

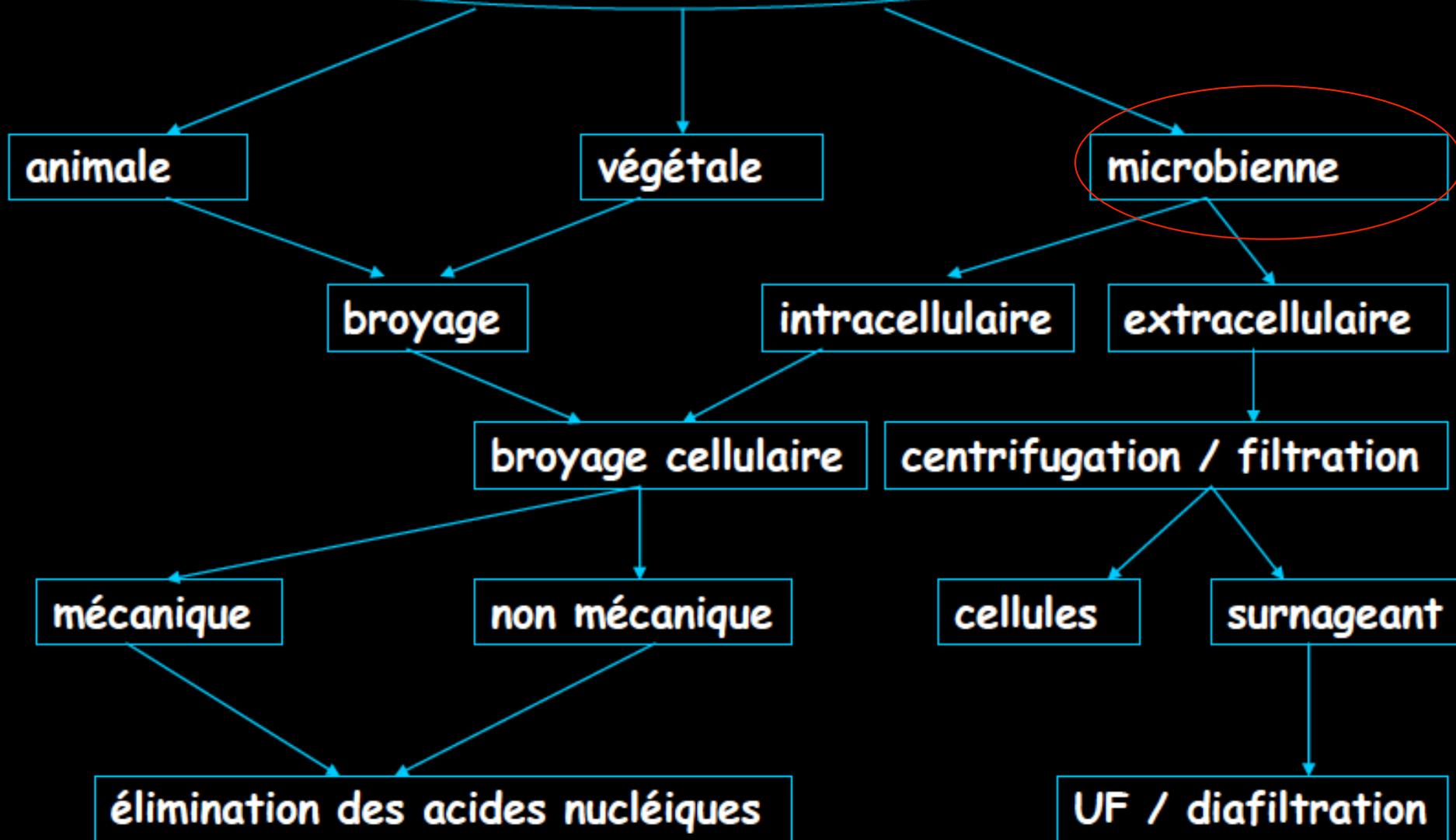
# Purification des Protéines

Obtenir en quantité suffisante une protéine « pure » tout en préservant ses propriétés physiologiques (structure et activité).

Source  Extraction  Purification

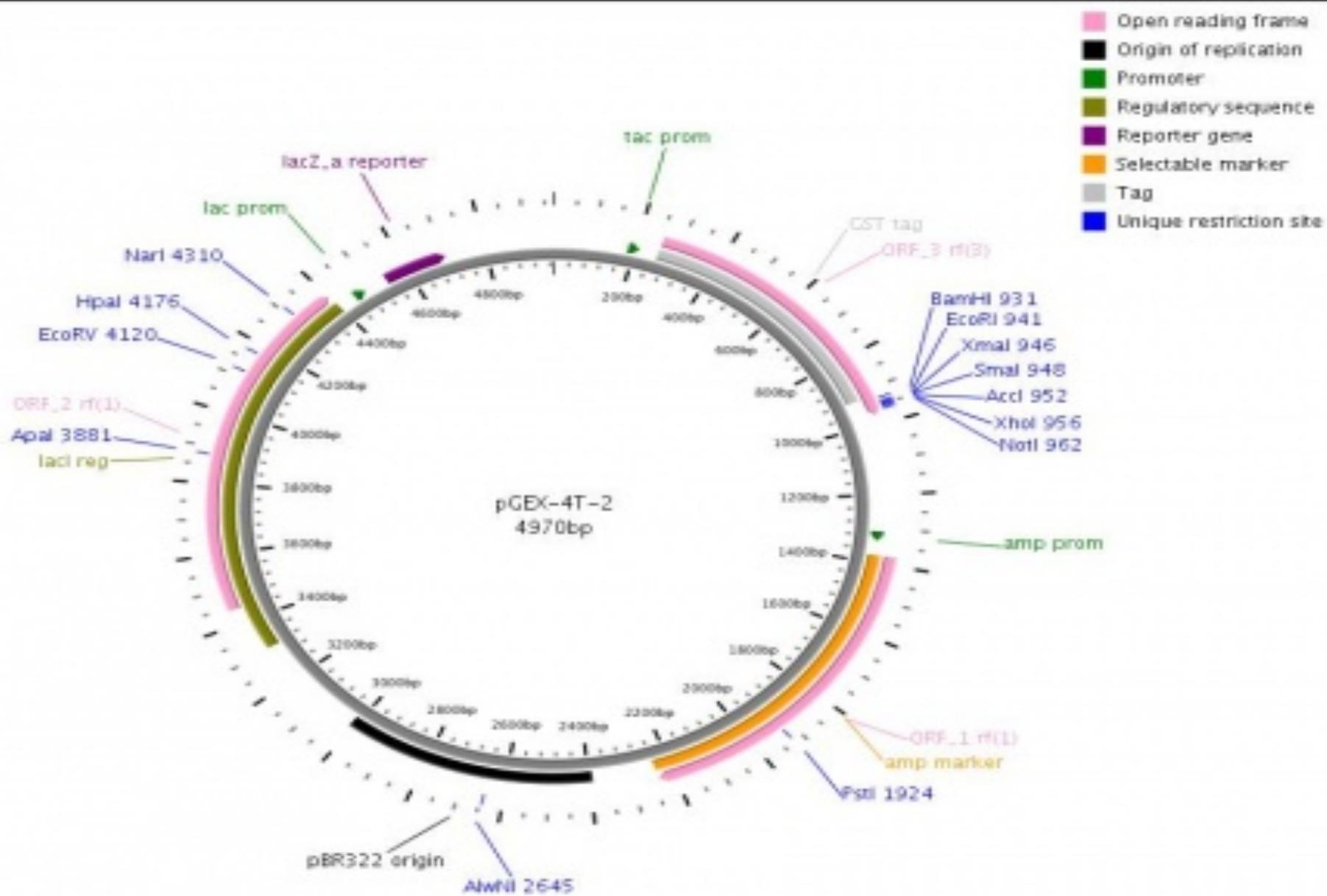
- Dosage de la quantité produite
- Contrôle de la pureté
- Contrôle de l'activité
- Stockage

