terme ne variera que en $\underline{\underline{T}} \cdot d i \vec{k} \cdot \vec{r}_{ij}$.

Le champ créé par un dipôle sur un autre étant très inférieur au champ extérieur, $\underline{\underline{T}} \cdot d \ll E$ on peut donc négliger la non localité dans le terme de couplage électrostatique. Tout le traitement se fait donc exactement de la même manière sauf qu'au lieu de considérer le vecteur $\underline{\underline{\mathcal{E}}}$ des E_{is} , ce sera le vecteur des $E_{is}(r_i)$. En posant alors :

$$\delta_G^n = \delta_{G,loc}^n + \delta_{G,nloc}^n$$

où le terme local $\delta_{G,loc}^n$ est donné par 3.24, le terme non local s'écrit :

$$\delta_{G,loc}^n = \mathcal{L}_n(\nu) \frac{|\mathcal{E}|^2}{2} \sum_{is,jt} t_n^{is} t_n^{jt} \vec{k} \cdot (\vec{r}_i - \vec{r}_j) (\vec{x} - i\vec{y}) (\vec{u}_{is} \otimes \vec{u}_{jt}) (\vec{x} + i\vec{y})$$

Sauf que cette fois, le terme $\vec{r}_i - \vec{r}_j$ est antisymétrique dans l'inversion de i et j . Il vient donc :

$$\delta_{G,loc}^n = -\mathcal{L}_n(\nu) \frac{|\mathcal{E}|^2}{2} \sum_{is,jt} t_n^{is} t_n^{jt} \vec{k} \cdot (\vec{r}_i - \vec{r}_j) (u_{is}^x u_{jt}^y - u_{is}^y u_{jt}^x)$$

Nous avons fait ce traitement pour une direction de propagation $\vec{z}$ donc $\vec{k}$ est suivant cette même direction. Finalement cette expression s'arrange en notant $\vec{r}_{ij} = \vec{r}_j - \vec{r}_i$

$$\delta_{G,loc}^n = \mathcal{L}_n(\nu) \frac{k |\mathcal{E}|^2}{2} \sum_{is,jt} t_n^{is} t_n^{jt} (\vec{z} \cdot \vec{r}_{ij}) [(\vec{u}_{is} \times \vec{u}_{jt}) \cdot \vec{z}]$$

En effectuant le calcul pour $\delta_{D,loc}^n$, on trouve l'expression de signe contraire. Il vient alors une fois de plus en utilisant la notation tensorielle :

$$\delta_G - \delta_D = k |\mathcal{E}|^2 \sum_n \mathcal{L}_n(\nu) \vec{z} \cdot \underline{\underline{Q}}^n \vec{z}$$

$$\text{avec } \underline{\underline{Q}}^n = \sum_{is,jt} t_n^{is} t_n^{jt} \vec{r}_{ij} \otimes (\vec{u}_{is} \times \vec{u}_{jt}) \quad (3.25)$$

Il s'agit alors de faire la moyenne sur toutes les orientations moléculaires possibles, le produit tensoriel se transforme en produit scalaire. On note également que $k = \frac{2\pi\nu}{c}$ et en utilisant 3.8

$$\Delta\epsilon = \kappa \frac{2\pi}{c} \sum_n \nu^2 \mathcal{L}_n(\nu) Q_n$$

$$Q_n = \sum_{is,jt} t_n^{is} t_n^{jt} \vec{r}_{ij} \cdot (\vec{u}_{is} \times \vec{u}_{jt}) \quad , \quad \mathcal{L}_n(\nu) = \frac{\nu \Gamma_n}{(\nu_n^2 - \nu^2)^2 + \nu^2 \Gamma_n^2}$$

Le but est à présent de relier Q_n à la force de rotation R_n de la bande n . Pour cela j'utilise 3.10 :

$$\int \frac{\Delta\epsilon(\nu)}{\nu} d\nu = \frac{2\kappa\pi}{c} \frac{\pi}{2} Q_n = \frac{2\kappa}{\hbar c} R_n$$

Où l'on a mené l'intégration de $\nu \mathcal{L}_n(\nu)$ exactement de la même façon que pour 3.9 en se plaçant proche des résonances. Finalement la force de rotation s'écrit :

$$R_n = \frac{\pi^2 \hbar}{2} Q_n$$

Vérifions à présent la règle de somme pour les forces de rotation :

$$\sum_n R_n = \frac{\pi^2 \hbar}{2} \sum_n Q_n = \frac{\pi^2 \hbar}{2} \sum_{n,is,jt} t_n^{is} t_n^{jt} \vec{r}_{ij} \cdot (\vec{u}_{is} \times \vec{u}_{jt})$$

Donc en réécrivant 3.23 :

$$\sum_n t_n^{is} t_n^{jt} = c_{is} \delta_{is,jt} \vec{u}_{is} \cdot \vec{u}_{jt}$$

On annule le produit mixte. On a donc bien

$$\sum_n R_n = 0$$

Evaluons ensuite le facteur gyrotropique :

$$\Delta\epsilon_{max} = \frac{2\kappa\pi\nu_n}{c\Gamma_n} Q^n \quad \epsilon_{max} = \frac{\kappa O^n}{\Gamma_n}$$

Soit finalement

$$\gamma_n = \frac{1}{\lambda_n} \frac{Q^n}{O^n} \approx \frac{r_{ij}}{\lambda_n}$$

où λ_n est la longueur d'onde de la transition. On retrouve les considérations de non-localité du premier chapitre. Ici le facteur gyrotropique est directement lié au rapport entre la longueur d'onde et la distance entre deux chromophores. Vérifions les ordres de grandeur. Pour la myoglobine à 400 nm, si l'on prend le couplage entre deux chromophores situés à 1 Angstrom l'un de l'autre, $\gamma_n = 2,5 \cdot 10^{-4}$ ce qui confirme l'ordre de grandeur donné à la section 1.1.

3.2.6 Le résumé du calcul

Dans cette section nous résumons les différentes étapes qui permettent de calculer pratiquement un spectre de CD à partir des considérations théoriques précédentes.

1. La première étape consiste à rechercher la structure tridimensionnelle du système étudié ; on le divise ensuite en chromophores indépendants, i . En pratique, il existe des bases de données des structures des protéines (Protein Data Bank) établies par diffraction de rayons X. Ceci permet de connaître la position relative $\vec{r}_{ij}$ des chromophores.
2. La deuxième étape consiste à demander à des chimistes quantiques de calculer les transitions dipolaires électriques de chaque chromophores. Les données suivantes sont indispensables :
 - la force d'oscillateur f_{is}
 - la fréquence de la transition ν_{is}
 - la direction de la transition $\vec{u}_{is}$
3. La troisième étape consiste à remplir la matrice $\underline{\underline{S}}$ et la matrice $\underline{\underline{\Delta}}^a$. On pose la force de polarisabilité $c_{is} = \frac{3f_{is}e^2}{4\pi^2m}$.
 - les éléments diagonaux de $\underline{\underline{S}}$ sont les $\frac{\nu_{is}^2}{c_{is}}$
 - les éléments non diagonaux de $\underline{\underline{S}}$ sont les $\underline{u}_{is} \cdot \underline{\underline{T}}^{\vec{r}_{ji}} \cdot \underline{u}_{jt}$
 - $\underline{\underline{\Delta}}^a$ est la diagonale des $\frac{1}{c_{is}}$
4. La quatrième étape consiste à pseudo-diagonaliser $\underline{\underline{S}}$ par rapport à $\underline{\underline{\Delta}}^a$, c'est une procédure standard de tout bon logiciel de calcul (MathLab, Mathématique). On obtient alors les t_n^{is} et les ν_n .
5. La cinquième étape consiste à calculer O_n et Q_n

$$O_n = \sum_{is,jt} l_n^{is} l_n^{jt} (\vec{u}_{is} \cdot \vec{u}_{jt}) \quad Q_n = \sum_{is,jt} l_n^{is} l_n^{jt} \vec{r}_{ij} \cdot (\vec{u}_{is} \times \vec{u}_{jt})$$

Ceci permet de remonter à la force d'oscillateur et à la force de rotation du mode n :

$$f_n = \frac{O_n \cdot 4\pi^2 m}{3e^2} \quad R_n = \frac{\pi^2 \hbar}{2} Q_n$$

6. La dernière étape consiste à calculer des spectres, en ajustant les Γ_n aux spectres expérimentaux.

$$\epsilon = \kappa \cdot \sum_n \nu \mathcal{L}_n(\nu) O_n \quad \Delta\epsilon = \kappa \frac{2\pi}{c} \sum_n \nu^2 \mathcal{L}_n(\nu) Q_n$$

$$\mathcal{L}_n(\nu) = \frac{\nu \Gamma_n}{(\nu_n^2 - \nu^2)^2 + \nu^2 \Gamma_n^2} \quad \kappa = \frac{20\pi \mathcal{N}_a}{3 \ln(10) \epsilon_0 c}$$

3.3 Le couplage de deux chromophores

Nous nous attacherons dans cette section à utiliser les concepts mis en place dans la section précédente. Nous commencerons par traiter complètement le cas de deux oscillateurs couplés dans le cas dégénéré (partie 3.3.1) et dans le cas non dégénéré (partie 3.3.2). Le but est de comprendre plus précisément la sensibilité d'une expérience de CD. Nous utiliserons ensuite le formalisme tensoriel développé précédemment afin de traiter le CD anisotrope (partie 3.3.3).

3.3.1 Le cas dégénéré

On considère donc deux chromophores identiques, A et B (Fig. 3.1). Il n'y a qu'une seule transition électronique, donc de force d'oscillateur 1/3. En notant $c_0 = \frac{e^2}{4\pi^2 m}$, la polarisabilité du chromophore A s'écrit donc :

$$\underline{\underline{\alpha}} = c_0 \frac{\vec{u}_a \otimes \vec{u}_a}{\nu_0^2 - \nu^2 - i\Gamma\nu}$$

De même pour le chromophore B. On prendra $\vec{u}_a = \vec{x}$ et $\vec{u}_b = \cos(\theta)\vec{x} + \sin(\theta)\vec{y}$, et le vecteur $\vec{r}_{ab}$ rejoignant les deux chromophores est suivant $\vec{z}$.

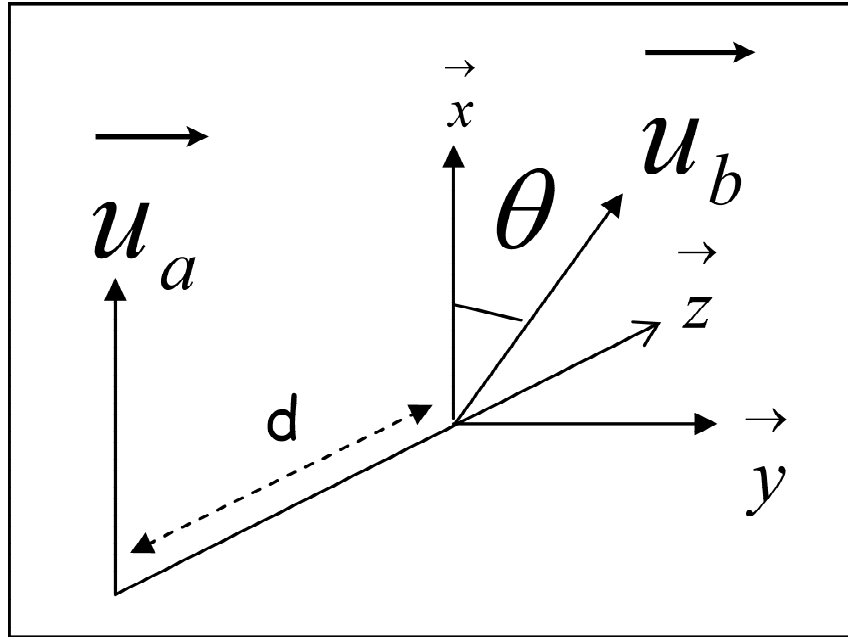


FIG. 3.1 – La schématisation de deux oscillateurs couplés

Avant de commencer le moindre calcul, une remarque s'impose. Si θ vaut 0 ou $\frac{\pi}{2}$ le système devient non chiral car il est alors symétrique par rapport au plan (x,z). Ces deux valeurs de θ devront d'une manière ou l'autre annuler le dichroïsme circulaire.

La première étape du traitement est de remplir la matrice $\underline{\underline{A}}$. Dans ce cas très simple le champ que A exerce sur B vaut d'après 3.12 $-\frac{\vec{u}_b}{4\pi\epsilon_0 d^3}$ et symétriquement pour le champ exercé par B sur

A. La matrice $\underline{\underline{A}}$ s'écrit donc :

$$\underline{\underline{A}} = \begin{pmatrix} \frac{\nu_0^2}{c_0} & \eta \\ \eta & \frac{\nu_0^2}{c_0} \end{pmatrix} \quad \text{avec} \quad \eta = \frac{\cos\theta}{4\pi\epsilon_0 d^3}$$

Il s'agit ensuite de pseudo-diagonaliser $\underline{\underline{A}}$ par rapport à $\frac{1}{c_0}\underline{\underline{1}}$, ce qui est dans ce cas particulier est une diagonalisation toute simple. On trouve deux modes normaux 1 et 2 :

$$\begin{aligned} t_1^a &= t_1^b = \sqrt{\frac{c_0}{2}} & \nu_1^2 &= \nu_0^2 + \eta c_0 \\ t_1^a &= -t_1^b = \sqrt{\frac{c_0}{2}} & \nu_2^2 &= \nu_0^2 - \eta c_0 \end{aligned}$$

Dans cette géométrie extrêmement simple, on peut écrire que :

$$\vec{u}_a \cdot \vec{u}_b = \cos(\theta) \quad \vec{r}_{ab} \cdot \vec{u}_a \times \vec{u}_b = d \sin(\theta)$$

On obtient alors comme paramètre pour les spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire :

$$O_1 = c_0(1 + \cos\theta) \quad O_2 = c_0(1 - \cos\theta)$$

$$Q_1 = -Q_2 = c_0 d \sin\theta$$

$\mathcal{L}_1(\nu)$ et $\mathcal{L}_2(\nu)$ sont les deux lorentziennes centrées respectivement sur ν_1 et ν_2 . Si l'on fait l'hypothèse raisonnable que $c_0\eta \ll \Gamma$ alors on a :

$$\mathcal{L}_1(\nu) + \mathcal{L}_2(\nu) = 2\mathcal{L}_0(\nu)$$

où $\mathcal{L}_0$ est la lorentzienne centrée en ν_0 . Posons $g(\nu)$ la différence des deux lorentziennes :

$$g(\nu) = \mathcal{L}_1(\nu) - \mathcal{L}_2(\nu)$$

On représente (Fig. 3.2) l'allure de $\mathcal{L}_1(\nu)$, $\mathcal{L}_2(\nu)$, pour une levée de dégénérescence très conséquente, $c_0\eta = \Gamma/5$

L'extinction molaire peut s'écrire comme suit :

$$\epsilon = \epsilon_\infty + \epsilon_{\text{couplage}}$$

où l'on définit ϵ_∞ comme étant l'absorption du système où l'on a éteint le couplage électrostatique. Toute la dépendance en d et θ se retrouve alors dans $\epsilon_{\text{couplage}}$:

$$\epsilon_{\text{couplage}} = \kappa c_0 \cos\theta \nu g(\nu) \quad \epsilon_\infty = 2\kappa c_0 \nu \mathcal{L}_0(\nu)$$

On trouve de même pour le dichroïsme circulaire

$$\Delta\epsilon = \kappa \frac{2\pi}{c} c_0 d \sin\theta \nu^2 g(\nu)$$

La forme obtenue pour le spectre de CD est alors caractéristique du couplage excitonique. On retrouve les considérations de la partie 1.4 : $\Delta\epsilon$ mais également $\epsilon_{\text{couplage}}$ dépendent doublement de la géométrie du système. En effet, $g(\nu)$ est directement proportionnelle à la levée de dégénérescence, ηc_0 , donc à $\cos\theta/d^3$

On vérifie alors la nullité du dichroïsme circulaire pour θ valant π et $\pi/2$

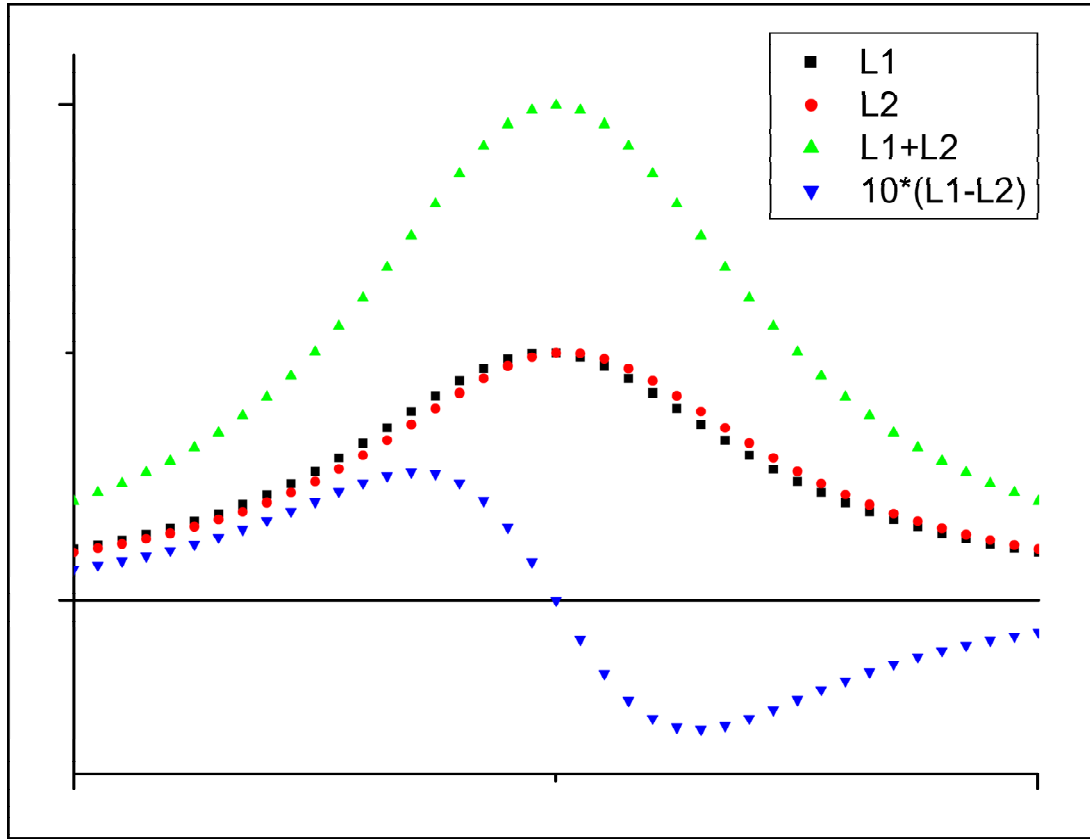


FIG. 3.2 – La structure excitonique

- quand $\theta = \frac{\pi}{2}$, Q_1 est important, mais les deux dipôles ne sont pas couplés car le champ électrique rayonné par le premier est orthogonal au second, donc $g(\nu) \equiv 0$
- quand $\theta = 0$ cette fois les deux dipôles sont idéalement couplés mais $Q_1=Q_2=0$

Comparons la sensibilité relative de $\Delta\epsilon$ et de $\epsilon_{couplage}$ à la géométrie du système :

$$\Delta\epsilon \propto \frac{\sin\theta\cos\theta}{d^2} \quad , \quad \epsilon_{couplage} \propto \frac{\cos^2\theta}{d^3}$$

Il est appréciable de noter que $\Delta\epsilon$ est une sonde en $1/d^2$, donc plus globale que $\epsilon_{couplage}$ qui est lui en $1/d^3$. Autrement dit, le CD permet de voir des chromophores plus éloignés. Cependant, le point important est la comparaison directe de $\Delta\epsilon$ et de $\epsilon_{couplage}$:

$$\frac{\Delta\epsilon}{\epsilon_{couplage}} = 4\pi^2 \tan\theta \frac{d}{\lambda} \ll 1$$

Dans ce cas simple de deux oscillateurs, on arrive à la conclusion que l'absorption est plus sensible aux changements de géométrie que le dichroïsme circulaire ! Cependant, la mesure du dichroïsme circulaire est une mesure sur fond noir : dès que l'on parvient à la mesurer, on devient très sensible à la géométrie. Alors que la partie de l'absorption intéressante reste très petite par rapport à l'absorption globale.

Analysons alors la pertinence d'une expérience de CD résolue temporellement dans ce système modèle. La pompe vient changer l'état électronique du système, *i.e.*, les forces de polarisation et

les fréquences des transitions. Simultanément, un changement de géométrie du système commence, par exemple, θ change.

Une mesure de ϵ renseigne principalement sur les changements de ϵ_∞ car on a $\epsilon_\infty \gg \epsilon_{couplage}$. On sera donc sensible aux déplacements des bandes d'absorption et aux changements de leurs intensités. Lorsque l'on fait donc la différence entre les deux états, système perturbé par la pompe - système non perturbé, les effets purement électroniques (changement d'état, rôle du solvant etc...) sont responsables de la quasi-totalité du changement. Les fluctuations inhérentes à une expérience pompe-sonde (variation aléatoire de l'intensité de la pompe ou dérive systématique de la superposition des faisceau en fonction du retard) rendent l'extraction de $\epsilon_{couplage}$ impossible.

Une mesure de dichroïsme circulaire résolue temporellement permet d'accéder **simultanément** à ϵ (donc ϵ_∞) et $\Delta\epsilon$. La sensibilité de cette mesure réside dans cette dualité.

- On retrouve dans ϵ_∞ tous les changements électroniques
- L'intérêt de $\Delta\epsilon$ est d'avoir une mesure sur fond noir, où les changements électroniques et conformationnels ont des incidences comparables.

C'est la comparaison de ces deux mesures qui permet d'isoler l'information sur les changements de géométrie du système.

Nous terminerons cette section avec une note optimiste. Le système modèle étudié dans cette section est trop simple pour que l'on puisse tirer une conclusion générale sur le rapport entre $\Delta\epsilon$ et $\epsilon_{couplage}$. Nous verrons en effet dans le cas de la myoglobine les chromophores responsables de la levée de dégénérescence sont différents de ceux qui contribuent efficacement à Q_n ...

3.3.2 Le cas non dégénéré

Dans cette section, on considère cette fois que les deux transitions sont à des fréquences différentes ν_a et ν_b , mais cas d'école, on considère que l'on a la même force de polarisation. La matrice $\underline{\underline{A}}$ se remplit de manière analogue à la section précédente.

$$\underline{\underline{A}} = \begin{pmatrix} \frac{\nu_a^2}{c_0} & \eta \\ \eta & \frac{\nu_b^2}{c_0} \end{pmatrix} \quad \text{avec} \quad \eta = \frac{\cos\theta}{4\pi\epsilon_0 d^3}$$

La pseudo diagonalisation conduit à l'équation aux valeurs propres suivantes :

$$(\nu_a^2 - \nu^2)(\nu_b^2 - \nu^2) = \eta^2 c_0^2$$

On considère de plus que la dégénérescence est grande devant le couplage ie $\nu_a^2 - \nu_b^2 \gg \eta^2 c_0^2$ et ceci permet d'écrire une valeur approchée des deux fréquences propres :

$$\nu_1^2 = \nu_a^2 + \frac{\eta^2 c_0^2}{\nu_a^2 - \nu_b^2} \quad \nu_2^2 = \nu_b^2 - \frac{\eta^2 c_0^2}{\nu_a^2 - \nu_b^2}$$

Sous cette hypothèse de faible couplage, les modes normaux sont très proches des modes non couplés

$$t_1^a = \sqrt{c_0} \quad t_1^b = \frac{\eta c_0}{\nu_a^2 - \nu_b^2} t_1^a$$

$$t_2^a = -\frac{\eta c_0}{\nu_a^2 - \nu_b^2} t_1^b \quad t_2^b = \sqrt{c_0}$$

On obtient alors comme paramètres pour les spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire :

$$O_1 = c_0(1 + \frac{2\eta c_0}{\nu_a^2 - \nu_b^2} \cos\theta) \quad O_2 = c_0(1 - \frac{2\eta c_0}{\nu_a^2 - \nu_b^2} \cos\theta)$$

$$Q_1 = -Q_2 = \frac{2\eta c_0^2}{\nu_a^2 - \nu_b^2} d \sin\theta$$

Il apparaît donc deux bandes distinctes, parfaitement séparées. L'absorption est centrée sur ν_1 et ν_2 avec O_1 et O_2 . Les deux bandes de CD sont centrées aux mêmes fréquences, avec des signes opposés. Les considérations de sensibilités relatives entre l'absorption et le CD sont les mêmes que la section précédente. En effet, si l'on considère, par exemple, le mode 1 on obtient les relations suivantes :

$$\epsilon^1 = \epsilon_\infty^1 + \epsilon_{couplage}^1$$

$$\epsilon_\infty^1 = \kappa c_0 \nu \mathcal{L}_1(\nu) \quad \epsilon_{couplage}^1 = \frac{2\eta c_0}{\nu_a^2 - \nu_b^2} \cos\theta \epsilon_\infty^1 \quad \Delta\epsilon^1 = 4\pi^2 \tan\theta \frac{d}{\lambda} \epsilon_{couplage}^1$$

Considérons à présent deux dipôles a et b avec des forces d'oscillateurs f_a et f_b . Le point important de ce paragraphe se résume dans la formule suivante

$$Q_1 \propto \frac{f_a f_b \sin\theta \cos\theta}{(\nu_a^2 - \nu_b^2) d^2}$$

On voit que la force d'oscillateur va dépendre non seulement de la géométrie, mais également de la différence des fréquences. Cette formule permet de justifier les considérations de la section 1.5 car elle permet de déterminer les chromophores importants.

Si l'on double la distance entre 2 résidus, et que l'on souhaite garder la même valeur de CD, il faut soit :

- multiplier une des deux forces d'oscillateur par 4
- diminuer l'écart en fréquence par 2 (à moyenne constante)

Ceci illustre que le critère de la distance entre les chromophores reste le plus important. Par exemple, dans le cas de la myoglobine, on couple une transition visible de l'hème (420 nm) avec des transitions dans l'ultra violet (entre 150 nm et 300 nm). L'écart en fréquence reste donc du même ordre de grandeur pour tous les résidus, (facteur 2). En revanche, la dispersion des distances entre l'hème et les résidus va de ~ 2 Angstroms à 10 Angstroms, soit un facteur 25.

3.3.3 Le rôle de l'anisotropie

Tous les calculs précédents se sont intéressés à des milieux isotropes. Cependant, on ne peut pas toujours se contenter de cette simplification et il est important de considérer le cas de milieux non isotropes. En effet, le rôle de l'anisotropie est crucial lorsque l'on parle d'absorption ou de dichroïsme circulaire résolu temporellement. L'excitation pompe est responsable d'une photo-sélection. Ceci signifie que toutes les molécules en solution ne vont pas être excitées de la même façon.

Distinguons deux cas

1. Si la pompe est dépolarisée, ou bien encore si elle est polarisée circulairement, toutes les transitions dipolaires parallèles à la direction de propagation ne seront pas excitées (l'excitation se faisant selon le champ électrique). Dans ce cas, on excite deux directions x et y (z étant la direction de propagation).
2. Si le faisceau pompe est polarisé linéairement selon x , tous les dipôles parallèles à y ou z ne seront pas excités

L'anisotropie dans une expérience pompe-sonde peut s'avérer très utile pour mesurer des temps de rotation en phase liquide. Mais en règle générale, ce phénomène est très gênant. En effet, si la transmission du système change avec le temps, on ne va pas savoir s'il s'agit réellement d'un changement d'état, ou d'une rotation de l'espèce excitée. Lors d'une expérience pompe-sonde traditionnelle, on arrive à régler le problème grâce à "l'angle magique" [51] : La pompe et la sonde sont polarisées linéairement avec un angle θ entre les deux, tel que

$$\cos\theta = \frac{1}{\sqrt{3}}$$

Ceci permet de regrouper toute la réponse non isotrope du système dans une direction orthogonale à la polarisation de sonde. En revanche, pour une expérience de dichroïsme circulaire résolu en temps, il n'y a pas d'angle magique car la sonde est circulaire. Il s'agit donc de bien comprendre l'influence de l'anisotropie.

Examinons dans un premier temps le cas de l'absorption. On considère que toutes les molécules sont orientées dans la même direction, et il s'agit d'étudier l'absorption d'une onde non polarisée en fonction de la direction de propagation. Cette notion ne doit pas être confondue avec le dichroïsme linéaire qui représente la différence d'absorption pour deux polarisations de la lumière orthogonales (ici le faisceau est dépolarisé).

L'approche tensorielle développée dans la section 3.2 est très générale et nous permet d'obtenir cette information directement : on utilise 3.22. Le paramètre $\mathcal{O}_n^Z$ correspondant à l'absorption d'une lumière dépolarisée se propageant selon $\vec{Z}$ s'écrit :

$$\mathcal{O}_n^Z = \frac{1}{2} \left(\vec{X} \underline{\underline{O}}^n \vec{X} + \vec{Y} \underline{\underline{O}}^n \vec{Y} \right)$$

On utilise maintenant 3.25 pour calculer le dichroïsme circulaire anisotrope. Le paramètre $\mathcal{Q}_n^Z$ correspondant au CD d'une lumière se propageant selon $\vec{Z}$ est

$$\mathcal{Q}_n^Z = \vec{Z} \underline{\underline{Q}}^n \vec{Z}$$

Nous illustrons (Fig. 3.3) l'effet de l'anisotropie dans une base de Tröger [52]. C'est une molécule composée de deux chromophores identiques. X désigne l'axe C_2 de la molécule, Y rejoint les deux azotes tandis que Z est orthogonal aux deux précédents. On constate que l'absorption dépend de la direction de propagation mais beaucoup moins que le dichroïsme circulaire. Un calcul annexe montre même que si l'on se propage selon l'axe reliant le centre des deux chromophores, le CD est maximum, et il est nul pour toutes les directions orthogonales à cet axe !

Ceci est assez intuitif lorsque l'on sait que le CD est un phénomène non local : si la lumière vient sonder simultanément les deux chromophores, il n'y aura pas d'activité optique. En revanche, si au cours de la propagation, on rencontre un chromophore, puis l'autre, le CD est alors maximal. Il est relié à la phase cumulée au cours de la propagation entre les deux interactions avec chaque chromophore.

Nous reviendrons sur le dichroïsme circulaire anisotrope à l'occasion de la section 4.2.3, lorsqu'il s'agira d'évaluer l'importance de ce phénomène lors de la réaction de photodissociation de MbCO.

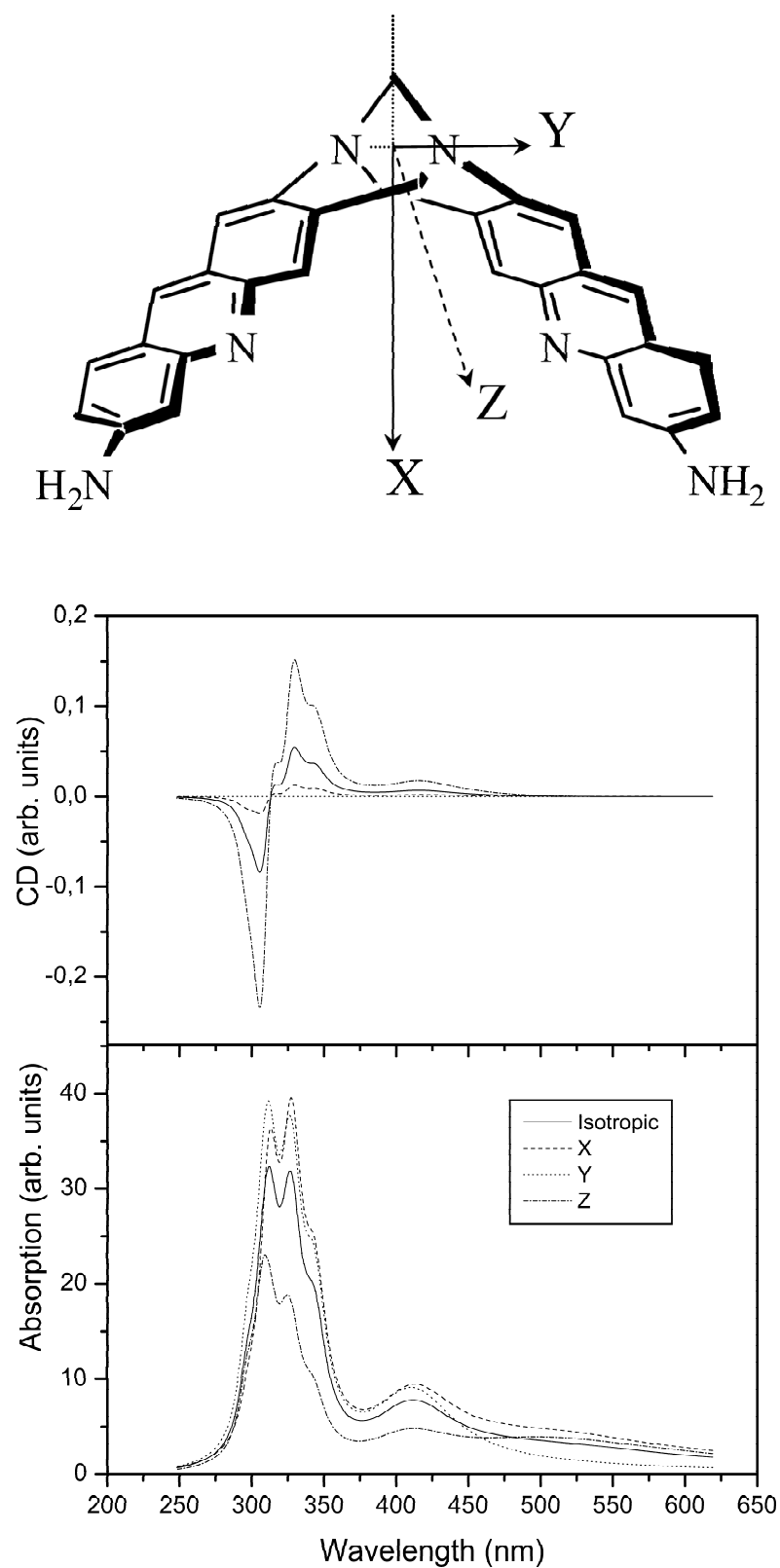


FIG. 3.3 – L'anisotropie dans une base de Tröger

3.4 Le dichroïsme circulaire dans la myoglobine

Le but de cette section est de présenter les calculs de spectres de dichroïsme circulaire que nous avons effectués dans la myoglobine. Nous commencerons tout d'abord par revenir sur le calcul historique de Hsu et Woody. Ce travail extrêmement complet nous a servi de base pour mener notre développement théorique. On peut légitimement s'interroger sur l'utilité de refaire "en moins bien" ces calculs. L'étude de Hsu et Woody est en effet déjà très complète.

En fait, notre objectif est de calculer non seulement le spectre de CD de MbCO, mais aussi celui de Mb et de différentes configurations intermédiaires (entre MbCO et Mb). Et ceci constitue un résultat nouveau, car l'étude de Hsu et Woody s'était limitée à MbCO. Il s'agit donc d'un calcul laborieux, mais indispensable pour qui souhaite pouvoir interpréter un résultat expérimental de dichroïsme circulaire résolu temporellement dans MbCO.

