

## 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.

Le sujet comprend 12 documents, pages 7 à 13.

### PARTIE 1.

## Amélioration d'une souche bactérienne industrielle à l'aide du système CRISPR Cas9 hétérologue pour résister à un nouveau bactériophage lytique

De nombreux processus bactériens de fermentation industrielle sont susceptibles de subir des infections phagiques dévastatrices. La forte densité de bactéries, la durée de la production et la présence d'une population mono espèce sont des éléments très favorables à la prolifération de virus bactériens appelés bactériophages.

Dans cette étude la souche *Escherichia coli* K12 FM5 est utilisée pour la production à grande échelle de propane-1,3-diol (PDO). Dans un bioréacteur a été mis en évidence un nouveau bactériophage lytique particulièrement virulent. L'équipe décide alors de modifier génétiquement la souche bactérienne pour la rendre résistante au phage à l'aide du système hétérologue CRISPR Cas9 de *Streptococcus thermophilus*.

### 1. Caractérisation structurale et génomique du bactériophage

Afin de caractériser et d'identifier le bactériophage incriminé, un prélèvement est réalisé sur un fermenteur en cours de production identifié comme infecté : la culture présente une forte lyse bactérienne.

**Q1.** A partir du prélèvement en bioréacteur, expliquer et justifier, à l'aide du document 1, la procédure de purification du bactériophage.

Le génome du bactériophage est extrait et purifié.

**Q2.** Le document 2 présente le protocole mis en œuvre. Bâtir un logigramme des différentes étapes. Argumenter le rôle de chacune.

L'analyse bio-informatique de la séquence du bactériophage a permis de construire la carte du génome (document 3). Celle-ci confirme l'identification réalisée lors de l'étude morphologique en microscopie. Il s'agit du bactériophage DTL apparenté à la sous-famille *Tunavirinae*, très proche génétiquement du bactériophage RTP.

L'analyse bio-informatique permet également de prédire une fonction biologique à chacun des éléments de séquence. Cette fonction doit être confirmée expérimentalement par un test d'activité biologique de la protéine correspondante exprimée dans un système hétérologue.

**Q3.** Proposer une démarche expérimentale pour obtenir la protéine à tester à partir du génome viral purifié.

## 2. Construction des souches *E. coli* K12 FM5 résistantes au bactériophage DTL

### 2.1. Système hétérologue CRISPR Cas9

Le système CRISPR a été, pour la première fois, mis en évidence dans les bactéries à Gram (-) en 1987. Ce n'est qu'au début des années 2000 que l'on comprend son fonctionnement et son rôle dans l'immunité acquise anti bactériophage chez les bactéries.

Le document 4 présente un schéma de l'organisation et du fonctionnement du système CRISPR Cas9 chez *Streptococcus thermophilus*. Le système CRISPR présente une organisation en opéron (document 4A).

**Q4.** Après avoir défini le terme «opéron», expliquer l'intérêt d'une telle organisation génétique chez les procaryotes.

**Q5.** A partir du document 4C, préciser l'activité enzymatique de la protéine Cas9. Expliquer son fonctionnement.

**Q6.** Préciser la fonction de l'ARN guide, acteur important du système.

En s'appuyant sur l'étude du génome du bactériophage DTL, deux stratégies sont testées afin de construire des souches résistantes à l'aide du système CRISPR Cas9:

- 1<sup>ère</sup> stratégie : *E. coli* K12 FM5 est transformée par le vecteur « **Strep therm CRISPR3** » obtenu par clonage de l'opéron complet et natif CRISPR Cas9 de *Streptococcus thermophilus* dans le plasmide pACYC184,

- 2<sup>ème</sup> stratégie : *E. coli* K12 FM5 est transformée par le vecteur « **DTL-CRISPR** » obtenu à partir du plasmide pACYC184 dans lequel a été cloné CRISPR Cas9 optimisé contenant des fragments du génome du bactériophage DTL.

**Q7.** Schématiser une carte du vecteur « **DTL-CRISPR** », avec l'ensemble des boîtes fonctionnelles nécessaires et permettant de cibler par le système CRISPR les séquences suivantes du bactériophage : « hélicase », « primase » et « fibre caudale ».

### 2.2. Contrôle de production avec les deux souches modifiées

Les souches productrices transformées sont validées par deux séries de tests :

- le contrôle de la résistance au bactériophage DTL des 2 types de souches transformées,
- le contrôle de la productivité des 2 types de souches transformées pour le propane-1,3-diol (PDO).

Les résultats sont présentés dans le document 5.

**Q8.** Analyser les résultats présentés dans le document 5A. Conclure quant aux deux stratégies employées.

**Q9.** Réaliser une analyse des résultats de production (document 5B) et conclure.

Le propane-1,3-diol est un métabolite primaire.

**Q10.** Tracer un graphe présentant l'évolution de la biomasse et de la production du propane-1,3-diol au cours du temps.

**Q11. Question rédactionnelle.**

La production du propane-1,3-diol par la souche *E. coli* K12 FM5 est réalisée en bioréacteur de 600 000 L en milieu non renouvelé. Des études en bioréacteur de laboratoires restent néanmoins nécessaires.

Après avoir défini la notion de culture en milieu non renouvelé, ses intérêts et ses limites, vous présenterez, à l'aide d'un schéma soigneusement annoté, les principaux éléments d'un bioréacteur de laboratoire puis décrierez leur fonction. Vous expliquerez, à partir d'un exemple concret, le principe d'une boucle de régulation et son intérêt.

