

## Prix Nobel de Chimie 2008

Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien

# Osamu Shimomura

Marie-Thérèse Nicolas, Marc Moreau



M.T. Nicolas : LIRDEF, Didactique et Socialisation, UM2, CC077, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France.

M. Moreau : Centre de Biologie du Développement, UMR 5547, CNRS, Université Paul Sabatier, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 09, et GDR 2688, Toulouse, France. [moreau@cict.fr](mailto:moreau@cict.fr)

Le prix Nobel de Chimie 2008 a été attribué à trois chercheurs, Osamu Shimomura, Roger Tsien et Martin Chalfie, pour leurs travaux sur une protéine fluorescente la GFP (*Green Fluorescent Protein*) extraite d'une méduse. Il n'est plus besoin de présenter cette protéine et ses utilisations. Dans cet article, nous rendons hommage au premier d'entre eux : Osamu Shimomura qui est à l'origine et représente le socle de tous ces travaux. O. Shimomura a apporté une contribution majeure dans le domaine de la biologie cellulaire avec la GFP (la vedette de ce Nobel), mais aussi dans le domaine de la chimie de la bioluminescence et surtout ne l'oublions pas dans la mesure du calcium avec l'aequorine. Il faut aussi souligner l'exemplarité de son parcours de recherche dévoué exclusivement à la recherche fondamentale, à une époque où la rentabilité, la rapidité et la production en masse deviennent un critère « d'excellence ». Le tout allié à une rigueur implacable, une honnêteté et une éthique sans faille.

### Contributions en biologie cellulaire

Les deux contributions majeures de Shimomura à la biologie cellulaire sont la double découverte de l'aequorine et de la GFP. La découverte de la GFP a été fortuite et n'aurait pu avoir lieu sans le travail effectué à partir de 1961 sur l'extraction à grande échelle du système lumineux de la méduse *Aequorea*, devant conduire à la purification de l'aequorine. Au début du travail d'extraction, la GFP est apparue à O. Shimomura comme un contaminant, car la GFP n'existe qu'à l'état de traces dans la méduse. Dans l'interview réalisée quelques heures après l'attribution du prix Nobel ([www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)), il dit tout simplement : « *I didn't know any use of that protein, of that fluorescent protein, at that time,*

*until Chalfie discovered in 1994 that it can be expressed in living cells. So I had no idea of the applications of green fluorescent protein for a long time* ». Seule l'extraction à grande échelle a permis d'accumuler suffisamment de matériel pour caractériser la protéine. En 1979, O. Shimomura détermine la structure chimique du chromophore de la GFP, c'est une combinaison de trois acides aminés (Sérine-Tyrosine-Glycine) de la chaîne polypeptidique de la protéine composée de 238 acides aminés. La GFP a été clonée en 1992 par Douglas Prasher et Milton Cormier [1], et exprimée pour la première fois, en 1994 par Martin Chalfie [2], dans un eucaryote, le nématode *Caenorhabditis elegans*, ouvrant ainsi l'ère de la GFP en biologie cellulaire.

### Contributions en chimie de la bioluminescence

L'œuvre de O. Shimomura est loin de se limiter à ses travaux sur la GFP. Ses contributions à la chimie de la bioluminescence sont nombreuses et exceptionnelles. Travaillant pratiquement seul avec son épouse, avec un budget minuscule, il a décortiqué l'un après l'autre pratiquement tous les mécanismes chimiques de la bioluminescence (l'ostracode *Cypridina*, la luciole, *Aequorea*, *Luminodesmus*, *Chaetopterus*...) Il a collaboré avec le groupe de J.W. Hastings aux États-Unis pour le système des Dinoflagellés [3] et avec celui de J.M. Bassot, en France, pour le système des Annélides polynoïdiens [4]. En 1960, à l'Université Princeton, Frank Johnson confia à O. Shimomura la caractérisation du système lumineux de la méduse *Aequorea*. C'est une petite méduse de quelques centimètres de diamètre et que l'on récoltait, jusqu'au milieu des années 1980, en abondance sur la côte ouest des États-Unis près de Friday Harbor. Les



