

LA PHOTOLUMINESCENCE AU SERVICE DE LA MÉDECINE

Pierre Labarbe

Partie des programmes de physique-chimie associée

Programme de spécialité physique-chimie de première générale : Partie 2.B. Modèles ondulatoires et particulaire de la lumière

Mots-clés : photon, interaction lumière-matière, quantification des niveaux d'énergie des atomes, spectre, diagramme d'énergie

INTRODUCTION

Un certain nombre de corps ou de systèmes moléculaires émettent de la lumière sous l'influence d'une excitation soit photonique, soit électrique. Ils ont alors des propriétés de fluorescence ou de phosphorescence. Ces mêmes propriétés peuvent aussi être particulièrement utiles ou prometteuses dans le domaine médical. Cet article rappelle les différents types de propriétés lumineuses des composés chimiques. Il se focalise sur la photoluminescence dont l'origine est quantique et décrit une application récente au diagnostic médical.

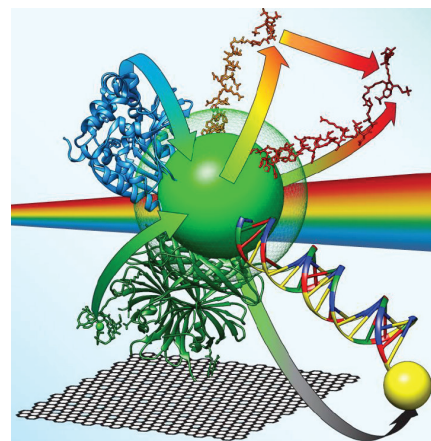


Figure 1 – Des nanoparticules aux propriétés fluorescentes ? Source : *Chemical Reviews*, 117 : 536-711 (2017).

QU'EST-CE QUE LA PHOTOLUMINESCENCE ?

Fluorescence et autres luminescences

Les atomes et les molécules peuvent produire de la lumière de différentes manières. Quand cela s'accompagne d'un dégagement de chaleur, il s'agit d'**incandescence**. Quand ce n'est pas le cas, on parle de **luminescence**. Ce phénomène peut avoir différentes origines (voir Figure 2). L'émission lumineuse est la conséquence d'une excitation, c'est-à-dire d'un apport d'énergie par différents moyens. Quand un composé est excité par la lumière, il réémet une lumière différente et on parle de photoluminescence. Quand l'excitation est d'origine électrique, il s'agit alors d'**électroluminescence** (à l'origine du fonctionnement des DEL). L'excitation peut aussi être d'origine chimique dans le cas de la **chimiluminescence**. L'énergie d'excitation est alors fournie par une réaction chimique, comme l'oxydation du luminol utilisé en criminologie. La chimiluminescence peut avoir une origine biologique. Il se produit par exemple une réaction enzymatique chez certaines méduses, les vers-luisants ou les poissons lanternes qui entraîne l'émission d'une lumière plutôt bleue ou verte. Cette **bioluminescence** résulte aussi d'une réaction d'oxydation mais en présence d'enzymes. Il existe aussi des phénomènes de thermoluminescences, de radioluminescence et même de sonoluminescence !

