

BIOTECHNOLOGIES

Durée : 3 heures

Notes :

- L'usage d'une calculatrice, d'abaques et tables est interdit pour cette épreuve.
 - La plupart des questions sont indépendantes ou regroupées en parties indépendantes.
- Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

La question rédactionnelle est clairement identifiée.

PARTIE 1.

Quantification en système multiplex

Quantifier des molécules d'intérêt est un enjeu majeur dans le domaine de la santé, de l'agriculture, de l'industrie agro-alimentaire... L'approche multiplex consiste à évaluer simultanément plusieurs paramètres d'un même échantillon dans un **unique tube réactionnel**. Cette approche s'avère particulièrement intéressante si l'échantillon à doser est difficile à obtenir en quantité, et de façon plus générale elle limite la durée d'analyse et son coût.

Si la détection se révèle assez simple pour doser spécifiquement plusieurs types d'acides nucléiques, la transposition au dosage de protéines particulières pose de nombreuses contraintes technologiques.

1. PCR, multiplexage et quantification

La culture des cucurbitacées représente un enjeu économique et agroalimentaire majeur. Cependant, ces cultivars sont la cible de nombreux pathogènes viraux, de la famille des potyvirus (virus nu filamenteux à ARN +), de la famille des tospovirus (virus enveloppé, sphérique à ARN- segmenté) et de pathogènes bactériens comme *Acidovorax avenae sp. citrulli* (bacille gram -).

L'amplification d'ADN, par PCR multiplex en point final, a été la première stratégie mise en œuvre pour mettre en évidence simultanément les 3 types de pathogènes dans une feuille de cucurbitacée polyinfectée.

Q1. Proposer 3 particularités des couples d'amorces indispensables à leur utilisation dans le même tube d'amplification en PCR multiplex en point final.

La PCR en temps réel apporte deux avantages par rapport à la PCR en point final :

- une quantification relative ou absolue de la matrice,
- une durée d'analyse réduite.

Q2. Question rédactionnelle.

La PCR quantitative (qPCR) dans le cadre de la quantification d'une matrice d'ADN.

Vous décrierez le principe général de la PCR et préciserez les caractéristiques majeures de l'enzyme employée.

Vous indiquerez ensuite les particularités de la qPCR et vous expliquerez comment exploiter les résultats expérimentaux en vue de la quantification d'un ADN cible.

L'approche multiplex en qPCR n'est pas attendue.

Le dosage de protéines spécifiques est souvent préféré à cette approche moléculaire qui, bien que facile à mettre en œuvre et relativement peu onéreuse, implique une étape d'extraction initiale des acides nucléiques à adapter en fonction du

pathogène.

2. Dosage immunologique et quantification multiplex de protéines spécifiques

2.1. Dosage unitaire par méthode immuno-enzymatique

Bacillus cereus, est présent dans de nombreux produits alimentaires. L'ingestion d'un produit contaminé contenant plus de 10^5 UFC · g⁻¹ (UFC, unité formant colonie) conduit à des symptômes en 24 h allant de simples vomissements à des complications pouvant entraîner la mort. La quantification de *B. cereus* est habituellement réalisée par des techniques microbiologiques de dénombrement assez longues.

Le document 1 propose une méthode rapide de dosage immuno-enzymatique de *B. cereus* sur le principe de l'E.L.I.S.A (Enzyme linked Immuno-Sorbent Assay). Le document 1A décrit le mode opératoire mis en œuvre pour établir le graphe d'étalonnage de la méthode.

- Q3.** Préciser le rôle de chaque étape et réaliser un schéma à l'échelle moléculaire de la détection du pathogène.
- Q4.** Analyser la courbe présentée dans le document 1C. En déduire l'intervalle d'exploitation de la courbe étalon.
- Q5.** Montrer que les conditions expérimentales définies par le protocole (1A), et les caractéristiques de l'enzyme (1B) assurent que le signal mesuré est corrélé à la quantité d'antigène capturée par le support.

Le document 2 montre un tableau comparatif des propriétés des deux enzymes classiquement utilisées pour des méthodes E.L.I.S.A.

- Q6.** Exploiter le document pour évaluer les limites de l'utilisation des dosages immuno-enzymatiques en version multiplex.

2.2. Nanotechnologies et dosages immunologiques multiplex

Pour réaliser un dosage immunologique multiplex de 3 antigènes biomarqueurs de tumeur, Li *et al.* ont testé un schéma d'amplification du signal de révélation exploitant les propriétés de l'oxyde de graphène carboxylé (cGO).

Pour doser chaque biomarqueur, deux types d'anticorps spécifiques sont nécessaires :

- un anticorps de capture adsorbé sur la phase hétérogène,
- un anticorps de révélation, noté « Ac2 ».

Les auteurs ont nommé ce test « A.L.I.S.A » pour Allochroic-cGO Linked Immunosorbent Assay.

La préparation du réactif immunologique de révélation noté « Ac2-cGO-Colorant » est schématisée dans le document 3A.

- Q7.** Analyser les courbes du document 3 B. En déduire les conditions expérimentales de révélation.

Les auteurs ont mis en œuvre, pour un même antigène et les mêmes anticorps de capture et de révélation, un test E.L.I.S.A et un test A.L.I.S.A. Les résultats sont montrés dans le document 3C.

- Q8.** Réaliser une analyse comparée des résultats obtenus et conclure.

Le dosage de trois biomarqueurs dans du plasma de patients sains ou atteints de différents cancers a été réalisé, les particularités des réactifs de révélation et les résultats ont été rassemblés dans le document 4.

- Q9.** Proposer une stratégie permettant de lire successivement les absorbances caractéristiques des 3 colorants. Evaluer la possibilité d'une interférence entre les différentes mesures.
- Q10.** Montrer l'intérêt de doser plusieurs biomarqueurs pour assurer un diagnostic de suspicion de cancer.

Développement d'une plateforme de production de protéines hétérologues sans marqueur antibiotique chez *Streptomyces lividans*

L'utilisation industrielle d'enzymes produites par des micro-organismes est en perpétuelle croissance et nécessite donc des solutions durables de fabrication. La plupart des plasmides d'expression utilisés chez les bactéries productrices industrielles portent des gènes de résistance aux antibiotiques comme marqueur de sélection. L'usage des antibiotiques dans ces processus n'est pas sans poser problème pour la santé des personnes et la sécurité des produits issus de ces filières.

L'étude porte sur la mise en place d'un nouveau système de production de protéines hétérologues sans marqueur de sélection de type antibiotique, exploitant un système de sélection naturel de type « toxine antitoxine » (TA).

La souche de l'étude, *Streptomyces lividans*, appartient à l'ordre des actinomycétales. Le genre *Streptomyces* présente un cycle de développement original pour un procaryote (document 5).

1. Caractérisation du système toxine antitoxine chez *Streptomyces lividans*

De nombreuses bactéries possèdent un ou plusieurs systèmes de type « toxine antitoxine » (TA) impliqués en particulier dans le mécanisme de persistance en environnement hostile (présence d'antibiotiques, conditions physicochimiques défavorables, déficit de nutriments...). En conditions favorables, la toxine (T) et l'antitoxine (A) sont produites, s'associent neutralisant l'effet biologique de la toxine (T). En conditions défavorables, l'antitoxine (A) est dégradée, la toxine (T) libre provoque une sorte de dormance chez la bactérie qui arrête de se multiplier.

