

# Quand la méduse fluo révolutionne la biologie moléculaire

Christophe B.Y. Cordella

**S**ouvenez-vous : octobre 2008, l'Académie royale de Suède décerne le prix Nobel de chimie à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien, pour la découverte et l'ensemble des travaux réalisés sur une protéine pour le moins

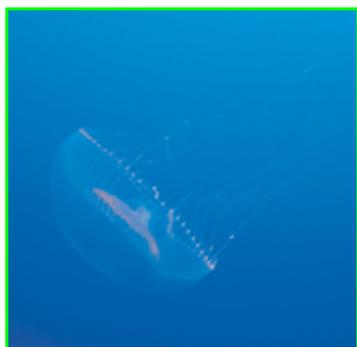


Figure 1 - La méduse *Aequorea victoria*.

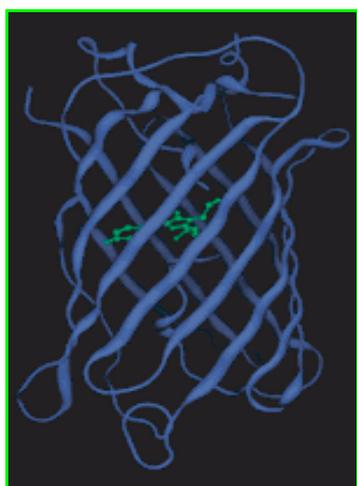


Figure 2 - La GFP.  
[www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-www/shimomura.html](http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-www/shimomura.html)

## Qu'est-ce que la fluorescence ?

Profitons de l'occasion pour revenir sur le phénomène dont cette protéine est naturellement le siège : la fluorescence. Il s'agit d'une émission lumineuse provoquée par diverses formes d'excitation autres que la chaleur. Comme nous le décrivons plus loin, elle se distingue de la phosphorescence en ce sens que la production de lumière intervient immédiatement ou rapidement après l'excitation et n'a pas pour origine les mêmes niveaux d'énergie au sein de la molécule. Cette propriété des molécules d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de restituer rapidement (lumière d'émission) est due à la présence de groupements fluorophores (terme recommandé par l'IUPAC)

ou fluorochromes (plutôt utilisés par les biologistes). Mais d'où vient exactement cette émission de lumière au sein de la molécule ?

Depuis les travaux de Jablonski<sup>(1)</sup> (figure 3), on sait que contrairement à l'émission laser, la fluorescence concerne les électrons de la molécule. Après absorption sélective de l'énergie de certains photons, la molécule se trouve alors dans un état électronique excité<sup>(2)</sup> nommé  $S_1$  (figure 4). Durant l'absorption de la lumière, le ou les électrons déplacés conservent la même orientation de spin. C'est la raison pour laquelle seules les transitions  $S_0 \rightarrow S_n$  sont permises et les transitions  $S_0 \rightarrow T$  ne le sont pas. Les dénominations S et T proviennent de l'état quantique des électrons de la molécule qui ont une multiplicité<sup>(3)</sup> égale à l'unité dans l'état singulet et à 3 dans l'état triplet. Le retour à l'état fondamental  $S_0$  peut alors se faire de différentes manières : l'une d'elles est le phénomène de fluorescence<sup>(4)</sup>. La lumière réémise par la molécule excitée peut être de même longueur d'onde (fluorescence de résonance) ou de longueur d'onde plus grande ou plus petite. Lors du phénomène de phosphorescence, la transition triplet-singulet nécessite une réorientation du spin, d'où une transition longue qui peut aller de la milliseconde à la seconde. *A contrario*, la fluorescence ne nécessite pas de réorientation du spin et le phénomène se produit en quelques picosecondes, voire quelques nanosecondes. Toute réorientation est consommatrice d'énergie qui est cédée par la molécule au milieu. Les passages d'un état S vers T ou T vers S



Figure 3 - Aleksander Jablonski.