## Ribonucléases anges ou démons

Les cellules synthétisent différentes catégories d'ARN (acides ribonucléiques) engagés dans des fonctions majeures des cellules comme la transcription, la traduction mais aussi la réplication. L'équilibre entre synthèse et dégradation est dû à la régulation de l'activité des enzymes impliquées comme les ARN polymérases et les ribonucléases (RNases). De plus certaines protéines à activité RNase ont été identifiées comme facteur angiogénique notamment dans le processus de cancérisation.

Les ARN sont exploités dans de nombreuses approches biotechnologiques :

- *in vitro*, pour évaluer l'activité promotrice d'un gène (RT-qPCR, par exemple), pour évaluer le transcriptome (RNA-seq)
- *in vivo*, pour inhiber l'expression d'un gène par l'interférence ARN.

Selon les phénomènes biologiques ou biotechnologiques mis en œuvre les ARN doivent être soit maintenus intacts, soit éliminés.

Le sujet s'intéresse à la mise en place de systèmes de mesure d'activité des RNases et de caractérisation de deux types d'inhibiteur, un polyside et une protéine.

### 1. Activité catalytique des ribonucléases

L'activité catalytique de deux types de ribonucléases, la ribonucléase A1 (RNase A1) et la ribonucléase H2 (RNase H2), est évaluée par différentes approches.

**Q12.** Proposer une unité pour exprimer l'activité enzymatique et la définir.

La ribonucléase A1 (EC 3.1.27.5) est une endonucléase clivant la liaison phosphodiester d'une molécule d'ARN engageant un cytidylate ou uridylate et libérant une extrémité 3' phosphate.

#### 1.1. RNase A1

- **Suivi par spectrophotométrie de l'activité de la RNase A1**

Le premier substrat utilisé pour doser l'activité RNase A1 est le para-nitrophénylphosphate- 3'-Uridine (pNPP-3'-U) dont la formule développée et les propriétés spectrales sont fournies dans le [document 6](#).

**Q13.** Montrer que la molécule pNPP-3'-U est utilisable pour la mesure d'activité enzymatique de la RNase A1.

- **Suivi par fluorescence de l'activité RNase A1**

Le [document 7B](#) montre les particularités d'un substrat permettant un suivi de l'activité RNase par fluorimétrie en phase homogène.

**Q14.** Exploiter le [document 7](#) pour choisir le meilleur quencher compatible avec le fluorochrome 6-FAM et vérifier que le substrat proposé est utilisable pour un suivi fluorimétrique de l'activité RNase A1. Justifier la réponse.

- **Comparaison des paramètres cinétiques**

Les constantes  $K_{cat}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}/K_m$ , normalisées pour ces 2 substrats dans les mêmes conditions expérimentales, sont fournies dans le [document 8](#).

**Q15.** Préciser ce que représentent  $k_{cat}$ ,  $K_m$  et  $k_{cat}/K_m$  pour une enzyme michaélienne. Proposer une explication justifiant les écarts de valeur de ces constantes pour les deux substrats testés.

## 1.2. Suivi par électrophorèse capillaire de la RNase H2

L'électrophorèse est une méthode intéressante pour mettre en évidence le clivage de molécules d'ARN. L'électrophorèse en capillaire rempli de gel permet d'allier les propriétés de l'électrophorèse de zone et la quantification précise des fragments ayant migré.

La mesure de l'activité catalytique de la ribonucléase H2 de mammifère se prête particulièrement bien à un suivi par électrophorèse capillaire. Cette enzyme présente un rôle majeur dans le métabolisme des acides nucléiques notamment en éliminant les amorces ARN des fragments d'Okasaki lors de la réplication. Elle catalyse le clivage de la liaison phosphodiester entre un ribonucléotide et un désoxyribonucléotide.

Le [document 9](#) propose un protocole simplifié du test d'activité enzymatique de la RNase H2.

**Q16.** Schématiser la structure du substrat et du (des) produit (s) de la réaction enzymatique catalysée par la RNase H2. Schématiser ensuite les différentes espèces moléculaires obtenues après l'étape de dénaturation.

**Q17.** Schématiser et annoter l'électrophorégramme obtenu pour 3 temps ( $t_0$ ,  $t_1$  et  $t_2$ ) de cinétique enzymatique.

Indiquer comment est calculée la fraction de substrat hydrolysé par la RNase H2.

## 2. Inhibition de la RNase A par le polyoside de *Pholiota nameko* (PNPS-1)

La recherche biomédicale cherche à identifier des molécules naturellement produites et utilisables dans un contexte thérapeutique. Le polyoside PNPS-1 à activité inhibitrice a été purifié à partir du champignon basidiomycète *Pholiota nameko*.

L'étude de cinétique d'inhibition réalisée est proposée dans le [document 10A](#).

**Q18.** Justifier l'importance de l'ajout de la solution d'arrêt dans la procédure expérimentale fournie.

Dans l'hypothèse d'un mécanisme d'inhibition compétitive, on montre l'égalité suivante dans des conditions opératoires précises.

$$V_i = V_{max} \cdot \frac{[S]_0}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]_0}{K_i}\right) + [S]_0}$$

$V_i$ , vitesse initiale,

$V_{max}$ , vitesse initiale maximale,

$[S]_0$ , concentration initiale en substrat,

$[I]_0$ , concentration initiale en inhibiteur,

$K_m$ , constante définie en Q15

$K_i$ , constante de dissociation du complexe enzyme/inhibiteur.

**Q19.** En déduire l'effet d'un inhibiteur compétitif sur les deux constantes cinétiques.

**Q20.** Analyser le graphe du [document 10B](#) pour préciser le type d'inhibition de la RNase A due à PNPS-1.

## 3. Inhibition de la RNase A par un effecteur protéique

Lors de nombreuses applications de biologie moléculaire, il est indispensable que les ARN restent intacts. Pour ce faire, on utilise un réactif contenant une petite protéine de 50 kDa, inhibitrice des ribonucléases de type pancréatique, RI, pour Ribonuclease Inhibitor.

