

> Né à Kyoto (Japon) le 27 août 1928, Osamu Shimomura est diplômé de la faculté de pharmacie de Nagasaki en 1951. O. Shimomura est un survivant. Ce n'est qu'à partir de 1955 qu'il débute sa carrière de recherche dans le laboratoire de chimie organique du Professeur Hirata à l'université de Nagoya, où il obtient son doctorat en 1960. Il migre alors aux États-Unis poursuivre ses travaux de biochimie à l'Université de Princeton (Princeton, NJ). De 1960 à 1982, il est à la fois chercheur-biochimiste à Princeton et professeur émérite de la *Boston University Medical School* (MA). Le Docteur Shimomura est ensuite chercheur au MBL (*Marine Biological Laboratory*, Woods Hole, MA) de 1982 jusqu'en 2001, date de la cessation de ses activités.

Martin Chalfie, né en 1947, a grandi à Chicago (États-Unis). Après une période d'incertitudes quant à son orientation professionnelle, il décide finalement de s'engager dans la carrière de chercheur au début des années 1970 et obtient son doctorat en 1977 à Harvard (Cambridge, MA), sous la direction de Robert Perlmutter. Il débute sa recherche post-doctorale sur les mutants *touch* du modèle *Caenorhabditis elegans*, en Angleterre dans le laboratoire de Sidney Brenner au MRC MBL (*the Marine Resources Center of the Marine Biological Laboratory*). Au bout de 5 années, il quitte l'Angleterre pour rejoindre l'Université de Columbia (New York) où il continue à étudier, au département des sciences biologiques, entre autres, les mécanismes moléculaires de la sensation chez *C. elegans*. M. Chalfie est membre de la *National Academy of Sciences* depuis 2004.

Roger Y. Tsien est né à New York (États-Unis) le 1^{er} février 1952. Chercheur « précoce » R. Tsien remporte à 16 ans le prix Westinghouse des jeunes talents et à 25 ans un doctorat de physiologie à l'université de Cambridge (Royaume-Uni). Chimiste atypique, depuis 1989, il est professeur à l'Université de Californie (San Diego, La Jolla, CA), où il se consacre à l'étude et à la synthèse de sondes photoniques pour la recherche en biologie. <

Prix Nobel de Chimie 2008

Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien

La « révolution-verte » est en marche

Jean Salamero



CNRS UMR 144,
 Équipe mécanismes moléculaires
 du trafic membranaire,
 Plate-forme Imagerie Cellulaire
 et Tissulaire-RIO, Institut Curie,
 26, Rue Ulm, 75005 Paris, France.
salamero@curie.fr

Le Prix Nobel de médecine 2008 aurait pu être attribué à un chercheur japonais, O. Shimomura, et deux chercheurs américains, M. Chalfie et R.Y. Tsien, tant leurs travaux sur la découverte et les applications de la « *Green Fluorescent Protein* » ont bouleversé notre vision du vivant. C'est le prix Nobel de chimie qui leur a été attribué, signe de la perméabilité entre les disciplines scientifiques qui se confirme d'année en année. L'histoire commence par la découverte fortuite de la GFP. En 1960, à son arrivée à Princeton du Japon, O. Shimomura s'intéresse à la bioluminescence de la méduse, *Aequorea victoria*. Cette méduse produit une luminescence verte à partir de petits photo-organes présents dans l'anneau de son ombrelle. En pressant les anneaux d'une trentaine de méduses, Shimomura obtint un liquide luminescent. Il estima que pour développer sa recherche, plus d'un million de spécimens d'*Aequorea* devaient être collectés. Débute alors une série de campagnes de pêche à l'épuisette pittoresques et familiales, organisées à Friday Harbor dans l'état de Washington, un rivage où dérivent alors les *Aequora victoria*. C'est lors de la production et de la purification du principe bioluminescent à grande échelle qu'O. Shimomura co-purifia en 1961, la GFP. Il la considère longtemps comme un contaminant. Puis il découvre que pour effectuer de la bioluminescence *Aequora* relargue des ions calcium. Ceux-ci se lient sur une protéine qu'il nomme aequorine, laquelle, en retour, va émettre une lumière bleue. Seulement voilà, *Aequora victoria* émet naturellement une lumière verte ! Possédant d'assez grandes quantités de molécules de « contaminant » purifiées, Shimomura décou-



vre ensuite que la future GFP se met à briller dans le vert sous les UV. C'est donc la lumière bleue émise localement et chimiquement par l'aequorine après liaison du calcium, qui est absorbée par la GFP, laquelle en retour, émet par fluorescence, une lumière verte, un mécanisme qui fut décrit en 1971 par Morin et Hastings. En 1979, Shimomura publiera la caractérisation du « chromophore » de la GFP. Malgré la découverte qui lui revient indiscutablement, O. Shimomura ne s'intéresse pas à la GFP comme traceur. Néanmoins, la « révolution-verte » est en marche. En marche lente.