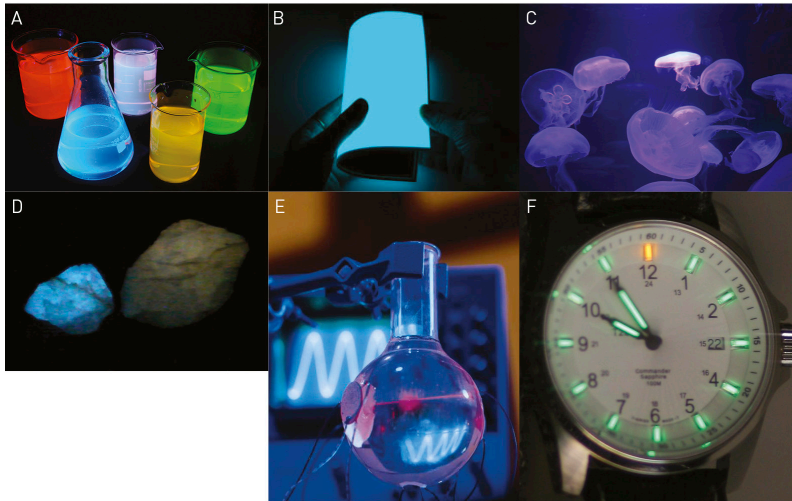


Figure 2 – Exemples de manifestations de luminescences. A) Photoluminescence ; B) électroluminescence ; C) bioluminescence [certaines méduses émettent une luminescence d'origine chimique] ; D) la thermoluminescence est l'excitation de molécules par la chaleur ; E) sonoluminescence (l'émission d'un signal sonore entraîne une luminescence rose dans une solution appropriée) ; F) radioluminescence (les aiguilles et le cadran de certaines montres émettent une luminescence d'origine radioactive permettant de lire l'heure dans le noir). Sources : A) Wikipédia, licence cc-by-sa-4.0, Maxim Bilovitsky ; D) Wikipédia, licence cc-by-sa-3.0, Mauswiesel ; E) www.chm.bris.ac.uk ; F) Wikipédia, licence cc-by-sa-3.0, Autopilot.

La photoluminescence

Un phénomène d'origine quantique

La suite de l'article concerne les différentes formes de **photoluminescence** qui se produisent quand un composé est excité par de la lumière et réémet une lumière d'une autre couleur. Pour comprendre le phénomène, il faut s'appuyer sur le diagramme énergétique des molécules fluorescentes ou phosphorescentes (voir **Figure 3**). Quand la molécule est excitée, un photon $h\nu_A$ est *absorbé* par la molécule photoluminescente. Toutes les molécules préfèrent être relaxées dans leur état fondamental d'énergie la plus basse, l'excédent d'énergie peut être réémis sous plusieurs formes : chaleur, mouvement et luminescence avec une longueur d'onde différente. Cette émission de photons spontanée peut être plus ou moins intense et rapide. Les émissions rapides et intenses (10^{-9} à 10^{-6} s) correspondent à la **fluorescence**, les émissions plus lentes et moins intenses à de la **phosphorescence** (10^{-3} à 10 s). Dans le second cas, le retour à l'état fondamental se fait en passant par un état intermédiaire dont la probabilité est moindre.

Un spectaculaire changement de couleur

Le retour à l'état fondamental de la molécule peut se faire en plusieurs étapes. Il en résulte une différence de longueur d'onde entre le photon absorbé $h\nu_A$ et le photon réémis par fluorescence $h\nu_F$ ou phosphorescence $h\nu_P$. Avant retour à l'état fondamental par émission de photon, il peut en effet se produire un phénomène de transition énergétique non radiative, dit de « conversion interne » : l'énergie absorbée par la molécule est en partie transférée au solvant (ou la matrice), sans émission de photon. La molécule peut alors passer d'un état excité (ou d'un sous-état associé) à un état excité de moindre énergie (passage de S_2 à S_1 par exemple sur la **Figure 3**). Il peut aussi se produire d'autres transitions non radiatives dues à des phénomènes de relaxation vibrationnelle. À chaque niveau énergétique principal de la molécule (en trait gras dans la **Figure 3**) correspondent en effet des sous-niveaux liés aux vibrations des liaisons de la molécule (en traits fins). Une molécule peut donc passer d'un sous-état vibrationnel à un autre (au sein du même niveau S_1 par exemple sur la **Figure 3**). C'est seulement ensuite qu'elle émet un photon, qui a alors une énergie plus faible que celle du photon absorbé, donc une fréquence plus faible et une longueur d'onde plus élevée. Par exemple, si les radiations absorbées sont violettes ou bleues, les radiations émises sont décalées vers le vert et le rouge. La fluorescence consiste en l'émission de photons $h\nu_F$ émis directement après ces deux types de transitions non radiatives.

