

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.

PARTIE 1.

***Caldicellulosiruptor bescii* et production de bio-éthanol**

L'accroissement de la demande mondiale en carburant, la baisse inexorable des réserves de pétrole font des biocarburants une ressource alternative durable et renouvelable pour le futur.

Des efforts considérables ont été mis en œuvre afin de produire des biocarburants de deuxième génération à partir d'une biomasse lignocellulosique (bois, paille, déchets, résidus agricoles et forestiers, cultures dédiées). La culture des plantes utilisées n'entre plus en concurrence directe avec les cultures vivrières.

Le sujet propose d'étudier une souche de *Caldicellulosiruptor bescii*, bactérie cellulolytique modifiée génétiquement, candidate de choix pour la production directe de bio-éthanol à partir d'une biomasse lignocellulosique. Cette souche présente l'intérêt de réaliser l'ensemble des étapes de production de bio-éthanol, depuis la digestion de la biomasse jusqu'à sa synthèse, sans recourir ni à un prétraitement chimique, ni à une digestion enzymatique exogène (deuxième génération simplifiée).

1. Quelques caractéristiques de *Caldicellulosiruptor bescii* sauvage

Caldicellulosiruptor bescii (*C. bescii*) est une eubactérie qui a été historiquement isolée, en 1990 par une équipe de microbiologistes dirigée par V. A. Svetlichnyi, dans la vallée des geysers, caldera de l'Uzon au Kamchatka (Russie).

1.1. Caractéristiques structurales

Le **document 1** présente une électrographie de la bactérie.

Q1. Exploiter le document et dégager, en justifiant, l'ensemble des éléments structuraux mis en évidence.

Q2. Argumenter le fait que cette bactérie est Gram positive. Schématiser et annoter l'organisation de la paroi de *C. bescii*.

1.2. Conditions de croissance

Des travaux préliminaires ont été nécessaires afin d'établir les conditions nutritionnelles et de croissance de la souche sortie de son environnement naturel. Les données sont fournies dans les **documents 2 et 3**.

Q3. Analyser la composition du milieu LOD (**document 2**) et en déduire les types trophiques de la bactérie ainsi que sa dépendance ou non à des facteurs de croissance.

Q4. Discuter les conditions expérimentales de l'étude présentée dans le **document 3** et en déduire le type respiratoire de *C. bescii*.

Q5. Analyser le **document 3**. Proposer une explication de l'allure générale des deux courbes obtenues.

Q6. Proposer les étapes permettant de doser les protéines totales d'un échantillon bactérien.

2. Production de bio-éthanol par la souche génétiquement modifiée *Caldicellulosiruptor bescii* JWCB032

2.1. Contrôle de la souche productrice JWCB032

Le **document 4** présente les voies métaboliques simplifiées de *C. bescii*.

Q7. Nommer la voie conduisant au pyruvate. Etablir un bilan moléculaire et énergétique des différentes voies présentées. Préciser leurs fonctions métaboliques.

Un mutant naturel de *C. bescii*, la souche JWCB018, est déficient en *ldh* (*ldh*, gène codant la lactate déshydrogénase). A partir de ce mutant, on a créé la souche JWCB032 productrice de bio-éthanol en lui intégrant, par recombinaison à sites spécifiques, le gène *adhe* (**séquence d'environ 2,4 kpb**). Ce gène code l'enzyme bifonctionnelle AdhE rendue détectable par la présence de l'étiquette 6 histidines (6-His).

L'AdhE (acétaldéhyde / alcool déshydrogénase) catalyse la réduction de l'acétylCoA en acétaldéhyde (éthanal) puis en éthanol. Elle provient de *Clostridium thermocellum* utilisé dans la production de bio-éthanol de deuxième génération.

Q8. Représenter les voies métaboliques simplifiées de la souche JWCB032 sous forme d'un schéma similaire à celui du **document 4**.

Par la technique de Western blot, on contrôle l'expression de l'enzyme par la souche JWCB032. Les résultats sont présentés dans le **document 5**.

Q9. Analyser les résultats obtenus. Estimer et discuter la taille de l'enzyme exprimée. Proposer alors les conditions de croissance de la souche JWCB032 pour une production optimale de bio-éthanol en accord avec les données présentées dans le **document 3**. Argumenter la réponse.

Donnée : masse molaire d'un acide aminé $\approx 110 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

2.2. Production de bio-éthanol

Le **document 6** présente les résultats des premiers tests de production des trois souches de *C. bescii*. Le substrat utilisé est du cellobiose (4-O- β -D-Glucopyranosyl-D-glucose, c'est à dire deux glucoses liés par une liaison β -osidique) à 1% (m/v).

Des tests supplémentaires sur des substrats plus complexes - Avicel®, plant de panic érigé (*Panicum virgatum*, graminée sauvage rustique à haut rendement de biomasse) - ont donné des résultats similaires.

Q10. Préciser comment sont calculés les différents rendements de conversion « Y ».

Q11. Analyser alors les résultats et conclure quant à l'efficacité de la souche JWCB032 à produire du bio-éthanol à partir de cellobiose.

2.3. Western blot

Q12. Question rédactionnelle

Le Western blot est un outil fondamental pour l'étude des protéines. Vous présenterez les données que l'on peut obtenir par cette technique. Vous détaillerez les étapes de la réalisation d'un Western blot en insistant sur les points critiques. Vous décrirez quelques systèmes utilisés pour la révélation et l'amplification des signaux de détection des protéines recherchées.

PARTIE 2.

Des luciférase profilées

Les gènes rapporteurs permettent d'étudier de nombreuses fonctions biologiques, comme l'expression génétique, les modifications post-traductionnelles ou les interactions protéine/protéine.

Parmi les gènes rapporteurs disponibles, nous allons nous intéresser aux gènes *luc* codant les luciférase.

Les luciférase présentent de nombreux atouts biotechnologiques notamment le dosage facile de l'activité *in vitro* et *in vivo*, mais aussi l'absence de forme endogène chez de nombreuses espèces. La course à la mise au point de nouveaux systèmes toujours plus performants conduit à l'apparition d'une gamme très large de luciférase issues d'espèces différentes et optimisées. L'étude portera sur celle de la luciole *Photinus pyralis* (FLuc, « F » pour « Firefly ») et celle de la pensée de mer *Renilla reniformis* (RLuc).

