

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR**

**BIOTECHNOLOGIE**

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 4

*ÉTUDE DE PROJET*

**Le sujet comporte 10 pages numérotées de 1/10 à 10/10**

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

## Production et caractérisation de deux variants de la protéine prion du mouton

Les prions sont des agents pathogènes transmissibles non conventionnels responsables d'encéphalopathies spongiformes (maladie de Creutzfeldt-Jakob, tremblante du mouton) ayant toutes des caractéristiques communes. Ces agents provoquent des désordres neurovégétatifs affectant diverses espèces de mammifères.

Une glycoprotéine, la PrPc, abondante à la surface des neurones et, qui interviendrait dans le fonctionnement synaptique et la transduction des signaux, serait à l'origine de ces pathologies. Cette molécule pourrait changer de conformation, de la forme PrPc physiologique à celle pathologique, dite "scrapie" ayant un taux de feuillets  $\beta$  augmenté et celui d'hélices  $\alpha$  diminué.

Chez le mouton, une étude génétique menée sur le gène PRNP qui code la protéine PrPc a fait ressortir deux allèles particuliers :

- Les animaux homozygotes portant l'allèle **V136-Q171** (valine en position 136 et glutamine en position 171) sont particulièrement prédisposés à la maladie. La protéine synthétisée est nommée **PrPc (VQ)**.
- Les animaux homozygotes pour l'allèle **A136-R171** (alanine en position 136 et arginine en position 171) sont très peu sujets à la maladie. La protéine synthétisée est nommée **PrPc (AR)**.

Les clonages des deux variants du gène PRNP codant la protéine PrPc du mouton ont été réalisés dans *E.coli*. Il est alors possible de produire et purifier en grande quantité ces deux protéines afin d'en étudier les propriétés.

### 1. Clonage médié par PCR des variants du gène PRNP du mouton (23 pts)

La stratégie de clonage des deux variants est similaire.

Le **document n° 1** présente la structure du gène PRNP du mouton (*Ovis aries*). Seul l'exon n° 2 code la protéine prion et son clonage a été décidé pour les deux variants du gène PRNP.

#### 1.1. Choix des amorces

- 1.1.1 À partir du **document n° 1a**, préciser pourquoi ce clonage est réalisable par PCR.
- 1.1.2 À l'aide du **document n° 1b**, déterminer les séquences des deux amorces utilisables pour cette PCR et s'hybridant avec les régions soulignées. Justifier. Elles sont nommées respectivement « *amorce 161* » et « *amorce 931* » selon leur site d'hybridation.
- 1.1.3 Calculer la  $T_m$  (°C) de chacune de ces deux amorces en utilisant la règle de Wallace :
$$T_m(^{\circ}\text{C}) = (4 \times \text{nombre de bases GC}) + (2 \times \text{nombre de base AT})$$
- 1.1.4 Déterminer une valeur de température d'hybridation pour ce couple d'amorces.

## BOPRO

Le clonage est réalisé en utilisant ces amorces modifiées au niveau de leur extrémité 5' par l'ajout, lors de leur synthèse, d'une petite séquence possédant un site de restriction unique :

Séquence ajoutée à l'amorce 161 : 5'-**ATGCGAATTC**-3' où GAATTC correspond à un site *Eco* RI

Séquence ajoutée à l'amorce 931 : 5'-**AGTCCATATG**-3' où CATATG correspond à un site *Nde* I

**1.1.5** Quel est le rôle des nucléotides indiqués en caractères gras dans les séquences ajoutées aux amorces ?

**1.1.6** À l'aide des **documents 1a et 1b**, calculer la taille de l'amplicon attendu. Expliquer.

### 1.2. Optimisation de la PCR

Cette PCR est réalisée avec différentes concentrations en magnésium. Les résultats sont présentés dans le **document n° 2**.

**1.2.1** Quelle est la composition du tube "témoin négatif" ? Quel est son rôle ? Quel autre témoin peut être réalisé ? Donner sa composition et son rôle.

**1.2.2** Présenter l'analyse de cet électrophorégramme sous la forme d'un tableau (nombre de bandes, taille estimée, intensité). Commenter les résultats des pistes 3 à 8.

