

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOTECHNOLOGIE

Durée : 4 h 00

Coef. : 4

SESSION 2004

L'usage d'un dictionnaire anglais-français est autorisé.
Calculatrice autorisée.
Feuille de papier millimétré.

ÉPREUVE : ÉTUDE DE PROJET

PECTINES ET BACTÉRIES PECTINOLYTIQUES

Les pectines constituent, avec d'autres polymères glucidiques, le ciment maintenant l'armature de cellulose des parois végétales.

Ces polyosides peuvent être détruits par différentes enzymes pectinolytiques dont l'action peut être dommageable (pourrissement de fruits ou de légumes, sur pied, après récolte ou lors du stockage) ou bénéfique (production de protoplastes dans le but d'obtenir de nouvelles espèces végétales, amélioration de la libération du jus de raisin lors des premières étapes de la vinification, valorisation de déchets de biomasses végétales ou obtention de fragments osidiques ayant des propriétés thérapeutiques).

L'étude des enzymes pectinolytiques, en particulier des pectate lyases, se révèle donc d'un grand intérêt biotechnologique.

1. Étude de la croissance et de l'activité Pectate Lyase d'*Erwinia Chrysanthemi* dans le but d'une production industrielle (10 points)

1.1. Etude du document 1.

1.1.1. Donner pour chaque graphe (1 et 2) les différentes phases de la croissance de *E.chrysanthemi* et estimer graphiquement la valeur des paramètres d'état suivants :

- temps de génération (G)
- vitesse spécifique de croissance (Q_x) pendant la phase exponentielle

1.1.2. Commenter les différences observées entre les deux graphes pour Q_x , G et l'activité pectate lyase.

1.1.3. Donner le rôle du polygalacturonate et des extraits de plantes.

1.2. Que penser des valeurs obtenues pour Q_x et G en vue d'une production industrielle de pectate lyase par *E. chrysanthemi* ?

2. Clonage du gène d'une pectate lyase chez *Escherichia coli* (31 points)

Il existe 5 isoenzymes de la pectate lyase notés Pel A, Pel B, Pel C, Pel D, Pel E.
Les pectate lyases Pel E et Pel D ont fait l'objet d'un clonage et d'une production chez la bactérie hôte *Escherichia coli*.

2.1. Choix d'une bactérie hôte de production.

En s'appuyant sur la valeur de G obtenue en 1.1.1. expliquer le choix d'*E. coli* comme cellule hôte dans le cadre du clonage de gènes codant les pectate lyases d'*E. chrysanthemi*.

2.2. Clonage du gène *pelE*

Dans des études préliminaires, le gène *pelE* (1,7 kb) codant la pectate lyase E a été placé dans un plasmide pour obtenir le plasmide TP9 (4,5 kb) (**document 2**).

Afin de caractériser enzymatiquement la pectate lyase PelE, le gène *pelE* du plasmide TP9 doit être transféré dans le vecteur de production constitué par le plasmide pT7-5 (**document 2**).

2.2.1. Le **document 3** présente un gel sur lequel a été déposé le produit de digestion du plasmide TP9 :

- Estimer la taille des trois bandes a – b – c obtenues pour le dépôt 2.
- Indiquer leur nature.

2.2.2. Le fragment de restriction issu du TP9 contenant *pelE* est récupéré puis mis en présence du plasmide pT7-5 digéré au préalable par *Bam*HI et *Hind*III afin de tenter une ligature (ou ligation) entre eux.

Pour vérifier la qualité de ce clonage, des bactéries *Escherichia coli* DH5 α rendues compétentes sont transformées par le mélange de ligature.

2.2.2.1. D'après le schéma du pT7-5 (**document 2**), rappeler les rôles des différentes séquences portées par ce vecteur.

2.2.2.2. Préciser sur quel milieu la sélection des bactéries transformées peut être effectuée.

2.2.2.3. 150 μ L de bactéries compétentes DH5 α ont été transformées par 5 μ L d'une solution de pT7-5-*pelE* à 3 ng/ μ L. 800 μ L de LB liquide sont ensuite ajoutés. Une boîte de sélection estensemencée avec 50 μ L de cette suspension. Après incubation, 80 colonies sont dénombrées sur la boîte.

Calculer l'efficacité de transformation exprimée en nombre d'unités formant colonie (UFC) par μ g de plasmide transformant.

