

# SUJET 1

## PRODUCTION ET PURIFICATION D'UNE ENZYME, LA TAQ POLYMÉRASE

Les ADN polymérases sont les enzymes les plus utilisées dans le domaine de la biologie moléculaire, en particulier certaines d'entre elles pour les expériences de PCR (Polymerase Chain Reaction). La première enzyme thermostable de ce type à avoir été caractérisée en 1976, et probablement une des plus utilisées dans les laboratoires, est issue de la bactérie *Thermus aquaticus*. De ce fait, elle est appelée Taq polymérase. L'extinction du brevet commercial de la Taq polymérase a eu pour conséquence de voir le prix de cette enzyme chuter. De plus, il offre la possibilité de se procurer des clones bactériens d'*Escherichia coli* transformés avec un plasmide contenant le gène codant l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* et, par conséquent, de pouvoir effectuer une production particulièrement économique.

D'après : Jérôme Olivares, Cahier des techniques de l'INRA, 2016

### Partie I - Questionnement scientifique et technologique (durée indicative 2 h 30)

Un laboratoire souhaite produire une Taq polymérase à moindre coût à partir d'une culture de clones d'*E.coli* transformés avec un plasmide contenant le gène de *Thermus aquaticus* codant la Taq polymérase.

La démarche se décompose en 3 parties :

1. Sélection et culture d'un clone bactérien transformé avec un plasmide contenant le gène codant la Taq polymérase, nommé pAKTaq.
2. Extraction et purification de la Taq polymérase produite.
3. Mise en évidence de l'activité de la Taq polymérase produite par PCR.

#### 1. SÉLECTION ET CULTURE D'UN CLONE BACTÉRIEN TRANSFORMÉ AVEC LE PLASMIDE pAKTaq

La transformation bactérienne consiste en l'introduction du plasmide recombiné pAKTaq dans le cytoplasme de la bactérie *Escherichia coli* sensible à l'ampicilline. Le plasmide pAKTaq introduit dans les bactéries est présenté dans le **document 1**. Les bactéries recombinées obtenues après transformation sont isolées sur milieu gélosé LB additionné avec de l'ampicilline.

##### 1.1 Sélection des clones d'*Escherichia coli* transformés

**Q1.** (C1) Argumenter l'utilisation du milieu LB additionné avec de l'ampicilline pour sélectionner spécifiquement les bactéries transformées.

##### 1.2 Culture des clones d'*Escherichia coli* transformés

Les colonies isolées sont remises en culture en milieu liquide et la croissance bactérienne est suivie par mesure de l'atténuation à 550 nm notée  $D_{\text{suspension à 550 nm}}$ .

La procédure d'extraction de la Taq polymérase produite par *E.coli* transformé nécessite d'avoir une suspension bactérienne d'au minimum  $1,2 \cdot 10^8$  bactéries  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>.

**Q2.** (C2) Calculer l'atténuation minimale à atteindre pour arrêter la culture avant de réaliser l'extraction.

Données :

- $D_{\text{suspension à 550 nm}} = 0,1$  pour la concentration  $C_{N(E.coli ; \text{suspension})} = 6,0 \cdot 10^7$  bactéries  $\cdot \text{mL}^{-1}$
- Limite de linéarité  $D_{\text{suspension à 550 nm}} = 0,5$

La mesure de l'atténuation peut être vérifiée en déterminant la concentration bactérienne par un dénombrement dans la masse en milieu gélosé PCA, lorsque l'atténuation atteint 0,600. Les résultats du dénombrement sont présentés dans le **document 2**.

**Q3.** (C2) Vérifier en calculant la concentration bactérienne précise si l'extraction de la Taq polymérase est possible.

## 2. EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA TAQ POLYMÉRASE PRODUITE

Dans le but d'extraire la Taq polymérase produite par les clones d'*E.coli* transformés avec le plasmide pAKTaq, les bactéries sont lysées. Dans un second temps, deux méthodes de purification sont réalisées successivement pour purifier l'enzyme :

- Filtration sur membrane Jumbosep® pour éliminer les débris cellulaires de grande taille
- Chromatographie échangeuse d'ions sur le surnageant.