# Origine de l'enzyme

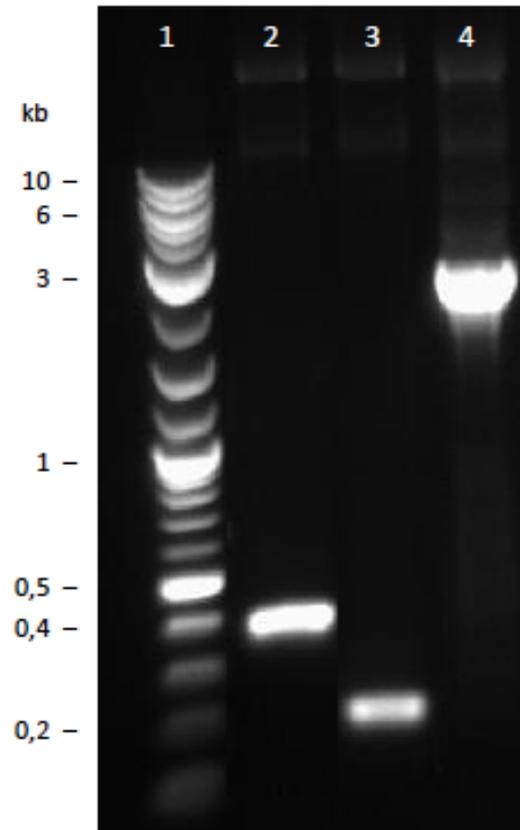


## **1. Linéarisation du plasmide recombinant**

La digestion du plasmide recombinant par l'enzyme de restriction SacII (5'...CCGCGG...3') génère un fragment d'ADN linéaire (cassette d'expression) qui est capable de s'intégrer dans le génome.



ENZYME	RECOGNITION SITE	ENZYME	RECOGNITION SITE	ENZYME	RECOGNITION SITE
<i>Aat II</i>	GAOGI▼C	<i>BsrBRI</i>	GATNN▼NNATC	<i>Fok I</i>	GGATG(9/13)
<i>AccI</i>	GT▼(A/T)(T/G)AC	<i>BsrS I</i>	ACTGGN▼	<i>Hae II</i>	(A/G)GCGC▼ (T/C)
<i>AccIII</i>	T▼OCGGA	<i>BssH II</i>	G▼OGCGC	<i>Hae III</i>	GG▼OC
<i>Acc65 I</i>	G▼GTAOC	<i>Bst71 I</i>	GCAGC(8/12)	<i>Hha I</i>	GOG▼C
<i>AccB7 I</i>	OCANNNN▼NTGG	<i>Bst98 I</i>	C▼TTAAG	<i>Hinc II</i>	GT(T/C)▼(A/G)AC
<i>AcyI</i>	G(A/G)▼OG(T/C)C	<i>BstE II</i>	G▼GTNACC	<i>Hind III</i>	A▼AGCTT
<i>Age I</i>	A▼OCGGT	<i>BstO I</i>	OC▼(A/T)GG	<i>Hinf I</i>	G▼ANTC
<i>Alu I</i>	AG▼CT	<i>BstX I</i>	OCANNNN▼ NTGG	<i>Hpa I</i>	GTT▼AAC
<i>A/w26 I</i>	G▼TCTQ(1/5)	<i>BstZ I</i>	C▼GGOCG	<i>Hpa II</i>	C▼OGG
<i>A/w44 I</i>	G▼TGCAC	<i>Bsu36 I</i>	OC▼TNAGG	<i>Hsp92 I</i>	G(A/G)▼ OG(T/C)C
<i>Apa I</i>	GGGOC▼C	<i>Cfo I</i>	GOG▼C	<i>Hsp92 II</i>	CATG▼
<i>Ava I</i>	C▼(T/C)CG(A/G)G	<i>Cla I</i>	AT▼OGAT	<i>I-Ppo I</i>	CTCTCTTAA▼ GGTAGC
<i>Ava II</i>	G▼G(A/T)OC	<i>Csp I</i>	OG▼G(A/T)CCG	<i>Kpn I</i>	GGTAC▼C
<i>BaI I</i>	TGG▼OCA	<i>Csp 45 I</i>	TT▼OGAA	<i>Mbo I</i>	▼GATC
<i>BamH I</i>	G▼GATCC	<i>Dde I</i>	C▼TNAG	<i>Mbo II</i>	GAAGA(8/7)
<i>Ban I</i>	G▼G(T/C)(A/G)OC	<i>Dpn I</i>	G▼A▼TC	<i>Mlu I</i>	A▼OGCGT
<i>Ban II</i>	G(A/G)GC(T/C)▼C	<i>Dra I</i>	TTT▼AAA	<i>Msp I</i>	C▼OGG
<i>Bbu I</i>	GCA TG▼C	<i>EdHK I</i>	GACNNN▼NNGTC	<i>MspA I</i>	Q(A/C)G▼ Q(G/T)G
<i>Bcl I</i>	T▼GATCA	<i>Eco47 III</i>	AOG▼GCT	<i>Nae I</i>	GOC▼GGC
<i>Bgl I</i>	GOCNNN▼NNGC	<i>Eco52 I</i>	C▼GGOCG	<i>Nar</i>	GG▼OGCC
<i>Bgl II</i>	A▼GATCT	<i>Eco72 I</i>	CAC▼GTG	<i>Nd I</i>	OC▼(G/C)GG
<i>BsaM I</i>	GATTGCN▼	<i>EcoI CR I</i>	GAG▼CJC	<i>Nco I</i>	C▼CATGG
<i>BsaO I</i>	OG(A/G)(T/C)▼OG	<i>EcoR I</i>	G▼AATTC	<i>Nde I</i>	CA▼TATG
<i>Bsp1286 I</i>	G(G/A/T)GQ(C/A/T)▼ C	<i>EcoR V</i>	GAT▼ATC	<i>NgoM I</i>	G▼OCGGC



**Figure : Electrophorèse sur gel d'agarose 1%. Contrôle de l'intégrité du plasmide recombinant**

### ***Séquençage de l'ADN***

Le séquençage de l'ADN est réalisé en utilisant la méthode de Sanger. Les résultats de séquençage sont analysés à l'aide du logiciel Chromaspro113 et comparés à des bases de données (NCBI Blast).

Décongeler 200  $\mu$ L de bactéries compétentes.