### 3.1. Etude structurale de la protéine RI, Ribonuclease Inhibitor

La protéine RI humaine est une protéine monomérique, acide ( $pI= 4,44$ ), présentant un taux élevé de résidus cystéine (6,94 %, contre 1,7 % en moyenne pour les autres protéines) et de résidus leucine (19,96 % contre 9 % en moyenne pour les autres protéines). Deux modélisations de la structure tridimensionnelle de la protéine RI sont proposées dans le [document 11](#).

**Q21.** Identifier chacune des structures secondaires présentées et l'associer à son code couleur. Préciser le type de liaison(s) engagée(s) pour stabiliser ces structures.

La protéine RI, présente une structure tridimensionnelle en forme en fer à cheval.

**Q22.** Schématiser 3 interactions faibles intervenant dans la mise en place de la structure tertiaire.

### 3.2. Production de la RI dans un système hétérologue

Si la purification de l'inhibiteur de la ribonucléase a permis de comprendre le rôle de cette protéine, les quantités exigées pour les utilisations commerciales et études en cours ont imposé la mise au point d'une méthode de production performante dans un système hétérologue.

Un des problèmes de la surexpression de la protéine RI est la présence de très nombreux résidus cystéine à maintenir dans un état réduit. La protéine RI est surexprimée sous forme cytoplasmique chez *E. coli*.

**Q23.** Sachant que le cytoplasme offre un environnement plutôt réducteur et que le milieu extracellulaire est un environnement oxydant, préciser sous quelle forme se trouvent les cystéines de la protéine RI avant et après lyse bactérienne. Proposer une méthode maintenant les cystéines dans un état réduit après lyse bactérienne.

La production de RI est réalisée par surexpression de la protéine RI sous le contrôle d'un promoteur inductible par le tryptophane. La procédure de purification et les résultats sont fournis dans le document 12.

**Q24.** Analyser les données fournies dans le document 12 pour établir la liste des 4 grandes étapes impliquées dans la purification de RI et préciser le but de chacune.

**Q25.** Présenter le rôle des 6 étapes mises en œuvre dans la chromatographie 2 (document 12A).

**Q26.** Calculer, pour chaque étape (document 12B), les données permettant d'évaluer la qualité de la purification : activité spécifique, rendement, facteur d'enrichissement. Conclure.

**Q27.** Proposer une procédure de vérification par électrophorèse en gel d'agarose de l'efficacité de la protéine RI produite.






## Document 1 Observation des particules phagiques en microscopie électronique à transmission

A partir du bioréacteur contaminé par des bactériophages, les deux étapes suivantes sont réalisées :

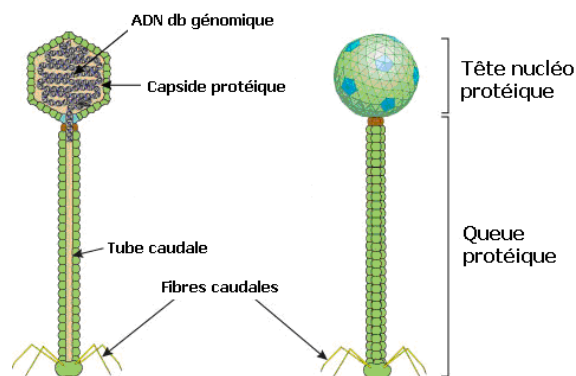
- prélèvement d'un échantillon de milieu de culture,
- filtration du lysat sur une membrane de cellulose de porosité 0,22  $\mu\text{m}$ .

La suspension phagique obtenue est ensuite concentrée, colorée à l'acétate d'uranyle puis observée au microscope électronique à transmission. On obtient l'image ci-dessous.

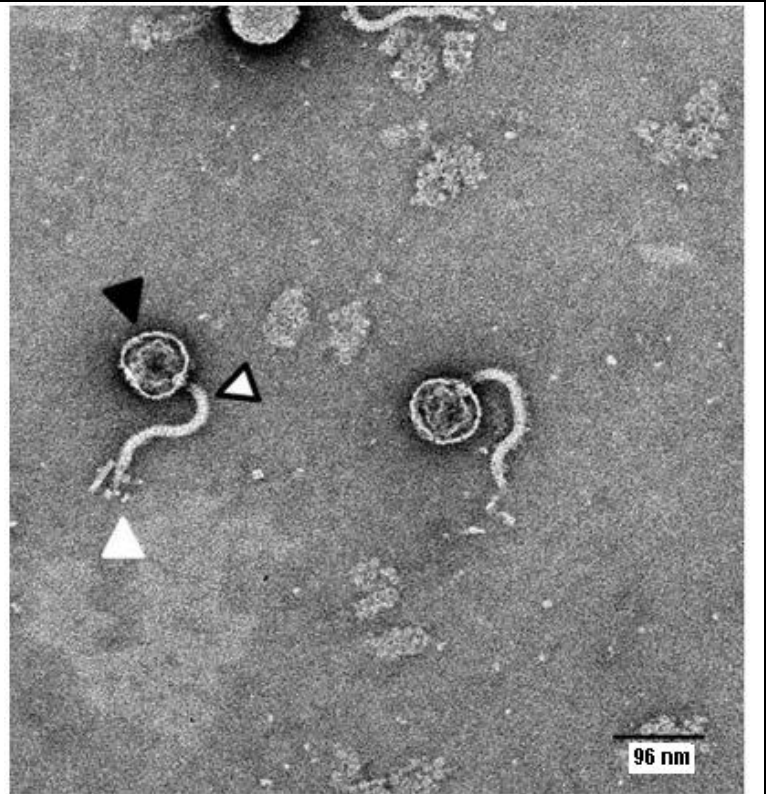
### • Identification des différentes structures du bactériophage :

-  : tête capsidique
-  : queue
-  : plaque et fibres caudales

### • Schéma d'interprétation de l'organisation du bactériophage



Source : <https://viralzone.expasy.org/510>



## Document 2 Protocole d'isolement du génome du bactériophage incriminé

A partir du filtrat obtenu précédemment :

- ajout d'ADNase et incubation 4 h à 37°C,
- puis chauffage 10 min à 65°C.