2.3. Vérification des clones sélectionnés :

Les bactéries obtenues après transformation et sélection sont repiquées sur un milieu de croissance contenant du polygalacturonate qui est un des substrats de la *PeIE*. En recouvrant ces répliques d'une solution saturée d'acétate de cuivre, un halo translucide sur fond bleu apparaît autour des colonies dotées d'une activité pectate lyase.

- 2.3.1. Quels sont les génotypes correspondant aux deux phénotypes mis en évidence sur ce milieu ?
- 2.3.2. Comment préparer le vecteur afin d'obtenir, après transformation, exclusivement des clones présentant une activité pectate lyase ?

2.4. Production de la protéine *peIE*.

Le plasmide pT7-5-*peIE* est ensuite transféré dans la souche BL21 d'*E. coli*. Cette souche présente dans son génome le gène de l'ARN polymérase du phage T7 (T7 polymérase) sous le contrôle du promoteur Lac (*Plac*) inductible par l'IPTG. Cette T7 polymérase reconnaît spécifiquement le promoteur *phi 10* placé sur le pT7-5 (**document 4a**).

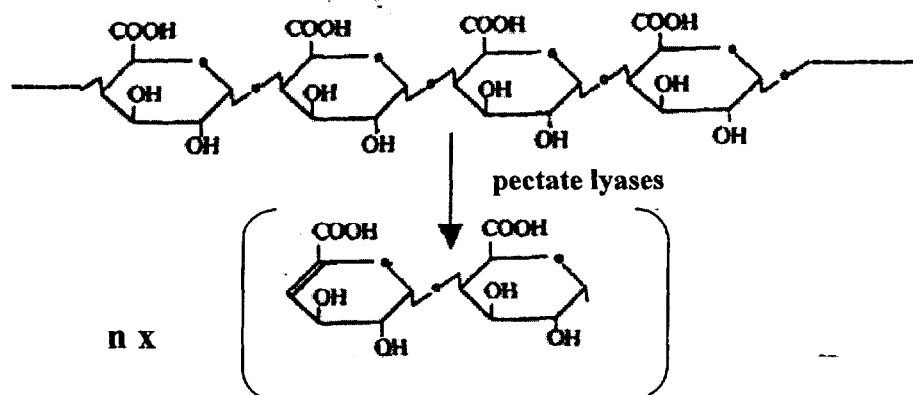
- 2.4.1. Reproduire, compléter et annoter le **document 4 a** pour expliquer l'effet de l'addition ou non d'IPTG dans un milieu de cultureensemencé avec des bactéries BL21 contenant le plasmide pT7-5-*peIE*.
- 2.4.2. **Le document 4 b** présente les résultats d'une SDS-PAGE réalisée à partir d'extraits de la souche d'*E.coli* cultivée dans deux conditions différentes. Analyser ces résultats.

3. Extraction purification et étude de pectate lyases (28 points)

3.1. Extraction et purification de l'enzyme à partir d'une culture d'*Escherichia coli* recombinante.

L'extraction - purification est conduite selon différentes étapes. Lors du recueil de la fraction périplasmique, on utilise un tampon contenant du β -mercaptoéthanol.

Le suivi de l'extraction nécessite le contrôle, à chaque étape, de l'activité catalytique (**document 5**). La réaction catalysée par une pectate lyase est la suivante :



Les composés insaturés produits présentant un maximum d'absorption à 230 nm (coefficient d'absorption linéique molaire $5200 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) permettent un suivi spectrophotométrique. L'activité Pel est exprimée en « μmol de produit formé par min » dans les conditions précisées pour le dosage.

- 3.1.1. Quel est le rôle du β -mercaptoéthanol dans le tampon d'extraction ?
- 3.1.2. Calculer l'enrichissement global (facteur de purification) obtenu lors de la purification de la Pel D à partir du **document 5**.

3.2. Etude de quelques propriétés des pectate lyases.

3.2.1. Influence de la nature du substrat.

Différentes pectines de citron, possédant des degrés variables de méthylation, ont été testées avec différentes pectate lyases (Pel). Les résultats obtenus sont présentés dans le **document 6**.

Dégager les conclusions de cette étude.

3.2.2. Détermination des constantes cinétiques.

Les conditions de mesure de la vitesse initiale sont les suivantes :

- 900 μL de substrat en tampon TRIS (concentrations variables en substrat) sont préincubés 5 min à 37°C .
- après addition de 100 μL d'enzyme, la cinétique est suivie à 230 nm pendant 2 min.
- trajet optique : 1 cm.

