

ED 3 : Biologie moléculaire

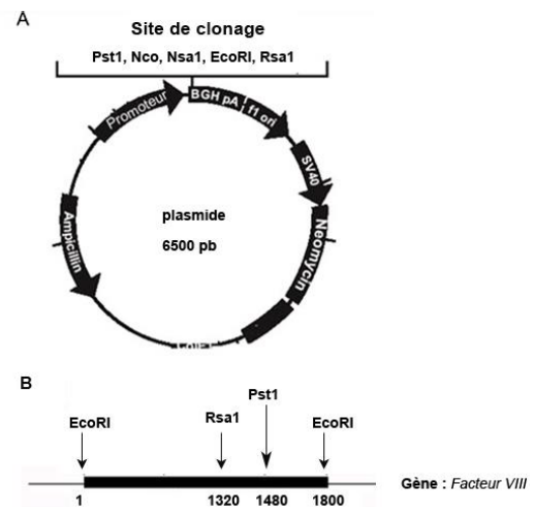
EXERCICE 1 :

Enoncé :

Le Facteur VIII est une **glycoprotéine** qui est importante pour la coagulation et est inactive ou non présente chez les hémophiles A. Le Facteur VIII peut être synthétisé par génie génique. Actuellement une nouvelle génération de facteur VIII est produite et correspond à une **forme tronquée de la protéine du Facteur VIII**. La **séquence codant** pour cette protéine tronquée (**de 1800 pb**) a été clonée dans un plasmide de 6500 pb afin de produire par génie génétique ce Facteur VIII recombinant.

Questions :

- Le plasmide utilisé pour le clonage est représenté dans la figure 1A, ainsi que la séquence codant pour Facteur VIII tronquée (Figure 1B).
- 1. Quelle enzyme de restriction allez-vous choisir pour faire le clonage du gène *FVIII*. Pourquoi?
- 2. Comment sélectionner le clone bactérien qui contient le plasmide recombinant?
- 3. Suite aux différentes étapes du clonage, afin de vérifier si le clone bactérien sélectionné possède le plasmide recombinant ou non recombinant, l'ADN extrait des bactéries est incubé avec 3 enzymes de restrictions : Rsa1, EcoR1, Pst1. Expliquer le nombre et la taille des fragments qui seront obtenus dans les différents cas : bactérie ayant le plasmide recombinant, bactérie ayant le plasmide non recombinant.
- 4) • Pour produire le facteur VIII recombinant, quel type de système de production allez-vous utiliser, pourquoi ?
- 5) • Une étape importante pour la production de biomédicament est la purification. Afin de purifier le Facteur VIII, le laboratoire a choisi de produire la protéine de fusion Facteur VIII avec une étiquette « histidine » (Facteur VIII-His). Expliquer le principe de la chromatographie qui est alors utilisée afin de purifier le Facteur VIII.



1) Eco R1 :

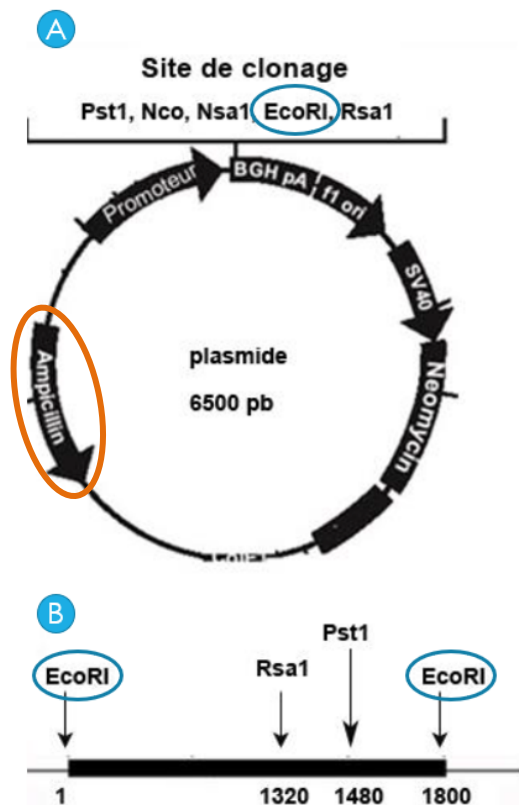
- Séquence codant pour la protéine tronquée = 1800 pb
- Eco R1 coupe la séquence au bon endroit : au début (1pb) et à la fin (1800 pb)
- Site de reconnaissance pour EcoR1 présent dans le site de clonage donc on peut intégrer la séquence dans le plasmide.

