

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIE**

Durée : 4 h 00

Coef. : 4

Session 2001

L'usage d'un dictionnaire anglais-français est autorisé.
Calculatrice autorisée.
1 feuille de papier millimétré.
1 feuille de papier semi-logarithmique.

ÉPREUVE : ÉTUDE DE PROJET

**Les protéines de fusion :
mise au point d'un système d'expression et application**

L'optimisation du système permettant l'expression à haut niveau de protéines hétérologues est capital pour le succès d'un procédé biotechnologique.

Le PinPoint^{TR} mis au point et commercialisé par la firme PROMEG permet d'améliorer l'expression des protéines de fusion chez E. coli.

Les divers aspects étudiés successivement seront :

- les éléments du **Pin Point System^{TR}**
- la mise au point du système
- un exemple d'application

1. Principe du Pin Point System^{TR} : (8 points)

C'est la capacité de la bactérie *E. coli* de fixer, par covalence, de la biotine sur un fragment protéique (de biotinyler un fragment protéique) porteur d'une séquence spécifique d'acides aminés qui est utilisée ici. La biotine ainsi fixée peut ensuite servir de marqueur et être reconnue par de l'avidine ou de la streptavidine. Ceci peut être utilisé pour la séparation de la protéine recombinante. Cette dernière pourra alors être séparée de la séquence marqueur ("tag") par hydrolyse grâce à une endopeptidase.

Le **document 1** schématise les divers temps du mode opératoire permettant l'obtention d'une protéine dans *E. coli* par le système considéré. Il est indiqué que la technique peut être mise en œuvre sur colonne ou en batch.

Nommer le type de purification réalisé ici. Indiquer les avantages et les inconvénients d'une mise en œuvre d'un côté sur colonne et, de l'autre, en batch.

2. Étude de certains aspects d'éléments constitutifs du PinPoint System^{TR} (40 points)

Les éléments constitutifs étudiés seront : la biotinylation, la liaison biotine - avidine, la résine ayant fixé l'avidine.

La biotine est un coenzyme, cofacteur des carboxylases du métabolisme.

2.1. La biotinylation in vivo

La biotinylation réalisée dans la cellule hôte est possible grâce à l'existence d'une séquence spécifique d'acides aminés reconnue par la *biotine ligase* (EC 6.3.4.9) de *E. coli*. La biotine se fixe sur la lysine 89 de cette séquence marqueur ("Tag sequence"). La séquence spécifique d'acides aminés provient de la sous-unité 1,3 S de 12,5 kDa du complexe de la transcarboxylase de *Propionibacterium shermanii*. Elle est codée par une séquence nucléotidique de 386 pb ; celle-ci peut être introduite dans une cellule hôte grâce, par exemple, à un plasmide.

On s'intéressera ici à la bactérie dont a été extrait le gène de la transcarboxylase, *Propionibacterium shermanii*, puis au vecteur d'expression susceptible d'être utilisé pour le clonage du gène à exprimer.

2.1.1. *Propionibacterium shermanii*

- 2.1.1.1.** L'étude préalable de la souche de *Propionibacterium shermanii* utilisée pour fournir la séquence d'ADN encodant la zone de marquage a été réalisée dans les conditions décrites par le **document 2**.

Dans quelles catégories classer cette bactérie, pour ce qui concerne sa source d'énergie, sa source de carbone, son type respiratoire, sa température et son pH optimum. Justifier les réponses

- 2.1.1.2.** Le **document 3** rassemble des résultats obtenus sur milieu glucosé d'une part, et sur milieu glycérolé d'autre part.

Quel milieu est-il préférable de choisir pour cultiver cette bactérie en vue du clonage de la séquence d'intérêt ? Justifier la réponse.

D'après les données des documents 2 et 4, tracer la courbe de croissance obtenue dans ces conditions expérimentales et déterminer graphiquement son temps de génération. Calculer la biomasse obtenue en fin de croissance.

2.1.2. Un exemple de vecteur d'expression

- 2.1.2.1.** Divers vecteurs d'expression ont été mis au point.

