

La GFP : Le cadeau de la méduse

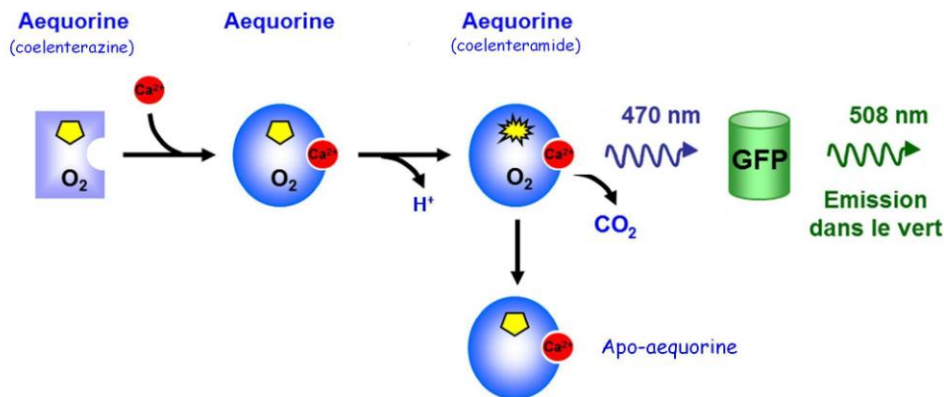
La découverte de la Green Fluorescent Protein a été une avancée considérable pour le monde scientifique.

I°/ Les premières avancées sur la GFP (in vivo) :

En 1961, le chercheur Osamu Shimomura débute ses travaux sur la méduse *Aequorea victoria* qui, du fait de l'émission de lumière verte à la base de son ombrelle, intéresse beaucoup. Après de nombreuses expériences, il se rend compte que la bioluminescence est due à une protéine (photoprotéine) et à un chromophore. Il extrait alors cette protéine qu'il nomme **aequorine** constituée d'une apoprotéine, l'**apo-aequorine**, d'un chromophore, le **coelenterazine**, et d'**O₂ moléculaire**. En quantité négligeable, il recueille aussi une protéine, la GFP (dont il découvrira la structure du chromophore en 1979).

En 1972, il comprend le mécanisme d'émission de lumière de l'aequorine et comment la méduse ne s'irradie que de vert, grâce à la GFP.

En effet lorsque tous les sites actifs de l'aequorine sont occupés par les ions Ca^{2+} le coelenterazine devient coelenteramide (état excité) ce qui provoque une libération de CO_2 et une émission de lumière. C'est cette radiation qui va exciter le chromophore de la GFP qui va à son tour émettre une radiation lumineuse qui est la fluorescence que l'on observe chez la méduse.

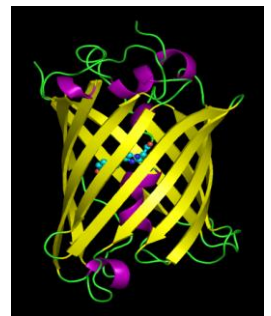


Le 10 décembre 2008, Shimomura reçoit le prix Nobel de Chimie pour la découverte de la GFP et de son fonctionnement (association à l'aequorine) au sein de la méduse *Aequorea victoria*.

II°/ Structure, chromophore et mutants

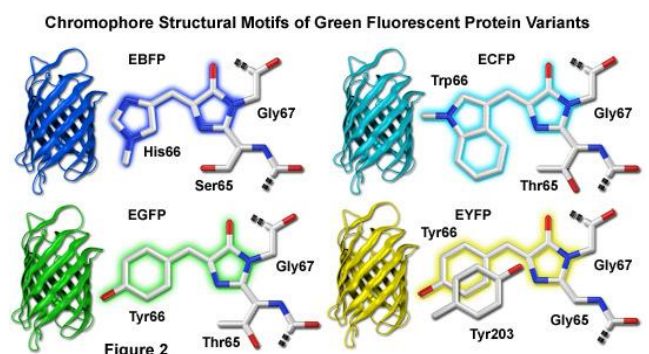
La GFP est une protéine composée de 238 acides aminés, dont trois forment le chromophore, responsable de la fluorescence de cette molécule. Lors de la formation de la protéine apparaissent 11 feuillets β et 4 hélices α , qui forment alors une structure protéique dite « en tonneau ». Ce baril, dont les coudes sont occupés par les hélices et les chaînes libres, offre ainsi une certaine protection au chromophore, situé dans l'hélice α centrale.

