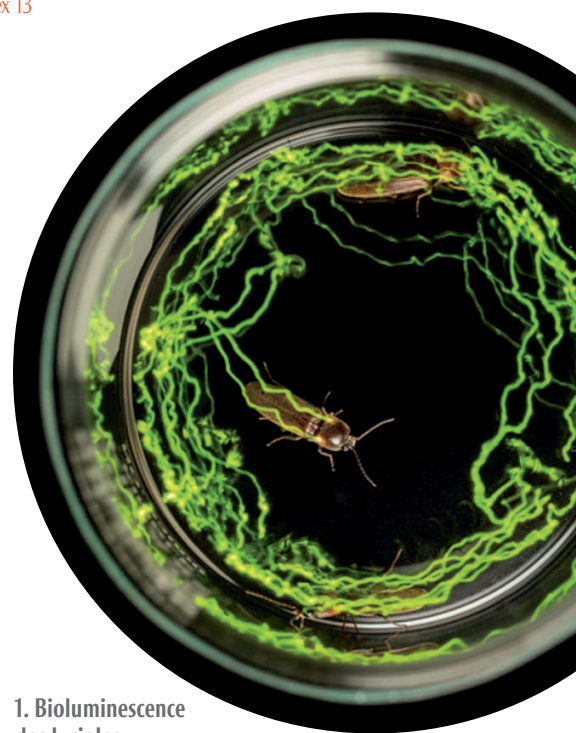


L'émission de lumière par le vivant, curiosité biologique et mine biotechnologique

Jean-Pierre Henry (jean-pierre.henry@univ-paris-diderot.fr)

Directeur de Recherche au CNRS

Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, Université Paris-Diderot, Bâtiment Condorcet, 10 rue Alice Domont et Léonie Duquet, 75205 Paris Cedex 13



1. Bioluminescence des lucioles.

Cette photographie, prise avec un long temps d'exposition, superpose l'émission lumineuse sur l'image de lucioles brésiliennes. La lumière provient d'organes spécialisés ; dans la nature, l'émission est en éclairs et elle a une fonction d'attraction sexuelle.

Source : National Geographic (<http://ngm.nationalgeographic.com/2015/03/luminous-life/liittschwager-photography>)

S'il existe d'autres animaux lumineux terrestres (parmi les vers de terre, mouches, et escargots), la plupart d'entre eux sont marins et on estime qu'en dessous de 400 mètres de profondeur, 90% des individus sont lumineux.

Revenons à la « phosphorescence » de la mer. Le terme est bien sûr erroné et il s'agit de la bioluminescence émise par des unicellulaires du plancton, dont le prototype est le dinoflagellé *Lingulodinium polyedron*, classé parmi les algues vertes (contenant un chloroplaste et capables de photosynthèse). Lorsqu'une suspension

La bioluminescence n'est pas une propriété générale du vivant. Néanmoins, c'est un phénomène assez commun chez des espèces appartenant à divers groupes du vivant. La diversité des fonctions et des réactions impliquées suggère une évolution convergente.

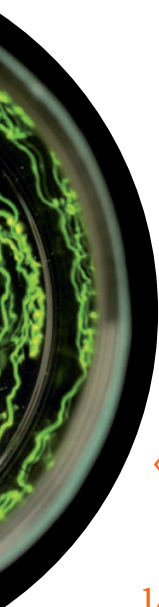
La bioluminescence implique des molécules différentes d'un système à l'autre, mais son mécanisme repose sur des bases communes. Il résulte généralement de l'oxydation d'un substrat (luciférine) par une enzyme (luciférase), créant un produit dans un état excité qui émet alors de la lumière.

Les spécificités de ces réactions offrent des possibilités biotechnologiques intéressantes.