L'échantillon est ensuite soumis à un traitement à la protéinase K :

- après 2 h d'incubation à 50°C, est ajouté de l'acétate de potassium à 3 mol · L<sup>-1</sup>.

Le flocculat est éliminé par centrifugation :

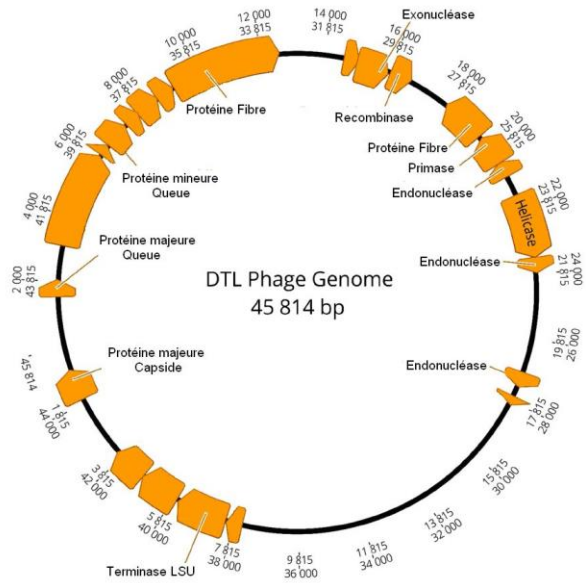
- le surnageant est récupéré dans un tube propre,
- de l'isopropanol est ajouté dans une proportion volumique 1:1.

L'ADN est récupéré par centrifugation, le surnageant est éliminé :

- le culot d'ADN est séché puis solubilisé en eau distillée.

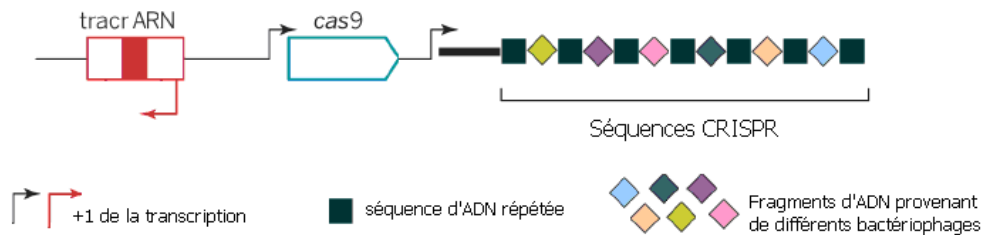
Source : Characterization of a novel lytic bacteriophage from an industrial *Escherichia coli* fermentation process and elimination of virulence using a heterologous CRISPR-Cas9 system, Halter MC, Zahn JA, J IndMicrobiolBiotechnol. 2018 Mar;45(3):153-163

## Génome du bactériophage DTL : annotation des cadres ouverts de lecture et identification de leur fonction prédictive



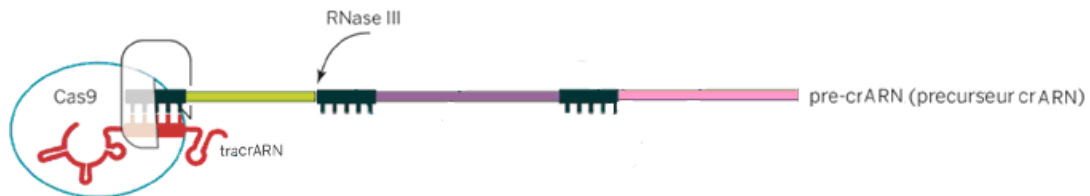
## Document 4 Organisation et fonctionnement du système CRISPR Cas9

### 4A. Organisation génétique du locus CRISPR Cas9 chez *Streptococcus thermophilus*



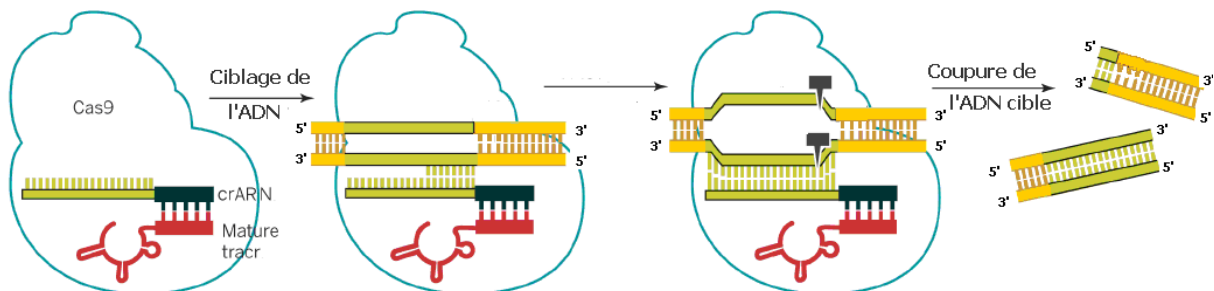
Les fragments d'ADN ont été au fil du temps intégrés par la bactérie entre des séquences d'ADN répétés (■). Cet ensemble, appelé CRISPR, est transcrit sous forme d'un ARN appelé pre-crARN.