1. Les luciférase, enzymes « rapporteur »

Le gène rapporteur *luc* est souvent apporté aux cellules hôtes sous forme de vecteur d'expression, par une étape de transformation ou de transfection. Une large gamme de vecteurs d'expression « luciférase » commerciaux est disponible.

1.1. Analyse des réactions catalysées par FLuc et RLuc

Le **document 7** montre les réactions catalysées par FLuc (EC 1.13.12.7) et RLuc (EC 1.13.12.5).

Q13. Justifier la proximité des codes « EC » pour les deux luciférase FLuc et RLuc.

Q14. Expliquer à l'aide du **document 7** comment les deux enzymes d'un même échantillon peuvent être dosées séquentiellement.

1.2. Analyse du vecteur pGL4-*[luc]*

Le **document 8** montre les différentes étapes de l'expression d'un gène et un exemple de carte de vecteur commercial, le vecteur pGL4-*[luc]*.

Q15. Analyser les informations du **document 8, parties 8A et 8B** pour conclure que le vecteur pGL4-*[luc]* est un vecteur navette permettant d'étudier l'activité promotrice de séquences d'intérêt.

Q16. Construire un organigramme récapitulant toutes les étapes nécessaires à la préparation d'un vecteur recombiné pGL4-**promoteur**-*[luc]*, de l'amplification d'une séquence promotrice potentielle à la vérification du clonage dans le vecteur pGL4-*[luc]*.

La documentation technique du vecteur indique que le cadre ouvert de lecture luciférase a été modifié pour une utilisation optimale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) et chez l'homme.

Certaines données concernant l'optimisation des séquences du plasmide pGL4-*[luc]* sont fournies dans le **document 9**.

La réduction drastique du nombre de sites consensus potentiels de fixation de facteurs de transcription du cadre ouvert de lecture *luc* est illustrée dans le **document 9A**.

Q17. Proposer une explication justifiant l'importance de la réduction du nombre de sites potentiels de fixation de facteurs de transcription.

Le **document 9** montre également :

- un alignement des 60 premiers nucléotides des cadres ouverts de lecture codant la protéine FLuc naturelle et la protéine FLuc2 du vecteur pGL4-*[luc]* (**document 9B**).

- l'usage des codons de deux acides aminés, la proline et l'acide aspartique chez l'homme et *S cerevisiae* (**document 9C**).

Q18. A l'aide des parties **9B et 9C du document 9**, expliquer l'effet des modifications opérées sur les codons proline (codons 11, 13 et 16) et acide aspartique (codons 3 et 19).

1.3. Activité luciférase intra-cellulaire et après lyse

L'analyse *in vivo*, sur cellules vivantes transfectées, permet de réaliser des suivis cinétiques de la même cellule sans destruction de l'échantillon. On se propose de comparer l'activité luciférase sur cellules intactes et après lyse cellulaire.

Q19. Préciser l'objectif de l'étape de transfection et proposer une technique de transfection.

Le **document 10** présente les procédures expérimentales mises en œuvre pour mesurer l'activité luciférase *in vivo* et *in vitro*.

Q20. Discuter et comparer la composition des milieux réactionnels.

Q21. Calculer et comparer les paramètres cinétiques de l'enzyme à l'aide du **document 10B**. Conclure. Proposer un phénomène simple expliquant des différences observées.

Q22. Analyser le graphe présenté dans le **document 10C**.

1.4. Importance de la normalisation

La normalisation est un procédé par lequel les données sont corrigées par des facteurs différents de ceux directement testés par l'expérience. Le contexte expérimental est schématisé dans le **document 11A**.

Le vecteur contrôle de normalisation pRLuc exprime la luciférase *Renilla* sous le contrôle d'un promoteur témoin, noté « prom T ».

Q23. Justifier que le promoteur « promT » est un promoteur constitutif.

Q24. Analyser les résultats obtenus et présentés dans le **document 11B** et conclure.

2. **Intérêt des luciférases déstabilisées**

Le seuil de détection des luciférases est directement lié à leur stabilité dans les cellules et est corrélé à l'accumulation de protéines luciférase. L'utilisation des luciférases pour étudier des phénomènes transitoires et rapides nécessite d'évaluer et de réduire leur demi-vie.

Les séquences déstabilisatrices sont connues pour accélérer la dégradation des protéines qui les portent. Une séquence particulièrement bien documentée est la séquence consensus PEST riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T). La calpaïne 3 (CAPN3), protéine très instable, est *in vivo* complètement dégradée en 10 minutes sans présenter de séquence PEST. Les auteurs cherchent à définir le motif de déstabilisation de la calpaïne pour tester son effet sur la stabilité de la luciférase.

Le **document 12A** montre la structure de la région d'expression luciférase du plasmide.

Q25. Indiquer les points critiques à respecter lors de la conception du clonage pour que les luciférases déstabilisées soient effectivement produites.

Q26. Analyser le protocole fourni au **document 12A** et évaluer la demi-vie des 3 luciférases testées. Conclure.

Dans un objectif de définition de séquence consensus et d'optimisation de taille de vecteur, les auteurs ont cherché à définir un motif minimal de déstabilisation.

Q27. Analyser la démarche et les résultats présentés dans le **document 12B**.

3. Mise au point d'un biocapteur à stéroïdes

Le système précédent est utilisable comme biocapteur pour doser des stéroïdes dans un contexte clinique, de dopage ou de toxicologie environnementale. Les stéroïdes agissent comme des activateurs transcriptionnels. Il suffit donc d'obtenir un système plaçant la luciférase sous le contrôle d'un promoteur inductible par un stéroïde donné.

L'étude porte sur la validation d'un biocapteur à levures génétiquement modifiées :

- pour exprimer la luciférase de luciole (Fluc) sous le contrôle transcriptionnel d'un stéroïde,
- pour exprimer de façon constitutive une autre luciférase utilisée comme contrôle interne de viabilité.

La conception des capteurs à testostérone et à l'œstradiol est représentée dans le **document 13A**.

Certains procédés d'immobilisation d'enzymes sont transposables pour immobiliser des cellules.

Q28. Proposer une méthode qui conviendrait à l'immobilisation de levures et justifier qu'il faut impérativement préparer un capteur à levures immobilisées et pas à enzyme luciférase immobilisée.