Vous avez vraisemblablement déjà vu des « vers lumineux » dans la période chaude (voir la photo de la p. 52). Leur émission, vert jaune, apparaît incongrue dans la nuit. Peut-être avez-vous aperçu un vol de lucioles dans le sud de la France ou en Italie ? Si vous naviguez en mer de nuit, vous avez peut-être admiré la « phosphorescence » de la mer, associée à des étincelles produites par l'agitation de l'eau de mer. Ces phénomènes sont regroupés sous le terme « bioluminescence », émission de lumière par le vivant. Ils sont connus depuis l'Antiquité, et Pline le Jeune raconte le jus lumineux qui coule de la bouche des participants à une orgie où ils consomment un bivalve (coquillage) dont nous reparlerons, la pholade dactyle. Dans *Vingt mille lieux sous les mers*, le capitaine Nemo décrit la phosphorescence de la mer.

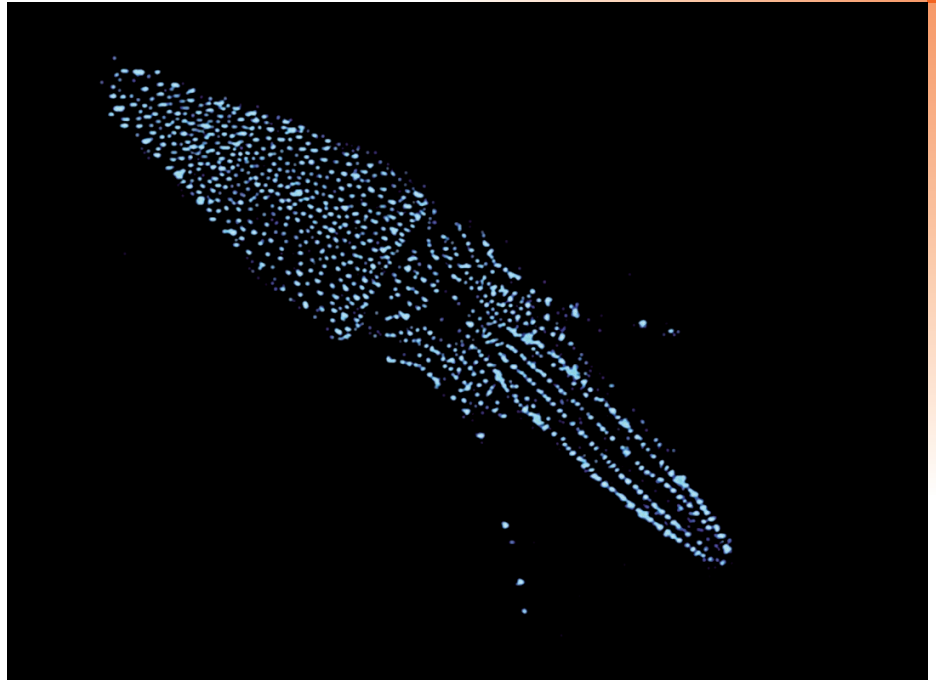
Diversité et fonctions de la bioluminescence

Voici quelques cas suffisamment connus de bioluminescence permettant de discuter ses possibles fonctions. Le « ver lumineux » ou lampyre n'est pas un ver, mais un insecte coléoptère. La femelle adulte a la forme de la larve (ver) et elle est lumineuse. Cette lumière a une fonction sexuelle qui lui permet d'attirer les mâles volants. La même fonction se retrouve chez la luciole (fig. 1), où les deux sexes volent : la lumière émise par la femelle posée lui sert à diriger le vol du mâle, lui-même lumineux.



« Les êtres lumineux se rencontrent à presque tous les degrés de l'échelle des organismes vivants, depuis l'infime microbe jusqu'aux vertébrés. Ils vivent dans les milieux les plus divers, dans l'air, dans la terre, dans l'eau sur tous les points du globe et jusqu'au fond des abysses de la mer. »

Raphaël Dubois,
Mécanisme intime de la production de la lumière chez les organismes vivants,
 Éditions A. Rey, Lyon (1913)



2. Bioluminescence de la seiche *Watasenia scintillans*. Ce petit céphalopode (7 à 8 cm) vit généralement en eau profonde (200 à 400 m). Il remonte à la surface pour se nourrir ou pour se reproduire. Il possède de nombreux photophores, sur les tentacules, autour des yeux et sur le corps, qui peuvent s'allumer de manière synchrone ou alternée. La bioluminescence lui sert à attirer les proies, effrayer les prédateurs (en particulier, en effaçant sa silhouette sur le fond lumineux de la surface de l'eau), et de signalisation. Au moment de la reproduction, des bancs serrés remontent vers la surface dans la baie de Toyama (Japon).

