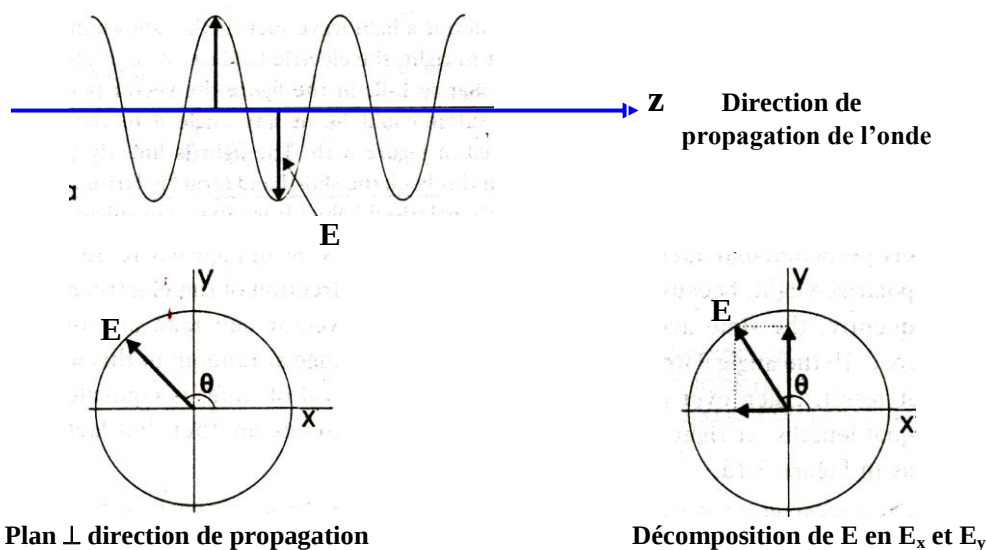


Chapitre III

APPLICATIONS ANALYTIQUES DE LA SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE

III-1- POLARISATION DE FLUORESCENCE (FP)

La lumière ordinaire (naturelle ou artificielle) est une onde électromagnétique qui vibre dans toutes les directions dans un plan perpendiculaire à la direction de propagation (θ variant).



Lorsque cette lumière traverse un filtre particulier (filtre polarisant) elle ne vibre que dans une seule direction (θ constant), cette lumière est appelée lumière polarisée. Le champ E peut être décomposé en deux composantes perpendiculaires selon x et y.

L'émission polarisée du fluorophore peut provenir d'une excitation polarisée. Cette polarisation est le résultat de la photosélection des fluorophores selon l'orientation relative de leur dipôle à l'état fondamental par rapport à la direction de la lumière excitatrice polarisée.

La mesure de la polarisation de fluorescence ou de l'anisotropie de fluorescence se fait selon le schéma suivant:

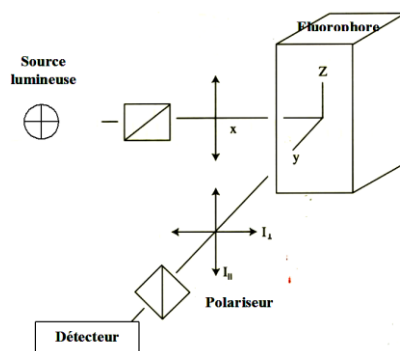
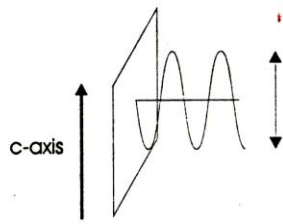
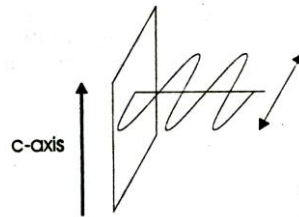


Fig. III-1- Représentation schématique de la polarisation

Le champ électrique de l'onde excitatrice est orienté parallèlement à l'axe z. Un polariseur permet de mesurer l'intensité de la lumière. Si la lumière émise est orientée parallèlement à la direction de la lumière incidente, l'intensité observée est $I_{||}$. Si le polariseur est placé perpendiculairement à la direction de la lumière excitatrice, l'intensité observée est $I_{\perp}$.



Vibration dans un plan $\parallel$ à l'axe c



Vibration dans un plan $\perp$ à l'axe c

La polarisation P et l'anisotropie A de la lumière émise sont données par les relations:

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}} \quad \text{et} \quad A = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}$$

Avec $P = 3A/(2 + A)$ et $A = 2P/(3 - P)$

L'appareil de mesure utilisé est identique à un fluorimètre classique, à la seule différence qu'un polariseur est placé au niveau de la lumière d'excitation et un autre au niveau de la lumière d'émission.

Si les molécules du fluorophore sont rigides au moment de la mesure de la polarisation, la valeur trouvée est la polarisation intrinsèque P_0 :

$$P_0 = (3\cos^2\theta - 1) / (\cos^2\theta + 3) \quad \text{et} \quad A_0 = (3\cos^2\theta - 1) / 5$$

θ est l'angle entre les moments dipolaires de transition de l'excitation et de l'émission.