propriétés d'émission de lumière de cette méduse étaient connues depuis que Petrus Forskal en 1775 l'avait mentionné dans son mémoire [5]. O. Shimomura, suivant le dogme en vigueur des réactions lumineuses luciférine-luciférase a commencé par rechercher l'enzyme et le substrat d'une réaction lumineuse. La réaction luciférine-luciférase, de type enzyme-substrat, a été démontrée à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle par le physiologiste Lyonnais Raphaël Dubois [6] et a été retrouvée et étudiée avec succès dans de nombreux systèmes bioluminescents dont le plus célèbres est celui de la luciole. Il se lança avec F. Johnson dans une frénésie d'extractions en tout genre investissant temps et énergie, sans succès. S'ensuivit alors une période de réflexion et d'analyse, et, dit-il, « pour résoudre le problème, il a fallu ignorer les théories existantes ». Il eut l'idée de proposer un autre type de réaction qui était un système qu'il a défini comme préchargé, où l'enzyme et son substrat sont si étroitement lié qu'il n'est pas possible de les séparer au cours des procédures d'extraction, sans perdre les propriétés d'émission de lumière. Rapidement, il put montrer que le système lumineux d'*Aequorea* était composé d'une apoprotéine associée à une petite molécule constituant le chromophore (la coelentérazine). Le déclencheur de la réaction lumineuse était simplement l'ion calcium qui, en se liant, induit une modification de la conformation de la apoprotéine, permet de libérer le chromophore qui émet alors un photon [7]. Il nomma cette protéine « aequorine ». La découverte de son mécanisme d'activation a provoqué un véritable changement de paradigme dans la chimie de la bioluminescence. O. Shimomura a proposé le concept de « photoprotéine ». Cette avancée théorique a été complètement oubliée dans les attendus de l'attribution du Nobel. O. Shimomura a introduit une nouvelle conception en bioluminescence et proposé un nouveau type de réaction. En effet, dans une réaction luciférine-luciférase, deux entités totalement séparées sont en jeu. Cette réaction chimique nécessite de l'énergie pour porter la luciférine à l'état excité et produire des photons. Dans le cas d'une photoprotéine, l'émission de lumière n'est pas le résultat d'une réaction chimique mais d'une liaison, d'une association avec une petite molécule, ici le calcium. Conséquence de cette liaison, la photoprotéine modifie sa conformation et sans aucune énergie dépensée peut émettre des photons. Les retombées de la découverte de l'aequorine furent très importantes. Sa sensibilité et son affinité vis-à-vis du calcium en firent la sonde idéale pour mesurer les variations de concentration intracellulaire de calcium [7]. C'est en 1967 que E. Ridgway et C. Ashley mirent à profit les propriétés de l'aequorine pour étudier les mouvements de calcium dans un système biologique. Ils ont enregistré, dans la fibre musculaire de balane (crustacé) les mouvements de calcium responsables de la contraction [8]. L'étude des voies de signalisation calciques devenait possible. Cependant, l'aequorine émet peu de photons et il fallut attendre 1978 pour effectuer les premières expériences d'imagerie calcique [9]. L'aequorine a été clonée en 1985 simultanément par deux groupes [10, 11] - Prasher *et al.* et Inouye *et al.*

- rendant la pêche de la méduse inutile. À l'origine, il fallait 500 kg de méduse pour isoler 5 mg d'aequorine. Ce clonage ouvrait la voie à la réalisation d'organismes transgéniques (aussi bien végétaux qu'animaux) exprimant l'aequorine. Dans ses recherches, Shimomura allie une rigueur implacable, une honnêteté, une éthique sans faille et une grande gentillesse, donnant sans compter et sans contrepartie les protéines qu'il purifie. À 80 ans, il continue à fournir, à de nombreux laboratoires, différentes formes d'aequorine pure. L'attribution du Nobel à O. Shimomura illustre que le travail de recherche fondamentale, lent, patient et tenace, s'inscrivant dans la durée est toujours et encore indispensable. Une recherche qui, à l'origine, pouvait paraître anecdotique a provoqué une révolution en biologie cellulaire que ce soit avec la GFP ou l'aequorine. O. Shimomura continue à défendre les recherches fondamentales en bioluminescence. Il le résume très bien lors de l'interview donnée à la suite de l'attribution du prix Nobel « *I don't do my research for application or any benefit. I just do my research to understand why jellyfish luminesce.* » ([www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)). ♦

**Osamu Shimomura**

## RÉFÉRENCES

1. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 1992 ; 111 : 229-33.
2. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994 ; 263 : 802-5.
3. Dunlap JC, Hastings JW, Shimomura O. Crossreactivity between the light-emitting systems of distantly related organisms : novel type of light-emitting compound. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980 ; 77 : 1394-7.
4. Nicolas M, Bassot J, Shimomura O. Polynoïdin : a membrane photoprotein isolated from the bioluminescent system of scale worm. *Photochem Photobiol* 1982 ; 35 : 201-7.
5. Forskal P. *Fauna arabica*. London : Heineck and Faber, 1775 : 110-1.
6. Dubois R. Fonction photogénique chez *Pholas dactylus*. *CR Soc Biol* 1887 ; 39 : 564-5.
7. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Microdetermination of calcium by aequorin luminescence. *Science* 1963 ; 140 : 1339-40.
8. Ridgway EB, Ashley CC. Calcium transients in single muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun* 1967 ; 29 : 229-34.
9. Gilkey JC, Jaffe LF, Ridgway EB, Reynolds GT. A free calcium wave traverses the activating egg of the medaka, *Oryzias latipes*. *J Cell Biol* 1978 ; 76 : 448-66.
10. Inouye S, Noguchi M, Sakaki Y, Takagi Y, Miyata T, Iwanaga S, Tsuji FI. Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 ; 82 : 3154-8.
11. Prasher D, McCann RO, Cormier MJ. Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1985 ; 126 : 1259-68.

**TIRÉS À PART**

M. Moreau