Source : Ocean Research and Conservation Association (www.oceanrecon.org/cfiles/images_restricted.cfm).

de ces organismes subit une agitation, les cellules répondent par l'émission d'un éclair lumineux bleu. Cette espèce peut proliférer, donnant lieu pendant la nuit à des éclairages spectaculaires. Les bancs de ce plancton matérialisent le passage de bateaux, de sous-marins ou de poissons. C'est de ce côté qu'a été cherchée la fonction de ces émissions. Ces algues servent de nourriture à un plancton plus gros, formé de petits crustacés (ostracodes) ; ceux-ci, en agitant les algues, amènent ces dernières à produire une lumière qui attire de plus gros prédateurs se nourrissant de ces petits crustacés. C'est l'hypothèse de l'alarme du cambrioleur. La bioluminescence aurait un rôle défensif.

Parmi les organismes pluricellulaires simples, on trouve les anthozoaires (animaux « fleurs » : anémones, corail) et les scyphozoaires (animaux « barques » : méduses). Dans ces deux groupes, on trouve des organismes bioluminescents : la pensée de mer (*Renilla reniformis*), dont les colonies de polypes dessinent une pensée, et la méduse américaine de petite taille, *Aequorea victoria*. Dans les deux cas, l'émission lumineuse apparaît après un stress : dans le premier, ce sont les polypes qui produisent la lumière et celle-ci se propage à travers la colonie, alors que dans le second, les cellules émettrices sont sur le pourtour de l'ombrelle.

Les mollusques comprennent les escargots (gastéropodes), les bivalves (moules) et les calmars (céphalopodes). C'est parmi ces derniers que se trouvent les espèces les plus spectaculaires comme *Thaumatomlampas diadema*, qui émet trois couleurs, ou *Watasenia scintillans*, aux multiples photophores (fig. 2).

Mais je voudrais m'attarder sur le bivalve *Pholas dactylus*, la datte de mer, dont j'ai étudié la bioluminescence au cours de ma thèse, dans les années 1970. Ce mollusque, à la coquille un peu fragile, perforé pourtant les roches tendres pour y creuser son terrier, et sa distribution est corrélée à la dureté des roches. En temps ordinaire, la coquille s'entrouvre et un siphon s'étend hors du trou. Lorsqu'il est perturbé, le mollusque contracte son siphon, rentre dans sa coquille et s'enfonce dans son trou en relâchant un mucus lumineux. Cette lumière est vraisemblablement destinée à masquer le trou, comme la seiche se dissimule dans son encre ! Rôle défensif ?

Cette stratégie défensive se retrouve chez d'autres organismes. Lorsqu'il est attaqué, le crustacé *Vargula hilgendorfi*, minuscule (2-3 mm) composant du plancton, produit une sécrétion lumineuse qui diffuse et égare l'agresseur.





3. Bioluminescence des poissons. Au-dessous de 400 m, la lumière du jour ne pénètre pas et de nombreux organismes sont lumineux. Ce poisson, *Chaenophryne longiceps*, est un poisson pêcheur qui utilise la lanterne bioluminescente devant sa gueule pour attirer les proies. La lanterne est une culture de bactéries lumineuses symbiotique. L'émission lumineuse peut avoir d'autres fonctions et le plus souvent elle n'est pas d'origine bactérienne. Source : The Bioluminescence Web Page (<http://biolum.eemb.ucsb.edu/organism/photo.html>).

>>>

La même diversité des fonctions de bioluminescence est observée chez les poissons. Les poissons pêcheurs femelles (fig. 3) possèdent une extension du premier rayon de leur nageoire dorsale avec un organe lumineux qui pend devant leur gueule, bien fournie en dents. Elles pêchent ainsi au lamparo ! *Photoblepharon*, un poisson phare de surface, possède un organe lumineux puissant situé sous l'œil, qui éclaire ses proies lorsqu'il pêche de nuit. Pour le poisson hachette, *Argyropelecus*, ou le poisson poney, *Leiognathus*, la lumière est défensive, dirigée vers le bas et destinée à compenser l'ombre du poisson vue en regardant vers la surface, plus lumineuse.