### 4B. Formation de l'ARN guide (tracr ARN : crARN) à l'aide de la RNase III et du complexe Cas9



Le complexe Cas9 lie tracr ARN et le pre-cr ARN. Le pre-cr ARN devient un cr ARN qui est conservé dans le complexe Cas 9 après l'action de la RNase III (site de coupe repéré par la flèche).

### 4C. Action du complexe Cas 9 - ARN guide sur l'ADN du bactériophage infectant



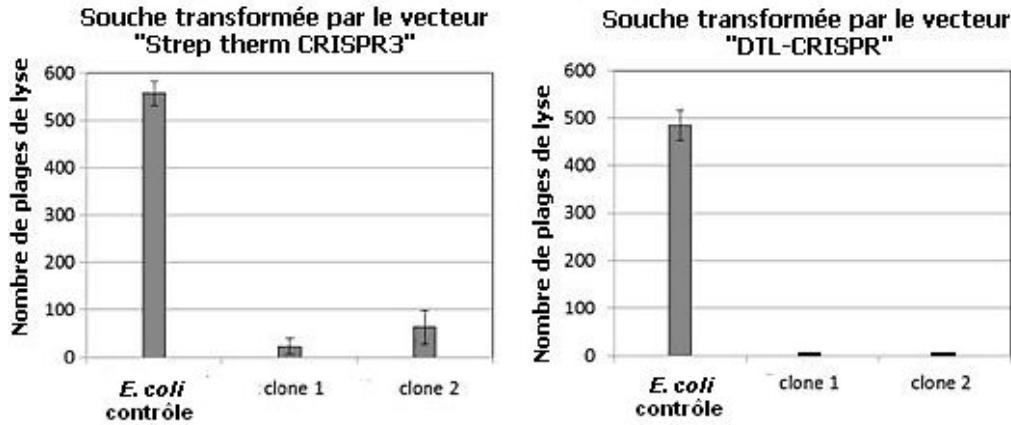
Source: The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Doudna, J. A. & Charpentier, E. Science 2014, 346(6213)



## Document 5 Validation des souches transformées

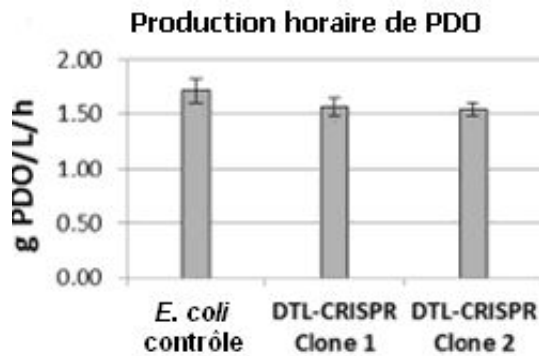
### 5A. Contrôle de la résistance des souches transformées au bactériophage DTL

- Deux clones des deux types de souches transformées ainsi qu'une souche de contrôle sont mis en culture durant une nuit à 37°C.
- 100 µL de chacune des cultures sont alors mis en contact avec 1 µL de suspension de bactériophage DTL calibrée.
- Le mélange est étalé à la surface d'une gélose et incubé une nuit à 37°C, la manipulation est réalisée en triplicate.
- Les plages de lyse obtenues sont alors comptées (une plage de lyse est une zone claire observée dans un tapis bactérien à la suite d'une infection lytique par un bactériophage).



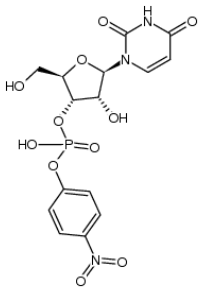
Les barres sur les histogrammes présentent l'erreur standard (n=3).

### 5B. Contrôle de la vitesse de production du propane-1,3-diol (PDO) par les deux clones de souches transformées par le vecteur « DTL-CRISPR » et par une souche contrôle



## Document 6 Substrat spectrophotométrique de la RNase A

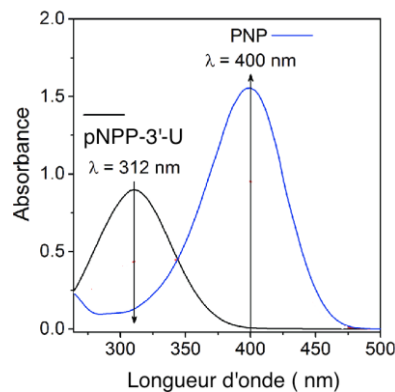
### 6A. Formule développée du para-nitrophenylphosphate-3'-Uridine



(UpOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-p-NO<sub>2</sub>)

Molécule identifiée par le sigle :  
pNPP-3'-U

### 6B. Spectre du pNPP-3'-U et du pNP à la même concentration molaire



D'après : [https://www.researchgate.net/figure/Absorption-spectral-change-from-PNPP-100-mM-to-PNP-catalyzed-by-ALP-0-10-and-100-U-L\\_fig2\\_319866514p3](https://www.researchgate.net/figure/Absorption-spectral-change-from-PNPP-100-mM-to-PNP-catalyzed-by-ALP-0-10-and-100-U-L_fig2_319866514p3)

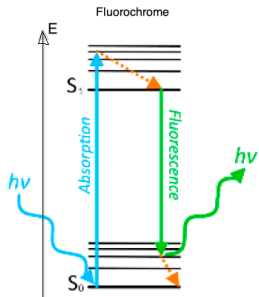
## Document 7 Mesure de l'activité catalytique de la RNase A par fluorimétrie

Les substrats permettant d'évaluer l'activité RNase A par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) sont couplés de façon covalente à un fluorochrome et à un quencher le plus souvent non émetteur.