Si entre l'absorption et l'émission l'orientation du dipôle des molécules fluorescentes change l'effet de la photo sélection diminue et la polarisation P mesurée est inférieure à P_0 : c'est la dépolarisation de la fluorescence. Le changement d'orientation peut se produire à cause d'une redistribution énergétique interne au sein de la molécule, de la rotation de la molécule ou d'un transfert d'énergie de la molécule excitée vers une autre d'orientation dipolaire différente.

Les techniques d'analyses utilisant les mesures de polarisation de fluorescence en fonction de la température et de la viscosité et les mesures de déclin de l'anisotropie en fonction du temps sont très importantes pour l'étude des mouvements et interactions dans les matrices protéiniques. Les fluorophores utilisés comme sondes peuvent être intrinsèques aux protéines ou extrinsèques.

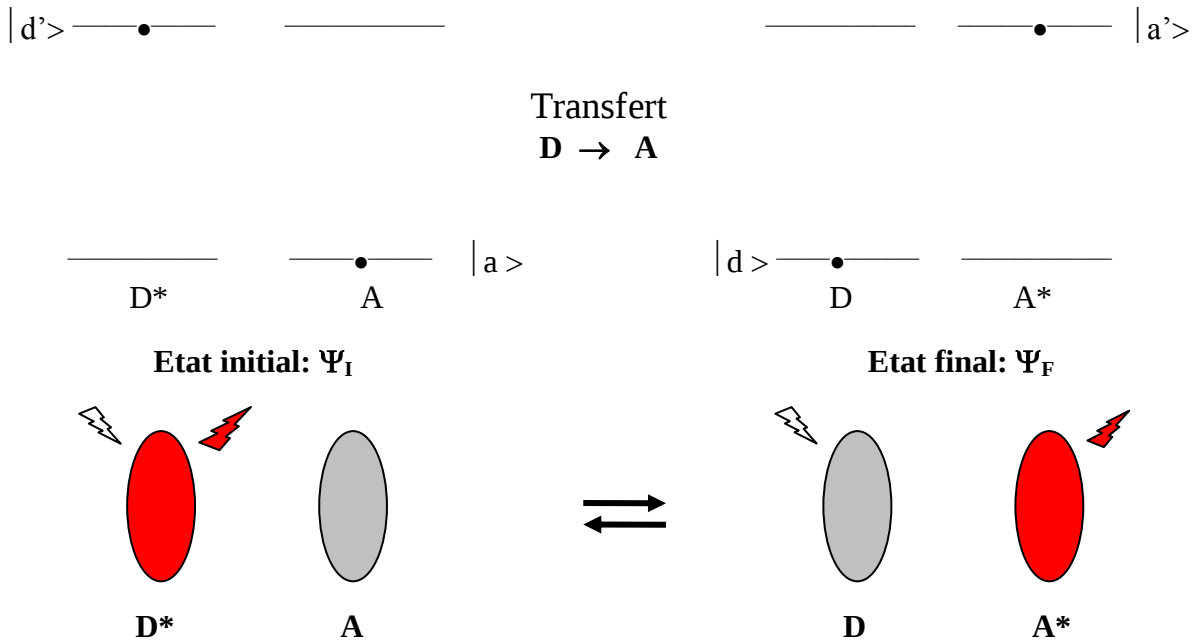
III-2- FLUORESCENCE PAR TRANSFERT D'ENERGIE DE RESONANCE FRET

L'inhibition de fluorescence peut se produire de deux façons différentes:

i- l'inhibition de fluorescence par collision qui dépend de la vitesse de diffusion des molécules. La vitesse de diffusion des molécules étant un facteur gouverné par la taille des molécules et la viscosité de la solution. .

ii- l'inhibition de fluorescence par transfert de l'énergie d'excitation entre les molécules. C'est un transfert d'énergie non radiatif d'une molécule donneuse D excitée vers une molécule réceptrice A . Ce processus dépend de la viscosité de la solution.

a- Principe du FRET



Selon la distance D-A deux mécanismes de transfert sont possibles:

- par interaction coulombienne pour des distances D-A allant de 1 à quelques dizaines d'angström.
- par échange électronique entre les molécules D et A, si la distance D-A est très faible ($<10\text{\AA}$).

Lorsque le transfert d'énergie se fait par interaction coulombienne l'énergie est transférée par résonance: l'électron de la molécule excitée induit un champ électrique oscillant qui entre en résonance avec les électrons de la molécule réceptrice si celle-ci possède la transition énergétique convenable.

La probabilité de transfert $D \rightarrow A$ dépend de l'intégrale de recouvrement entre l'émission du donneur D et l'absorption de l'accepteur A. Si les spectres d'émission de D et d'excitation de A ne se chevauchent pas le transfert ne peut pas se faire.