1.1. Recherche d'un système (TA) chez *Streptomyces lividans*

Des travaux préliminaires sont menés sur *Streptomyces lividans* afin d'identifier un système (TA) par recherche d'homologies de séquences avec un système (TA) bien caractérisé et documenté : le système « *yefM - yoeB* » de *E.coli*. Une valeur minimale de 30% d'identité entre deux séquences indique que les deux protéines appartiennent à une même famille.

Le document 6 présente les résultats obtenus.

Q11. Certains acides aminés alignés sont notés (+). En comparant leurs propriétés chimiques, déduire la signification du paramètre « Positives ». Indiquer ensuite la signification du second paramètre « Identities ». Justifier l'affirmation : le système (TA) de *S. lividans* mis en évidence appartient à la famille de protéines « *yefM - yoeB* »

1.2. Purification des protéines YefMsl et YoeBsl

Les séquences codantes identifiées des gènes *yefMsl* (264 pb) et *yoeBsl* (270 pb) sont clonées chacune dans un vecteur d'expression procaryote pET22b afin de produire l'antitoxine ou la toxine avec une étiquette de 6 Histidines. Le document 7 présente les protocoles d'extraction et de purification des protéines d'intérêt.

Q12. Analyser les étapes d'extraction et préciser le devenir des protéines d'intérêt au cours du processus.

Q13. Expliquer le principe de la méthode utilisée pour purifier les protéines recherchées. Représenter le profil d'élution obtenu.

Une dialyse termine la purification.

Q14. Préciser l'intérêt de cette étape. A l'aide du document 7B, expliquer et justifier l'utilisation de la cartouche de référence 71509-3 D-Tube™ Dialyzers Maxi, seuil de coupure de 6 - 8 kDa.

Données : masse molaire d'un acide aminé $\approx 110 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.
taille des séquences codantes : 264 pb (*yefMsl*) et 270 pb (*yoeBsl*)

1.3. Evaluation de la toxicité du système (TA) de *Streptomyces lividans* exprimé chez *E. coli*

De nouvelles constructions sont produites dans le vecteur d'expression pFUS2 afin de valider le fonctionnement *in vivo* du système (TA) de *Streptomyces lividans* chez *E. coli*. Les différents vecteurs d'expression sont présentés dans le document 8.

- Q15.** Expliquer et justifier, à l'aide du document 8, les conditions de culture indiquées dans le document 9.
- Q16.** Préciser les points critiques techniques nécessaires à respecter pour les mesures de $D_{600 \text{ nm}}$ (mesure du trouble ou atténuation à 600 nm) réalisées.
- Q17.** A partir du document 9, expliquer comment peut être déterminé le temps de génération, G , de la souche *E.coli* transformée par pFUS2 - Tox en présence et en absence de la toxine YoeBsl. Evaluer alors G pour ces deux conditions.
- Q18.** Analyser et interpréter les résultats obtenus du document 9.

2. Développement de la plateforme d'expression chez *Streptomyces lividans*

2.1. Construction de la souche productrice

Dans un premier temps, des manipulations génétiques, par la technologie REDIRECT, sont mises en œuvre afin d'obtenir la souche productrice *Streptomyces lividans* Δ TA-Tox (pRoxAnti-Prot) présentée dans le document 10.

Ce travail est mené sur une culture de protoplastes : *Streptomyces lividans* dont la paroi a été éliminée. Le document 11 présente la procédure suivie pour leur obtention.

- Q19.** A partir du protocole fourni dans le document 11, discuter la composition du **milieu P** utilisé pour cette préparation. Expliquer l'intérêt de la préparation de la souche productrice à partir de protoplastes plutôt que des bactéries directement.

2.2. Validation de la plateforme d'expression

On cherche à valider la nouvelle plateforme d'expression en produisant l'alpha-amylase, codée par le gène *amy* et naturellement sécrétée. Trois souches de *Streptomyces lividans* sont utilisées pour l'étude :

- la souche sauvage,
- la souche possédant l'ancien système d'expression avec 2 marqueurs antibiotiques,
- la souche *Streptomyces lividans* Δ TA-Tox (pRoxAnti-*amy*).

La production de l'enzyme, dans le surnageant de culture, est suivie :

- par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS PAGE) et révélation par coloration au bleu de Coomassie à 0,5%,
- par mesure de l'activité enzymatique.

Les résultats sont donnés dans le document 12.

- Q20.** Analyser l'ensemble des résultats obtenus. Préciser l'intérêt de chacune des manipulations réalisées. Conclure.

Document 1 Dosage de pathogènes par méthode immunoenzymatique

1A. Protocole mis en œuvre pour l'obtention du graphe étalon

L'étalonnage est réalisé en soumettant à l'essai une suspension de *B. cereus* de concentration $5 \cdot 10^7$ bactéries \cdot mL⁻¹.

Dans une microplaque de 96 puits :

- Préparer des dilutions de la suspension bactérienne étalon en tampon PBS ($138 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl - $2,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl - $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tampon phosphate pH 7,4 à 25 °C), de $(1/4)^0$ à $(1/4)^{11}$.

Dans une seconde microplaque :

- Distribuer 100 μ L/puits de l'anticorps polyclonal (de lapin) de capture spécifique en tampon carbonate, pH = 9,6 ;
- Incuber pendant une nuit à 4°C ;
- Laver trois fois avec 300 μ L/puits de tampon PBS-T (PBS contenant 0,05 % de TWEEN® 20) ;
- Distribuer 200 μ L/ cupule d'une solution de lait écrémé en poudre (0,05 % en PBS-T) ;
- Incuber pendant 1,5 h à 37°C ;
- Laver trois fois avec 300 μ L/puits de tampon PBS-T ;
- Transférer 100 μ L de chaque dilution de la suspension bactérienne ;
- Incuber pendant 40 minutes à 37°C ;
- Laver trois fois avec 300 μ L/puits de tampon PBS-T ;
- Ajouter 100 μ L d'anticorps monoclonal (de souris) anti-*B. cereus* dilué au 1/1000^{ème} en tampon PBS ;
- Incuber 30 minutes à 37°C ;
- Laver trois fois avec 300 μ L/puits de tampon PBS-T ;
- Ajouter 100 μ L de conjugué, Anticorps (de chèvre) anti Immunoglobuline de souris couplé à la peroxydase de raifort (HRP, HorseRadish Peroxidase), dilué au 1/5000^{ème} en tampon PBS. Incuber 30 minutes à 37°C ;
- Laver six fois avec 300 μ L/puits de tampon PBS-T ;
- Ajouter 100 μ L de solution de substrat TMB ($400 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$) ;
- Incuber 15 minutes à 37°C ;
- Ajouter 50 μ L de H₂SO₄ ($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) ;
- Mesurer l'absorbance à 450 nm.