Q29. Analyser les résultats du contrôle de viabilité et du comportement des levures immobilisées en réponse à la testostérone (**document 13B**).

La spécificité des capteurs à testostérone et à l'œstradiol a été testée, les résultats sont présentés dans le **document 13C**.

Q30. Analyser les résultats obtenus et conclure.

Document 1 Electronographie d'une cellule bactérienne de *Caldicellulosiruptor bescii*



Source: Biodiversity of Thermophilic Prokaryotes with Hydrolytic Activities in Hot Springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia), Ilya V. Kublanov *et al*, *Appl. Environ. Microbiol.* January 2009 vol. 75 no. 1 286-291.

Document 2 Composition du milieu LOD (low osmolarity defined medium)

NH ₄ Cl	0,250 g
KH ₂ PO ₄	0,0136 g
KCl	0,330 g
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	0,330 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,140 g
NaHCO ₃	1,000 g
Solution éléments trace SL10	1 mL
Solution de vitamines	1 mL
Maltose ou cellobiose ou cellulose micro cristalline (Avicel®) ou lignocellulose	5,000 g
Cystéine, HCl	1,000 g
Résazurine	0,025 g
Eau déminéralisée et bouillie	qsp pour 1 L
Milieu dégazé sous argon, pH ajusté à pH = 7,2	

Ajout de 1,5 % (m/v) d'agar pour le milieu LOD solide

Composition de la solution éléments trace SL10

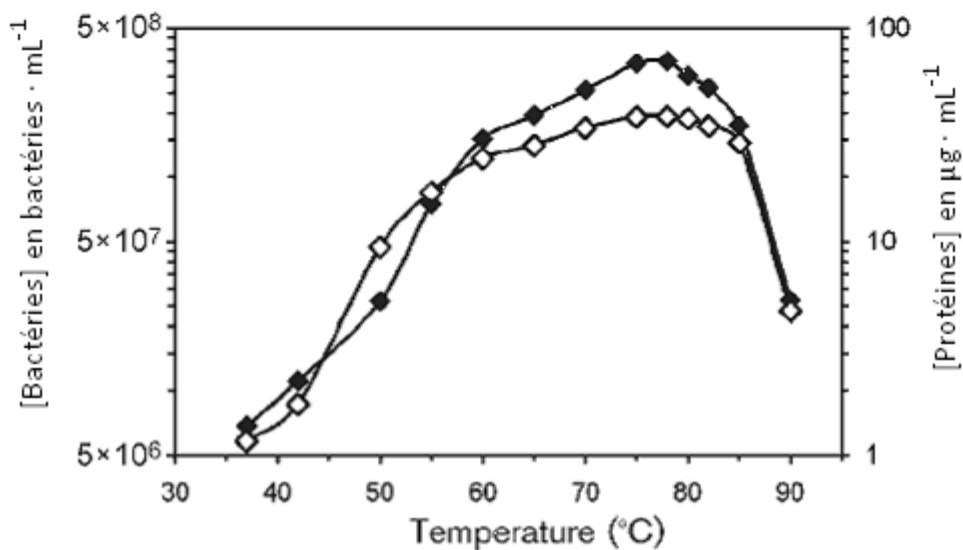
HCl (25%, 7,7 M)	10,0 mL
FeCl ₂ , 4 H ₂ O	1,5 mg
ZnCl ₂	70,0 mg
MnCl ₂ , 4 H ₂ O	100,0 mg
H ₃ BO ₃	6,0 mg
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	190,0 mg
CuCl ₂ , 2 H ₂ O	2,0 mg
NiCl ₂ , 6 H ₂ O	24,0 mg
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	36,0 mg
Eau distillée	990,0 mL

Composition de la solution de vitamines

vitamine B12	50 mg
acide pantothénique	50 mg
riboflavine	50 mg
pyridoxamine	50 mg
biotine	50 mg
acide folique	50 mg
acide nicotinique	50 mg
nicotinamide	50 mg
acide para amino benzoïque	50 mg
thiamine	50 mg
Eau distillée	1 L

Source: Improved growth media and culture techniques for genetic analysis and assessment of biomass utilization by *Caldicellulosiruptor bescii*, Joel Farkas *et al*, *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2013 January ; 40(1): 41-49.

Document 3 Effet de la température sur la croissance de *C. bescii*

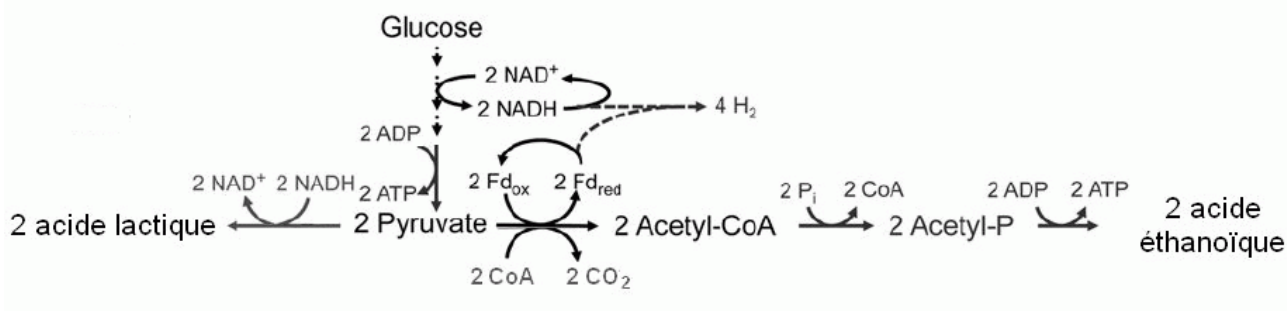


La souche est cultivée à différentes températures durant 24 heures dans des flacons de 100 mL, sous atmosphère contrôlée (N₂/CO₂ 80 : 20, v/v), contenant 50 mL de milieu LOD à 0,5 % (m/v) de cellulose micro cristalline (Avicel®).

La croissance est suivie par mesure de la concentration bactérienne (◆) et mesure de la concentration en protéines (◇).

Source: Classification of '*Anaerocellum thermophilum*' strain DSM 6725 as *Caldicellulosiruptor bescii* sp. nov., Sung-Jae Yang *et al*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2010), 60, 2011–2015.