Les documents techniques de présentation du vecteur d'expression utilisé fournissent les indications suivantes :

- "DNA coding for the protein of interest is cloned into one of the three *PinPoint™ Xa Vectors*, which differ only in reading frame. The DNA is inserted downstream from a sequence encoding a peptide that is biotinylated in vivo as the fusion protein is expressed."

- "The sequence connecting the coding regions for the two fusion partners encodes an in-frame site for Endoproteinase Factor Xa cleavage."

Dans les indications précédentes, relever et expliquer les caractéristiques qui sont importantes pour la construction du vecteur recombinant.

- 2.1.2.2.** Le vecteur *PinPoint™ Xa1 T* peut être utilisé. Les diverses séquences nucléotidiques présentes dans ce vecteur sont schématisées dans le **document 5**.

*Indiquer le rôle des diverses séquences nucléotidiques présentes dans ce vecteur *PinPoint Xa1 T*. Le choix d'une insertion aux sites *Eco RI* ou *Sca I* est-il judicieux ? Expliquer.*

2.2. La liaison biotine - avidine : les deux types de résine

L'avidine est un tétramère. Elle peut néanmoins être utilisée à l'état de monomère. Les formes tétramère et monomère sont fixées par covalence sur une résine métacrylique. Les constantes de dissociation des formes tétramère et monomère sont respectivement 10^{-15} M et 10^{-7} M.

2.2.1. *Ecrire l'équilibre d'association de la biotine-avidine monomère et calculer les constantes d'association pour les deux formes de l'avidine avec la biotine.*

2.2.2. *Quelle résine utiliser pour réaliser une chromatographie, celle ayant fixé la forme tétramère ou celle ayant fixé la forme monomère ? Justifier votre réponse.*

3. La mise au point du système : l'expression d'une β -galactosidase active (10 points)

Afin de valider le *PinPoint System^{TR}*, la β -galactosidase a été clonée et exprimée avec le vecteur d'expression PinPoint Vector. Après expression, les bactéries ont été lysées et le lysat passé sur une colonne remplie de résine sur laquelle de l'avidine a été fixée par covalence.

3.1. *Dans le document 6, dire ce que permet de quantifier la mesure d'absorbance à 280 nm? Justifier votre réponse.*

3.2. *En vous aidant des indications fournies dans le document 6, commenter le diagramme d'élution obtenu. Emettre une hypothèse expliquant l'absence de pic à 280 nm correspondant aux fractions obtenues suite à l'addition de biotine.*

4. Utilisation du système dans la purification d'anticorps (22 Points)

Le système décrit précédemment (*PinPoint (TM) Xa1 T-vector / E.coli JM 109 / avidin linked resin*) a été utilisé pour purifier les anticorps dirigés contre la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) à partir d'œufs de poulets immunisés contre cette protéine.

4.1. *A partir des figures 1 et 2 du document 7 et en vous aidant du document 1, récapituler les différentes étapes de la purification.*

4.2. *Rappeler la définition d'un « sérum polyclonal ». Indiquer l'intérêt du système précédent pour la purification d'un anticorps spécifique d'un antigène particulier.*