1B. Propriétés de l'enzyme HRP et de son substrat TMB

- La peroxydase de raifort catalyse la réaction d'oxydation du substrat chromogène TMB (3,3'- 5,5'- tétraméthylbenzidine) fournie ci-dessous.



Source : <https://www.mpbio.com/product.php?pid=02152346&country=73>

- Les valeurs de K_M et V_{max} pour ce substrat ont été obtenues avec l'enzyme HRP soluble (et non couplée à un anticorps), mais dans les conditions exactes de volume, de température, de tampon utilisées à l'étape de révélation décrite dans la partie 1A du document 1.

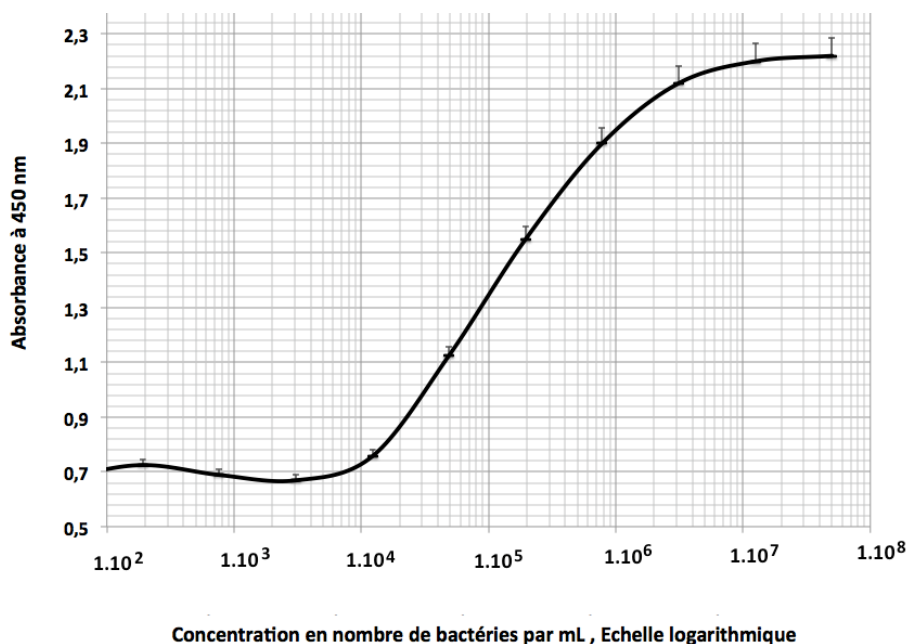
$$K_M \approx 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \quad \text{et} \quad V_{max} \approx 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

Les valeurs indiquées ont été arrondies.

1C. Dosage immuno-enzymatique de *B. cereus* par E.L.I.S.A.

Courbe étalon

Les absorbances moyennes de 3 séries de mesures conformément au protocole décrit dans le document 1A ont permis de tracer le graphe étalon ci dessous en échelle semi-logarithmique.

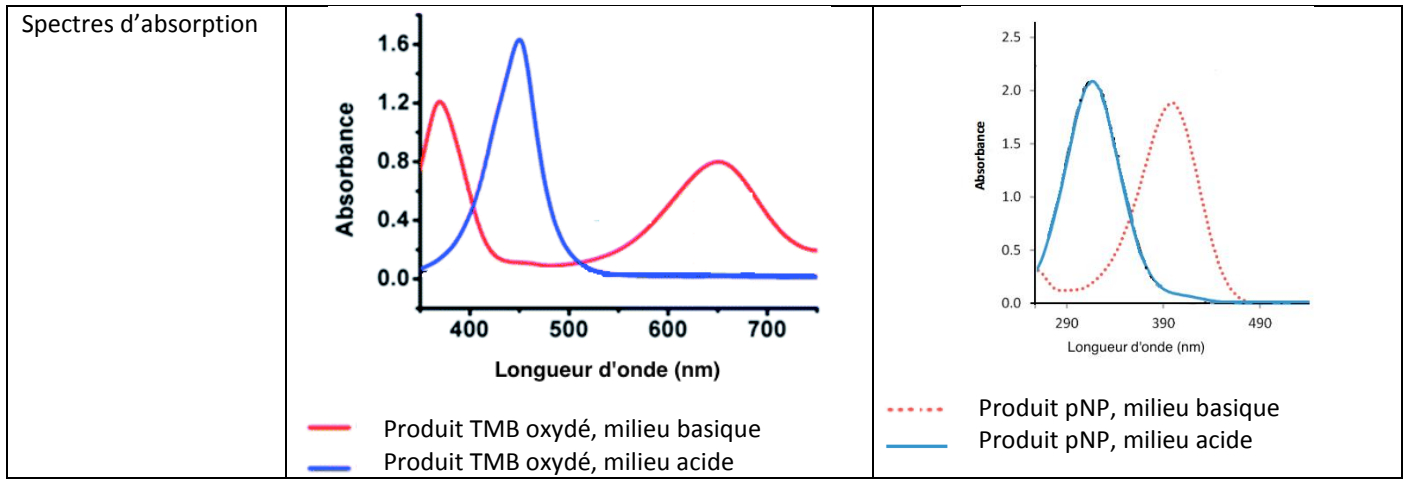


Procédure et résultats expérimentaux d'après : Zhu, L. et al. Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection of *Bacillus Cereus* in food. Sci. Rep. 6, 16092; doi: 10.1038/srep16092 (2016).

Document 2 Enzymes et substrats pour test E.L.I.S.A.

Les 2 enzymes suivantes sont largement utilisées pour mettre en œuvre des techniques immuno-enzymatiques, du fait de leurs qualités. Elles sont notamment faciles à produire, à utiliser, à conjuguer sur un anticorps, stables (demi-vie supérieure à 6 mois à 4°C), peu coûteuses et présentent une constante catalytique élevée.