La seconde étape de purification est décrite dans les **documents 3 et 4**.

**Q4.** (C1) Expliquer la rétention de l'enzyme dans la colonne.

**Q5.** (C1) Après avoir comparé la composition du tampon A et du tampon B, expliquer l'élution de la Taq polymérase par le tampon B.

## 3. MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ DE LA TAQ POLYMÉRASE PAR PCR

### 3.1 Place de la Taq polymérase dans la PCR

Le **document 5** présente le principe de la PCR mise en œuvre pour contrôler l'activité de la Taq polymérase purifiée.

**Q6.** (C1) Reporter sur la copie les lettres (A) (B) (C) de légende du **document 5** puis compléter avec les termes manquants.

**Q7.** (C4) Expliquer en quoi la PCR est un test qui permet de mettre en évidence que la Taq polymérase produite est bien fonctionnelle.

### 3.2 Mise en œuvre d'une PCR pour contrôler l'activité de la Taq polymérase

Afin de contrôler l'activité de l'enzyme produite, deux PCR sont réalisées :

- l'une avec la Taq polymérase purifiée ;
- l'autre avec une Taq polymérase commerciale.

Les résultats de ces deux PCR sont ensuite comparés après migration par électrophorèse.

Le **document 6** présente le protocole suivi pour mettre en œuvre, par PCR, l'estimation semi-quantitative de l'activité enzymatique de la Taq polymérase produite.

**Q8.** (C2) Calculer les  $T_m$  (températures de fusion) des amorces choisies.

**Q9.** (C4) Sachant que la température d'hybridation doit être inférieure d'au moins 4 °C au  $T_m$ , discuter du choix d'utiliser la température de 56 °C comme température d'hybridation pour l'amplification du gène de référence.

Le **document 6** présente le résultat de l'analyse des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.

**Q10.** (C1) Vérifier l'absence d'ADN détectable en l'absence de Taq polymérase.

**Q11.** (C3) Expliquer la différence d'intensité de fluorescence obtenue pour les différentes conditions réalisées avec la Taq polymérase commerciale.

**Q12.** (C3) Analyser le gel d'électrophorèse obtenu pour montrer que le protocole de production de la Taq polymérase est efficace.

**Q13.** (C1) Déterminer la dilution de l'extrait de Taq polymérase purifiée à utiliser pour obtenir un résultat équivalent à celui de la Taq commerciale diluée au 1/40.

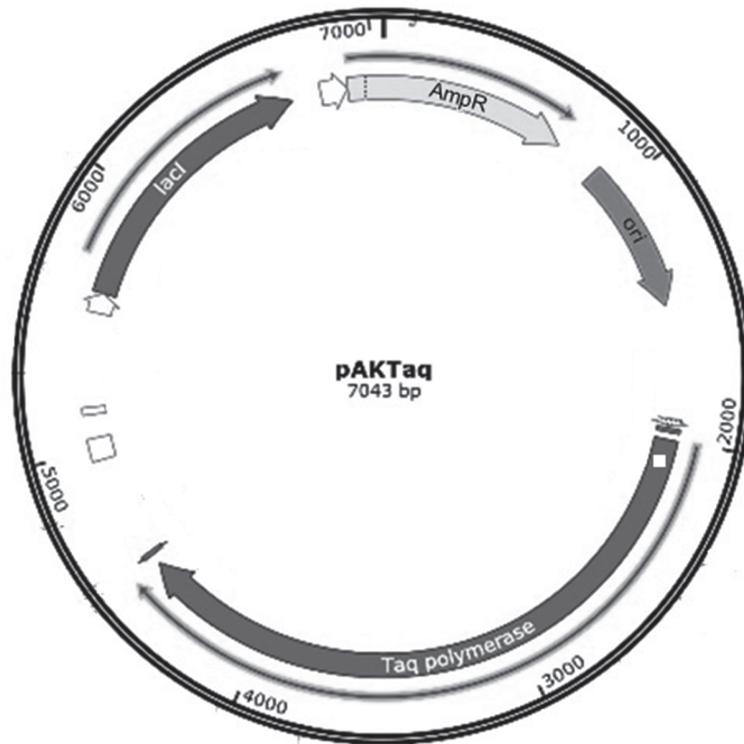
**Q14.** (C5) Rassembler sous la forme d'un organigramme la succession des étapes ayant conduit à la production d'une Taq polymérase à partir d'une bactérie *E. coli* transformée avec un plasmide contenant le gène codant l'enzyme.