3.2.2.1. Les résultats, obtenus pour la Pel C sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Concentration en substrat $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0,016	0,024	0,032	0,040
Vitesse initiale $\Delta A/\text{min}$	0,028	0,037	0,044	0,050

- A partir de l'équation de Michaelis-Menten, retrouver l'expression $\frac{V}{S} = -\frac{1}{K_m} \times V + \frac{V_m}{K_m}$
- Tracer la courbe $V/S = f(V)$
- Déterminer graphiquement les constantes cinétiques de la Pel C (K_m en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, V_{max} en $\Delta A/\text{min}$). Exprimer la concentration d'activité catalytique en U/mL d'enzyme sachant que 1 U correspond à la formation de 1 μmol de produit par minute ?

3.2.2.2. Comparaison de l'efficacité des différentes Pel.

Pel étudiée	A	B	C	D	E
Km (g. L ⁻¹)	0,30	0,03	0,04	0,28	0,42
Vmax (U) rapportée à 1 mg d'enzyme	46	2500	760	670	3800

- Dans quelle condition de milieu réactionnel de catalyse peut on écrire :

$$V_i \approx \frac{V_{\max}}{K_m} [S] ? \text{ Justifier.}$$

- Le rapport $\frac{V_{\max}}{K_m}$ est appelé efficacité catalytique. A partir des valeurs du tableau ci-dessus, déduire la forme enzymatique la plus efficace.

3.2.3. Influence de l'épicatéchine sur l'activité des pectate lyases (document 7)

L'épicatéchine est un composé présent à forte concentration dans le péricarpe (ensemble des tissus entourant les graines) de fruits non mûrs.

3.2.3.1. Indiquer et justifier la nature de l'effet observé sur la Pel E.

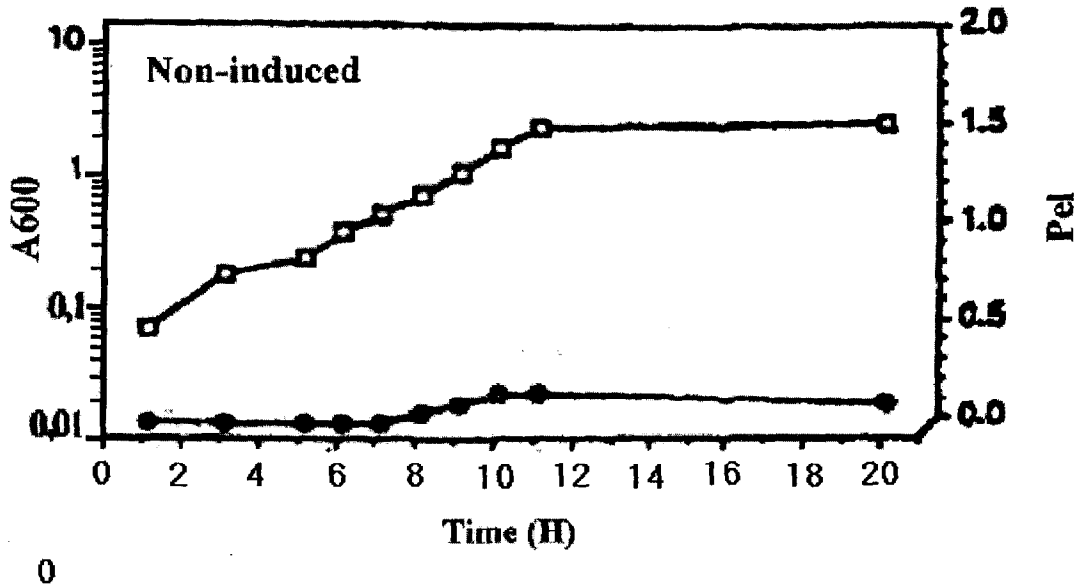
3.2.3.2. En déduire le rôle physiologique de l'épicatéchine sur le pourrissement des fruits.