Après avoir rappelé le travail de Hsu et Woody (3.4.1), nous décrirons les paramètres que nous avons choisis pour mener cette étude (3.4.2). Nous exposerons ensuite les calculs et résultats obtenus dans le cas de MbCO et Mb (3.4.3), puis dans le cas de quelques configurations intermédiaires (3.4.4).

3.4.1 Le calcul historique de Woody

Le travail de Woody est reporté dans deux articles. Dans un premier article en 1971 [13], Hsu et Woody calculent le CD de MbCO basé sur les expressions quantiques de Tinoco [7]. Cet article constitue le point de départ de ce travail. Il montre en effet que le CD dans la myoglobine peut s'expliquer comme le couplage entre les transitions électroniques de l'hème avec les résidus aromatiques environnants.

En 1993, en collaboration avec Blauer [53], Woody revient sur ce modèle en montrant que la chiralité intrinsèque de l'hème et d'autres chromophores polarisables peut avoir une contribution non négligeable. Autrement dit, des transitions magnétiques de l'hème (chiralité à un électron exposée dans la section 1.3) doivent être prises en compte si l'on souhaite être parfaitement rigoureux.

Cependant, étant donné le caractère semi empirique de nos calculs, nous nous sommes arrêtés à l'article de 1971, dont nous exposons à présent les principaux résultats.

Hsu et Woody se sont limités au mécanisme des oscillateurs couplés, en utilisant des outils théoriques différents de ceux présentés dans ce chapitre, mais qui donne le même résultat : les forces de rotation s'expriment comme des combinaisons linéaires de produits mixtes de la forme $\vec{r}_{ab} \cdot \vec{u}_a \times \vec{u}_b$.

Leur étude a donc consisté à calculer le couplage des transitions électroniques de l'hème avec toutes les autres transitions électroniques situées sur la protéine afin d'isoler les contributions les plus importantes. Voici un résumé des valeurs obtenues :

- Le couplage avec les 12 résidus aromatiques les plus proches de l'hème contribue à hauteur de 0.5 DBM à la bande de CD à 420 nm. (Sur les 23 résidus aromatiques que comprend la myoglobine, la moitié sont situés à moins de 12 Angstroms)

- Le couplage avec les chaînes latérales non aromatiques (transition alkyle) est de 0.04 DBM
- Le couplage avec les transitions de toutes les liaisons peptidiques (à l'exception des hélices A et D, très éloignées) est de 0.003 DBM

On rappelle que DBM signifie Debye Magnéton de Bohr (revenir à la partie 3.1.2).

La conclusion de cette étude est que le couplage entre les transitions de l'hème et des 12 résidus aromatiques les plus proches de l'hème est suffisant pour expliquer de manière relativement correcte le CD dans la myoglobine.

3.4.2 Les paramètres du système

Rappelons que pour mener à bien ce calcul, il nous faut la position relative de l'hème et des résidus, ainsi que les paramètres des transitions électroniques de chaque chromophore (section 3.2.6).

Commençons par les positions relatives des résidus. Les structures de la myoglobine avec et sans ligand ont été déterminées par rayons X. Ces structures sont disponibles dans la banque de données Protein Data Bank MbCO 1A6G, MB 1A6N [42]. Nous avons choisi ces données en particulier parce qu'elles sont récentes, et surtout parce que les structures de MbCO et de Mb ont été obtenues dans les mêmes conditions expérimentales. De plus, elles sont reportées dans le même repère. Nous donnons (fig 3.4) une représentation de l'hème et des résidus importants.

Pour reproduire le spectre de MbCO, nous avons considéré le couplage de l'hème avec 14 résidus aromatiques suffisamment proches. En plus des 12 résidus utilisés par Hsu et Woody, nous avons introduit 2 tryptophanes qui sont susceptibles d'apporter une contribution non négligeable [54]. Nous avons donc à ce stade 15 chromophores, nous connaissons leurs positions relatives, il nous reste à trouver les paramètres électroniques.

Comme nous l'avons vu, le couplage est d'autant plus efficace que l'on couple deux transitions proches en fréquence. Ainsi l'hème se couplera principalement avec les transitions aromatiques les plus proches du visible, donc les plus basses en énergie.

Les paramètres de ces transitions aromatiques ont été pris dans la littérature. Des calculs sur la phénylalanine, tyrosine et tryptophane ont été publiés récemment [55]. En revanche, nous n'avons pas trouvé de calcul récent pour l'histidine, qui est pourtant le résidu le plus important pour la détermination du dichroïsme circulaire, car les histidines distales et proximales sont les résidus les plus proches de l'hème. Nous avons donc pris les paramètres utilisés par Woody [13].

Nous avons donc 14 résidus (46 transitions) dont les paramètres sont résumés dans la table 3.3.

Le choix des paramètres de l'hème est quant à lui très délicat. Il est impossible de prendre les fréquences de transition de la porphyrine et d'arriver après calcul à une position correcte du pic d'absorption. Celle ci dépend en effet de l'état d'oxydation et de coordination du fer, du couplage avec toutes les transitions électroniques de la protéine, mais aussi du dipôle permanent généré par les hélices α régnant dans la poche de l'hème...

Hème	λ (nm)	force d'oscillateur	Polarisation
MbCO	422	0.75	x,y
Mb	440	0.5	x,y
	413	0.4	x,y
acide aminée/Residu	λ (nm)	force d'oscillateur	Polarisation
Histidine Imidazole	243	0.12	58
	206	0.03	-26
	164	0.41	51
	155	0.07	-23
Tyrosine Phenol	275	0.02	x
	213	0.13	y
	186	1.1	y
	186	1.1	x
Tryptophane Indole	284	0.05	28
	260	0.12	-41
	206	0.6	23
	195	0.5	-33
Phenylalanine Phenyl	179	0.9	x
	179	0.9	y

TAB. 3.3 – paramètres utilisés pour le calcul

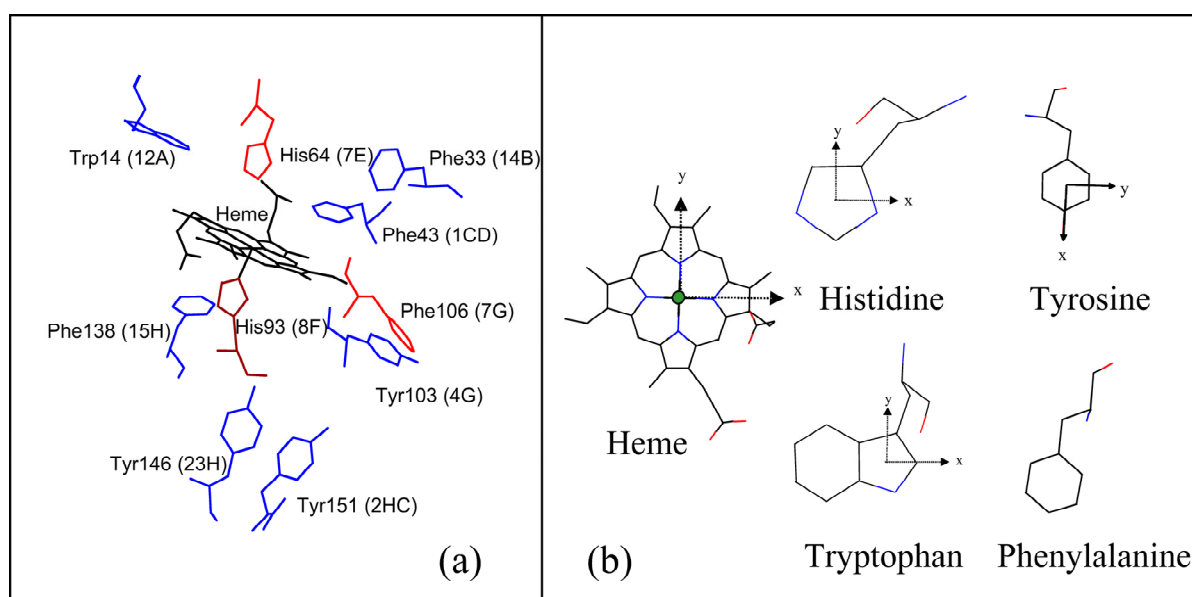


FIG. 3.4 – Les résidus aromatiques importants

La fréquence de la transition de l'hème est donc un paramètre d'ajustement. Dans le cas de MbCO, une seule transition à 2,94 eV est suffisante pour reproduire correctement l'allure du spectre d'absorption dans la bande de Soret. Nous obtenons alors pour la force d'oscillateur totale une valeur de 1,35, en accord avec [56].

Le cas de Mb est plus compliqué. On rappelle que lorsqu'il n'y a pas de ligand fixé sur le fer, l'hème est en forme de dôme. La symétrie plane étant brisée, de nouvelles transitions vibrationnelles apparaissent. La bande d'absorption est alors plus large et plus dissymétrique. Une étude théorique complète des spectres d'absorption de Mb et MbCO qui tient compte de ces mécanismes a été menée par Cupane et al [57].

A notre niveau, nous avons tenté de reproduire cette dissymétrie en considérant deux transitions électroniques distinctes pour l'hème Mb : la bande de Soret à 2,82 eV (335 nm) ainsi que la bande N à 3 eV. On a donc pour l'hème dans la configuration Mb deux fréquences de transition à ajuster.

Il s'agit également d'examiner le cas du CO. Initialement fixé à l'hème, il se détache pour rejoindre rapidement le "Docking site", où il sera parallèle au plan de l'hème [58]. Les transitions électroniques du CO sont dans l'UV lointain, donc le couplage avec l'hème n'est *a priori* pas très efficace. Cependant, sa grande proximité avec l'hème peut contrebalancer cet écart en fréquence.

Dans la configuration MbCO, le CO est très proche, mais orthogonal à l'hème, il ne contribue donc pas. Dans le docking site, il n'intervient pas non plus car il est à 3 Angstroms de l'hème. Le passage d'une position à l'autre se faisant très rapidement (les toutes premières picosecondes), nous ne tiendrons pas compte du CO dans les calculs

3.4.3 Le calcul des spectres de la myoglobine

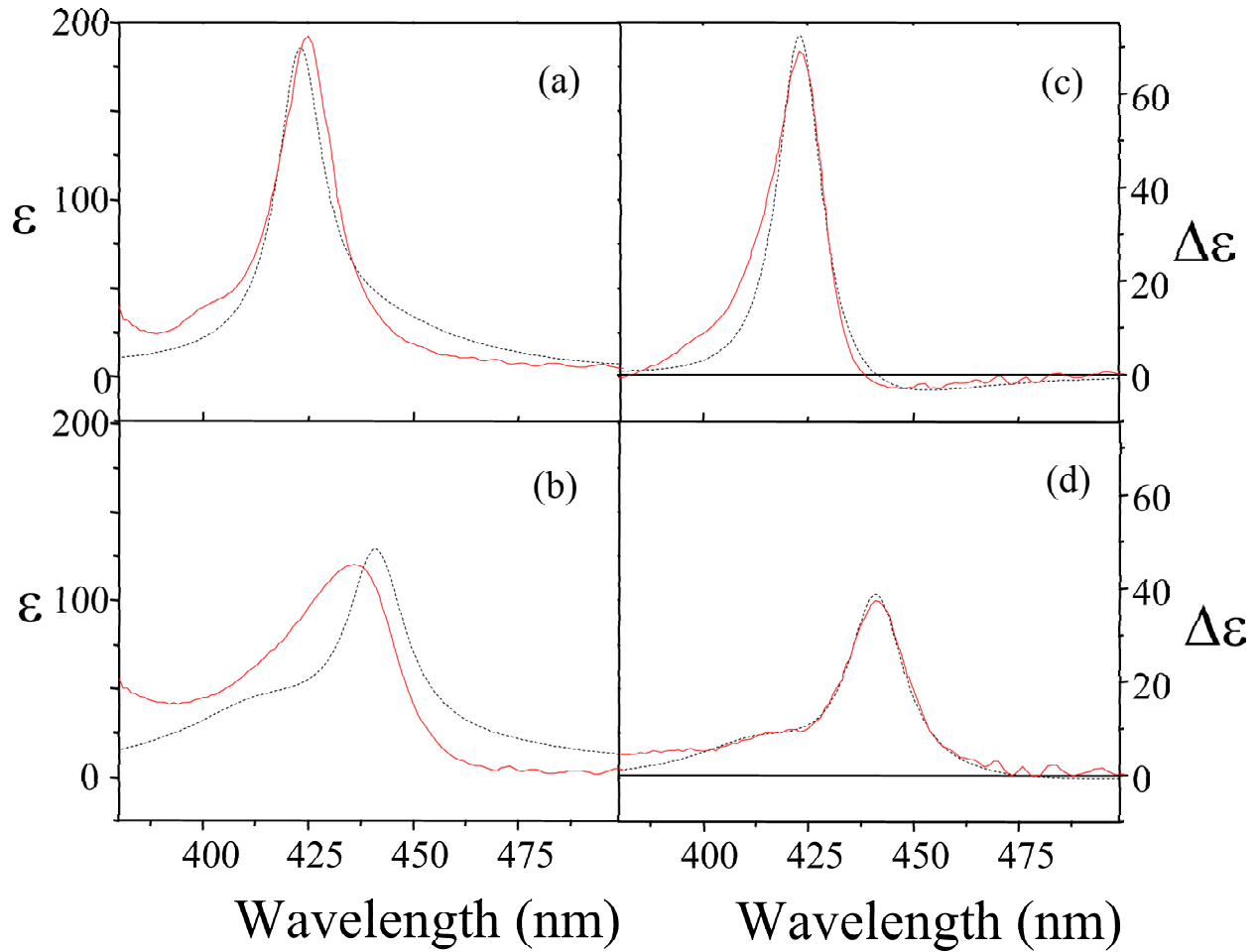


FIG. 3.5 – Les spectres d'absorption et de CD

Les extinctions molaires ϵ sont exprimées en $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, et $\Delta\epsilon$ en $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Le but de cette section est d'exposer les résultats du calcul des spectres théoriques d'absorption et de dichroïsme circulaire de Mb et MbCO, ainsi que l'ajustement aux spectres expérimentaux. La figure 3.5 représente en rouge les spectres expérimentaux, en noir les spectres théoriques, et l'on a :

- a= absorption de MbCO
- b= absorption de Mb
- c= CD de MbCO
- d= CD de Mb

On se concentre ici sur le domaine spectral situé entre 390 nm et 480 nm. Commençons par le cas du CD de MbCO. On constate l'existence d'une bande importante positive pour les hautes énergies, suivie d'une toute petite épaule négative. Le traitement en modes normaux du système permet d'attribuer ces deux éléments à deux modes normaux, que nous noterons t_1 et t_2 . Une analyse des résultats du calcul amène à plusieurs remarques :

- l'hème au niveau de la bande de Soret possède deux transitions dégénérées X et Y. Le couplage avec l'environnement va lever cette dégénérescence et donner naissance aux deux modes normaux t_1 et t_2 , mélange de toutes les transitions de la protéine.
- t_1 et t_2 sont presque exclusivement composés des transitions X et Y, ceci n'a rien de surprenant d'après les considérations de la partie 3.3.2. On a donc

$$t_1 \approx t_1^X X + t_2^Y Y \quad t_2 \approx t_2^X X + t_1^Y Y$$

- La détermination de ces quatre coefficients ne dépend presque exclusivement que du couplage entre l'hème et l'histidine proximale. C'est en effet le résidu le plus proche de l'hème. La décomposition complète de t_1 et de t_2 dépend quant à elle de tous les couplages

Rappelons l'expression de Q_n (qui permet de calculer la force de rotation) :

$$Q_n = \sum_{is,jt} t_n^{is} t_n^{jt} \vec{r}_{ij} \cdot (\vec{u}_{is} \times \vec{u}_{jt})$$

Ici, $n=1$ ou 2 . $i \neq j$ car sinon r_{ij} est nul. Le produit $t_n^{is} t_n^{jt}$ n'est non négligeable que pour i =hème et j =résidu aromatique (ou réciproquement) . On néglige donc les couplages entre deux résidus. $s=X$ ou Y . Finalement on trouve pour Q_1 (idem pour Q_2) :

$$Q_1 = 2 \sum_{j,t} t_1^{jt} \vec{r}_j \cdot (\vec{W}_1 \times \vec{u}_{jt}) \quad (3.26)$$

$$\vec{W}_1 = t_1^X \vec{X} + t_1^Y \vec{Y}$$

où l'on a fait la somme sur toutes les transitions des résidus jt . r_j désigne la position relative du résidu i par rapport à l'hème. $\vec{W}_1$ est un vecteur de norme constante, contenu dans le plan de l'hème, et dont la direction va entièrement dépendre du couplage avec l'histidine proximale.

Si on modifie ce couplage (déplacement quelconque de l'histidine proximale), le vecteur $\vec{W}_1$ va tourner dans le plan de l'hème, ce qui modifie profondément les valeurs de Q_1 et Q_2 .

Nous pouvons maintenant examiner la force de rotation des deux modes, et l'on trouve

$$R_1 = 0.9 \text{ DBM} \quad \text{et} \quad R_2 = -0.5 \text{ DBM}$$

où l'on utilise l'unité Debye magnéton de Bohr (revenir à la partie 3.1.2) et l'équivalence entre R_1 et Q_1 (partie 3.2.5)

La levée de dégénérescence étant très faible, les deux bandes se chevauchent beaucoup, et il reste une force effective de 0.4 DBM, qui est en bon accord avec la force de 0.5 DBM mesurée expérimentalement. Le challenge de la procédure d'ajustement est de pouvoir reproduire le spectre expérimental aussi dissymétrique avec deux valeurs R_1 et R_2 aussi symétriques. En effet la bande de haute énergie est beaucoup plus intense que la bande de faible énergie.

Le seul moyen est donc de jouer sur les largeurs Γ_1 et Γ_2 afin de pouvoir "diluer" plus ou moins la force de rotation. L'ajustement correct est obtenu avec des largeurs de 0.09 eV pour le pic positif et 0.35 eV l'épaule de basse énergie. L'ajustement de Γ_1 , Γ_2 et de la fréquence de la

transition de l'hème non couplé permet de reproduire **simultanément** les spectres d'absorption et de CD de MbCO

Cependant, le facteur 4 de différence sur les largeurs peut paraître surprenant car les deux transitions initialement dégénérées avaient la même largeur. Cette différence peut s'expliquer grâce au couplage avec l'histidine proximale. La bande de faible énergie est composée majoritairement de la transition X. L'histidine est presque parallèle à X, donc elle va se coupler majoritairement avec cette transition. On montre que l'énergie de couplage est plus d'un ordre de grandeur plus grand pour X que pour Y. L'élargissement d'une transition augmente avec le couplage avec le bain, on trouve donc que la transition de faible énergie va être plus large que celle de haute énergie.

L'équation 3.26 présente l'avantage de pouvoir calculer la contribution de chaque résidu à la bande 1 ou 2. Les valeurs de $R_1 + R_2$ sont reportées à la table 3.4. Nos résultats sont en accord qualitatif avec ceux de Woody. On notera que la ligne totale diffère légèrement de la somme sur tous les résidus. La différence vient du couplage entre les résidus aromatiques que nous avons négligé.

	MbCO		Mb	
Residu ¹	distance ²	rot. str. ³	distance ²	rot. str. ³
His36 (1C)	<i>15.08</i>	-12	<i>15.12</i>	-7
His64 (7E)	<i>5.64</i>	-125	<i>5.22</i>	-148
His93 (8F)	<i>3.22</i>	6	<i>3.66</i>	-25
His97 (2FG)	<i>5.88</i>	2	<i>6.04</i>	-27
Phe33 (14B)	<i>10.24</i>	108	<i>10.21</i>	116
Phe43 (1CD)	<i>6.14</i>	31	<i>6.37</i>	-39
Phe46 (4CD)	<i>10.04</i>	18	<i>10.23</i>	59
Phe106 (7G)	<i>13.85</i>	-63	<i>13.84</i>	-50
Phe138 (15H)	<i>9.44</i>	81	<i>9.21</i>	83
Tyr103 (4G)	<i>10.94</i>	102	<i>10.81</i>	74
Tyr146 (23H)	<i>10.93</i>	87	<i>11.01</i>	1
Tyr151 (2HC)	<i>14.63</i>	39	<i>12.82</i>	50
Trp7 (5A)	<i>20.26</i>	14	<i>20.79</i>	-8
Trp14 (12A)	<i>14.81</i>	116	<i>14.57</i>	84
Total		404		163

TAB. 3.4 – calcul de la contribution de chaque résidu à la bande de Soret

1 : Les acides aminés His = histidine, Phe = phenylalanine, Tyr = tyrosine, Trp = tryptophane. A, B, C ... désignent les hélices

2 : les distances sont exprimées en Angstroms

3 : les forces de rotation sont exprimées en 10^{-3} DBM

Les résidus ayant les contributions les plus importantes sont l'histidine distale (His64), ainsi que 3 autres acides aminés un peu plus éloignés (schéma 3.4) : Phe33, Tyr103 et Trp14. Il est important de noter que l'histidine proximale (His93) ne contribue que très peu à la force de rotation. Ceci tient

au fait que le groupe imidazole est presque perpendiculaire au plan de l'hème. Nous reviendrons ultérieurement sur le rôle crucial de ce résidu qui détermine, de manière indirecte, mais capitale (3.26), les forces de rotation.

On note de plus qu'à l'exception de l'histidine distale dont la contribution est fortement négative, la plupart des autres résidus ont des contributions positives. Il est intéressant de voir que toutes les hélices (A à H) sont impliquées dans la détermination de la force de rotation, le CD est donc bien une sonde globale de toute la protéine. Toutes les hélices (à l'exception de E) ont des contributions positives.

Considérons maintenant l'espèce Mb. Le pic d'absorption est à 435 nm, et l'introduction de la bande N est nécessaire pour reproduire les spectres expérimentaux. On peut noter que, contrairement à MbCO, on ne parvient pas à reproduire fidèlement à la fois le spectre d'absorption et de CD. Le fait est que le couplage que l'on obtient théoriquement décale le pic de CD vers le bleu par rapport au pic d'absorption : la bande positive de haute énergie est "rognée" par une petite bande négative d'énergie plus basse.

Le problème est que l'on observe strictement le contraire expérimentalement : la bande de CD est décalée vers le rouge par rapport à la bande d'absorption.

Donc, pour reproduire le plus fidèlement possible le spectre de CD de Mb, nous avons dû décaler "arbitrairement" la transition de l'hème vers le rouge, ce qui nous fait perdre l'accord avec le spectre d'absorption, l'ajustement avec le spectre de CD étant lui excellent. Nous privilégions l'accord avec le spectre de dichroïsme circulaire car il s'agit de l'observable de nos expériences.

Tentons cependant d'expliquer cette inversion fâcheuse. Une explication plausible viendrait de la multiplicité des transitions vibrationnelles $\nu = 0, 1, \dots$ contenue dans le pic d'absorption. Pour fixer les idées, notons une transition du système :

$$(f/\nu = i) \rightarrow (e/\nu = i + p)$$

Ce qui signifie simplement que l'on passe de l'état électronique fondamental à l'état électronique excité, tout en changeant le niveau d'énergie vibrationnel. On impose $i+p > 0$. Il suffit alors que les transitions $p=0,1$ (partie rouge du pic d'absorption) se couplent beaucoup plus avec les résidus aromatiques que les transitions ayant un p grand (partie bleu du spectre d'absorption). Le spectre de CD est alors décalé vers le rouge par rapport aux spectres d'absorption

Les remarques précédentes permettent de montrer le caractère **semi-empirique** des calculs effectués lors de ce travail de thèse. Le but est simplement de comprendre qualitativement le dichroïsme circulaire dans un tel système afin d'être relativement mieux armé pour l'interprétation des résultats expérimentaux que nous présenterons lors de la quatrième partie.

Nous reportons dans la table 3.4 les résultats des forces de rotation $R_1 + R_2$ correspondant à la transition à 440 nm. On note de manière claire que les valeurs sont très corrélées avec celles de MbCO : les résidus ont sensiblement les mêmes contributions dans les deux configurations Mb et MbCO. La différence entre le spectre de CD de Mb et de MbCO provient donc majoritairement du changement des transitions électroniques de l'hème (décalage de la fréquence et baisse de la force d'oscillateur)

3.4.4 Les configurations intermédiaires

Le but de cette section est d'évaluer le dichroïsme circulaire de la myoglobine dans des états intermédiaires le long de la photodissociation.

Rappelons que l'état électronique de l'hème change très rapidement. Après trois picosecondes et la relaxation de l'état excité, le spectre d'absorption de l'état photo-dissocié est celui de Mb. Le premier état intermédiaire que nous avons considéré, et que nous avons appelé Mb* est obtenu en prenant la géométrie de la protéine MbCO, mais en prenant pour l'hème les états électroniques de Mb. Bien que cet état n'ait pas de sens réel car les toutes premières étapes de la dynamique conformationnelle sont indissociables des changements électroniques, cet état nous permet de fixer un point de départ des changements conformationnels.

Nous avons également simulé une deuxième configuration intermédiaire où l'on a déplacé l'histidine proximale et l'hème dans leur position finale. Ceci donne sensiblement les mêmes valeurs de dichroïsme circulaire. Tous ces états intermédiaires redonnent des spectres de dichroïsme circulaire très sensiblement semblables au spectre de CD de l'état final (Mb).

Nous avons également tenté de déplacer notablement les 4 résidus ayant une contribution importante (histidine distale, Phe33, Tyr103 et Trp14) pour arriver à la même conclusion. L'explication vient du fait que lors de la photodissociation, ces résidus bougent, mais pas suffisamment pour expliquer des changements notables des forces de rotation. De plus les changements ont tendance à se compenser d'un résidu à l'autre.

Revenons au cas de l'histidine proximale. Nous avons simulé l'état Mb** correspondant à l'hème dans l'état Mb, et l'histidine proximale tournée de $\frac{\pi}{6}$ autour de l'axe hème/(His93). Nous représentons (Fig. 3.6) les spectres de CD pour les différentes configurations MbCO, Mb*, Mb**, et Mb. On constate qu'une rotation de l'histidine proximale modifie profondément le spectre de CD.

L'explication de ce phénomène est dans la section précédente : si l'on fait tourner l'histidine proximale, ou si plus généralement, on modifie le couplage entre ce résidu et l'hème, on fait tourner notablement le vecteur $\vec{W}$ dans le plan de l'hème. Ce phénomène modifie beaucoup plus efficacement le CD que les autres mouvements évoqués ci-dessus. En effet :

- $\vec{W}$ est une entité mathématique, qui bouge *a priori* plus librement qu'une transition réelle, accrochée à un résidu presque immobile
- autant les mouvements de l'histidine distale, de Phe33, Tyr103 et Trp14 ont tendance à se compenser, autant une rotation de $\vec{W}$ est cumulative : en permutant le produit mixte dans 3.26 on voit que $\vec{W}_1$ se factorise

$$Q_1 = \vec{W}_1 \cdot \vec{N} \quad \text{avec} \quad \vec{N} = 2 \sum_{j,t} t_1^{jt} \vec{u}_{jt} \times \vec{r}_j$$

- en plus d'être cumulatif, l'effet est concerté, vu **qu'un seul résidu** en est à l'origine, l'histidine proximale

Une rotation de l'histidine plus importante peut même changer le signe du CD. Il est cependant important de noter que de telles rotations vont modifier les largeurs des modes normaux, ce qui

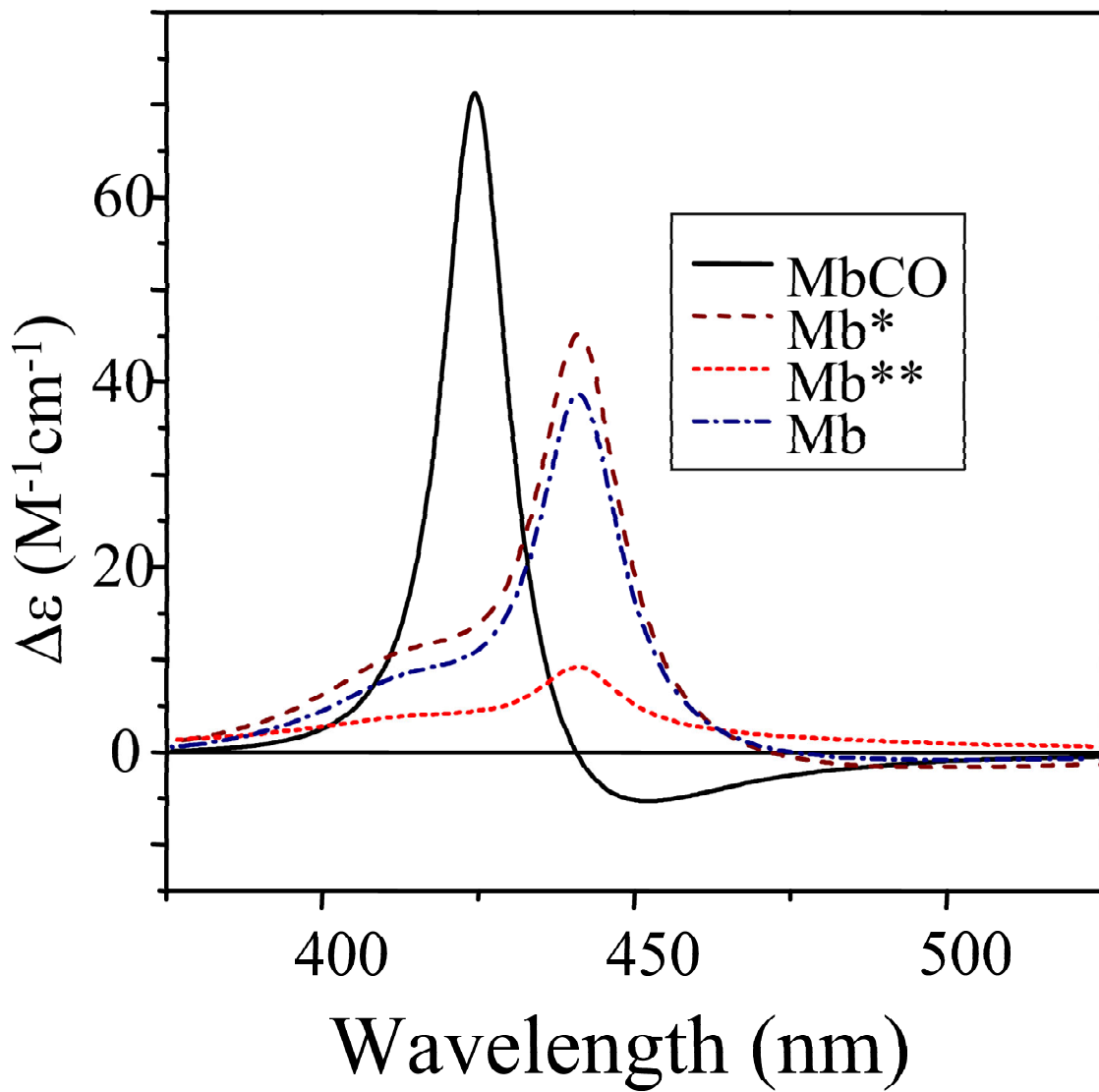


FIG. 3.6 – L'influence d'une rotation de l'histidine proximale

a pour conséquence de modifier encore plus le CD car on change l'équilibre entre les forces de rotation (elles-mêmes drastiquement modifiées par le mécanisme précédent). Nous n'avons pas pris en compte ce changement des largeurs dans les calculs présentés.

Nous représentons (Fig. 3.7) l'évolution des contributions des résidus entre les différentes configurations intermédiaires. Il est alors intéressant de noter que les résidus importants d'un point de vue statique ne sont pas les mêmes que les résidus importants d'un point de vue dynamique. On retrouve, certes, l'histidine distale dans les deux cas, mais les deux autres résidus importants d'un point de vue dynamique sont Tyr 146 et Phe 43.

Si l'on fait le bilan des ces trois premier chapitres, on s'aperçoit de deux choses :

- l'histidine proximale est un élément central dans la compréhension de l'effet allostérique.
- une mesure de CD est *a priori* très sensible à un mouvement de cette histidine

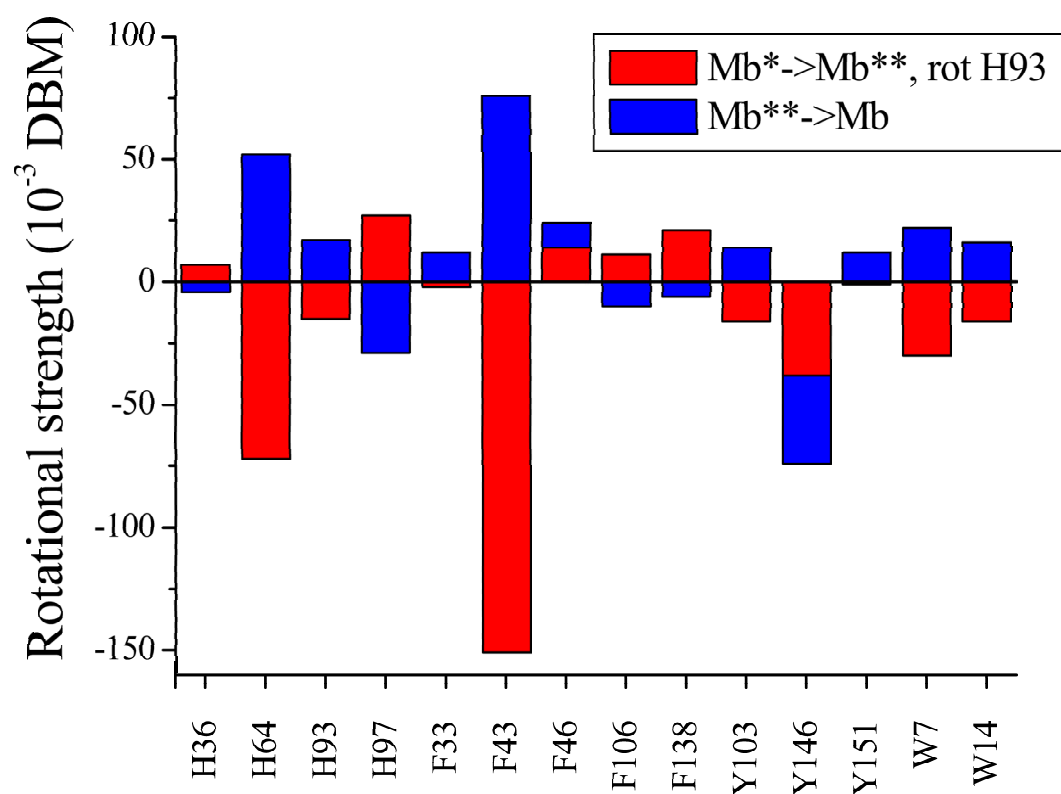


FIG. 3.7 – L'importance dynamique des résidus

Chapitre 4

L'expérience et les résultats

Nous présentons lors de ce quatrième chapitre l'ensemble des résultats expérimentaux de ce travail de thèse. Selon le principe d'une expérience de dichroïsme circulaire résolu temporellement exposé à la section 1.6, une pompe amorce une réaction photophysique, alors qu'une sonde, polarisée alternativement gauche et droite vient mesurer le dichroïsme circulaire de l'échantillon après l'excitation.