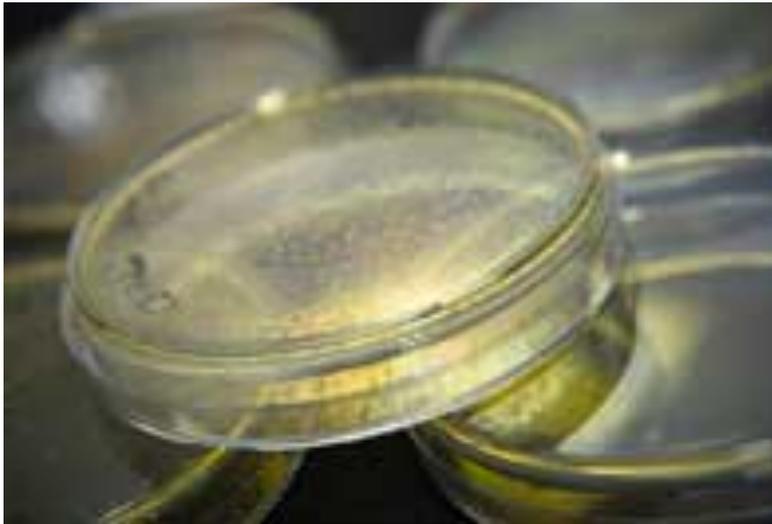
### **Souches bactériennes**

- **E. coli BL21 (DE3)**,
- Rosetta 2 (DE3)
- Rosetta-gami 2 (DE3) sont utilisées pour sur-exprimer la protéine

- Ajouter 10 ng de plasmide.
2. Laisser incuber dans la glace pendant 1 h.
3. Incuber à 42°C pendant 2 min.
4. Ajouter 1 mL de milieu de culture stérile, mélanger par aller-retour. Incuber 1 h à 37°C.
5. Centrifuger à 3 000 g pendant 3 min à température ambiante.
6. Eliminer 1 mL de surnageant. Reprendre délicatement le culot avec les 200 µL restants.
7. Inoculer 2 boites de cultures avec 100 µL de bactéries chacune. Les boites de cultures doivent contenir du milieu de culture et l'antibiotique de sélection.

Laisser incuber 15 min à 37°C,

Les bactéries ayant intégré le plasmide recombinant sont inoculées dans 10 ml de milieu LB (Luria Broth, 1% de tryptone, 0,5% d'extrait de levure et 0,5% de chlorure de sodium) contenant de l'ampicilline à une concentration de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Les cultures sont incubées sous agitation (200 rpm) toute la nuit à 37°C. Ces précultures servent à ensemencher 1 l de milieu de culture supplémenté de l'antibiotique.



\* Les cultures sont incubées à 37°C sous agitation. Lorsque la densité optique à 600 nm atteint 0,8-1, la température est abaissée à 30°C et l'expression de la protéine est induite par l'ajout d'IPTG (isopropyl-B-D –thiogalactopyranoside) à une concentration de 1 mM.

\* Après 3 h d'incubation à 30°C, les bactéries sont sédimentées par centrifugation (8200 x g pendant 15 min à 4°C), resuspendues dans du tampon 50 mM HEPES, 0,5 M NaCl, pH 7,4, et lysées par sonication.

La fraction soluble après la lyse cellulaire (centrifugation à 23400 x g pendant 15 min à 4°C), est déposée sur une colonne d'affinité (résine de nickel, HisTrap FF 1 m

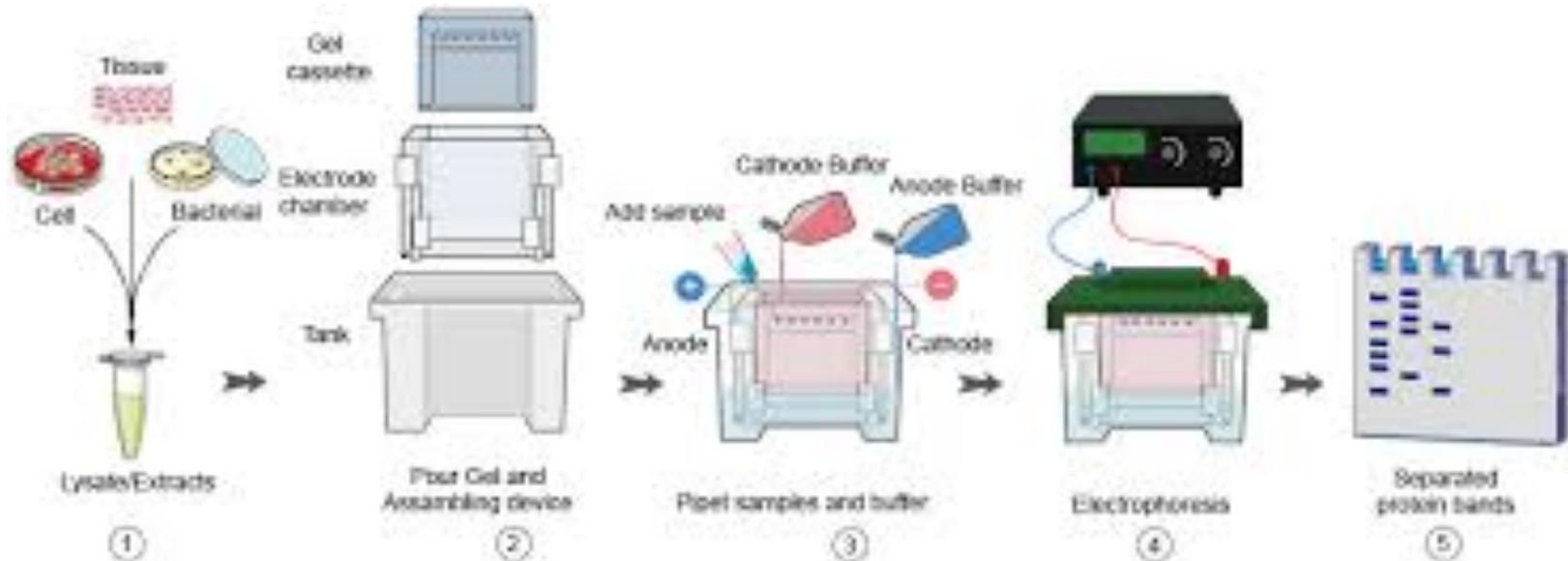
Préalablement équilibrée avec du tampon 50 mM HEPES, 0,5 M NaCl, pH 7,4c

Les protéines fixées sont ensuite éluées sur 30 fois le volume de la colonne grâce au passage d'un gradient linéaire d'Imidazole (de 0 à 110 mM) à travers la résine. Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont réunies et dialysées dans du tampon 20 mM Tris-HCl pH 7,5.