4. Applications biotechnologiques des pectinases : obtention et cultures de protoplastes (11 points)

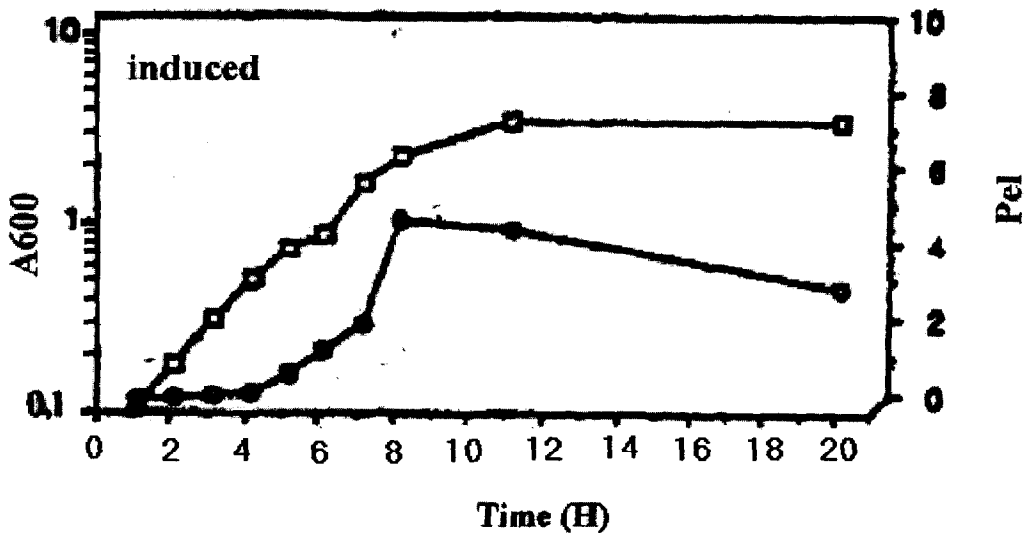
- 4.1. Préciser le rôle de chaque catégorie de substances entrant dans la composition des milieux utilisés pour l'obtention et la culture de protoplastes (document 8).
- 4.2. Déduire de l'analyse comparative de la composition des deux milieux proposés, l'utilisation de chacun des milieux.

DOCUMENT 1 : Croissance et activité Pectate Lyase (Pel) de *Erwinia chrysanthemi* en fonction du temps

GRAPHE 1



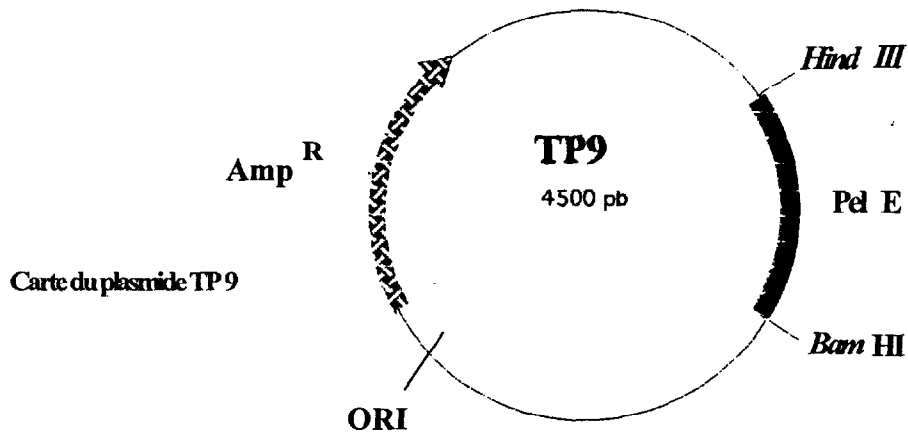
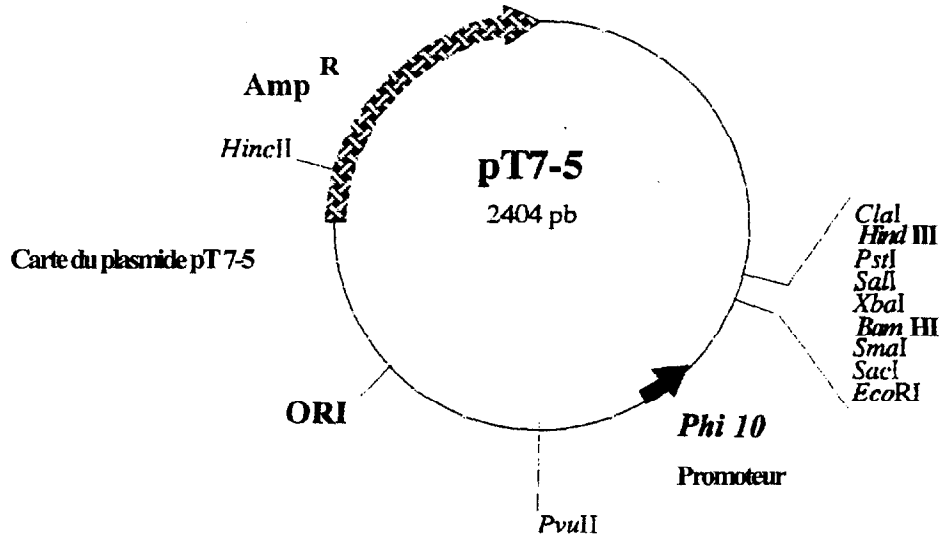
GRAPHE 2