Ces différentes observations sont renforcées par des études anatomiques montrant souvent la présence d'équipements dioptriques servant à renforcer l'émission : réflecteurs, diaphragmes, lentilles. Mais il est parfois difficile de trouver une fonction à certaines émissions. Bactéries et champignons peuvent émettre une lumière continue, parfois vive. Certains poissons bioluminescents entretiennent des « cultures » de bactéries lumineuses (fig. 3). On a aussi décrit des mers laiteuses, lumineuses sur de grandes étendues, repérables par satellite !

Comment le vivant produit-il la bioluminescence ?

Les exemples précédents nous donnent à croire que l'émission de lumière n'est pas un « sous-produit » d'un phénomène ayant une autre fonction. Cette « lumière froide » est une chimiluminescence qui, si la lumière doit être vue, doit remplir trois conditions :

- i) son rendement quantique (nombre de photons émis par molécule consommée) doit être suffisamment élevé ;
- ii) sa distribution spectrale doit être compatible avec la sensibilité des récepteurs, c'est-à-dire des pigments visuels ;
- iii) sa cinétique, directement reliée au nombre de photons émis par seconde, doit être rapide, l'œil étant sensible à l'intensité lumineuse.

Historiquement, il est vite apparu que l'oxygène était indispensable : cette « lumière froide » est produite par une oxydation. Raphaël Dubois, professeur de physiologie à l'Université de Lyon, fut le premier (1887) à aborder la bioluminescence en termes moléculaires. Ses premiers travaux furent effectués sur des lucioles présentes dans des bois exotiques importés. Un extrait aqueux des lanternes émettait de la lumière pendant un

certain temps et si, après extinction, cet extrait était mélangé avec un second, chauffé pour en éteindre la lumière, alors le mélange des deux extraits, tous deux non lumineux, produisait de la lumière. Le second contenait une enzyme, la « luciférase », qui oxydait un substrat thermostable, la « luciférine », contenu dans le premier. En termes modernes, le produit de l'oxydation, l'oxyluciférine, était dans un état quantique excité et l'émission bioluminescente correspondait à sa fluorescence.

Ce principe de base est toujours valide, mais les successeurs américains de Dubois ont rapidement montré qu'il n'y avait pas une réaction unique responsable de toutes les bioluminescences : la luciférase de luciole n'oxyde pas la luciférine du crustacé *Vargula*. Il importe de préciser l'origine des réactifs pour définir une bioluminescence. Les chercheurs ont alors entamé des études approfondies des principaux organes lumineux. Par exemple, les étapes de la réaction du système de *Vargula* sont bien comprises : en termes spécialisés, la luciférine va être oxydée par la luciférase, avec une perte de CO_2 . La luciférine possède un noyau dit « imidazopyrazinone », qui est attaqué par l'oxygène moléculaire avec formation

d'un peroxyde cyclique de type dioxétanone, se décomposant en libérant une énergie suffisante pour laisser le produit dans un état quantique excité.

La luciférine de la pensée de mer (*Renilla*), la coelentérazine, diffère de celle de *Vargula*, mais ces deux molécules ont des structures voisines, ce qui suggère un mécanisme commun. Les travaux récents indiquent que la coelentérazine, ou des molécules apparentées, participent à la bioluminescence d'organismes variés, des crustacés, des céphalopodes et vraisemblablement la pholade. La luciférine de luciole a une structure chimique très différente. Toutefois, après activation en présence d'ATP, un peroxyde cyclique se forme en présence d'oxygène moléculaire, qui conduit à l'émission lumineuse.

En résumé, si les réactions lumineuses sont multiples, avec à chaque fois des luciférasés différentes, il semble que les structures permettant une émission lumineuse efficace ne soient pas si nombreuses et qu'un intermédiaire de type peroxyde cyclique soit souvent impliqué.

Comment les organismes bioluminescents contrôlent-ils leur émission lumineuse ?

