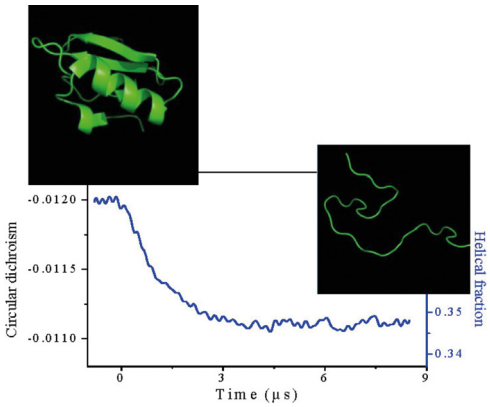
LE DICHROÏSME CIRCULAIRE : UNE SONDE DYNAMIQUE DE LA CONFORMATION DES MOLÉCULES

François HACHE*

Laboratoire d'Optique et Biosciences, École polytechnique, CNRS, Inserm, Institut Polytechnique de Paris, 91120 Palaiseau, France
***francois.hache@polytechnique.edu**



Le dichroïsme circulaire, une propriété optique des molécules chirales, permet d'obtenir des informations uniques sur la conformation tridimensionnelle des molécules. Nous montrons comment on peut utiliser cet effet dans des expériences résolues en temps pour déterminer la dynamique des changements de conformation de molécules chimiques ou biologiques.

https://doi.org/10.1051/photon/2025313558

DICHROÏSME CIRCULAIRE

La chiralité des molécules a toujours été et reste aujourd'hui encore une caractéristique fascinante de certaines molécules chimiques et de pratiquement toutes les molécules biologiques [1]. Rappelons qu'un objet est dit « chiral » s'il existe sous deux formes géométriques images l'une de l'autre dans un miroir, mais non superposables. C'est le cas des deux mains qui bien que très semblables sont immédiatement identifiables comme droite ou gauche sans ambigüité possible (et d'ailleurs, le mot chiral a été formé d'après le mot grec χειρ qui désigne la main). Ainsi les deux formes chirales d'une molécule (appelées énantiomères) sont souvent appelées « gauche » et « droite » [1].

La chiralité joue un rôle particulièrement important en biologie car toutes les molécules du vivant sont chirales et présentes naturellement sous un énantiomère bien défini. Ainsi, tous les acides aminés naturels sont gauches tandis que tous les sucres sont droits. Cette chiralité des composants élémentaires a des conséquences particulièrement importantes en pharmacologie car une molécule chimique composant un médicament n'aura pas les mêmes effets selon qu'elle est gauche ou droite. Un exemple classique est le limonène : selon l'énantiomère choisi, la molécule à l'odeur de l'orange ou du citron. Un autre exemple dramatique est la thalidomide dont un énantiomère soulage les nausées des femmes enceintes tandis que l'autre provoque de graves malformations chez le fœtus. Cet épisode dramatique des années 1950 a démontré l'absolue nécessité de prendre en compte la chiralité des molécules pharmaceutiques.

La question de savoir comment sonder la chiralité d'un objet se pose donc rapidement et dès le début, l'optique a représenté le meilleur moyen de différentier deux

[1] Les deux énantiomères peuvent être repérés par des couples d'initiales variées : L/D, S/R, +/-, Λ/Δ, ...