Ce chromophore est composé de trois acides aminés : la sérine 65, la tyrosine 66 et la glycine 67. Sa structure finale et donc fonctionnelle n'est cependant obtenue qu'après trois transformations post-traductionnelles. La GFP peut alors émettre à 508 nm après excitation. Cette caractéristique de la protéine va permettre le développement de nouvelles techniques de marquage, notamment grâce à l'apparition des mutants de la GFP. Enfin, pour pallier l'absence de l'aequorine est utilisée la lumière UV afin de permettre l'excitation et l'émission de la lumière.



Tout d'abord sont créés les mutants par mutagenèse (mutation précise par changement d'un ou deux nucléotides au sein de la chaîne principale et, dans ce cas, au niveau des acides aminés du chromophore) dont la seule différence se situe au niveau de la longueur d'onde à laquelle la lumière est émise.

On obtient ainsi des « mutants de couleur ». Ensuite sont mis au point des mutants dits « Timer » car la longueur d'onde émise varie en fonction du temps. Mais ces mutants et leurs applications sont quelques exemples au sein de nombreux autres.



III°/ Les applications de la GFP

Le gène de la GFP est isolé à partir des années 1988 par Martin Chalfie et son équipe. Cela va permettre de nombreuses applications. La GFP est un outil révolutionnaire pour l'étude des processus biologiques. En effet, sa fluorescence permet de la tracer facilement, et elle ne nécessite aucun facteur supplémentaire pour émettre sa fluorescence. Ce qui lui confère sa place de marqueur préféré. De plus, c'est une protéine non toxique pour la cellule et n'influant pas sur son fonctionnement. Sa taille, sa forme ainsi que le pH et les différents potentiels rédox des organites ne semblent pas imposer une barrière pour son expression.

La découverte de la GFP a permis de concevoir de nombreuses applications pour l'observation du monde du vivant :

- **Marqueur cellulaire** : En insérant le gène codant la GFP dans une cellule (= transfection) on va pouvoir trier les cellules transformées en les sélectionnant grâce à des appareils de tri cellulaire. Par exemple via Cytométrie en flux. Cette technique permet de mesurer la fluorescence ou la lumière diffractée d'un grand nombre de particules à haute vitesse telles que des cellules, bactéries, ou organites. On va donc pouvoir trier les cellules exemptes du gène codant la GFP ainsi que les cellules qui le possède.
- **Marqueur moléculaire** : Synthèse d'une protéine de fusion (protéine d'intérêt/GFP) en insérant le gène codant la GFP dans le plasmide de la protéine d'intérêt in vitro. En insérant ce plasmide codant la protéine d'intérêt lié à la GFP, on pourra suivre la localisation de la GFP par fluorescence dans la cellule, et par conséquent suivre la localisation de la protéine d'intérêt en même temps.
- **Gène rapporteur** : Il est possible d'étudier les séquences régulatrices de gènes grâce à l'insertion d'un plasmide recombiné dans l'organisme. Un gène rapporteur est un « gène témoin » qui va coder pour une protéine possédant une activité connue et détectable (par exemple la fluorescence), cela va permettre de mesurer l'expression d'un gène d'intérêt.

Voici la carte du plasmide pEGFP-N1, il est utilisé afin de pouvoir synthétiser une protéine chimère lié à l'EGFP.

Un vecteur d'expression est un vecteur qui possède une région permettant l'insertion d'une séquence codante d'un gène entre les signaux indispensables à son expression.

Ce plasmide est celui de l'« enhanced » GFP-N1 : L'EGFP est un mutant de la GFP, émettant un vert plus intense et étant plus stable et fonctionnel à 37°C.

Ce plasmide possède :

- Une origine de répllication (**pUC ori**) procaryote.
- Un promoteur (**CMV**)
- Un site de clonage multiple (**MCS**) qui est une région comportant de très nombreux sites de coupure unique permettant l'insertion d'un gène d'intérêt dans le plasmide.
- Le gène codant l'EGFP (**EGFP**)
- Le signal SV40 Polyadénylation (**SV40 Poly A**) permettant l'ajout d'une queue poly A côté 3'.
- Un gène de résistance à la Kanamycine (**Kan**) qui est en antibiotique bactérien. Gène de résistance essentiel afin de recourir à une sélection.