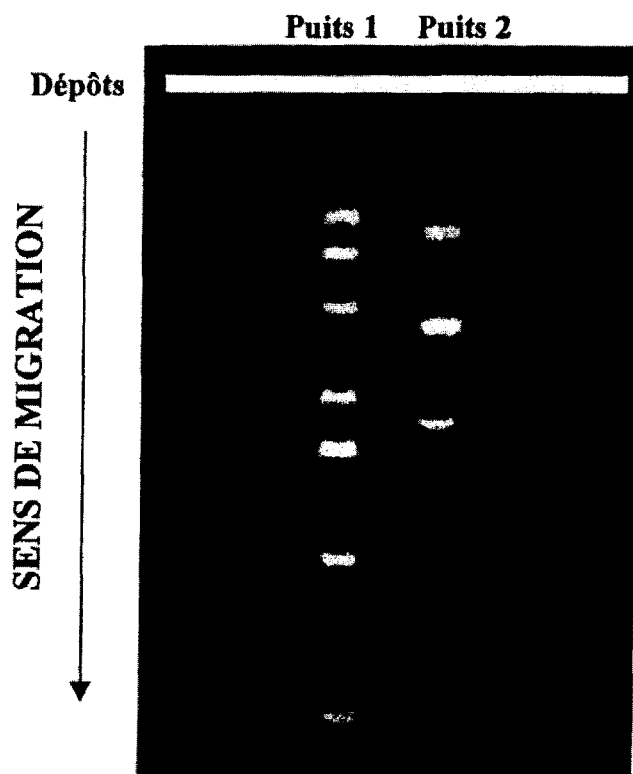
Pel synthesis during bacterial growth. Growth and induction of Pel synthesis were followed in the wild-type strain 3937 in glycerol M63 minimal medium supplemented with PGA and vegetal extract for the inducing conditions. Growth was followed by measurement at A₆₀₀ (□). Pel (●) specific activities were determined on each sample and are expressed in micromoles per minute per milligram (dry weight) of bacteria.

PGA = polygalacturonate

DOCUMENT 2 : Vecteurs de clonage du gène *Pel E*.

