



**TECHNIQUES**  
**DE L'INGÉNIEUR**

Réf. : **R6470 V2**

Date de publication :  
**10 décembre 2009**

# Activité optique : dichroïsme circulaire

Cet article est issu de : **Électronique - Photonique | Optique Photonique**

par **Jean-Claude MAURIZOT**

**Résumé** L'utilisation de l'activité optique, en particulier à travers le dichroïsme circulaire, fait aujourd'hui partie des approches physico-chimiques classiquement utilisées dans les laboratoires de chimie et surtout des sciences de la vie. La connaissance de ce paramètre permet une meilleure compréhension des phénomènes fondamentaux du vivant. Après avoir introduit les différentes formes de polarisation de la lumière, cet article présente les principales caractéristiques de l'activité optique. Sont décrits ensuite les deux phénomènes essentiels et intimement liés, qui sont la rotation optique et surtout le dichroïsme circulaire. Différentes applications du dichroïsme circulaire pour l'étude des petites molécules et des biomolécules sont présentées.

**Abstract** The use of optical activity, and in particular via circular dichroism, belongs to the most widely used physico-chemical approaches in chemistry and above all life science laboratories, to date. The knowledge of this parameter allows for a better understanding of the fundamental phenomena of living organisms. After introducing the various forms of light polarization, this article presents the main characteristics of optical activity. It then proceeds to describing two essential and strongly linked phenomena, namely the optical rotation and especially the circular dichroism. Various applications of the circular dichroism are presented for the study of small molecules and biomolecules.

**Pour toute question :**  
Service Relation clientèle  
Techniques de l'Ingénieur  
Immeuble Pleyad 1  
39, boulevard Ornano  
93288 Saint-Denis Cedex

**Par mail :**  
infos.clients@teching.com  
**Par téléphone :**  
00 33 (0)1 53 35 20 20

Document téléchargé le : **11/05/2020**

Pour le compte : **7200048087 - ecole normale superieure de lyon // 140.77.168.36**

© Techniques de l'Ingénieur | tous droits réservés

# Activité optique : dichroïsme circulaire

par **Jean-Claude MAURIZOT**

Ingénieur ENSCS

Directeur de recherche au CNRS

Centre de biophysique moléculaire (Orléans)

<b>1. Lumière</b> .....	R 6 470v2 – 2
1.1 Approche ondulatoire.....	— 2
1.2 Approche quantique.....	— 3
1.2.1 Photon.....	— 3
1.2.2 Relation de Planck.....	— 3
1.2.3 Indice de réfraction.....	— 3
<b>2. Lumière polarisée</b> .....	— 3
2.1 Lumière polarisée dans un plan .....	— 3
2.2 Lumière polarisée circulairement .....	— 3
2.3 Construction de Fresnel .....	— 4
<b>3. Rotation. Dichroïsme circulaire</b> .....	— 4
3.1 Rotation optique.....	— 4
3.2 Dichroïsme circulaire.....	— 5
3.3 Relation entre dichroïsme circulaire, dispersion optique rotatoire et absorption .....	— 5
<b>4. Molécules optiquement actives</b> .....	— 6
4.1 Chiralité.....	— 6
4.2 Force rotationnelle .....	— 6
4.3 Classification des chromophores.....	— 7
<b>5. Méthodes de mesure</b> .....	— 7
5.1 Mesure par modulation de polarisation .....	— 7
5.2 Méthode utilisant directement la différence d'absorption.....	— 8
5.3 Méthode utilisant l'ellipticité .....	— 8
5.4 Conclusion .....	— 8
<b>6. Applications</b> .....	— 9
6.1 Petites molécules.....	— 9
6.1.1 Règle de l'octant et son utilisation pour l'étude des cétones insaturées.....	— 9
6.1.2 Activité optique des diènes conjugués .....	— 9
6.1.3 Chiralité liée à un couplage excitonique.....	— 10
6.2 Applications aux systèmes biologiques .....	— 10
6.2.1 Acides nucléiques .....	— 10
6.2.2 Protéines .....	— 12
<b>7. Conclusion-perspective</b> .....	— 13
<b>Pour en savoir plus</b> .....	Doc. R 6 470v2

**P**ratiquement tous les produits naturels, protéines, acides nucléiques, sucres, hormones, lipides, vitamines, antibiotiques, etc., manifestent le phénomène d'activité optique. Compte tenu du rôle important joué par les interactions entre ces différents types de molécules dans les processus biologiques, la connaissance de leur activité optique est cruciale pour la compréhension des phénomènes fondamentaux du vivant. De même la détermination de la chiralité ou de la pureté optique de certains composés est un élément extrêmement important dans l'industrie pharmaceutique ou alimentaire en raison des différences d'effets que peuvent présenter des isomères optiques.

La découverte de l'activité optique naturelle remonte au début du XIX<sup>e</sup> siècle avec Biot et Fresnel, et la première explication de l'origine de ce phénomène est due à Pasteur, en 1848. Ces avancées ont permis aux données de l'activité optique d'être parmi les premières utilisées, en particulier pour la caractérisation des molécules. La rotation molaire à la longueur d'onde de la raie D du sodium a longtemps été l'un des paramètres fournis dans la description d'un nouveau produit. Cependant, il a fallu attendre le milieu du XX<sup>e</sup> siècle pour que les mesures spectrales, en particulier la dispersion optique rotatoire, deviennent un outil utilisé en routine dans les laboratoires de chimie. Petit à petit, cette spectroscopie a laissé la place au dichroïsme circulaire qui est capable de fournir une information équivalente mais plus facile à mesurer et à interpréter que les spectres de dispersion optique rotatoire.

Dans un premier temps, nous décrivons la lumière (§ 1.) et ses différentes formes de polarisation (§ 2.) en nous basant principalement sur la théorie ondulatoire.

Après avoir décrit les principales caractéristiques de l'activité optique, nous présenterons les deux méthodes essentielles qui permettent de la mettre en évidence, la rotation optique et surtout le dichroïsme circulaire (§ 3.). Après avoir abordé les bases moléculaires de l'activité optique (§ 4.), nous donnerons des indications sur la manière de mesurer le dichroïsme circulaire (§ 5.). Enfin nous présenterons différentes applications du dichroïsme circulaire pour l'étude des petites molécules et des biomolécules (§ 6.).

## 1. Lumière

Il existe deux approches, ondulatoire et quantique, pour caractériser la lumière.

### 1.1 Approche ondulatoire

Dans l'approche ondulatoire, on considère la lumière comme composée d'un champ électrique  $\vec{E}$  et d'un champ magnétique  $\vec{H}$ , perpendiculaires l'un à l'autre et tous deux perpendiculaires à la direction de propagation de la lumière, d'où le terme de « rayonnement électromagnétique » (figure 1). Chacun de ces champs se comporte comme une onde se déplaçant à une vitesse qui, dans le vide, est appelée « vitesse de la lumière », notée  $c$ . Pour la suite de cet exposé, nous n'utiliserons que le champ électrique  $\vec{E}$ .

L'amplitude du champ électrique  $\vec{E}$  associé à l'onde lumineuse est une fonction du temps et de l'espace : si l'onde lumineuse se propage selon l'axe  $z$  dans le vide, cette amplitude est décrite par la relation :

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \sin \frac{2\pi}{\lambda} (z - ct)$$

Plusieurs paramètres permettent de caractériser l'onde : la longueur d'onde,  $\lambda$ , qui représente la distance séparant deux points en phase sur l'onde (figure 2). Dans la spectroscopie UV visible, qui est la principale concernée par cet article, on a l'habitude de l'exprimer en nanomètres ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ).

On peut également caractériser la lumière en employant la fréquence,  $\nu$ , qui correspond au nombre d'oscillations du champ par unité de temps en un point donné sur l'axe du faisceau. L'unité de fréquence utilisée est le hertz ( $\text{s}^{-1}$ ).

La fréquence et la longueur d'onde sont liées par :

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

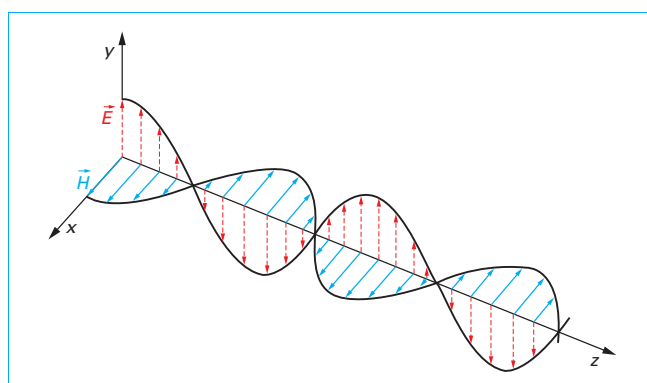


Figure 1 – Onde électromagnétique avec le champ électrique  $\vec{E}$  (en rouge) et le champ magnétique  $\vec{H}$  (en bleu) perpendiculaires à la direction de propagation de la lumière

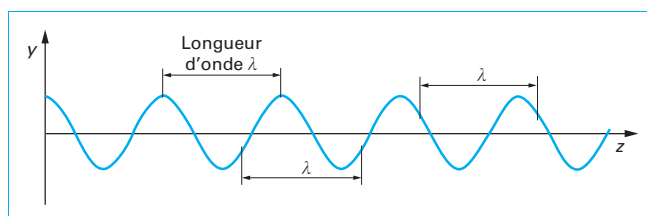


Figure 2 – Définition de la longueur d'onde

## 1.2 Approche quantique

### 1.2.1 Photon

Dans cette approche, un rayon lumineux est constitué d'un faisceau de particules d'énergie élémentaire, avec une masse et une charge nulles, se déplaçant selon l'axe du rayonnement à la vitesse de la lumière.

### 1.2.2 Relation de Planck

La physique quantique – et notamment **Louis De Broglie** avec sa loi sur la dualité onde-particule, généralisation des travaux de Planck et d'Einstein, en 1926 – réconcilie l'aspect corpusculaire de la lumière qu'incarnent le photon et son aspect ondulatoire.

L'énergie d'un photon est reliée à la fréquence de l'onde associée par la relation :

$$E = h\nu$$

$h$  étant la constante de Planck.

### 1.2.3 Indice de réfraction

La propagation de la lumière dans un milieu matériel est moins rapide que dans le vide. L'indice de réfraction  $n$ , rapport entre la vitesse de propagation de la lumière dans le vide et la vitesse de la lumière dans le milieu, caractérise ce milieu :

$$n = \frac{c}{v}$$

La valeur de  $n$  varie avec la longueur d'onde. Pour l'air, à 587,6 nm (raie D du sodium) dans des conditions de pression et de température ordinaires, la valeur de  $n$  est de 1,00029, ce qui correspond à une vitesse de la lumière très proche de celle dans le vide. Pour de l'eau, également à température ordinaire, cette valeur est de 1,333 pour la même longueur d'onde. Pour un verre ordinaire, l'indice de réfraction a une valeur voisine de 1,52 dans les mêmes conditions.

## 2. Lumière polarisée

### 2.1 Lumière polarisée dans un plan

Une lumière est dite « **polarisée dans un plan** » (figure 3) lorsque le champ électrique qui lui est associé se déplace en restant dans un même plan. Bien évidemment le champ magnétique reste dans un plan perpendiculaire au précédent. On emploie parfois le terme de « polarisation rectiligne ».

La **lumière non polarisée**, telle que la lumière dite « naturelle », est composée de lumières polarisées dans toutes les directions de façon aléatoire (figure 4) ; chaque onde successive se déplace dans un plan différent.

Quelques rares sources peuvent produire de la lumière polarisée. C'est le cas par exemple du rayonnement émis par les lasers ou par les synchrotrons. Mais la façon la plus classique de produire ce type de lumière est d'utiliser un polariseur.