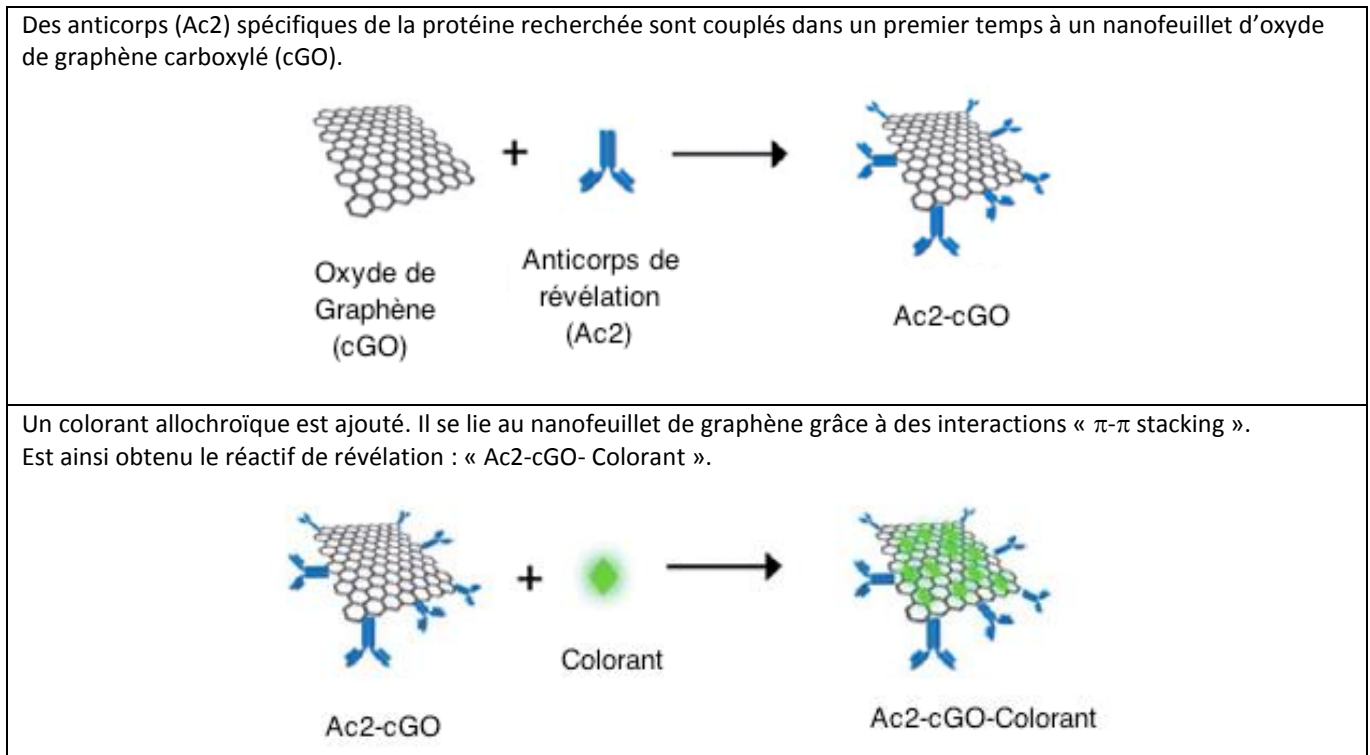
	Peroxydase de raifort	Phosphatase alcaline
MM	40 kD	86 kD
Ratio de couplage	Elevé, environ 4 enzymes par anticorps	Faible, environ 1 à 2 enzymes par anticorps
Substrat	TMB	pNPP
Conditions de mesure d'absorbance	Environnement acide	Environnement basique



Sources : Selecting the Detection System - Colorimetric, Fluorescent, Luminescent Methods, ELISA Technical Bulletin - No.5, Corning
 Spectre pNP : Process Safety and Environmental Protection. Volume 98, November 2015, Pages 109-115
 Spectres TMB: Chem. Sci., 2015, 6, 1272–1276

Document 3 Dosage immunologique en phase hétérogène grâce à un colorant allochroïque Test A.L.I.S.A

3A. Représentation schématique de la préparation du réactif de révélation « Ac2-cGO-Colorant »



3B. Caractérisation du réactif de révélation « Ac2-cGO-Colorant »

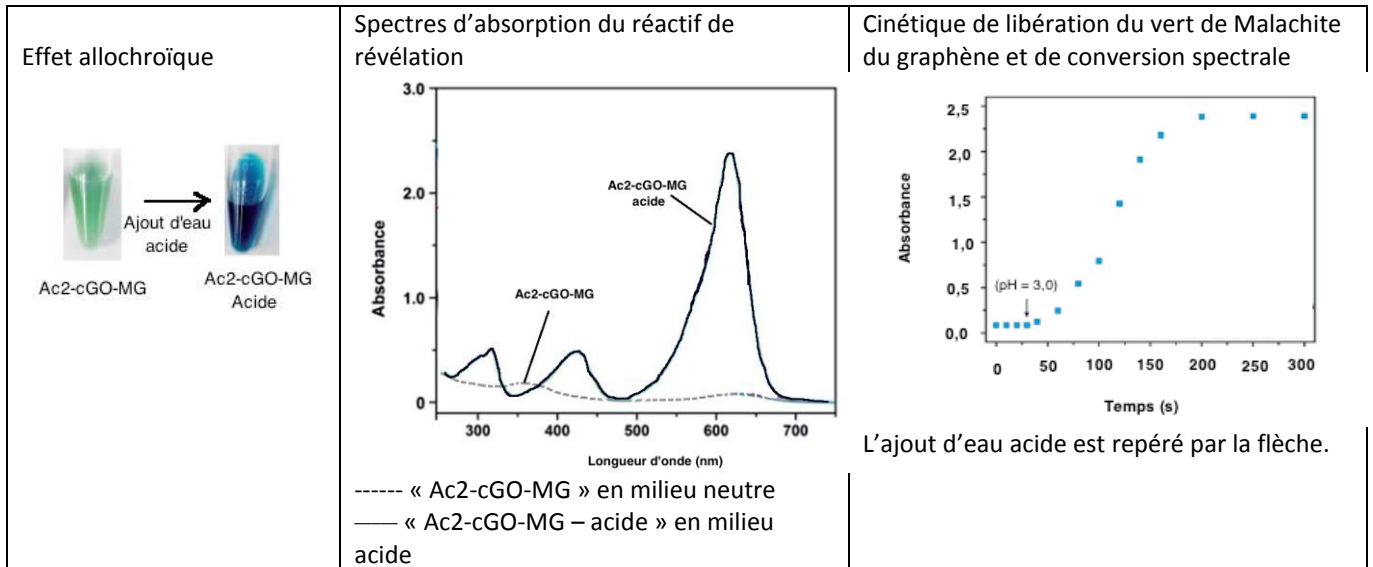
Les colorants liés au graphène sont allochroïques. Ils se caractérisent par des propriétés spectrales variant en fonction de l'environnement physicochimique. Les colorants choisis :

- se lient fortement au graphène à pH neutre,
- se dissocient du graphène lors d'une variation de pH qui modifie leurs propriétés spectrales.

La vérification de ces propriétés est réalisée par l'étude d'un réactif de révélation portant comme colorant allochroïque le vert de malachite (MG, malachite green). L'effet de l'acidification est suivi par la réalisation :