Dans

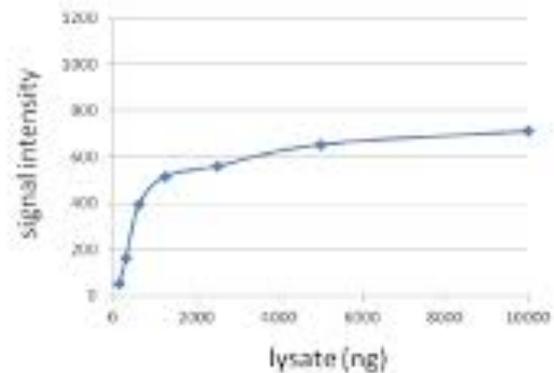
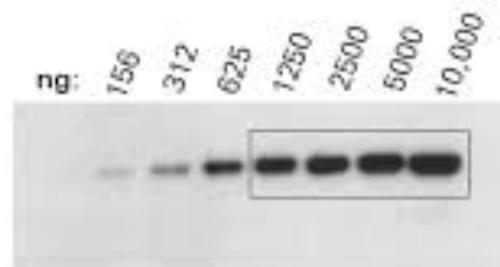
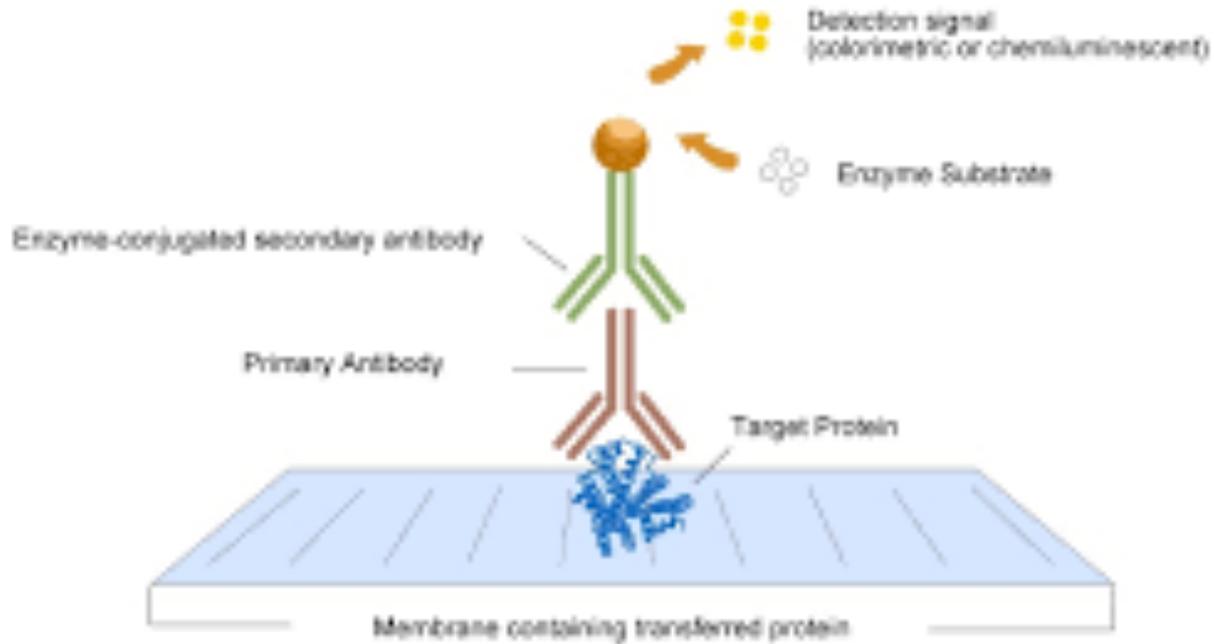
# Tests d'expression de la protéine recombinante

Les culots cellulaires et les surnageants de culture sont analysés pour localiser la protéine d'intérêt et évaluer le niveau d'expression : analyse sur gel SDS-PAGE et par Western Blot.



# Tests d'expression de la protéine recombinante

## Detection in Western Blots



# DIALYSE

Il se produit souvent qu'une préparation de macromolécules contienne différents produits dont on veut se débarrasser. Ces produits, sels, glucides, détergents ou autres petites molécules, étaient présents dans la préparation initiale ou ont été introduits lors d'une étape de la purification. Une façon simple d'éliminer ces petites molécules est la dialyse. Les molécules de petite taille qui traversent la membrane du sac à dialyse sont qualifiées de diffusibles. Celles qui sont trop grosses sont dites non diffusibles.

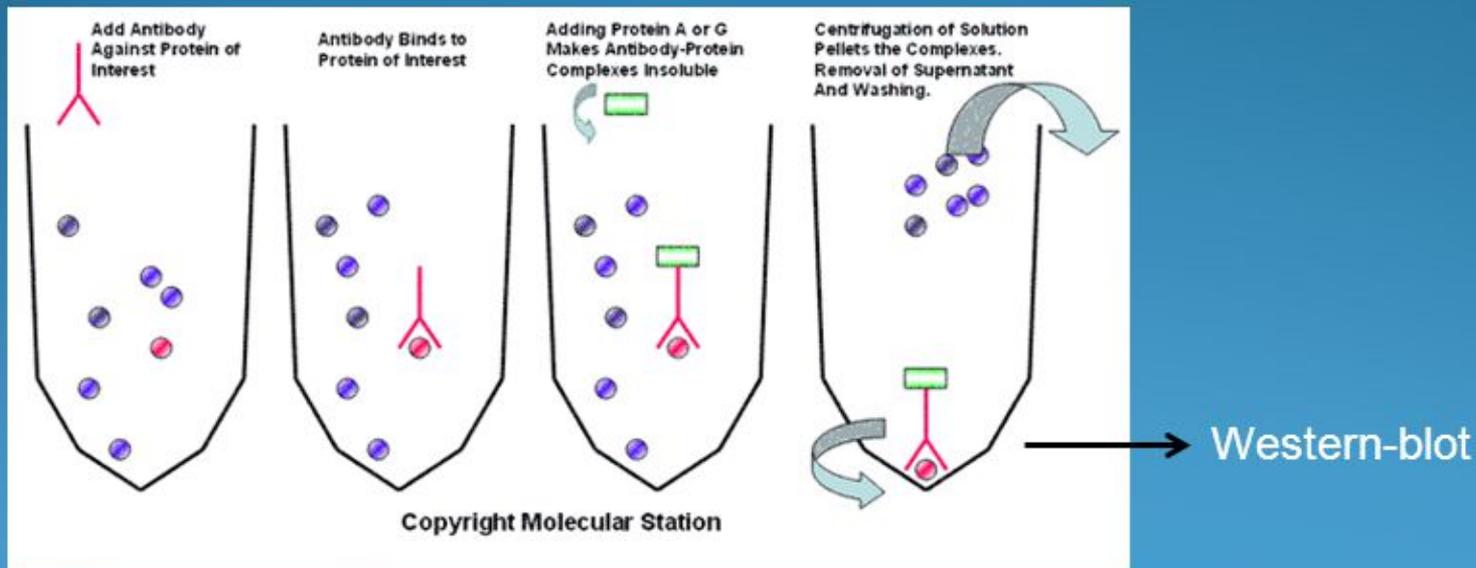
## **PRINCIPES DE BASE**

La dialyse est basée sur les principes régissant la diffusion à travers une membrane perméable ou semi-perméable. Deux mécanismes entrent en jeu dans ce processus. Tout d'abord, les molécules diffusibles vont traverser la membrane selon le gradient de concentration. Il y aura donc un déplacement net des molécules du côté le plus concentré vers le côté le moins concentré. Chaque espèce chimique en solution subit individuellement ce processus.