Ce n'est que huit ans plus tard que Douglas Prasher réalise le potentiel de la GFP comme traceur. Il anticipe que par ses qualités photophysiques, la GFP pourrait être utilisée pour la visualisation sous le microscope, de n'importe quelle protéine, après sa synthèse par une cellule. C'est par les techniques biomoléculaires qu'il essaiera d'insérer le gène de la GFP au bout du gène d'une autre protéine. Il parvient à cloner le gène de la GFP et partage ses découvertes avec Martin Chalfie et Roger Y. Tsien. S'il y a une injustice dans l'attribution du prix Nobel 2008, elle concerne D. Prasher. Il n'arrive pas à sécuriser son emploi au *Woods Hole Oceanographic Institute*, principalement parce qu'il ne parvient pas dans la durée de son contrat, à créer une « molécule chimérique ». Quand on sait la facilité avec laquelle il est aujourd'hui possible d'effectuer de telles constructions, on mesure la déception que doit ressentir ce généticien visionnaire. La suite de la carrière scientifique de D. Prasher est tristement à l'avenant. Il est aujourd'hui chauffeur pour une petite compagnie de mini-bus en Alabama. Les déconvenues de D. Prasher n'entachent en rien la récompense attribuée à M. Chalfie et R.Y. Tsien, lesquels reconnaissent sa contribution.

M. Chalfie a démontré la valeur de la GFP comme étiquette génétique. Il eut l'intuition de son utilisation pour ses recherches sur la régulation de l'expression des gènes dans le ver *C. elegans*. Peu après publication de la séquence de la GFP, M. Chalfie reçoit le clone de la GFP de D. Prasher. À cette époque, d'autres équipes tentent d'exprimer la GFP dans divers organismes, sans succès. M. Chalfie n'utilise que la séquence codante et non les régions flanquantes de l'ADN. Il utilise la PCR pour l'obtenir, une technique de réplique ciblée *in vitro*, aujourd'hui popularisée. C'est en s'affranchissant des extra-séquences à chaque bouts de l'ADN originel que l'équipe de Chalfie obtint l'expression du gène de la GFP dans la bactérie *E. coli* et la traduction d'une protéine fluorescente. Le gène de la GFP contient l'information nécessaire et suffisante pour la synthèse post-traductionnelle du chromophore responsable de la fluorescence. Un peu de chance et la maîtrise des techniques de biologie moléculaire permettent à M. Chalfie de démontrer en 1994, les qualités « quasi-universelles » d'utilisation de ce marqueur, pour étudier l'expression des gènes et la localisation des protéines dans les organismes vivants. L'outil GFP est né. S'ensuivra la production d'une myriade de protéines de fusion, démontrant que la GFP permet non seulement de localiser, mais aussi de suivre dans le temps, « théoriquement », n'importe quelle protéine.

R.Y. Tsien est alors un chimiste reconnu par les biologistes, pour ses contributions essentielles dans le design de sondes chimiques fluorescentes depuis, mondialement utilisées dans les laboratoires. C'est notamment dans la compréhension du rôle du calcium et de l'AMPc dans les mécanismes de la signalisation cellulaire que ses découvertes sont les plus significatives. Dès le début, il engage la mutagenèse de la GFP. En 1994, il publie, avec D. Prasher, le premier variant dont le spectre d'émission bleue va ouvrir la voie à une génération de molécules aux propriétés physicochimiques variées. La possibilité d'utiliser deux couleurs distinctes pour suivre concomitamment deux protéines, étend considérablement l'utilisation de la GFP en biologie moléculaire et cellulaire, parce qu'elle permet *in vivo*, la localisation relative de protéines. Certains couples de protéines fluorescentes permettent aussi la mesure de l'association des protéines auxquelles elles sont fusionnées (par transfert d'énergie de fluorescence) et d'envisager dans l'avenir, une cartographie des interactions protéiques, *in vivo*. Roger Tsien est responsable de l'essentiel de notre compréhension du fonctionnement de la GFP et du développement des nouveaux outils et techniques en découlant. Il déplorait en 1996, qu'il n'y ait qu'un type de protéines fluorescentes, toutes reliées à la GFP. Depuis, d'autres ont été découvertes, dans les coraux, les anémones ; certaines émettent dans le rouge lointain, ou sont photo-activables. Grâce à la biologie marine, les protéines fluorescentes continueront longtemps de briller dans le ciel des biologistes. Au-delà de leur utilisation dans l'étude de processus moléculaires fondamentaux, les XFP permettent l'expression et le suivi d'une protéine dans un petit nombre de cellules dans des organismes vivants, le ciblage de tumeurs, la visualisation de la croissance des neurones ou leur organisation dans le cerveau. Elles sont utilisées dans de nombreux cribles, en pharmacologie et dans le domaine agroalimentaire. L'impact de cette découverte est certes lié aux connaissances acquises grâce aux programmes génomiques débutés dans les années 1980 et à l'explosion des développements de l'imagerie digitale en microscopie optique, depuis les années 1990. Nul doute qu'il est aussi le fruit d'expériences fortuites, d'études souvent à la marge des priorités des organismes financeurs et du... « temps de la recherche ». ♦

The « green-revolution » is underway

TIRÉS À PART

J. Salamero