

INTRODUCTION

L'objet de ce document est de donner aux utilisateurs de la plateforme ARPEGE des notions fondamentales sur le transfert d'énergie par résonance (RET, *Resonance Energy Transfer*) et sur les techniques qui permettent de valider la spécificité d'une interaction entre deux molécules. Le principe de ces techniques sera illustré à travers des exemples d'interactions protéine-protéine.

I – LE TRANSFERT D'ENERGIE PAR RESONANCE (RET, *RESONANCE ENERGY TRANSFER*)

La luminescence peut se définir comme une émission de lumière (photons) par une molécule luminescente (fluorophore, enzyme, etc.). Parmi les phénomènes de luminescence, on distingue la photoluminescence (fluorescence, phosphorescence) qui est consécutive à une excitation lumineuse, la chimioluminescence dont l'émission de lumière est consécutive à une réaction chimique et la bioluminescence qui est déclenché par une réaction enzymatique. Lorsque deux molécules luminescentes (appelées respectivement le donneur et l'accepteur d'énergie) sont à proximité, il peut se produire un transfert d'énergie (RET) du donneur vers l'accepteur. Ce phénomène se traduit par l'extinction totale de la luminescence (fluorescence, bioluminescence, chimioluminescence) du donneur et par l'apparition d'une émission de fluorescence de l'accepteur. Ce transfert d'énergie est non radiatif, c'est-à-dire qu'il s'effectue sans émission de lumière. Pour des raisons de simplification, les exemples ci-après décriront uniquement le processus de transfert d'énergie intervenant entre deux molécules fluorescentes (fluorophores¹).

A/ DONNEUR D'ENERGIE SEUL

En l'absence de fluorophore accepteur, l'énergie des photons provenant d'une source lumineuse d'excitation est absorbée par le fluorophore donneur qui passe dans un état excité (modification de la répartition de ses électrons par rapport à l'état fondamental). Pour que le fluorophore passe dans un état excité, il est indispensable que l'énergie des photons absorbés soit supérieure ou égale à la différence d'énergie (ΔE) entre l'état fondamental et l'état excité. Le retour de l'état excité vers l'état fondamental (de plus basse énergie) peut se faire de différentes manières, notamment par l'émission rapide (nanosecondes) d'un photon (dit photon de fluorescence) à une longueur d'onde donnée. Le diagramme simplifié de Jablonski de la Figure 1 illustre ce phénomène.

¹ Une molécule fluorescente (ou fluorophore) possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission).