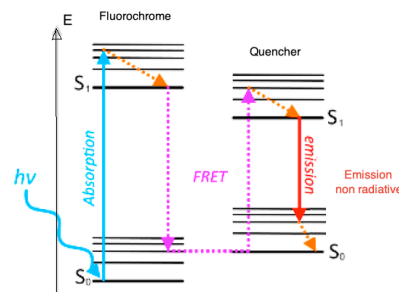
### 7A. Principe du transfert d'énergie par résonance vers un quencher non émetteur.

L'extinction de fluorescence par FRET intervient quand le quencher et le fluorochrome sont suffisamment proches et qu'ils présentent des profils de spectres excitation du quencher et d'émission du fluorochrome chevauchants donc d'énergie transférable par résonance sans absorption ni émission de lumière, comme représenté sur les diagrammes de Jablonski suivants.

#### Fluorochrome seul



#### Fluorochrome et quencher non émetteur, proches



Source : D'après *Sensors* 2015, 15(10), 26281-26314; doi:[10.3390/s151026281](https://doi.org/10.3390/s151026281)

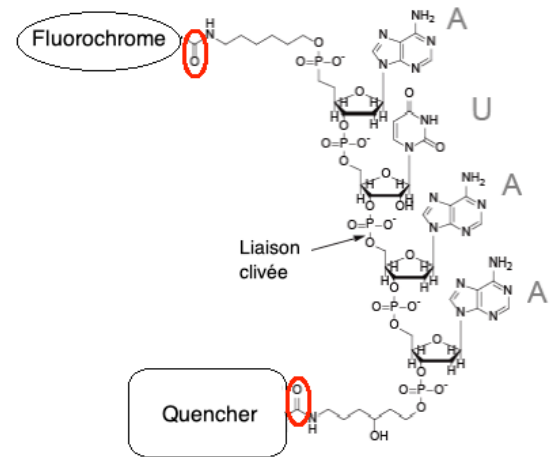
### 7B. Un exemple de substrat de la RNase A

Le substrat présenté est un oligonucléotide composé de 3 désoxyribonucléotides et un ribonucléotide. Son extrémité 5' est liée à un fluorochrome comme le 6-FAM (6-carboxy-Fluorescéine). Son extrémité 3' est liée à un quencher non émetteur. Différents quenchers non émetteurs, appelés BHQ pour « Black Hole Quencher » sont disponibles.

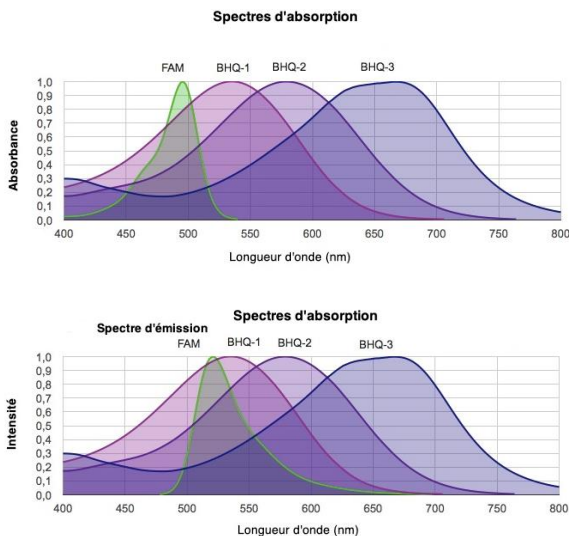
Source : D'après *Sensors* 2014, 14, 12437-1245

La distance mesurée entre les carbones de C=O liant les groupements greffés, repérés sur la molécule ci contre par une marque rouge, est de 3,3642 nm.

Source : La mesure a été réalisée à l'aide du logiciel Discovery Studio 2016 / Biovia / Dassault System par E. Braud (MCU, HDR, CNRS UMR 8601) et N. Pietrancosta (CR, HDR, CBMIT CNRS UMR 8601).

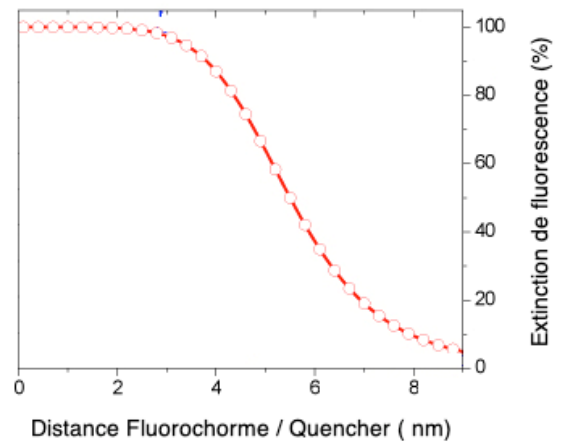


### 7C. Propriétés spectrales du fluorochrome et de 3 types de quenchers



Source : d'après <https://www.biosearchtech.com/qpcr-multiplex-spectral-overlay-tool>

### 7D. Effet de la distance fluorochrome et quencher sur l'efficacité d'extinction



Source : d'après <https://www.biosearchtech.com/quenching-mechanisms> doi.org/10.1093/nar/gnf121

## Document 8 Constantes cinétiques calculées pour les 2 substrats

substrat	$K_m$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_m$
6-FAM-(dA)rU-(dA)2-6 Q	$1,66 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$6 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$	$(3,6 \pm 0,4) \cdot 10^7 \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$
pNPP-3'-U	$(0,33 \pm 0,05) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$18,8 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$	$(5,7 \pm 0,6) \cdot 10^4 \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$

### Conditions expérimentales.

La RNase est dissoute en tampon  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MES (acide 2-(N -morpholino)éthanesulfonique) -  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl - pH = 6,0.  
Le substrat est préparé dans le même tampon.