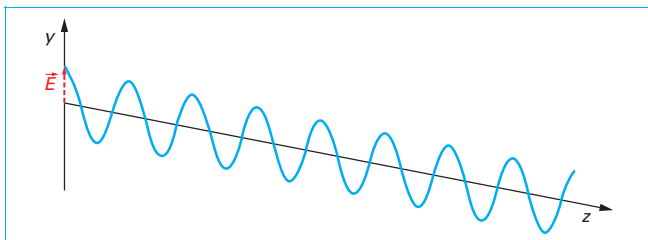


Figure 3 – Lumière polarisée dans un plan

Plusieurs phénomènes physiques peuvent être mis à profit pour polariser la lumière : pour une certaine incidence appelée « incidence de Brewster », un verre ne réfléchit que la lumière pour laquelle  $\vec{E}$  possède une direction particulière ; cependant, cette méthode est peu efficace, car l'intensité de la lumière réfléchie est faible.

Certains cristaux donnent, pour un même rayon incident, deux rayons réfractés polarisés à angle droit. Le prisme de Nicol, obtenu en découpant un même monocristal perpendiculairement à son axe principal puis recollant les deux morceaux avec du baume du Canada, est conçu de façon à éliminer l'un des rayons. La lumière transmise est alors polarisée.

Les feuilles Polaroids, mises au point par l'inventeur américain E. Land en 1932, sont constituées de fibres de polymères étirées. Celles-ci laissent passer la lumière polarisée perpendiculairement à la direction des fibres, tandis que la polarisation parallèle aux fibres est absorbée.

### 2.2 Lumière polarisée circulairement

Une lumière est dite « polarisée circulairement » lorsque la projection de l'extrémité du vecteur  $\vec{E}$  sur un plan perpendiculaire à la direction de propagation de la lumière décrit un cercle.

Si le cercle est décrit dans le sens des aiguilles d'une montre, la lumière est dite « **polarisée circulairement droite** ». S'il est décrit dans le sens inverse des aiguilles d'une montre, la lumière est dite « **polarisée circulairement gauche** ».

Dans les deux cas, l'extrémité du vecteur champ électrique décrit une hélice : droite dans le cas d'une lumière polarisée circulairement droite, et gauche dans le cas d'une lumière polarisée circulairement gauche (figure 5).

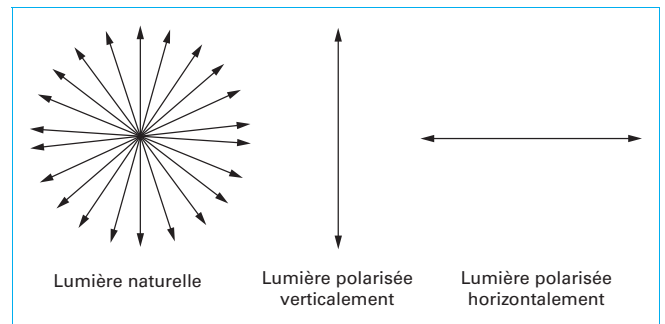


Figure 4 – Lumière naturelle et lumières polarisées dans un plan

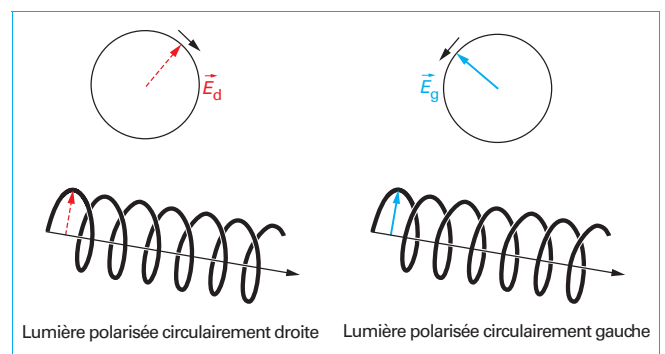


Figure 5 – Lumière polarisée circulairement droite et gauche. En haut, le cercle décrit par la projection de l'extrémité du champ électrique  $\vec{E}$ . En bas, la trajectoire décrite par son extrémité

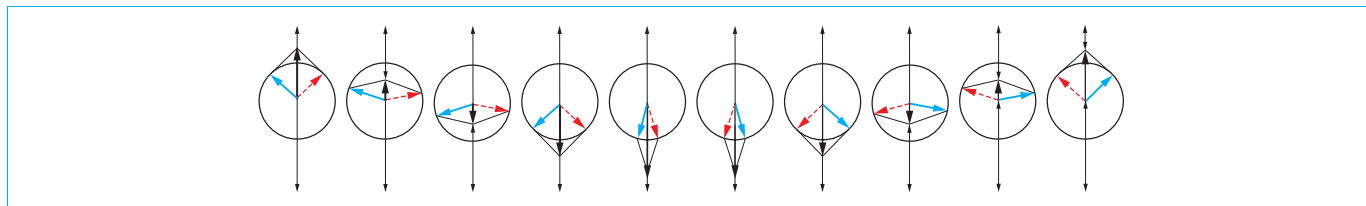


Figure 6 – La construction de Fresnel montre comment la superposition de lumières polarisées circulairement droite et gauche donne de la lumière polarisée dans un plan

## 2.3 Construction de Fresnel

Si l'on combine une lumière polarisée circulairement gauche avec une lumière polarisée circulairement droite de même fréquence et de même intensité, la construction de Fresnel montre que l'on obtient une lumière polarisée dans un plan (figure 6). On peut donc, réciproquement, considérer qu'une lumière polarisée dans un plan est la superposition de deux lumières polarisées circulairement droite et gauche, de même fréquence et même intensité.

# 3. Rotation. Dichroïsme circulaire

Certains milieux sont dits « **optiquement actifs** » ; on dit également qu'ils possèdent de l'**activité optique** ou encore qu'ils sont doués de **pouvoir rotatoire**. Cela va se traduire par deux phénomènes intimement liés : la **rotation optique** et le **dichroïsme circulaire**.

## 3.1 Rotation optique

Les milieux optiquement actifs possèdent la propriété de faire tourner le plan de polarisation de la lumière qui les traverse.

Considérons, selon la construction de Fresnel, qu'une onde plane est la superposition de deux ondes polarisées circulairement, droite et gauche, d'égales amplitudes. Si dans le milieu l'une des ondes se déplace à une vitesse supérieure à l'autre, à la sortie du milieu l'un des deux vecteurs,  $\vec{E}_d$  ou  $\vec{E}_g$  va se trouver déphasé par rapport à l'autre, et la construction de Fresnel donnera une lumière polarisée dans un plan, mais ce plan sera différent du plan de polarisation à l'entrée du milieu (figure 7).

Le milieu possède donc deux indices de réfraction, l'un pour la lumière polarisée circulairement gauche,  $n_g$ , et l'autre pour la lumière polarisée circulairement droite,  $n_d$ . Cette différence d'indice de réfraction est appelée **biréfringence circulaire**.

Si le trajet optique dans le milieu est  $l$ , on peut montrer que l'angle  $\alpha$  dont a tourné le plan de polarisation de la lumière est relié à la biréfringence par la relation :

$$\alpha = \frac{\pi}{\lambda} (n_g - n_d) \times l$$

où  $\lambda$  est la longueur d'onde de la lumière traversant le milieu.

On définit la **rotation spécifique d'une solution** à la longueur d'onde  $\lambda$  par la relation :

$$[\alpha]_{\lambda} = \frac{\alpha}{c \cdot l}$$

où  $\alpha$  est l'angle effectif, exprimé en degré, dont a tourné le plan de polarisation de la lumière,  $c$  la concentration (exprimée traditionnellement en  $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) et  $l$  le trajet optique traditionnellement (exprimé en dm).

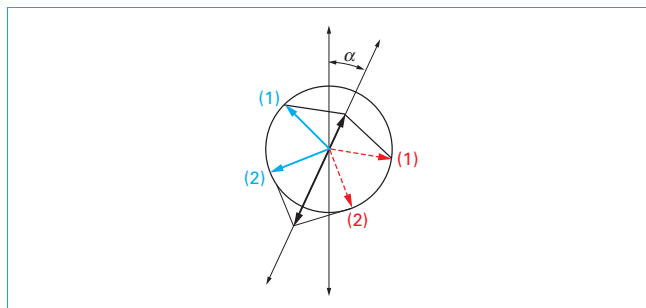


Figure 7 – Le phénomène de rotation optique est dû à un déphasage entre la lumière polarisée circulairement droite et celle polarisée circulairement gauche

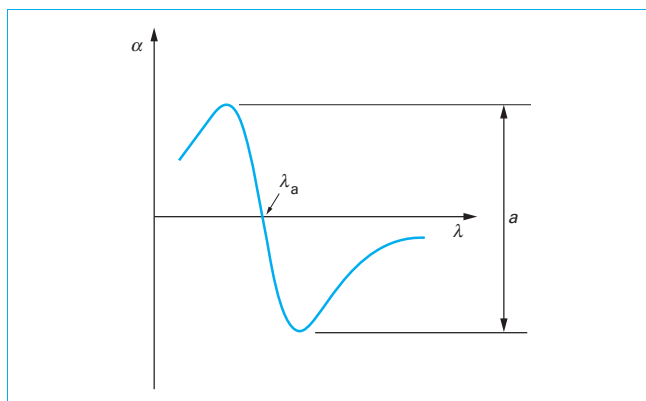


Figure 8 – Courbe de dispersion optique rotatoire ( $a$  caractérise l'intensité de l'effet Cotton)

On peut également employer la **rotation molaire** :

$$[m]_{\lambda} = [\alpha]_{\lambda} \times \frac{M}{100}$$

où  $M$  est la masse molaire du produit en solution.

À noter que, pour un polymère,  $M$  représente la masse d'un motif du polymère. Par exemple pour une protéine,  $M$  est la masse molaire moyenne d'un résidu de la protéine.

L'angle  $\alpha$  varie avec la longueur d'onde : la courbe représentant cette variation est appelée **spectre de dispersion optique rotatoire** (DOR).

Lorsque l'on trace le spectre de dispersion optique rotatoire dans une région où il n'y a pas d'absorption (c'est-à-dire loin d'une transition électronique), on observe une décroissance régulière en valeur absolue de la rotation, celle-ci tendant vers zéro sans toutefois atteindre cette valeur. Par contre, si la molécule possède une bande d'absorption à une longueur d'onde  $\lambda_a$ , la courbe prend une forme particulière, représentée sur la figure 8, la rotation changeant de signe et s'annulant pour la longueur d'onde  $\lambda_a$ .

Ce type de courbe est appelé « effet Cotton ». Cet effet, ou effet Cotton, est qualifié de positif quand la rotation est positive pour les longueurs d'onde supérieures à  $\lambda_a$ , et de négatif dans le cas contraire.

## 3.2 Dichroïsme circulaire

Dans tout domaine spectral où la solution présente de l'absorption, lorsqu'il existe de l'activité optique, les deux radiations correspondant aux lumières polarisées circulairement droite et gauche ne sont pas absorbées avec la même intensité. Les cercles décrits par les projections des vecteurs  $\vec{E}_d$  et  $\vec{E}_g$  n'ont plus le même rayon.

Dans ces conditions, la construction de Fresnel permet de voir que la projection de l'extrémité du vecteur résultant décrit une ellipse : la lumière est polarisée elliptiquement. Le grand axe de cette ellipse fait un angle  $\alpha$  par rapport à la direction de polarisation de la lumière incidente (figure 9).

Deux paramètres peuvent être utilisés pour caractériser ce phénomène :

– le **coefficient d'absorption molaire dichroïque** qui est la différence entre le coefficient d'absorption molaire pour la lumière polarisée circulairement gauche,  $\varepsilon_g$ , et celui pour la lumière polarisée circulairement droite,  $\varepsilon_d$  :

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_g - \varepsilon_d$$

L'unité employée est la même que pour les coefficients d'absorption molaire ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ;

– on peut également employer l'**ellipticité**  $\Psi$ , telle que :

$$\tan \Psi = \frac{B}{A}$$

où  $B$  et  $A$  sont le petit et le grand axe de l'ellipse.