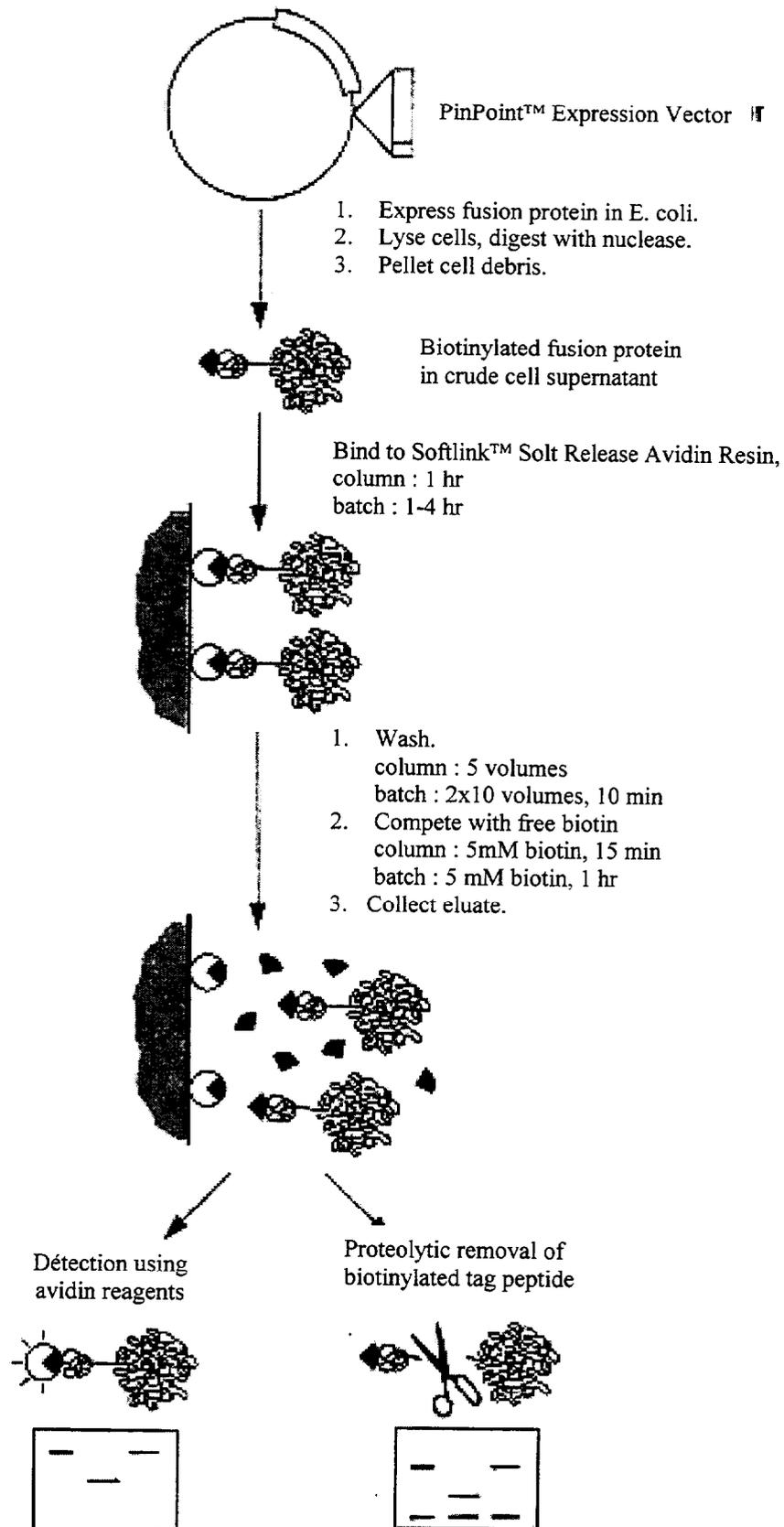
4.3. *Analyser les résultats de la figure 1 du document 7.*

4.4. *Analyser les résultats de la figure 2 du document 7.*

4.5. Le document 8 montre les résultats d'un test ELISA sur les différentes fractions.

- *Les puits sont traités préalablement avec de la BSA à 1%. Pourquoi ? Schématiser la technique utilisée. Analyser les résultats.*

Document 1 : Schéma de l'obtention de protéines de fusion par utilisation de PinPoint System^{TR}



BOPRO

Document 2 : Medium and growth conditions

Inoculum culture was prepared in 120 mL flask containing 60 mL nitrogen-gassed, sterile, medium [10 g/L yeast extract ; 5 g/L tryptic soy broth ; 2,5 g/L K_2HPO_4 and 1,5 g/L KH_2PO_4]. Flask was sealed with butyl rubber caps and incubated for 30 h at 30°C. Batch fermentation was performed using 1,2 L glass reactor containing 1 L of the same culture medium supplemented with 20 g/L glucose or glycerol. Except for the concentrated solution of glucose or glycerol, which were sterilised separately, medium was autoclaved for 20 min at 120°C, then gassed with sterile nitrogen gas to remove any traces of oxygen. The inoculum consisted of 100 mL (10% v/v) inoculum culture ; the temperature was maintained at 30°C by a thermostated water-circulation system, the pH was controlled at 7,0 by automatic addition of 10M NaOH, and the medium was stirred by magnetic agitation (250 rpm).