<b>Partie II – Question de synthèse (durée indicative 30 min)</b>
---

Le **document 7** présente deux ressources portant sur le développement de nouvelles enzymes développées pour la PCR.

**Q15.** (C5) Montrer que la démarche menée dans le laboratoire évoqué en partie I relève d'une démarche de développement de produit en vue d'une production mais pas d'une démarche de recherche, contrairement aux exemples présentés dans le **document 7**.

**DOCUMENT 1 — Sujet 1 : représentation schématique du plasmide pAKTaq contenant le gène codant la Taq polymérase de *Thermus aquaticus***



Ce plasmide comporte :

- gène codant la Taq polymérase de *Thermus aquaticus*
- gène de résistance à l'ampicilline (antibiotique) : *AmpR*
- plusieurs sites de restriction enzymatique
- *ori* : origine de réplication

Source : <http://www.addgene.org/browse/sequence/99882/>

## **DOCUMENT 2 — Sujet 1 : dénombrement de *Escherichia coli* en milieu gélosé PCA**

**Méthode** : Dénombrement en simple essai dans la masse d'un milieu gélosé PCA (non sélectif et non différentiel)

Volume d'inoculum :  $V = 1$  mL

**Résultat** :

Dilution (d)	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
n (colonies)	292	54	2

**Extrait de la norme ISO 7218 octobre 2007 :**

Le **calcul** du nombre d'UFC par mL ou par g de produit, consiste à faire la moyenne pondérée du nombre de colonies obtenues sur **deux dilutions successives dont l'une, au moins, présente un minimum de 10 colonies**.

Ce calcul est valable dans le cas où le rapport du nombre de colonies entre deux dilutions est cohérent avec le facteur de dilution.

Choisir deux dilutions successives dont :

- l'une au moins **présente un minimum de 10 colonies**.
- le "nombre maximal de colonies en totalité est de 300 par boîte" ; en présence d'un agent de différenciation, le "nombre maximal des colonies caractéristiques ou présumées est de 150 par boîte "

**Équation aux grandeurs :**

$$N = \Sigma c / (V \times 1,1 d)$$

avec :

- $N$  = concentration en nombre d'UFC par millilitre
- $\Sigma c$  = somme des colonies comptées sur les deux boîtes retenues.
- $V$  = volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte en millilitre.
- $d$  = dilution correspondant à la première boîte retenue, avec l'inoculum le moins dilué.

Le résultat est arrondi avec 2 chiffres significatifs, exprimé avec un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance de 10 appropriée.

**DOCUMENT 3 — Sujet 1 : purification de la Taq polymérase par chromatographie échangeuse d'ions**

Après extraction, l'enzyme est chargée négativement et peut donc être purifiée par chromatographie échangeuse d'anions.

La résine échangeuse d'anions utilisée est au préalable équilibrée avec du tampon A (50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8).

