



HAL
open science

INGÉNIERIE DES PROTÉINES ET MODÉLISATION

J Garnier

► **To cite this version:**

J Garnier. INGÉNIERIE DES PROTÉINES ET MODÉLISATION. Annales de Recherches Vétérinaires, 1988, 19 (1), pp.80-81. hal-00901802

HAL Id: hal-00901802

<https://hal.science/hal-00901802>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Après les tout premiers stades du développement embryonnaire, seule la technique rétrovirale peut être utilisée pour introduire des gènes *in vivo*. Après infection *in situ* de l'embryon, la présence des provirus peut être détectée par leur expression si un gène marqueur décelable au niveau de la cellule individuelle est inclus dans le RVR. L'activité β -galactosidase codée par le gène LacZ d'*E coli* peut servir de marqueur puisqu'elle n'interfère ni avec la croissance cellulaire ni avec la différenciation des cellules multipotentielles. Cela s'applique non seulement à la forme cytoplasmique de l'enzyme (Sanes *et al* 1986) mais aussi à une forme à localisation périnucléaire construite en adjoignant le peptide signal de l'antigène T de SV40 (Bonnerot *et al* 1987). Les RVR LacZ où l'expression de l'enzyme dépend d'un promoteur ubiquitaire peuvent servir de gène traceur pour le lignage des cellules au cours de l'embryogénèse puisqu'à un événement d'intégration unique correspondra un groupe de cellules marquées d'origine clonale. L'utilisation de ce mosaïcisme génétique a déjà permis d'analyser le lignage de plusieurs tissus de la souris.

Ce type de marqueur sert aussi d'indicateur utile pour étudier *in vivo* directement les facteurs impliqués dans la régulation de l'expression des gènes, notamment dans les trois premiers stades du développement embryonnaire (Bonnerot *et al* 1987).

Références

- Bonnerot C, Rocancourt D, Briant P, Grimber G, Nicolas JF, 1987. A β -galactosidase hybrid protein targeted to nuclei as a marker for developmental studies. *Proc Natl Acad Sci USA*. Accepté pour publication.
- Nicolas JF, Rubenstein JLR, 1987. Retroviral vectors. In Rodriguez RL, Denhardt (eds), *Vectors : a survey of molecular cloning vectors and their uses*, 493-513, Butterworth, Stoneham
- Nicolas JF, Rubenstein JLR, Bonnerot C, Jacob F, 1985. Introduction of genes into embryonal carcinoma cells and preimplantation embryos by retroviral vectors. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 50:713-720
- Palmiter RD, Brinster RL, 1986. Germ-line transformation of mice. *Annu Rev Genet* 20:465-499
- Sanes JR, Rubenstein JLR, Nicolas JF, 1986. Use of a recombinant retrovirus to study postimplantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J* 5:3133-3142

INGÉNIERIE DES PROTÉINES ET MODÉLISATION

J GARNIER

Laboratoire de Biochimie Physique INRA, Université de Paris Sud, 91405 Orsay, France

Le développement du génie génétique permet d'envisager le clonage puis la production industrielle de n'importe quelle protéine bien que les difficultés techniques ne soient pas négligeables au niveau du vecteur d'expression ou de l'obtention d'une protéine active.

L'ingénierie des protéines, c'est-à-dire la modification de la séquence d'une protéine par délétion, insertion ou remplacement d'acides aminés, est une très nouvelle technologie dont les principes sont connus (Garnier 1985, Robson et Garnier 1986) et dont les applications thérapeutiques ou industrielles commencent à voir le jour. Des exemples sont donnés en distinguant trois cas rencontrés dans la pratique : celui où la structure tridimensionnelle de la protéine est connue, celui où seulement la structure d'un homologue est connue, et enfin celui où seule la séquence en amino-acides est connue.

Dans le cas où la structure tridimensionnelle est connue, ce sont souvent des enzymes, un certain nombre de propriétés peuvent être l'objet de modification. La stabilité thermique peut être augmentée par l'introduction d'un nouveau pont disulfure (Perry et Wetzel 1986). On peut aussi former de nouvelles liaisons hydrogènes, de nouveaux ponts salins à la surface de la protéine ou améliorer les contacts entre résidus d'acides aminés hydrophobes. La résistance aux agents oxydants, source d'inactivation, peut être accrue par le remplacement d'un résidu facilement oxydable comme la cystéine par un résidu non oxydable tel que Ala ou Ser ou le remplacement d'une Met par Ala, Gln, Val, Ile ou Leu ou celui du Trp par Phe ou Tyr. C'est le cas du remplacement de Met₂₂₂ de la subtilisine par Ala qui rend cet enzyme très

résistant aux agents oxydants et permet d'envisager de l'utiliser comme enzyme de détergent (Blow *et al* 1986). La résistance à l'action des métaux lourds peut être modifiée par le remplacement d'acides aminés avec lesquels ceux-ci réagissent comme les résidus Cys, Met ou les groupes carboxyles à la surface de la protéine. La stabilité vis-à-vis du pH peut être déplacée en altérant la charge globale en surface de la protéine ou en remplaçant un résidu chargé par exemple Asp₉₉ de la subtilisine par Ser au voisinage du site actif (Blow *et al* 1986). La spécificité du substrat d'un enzyme peut être modifiée : le remplacement de Gly₁₆₆ par Lys dans la subtilisine change sa spécificité vis-à-vis des substrats comportant un résidu Glu (Blow *et al* 1986).