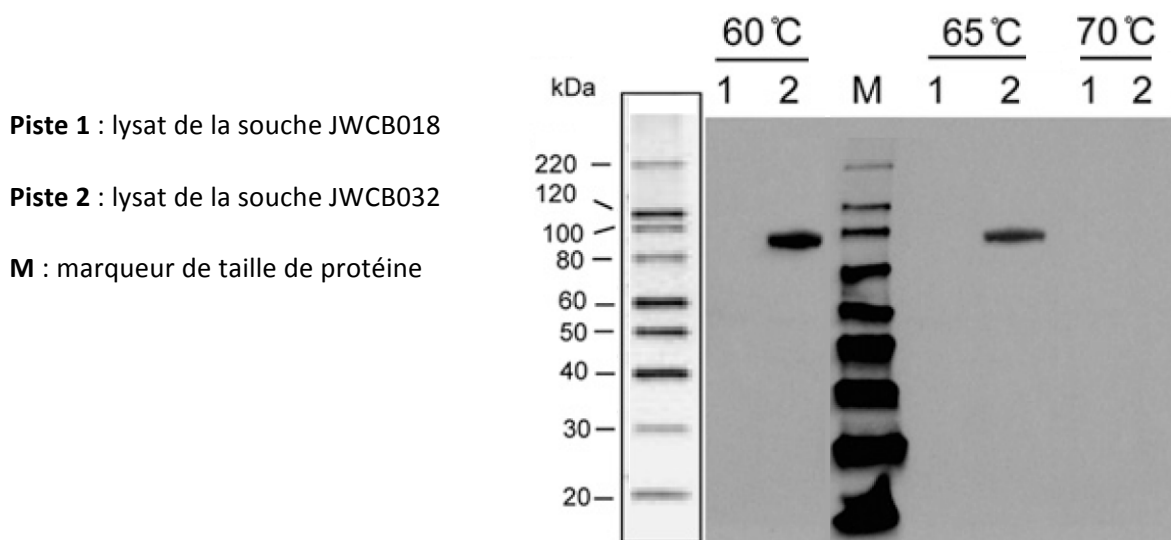
Document 4 Voies métaboliques simplifiées chez *Caldicellulosiruptor bescii*



Source: Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor bescii*, Chung D *et al*, Proc Natl Acad Sci U S A 2014 Jun 17;111(24):8931-6.

Document 5 Contrôle de l'expression de l'enzyme AdhE par Western Blot

- Les bactéries sont cultivées dans 50 mL de milieu LOD à 1 % (m/v) de cellobiose, à trois températures différentes 60 °C, 65 °C et 70 °C.
- Les échantillons des différentes souches sont prélevés en milieu de phase exponentielle de croissance.
- 77 µg de lysat cellulaire des différentes souches sont utilisés alors pour la réalisation du Western blot.
- La révélation se fait par chimioluminescence (kit ECL Western blotting substrate) à l'aide d'un anticorps monoclonal anti étiquette histidine, couplé à la peroxydase.



Source : Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor bescii*, Chung D *et al*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jun 17;111(24):8931-6.

Document 6 Résultats de production des 3 souches de *C. bescii*

Les cultures sont réalisées en double essai, en flacon de 125 mL contenant 50 mL de milieu LOD à 1 % (m/v) de cellobiose, à 65 °C, sous agitation à 150 rpm.

Les différents métabolites sont dosés à l'état initial et après 48 h de croissance. Les rendements de conversion notés Y sont calculés, par exemple $Y_{L/C}$ représente le rendement de conversion du cellobiose en lactate.

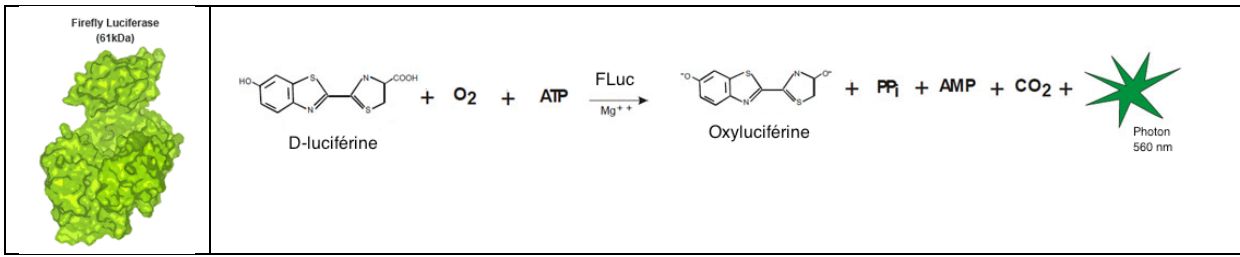
Souches	Concentration des différents métabolites (à 48h) (mmol·L ⁻¹)						Rendement de conversion (à 48 h)			
	Cellobiose <i>initial</i> (mmol·L ⁻¹)	Cellobiose <i>final</i>	Lactate	Acetate	Ethanol	diHydrogene	$Y_{L/C}$	$Y_{A/C}$	$Y_{E/C}$	$Y_{H/C}$
Sauvage	28.4 ± 0.11	18.9 ± 0.42	1.3 ± 0.07	6.9 ± 0.23	0.0	11.8 ± 0.21	0.65	3.45	0.0	5.90
JWCB018	28.4 ± 0.36	19.7 ± 0.27	0.0	9.3 ± 0.56	0.0	14.5 ± 0.53	0.0	4.05	0.0	6.30
JWCB032	28.4 ± 0.25	16.9 ± 1.57	0.0	5.5 ± 0.30	15.3 ± 0.19	9.8 ± 0.64	0.0	1.14	3.19	2.04

Note : Lactate (L), Acétate (A), Ethanol (E), diHydrogène (H), Cellobiose (C)

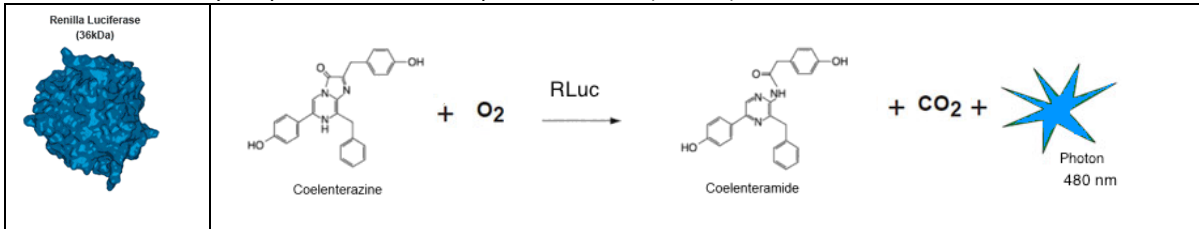
Source : Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor bescii*, Chung D *et al*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jun 17;111(24):8931-6.