L'étude des pigments visuels de 175 espèces de poissons des profondeurs marines a révélé que leur sensibilité spectrale s'étale de 468 à 494 nm, correspondant à la bande d'émission de bioluminescence, alors que la bande spectrale de la lumière passant à ces profondeurs s'étend de 450 à 475 nm. *La couleur des émissions de bioluminescence est donc contrôlée par la vision des couleurs des organismes du biotope.*

Certains organismes modifient la couleur de l'émission. Le cas le plus fameux est celui de la méduse *Aequorea* : le système de bioluminescence isolé *in vitro* produit une lumière bleue, différente de l'émission *in vivo*, centrée sur le vert. L'explication repose sur un transfert d'énergie impliquant une protéine fluorescente verte, la fameuse "Green Fluorescent Protein" (GFP).

D'autres organismes (insectes, poissons, céphalopodes) émettent plusieurs couleurs. Un ver luisant sud-américain, *Phrixothrix*, le ver « chemin de fer », est doté d'organes émettant dans le vert sur chaque anneau du corps et dans le rouge sur la tête !

Pourtant l'animal ne possède qu'une seule luciférine, mais de petites variations de la séquence d'acides aminés de la luciférase entre le corps et la tête expliquent cette caractéristique.

Quant à l'intensité de l'émission bioluminescente, elle est proportionnelle à la vitesse de la réaction d'oxydation qui représente le facteur clé. Ceci est plutôt inhabituel en enzymologie, où la quantité de produit fourni prime généralement sur la cinétique. Lorsque la luciférine et la luciférase sont sécrétées, comme chez le crustacé *Vargula*, la luminescence diminue rapidement lorsque le substrat et l'enzyme diffusent dans l'eau de mer. Plusieurs solutions originales permettent de limiter cet effet.

Chez l'unicellulaire *Lingulodinium*, luciférine et luciférase sont concentrées dans une microstructure enveloppée par une bicouche lipidique, le « scintillon ». Rappelons que ces microalgues réagissent aux chocs. Au repos, la réaction est bloquée car : i) le pH de la structure n'est pas optimal pour la luciférase ; ii) la luciférine est complexée à une protéine qui lui interdit de réagir avec la luciférase. Un choc ouvre des canaux ioniques de la membrane du scintillon, provoquant l'acidification de la structure. Le pH devient optimum pour la luciférase et l'acidité libère la luciférine, ce qui permet une émission intense et brève, sous forme d'un éclair.

Chez la méduse *Aequorea*, c'est un saut de la concentration en ions Ca^{2+} qui constitue la « gâchette » : à partir de l'animal, on isole une protéine soluble (l'aequoréine) qui émet un éclair de lumière bleue quand des ions Ca^{2+} sont ajoutés, sans requérir d'oxygène ! On parle de « système préchargé » ou de « photoprotéine ». En effet, cette protéine est une luciférase qui a démarré l'oxydation de son substrat, la coelentérazine, et a absorbé l'oxygène moléculaire, mais qui, en l'absence de Ca^{2+} est bloquée dans un état métastable ; l'émission ne viendra qu'après l'addition de Ca^{2+} , qui permet l'évolution vers l'état radiatif. L'enzyme n'a aucun taux de renouvellement, mais la protéine travaille toujours à sa vitesse maximale.

L'existence de systèmes préchargés se retrouve dans d'autres organismes, avec des « gâchettes » différentes. Par exemple, la « luciférine » de la pholade, décrite par Dubois, est un système préchargé dont

l'émission est déclenchée par les ions superoxyde.

Avant de quitter la régulation de l'émission, revenons aux bactéries. Nous nous sommes interrogés sur cette fonction, coûteuse pour ces cellules et, en fait, lorsque la bactérie est libre, elle ne synthétise pas de luciférase. En revanche, dans un milieu confiné, l'enzyme est induite : la bactérie sécrète continuellement un inducteur qui se dilue dans le milieu, mais voit sa concentration augmentée en milieu confiné. C'est le phénomène du « quorum sensing » ; au-delà d'un seuil, cette molécule déclenche la synthèse de l'enzyme. Dans la nature, ce confinement se produit dans les organes d'un hôte (poisson, céphalopode), qui profite de la lumière bactérienne et fournit à ses invités « le gîte et le couvert » : c'est une symbiose.