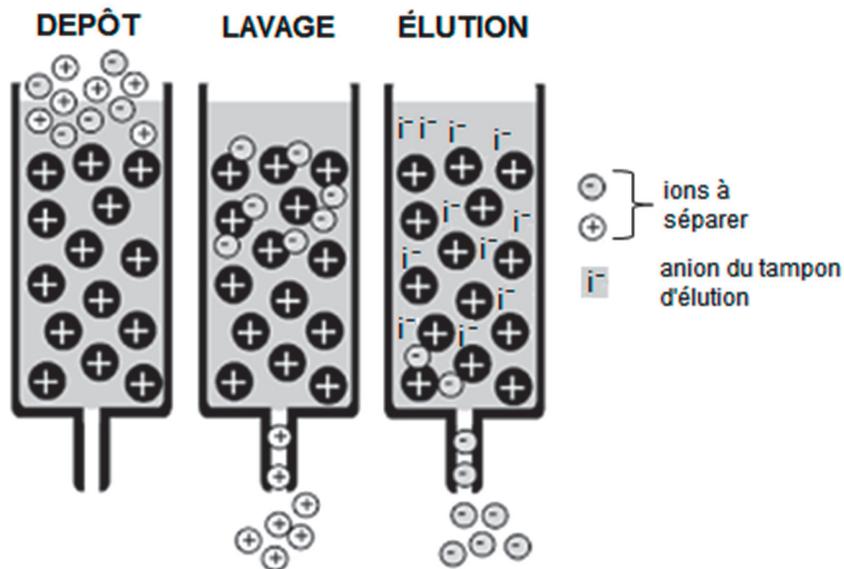
La solution contenant l'enzyme est ensuite déposée sur la résine.

Un lavage de la résine est réalisé par passage du tampon A.

L'éluion de l'enzyme est réalisée par passage du tampon B (50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8 – 0,5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl) à travers la colonne.

**DOCUMENT 4 — Sujet 1 : schéma du principe de la chromatographie sur colonne échangeuse d'anions**

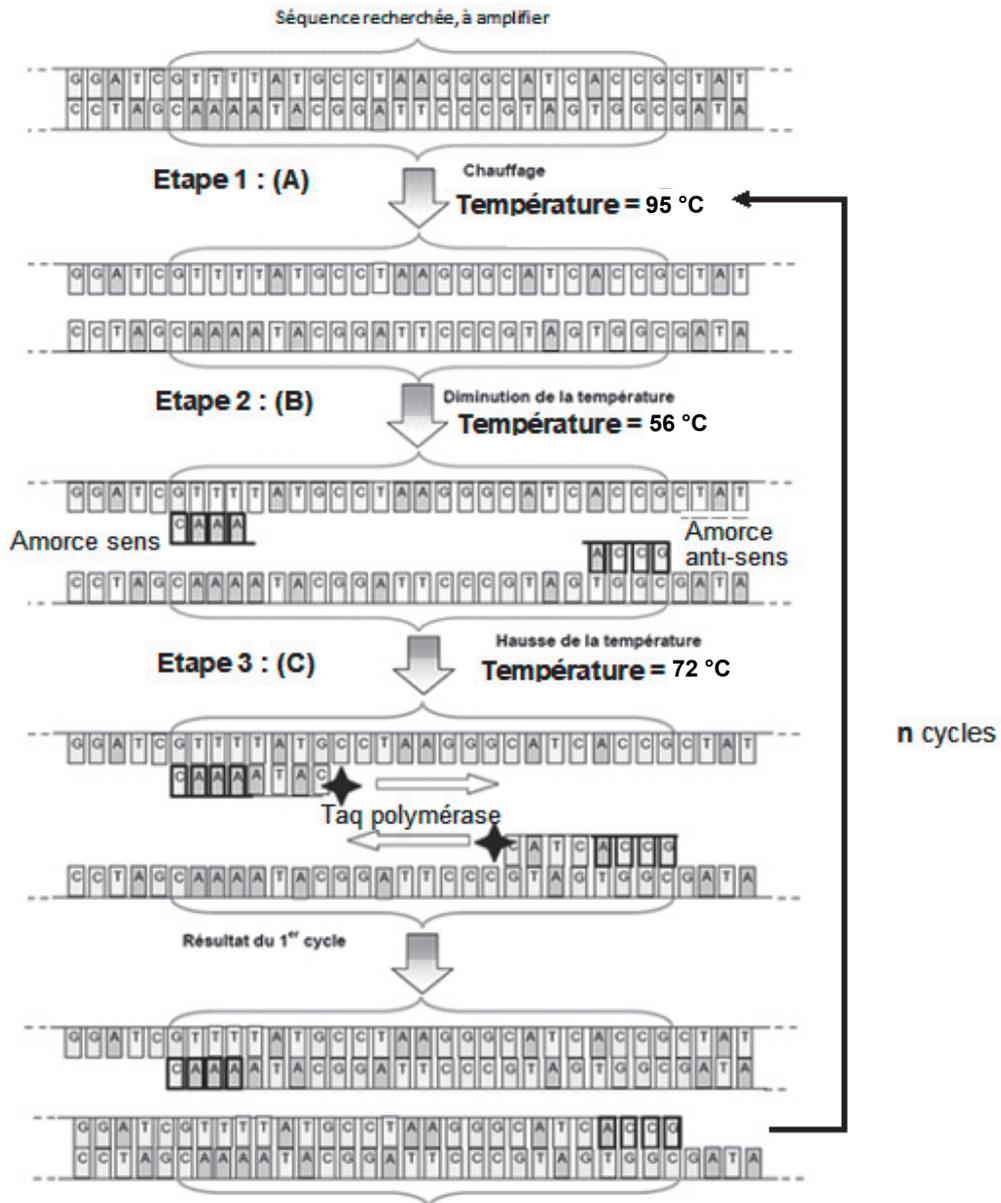
Le principe de la chromatographie échangeuse d'anions repose sur la capacité d'une colonne composée d'une résine chargée positivement de retenir les anions qui la traversent (rétention). Un lavage permet d'éliminer les molécules non retenues. Les anions sont ensuite libérés de la colonne par ajout d'une solution d'éluion de force ionique élevée.



