

# Filière Technologies du vivant

## Orientation Biotechnologie

# Diplôme 2010

*Grégoire de Lavallaz*

*Purification de GFP  
avec et sans marqueur d'affinité*

Professeur           SIMON CRELIER  
Expert                THIERRY CHAPPUIS

---

Sion, le 20 août 2010

SI	TV
X	X

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr 2009/2010	No TD / Nr. DA bt/2010/51
Mandant / Auftraggeber <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire	Etudiant / Student Grégoire de Lavallaz	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire
Professeur / Dozent Simon Crelier	Expert / Experte (données complètes) Thierry Chappuis EIA—FR Bd de Pérolles 80   CP 32   1705 Fribourg	
Travail confidentiel / vertrauliche Arbeit <input type="checkbox"/> oui / ja <sup>1</sup> <input checked="" type="checkbox"/> non / nein		

Titre / Titel

**Purification de GFP avec et sans marqueur d'affinité**

Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele

La HES-SO Valais dispose de deux souches d'*E. coli* produisant chacune une GFP recombinante. L'une de ces GFPs possède un marqueur d'affinité de type intrinsèque, l'autre en est dépourvue. On aimerait comparer différentes stratégies de purification pour la GFP, notamment l'utilisation d'une colonne d'affinité à base de chitine pour la GFP marquée.

Les objectifs du travail de bachelor sont les suivants :

- essais de fermentation des deux souches recombinantes
- développement de stratégies pour l'isolation des deux formes de GFP à l'échelle préparative
- fabrication et évaluation de billes de chitine pour la chromatographie d'affinité.

Délais / Termine

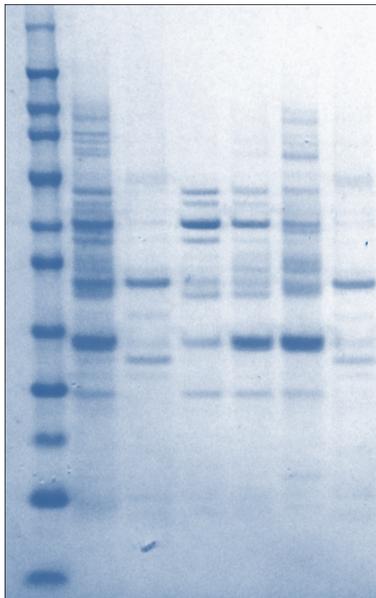
Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags: 03.05.2010	Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten: 27.08.2010
Fin des travaux en laboratoires / Ende Laborarbeiten: 16.07.2010	Défense orale / Mündliche Verteidigung: dès la semaine 35 / ab Woche 35
Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts: 20.08.2010   12h00	

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum

Responsable de la filière  
Leiter des Studiengangs:  <sup>1</sup> Etudiant/Student: 

<sup>1</sup> Par sa signature, l'étudiant s'engage à respecter strictement le caractère confidentiel du travail de diplôme qui lui est confié et des informations mises à sa disposition; il s'engage également à appliquer formellement la directive y relative.  
Durch seine Unterschrift verpflichtet sich der Student, die Richtlinie einzuhalten sowie die Vertraulichkeit der Diplomarbeit und der dafür zur Verfügung gestellten Informationen zu wahren.

Rapport reçu le / Schlussbericht erhalten am ..... Visa du secrétariat / Visum des Sekretariats .....



## Purification de GFP avec et sans marqueur d'affinité



Diplômant

Grégoire de Lavallaz

### Objectif du projet

L'objectif de ce travail est de produire deux GFP recombinantes, l'une possédant un marqueur d'affinité de type intéine, l'autre en étant dépourvue, puis de développer et comparer des stratégies pour l'isolation des deux formes de GFP.

### Méthodes | Expériences | Résultats

Deux fermentations fed-batch des souches *E. coli* B ER2566 pHEVS et W3110 ont permis respectivement la production de GFP avec et sans marqueur d'affinité. Ces deux types de GFP, possédant des propriétés distinctes, ont été purifiés à l'aide de diverses méthodes dans le but de comparer leur efficacité.

L'isolation de la GFP dépourvue de marqueur a été conduite par extraction à l'éthanol, chromatographie d'interactions hydrophobes ou chromatographie échangeuse d'anions. Les meilleurs résultats ont été obtenus lors de l'extraction à l'éthanol avec un facteur de purification de 15-20 fois.

Des essais en mode batch, basés sur le principe de la chromatographie d'affinité, ont été utilisés afin d'isoler la GFP-intéine. Les résultats, parfois contradictoires, ont montré que cette stratégie ne conduisait pas à une purification efficace.

Les essais de purification de la « Maltose Binding Protein » ont confirmé que la méthode de purification en mode batch ne permettait pas d'isoler une protéine couplée à un marqueur intéine. En revanche, l'utilisation d'une colonne remplie de billes de chitine démontre qu'il est possible de purifier la MBP. Par conséquent, cette technique devrait également permettre de purifier une GFP couplée à un marqueur intéine.