Comme cette valeur est très petite, on peut considérer que  $\tan \Psi = \Psi$ . On utilise usuellement l'**ellipticité molaire**  $[\theta]_\lambda$  par analogie avec la rotation molaire, en employant les mêmes unités :

$$[\theta]_\lambda = \frac{\theta}{c \cdot l} \times \frac{M}{100}$$

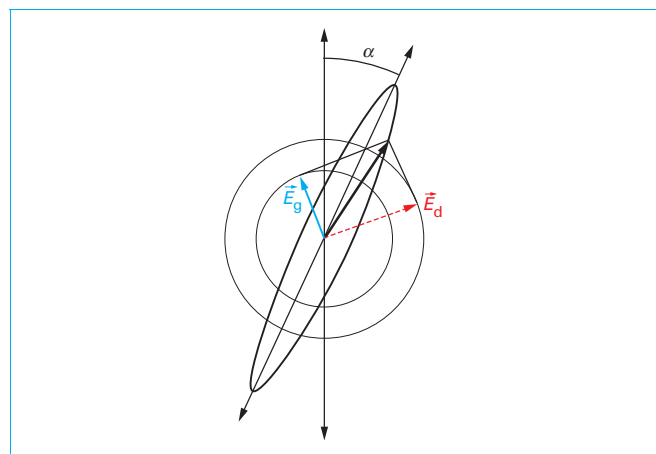


Figure 9 – Lorsque les lumières incidentes polarisées circulairement droite et gauche ne sont pas absorbées de la même manière, la lumière résultante est polarisée elliptiquement

Il existe une relation entre les valeurs du dichroïsme circulaire et de l'ellipticité puisque l'on peut démontrer que, pour des faibles valeurs de  $\theta$ , on a en première approximation la relation :

$$\Delta\varepsilon = 3300 \times [\theta]_\lambda$$

Les deux types de paramètres sont autant utilisés l'un que l'autre.

Bien entendu, l'ellipticité et le coefficient dichroïque varient avec la longueur d'onde, ce qui conduit au spectre de dichroïsme circulaire.

## 3.3 Relation entre dichroïsme circulaire, dispersion optique rotatoire et absorption

Le dichroïsme circulaire ne se manifeste que dans les régions de longueur d'onde où la solution présente de l'absorption. Lorsqu'un composé est optiquement actif et présente de l'absorption dans une bande centrée sur la longueur d'onde  $\lambda_a$ , dans cette même bande il présentera du dichroïsme circulaire positif ou négatif. À cette même longueur d'onde, la courbe de dispersion optique rotatoire présentera un effet Cotton, lui aussi positif ou négatif (figure 10). Il est important de noter que le dichroïsme circulaire, comme l'absorption, n'existe que dans certaines régions spectrales, alors que la rotation d'une substance optiquement active n'est jamais nulle, même si sa valeur est très faible à certaines longueurs d'onde.

Kronig et Kramers ont montré que, si l'on connaît la totalité du spectre de dispersion optique rotatoire (entre  $\lambda = 0$  et  $\lambda = \infty$ ), il est possible de calculer à chaque longueur d'onde la valeur du dichroïsme circulaire :

$$[\theta(\lambda)] = -\frac{2}{\pi\lambda} \int_0^\infty [m(\lambda')] \frac{\lambda'^2}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda'$$

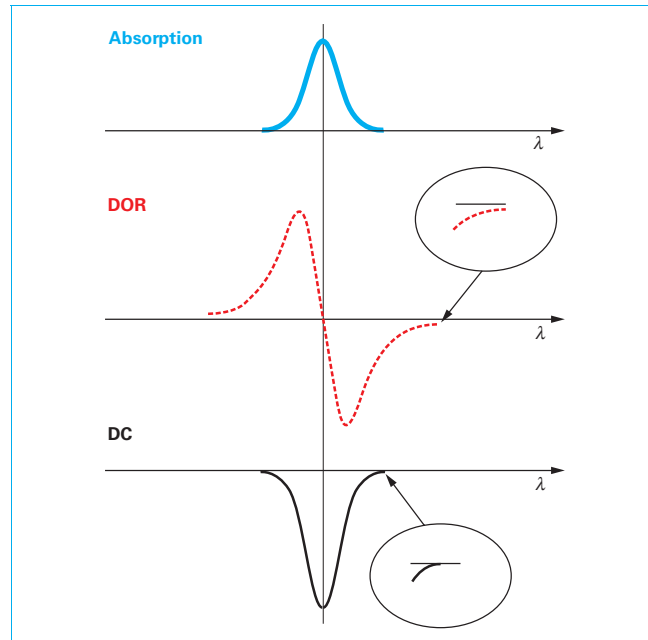


Figure 10 – Relation entre absorption, dispersion optique rotatoire (DOR) et dichroïsme circulaire (DC) représentée dans le cas d'un effet Cotton négatif



Réciproquement, la connaissance de la totalité du spectre de dichroïsme circulaire permet de calculer la rotation :

$$[m(\lambda)] = -\frac{2}{\pi} \int_0^\infty [\theta(\lambda')] \frac{\lambda'}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda'$$

Dans la pratique, on ne connaît jamais la totalité de l'un des deux spectres, néanmoins ces relations ont permis de développer des formules permettant de relier approximativement les intensités des bandes dichroïques aux amplitudes des effets Cotton correspondants. Dans tous les cas, puisqu'à partir d'un des spectres on peut calculer l'autre, il est clair que le contenu en information des deux types de spectre est le même. Dès lors, l'utilisation de l'une ou l'autre technique pour étudier des solutions n'est qu'une question d'opportunité.

Au cours des dernières décennies, le dichroïsme circulaire a progressivement remplacé la dispersion optique rotatoire, essentiellement parce que la forme des spectres est plus facile à interpréter et que l'instrumentation a considérablement progressé. Néanmoins, lorsque les composés que l'on étudie présentent de l'absorption dans une région de longueur d'onde où il est difficile de faire des mesures, la rotation, qui se manifeste à toute longueur d'onde, permet d'obtenir des informations, même si celles-ci sont limitées.

**Exemple :** c'est le cas de nombreux dérivés des sucres qui absorbent vers 160 nm, et pour lesquels des mesures de dispersion optique rotatoire dans l'UV, ou même le visible, peuvent apporter certaines informations.

## 4. Molécules optiquement actives

### 4.1 Chiralité

Il y a plus d'un siècle et demi, Louis Pasteur avait eu l'intuition qu'un composé optiquement actif, dans son cas un tartrate, pouvait exister sous deux formes isomères, non superposables, images l'une de l'autre dans un miroir. Cette propriété, pour une molécule, ou plus généralement pour un objet, de ne pouvoir se superposer à son image dans un miroir plan, s'appelle la **chiralité**. Ce terme provient du grec « keir », la main : la main droite et la main gauche ne sont pas équivalentes et sont l'image l'une de l'autre dans un miroir. Bien d'autres objets sont chiraux, par exemple des coquilles d'escargot, des ressorts, des oreilles.

Pour les édifices moléculaires, il est possible d'énoncer des conditions géométriques pour qu'ils soient **chiraux**, et donc possèdent de l'**activité optique** :

- la molécule ne doit pas présenter de plan de symétrie ;
- elle ne doit pas présenter de centre de symétrie ;
- elle ne doit pas présenter d'axe impropre de symétrie (combinaison d'une rotation autour d'un axe et d'une symétrie par rapport à un plan perpendiculaire à cet axe).

La figure 11 présente quelques objets ou molécules chirales. Le groupement chimique asymétrique le plus souvent évoqué est le carbone tétraédrique possédant quatre substituants différents, par exemple dans l'alanine sur la figure 11. Beaucoup de molécules présentent cette propriété, sans nécessairement posséder de carbone asymétrique.

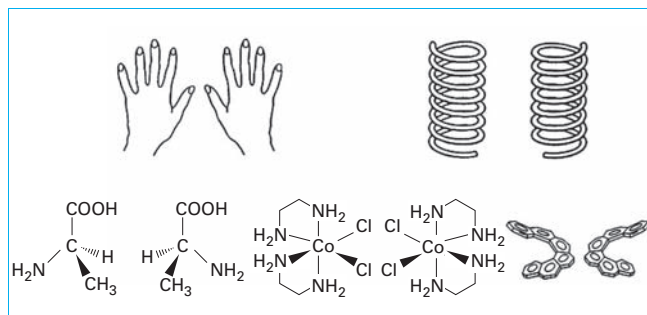


Figure 11 – Objets chiraux : mains, ressorts, molécules d'alanine, dérivées du cobalt, molécules d'hexahélicène

### 4.2 Force rotationnelle

Le paramètre qui caractérise l'intensité de l'activité optique est la force rotationnelle  $R$ . D'un point de vue expérimental, la force rotationnelle est liée à la surface de la courbe de dichroïsme circulaire par la relation :

$$R = 2,297 \times 10^{-39} \int \frac{\Delta \epsilon}{\lambda} d\lambda$$

La valeur de  $R$  peut être calculée à partir des propriétés électroniques de la molécule.

Lorsque la molécule absorbe un photon, un électron change d'orbitale. Ce changement d'orbitale est accompagné d'un moment de transition électrique dépendant de la distribution spatiale des électrons dans les orbitales initiale et finale :  $\vec{\mu}$ . Il est également

accompagné d'un moment de transition magnétique  $\vec{m}$ . On peut démontrer que la force rotationnelle est égale au produit scalaire de ces deux vecteurs :

$$R = \vec{\mu} \cdot \vec{m}$$

Il y a une analogie importante entre la force rotationnelle et la force dipolaire  $D$  qui caractérise l'intensité d'une bande d'absorption, et qui peut également être reliée à la surface de la bande :

$$D = 9,184 \times 10^{-39} \int \frac{\epsilon}{\lambda} d\lambda$$

La force dipolaire est aussi égale au carré scalaire du moment de transition électrique  $\vec{\mu}$  :

$$D = \vec{\mu} \cdot \vec{\mu}$$

Pour qu'une transition soit optiquement active, il faut donc que  $R$  soit différent de zéro, ce qui implique que le moment de transition électrique  $\vec{\mu}$  ne soit pas nul, que le moment de transition magnétique  $\vec{m}$  ne soit, lui aussi, pas nul, et que ces deux moments ne soient pas perpendiculaires l'un à l'autre. Ces trois conditions sont équivalentes aux conditions de symétrie que nous avons indiquées précédemment.

Un cas intéressant est celui des molécules aromatiques planes qui présentent des transitions électroniques de type  $\pi \rightarrow \pi^*$  avec un moment de transition électrique  $\vec{\mu}$  situé dans le plan de la molécule et un moment de transition magnétique  $\vec{m}$  perpendiculaire au plan de la molécule ; elles sont donc optiquement inactives.

L'intensité d'une bande de dichroïsme circulaire, ou d'un effet Cotton, n'est donc pas directement reliée à l'intensité de l'absorption, mais il est possible d'observer plusieurs cas de figure en fonction des valeurs respectives de  $\vec{\mu}$  et de  $\vec{m}$  : par exemple, une faible absorption et une forte activité optique sont souvent observées pour des transitions de type  $n \rightarrow \pi^*$  dans les cétones, alors que ces mêmes cétones ont souvent une forte absorption et une faible activité optique pour leur transitions de type  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

Bien que  $R$  soit le paramètre *ad hoc* pour caractériser l'intensité d'une transition, de manière opérationnelle on utilise habituellement soit l'intensité du dichroïsme circulaire au maximum  $\Delta\epsilon_{\max}$ , ou la valeur  $a$  représentant la différence de rotation entre le maximum et le minimum de l'effet Cotton du spectre de dispersion optique rotatoire (cf. figure 8).

### 4.3 Classification des chromophores

On considère généralement qu'il existe deux types de chromophores présentant de l'activité optique :

- des chromophores intrinsèquement dissymétriques ;
- des chromophores intrinsèquement symétriques perturbés de façon dissymétrique.