La première section présentera l'artefact intrinsèque à ce type d'expérience, et la difficulté de générer des polarisations gauche et droite bien symétriques.

La deuxième section sera consacrée à l'expérience visible et à l'étude de la photodissociation du complexe MbCO : cette section présente le résultat principal de ce travail de thèse.

La troisième section présentera la construction d'une source laser UV, ainsi que des résultats préliminaires.

4.1 L'artefact et sa résolution

Dans cette section, nous analyserons en détail les problèmes d'artefacts inhérents à l'expérience et les moyens d'y remédier que nous avons mis au point [59]. La première partie expliquera l'origine de l'artefact de dichroïsme circulaire induit. Nous verrons que celui-ci est nul dès que les deux polarisations de sonde sont symétriques par renversement du temps.

Nous verrons dans la deuxième partie que nous générons les polarisations de sonde gauche et droite avec une cellule de Pockels. Nous démontrerons alors que les polarisations de sonde sont symétriques si et seulement si la cellule de Pockels est parfaitement alignée.

La troisième partie décrira une procédure d'alignement avec un contrôle expérimental de l'artefact.

La dernière partie énumérera les autres pistes que nous avons utilisées pour réduire cet artefact.

4.1.1 Le dichroïsme circulaire induit

Pour mesurer du CD, nous générons alternativement des polarisations de sonde circulaires droite et gauche. Dans la réalité, ces dernières ne sont jamais parfaitement circulaires : elles sont légèrement elliptiques. De plus, elles ne sont pas symétriques l'une par rapport à l'autre. On peut néanmoins les décomposer en une polarisation parfaitement circulaire et une petite polarisation linéaire. Maintenant, selon que cette petite polarisation est parallèle ou orthogonale à la polarisation de la pompe, nous allons obtenir deux effets pompe-sonde différents [60]. Il s'agit du dichroïsme linéaire induit (Fig. 4.1).

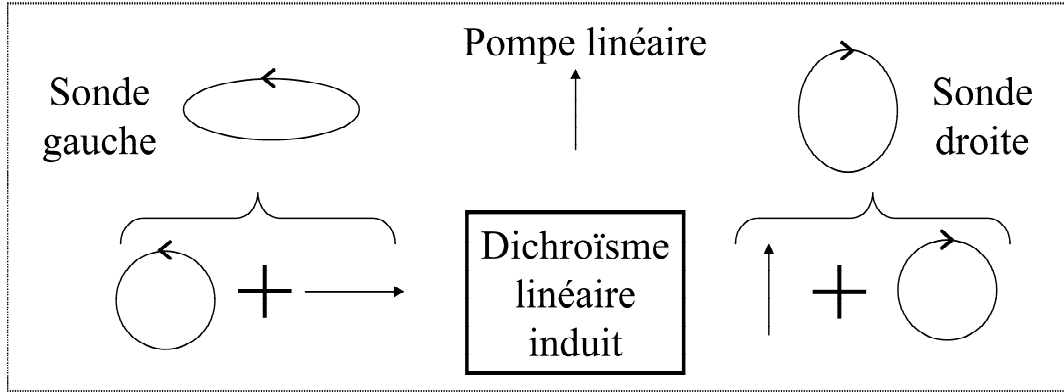


FIG. 4.1 – Le dichroïsme linéaire induit

Ceci se traduira par une modulation de la transmission de la sonde (gauche moins droite) mais qui n'aura rien à voir avec du dichroïsme circulaire. Ce signal existe en effet dans des systèmes ne possédant pas d'activité optique. Sachant que les signaux de CD sont très petits, ce signal artefact peut devenir beaucoup plus grand que le signal que l'on cherche à mesurer.

Nous souhaitons à présent décrire ce phénomène de manière plus quantitative afin de pouvoir contrôler la pertinence de nos résultats expérimentaux. Considérons donc la propagation d'une onde électromagnétique dans un milieu **non chiral** :

$$\frac{\partial A}{\partial Z} = -\frac{1}{2}(\alpha + \beta I_p)$$

où l'on a noté $E(Z, t) = A(Z)e^{-i\omega t} + cc$ le champ électrique associé au faisceau sonde, I_p est l'intensité de la pompe, Z étant la direction de propagation. Cette équation décrit simplement le changement de transmission du milieu induit par la pompe sur la sonde.

Nous avons introduit le paramètre d'absorption non linéaire β . Le point important de notre discussion est que β prendra des valeurs différentes si la pompe et la sonde sont parallèles ou orthogonales. Intuitivement, l'effet est plus important si les deux polarisations sont parallèles car la sonde vient lire préférentiellement les molécules excitées par la pompe. Introduisons donc $\beta_{\parallel}$ et $\beta_{\perp}$.

Ces coefficients s'expriment en fonction de la partie imaginaire de la susceptibilité non linéaire du troisième ordre $\chi^{(3)}(\omega_p, -\omega_p, \omega)$ où ω_p est la fréquence de la pompe

$$\beta_{\parallel} = \frac{\omega}{(\varepsilon_0 c n)^2} \text{Im} \chi_{XXX}^{(3)} \quad \beta_{\perp} = \frac{\omega}{(\varepsilon_0 c n)^2} \text{Im} \chi_{XYX}^{(3)}.$$

X désigne la polarisation de la pompe, la sonde étant sur X ou sur Y . Nous ne considérons pas ici le changement de l'indice de réfraction avec la pompe (proportionnel à la partie réelle de χ ou ε_0 , ceci est une hypothèse de travail raisonnable quand on étudie des phénomènes résonnants).

L'énergie à la sortie de l'échantillon s'écrit alors :

$$I(L) = I(0) e^{-\alpha L} e^{-\beta I_p L_{eff}}$$

où β peut prendre les valeurs $\parallel$ ou $\perp$. $L_{eff} = (1 - e^{-\alpha L}) / \alpha$ rend compte de l'absorption de la pompe. Revenons à présent au contexte de notre expérience : la sonde est circulaire gauche ou droite, de manière alternative, et on mesure la différence de transmission correspondante. Décomposons ces polarisations en polarisations linéaires :

$$\hat{e}_{G,D} = \frac{e^{\pm i\varphi}}{\sqrt{2}} (\hat{X} \pm i \hat{Y}).$$

Le facteur $e^{\pm i\varphi}$ permet de placer le point de superposition des champs électriques gauche et droite pour une direction arbitraire. La transmission de l'onde droite et de l'onde gauche s'écrit alors

$$T_{G,D} = \frac{e^{-\alpha L}}{2} (e^{-\beta_{\parallel} I_p L_{eff}} + e^{-\beta_{\perp} I_p L_{eff}}), \quad (4.1)$$

Il n'y a donc pas de signal de dichroïsme circulaire, ce qui est le résultat attendu pour un échantillon non chiral. Examinons maintenant ce qui se passe lorsque les polarisations de sonde deviennent elliptiques :

$$A_G = A(0) [\hat{e}_G + \epsilon_G \hat{e}_D]$$

$$A_D = A(0) [\epsilon_D \hat{e}_G + \hat{e}_D]$$

où $\epsilon_{G,D}$ sont des nombres complexes de module très petit devant 1 : les deux polarisations sont en effet presque circulaires. Nous pouvons calculer la différence de transmission en nous arrêtant à l'ordre 1.

$$T_G - T_D = [(\epsilon'_G - \epsilon'_D) \cos 2\varphi + (\epsilon''_G + \epsilon''_D) \sin 2\varphi] e^{-\alpha L} (e^{-\beta_{\parallel} I_p L_{eff}} - e^{-\beta_{\perp} I_p L_{eff}}). \quad (4.2)$$

Ce résultat amène à plusieurs remarques :

– Tout d'abord, nous voyons que l'effet est proportionnel à

$$e^{-\beta_{\parallel} I_p L_{eff}} - e^{-\beta_{\perp} I_p L_{eff}} \propto \text{Im} \chi_{XXX}^{(3)} - \text{Im} \chi_{XYX}^{(3)}.$$

Ceci est la signature du dichroïsme linéaire induit

- De plus, nous retrouvons que cet effet est nul si les deux polarisations sont parfaitement circulaires ($\epsilon_G = \epsilon_D = 0$).
- Mais également, on peut annuler l'effet en choisissant

$$\epsilon_G = \epsilon_D^* \quad (4.3)$$

Ceci revient à choisir les deux polarisations images l'une de l'autre par l'opération T , renversement du temps. La condition 4.3 nous donne donc un critère objectif sur les polarisations de sonde permettant d'annuler l'artefact.

4.1.2 La génération de polarisations circulaires

Nous utilisons une cellule de Pockels longitudinale pour générer les polarisations circulaires. Le principe est basé sur l'effet électrooptique, ou effet Pockels. C'est un effet non linéaire d'ordre deux n'existant que dans les milieux non centro-symétriques :

$$\vec{P}(\omega) = \underline{\chi}^2(-\omega, \omega, 0) \vec{E}(\omega) \vec{E}(0)$$

où $\underline{\chi}^2$ est la susceptibilité non linéaire du deuxième ordre. Autrement dit, un champ électrique statique perturbe la propagation linéaire d'une onde électromagnétique. Si l'on se place loin des résonances du cristal, cette perturbation se limite à une modification des indices de propagation.

On utilise un cristal non centro-symétrique de KD^*P auquel on applique une tension statique. Si le champ électrique est parallèle à l'axe optique (axe extraordinaire du cristal), il s'agit d'une cellule de Pockels longitudinale.

Le résultat est que l'effet électrooptique fait apparaître une biréfringence directement proportionnelle au champ électrique statique. En ajustant la tension appliquée, la cellule de Pockels se comporte donc comme une lame à retard variable. On peut en effet choisir de la faire fonctionner comme une $\lambda/4$ afin de générer des polarisations circulaires, ou comme $\lambda/2$ pour l'utiliser comme interrupteur optique (on fait tourner ou non la polarisation de $\pi/2$ et on utilise ensuite un polariseur).

Nous utilisons donc une tension adaptée pour obtenir une lame $\lambda/4$, $\sim 1300V$ vers 420 nm. Si la cellule est bien alignée, *i.e.* si le faisceau se propage selon l'axe optique, tout se passe comme s'il traversait une lame $\pm\lambda/4$ pour une tension positive ou négative. Ceci permet alors de générer des polarisations circulaires gauche ou droite. Il suffit en effet que la polarisation linéaire incidente arrive à $\pi/4$ des deux axes de la lame $\lambda/4$. Les deux composantes projetées seront alors déphasées de $\pi/2$ à la sortie de l'échantillon.

Dans un modulateur photo-élastique, c'est la contrainte que l'on applique sur le cristal qui est à l'origine de la biréfringence. Les résonances internes du cristal imposent de travailler à plusieurs dizaines de kHz. Utiliser un tel système sur laser kHz amplifié impose alors une procédure lourde de synchronisation du photo-élastique sur le laser. C'est pour cela que nous avons préféré la solution d'une cellule de Pockels.

Il reste à expliquer pourquoi nous avons utilisé une cellule longitudinale et non pas une cellule transverse. Les cellules transverses peuvent effectivement fonctionner avec des tensions plus accessibles et sont moins sensibles à l'alignement. Mais elles ont un inconvénient majeur : les polarisations générées dépendent de manière critique de la température de la cellule, ce qui rend leur utilisation impossible si l'expérience nécessite une accumulation, à cause des dérives thermiques.

Nous souhaitons donc décrire le comportement d'une cellule de Pockels longitudinale quand l'alignement n'est pas parfait : on suppose que la propagation du faisceau laser n'est pas sur l'axe optique du cristal. La démarche est la suivante :

- On calcule les nouveaux axes propres et indices de réfraction de la cellule désalignée
- Ceci nous permet ensuite de trouver la lame biréfringente équivalente

- On finit par calculer les états de polarisation du faisceau laser après propagation dans la cellule de Pockels

Appelons x , y et z les trois axes principaux de la cellule de Pockels allumée. Les trois indices propres s'écrivent alors :

$$\begin{aligned} n_x &= n_o + \frac{1}{2}n_o^3 r_{63} V_z = n_o + \Delta n^{eo} \\ n_y &= n_o - \frac{1}{2}n_o^3 r_{63} V_z = n_o - \Delta n^{eo} \\ n_z &= n_o + \Delta n^n \end{aligned}$$

$\Delta n^n = n_e - n_o$ est la biréfringence naturelle de KD*P et $\Delta n^{eo} = \frac{1}{2}n_o^3 r_{63} V_z$ la biréfringence électro-optique qui dépend donc de la tension appliquée V_z ainsi que des coefficients électro-optique r du KD*P. Le tenseur électro-optique $\underline{r}$ s'exprime en fonction de $\underline{\chi}^2$. Il est alors tout à fait instructif de comparer les ordres de grandeur de ces deux biréfringences :

$$\Delta n^n \approx 0.04 \quad \Delta n^{eo} \sim 10^{-5}$$

Δn^n est tabulée pour des longueurs d'onde visible dans [61] alors que Δn^{eo} est évaluée pour une cellule $\frac{\lambda}{4}$ de 2 cm de long :

$$\Delta \Phi \equiv 2\Delta n^{eo} \frac{\omega}{c} L \simeq \frac{\pi}{2} \Rightarrow \Delta n^{eo} \sim 10^{-5}.$$

On constate alors que $\Delta n^{eo} \ll \Delta n^n$: la biréfringence induite par la tension est très inférieure à la biréfringence naturelle.

Considérons à présent le faisceau laser arrivant sur la cellule de Pockels. Si l'alignement est parfait, le vecteur unitaire $\vec{k}$ dirigeant le faisceau selon l'axe z . Donc, pour un désalignement léger, les composantes de $\vec{k}$ s'écrivent $k_x, k_y \ll 1$ et $k_z \approx 1$. Introduisons les coordonnées polaires

$$\begin{aligned} k_x &= \sin\theta \cos\phi \sim \theta \cos\phi \\ k_y &= \sin\theta \sin\phi \sim \theta \sin\phi \\ k_z &= \cos\theta \sim 1. \end{aligned}$$

où l'on note bien que $\theta \ll 1$ alors que ϕ peut prendre n'importe quelle valeur entre 0 et 2π . Le but est maintenant de déterminer les axes propres pour cette direction de propagation. C'est un problème très classique [62] : il s'agit de trouver l'ellipse intersection de l'ellipsoïde des indices avec le plan orthogonal à $\vec{k}$, (Fig. 4.2).

Les axes et indices propres sont alors donnés par les axes et les paramètres de l'ellipse. Le point de départ est donc (θ, ϕ) , le paramétrage de $\vec{k}$. Soit $M(n, \theta', \phi')$ un point à l'intersection entre l'ellipsoïde des indices et le plan orthogonal à $\vec{k}$. On a alors $\theta' \sim \frac{\pi}{2}$, et la condition d'orthogonalité s'écrit

$$\theta' - \frac{\pi}{2} = \theta \cos(\phi - \phi'), \quad (4.4)$$

De plus, M appartient à l'ellipsoïde des indices

$$\frac{\sin^2\theta' \cos^2\phi'}{n_x^2} + \frac{\sin^2\theta' \sin^2\phi'}{n_y^2} + \frac{\cos^2\theta'}{n_z^2} = \frac{1}{n^2}.$$

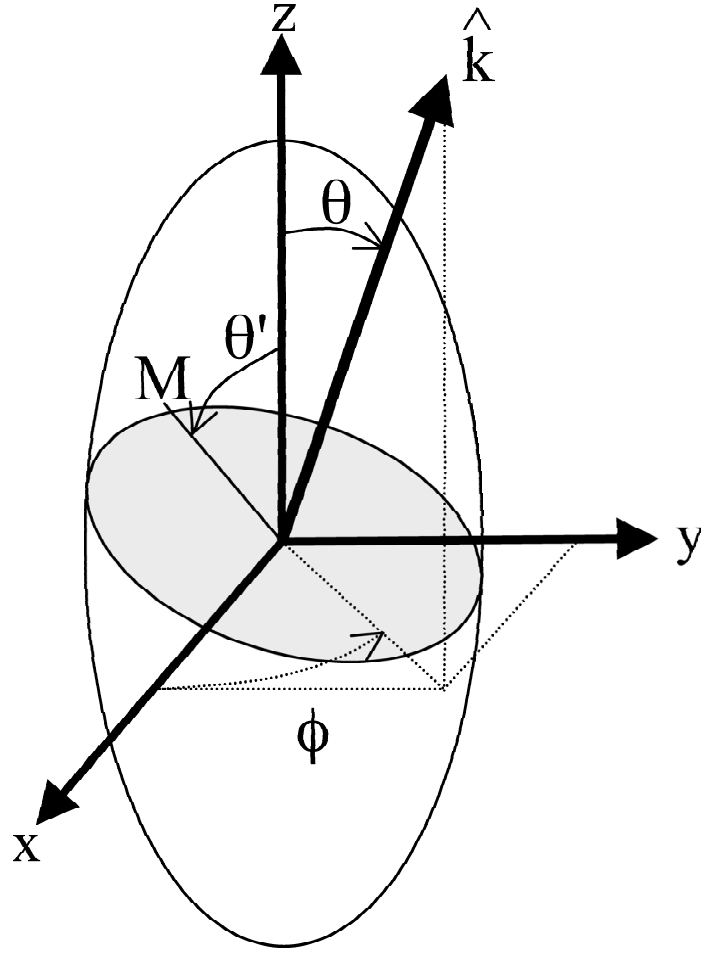


FIG. 4.2 – L'ellipsoïde des indices

Soit en s'arrêtant au premier ordre en biréfringence

$$n = n_o + \Delta n^{eo} \sin^2 \theta' \cos 2\phi' + \Delta n^n \cos^2 \theta'$$

soit encore en utilisant 4.4, et en s'arretant à l'ordre le plus bas en θ ,

$$n = n_o + \Delta n^{eo} \cos 2\phi' + \Delta n^n \theta^2 \cos^2(\phi - \phi'). \quad (4.5)$$

où l'on a utilisé le fait que $\Delta n^{eo} \ll \Delta n^n$. Cette équation permet de calculer la valeur de l'indice de réfraction pour un angle azimutal donné ϕ' .

Il s'agit ensuite de déterminer les axes propres. Ceci revient à trouver les extrema de n , ainsi que les angles correspondants. Avant de passer au cas général, vérifions la pertinence de cette équation pour les cas limites.

Si aucune tension n'est appliquée, ($\Delta n^{eo} = 0$), nous obtenons deux directions principales $\phi' = \phi$ et $\phi' = \phi + \pi/2$ comme pour n'importe quel cristal uniaxe, avec une biréfringence de :

$$\Delta n_{V=0} = \Delta n^n \theta^2, \quad (4.6)$$

indépendante de ϕ . Cette expression permet de retrouver la figure obtenue lorsque l'on place la cellule de Pockels entre deux polariseurs croisés, nous y reviendrons ultérieurement.

Comme autre cas limite, supposons que la cellule de Pockels soit sous tension, et parfaitement alignée ($\theta = 0$). L'équation 4.5 donne $n = n_o + \Delta n^{eo} \cos 2\phi'$. On retrouve bien comme directions principales x et y correspondant à $\phi' = 0$ and $\phi' = \pi/2$.

Examinons à présent la solution générale. Dérivons 4.5 par rapport à ϕ' . La dérivée est nulle quand ϕ' vérifie l'équation implicite suivante :

$$\sin(2\phi') = \frac{\Delta n^n}{2\Delta n^{eo}} \theta^2 \sin 2(\phi - \phi')$$

Nous nous limitons au cas d'un faible désalignement. On s'attend donc à trouver ϕ' proche de 0 (modulo $\pi/2$) On obtient donc comme solutions approchées $\phi' = \alpha$ et $\phi' = \alpha + \pi/2$ avec

$$\alpha = \frac{\Delta n^n}{4\Delta n^{eo}} \theta^2 \sin 2\phi. \quad (4.7)$$

Cette solution est correcte tant que $\theta^2 < \frac{2\Delta n^{eo}}{\Delta n^n}$. Ceci fixe donc une limite pour θ^2 de l'ordre de quelques 10^{-4} . α peut alors s'écrire en utilisant les composantes k_x et k_y .

$$\alpha = \frac{\Delta n^n}{2\Delta n^{eo}} k_x k_y. \quad (4.8)$$

Si l'on rapproche cette équation de 4.4, on dispose alors d'une détermination complète des nouveaux axes et indices propres de la cellule de Pockels désalignée. En effet, en reportant la valeur de α dans l'équation 4.5 on obtient la biréfringence effectivement subie par le faisceau laser $\Delta n^{eff} \equiv n(\alpha) - n(\alpha + \frac{\pi}{2})$.

Soit en se limitant au premier ordre en θ :

$$\Delta n^{eff} = 2\Delta n^{eo} + \Delta n^n \theta^2 \cos 2\phi$$

soit encore, en utilisant les composantes k_x et k_y :

$$\Delta n^{eff} = 2\Delta n^{eo} + \Delta n^n (k_x^2 - k_y^2) \quad (4.9)$$

Lors d'une mesure de dichroïsme circulaire, on applique une tension alternative $\pm V$ sur la cellule de Pockels. Ceci revient à remplacer dans les équations ci-dessus la biréfringence électro-optique par $\pm \Delta n^{eo}$, les autres paramètres géométriques restent quant à eux inchangés.

Les changements sont alors de deux ordres :

- l'angle α change de signe, ce qui implique que la direction des axes va elle aussi changer
- on obtient deux valeurs non symétriques pour la biréfringence effective. Seul le terme de gauche dans l'équation 4.9 va changer de signe alors que le second reste constant lorsque l'on commute la tension.

Ceci nous permet de comprendre que le désalignement de la cellule de Pockels va créer des dissymétries qui vont sérieusement perturber les expériences. En plus de l'alignement de la cellule par rapport au faisceau, deux autres paramètres sont *a priori* critiques :

- l'angle entre la polarisation du faisceau incident avec la première bissectrice (x,y). Idéalement, cet angle vaut zéro, sinon la polarisation de sortie ne peut pas être circulaire
- la valeur de la tension, qui doit conduire à une biréfringence de $\frac{\pi}{2}$

Nous allons donc supposer que, en plus d'un mauvais alignement de la cellule, ces deux paramètres ne sont pas parfaitement ajustés, et nous allons caractériser l'état de polarisation complet après propagation dans la cellule.

L'angle entre la polarisation incidente et x vaut donc $\pi/4 + s$, ce qui donne par rapport à l'axe propre proche de x $\pi/4 + s \mp \alpha$ en fonction du signe de la tension.

La cellule n'est pas tout à fait quart d'onde parce que la tension n'est pas parfaitement adaptée. Ceci se résume de la manière suivante : $\varphi^\pm \equiv L_c^\omega \Delta n^{eff}(\pm V) = \pm \pi/2 + 2\delta^\pm$.

Examinons à présent ce qui se passe pour une tension positive. En écrivant $\vec{x}_\alpha$ and $\vec{y}_\alpha$ les directions principales, la polarisation incidente se décompose de la manière suivante :

$$E_{in} = \cos\left(\frac{\pi}{4} + s - \alpha\right) \hat{x}_\alpha + \sin\left(\frac{\pi}{4} + s - \alpha\right) \hat{y}_\alpha.$$

Après propagation dans la cellule de Pockels, ces deux composantes se retrouvent déphasées de φ^+ et si l'on ne garde que les termes du premier ordre en s , α et δ^+ , on obtient

$$E_{out}^+ = \frac{e^{i\delta^+}}{\sqrt{2}} \left\{ (1 - s + \alpha)(1 - i\delta^+) \hat{x}_\alpha + i(1 + s - \alpha)(1 + i\delta^+) \hat{y}_\alpha \right\}.$$

On introduit la base des polarisations circulaires $\hat{e}_{L,R} = \frac{1}{\sqrt{2}} (\vec{x}_\alpha \pm i\vec{y}_\alpha)$, ce qui nous permet de réécrire (en omettant le facteur de phase)

$$E_{out}^+ = \hat{e}_G + (\alpha - s - i\delta^+) \hat{e}_D. \quad (4.10)$$

De manière similaire, on obtient lorsque la tension est négative

$$E_{out}^- = \hat{e}_D + (-\alpha - s - i\delta^-) \hat{e}_G. \quad (4.11)$$

On obtient ainsi le résultat attendu : pour une tension positive (*resp.* négative), la polarisation de sortie est circulaire gauche (*resp.* droite) avec une petite composante droite (*resp.* gauche) créée par les différents mauvais réglages expérimentaux. En utilisant les résultats précédent, on écrit

$$\epsilon_G = \alpha - s - i\delta^+$$

$$\epsilon_D = -\alpha - s - i\delta^-.$$

Et la condition $\epsilon_G = \epsilon_D^*$ implique

$$\alpha = 0 \quad , \quad \delta^+ + \delta^- = 0.$$

On utilise alors les équations 4.8 et 4.9, et ceci permet d'écrire ces conditions de la manière suivante :

$$\alpha = \frac{\Delta n^n}{2\Delta n^{eo}} k_x k_y = 0 \quad (4.12)$$

$$\delta^+ + \delta^- = \frac{L\omega}{c} \Delta n^n (k_x^2 - k_y^2) = 0. \quad (4.13)$$

Ceci amène à plusieurs commentaires. Tout d'abord, nous voyons que l'angle s n'intervient pas dans ces équations. Rappelons tout de même que cela est vrai tant que celui-ci reste petit. Ceci est très confortable : il n'est pas nécessaire que la cellule de Pockels soit précisément à 45° . Si s est légèrement différent, ceci va avoir pour effet de générer une légère ellipticité que l'on retrouvera de manière symétrique sur les deux polarisations, et qui ne sera pas gênante.

On constate également que Δn^{eo} n'apparaît pas dans l'équation 4.13, ce qui signifie qu'il n'est pas critique que la cellule de Pockels soit précisément une lame quart d'onde. On retrouve à nouveau une ellipticité, mais pas de dissymétrie.

L'analyse des équations 4.12 et 4.13 montre que le seul paramètre critique est bien l'alignement de la cellule de Pockels. On montre même que le seul moyen de s'affranchir de l'artefact de dichroïsme linéaire induit, ou d'avoir des polarisations symétriques est de réaliser $k_x = k_y = 0$. Le développement ci-dessus va nous permettre de mettre au point une procédure d'alignement.

4.1.3 La procédure d'alignement

L'alignement grossier

Pour obtenir les expressions précédentes, nous avons supposé que le désalignement était suffisamment petit afin de ne garder que les termes à l'ordre le plus bas. Il s'agit de réaliser un premier alignement afin de se ramener à cette situation. On y parvient sans difficulté grâce à la procédure standard d'alignement des cellules de Pockels. On en rappelle ici le principe.

La procédure consiste à placer la cellule de Pockels, sans tension, entre deux polariseurs croisés. On place de plus en amont des trois optiques un élément diffusant. Le rôle de ce dernier est de générer une grande famille de vecteurs d'onde différents. Nous pouvons alors appliquer les résultats de la section précédente.

Pour une direction de faisceau donné, caractérisé par un angle ϕ et θ les axes propres du milieu seront à ϕ et $\phi + \pi/2$. Par conséquent, les rayons lumineux dont le désalignement est dans la direction du polariseur ou de l'analyseur seront inchangés au cours de la propagation dans la cellule de Pockels, et ils seront donc éteints au niveau de l'analyseur. Ceci donne naissance à une croix noire (Fig. 4.3).

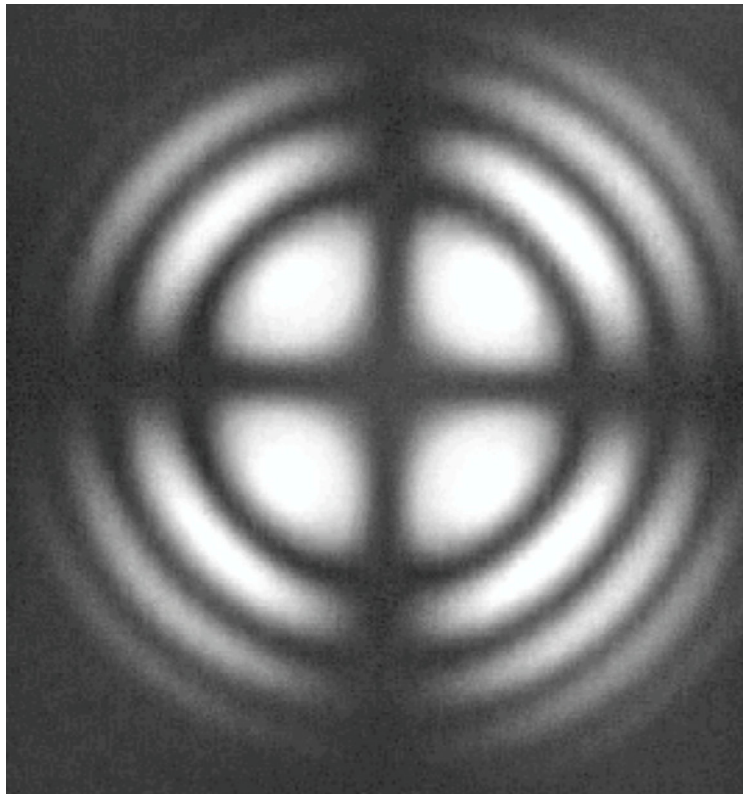


FIG. 4.3 – La croix noire

Considérons maintenant les autres faisceaux lumineux. Après propagation dans la cellule, ils deviennent elliptiques à cause du déphasage : $\Delta n_{V=0} \frac{2\pi L}{\lambda}$ (cf eq. 4.6) Le déphasage cumulé dépend

de manière cruciale de la direction du faisceau considéré. Quand celui ci vaut un multiple de 2π on observe de nouveau une extinction. La première extinction est obtenue pour :

$$k_x^2 + k_y^2 = \frac{\lambda}{L\Delta n^n}. \quad (4.14)$$

On observe donc une série de cercles concentriques. Le but est donc de placer le faisceau direct (sans élément diffusant) au centre de la croix. Si l'on réalise cet alignement avec une précision meilleure que la moitié du rayon de la première extinction alors on montre que $\theta^2 \sim 10^{-4}$ (se reporter à 4.7). On est alors dans le domaine de validité des calculs précédents.

On peut également estimer la précision maximale de cette procédure préliminaire. Il est tout à fait possible de placer le faisceau direct mieux qu'au dixième du rayon de la première extinction. Ceci correspond à $\theta^2 \sim 5 \times 10^{-6}$. Le but de la procédure fine que nous allons maintenant détailler est d'obtenir une précision bien plus grande.

L'alignement fin

Pour obtenir un alignement compatible avec nos expériences, nous devons aller plus loin que ce simple alignement. Nous utilisons le même type de dispositif, mais cette fois-ci la cellule de Pockels est alimentée par une tension alternative. La direction du polariseur est sur la première bissectrice du système d'axe propre (x,y) et la direction de l'analyseur est désormais variable. Appelons a , l'angle de l'analyseur avec l'axe x.

Après propagation dans la cellule de Pockels, le champs électrique donné par les équations 4.10 et 4.11 arrive sur l'analyseur. L'intensité lumineuse détectée après celui-ci s'écrit :

$$I^\pm \propto 1 + 2(\pm\alpha - s) \cos 2a \mp \delta^\pm \sin 2a. \quad (4.15)$$

Ceci signifie que le signal est modulé à la fréquence de l'alimentation de la cellule de Pockels. Il est alors aisé d'extraire cette modulation grâce à une détection synchrone. Notons LI cette modulation :

$$LI \propto 4\alpha \cos 2a - (\delta^+ + \delta^-) \sin 2a.$$

Cette équation nous permet de contrôler précisément l'alignement :

- si $a = 0^\circ$ on ne détecte que α
- si $a = 45^\circ$ on ne détecte que $\delta^+ + \delta^-$

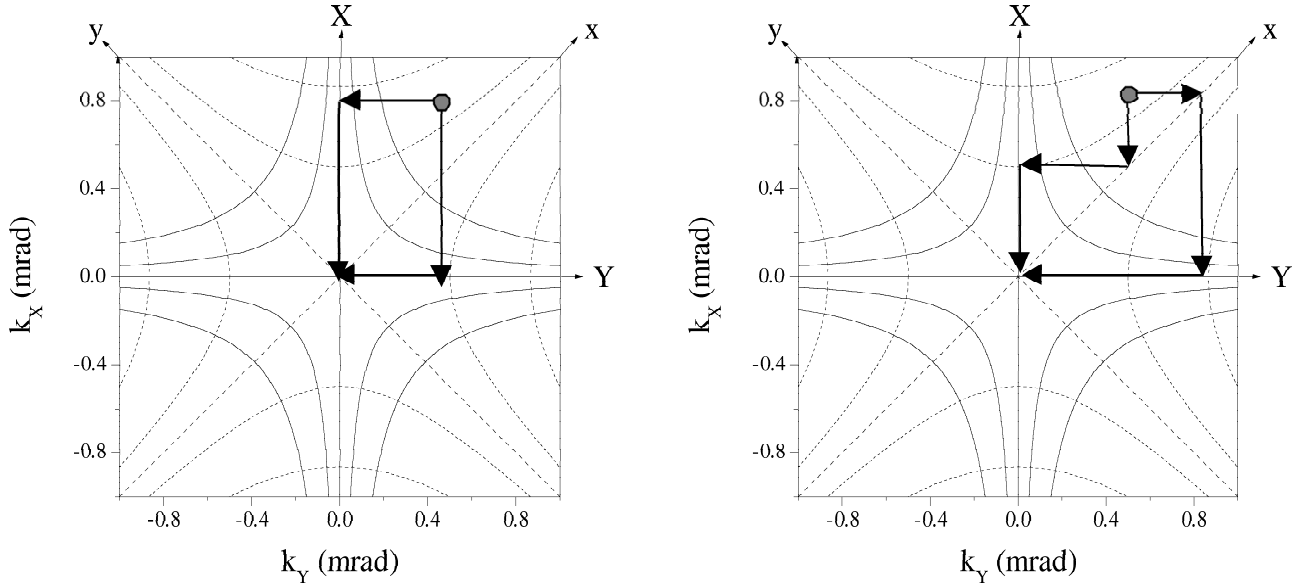
La figure 4.4 représente le plan (k_X, k_Y) . L'origine correspond à l'alignement parfait ie $k_X = k_Y = 0$. On a également représenté les lignes de niveau de α et de $\delta^+ + \delta^-$. Il s'agit d'hyperbole. En effet rappelons que

$$\alpha \propto k_x k_y \quad \delta^+ + \delta^- \propto k_x^2 - k_y^2$$

Concrètement, on se déplace dans ce plan en ajustant des vis d'un système trait-point-plan, que l'on appellera V et H. En jouant sur V (*resp.* H), on se déplace verticalement (*resp.* horizontalement) dans le plan (k_X, k_Y)

La procédure d'alignement est donc la suivante :

- on place l'analyseur à 45° et on annule le signal LI ($LI_{45} \propto \delta^+ + \delta^-$) en utilisant une des deux vis (V or H)

FIG. 4.4 – Le plan k_x, k_y

- On place l'analyseur à 0° et on annule le signal LI ($LI_0 \propto 4\alpha$) en utilisant l'autre vis

Comme illustré ci-dessus (Fig. 4.4), la procédure converge rapidement vers l'alignement parfait au bout de quelques itérations. L'alignement final n'est bien évidemment pas absolu. La limitation vient de la précision avec laquelle on peut annuler le signal Lock-In, et ceci est strictement relié au niveau de bruit. Notre dispositif nous permet après quelques itérations d'atteindre une annulation de LI de quelques 10^{-4} (soit une modulation inférieure au mV pour une tension de 1,5V). Ceci correspond à des valeurs de k_x, k_y de l'ordre de 0.1 mrad soit moins d'une fraction de tour des butés différentielles (V et H).