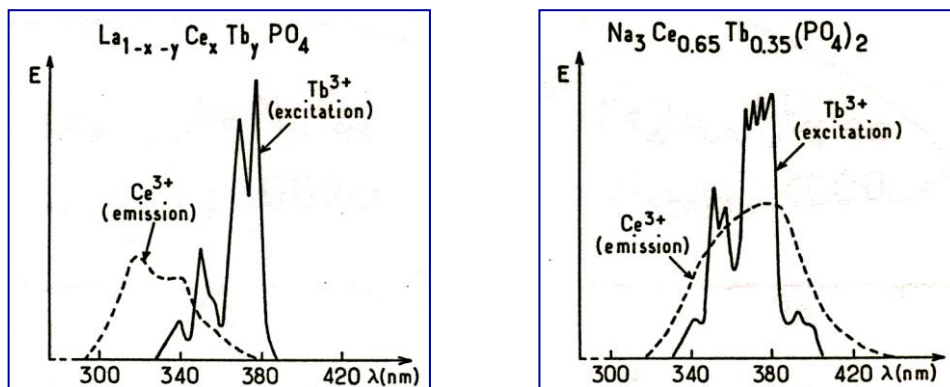


Fig. III-2- recouvrement entre spectres émission de D et d'excitation de A

En présence de transfert, l'intensité d'émission du donneur et donc son rendement quantique diminuent en fonction de la concentration en accepteur.

Si l'accepteur est une molécule fluorescente, l'intensité de sa fluorescence augmente et son spectre d'excitation contient le spectre d'excitation du donneur.

En présence de transfert le déclin de fluorescence de D est plus rapide et sa durée de vie plus courte qu'en l'absence d'accepteur (voir figure II-4).

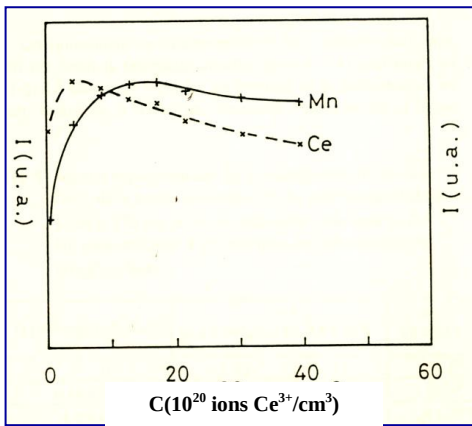


Fig. III-3

Intensité de fluorescence de Ce^{3+} (D) et de Mn^{2+} (A) dans les verres $\text{LaMgB}_5\text{O}_{10}$

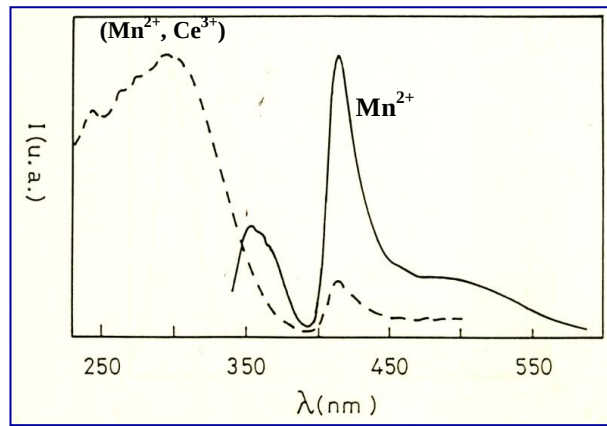


Fig. III-4

Spectres d'excitation de Mn^{2+} (A) dans les verres $\text{LaMgB}_5\text{O}_{10}$ en présence et en absence de Ce^{3+} (D)

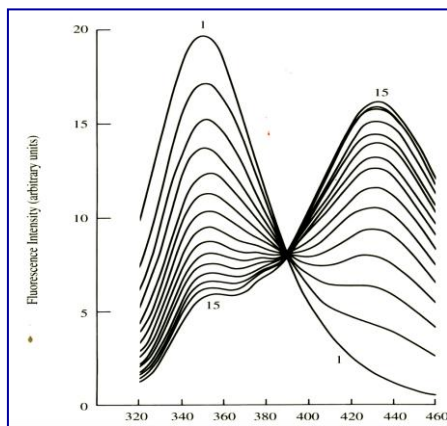


Fig. III-5

Fluorescence des résidus Trp (D) en fonction de la concentration en TNS (A)

b- Paramètres du FRET

Si τ_t est la durée de vie de fluorescence mesurée: $1/\tau_t = 1/\tau + k_t$

$1/\tau$: constante de vitesse de désexcitation de D en absence de transfert d'énergie.

k_t : constante de vitesse de désexcitation de D par transfert d'énergie par résonance

L'efficacité E du dépeuplement de l'état excité de D par transfert d'énergie est donnée par:

$$E = \frac{k_t}{k_t + 1/\tau} = \frac{1/\tau_t - 1/\tau}{1/\tau_t} = 1 - \frac{1/\tau}{1/\tau_t} = 1 - \frac{\tau}{\tau_t}$$

La durée de vie, le rendement quantique et l'intensité d'émission du donneur D sont affectés par le mode d'inhibition par transfert:

$$E = 1 - \frac{\eta_t}{\eta_0} = 1 - \frac{I}{I_0}$$

η_t et η_0 : rendements quantiques en présence et en absence de transfert.

I et I_0 : intensités de fluorescence en présence et en absence de transfert.

