

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 6

*SCIENCES BIOLOGIQUES
FONDAMENTALES ET
GÉNIE BIOLOGIQUE*

Le sujet comporte 4 pages numérotées de 1/4 à 4/4

Green Fluorescent Protein

La *Green Fluorescent Protein* « GFP » est une protéine spontanément fluorescente isolée d'animaux (par exemple la méduse *Aequorea victoria*) dont le rôle naturel est de transférer la chimio-luminescence bleue d'une autre protéine (l'aéqorine) vers le vert. Cette molécule (de même que ses dérivés) est appelée à jouer un rôle majeur en biologie dans la mesure où elle est intrinsèquement fluorescente et peut servir de marqueur polyvalent dans la cellule vivante.

1. Amélioration des propriétés biologiques de la GFP (37 points)

Afin d'étudier la structure de la GFP et d'optimiser ses propriétés biologiques par mutagenèse, on réalise son extraction à partir de la méduse *Aequorea victoria* puis sa purification.

1.1 Purification de la GFP

La purification de la GFP met en oeuvre quatre techniques chromatographiques :

- DEAE-sepharose
- Phase inverse
- DEAE-Bio-Gel
- Gel filtration

1.1.1. Donner le principe de la séparation par gel filtration.

1.1.2. Présenter le principe et les caractéristiques de la chromatographie en phase inverse.
Donner un exemple de phase stationnaire utilisée.

1.1.3. La purification d'une protéine peut être évaluée de manière qualitative ou quantitative.
Expliquer succinctement ces deux approches.
Proposer une méthode adaptée à chacune.

1.2 Données structurales

La structure de la GFP a été élucidée récemment par diffraction des rayons X, ce qui a permis de définir ainsi une nouvelle classe de protéines (boîte ou bidon β : « β -can») : conformation en cylindre avec une enveloppe constituée de feuillets β protégeant des hélices α portant les fluorophores.

1.2.1. Décrire les différents niveaux d'organisation d'une protéine en insistant sur la nature des liaisons qui en permettent le maintien.

1.2.2. Représenter le schéma conventionnel d'un feuillet β et d'une hélice α dans une protéine.

Chaque molécule de GFP est un dimère dont les deux protomères de 238 résidus d'acides aminés sont identiques. La zone de contact entre les deux protomères met en évidence deux groupes de résidus :

- alanine, leucine, phénylalanine d'une part ;
- tyrosine, acide glutamique, glutamine, asparagine, sérine, arginine d'autre part.

- 1.2.3 Indiquer la propriété caractéristique de chacun des deux groupes de résidus intervenant dans l'association des deux protomères en dimère. Présenter les types d'interactions pouvant s'établir entre les résidus à l'intérieur de chaque groupe.

La stabilité remarquable (demi-vie de 24 heures) de la fluorescence de la GFP native s'explique par la localisation des fluorophores.

- 1.2.4 Donner la signification de l'expression « demi-vie de la fluorescence de la GFP ». À partir des données structurales de la GFP, expliquer la stabilité de la fluorescence.

1.3 Modifications de la GFP native

Dans le but de produire de nouvelles molécules fluorescentes dérivées de la GFP, on a modifié par mutagenèse dirigée la structure primaire de la GFP. De nombreuses autres molécules ont été obtenues :

- des molécules apparentées dont la CFP (*Cyan Fluorescent Protein*), la BFP (*Blue FP*), la YFP (*Yellow FP*) ;
- diverses GFP moins stables dont les demi-vies varient de 1 à 4 heures ;
- divers marqueurs fluorescents de solubilité améliorée.

1.3.1. Définir «mutagenèse dirigée» et «mutagenèse aléatoire».

1.3.2. Dans le cas d'une mutagenèse dirigée, comment doit-on concevoir l'oligonucléotide nécessaire pour réaliser une mutation ponctuelle ?

Quelle sera la conséquence de cette mutagenèse pour la protéine ?