Dans le premier cas, c'est le chromophore lui-même qui ne présente pas de symétrie, et les deux moments de transition sont, par nature, différents de zéro et non perpendiculaires l'un à l'autre. Il en résulte des activités optiques importantes. L'archétype de ces composés est l'hexahélicène, molécule composée de six cycles benzéniques qui, pour des raisons d'encombrement stérique, n'est pas plane et peut adopter une conformation en début d'hélice droite ou en début d'hélice gauche (figure 11). Cette molécule présente de nombreuses transitions électroniques entre 220 et 380 nm, avec des valeurs de  $\Delta\epsilon_{\max}$  de l'ordre de + 200 ou - 200 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> selon l'isomère que l'on observe.

Dans le deuxième cas, la symétrie du chromophore isolé est telle qu'il ne possède pas d'activité optique propre ; cependant, ce chromophore est perturbé par une interaction dissymétrique due à un groupement voisin. La figure 12 illustre le cas d'un phényl-3,3-diméthylbutane dans lequel le chromophore benzénique isolé ne présente aucune activité optique en raison de sa symétrie plane. Par contre, dans ce composé, le carbone asymétrique perturbe le cycle benzénique et induit un signal de dichroïsme. Le signe et l'intensité de ce signal dépendent de la nature et de la stéréochimie du groupe perturbateur. En général, ce type d'activité optique est moins intense que le précédent.

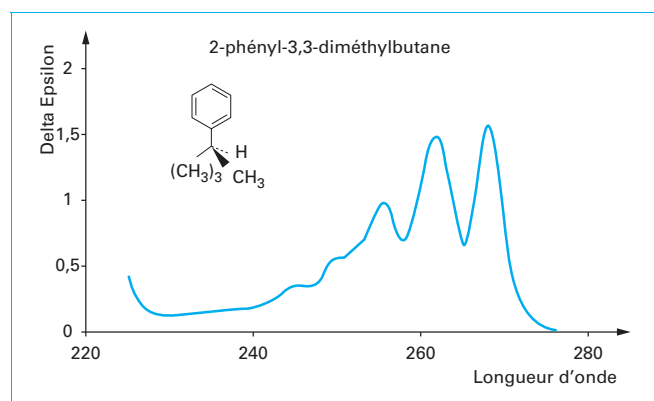


Figure 12 – Le spectre de dichroïsme circulaire du 2-phényl-3,3-diméthylbutane résulte de la perturbation du cycle benzénique par le groupement asymétrique qui lui est lié

## 5. Méthodes de mesure

Nous nous limiterons à la mesure du **dichroïsme circulaire** qui, comme nous l'avons dit précédemment, est l'approche essentiellement utilisée aujourd'hui, et qui peut s'effectuer de trois façons.

■ La méthode la plus évidente consiste à **mesurer l'absorbance** de la solution avec une lumière polarisée circulairement droite, puis avec une lumière polarisée en sens inverse et à faire la **différence**. Cependant, cela nécessite une très grande précision, car la différence entre les deux absorbances est en général très faible ( $\Delta A/A$  peut typiquement être de l'ordre de  $10^{-4}$ ).

■ Une autre possibilité consiste à **mesurer l'ellipticité** du faisceau lumineux en sortie de la solution lorsque celle-ci est éclairée en lumière polarisée plane. Le petit axe de l'ellipse étant très petit par rapport au grand axe, il faut disposer d'une lumière polarisée plane de très bonne qualité et d'une grande précision dans l'analyse de la lumière.

■ La troisième méthode consiste à **moduler la lumière incidente entre polarisation circulaire droite et gauche**, et à appliquer en sortie une détection synchrone pour mesurer à chaque longueur d'onde la différence d'absorption entre les deux types de polarisation. C'est cette dernière méthode qui est la plus employée, car la technique de détection synchrone est électroniquement bien maîtrisée [1].

### 5.1 Mesure par modulation de polarisation

La variation d'absorbance entre la lumière polarisée circulairement droite et la lumière polarisée circulairement gauche,  $\Delta A$ , est donnée par la relation :

$$\Delta A = \lg(I_0/I_g) - \lg(I_0/I_d) = \lg(I_d/I_g)$$

On définit :

$$S = I_d - I_g$$

$$\text{et } I = \frac{1}{2}(I_g + I_d).$$

La valeur de  $I_d/I_g$  étant très proche de 1 on peut faire un développement limité qui conduit à la relation :

$$\lg(I_d/I_g) \approx 2,303 S/I$$

Pour des valeurs de  $S/I$  inférieures à  $10^{-3}$ , ce qui est pratiquement toujours le cas, l'erreur commise par cette approximation est négligeable.

Le principe de ce type d'appareil consiste à transformer  $S$  en un signal alternatif et  $I$  en un signal continu.  $S$  est amplifié de façon indépendante de  $I$ .

La figure 13 illustre l'exemple de l'appareil J 810 commercialisé par la société JASCO. Le schéma montre les différentes parties de cet appareil.

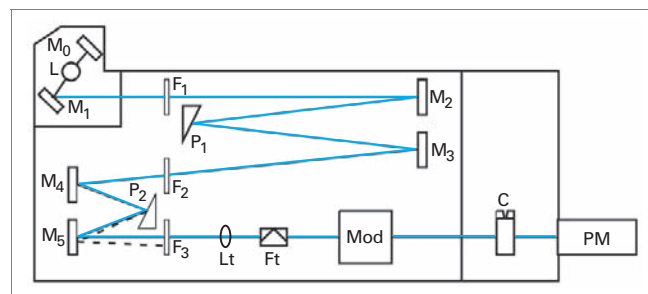
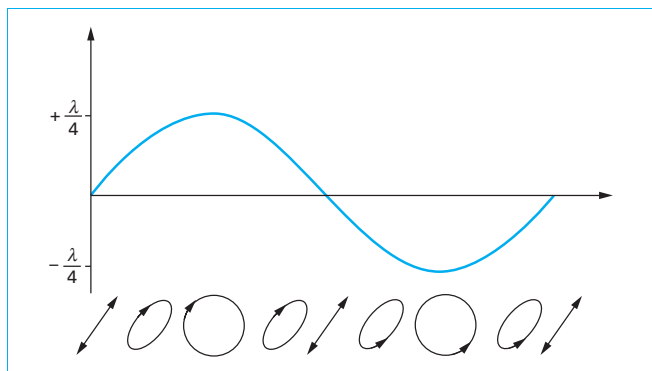


Figure 13 – Schéma de principe du dichrographe J 810 (JASCO)





**Figure 14 – Le modulateur permet d'obtenir alternativement de la lumière polarisée circulairement droite et circulairement gauche**

La source de lumière est une lampe au xénon haute pression fournissant un rayonnement continu entre 175 et 800 nm.

La lumière émise par l'arc au xénon est dirigée par un système de miroirs (M) sur la fente d'entrée  $F_1$  d'un double monochromateur à prismes,  $P_1$ ,  $P_2$ , présentant la particularité d'avoir ses deux prismes taillés dans un même cristal avec axes optiques perpendiculaires l'un à l'autre. Outre son rôle de monochromateur, celui-ci joue donc le rôle de polariseur. En sortie, la fente  $F_3$  élimine l'un des deux rayons (---) pour ne conserver que le rayonnement ordinaire polarisé verticalement. Ce rayonnement est focalisé par une lentille (Lt) puis filtré pour éliminer toute composante horizontale de la lumière (Ft).

Le rayonnement lumineux, parfaitement polarisé verticalement, traverse ensuite le modulateur. C'est là le dispositif essentiel de l'appareil de mesure. Ce modulateur va transformer la lumière polarisée verticalement en lumière alternativement polarisée circulairement droite et gauche (figure 14). Dans ce modulateur élasto-optique, un milieu transparent est comprimé puis décomprimé grâce à un transducteur piézoélectrique et devient ainsi biréfringent. Lorsque le taux de compression/décompression est correctement choisi, le milieu oscille entre une lame quart d'onde  $+\lambda/4$  et  $-\lambda/4$ , transformant la lumière incidente polarisée plane en lumière polarisée circulairement.

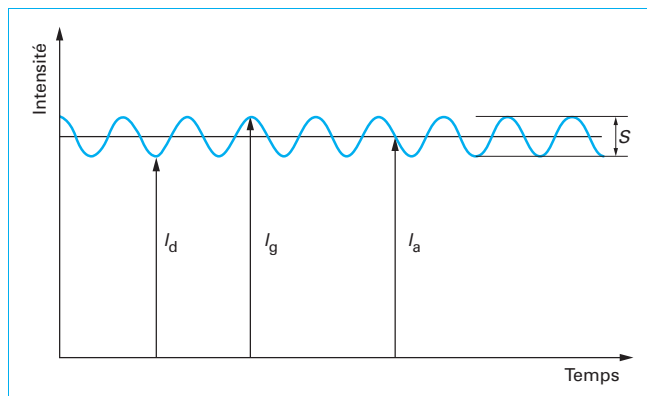
La fréquence de modulation est de 50 kHz. La tension appliquée au transducteur est programmée pour que l'oscillation se produise entre les deux valeurs de la polarisation quelle que soit la longueur d'onde. Le rayonnement ainsi modulé pénètre dans le compartiment de mesure pour traverser la cuve (C) et atteindre le photomultiplicateur (PM) où le flux lumineux est transformé en intensité électrique.

Quand une substance présentant du dichroïsme circulaire se trouve dans la cuve, l'intensité lumineuse au niveau du photomultiplicateur a la forme présentée sur la figure 15.

Le signal électrique présente une composante continue proportionnelle à  $I$  et une composante alternative proportionnelle à  $S$ . Cette dernière peut être amplifiée à l'aide d'un amplificateur synchrone et, comme nous l'avons vu plus haut, le signal de dichroïsme circulaire est proportionnel au rapport  $S/I$ . Dans la pratique, la composante continue du signal est maintenue constante grâce à un asservissement qui augmente ou diminue la tension de dynode du photomultiplicateur lorsque l'intensité lumineuse varie.

## 5.2 Méthode utilisant directement la différence d'absorption

Il existe au moins un appareil commercial (OLIS) utilisant cette approche. Dans cet appareil, la lumière monochromatique provenant du monochromateur passe dans un polariseur classique qui



**Figure 15 – Variation de l'intensité lumineuse après traversée de la cuve lorsque celle-ci contient une substance dichroïque. Cette intensité lumineuse est transformée en intensité électrique par le photomultiplicateur**

produit deux faisceaux polarisés perpendiculairement l'un à l'autre. Ces deux faisceaux passent ensuite à travers un même modulateur dont l'axe neutre est orienté à  $45^\circ$  des deux polarisations produisant alternativement de la lumière polarisée circulairement droite et gauche. Lorsqu'un des faisceaux est polarisé circulairement droit, l'autre l'est circulairement gauche, et inversement. Ils traversent la même cuve, avant d'être détectés par deux photomultiplicateurs différents. C'est alors la différence entre les signaux des deux faisceaux qui est analysée.

## 5.3 Méthode utilisant l'ellipticité

C'est une méthode qui a surtout été employée pour des études cinétiques [2] et à notre connaissance, il n'existe pas d'appareil commercial.

Le principe est de mesurer successivement l'intensité du petit et du grand axe de l'ellipse pour en déduire l'angle  $\Psi$ . En fait, l'échantillon reçoit une lumière alternativement polarisée elliptiquement droite et elliptiquement gauche. Le dispositif est choisi de façon à ce que l'ellipse soit extrêmement allongée. À la sortie de l'échantillon, un analyseur dont la polarisation est perpendiculaire au grand axe de l'ellipse mesure l'intensité du petit axe pour les deux sens de rotation de la lumière. On peut en déduire l'ellipticité. La méthode produit un meilleur rapport signal sur bruit que les méthodes précédentes, mais elle est extrêmement sensible à la présence de biréfringence linéaire.

## 5.4 Conclusion

Quelle que soit la méthode de mesure utilisée, il est important de prendre un certain nombre de précautions pour garantir la qualité de la mesure.