2) 2 étapes :

→ 1^{ère} étape :

Sélection des bactéries ayant intégré le **plasmide** recombinant ou non par culture sur milieu gélosé contenant de l'**Ampicilline** (= antibiotique).

- Présence du **gène de résistance**
- Les bactéries n'ayant pas intégré le plasmide n'ont pas le gène de résistance à l'Ampicilline et meurent.
→ Ne reste que les bactéries ayant intégré le plasmide



→ 2^{ème} étape :

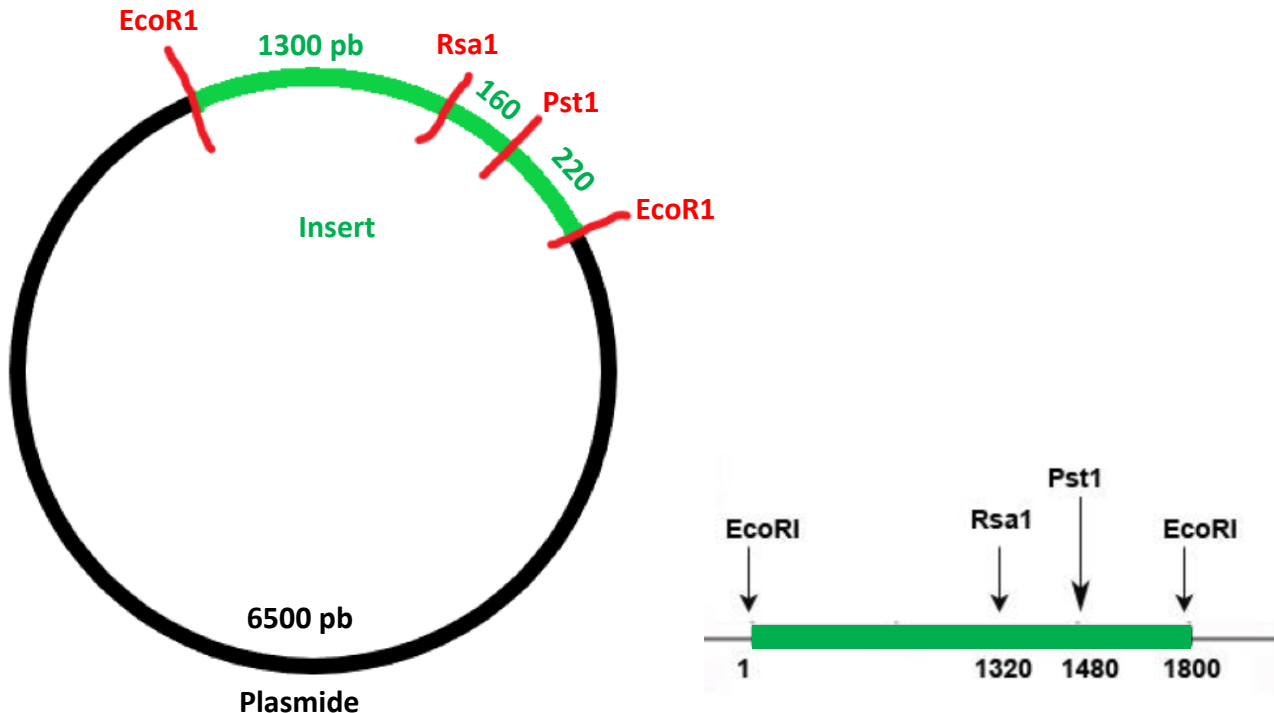
Sélection des bactéries ayant intégré le plasmide **RECOMBINANT**

