

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIE**

Durée : 4 h 00

Coef. : 4

SESSION 2003

L'usage d'un dictionnaire anglais-français est autorisé.

L'usage d'une calculatrice est autorisé.

1 feuille de papier millimétré.

EPREUVE : ÉTUDE DE PROJET

La Taq polymérase

En 1983, Kary Mullis conçoit l'idée de la réaction d'amplification spécifique *in vitro* de l'ADN : la "Polymerase Chain Reaction" (PCR). L'ADN polymérase I d'*Escherichia coli*, utilisée à l'origine, était cependant irréversiblement dénaturée à chaque cycle.

En 1988, David Gelfand et ses collaborateurs isolèrent à partir de l'eubactérie thermophile *Thermus aquaticus* une enzyme qui devait devenir, sous le nom de Taq polymérase (EC 2.7.7.7), un outil majeur du génie génétique.

Depuis, cet outil ne cesse d'être amélioré. D'autres enzymes ont en effet été isolées à partir de bactéries thermophiles (eubactéries ou archaées) et toute une panoplie d'enzymes recombinantes sont commercialisées par des sociétés spécialisées.

En particulier, différents protocoles sont maintenant proposés pour réaliser une "hot start" PCR ou "démarrage à chaud" de la PCR.

Le sujet se propose d'aborder quelques aspects de cette recherche.

1. La purification originelle de la Taq polymérase (19 points)

Cette purification a nécessité de partir d'un grand volume de culture de *Thermus aquaticus* et a mis en jeu trois chromatographies successives sur colonne.

1.1 La culture de *Thermus aquaticus*

Le milieu et les conditions de culture sont indiqués dans le **Document 1**.

Indiquer et justifier le rôle de chacun des nutriments organiques du milieu de culture utilisé.
Préciser et justifier les conditions de culture mises en jeu.

1.2 La purification

Les cellules sont mises en culture pendant 20 h puis centrifugées. L'extraction de l'enzyme est réalisée sur le culot bactérien.

Le tableau du **Document 2A** indique les étapes chromatographiques mises en jeu ainsi que les résultats obtenus à l'issue de chaque étape.

- 1.2.1 L'activité enzymatique est mesurée selon le protocole du **Document 2B**. Dégager les étapes du protocole mis en jeu pour déterminer l'activité enzymatique.
- 1.2.2 Reproduire et compléter le tableau du document 2A en prenant comme référence pour les calculs l'extrait brut ("crude").

2. La production de Taq polymérase chez *E. coli* (35 points)

Par la suite, le gène de la Taq polymérase a été cloné chez *E. coli* à partir d'une banque génomique de *Thermus aquaticus*, puis séquencé. Un clonage direct du gène est alors devenu possible, ce qui a permis de produire plus aisément l'enzyme, d'étudier sa relation structure-fonction et de l'améliorer.

2.1 Le clonage direct du gène

Le gène est amplifié spécifiquement à partir de l'ADN génomique de *Thermus aquaticus* puis inséré dans le site de clonage multiple (MCS) du plasmide pUC18.

La construction obtenue est utilisée, après ligature, pour transformer une souche hôte de *E. coli*.

Le **Document 3** présente :

- une brève présentation du principe du clonage
- les sites de restriction des enzymes utilisées
- une carte de restriction partielle du gène *Taq* avec les positions des amorces utilisées
- les séquences de ces amorces
- la carte du plasmide pUC18

- 2.1.1 L'amplicon formé doit subir une double digestion. Préciser laquelle et expliquer pourquoi.
- 2.1.2 Comparer les sites de restriction *Bam*H I et *Bgl* II. Justifier le choix de ces 2 enzymes pour ce clonage (en plus d'*Eco*R I).
- 2.1.3 Montrer à l'aide d'un schéma que la stratégie utilisée conduit à une insertion orientée du gène *Taq* dans le vecteur pUC18 et représenter la construction obtenue.

Le **Document 4** reproduit les indications du vendeur de ces enzymes sur la composition des tampons de digestion fournis et les activités des enzymes dans ces tampons.

- 2.1.4 En déduire le tampon à utiliser lors de la double digestion de l'amplicon d'une part, et celui utilisé pour la digestion du vecteur d'autre part.