Il est alors intéressant de noter que cet alignement correspond à une précision $\theta^2 \sim 10^{-8}$ soit 3 ordres de grandeur de plus que le préalignement. D'après les équations 4.1 et 4.2, on peut estimer que ceci correspond à un artefact de quelques 10^{-5} (pour un changement de la transmission de sonde induit par la pompe de 10%) ce qui est en dessous de notre seuil de détection.

Cette procédure nous permet donc de supprimer efficacement les artefacts de dichroïsme linéaire induit par la pompe. Nous illustrons ce résultat (Fig. 4.5) dans une solution de Ruthenium-tris(bipyridyl).

Les cercles vides représentent les changements de transmission (pompe-sonde traditionnel), alors que les 3 autres courbes représentent le dichroïsme circulaire de l'échantillon en fonction du retard entre la pompe et la sonde. Nous avons pris un mélange racémique de Ruthenium-tris(bipyridyl) pour une pompe à 400 nm ($1 \mu\text{J}$) et une sonde à 420 nm. La courbe triangle vers le haut a été obtenue après avoir appliqué la procédure d'alignement complète. Il n'y a pas d'artefact résiduel.

A titre de comparaison, la courbe triangle vers le bas représente la même expérience où l'on a tourné la vis H d'un tour complet. On note que ceci correspond à une précision 3 fois meilleure que ce que l'alignement de la croix aurait pu donner. On observe dans ce cas un signal conséquent

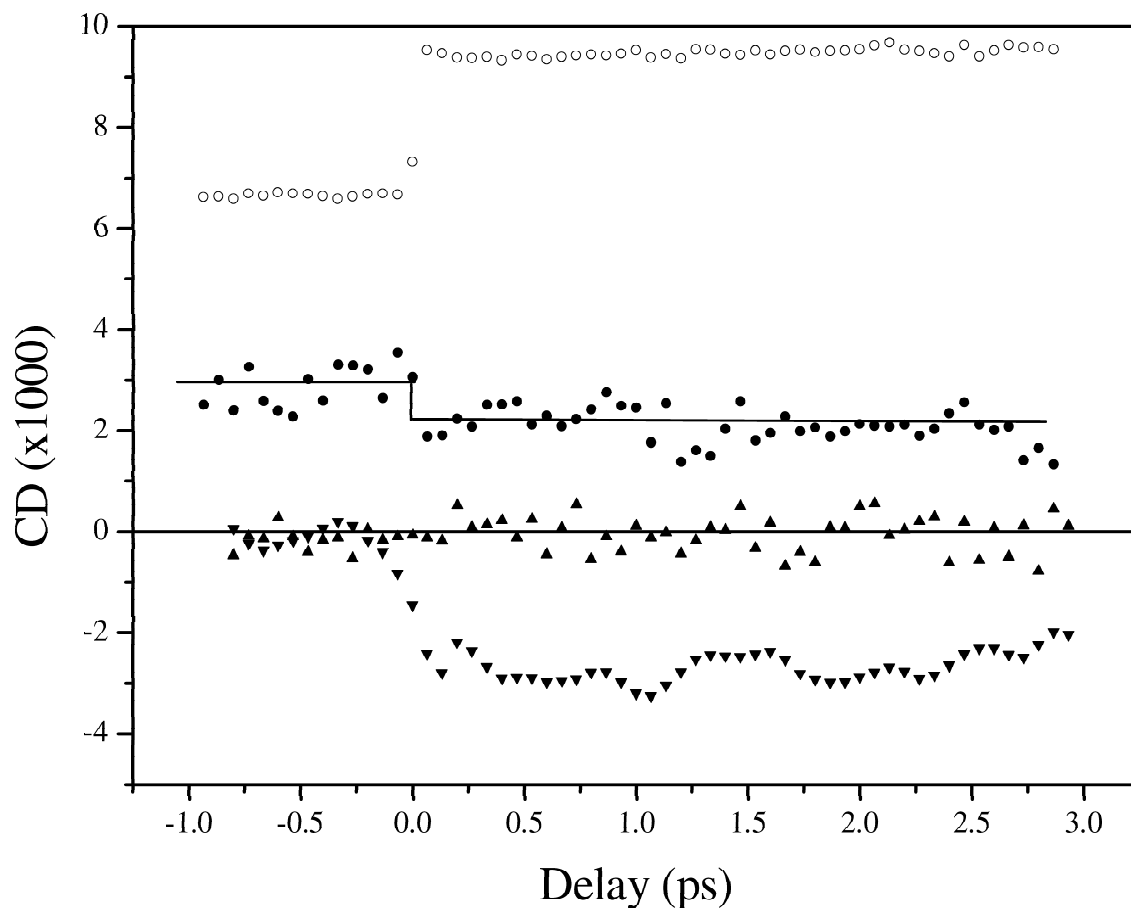


FIG. 4.5 – Une illustration de l'artefact

Rond vide : changements de transmission

Rond noir : dichroïsme circulaire transitoire dans un énantiomère

Triangle haut : signal plat dans un mélange racémique

Triangle bas : signal artefact dans un mélange racémique

qui est du dichroïsme linéaire induit. Ceci prouve encore une fois qu'un alignement poussé est vraiment indispensable.

Une troisième courbe est représentée dans 4.5. Il s'agit d'une variation de CD pour un énantiomère du Ruthenium-tris(bipyridyl). Il est remarquable de noter que le signal véritable et l'artefact ont exactement la même allure, et c'est bien la difficulté de ces expériences de CD résolu temporellement.

4.1.4 D'autres moyens de contrôle de l'artefact

La procédure d'alignement exposée précédemment est très délicate et l'on a pu constater que l'artefact d'alignement est tout de suite important. De plus, les expériences dans la myoglobine nécessitent parfois des jours d'accumulation. Il n'est alors pas réaliste de conserver une grande qualité d'alignement sur de telles échelles de temps. En effet, le laser peut changer légèrement de direction, et des dérives thermiques lentes (notamment au niveau de la cellule de Pockels) peuvent modifier l'état de polarisation du faisceau sonde. Donc si l'on souhaite accéder avec précision aux changements de CD, il est vital d'avoir un autre moyen de contrôle de cet artefact. Nous proposons ici deux pistes pour y parvenir

a/Utilisation de deux énantiomères

Si l'on dispose de deux énantiomères, le principe d'un deuxième contrôle est facile : il s'agit de faire la mesure dans chacun des deux énantiomères, ainsi que dans le mélange racémique, en ne changeant aucun autre paramètre. Si la cellule n'est pas parfaitement alignée, on retrouve un artefact mais il est parfaitement identique pour les deux énantiomères. (On rappelle en effet que c'est un phénomène non chirale). Les signaux recherchés changent eux de signe quand on passe d'un énantiomère à l'autre.

Il suffit donc de faire la différence entre les deux courbes obtenues pour chaque énantiomère.

La figure 4.6 illustre le gain de précision que peut apporter cette méthode. On constate en effet que la cellule est ici très bien alignée, mais pas parfaitement. En effet, lorsque l'on examine la courbe de la solution racémique, elle n'est pas parfaitement constante. Au retard négatif le nuage de points est en dessous de zéro, et il est au dessus au retard positif. L'artefact est ici une marche vers le haut, ce qui est compatible avec le fait que l'énantiomère positif descende moins que l'énantiomère négatif ne monte. En effectuant la différence entre les deux énantiomères, on remonte à la valeur correcte.

b/ Varier la polarisation de la pompe

Lorsque l'on étudie des systèmes biologiques, cette méthode ne marche pas car la nature n'a pas eu la délicate attention de nous fournir les deux énantiomères. On ne trouve en effet qu'un seul énantiomère, c'est l'homochiralité. On doit donc trouver un autre moyen. La première piste serait de dépolariser la pompe ce qui annule automatiquement le dichroïsme linéaire induit. Ceci est rendu possible grâce à des lames composées de petits cristaux de quartz de biréfringence et d'orientation aléatoire. Cette solution présente l'avantage de la simplicité. Il y a cependant deux inconvénients majeurs :

- le prix d'une lame dépolarisante
- on ne dispose pas de moyen de contrôle précis de la qualité de dépolarisation

Nous avons donc opté pour une autre piste. Si la dépolarisation propre d'un faisceau lumineux peut-être considérée comme une opération délicate, l'action de transformer une polarisation circulaire en une polarisation linéaire est elle plus aisée. Il suffit en effet de placer une lame quart d'onde convenablement orientée.

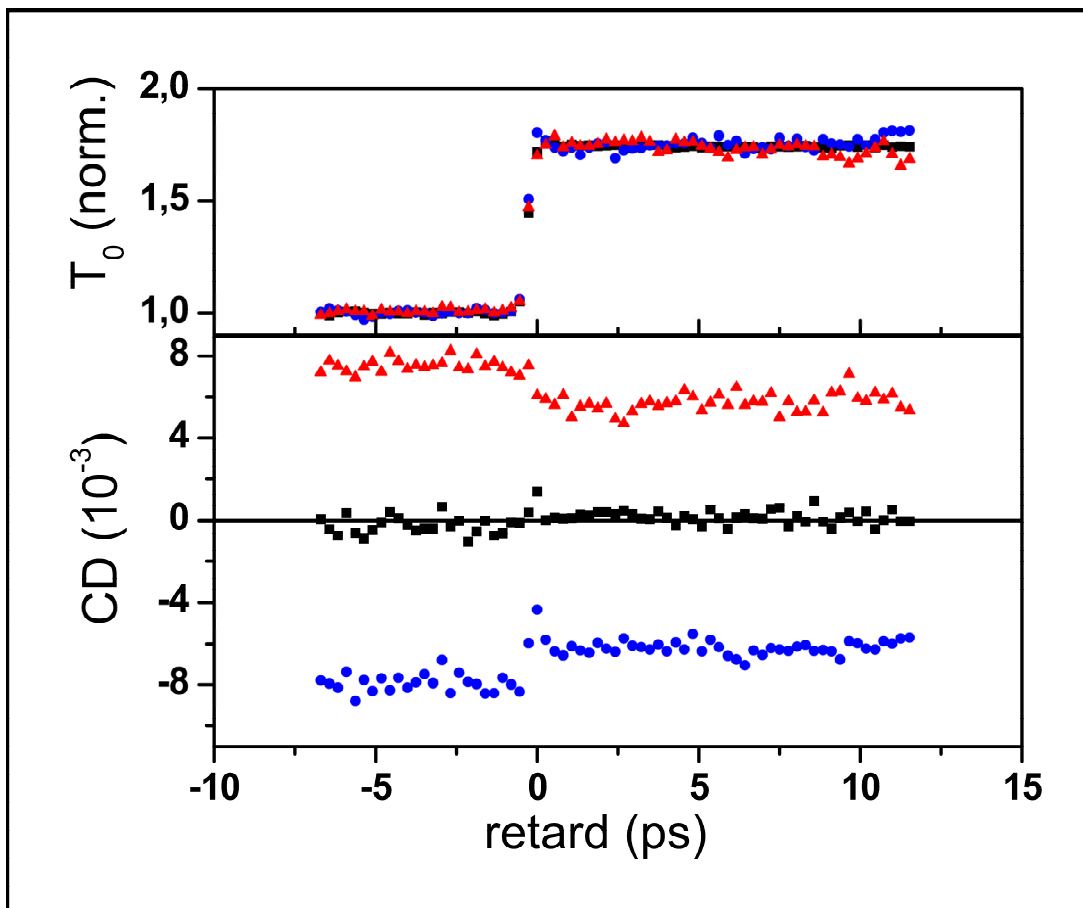


FIG. 4.6 – La comparaison des résultats obtenus pour les 2 énantiomères

L'idée a alors été de voir la variation cet l'artefact en fonction de la polarisation de la pompe (linéaire parallèle, circulaire droite ou circulaire gauche). Nous illustrons le résultat (Fig. 4.7).

Sur l'encart de gauche (A), la cellule de Pockels est parfaitement alignée. On constate que en dehors du retard zéro, les trois courbes obtenues pour les trois polarisations de pompe possibles donnent le même résultat.

Dans l'encart B, on a recommencé la même expérience, avec strictement les même conditions, mais en désalignant légèrement la cellule. On constate que pour une polarisation parallèle, l'artefact est très grand. Il est beaucoup plus faible quand la pompe est circulaire gauche ou droite.

Ceci est assez intuitif car dans le cas d'une polarisation de pompe circulaire, il n'y a plus *a priori* de dichroïsme linéaire induit. Cependant, les deux courbes obtenues pour les polarisations gauche et droite (notée C+ et C-) ne se superposent pas exactement, mais lorsque l'on effectue la moyenne des deux, on élimine complètement l'artefact.

Nous ne chercherons pas ici à analyser ce qui se passe au retard zéro. On constate simplement que l'effet est maximal pour des polarisations de pompe circulaire.

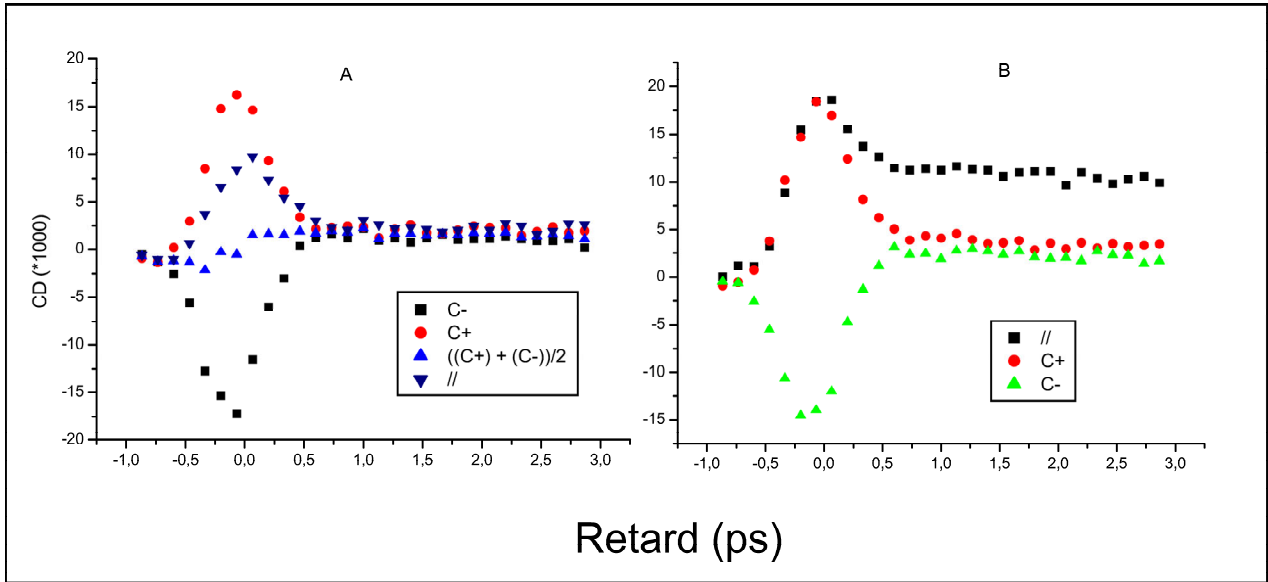


FIG. 4.7 – L'effet de la polarisation de la pompe

4.2 L'expérience visible

Fort de ce travail approfondi de maîtrise des artefacts de dichroïsme linéaire induit, nous pouvons nous livrer à l'étude de dichroïsme circulaire dans MbCO au niveau de la bande de Soret. Notons que sans l'étude de la section précédente, cette expérience aurait été impossible car les signaux de CD mesurés, donc *de facto*, les variations de ces signaux avec l'excitation de la pompe sont vraiment petits.

Nous détaillerons tout d'abord la configuration expérimentale que nous avons adoptée pour mesurer le CD dans cette de longueur d'onde 4.2.1

La deuxième partie 4.2.2 présentera les résultats les plus importants de ce travail de thèse : l'obtention d'un signal de CD transitoire dans la myoglobine.

Les deux dernières parties 4.2.3 et 4.2.4 seront consacrées à la discussions des différentes sources parasites de signal, et à l'interprétation des résultats.

4.2.1 Le principe

Pour faire cette expérience nous disposons d'un faisceau amplifié titane saphir (800 nm, 1 kHz, 100 fs) système Spectra-Physics Spitfire. Le but est de générer à partir de ce faisceau une pompe et une sonde. Il est très aisé de photodissocier le complexe MbCO avec un faisceau à 400 nm (800 nm doublé). L'inconvénient de cette longueur d'onde de pompe est que l'énergie déposée est bien supérieure à l'énergie de dissociation. On dépose donc un excès d'énergie dans le système.

Il serait plus adapté de pomper vers le jaune, dans les bandes latérales (α et β) d'absorption de l'hème, mais ceci à un coût : la construction de NOPA. Il faut alors initialement environ 200 μ J de faisceau à 800 nm pour réaliser une telle source, et nous disposons de 100 μ J au total pour

faire cette expérience. Nous avons donc dû nous contenter de la première solution, *i.e.* exciter le système à 400 nm.

La sonde doit être accordable dans toute la bande de Soret, donc de 400 nm à 500 nm. La stratégie usuelle pour générer une sonde accordable est de focaliser le faisceau à 800 nm dans une lame de saphir. Le problème est que le continuum obtenu s'effondre à 480 nm. Deux méthodes différentes sont utilisées pour descendre plus loin dans l'UV.

- la première consiste à remplacer le saphir par du CaF_2 . Ceci permet de gagner une bonne centaine de nanomètres. La grosse difficulté est qu'il faut en permanence bouger la lame de CaF_2 qui se dégrade très rapidement sous le flux laser.
- la deuxième solution, qui est celle que nous avons adoptée, consiste à réaliser un continuum bleu : on double le faisceau à 800 nm afin d'obtenir un faisceau à 400 nm que l'on focalise ensuite dans une lame de saphir. Cette solution est plus simple que la première. Il y a deux inconvénients par rapport à la première solution : la stabilité est moins bonne (un effet non linéaire de plus) et le spectre obtenu est plus étroit. On obtient en effet une gamme de 350 nm à 560 nm (Fig. 4.8), au lieu de 350 nm à 1,2 μm dans le cas du CaF_2 .

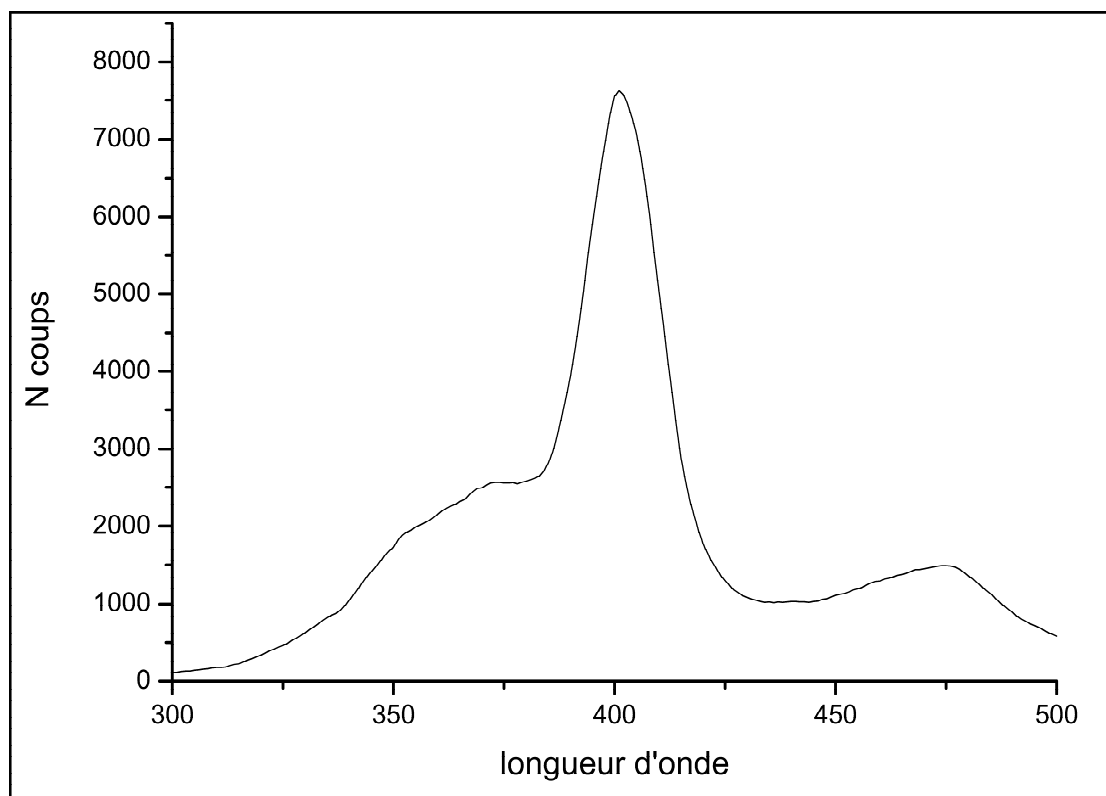


FIG. 4.8 – Le spectre d'un continuum bleu

Le point délicat reste la sélection spectrale de la longueur de sonde. Dans les expériences pompe-sonde traditionnelles, on place un spectromètre à réseau après l'échantillon et on vient mesurer sur une CCD (ou une barette de diode) la transmission de toutes les longueurs d'onde

simultanément. Ce dispositif très confortable (on obtient en une seule fois la carte temps-fréquence) n'est pas transposable à notre expérience pour les raisons suivantes :

- la cellule de Pockels n'est $\lambda/4$ que pour une longueur d'onde donnée, donc il faut changer la tension d'alimentation à chaque fréquence.
- dans la myoglobine $\gamma = \frac{\Delta(DO)}{DO} = 3.10^{-4}$, donc il est nécessaire de travailler avec une densité optique de 3 pour la sonde, si l'on souhaite mesurer du dichroïsme circulaire. La transmission après l'échantillon n'est alors plus détectable avec une diode ou une caméra CCD : il faut un tube photomultiplicateur ainsi qu'un système lourd d'amplification électronique du signal. La détection ne peut donc être que monocanal
- on ne peut pas effectuer la sélection spectrale après l'échantillon. En effet, l'expérience est très sensible à tous les éléments possédant du dichroïsme linéaire, ou une biréfringence. Donc de ce point de vue, un spectromètre est très mauvais. Il doit donc être placé avant la génération des polarisations circulaires

Placer le spectromètre avant l'interaction pompe sonde peut paraître absurde : en effet, si l'on augmente la résolution spectrale, on allonge les impulsions, donc on perd en résolution temporelle, il est donc plus judicieux de placer le spectromètre après l'interaction pompe sonde.

Ce raisonnement est faux, du moins si l'on fait l'hypothèse que le spectromètre se comporte comme une ligne à dispersion nulle (*i.e.*, il n'introduit pas de dérive en fréquence supplémentaire). En effet, on ne peut pas tricher avec la relation $\tau\Delta\nu = 1$ et la perte en résolution temporelle lorsque l'on augmente la résolution spectrale existe que l'on fasse la sélection spectrale après ou avant l'interaction pompe sonde :

- si le spectromètre est placé avant, il allonge les impulsions, on perd en résolution temporelle
- si le spectromètre est placé après, les impulsions gardent leur durée, la résolution temporelle semble excellente, mais l'on fait apparaître des effets cohérents de polarisation perturbée. Ceci induit alors indirectement une perte de résolution temporelle.

Le fait de placer un spectromètre avant l'interaction pompe sonde ne fait donc pas perdre en résolution temporelle. Les considérations précédentes nous amènent maintenant à présenter le montage expérimental (figure 4.9). Le faisceau à 400 nm est obtenu par doublage du 800 nm dans un cristal de BBO de 1 mm. Le faisceau est ensuite séparé en deux parties.

Sur la partie sonde, on retrouve la génération d'un continuum. Le spectromètre à réseau assure la sélection spectrale. Un polariseur polarise le faisceau linéairement, puis la cellule de Pockels génère les polarisations gauche et droite. La sonde est ensuite focalisée dans l'échantillon. Les signaux détectés simultanément par les deux photomultiplicateurs sont amplifiés parallèlement par deux Boxcar. On effectue ensuite une normalisation afin d'éliminer le bruit pic à pic. Le signal normalisé est ensuite envoyé sur un appareil de détection synchrone.

Sur la partie pompe on trouve une ligne à retard qui permet d'avancer la pompe. On place également un polariseur ainsi qu'une lame quart d'onde qui permet de faire varier les polarisations de pompe.

Discutons à présent les autres détails importants spécifiques à cette expérience.

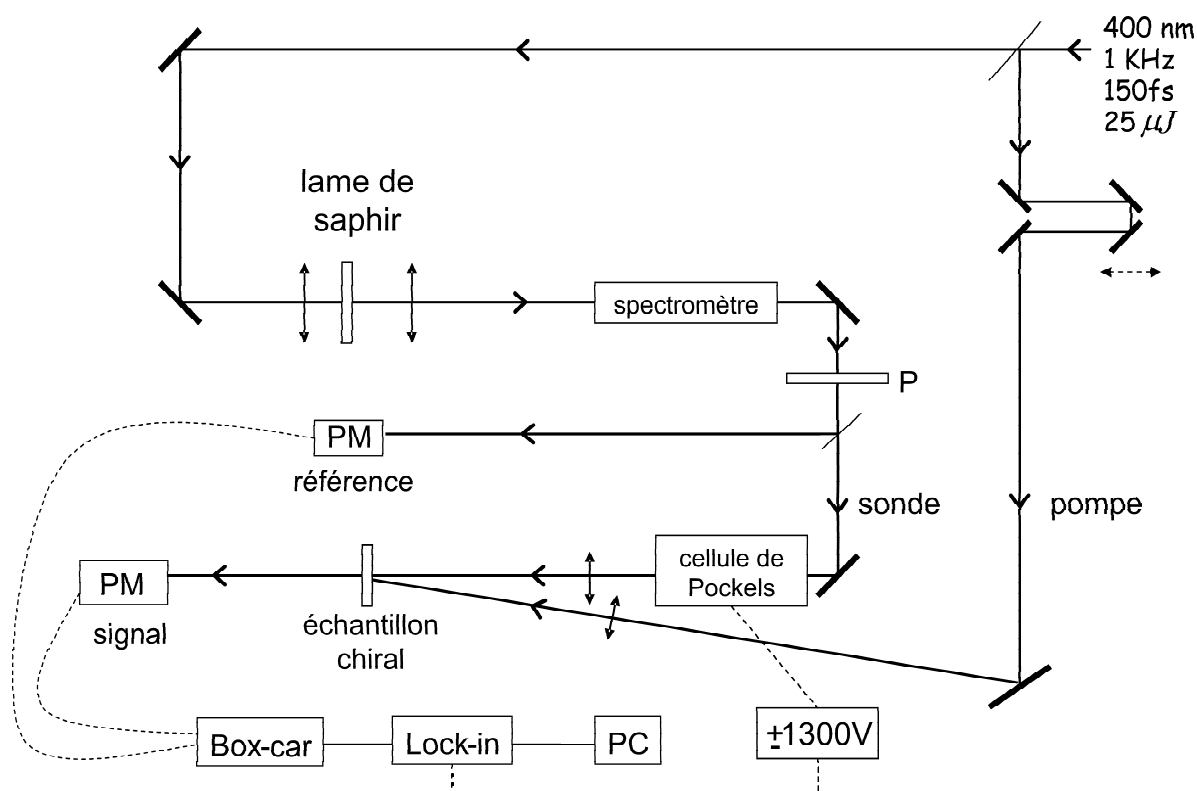


FIG. 4.9 – Le schéma de l'expérience visible

préparation des échantillons

On prépare tout d'abord une solution de myoglobine $230 \mu\text{M}$ dans une solution tampon de trisHCl 100 mM $\text{pH}=8$. La myoglobine est alors sous la forme oxydée Fe^{3+} . Pour pouvoir fixer le ligand CO , la protéine doit être sous la forme réduite Fe^{2+} . On place donc la solution dans une fiole étanche, on rince à l'argon afin de supprimer l'oxygène dissout dans la solution, et on la réduit dans un excès de dithionite. Il ne reste plus qu'à rajouter du CO gazeux qui se fixe très rapidement et irréversiblement. La solution est ensuite transférée dans une cuve étanche et rincée à l'argon. Nous avons travaillé avec des cuves Hellma en silice de 1 mm de trajet optique.

le mouvement de la cuve

Le taux de répétition du laser est de 1 kHz . Donc toutes les millisecondes, un nouveau couple d'impulsions (pompe et sonde) arrive sur l'échantillon. Or la recombinaison du CO sur la protéine est de quelques millisecondes. Pour éviter d'avoir une sonde qui mesure la photodissociation résiduelle d'une pompe précédente, il faut bouger l'échantillon avec une vitesse supérieure à $80 \mu\text{m/ms}$ (soit 8 cm.s^{-1}) où $80 \mu\text{m}$ est le diamètre de la tache focale.

Une rotation excentrique permet de faire décrire à la cuve des cercles d'un centimètre de diamètre. Il suffit alors que la cuve fasse plus de trois tours par seconde ($3 \cdot \pi \cdot 1 > 8$). Avec un tel déplacement de la cuve, on est très sensible à l'homogénéité de l'échantillon. On observe en effet très fréquemment des oscillations très importantes de la transmission de l'échantillon, et le fait de

normaliser pic à pic ne peut évidemment pas supprimer ce bruit.

On constate de plus que dans cette configuration, le faisceau revient sur la même tache toute les 333 ms. Pour l'étude de MbCO, ceci n'est pas gênant car le système met quelques millisecondes pour revenir à l'état initial. Cependant, il serait plus rigoureux de composer cette rotation rapide avec une translation lente afin de décrire un cercle différent à chaque tour. Seules deux taches sur 333 seraient alors excitées de manière rapprochée, et pour toutes les autres, le temps séparant deux excitations seraient égal au temps d'aller retour de la translation, soit quelques secondes.

Un tel système est à l'étude et sera bientôt en place sur l'expérience.

l'alignement polarimétrique de la sonde

Les signaux de dichroïsme circulaire mesurés sont extrêmement faibles. Nous avons largement décrit précédemment l'artefact à l'origine de la création d'un saut de CD au niveau du retard zéro. En plus de ce problème, l'expérience est sujette à des offsets (indépendants de l'effet de la pompe) pouvant être importants.

Illustrons ce phénomène : il suffit de placer sur le trajet de la sonde un élément possédant une biréfringence, suivi d'un élément possédant du dichroïsme linéaire. Pour fixer les idées, prenons le cas catastrophique d'une biréfringence de $\lambda/4$ suivie d'un dichroïsme linéaire de 100%. La biréfringence transformera les deux polarisations circulaires (gauche et droite) en deux polarisations linéaires orthogonales. Si l'élément de dichroïsme linéaire est idéalement mal orienté on verra alors un pseudo dichroïsme circulaire de 100 %

La moindre contrainte sur une optique créera une biréfringence. Nous avons donc soigné le collage de toutes les optiques. Nous avons nous-mêmes trié en polarimétrie les cuves commerciales Hellma qui dans la plupart des cas étaient excellentes.

Le moindre dioptre qui n'est pas perpendiculaire à l'axe du faisceau crée du dichroïsme linéaire, car on peut alors trouver un coefficient de réflexion s , différent du coefficient p . Donc, les transmissions des polarisations s et p sont différentes. Nous avons réglé les différentes lentilles le plus possible en autocollimation. Il a fallu aussi contrôler le dichroïsme linéaire du PM (ou plutôt la différence d'efficacité pour deux polarisations orthogonales)

Pour résumer, un élément biréfringent suivi d'un élément possédant un dichroïsme linéaire peut créer un offset (identique au retard positif et négatif). On peut donc s'en affranchir en faisant une mesure où l'on a remplacé la solution de la cuve par une solution non chirale ayant la même absorption.

Cependant, si la pompe est polarisée linéairement, l'échantillon possède pour des retards positifs du dichroïsme linéaire, mais également une biréfringence induite (faible dans le cas résonnant, mais non négligeable). Donc, si il y a un élément possédant du dichroïsme linéaire après l'échantillon, celui-ci va transformer la biréfringence en dichroïsme circulaire. On retrouve alors un artefact analogue au dichroïsme linéaire induit. Cette dernière remarque est surtout là pour mettre en évidence le fait qu'il est impossible de placer un spectromètre après l'échantillon. Ils sont en général très biréfringents et dichroïques.

le compromis absorption de l'échantillon-énergie de la pompe

Les signaux de CD sont très faibles, donc pour pouvoir les mesurer, il faut travailler avec une concentration maximale. La seule limite est le fait de pouvoir détecter des photons après l'échantillon. Ce raisonnement est celui que l'on adopte lorsque l'on veut faire une mesure de CD statique.

Les spectromètres de CD commerciaux tolèrent une DO de 0.5 dans l'ultraviolet lointain (de 180 nm à 230 nm), une DO de 1 dans l'UV moyen (de 230 nm à 350 nm) et une DO de 2 pour le reste (350 nm à 800 nm). Ces données dépendent de la luminosité de la source utilisée et de la sensibilité des PM.

Dans notre configuration, la brillance de notre continuum et la sensibilité de notre PM fait que nous pouvons travailler sans problème avec une DO de 3 de 400 nm à 450 nm. Etant donné la faiblesse du rapport $\gamma = \Delta DO / DO = 3.10^{-4}$ pour ces longueurs d'onde, ceci donne $\Delta DO \sim 10^{-3}$: c'est une modulation mesurable avec un système laser, (en se fatiguant un peu tout de même).

Le but est donc d'avoir une DO de 3 à la longueur d'onde de la sonde. Ceci est facile si l'on travaille à 422 nm au pic de l'absorption. En revanche, si l'on travaille à 435 nm, il faut multiplier la concentration par 2.

Cependant, il ne faut pas oublier que nous effectuons une expérience de TRCD. L'absorption de la pompe est elle aussi critique. L'idéal est d'avoir une DO entre 0.5 et 1 à 400 nm. Au delà, seules les toutes premières couches de l'échantillon sont excitées, et le système n'est plus optimal. Une mauvaise idée serait de compenser ce phénomène en augmentant l'énergie de la pompe, car dans ce cas, on saturerait le phénomène et détruirait l'échantillon.

Travailler avec une DO d'environ 3 au pic de la bande de Soret, nous amène vers une densité optique d'environ 0.8 pour la pompe. L'expérience est donc tout à fait faisable pour une sonde à 422 nm. En revanche, pour l'expérience à 435 nm, il n'est pas raisonnable de multiplier la concentration par deux, car la marge de manoeuvre au niveau de l'absorption de pompe est assez limitée. L'expérience pour cette longueur d'onde sonde est donc intrinsèquement plus difficile.

