

Bull. Acad. Vét. de France, 1989, 62, 247-251

L'ingénierie des protéines, ses techniques et ses objectifs

par **M. MORRE***

RÉSUMÉ

Grâce à l'utilisation de la mutagenèse dirigée, de la fusion cellulaire, de la fusion de gènes ou des modifications chimiques, il est maintenant possible d'obtenir des protéines de seconde génération. Ceci nous permet d'améliorer leur fonction, leur affinité pour le substrat ou le récepteur, leur spécificité, leur demi-vie, etc., l'un des principaux problèmes et le besoin le plus urgent, résideront dans la modification de leur immunogénicité.

Mots clés : Ingénierie des Protéines - Immunogénicité - Gène.

SUMMARY

PROTEIN ENGINEERING TECHNIQUES AND OBJECTIVES

Through the use of site directed mutagenesis, cell or gene fusion, chemical modification, it is now possible to have access to second generation proteins. This allow us to improve their function, their affinity, their half life, etc. One of the main concern and urgent need will also be to modify their immunogenicity.

Key words : Protein Engineering - Immunogenicity - Gene.

Le génie génétique n'est pas une science en soi, c'est une technologie qui permet d'avoir accès à la production de protéines à grande échelle. Avec la fusion cellulaire, ces deux technologies ont déjà permis de produire des protéines naturelles, dites de première génération, telles que des hormones, des cytokines, des facteurs de croissance, des enzymes, et certains antigènes pour réaliser des vaccins synthétiques.

L'ensemble de ces protéines de première génération est obtenu au moyen de l'expression d'un ADN codant, pour une séquence naturelle d'acides aminés.

Ces protéines ne permettent pas de répondre aux questions suivantes :

* Docteur vétérinaire SANOFI, 31036 Toulouse.

- comment peut-on cibler une toxine vers un tissu spécifique ?
- comment pourrait-on augmenter la demi-vie d'une enzyme ou d'un anticorps pour prolonger son activité ?
- comment pourrait-on diminuer l'immunogénicité d'une protéine hétérologue pour l'employer chez l'homme ?
- comment pourrait-on modifier la spécificité ou l'activité d'une enzyme ?

Et plus globalement comment aborder la réalisation de ces produits de façon à progressivement comprendre la logique qui nous permettra de les concevoir (LEATHERBARROW, 1986) ?

La réponse à toutes ces questions viendra probablement des techniques de l'ingénierie des protéines. En partant de la séquence naturelle d'une protéine, on peut en effet ainsi la modifier pour obtenir un nouveau produit dont les nouvelles caractéristiques seront testées et par étapes successives, cette démarche permettra d'obtenir de nouveaux outils pour les industries pharmaceutique, chimique ou agroalimentaire.

Il y a principalement cinq approches possibles pour obtenir une protéine modifiée.

La plus classique, la mutagenèse dirigée, permet par mutation ponctuelle, substitution ou délétion sur l'ADN, d'obtenir une séquence « amorce » modifiée, qui par réplication permettra d'obtenir un nouveau vecteur codant pour un nouveau produit.

La fusion de gènes permet la production de protéines hybrides ou chimères, elles sont obtenues par liaison de deux séquences d'ADN venant d'origines diverses.

La synthèse peptidique qui évolue actuellement très rapidement de la phase liquide vers la phase solide ou vers des systèmes mixtes, permet d'avoir accès à l'échelle industrielle à des peptides de 30 à 45 acides aminés. Elle offre toutes les possibilités de modifications chimiques : délétion, inversion, saturation, alkylation, cyclisation, etc.

Le traitement chimique de l'ensemble de la protéine, ou sa conversion enzymatique peuvent donner naissance à des protéines modifiées par glycosylation, méthylation, amidation terminale ou conjugaison à des polymères.

Finalement par fusion cellulaire, il est possible d'hybrider des populations cellulaires différentes et d'obtenir ainsi de nouveaux variants d'anticorps monoclonaux (VERHOEYEN, 1988).

La stratégie générale pour élaborer un produit de seconde génération est la suivante : en premier lieu, on analyse la séquence, la conformation, les caractéristiques biophysiques ou biochimiques de la protéine naturelle, et on en conçoit les modifications. Les techniques d'analyse disponibles sont essentiellement la diffraction des rayons X, la réso-

nance magnétique nucléaire et la compilation et analyse de toutes ces données par des moyens informatiques.

Dans une seconde étape, le produit remodelé selon cette nouvelle conception est généré à l'aide de l'une des cinq techniques décrites précédemment.

En troisième lieu, la nouvelle protéine est contrôlée puis testée pour en reconnaître la structure et l'activité.

Cette nouvelle protéine pourra alors soit servir de base à la conception d'une nouvelle modification, soit être dirigée vers une unité pilote pour sa production à plus grande échelle.

La première approche de mutation ponctuelle a été particulièrement illustrée dans le cas de la Tyrosine tRNA synthétase. FERSHT et LEATHERBARROW (1986) ont ainsi été capables de montrer le mécanisme de liaison intrinsèque de la Tyrosine et de l'ATP sur l'enzyme dans son état de transition. Par mutation substitutive, ils ont montré les rôles critiques joués par la Threonine 40, l'Histine 45, la Cystéine 35 et l'Histine 48 dans la liaison de l'enzyme au substrat. Leurs conclusions ont été déduites des profils énergétiques d'enzymes modifiées, dans lesquelles ces quatre résidus critiques avaient été remplacés par une glycine ou une alanine.

Cette approche de type mutation ponctuelle est surtout utilisée pour analyser l'influence d'un résidu individuel sur la conformation et la fonction globale de la protéine.

