

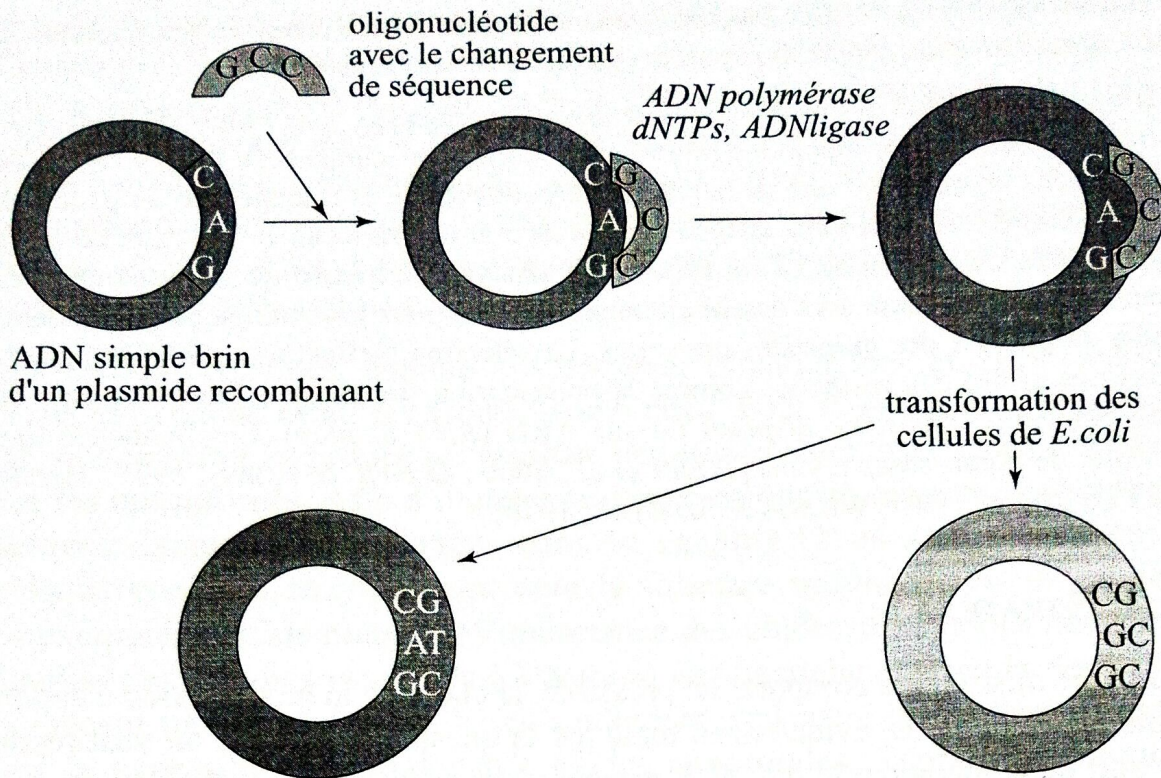
### 9.3. UTILISATION DES MÉTHODES DE MUTAGENÈSE DIRIGÉE POUR L'ÉTUDE DU CENTRE ACTIF DES ENZYMES

Introduites ultérieurement, les méthodes génétiques, et en particulier les techniques de mutagenèse dirigée offrent une autre voie d'approche dans la détermination des groupes essentiels à l'activité d'un enzyme. Les techniques de mutagenèse dirigée sont nées de la rencontre d'un chercheur américain, HUTCHINSON, et d'un chercheur canadien SMITH qui effectuaient une année sabbatique dans le laboratoire de SANGER à Cambridge au moment où celui-ci venait de mettre au point le séquençage de l'ADN (1977). Ces techniques permettent de remplacer n'importe quel acide aminé d'une protéine par une autre et sont parfaitement adaptées à la détermination des acides aminés impliqués dans la catalyse enzymatique.