Il reste à présent à choisir l'énergie des impulsions de pompe. Le pourcentage de molécules photodissociées η est proportionnelle à cette énergie, mais aussi à l'absorption de la pompe. L'objectif est triple :

- avoir l'effet maximal de changement de CD et d'absorption
- ne pas saturer le phénomène
- ne pas photo détruire l'échantillon

Après avoir effectué des tests de linéarité, de stabilité de l'échantillon, le domaine de fonctionnement de l'expérience est le suivant

- l'énergie de pompe est entre 250 nJ et 300 nJ
- l'absorption de la pompe à 400 nm est entre $DO \approx 0,8$ et 1
- on excite environ 30 % des molécules
- la concentration est vers 230 μM

l'accumulation

C'est la difficulté finale de l'expérience. Les signaux étant très petits, le seul moyen de tirer le signal du bruit est d'accumuler très longuement. Les courbes présentées dans la section suivante ont été obtenues avec plus de 24 heures d'accumulation, pour un fonctionnement optimal du système. Ceci pose le problème de la stabilité de laser et de l'échantillon sur une telle durée.

La qualité du système Spectra-Physics, et la simplicité de la source (simple doublage de fréquence pour générer la pompe) assurent une excellente stabilité du système sur 24 heures.

La tenue de l'échantillon dépend de manière critique de l'étanchéité de la cuve (si de l'oxygène rentre, l'échantillon se dégrade très rapidement) ainsi que de l'énergie avec laquelle on pompe (si l'énergie des impulsions pompe est supérieure à 300 nJ, l'échantillon ne tient pas longtemps). Nous avons deux critères nous permettant de vérifier qu'il n'y a pas eu de changement au cours des 24 heures :

- on effectue un spectre d'absorption avant et après la série d'expériences, les spectres visibles de MbCO, Mb et Mb oxydé sont en effet très différents
- notre expérience nous permet d'accumuler simultanément l'absorption et le CD résolu temporellement. Il s'agit donc de vérifier que les quelques dizaines de courbes obtenues pendant une série donnent toutes la même absorption transitoire

4.2.2 Les résultats

Nous nous sommes attachés dans un premier temps à étudier la photodissociation sur un temps long. Le retard maximum que pouvait nous donner notre ligne à retard était 1,5 ns.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes concentrés sur les 200 premières picosecondes de la réaction afin de pouvoir étudier les tout premiers mouvements des résidus après la photodissociation.

Pour finir nous avons tenté de réaliser l'expérience directement dans l'hémoglobine.

résultats sur une échelle de temps nanoseconde

La figure 4.10, encart du haut, donne l'évolution temporelle du CD, ou plus précisément de $1000 * \Delta\alpha L$ (se reporter à la section 1.2), en fonction du retard en picoseconde. Nous avons choisi deux longueurs d'onde de sonde où l'effet est le plus important 422 nm et 440 nm. Pour plus de lisibilité, nous reproduisons la figure 4.11 donnant les spectres de CD et d'absorption statique de Mb et MbCO.

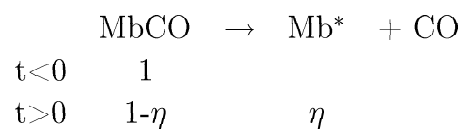
A 422 nm le CD de MbCO est maximal, alors que celui de Mb est faible (Fig. 4.11). On observe bien que le CD diminue entre le retard positif et négatif.

A 440 nm, le niveau de MbCO est légèrement négatif, le CD de Mb est maximal. Le résultat est là encore cohérent.

Nous avons donc réalisé cette expérience pour différentes longueurs d'onde afin de construire le spectre de dichroïsme circulaire de l'espèce dissociée, figure 4.10 encart du bas.

- Les ronds verts représentent le CD de l'échantillon au retard négatif CD^- : il s'agit donc du CD de l'espèce MbCO
- Les carrés noirs représentent la différence de CD entre le retard positif et le retard négatif $CD^+ - CD^-$, normalisée à 100% de molécules excitées.
- Les carrés rouges représentent le niveau de CD de l'espèce dissociée Mb^* . Il s'agit de points extraits des deux courbes précédentes

Détaillons brièvement le calcul. La réaction de photodissociation s'écrit :



Ceci permet de calculer le CD de l'échantillon au retard positif et négatif .

$$\begin{aligned}
 CD^- &= CD(MbCO) \\
 CD^+ - CD^- &= \eta(CD(Mb^*) - CD(MbCO))
 \end{aligned}$$

où η est le pourcentage de molécules dissociées, et Mb^* désigne l'espèce dissociée qui peut *a priori* avoir un niveau de CD différent de celui de Mb. En revanche, on sait que l'absorption de Mb^* après quelques picosecondes est celle de Mb [30]. Ceci va être très utile pour calculer η car on peut mesurer facilement la différence d'absorption statique entre $DO(MbCO)$ et $DO(Mb)$. On note DO^+ et DO^- les absorptions de l'échantillon aux retards positifs et négatif. On trouve alors

$$\eta = \frac{DO^- - DO^+}{DO(MbCO) - DO(Mb)}$$

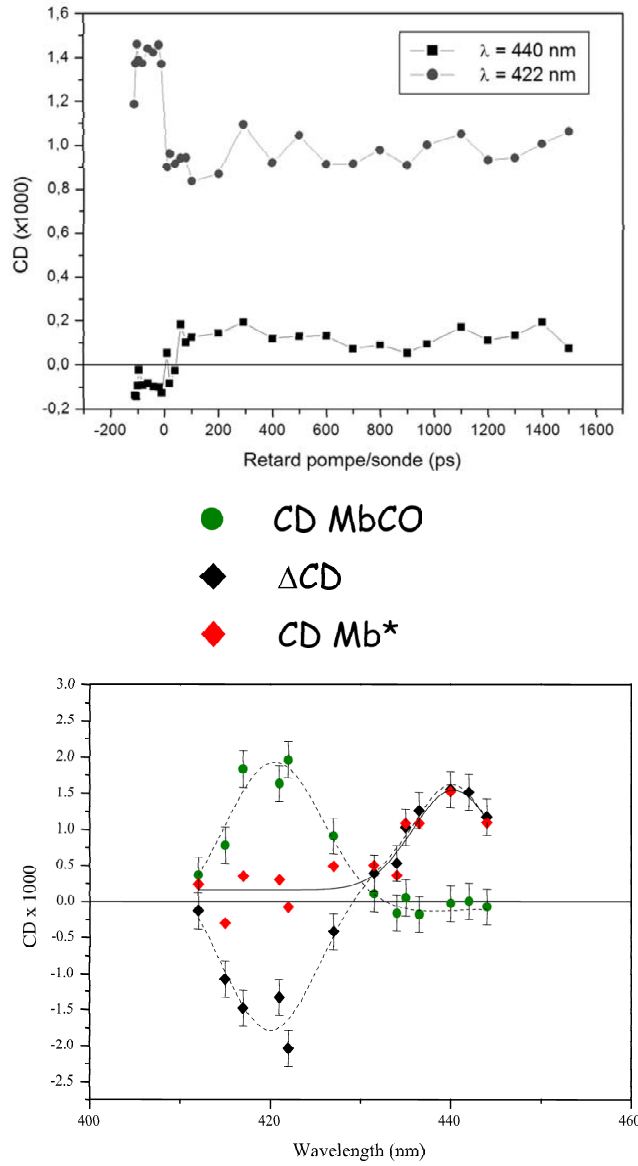


FIG. 4.10 – L'évolution du spectre de CD sur une échelle de temps d'une nanoseconde

Ceci permet alors de terminer le calcul de l'ordonnée des carrés rouges

$$CD(MB^*) = \frac{CD^+ - CD^-}{\eta} + CD^-$$

Le spectre de l'espèce dissociée obtenu est alors très semblable au spectre de CD de Mb. L'intensité de la bande peut néanmoins paraître un peu plus grande que celle de Mb lorsque l'on examine les spectres statiques 4.11. Il faut cependant noter que la détermination précise du niveau de CD de l'espèce photodissociée reste extrêmement difficile. En particulier, la détermination du niveau de CD de Mb* dépend de manière critique du calcul de η , ce qui rajoute à l'incertitude.

Nous pouvons donc conclure que, à l'échelle de la précision de notre expérience, le niveau de CD obtenu au bout de 200 ps est celui de Mb, et que ce niveau ne bouge pas entre 200 ps et 1,5 ns. Ces résultats sont donc en accord avec ceux obtenus par l'équipe de Kliger [17] où le domaine temporel exploré allait de 1 ns à 200 ns.

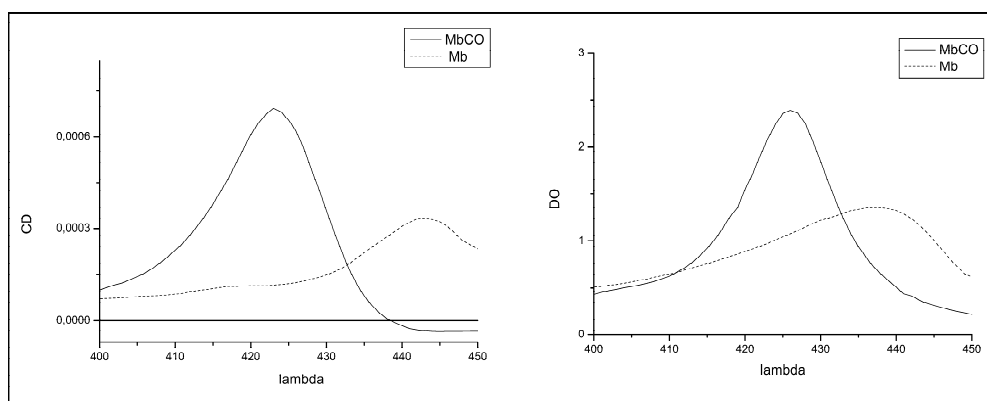


FIG. 4.11 – Les spectres expérimentaux de MbCO et Mb

Notons que chaque point de ce spectre a demandé parfois plusieurs jours d'accumulation. A titre de comparaison, une expérience pompe sonde traditionnelle permet d'avoir la carte complète (retard fréquence) de l'absorption transitoire en quelques minutes. A ce stade, une telle expérience n'apporte donc pas d'information supplémentaire. Il est en effet amplement suffisant de suivre le passage de MbCO à Mb avec une expérience d'absorption.

résultats sur une échelle de temps picoseconde

Nous avons ensuite étudié le phénomène sur des temps plus courts. Ces signaux ont demandé encore plus d'accumulation que ceux obtenus à l'échelle nanoseconde. Le résultat est rapporté sur la figure 4.12.

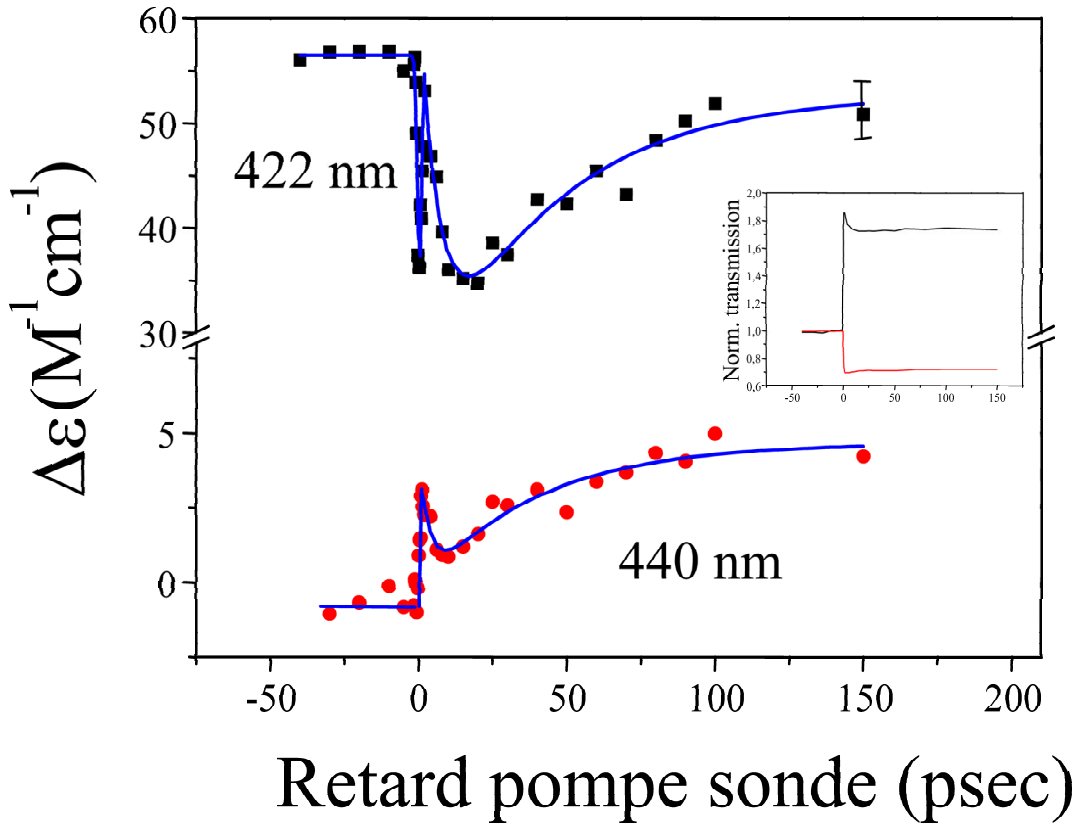


FIG. 4.12 – L'évolution du CD sur une échelle de temps de 100 ps

Après une variation de signal instantanée, due au changement de l'état électronique de l'hème, on observe aussi bien à 422 nm qu'à 440 nm la même dynamique temporelle :

- le niveau de CD baisse en une dizaine de picosecondes
- il se relaxe vers sa valeur finale en une centaine de picosecondes

Le pic étroit au retard zéro est un artefact qui ne contient pas d'informations conformationnelles (d'origine non chirale) [63]. Il permet cependant de vérifier que notre résolution temporelle est sub-picoseconde (650 fs) car celui-ci ne dure que le temps de recouvrement des impulsions pompe et sonde. La courbe en trait plein correspond à un ajustement avec deux exponentielles, un temps de 7 picosecondes pour la phase descendante (± 3 ps), et 43 picosecondes pour la remontée (± 17 ps).

A titre de comparaison, nous avons tracé la transmission de l'échantillon en fonction du retard (petit encart (Fig. 4.12)), qui ne présente elle aucune dynamique particulière, en dehors de la relaxation de l'état excité de l'hème sur un temps de 3 ps [30]. Ceci met en évidence le gain de sensibilité du dichroïsme circulaire par rapport à l'absorption.

Pour cette série d'expériences, rappelons encore une fois que le niveau final est soumis à une grande incertitude à cause des artefacts. Il est donc possible que la courbe soit globalement décalée verticalement pour les retards positifs. Nous avons en effet observé que ces phénomènes parasites n'ont pas de structure temporelle, il s'agit d'une marche d'escalier. En revanche, la dynamique temporelle, c'est à dire la position relative des points aux retards positifs, est elle tout à fait reproductible.

Comparons à présent ces résultats expérimentaux avec ceux obtenus par Simon [18]. Un temps de monté (300 ps) du signal de CD, dans le proche UV (à 355 nm), avait été observé. La résolution était de 50 picosecondes. Nous observons une dynamique globale sensiblement plus rapide. Il faut cependant remarquer que l'incertitude de l'expérience de Simon est grande, due à sa faible résolution temporelle. De plus, les longueurs d'onde sont différentes : dans le proche UV, le signal de CD est beaucoup plus difficile à interpréter (section 1.5) et il est tout à fait concevable qu'un signal de CD à 355 nm ne soit pas sensible aux mêmes mouvements de résidus.

Le point vraiment nouveau est que notre résolution temporelle nous permet d'observer de manière séquentielle une décroissance, suivi d'une remontée du signal. De plus, nous obtenons cette dynamique pour deux longueurs d'ondes de sonde différentes.

résultat dans l'hémoglobine

Nous avons également fait quelques expériences dans l'hémoglobine, mais uniquement sur une échelle de temps courte, et pour une seule longueur d'onde de sonde, à 422 nm . Nous n'avons pas mené, pour l'instant, d'étude systématique sur ce système à cause de la grande complexité du produit obtenu après dissociation. Il s'agit en effet d'un état où un seul CO sur les quatre est dissocié et ceci rend l'interprétation des spectres de CD très compliquée.

Cependant, le résultat obtenu est suffisamment intéressant pour être présenté dans ce manuscrit. Celui-ci peut en effet être considéré comme une illustration de l'effet allostérique homotrope. Examinons le résultat obtenu (Fig. 4.13), nous reportons deux cinétiques de deux expériences différentes, mais effectuées avec des conditions proches. On retrouve la même courbe que celle reportée à la figure 4.12 (MbCO à 422 nm), (triangles), et le résultat obtenu dans HbCO, à la même longueur d'onde, (carrés).

Nous observons le même type de dynamique. Cependant, le CD transitoire au bout de quelques dizaines de picosecondes est beaucoup plus bas dans HbCO que dans MbCO. Notre propos ici n'est pas de détailler l'interprétation de ces signaux de CD, ceci est en effet l'objet des deux sections suivantes. Nous nous contentons d'exposer un modèle simple, mais qui permet cependant de comprendre les différences obtenues en terme d'effet allostérique.

Revenons sur le mécanisme de la réaction. Après l'absorption d'un photon, il y a dissociation, l'hème se dôme, et la myoglobine se retrouve sous une forme contrainte Mb*. Elle se relâche ensuite vers la forme Mb. La différence principale dans le cas de l'hémoglobine est que le relâchement est gêné par la structure quaternaire. En effet, selon le modèle de Perutz, le mouvement de l'hélice F est responsable des premières étapes de l'effet allostérique homotrope.

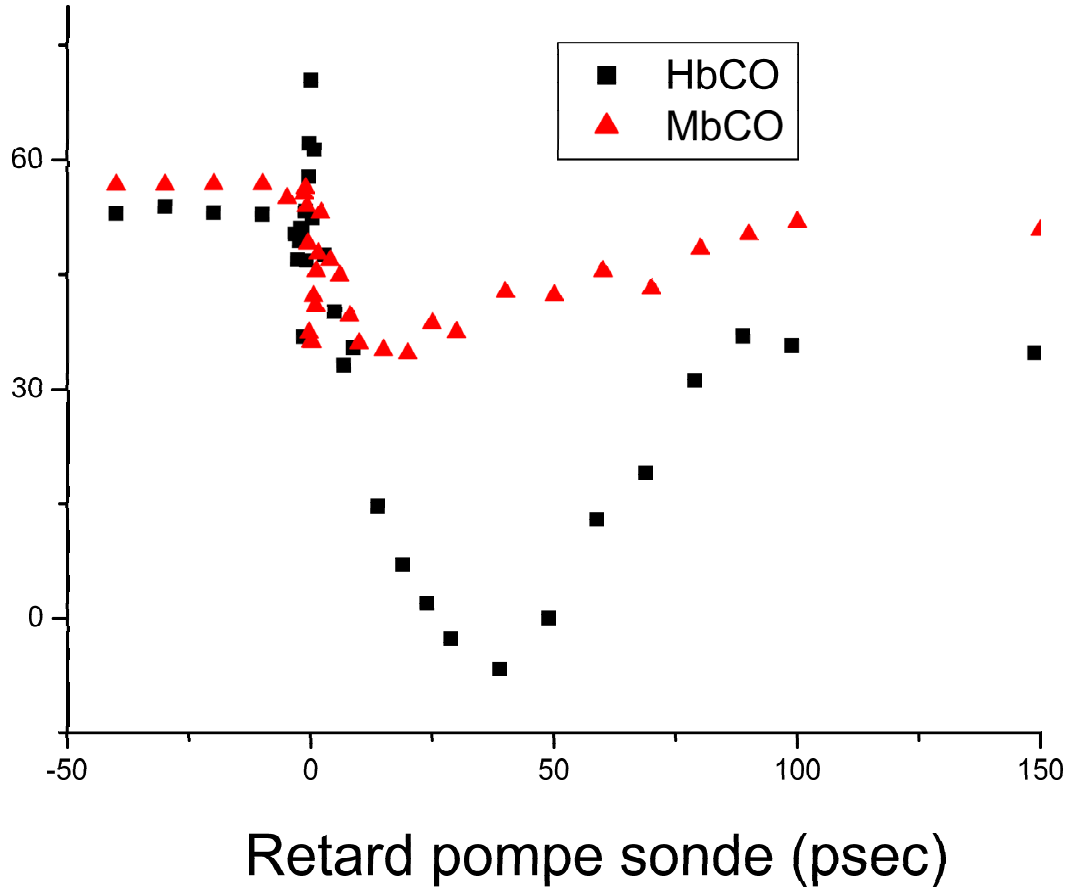
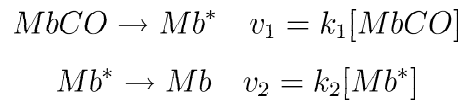


FIG. 4.13 – La comparaison entre l'hémoglobine et la myoglobine

Ce phénomène étant beaucoup plus lent que les échelles de temps discutées ici, le mouvement de l'hélice F est gêné dans le cas de l'hémoglobine. On peut s'attendre à ce que la première étape, le passage de $HbCO$ à Hb^* , se fasse sur la même échelle de temps que dans le cas de la myoglobine, et que la deuxième étape de relâchement ($Hb^* \rightarrow Hb$) se fasse sur une échelle de temps plus longue.

Ecrivons donc un système d'équations cinétiques modèle.



Les conditions initiales s'écrivent :

$$[MbCO] = [MbCO]^0, \quad [Mb^*] = [Mb] = 0$$

La résolution des équations différentielles de ce système donne

$$\begin{aligned} [MbCO] &= [MbCO]^0 e^{-k_1 t} \\ [Mb^*] &= [MbCO]^0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \end{aligned}$$

$$[Mb] = [MbCO]^0 \frac{k_1 k_2}{k_2 - k_1} \left(\frac{e^{-k_2 t}}{k_2} - \frac{e^{-k_1 t}}{k_1} \right) + [MbCO]^0$$

La quantité d'espèce intermédiaire présente dépend de manière critique du rapport entre k_1 et k_2 . Si la deuxième réaction est plus rapide que la première, Mb^* est aussitôt consommé. En revanche, si l'on ralentit la deuxième réaction, $[Mb^*]$ peut devenir transitoirement beaucoup plus important.

L'ajustement précis de nos données expérimentales à partir de ce modèle simple n'aurait pas de sens. Nous ne connaissons pas les niveaux de CD de Mb^* , Hb^* . L'espèce Hb à +300 ps a encore 3 CO fixés, et est sous une forme "encore à peu près R", avec un niveau de CD non quantifiable. De plus, nous n'avons pas fait d'expérience sur une échelle de temps d'une nanoseconde, donc nous ne pouvons pas affirmer que la remontée du signal obtenue s'arrête à 150 ps. Pour finir, le modèle cinétique proposé ne rend pas compte du continuum d'espèce qu'est le chemin réactionnel de MbCO à Mb.

Nous nous contenterons donc d'une procédure d'ajustement minimaliste. Nous ramenons tous les niveaux de CD à zéro (MbCO, Mb, HbCO, et Hb), et nous prenons les niveaux de CD Mb^* et Hb^* à $-10 M^{-1} cm^{-1}$.

Nous représentons (Fig. 4.14) une simulation pour $k_1^{-1} = 10$ ps, et $k_2^{-1} = 20$ ps, trait pointillé et $k_2^{-1} = 100$ ps, trait plein. Ceci permet, de manière qualitative, de reproduire l'allure grossière de la différence obtenue entre MbCO et HbCO. La mise sous contrainte du système se ferait avec la même vitesse pour la myoglobine et l'hémoglobine, et le relâchement serait plus lent dans le cas de l'hémoglobine à cause de la gêne engendrée par la structure quaternaire sur l'hélice F.

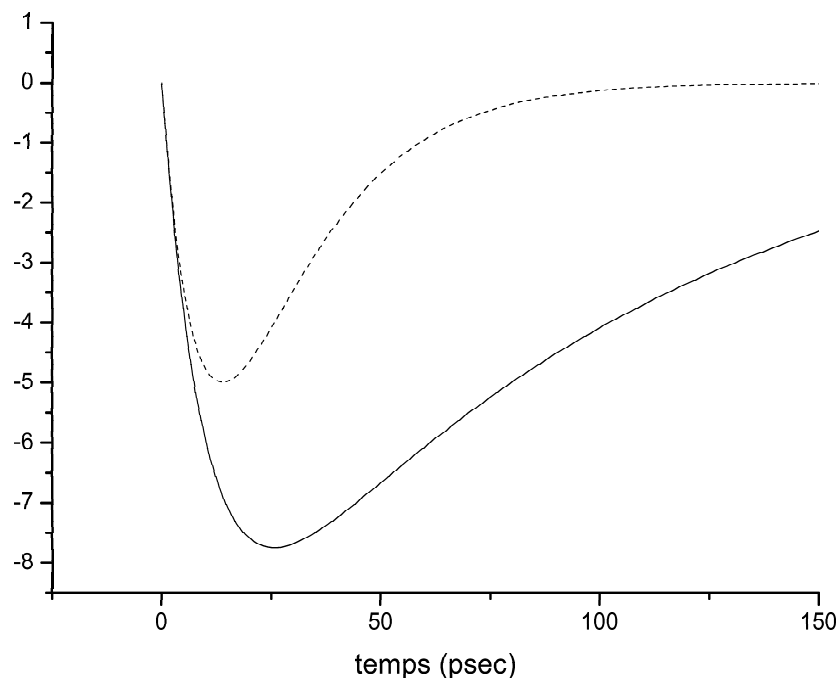


FIG. 4.14 – La simulation d'une cinétique à deux temps

En trait plein, $k_1^{-1} = 10$ ps, $k_2^{-1} = 100$ ps

En trait pointillé, $k_1^{-1} = 10$ ps, $k_2^{-1} = 20$ ps

4.2.3 La discussion

Commençons par analyser les résultats à l'échelle nanoseconde : aucune dynamique temporelle n'est observée. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Kliger [17]. L'expérience de diffraction de rayons X résolue temporellement [45] montre qu'à 100 ps, tous les résidus du proche environnement de l'hème ont globalement atteint leurs positions finales. En revanche, certains résidus plus éloignés bougent sur une échelle nanoseconde.

Mais les calculs de la troisième partie ont montré que les mouvements des résidus autre que l'histidine proximale ne modifiaient pas notablement le CD, lorsque l'on passait de la géométrie de MbCO à Mb. En effet :

- les résidus bougent relativement peu, un dixième d'Angstrom en moyenne
- le CD n'est que peu sensible à leurs mouvements
- les influences respectives de chaque résidu sur la force de rotation globale ont tendance à se compenser.

Il est donc normal de ne pas trouver de dynamique temporelle sur ces échelles de temps. Le niveau de CD atteint doit être très proche du niveau Mb statique.

Analysons maintenant les résultats aux temps courts. Il s'agit tout d'abord de vérifier que ce signal est vraiment lié à un changement de conformation de la protéine. Examinons les effets parasites possibles (à l'exception des dichroïsmes et biréfringences induits qui ont été largement abordés depuis le début de ce chapitre).

l'effet de l'anisotropie

Un des tout premiers points à discuter dans une expérience pompe sonde est l'anisotropie induite par la pompe. Nous avons tiré profit du développement théorique afin d'analyser ce phénomène. Nous avons mené le calcul pour une pompe polarisée linéairement. Il faut être conscient que cette configuration génère **plus** d'anisotropie que lorsque la pompe est polarisée circulairement comme dans notre configuration.

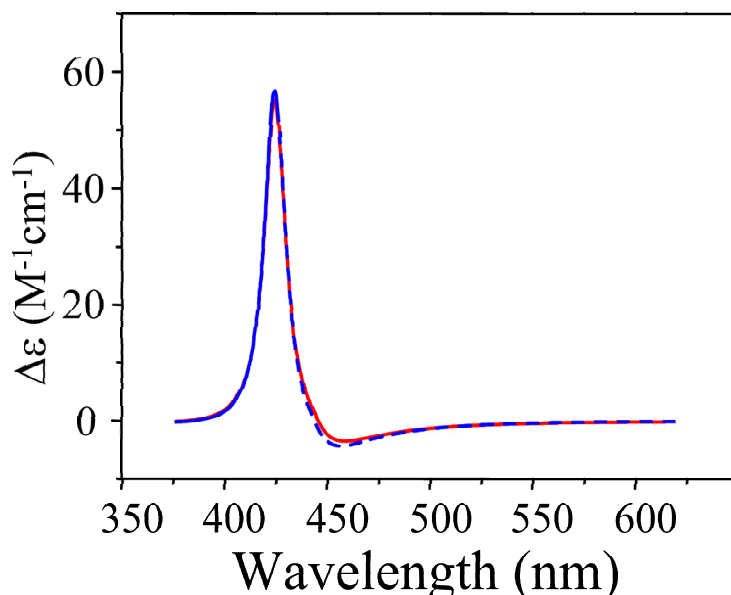


FIG. 4.15 – Le dichroïsme circulaire anisotrope dans MbCO

Malgré cela, nous avons montré que cet effet reste négligeable. La figure 4.15 illustre une simulation : on compare le cas où 20% des molécules sont excitées de manière non isotrope (trait pointillé), au cas isotrope (trait plein).

Cet effet d'anisotropie est faible car toutes les transitions électroniques de l'hème sont dégénérées (x,y). Seules les protéines dont le plan de l'hème est perpendiculaire à la polarisation de la pompe ne seront pas excitées.

De plus, le temps de réorientation de la myoglobine en solution aqueuse est connu. Le temps caractéristique est de 35 ns [64]. Le signal observé ne peut donc pas être dû à l'anisotropie.

les effets électroniques

Le changement d'état électronique de l'hème induit purement par le départ du ligand est sub picoseconde. Il ne peut pas être à l'origine de la dynamique observée.

La durée de vie de l'état excité provoqué par l'absorption d'un photon de pompe n'excède pas les 3 picosecondes [30].

La dynamique observée ici est sur une échelle de temps plus grande. Ces changements électroniques ne peuvent donc pas expliquer le signal observé.

les effets thermiques

Lors de la photodissociation, on dépose un excès d'énergie dans l'hème. Nous avons vu que l'expérience par réseau de phase montre que cette énergie est thermalisée en moins de 20 ps [39]. Une autre étude [65] montre que les effets thermiques se dissipent en 6 ps. Ces constantes de temps sont donc trop petites pour expliquer la dynamique de 100 ps que nous observons.

Il reste néanmoins à s'assurer que le premier temps que l'on observe, de 10 ps, ne soit pas d'origine thermique. Cependant, il apparaît comme peu crédible qu'un phénomène thermique soit responsable de la descente du signal, et qu'un autre phénomène, non thermique, soit responsable du retour à l'équilibre en 100 ps. De plus, les phénomènes thermiques affectent surtout les transitions vibrationnelles et ont probablement moins d'effet sur les transitions électroniques.

La dynamique observée ne peut donc pas être expliquée par un phénomène électronique, thermique, ou d'anisotropie. Ce signal est donc bien lié à un changement ultra rapide de la conformation de la protéine.

4.2.4 L'interprétation

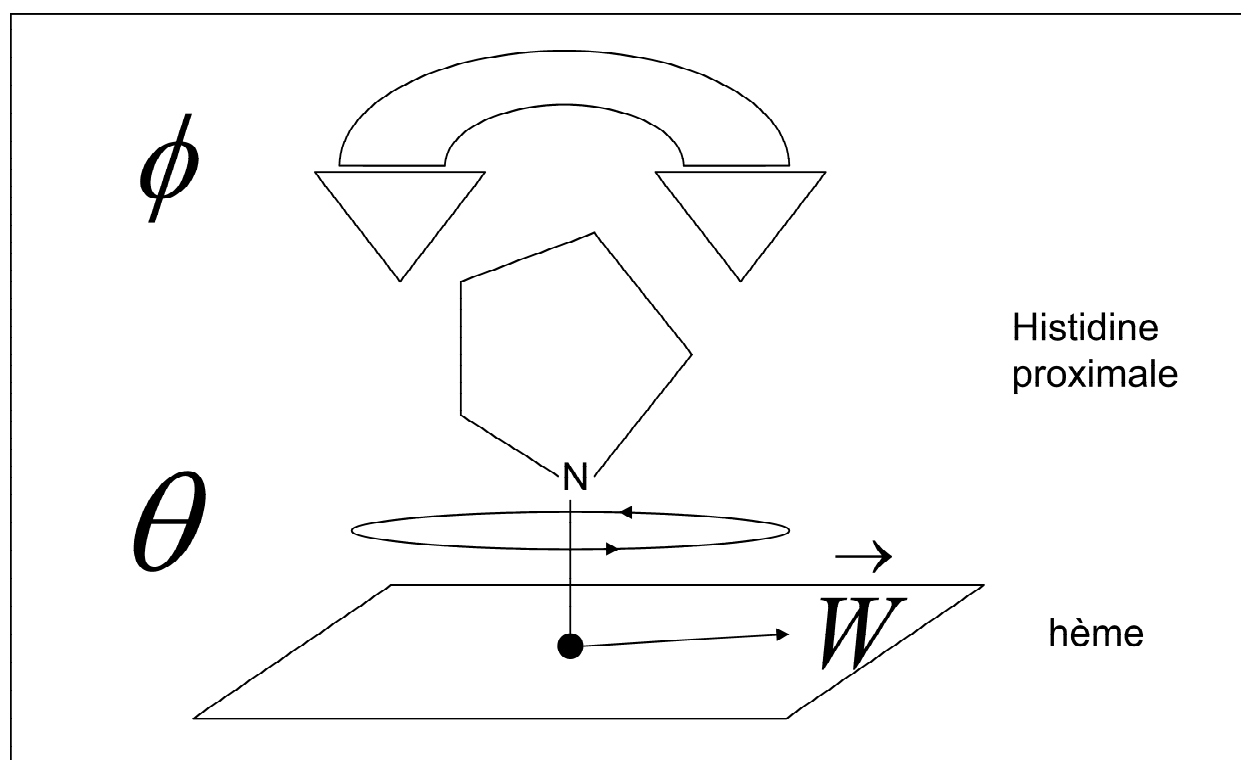


FIG. 4.16 – La représentation des mouvements de l'histidine proximale

L'analyse de la dynamique temporelle obtenue dans la myoglobine à 422 nm montre un niveau de CD très bas pour un retard de 15 picosecondes. Nous excitions environ 30% des molécules et $\Delta\epsilon$ chute de 55 à 35 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Ceci correspond donc à une valeur de -10 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pour le CD de l'espèce contrainte Mb*. Cette valeur est très éloignée de la valeur initiale MbCO, et la valeur finale Mb. Il s'agit donc d'essayer d'expliquer ce résultat

Résumons rapidement les conclusions du chapitre 3.4.

- L'histidine proximale contribue de manière indirecte mais capitale à la détermination du dichroïsme circulaire. Le couplage entre l'hème et ce résidu est responsable de la levée de dégénérescence des transition X,Y de l'hème, ainsi que de la composition des modes normaux du système couplé. Si l'on change la position de l'histidine proximale, le vecteur $\vec{W}$ tourne dans le plan de l'hème, ce qui modifie profondément le CD.
- Deux mouvements importants de l'histidine proximale sont à considérer (Fig. 4.16) : la rotation θ autour de l'axe fer-histidine, et la rotation ϕ autour de l'axe perpendiculaire au plan de l'imidazole. Nous avons simulé l'influence de ces deux rotations sur le vecteur $\vec{W}$, qui est beaucoup plus sensible à θ qu'à ϕ . Lorsque l'on change θ de $\pi/6$, le CD de Mb* chute en dessous de la dizaine de $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Des rotations supérieures peuvent inverser le signe, mais on sort complètement du domaine de validité de nos calculs car on ne peut pas changer aussi fortement ce paramètre sans réajuster les largeurs Γ des modes normaux.