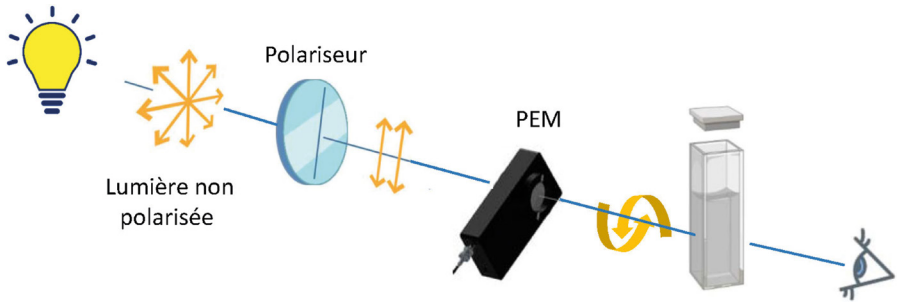
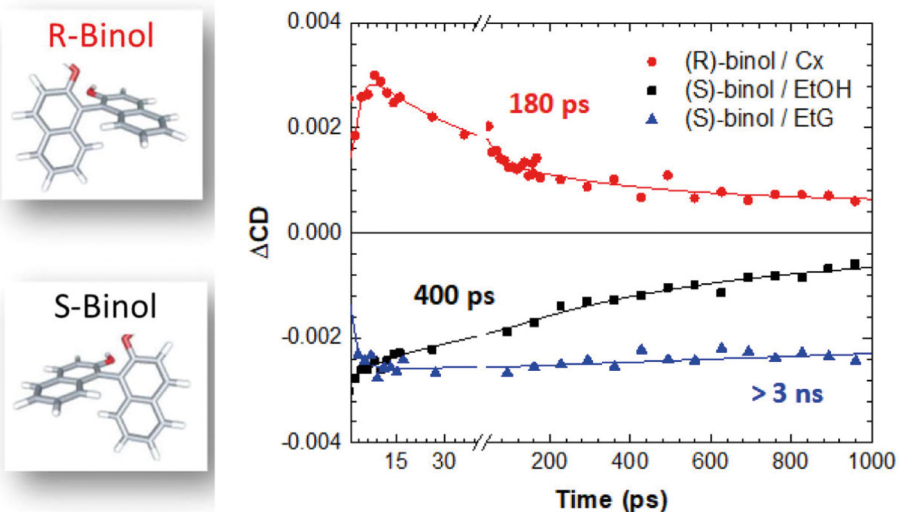


Figure 1. Principe de fonctionnement d'un spectropolarimètre: le modulateur photoélastique (PEM) module la polarisation de circulaire gauche à droite. Le signal est ensuite démodulé pour mesurer le CD.

énantiomères. En 1848, Pasteur découvre en effet le lien entre l'activité optique et la chiralité moléculaire. Le principe est que pour sonder un objet chiral, il faut utiliser une sonde qui est elle-même chirale. Or la lumière, si elle est polarisée circulairement, est chirale puisqu'elle existe sous deux formes gauche et droite. L'interaction de la lumière avec une lumière polarisée se traduit par deux effets (voir encadré 1) : la rotation de polarisation et le dichroïsme circulaire (CD). Les deux effets sont connectés comme sont connectés l'indice de réfraction et l'absorption, mais il est souvent plus aisé d'utiliser le CD qui n'existe que là où la lumière est absorbée contrairement à la rotation optique.