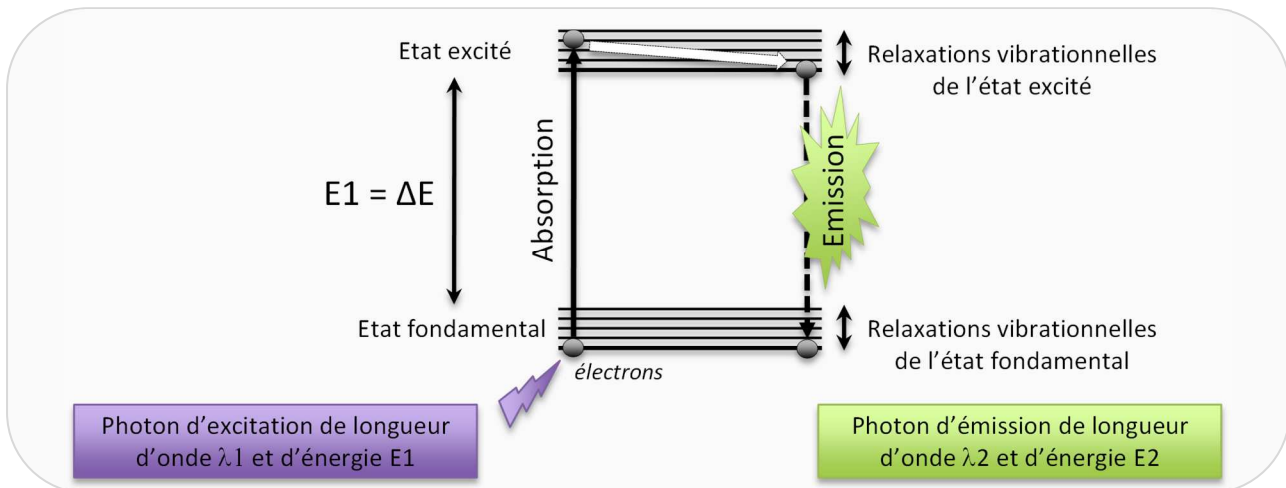


Figure 1. Diagramme de Jablonski : émission de fluorescence. ΔE correspond à la différence d'énergie entre l'état fondamental et l'état excité. L'énergie apportée par les photons de la source lumineuse (E_1) doit être égale à ΔE pour faire passer le fluorophore dans un état excité. Les photons émis par le fluorophore lors de sa relaxation ont une énergie $E_2 < E_1$ soit une longueur d'onde $\lambda_2 > \lambda_1$. Ceci est la conséquence de la dissipation d'une partie de l'énergie par relaxation vibrationnelle c'est-à-dire sous forme de vibration des atomes de la molécule et/ou de chaleur.

La relation entre l'énergie d'un photon et sa longueur d'onde est donnée par la formule suivante :

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{et donc} \quad \lambda = \frac{hc}{E}$$

où E représente l'énergie du photon, h la constante de Planck², ν la fréquence, C la vitesse (célérité) de la lumière dans le vide³ et λ la longueur d'onde du rayonnement. L'énergie d'un photon est donc inversement proportionnelle à sa longueur d'onde. Par conséquent, une source lumineuse dans l'ultraviolet (petites longueurs d'ondes) est beaucoup plus énergétique qu'une source lumineuse dans le rouge (grandes longueurs d'ondes).

Comme un fluorophore possède plusieurs niveaux excités, il peut absorber des photons de différentes longueurs d'ondes (Figure 2). Il en résulte **la notion de spectre d'absorption** (généralement superposable au spectre d'excitation) propre à chaque fluorophore. Le spectre d'absorption de la Figure 2, représente la probabilité d'absorption par le fluorophore de l'énergie d'un photon d'excitation à chaque longueur d'onde.

² Constante de Planck : $h = 6,62606957 \times 10^{-34} \text{ J.s.}$

³ Vitesse de la lumière dans le vide : $c \approx 300000 \text{ km.s}^{-1}$.

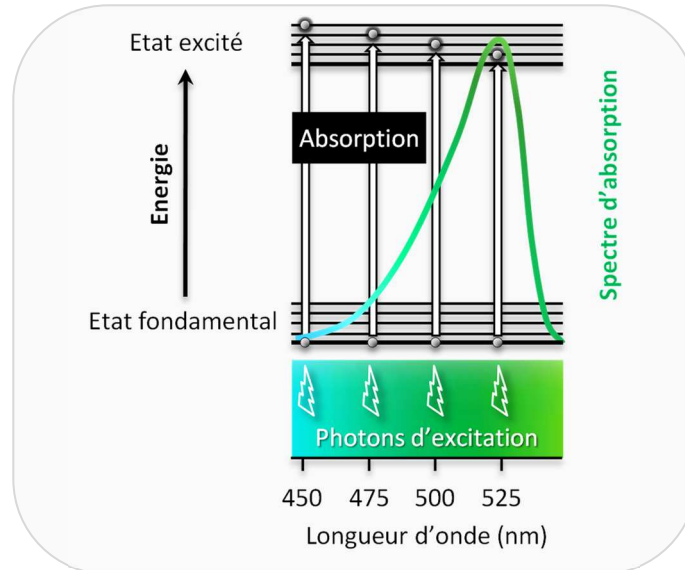


Figure 2. Le spectre d'absorption. Ce fluorophore absorbe principalement l'énergie de photons provenant de sources lumineuses émettant dans le bleu-vert.