- Les autres résidus, His64 , Phe33 sont très importants d'un point de vue statique, mais pas d'un point de vue dynamique. Le niveau de CD n'est pas très sensible à leurs déplacements. His64 peut-être perçu comme la porte d'entrée et de sortie du ligand, et ce résidu est susceptible de subir des déplacements conséquents lors de la diffusion du CO dans la poche de l'hème. Nous avons donc à cet effet simulé des déplacements de fortes amplitudes sur ce résidu, sans observer d'incidence notable sur le niveau de CD.

Le seul moyen d'expliquer un signal d'une telle amplitude est donc de faire tourner l'histidine proximale (rotation θ). Il est alors tout à fait remarquable de noter que cette rotation permet d'expliquer (Fig. 3.6) simultanément le signal obtenu à 422 nm et à 440 nm. On constate en effet qu'à ces deux longueurs d'onde le signal décroît avant de remonter à sa valeur finale.

Les deux échelles de temps que l'on obtient (10 ps et 100 ps) sont à rapprocher de celles obtenues par les différentes techniques exposées lors du deuxième chapitre.

- le mouvement de respiration globale de la protéine en **10** ps - (spectroscopie de réseau de phase) [39]
- le changement des caractéristiques de la vibration fer-histidine en **100** ps- (Raman résonnant) [38]
- le phénomène de doming multiexponentiel 3.5 , **80** , 3300 ps (étude de la bande III de l'hème) [22]
- les résidus les plus proches de l'hème adoptent la géométrie Mb en moins de 100 ps (rayons X résolu temporellement) [45]

Notre résultat expérimental permet de retrouver le scénario proposé par Perutz [23] [24].

1. la liaison hème ligand se casse, l'hème se "dôme"
2. le mouvement du fer en dehors du plan pousse l'histidine proximale, mais simultanément la force de répulsion entre l'hème et l'hélice F diminue. L'histidine est donc "prise en sandwich" : elle se tourne et s'incline.
3. le déplacement de l'histidine vient pousser l'hélice F, la contrainte se relâche vers le reste de la protéine

La torsion initiale de l'histidine proximale dure 10 ps (l'étape 2 de ce mécanisme).

La relaxation de 100 ps est à rapprocher de l'étape 3 .

Avec ce point de vue, toute l'énergie motrice de la transformation est initialement concentrée dans la liaison fer histidine proximale. C'est uniquement dans deuxième temps que l'on obtient un relâchement de cette contrainte vers l'hélice F. Dans ce modèle, le phénomène est séquentiel. Cette vision impose donc une certaine flexibilité de la protéine.

Dans une autre hypothèse, on peut concevoir que la liaison fer histidine n'est pas l'unique point de passage de l'information conformationnelle. L'énergie motrice de la transformation peut être délocalisée dans d'autre sites. On note que la petite centaine de liaisons de van der Waals qui maintiennent l'hème en place peuvent aussi intervenir. L'énergie dégagée lors du doming de l'hème est alors efficacement couplée avec les modes globaux de la protéine. Avec cette vision, le doming de l'hème devient perceptible en tout point de la protéine en quelques picosecondes, l'utilisation des modes globaux [66] permet effectivement aux signaux de se propager à la vitesse du son. Le changement global de conformation se fait alors de manière plus concertée que séquentielle.

Nos résultats permettent d'abonder dans le sens d'une dynamique séquentielle, vu que l'on observe successivement une décroissance puis une remontée du signal. De plus, l'expérience dans l'hémoglobine montre que le deuxième temps de relaxation est plus lent, ce qui peut s'interpréter comme une contrainte sur l'hélice F exercée par la structure quaternaire.

4.3 L'expérience dans l'ultra-violet

Nous avons vu à plusieurs reprises que le CD était un phénomène non local ; il n'existe que si l'on accepte que le champ électrique ne soit pas le même d'un point à l'autre du système que l'on étudie. Nous avons vu par conséquent, que les signaux de CD étaient proportionnels à $\frac{d}{\lambda}$, donc ils sont mécaniquement plus importants dans l'ultraviolet. Les expériences de dichroïsme circulaire résolu temporellement seront donc plus faciles dans l'UV.

L'autre raison qui nous a poussé à construire une expérience de TRCD dans l'ultraviolet est la problématique du repliement des protéines. Le but ultime est de pouvoir induire optiquement un repliement d'une petite chaîne d'acides aminés, et de venir mesurer la création d'hélice α en mesurant le CD à 220 nm. Nous avons effectivement vu lors de la section 1.5 qu'il y avait une bande caractéristique de CD à cette longueur d'onde.

Nous souhaitons donc construire une source laser délivrant des impulsions courtes, de longueur d'onde variable, allant de 220 nm à 400 nm, le but étant d'avoir à terme une expérience pompe sonde, pompe 400 nm, sonde UV avec une résolution temporelle sub-picoseconde. Il faut être conscient que le phénomène de repliement s'étend sur des échelles de temps allant de la picoseconde à la milliseconde. Nous nous concentrons ici sur les toutes premières étapes du phénomène.

Nous expliquerons tout d'abord la construction d'un laser UV (section 4.3.1)

Nous détaillerons ensuite les résultats que nous avons obtenus dans le ruthénium trisbipyridyl (section 4.3.2) : cette expérience nous a permis de caractériser notre source laser et de montrer la faisabilité d'une expérience de TRCD dans l'UV

Nous terminerons par l'exposé de résultats préliminaires obtenus dans la myoglobine (section 4.3.3).

4.3.1 La construction d'un laser UV

Dans cette section nous présenterons le dispositif qui nous a permis d'obtenir un faisceau laser UV. Nous récupérons pour cela 10 % d'un faisceau intense de 12 mJ. La majeure partie de ce faisceau est en fait utilisée pour une des expériences clefs du laboratoire : la génération d'une source laser X plasma (section 2.2.3)

Nous reviendrons donc brièvement dans un premier temps sur le principe de cette source amplifiée, ainsi que sur les caractéristiques du faisceau. Dans un deuxième temps nous décrirons la construction d'un laser ultraviolet, basée sur la technologie des amplificateurs paramétriques optiques non colinéaires (NOPA).

La génération du faisceau laser amplifié

Une source laser kHz amplifiée est développée au Laboratoire d'Optique et Biosciences. Le but est de produire des impulsions de 12 mJ, 800 nm, 150 fs.

En tant qu'utilisateur de ce faisceau, - nous prélevons 10 % de l'énergie-, nous avons dû consacrer un temps non négligeable à l'entretien, et dans une moindre mesure, au développement de

cette source (Fig. 4.17). Nous résumons donc dans ce paragraphe le principe de cette source, ainsi que les problèmes rencontrés.

Le point de départ est un système commercial intégré Spectra-Physics Hurricane. Il délivre des impulsions de $750 \mu\text{J}$, 800 nm avec un taux de répétition de 1 kHz . Rappelons que ce système est basé sur l'amplification à dérive de fréquence : une impulsion de l'oscillateur femtoseconde est étirée, injectée dans la cavité régénérative, amplifiée, puis éjectée. On peut alors décider soit de la re-comprimer afin de retrouver la durée initiale, soit de l'utiliser non comprimée.

Afin de pouvoir amplifier davantage le faisceau, on utilise la sortie non comprimée.

Après un nettoyage des pré-pulses nanoseconde grâce à une cellule de Pockels, le faisceau est injecté dans un amplificateur multi passage construit au laboratoire. En voici le principe : on focalise 3 lasers de pompe (YLF doublé kHz), soit un total de 60 W dans un cube de titane saphir, le faisceau à 800 nm est injecté dans le cristal et effectue quatre passages successifs. Nous donnons dans le tableau suivant l'énergie obtenue après chaque passage :

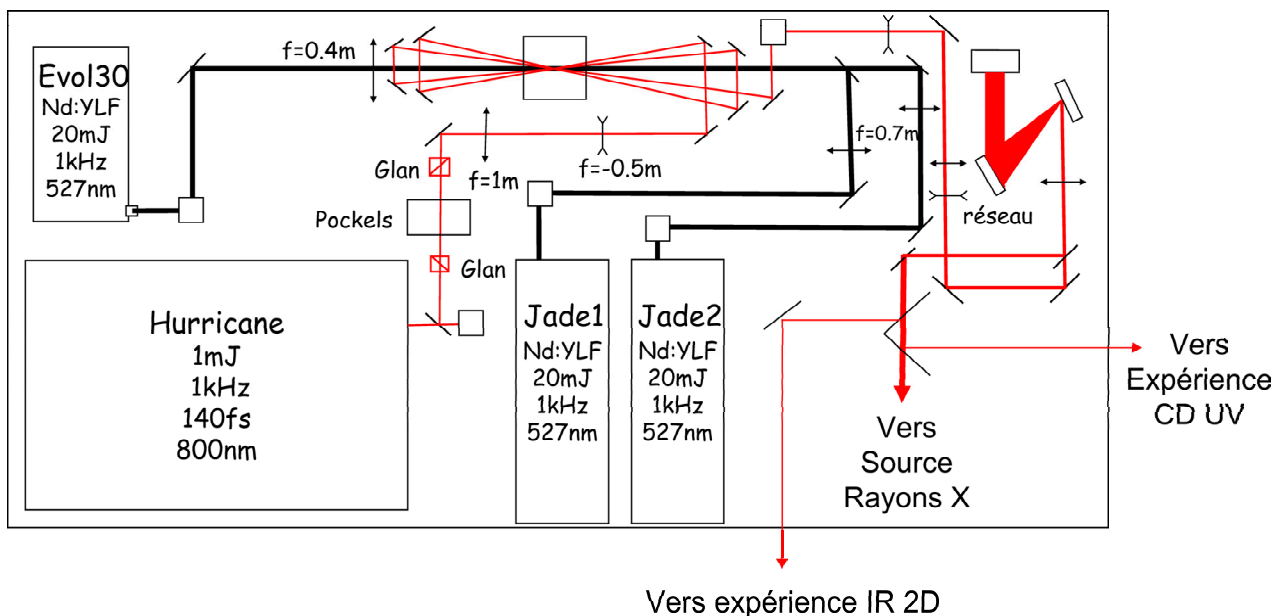


FIG. 4.17 – Le schéma de la source laser amplifiée

puissance de pompe	60 W
passage 1	2,5
passage 2	7.8
passage 3	13
passage 4	16,7

TAB. 4.1 – L'énergie après chaque passage (en mJ)

A chaque milliseconde, les trois faisceaux lasers YLF,- représentant une énergie nominale de 60 mJ -, pompent considérablement le cristal. On extrait 16 mJ dans le faisceau amplifié. L'excédent

d'énergie part sous forme de fluorescence, mais surtout sous forme de chaleur. Le cristal doit être constamment refroidi : un système cryogénique, (bouteille d'azote liquide, électrovanne, sondes Pelletier) maintient le cristal à une température constante de - 175 °. Ceci permet de réduire considérablement la lentille thermique. Notons que la cryogénie est actuellement la solution la plus adaptée dans le développement de source laser titane saphir kHz amplifiée de forte énergie.

Le faisceau est ensuite comprimé mais avant de l'envoyer sur les réseaux, il faut absolument agrandir sa taille pour éviter les effets thermiques. On utilise donc deux télescopes successifs. La taille du faisceau finale est de ϕ 50.

Après compression, on obtient des impulsions d'environ 180 fs. Une lame de prélèvement nous permet de récupérer environ 10%.

Examinons maintenant les caractéristiques de ce faisceau

De manière un peu simpliste, on peut dire que l'amplificateur multi passage possède un avantage et un inconvénient en comparaison avec une cavité régénérative :

- dans une cavité régénérative, le faisceau s'amplifie en faisant des aller retours sur lui même, le mode spatial obtenu est donc tout à fait remarquable. En revanche, le contraste temporel des impulsions laisse à désirer, on obtient des pré-pulses picosecondes et nanosecondes.
- dans un amplificateur multi passage, c'est l'inverse. Le système n'étant plus une cavité, on est beaucoup moins dérangé par les pré-pulses ns. En revanche, les pré-pulses ps créés au niveau du système hurricane sont injectés dans l'amplificateur multipassage. Ils sont donc amplifiés. Le mode spatial du faisceau final dépend de manière critique de la superposition des passages successifs, et sa qualité devient très vite médiocre quand l'alignement n'est pas optimal.

De plus, les aberrations cumulées sur les télescopes successifs (deux avant le compresseur, et un après, à l'entrée de la source UV) contribuent à la dégradation de la qualité du mode spatial obtenu. En revanche le contraste temporel des impulsions est très bon.

Une autre qualité de ce faisceau est sa stabilité pic à pic. En effet, on est dans un régime de saturation de l'amplification, c'est à dire qu'une baisse de l'énergie du faisceau infrarouge initiale ne se répercutera pas sur l'énergie finale du faisceau amplifié (en revanche, une baisse de l'énergie des pompes YLF se répercute directement). La stabilité pic à pic est donc tout à fait bonne, comparable à celle du système Spectra Physics.

Le problème principal de ce système reste les instabilités générées par la circulation d'azote liquide au niveau du cryostat. L'ouverture de l'électrovanne et l'arrivée d'azote liquide provoquent une modification de la lentille thermique au niveau du cristal : le pointé et la divergence du faisceau changent alors brutalement environ une fois toutes les minutes. Cependant un réglage optimal des consignes de température, ainsi qu'un bon positionnement des sondes Pelletier permettent de limiter ce phénomène.

La difficulté a donc été de construire en aval de ce système (plusieurs mètres de propagation plus loin) une source contenant une cascade d'effets non linéaires, donc très sensible à la stabilité du laser.

Ce système est très lourd à utiliser et entretenir. Il contient 5 lasers (en plus des 3 gros laser de pompe, il ne faut pas oublier les lasers de pompe de l'oscillateur femtoseconde et de la cavité régénérative) donc autant de diodes laser, de cristaux ou de groupes de refroidissement.

La génération d'une source ultraviolette

Nous représentons (Fig. 4.18) le schéma de la source ultraviolette développée lors de ce travail de thèse. Le travail de construction de cette source ne présente aucune originalité d'un point de

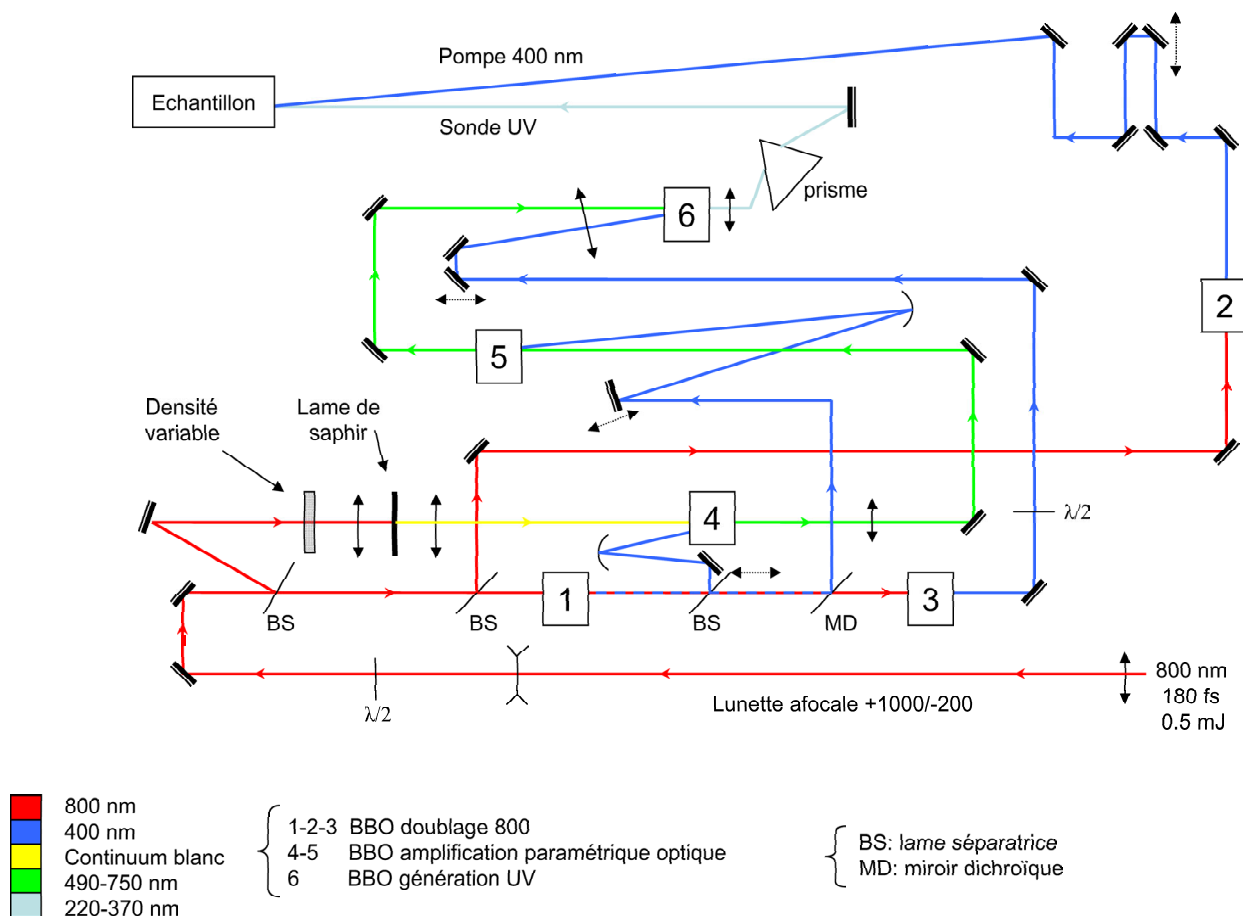


FIG. 4.18 – Le schéma de la source laser ultraviolette

vue scientifique. Notons même que pour la première partie (NOPA à deux étages), il existe des systèmes commerciaux clef en main.

En revanche, l'énorme challenge technique a été de pouvoir construire une source à peu près stable avec les conditions du faisceau initial décrit dans le paragraphe précédent. Reprenons donc le schéma expérimental en insistant sur les points spécifiques à l'utilisation de ce faisceau amplifié.

La première idée était de faire un filtrage spatial pour améliorer la qualité du mode spatial. Nous avons vite abandonné cette idée en raison des instabilités du pointé. La stratégie adoptée a été de faire propager le faisceau le moins possible, en plaçant le télescope le plus tôt possible.

Nous avons désaxé légèrement la première lentille du télescope pour compenser l'astigmatisme initial.

L'étape suivante a été de placer le premier cristal non linéaire le plus proche possible, encore une fois pour limiter au maximum la propagation du faisceau. Le premier cristal de BBO générant

du 400 nm est donc juste après quelques miroirs. Les accords de phase sont de type I, la polarisation initiale est perpendiculaire au plan de la table.

Nous avons également la génération d'un continuum. Pour vaincre les changements de focalisation du faisceau, nous avons pris une lame de saphir d'un centimètre d'épaisseur, ce qui est beaucoup plus épais que les 2 ou 4 mm habituel. Nous avons de plus placé le point de focalisation notablement avant la lame de saphir, afin que cela soit vraiment l'auto focalisation et non la focalisation naturelle (fluctuante à cause de l'électrovanne) qui génère le continuum.

La suite du montage est extrêmement classique, c'est un NOPA à deux étages. Le principe est de focaliser dans un cristal de BBO le continuum et un faisceau pompe à 400 nm. En ajustant le retard entre les impulsions, on superpose la pompe avec une partie du continuum (le continuum possède une dérive de fréquence conséquente à cause de l'épaisseur de la lame de saphir et des lentilles traversées). En jouant sur l'angle du cristal de BBO, on va modifier l'accord de phase.

Ces deux paramètres (angle du cristal et retard entre les impulsions) permettent de choisir la longueur d'onde du continuum que l'on souhaite amplifier. On crée simultanément un faisceau complémentaire (idler) dans l'infra rouge. L'accordabilité est cependant limitée :

- du côté bleu, le continuum s'effondre vers 490 nm. De plus, si l'on cherche à amplifier des longueurs d'onde trop proches de la pompe, l'idler créé est très loin dans l'infrarouge, au delà du domaine de transparence du BBO.
- du côté rouge, si l'on cherche à amplifier des fréquences trop proches de 800 nm, on s'approche de la dégénérescence : l'idler créé et le signal amplifié ont la même fréquence. L'amplification est alors en compétition avec le phénomène inverse (idler + signal $\rightarrow$ 400 nm)

Nous avons obtenu une accordabilité de 490 nm à 750 nm. Il existe de plus un angle magique entre le faisceau à 400 nm et le faisceau pompe permettant d'amplifier simultanément un large domaine de longueurs d'onde. Ceci est très pratique si l'on avait voulu obtenir des impulsions courtes. Nous n'avons pas cherché à nous placer dans ces conditions.

Le rendement est médiocre ($\sim 100 \mu\text{J}$ de pompe à 400 nm, pour produire moins d'une dizaine de μJ de faisceau visible) Ceci est dû au fait que l'on ne parvient pas à focaliser correctement les faisceaux à cause du mode spatial. Nous avons donc changé l'épaisseur des BBO d'amplification paramétrique de 1 mm à 2 mm pour récupérer un régime de déplétion de la pompe au deuxième étage.

La dernière étape de la source est quant à elle plus originale, bien que pas réellement nouvelle [67]. On double la sortie du NOPA, en focalisant le faisceau dans un cristal de BBO. On obtient alors une accordabilité de 250 à 375 nm. On peut également réaliser une somme de fréquences entre le NOPA et le faisceau à 400 nm et descendre alors jusqu'à 220. On obtient entre 200 et 300 nJ sur l'ensemble du spectre. Les spectres des impulsions obtenues dans la configuration NOPA+400 sont représentés sur la figure 4.19. On obtient le même type de spectre dans la configuration NOPA doublé.

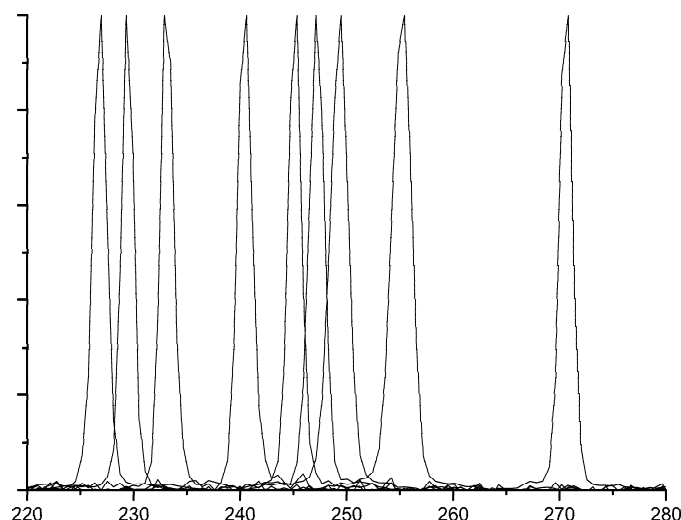


FIG. 4.19 – Le spectre des impulsions NOPA+400

On constate que les spectres des impulsions doublées ou obtenues par somme de fréquence (OPA+800) sont beaucoup plus propres et étroits que les spectres typiques obtenus à la sortie d'un OPA. Ceci se comprend aisément : le dernier cristal doubleur se comporte comme un filtre spectral à cause des conditions d'accord de phase.

On peut noter que la conception de cette source n'est pas optimale. En effet les cristaux de BBO permettent de descendre sans problème jusqu'à 200 nm. On peut atteindre cette longueur d'onde en doublant la sortie du NOPA, puis en faisant la somme de fréquence avec un faisceau à 800. Cette possibilité reste envisagée pour la suite.

Le dernier challenge, encore une fois technique, a été de développer une ligne sonde, afin de faire de la polarimétrie dans l'UV. Je donne une énumération succincte et non exhaustive des problèmes rencontrés.

- choisir les bons miroirs (en aluminium et pas en argent), les bonnes lentilles (en silice et pas en BK7), les bon PMT, les bonnes densités optiques.
- obtenir une bonne cellule de Pockels, transparente dans l'UV, et les bons polariseurs (prisme de Glan en BBO)
- séparer le faisceau UV des autres faisceaux visibles (filtre adapté ou utilisation d'un prisme)
- concevoir une procédure d'alignement spécifique avec un laser hélium néon, car les faisceaux ultraviolets sont difficilement repérables.

Nous avons donc à ce stade un système de TRCD inédit. La pompe est à 400 nm (800 doublé), et la sonde est accordable de 220 nm à 375 nm. Nous présentons maintenant des résultats expérimentaux obtenus dans le ruthénium trisbipyridyl et dans le complexe MbCO

4.3.2 Les résultats dans le ruthénium trisbipyridyl

Nous avons brièvement présenté le ruthénium trisbipyridyl (**RuTB**) à la section 1.2. Ce système nous a également permis de caractériser et comprendre l'artefact de dichroïsme linéaire induit, sections 4.1.3 et 4.1.4. Nous lui dédions cette section, et nous en reparlerons une dernière fois dans le chapitre de perspective.

Cette molécule tient une place "ubiquitaire" dans ce manuscrit pour deux raisons. Tout d'abord, il s'agit d'un système très intéressant et très étudié (en plus d'être chiral, c'est un exemple "cas d'école" du transfert de charge d'un élément de transition vers un ligand).

De plus, ce complexe a fait l'objet de la thèse de doctorat qui précède le travail que nous présentons dans ce manuscrit : Hugues Mesnil a mis en évidence expérimentalement le phénomène de dichroïsme circulaire non linéaire [68]. L'objectif était entre autres d'étudier RuTB dans une configuration pompe sonde :

- une pompe à 470 nm sature la transition MLCT (Metal Ligand Charge Transfer)
- la sonde vient mesurer les changements de CD associés à cette saturation, entre 440 et 490 nm

Nous disposons donc au laboratoire des deux énantiomères, et nous avons une bonne expertise de ce système.

Notre pompe est à 400 nm. Cette longueur d'onde est au bord de la bande MLCT. Expliquons un peu plus en détail la signification de cette transition. Sous l'absorption d'un photon de pompe, un électron va passer du ruthénium, pour se délocaliser sur les trois ligands, avant de se localiser très rapidement sur un des trois ligands [69].

La dynamique est donc plus rapide que notre résolution temporelle, et le système reste dans l'état excité plusieurs centaines de nanosecondes, ce qui est idéal pour trouver un signal pompe sonde.

La sonde est accordable dans l'UV, et elle peut venir sonder la transition électronique des groupements bipyridil vers 290 nm. A cette longueur d'onde, le CD s'explique de manière très simple comme le couplage excitonique des 3 transitions [8].

L'étude de ce système est donc pertinente pour caractériser notre système et nous permettre d'obtenir aussi bien un signal d'absorption transitoire que de CD transitoire.

l'absorption différentielle

Nous avons pu trouvé sans difficulté le spectre d'absorption différentielle (Fig. 4.20). Celui-ci était connu [70], mais avait seulement été déterminé avec une résolution nanoseconde. Nous retrouvons donc à 290 nm une forte bande de saturation de l'absorption. On retrouvera sur la figure 4.21 le spectre d'absorption statique. Les bandes de saturation de l'absorption et d'absorption sont superposées. De part et d'autre, on observe de l'absorption induite, probablement due à l'absorption de l'état excité.

Nous représentons également les courbes temporelles pour 3 longueurs d'onde différentes. Ceci permet de donner une limite supérieure à notre résolution temporelle de 1 ps. En effet, on ne peut pas affirmer que la réponse du ruthénium soit purement instantanée. L'existence d'une bosse au retard zéro, et ceci uniquement pour les petites longueurs d'onde, inférieures à 260 nm, fera l'objet d'études complémentaires.

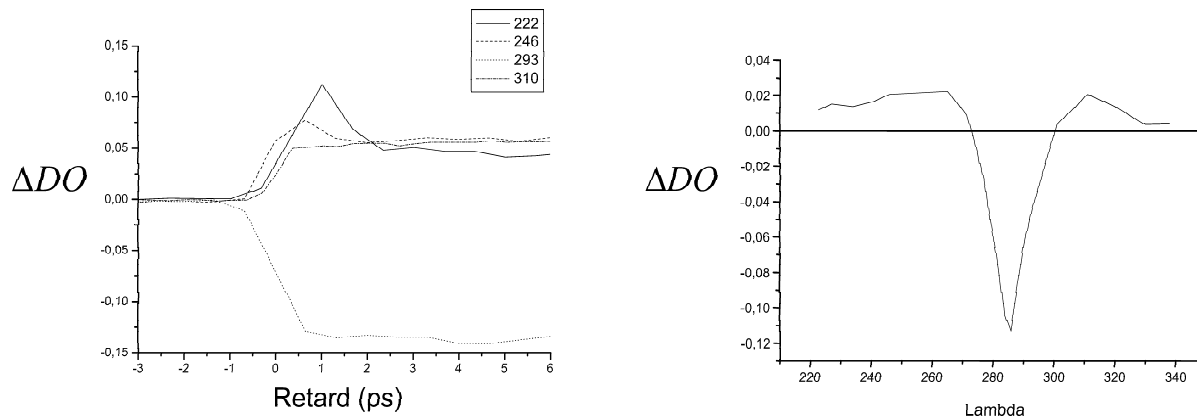


FIG. 4.20 – Le spectre d'absorption transitoire de RuTB

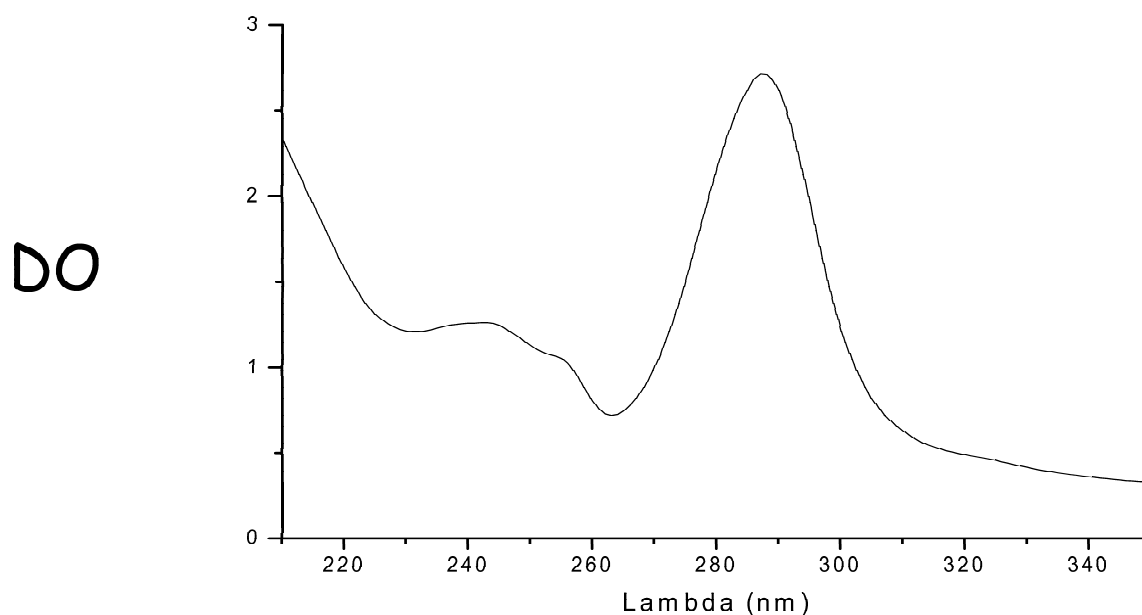


FIG. 4.21 – Le spectre d'absorption de RuTB

le dichroïsme circulaire

Nous représentons sur la figure 4.22 le spectre de CD statique du ruthénium trisbipiridyl. On observe une belle structure excitonique correspondant aux couplages des transitions des groupements trisbipiridyl [8]. (une bande d'absorption et deux bandes de CD de signes opposées)

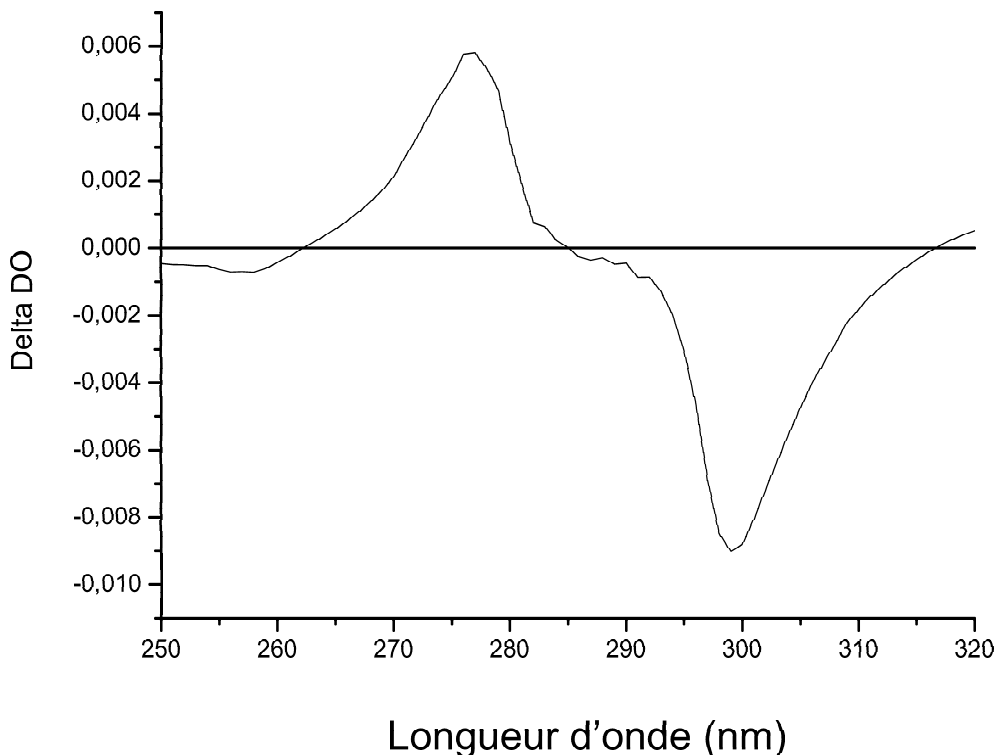


FIG. 4.22 – Le spectre de CD de RuTB

Nous avons donc réalisé l'expérience pour plusieurs longueurs d'onde entre 270 nm et 300 nm. Nous montrons à la figure 4.23, encart du haut un exemple des résultats obtenus à 290 nm. La courbe réalisée pour le mélange racémique ne présente aucun dichroïsme circulaire, alors que pour chacun des deux énantiomères Λ et Δ on observe deux signaux symétriques, ainsi qu'une saturation du dichroïsme circulaire.