Pour comprendre en quoi la mesure du CD donne des informations sur la structure tridimensionnelle des molécules, il est bon de comprendre l'origine de la chiralité. De façon évidente, la chiralité est une propriété géométrique. Qu'est-ce qui différencie deux énantiomères si ce n'est la position des atomes dans l'espace ? Une molécule plane ne peut pas être chirale, il faut nécessairement considérer les trois dimensions de l'espace pour obtenir de la chiralité. On comprend donc que le CD doit refléter ces propriétés spatiales et donner des informations sur la stéréochimie des molécules. Comment cela se traduit-il au niveau du formalisme de l'interaction lumière-matière ? Rappelons que cette interaction est habituellement décrite par un hamiltonien d'interaction $\hat{W} = -\vec{\mu} \cdot \vec{E}$ où $\vec{\mu}$ est l'opérateur « moment dipolaire électrique » et $\vec{E}$ le champ électrique de l'onde électromagnétique. Cependant, cette formulation correspond à l'approximation dipolaire électrique qui revient à négliger l'extension spatiale des molécules par rapport à la longueur d'onde du rayonnement ou, en d'autres termes, à rassembler tous les atomes de la molécule en un unique point. Cette approximation semble justifiée vu les dimensions en jeu, mais alors, comment peut-on faire la différence entre deux énantiomères ? On voit donc que ce niveau d'approximation ne va pas être suffisant pour décrire les interactions chiroptiques et qu'il va falloir pousser le développement multipolaire plus loin et introduire des effets magnétiques[2]. Ainsi, à côté de la force d'oscillateur qui décrit les effets optiques habituels (réfraction, absorption), on va introduire la force de rotation (dite de Rosenfeld) qui va permettre de calculer les effets chiroptiques. L'expression quantique de cette force de rotation se calcule aisément comme $R = \mathrm{Im}(\vec{\mu} \cdot \vec{m})$ où $\vec{m}$ est l'opérateur « moment dipolaire magnétique ». Au niveau microscopique, il y a plusieurs origines possibles de cette force de rotation selon les caractéristiques des molécules étudiées (voir encadré 2). Le caractère magnétique de cette réponse chiroptique permet de comprendre une de ses caractéristiques : vu qu'il s'agit d'un niveau supérieur d'approximation, les effets chiroptiques vont être beaucoup plus faibles que les effets ● ● ●

Figure 2. Mesure du TRCD dans le Binaphtol pour trois solvants différents (cyclohexane, éthanol et éthylène-glycol), mettant en évidence les effets de viscosité et de proticité des solvants sur la dynamique de fermeture de l'angle dihédral après une photoexcitation de l'échantillon.



[2] Pour des raisons de symétrie, les effets quadripolaires électriques n'interviennent pas.

optiques habituels. Ainsi, le CD est habituellement 3 à 5 ordres de grandeur plus faible que l'absorption… et c'est là que réside toute la difficulté d'utiliser le CD en pratique !

Le CD est néanmoins utilisé en routine par de nombreux laboratoires ou compagnies de chimie ou pharmaceutiques pour vérifier la conformation d'une molécule ou mesurer la pureté énantiomérique d'une solution et il existe des appareils commerciaux (spectropolarimètres) qui mesurent les spectres de CD avec une grande précision. Au niveau de la recherche, de nombreuses études sont conduites pour étendre les possibilités. Il peut s'agir soit d'élargir la gamme spectrale vers l'UV (en particulier grâce au rayonnement synchrotron (SRCD)) ou vers l'IR (dans ce cas, on sonde les transitions vibrationnelles et on parle de VCD). Une autre direction est d'implémenter les mesures de CD dans des expériences résolues en temps.

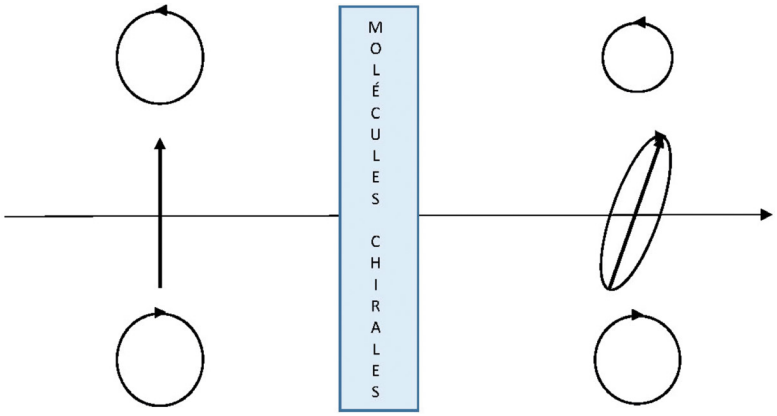
MESURES DE CD RÉSOLUES EN TEMPS

L'idée des mesures de CD résolues en temps (Time-resolved CD : TRCD) est de mettre à profit la sensibilité du CD à la structure tri-dimensionnelle des molécules pour accéder à la dynamique ultrarapide des changements conformationnels. Il s'agit d'informations très importantes pour comprendre la réactivité des molécules car ces changements conformationnels transitoires jouent un grand rôle lors des réactions chimiques. C'est particulièrement vrai en biologie où la plupart des réactions enzymatiques reposent sur de tels changements.