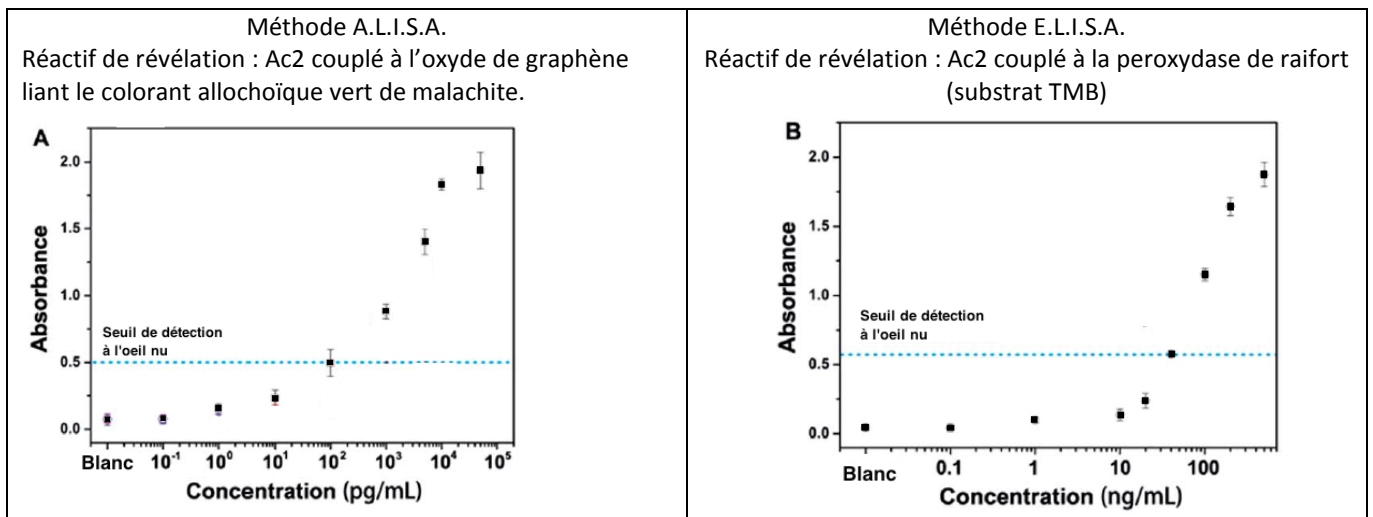
- de spectres d'absorption,

- d'une cinétique de libération du colorant par le graphène.



Source: Chem. Sci., 2016, 7, 3011. Improvement of enzyme-linked immunosorbent assay for the multicolor detection of biomarkers. Li et al.

3C. Comparaison de performance d'un test E.L.I.S.A. « classique » et un test A.L.I.S.A.



Blanc: PBS-T et barres d'erreur montrant les écarts-types des 3 répétitions.

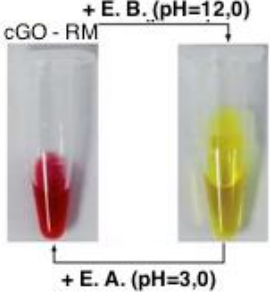
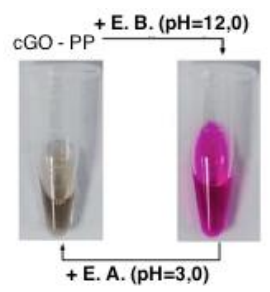
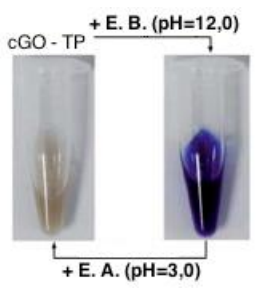
Source: Chem. Sci., 2016, 7, 3011. Improvement of enzyme-linked immunosorbent assay for the multicolor detection of biomarkers. Li et al.

Document 4 A.L.I.S.A. multiplex

Les 3 biomarqueurs indiqués dans le tableau ci dessous ont été dosés dans du plasma d'une cohorte de patients :

- 24 patients sains (HI, Healthy individual),
- 24 patients atteints d'adénocarcinomes (AC),
- 24 patients atteints carcinome à cellules squameuses (SQ),
- 24 patients atteints de cancer du poumon à petites cellules (SCLC).

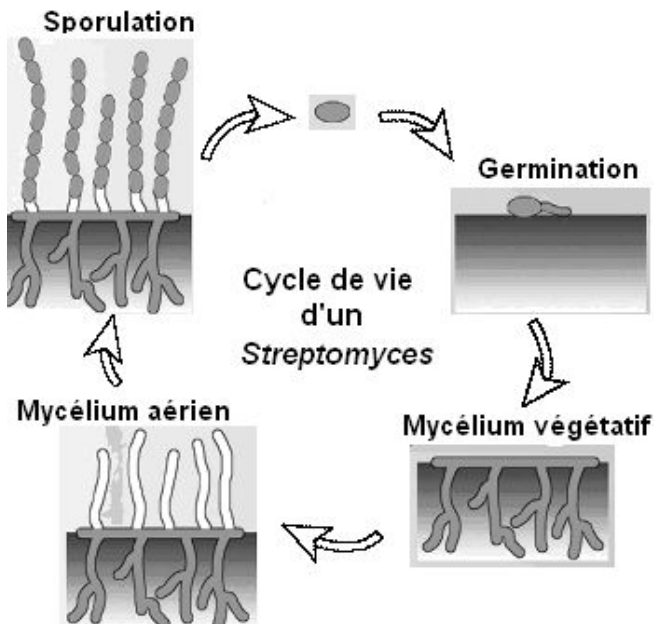
Antigène	Antigène carcino-embryonnaire (CEA)	Enolase spécifique des neurones (NSE)	Cytokératine fragment 19 (Cyfra)
Colorant allochroïque	Rouge de méthyle (MR)	Phénolphtaléine (PP)	Thymophtaléine (TP)

<p>Effet du pH sur les propriétés spectrales du colorant allochromique E.A. : eau acide E.B. : eau basique</p>																																																								
<p>Résultats obtenus pour chaque prélèvement</p>	<p>Les trois biomarqueurs ont été dosés dans les plasmas de chaque patient, la valeur obtenue a ensuite été comparée au seuil de positivité du test, valeur de l'absorbance à partir de laquelle la réponse est donnée positive. Le nombre d'échantillons positifs et négatifs est évalué pour chaque groupe de patients et chaque biomarqueur.</p> <table border="1" data-bbox="352 600 1433 981"> <thead> <tr> <th rowspan="3">Biomarqueur</th> <th rowspan="3">Résultat</th> <th colspan="4">Groupe de patients</th> </tr> <tr> <th>Sains</th> <th colspan="3">Atteints d'un cancer</th> </tr> <tr> <th>HI</th> <th>AC</th> <th>SQ</th> <th>SCLC</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="2">Nombre d'échantillons positifs et négatifs</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">CEA</td> <td>positif</td> <td>1</td> <td>14</td> <td>9</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>négatif</td> <td>23</td> <td>10</td> <td>15</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">NSE</td> <td>positif</td> <td>0</td> <td>5</td> <td>6</td> <td>19</td> </tr> <tr> <td>négatif</td> <td>24</td> <td>19</td> <td>18</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Cyfra</td> <td>positif</td> <td>2</td> <td>9</td> <td>13</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>négatif</td> <td>22</td> <td>15</td> <td>11</td> <td>19</td> </tr> </tbody> </table>			Biomarqueur	Résultat	Groupe de patients				Sains	Atteints d'un cancer			HI	AC	SQ	SCLC	Nombre d'échantillons positifs et négatifs						CEA	positif	1	14	9	8	négatif	23	10	15	16	NSE	positif	0	5	6	19	négatif	24	19	18	5	Cyfra	positif	2	9	13	5	négatif	22	15	11	19
Biomarqueur	Résultat	Groupe de patients																																																						
		Sains	Atteints d'un cancer																																																					
		HI	AC	SQ	SCLC																																																			
Nombre d'échantillons positifs et négatifs																																																								
CEA	positif	1	14	9	8																																																			
	négatif	23	10	15	16																																																			
NSE	positif	0	5	6	19																																																			
	négatif	24	19	18	5																																																			
Cyfra	positif	2	9	13	5																																																			
	négatif	22	15	11	19																																																			

Source: Chem. Sci., 2016, 7, 3011. Improvement of enzyme-linked immunosorbent assay for the multicolor detection of biomarkers. Li et al.