L'efficacité du transfert est liée à la distance R séparant D et A:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad R_0 = 9.79 \cdot 10^3 (k^2 J \eta_D n^{-4})^{1/6} \text{ \AA}$$

$$J = \frac{\int F_{(\lambda)} \varepsilon_{(\lambda)} \lambda^4 d\lambda}{\int F_{(\lambda)} d\lambda}$$

R_0 : rayon de Förster ou distance pour laquelle $E = 50\%$ (ou 0.5).

n : indice de réfraction du milieu

η : rendement quantique de D en l'absence de A

k^2 : facteur d'orientation du couple diôle-dipôle (varie de 0 à 4)

J : recouvrement entre spectres d'émission de D et d'excitation de A (en cm^3M^{-1})

ε : coefficient d'extinction de A (en $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

R_0 varie en fonction des fluorophores utilisés (ex.: Tableau 1).

Tableau I: Rayon de Förster pour différents couples de fluorophores D-A

D	A	R_0 (Å)
Fluorescéine	Eosine	50-54
BFP	GFP	50-60
CFP	YFP	50-60
GFP	Cyanine 3	60
Cryptate d'Europium	Allophycocyanine	90

Une variation de l'intensité du FRET n'est visible que dans la mesure où la distance R, séparant les fluorophores varie entre $0,5R_0$ et $1,5R_0$. En effet le FRET variant $1/R^6$, des distances inférieures à $0,5R_0$ ou supérieures à $1,5R_0$ résulteront respectivement en un transfert total ou une absence de FRET.

Remarque: Pour des R_0 supérieurs à 70-80 Å, un signal de FRET entre des fluorophores situés de part et d'autre d'une membrane biologique est envisageable.

c- Utilisation du FRET

La technique de fluorescence par transfert d'énergie de résonance (**ou FRET** pour Fluorescence Resonance Energy Transfert) est une technique qui permet de mesurer les distances (de quelques dizaines d'angström) séparant les fluorophores, et de très faibles variations de celles-ci. Elle est par conséquent une technique de choix pour étudier les interactions moléculaires tant in vivo que in vitro.

Les applications du FRET sont nombreuses et variées. L'exploitation de la protéine fluorescente verte GFP (green fluorescent protein) et la génération de variantes de cette protéine ont permis le développement de technologies de FRET parfaitement adaptées à l'étude de la dynamique des interactions moléculaires dans l'espace et dans le temps à l'intérieur de cellules vivantes. **Ex.:**

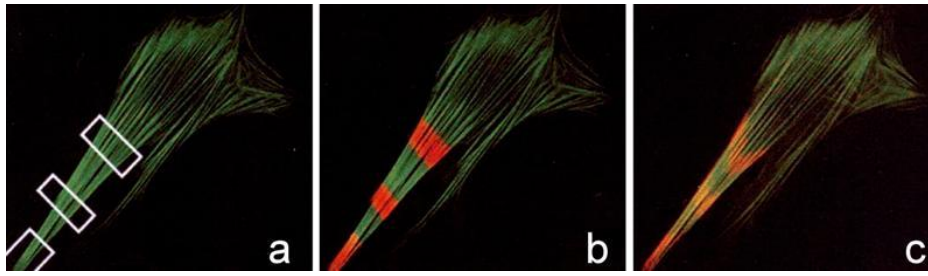


Fig.III-6 Suivi de la dynamique des cellules au cours du temps
(a): Fibroblastes (cellules du tissu conjonctif) marqués à la protéine EosFP forme verte,
(b): photo convertis par irradiation laser en forme rouge dans 3 zones
[Source :Wiedenmann, J. & Nienhaus, G.U.]

Le FRET est aussi utilisé dans l'élaboration de tests biologiques permettant de mesurer des seconds messagers tels que l'AMP cyclique et le calcium ou dans le criblage de molécules capables d'affecter l'activité d'une molécule donnée.

Deux principes sont à la base du développement de nombreuses expériences de FRET:

- 1) Les fluorophores sont portés par deux molécules différentes ; de leur association ou de leur dissociation résultera une variation du signal de FRET.
- 2) les fluorophores sont portés par la même molécule. Un changement de conformation de celle-ci se traduira par une modification de la distance entre les deux fluorophores et une variation de l'intensité du signal de FRET.

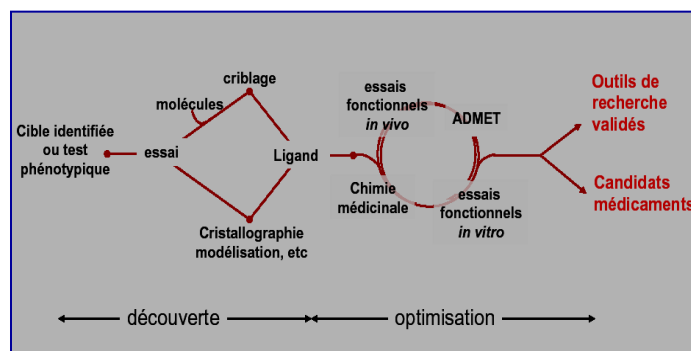
Cette technique très ancienne de plus d'un demi-siècle connaît actuellement un regain d'intérêt lié au développement de nouveaux fluorophores et à la grande sensibilité des appareils de mesure de la fluorescence (spectrofluorimètre et microscope à fluorescence).