Growth yield determination

Growth yield was calculated using the optical density of the culture broth after calibrating the dry cell mass to this parameter. The absorbance was measured at 578 nm (dry cell mass in g/L = 0,35 x A_{578}) with a spectrophotometer after appropriate dilution in distilled water.

Document 3

End-products yields, biomass and kinetic parameters of fermentations with *Propionibacterium shermanii*. (r_x , biomass production rate ; r_s , glucose or glycerol consumption rate ; r_p , propionate production rate ; r_a , acetate production rate.) Products yields are expressed in mol product / mol equivalent pyruvic acid from glucose or in mol product / mol glycerol

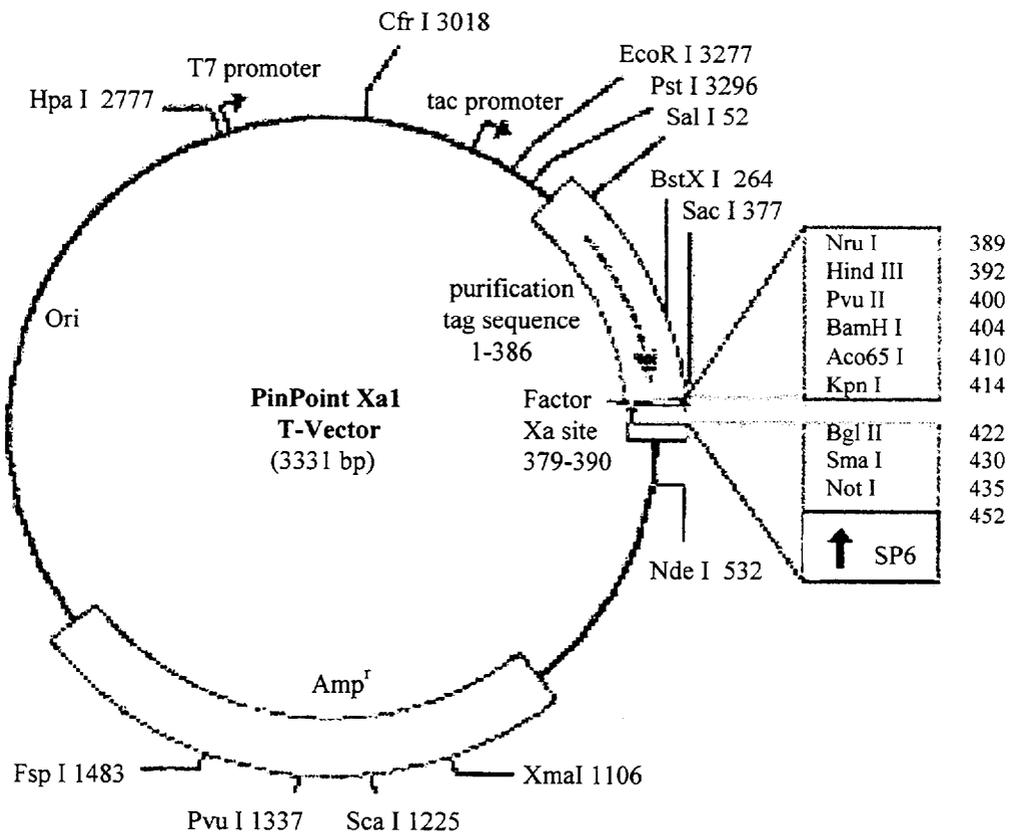
	product yield (mol/mol)				biomass (g/L)	kinetic parameters (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)			
	acetate	propionate	propanol	succinate		$r_x \frac{dx}{dx}$	$r_s \frac{ds}{dx}$	$r_p \frac{dp}{dt}$	$\frac{dp}{dt} r_a$
glucose	0,26	0,40	0,06	0,01	8,8	0,09	0,21	0,07	0,12
glycerol	0,16	0,58	0,09	0,04	5,2	0,13	0,29	0,18	0,07