**1.2.3** Conclure quant aux conditions optimales en magnésium de cette PCR.

## 2. Production des variants de la protéine PrPc par fermentation (18 pts)

La production de la protéine recombinée est réalisée dans une unité de fermentation de 3 L utiles, selon le mode opératoire présenté dans le **document n° 3**.

### 2.1. Étude des étapes de la production

**2.1.1** Expliquer le rôle des différentes étapes de la production. Préciser le rôle de l'ampicilline.

**2.1.2** Préciser l'intérêt d'une absorbance proche de 1 à l'étape n° 2 du mode opératoire.

**2.1.3** À partir du **document n° 3**, calculer la quantité d'IPTG nécessaire à la réalisation d'une production. En déduire le conditionnement le plus approprié à l'aide du **document n° 4**.

**2.1.4** Justifier l'intérêt de réaliser les deux prélèvements aux étapes 2 et 3.

**2.1.5** Comment peut-on procéder en fin de production pour l'évaluation de la biomasse ? Quel en est l'intérêt ?

### 2.2. Étude de l'unité de fermentation

**2.2.1** Légender le **document n° 5 a**, en reportant les numéros sur la copie.

**2.2.2** À partir du schéma de l'échantillonneur (**document n° 5 b**), présenter le mode opératoire à suivre pour effectuer un prélèvement.

### 3. Production d'anticorps monoclonaux spécifiques des variants de la protéine PrPc (17 pts)

Les études envisagées nécessitent de disposer d'anticorps monoclonaux murins spécifiques de la protéine prion PrPc reconnaissant indifféremment les protéines PrPc (VQ) et PrPc (AR).

#### 3.1. Obtention des hybridomes et contrôle de la préparation obtenue.

3.1.1 À partir du **document n° 6**, justifier le choix des souris PrP<sup>0/0</sup> pour l'immunisation.

Afin de s'assurer que les hybridomes obtenus sont producteurs d'anticorps monoclonaux, un test ELISA est pratiqué sur les surnageants de culture des hybridomes.

3.1.2 À partir du **document n° 7**, schématiser les différentes étapes du test ELISA. Indiquer leurs rôles et préciser les conditions opératoires.

3.1.3 Quelles sont les caractéristiques de l'anticorps appelé « *second antibody* » utilisé dans ce protocole ?

#### 3.2. Production d'ascite

Une inflammation est déclenchée par injection d'une molécule, le pristane dans la cavité intra-péritonéale d'une souris PrP<sup>0/0</sup>. Après 48h,  $8,0 \cdot 10^5$  cellules d'hybridomes sont injectées dans le péritoine de la souris. Celle-ci est surveillée quotidiennement pour apprécier le gonflement abdominal jusqu'au prélèvement de l'ascite après environ 10 jours.

3.2.1 Quel volume d'hybridome faut-il injecter à la souris sachant qu'après trypsination d'une culture d'hybridomes, la concentration cellulaire est de  $3,4 \cdot 10^6$  cellules totales.mL<sup>-1</sup> et la viabilité de 94 % ?

3.2.2 Quels sont les avantages et inconvénients de la production d'anticorps monoclonaux en ascite de souris et en cytoculteur ?

### 4. Purification et analyse des variants de la protéine PrPc (22 pts)

#### 4.1 Purification des deux variants

Les deux protéines, **PrPc (VQ)** et **PrPc (AR)**, contiennent naturellement des régions riches en histidines, présentant une haute affinité pour le nickel. Cette propriété est utilisée pour les purifier. Le **document n° 8** présente les différentes étapes à suivre pour les extraire et les purifier, à partir de *E.coli* BL21 recombinées.

4.1.1 Expliciter le mode opératoire de l'étape d'extraction.

4.1.2 Expliquer le principe de l'élution des protéines retenues en présence d'imidazole 1 M.

4.1.3 Indiquer le rôle de l'étape soulignée dans le protocole utilisé.

#### 4.2. Analyse des caractéristiques structurales des variants PrPc (VQ) et PrPc (AR).

La masse moléculaire de ces protéines est connue (23 kDa). Afin de préciser leurs caractéristiques structurales, elles sont analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide selon deux conditions expérimentales :

**A** : SDS

**B** : SDS +  $\beta$ -mercaptoéthanol

**4.2.1** Préciser l'action du  $\beta$ -mercaptoéthanol sur les protéines.

**4.2.2** Analyser l'électrophorégramme obtenu (**document n° 9**).

Conclure quant à la structure monomérique ou multimérique des variants protéiques.