On peut amplifier cette élimination des molécules diffusibles en répétant ce processus.

# Immunoprécipitation

- Isoler une protéine d'intérêt à partir d'un lysat cellulaire
- Utiliser un Ac spécifique de la protéine d'intérêt
- Précipiter le complexe Protéine-Ac avec une forme insoluble de protéines se liant à des anticorps (ex: Protein G)
- Centrifuger la suspension: la protéine d'intérêt est séparée



- Interactions protéines-protéines, protéine-médicament
- Concentration d'une protéines présente en faible quantité

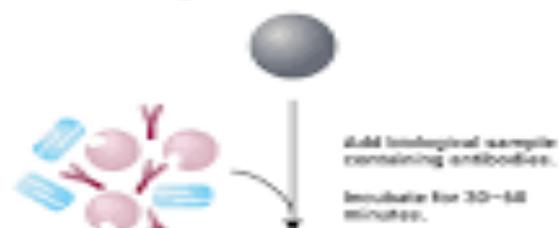
## Protein A, G, L, and LA Capacities for Various Species

## Protein A/G/L Binding Affinities

Species	Immunoglobulin	Binding - Protein A <sup>1-4</sup>	Binding - Protein G <sup>5-8</sup>	Binding - Protein L <sup>9-10</sup>
Human	IgG (normal)	++++	++++	++++
	IgG1	++++	++++	++++
	IgG2	++++	++++	++++
	IgG3	—	++++	++++
	IgG4	++++	++++	++++
	IgM	—	—	++++
	IgA	—	—	++++
	IgE	—	—	++++
	IgD	—	—	++++
	Fab	++	++	++++
	κ light chains	—	—	++++
	λ light chains	—	—	—
	ScFv	++	—	++++
Mouse	IgG1	+	++++	++++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	++++
	IgG3	++	+++	++++
Rat	IgG1	—	+	++++
	IgG2a	—	++++	++++
	IgG2b	—	++	++++
	IgG2c	+	++	++++
Bovine	IgG	++	++++	—
Cat	IgG	++++	—	N/A
Chicken	IgG	—	+	++
Dog	IgG	++++	++++	+
Goat	IgG	+/-	++	—
Guinea Pig	IgG	++++	++	++
Hamster	IgG	+	++	++++
Horse	IgG	++	++++	+/-
Pig	IgG	+++	+++	++++
Rabbit	IgG	++++	+++	+
Sheep	IgG	+/-	++	—

It should be noted that Protein L is restricted to specific subclasses of the VL domain. Thus, the affinity indicated in the table is not general for the IgG subclass, but accounts only for those antibodies carrying the right kappa light chain.

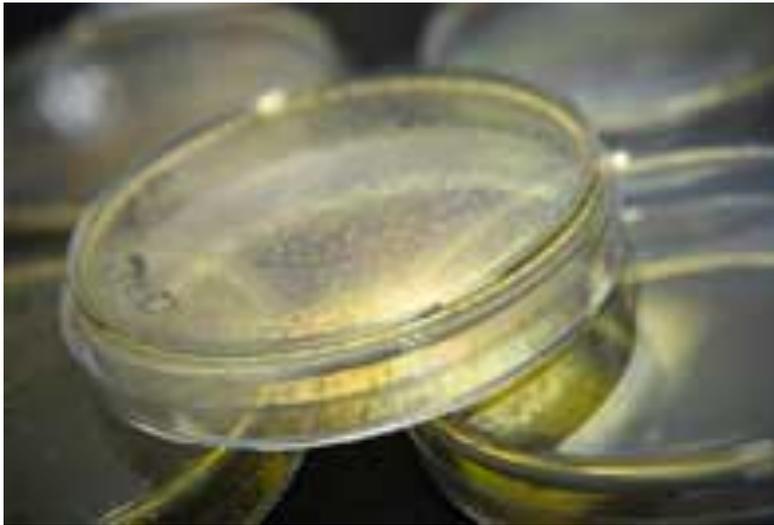
**Magne™ Protein G Beads or  
Magne™ Protein A Beads**

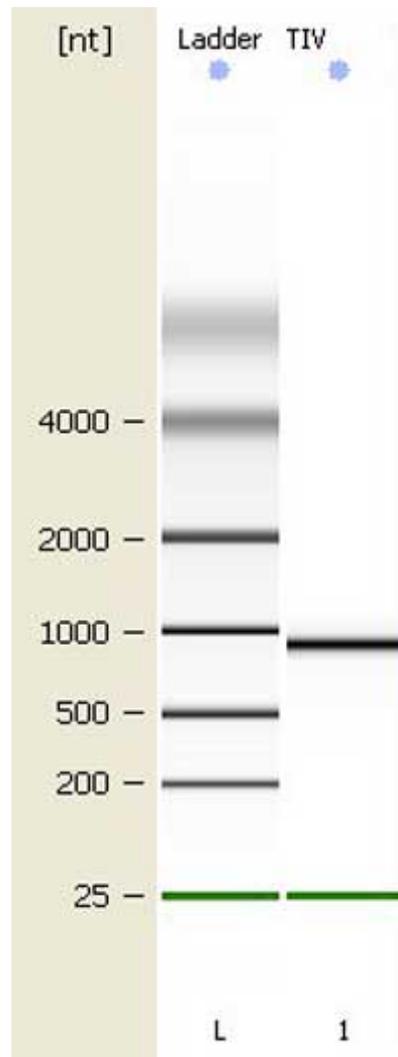


**Antibodies bound  
to beads**



**Purified antibodies**





4- Pour ne pas dénaturer les protéines, on travaille en milieu tamponné et à 0 C (glace): on obtient enfin un homogénat cellulaire.

5- On élimine ensuite les débris cellulaires par centrifugation. On facilite la solubilisation des protéines dans des solutions salines et on obtient alors un extrait brut.

## **Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium**

Cette technique utilise la solubilité différentielle des protéines. Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition, on peut en séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique de la solution qui les contient.

Les protéines seront éventuellement toutes précipitées par une teneur en sel assez élevée, mais certaines d'entre elles seront remarquablement résistantes alors que d'autres précipiteront très facilement. C'est cette différence de solubilité qui permet de les séparer.