L'état d'excitation du fluorophore est toujours suivi par un retour vers un état plus stable de moindre énergie (état fondamental). On parle de processus de désexcitation. Les photons qui sont émis par un fluorophore au cours de sa désexcitation n'ont pas tous la même énergie et donc pas la même longueur d'onde. L'énergie des photons émis est fonction du niveau vibrationnel de l'état fondamental dans lequel se trouve le fluorophore après sa désexcitation (Figure 3)⁴. Il en résulte **la notion de spectre d'émission** caractéristique de chaque fluorophore.

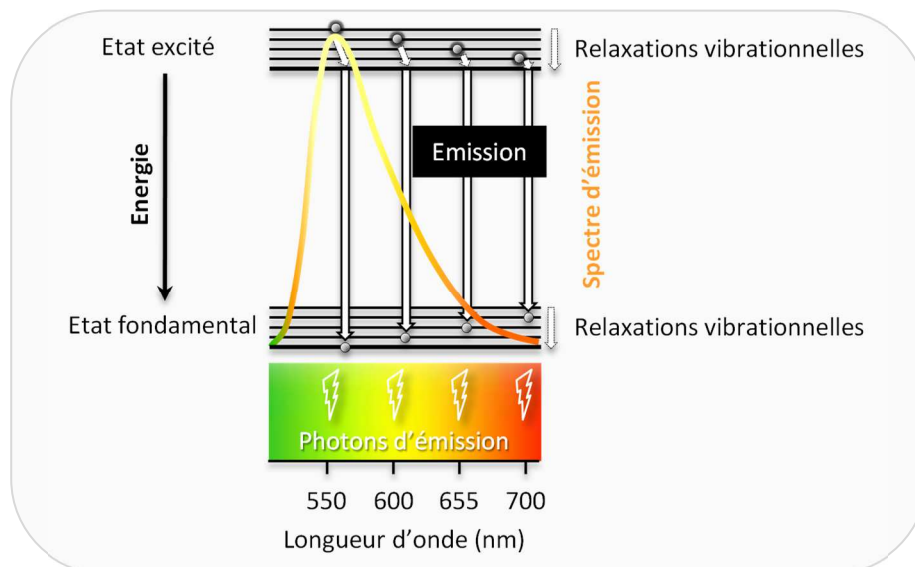


Figure 3. Le spectre d'émission. La désexcitation de ce fluorophore se traduit par une émission de photons dont les longueurs d'ondes correspondent principalement à la couleur jaune-rouge.

⁴ La désexcitation se fait toujours à partir de l'état vibrationnel le plus bas de l'état excité (loi de Kasha) car les processus de relaxation vibrationnelle intramoléculaire intervenant au niveau de l'état excité sont bien plus rapides (10^{-15} et 10^{-12} s) que ceux d'émission photonique (10^{-9} s).

La perte d'énergie entre les photons absorbés et les photons émis (conséquence des relaxations vibrationnelles qui s'opèrent au niveau de l'état excité), est responsable du décalage du spectre d'émission d'un fluorophore vers de plus grandes longueurs d'onde par rapport à son spectre d'absorption (Figure 4). C'est ce que l'on appelle le **déplacement de Stokes**. (Figure 1).

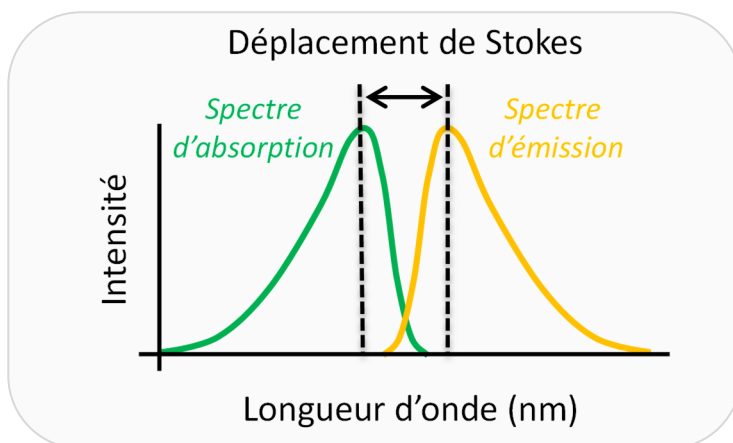


Figure 4. Le déplacement de Stokes.