Document 7 Réactions catalysées par FLuc et RLuc

7A. Réaction catalysée par la luciférase de luciole (firefly), FLuc



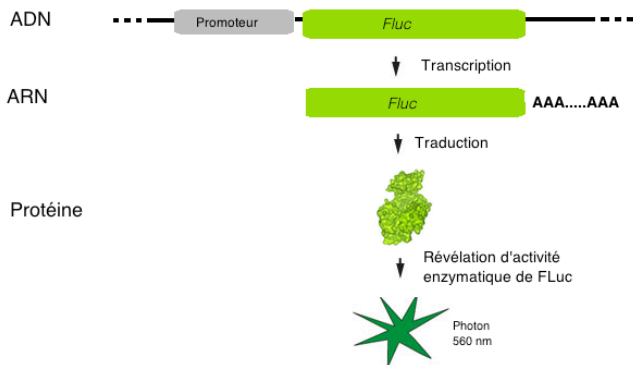
7B. Réaction catalysée par la luciférase de pensée de mer (*Renilla*), RLuc



Source : <http://photobiology.info/Ohmiya.html>.

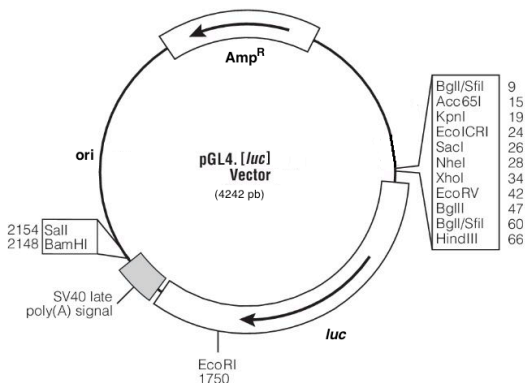
Document 8 Vecteur d'expression luciférase et activité transcriptionnelle

8A. Schéma simplifié récapitulant les étapes d'expression d'un gène rapporteur luciférase de luciole (*Fluc*)



La liaison de l'ARN polymérase au promoteur minimum est stabilisée par l'interaction avec les facteurs de transcription obligatoires conduisant à une initiation de transcription basale. Les boîtes régulatrices, activatrices (enhancer) ou inhibitrices (silencer) recrutent, si elles sont présentes, des facteurs de transcription facultatifs qui modifient l'efficacité d'initiation de la transcription. L'activité enzymatique révélée reflète donc l'activité transcriptionnelle du promoteur.

8B. Carte du vecteur commercial pGL4-*[luc]*



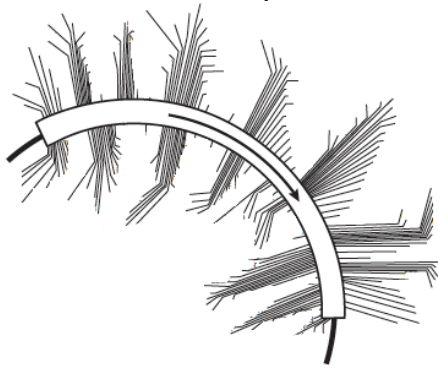
Légende :

SV40 late poly(A) signal, terminateur de transcription, site de polyadénylation

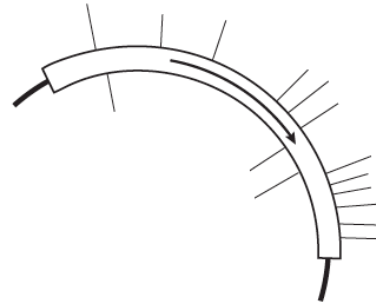
Source : D'après <https://france.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/a/pgl4-10-vector.pdf>.

Document 9 Optimisation de la séquence codant *Fluc*

9A. Carte de la région du cadre ouvert de lecture de la luciférase de luciole montrant l'élimination des sites putatifs de liaison à des facteurs de transcription



Cadre ouvert de lecture de la luciférase naturelle de luciole



Cadre ouvert de lecture de la luciférase du vecteur pGL4. [*luc*]

Légende :

Chaque trait représente un site consensus de fixation d'un facteur de transcription.

Source : D'après <https://france.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/a/pgl4-10-vector.pdf>.

9B. Alignement des 60 premiers nucléotides du cadre ouvert de lecture de la luciférase naturelle de luciole et du cadre ouvert de lecture de la luciférase du vecteur pGL4. [*luc*]

CODON	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	M	E	D	A	K	N	I	K	K	G	P	A	P	F	Y	P	L	E	D	G
Luciole	ATG	GAA	GAC	GCC	AAA	AAC	ATA	AAG	AAA	GGC	CCG	GCG	CCA	TTC	TAT	CCT	CTA	GAG	GAT	GGA
			·				·		·		·				·	·	·	·	·	
Vecteur	ATG	GAA	GAT	GCC	AAA	AAC	ATT	AAG	AAG	GGC	CCA	GCG	CCA	TTC	TAC	CCA	CTC	GAA	GAC	GGG
	M	E	D	A	K	N	I	K	K	G	P	A	P	F	Y	P	L	E	D	G

9C. Usage des codons proline et acide aspartique chez *S. cerevisiae* et *H. sapiens*.

L'usage des codons est évalué par la fréquence d'apparition d'un codon particulier pour un acide amine donné (en %).

	Proline (P)				Acide aspartique (D)	
	CCU	CCC	CCA	CCG	GAU	GAC
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31 %	15 %	42 %	12 %	65 %	35 %
<i>Homo sapiens</i>	29 %	32 %	28 %	11 %	46 %	54 %

Source : <http://www.biologicscorp.com/tools/CodonUsage>.