- **Par PCR** : via des amorces spécifiques du plasmide ou de l'insert

OU

- **Par profil de restriction** : via des enzymes de restriction qui vont couper l'ADN à des endroits connus
→ migration sur gel d'agarose → obtention de bandes de différentes tailles

3) **Bactérie ayant le plasmide recombinant :**



4 fragments : 6500 pb / 1300 pb / 220 pb / 160 pb

Bactérie ayant le plasmide NON recombinant :

Multi site de clonage → reconnaissance des 3 enzyme... Quelle taille ??

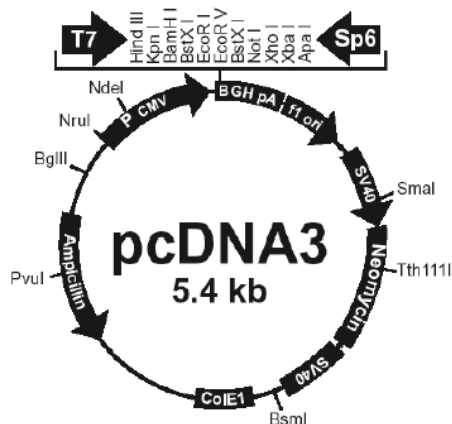
Un gros fragment d'environ 6500 pb et plusieurs autres petits fragments de qlq pb

- 4) **Système d'expression** → ici plasmide d'expression : car on veut produire une protéine recombinante
Système eucaryote ?? → FVIII = glycoprotéine donc nécessite des modifications post traductionnelles : glycosylation
Mais dans les questions précédentes on parle de clone bactérien. De plus, on nous parle de la forme tronquée de la protéine du FVIII, peut-être non glycosylé / petite taille → **système procaryote ??**

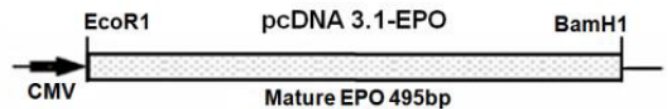
- 5) Lors du clonage, on va créer une protéine de fusion cad que le plasmide que l'on aura choisi va permettre l'ajout d'un **tag histidine** (ajout d'HIS en C-terminal ou N-terminal de la chaîne peptidique).
La colonne de la chromatographie contient une résine sur laquelle sont fixé des atomes métalliques de **Nickel**. Lors de la **chromatographie d'affinité**, on fait passer la protéine de fusion sur la colonne. Celle-ci va se fixer à la colonne via complexation du Nickel avec les histidines (par liaison de coordination). On effectue ensuite une **élution** avec un **tampon imidazole** (concentrations croissantes d'imidazole). L'imidazole va rentrer en compétition avec l'histidine pour se fixer au nickel et la protéine liée à l'histidine va se détacher, ce qui va nous permettre de la récupérer. Il faudra ensuite enlever le tag HIS afin d'avoir une protéine fonctionnelle.

EXERCICE 2 :

- Pour la production de l'EPO, les industriels ont utilisé comme vecteur d'expression le plasmide pcDNA3, et la séquence entière du gène codant pour l'EPO humaine.
- Quelles sont les étapes pour la production de protéine recombinante pour usage thérapeutique?
- Quelle(s) enzyme(s) pouvez vous utiliser pour l'étape de clonage?
- Quel(s) système(s) de production peut être utilisé pour la production de l'EPO?
- Les industriels ont choisi de produire l'EPO dans le système CHO, comment sélectionner la cellule CHO qui a intégré le plasmide?