2. Clonage du gène de la GFP (21 points)

Le gène de la GFP étant utilisé pour produire des protéines de fusion, il est nécessaire de le cloner. La méthode suivante a été mise en œuvre :

- obtention des ADNc à partir de la fraction cytosolique d'un broyat cellulaire ;
- utilisation de la bactérie *Escherichia coli* pour réaliser une banque plasmidique d'ADNc ;
- criblage de la banque à l'aide d'une sonde oligonucléotidique marquée par une technique froide.

2.1. Définir précisément le terme « ADNc ». Présenter à l'aide de schémas les étapes indispensables de la synthèse d'un ADNc à partir d'une fraction cytosolique.

2.2. Justifier l'utilisation d'un ADNc et non pas du gène naturel pour la production de la GFP chez *Escherichia coli*.

2.3. Décrire les étapes de l'incorporation de l'ADNc au vecteur à l'aide d'adaptateurs (linkers).

2.4. Donner le principe de la transformation d'une bactérie par la technique d'électroporation.

2.5. Présenter les éléments essentiels d'un vecteur plasmidique de clonage chez *E. coli* et préciser leur rôle.

3. La GFP, outil de recherche de nouveaux anti-microbiens (26 points)

Un groupe pharmaceutique a financé l'étude de voies métaboliques spécifiques du processus infectieux, en espérant découvrir de nouvelles cibles d'antibiotiques.

La stratégie de cette société repose essentiellement sur la technologie dite «*Differential Fluorescence Induction*» (DFI : induction différentielle de fluorescence) : des souches pathogènes ont été transformées par des vecteurs exprimant la GFP sous le contrôle de différents promoteurs de gènes liés au processus infectieux. L'action d'un agent antimicrobien est alors repérée par la diminution de la fluorescence des souches transformées.

- 3.1. Définir le terme «promoteur».
- 3.2. Le gène codant la GFP est utilisé dans cette technologie comme gène rapporteur. Définir le terme « gène rapporteur ». Préciser le rôle d'une telle construction dans le contexte de l'étude réalisée.
- 3.3. À l'aide d'un schéma, indiquer trois cibles des antibiotiques chez les bactéries et citer, pour chacune d'elle, un antibiotique actif.
- 3.4. Présenter quatre mécanismes de résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique.
- 3.5. Le dénombrement des bactéries fluorescentes peut être réalisé en cytofluorimétrie de flux. Décrire le principe de la cytofluorimétrie de flux dans un contexte général et exposer également le principe du tri des cellules.

4. La GFP, outil de biologie cellulaire (36 points)

La GFP est utilisée pour produire des protéines de fusion afin de marquer par fluorescence divers constituants cellulaires. Par exemple, la GFP permet l'étude de la distribution dans l'espace de certains composants des chromosomes (centromères, télomères, gènes actifs et inactifs...) qui sont visualisés en microscopie confocale.

- 4.1. Définir «télomère» et «centromère» ; préciser leur(s) rôle(s) respectif(s).

L'utilisation de la GFP permet aussi l'analyse des mouvements des chromosomes au cours des divisions cellulaires (mitose et méiose) et la mise en évidence du rôle du cytosquelette dans des mouvements intracellulaires variés.

- 4.2. Réaliser des schémas annotés d'une cellule diploïde ($2n = 6$) en anaphase I et en anaphase II de méiose, ainsi qu'en anaphase de mitose.
- 4.3. Citer les trois constituants filamenteux du cytosquelette. Décrire la structure moléculaire de chacun d'entre eux.

La GFP est un outil de marquage qui peut constituer une alternative à l'utilisation des anticorps marqués, qu'ils soient d'origine polyclonale ou monoclonale, pour le repérage des ultrastructures cellulaires.

- 4.4. Les anticorps monoclonaux sont généralement des immunoglobulines G. Présenter la structure d'une IgG sous forme d'un schéma annoté.
- 4.5. Définir le terme « anticorps monoclonaux ».
- 4.6. Présenter la démarche d'obtention d'un clone d'hybridome producteur d'anticorps monoclonaux : préciser les caractéristiques des cellules mises en jeu et la stratégie de sélection des hybridomes.