#### 4.3. Protéolyse ménagée du variant PrPc (VQ)

On cherche à démontrer l'influence de la conformation tridimensionnelle d'une protéine sur l'action de la chymotrypsine.

La chymotrypsine est une protéase, qui hydrolyse les liaisons peptidiques du côté carboxyl des résidus tryptophanyl, tyrosyl et phénylalaninyl.

Les sites de coupure de la chymotrypsine sont positionnés aux mêmes endroits sur les deux protéines étudiées, car la présence des 2 résidus différents aux positions 136 et 171 ne rajoute pas de site de coupure supplémentaire (**document n° 10**).

La protéine PrPc (VQ) est soumise à une hydrolyse ménagée par la chymotrypsine, après action préalable ou non de l'urée. Les produits d'hydrolyse sont déposés sur SDS PAGE et révélés au bleu de Coomassie. Cette expérience a été uniquement réalisée sur le variant PrPc (VQ).

	PrPc (VQ) avec urée (1 mol/L)	PrPc (VQ) sans urée
Nombre de fragments obtenus après hydrolyse ménagée par la chymotrypsine	environ 20 fragments peptidiques	5 fragments peptidiques

**4.3.1** Rappeler l'effet de l'urée sur une protéine.

**4.3.2** Expliquer pourquoi l'hydrolyse ménagée de la protéine PrPc (VQ), avec ou sans urée, ne conduit pas au même résultat.

#### 4.4. Protéolyse ménagée des variants PrPc (VQ) et PrPc (AR) en conditions non dénaturantes

Les deux protéines PrPc (VQ) et PrPc (AR) sont soumises à une hydrolyse ménagée par la chymotrypsine, sans urée.

Les produits de la digestion sont déposés sur un gel SDS-PAGE, suivi d'un western blot utilisant un anticorps monoclonal spécifique, l'anticorps **2D6** (**document n° 10**).

Les résultats obtenus sont présentés dans le **document n° 11**.

**4.4.1** Analyser et comparer les résultats obtenus.

**4.4.2** Formuler une hypothèse relative à la structure des protéines analysées.

**4.4.3** Conclure sur le lien entre la prédisposition à la maladie de la tremblante du mouton et la conformation de la protéine exprimée chez les variants VQ et AR.

**Document n° 1 a**

**Principales caractéristiques du gène PRNP du mouton (*ovis aries*)**

gene ID : 493887

taille ADN : # 20 kpb      taille du transcrit : 4178 bases      3 exons,  
 mais seul l'exon 2 (nucléotides 161 - 931 soit 771 pb) code pour la protéine PRION de 256 aa  
 (ID P23907)

**Document n° 1 b**

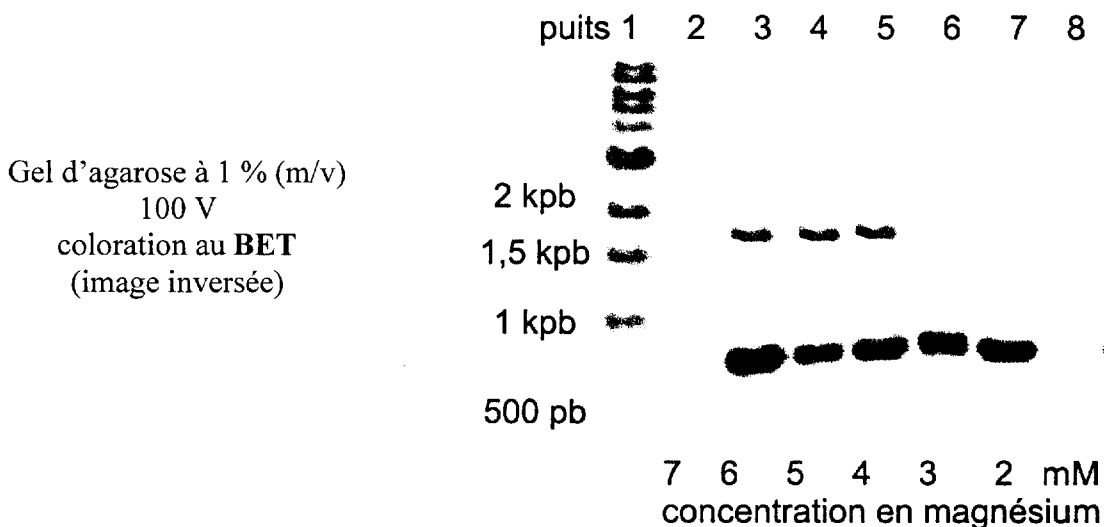
**Séquence de l'exon n° 2 du gène PRNP du mouton**