Une autre approche classique consiste à effectuer des délétions sur de larges domaines, pour tenter d'attribuer des fonctions à des domaines spécifiques (HARRIS, 1987).

Le meilleur exemple en est la conception des TPA de seconde génération. Le TPA (Tissu Plasminogen Activator) est une enzyme fibrinolytique de 527 acides aminés qui comporte ainsi sept domaines délimités par des résidus cystéines :

- la séquence peptide signal ;
- la séquence « leader » ;
- le domaine fibronectine ;
- le domaine EGF (par analogie avec le facteur de croissance épidermique : Epidermal Growth Factor) ;
- les deux structures Kringle (dont la forme ressemble aux pâtisseries viennoises du même nom) ;
- le domaine sérine protéase.

Plusieurs équipes ont réalisé des analogues du TPA partant des délétions de ces divers domaines, et ils les ont testés vis-à-vis des caractéristiques suivantes :

- activation du plasminogène tissulaire ;
- stimulation de l'activité catalytique par la fibrine ;
- liaison de la fibrine au TPA ;
- liaison de l'inhibiteur plaquettaire du TPA.

De ces diverses protéines partiellement délétées, il résulte :

- que le domaine sérine protéase est essentiellement porteur de l'activité amidolytique ;
- que l'activation de la fonction TPA par la fibrine repose sur les deux domaines « Kringles » ;
- que ces deux structures semblent également importantes pour la liaison de l'inhibiteur plaquettaire ;
- que la délétion du domaine « fibronectine » ou du domaine « EGF » augmente la demi-vie de la protéine, mais réduit son activité à faible concentration d'enzyme.

Bien entendu, on pourrait également réanalyser l'ensemble de ces déductions, en tenant compte des interactions potentielles d'un domaine sur l'autre, ou sur la conformation globale de la protéine, donc sur sa fonction. C'est ce qui est possible dans une certaine mesure, en approchant la fonctionnalité de ces différents domaines par une batterie d'anticorps monoclonaux dirigés contre ceux-ci, et qui permet d'infirmier ou de confirmer les hypothèses précédentes.

Une troisième façon de modifier les protéines peut se faire par voie chimique.

Il est ainsi possible d'augmenter ou de diminuer l'immunogénicité, d'accroître la demi-vie, de modifier la solubilité dans des solvants organiques.

Cette modification chimique globale consiste souvent en une conjugaison à un polymère ou biopolymère tel qu'un polysaccharide, un polyéthylglycol (PEG) ou des dérivés d'acides gras.

La conjugaison de l'Asparaginase à un PEG a permis de considérablement décroître son immunogénicité et d'augmenter sa demi-vie dans le sérum du rat, ce qui entraîne une baisse prolongée de l'asparagine sérique (INADA, 1986).

Enfin, je pense qu'il faut souligner un point particulièrement critique qui est celui de l'immunogénicité des protéines. C'est probablement l'un des problèmes les plus urgents à résoudre pour développer les applications pharmaceutiques des produits issus du génie génétique. On peut ainsi souhaiter, soit diminuer l'immunogénicité des protéines hétérologues pour les utiliser dans une espèce différente de leur espèce d'origine, ou au contraire augmenter l'immunogénicité de certains antigènes, pour faire des vaccins synthétiques en déclenchant une réaction spécifique du système immunitaire.

Ainsi pour deux raisons opposées, la compréhension des mécanismes de base, qui déterminent la reconnaissance de peptides étrangers par le système immunitaire et la régulation de cette réponse semble essentielle. Plusieurs équipes ont déjà mis en évidence les éléments de la séquence primaire de la structure secondaire ou de la maturation post-traductionnelle des protéines qui déterminent leur antigénicité. On notera avec intérêt que la préparation de l'anatoxine tétanique par G. RAMON en 1932 était déjà une manipulation de ce type qui visait par traitement au formol à conserver l'immunogénicité de la toxine tétanique en en supprimant la pathogénicité.

En conclusion, on peut dire que les outils sont maintenant disponibles pour aborder la conception et la réalisation des protéines de seconde génération.

L'ingénierie des protéines peut d'abord permettre d'améliorer ou d'antagoniser la fonction de protéines naturelles. On peut également modifier l'affinité d'enzymes ou d'anticorps et changer ainsi leur spécificité. On peut prolonger la demi-vie d'hormones et d'enzymes pour envisager leur utilisation en thérapeutique. On peut modifier une protéine pour faciliter sa production, sa purification ou son administration.

Enfin, l'un des besoins les plus urgents qui permettront le développement de l'usage pharmaceutique de ces produits, consiste à comprendre les mécanismes fondamentaux qui permettent d'augmenter ou de diminuer l'immunogénicité de ces molécules.

BIBLIOGRAPHIE

- FERSHT (A.R.), LEATHERBARROW (R.J.), WELLS (T.N.C.). — Binding energy and catalysis: a lesson from protein engineering of the tyrosyl-tRNA synthetase. *TIBS*, 1986, 11, 321-325.
- HARRIS (T.J.R.). — Second generation plasminogen activators. *Protein Engineering*, 1987, 1, 449-458.
- INADA (Y.), YOSHIMOTO (T), MATSUSHIMA (A.) et al. — Engineering physico-chemical and biological properties of proteins by chemical modification. *TIBTECH*, 1986, March, 68-72.
- LEATHERBARROW (R.J.), FERSHT (A.R.). — Protein Engineering. *Review*, 1986, 1, 7-16.
- VEHOEYEN (M.), MILSTEIN (C.), WINTER (G.). — Reshaping human antibodies: Grafting an antilysozyme activity. *Science*, 1988, 239, 1534-1536.
-