Les améliorations techniques ont permis par ailleurs de développer des «variantes» du FRET: **FRET**, **PbFRET** (Photobleaching FRET), **BRET** (Bioluminescence Resonance Energy Transfert), **HTRF** (Homeogeneous Time Resolved Fluorescence)... Chacune de ces formes présente des avantages et des inconvénients, le choix d'une de ces approches se fait selon le problème qui se pose, la nature des partenaires impliqués, les fluorophores choisis

Le criblage pharmacologique permet d'étudier l'effet de composés chimiques sur le développement de cellules normales ou pathologiques.

Le criblage de génomique fonctionnelle consiste à induire la surexpression ou au contraire, l'extinction de certains gènes dans une cellule. On analyse les effets sur les autres gènes présents dans la cellule ou les produits de ces gènes, des protéines, et, au final, sur les organismes.

Le criblage haut débit permet d'analyser la quasi-totalité des gènes présents dans un noyau cellulaire, en utilisant certaines molécules capables de moduler leur action. Ce qui permet d'identifier les «portes d'entrée» d'une maladie afin de proposer des cibles thérapeutiques.



Le criblage et les approches de biochimie constituent un outil puissant pour la recherche fondamentale et thérapeutique.

Pr. N. EL JOUHARI,

Master Chimie Fondamentale et Environnement, Cours: «Spectrofluorimétrie »

UNIVERSITE MOHAMMED V-AGDAL, FACULTE DES SCIENCES, DEPARTEMENT DE CHIMIE

III-3- FLUORESCENCE EN TEMPS RESOLU (TRF)

Le manque de sélectivité spectrale des fluorophores utilisés ainsi que la difficulté de s'affranchir des signaux parasites (bruit de fond) constituent une limite du FRET. Ceci a des conséquences sur la sensibilité des tests mis en œuvre : l'utilisation de traceurs présentant des propriétés originales de luminescence a permis de mettre au point des tests plus sensibles en améliorant la résolution spectrale et temporelle du signal de FRET.

Ces molécules sont des complexes formés par l'association d'un chromophore (cryptand ou chélate) et d'un cation lanthanide faisant parti du groupe des terres rares (europium, terbium...).

La durée de vie de fluorescence de la plupart des fluorophores organiques et des protéines fluorescentes est très courte: de l'ordre de la nanoseconde, tout comme les fluorescences parasites. La principale caractéristique des lanthanides vient de leur durée de vie de luminescence relativement longue (de l'ordre de la milliseconde).

Grâce à cette propriété des ions lanthanides, les systèmes de détection de fluorescence en phase homogène et en temps résolu ont pu être développés. Ces systèmes reposent sur l'application d'un délai entre l'excitation de l'échantillon et la mesure du signal émis de manière à s'affranchir des fluorescences parasites à durée de vie courte. Cette résolution temporelle du signal permet ainsi d'améliorer le rapport entre le signal du traceur et le bruit de fond inhérent aux conditions du test sans qu'aucune étape de séparation des espèces ne soit nécessaire.

La spectroscopie résolu dans le temps permet de suivre la migration de l'énergie excitatrice et l'évolution des effets de l'environnement du fluorophore en fonction du temps. Le signal de fluorescence est analysé après un délai à l'excitation.

III-4- FLUORIMETRIE DIRECTE ET PAR DERIVATISATION

La spectroscopie de fluorescence, la fluorimétrie ou encore la spectrofluorimétrie est l'analyse de la fluorescence d'un échantillon sous excitation par un rayon UV ou visible.

La fluorimétrie est une méthode très sensible pour la mise en évidence et le dosage des composés fluorescents à l'état de traces: elle permet de détecter ces composés à des concentrations très faibles. Comme le spectre d'absorption, le spectre de fluorescence d'un composé est une caractéristique aussi spécifique qu'un diagramme de diffraction RX.

En chimie inorganique les applications les plus fréquentes sont des dosages d'ions métalliques à l'état de complexes organiques fluorescents, en solution aqueuse ou après extraction.

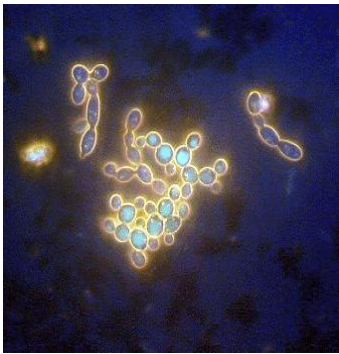
III-5- MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE

La microscopie à fluorescence consiste à former une image en collectant la lumière émise par l'échantillon à analyser sous excitation adéquate. Elle fait partie des méthodes de recherche utilisées de manière routinière et permet de déceler la présence de divers composés par l'observation de la fluorescence.

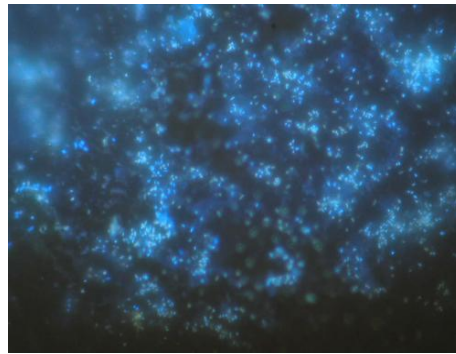
La microscopie en fluorescence est une méthode de première importance dans les sciences de la vie. Elle permet de visualiser des substances, des cellules, des molécules non fluorescentes en les marquant avec des fluorochromes (le DAPI marque l'ADN qui fluoresce en bleu).