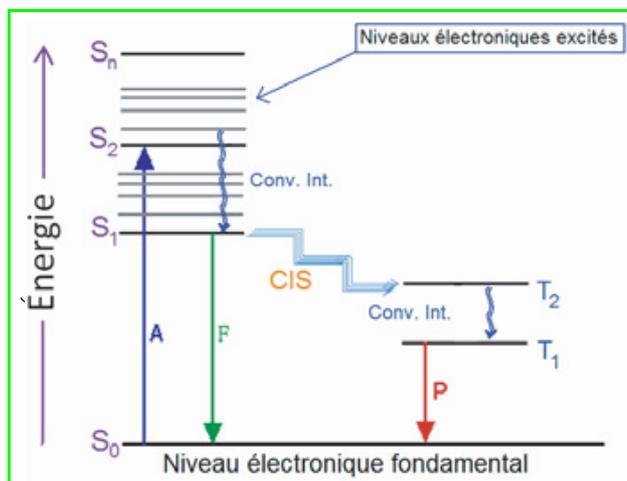


Figure 4 - Diagramme de Jablonski.  
A = absorption d'un photon ; F = fluorescence ; P = phosphorescence ; Conv. Int. = conversion interne ; CIS = croisement inter-système.

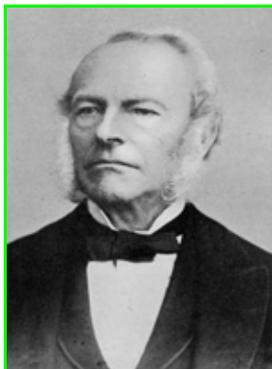


Figure 5 - George Gabriel Stokes.

sont appelés « intersystem crossing » et les processus S vers S et T vers T sont appelés « conversion interne ». Dans les milieux liquides en particulier, le fait que la longueur d'onde d'émission après excitation soit plus grande est dû à ce que la molécule retourne à l'état fondamental à partir du niveau de vibration le plus bas de l'état excité : c'est la règle de Kasha<sup>(5)</sup>. Cette différence est appelée déplacement de Stokes<sup>(6)</sup> (figure 5). Ce déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées

facilite la détection de la lumière de fluorescence, signal spécifiquement associé au fluorophore.

## De la découverte aux applications

Bien que l'extraction puis la synthèse de fluorophores datent de plus de cent ans (synthèse des colorants), les chimistes, depuis la découverte de la protéine verte, ont synthétisé ou découvert de nombreux fluorophores, chacun pouvant être caractérisé par ses spectres d'excitation et d'émission. Roger Tsien fut très actif dans ce domaine car il développa des GFP capables d'émettre de la lumière à des longueurs d'onde différentes pendant une durée plus importante et d'une plus grande intensité.

Comme la fluorescence se traduit généralement par l'émission de lumière visible à partir d'une source d'énergie invisible (ultraviolets), les objets fluorescents paraissent plus lumineux que des objets de même teinte, mais non fluorescents. Cette propriété a rapidement été valorisée par l'industrie qui a développé et commercialisé des applications nous touchant directement dans la vie quotidienne : par exemple dans les peintures anticollision de couleur orange dont on recouvre certaines parties des avions. La fluorescence est également utilisée comme source de lumière noire, essentiellement composée de proches ultraviolets, qui fait ressortir les blancs et les objets fluorescents lorsqu'elle est émise dans la pénombre, afin de créer une ambiance psychédélique. Encore une application que nous utilisons au moins une fois par jour sinon plus : le surligneur, qui dépose sur le papier une encre fluorescente visible et résistante à la lumière mais qui laisse le texte visible. Nous pourrions dérouler ainsi plusieurs pages sur les applications technologiques de la fluorescence. Évoquons également les tubes luminescents, qui servent aussi bien à l'éclairage industriel que domestique, dont la fluorescence provient cette fois non pas du gaz qu'ils renferment (mercure gazeux ou argon par exemple) mais de la poudre dont est tapissée la paroi du tube, poudre elle-même constituée de molécules d'un certain fluorophore (souvent des mélanges ternaires de silicates et d'aluminates).