En premier lieu, le solvant ou le tampon dans lequel se trouve le produit que l'on souhaite étudier doit être le plus transparent possible. Pour pouvoir analyser la lumière, il est indispensable que le nombre de photons atteignant le photomultiplicateur soit suffisant, aussi est-il très difficile de travailler avec une absorbance de solvant supérieure à 1. La limite vers les courtes longueurs d'onde sera en général imposée par le solvant, mais dépendra également du trajet optique.

**Exemple :** dans du dioxanne, il sera possible de mesurer un spectre de bonne qualité jusqu'à 230 nm si on utilise une cuve de 1 cm, alors qu'avec une cuve de 1 mm on pourra atteindre 205 nm. Bien entendu la solution devra être 10 fois plus concentrée dans une cuve de 1 mm si l'on souhaite avoir la même intensité de signal.

## 6. Applications

### 6.1 Petites molécules

De très nombreuses petites molécules peuvent être étudiées par dichroïsme circulaire. Nous avons choisi d'illustrer ce type d'applications avec quelques exemples.

#### 6.1.1 Règle de l'octant et son utilisation pour l'étude des cétones insaturées

Le groupement carbonyle des cétones possède deux plans de symétrie, il est donc dénué d'activité optique. Néanmoins, lorsque le groupement carbonyle appartient à une molécule présentant un ou plusieurs carbones asymétriques, une activité optique est induite, qui s'observe en particulier dans la région de longueur d'onde correspondant à la transition  $n \rightarrow \pi^*$  (en général vers 280-300 nm). La règle de l'octant permet de prévoir le signe du dichroïsme circulaire en fonction de la position des atomes dans l'espace [3]. Selon cette règle, l'espace autour du groupement carbonyle est divisé en huit régions (octants) par deux plans perpendiculaires (figure 16). Chaque atome de la molécule contribue de façon positive ou négative au signal de dichroïsme en fonction de l'octant dans lequel il se situe. La figure 16 montre le signe des contributions des atomes C, H, Cl, Br et I. Les atomes se situant sur les plans de symétrie ne contribuent pas au signal. L'intensité de la contribution diminue rapidement lorsque les atomes s'éloignent du carbonyle ; elle diminue également lorsqu'il se rapproche d'un plan nodal.

La règle de l'octant a été utilisée pour prévoir la configuration absolue de très nombreux composés. La figure 17 illustre l'exemple de la 2(S)-méthylcyclohexanone. L'application de la règle permet de prévoir que, dans la conformation chaise, le groupement méthyle qui se trouve dans l'octant arrière gauche donnera une contribution positive s'il est en configuration équatoriale, alors que la contribution sera très positive s'il est en configuration axiale. Expérimentalement, le signal de dichroïsme est légèrement positif, ce qui indique que, dans l'équilibre entre les deux formes, c'est la configuration équatoriale qui prédomine. De plus, des expériences en fonction de la température montrent que la population du conformère axial est très faible.

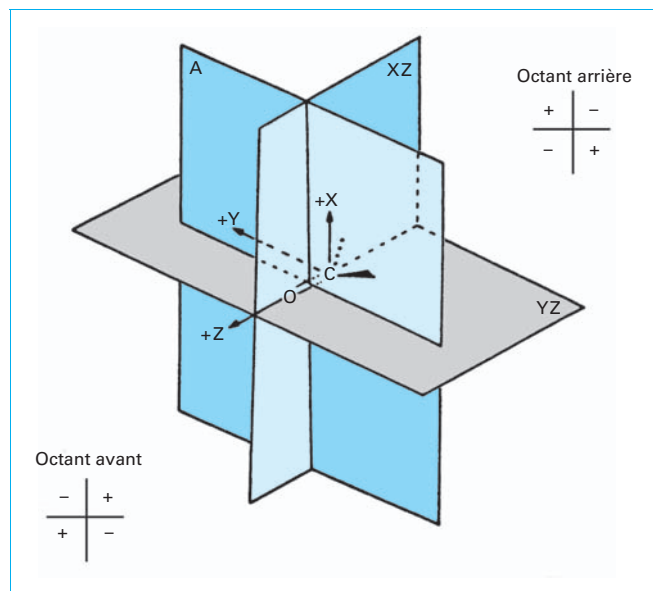


Figure 16 – Position des huit octants d'un groupe carbonyle

L'équilibre entre plusieurs formes peut être suivi comme dans le cas de la trans-2-chloro-5-méthylcyclohexanone. Un équilibre existe entre la forme diéquatoriale et la forme diaxiale. Dans un solvant polaire, on observe un signal dichroïque positif, que la règle de l'octant permet d'attribuer à la forme diéquatoriale, alors que le signal négatif observé dans l'iso-octane correspond à la forme diaxiale (figure 18).

En changeant la température, on modifie également l'équilibre entre les deux formes. Dans ce cas, les mesures de dichroïsme circulaire ont été utilisées avec succès pour déterminer les paramètres thermodynamiques relatifs à l'équilibre entre les deux formes [4].

#### 6.1.2 Activité optique des diènes conjugués

Les diènes conjugués, dans lesquels deux liaisons éthyléniques sont séparées par une liaison simple, sont intrinsèquement optiquement actifs. Le chromophore correspondant possède une

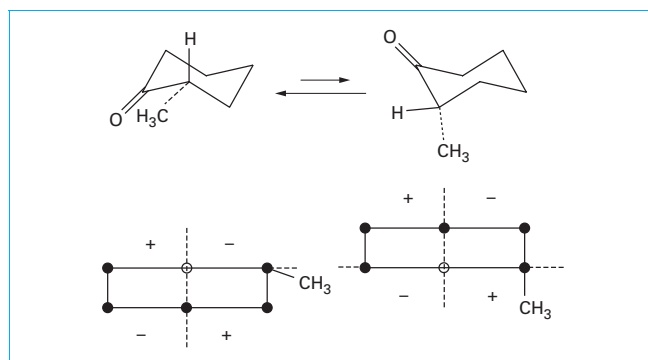


Figure 17 – Règle de l'octant appliquée à la 2(S)-méthylcyclohexanone. Seuls les quatre octants arrière sont représentés

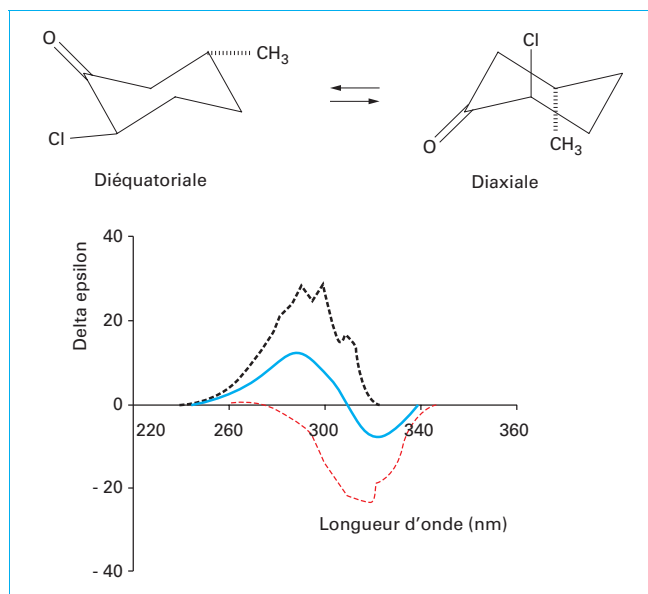
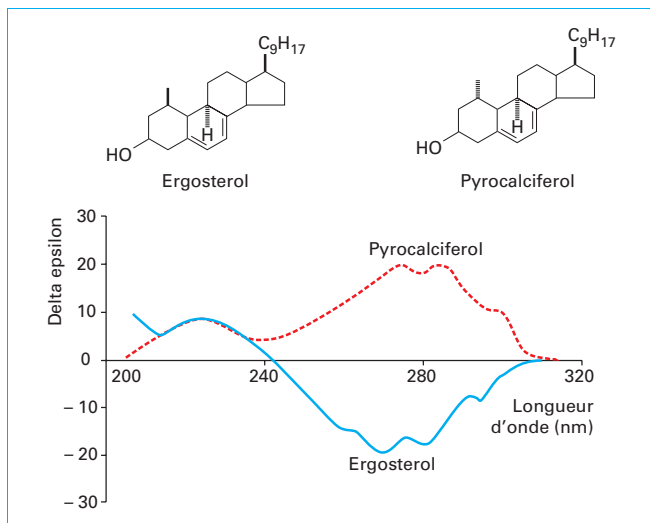


Figure 18 – Équilibre entre la forme diaxiale de la trans-2-chloro-5-méthylcyclohexanone et sa forme diéquatoriale. En noir (pointillés) le spectre obtenu à basse température ( $-192^{\circ}\text{C}$ ) dans un solvant EPA (éther-isopentane-éthanol 5:5:2) ; en bleu, dans le même solvant à  $25^{\circ}\text{C}$  et en rouge dans l'iso-octane. L'équilibre entre les deux formes dépend de la température et de la polarité du solvant



**Figure 19 – Le signe du signal de dichroïsme circulaire est lié à l'angle dièdre des diènes conjugués :  $-11^\circ$  pour l'ergosterol,  $+9,5^\circ$  pour le pyrocalciférol**

transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  intense qui donne lieu à un signal de dichroïsme qui a été très utilisé pour étudier les molécules présentant ce type de groupement. La figure 19 illustre un exemple où le groupement diène conjugué fait partie d'un même cycle dans deux composés reliés à la vitamine D2, l'ergosterol et le pyrocalciférol [5]. Dans le premier composé, l'angle dièdre du diène est négatif ( $-11^\circ$ ), alors que pour le deuxième il est positif ( $+9,5^\circ$ ).

### 6.1.3 Chiralité liée à un couplage excitonique

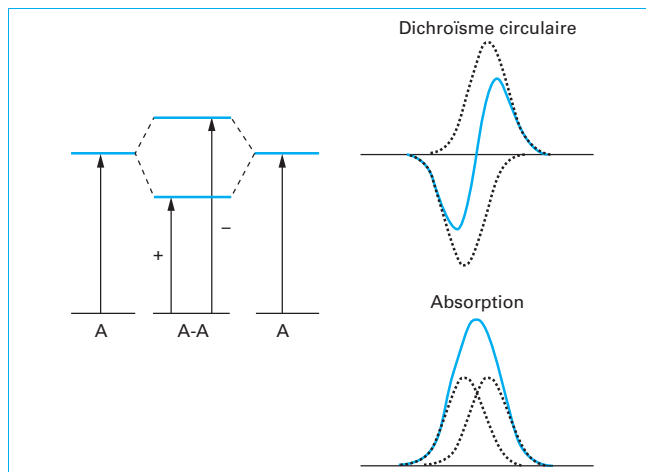
Lorsque deux chromophores identiques sont proches dans l'espace, leurs moments de transition électrique peuvent interagir et conduire à un dédoublement de l'état excité à la suite d'une délocalisation de l'excitation. Dans le spectre d'absorption, cela conduit à l'apparition de deux bandes, l'une située à plus courte longueur d'onde que celle du chromophore isolé et l'autre située à plus grande longueur d'onde. En général, l'écart entre la position des bandes est faible, quelques nanomètres, et compte tenu de la largeur des bandes, le spectre d'absorption du composé comportant les deux chromophores est identique à celui du chromophore isolé.

Dans le cas où les deux chromophores adoptent une structure chirale, les deux bandes présentent des signaux de dichroïsme circulaire de signe opposé, ce qui donne au spectre de dichroïsme circulaire une forme très particulière. Celui-ci comporte deux bandes d'égales intensités, l'une positive, l'autre négative, l'intersection avec la ligne de base se situant à la longueur d'onde du maximum d'absorption du monomère (figure 20). Le signe de la bande située à plus grande longueur d'onde permet de déterminer le signe de l'angle dièdre que font les moments de transitions électriques des deux chromophores [6] [7].