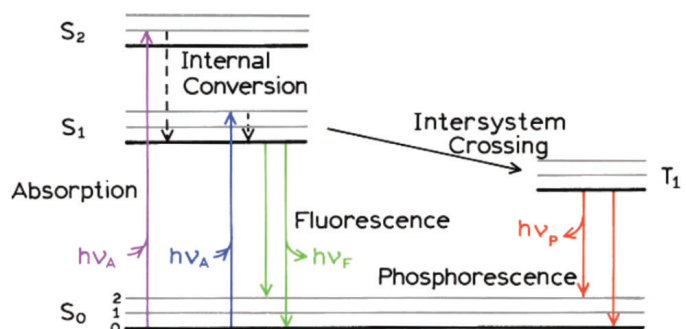


Figure 3 – Diagramme de Jablonski : niveaux énergétiques d'une molécule et transitions énergétiques associées aux phénomènes d'absorption $h\nu_A$, de fluorescence $h\nu_F$ et de phosphorescence $h\nu_P$. Remarques : aux niveaux énergétiques principaux de la molécule (traits gras) sont associés des sous-niveaux vibrationnels (traits fins) ; la transition interne vers T_1 concerne l'état triplet ; les transitions de fluorescence et de phosphorescence sont bien sûr avec changement de fréquence mais toujours avec une longueur d'onde plus élevée.

Fluorescence ou phosphorescence ? Une affaire de spin

Une autre étape intermédiaire avant retour à l'état fondamental peut consister en une conversion dite « inter-système ». Elle consiste en un retournement spontané de spin de l'état associé (passage de l'état singulet S_1 à l'état triplet T_1 sur la Figure 3). À un état énergétique principal (associé au nombre quantique principal n) peuvent en effet correspondre plusieurs états possibles de la molécule. Au nombre quantique principal $n = 2$ peut correspondre un état singulet S_1 dans lequel les électrons sont de spins opposés $\uparrow\downarrow$, ou un état triplet T_1 de plus basse énergie dans lequel deux électrons ont des spins parallèles $\uparrow\uparrow$. Le passage de l'un à l'autre se fait par retournement de spin. L'émission de photons $h\nu_P$ émis après cette dernière transition non radiative constitue le phénomène de phosphorescence. Les photons $h\nu_P$ émis par phosphorescence sont moins énergétiques et ont une longueur d'onde plus élevée que les photons $h\nu_F$ émis par fluorescence. Les états triplets T_1 sont moins probables que les états singulets S_1 . L'émission lumineuse par phosphorescence est donc plus longue et moins intense que l'émission lumineuse par fluorescence.

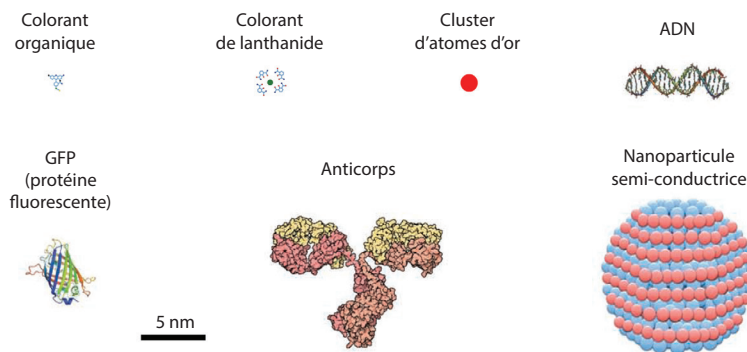


Figure 4 – Exemples de molécules fluorescentes et biologiques.

Sur la figure 4 se trouvent plusieurs exemples de molécules fluorescentes. Certaines d'entre elles sont d'origine biologique, ce qui permet d'imaginer des applications médicales de la photoluminescence.

APPLICATIONS DE LA PHOTOLUMINESCENCE AU DIAGNOSTIC MÉDICAL

La détection des biomarqueurs grâce au transfert d'énergie de Föster ou FRET

Une nouvelle application au diagnostic médical de la photoluminescence repose sur le principe du « transfert d'énergie de Föster » (FRET) entre une molécule fluorescente dite *donneur* et une autre *accepteur*. On excite la molécule donneur pour générer sa fluorescence. Si le donneur et l'accepteur sont éloignés, il n'y a pas d'interaction entre ces deux molécules et les photons émis par fluorescence sont caractéristiques du donneur (voir Figure 5A). Si le donneur et l'accepteur sont séparés de moins de 10 nm, l'excitation du donneur conduit à une fluorescence caractéristique de l'accepteur. Les photons émis par fluorescence par le donneur sont en effet absorbés par l'accepteur et réémis à nouveau par fluorescence. La modification de spectre associée est caractéristique du donneur, de l'accepteur et de leur interaction (voir Figure 5B).