Le marquage simultané de différentes structures ou composés chimiques permet de détecter simultanément des composés différents, tout en les différenciant par leur couleur de fluorescence.

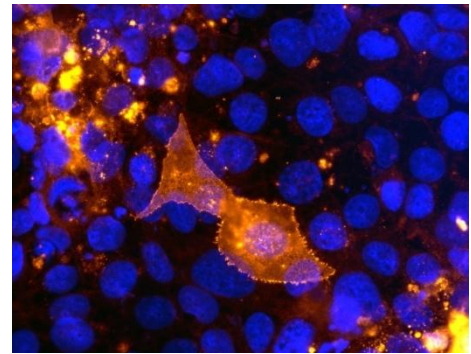
Certains marqueurs génétiques comme la protéine fluorescente verte (GFP) sont aussi très utilisés en biologie. Dans ce cas, le fluorochrome est une protéine produite directement par la cellule elle-même, la fluorescence peut alors être visualisée directement dans les cellules vivantes.



Levures marquées



Bactéries marquées



Virus Chikungunya dans des cellules humaines en culture

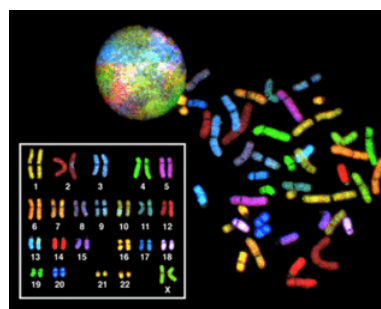
III-6- SONDES FLUORESCENTES: LES MARQUEURS FLUORESCENTS

L'utilisation de sondes fluorescentes est une technique d'analyse de choix: elle permet la détection et le suivi en temps réel d'espèce d'intérêt biologique.

A titre d'exemple:

- Dans le suivi des acides aminés et neurotransmetteurs.
- Dans le suivi des acides gras de triglycérides dans le système gastro-intestinal. Les études s'intéressent plus particulièrement aux acides gras essentiels de type omega-3 tels que l'acide α -linoléique, l'acide éicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docohexaénoïque (DHA). Ces espèces, indispensables à l'organisme, jouent un rôle central au niveau des membranes cellulaires et interviennent dans la prévention des maladies cardiovasculaires et inflammatoires.
- Dans La cytogénétique moléculaire qui étudie des phénomènes génétiques au niveau de la cellule cad au niveau des chromosomes sans la nécessité d'extraire l'ADN: anomalies chromosomiques (de nombre et de structure), recombinaison de chromosomes, etc.

Exemple: Constitution chromosomique d'un individu par la technique de FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)



- **Caryotype spectral:** photographie de l'étalement chromosomique après hybridation.

- **Caryogramme:** après identification et classement des chromosomes.

*** Individu de sexe féminin avec 2 chromosomes X**

L'espèce à détecter est modifiée chimiquement par une sonde fluorescente: marquage fluorescent. La molécule ainsi marquée est alors introduite dans le système biologique (neurones, membranes, cellules) afin de permettre son suivi.

Les sondes ou marqueurs présentent de nombreux avantages: une sensibilité de mesure importante, un temps de réponse court, une observation locale ou à distance par l'intermédiaire de fibres optiques ou de microélectrodes. La luminescence permet, en particulier, de réaliser l'imagerie en temps réel des cibles étudiées.

Les marqueurs fluorescents sont de petites molécules qui subissent des changements dans leurs paramètres de fluorescence suite à une interaction avec des macromolécules. Ils se divisent en deux groupes, les fluorophores intrinsèques et extrinsèques.

i) Fluorophores intrinsèques

* Les acides aminés aromatiques

- Les résidus tryptophane, tyrosine et phénylalanine sont des acides aminés responsables de la fluorescence proche UV des protéines.

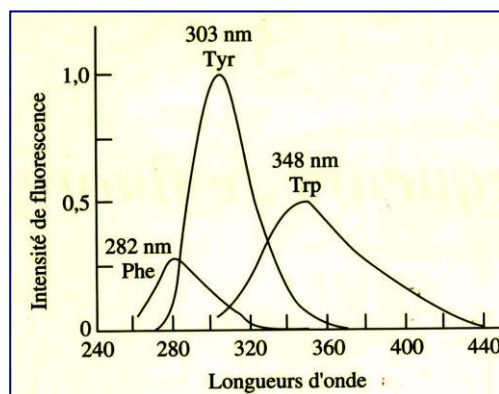


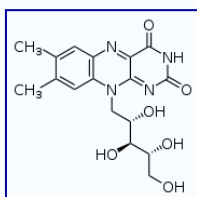
Fig. III-7
Spectres de fluorescence des Trp, Tyr et Phe

L'émission des résidus Trp participent généralement à 90% dans la fluorescence totale des protéines. Elle est très sensible à la polarité du milieu environnant. La fluorescence des résidus Trp est utilisée pour doser les protéines.