Sources: Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, No. 18 3699  
J Am Chem Soc. 1994 June; 116(12): 5467–5468.

## Document 9 Mesure de l'activité RNase H2 par électrophorèse capillaire

### 9A : Substrat de la RNase H2

Le substrat de la RNase H2 utilisé est un acide nucléique double brin:

- le brin 5'-3', chimérique ARN (10 ribonucléotides) / ADN (49 désoxyribonucléotides), est couplé en 3' au fluorochrome FAM:  
 $5\text{'-RNA}_{10}\text{-DNA}_{49}\text{-FAM-3'}$
- le deuxième brin est un ADN complémentaire de 59 nucléotides.

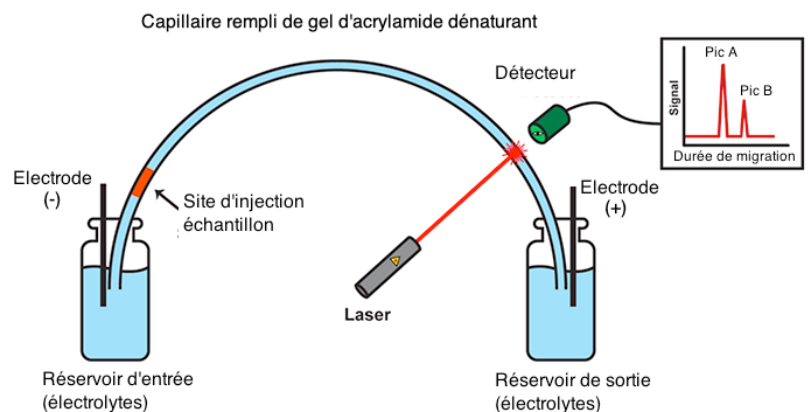
### 9B : Protocole simplifié de mesure activité enzymatique de la ribonucléase H2

- Composition du milieu réactionnel :  
 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 8,8 -  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  -  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$  -  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl - 0,1 % Triton x100 et  $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  de substrat de la RNase H2 décrit en 9A.
- Réaction déclenchée par addition de quantités différentes d'enzyme.
- Incubation à  $60^\circ\text{C}$  pendant des durées variables.
- Précipitation des acides nucléiques, élimination des surnageants.
- Mise en solution des culots, dénaturation des acides nucléiques.
- Analyse par électrophorèse capillaire.

Source : Nucleic Acids Research, 2016, Vol. 44, No. 2

### 9C. Séparation par électrophorèse capillaire

Des volumes d'échantillon de l'ordre du nL sont introduits dans un capillaire de diamètre interne de  $100 \mu\text{m}$ , rempli d'un gel dénaturant des acides nucléiques.  
Les électrodes sont reliées à un générateur haute tension.  
Le détecteur mesure l'intensité de fluorescence de la fluoescéine (6-FAM).  
Le résultat est fourni sous forme d'un électrophorégramme représentant l'intensité de fluorescence mesurée en fonction de la durée de migration.



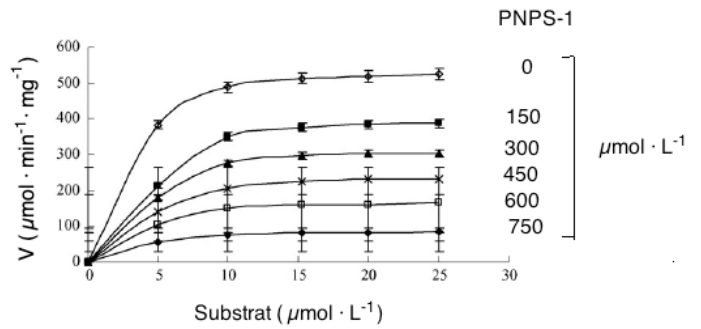
## Document 10 Inhibition de la RNase A par PNPS-1

### 10A. Cinétiques d'inhibition

#### Procédure simplifiée

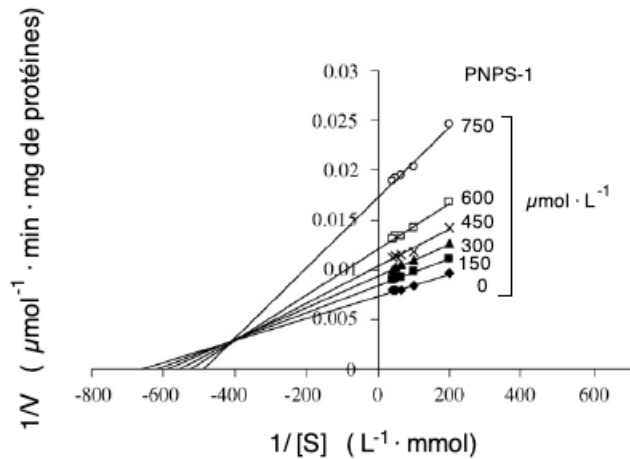
- Mélanger
  - 50  $\mu\text{L}$  de RNase A à  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,
  - 100  $\mu\text{L}$  d'inhibiteur PNPS-1 à différentes concentrations (0, 150, 300, 450, 600 et  $750 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),
  - 200  $\mu\text{L}$  de tampon réactionnel équilibré à  $37^\circ\text{C}$ .
- Incuber pendant 5 minutes à  $37^\circ\text{C}$ .
- Ajouter de 500  $\mu\text{L}$  de substrat (ARN) à différentes concentration (5, 10, 15, 20,  $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).
- Incuber pendant 30 minutes exactement à  $37^\circ\text{C}$ .
- Ajouter de 0,5 mL de solution d'arrêt.
- Mesurer quantitativement le produit

#### Graphe secondaire, $V_i = f([S])$



La vitesse initiale est exprimée en  $\mu\text{mol}$  de produit apparu par min et par  $\text{mg}$  de protéine.