Document 10 Mesure de l'activité de FLuc *in vitro* et *in vivo*

10A. Extrait des protocoles mis en œuvre

Des cellules humaines cultivées *in vitro* ont été transfectées par un vecteur exprimant FLuc sous le contrôle d'un promoteur inductible par la tétracycline. L'activité luciférase est mesurée après lyse cellulaire ou directement sur cellules intactes selon les procédures suivantes.

Mesure sur lysat clarifié

Les cellules sont lysées par action conjointe d'un tampon de lyse et de congélation à -80 °C. Le surnageant clarifié est soumis à l'essai.

10 µL d'échantillon (lysate clarifié) est mélangé rapidement à 100 µL de tampon luciférase et placé dans le luminomètre. Le signal mesuré est exprimé en RLU (« Relative Light Unit »).

Composition du tampon luciférase :

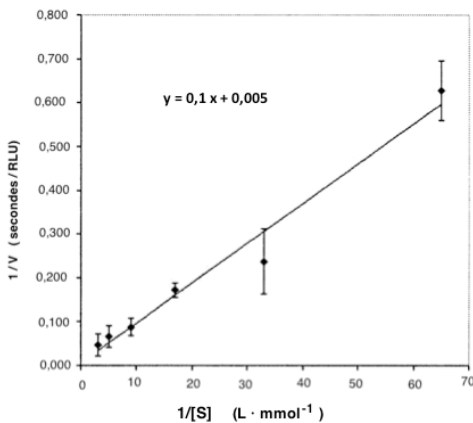
Tricine (20 mmol · L⁻¹) - Carbonate de magnésium (1,07 mmol · L⁻¹) - Sulfate de magnésium (2,67 mmol · L⁻¹) - EDTA (0,1 mmol · L⁻¹) - ATP (0,5 mmol · L⁻¹) - Coenzyme A (0,27 mmol · L⁻¹) - Dithiothréitol (33,3 mmol · L⁻¹) - D-luciférine (0,47 mmol · L⁻¹)

Mesure sur cellules vivantes

10⁵ cellules ayant incorporé le vecteur d'expression FLuc sontensemencées par boîte de 35 mm de diamètre.

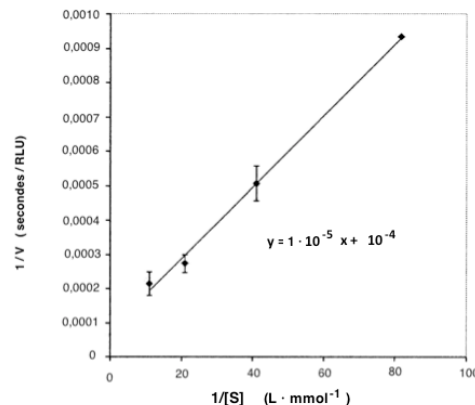
Après 24 h de pré-culture, le substrat D-luciférine est ajouté au milieu de culture et la boîte est placée dans le luminomètre. Le signal mesuré est exprimé en RLU (« Relative Light Unit »).

10B. Evaluation de V_{max} et K_M par représentation en double inverse



a. *In vivo*, mesure sur cellules vivantes.

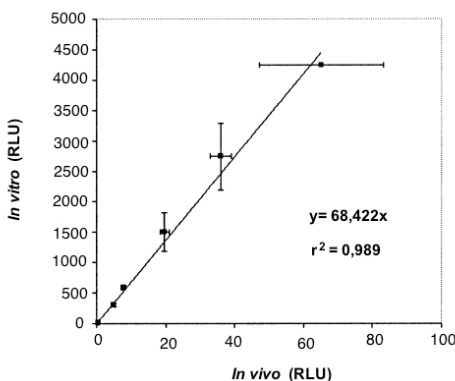
Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour chaque série de mesures réalisée en triple.



b. *In vitro*, mesure sur lysat cellulaire.

NB : les valeurs numériques des équations des droites de modélisation ont été arrondies pour faciliter l'exploitation numérique.

10C. Corrélation entre les mesures l'activité luciférase *in vivo* et *in vitro*



Six concentrations croissantes de tétracycline (0 - 0,001 - 0,002 - 0,006 - 0,020 et 20 µg · mL⁻¹) agissant comme inducteur transcriptionnel ont été testées.

Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour chaque série de mesures réalisée en triple.

Source : BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, VOL. 86, NO. 7, JUNE 30, 2004. Kinetic Analysis and Modeling of Firefly Luciferase as a Quantitative Reporter Gene in Live Mammalian Cells. Jolene M. Ignowski, David V. Schaffer.

Document 11 Normalisation des mesures d'activité luciférase

11A. Principe

Trois séries d'expériences sont mises en œuvre, selon le principe illustré ci-contre.

Deux vecteurs sont co-transfectés dans les cellules :

- le vecteur de normalisation exprimant la luciférase RLuc sous le contrôle d'un promoteur « témoin », noté prom T,

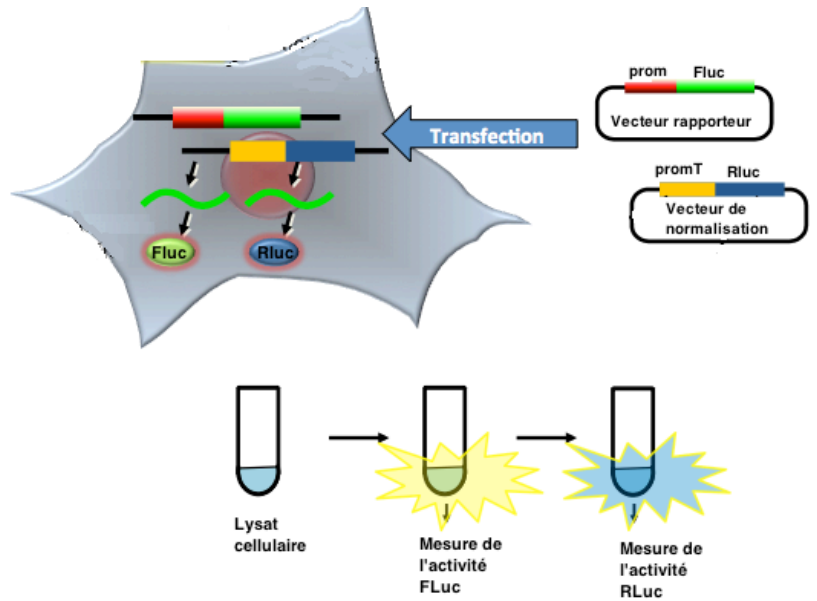
- un vecteur rapporteur exprimant la luciférase FLuc sous le contrôle de promoteurs différents pour chaque série de manipulation :

- prom T (le même que celui du vecteur de normalisation)

- ou deux autres promoteurs différents notés prom A et prom B.