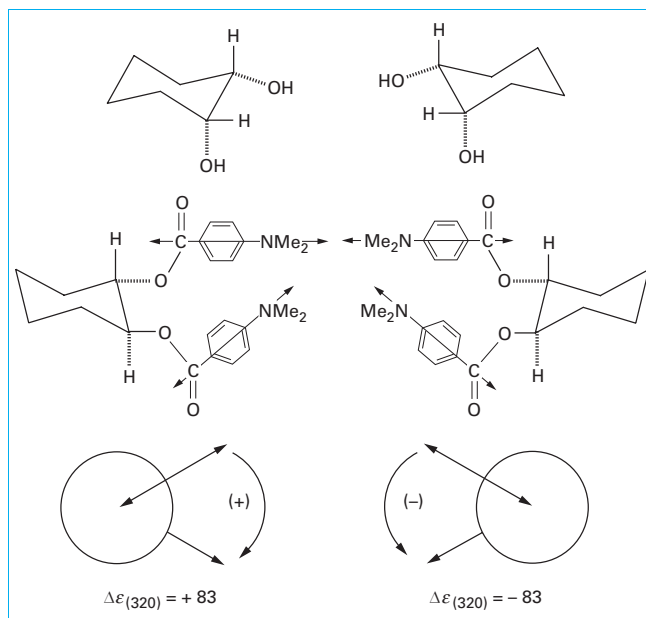
Cette approche a été utilisée pour déterminer la configuration absolue de très nombreux composés. La figure 21 montre l'exemple du 1(S),2(S) et 1(R),2(R)-cyclohexanediol et de leurs dérivés avec le bis-p-diméthylbenzoate, qui donnent des dédoublements excitoniques avec une bande positive à la plus grande longueur d'onde pour le composé 1(S),2(S) correspondant à une chiralité avec un angle dièdre positif, et une bande négative pour le composé 1(R),2(R) correspondant à une chiralité de signe opposé [8].

## 6.2 Applications aux systèmes biologiques

C'est dans l'étude des molécules biologiques que le dichroïsme circulaire a connu ses plus forts développements au cours des



**Figure 20 – Effet du dédoublement excitonique sur les niveaux d'énergie (gauche) et sur la forme des spectres (droite)**



**Figure 21 – Exemple d'utilisation du couplage excitonique. Le 1(S),2(S) et le 1(R),2(R)-cyclohexanediol bisubstitués par le para-diméthylaminobenzoate présentent un dédoublement excitonique avec des bandes à plus grande longueur d'onde de signes opposés, car les angles de torsion O-C-C-O du diol sont de signes opposés**

dernières années. Bien que plusieurs domaines soient concernés, nous avons choisi d'illustrer le cas des acides nucléiques et surtout celui des protéines.

### 6.2.1 Acides nucléiques

Les chromophores responsables de l'activité optique des acides nucléiques sont les bases puriques et pyrimidiques qui absorbent dans l'ultraviolet, avec une première transition au voisinage de 260 nm et plusieurs autres transitions à plus courtes longueurs d'onde. Les sucres, riboses ou désoxyriboses, ainsi que les groupements phosphates, présentent des transitions électroniques en dessous de 180 nm et, pour l'instant, ne sont pratiquement pas utilisés dans les études de dichroïsme circulaire.

Les bases nucléiques sont planes et ne présentent donc aucune activité optique lorsqu'elles sont isolées. Lorsqu'elles sont liées à un sucre – ribose ou désoxyribose –, comme c'est le cas dans les nucléosides ou les nucléotides, un signal de dichroïsme circulaire apparaît dans la région spectrale où elles absorbent. Ce signal résulte de la perturbation asymétrique de la base par le sucre qui lui est attaché. Le groupement phosphate intervient très peu dans la perturbation, ce qui fait que le signal des nucléosides et nucléotides correspondant est pratiquement identique. La figure 22 illustre le cas de l'adénosine monophosphate qui présente un signal de faible intensité dû à la perturbation de l'adénine par le désoxyribose.

Pour les édifices moléculaires comportant plusieurs nucléotides – oligonucléotides, polynucléotides, acides nucléiques naturels ou de synthèse –, la situation est radicalement différente dès qu'une structure ordonnée existe. Le signal de dichroïsme circulaire a toujours pour origine les bases puriques et/ou pyrimidiques du composé mais, à la perturbation de ces bases par le sucre, s'ajoute une perturbation de chaque base par les bases voisines. Cette deuxième perturbation est souvent la plus importante et conduit à des spectres qui diffèrent fortement de celui des nucléotides constituant l'édifice moléculaire étudié.

Lorsque la structure du composé est désordonnée, le signal de dichroïsme circulaire est identique à celui d'un mélange de nucléotides de même composition que celui du produit étudié. La forme du spectre dépend donc directement de la perturbation de chaque base par ses voisines, et donc de la géométrie des bases les unes par rapport aux autres. Si cette géométrie change, le spectre change. **Le dichroïsme circulaire est donc un outil très puissant pour analyser la conformation et les changements de conformation des acides nucléiques** [9] [13].

La figure 23 illustre ce point. Le spectre d'un ADN (acide désoxyribonucléique) en double hélice est comparé au spectre d'un ARN (acide ribonucléique) provenant d'un virus végétal, lui aussi en double hélice. Les deux acides nucléiques présentent la même composition en bases (environ 50 % de paires de bases AT et donc 50 % de paires GC) ; la seule différence étant que dans l'ARN l'uracile a remplacé la thymine, ce qui est spectroscopiquement neutre. À haute température, lorsque les composés adoptent une structure désorganisée, leur spectre est identique et équivalent à celui d'un mélange de nucléotides A,C,G,T équimolaire. Seule subsiste dans ces conditions l'interaction base-sucre. Ce qui explique la différence de spectre entre la double hélice d'ADN et la double hélice d'ARN, c'est la différence entre les paramètres géométriques des deux hélices. Dans le cas de l'ADN, on a une hélice de type A et

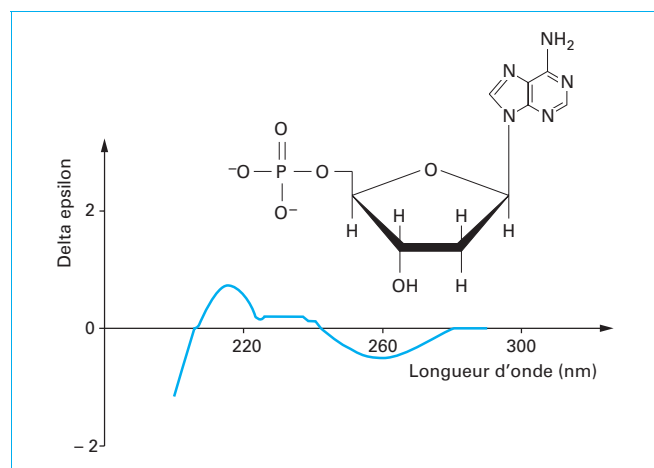


Figure 22 – Le spectre de dichroïsme circulaire de l'adénosine monophosphate est dû à la perturbation de la base par le désoxyribose

dans l'ARN une hélice de type B. Les principaux paramètres qui les distinguent sont :

- le nombre de paires de bases par tour, 10 pour la forme A et 11 pour la forme B ;
- la distance entre les paires de bases successives, 3,4 Å (0,34 nm) pour le A et 2,8 Å (0,28 nm) pour le B ;
- l'inclinaison des plateaux de bases par rapport à l'axe de l'hélice, beaucoup plus importante dans le cas de la forme A que dans celui de la forme B.

Cette extrême sensibilité du dichroïsme circulaire à la structure est illustrée sur un autre exemple sur la figure 24 où est représenté le spectre d'un petit oligonucléotide capable, selon les conditions,

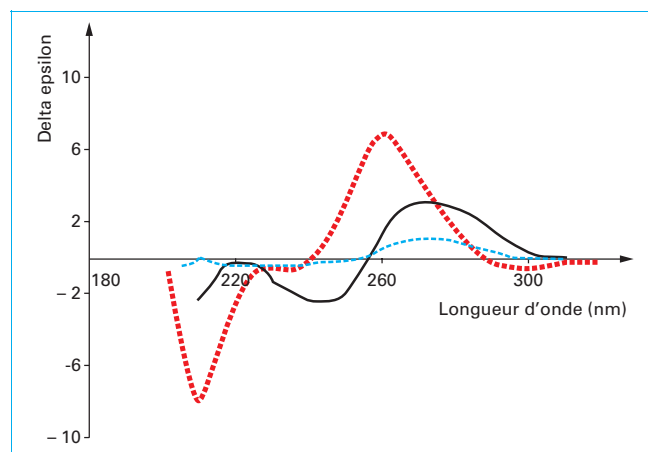


Figure 23 – Spectres de dichroïsme circulaire de double hélice d'ADN (noir) et d'ARN (rouge). Les différences traduisent des géométries d'hélice différentes alors que la composition en bases reste la même. Le spectre du mélange de nucléotides correspondant est présenté en pointillés bleus

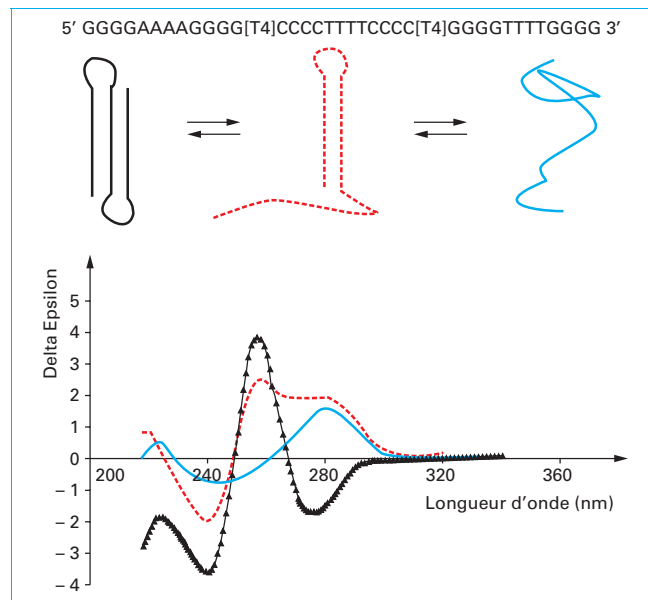


Figure 24 – Spectres de dichroïsme circulaire d'un oligonucléotide pouvant adopter plusieurs conformations par repliement sur lui-même : une conformation en triple hélice (noir) ; une conformation en double hélice avec un brin pendante (rouge) ; une conformation désordonnée (bleu)

d'adopter plusieurs conformations : triple hélice, double hélice avec un brin pendant, et forme désordonnée. Chacune de ces formes présente un spectre caractéristique, ce qui confère une très grande utilité au dichroïsme circulaire dans l'étude du polymorphisme des oligonucléotides [14] [15] [16]. Compte tenu du potentiel thérapeutique de ces oligonucléotides, de nombreuses études basées sur le dichroïsme circulaire ont été publiées au cours des dernières années.

## 6.2.2 Protéines

C'est incontestablement dans le domaine des protéines que le dichroïsme circulaire a été le plus appliqué ces dernières années. Si l'on sait depuis longtemps que cette technique peut donner rapidement des informations structurales sur ces molécules sans nécessiter de grandes quantités de matériel, le développement de différents programmes liés à la génomique, avec la possibilité de produire de plus en plus vite des nouvelles protéines de plus en plus nombreuses a conduit à une augmentation considérable du nombre d'études basées sur cette approche.

Pour les protéines, deux types de **chromophores** contribuent à l'activité optique :

- les chromophores aromatiques, tryptophane, tyrosine et phénylalanine, contribuent aux signaux des protéines aux longueurs d'onde supérieures à 250 nm. Les acides aminés soufrés, cystéines et cystines, présentent également une absorption dans cette région spectrale, mais leur faible coefficient d'absorption et leur abondance réduite dans les protéines font que, sauf pour de très rares cas particuliers, leur contribution au spectre de dichroïsme circulaire peut être négligée. L'information obtenue concerne l'environnement des groupements aromatiques ;

- le chromophore peptidique absorbe pour les longueurs d'onde inférieures à 250 nm. Même s'il n'est pas le seul absorbeur dans cette région spectrale, le très grand nombre de liaisons peptidiques ( $N-1$  pour une protéine de  $N$  acides aminés) fait que c'est lui qui apporte la contribution prépondérante au spectre en dessous de 250 nm. L'information que l'on obtient dans ce cas concerne la structure globale de la molécule.