Dans le cas où la structure tridimensionnelle d'un homologue est connue, on peut alors modéliser par graphique moléculaire la structure de la protéine que l'on veut étudier sur celle de l'homologue dont la structure est connue. L'on tient compte des insertions et délétions nécessaires tout en donnant aux parties identiques ou homologues de la séquence les coordonnées des parties similaires de la structure connue. On affine l'opération de modélisation par une minimisation de l'énergie. C'est selon cette méthode qu'un modèle de structure 3 D de la thrombine a été établie d'après la structure de l'élastase (Robson 1980) et celui de la rénine à partir de la pepsine d'endothia (Sibanda *et al* 1984) dans le but d'analyser la structure de site actif et modéliser alors des inhibiteurs actifs respectivement dans ces deux exemples contre des cas de thrombose ou d'hypertension (Courtney *et al* 1985).

Dans le cas où seule la séquence en acides aminés est connue, il est possible, dans une première étape d'utiliser les données biochimiques connues comme par exemple les modifications du site actif de l' α -anti-trypsine reconnu pour être sensible à l'oxydation.

On peut également se servir de modèles structuraux développés à partir de la séquence en acides aminés seule. Des considérations simples de répartition de résidus hydrophyles le long de la séquence et la synthèse d'un grand nombre de peptides a permis de mettre au point un vaccin synthétique neutralisant le virus de la fièvre aphteuse en associant deux fragments peptidiques : résidus 141-158 aux résidus 200-213 de la protéine virale de l'enveloppe VPI (Dimarchi *et al* 1986).

Pour le produit p28^{sis} de l'oncogène v-sis du sarcome simien, analogue du facteur de croissance des plaquettes sanguines (PDGF), la simulation de la structure tertiaire par minimisation de l'énergie combinée à l'utilisation des prédictions de structures secondaires de GOR (Garnier *et al* 1978) ont permis de localiser les épitopes continus à la surface de la protéine avec une grande précision offrant ainsi la possibilité de modéliser de nouveaux vaccins synthétiques (Robson *et al* 1985). Plus récemment, la modélisation de la structure du récepteur de l'EGF (facteur de croissance des cellules épithéliales) a été faite d'après les homologies de séquences internes et externes et l'identification des familles de structures supersecondaires (Fishleigh *et al* 1987).

Références

- Blow DM, Fersht AR, Winter G, 1986. Design, construction and properties of novel protein molecules. The Royal Society, London
- Courtney M, Jallat S, Tessier LH, Benavente A, Crystal RG, Lecocq JP, 1985. Synthesis in *E Coli* of 1-antitrypsin variants of therapeutic potential for emphysema and thrombosis. *Nature* 313:149-151
- Dimarchi R, Brooke G, Gale C, Cracknell V, Doel T, Mowat N, 1986. Protection of cattle against foot- and- mouth disease by a synthetic peptide. *Science* 232:639-641
- Fishleigh RB, Robson B, Garnier J, Finn PW, 1987. Studies on rationales for an expert system approach to the interpretation or protein sequence data. Preliminary analysis of the human epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett* 214:219-225
- Garnier J, Osguthorpe DJ, Robson B, 1978. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol* 120:97-120
- Garnier J, 1985. Simulation de la conformation des peptides et des protéines. Développement de nouveaux polypeptides biologiquement actifs. *J Chim Phys* 82:591-598
- Perry LJ, Wetzel R, 1986. Unpaired Cys 54 interferes with the ability of an engineered disulfide to stabilize T4 lysozyme. *Biochemistry* 25:733-739
- Robson B, 1980. Designing biologically active polypeptides. *Trends Biochem Sci* 5:240-244
- Robson B, Platt E, Finn PW, Millard P, Gibrat JF, Garnier J, 1985. Predictions of the conformation and antigenic determinants of the v-sis viral oncogene product homologous with human platelet-derived growth factor. *Int J Peptides Protein Res* 25:1-8
- Robson B, Garnier J, 1986. Introduction to proteins and protein engineering. Elsevier, Amsterdam
- Sibanda BL, Blundell T, Hobart PM, Fogliano M, Bindra JS, Dominy BW, Chirgwin JM, 1984. Computer graphics modelling of human renin. *FEBS Lett*, 174:102-111