La fluorescence est aussi très utilisée en laboratoire. Citons par exemple les microscopes confocaux à balayage laser, les microscopes et autres spectromètres de fluorescence. L'imagerie par rayons X, qui est aussi une utilisation du principe de la fluorescence, permet de convertir les rayons X en lumière visible pour l'œil ou un capteur CCD. L'étude du processus fondamental de lecture de l'ADN par les ribosomes n'aurait pas été possible (entre autres) sans outils de détection basés sur la fluorescence (cf. prix Nobel

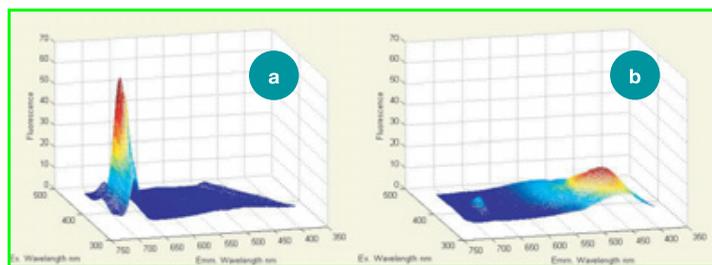


Figure 6 - Fluorescence émise par les chlorophylles dans l'huile d'olive naturelle (a) à température ambiante ; (b) chauffée à 170 °C après 140 min. Longueurs d'onde d'excitation : 360-470 nm ; longueurs d'onde d'émission : 370-710 nm. Image : Équipe Chimométrie, UMR214 INRA, Paris.

de chimie 2009<sup>(7)</sup>). Elle peut également servir à caractériser un matériau minéral ou biologique. La chlorophylle a – antioxydant essentiel de nombreux végétaux tels que l'olive – est fluorescente, et sa mesure grâce à un spectromètre de fluorescence est un moyen efficace pour évaluer l'état de stress d'une plante ou mesurer les changements chimiques se produisant au sein d'une substance naturelle à laquelle on applique une contrainte physique telle qu'un chauffage. La figure 6 présente des spectres de fluorescence 3D acquis sur un spectromètre de notre laboratoire sur lesquels on observe la diminution de fluorescence émise par les molécules de la famille des chlorophylles lorsque l'on chauffe de l'huile d'olive. Ces images montrent que les chlorophylles de l'huile d'olive disparaissent (l'oxydation est une réaction possible) en réagissant avec d'autres molécules du milieu, ce qui induit un changement de structure chimique et une perte de la fluorescence native. On suit ainsi l'effet du procédé de chauffage sur l'échantillon et on mesure indirectement la stabilité du produit vis-à-vis de la chaleur.

Un autre domaine d'application qui connaît actuellement de grands développements est celui des « puces à ADN » ou « biopuces ». Il en est de même pour les « laboratoires sur puce », plus connus sous le vocable anglais « lab-on-a-chip », qui connaissent depuis quelques années d'importants développements dans plusieurs domaines des sciences, et en particulier en biologie et médecine. Ils trouvent également de plus en plus d'applications dans

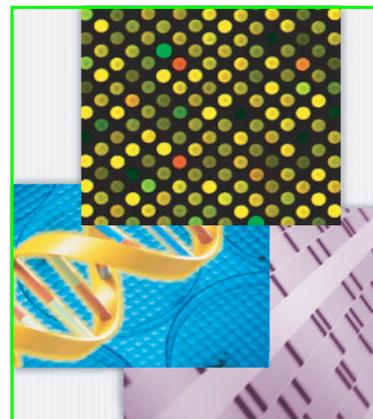


Figure 7 - Puce à ADN.