Le point intéressant est que l'on n'observe une variation du dichroïsme circulaire induit par la pompe que pour la partie basse énergie de la structure excitonique. Effectivement, pour la partie haute énergie (275 nm) (figure 4.23 encart du bas) nous n'avons pas observé de saturation du CD.

Une analyse théorique de ces résultats est en cours.

Nous avons donc montré la faisabilité de mesurer du dichroïsme circulaire résolu temporellement, dans l'ultraviolet, avec une résolution sub-picoseconde. Le but est d'essayer d'appliquer cela à d'autres systèmes.

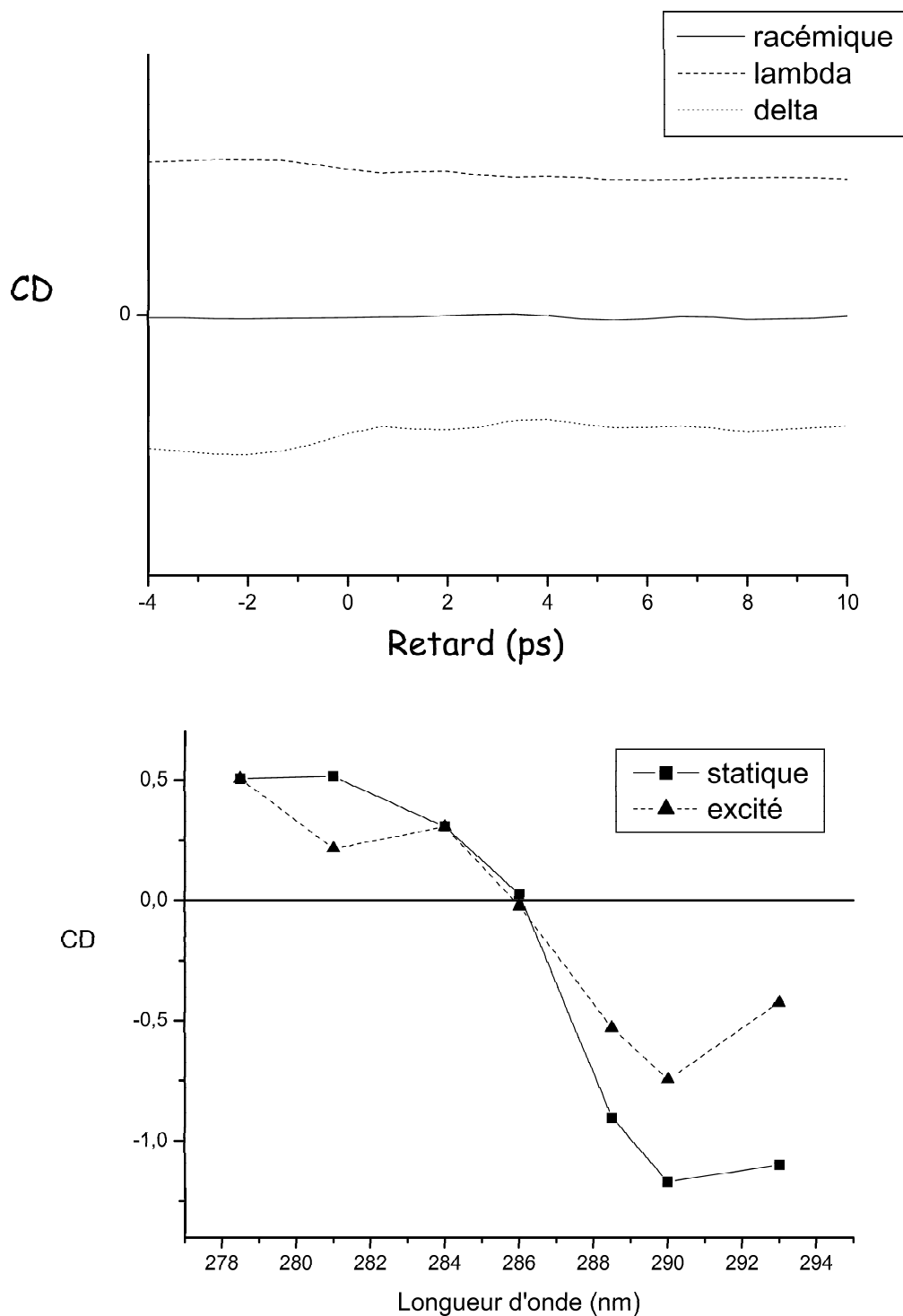


FIG. 4.23 – Le spectre de CD transitoire de RuTB

4.3.3 Les résultats préliminaires dans MbCO

Le premier objectif était de voir si la myoglobine possédait un signal d'absorption transitoire dans l'ultraviolet. Les signaux dans le visible sont très bien connus et étudiés, mais rien n'a été fait en dessous de 380 nm. Nous avons donc dans un premier temps réalisé les spectres d'absorption de MbCO et de Mb dans l'ultraviolet, et obtenu le spectre différentiel.

Le spectre différentiel statique (MbCO-Mb) est représenté en trait plein (Fig. 4.24). Ceci correspond à une DO de 1 à 422 nm soit une concentration de 100 μM . Nous avons superposé à cela (carré noir) les valeurs obtenues dans notre dispositif pompe sonde, 50 picosecondes après la photodissociation, normalisé à 100% de molécules excitées. Les spectres se superposent, mais pas partout. L'accord est cependant appréciable car on constate que l'on reproduit tous les changements de signe.

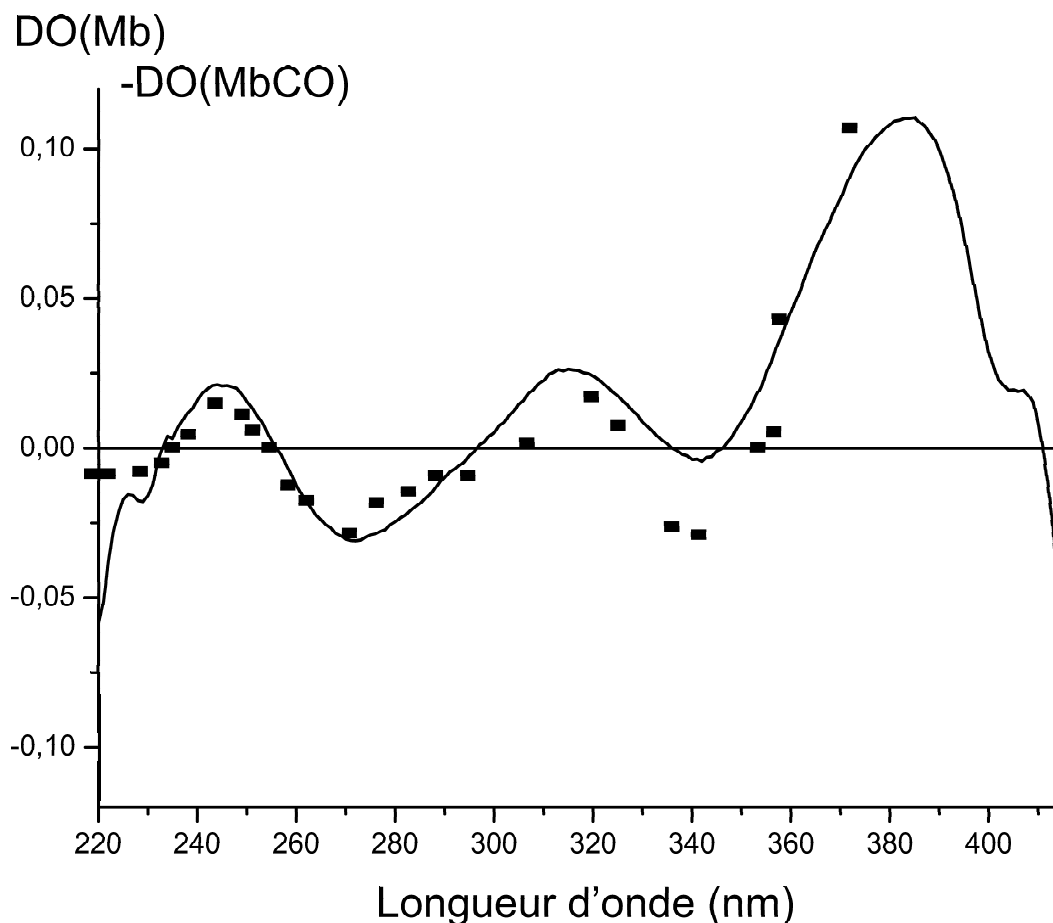


FIG. 4.24 – Le spectre d'absorption transitoire de MbCO dans l'ultraviolet

spectre transitoire 50 picosecondes après la photodissociation (carré noir), comparé au spectre statique (trait plein)

Le point le plus surprenant de cette étude est la dynamique obtenue (Fig. 4.25) : nous montrons une courbe pour une longueur de sonde de 222 nm. On observe une dynamique d'une dizaine de picosecondes. On retrouve ce temps pour d'autres longueurs d'onde UV. Il est impératif pour ce point-ci de s'assurer que cette structure temporelle est bien liée au départ du ligand, et pas à un effet thermique dû à un excès d'énergie déposée dans l'hème.

On note en effet que 10 ps est tout à fait l'ordre de grandeur d'une relaxation vibrationnelle à l'échelle de la protéine [39] [71]. Le test de contrôle dans l'espèce deoxyglobine est en cours.

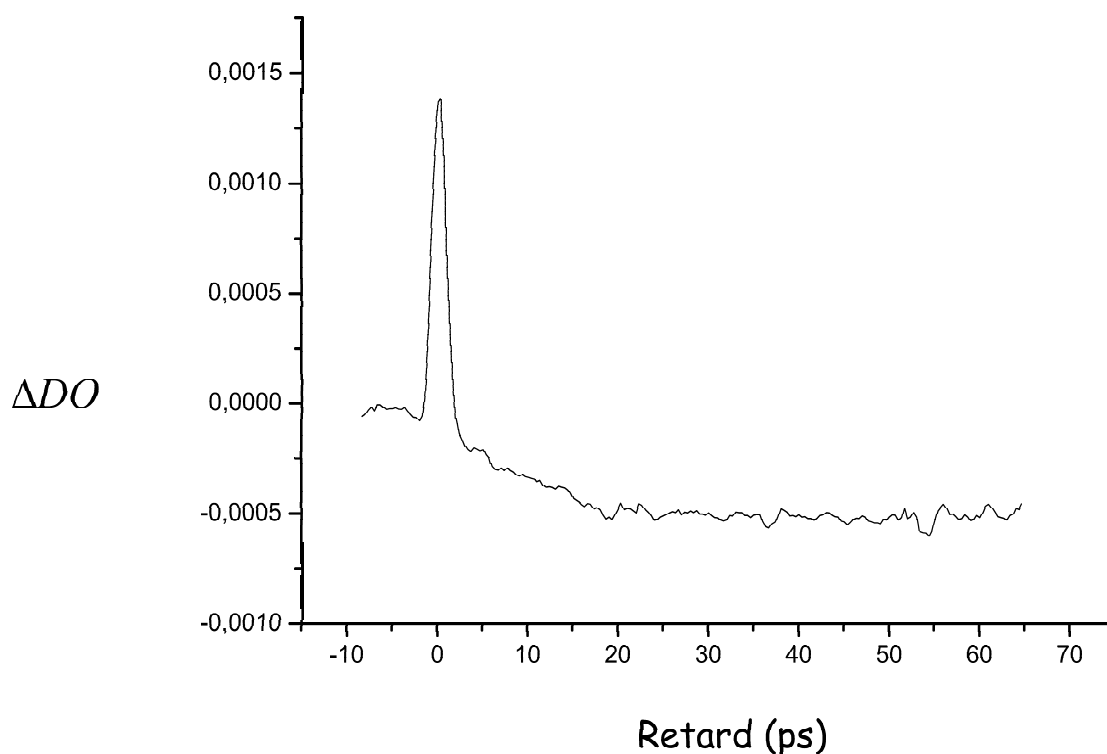


FIG. 4.25 – Une cinétique de photodissociation de MbCO

Sonde à 222nm, Pompe à 400 nm

En effet, en réalisant l'expérience dans un échantillon sans monoxyde de carbone, ce signal doit disparaître (si jamais il est effectivement lié au processus de dissociation).

Insistons cependant sur le fait que le spectre obtenu à 50 picosecondes est en accord avec le spectre statique. Il s'agit donc bien d'un effet lié à la photodissociation. Le temps de 10 picosecondes est donc à rapprocher des temps observés lors de l'expérience de TRCD visible, ainsi que des expériences de réseau de phase. Celui-ci pourrait effectivement être lié à la contrainte initiale engendrée par le doming de l'hème sur l'histidine proximale et sur l'hélice F.

La difficulté sera d'interpréter ces résultats car toutes les parties de la protéine absorbent à ces longueurs d'onde. Essayons cependant d'évaluer l'absorption de l'hème comparativement aux résidus aromatiques. On trouvera reportées dans [72] des données sur l'hème inséré dans un fragment de cytochrome c sans résidus aromatiques (undecapeptide). Ceci permet de pouvoir évaluer l'absorption de l'hème dans des conditions très proches de la myoglobine sans être gêné par les résidus aromatiques.

On reporte les bandes d'absorption de l'hème suivantes :

- la bande δ à 325 nm $\epsilon = 35000$
- la bande ϵ 275 nm $\epsilon = 19000$

Comparons cela avec les valeurs d'absorption des résidus aromatiques dans l'UV moyen. La table (Tab. 4.2) permet d'évaluer le poids relatif de l'hème et des résidus aromatiques, même si

système	Nbre ds Mb	λ (nm)	$\epsilon_{max} M^{-1}cm^{-1}$	%
hème δ	1	325	35000	50
hème ϵ	1	275	19000	28
tryptophane	2	279	5000	14
tyrosine	3	274	1400	6
phénylalanine	6	258	190	2

TAB. 4.2 – Les principaux éléments absorbants d'une protéine

On reporte à la colonne % la contribution relative de chaque espèce

on compare ici des éléments absorbant à des longueurs d'onde différentes. La conclusion est que dans le domaine spectral de notre expérience (220 nm - 350 nm) environ 80% de l'absorption vient de l'hème. De plus, les transitions de l'hème sont de manière générale plus affectées par le départ du ligand que celles des résidus aromatiques. On peut donc avancer avec confiance que le spectre d'absorption différentiel obtenu est dû essentiellement à l'hème.

Le grand nombre de changements de signe présents dans ce spectre (Fig. 4.24) laisse penser à des décalages en fréquence des transitions (on obtient effectivement autant de changement de signes que de bandes décalées). Notons que les différences de spectre entre MbCO et Mb sont faibles, quelques centièmes de DO en dessous de 350 nm. Il ne s'agit probablement pas d'un changement conséquent de la structure électronique de l'hème, mais plutôt d'une modification du couplage avec l'environnement. Ce phénomène est imperceptible dans une expérience pompe visible sonde visible parce que complètement masqué par le décalage dû aux changements de spin. Pour reprendre le vocabulaire mis en place à la section 3.3, $\epsilon_{couplage}$ est a nouveau observable, car il n'est plus masqué par les changements de ϵ_{∞} .

On peut donner une autre raison aux décalages des bandes d'absorption. Lorsque l'on passe de MbCO à Mb, les hélices se déplacent, et les dipôles électriques permanents des hélices changent de direction. La position absolue des bandes d'absorption de l'hème étant relativement sensible au dipôle permanent régnant dans la poche de l'hème, on observe donc un décalage.

Sans privilégier une hypothèse, on peut donc avancer qu'une mesure de l'absorption de l'hème dans l'UV montre une plus grande sensibilité à l'environnement de l'hème que dans le visible. Le temps de 10 picosecondes pourrait donc être relié à un changement de l'environnement de l'hème.

Nous avons également tenté de mesurer le CD dans l'UV. A ce stade, nous avons réussi à mesurer sans aucun problème le CD à 222 nm avec notre dispositif, en revanche nous n'avons pas réussi à le voir évoluer au cours d'une photodissociation. Il faut noter que la variation est probablement très faible car les hélices α sont rigides et se déplacent en bloc [21].

Chapitre 5

Les perspectives

Les nouvelles expériences envisageables sont de deux ordres. On peut tout d'abord mettre à profit la forte sensibilité de notre technique aux mouvements du ligand proximal pour étudier d'autres hémoprotéines. L'effet allostérique décrit dans l'hémoglobine se retrouve dans d'autres systèmes, et l'histidine proximale est souvent l'élément moteur d'une cascade de changements conformationnels.

L'autre idée est bien évidemment d'utiliser la source développée lors de ce travail de thèse afin de réaliser des expériences de TRCD dans l'UV

5.1 L'étude d'autres hémoprotéines

Nous avons démontré lors de ce travail qu'une expérience de TRCD était très sensible aux mouvements éventuels du ligand proximal. De manière générale, ces mouvements ont un rôle physiologique important dans d'autres hémoprotéines comme la guanylate cyclase, le cytochrome c, la NO synthase et le complexe HRI.

5.1.1 Le cytochrome c

Le cytochrome c est une hémoprotéine avec un seul hème, mais qui est lié par deux liaisons covalentes à la protéine, contrairement à l'hème b de la myoglobine.

On trouve le cytochrome c dans la membrane interne des mitochondries. Il peut être réduit ou oxydé (Fe^{2+} ou Fe^{3+}). Il sert alors de réserve d'électrons dans la cascade de réaction d'oxydo-réduction qu'est la chaîne respiratoire. La dernière étape est le transfert d'électron du cytochrome c vers la cytochrome c oxydase, qui réduit simultanément O_2 en H_2O . L'énergie de ce processus permet la synthèse d'ATP.

Le cytochrome c peut également fixer du NO sur l'hème, c'est sous cette forme qu'il est d'ailleurs relargué par la mitochondrie lors de l'apoptose [73]. Nous avons mesuré lors de ce travail de thèse des spectres de dichroïsme circulaire statique du cytochrome c en faisant varier les deux paramètres du fer de l'hème(avec et sans NO) et (Fe^{2+} ou Fe^{3+}) (fig5.1)

Il est très intéressant de voir les changements de CD spectaculaires lorsque l'on passe d'une forme à l'autre. On peut induire par laser la photodissociation du ligand distal (NO dans le cas

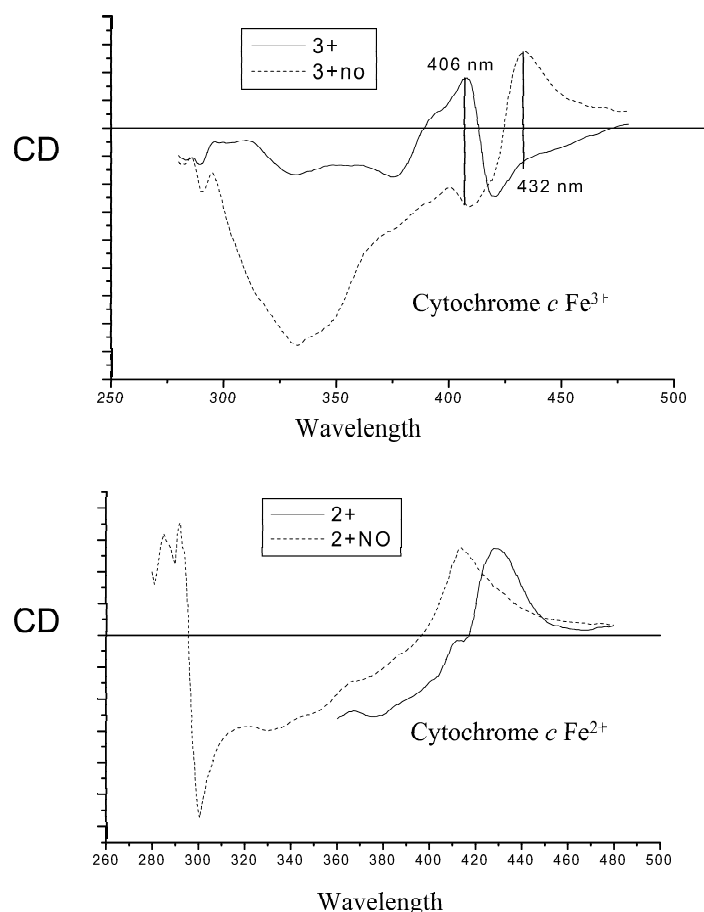


FIG. 5.1 – Les spectres de CD du cytochrome c

de cytc-NO, ou méthionine dans le cas du cyt sans NO) La difficulté d'une éventuelle expérience de TRCD est que dans les deux cas, le ligand se recombine en moins de 10 picosecondes. Le signal dû aux changements de conformation est noyé par les effets électroniques. Il est cependant envisageable de faire l'expérience avec une souche mutante de la protéine qui fixe elle le CO. Dans ce cas, le phénomène de recombinaison est analogue à MbCO.

5.1.2 La guanylate cyclase

Décrivons brièvement un des rôles de la guanylate cyclase. Au niveau des cellules endothéliales (cellules tapissant l'intérieur des vaisseaux sanguins), il existe une chaîne de réaction permettant la régulation de la pression artérielle. L'acétylcholine provoque l'entrée d'ions calcium dans la cellule. Ceci active la NO synthase endothéliale. La concentration en NO augmente dans le milieu. La guanylate cyclase fixe un NO, elle devient active, et produit du GMP cyclique (cGMP) à partir de GTP. Ce cGMP induit finalement la relaxation des cellules de muscle lisse entourant l'artère, aboutissant à moduler le diamètre, donc la pression artérielle.

On retrouve ici la même problématique de l'effet allostérique déjà rencontré dans HbCO : la fixation d'un NO sur l'hème de la guanylate cyclase provoque un changement de conformation

globale de la protéine permettant l'activation d'un site catalytique, **à distance de l'hème**. L'histidine distale est ici remplacée par une tyrosine. Des études montrent que la tyrosine distale [74] et l'histidine proximale sont très importantes dans ces changements de conformation.

5.1.3 La protéine HRI

HRI signifie Heme Regulated Inducer [75]. Lorsque la concentration en hème diminue, cette protéine a pour but de stopper la production de réticulocyte. Dans une situation normale, HRI possède deux hèmes. Lorsque la concentration en hème dans le milieu baisse, HRI perd un de ces deux hèmes. Ceci est alors l'élément qui va déclencher l'arrêt de la synthèse protéique.

L'hème restant fixe alors un NO, ce qui provoque alors l'autophosphorylation de HRI. HRI phosphoryle à son tour le complexe EIF₂, ceci a pour conséquence de stopper la production d'hématie. La problématique est encore une fois de comprendre par quels mécanismes la fixation du ligand distal permet de provoquer un changement de géométrie susceptible d'activer à distance la phosphorylation. De plus, la raison pour laquelle seul le NO active la réaction (et pas le CO) n'est pas encore connue.

5.2 L'expérience dans l'ultraviolet

Il s'agit également d'utiliser la source développée dans l'UV. Les projets sont de deux ordres. Tout d'abord nous souhaitons terminer les expériences dans MbCO. Ensuite, deux projets de repliement des protéines sont à l'étude.

5.2.1 L'étude de MbCO

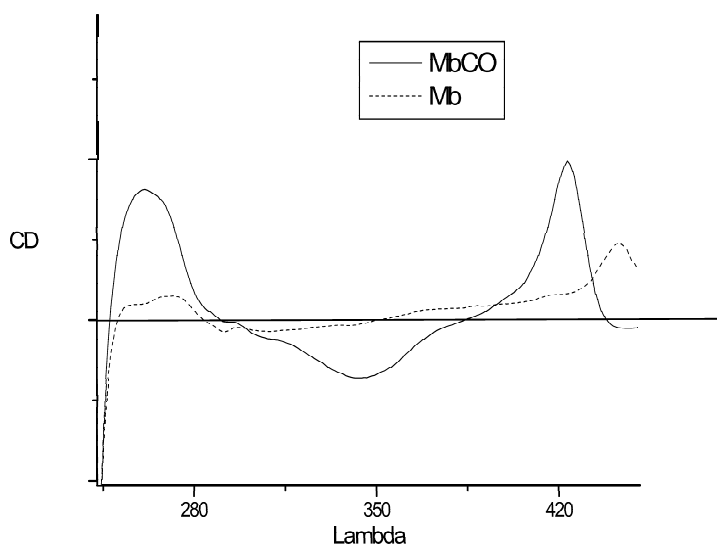


FIG. 5.2 – Les spectres de CD de MbCO et de Mb dans l'UV

La comparaison des spectres de CD de Mb et MbCO dans l'UV moyen (Fig. 5.2) montre très clairement des différences de signal importantes entre les deux espèces, vers 355 nm et vers 260 nm. La cinétique de ces deux bandes serait donc particulièrement intéressante à mesurer.

L'expérience à 355 nm a été réalisée par Simon [19], en revanche l'expérience à 260 nm serait elle inédite. L'interprétation d'une éventuelle dynamique temporelle à ces longueurs d'onde (260 et 355 nm) risque d'être délicate, car comme nous l'avons expliqué dans la première partie, beaucoup d'éléments différents absorbent à ces longueurs d'onde. Il sera alors très difficile de déterminer avec certitude lesquels seront responsables du signal éventuellement observé.

Nous avons également tenté de mettre en évidence des différences de CD entre MbCO et Mb, dans l'UV plus lointain, au niveau de la signature des hélices α . La conclusion est que les spectres présentent bien cette signature, il y a effectivement une majorité d'hélice α dans la myoglobine. Cependant, nous n'avons pas réussi à voir de différence nette entre Mb et MbCO. Cette absence de différence est logique, il y a exactement la même quantité d'hélices α pour les deux structures. De plus, ces hélices sont plutôt rigides, il n'y a donc pas beaucoup de différences. Nous allons tout de même essayer de voir, si d'un point de vue dynamique, le CD change lors des toutes premières étapes après la photodissociation.

5.2.2 Les expériences modèles de repliement des protéines

Le défi futur est de pouvoir mesurer le dichroïsme circulaire d'hélices α en formation afin de mieux cerner les toutes premières étapes du repliement des protéines. Nous devons faire face à deux gros problèmes :

- le repliement d'hélices étudié doit se faire sur des échelles de temps accessibles par un retard optique, donc moins d'une nanoseconde
- le repliement doit être inductible optiquement

Le premier point impose donc que l'on se limite à l'étude du repliement de petits polypeptides, d'une dizaine d'acides aminés. Une étude théorique de Eaton [76] met en évidence un temps d'enroulement "zipping time" de quelques centaines de picosecondes par acides aminés, pour les petits polypeptides.

Pour le deuxième point, nous donnons à présent deux exemples de systèmes modèles qui feront certainement l'objet du prochain travail de doctorat sur ce sujet. Concernant le développement théorique indispensable à la compréhension d'éventuels résultats expérimentaux, une collaboration est envisagée avec le professeur Hirst [77].

l'azobenzène

Le système décrit dans ce chapitre est étudié par le groupe du professeur Wachtweil de Francfort et le groupe du professeur Zinth de Munich. Ce système a été étudié par spectroscopie IR résolue temporellement [78], mais aussi à deux dimensions [79], également par absorption transitoire [16], et par RMN2D [80]. Une collaboration avec le professeur Wachtweil a été commencée pendant ce travail de thèse.

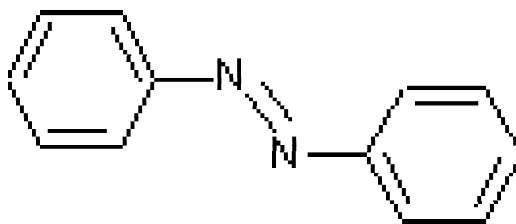


FIG. 5.3 – La formule de l'azobenzène

La photophysique de l'azobenzène permet d'induire optiquement des changements de géométrie. Cette molécule (Fig. 5.3) existe en effet sous deux isomères possibles : entre la forme *trans* et la forme *cis*, la distance entre les deux extrémités diminue de quelques Angstroms. Le principe est alors de venir greffer une petite chaîne de polypeptides sur chacune des extrémités d'un dérivé d'azobenzène. La synthèse consiste à ajouter une fonction carboxylique et une fonction amine sur la position para des deux azobenzènes, puis à créer deux liaisons peptidiques avec les deux

extrémités du même polypeptide. Le polypeptide cyclique n'adopte pas alors la même structure secondaire en fonction de l'état *cis* ou *trans* de la partie azobenzène.

Revenons donc sur les caractéristiques de ces stéréoisomères.

- Sous la forme *trans*, l'azobenzène est plan, le système π est délocalisé sous l'ensemble de la molécule. C'est donc la forme thermodynamiquement stable. Cet isomère possède une transition $n\pi^*$ vers 440 nm et une transition $\pi - \pi^*$ dans l'UV moyen
- Sous la forme *cis*, il y a une rotation autour de l'axe des deux azotes, la molécule n'est plus plane, et elle est constituée de deux systèmes π indépendants. Cette forme est instable. Elle possède une transition $n\pi^*$ dans le même domaine spectral, en revanche, la transition $\pi - \pi^*$ est déplacée dans l'UV plus lointain (vers 280nm) à cause de la rupture du système π

Il est possible de passer d'une forme à l'autre par l'absorption d'un photon. On peut soit utiliser la transition $n - \pi^*$ soit la transition $\pi - \pi^*$. Lorsque l'on excite la transition $\pi - \pi^*$, on casse le système π et on libère la rotation autour de l'axe N-N. Les deux benzènes tournent l'un par rapport à l'autre pour passer d'un isomère à l'autre.

Lorsque l'on excite la liaison $n - \pi^*$, on effectue une inversion du système électronique autour d'un des azotes, ce qui entraîne également l'isomérisation. L'excitation de ces deux transitions permet donc le passage d'un énantiomère à l'autre, mais le mouvement global lors de l'isomérisation est différent.

Il s'agit à présent de comprendre les conditions expérimentales qui permettent de privilégier un sens par rapport à l'autre. La forme *cis* absorbe plus que la forme *trans* vers 450 nm et la forme *trans* absorbe plus que *cis* vers 350 nm. Donc une illumination continue à 350 nm contribue à créer une majorité de *cis*, car la forme *trans* absorbe plus, donc s'isomériser plus que la forme *cis*.

Si l'on souhaite induire optiquement l'isomérisation *cis* vers *trans*, il suffit alors d'envoyer un rayonnement continu UV, et une pompe laser à 450 nm.

Si l'on souhaite étudier l'isomérisation *trans* vers *cis*, il suffit d'envoyer une lumière visible continue qui permet d'obtenir une majorité de *trans*, et d'induire l'isomérisation avec un photon visible.

On reporte à la figure 5.4 les spectres de CD obtenus pour le polypeptide cyclique RB100. On remarque pour ce composé que la signature spectrale des hélices α est plus importante dans la configuration *cis* que dans la configuration *trans*, et ceci est compatible avec des mesures de RMN2D montrant que pour la forme *cis*, l'hélice est un peu plus formée que pour la forme *trans*. On constate également un signal de CD intéressant dans l'UV moyen, correspondant au couplage entre la chaîne latérale du polypeptide et l'azobenzène.

polyalanine

Le principe est ici d'utiliser le RuTB pour induire le repliement d'un petit polypeptide. Rappelons que sous l'absorption d'un photon visible, ce système subit un transfert de charge, un électron passe du ruthénium et se localise sur un des trois ligands. Il apparaît alors un dipôle permanent, entre 5 et 9 debye. Ceci a pour conséquence de stabiliser les hélices α , car elles possèdent elles aussi un dipôle permanent.

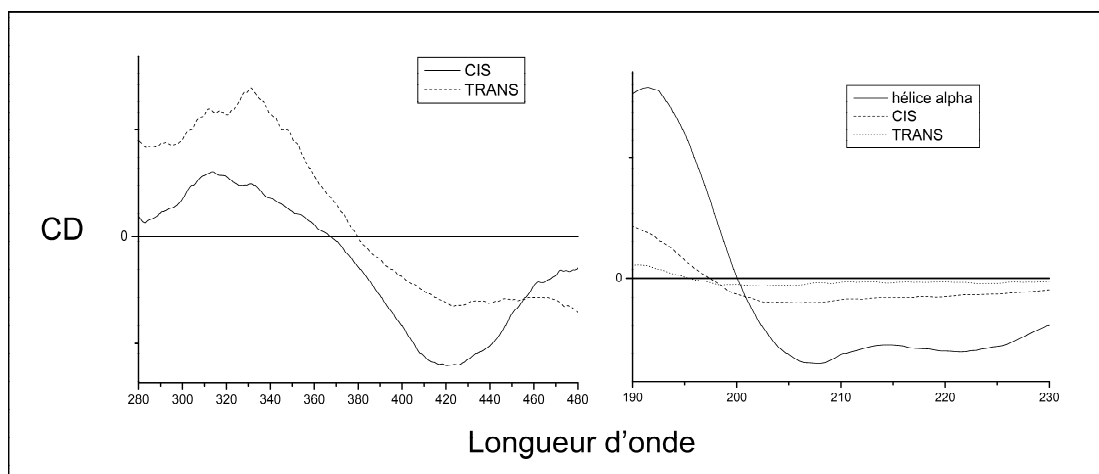


FIG. 5.4 – Les spectres de CD du système RB100

L'idée est d'attacher un RuTB au bout d'une chaîne d'une dizaine d'alanines, et d'induire avec une impulsion lumineuse un repliement. Une étude préliminaire [81] montre qu'à l'équilibre, 50% des hélices sont formées, et que sous illumination laser, cette proportion augmente. Il reste à étudier la faisabilité d'une telle expérience, (niveau de signal, photostabilité, retour de l'échantillon à l'équilibre...)

Conclusion

Au cours de ce travail de thèse nous avons vu qu'une mesure de dichroïsme circulaire permettait d'obtenir des informations sur la géométrie de systèmes biologiques. Une expérience de dichroïsme circulaire résolu temporellement est donc indiquée pour suivre des changements de conformation. Si de plus on utilise la technologie des lasers femtoseconde, on peut suivre des changements de structure avec une grande résolution temporelle.

La réaction de photodissociation du complexe MbCO peut servir de modèle aux toutes premières étapes de l'effet allostérique dans l'hémoglobine. L'histidine proximale est considérée comme le point de passage des transformations du système : après le départ du ligand, l'hème se "dôme" et vient pousser l'histidine proximale qui à son tour vient pousser l'hélice F. La transformation se répercute ensuite à l'ensemble du système. Diverses expériences ont mis en évidence des temps caractéristiques entre 10 et 100 picosecondes pour ce mécanisme.

Un calcul détaillé basé sur la théorie de la polarisabilité nous a permis de mettre en évidence le rôle crucial de l'histidine proximale dans la détermination du spectre de CD visible. C'est le résidu le plus proche de l'hème, donc celui qui se couple le plus efficacement, il sera responsable de la levée de dégénérescence des niveaux (x, y) de l'hème et de l'équilibre des niveaux initiaux dans les modes couplés. On constate qu'une rotation de cette histidine modifie notablement l'allure du spectre de CD.

Un traitement expérimental approfondi a par ailleurs permis la maîtrise des artefacts de dichroïsme linéaire induit dans les expériences de CD résolues en temps. Un alignement rigoureux de la cellule de Pockels, un choix pertinent des polarisations de pompe, et un contrôle strict de la polarimétrie des optiques permettent alors d'effectuer une expérience de TRCD sur la myoglobine. Les résultats obtenus sur une échelle de temps d'une nanoseconde montre que le spectre de CD passe directement de celui de MbCO à celui de Mb. Ceci est en accord avec les premiers résultats de diffractions X : la structure 100 ps après la photodissociation est très proche de la structure de Mb, les changements de CD entre $t+100$ ps et $t+\infty$ sont logiquement négligeables.