B/ COUPLE DONNEUR – ACCEPTEUR

En présence de deux fluorophores donneur-accepteur d'énergie, le phénomène d'excitation du donneur suit le processus décrit précédemment mais sa désexcitation peut sous certaines conditions passer par un transfert d'énergie non radiatif sur l'accepteur (et non par l'émission directe d'un photon) (Figure 5). L'énergie de désexcitation du fluorophore donneur est donc « absorbée » par le fluorophore accepteur qui passe alors d'un état fondamental à un état excité. Le retour vers l'état fondamental de l'accepteur peut se faire par une émission d'un photon dont la longueur d'onde est plus grande que celle du photon qui aurait été émis par le fluorophore donneur en absence d'accepteur (Figure 5).

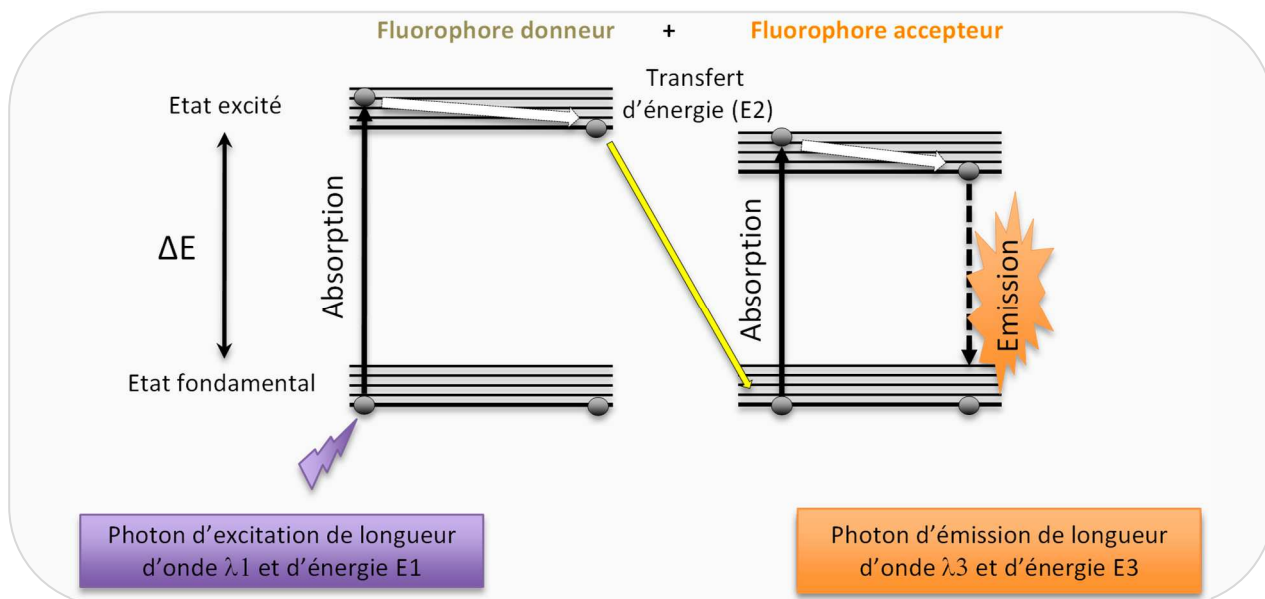


Figure 5. Diagramme de Jablonski : transfert d'énergie. Les photons émis par le fluorophore accepteur lors de son retour à l'état fondamental ont une énergie $E_3 < E_2 < E_1$ soit une longueur d'onde $\lambda_3 > \lambda_1$.