Les activités FLuc et RLuc sont ensuite mesurées, chaque essai est réalisé en triple.

Source : d'après <http://photobiology.info/Ohmiya.html>.



11B. Exploitation des résultats expérimentaux

Expérience	Vecteurs		essais	Activité luciférase (RLU)		Avec normalisation			Sans normalisation		
	Rapporteur	Normalisation		FLuc (F)	RLuc (R)	Ratio (F/R)	Moyenne (F/R)	facteur de modification d'activité	écart-type par rapport à la moyenne	facteur de modification d'activité	écart-type par rapport à la moyenne
	Fluc	Rluc									
Expérience T	pGL4-promT-Fluc	pGL4-promT-Rluc	1	2,77.10 ⁷	1,01.10 ⁷	2,75	2,81	1,00	2,1%	1,00	6,8%
			2	2,56.10 ⁷	0,89.10 ⁷	2,87					
			3	2,94.10 ⁷	1,04.10 ⁷	2,81					
			Moyenne	2,76.10 ⁷							
Expérience A	pGL4-promA-Fluc	pGL4-promT-Rluc	1	2,66.10 ⁷	1,12.10 ⁷	2,37	2,39	0,85	1,0%	0,99	10,0%
			2	2,51.10 ⁷	1,04.10 ⁷	2,41					
			3	3,05.10 ⁷	1,26.10 ⁷	2,41					
			Moyenne	2,74.10 ⁷							
Expérience B	pGL4-promB-Fluc	pGL4-promT-Rluc	1	7,53.10 ⁸	3,88.10 ⁶	194,13	192,93	68,58	2,0%	25,56	6,1%
			2	6,92.10 ⁸	3,61.10 ⁶	191,72					
			3	6,69.10 ⁸	3,59.10 ⁶	186,70					
			Moyenne	7,05.10 ⁸							

NB : les valeurs numériques d'activité luciférase (RLU) ont été présentées en écriture scientifique et arrondies pour faciliter la lecture.

Source : D'après Promega corporation notes- issue 17 - 2007. Normalizing genetic reporter assays: approaches and considerations for increasing consistency and statistical significance.

Document 12 Luciférase déstabilisées

12A. Evaluation de la demi-vie de luciférase déstabilisées ou non

Des cellules de mammifère sont transfectées par des vecteurs d'expression codant la luciférase de luciole (FLuc) portant ou non une séquence déstabilisatrice en C-terminal.

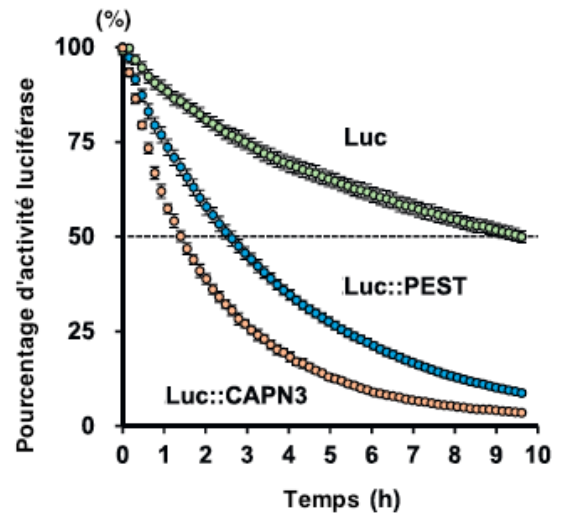
La zone d'expression des vecteurs codant la luciférase déstabilisée est schématisée ci-dessous :



24 h après transfection le milieu de culture est éliminé.

100 μL de milieu de culture contenant la D-luciférine ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) et un inhibiteur de la synthèse protéique, la **cycloheximide** ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) sont ajoutés par puits. Le milieu est recouvert avec 50 μL d'huile minérale pour éviter toute évaporation. La bioluminescence est mesurée toutes les 10 minutes pendant 9,6 h à 37 °C.

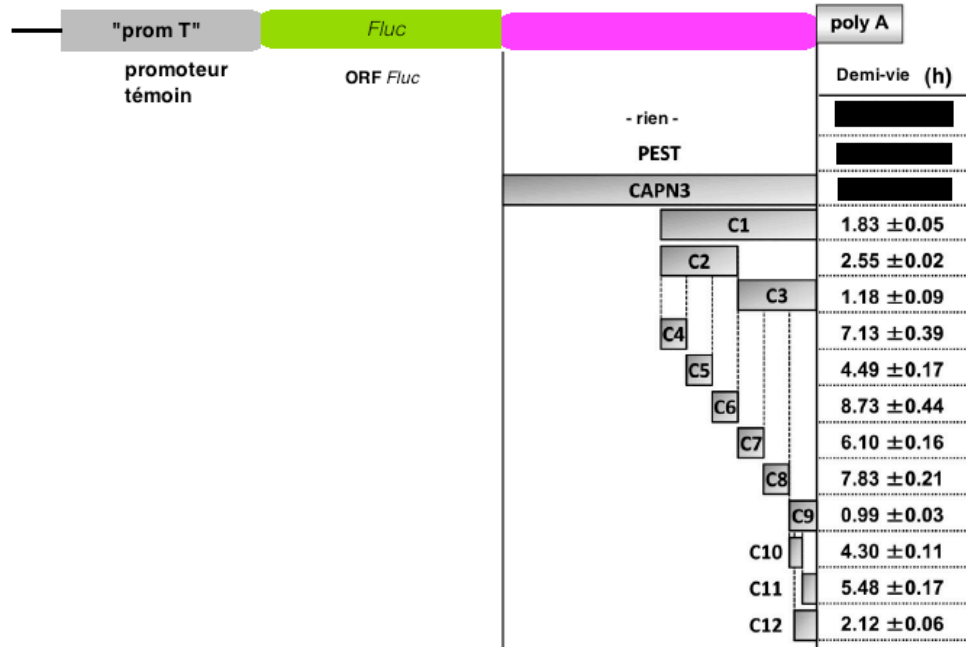
Trois courbes ci-contre, ont été obtenues, pour la luciférase « normale » non déstabilisée (Luc), pour des versions de luciférase déstabilisées par la séquence PEST (Luc::PEST) et par la séquence CAPN3 (Luc::CAPN3).