Document 5 Cycle de vie de *Streptomyces lividans*

Cette bactérie à Gram positif, filamenteuse, aérobique, chimiotrophe, est capable de se développer sur de nombreux composés organiques comme seule source de carbone. Son génome est constitué d'un ADN linéaire de 8,34 Mpb très riche en bases G et C.



Cycle de vie

À partir d'une exospore, émerge un tube germinatif qui se développe et forme une hyphe (filament élémentaire). Ce filament prolifère en formant un réseau dense de filaments : le mycélium végétatif dans le sol. Suite à une stimulation, le mycélium végétatif produit des filaments aériens (mycélium aérien), capables de se différencier et libérer des exospores, formes de résistance et de dispersion de la bactérie.

Source: *Streptomyces Exploration: Competition, Volatile Communication and New Bacterial Behaviours*. Jones SE, Elliot MA. Trends Microbiol. 2017 Jul; 25(7): 522-531.

Document 6 Alignement des séquences protéiques putatives de l'antitoxine (AsI) et de la toxine (Tsl) chez *S. lividans* avec respectivement, l'antitoxine (Aec) et la toxine (Tec) chez *E. coli*

Identities	Positives
42/81 (52%)	57/81 (70%)

Asl	2	SITASEARQNLFPPLIEQVNEHDHAPVHITSRKGNA-VLMSEEDFTAWTETVHLLRSPNAR	60
Aec	3	+I+ SEARQNL + + EDHAP+ IT + G A VLMS E++ + ET +LLRSP NAR	
		TISYSEARQNL SATMMKAVEDHAPILITRQNGEACVLMSLEEYNSLEETAYLLRSPANAR	62
Asl	61	RLDSIAEAEAGDATEHDLID	81
		RL+DSI ++G TE D+I+	
Aec	63	RLMDSIGSLKSGKGTEKDIIE	83

Identities	Positives
47/84 (56%)	64/84 (76%)

Tsl	1	MRITFTSHGWEDYVHWAESDRKVTKRINRLIADIARDPFKGVGKPEPLKGDLSGYWSRRI	60
		M++ ++ W+DY++W E+D+++ K+IN LI DI R PF+G GKPEPLK +LSG+WSRRI	
Tec	1	MKLIWSEESWDDYLYWQETDKRIVKINELIKDIRRTPFEGKKGKPEPLKHNLSGFWSRRI	60
Tsl	61	DDTHRLVYKPTDDQLVIVQARYHY	84
		+ HRLVY TDD L+I RYHY	
Tec	61	TEEHRLVYAVTDDSLIAACRYHY	84

Code des acides aminés à 3 lettres et à 1 lettre (source : <http://www.fao.org/docrep/004/Y2775E/y2775e0e.htm#TopOfPage>)

ala	arg	asn	asp	cys	glu	gln	gly	his	ile	leu	lys	met	phe	pro	ser	thr	trp	tyr	val
A	R	N	D	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V

Source: Identification of the first functional toxin-antitoxin system in *Streptomyces*. Sevillano L, Díaz M, Yamaguchi Y, Inouye M, Santamaría RI., PLoS One. 2012; 7(3):e32977

Document 7 Protocole d'extraction et de purification des protéines YefM-His₆SI et YoeB-His₆SI

Les protéines d'intérêt sont préparées à partir d'une culture induite de la souche *E. coli* BL 21 productrice selon le protocole ci-dessous.

1^{ère} partie : Extraction

- Centrifugation de la culture bactérienne induite à 5000 x g à 4°C pendant 10 min ;
- Mise en suspension du culot bactérien dans le tampon de lyse (5 mmol · L⁻¹ Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ pH = 7,5, 300 mmol · L⁻¹ NaCl, 0,1 % Triton X100, 5 mmol · L⁻¹ Imidazole) ;
- Sonication (4 impulsions de 20 s ; 0°C ; 1 min de pause entre 2 impulsions) ;
- Centrifugation à 100 000 x g pendant 30 min.

2^{ème} partie : Purification

- Dépôt du surnageant sur une colonne contenant 2 mL de résine NTA- Ni (Qiagen) (cf. [document 7a](#)) ;
- Dépôt et élution par les tampons suivants :

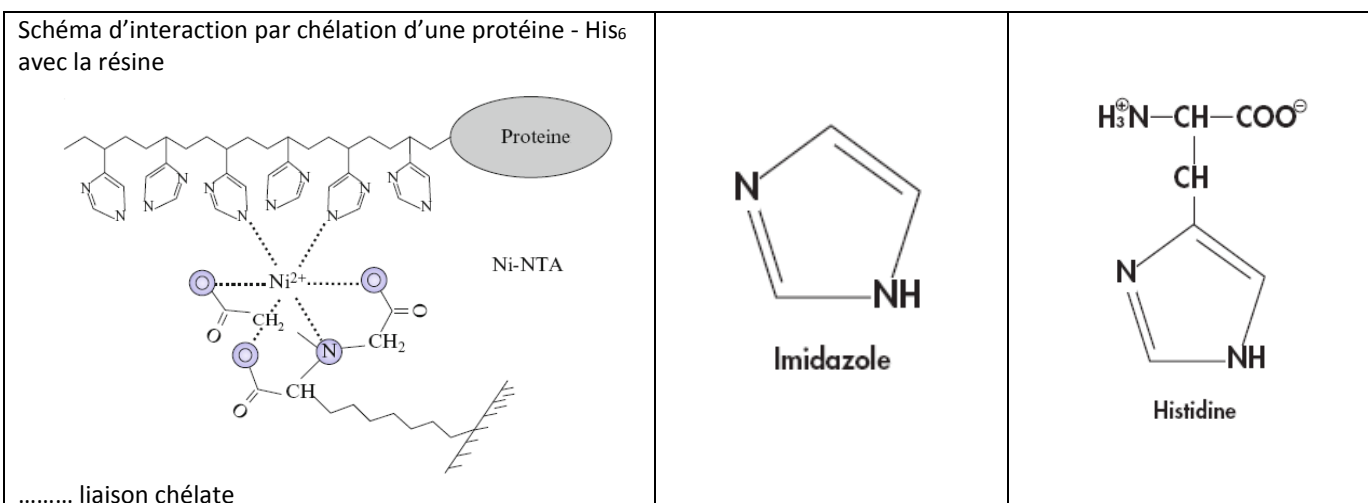
Tampons	Volume déposé
5 mmol · L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ pH = 7,5, 300 mmol · L ⁻¹ NaCl, 0,1 % Triton X100, 20 mmol · L ⁻¹ Imidazole	15 mL
5 mmol · L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ pH = 7,5, 300 mmol · L ⁻¹ NaCl, 0,1 % Triton X100, 30 mmol · L ⁻¹ Imidazole	10 mL
5 mmol · L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ pH = 7,5, 300 mmol · L ⁻¹ NaCl, 0,1 % Triton X100, 250 mmol · L ⁻¹ Imidazole	1,5 mL
5 mmol · L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ pH = 7,5, 300 mmol · L ⁻¹ NaCl, 0,1 % Triton X100, 1 M Imidazole	1 mL

- Collecte des fractions riches en protéines ;
- Dialyse avec le système D-Tube™ Dialyzers Maxi (cf. [document 7b](#)) durant 48 h contre 2 L de tampon de dialyse (50 mmol · L⁻¹ Tris, pH = 7,5, 10 mmol · L⁻¹ NaCl, 10 % Glycérol).