(1) **Ajustement à 20%** sulfate Centrifugation et récupération du culot  
**(fraction C20)**

(2) Ajustement du surnageant à 40% sulfate Centrifugation et  
récupération du culot **(fraction C40)**

(3) Ajustement du surnageant à 60% sulfate Centrifugation et  
récupération du culot  
**(fraction C60)**

(4) Ajustement du surnageant à 80% sulfate Centrifugation et  
récupération du culot **(fraction C80)**

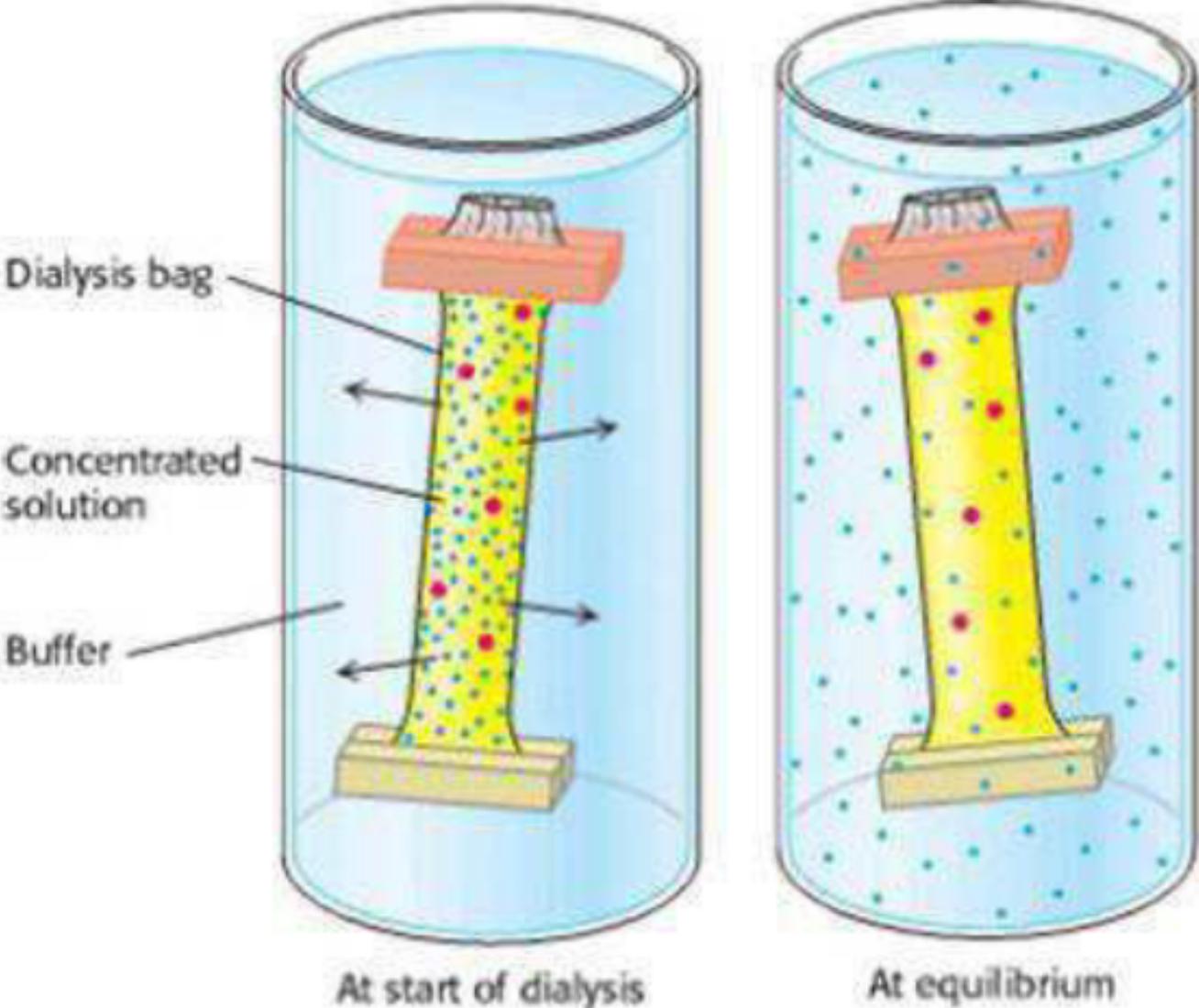
(5) Ajustement du surnageant à 100% sulfate Centrifugation et  
récupération du culot **(fraction C100)**

**Notre protéine se trouvera dans une des fractions  
C20, C40, C60, C80 ou C100.**

# DIALYSE

Il se produit souvent qu'une préparation de macromolécules contienne différents produits dont on veut se débarrasser. Ces produits, sels, glucides, détergents ou autres petites molécules, étaient présents dans la préparation initiale ou ont été introduits lors d'une étape de la purification. Une façon simple d'éliminer ces petites molécules est la dialyse. Les molécules de petite taille qui traversent la membrane du sac à dialyse sont qualifiées de diffusibles. Celles qui sont trop grosses sont dites non diffusibles.

# DIALYSE



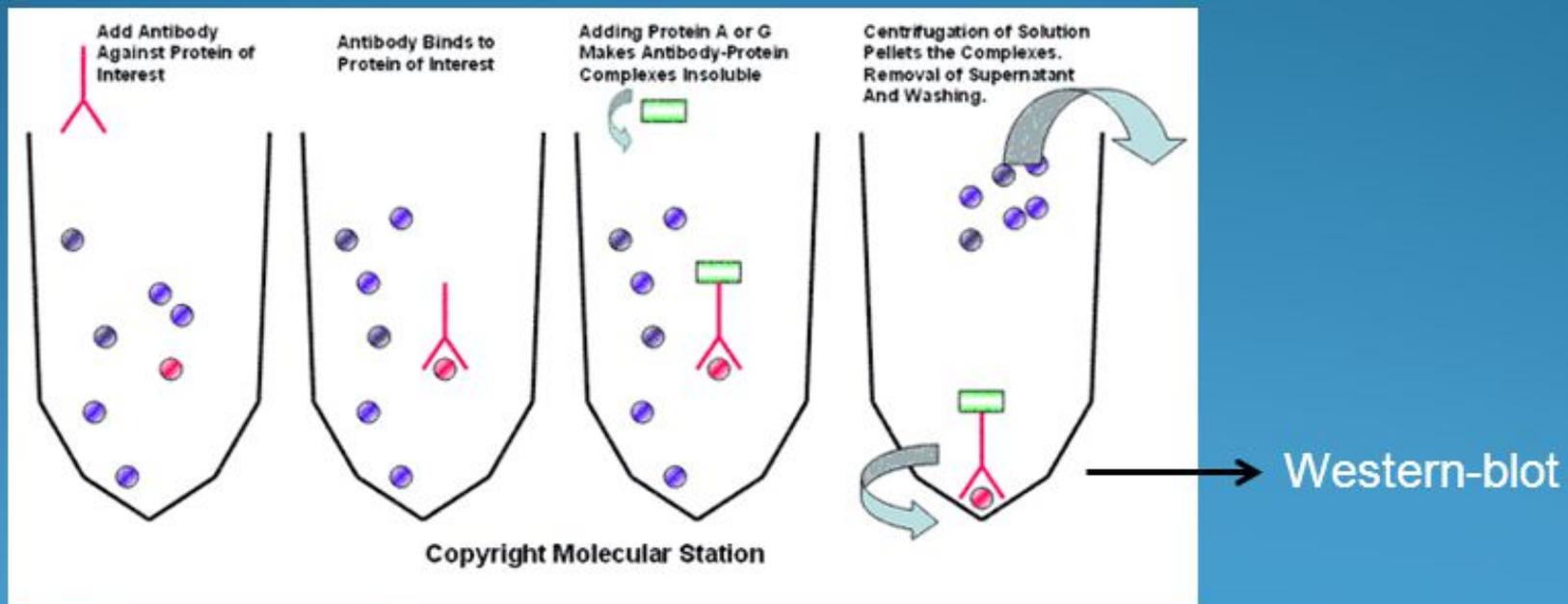
La fraction soluble après la lyse cellulaire (centrifugation à 23400 x g pendant 15 min à 4°C), est déposée sur une colonne d'affinité (résine de nickel, HisTrap FF 1 m)