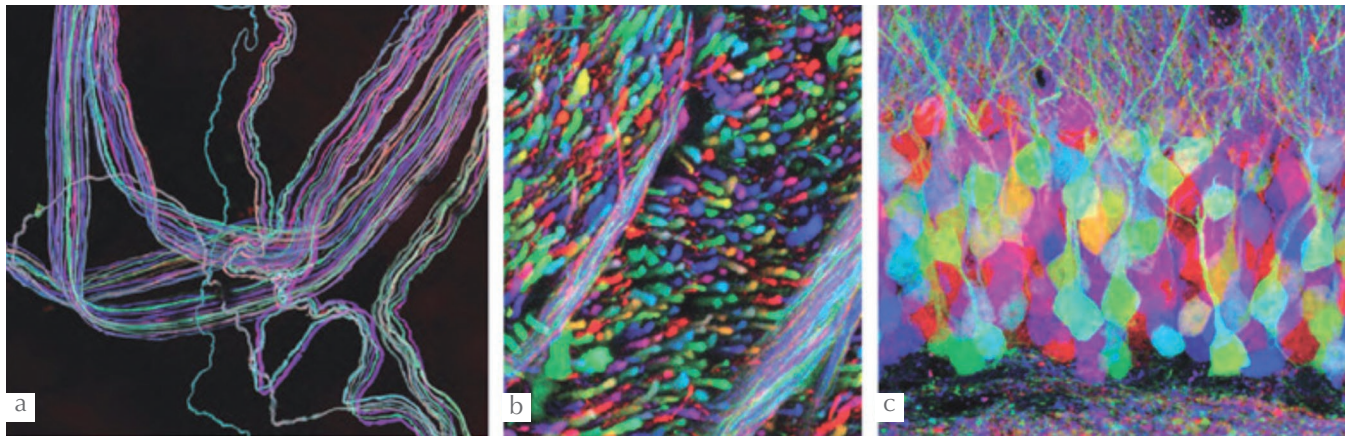
Les applications de la bioluminescence

« La meilleure lumière pour l'éclairage serait celle qui contiendrait la quantité maximale de radiations de longueur d'onde moyenne unie à la quantité minimale de radiations calorifiques et chimiques. À l'heure actuelle, ce qui se rapproche le plus de cet éclairage idéal, c'est la lumière froide physiologique, dite lumière vivante. » (Raphaël Dubois, op. cit.)

À l'Exposition universelle de Paris en 1900, Raphaël Dubois fut chargé d'éclairer une salle consacrée à l'optique. Des lampes contenant un bouillon de gélatine inoculé par des bactéries lumineuses avant solidification éclairaient des bustes et Dubois soulignait l'intérêt de ces lampes, incapables de mettre le feu aux draps de lecteurs nocturnes ! Cet aspect anecdotique garde toujours des supporters. Une *start-up* américaine, *Glowing Plant*, propose des plantes transgéniques exprimant la luciférase bactérienne, permettant d'éclairer à faible coût des espaces privés ou publics. Dans le même style, *Glowee* est une jeune entreprise française qui développe des éclairages urbains à partir de bactéries lumineuses.

Cependant, c'est pour les laboratoires que les applications sont les plus intéressantes. Certaines réactions luciférine-luciférase requièrent des facteurs supplémentaires, comme l'ATP utilisé par le système de la luciole. Il est alors possible d'utiliser ce système pour doser l'ATP de manière

»»»



4. Marquage multicolore de neurones du cerveau de souris par la technique *Brainbow*. Trois variants de la protéine GFP, de couleur rouge, jaune et cyan ont été exprimés en combinaisons aléatoires produisant 160 couleurs différentes, qui permettent de suivre un neurone dans un ensemble complexe.

- (a) Nerf moteur innervant un muscle de l'oreille.
 (b) Faisceau d'axones dans le tronc cérébral.
 (c) Le *gyrus* dentelé de l'hippocampe.