### 6.2.2.1 Région aromatique

Les groupements aromatiques du tryptophane, de la tyrosine et de la phénylalanine, c'est-à-dire l'indole, le phénol et le benzène présentent entre 250 et 300 nm des transitions de type  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

Ces chromophores sont plans et ne devraient pas présenter d'activité optique. Mais, dans les protéines, ils sont perturbés de façon asymétrique par les divers groupements chimiques de la protéine se situant dans leur voisinage. On considère en général que tout groupement localisé à moins de 5 Å du cycle aromatique est susceptible de participer à cette perturbation. Lorsque plusieurs acides aminés aromatiques sont présents dans une protéine, le spectre de dichroïsme circulaire sera la somme des contributions dues à chacun d'entre eux [17].

Une des conséquences est que, dans cette région spectrale, chaque protéine va posséder un spectre de dichroïsme circulaire qui lui sera propre. Toute modification du spectre traduira un changement de conformation de la protéine ou la présence d'une impureté. Mais, à l'inverse, l'absence de modification du spectre ne traduira pas l'absence de changement conformationnel, car celui-ci peut être intervenu dans une partie de la protéine loin de tout acide aminé aromatique.

La figure 25 illustre l'exemple d'une protéine, le répresseur de l'opéron lactose possédant 2 tryptophanes, 8 tyrosines et 7 phénylalanines. Le spectre de dichroïsme circulaire de la protéine « sauvage » est comparé à ceux de deux répresseurs « mutants ». Lorsque la mutation affecte un acide aminé aromatique (tryptophane 220  $\rightarrow$  phénylalanine), le changement spectral résulte du changement dans la composition de la protéine, la phénylalanine ayant une autre contribution au spectre que le tryptophane. On ne peut cependant pas exclure un changement de conformation. Par contre, pour l'autre mutant (glycine 58  $\rightarrow$  serine), le contenu en

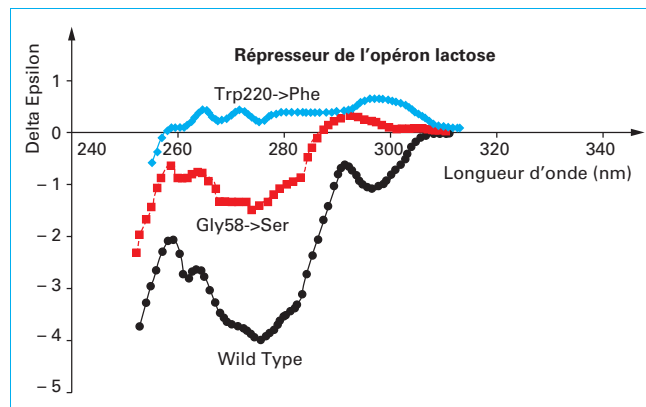


Figure 25 – Spectres de dichroïsme circulaire dans la région aromatique du répresseur de l'opéron lactose souche sauvage (●) et de deux de ses mutants

acide aminé aromatique n'a pas changé et la seule explication du très grand changement expérimental observé est que cette mutation a induit un bouleversement conformationnel de la protéine très important.

### 6.2.2.2 Région peptidique

Le chromophore peptidique isolé présente une transition  $n \rightarrow \pi^*$  vers 230 nm et une transition de type  $\pi \rightarrow \pi^*$  vers 200 nm. Le groupement peptidique étant plan, il ne possède pas d'activité optique intrinsèque. Cependant, dans les protéines, ce groupement subit deux perturbations :

- une perturbation par la chaîne latérale commençant au carbone  $\alpha$  qui est un carbone asymétrique, sauf pour la glycine ;
- et une deuxième perturbation qui est celle produite par les groupements peptidiques voisins du groupement considéré.

La première perturbation est faible et a peu d'influence sur le spectre, alors que la deuxième est prépondérante et contribue pour l'essentiel à la forme du spectre que l'on observe.

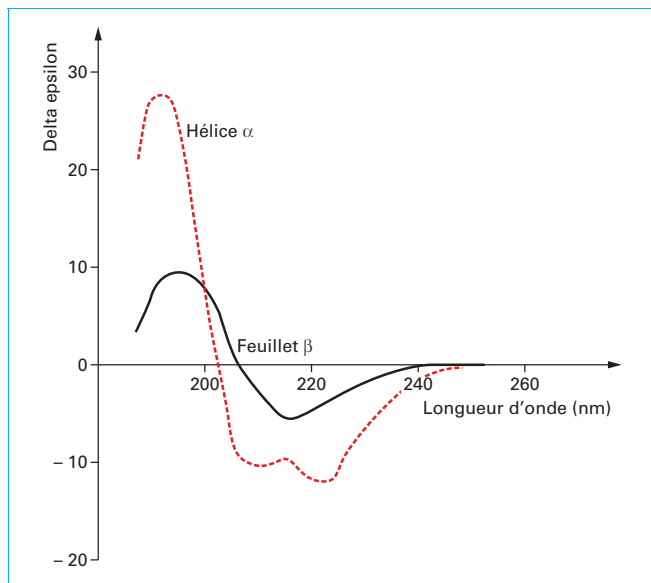
Comme dans le cas des bases des acides nucléiques, c'est donc la **géométrie** des liaisons peptidiques les unes par rapport aux autres qui détermine la forme du signal. Cette géométrie est caractéristique de la structure secondaire de la chaîne polypeptidique et, en conséquence, chaque élément de structure secondaire possèdera un spectre de dichroïsme circulaire qui lui est propre [18] [19].

Par exemple une hélice  $\alpha$ , hélice droite avec 3,6 résidus par tour, présentera un spectre avec un maximum négatif à 222 nm, un autre maximum négatif à 208 nm et un maximum positif vers 192 nm. La bande à 222 nm est due à la transition  $n \rightarrow \pi^*$ , tandis que les bandes localisées à 208 et 192 nm résultent du dédoublement excitonique de la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  du groupement peptidique (figure 26).

Comme c'est la perturbation peptide-peptide qui constitue la contribution majeure à l'activité optique, le signal dichroïque observé dépend essentiellement de la structure secondaire et seulement de façon marginale de la nature des acides aminés, c'est-à-dire de la séquence. La figure 26 présente également le spectre d'une séquence peptidique en feuillet  $\beta$  illustrant bien la sensibilité du spectre à la structure secondaire.

Dans une protéine, plusieurs types de **structures secondaires** cohabitent en général. Il en résulte des spectres dichroïques extrêmement variés comme l'illustre la figure 27. La myoglobine, qui est riche en hélices  $\alpha$ , présente un spectre totalement différent de celui de la concanavaline A qui est composée d'un grand nombre de feuillets  $\beta$ . Ces deux spectres diffèrent également du spectre du collagène dans lequel un autre type de structure secondaire est présent.





**Figure 26 – Spectres de dichroïsme circulaire caractéristique d'une hélice  $\alpha$  (rouge) et d'un feuillet  $\beta$  (noir)**

On peut donc utiliser le spectre de dichroïsme circulaire pour **analyser le contenu en structure secondaire** [20] à [24]. Si l'on considère que les contributions des différents types de structure sont additives, on peut écrire la relation suivante :

$$\Delta\epsilon^\lambda = \sum_i f_i \cdot \Delta\epsilon_i^\lambda$$

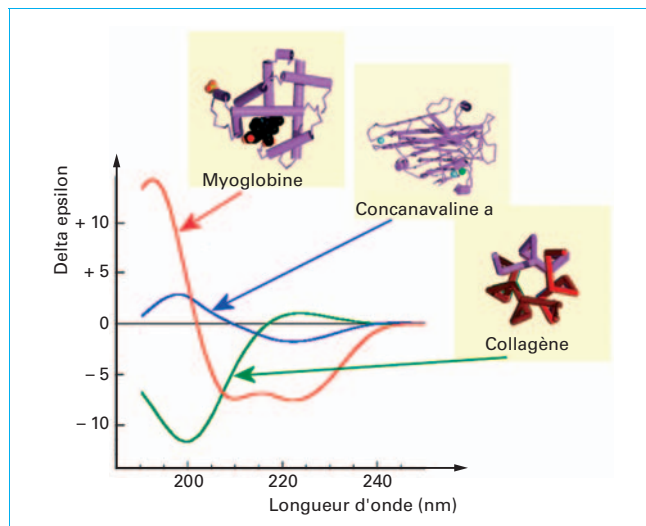
avec  $\Delta\epsilon^\lambda$  signal de la protéine que l'on souhaite analyser à la longueur d'onde  $\lambda$ ,  
 $f_i$  fraction de résidu adoptant la structure secondaire  $i$ , par exemple en hélice  $\alpha$ ,  
 $\Delta\epsilon_i^\lambda$  valeur du signal de dichroïsme circulaire de la forme  $i$  à la longueur d'onde  $\lambda$ .

Dès lors que l'on connaît cette valeur à un nombre de longueurs d'onde égal ou supérieur au nombre de structures secondaires que l'on veut analyser, il est possible d'écrire un système d'équations permettant de déterminer chacune des valeurs de  $f_i$ . Les premières méthodes considéraient que seules trois structures étaient présentes dans les protéines : les hélices  $\alpha$ , les feuillets  $\beta$  et des structures différentes des précédentes appelées « reste » ( $p$ ). La formule devient :

$$\Delta\epsilon^\lambda = f_\alpha \cdot \Delta\epsilon_\alpha^\lambda + f_\beta \cdot \Delta\epsilon_\beta^\lambda + f_p \cdot \Delta\epsilon_p^\lambda$$

Si l'on connaît la valeur des signaux de référence à trois longueurs d'onde, la mesure du signal de la protéine à ces mêmes longueurs d'onde permet de faire une analyse structurale.

Avec la connaissance de la structure cristallographique d'un nombre croissant de protéines, ces méthodes d'analyse ont été perfectionnées en incluant un plus grand nombre de structures secondaires, par exemple en différenciant les feuillets  $\beta$  parallèles des feuillets  $\beta$  antiparallèles ou en introduisant des coudes  $\beta$ .



**Figure 27 – Spectres de dichroïsme circulaire de trois protéines présentant des contenus structuraux très différents**

Une autre amélioration de ces méthodes est venue de l'utilisation de protéines de structures connues pour extraire les spectres de référence. Enfin les algorithmes d'analyse ont également progressé, ce qui fait qu'on peut aujourd'hui facilement utiliser ce type de méthode.

## 7. Conclusion-perspective

L'utilisation de l'activité optique, en particulier à travers le dichroïsme circulaire, fait aujourd'hui partie des approches physico-chimiques classiquement utilisées dans les laboratoires de chimie et surtout des sciences de la vie. Le développement des différents programmes de génomique, avec la production de protéines de plus en plus nombreuses, a donné un nouvel élan à cette technique. Les développements futurs de cette méthode se situent certainement au niveau de l'utilisation du **rayonnement synchrotron** comme nouvelle source de lumière : dans ces conditions, la lumière est beaucoup plus intense que celle fournie par les sources conventionnelles et de plus, cette lumière est naturellement polarisée. Cela améliore fortement le rapport signal sur bruit, permettant des acquisitions plus rapides, avec des échantillons contenant moins de matériel. Un autre très grand avantage de l'utilisation du rayonnement synchrotron est la possibilité de travailler dans l'ultra-violet « à vide » (pour des longueurs d'onde inférieures à 180 nm). Dans ces régions, de nouvelles bandes sont observées, donnant des informations supplémentaires sur les molécules étudiées. C'est par exemple le cas pour les protéines, où au minimum deux nouvelles transitions électroniques sont présentes, ce qui permet de procéder à une analyse structurale à la fois plus stable et plus précise qu'avec des spectres conventionnels. Des montages utilisant ce rayonnement sont installés ou en cours d'installation sur de nombreux synchrotrons construits récemment à travers le monde [25] à [27].