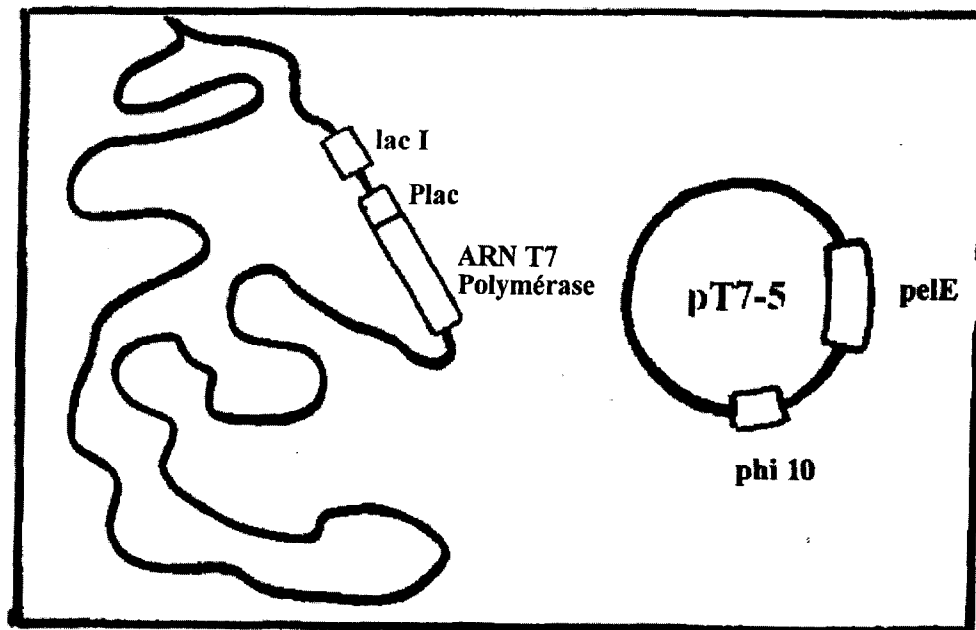


DOCUMENT 3 : profil de restriction du TP9 digéré par *Hind* III et *Bam*H I



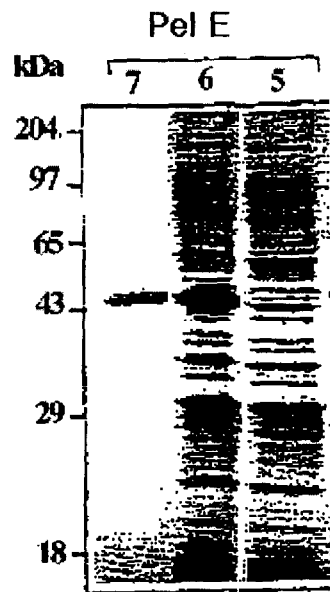
- a Puits 1 : marqueur de taille
(bandes : 516, 1018, 1633, 2036, 3054, 4077, 5090 pb)
- b Puits 2 : partie aliquote de la digestion du plasmide TP9 par *Bam*H I et *Hind* III.
- c

DOCUMENT 4a :



Bactérie BL21 transformée par pT7-5

lac I = gène codant le répresseur de l'opéron lactose
Plac = promoteur de l'opéron lactose

DOCUMENT 4 b

SDS-PAGE of the *E. chrysanthemi* PelE extracts from *E. coli* : protein bands were detected by Coomassie blue staining. Lane 5 : extracts of the recombinant *E. coli* cultures before induction. Lane 6 : extracts of the recombinant *E. coli* cultures after induction. Lane 7 : purified enzyme.

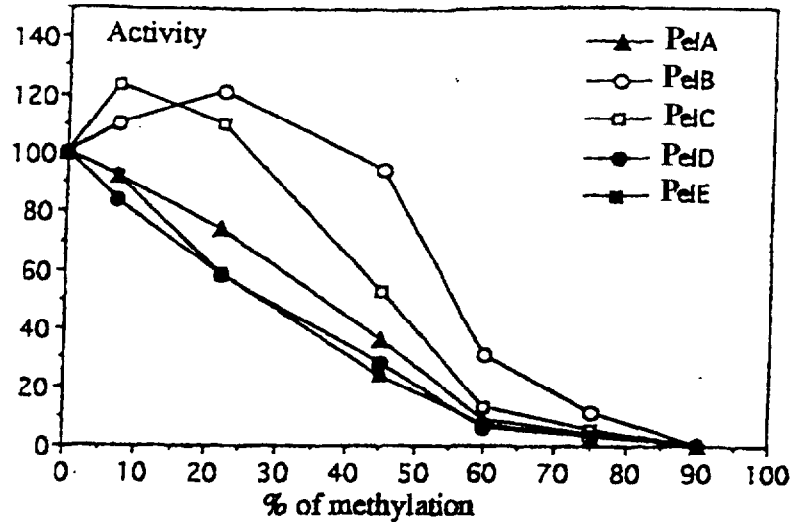
DOCUMENT 5 : Extraction et purification de pectate lyases (Pel)

Pel E purification

Step	Sp act ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) ^a
	PelE
Cell	24
Periplasmic fraction	98
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	160
TSK- gel Phenyl 5 PW column	487