Document 4

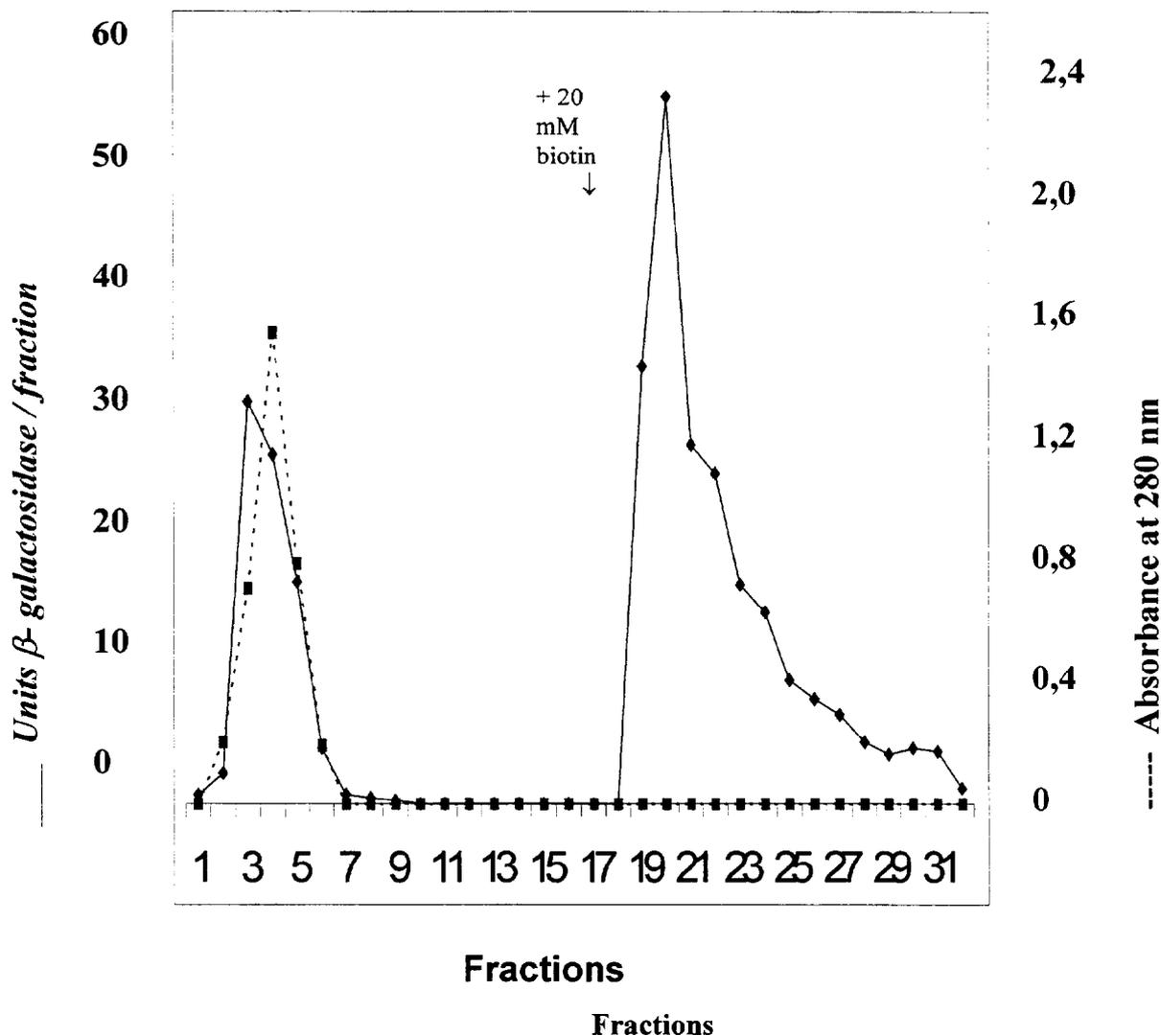
Absorbances à 578 nm

temps (heures)	absorbance
0	1,92
12,1	2,29
29,6	4,29
48,4	8,28
59,2	11,71
76,7	16,57
94,2	21,43
102,2	23,43
118,4	24,57
126,5	25,71
148	25,14