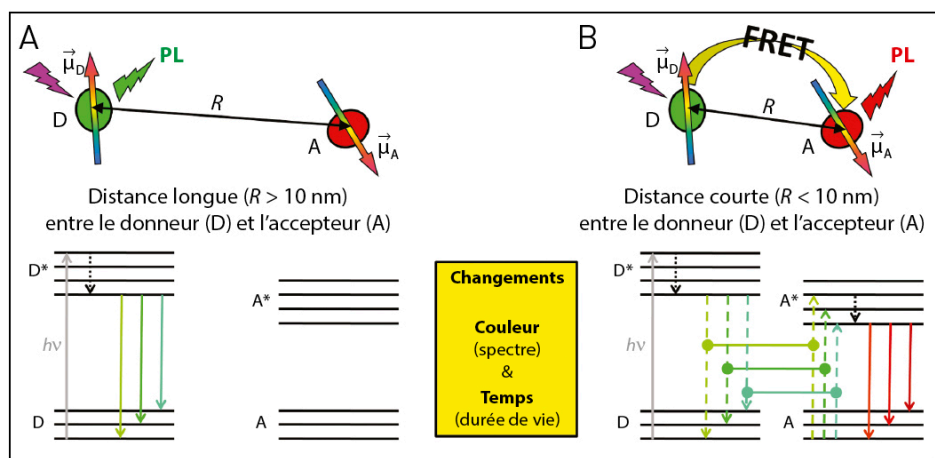


Figure 5 – Transfert d'énergie de Föster (FRET) ; A) si le donneur et l'accepteur sont trop éloignés, le donneur excité retourne dans son état fondamental en émettant une énergie sous forme de la luminescence qui le caractérise ; B) si le donneur et l'accepteur sont suffisamment proches, le donneur transmet son énergie à l'accepteur, qui retournera à l'état fondamental en émettant une luminescence caractéristique du donneur, de l'accepteur et de leur interaction.

La détection de biomarqueurs par la technologie TRACE : application au diagnostic médical

Certaines maladies infectieuses, les maladies cardiovasculaires, le diabète, le cancer, les diagnostics prénataux sont associés à des bio marqueurs. Ces molécules sont à l'origine de la reconnaissance biologique de la maladie par nos anticorps : deux anticorps interagissent avec un biomarqueur. Le principe de la méthode de

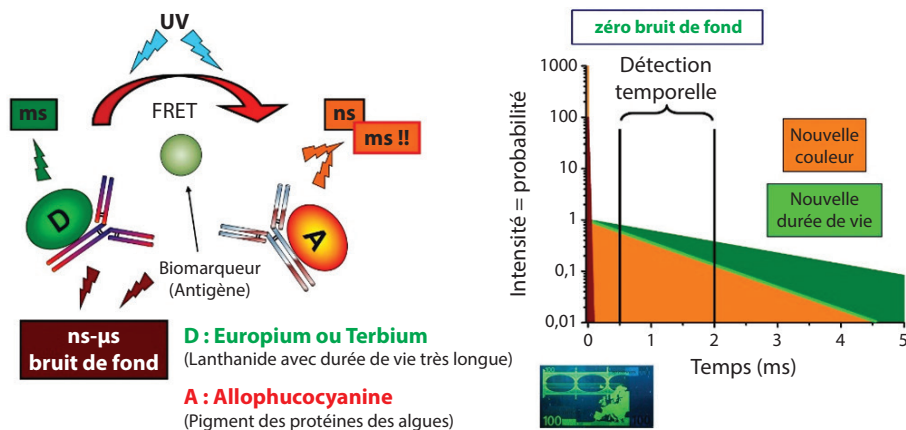


Figure 6 – L'immunodosage TRACE peut être utilisé pour le diagnostic de maladies infectieuses, cardiovasculaires, diabète et métaboliques, cancer, ainsi que pour le diagnostic prénatal. Le terbium, qui présente une luminescence avec une durée de vie très longue quand on les excite dans l'UV, est fixé aux antigènes. La présence d'un biomarqueur lié aux antigènes diminue la distance donneur-accepteur, et modifie la couleur et la durée de vie de la luminescence.

diagnostic sera de détecter le biomarqueur et de lire les informations transmises par le biomarqueur sur l'état de la maladie car le biomarqueur est reconnu par deux anticorps.