Les résultats obtenus sur des temps courts permettent cependant de mettre en évidence une dynamique à deux étapes : on observe une décroissance du signal sur 10 picosecondes, et une augmentation sur 100 picosecondes. Cette dynamique est donc interprétée comme liée aux mouvements de l'histidine proximale. Ceci permet d'étayer le modèle de changements structuraux séquentiels. Un résultat comparatif avec la photodissociation de l'hémoglobine permet d'illustrer que ce mouvement est gêné par la coopérativité des autres monomères du complexe.

Dans l'espoir de pouvoir étudier la dynamique de repliement des protéines, une source laser ultraviolette a été développée. Le principe est de faire la somme de fréquences entre la sortie d'un

amplificateur paramétrique optique non colinéaire et un faisceau à 400 nm. On obtient alors une source laser accordable de 220 nm à 375 nm. Des résultats d'absorption différentielle et de TRCD ont été obtenus dans le ruthénium trisbipyridyl. Des résultats d'absorption différentielle ont été obtenus dans le complexe MbCO. L'interprétation ainsi que les mesures complémentaires sont en cours.

Le but est désormais d'utiliser l'expérience visible pour étudier d'autres hémoprotéines (cytochrome c, guanylate cyclase et HRI) et l'expérience UV pour étudier la dynamique de repliement des protéines.

Annexe A

Le formalisme tensoriel et la moyenne isotrope

On considère l'espace muni d'une base orthonormale $(\vec{u}_x, \vec{u}_y, \vec{u}_z)$. Soit deux vecteurs

$$\vec{a} = (x, y, z) \quad \vec{b} = (x', y', z')$$

On introduit "a tensorielle b" $\vec{a} \otimes \vec{b}$ la matrice suivante

$$\vec{a} \otimes \vec{b} = \begin{pmatrix} xx' & xy' & xz' \\ yx' & yy' & yz' \\ zx' & zy' & zz' \end{pmatrix}$$

Qui vérifie les trois propriétés suivantes :

1. $\vec{a} \otimes \vec{b} \cdot \vec{F} = (\vec{F} \cdot \vec{b}) \vec{a}$
2. $\vec{E} \cdot \vec{a} \otimes \vec{b} = (\vec{E} \cdot \vec{a}) \vec{b}$
3. $\vec{E} \cdot (\vec{a} \otimes \vec{b}) \cdot \vec{F} = (\vec{E} \cdot \vec{a}) (\vec{F} \cdot \vec{b})$

A plusieurs reprises dans ce manuscrit, nous avons effectué une moyenne isotrope. Nous en détaillons ici le principe. $\vec{a}$ et $\vec{b}$ sont deux vecteurs associés aux directions moléculaires (moment dipolaire, vecteur entre deux atomes), alors que $\vec{E}$ et $\vec{F}$ sont deux vecteurs liés au repère du laboratoire (champ électrique, magnétique, direction de propagation). **Tous les vecteurs** ($\vec{a}$, $\vec{b}$, $\vec{E}$, $\vec{F}$) **sont unitaires**. On souhaite donc calculer la quantité

$$\vec{F} \cdot (\vec{a} \otimes \vec{b}) \cdot \vec{E} = (\vec{F} \cdot \vec{a}) (\vec{E} \cdot \vec{b})$$

et effectuer la moyenne sur toutes les directions possibles du couple $(\vec{a}, \vec{b})$, c'est à dire sur toutes les orientations possibles de la molécule. J'insiste sur le fait que $\vec{b}$ est fixe par rapport à $\vec{a}$. Donc si $(\vec{u}_x, \vec{u}_y, \vec{u}_z)$ est une base vectorielle moléculaire. On peut sans perte de généralité écrire :

$$\vec{a} = \vec{u}_x \quad \vec{b} = \cos(\alpha)\vec{u}_x + \sin(\alpha)\vec{u}_y$$

Et donc bien évidemment α est indépendant de l'orientation de la molécule. De manière strictement équivalente, on peut introduire la base $\vec{U}_x, \vec{U}_y, \vec{U}_z$, associée aux directions du laboratoire tel que :

$$\vec{E} = \vec{U}_x \quad \vec{F} = \cos(\alpha')\vec{U}_x + \sin(\alpha')\vec{U}_y$$

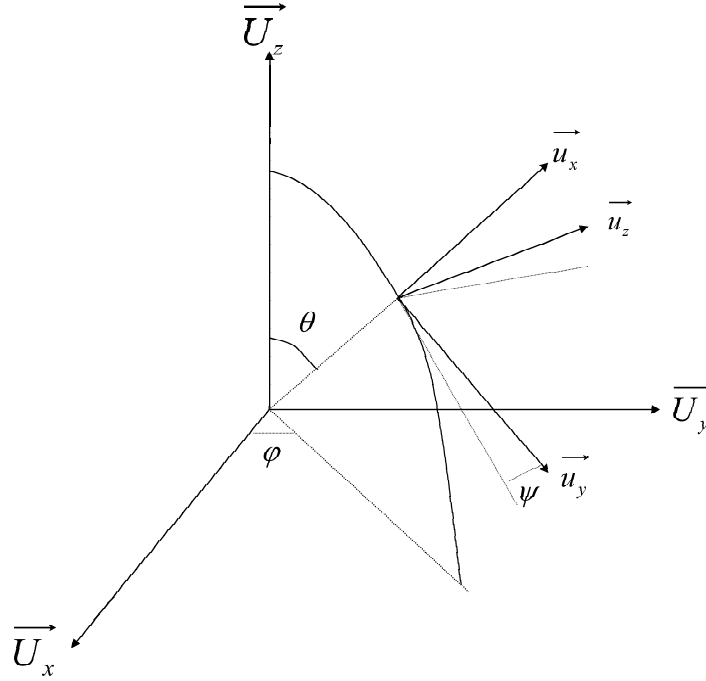


FIG. A.1 – La définition des angles d'Euler

La matrice de passage $\underline{\underline{P}}$ de la base $\vec{U}_x, \vec{U}_y, \vec{U}_z$ à la base $\vec{u}_x, \vec{u}_y, \vec{u}_z$ s'écrit alors directement :

$$\underline{\underline{P}} = \begin{pmatrix} \sin\theta\cos\phi & \cos\psi\cos\theta\cos\phi - \sin\psi\sin\phi & -\sin\psi\cos\theta\cos\phi - \cos\psi\sin\phi \\ \sin\theta\sin\phi & \cos\psi\cos\theta\sin\phi + \sin\psi\cos\phi & -\sin\psi\cos\theta\sin\phi + \cos\psi\cos\phi \\ \cos\theta & -\cos\psi\sin\theta & +\sin\psi\sin\theta \end{pmatrix}$$

Où l'on a introduit les angles d'Euler qui permettent d'orienter de manière arbitraire la base moléculaire par rapport à la base du laboratoire.

La quantité que l'on cherche à calculer est donc :

$$I = \frac{1}{8\pi^2} \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi (\vec{E}\underline{\underline{P}}\vec{a}) \cdot (\vec{F}\underline{\underline{P}}\vec{b}) \sin(\theta) d\theta d\phi d\psi$$

Où l'on a exprimé chacun des vecteurs dans sa base naturelle. Le facteur $8\pi^2$ s'obtient en remplaçant l'intégrant par 1. L'étape suivante est de remplacer les vecteurs par leurs expressions, et dans notre cas, on cherche à intégrer :

$$p^{11}\sin\theta (\cos\alpha' (p^{11}\cos\alpha + p^{12}\sin\alpha) + \sin\alpha' (p^{21}\cos\alpha + p^{22}\sin\alpha))$$

où les p^{ij} sont les coefficients de $\underline{\underline{P}}$.

L'intégration va alors annuler beaucoup de termes. θ étant intégré sur $[0, \pi]$, tous les termes en $\cos$, $\sin$, $\cos$, $\sin^2$.

ψ ou ϕ étant intégré sur $[0, 2\pi]$, tous les termes en $\cos$, $\sin$, $\cos$, $\sin$, $\cos$, $\sin^2$... vont partir. Dans notre cas, il ne reste que le terme en $p^{11}p^{11}\sin(\theta)$. Donc le calcul se termine aisément et il vient

$$I = \frac{1}{3} \cos(\alpha) \cos(\alpha') = \frac{1}{3} (\vec{E} \cdot \vec{F}) \cdot (\vec{a} \cdot \vec{b})$$

La force de la moyenne isotrope est de permettre de regrouper d'un côté les directions moléculaires, et de l'autre les directions du laboratoire. Cette formule étant valable pour tout $\vec{E}$ et pour tout $\vec{F}$, on a bien :

$$\vec{a} \otimes \vec{b} \rightarrow \frac{1}{3} \vec{a} \cdot \vec{b}$$

La formule que je viens de montrer (laborieusement) est la première d'une longue série .

$$\left(\vec{E} \cdot \vec{a} \right) \left(\vec{F} \cdot \vec{b} \right) \rightarrow \frac{1}{3} (\vec{E} \cdot \vec{F}) \cdot (\vec{a} \cdot \vec{b})$$

$$\left(\vec{E} \cdot \vec{a} \right) \left(\vec{F} \cdot \vec{b} \right) \left(\vec{G} \cdot \vec{c} \right) \rightarrow \frac{1}{6} (\vec{E} \cdot \vec{F} \times \vec{G}) \cdot (\vec{a} \cdot \vec{b} \times \vec{c})$$

La moyenne isotrope pour 4 et 5 moments est très utilisée pour l'activité optique non linéaire. Pour plus de détail nous renvoyons le lecteur à l'ouvrage écrit par Wagnière [82]

Annexe B

Le couplage quadripolaire électrique

Le but de cette section est de montrer que la moyenne isotrope annule l'effet du quadripôle électrique. Nous nous appuyerons sur les notions introduites au début de la section 2 et de l'annexe 1. Nous considérons l'Hamiltonien d'interaction lumière-matière complet, c'est à dire que l'on tient compte de l'interaction dipolaire électrique, dipolaire magnétique, et quadripolaire électrique :

$$\hat{H} = -\hat{\vec{d}} \cdot \vec{E} - \hat{\vec{m}} \cdot \vec{B} - \underline{\underline{\hat{Q}}} : \vec{\nabla} \vec{E}$$

Il est important de noter qu'il n'y a pas de chapeau sur le $\vec{\nabla}$ car celui-ci n'agit que sur le champ électrique et pas sur l'espace de Hilbert. L'opérateur quadripolaire électrique s'écrit :

$$\underline{\underline{\hat{Q}}} = \frac{1}{2e} \hat{\vec{d}} \otimes \hat{\vec{d}} = \frac{e}{2} \sum_{i,j} \hat{r}_i \otimes \hat{r}_j$$

Ceci permet de réécrire proprement l'Hamiltonien quadripolaire électrique

$$-\underline{\underline{\hat{Q}}} : \vec{\nabla} \vec{E} = -\frac{e}{2} \sum_{i,j} \hat{r}_i \left[\left(\hat{r}_j \cdot \vec{\nabla} \right) \vec{E} \right]$$

Je rappelle l'équation 3.3

$$\vec{x} = -\frac{1}{\hbar} \sum_e \left(\frac{\vec{x}_{fe} H_{ef}}{\omega_{ef} - \omega - i\Gamma_{ef}} + \frac{\vec{x}_{ef} H_{fe}}{\omega_{ef} + \omega + i\Gamma_{ef}} \right)$$

Il s'agit ici de l'appliquer à $\hat{\vec{x}} = \hat{\vec{d}}$, en se limitant à l'Hamiltonien quadripolaire électrique car les autres termes ont été étudiés au début de la section 2.

il vient donc en négligeant le terme non résonnant :

$$\vec{d}^{quad} = \frac{1}{\hbar} \sum_e \frac{\vec{d}_{fe} \underline{\underline{Q_{ef}}} : \vec{\nabla} \vec{E}}{\omega_{ef} - \omega - i\Gamma_{ef}}$$

$\underline{\underline{Q_{ef}}}$ est une matrice 3 par 3, donc nous pouvons sans perte de généralité la décomposer en une somme de 3 matrices de rang 1 :

$$\underline{\underline{Q_{ef}}} = \sum_{i=1}^{i=3} \vec{u}_i^{ef} \otimes \vec{v}_i^{ef}$$

$$\vec{d}^{quad} = \frac{1}{\hbar} \sum_{e,i} \vec{d}_{fe} \frac{\vec{u}_i^{ef} \cdot (\vec{v}_i^{ef} \cdot \vec{\nabla}) \vec{E}}{\omega_{ef} - \omega - i\Gamma_{ef}}$$

L'énergie déposée dans le milieu par le processus quadripolaire $\delta = Im(\vec{d}^{quad} \cdot \vec{E}^*)$ est donc une somme de termes de la forme :

$$(\vec{d}_{fe} \cdot \vec{E}^*)(\vec{v}_i^{ef} \cdot \vec{\nabla})(\vec{u}_i^{ef} \cdot \vec{E})$$

On a donc bien 3 directions moléculaires, 3 directions associées au laboratoire. La moyenne isotropique de cette expression est donc nulle d'après la première annexe car on fait apparaître le produit vectoriel de $\vec{E}$ avec lui même.

Annexe C

Les règles de somme de Thomas-Kuhn-Reiche

Le but de cette section est de redémontrer les règles de somme pour les forces d'oscillateur et les forces de rotation. Par souci de lisibilité, nous omettrons les flèches sur les vecteurs.

Les règles de somme pour les forces d'oscillateur Nous commencerons par le cas où seul un électron est impliqué dans l'opérateur dipolaire électrique. On a donc :

$$\hat{d} = -e\hat{r} \quad \hat{p} = \frac{\hbar}{i}\hat{\nabla}$$

L'Hamiltonien du système isolé s'écrit :

$$\hat{H}^0 = \frac{\hat{p}^2}{2m} + V(x)$$

Retrouvons rapidement l'expression des commutateurs usuels :

$$[\hat{r}, \hat{p}] = \hat{r}\frac{\hbar}{i}\hat{\nabla} - \frac{\hbar}{i}\hat{\nabla}\hat{r} = i\hbar$$

$$[\hat{r}, \hat{p}^2] = 2i\hbar\hat{p} \quad \left[\hat{r}, \hat{H}^0\right] = \frac{i\hbar}{m}\hat{p}$$

Considérons 2 niveaux d'énergie E_f et E_e , $\hat{H}^0|e\rangle = E_e|e\rangle$, $\hat{H}^0|f\rangle = E_f|f\rangle$. Ceci permet donc d'écrire :

$$\langle e|\hat{p}|f\rangle = \frac{m}{i\hbar} \langle e|[\hat{r}, \hat{H}^0]|f\rangle = \frac{m}{i\hbar}(E_f - E_e) \langle e|\hat{r}|f\rangle \quad (C.1)$$

Ceci permet de réécrire la force d'oscillateur de manière plus simple :

$$f_{fe} = \frac{2\omega_{ef}m}{e^2\hbar} \langle f|\hat{d}|e\rangle \langle e|\hat{d}|f\rangle = \frac{2}{i\hbar} \langle f|\hat{r}|e\rangle \langle e|\hat{p}|f\rangle$$

mais on peut tout aussi bien écrire :

$$f_{fe} = -\frac{2}{i\hbar} \langle f|\hat{p}|e\rangle \langle e|\hat{r}|f\rangle$$

Il s'agit maintenant de vérifier la règle de somme de Thomas-Kuhn-Reiche pour les forces d'oscillateur :

$$\sum_e f_{fe} = \frac{2}{i\hbar} \langle f | \hat{r} | \left(\sum_e |e\rangle \langle e| \right) \hat{p} | f \rangle$$

Le système étant fermé, on a la règle de fermeture :

$$|f\rangle \langle f| + \sum_e |e\rangle \langle e| = \underline{\underline{1}}$$

soit en remplaçant :

$$\begin{aligned} \sum_e f_{fe} &= \frac{2}{i\hbar} \langle f | \hat{r} \hat{p} | f \rangle - \frac{2}{i\hbar} \langle f | \hat{r} | f \rangle \langle f | \hat{p} | f \rangle \\ \sum_e f_{fe} &= -\frac{2}{i\hbar} \langle f | \hat{p} \hat{r} | f \rangle + \frac{2}{i\hbar} \langle f | \hat{p} | f \rangle \langle f | \hat{r} | f \rangle \end{aligned}$$

soit en faisant la demie somme de ces deux relations :

$$\sum_e f_{fe} = \frac{1}{i\hbar} \langle f | [\hat{r}, \hat{p}] | f \rangle = 1$$

la généralisation à N électrons est immédiate :

$$\hat{D} = -e\hat{R} \quad \hat{R} = \sum_{j=1}^N \hat{r}_j \quad \hat{P} = \sum_{j=1}^N \hat{p}_j \quad \hat{H} = \frac{1}{2m} \sum_{j=1}^N \hat{p}_j^2 + \dots$$

Deux opérateurs de deux électrons différents commutent, et s'il s'agit du même électron, on a les mêmes relations que précédemment. On a donc :

$$[\hat{R}, \hat{P}] = Ni\hbar \quad [\hat{R}, \hat{H}] = \frac{i\hbar}{m} \hat{P}$$

La suite de la démonstration est rigoureusement identique :

$$\sum_e f_{fe} = N$$

Les règles de somme pour les forces de rotation

$$\widehat{D} = -e\widehat{R} \quad \widehat{R} = \sum_{j=1}^N \widehat{r}_j \quad \widehat{P} = \sum_{j=1}^N \widehat{p}_j \quad \widehat{M} = -\frac{e}{2m} \sum_{j=1}^N \widehat{r}_j \times \widehat{p}_j$$

Le point important de cette démonstration est de vérifier que $\widehat{D}$ commute avec $\widehat{M}$, ce qui revient à vérifier que $\widehat{r}_i$ commute avec $\widehat{r}_i \times \widehat{p}_i$. Il suffit de l'écrire pour s'en convaincre :

$$\widehat{r}_i \cdot (\widehat{r}_i \times \widehat{p}_i) = \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} y \frac{\partial}{\partial z} - z \frac{\partial}{\partial y} \\ z \frac{\partial}{\partial x} - x \frac{\partial}{\partial z} \\ y \frac{\partial}{\partial z} - z \frac{\partial}{\partial x} \end{pmatrix} = (\widehat{r}_i \times \widehat{p}_i) \cdot \widehat{r}_i$$

On a donc le résultat annoncé :

$$[\widehat{D}\widehat{M}] = 0$$

La force de rotation du niveau e-f s'écrit :

$$R_{ef} = \text{Im}(\langle f | \widehat{D} | e \rangle \langle e | \widehat{M} | f \rangle)$$

Comme $\widehat{M}$ est imaginaire pur hermitien et que $\widehat{D}$ est réel symétrique, il vient :

$$R_{ef} = -\text{Im}(\langle f | \widehat{M} | e \rangle \langle e | \widehat{D} | f \rangle)$$

De manière analogue à la section précédente, on utilise la relation de fermeture, et il vient :

$$\sum_e R_{ef} = \langle f | \widehat{D}\widehat{M} | f \rangle - \langle f | \widehat{D} | f \rangle \langle f | \widehat{M} | f \rangle$$

$$\sum_e R_{ef} = -\langle f | \widehat{M}\widehat{D} | f \rangle + \langle f | \widehat{M} | f \rangle \langle f | \widehat{D} | f \rangle$$

Soit en faisant la somme des deux dernières relations :

$$2 \sum_e R_{ef} = \langle f | [\widehat{D}\widehat{M}] | f \rangle = 0 \quad (\text{C.2})$$

Bibliographie

- [1] L D Barron. Molecular light scattering and optical activity. *Cambridge University Press*, (1982).
- [2] S F Mason. Molecular optical activity and the chiral discriminations. *Cambridge University Press*, (1982).
- [3] K Nakanishi N Berova and R W Woody. Circular dichroism - principles and applications - 2nd ed. *Wiley-VCH, New York*, (2000).
- [4] W Kauzman. Quantum chemistry. *Academic Press New York*, . :616, (1957).
- [5] L Rosenfeld. Quantenmechanische theorie der natürlichen optischen aktivität von flüssigkeiten und gasen. *Z. Physik*, **52** :161, (1928).
- [6] W Kuhn. Quantitative verhältnisse und beziehungen bei der natürlichen optischen aktivität. *Z. Physik. Chemie*, **B4** :14, (1929).
- [7] I Tinoco. Theoretical aspects of optical activity. *J. Advan. Chem. Phys.*, **4** :113, (1962).
- [8] A Rodger and B Norden. *Circular dichroism and linear dichroism*. Oxford University Press, Oxford, 1997.
- [9] H DeVoe. Optical properties of molecular aggregates. ii. classical theory of the refraction, absorption, and optical activity of solutions and crystals. *J. Chem. Phys.*, **43** :3199, (1965).
- [10] J Applequist, K R Sundberg, M L Olson, and L C Weiss. A normal mode treatment of optical properties of a classical coupled oscillator system with lorentzian bandshapes. *J. Chem. Phys.*, **70** :1240–1246, (1979).
- [11] P M Bayley, E B Nielsen, and J A Schellman. The rotatory properties of molecules containing two peptide groups : Theory. *J. Phys. Chem.*, **73** :228–243, (1969).
- [12] J D Hirst, K Colella, and A T B Gilbert. Electronic circular dichroism of proteins from first-principles calculations. *J. Phys. Chem. B*, **107** :11813–11819, (2003).
- [13] M C Hsu and R W Woody. The origin of the heme cotton effects in myoglobin and hemoglobin. *J. Am. Chem. Soc.*, **93** :3515–3525, (1971).
- [14] J W Lewis, R F Tilton, C M Einterz, S J Milder, I D Kuntz, and D S Kliger. New technique for measuring circular dichroism changes on a nanosecond time scale. application to (carbonmonoxy)myoglobin and (carbonmonoxy)hemoglobin. *J. Phys. Chem.*, **89** :289–294, (1985).
- [15] H S Aojula, M T Wilson, and A Drake. Characterisation of haem disorder by circular dichroism. *Biochem.*, **237** :613, (1986).
- [16] T Nägele, R Hoche, W Zinth, and J Wachtveitl. Femtosecond photoisomerization of cis-azobenzene. *Chem. Phys. Lett.*, **272** :489–495, (1997).

- [17] S J Milder, S C Bjorling, I D Kuntz, and D S Kliger. Time-resolved circular dichroism and absorption studies of the photolysis reaction of (carbonmonoxy) myoglobin. *Biophys. J.*, **53** :659–664, (1988).
- [18] X Xie and J D Simon. Protein conformational relaxation following photodissociation of co from carbonmonoxymyoglobin : Picosecond circular dichroism and absorption studies. *Biochem.*, **30** :3682–3692, (1991).
- [19] X Xie and J D Simon. Picosecond time-resolved circular dichroism spectroscopy : Experimental details and applications. *Rev. Sci. Instrum.*, **60** :2614–2627, (1989).
- [20] J Bredenbeck, J Helbing, and P Hamm. Continuous scanning from picoseconds to microseconds in time resolved linear and nonlinear spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum.*, **75**(11) :4462, (2004).
- [21] G S Kachalova, A N Popov, and H D Bartunik. A steric mechanism for inhibition of co binding on heme proteins. *Science*, **284** :473–476, (1999).
- [22] M Lim, T A Jackson, and P A Anfinrud. Nonexponential protein relaxation : Dynamics of conformational changes in myoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90** :5801–5804, (1993).
- [23] G Fermi, M F Perutz, B Shaanan, and R Fourme. The crystal-structure of human deoxyhemoglobin at 1.74 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **175** :159, (1984).
- [24] M F Perutz, G Fermi, B Lushi, B Shaanan, and R C Liddington. Stereochemistry of cooperative mechanisms in hemoglobin. *Acc. Chem. Res.*, **20** :309, (1987).
- [25] R A Golbeck, S J Paquette, and D S Kliger. The effect of water on the rate of conformational changes in protein allostery. *Biophys. J.*, **81** :2919–2934, (2001).
- [26] M Brunori. Structural dynamics of myoglobin. *Biophys. Chem.*, **86** :221–230, (2000).
- [27] E R Henry, W A Eaton, and R M Hochstrasser. Molecular dynamics simulations of cooling in laser-excited heme proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83** :8982–8986, (1986).
- [28] I Okazaki, Y Hara, and M Nagaoka. On vibrational cooling upon photodissociation of carbonmonoxymyoglobin and its microscopic mechanism from the viewpoint of vibrational modes of the heme. *Chem. Phys. Lett.*, **337** :151–157, (2001).
- [29] J W Petrich, C Poyart, and J L Martin. Photophysics and reactivity of heme proteins : A femtosecond absorption study of hemoglobin, myoglobin and protoheme. *Biochem.*, **27** :4049–4060, (1988).
- [30] S Franzen, L Kiger, C Poyart, and J-L Martin. Heme photolysis occurs by ultrafast excited state metal-to-ring charge transfer. *Biophys. J.*, **80** :2372–2385, (2001).
- [31] T Polack, J P Ogilvie, S Franzen, M H Vos, M Joffe, J L Martin, and A Alexandrou. Co vibration as a probe of ligand dissociation and transfer in myoglobin. *Phys. Rev. Lett.*, **93**(1), (2004).
- [32] M Asplund, M Zanni, and R M Hochstrasser. Two-dimensional infrared spectroscopy of peptide by phase-controlled femtosecond vibrational photon echoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97** :8219, (2000).
- [33] M R Armstrong, J P Ogilvie, M L Cowan, A M Nagy, and R J D Miller. Observation of the cascaded atomic-to-global length scales driving protein motion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**(9) :4990–4994, (2003).

- [34] U Liebl, G Lipowski, M Negrier, J C Lambry, J L Martin, and M H Vos. Coherent reaction dynamics in cytochrome c oxidase. *Nature*, **401** :181, (1999).
- [35] M L Groot, M H Vos, I Schlichting, F van Mourik, M Joffe, J C Lambry, and J L Martin. Coherent infrared emission from myoglobin crystals : An electric field measurement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** :1323–1328, (2002).
- [36] E W Findsen, J M Friedman, M R Ondrias, and S R Simon. Picosecond time-resolved resonance raman studies of hemoglobin : Implications for reactivity. *Science*, **229** :661–665, (1985).
- [37] T W Scott and J M Friedman. Tertiary-structure relaxation in hemoglobin : A transient raman study. *J. Am. Chem. Soc.*, **106** :5677–5687, (1984).
- [38] Y Mizutani and T Kitagawa. Ultrafast structural relaxation of myoglobin following photodissociation of carbon monoxide probed by time-resolved resonance raman spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, **105** :10992–10999, (2001).
- [39] R J D Miller. Energetics and dynamics of deterministic protein motion. *Acc. Chem. Res.*, **27** :145–150, (1994).
- [40] R J D Miller. Vibrational energy relaxation and structural dynamics of heme proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **42** :581–614, (1991).
- [41] M F Perutz, H Muirhead, J M Cox, and L C G Goaman. Three-dimensional fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution : The atomic model. *Nature*, **219** :131–139, (1968).
- [42] J Vojtechovsky, K Chu, J Berendzen, R M Sweet, and I Schlichting. Crystal structures of myoglobin-ligand complexes at near-atomic resolution. *Biophys. J.*, **77** :2153–2174, (1999).
- [43] S I Adachi, S Y Park, J R H Tame, Y Shiro, and N Shibayama. Direct observation of photolysis-induced tertiary structural changes in hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** :7039–7044, (2003).
- [44] R Ernst, G Bodenhausen, and A Wokaun. Principle of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions. *Oxford U. Press*, (1997).
- [45] F Schotte, M Lim, T A Jackson, A V Smirnov, J Solman, J L Olson, G N Phillips, M Wulff, and P A Anfinsen. Watching a protein as it functions with 150 ps time-resolved x-ray crystallography. *Science*, **300** :1944–1947, (2003).
- [46] K Chu, J Vojtechovsky, B H McMahon, R M Sweet, J Berendzen, and I Schlichting. Structure of a ligand-binding intermediate in wild-type carbonmonoxy myoglobin. *Nature*, **403** :921–923, (2000).
- [47] I Schlichting, J Berendzen, G N Phillips, and R M Sweet. Crystal structure of photolysed carbonmonoxy-myoglobin. *Nature*, **371** :808–812, (1994).
- [48] H Hartmann, S Zinser, P Komninos, R T Schneider, G U Nienhaus, and F Parak. X-ray structure determination of a metastable state of carbonmonoxy myoglobin after dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93** :7013–7016, (1996).
- [49] J G Kirkwood. On the theory of optical rotatory power. *J. Chem. Phys.*, **5** :479, (1937).
- [50] C Diedrich and S Grimme. Systematic investigation of modern quantum chemical methods to predict electronic circular dichroism spectra. *J. Phys. Chem. A*, **107** :2524–2539, (2003).

- [51] C Rullière. Femtosecond laser pulses : Principle and experiments. *Springer, Berlin*, (1998).
- [52] F Hache and T Dartigalongue. Application of the polarizability theory to the calculation of anisotropic circular dichroism spectra. *Chem. Phys.*, **303** :197–203, (2004).
- [53] G Blauer, N Sreerama, and R W Woody. Optical activity of hemoproteins in the solet region. circular dichroism of the heme undecapeptide of cytochrome c in aqueous solution. *Biochem.*, **32** :6674–6679, (1993).
- [54] G Geraci and L Parkhurst. Circular dichroism spectra of hemoglobins. *J. Meth.enzym.*, **76** :262, (1981).
- [55] D M Rogers and J D Hirst. Ab initio study of aromatic side chains of amino acids in gas phase and solution. *J. Phys. Chem. A*, **107** :11191–11200, (2003).
- [56] W A Eaton and J Hofrichter. Polarized absorption and linear dichroism spectroscopy of hemoglobin. *Meth. Enzym.*, **76** :175–261, (1981).
- [57] A Cupane, M Leone, E Vitrano, L Cordone, U R Hiltbold, K H Winterhalter, W Yu, and E E Di Iorio. Structure-dynamics-function relationships in asian elephant (*elephas maximus*) myoglobin. an optical spectroscopy and flash photolysis study on functionally important motions. *Biophys. J.*, **65** :2461–2472, (1993).
- [58] D Vitkup, G A Petsko, and M Karplus. A comparison between molecular dynamics and x-ray results for dissociated co in myoglobin. *Nature Struct. Biol.*, **4** :202–208, (1997).
- [59] T Dartigalongue and F Hache. Precise alignment of a longitudinal pockels cell for time-resolved circular dichroism experiments. *J. Opt. Soc. Am. B*, **20** :1780–1787, (2003).
- [60] J W Lewis, R A Golbeck, D S Kliger, X Xie, R C Dunn, and J D Simon. Time-resolved circular dichroism spectroscopy : Experiment, theory and applications to biological systems. *J. Phys. Chem.*, **96** :5243–5254, (1992).
- [61] V G Dmitriev, G G Gurzadyan, and D N Nikogosyan. Handbook of nonlinear crystals. *Springer, Berlin*, page 57, (1991).
- [62] M Born and E Wolf. Principle of optics, 5th ed. *Pergamon Press, Oxford*, page 665, (1975).
- [63] H Mesnil, M C Schanne-Klein, and F Hache. Effects of a modulation of the pump-polarization in a degenerate pump/probe experiment. *Eur. Phys. J. D.*, **5** :447, (1999).
- [64] J Hofrichter, A Ansari, C M Jones, R M Deutsch, J H Sommer, and E R Henry. Ligand binding and conformational changes measured by time-resolved absorption spectroscopy. *Meth. Enzym.*, **232** :387–415, (1994).
- [65] M Lim, T A Jackson, and P A Anfinrud. Femtosecond near-ir absorbance study of photoexcited myoglobin : Dynamics of electronic and thermal relaxation. *J. Phys. Chem.*, **100** :12043–12051, (1996).
- [66] Y Seno and N Go. Deoxymyoglobin studied by the conformational normal mode analysis. *J. Mol. Biol.*, **216** :95–109, 111–126, (1990).
- [67] P Baum, S Lochbrunner, and E Riedle. Tunable sub 10 fs ultraviolet pulses generated by achromatic frequency doubling. *Opt. lett.*, **29**(14) :1686, (2004).
- [68] H Mesnil and F Hache. Experimental evidence of third-order nonlinear circular dichroism in a liquid of chiral molecule. *Phys. Rev. Lett.*, **85** :4257, (2000).

- [69] A T Yeh, C V Shank, and J M McCusker. Ultrafast electron localization dynamics following photo-induced charge transfer. *Science*, **289** :935–938, (2000).
- [70] A Hauser and E Krausz. The excited-state absorption of $ru(bpy)_3^{2+}$ reexamined. *Chem. Phys. Lett.*, **138** :355–360, (1987).
- [71] R G Alden, M D Chavez, M R Ondrias, S H Courtney, and J M Friedman. Direct measurement of vibrational temperatures in photoexcited deoxyhemoglobin on picosecond timescales. *J. Am. Chem. Soc.*, **112** :3241–3242, (1990).
- [72] D W Urry. The heme chromophore in the ultraviolet. *J. Biol. Chem.*, **242** :4441–4448, (1967).
- [73] C M Schonhoff, B Gaston, and J B Maunick. Nitrosylation of cytochrome c during apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **278** :18265, (2003).
- [74] P Nioche, V Berka, J Vipon, N Minton, A L Tsai, and C S Raman. Femtomolar sensitivity of a no sensor from clostridium botulinum. *Science*, **306** :1550, (2004).
- [75] T Inzuka, BG Yun, H Ishikawa, S Takahashi, and H Hori. Identification of crucial histidines for heme binding in the n-terminal domain of the heme-regulated of eif2 α kinase. *J. Biol. Chem.*, **279** :6778, (2004).
- [76] P A Thompson, V Munoz, G S Jas, E R Henry, W A Eaton, and J Hofrichter. The helix-coil kinetics of a heteropeptide. *J. Phys. Chem.*, **104** :378, (2000).
- [77] J D Hirst, S Bhattacharjee, and A V Onufriev. Theoretical studies of time-resolved spectroscopy of protein folding. *Faraday Discuss.*, **122** :253–267, (2002).
- [78] J Bredenbeck, J Helbing, A Sieg, T Schrader, W Zinth, C Renner, R Behrendt, L Moroder, J Wachtveitl, and P Hamm. Picosecond conformational transition and equilibration of a cyclic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**(11) :6452–6457, (2003).
- [79] J Bredenbeck, J Helbing, R Behrendt, C Renner, L Moroder, J Wachtveitl, and P Hamm. Transient 2d-ir spectroscopy : Snapshots of the nonequilibrium ensemble during the picosecond conformational transition of a small peptide. *J. Phys. Chem. B*, **107**(33) :8654–8660, (2003).
- [80] C Renner, J Cramer, R Behrendt, and L Moroder. Photomodulation of conformational states. i -ii. *Biopolymers*, **54** :489–500,501–514, (2000).
- [81] C Y Huang, S He, W F DeGrado, D G Mc Cafferty, and F Gai. Light-induced helix formation. *J. Am. Chem. Soc.*, **124** :12674–12675, (2002).
- [82] G H Wagnière. Linear and nonlinear optical properties of molecules. *Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel*, (1993).