2.2 La production de Taq polymérase chez *E. coli*

Le vecteur recombinant pTAQ obtenu précédemment est utilisé pour exprimer le gène Taq sous la dépendance du promoteur Lac.

La thermostabilité de l'enzyme rend possible son extraction et sa purification en une seule étape.

Le **Document 5** présente le protocole mis en œuvre (**5A**) et le résultat de l'électrophorèse (SDS-PAGE) de contrôle (**5B**).

- 2.2.1 Pourquoi procède-t-on à une addition d'IPTG ?
- 2.2.2 Dégager le principe de l'extraction et de la purification à partir du document 5A.
- 2.2.3 Quel est le pourcentage final de glycérol et quelle est la dilution finale du lysat congelé ?
- 2.2.4 Analyser le document 5B et conclure quant à l'efficacité de la purification.
- 2.2.5 La taille de la protéine obtenue est-elle en accord avec la taille du gène du document 3 ? donnée : masse molaire moyenne d'un acide aminé : 110 g.mol⁻¹

2.3 Une Taq polymérase recombinante

Le **Document 6** présente un alignement informatique des séquences protéiques de la Taq polymérase (Taq) et de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (pol), enzyme possédant les 3 domaines suivants :

activité exonucléase 5' \Rightarrow 3'	activité exonucléase 3' \Rightarrow 5'	activité polymérase 5' \Rightarrow 3'
Acides aminés 1 à 323	Acides aminés 324 à 517	Acides aminés 521 à 928

Analyser les homologies de séquences résultant de cet alignement et conclure quant aux domaines susceptibles d'être présents dans la Taq polymérase.

3. Un procédé de "hot start" (26 points)

La Taq polymérase possède à la température du laboratoire une activité non négligeable qui peut conduire à des amplifications non spécifiques consécutives à des appariements indésirables des amorces avec l'ADN matrice lors de la préparation du milieu réactionnel.

Pour éviter ces risques, on effectue un "démarrage à chaud" de l'amplification en faisant en sorte que l'enzyme ne soit active qu'après la montée en température du premier segment du premier cycle.

Plusieurs procédés ont été développés, parmi lesquels l'utilisation d'un anticorps monoclonal neutralisant.

3.1 L'obtention et le criblage des clones d'hybridomes producteurs

Les anticorps monoclonaux dirigés contre l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* sont préparés en utilisant des cellules sensibilisées de souris ou de rats immunisés par l'ADN polymérase, selon le procédé classique.

3.1.1 Rappeler les grandes étapes de la préparation d'anticorps monoclonaux.

3.1.2 À l'aide du **document 7**, expliquer le principe de la sélection des hybrides.

Les puits contenant des hybridomes obtenus après 10 jours de culture sont testés pour leur capacité à synthétiser des anticorps monoclonaux contre l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (criblage)

Le protocole du criblage des hybridomes sécréteurs est décrit dans le **Document 8**.

3.1.3 Schématiser le principe du criblage des puits contenant des hybridomes.

3.1.4 Quels sont les rôles des réactifs : "gelatin" et "tween 20 0,05 % in phosphate buffered salin" ?

3.1.5 Quels sont les témoins réalisés pour valider cet ELISA ? Donner la composition qualitative de ces témoins, le résultat attendu et le rôle de chacun d'eux.

3.2 Étude des anticorps obtenus

À l'issue du criblage, plusieurs surnageants ont été trouvés positifs.

L'effet inhibiteur des différents anticorps monoclonaux vis à vis de l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* est ensuite testé selon 2 protocoles différents rapportés dans le **Document 9**.

3.2.1 Dans la perspective de l'utilisation d'un procédé "hot start" PCR, justifier les températures mises en jeu dans les protocoles 1 et 2.

Que teste-t-on dans le protocole 1 ? Que vérifie-t-on dans le protocole 2 ?

3.2.2 Que peut-on conclure de l'analyse des résultats obtenus lors de la mise en œuvre du protocole 1 ?

Comment qualifier les anticorps étudiés ?

3.2.3 Que peut-on déduire des résultats du protocole 2.

3.2.4 Quel anticorps monoclonal est-il préférable d'utiliser pour éviter la formation de produits non spécifiques au cours de la PCR ? Justifier ce choix.