Les protéines purifiées seront utilisées afin d'étudier leur structure biochimique, leur cible moléculaire, le mécanisme et la stœchiométrie de leur interaction pour la souche *Streptomyces lividans*.

Source: Identification of the first functional toxin-antitoxin system in *Streptomyces*. Sevillano L, Díaz M, Yamaguchi Y, Inouye M, Santamaría RI., PLoS One. 2012; 7(3):e32977

7A. Résine NTA – Ni (Qiagen)



Source: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, Qiagen

7B. D-Tube™ Dialyzers (Novagen®)

Produit	Volume	Seuil de coupure en kDa	Référence catalogue
D-Tube™ Mini	10 à 250 µL	6 – 8	71504-3
		12 - 14	71505-3
D-Tube™ Midi	50 à 800 µL	3,5	71506-3
		6 – 8	71507-3
D-Tube™ Maxi	100 à 3000 µL	3,5	71508-3
		6 – 8	71509-3
		12 - 14	71510-3
D-Tube™ Mega	3 à 10 mL	3,5	71739-3
		6 – 8	71740-3

Source : d'après Dialysis and filtration products, Product Selection Guide, Merck4biosciences

Document 8 Construction des souches transformées de *E. coli* pour le contrôle du système (TA) de *Streptomyces lividans*

Souche utilisée : *Escherichia coli* SC36 (MG1655 Δ *yefM-yoeB*)

Milieu de culture : Milieu LB (Tryptone 10 g · L⁻¹, extrait de levure 5 g · L⁻¹, chlorure de sodium 5 g · L⁻¹)

Vecteurs de transformation employés :

pFUS2	Vecteur d'expression procaryote contenant le gène de résistance à la kanamycine et permettant d'exprimer une protéine d'intérêt chez <i>E. coli</i> sous le contrôle du promoteur inducible à l'arabinose P _{BAD} .
pFUS2 - Tox	Vecteur pFUS2 dérivé permettant la production de la protéine YoeBsl sous le contrôle du promoteur inducible à l'arabinose P _{BAD} .
PFUS2 - TA	Vecteur pFUS2 dérivé permettant la production des protéines YefMsl et YoeBsl sous le contrôle du promoteur inducible à l'arabinose P _{BAD} .

Source: Identification of the first functional toxin-antitoxin system in *Streptomyces*. Sevillano L, Díaz M, Yamaguchi Y, Inouye M, Santamaría RI., PLoS One. 2012; 7(3):e32977

Document 9 Effet de la surexpression de YoeBsl et du complexe YefMsl - YoeBsl dans *E. coli* SC36 (MG1655 Δ *yefM-yoeB*)

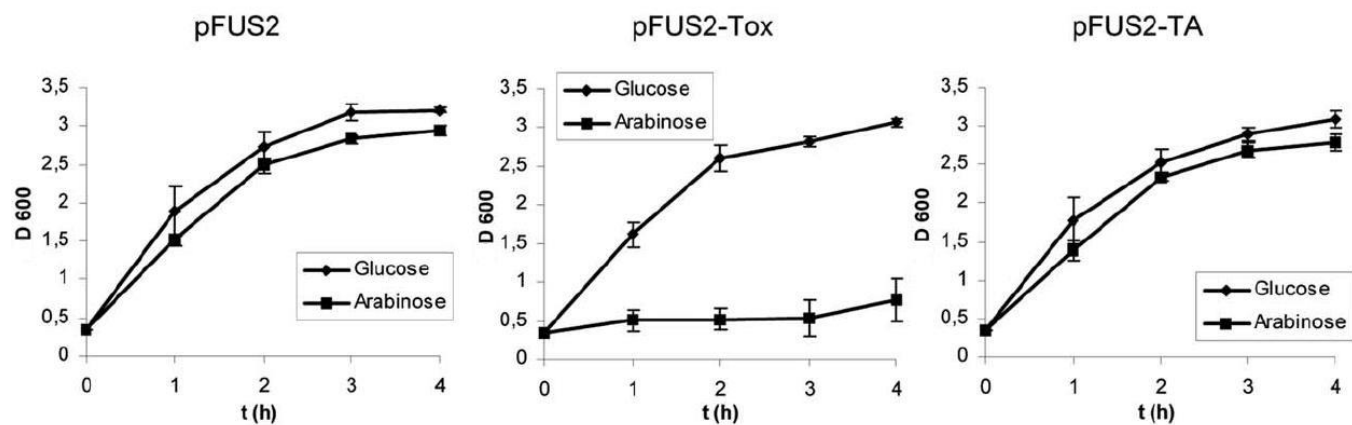
Les souches *Escherichia coli* SC36, respectivement transformées avec chacun des trois plasmides, sont mises en préculture

sur milieu LB supplémenté avec $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de kanamycine, à 37°C , sous agitation jusqu'à ce que les cultures atteignent une valeur de $D_{600 \text{ nm}}$ proche de 0,5.

Les cultures sont alors divisées en 2 lots afin de tester deux conditions de croissance :

- 1^{ère} condition : la culture est supplémentée avec 0,2 % (m/v) de glucose,
- 2^{ème} condition : la culture est supplémentée avec 0,2 % (m/v) d'arabinose.

La croissance bactérienne est suivie par mesure de $D_{600 \text{ nm}}$ durant 4 heures, chaque condition étant réalisée en triple. On obtient les résultats ci-dessous.



Note : Les barres sur chaque point des courbes présentent l'erreur standard (n=3).

Source: Identification of the first functional toxin-antitoxin system in *Streptomyces*. Sevillano L, Díaz M, Yamaguchi Y, Inouye M, Santamaría RI., PLoS One. 2012; 7(3):e32977

Document 10 Particularités génétiques de la souche *Streptomyces lividans* Δ TA-Tox (pRoxAnti-Prot)



L'opéron TA de la souche est délété, le gène *yoeBsl* est réintroduit dans le chromosome bactérien.

Le plasmide pRoxAnti-Prot, vecteur d'expression, contient :

- le gène *yefMsl* sous le contrôle du promoteur *xylAp* inducible par le xylose,
- la séquence de la protéine d'intérêt sous le contrôle du promoteur fort *pstSp* inducible lui aussi par le xylose.

Source: Development of an antibiotic marker-free platform for heterologous protein production in *Streptomyces*. Sevillano L, Díaz M, Santamaría Rl., *Microb Cell Fact.* 2017 Sep 26; 16(1):164.