Préalablement équilibrée avec du tampon 50 mM HEPES, 0,5 M NaCl, pH 7,4



# Immunoprécipitation

- Isoler une protéine d'intérêt à partir d'un lysat cellulaire
- Utiliser un Ac spécifique de la protéine d'intérêt
- Précipiter le complexe Protéine-Ac avec une forme insoluble de protéines se liant à les anticorps (ex: Protein G)
- Centrifuger la suspension: la protéine d'intérêt est séparée



- Interactions protéines-protéines, protéine-médicament
- Concentration d'une protéines présente en faible quantité

Les protéines recombinantes sont produites à partir d'un transgène introduit dans un organisme hétérologue par génie génétique. Ce procédé biotechnologique se déroule suivant cinq grandes étapes :

**I-** La construction d'un vecteur d'expression (en général, plasmide ou virus) jouant le rôle de transporteur du gène codant pour la protéine d'intérêt ;

**II-** La modification d'une cellule hôte ou d'un organisme complexe par le vecteur d'expression ;

**III-** la production de ce nouveau système d'expression, qui exécute les instructions fournies par le transgène, en l'occurrence synthétise la protéine d'intérêt ;

**IV-** la séparation de la protéine du milieu de culture, quand elle est sécrétée, ou son extraction du milieu intracellulaire le cas échéant, puis sa purification ;

**V-** la caractérisation de la molécule et la vérification de son degré de pureté

## Des défis majeurs

Les principaux défis des acteurs de la bioproduction pharmaceutique en vue de l'abaissement des coûts et des délais de production sont de trois ordres :

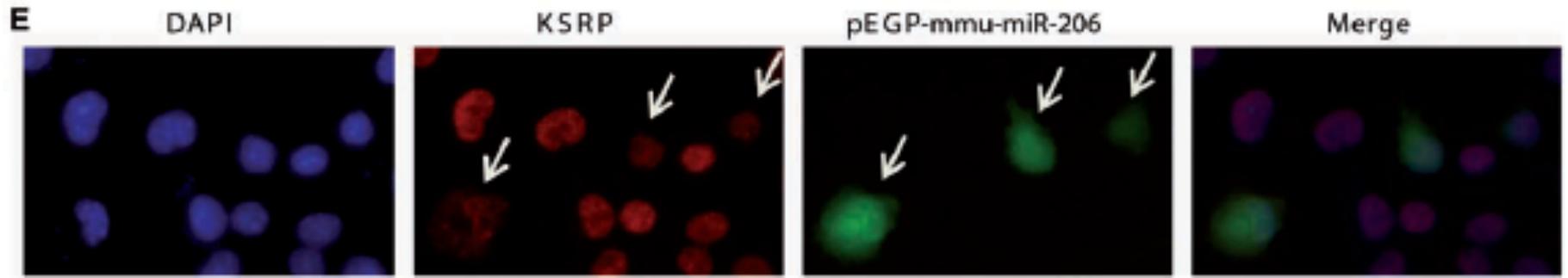
1- L'optimisation du système d'expression des molécules - amélioration de la productivité des clones et des techniques et rendements de production en masse, (éliminant ainsi les risques de contamination).

2- Amélioration des performances et rendements en *downstream process* (extraction/purification des molécules), développement des *Process analytical technologies*.

3- Une meilleure compréhension des mécanismes d'action des biomolécules et de l'impact de leur structure tri-dimensionnelle sur leur activité, en vue d'orienter le choix du modèle d'expression en fonction de l'application thérapeutique ciblée

# Applications de GFP

- GFP en biologie cellulaire et biotechnologie



# Applications pharmaceutiques

## **Bactéries** (ex : *Escherichia coli*)

Depuis une vingtaine d'années, des bactéries sont modifiées pour synthétiser certaines molécules utiles, que l'industrie pharmaceutique ne sait pas produire. Ce procédé est utilisé pour fabriquer, en grande quantité et à faible coût, des protéines que l'on devait auparavant extraire de tissus humains ou animaux (avec tous les risques de transmission d'agents pathogènes que comportait cette pratique).

# **l'insuline**

La quasi totalité de l'**insuline** humaine est désormais produite par des bactéries recombinantes, au lieu de l'extraire des pancréas de porc. Cette protéine a une composition strictement identique à l'insuline humaine et elle est plus purifiée que celle provenant des pancréas de porc.

# L'hormone de croissance

L'**hormone de croissance** provient également en quasi totalité de bactéries recombinantes. Ceci évite de collecter des hypophyses humaines mais permet surtout de ne plus prendre le risque de transmettre la maladie de Creutzfeld-Jacob par le prion contaminant

**Levures** (ex : *Saccharomyces cerevisiae*)

L'utilisation des bactéries présente toutefois des limites : leur métabolisme ne permet pas certaines transformations des protéines qui interviennent après la synthèse et sont nécessaires à leur passage sous une forme biologiquement active. D'où le recours aux levures, champignons unicellulaires plus proches sur le plan métabolique des organismes pluricellulaires.

## Cellules d'organismes supérieurs

(ex : cellules d'ovaire de hamster chinois)

Les protéines d'intérêt pharmaceutique sont souvent glycolysées, parfois gamma-carboxylées, clivées et réassociées pour former des molécules comprenant plusieurs sous-unités. De ce fait, elles possèdent une structure trop complexe pour être produite à l'état biologiquement actif par des bactéries, des levures ou sont trop difficiles à extraire.

D'où des recherches engagées ayant recourt à des lignées de cellules d'organismes supérieurs. C'est l'exemple de cellules d'ovaire de hamster chinois cultivées dans des fermenteurs pour produire de l'**érythropoïétine** (EPO) qui ne peut être obtenue par extraction, car trop rare, et qui doit être glycolysée pour être active.

Protéines thérapeutiques	Fonctions	Exemples d'applications
Cytokines	Régulation du système immunitaire	
	Ex : Interférons Interleukines	Hépatite B Cancers, VIH
Enzymes	Catalyse de réactions biochimiques	
	Ex : Enzymes lysosomales Lipase gastrique	Maladies lysosomales Mucoviscidose
Hormones	Régulation des fonctions de l'organisme	
	Ex : Insuline Œstrogènes	Diabète Traitements de substitution hormonale
Facteurs de coagulation	Régulation de la coagulation du sang	
	Ex : Facteur VIII	Hémophilie
Antigènes	Stimulation du système immunitaire pour la production d'anticorps spécifiques	
	Ex : Héماغglutinine Antigène HB	Vaccin contre la grippe Vaccin contre l'hépatite B
	Allergènes	Désensibilisation et traitement des allergies
Anticorps	Régulation du système immunitaire	
	Ex : Anticorps polyclonaux Anticorps monoclonaux	Sérothérapie, prévention des maladies hémolytiques du second nouveau-né Cancérologie, transplantation d'organes, maladies auto-immunes