A



Question 1 :

- **Extraction d'ADN** chez un organisme donneur
- **Intégration** du gène d'intérêt dans un vecteur d'expression : coupure de l'ADN donneur et du vecteur par des enzymes de restriction puis ligation → obtention de l'ADN recombinant
- Introduction du vecteur d'expression dans l'hôte = **Transformation**
- **Sélection** des cellules qui ont le plasmide recombinant (et donc le gène qui code pour la prot d'intérêt)
- **Culture**
- **Extraction de la protéine**
- **Purification**
- **Vérification** que la protéine est pure, au bon poids moléculaire, que sa structure est bonne et qu'elle a l'activité attendue

Question 2 :

Eco R1 et BamH1

Question 3 :

- **Système d'expression** = plasmide d'expression
- **Système eucaryote** : plusieurs glycosylations → eucaryotes supérieurs = cellules de mammifères → CHO ou cellules humaines

Question 4 :

- **1^{ère} étape :**
Sélection des cellules ayant intégré le **plasmide** recombinant ou non grâce à la **Néomycine** (= antibiotique).
 - Présence du gène de résistance à la Néomycine
 - Les cellules n'ayant pas intégré le plasmide n'ont pas le gène de résistance à la Néomycine et meurent.
→ Ne reste que les cellules ayant intégré le plasmide

➔ **2^{ème} étape :**

Sélection des bactéries ayant intégré le plasmide **RECOMBINANT**

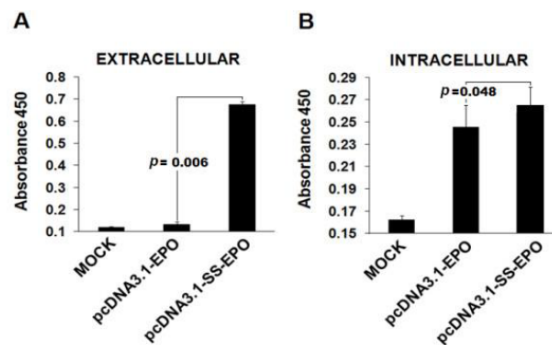
- **Par PCR :** via des amorces spécifiques du plasmide ou de l'insert

OU

- **Par profil de restriction :** via des enzymes de restriction qui vont couper l'ADN à des endroits connus
→ migration sur gel d'agarose → obtention de bandes de différentes tailles

Question 4 :

- Les auteurs ont réalisés des tests afin de faire sécréter la protéine par les cellules. Pour cela ils ont ajouté dans la construction une séquence codant pour le peptide signal (SS-EPO). Ils ont comparé l'expression de la protéine en extra et intracellulaire dans les deux types de cellules : expression de l'EPO avec ou sans peptide signal. Décrire les résultats obtenu dans la figure A et B



L'ajout du peptide signal SS-EPO augmente considérablement l'expression de la protéine en extracellulaire. Cela augmente aussi légèrement son expression en intracellulaire. Grâce au peptide signal, la protéine est donc sécrétée en extracellulaire.

Question 5 :

Pourquoi les auteurs ont-ils réalisé des expériences pour tester une production dans le milieu extracellulaire?

L'extraction de la protéine d'intérêt en extracellulaire est plus simple. On n'a pas besoin de lyser la membrane cellulaire → récupération du surnageant. De plus, ça évite de tuer la cellule et elle peut donc être réutilisée (dure plus longtemps).

Question 6 :

Quelles sont les vérifications complémentaires à réaliser pour vérifier que la protéine EPO est bien produite et qu'elle est active?

Vérifier que la protéine est bien **produite au bon PM** : Western Blot

- Migration du mélange de protéine sur gel d'acrylamide avec SDS (migration en fonction du PM)
- Transfert sur une mb et incubation avec un anticorps spécifique de l'EPO

Vérifier l'**activité** de la protéine :

On regarde si la protéine est capable de se fixer à son récepteur et on étudie cette capacité → on étudie son activité