Document 11 Protocole de préparation d'une suspension de protoplastes à partir d'une culture de *Streptomyces lividans*

- Mise en culture de la souche sur **milieu S** 48 h à 28 °C, sous agitation à 200 rpm ;
- Collecte du mycélium par centrifugation 300 x g durant 10 min et élimination du surnageant ;
- Mise en suspension du mycélium en **milieu P** contenant 1 mg · mL⁻¹ de lysozyme ;
- Incubation 2 h à 32 °C ;
- Centrifugation de la suspension de protoplastes à 300 x g durant 5 min et récupération du surnageant ;
- Centrifugation du surnageant à 1500 g pendant 15 min et lavage du culot avec 5 mL de **milieu P** (répéter cette étape 3 fois) ;
- Mise en suspension du culot dans 0,2 à 0,3 mL de **milieu P** ;
- Dénombrement et calibration de la suspension de protoplastes obtenue.

Milieu S :

Glucose	10 g
Peptone	4 g
Extrait de levure	4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
KH ₂ PO ₄	4 g
Glycine	10 g
Solution d'éléments trace	0,25 mL
Eau distillée	Qsp 1 L

Milieu P

Saccharose	103 g
K ₂ SO ₄	0,25 g
MgCl ₂ , 6H ₂ O	2,03 g
KH ₂ PO ₄	0,05 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	3,68 g
Tampon TES 0,25 mol · L ⁻¹ , pH = 7,2	100 mL
Solution d'éléments trace	0,25 mL
Eau distillée	Qsp 1 L

Solution d'éléments trace (pour 1 L)

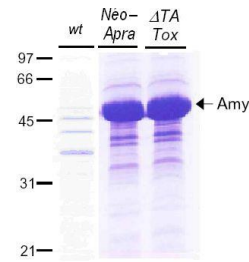
ZnCl ₂	40 mg	MnCl ₂ ·4H ₂ O	10 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	200 mg	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	10 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	10 mg	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	10 mg

Source: Formation and reversion of Streptomyces protoplasts: cultural condition and morphological study. Okanishi M, Suzuki K, Umezawa H., *J Gen Microbiol.* 1974 Feb; 80(2):389-400.

Document 12 Résultats de l'expression de l'enzyme alpha-amylase par différents systèmes d'expression et dans différentes conditions

12 A. Expression de l'alpha-amylase par différentes souches de *S. lividans*

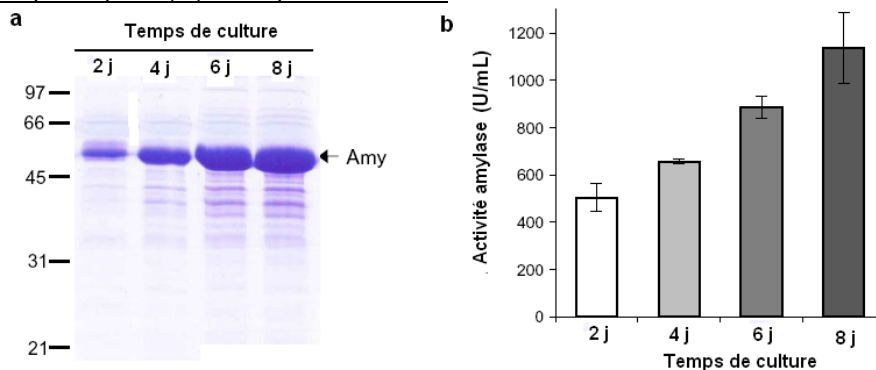
- **wt** : souche sauvage,
- **Néo – Apra** : souche possédant l'ancien système d'expression avec 2 marqueurs antibiotiques (Néomycine –Apramycine)
- **ΔTA Tox** : nouvelle plateforme d'expression



12 B. Etude de l'expression l'alpha-amylase par la nouvelle plateforme d'expression

Pour chaque expérience, la souche est mise en culture dans le milieu YES supplémenté à 3% (m/v) en xylose. L'expression de l'alpha-amylase est suivie par électrophorèse SDS PAGE (a) révélée au bleu de Coomassie et par la mesure de l'activité amylase (b).

Expression de l'alpha-amylase après 2, 4, 6 et 8 jours de culture



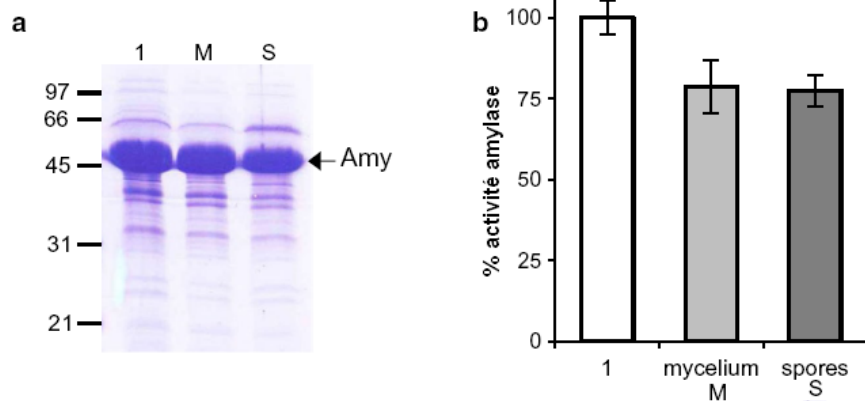
Expression de l'alpha-amylase à partir des structures bactériennes présentées dans le document 5

(1) culture initiale

(M) après remise en culture du mycélium congelé

(S) après remise en culture des spores congelées

Les surnageants de culture sont analysés après 6 jours de culture.



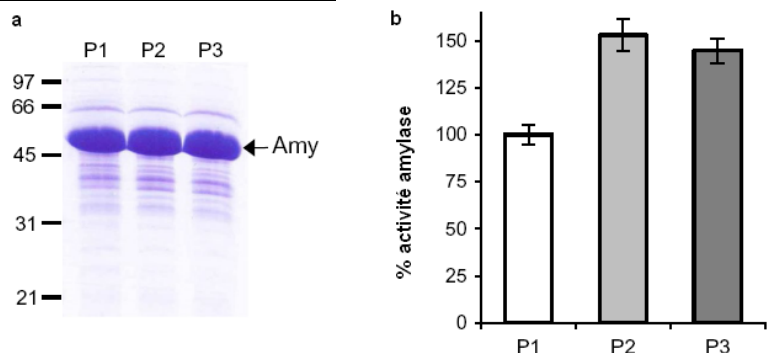
Expression de l'alpha-amylase après dilution, tous les 2 jours, au 1/100 de la culture

P1 est préparée par dilution au 1/100^{ème} d'une pré-culture de 2 jours.

P2 est préparée par dilution au 1/100^{ème} de P1 après 2 jours de culture.

P3 est préparée par dilution au 1/100^{ème} de P2 après 2 jours de culture.

P1, P2 et P3 sont analysées à 6 jours de culture.



Notes : Pour chaque piste des gels, 10 μL de surnageant de culture ont été déposés.

Les barres sur les histogrammes de mesure de l'activité amylase ou du % activité amylase présentent l'erreur standard (n=3).

Source: Development of an antibiotic marker-free platform for heterologous protein production in *Streptomyces*. Sevillano L, Díaz M, Santamaría Rl., *Microb Cell Fact.* 2017 Sep 26; 16(1):164.