# Activité optique : dichroïsme circulaire

par **Jean-Claude MAURIZOT**

Ingénieur ENSCS

Directeur de recherche au CNRS

Centre de biophysique moléculaire (Orléans)

## Sources bibliographiques

- [1] DRAKE (A.F.). – *Polarisation modulation-the measurement of linear and circular dichroism*. J. Phys. E : Sci. Instrum. **19** 170-181 (1986).
- [2] LEWIS (J.W.), TILTON (R.F.), EINTERZ (C.M.), MILDER (S.J.), KUNTZ (I.D.) et KLIGER (D.S.). – *New technique for measuring circular dichroism changes on a nanosecond time scale. Application to (carbonmonoxy)myoglobin and (carbonmonoxy)haemoglobin*. J. Phys. Chem. **89** (2), 289-294 (1985).
- [3] MOFFITT (W.), WOODWARD (R.B.), MOSCOWITZ (A.), KLYNE (W.) et DJERASSI (C.). – *Structure and the Optical Rotatory Dispersion of Saturated Ketones*. J. Am. Chem. Soc. **83** (19) 4013-4018 (1961).
- [4] WELLMAN (K.M.), BRIGGS (W.S.) et DJERASSI (C.). – *Optical Rotatory Dispersion Studies. C. Variable-Temperature Circular Dichroism Studies of Ring-Conformational and Rotational Equilibria in Cyclohexanones*. J. Am. Chem. Soc., **87** (1) 73-81 (1965).
- [5] GAWRONSKY (J.K.). – *Circular Dichroism and Chirality of Dienes*. In *Circular Dichroism : Principles and Applications*. Second Edition N Berova, K. Nakanishi, RW Woody Eds. Wiley-VCH publishers, New York, p 305-335 (2000).
- [6] HARADA (N.) et NAKANISHI (K.). – *Determining the chiralities of optically active glycols*. J. Am. Chem. Soc., **91** (14) 3989-3991 (1969).
- [7] HARADA (N.) et NAKANISHI (K.). – *Circular Dichroism Spectroscopy : Exciton coupling in Organic Stereochemistry*. University Science Books, Mill Valley, CA 460 pp (1984).
- [8] BYUN (Y.S.) et LIGHTNER (D.A.). – *Exciton coupling from dipyrnone chromophores*. J. Org. Chem., **56** (21) 6027-6033 (1991).
- [9] BAASE (W.A.) et JOHNSON (W.C.). – *Jr - Circular dichroism and DNA secondary structure*. Nucleic Acids Res. **6** (2) 797-814 (1979).
- [10] SPRECHER (C.A.), BAASE (W.A.) et JOHNSON (W.C.). – *Jr - Conformation and Circular dichroism of DNA*. Biopolymers. **18** (4) 1009-1019 (1979).
- [11] TINOCO (I.) Jr, BUSTAMANTE (C.) et MAESTRE (M.F.). – *The optical activity of nucleic acids and their aggregates*. Annu Rev Biophys Bioeng. **9** 107-141 (1980).
- [12] GRAY (D.M.), RATLIFF (R.L.) et VAUGHAN (M.R.). – *Circular dichroism spectroscopy of DNA*. Methods Enzymol **211** 389-406 (1992).
- [13] NORDEN (B.) et KURUCSEV (T.). – *Analysing DNA complexes by circular and linear dichroism*. J Mol Recognit. **7** (2) 141-155 (1994).
- [14] GONDEAU (C.), MAURIZOT (J.C.) et DURAND (M.). – *Circular dichroism and UV melting studies on formation of an intramolecular triplex containing parallel T\*A:T and G\*G:C triplets : netropsin complexation with the triplex*. Nucleic Acids Res. **26** (21) 4996-5003 (1998).
- [15] GONDEAU (C.), MAURIZOT (J.C.) et DURAND (M.). – *Spectroscopic investigation of an intramolecular DNA triplex containing both G.G:C and T.A:T triads and its complex with netropsin*. J Biomol Struct Dyn. **15** (6) 1133-1145 (1998).
- [16] MAURIZOT (J.C.). – *Circular dichroism of Nucleic acids : Nonclassical conformations and modified oligonucleotides in Circular Dichroism : Principles and Applications*. Second Edition N Berova, K. Nakanishi, RW Woody Eds. Wiley-VCH publishers, New York, p 719-739 (2000).
- [17] STRICKLAND (E.H.). – *Aromatic contributions to circular dichroism spectra of proteins*. CRC Crit Rev Biochem. **2** (1) 113-175 (1974).
- [18] WOODY (R.W.). – *Circular dichroism*. Methods Enzymol. **246** 34-71 (1995).
- [19] KELLY (S.M.) et PRICE (N.C.). – *The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function*. Curr Protein Pept Sci. **1** (4) 349-384 (2000).
- [20] PROVENCHER (S.W.) et GLOCKNER (J.). – *Estimation of globular protein secondary structure from Circular Dichroism*. Biochemistry **20** (1) 33-37 (1981).
- [21] JOHNSON (W.C.). – *Protein secondary structure and circular dichroism : a practical guide*. Proteins. **7** (3) 205-14 (1990).
- [22] GREENFIELD (N.J.). – *Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data*. Anal Biochem. **235** (1) 1-10 (1996).
- [23] SREERAMA (N.) et WOODY (R.W.). – *Computation and analysis of protein circular dichroism spectra*. Methods Enzymol **383** 318-351 (2004).
- [24] WHITMORE (L.) et WALLACE (B.A.). – *Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy : methods and reference databases*. Biopolymers. **89** (5) 392-400 (2008).
- [25] WALLACE (B.A.) et JANES (R.W.). – *Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins : secondary structure, fold recognition and structural genomics*. Curr Opin Chem Biol. **5** (5) 567-571 (2001).
- [26] MIRON (S.), REFREGIER (M.), GILLES (A.M.) et MAURIZOT (J.C.). – *New synchrotron radiation circular dichroism end-station on DISCO beamline at SOLEIL synchrotron for biomolecular analysis*. Biochim Biophys Acta. **1724** (3) 425-431 (2005).
- [27] MILES (A.J.) et WALLACE (B.A.). – *Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics*. Chem Soc Rev. **35** (1) 39-51 (2006).

## Ouvrages généraux

HARADA (N.) et NAKANASHI (K.). – *Circular Dichroism Spectroscopy : Exciton coupling in Organic Stereochemistry*. University Science Books, Mill Valley, CA 460 pp (1984).

UVESKY (V.N.) et PERMAKOV (E.A.). – *Methods in Protein Structure and Stability Analysis : Luinescence Spectroscopy and Circular Dichroism*. Nova Science publishers 372 pp (2007).

*Circular dichroism : Principles and applications*. Second edition : Edited by K. Nakanishi, N. Berova and R.W. Woody. Wiley-VCH publishers, New York, 878 pp (2000).

LIGHTGNER (D.A.) et GURST (J.E.). – *Organic Conformational Analysis and Stereochemistry from Circular Dichroism Spectroscopy*. Wiley-VCH publishers, 496 pp (2000).

*Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Edited by GD Fasman Kluwer Academic/Plenum Publishers 695 pp (1996).

RODGER (A.) et NORDEN (B.). – *Circular Dichroism and Linear Dichroism*. Oxford University Press 160 pp (1997).

## À lire également dans nos bases

RICHER (J.C.), PANICO (R.) et RIGAUDY (J.). – *Glossaire de stéréochimie*. [K 240]. Constantes physico-chimiques (1995).

## Sites Internet

Sites web permettant de télécharger des programmes d'analyse ou d'analyser en ligne les données de dichroïsme circulaire des protéines

<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/>

<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>

<http://www.chem.elte.hu/departments/protnmr/cca/>

<http://dicroprot-pbil.ibcp.fr/>

## Annuaire

### Constructeurs – Fournisseurs – Distributeurs

**Appareils de mesure du dichroïsme circulaire**

**Applied Photophysics**

<http://www.photophysics.com/>

**Aviv Biomedical, Inc**

<http://www.avivbiomedical.com/>

**JASCO**

<http://www.jascofrance.fr/spectroscopy.html>

**OLIS Inc.**

<http://www.olisweb.com/>

# GAGNEZ DU TEMPS ET SÉCURISEZ VOS PROJETS EN UTILISANT UNE SOURCE ACTUALISÉE ET FIABLE

Techniques de l'Ingénieur propose la plus importante collection documentaire technique et scientifique en français !

Grâce à vos droits d'accès, retrouvez l'ensemble des **articles et fiches pratiques de votre offre**, **leurs compléments et mises à jour**, et bénéficiez des **services inclus**.



RÉDIGÉE ET VALIDÉE  
PAR DES EXPERTS



MISE À JOUR  
PERMANENTE



100 % COMPATIBLE  
SUR TOUS SUPPORTS  
NUMÉRIQUES



SERVICES INCLUS  
DANS CHAQUE OFFRE

- + de 350 000 utilisateurs
- + de 10 000 articles de référence
- + de 80 offres
- 15 domaines d'expertise

- |   |   |
|---|---|
| <input type="radio"/> Automatique - Robotique         | <input type="radio"/> Innovation                    |
| <input type="radio"/> Biomédical - Pharma             | <input type="radio"/> Matériaux                     |
| <input type="radio"/> Construction et travaux publics | <input type="radio"/> Mécanique                     |
| <input type="radio"/> Électronique - Photonique       | <input type="radio"/> Mesures - Analyses            |
| <input type="radio"/> Énergies                        | <input type="radio"/> Procédés chimie - Bio - Agro  |
| <input type="radio"/> Environnement - Sécurité        | <input type="radio"/> Sciences fondamentales        |
| <input type="radio"/> Génie industriel                | <input type="radio"/> Technologies de l'information |
| <input type="radio"/> Ingénierie des transports       |   |

**Pour des offres toujours plus adaptées à votre métier,  
découvrez les offres dédiées à votre secteur d'activité**

Depuis plus de 70 ans, Techniques de l'Ingénieur est la source d'informations de référence des bureaux d'études, de la R&D et de l'innovation.

**[www.techniques-ingenieur.fr](http://www.techniques-ingenieur.fr)**

**CONTACT :** Tél. : + 33 (0)1 53 35 20 20 - Fax : +33 (0)1 53 26 79 18 - E-mail : [infos.clients@teching.com](mailto:infos.clients@teching.com)

# LES AVANTAGES ET SERVICES compris dans les offres Techniques de l'Ingénieur

## ACCÈS



### Accès illimité aux articles en HTML

Enrichis et mis à jour pendant toute la durée de la souscription



### Téléchargement des articles au format PDF

Pour un usage en toute liberté



### Consultation sur tous les supports numériques

Des contenus optimisés pour ordinateurs, tablettes et mobiles

## SERVICES ET OUTILS PRATIQUES



### Questions aux experts\*

Les meilleurs experts techniques et scientifiques vous répondent



### Articles Découverte

La possibilité de consulter des articles en dehors de votre offre



### Dictionnaire technique multilingue

45 000 termes en français, anglais, espagnol et allemand



### Archives

Technologies anciennes et versions antérieures des articles



### Impression à la demande

Commandez les éditions papier de vos ressources documentaires



### Alertes actualisations

Recevez par email toutes les nouveautés de vos ressources documentaires

\*Questions aux experts est un service réservé aux entreprises, non proposé dans les offres écoles, universités ou pour tout autre organisme de formation.

## ILS NOUS FONT CONFIANCE



**www.techniques-ingenieur.fr**

**CONTACT :** Tél. : + 33 (0)1 53 35 20 20 - Fax : +33 (0)1 53 26 79 18 - E-mail : [infos.clients@teching.com](mailto:infos.clients@teching.com)