161 atggtagaaa gccacatagg  
 181 cagttggatc ctggttctct ttgtggccat gtggagtgcac gtgggacctc gcaagaagcg  
 241 accaaaacct ggcggaggat ggaacactgg ggggagccga taccggggac agggcagtcc  
 301 tggaggcaac cgctatccac ctgagggagg ggggtggetgg ggtcagcccc atggagggtg  
 361 ctggggccaa cctcatggag gtggetgggg tgcagcccat ggtggtggct ggggacagcc  
 421 acatggtggt ggaggetggg gtcaagggtg tagccacagt cagtggaaca ageccagtaa  
 481 gccaaaaacc aacatgaage atgtggcagg agctgctgca gctggagcag tggtaggggg  
 541 ccttgggtgc tacatgctgg gaagtgccat gacagggcct ctatatact ttgccaatga  
 601 ctatgaggac cgttactatc gtgaaaacat gtaccgttac ccaaceaag tgtaetacag  
 661 accagtggat cagtatagta accagaacaa ctltgtgcat gactgtgca acatcacagt  
 721 caagcaacac acagtcacca ccaccacca ggggggagaac ttcaccgaaa ctgacatcaa  
 781 gataatggag cgagtgggtg agcaaatgtg caccaccag taccagagag aatcccagge  
 841 ttattaccaaa agggggggcaa gttgtatcct cttttctcc cctcctgtga tectctcat  
 901 ctcttctc attttctca tagtaggata g

**Document n° 2**

**Électrophorégramme**

**Optimisation de la concentration en magnésium**



puits 1 : marqueur : 1 kpb ladder (biolabs)  
 puits 8 : témoin négatif

## Document n° 3

## Mode opératoire de la production de la protéine PrPc

Le vecteur utilisé est porteur des gènes Amp<sup>R</sup> et LacI. L'insert est placé sous contrôle d'un promoteur régulé par la protéine codée par le gène LacI.

**Étape 1**

- Introduire 750 mL de milieu LB dans un fermenteur de 3 L de volume utile.
  - Ajouter 750 µL d'ampicilline (100 mg.mL<sup>-1</sup>).
  - Ajouter 30 µL de bactéries *E.coli* BL21 recombinées (souche productrice) glycérolées.
- Incubation une nuit à 37 °C 180 rpm, pH régulé à 6,8.*

**Étape 2**

- Ajouter 750 mL de milieu LB.
  - Vérifier que l'absorbance à 600 nm est proche de 1.
  - Prélever 10 mL de culture dans un tube conique.
  - Ajouter 750 µL d'IPTG (240 mg.mL<sup>-1</sup>).
- Incubation une nuit à 37 °C 180 rpm, pH régulé à 6,8.*

**Étape 3**

- Prélever 10 mL de culture dans un tube conique.
- Récolter la culture dans des pots à centrifuger de 500 mL.
- Centrifuger 15 min à 4°C et à 1800 rpm.

## Document n° 4

## Fiche fournisseur de l'IPTG (prix hors taxes en euros)

**Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside**

IPTG; Isopropyl β-D-thiogalactoside

C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>S FW 238,30 [367-93-1]

**BioChemika, ≥99.0% (TLC)**

Non-metabolizable galactose analog.