12B. Définition du motif déstabilisateur minimum

Des expériences identiques sont menées en réduisant la séquence CAPN3.

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous. Les valeurs des demi-vies de la luciférase (Luc), de la luciférase/PEST (Luc::PEST) et de la luciférase/ CAPN3 (Luc::CAPN3) ont été volontairement masquées par un rectangle noir.



Source : D'après Journal of Biotechnology 194 (2015) 115–123. Highly sensitive luciferase reporter assay using a potent destabilization sequence of calpain 3.

Document 13 Biocapteur à stéroïdes

Des souches de levures ont été génétiquement modifiées pour exprimer :

- une luciférase dont la mesure de l'activité permet de normaliser les résultats,
- une luciférase dont la synthèse est conditionnée à la présence d'un perturbateur endocrinien en clonant dans la région promotrice les boîtes de réponse soit à la testostérone, soit à l'œstradiol.

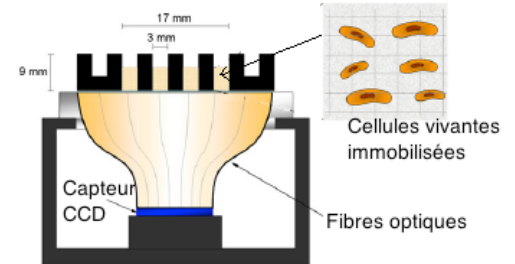
Les études ont été menées sur deux souches indicatrices, la première détectant la testostérone et la seconde l'œstradiol.

13A. Etude de la stabilité du capteur à levures génétiquement modifiées immobilisées

Le biocapteur est composé de 2 parties :

- un capteur photosensible (capteur CCD), couplé à un système de fibres optiques organisées en fuseau,
- une cartouche (36 x 32 mm) délimitant 12 puits de 3 mm de diamètre et d'un volume de 70 μL .

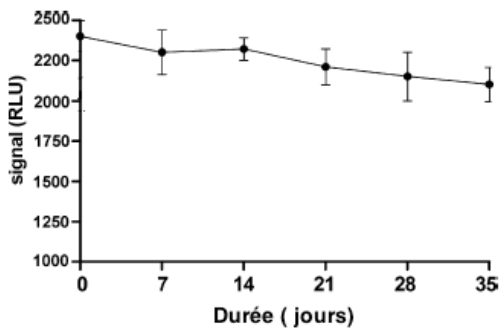
Dans les puits de la cartouche sont déposés 30 μL d'un mélange cellules / matrice d'immobilisation.



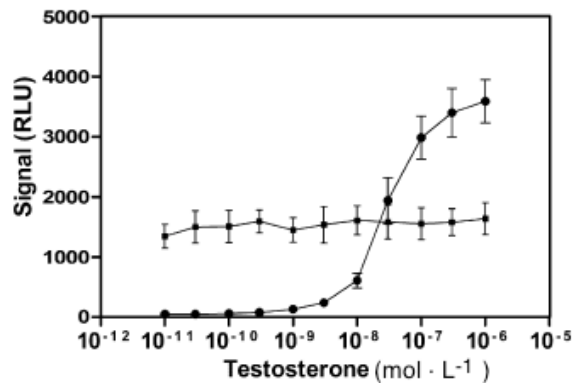
13B. Contrôle du procédé de préparation biocapteur.

La qualité de l'immobilisation est testée en privilégiant deux critères : la conservation et l'étalonnage du biocapteur.

Les résultats montrés concernent la souche indicatrice de la testostérone.



Mesure du signal luminescent de normalisation.



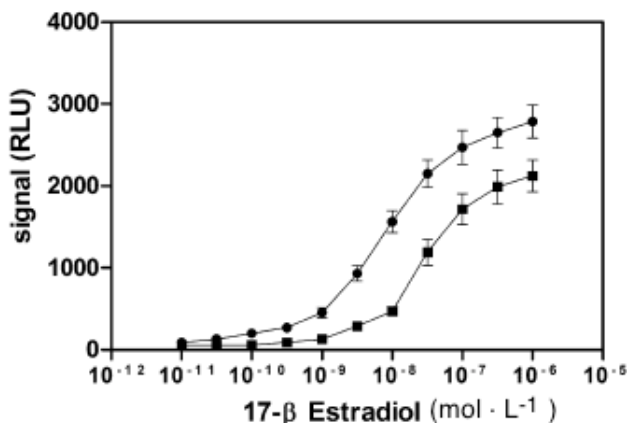
Mesure du signal luminescent de normalisation (■)

Mesure du signal de réponse à la testostérone (●)

13C. Contrôle de la spécificité des capteurs

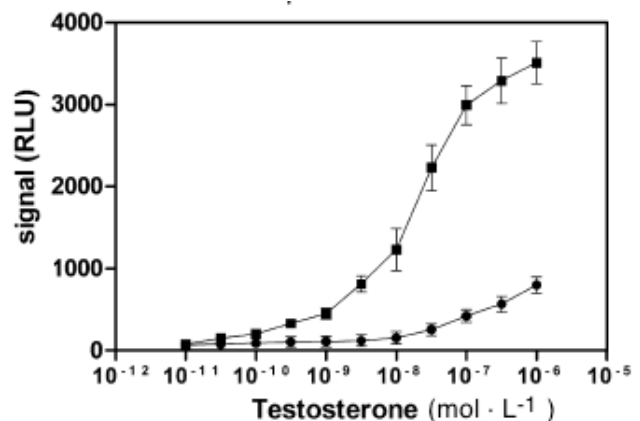
Les réponses des deux capteurs préparés à partir des souches détectant soit la testostérone soit l'œstradiol ont été testées en présence de chacune des deux hormones.

Les graphes présentent des résultats bruts, non normalisés.



Mesure du signal du capteur œstradiol (●)

Mesure du signal du capteur testostérone (■)



Source : A. Roda et al. / Biosensors and Bioelectronics 26 (2011) 3647–3653. A portable bioluminescence engineered cell-based biosensor for on-site applications.