**DOCUMENT 5 — Sujet 1 : schéma de la réaction de PCR mise en œuvre pour contrôler l'activité de la Taq polymérase purifiée**

La PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou *réaction de polymérisation en chaîne*) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro* qui permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase thermorésistante, la Taq polymérase. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une augmentation exponentielle de la séquence d'ADN cible (la durée d'un cycle est de l'ordre de la minute).



Source : d'après Ifremer – décembre 2009 – Fiche réalisée pour Bibliomer et le centre de veille des produits aquatiques

## **DOCUMENT 6 — Sujet 1 : protocole de l'estimation semi-quantitative de l'activité enzymatique de la Taq purifiée**

L'estimation semi-quantitative de l'activité de la Taq polymérase purifiée est estimée par comparaison à l'activité de la Taq polymérase commerciale après électrophorèse sur gel d'agarose.

Les auteurs du protocole ont choisi d'amplifier une séquence de 1363 pb d'un gène couramment amplifié par la Taq polymérase commerciale.

### **Choix des amorces**

Amorce sens : SKdr-F / 5' - GGCCGACACTTAATTTACTCAT - 3'

Amorce anti-sens : SKdr-R / 3' - GCAATCCCACATGCTCTCTA - 5'

Paramètres de réglage du thermocycleur :

95 °C pendant 3 minutes	
35 cycles	95 °C pendant 30 secondes
	56 °C pendant 45 secondes
	72 °C pendant 1 min 30
72 °C pendant 10 minutes	

Formule pour le calcul de la température de fusion  $T_m$  d'une amorce (en °C) :

Formule de Wallace :  $T_m = 2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_C + n_G)$

$n_A$  : nombre de nucléotides « A » dans l'amorce     $n_T$  : nombre de nucléotides « T » dans l'amorce