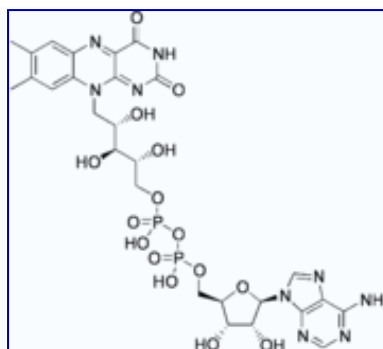
La tyrosine peut être utilisée pour suivre des changements de conformation dans une protéine donnée.

* Les cofacteurs

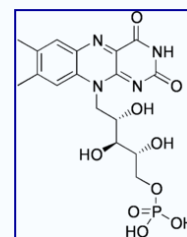
Un cofacteur est un coenzyme ou substance dont la présence avec une enzyme est nécessaire pour qu'une certaine réaction se déroule:



Riboflavine



FAD



FMN

le flavine caractérise une famille de composés organiques formés d'isoalloxazine tricyclique. Il dérive d'une vitamine, le riboflavine (vitamine B₂). Le flavine est souvent attaché avec l'adénosine diphosphate formant le flavine adénine dinucléotide (**FAD**). Dans d'autres cas il se trouve sous forme de flavine mononucléotide (**FMN**). Le flavine est le plus important colorant extrait de l'écorce de citron.

- Le (**FAD**), le (**FMN**) et le nicotinamide adénine dinucléotide (**NAD⁺**) sont des coenzymes importantes dans les processus d'oxydo-réduction. Le (**NAD⁺**) est non fluorescent.

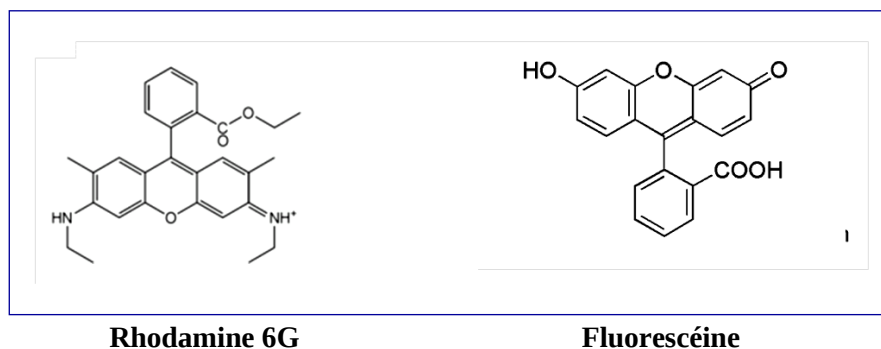
Le (**FMN**) est utilisée dans le dosage flavinique qui permet de mesurer la fluorescence spécifique de la flavine totale libre et fixée sur une protéine. Il possède de fortes interactions avec les acides aminés formant son site de fixation.

- Le (**FMN**) et le (**FAD**) absorbent la lumière dans le visible (450nm) et émettent autour de 515nm.

- Le (**NADH**), forme réduite de le (**FAD**), est très fluorescente avec des maxima d'absorption et d'émission à 340 et 450nm. Son rendement quantique augmente en général de 4 fois lors de sa fixation sur les protéines.

ii) Fluorophores extrinsèques aux protéines

* La fluorescéine et la rhodamine



- Elles se fixent d'une façon covalente sur les résidus lysine et cystéine des protéines. Elles absorbent et émettent dans le visible. Leur émission n'est pas sensible de façon significative à la polarité du solvant.

L'absorption et la fluorescence de la fluorescéine sont sensibles au pH.

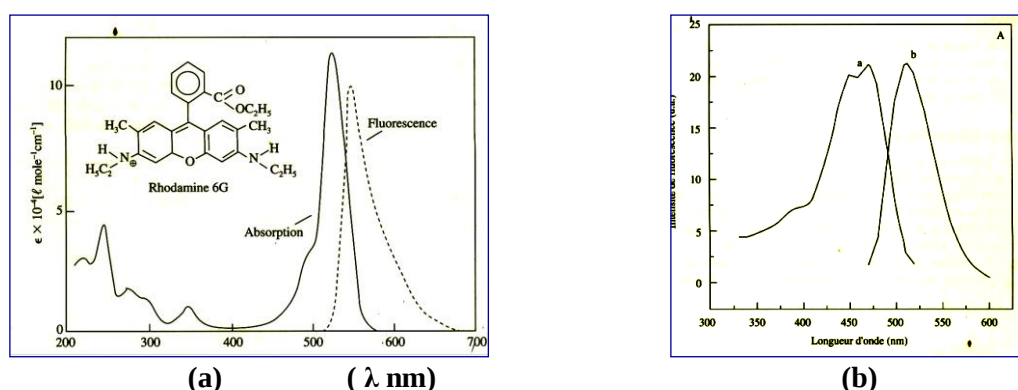
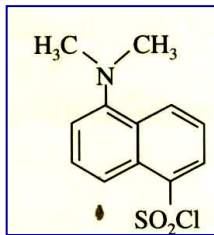


Fig. III-8

Absorption et fluorescence de la rhodamine (a) et de la fluorescéine (b) à pH=4

* Le chlorure de dansyl (DNS-Cl)

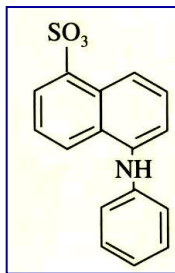
Utilisé pour l'étude des protéines. Son temps de vie de fluorescence dépend de l'endroit de sa fixation sur la protéine: plus il est exposé à la surface de la protéine plus la durée de vie de fluorescence est longue. Son émission est très sensible à la polarité du solvant.