Source : figure 3 de Lichtman et al., *Nature Review Neuroscience* 9 (2007) 417.



sensible et peu coûteuse. De même, la « luciférine » de la pholade, rebaptisée « pholasine », est exploitée pour tester les ROS (*Reactive Oxygen Species*, radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire). L'aequoréine, est un réactif très sensible aux ions Ca^{2+} qui jouent un rôle important dans la transmission nerveuse : son introduction par micro-injection dans un neurone permet de suivre en temps réel son activité.

Depuis un certain temps, les biologistes s'intéressent à la bioluminescence pour trouver des alternatives à l'usage des radioisotopes *in vivo*. Par exemple, le radio-immunos dosage utilise l'affinité d'un anticorps pour un antigène et l'anticorps est marqué isotopiquement ; il peut aussi être marqué par un couplage avec une luciférase, qui révèle le complexe par une émission lumineuse.

Les progrès technologiques permettent maintenant des essais de marquage *in vivo* sur de petits animaux. Une publication récente décrit la progression du virus de la bronchiolite chez la souris, suivie en bioluminescence par la luciférase de luciole, couplée à une protéine du virus.

Il est certain que tous ces développements ont bénéficié des progrès de la génétique moléculaire. À partir du moment où le gène d'une luciférase est connu, la règle du jeu sera de l'insérer dans l'ADN d'une cellule de manière à utiliser l'émission lumineuse comme « reporter » d'un événement cellulaire. Par exemple, dans une cellule, une faible fraction des gènes est exprimée à un

instant donné. Ces gènes sont sortis de la banque de données que représente l'ADN nucléaire, par des systèmes très contrôlés : c'est la transcription. Coupler un gène de luciférase avec un de ces systèmes permet de définir les conditions d'expression du gène. Les biotechnologies offrent de grands catalogues de gènes de luciférase, avec de nombreux mutants permettant l'adaptation des systèmes.

Toutefois, les produits les plus populaires ne sont pas les luciférases mais la GFP, responsable du transfert d'énergie chez la méduse. Le gène correspondant a été introduit dans des cellules variées, sous des contrôles différents permettant des applications multiples ; cela va des animaux fluorescents, comme les poissons d'aquarium commercialisés, jusqu'au marquage des neurones de souris. La cible peut être un type cellulaire, un organe subcellulaire ou une macromolécule, ce qui a fait de cette technologie un outil indispensable en biologie.

Parallèlement, la GFP a été perfectionnée par mutagenèse pour améliorer la stabilité et le rendement quantique, et des variants aux couleurs multiples ont été dérivés. Dans la technique *Brainbow*, les neurones expriment des combinaisons aléatoires de protéines de couleurs différentes, produisant une palette d'une centaine de nuances. La diversité des couleurs permet d'individualiser les neurones dans des ensembles complexes (fig. 4). Des transferts d'énergie sont possibles entre protéines de différentes couleurs, et l'association de ces protéines avec des composants cellulaires est une méthode pour tester la formation de complexes cellulaires.

La richesse de ces applications a impressionné le jury du prix Nobel de chimie qui, en 2008, a récompensé Osamu Shimomura, l'auteur des études sur la méduse, et Martin Chalfie et Roger Tsien, qui ont fait de la GFP un outil indispensable aux biologistes. ■

Bibliographie sommaire

- Thérèse Wilson et J. Woodland Hastings, *Bioluminescence, Living Lights, Lights for Living*, Harvard University Press (2013). [Un ouvrage complet et bien illustré, par les meilleurs spécialistes du sujet.]
- *The Bioluminescence web page* : <http://biolum.eemb.ucsb.edu/> [Un site régulièrement modifié donnant beaucoup d'informations intéressantes.]
- O. Shimomura, *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*, World Scientific Publishing Co (2006). [Un ouvrage très détaillé, écrit par un spécialiste.]
- E. Newton Harvey, *Bioluminescence*, Academic Press (1952). [Le livre qui m'a initié à la bioluminescence et qui reste intéressant sur le plan zoologique.]
- <http://bibulyon.hypotheses.org/5941>. [Site de l'Université de Lyon qui, pour 2015 Année de la lumière, présente les travaux de Raphaël Dubois, le « père » de la bioluminescence.]