Points à considérer	Systèmes de production					
	Bactéries	Levures	Cellule d'insectes + baculovirus	Cellules animales (cellules CHO)	Plantes transgéniques	Animaux transgéniques
Niveau de production théorique	+++++	+++++	+++	+	+++++	+++++
Niveau de production pratique	++(+)	++(+)	+	+	++	++++
Coût d'investissement	+++++	+++++	++	+	++++	+++
Coût de production	+++++	+++++	++	++	+++++	++++
Flexibilité	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Conservation	+++++	+++++	+++	+++	+++++	+++++
Stabilité	+++++	+++++	++++	+++	+++++	+++++
Délai pour la 1 <sup>re</sup> production	+++++	+++++	+++	+++++	++++	+++(+)
Augmentation	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Recueil	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	++++
Effets sur l'organisme	+++(+)	+++(+)	+++(+)	+++(+)	+++(+)	+++
Modifications post-translationnelles	+	++	+++	++++	+++	++++
Glycosylation	+	++	+++	++++	++	++++
Stabilité du produit	+++++	+++++	+++	+++	++++	++++
Purification	+++	+++	+++	++++	+++	+++
Pathogènes contaminants	+++++	+++++	+++++	++++	+++++	++++
Propriété intellectuelle	++++	+++	+++	++	+++	+++
Produits sur le marché	++++	+++	+++	+++++	+	+++

## RNA electrophoretic mobility shift assays (REMSA)

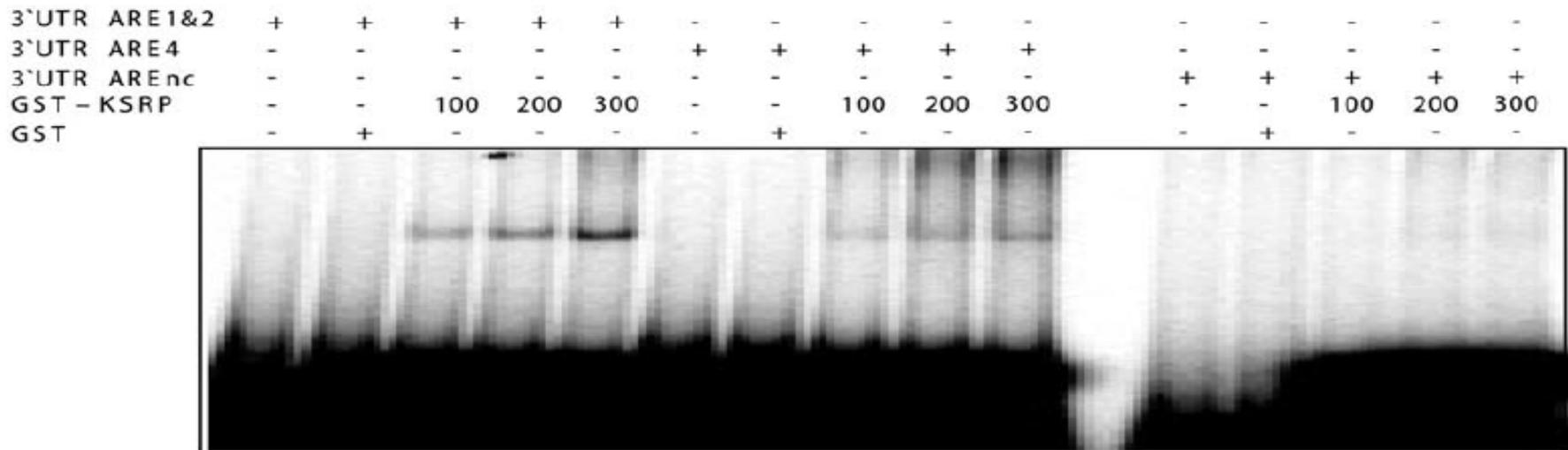
REMSA using specific regions of the utrophin A 3' UTR and GST-KSRP was performed as previously described (32). KSRP from pCMV-Myc-KSRP was subcloned into pGEX-4T2 (Acc. No. U13854; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) using its *EcoRI* and *XhoI* sites. GST, and GST-KSRP fusion constructs were subsequently overexpressed in *Escherichia coli* BL-21 competent cells (Stratagene) by induction with 0.1 mM isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 37°C for 3 h. After induction, cells were spun down and resuspended in 10 mL of 1 × PBS supplemented with Complete<sup>TM</sup> Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Laval, QC, Canada) and broken down by sonication (five pulses of 15 s at 12 watts). Cellular debris were centrifuged for 20 min at 10 000g and GST-KSRP from the supernatant was purified using glutathione-agarose beads (Sigma) and extensive washes with 1 × PBS wash buffer. To facilitate collection for UV crosslinking assays, fusion proteins were not eluted from the GST beads and were instead resuspended as 50% V/V in 1 × PBS supplemented with Complete<sup>TM</sup> tablets.

# Activation of p38 signaling increases utrophin A expression in skeletal muscle via the RNA-binding protein KSRP and inhibition of AU-rich element-mediated mRNA decay: implications for novel DMD therapeutics

Adel Amirouche, Helina Tadesse, John A. Lunde, Guy Bélanger, Jocelyn Côté and Bernard J. Jasmin\*

Faculty of Medicine, Department of Cellular and Molecular Medicine and Centre for Neuromuscular Disease, University of Ottawa, ON, Canada K1H 8M5

Download



**Figure 5.** KSRP binds to the AREs contained within the utrophin A 3' UTR. (A) The results of an EMSA using purified GST-KSRP (100, 200 or 300 ng) and  $P^{32}$ -radiolabeled RNA probes encompassing the different conserved AREs and a non-conserved one (ARE 5). (B) and (C) EMSA using conserved AREs and competition with mutants or cold probes. The presence of a shifted complex is indicative of a specific interaction between the probe and the purified KSRP. Note that addition of increasing concentrations of cold probes (100 or 400 ng) successfully competed away shifted bands. (D) C2C12 cells were cross-linked with formaldehyde and subjected to immunoprecipitation with either anti-KSRP antibody or IgG. Western blot (WB) shows the amount of KSRP in each fraction (IN, input; E, Eluate). qRT-PCR analysis revealed the enrichment of utrophin A mRNAs in the KSRP immunoprecipitate. (E) Shows the results of RIP assays in C2C12 cells transfected with either pcDNA3 or MKK6-EE. Western blot (WB) shows the amount of KSRP in each fraction (IN, input; E, Eluate). Note the decreased amount of utrophin A mRNA interacting with KSRP upon p38 activation. Values are expressed as means  $\pm$  SE ( $n = 3$  per group). \*\*\* $P < 0.001$  relative to corresponding control.  $^{SSS}P < 0.0001$ ; relative utrophin A mRNA immunoprecipitated with KSRP antibody in untreated group (Fig. 5D and E: unpaired  $t$ -test).

## A partir du tissus entier:

On choisit un matériel tissulaire que l'on sait riche en cette protéine.

1- On le broie grâce à l'appareil de Potter.

2- L'éclatement des cellules est achevée par choc osmotique ou encore par sonication ce qui va lyser les membranes des cellules.

3- Pour ne pas dénaturer les protéines partir du tissus entier: On choisit un matériel tissulaire que l'on sait riche en cette protéine