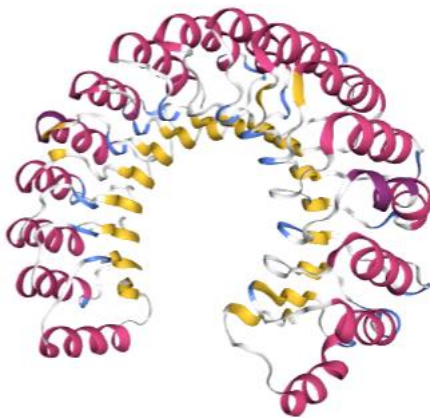
### 10B. Représentation de Lineweaver et Burk



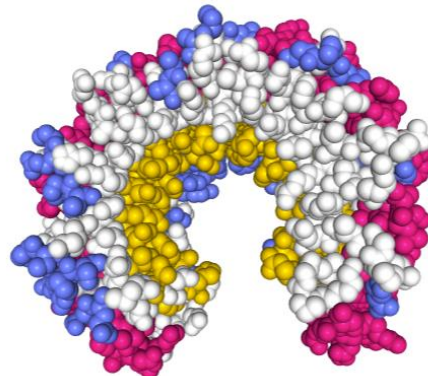
**Source :** International Journal of Biological Macromolecules 40 (2007) 134–138

## Document 11 Structure de la protéine RI, Ribonuclease Inhibitor

### 11A. Structure 3D, style « cartoon »



### 11B. Structure 3D, style « spacefill »



Réglage opéré : « couleur des structures secondaires ».

3 structures secondaires différentes sont visibles et représentées par des couleurs différentes : rose, jaune et bleu.

**Source :** <http://www.rcsb.org/3d-view/2BNH/0>

## Document 12 Production et purification de la protéine inhibitrice de la RNase A

### 12A. Extrait des protocoles mis en œuvre

A partir de 15 g de culot sec d'une culture bactérienne surexprimant la protéine RI.

#### 1. Lyse bactérienne et centrifugation

- Mise en suspension avec 0,5 L de tampon de lyse (20 mmol · L<sup>-1</sup> Tris- HCl (pH 7,8) ; 100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA, 10 mmol · L<sup>-1</sup> DTT (dithiothéritol), 40 mmol · L<sup>-1</sup> PMSF (Fluorure de phénylméthylsulfonyle)).
- Lyse par sonication.
- Centrifugation pendant 30 min à 15 300 x g, à 4 °C, le surnageant est conservé.

#### 2. Chromatographie 1,

Phase stationnaire : 15 mL de résine RNase A - sépharose à capacité de rétention de 2 mg de RI par mL de résine.

- Lavage avec 5 volumes de tampon de lavage (50 mmol · L<sup>-1</sup> phosphate de potassium (pH 6,4), 10 mmol · L<sup>-1</sup> DTT, 1 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA).
- Dépôt surnageant précédent.
- Elution avec 100 mmol · L<sup>-1</sup> d'acétate de sodium (pH 5,0), 3,0 mol · L<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol · L<sup>-1</sup> DTT, 1 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA.
- Analyse des fractions collectées par SDS-PAGE.

#### 3. Dialyse et concentration

A partir de l'ensemble des fractions contenant RI, les étapes suivantes sont mises en œuvre.

- Dialyse contre le tampon suivant : 20 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,5), 10 mmol · L<sup>-1</sup> DTT et 1 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA.
- Concentration du dialysat (0,50 L) par ultrafiltration jusqu'à un volume de 0,10 L.
- Centrifugation pendant 30 min à 15300 x g.

#### 4. Chromatographie 2,

Phase stationnaire: résine HiTrap Q (résine de sépharose couplée à un ammonium quaternaire), capacité de rétention 7 mg de RI par mL de résine

- Lavage en tampon d'équilibration (20 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl buffer (pH 7.5), 10 mmol · L<sup>-1</sup> DTT, 1 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA).
- Charge du surnageant obtenu à l'issue de l'étape 3.
- Lavage avec 40 mL de tampon d'équilibration.
- Elution par un gradient linéaire de NaCl (0 - 0,50 mol · L<sup>-1</sup>) en tampon d'équilibration.
- Collecte des fractions.
- Suivi par SDS-PAGE.

#### 5. Evaluation de la concentration en RI active par titration avec la RNase A

L'activité enzymatique de la RNase A est mesurée en présence de la fraction de la protéine RI à chaque étape de la purification.

A une fraction aliquote correspondant à chaque étape de purification sont ajoutés

- une quantité fixée de RNase A en tampon adapté,
- le substrat en condition saturante représenté dans le [document 7](#).

Le suivi est identique à celui fourni dans le [document 7](#).

Définition d'une unité (U) de RI active : quantité de RI nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de 5 ng de RNase A.

### 12B. Résultats

Remarque : les valeurs ont été arrondies pour simplifier les calculs demandés.

Etape	Activité totale RI	Protéines totales	Rendement de l'étape	Activité spécifique	Facteur d'enrichissement de l'étape
1   Surnageant clarifié	9,6 · 10 <sup>5</sup> U	9600 mg	R <sub>1</sub>	AS <sub>1</sub>	F <sub>1</sub>
2   Chromatographie sur RNaseA - sépharose	6,4 · 10 <sup>5</sup> U	80 mg	R <sub>2</sub>	AS <sub>2</sub>	F <sub>2</sub>
3   Chromatographie HyTrapQ	4,8 · 10 <sup>5</sup> U	48 mg	R <sub>3</sub>	AS <sub>3</sub>	F <sub>3</sub>

**Source :** D'après Protein Expression and Purification **22**, 174–179 (2001)