

> Le prix Nobel de chimie 2008 a été attribué à un chercheur japonais, Osumo Shimomura (*Marine Biological Laboratory, MBL, Woods Hole, MA, États-Unis*) et deux chercheurs américains, Martin Chalfie (*Columbia University, New York, NY, États-Unis*) et Roger Y. Tsien (*University of California, San Diego, CA, États-Unis*), pour leurs travaux pionniers dans la découverte et le développement de la *Green Fluorescent Protein (GFP)*, une protéine fluorescente extraite de la méduse *Aequoria Victoria*. Ces travaux ont radicalement révolutionné le monde des sciences biologiques. L'essor de la GFP et de ses homologues s'est effectuée en synergie avec le développement rapide de la microscopie optique, de la technologie des lasers, des méthodes d'imagerie de fluorescence, de logiciels de traitement et d'analyse des images ainsi que de méthodes de modélisation et de simulation de processus biologiques au niveau moléculaire et cellulaire. <

Les protéines fluorescentes (PF) homologues de la GFP sont des outils versatiles devenus incontournables depuis une dizaine d'années [1-3]. Elles permettent le suivi de la distribution spatio-temporelle des partenaires moléculaires impliqués dans les processus intra- et extracellulaires. Les applications des PF sont légion. Elles offrent la possibilité d'explorer un nombre toujours croissant de processus biologiques en cellules ou tissus vivants tels que l'expression des gènes, la localisation et la dynamique des protéines, les interactions entre les protéines, la division cellulaire, le développement des neurones, la prolifération des métastases, les dégâts causés lors de la maladie d'Alzheimer... Elles sont également utilisées comme biosenseurs de paramètres physico-chimiques intracellulaires comme le pH, la concentration en Ca^{2+} ou en autres métabolites. Toutes les PF disponibles à ce jour sont issues d'animaux appartenant principalement à la branche des cnidaires (méduses, coraux, anémones de mer...). Elles sont caractérisées par une structure tridimensionnelle en forme de tonneau, constituée de 11 feuillets β . Le chromophore, soutenu par une hélice α coaxiale, se trouve rigidement ancré au cœur du tonneau via un réseau de liaisons hydrogènes.

Prix Nobel de Chimie 2008

Osumo Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien

Lumière sur les protéines fluorescentes

Hélène Pasquier



Équipe de Photobiologie,
 Groupe de Biophysique,
 Laboratoire de Chimie Physique,
 UMR-CNRS 8000, Bâtiment 349,
 Centre Universitaire Paris-Sud,
 91405 Orsay, France.
helene.pasquier@u-psud.fr

Le succès des PF repose sur plusieurs de leurs propriétés fondamentales. D'une part, elles peuvent être exprimées dans tous les organismes vivants dans lesquels elles deviennent spontanément fluorescentes. En effet, le chromophore est formé par cyclisation autocatalytique de trois résidus, sans nécessité de cofacteur additionnel, hormis le dioxygène. D'autre part, parce que les PF sont des protéines, leur gène peut être exprimé seul ou fusionné à celui d'une protéine d'intérêt dans des sub-localisations cellulaires telles que les mitochondries, le noyau, la membrane plasmique, les peroxysomes, l'appareil de Golgi... Ainsi, virtuellement toutes les protéines d'intérêt et toutes les sous-structures cellulaires peuvent être visualisées et suivies. Ce marquage génétique spécifique, n'induisant pas de cytotoxicité notable dans la cellule ou l'organisme porteur, est complémentaire des techniques, à l'inverse, invasives telles que la micro-injection ou l'immunofluorescence. Enfin, nous disposons à ce jour d'une panoplie de PF présentant des propriétés physico-chimiques et biochimiques très diverses permettant, *a priori*, de choisir la protéine fluorescente la mieux adaptée à la problématique biologique étudiée. (1) Les longueurs d'onde d'émission des variants spectraux de la GFP (eGFP, YFP, CFP) et ceux de la DsRed (m-cherry, m-orange...) couvrent la totalité du domaine du visible. Ces variants rendent possible la colocalisation simultanée de multiples protéines ou la mise en évidence des interactions intra- ou intermoléculaires via la technique de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) ou encore celle de FCCS (*Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy*). (2) Une autre voie permettant la visualisation de ces interactions est la technique BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*) qui exploite l'apparition



d'un signal de fluorescence lors de la complémentarité de deux fragments de PF lorsque les deux protéines d'intérêt fusionnées à ces deux fragments interagissent. (3) De nombreux efforts ont été menés afin de générer par mutagenèse des PF ou des assemblages de PF présentant des propriétés physicochimiques spécifiquement modulées par certains paramètres intracellulaires ou par certains analytes (pH, potentiel de membrane, concentration en Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cl^- ou autres, protéine spécifique...). C'est le cas notamment des pHluos sensibles au pH ou des caméléons permettant d'estimer la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . (4) D'autres PF sont capables de modifier graduellement la couleur de leur émission de fluorescence avec le temps (GFP-Timer) ce qui peut être mis à profit pour l'analyse de l'histoire spatio-temporelle d'un événement cellulaire tel que l'expression d'un gène lors du développement embryonnaire. (5) Dans le cas des PF photoactivables et photoconvertibles, l'information analysée provient d'une nouvelle émission de fluorescence, générée suite à une irradiation brève et intense. Cette nouvelle émission est suivie dans l'espace et le temps pour l'étude des processus de transport. L'utilisation de telles PF offre une alternative aux techniques de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), de FLIP (*Fluorescence Loss In Photobleaching*) ou de FLAP (*Fluorescence Localization After Photobleaching*) qui emploient également les PF.