l'environnement (détection de contaminants et/ou de polluants). Les puces à ADN (figure 7) sont des outils particulièrement utilisés en biologie moléculaire et génétique car elles ouvrent les portes de la génomique en permettant d'étudier simultanément l'expression de plusieurs milliers de gènes (le transcriptome) en une seule analyse. Grâce à la mesure optique de nuances de couleurs, les puces à ADN mesurent les modifications des différents états cellulaires d'un tissu donné. De facture plutôt récente, la puce à ADN est un dispositif miniaturisé se composant d'un support rigide (verre ou nylon) de quelques cm<sup>2</sup>, sur lequel de courtes séquences d'ADN appelées « sondes »<sup>(8)</sup> ont été fixées. Les sondes sont choisies pour leur spécificité vis-à-vis d'un seul et unique

gène. Exploitant la complémentarité des fragments d'acides nucléiques qui peuvent s'associer et se dissocier de façon réversible sous l'action de la chaleur et de la concentration saline du milieu, une puce à ADN devient le support où l'on peut mettre en contact les sondes et les ARN extraits des échantillons à analyser (appelés « cibles »). La propriété de complémentarité évoquée plus haut s'exprime au sein du mélange et un phénomène de recombinaison appelé hybridation s'opère. Grâce au marquage des cibles, le plus souvent par incorporation de fluorophores (mais un marquage par radioéléments est également possible) et acquisition des images d'hybridation, la quantification des signaux d'hybridation indique le niveau d'expression, dans l'échantillon initial, de chacun des gènes déposés sur la puce. Ce type de technologie peut ainsi permettre de comparer l'état physiologique de deux cellules de même type, l'une saine, l'autre « malade ». On voit immédiatement les applications possibles et innombrables en cancérologie, par exemple pour le typage tumoral. Les « lab-on-a-chips » constituent actuellement la forme la plus avancée de microsystèmes intégrant l'ensemble de la chaîne analytique, depuis le dépôt de l'échantillon en passant par la séparation des constituants jusqu'à la détection des différents analytes recherchés (figure 8). Cette technologie utilise un réseau de canaux et de puits qui sont gravés sur des supports miniaturisés en verre, en silicium ou en polymère pour construire des mini-laboratoires. La pression et les forces électrocinétiques déplacent des volumes de l'ordre du picolitre, finement contrôlés à l'intérieur des micro-canaux. Les « lab-on-a-chips » permettent la manipulation des échantillons, le mélange, la dilution, l'électrophorèse, la séparation chromatographique et la détection sur des systèmes intégrés. Leurs principaux avantages sont la facilité d'utilisation, la rapidité d'analyse, d'échantillonnage et la faible consommation de réactif, ainsi qu'une répétabilité élevée principalement due à l'automatisation. Dans les deux cas, la détection des éléments d'intérêt se fait très souvent par mesure de la fluorescence émise par l'échantillon.

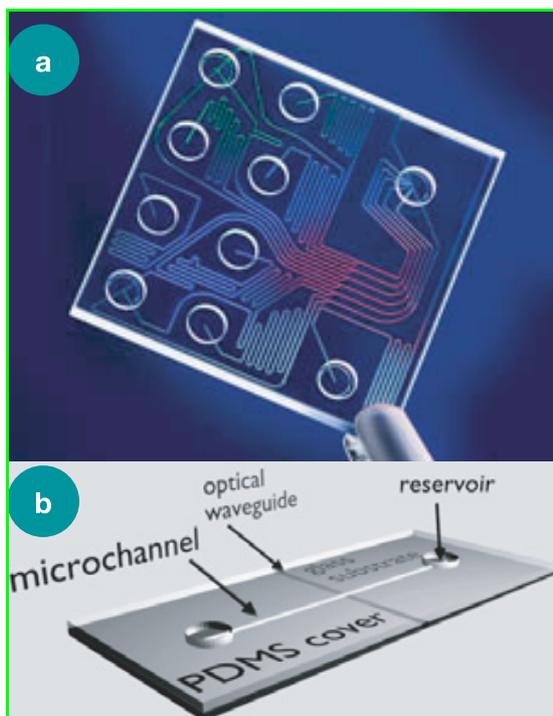


Figure 8 - Exemples de « lab-on-a-chip » : (a) Chip Agilent Technology ; (b) Chip LEOM-ECL/CNRS.

## Une révolution scientifique ? Technique ?

Vous l'aurez compris : la découverte du phénomène de fluorescence au sein de la « méduse fluo » aura réellement révolutionné notre quotidien.