Si on veut accéder à des temps très courts (pico-microseconde), il n'est pas possible d'utiliser des appareils commerciaux et il faut se tourner vers les techniques de spectroscopie ultrarapide et combiner les techniques d'excitation-sondage faite avec des lasers impulsionnels et la mesure de CD. Rappelons que ces techniques consistent à exciter un échantillon avec une première impulsion laser et à venir sonder l'état excité et son évolution temporelle avec une seconde impulsion dont on contrôle précisément le délai d'arrivée. Pour développer une expérience de TRCD, deux questions se posent : comment provoquer un changement conformationnel avec une impulsion laser ?, comment mesurer le CD de la sonde ?

Dans certains cas, l'impulsion pompe crée une molécule électroniquement excitée et le changement de distribution électronique peut induire un changement de conformation. C'est le cas par exemple du Binaphtol : l'angle dihédral entre les deux naphtols n'est pas le même entre l'état fondamental et l'état excité et une mesure de TRCD permet de suivre temporellement l'évolution de cet angle. Un autre exemple est la CO-hémoglobine. Lorsqu'on excite cette protéine dans le visible, on provoque le détachement du CO et on simule artificiellement ce qui se passe dans la nature. Le départ du CO provoque un changement de conformation de la protéine qui est la première étape du processus d'allostérie qui joue un grand rôle physiologique dans le relargage de l'oxygène dans le sang. Pour étudier le repliement/dépliement des protéines ou des structures d'ADN, on peut également utiliser la technique du T-jump qui consiste à échauffer très rapidement l'eau d'un échantillon grâce à une impulsion laser infrarouge. Cet échauffement perturbe l'équilibre thermodynamique et provoque un dépliement des structures secondaires que l'on peut suivre par CD.

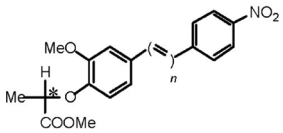
Les effets chiroptiques sont décrits par l'existence de deux indices de réfraction n_L et n_R (*resp.* coefficients d'absorption α_L et α_R) selon que la lumière est polarisée circulairement gauche ou droite. Le dichroïsme circulaire est alors donné par CD = αL - αR. Par ailleurs, si on envoie une onde linéairement polarisée qui peut être vue comme la superposition de deux ondes circulaires gauche et droite, on observe deux phénomènes : une rotation de la direction de la polarisation (ORD : optical rotatory dispersion) et l'apparition d'une légère ellipticité. Cette ellipticité est directement proportionnelle au CD et c'est pour cela que le CD est souvent exprimé en millidegrés dans les appareils commerciaux.



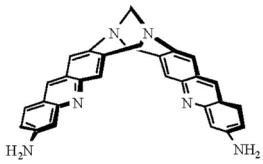
Représentation schématique des effets chiroptiques : les deux polarisations circulaires sont absorbées de façons différentes (CD) tandis qu'une polarisation linéaire voit son orientation tourner et devenir elliptique à cause du CD.

Pour accéder au CD, on peut revenir aux fondamentaux. La façon la plus directe est de moduler la polarisation de la sonde de circulaire gauche à circulaire droite. L'absorption de l'échantillon est alors modulée par le CD et une démodulation du signal donne accès au CD. Dans cette technique, on mesure le CD et on détecte les variations du CD causées par la pompe. Comme ces variations sont généralement très faibles, cette technique demande un bon rapport signal sur bruit. On peut également utiliser le fait qu'un faisceau polarisé linéairement voit sa polarisation devenir elliptique après la traversée d'un échantillon chiral. En utilisant un compensateur de Babinet-Soleil finement ajusté, on peut n'observer que les changements d'ellipticité dus à la pompe. Cette technique est beaucoup plus lente, mais permet d'observer un signal sur un fond noir et est moins sujette au bruit. L'inconvénient majeur de ces techniques est qu'elles sont séquentielles : il faut faire plusieurs mesures pour accéder au CD. Récemment, nous avons proposé une méthode de détection du CD avec une seule impulsion laser en mesurant simultanément l'intensité sur deux polarisations orthogonales [2].