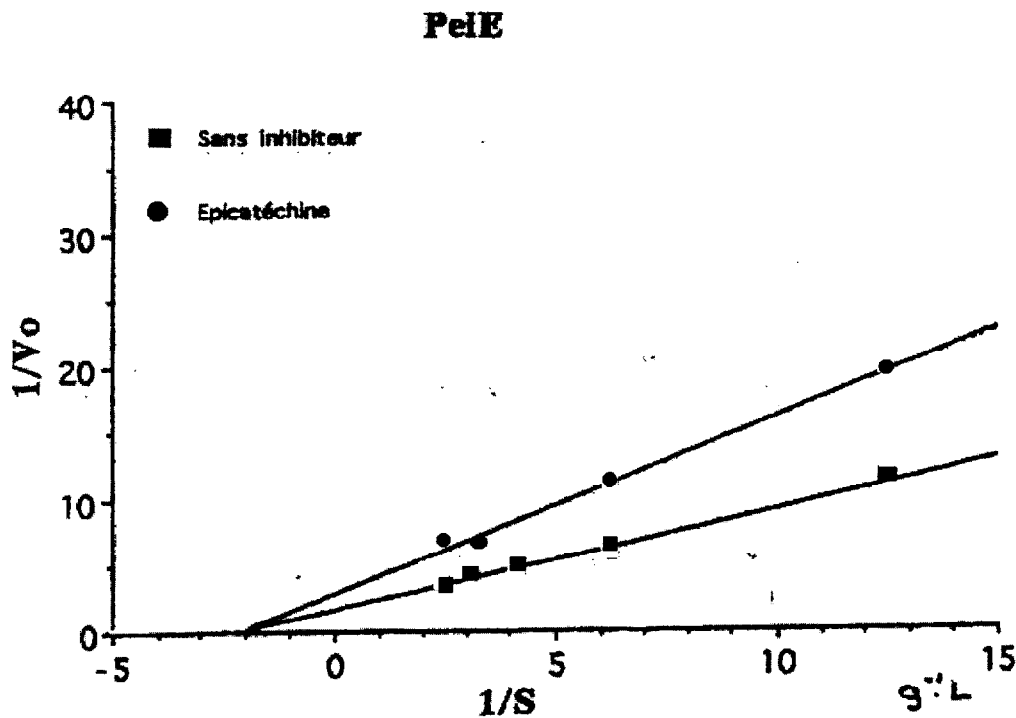
^a Specific activities are expressed as enzyme units per mg of protein. Standard conditions were used for these assays : 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 0.1 mM CaCl₂ and 0.5 g of polygalacturonate per liter.

DOCUMENT 6 : Etude de l'influence de la nature du substrat sur l'activité des différentes Pel



Effects of the degree of pectin methylation on Pel activity. Activities of the five Pels toward pectins, presenting various degrees of methylation, were expressed relative to that toward nonmethylated substrate, which was arbitrarily defined as 100. Assays were performed at 37°C in 100 mM Tris-HCl (pH 8.5)-0.1 mM CaCl₂-0.5 g of substrate per liter.

DOCUMENT 7 : Etude de l'inhibition de la Pel E par l'épicatéchine



DOCUMENT 8 : Composition des deux milieux utilisés pour l'attention et la culture de protoplastes

ELEMENTS	COMPOSITION EN MILLIGRAMME/LITRE	
	MILIEU 1	MILIEU 2
Pectinase		
- Macerozyme R10 (¹).....	200	
Cellulases :		
- Onozuka R10 (¹).....	1 000	
- Driselase (²).....	500	
NH ₄ NO ₃	825	825
KNO ₃	950	950
CaCl ₂ , 2 H ₂ O.....	220	220
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	185	185
KH ₂ PO ₄	85	85
FeSO ₄ , 7H ₂ O	27,85	27,85
Na ₂ SO ₄	37,25	37,25
ZnSO ₄	1	1
H ₂ BO ₃	1	1
MnSO ₄ , 4H ₂ O.....	0,1	0,1
CuSO ₄ , 5H ₂ O.....	0,03	0,03
AlCl ₃	0,03	0,03
NiCl ₂ , 6H ₂ O.....	0,03	0,03
K I.....	0,01	0,01
Inositol.....	100	100
Panthoténate de calcium.....	1	1
Biotine.....	0,01	0,01
Niacine (Nicotinamide).....	1	1
Pyridoxine.....	1	1
Thiamine.....	1	1
Acide naphthalène acétique.....	3	3
6-Benzyladénine.....	1	1
Saccharose.....		20 000
Mannitol.....	80 000	80 000
Agar.....		6 000
(le pH est ajusté à 5,5)		(éventuellement)

1. Yakult Biochemicals Co, Ltd, 8-21 Shingikancho, Nishinomiya, Japon.
2. Kyoxa Hakko Kogyo Co, Ltd, P.O. Box 5170, Tokyo International 100-31, Japon.