Mais comme nous le rappelle Hervé This dans son livre *La sagesse du chimiste*<sup>(9)</sup>, tout ceci est technologie et non science. La découverte et la compréhension du phénomène de fluorescence au sein de la « méduse fluo » du point de vue chimique sont l'aspect scientifique de cette affaire ; tout ce qui en a découlé en termes d'applications en est le versant technologique. Ces trois chercheurs ont donc contribué avec succès à ce que la science soit source de progrès pour notre société. Qu'ils en soient encore une fois remerciés. Cette révolution scientifique et technique, l'Académie suédoise se devait de la souligner... ou plutôt surligner pourrais-je dire.

### Notes et référence

- (1) Le professeur Aleksander Jablonski (1898-1980) était un physicien polonais, membre de l'Académie polonaise des sciences. Sa thèse porte sur l'influence du changement de la longueur d'onde de la lumière d'excitation sur les spectres de fluorescence. Jablonski a été l'un des pionniers de la physique photonique moléculaire. Il a créé entre autres le concept de « centre luminescent » et s'est intéressé au phénomène de dépolarisation de la photoluminescence. La fluorescence est schématiquement illustrée avec le très classique diagramme de Jablonski, proposé en 1935, pour décrire l'absorption et l'émission de lumière.
- (2) Souvent un état dit *singulet*, c'est-à-dire dans lequel le spin total des électrons est nul. Sur leur niveau d'énergie, les deux électrons qui occupent l'orbitale ont une orientation de spin opposée ; ce que l'on schématise habituellement par des flèches de sens opposé. Dans l'état dit *triplet*, les électrons ont une orientation de spin identique ; les flèches pointent dans la même direction.
- (3) La multiplicité de spin est définie à partir de la valeur du spin des électrons qui ne peut être égale qu'à  $\frac{1}{2}$  ou à  $-\frac{1}{2}$ . Deux électrons ont des spins parallèles s'ils ont leurs spins de même signe ; ils ont des spins antiparallèles si leurs spins sont de signes opposés. La multiplicité  $M = 2|\frac{1}{2} - \frac{1}{2}| + 1 = 1$  pour l'état singulet (S) et  $M = 2|\frac{1}{2} + \frac{1}{2}| + 1 = 3$  pour l'état triplet (T).
- (4) Le phénomène de fluorescence ne se limite pas à l'émission dans le spectre visible, mais concerne tout le spectre électromagnétique. Il existe donc par exemple une fluorescence X associée à l'émission de rayons X.
- (5) Pr Michael Kasha (1920-...), Université de Californie, Berkeley (États-Unis).
- (6) George Gabriel Stokes (1819-1903). Mathématicien et physicien britannique, il est à l'origine de nombreuses contributions de premier plan dans divers domaines de la physique tels que la mécanique des fluides, l'optique et la géodésie. Il explique le phénomène de la fluorescence en 1852.
- (7) Les lauréats du prix Nobel de chimie 2009 ont montré la structure des ribosomes, notamment à l'échelle atomique. Ils ont pour cela utilisé une méthode de cristallographie aux rayons X pour établir la position de chacun des centaines de milliers d'atomes des ribosomes. C'est le volet structural de ce travail de recherche. En revanche, l'étude du processus de lecture de l'ADN par les ribosomes a été réalisée avec des techniques de biologie moléculaire utilisant la fluorescence. Voir [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2009/press.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2009/press.html)
- (8) Ici, les sondes correspondant à des oligonucléotides de synthèse ou à des produits de réaction PCR (« polymerase chain reaction »).
- (9) This H., *La sagesse du chimiste*, Collection « Sagesse d'un métier », L'œil neuf éditions, 2009.



#### Christophe B.Y. Cordella

est chimiométricien et ingénieur de recherche INRA au Laboratoire de chimie analytique d'AgroParisTech\*.

\* Laboratoire de Chimie Analytique, INRA/INA-PG AgroParisTech, UMR 214 Ingénierie Analytique pour la Qualité des Aliments, 75005 Paris.  
Courriel : christophe.cordella@paris.inra.fr