Néanmoins, le nombre croissant de nouvelles FP découvertes et la prolifération de leurs mutants soulèvent un problème de fond. Pour la plupart d'entre elles, leurs caractéristiques physico-chimiques et biochimiques ne sont pas établies. Aussi, parce que beaucoup reste à comprendre de ce point de vue, l'utilisateur de ces sondes fabuleuses doit analyser ses résultats avec circonspection.

Ce prix Nobel couronne les travaux de trois scientifiques qui sont à l'origine des étapes clés de l'histoire de la GFP et de ses homologues. En juillet 1961, Osumu Shimomura cherchait à étudier la bioluminescence de la méduse *Aequoria Victoria* et à en extraire la substance responsable de son émission. Après avoir mis au point une méthode de solubilisation et d'extraction, il fut intrigué par la couleur bleu émise par l'extrait obtenu, en désaccord avec ses attentes : les méduses vivantes émettaient une lumière verte ! Lors de la purification de l'extrait, il mit en évidence la présence d'une protéine bioluminescente, l'Aequorine, capable d'émettre de la lumière bleue en présence de Ca^{2+} . Cet extrait recela également une autre protéine, non bioluminescente, présentant des propriétés d'émission dans le vert : la *Green Fluorescent Protein*, nommée ainsi par Morin et Hastings en 1969, avait été découverte [4]. Il élucida quelques années plus tard le mécanisme impliqué dans l'émission verte de la méduse. Suite à l'activation de l'aequorine en présence de Ca^{2+} , un transfert résonnant d'énergie de type Förster se produit vers la GFP induisant son émission verte [5]. Il s'attacha ensuite à découvrir la structure chimique du chromophore de la GFP. Il l'obtint en 1979 par comparaison des résultats obtenus pour la GFP et pour des composés modèles renfermant un groupe imidazolinone qu'il avait synthétisés [6]. Cette structure fut confirmée par Cody *et al.* en 1993 par RMN.

Martin Chalfie mis à profit les travaux de Douglas Prasher qui clona le gène de la GFP en 1992. Il montra que la GFP pouvait s'exprimer dans divers organismes vivants hétérologues, procaryotes comme la bactérie *E. coli* (1992) ou eucaryotes comme le ver *C. elegans* (1994). En fusionnant le gène de la GFP à celui de la β -tubuline, une protéine abondante dans les

neurones impliqués dans la perception sensorielle du ver *C. elegans*, il réussit à marquer spécifiquement ces neurones dont il pu suivre ensuite le développement par imagerie de fluorescence [7]. Ainsi les travaux de M. Chalfie ont révélé l'immense potentiel de la GFP comme marqueur génétique fluorescent et marquèrent le début de la révolution des PF en sciences biomédicales.

Enfin, Roger Tsien montra que l'émission des PF était intimement liée à la présence de dioxygène et proposa un mécanisme chimique de formation du chromophore [8]. Il est également à l'origine des principaux développements des FP pour générer des mutants plus adaptés aux études des processus biologiques [11]. Notamment, il mit au point par mutagenèse les variants spectraux de la GFP [8] puis ceux de la DsRed, une protéine fluorescente rouge issue du corail *Discosoma* [9]. Il s'employa à réduire la propension des FP à s'oligomériser. En particulier, 37 mutations furent nécessaires pour transformer la DsRed, tétramérique, en une forme monomérique, mRFP1. Il s'attacha à améliorer le repliement, la vitesse de maturation, la brillance, la photostabilité... des PF [10]. Il développa des biosenseurs fluorescents spécifiques de certains ions comme le Ca^{2+} [10]. Aujourd'hui, il se tourne vers des problématiques médicales et explore les voies d'utilisation des PF, par exemple, pour aider les chirurgiens à détecter et ôter les tumeurs. \diamond

Light on fluorescent proteins

RÉFÉRENCES

1. Chalfie M, Kain SR. *Green fluorescent protein: properties, applications and protocols*, 2nd ed. *Methods of biochemical analysis*, vol. 47. New York : Wiley, 2005.
2. Sullivan KF, Kay SA. *Green fluorescent proteins. Methods in cell biology*, vol. 58. 1999.
3. Sullivan KF. *Fluorescent proteins. Methods in molecular biology*, 1st ed, vol. 85. San Diego : Elsevier Inc, 2008 : 592.
4. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 1962 ; 59 : 223-39.
5. Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J, Saiga Y. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *Biochemistry* 1974 ; 13 : 2656-62.
6. Shimomura O. Structure of the chromophore of *Aequorea green fluorescent protein*. *FEBS Lett* 1979 ; 104 : 220-2.
7. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994 ; 263 : 802-5.
8. Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 12501-4.
9. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 2004 ; 22 : 1567-72.
10. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998 ; 67 : 509-44.
11. Livet J. *Brainbow* ou le cerveau en couleurs. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 1173-6.

TIRÉS À PART

H. Pasquier