Nos anticorps contiennent naturellement de l'euro-pium et du terbium qui sont photoluminescents sous UV. Un anticorps contenant de l'euro-pium ou du terbium joue le rôle de donneur. Un anticorps marqué par un colorant comme l'allophycocyanine

joue celui d'accepteur. En l'absence de biomarqueur d'une maladie, quand on excite dans l'UV l'anticorps donneur, le donneur et l'accepteur sont trop éloignés et la couleur, l'intensité et la durée de vie de la photoluminescence sont caractéristiques de l'euro-pium ou du terbium du donneur. En présence d'un biomarqueur, il se produit un phénomène de reconnaissance biologique qui rapprochent les anticorps donneur et accepteur. Un transfert d'énergie de Förster peut alors se faire, ce qui entraîne l'émission d'un rayonnement de photoluminescence d'une nouvelle couleur et d'une nouvelle durée (voir Figure 6) caractéristiques de la nature du biomarqueur, donc de la maladie. Cette technologie d'analyse porte le nom de TRACE (Time-Resolved Amplified Cryptate Emission) et a vu le jour en France en collaboration avec le prix Nobel de chimie Jean-Marie Lehn.

Variations autour du FRET

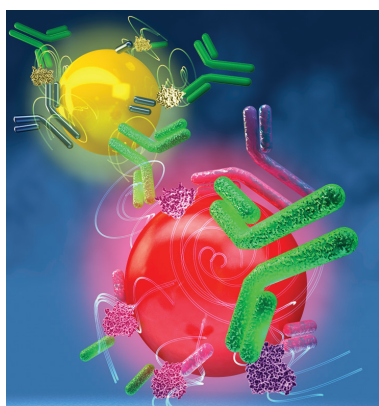


Figure 7 – Cinq paires d'anticorps peuvent se fixer sur cinq biomarqueurs différents pour permettre une détection multiplexée.

Afin de multiplier les informations sur la maladie, plusieurs variations de la technologie précédentes ont été développées ou sont en cours de développement. C'est par exemple le cas du FRET multiplexé (voir Figure 7). Dans ce cas, on étudie plusieurs biomarqueurs et plusieurs paires d'anticorps. Le recours à plusieurs biomarqueurs est nécessaire car un biomarqueur n'est pas spécifique à une seule maladie : la concentration en un biomarqueur peut augmenter aussi bien sous l'effet d'un rhume que sous celui d'un cancer du poumon. On analyse alors les transferts entre le terbium et 5 types de colorants différents.

Il est aussi possible de découper les anticorps et de les fixer à des nanoparticules. Cela permet de multiplier les interactions anticorps-biomarqueur et d'obtenir une reconnaissance biologique plus fine. Enfin, si les biomarqueurs utilisés sont de l'ADN ou de l'ARN qui jouent un rôle important pour de nombreuses maladies ou états biologiques, on peut en augmenter la quantité dans l'échantillon analysé par polymérase, c'est-à-dire par réplication enzymatique de ces molécules. On augmente alors l'intensité des signaux mesurés et donc la sensibilité de détection et avoir accès à des concentrations même très faibles.

CONCLUSION

L'interaction lumière-matière est riche d'applications. On a peut-être plus fréquemment connaissance de la spectroscopie dans le domaine médical : radiologie, scanner et IRM. Les propriétés de photoluminescence des molécules biologiques sont maintenant elles aussi à même de fournir leur lot d'informations pour affiner un diagnostic et détecter des cancers dans le sang, les cellules, les tissus. Leur étude constitue une partie de la nanobiophotonique, une spécialité probablement promise à de nombreux développements.

SOURCES PRINCIPALES

Chimie et biologie de synthèse – Les applications, EDP Sciences, 2019, ISBN : 978-2-7598-2315-4, « Diagnostic médical à l'échelle nanométrique : détection des biomarqueurs des maladies par des technologies de fluorescence » par Niko Hildebrandt.

La lumière vivante : chimie de la bioluminescence, <https://www.scienceinschool.org/fr/content/la-lumi%C3%A8re-vivante-chimie-de-la-bioluminescence>

Pierre Labarbe est professeur agrégé de physique-chimie

Comité éditorial : Danièle Olivier, Jean-Claude Bernier, Grégory Syoen