IPTG is commonly used in cloning procedures that require induction of β-galactosidase activity. It is used in conjunction with X-Gal or Blue-Gal in blue-white selection of recombinant bacterial colonies that induce expression of the *lac* operon in *Escherichia coli*. IPTG functions by binding to the *lacI* repressor and altering its conformation, which prevents the repression of the β-galactosidase coding gene *lacZ*.

IPTG is an inducer of β-galactosidase activity in bacteria and is used to detect *lac* gene activity during cloning experiments<sup>1</sup>

loss on drying ..... ≤6%

ign. residue ..... ≤0.2%

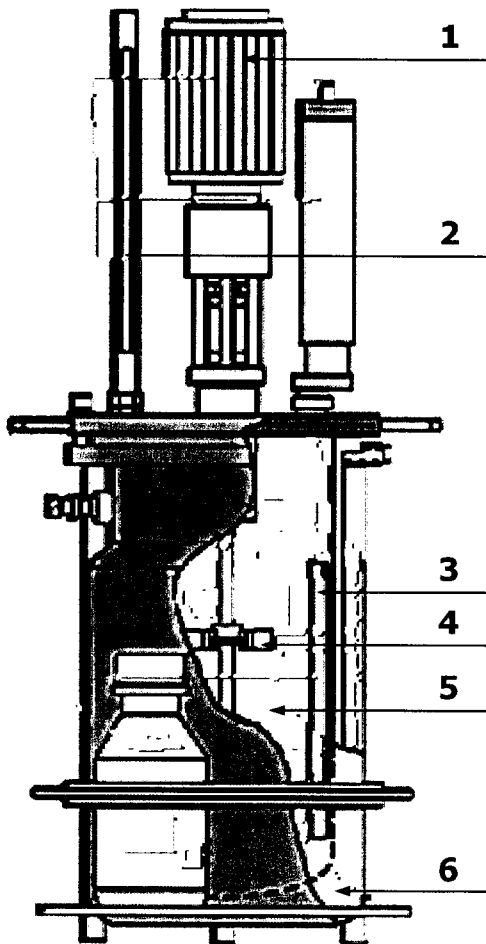
**Lit. cited:** 1. S. Cho et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **128**, 1268 (1985)

S: 22-24/25 EC No. 206-703-0 

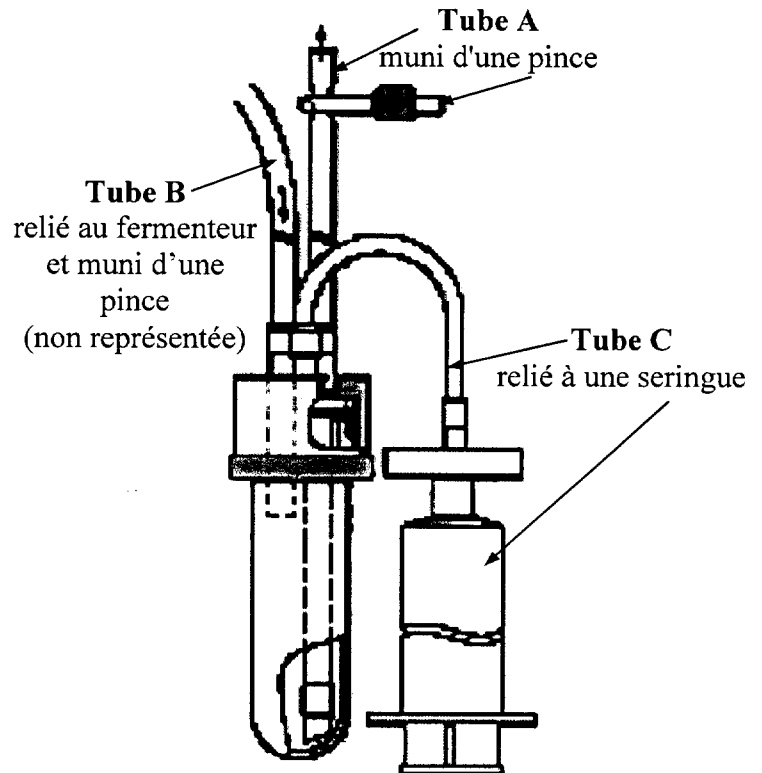
59740-250MG	250 mg	21.90
59740-1G	1 g	54.80
59740-5G	5 g	240.50

**Document n° 5**  
**Quelques aspects du bioréacteur utilisé**

**Document n°5 a :**  
**Schéma du bioréacteur**



**Document n°5 b :**  
**Échantillonneur**



**Document n° 6**  
**Protocole d'immunisation des souris.**

Les animaux choisis pour l'immunisation sont des souris non tolérantes PrP<sup>0/0</sup>, immunologiquement compétentes mais déficientes dans l'expression de la protéine prion endogène.