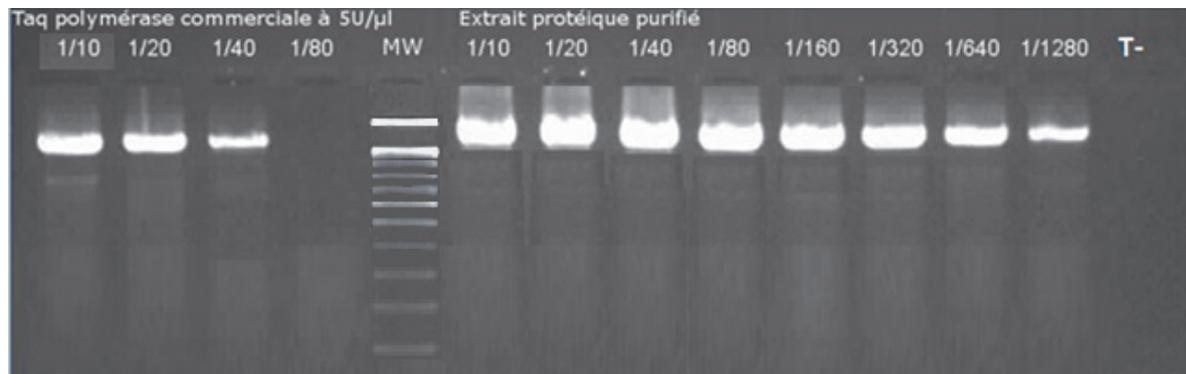
$n_C$  : nombre de nucléotides « C » dans l'amorce     $n_G$  : nombre de nucléotides « G » dans l'amorce

### **Analyse des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose**

Migration sur gel d'agarose des produits de PCR avec diverses dilutions en cascade de la Taq polymérase commerciale (à gauche) et de la Taq polymérase purifiée (à droite).

MW : marqueur de taille en pb (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100)

T- : témoin négatif dont la composition est la suivante : ADN de référence, couple d'amorces spécifiques, désoxyribonucléotides.



## **DOCUMENT 7 — Sujet 1 : données sur les polymérases utilisées pour la PCR**

### **Invention de la PCR**

*D'après La saga des brevets sur la PCR, V.B. dans mensuel 283, daté de janvier 1996 - <https://www.larecherche.fr/la-saga-des-brevets-sur-la-pcr>*

La PCR est une méthode d'amplification exponentielle de l'ADN inventée par l'Américain Kary Mullis en 1985, prix Nobel de chimie en 1993, et utilisant une enzyme thermostable. Trois brevets, deux pour la méthode, un pour la Taq polymérase, ont été déposés par la société américaine Cetus® à la fin des années 1980. Les droits d'exploitation ont été rachetés par la société suisse Hoffmann-La Roche® en 1991 (...). La firme suisse a ainsi pu attaquer en 1992 DuPont de Nemours pour contrefaçon des brevets de la PCR puis la société américaine Promega pour contrefaçon de la Taq polymérase et a obtenu gain de cause devant les tribunaux américains.

### **Exemple d'innovation pour la PCR : la technologie Phusion®**

*D'après New England Biolabs, [neb-online.fr](http://neb-online.fr), document commercial*

La « Phusion DNA Polymerase » est une nouvelle enzyme issue de la fusion entre une ADN polymérase issue de *Pyrococcus* et un fragment protéique améliorant la processivité\*. Elle génère des produits de PCR avec une précision et une vitesse encore jamais atteintes par une seule enzyme. Elle est également capable d'amplifier de longues séquences – ses tests de contrôle qualité incluent l'amplification de 7,5 kb d'ADN génomique et de 20 kb d'ADN du phage Lambda. La structure et les caractéristiques uniques de la « Phusion DNA Polymerase » en font une polymérase de choix en matière de performances PCR.

Avantages :

- haute fidélité (50 fois supérieure à celle de la Taq polymérase) ;
- rapidité – réduction considérable des temps d'élongation (10 fois plus rapide que la Pfu polymérase) ;
- réactions robustes – excellents résultats avec une optimisation minimale ;
- rendement élevé – quantité de produits accrue avec une quantité d'enzyme minimale.

*\* processivité : propriété indicatrice de la rapidité de synthèse d'ADN par l'enzyme*