Il n'est pas de notre propos de développer les différentes méthodes de mutagenèse qui sont aujourd'hui classiques et nous renvoyons le lecteur à l'ouvrage spécialisé : *Directed mutagenesis : a practical approach* (edited by MC PHERSON, Oxford University Press). Nous donnons simplement le principe de l'une de ces méthodes.

#### 9.3.1. MÉTHODOLOGIE

- ▼ La méthodologie est aujourd'hui bien développée et représente une technique courante en ce qui concerne la modification de l'ADN. Il existe différentes méthodes pour remplacer par voie génétique un acide aminé déterminé dans une protéine. La figure 9.28 ci-contre illustre le principe de l'une de ces méthodes, celle qui utilise un oligonucléotide de synthèse.



### 9.28 - Principe de la technique de mutagenèse dirigée

- ▶ Le fragment d'ADN correspondant au gène de la protéine que l'on souhaite muter est cloné sur un vecteur bactérien, généralement un plasmide, qui en permet l'obtention sous forme de simple brin.
- ▶ La séquence du fragment d'ADN est établie et l'on définit les modifications que l'on souhaite y apporter.
- ▶ L'oligonucléotide complémentaire de la partie de la séquence choisie incluant la modification est synthétisé par voie chimique.
- ▶ L'oligonucléotide peut être hybridé *in vitro* au vecteur simple brin. L'hybride est stable à une température inférieure à la température de transition  $T_m$ .
- ▶ L'ADN polymérase I reconnaît cet hybride comme substrat pour la replication *in vitro*, l'oligonucléotide jouant un rôle d'amorce de réplication et le vecteur simple brin celui de matrice (*template*).
- ▶ Cet ADN est introduit dans les cellules pour transformation (*E. coli*, levure...). Il s'y réplique et donne naissance à une population mixte, une partie des vecteurs portant la mutation, l'autre non. Au cours des générations, il se produit une ségrégation.
- ▶ Il reste alors à sélectionner les colonies de cellules mutantes des colonies de cellules de type sauvage. On dispose d'une méthode simple basée sur la propriété suivante : l'hybride formé entre l'ADN muté et l'oligonucléotide a une plus grande thermostabilité que celui formé par l'ADN de type sauvage et l'oligonucléotide.

Il existe des variantes de cette technique. Une condition importante pour l'application de la méthode est que le gène correspondant à la protéine mutée s'exprime correctement et que la protéine ne soit pas dégradée par les protéases. Si la modifi-

cation apportée à l'ADN constitue une technique bien éprouvée, les conditions d'expression et de dégradation posent parfois de sérieux problèmes.

Il existe actuellement des méthodes génétiques variées qui font l'objet de nombreux travaux. A côté des méthodes rationnelles comme la mutagenèse dirigée, d'autres méthodes procèdent d'une démarche différente comme la mutagenèse au hasard et les techniques d'évolution dirigée avec sélection des mutants en fonction de leurs propriétés ou de l'absence de celles-ci et analyse ultérieure de la mutation. Ces techniques cependant sont essentiellement utilisées pour le remodelage de protéines afin de générer des propriétés nouvelles. La sélection s'effectue à partir de ligands fixés et utilise des méthodes comme la présentation sur phage (*phage display*), ou sur ribosome (*ribosome display*) ou sur ARN (*RNA display*). Ces méthodes font l'objet de nombreuses revues [TOBIN *et al.*, 2000 ; O'NEIL & HOESS, 1997 ; HANES & PLÜKTHUN, 1997 ; WILSON & SZOSTAK, 1998].