DNS-Cl

* Les naphthalènes sulfonates

- Les deux sondes les plus utilisées sont le 1-anilo-8-naphtalène sulfonate (**ANS**) et le 2-p-toluidinylnaphtalène-6-sulfonate (**TNS**).



ANS

Elles se lient de façon non covalente aux protéines et aux membranes.

Elles ne fluorescent pas ou très peu lorsqu'elles sont dissoutes dans un milieu polaire (eau). Elles fluorescent fortement dans un milieu non polaire ou de faible polarité (alcool) ou fixées sur les protéines ou sur les membranes,

* Les bases nucléiques

Les bases azotées appelées bases nucléiques ou nucléobases sont des molécules qui font partie des nucléotides, qui sont eux-mêmes des éléments de l'ARN et de l'ADN.

Il existe cinq bases azotées:

- L'Adénine et guanine sont des bases puriques
- La cytosine, thymine et uracile sont des bases pyrimidiques

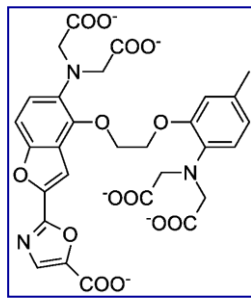
Les bases puriques et pyrimidiques sont fluorescentes. L'émission est faible à pH neutre. L'émission est 10 fois plus intense à pH=2. L'émission est 100 fois plus intense à 77 K.

Le rendement quantique des bases nucléiques dépend fortement de la température.

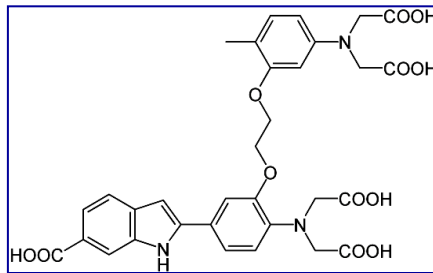
La polarisation de fluorescence est élevée même à température ambiante.

* Les détecteurs d'ions

Certaines sondes fluorescentes sont utilisées pour détecter et doser le calcium dans les cellules. Par exemple le Fura-2 et l'indo-1.



Fura - 2



Indo-1

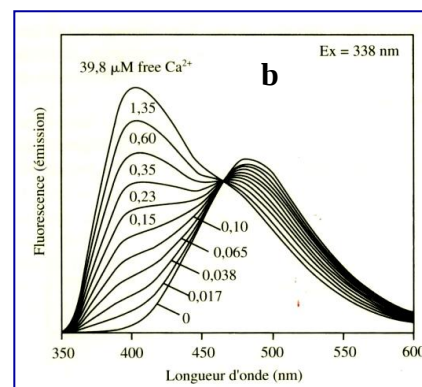
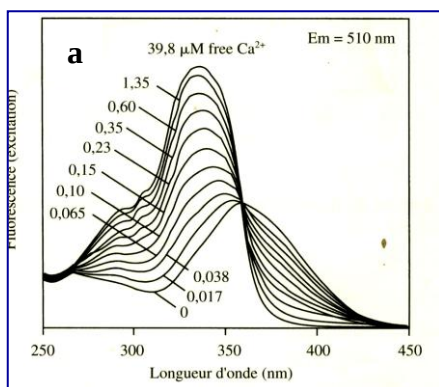


Fig. III-9

Spectres d'excitation du Fura-2 (a) et d'émission de l'indo 1(b) avec le calcium

En présence de calcium le maximum du spectre d'excitation du Fura-2 se déplace vers les grandes énergies et l'intensité d'émission augmente.

Le maximum du spectre d'émission de l'indo-1 se déplace de 490 à 405 et l'intensité de fluorescence croît lorsque la concentration en calcium augmente.

* Les marqueurs des glycanes

Un glycanne est une partie glucidique reliée à une protéine.

Le calcofluor est un marqueur fluorescent qui se fixe sur les glycanes. La position du maximum d'émission dépend de sa concentration et de la nature du solvant.

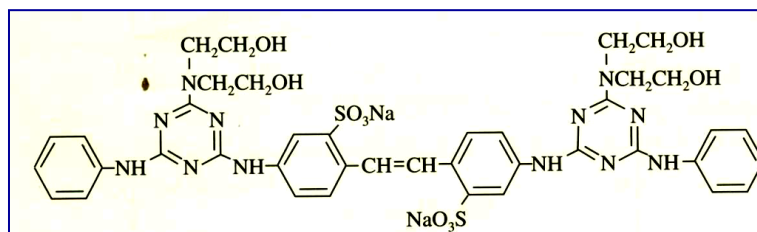


Fig. III-10

Structure chimique du calcofluor