Le protocole d'immunisation est basé sur l'injection d'acide nucléique (ADN ou ARN) codant pour une partie de la protéine prion de mouton dans le tissu musculaire de la souris.

Après un délai convenable, l'immunsérum des souris est prélevé et testé par méthode ELISA afin de détecter la présence d'anticorps spécifiques de la protéine prion du mouton. Les souris présentant un taux élevé d'anticorps sont sacrifiées et leur rate est prélevée.



**Document n° 7**

**ELISA on hybridoma supernatants**

**Protocol :** ELISA plates were coated overnight at room temperature with 100 ng per well of prion protein-specific peptide in coating buffer (10 mM Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>, 35mM NaHCO<sub>3</sub>, pH9.6). ELISA plates were blocked for 30 minutes at 37°C (PBS supplemented with 0.1% Tween and 5% milk powder) and subsequently washed with washing buffer (PBS with 0.1% Tween and 200 mM NaCl). Hybridoma supernatants were diluted 1:10 in PBS containing 3% FCS and incubated for 2h at 37°C. Plates were washed four times with washing buffer. Binding antibodies were detected with a second antibody coupled with horseradish peroxidase and detected with oPD.

FCS: foetal calf serum

oPD: o-Phenylene diamine dihydrochloride

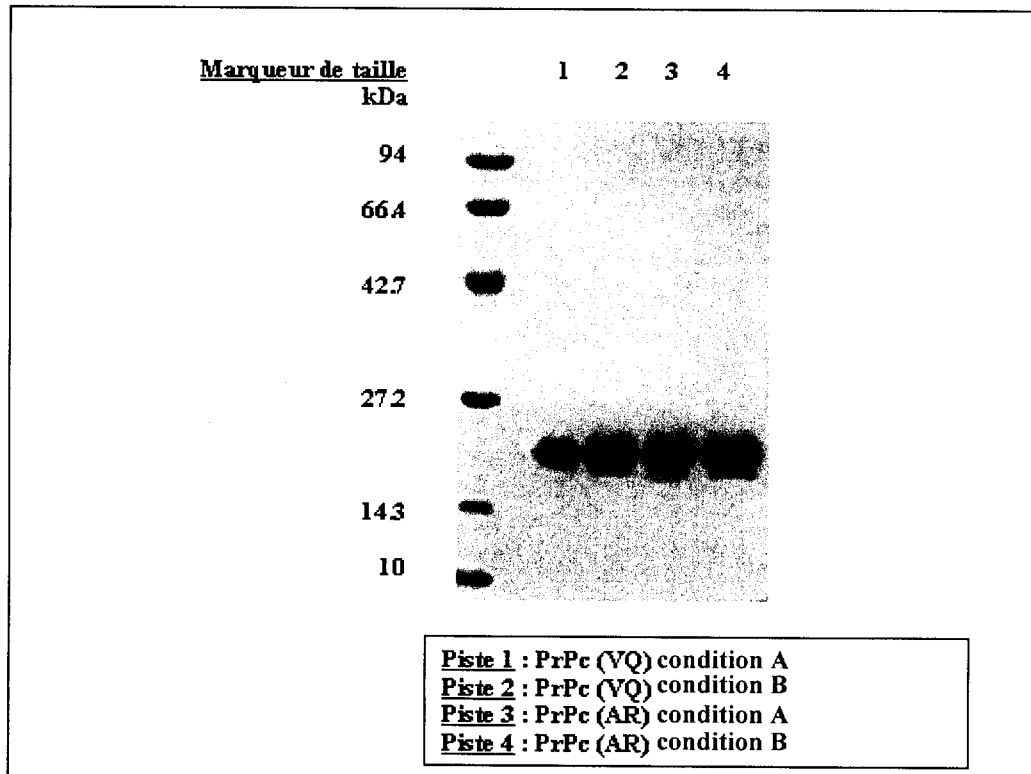
**Document n° 8**

**Protein extraction and purification**

After lysis for 30 min of *E.coli* BL21 (in Tris 10 mM EDTA 10 mM pH 7.5 containing 50 mg.mL<sup>-1</sup> of lysozyme), sonication and centrifugation, the supernatant is applied to a Ni-Sepharose column. The wash step with Tris/imidazole buffer led simultaneously to elimination of urea and renaturation of Ni<sup>2+</sup> bound-proteins. PrP variants were eluted in one-step by a 1 M imidazole solution in 20 mM Mops, pH 7.5. Imidazole was removed by an exclusion G 25 column and protein recovered in the desired buffer. Final protein concentration was measured by the optical density at 280 nm using for the extinction coefficient a value of 58718.0 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> deduced from the composition of the protein.

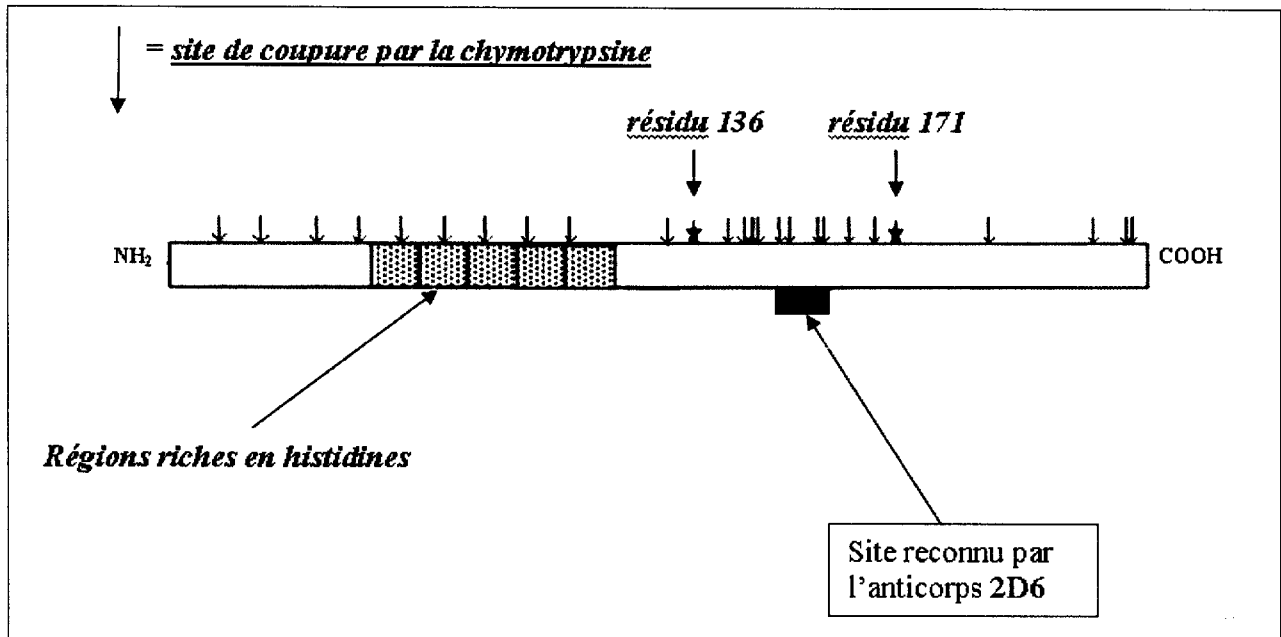
**Document n° 9**

**Electrophorégramme des variants protéiques PrPc (VQ) et PrPc (AR) sur gel de polyacrylamide**



Document n° 10

Localisation de sites d'intérêt sur les variants protéiques PrPc (VQ) et PrPc (AR)



Document n°11

Analyse par western blot des résultats d'hydrolyse ménagée.  
Révélation avec l'anticorps 2D6