### 9.3.2. STRATÉGIE

La stratégie mise en jeu comporte un préalable, le choix de la modification à apporter à la protéine. Celui-ci est évidemment dicté par la question à laquelle on veut répondre. S'il s'agit de comprendre le rôle d'un groupe d'une chaîne latérale dans la catalyse ou dans la fixation du substrat, il conviendra de considérer tout d'abord la structure tridimensionnelle de l'enzyme étudié et la position du substrat ou d'un analogue au centre actif. Cette stratégie est également valable pour l'utilisation des méthodes de marquage chimique lorsque les données structurales sont disponibles. Toute mutation rationnelle implique une connaissance de la structure. D'après la position des acides aminés les plus probablement impliqués, l'emploi de la modélisation moléculaire et les méthodes de minimisation d'énergie aideront à concevoir le remplacement le plus judicieux. Un point important à considérer est celui de la dynamique interne de la protéine. En effet, la substitution d'un acide aminé peut avoir des conséquences structurales importantes dans une région de la protéine éloignée du site de la mutation. L'utilisation des méthodes génétiques pour la détermination des groupes catalytiques des enzymes appelle cependant quelques réserves. Elles ne permettent pas comme les méthodes de marquage chimique d'effectuer une analyse cinétique des résultats. De plus, la perte d'activité engendrée par la mutation peut résulter d'un effet secondaire et n'indique pas nécessairement que le groupe modifié soit directement impliqué dans la catalyse.

### 9.3.3. QUELQUES EXEMPLES

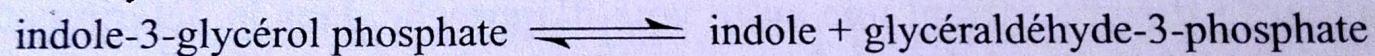
Depuis l'introduction de la méthode, les travaux utilisant la mutagenèse dirigée pour déterminer les groupes essentiels à l'activité des enzymes se multiplient à un rythme accéléré. Aussi n'est-il pas question dans ce chapitre d'en faire une revue exhaustive. Seuls quelques exemples sont donnés ici afin d'illustrer les potentialités de la méthode. D'autres applications seront données à propos de systèmes enzymatiques particuliers dans la partie IV.

La  $\beta$ -lactamase possède une sérine en position 70 et une thréonine en position 71 qui sont conservées dans toutes les espèces. La mutation Ser70  $\longrightarrow$  Thr entraîne une perte totale de l'activité enzymatique montrant le rôle essentiel de ce résidu pour la catalyse. Le mutant Thr71  $\longrightarrow$  Ser, par contre conserve encore 15% de l'activité de l'enzyme de type sauvage.

Le remplacement de l'His170 par une tyrosine dans l'anthranilate synthase, enzyme qui catalyse la première réaction de biosynthèse du tryptophane, entraîne la perte de l'activité de l'enzyme avec le substrat glutamine, mais pas avec l'ammoniac. Cette réaction procède normalement *via* la formation d'un intermédiaire covalent, glutaminyl-Cys84. Les résultats obtenus après mutagenèse dirigée indiquent le rôle essentiel de l'histidine qui semble intervenir comme catalyseur général basique dans la glutaminylation de la cystéine 84.

Dans le cas de la glycyl-ARNt synthétase, des expériences de modifications chimiques par la N-éthylmaléimide avaient suggéré que la Cys395 est essentielle à la catalyse. Un mutant Cys395  $\longrightarrow$  Glu a été construit. Il présentait une activité faible, mais significative, représentant environ 10% de celle de l'enzyme de type sauvage. La mutation n'affectait pas la vitesse de formation de l'aminocyl adénylate, mais seulement l'étape dépendant de l'ARNt. Ces expériences ont montré que le résidu cystéinyl n'est pas un résidu catalytique. Dans une moindre mesure, la mutation comme le marquage par la NEM, limite la réaction par un effet stérique.

La sous-unité  $\alpha$  de la tryptophane synthase catalyse la réaction suivante :



La sous-unité  $\beta$  catalyse la formation de tryptophane à partir de l'indole et de la sérine. Il a été montré que le résidu glutamate 49 de la sous-unité  $\alpha$  est un groupe essentiel à l'activité. En effet son remplacement par l'un quelconque des 19 autres acides aminés au moyen de la technique de mutagenèse dirigée, conduit à un enzyme totalement inactif.