La réponse chiroptique d'une molécule est donnée par la force de rotation $R = Im(\vec{\mu} \cdot \vec{m})$ et nécessite donc d'avoir en même temps une réponse dipolaire électrique et une dipolaire magnétique. Deux cas de figure se rencontrent le plus souvent : soit la même transition électronique possède les deux caractères électrique et magnétique (chiralité à un électron) : c'est le cas des carbones asymétriques dont les quatre constituants sont tous différents ; soit la molécule n'est composée que de transitions dipolaires électriques, mais l'arrangement des différentes parties est globalement chiral (couplage excitonique): c'est le cas de molécules composées de deux ou plus moitiés achirales disposées de façon asymétrique. Même si les composants élémentaires des protéines ou de l'ADN sont intrinsèquement chiraux, la chiralité des macromolécules biologiques relève du second cas.



Chiralité à un électron
*(le carbone chiral est marqué par *)*



Couplage excitonique entre les deux parties de la molécule

Exemple de deux molécules correspondant aux deux principales origines de la chiralité moléculaire.

DEUX EXEMPLES D'APPLICATION

Un autre point qu'il est important d'avoir à l'esprit est que ces expériences de TRCD ne peuvent donner des informations exploitables qu'à condition d'avoir des informations complémentaires qui permettent de relier le CD et son évolution à la dynamique ●●●

SPECTROGON
State of the art products

Filtres Interférentiels
De 200 á 15000 nm
• Passe-bande
• Passe-haut
• Passe-bas
• Large bande
• Densité neutre
• Disponible en stock

Réseaux Holographiques
De 150 á 2000 nm
• Compression d'impulsion
• Télècom
• Accordabilité spectrale
• Monochromateurs
• Spectroscopie
• Disponible en stock

UK (parle francais): sales.uk@spectrogon.com • Tel +44 1592770000
Sweden (headquarters): sales.se@spectrogon.com • Tel +46 86382800
US: sales.us@spectrogon.com • Tel +1 9733311191

www.spectrogon.com

conformationnelle des molécules étudiées. Nous donnons maintenant deux exemples d'application.

Binaphtol (BINOL) : cette molécule est composée de deux naphtols qui forment un angle entre eux (angle dihédral). Cette configuration correspond tout à fait au mécanisme du couplage excitonique (cf encadré) puisque chaque naphtol est achiral et c'est l'arrangement de ces deux moitiés qui rend la molécule chirale. On comprend alors que le CD va être fortement dépendant de cet angle. Nous avons mesuré le CD après une photoexcitation du BINOL et nous observons une dynamique en CD que nous ne voyons pas en absorption qui montre que suite au changement de répartition électronique dans l'état excité, l'angle dihédral change et nous pouvons mesurer le temps caractéristique de ce changement. Cette idée intuitive a été confirmée par des calculs de chimie quantique. Nous voyons clairement que ce temps dépend de la viscosité et de la proticité du solvant (figure 2) [3].