Document 5 : Structure d'un vecteur d'expression du PinPoint System^{TR} : le vecteur PinPoint System^{TR} Xa1 T



Document 6 : Courbe d'élution

***Purification of the β -galactosidase fusion protein***

One hundred mL cultures of *E. coli* F 11 recA (β gal+) carrying the fusion plasmid pCY74 were grown to early exponential phase in a broth medium, induced with 1 mM IPTG for 3 h and harvested. The strain also carry pBA11, a compatible plasmid that overproduces biotin ligase ca 10-fold. These cells were harvested and disrupted in a buffer called Z. The resulting lysate was centrifuged at 48 000 g for 1 hr and the supernatant (ca 2 mg protein) were applied to an 0,5 mL column of avidin-Sepharose. The column is eluted with Z buffer or Z buffer containing 20 mM biotin (arrow) . Fraction of ca 250 μ L were collected and assayed for β -galactosidase (Miller, 1972) and protein (absorbance at 280 nm of a twenty fold dilution).

adapté de Cronan E. Jr., 1990, J Biol. Chem., 10333

Document 7

Figure 1. Preparation of a resin containing bound CAT fusion protein.

A plasmid containing the CAT gene fused to the biotinylation segment was constructed and introduced into JM109. Fusion protein was expressed by addition of IPTG to the growth media and cells were harvested approximately 14 hours post-induction. Cells were lysed by sonication, the resin was incubated with the cleared lysate overnight (4°C on a rotating platform) and the resin was washed with five column volumes of TBS. A small amount of the washed resin was removed and SDS sample buffer was added to remove the bound protein. The lysate and the bound protein were analyzed by SDS-PAGE (4-20% Tris-glycine) under reducing conditions and subsequently were visualized by Coomassie® staining. The position of the molecular weight markers (Promega's Mid-Range Protein Molecular Weight Markers (Cat.# V5231)) are indicated. Lane 1: E. coli lysate; Lane 2: bound protein.

The bound sample shows purified CAT fusion and a small amount of biotinylation domain that was present in the preparation due to the proteolysis of the fusion protein.

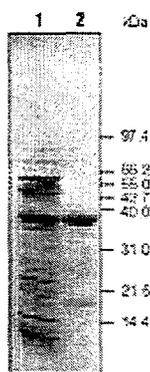
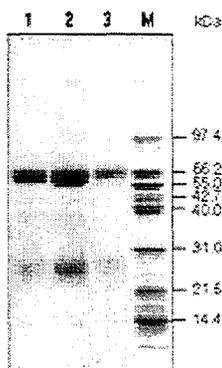


Figure 2. Affinity purification of anti-CAT antibody.

A polyclonal antibody pool was prepared from eggs produced by immunized chickens using the EGGstract® IgY Purification System and passed over the avidin linked resin containing bound biotinylated CAT fusion protein (see Figure and the text). The various fractions were analyzed by SDS-PAGE (4-20% Tris-glycine) under reducing conditions and subsequently were visualized by Coomassie® staining. Lanes: Lane 1, 4µl of total IgY pool; Lane 2, 4µl of non-specific IgY flowthrough; Lane 3, 4µl of antigen-specific IgY eluate.



Document 8 :

Antigen binding of the polyclonal antibodies in an ELISA format.

Ten-fold dilutions were prepared from the fractions indicated and incubated with 50ng/well of CAT protein. Bound antibody was detected using a goat anti-chicken alkaline phosphatase conjugate (Cat.# G1151) and p-nitrophenyl phosphate substrate.