Dépliement d'un polypeptide : la question du dépliement/repliement des protéines et des polypeptides est cruciale en biologie car chaque protéine doit acquérir une structure tridimensionnelle spécifique afin de fonctionner correctement. Certaines maladies neurodégénératives sont par exemple reliées à un mauvais repliement de certaines protéines au niveau des neurones. Afin de déterminer les temps caractéristiques de repliement/dépliement des protéines, nous avons construit une expérience de T-jump. Le phénomène étant un processus thermodynamique, tout changement de température modifie l'équilibre et l'idée est de suivre par CD l'évolution du dépliement consécutif à une brusque montée de la température. Dans ce cas, l'information supplémentaire nécessaire à l'interprétation est la connaissance empirique du spectre de CD en fonction de la structure secondaire des protéines et la possibilité de relier directement le CD à la fraction d'hélices alpha présentes dans la protéine (cf figure 3A, B). Nous avons fait l'expérience sur un poly (acide glutamique) qui forme une hélice alpha et on observe une diminution du CD en quelques microsecondes caractéristique du dépliement (figure 3C). Une étude en fonction de la température de départ permet alors de remonter aux paramètres thermodynamiques du processus [4].

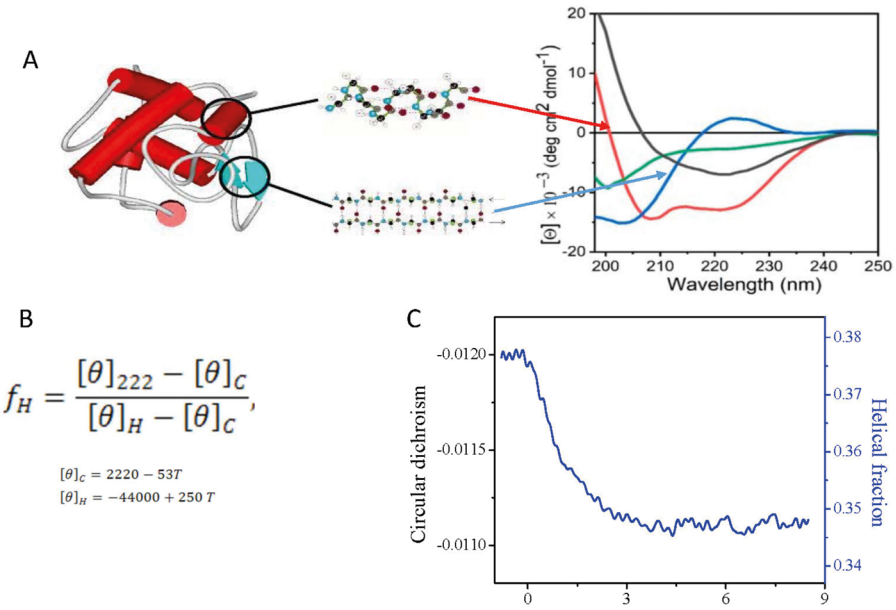


Figure 3. Dépliement d'un polypeptide (poly(acide glutamique)) après un saut de température (T-jump). A : relation entre la structure secondaire et les spectres de CD ((d'après Pignataro, Molecules 2020)); B : formule permettant de mesurer la fraction d'hélices alpha à partir de la mesure de CD; C : mesure expérimentale de la dynamique de dépliement [4].

CONCLUSION

Le CD fournit des informations uniques sur la conformation des molécules. Cette caractéristique est utilisée depuis longtemps en chimie et en biochimie. En implémentant le CD dans des techniques résolues en temps, on peut maintenant avoir accès à des mesures originales de dynamique des changements conformationnels qui ouvrent la voie à une meilleure compréhension des processus réactionnels et enzymatiques [5].

RÉFÉRENCES

[1] N. Berova N *et al.*, Circular Dichroism—Principles and Applications. 2nd ed. (Wiley-VCH New-York, 2000)

[2] P. Changenet, F. Hache, Opt. Expr. **31**, 21296 (2023)

[3] M. Schmid *et al.*, J. Phys. Chem. Lett. **10**, 4089 (2019)

[4] L. Mendonça *et al.*, J. Phys. Chem. B **118**, 5350 (2014)

[5] D.M. Rogers *et al.*, Chem. **5**, 2751 (2019)