Travail de diplôme  
| édition 2010 |



Filière

*Technologies du vivant*

Domaine d'application

*Biotechnologie*

Professeur responsable

*Dr Crelier Simon*

*Simon.crelier@hevs.ch*

Partenaire

*Projet interne*

HES-SO Valais  
Route du Rawyl 47  
1950 Sion

Tél. 027 606 85 11  
URL [www.hevs.ch](http://www.hevs.ch)

## TABLE DES MATIÈRES

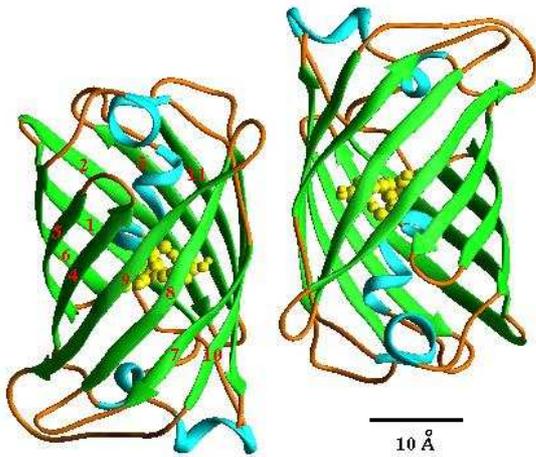
<b>Table des matières.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>7</b>
1.1 La green fluorescent protein.....	7
1.2 Production de la green fluorescent protein.....	8
1.3 Downstream processing de la GFP.....	9
1.4 Synthèse de billes de chitine.....	11
1.5 Objectifs du travail de diplôme.....	13
<b>2. Matériel et Méthodes.....</b>	<b>14</b>
2.1 Matériel.....	14
2.1.1 Matériel général du laboratoire.....	14
2.1.2 Matériel pour la fermentation de <i>E. coli</i> W3110.....	14
2.1.3 Matériel pour la fermentation de <i>E. coli</i> B ER2566.....	15
2.1.4 Matériel pour la lyse des cellules.....	15
2.1.5 Matériel pour la purification de la GFP-UV.....	15
2.1.6 Matériel pour la fabrication des billes de chitine.....	16
2.1.7 Matériel pour la purification de la GFP-intéine.....	16
2.1.8 Matériel pour la purification de la Maltose Binding Protein.....	16
2.1.9 Matériel pour le SDS-PAGE.....	17
2.2 Méthodes.....	17
2.2.1 Dosage des protéines totales et de la fluorescence.....	17
2.2.2 Dosage de la biomasse.....	18
2.2.3 Dosage du glucose et du glycérol par HPLC.....	18
2.2.4 Protocole pour la fermentation de <i>E. coli</i> W3110.....	18
2.2.5 Protocole pour la lyse de <i>E. coli</i> W3110.....	19
2.2.6 Protocole pour la fermentation de <i>E. coli</i> B ER2566 pHEVS.....	20
2.2.7 Protocole pour la lyse de <i>E. coli</i> B ER2566 pHEVS.....	21
2.2.8 Protocole pour la purification de la GFP-UV par extraction à l'éthanol [2].....	22
2.2.9 Protocole pour la purification de la GFP-UV par chromatographie d'interactions hydrophobes [15].....	22

2.2.10	Protocole pour la purification de la GFP-UV par chromatographie échangeuse d'ions [16].....	24
2.2.11	Protocole pour la fabrication des billes de chitine .....	25
2.2.12	Protocole pour la purification en mode batch de la GFP-intéine .....	26
2.2.13	Protocole pour la purification de la Maltose Binding Protein (MBP) en mode batch ainsi qu'à l'aide de colonnes de chitine .....	27
2.2.14	Protocole d'utilisation du SDS-PAGE.....	28
<b>3.</b>	<b>Résultats</b> .....	<b>30</b>
3.1	Fermentation de la souche <i>E. coli</i> W3110.....	30
3.1.1	Détermination du taux de croissance .....	30
3.1.2	Corrélation entre biomasse sèche et densité optique.....	32
3.1.3	Evolution du substrat .....	32
3.1.4	Paramètres physiques de la culture.....	33
3.2	Lyse de la fermentation de <i>E. coli</i> W3110.....	34
3.3	Purification de GFP-UV par extraction à l'éthanol .....	34
3.4	Purification de GFP-UV par chromatographie d'interactions hydrophobes.....	36
3.5	Purification de GFP-UV par chromatographie échangeuse d'ions.....	37
3.6	SDS-PAGE : purification GFP-UV .....	39
3.7	Fermentation de la souche <i>E. coli</i> B ER2566 pHEVS.....	40
3.7.1	Détermination du taux de croissance .....	40
3.7.2	Corrélation entre biomasse sèche et densité optique.....	42
3.7.3	Evolution du substrat .....	43
3.7.4	Paramètres physiques de la culture.....	43
3.8	Lyse de la fermentation de <i>E. coli</i> B ER2566 pHEVS.....	44
3.9	Fabrication des billes de chitine .....	45
3.10	Purification en mode batch de la GFP-intéine à l'aide de billes de chitine commerciales .....	48
3.11	Contrôle du couplage intéine-chitine et test d'efficacité des billes « maison » .....	54
<b>4.</b>	<b>Discussion</b> .....	<b>56</b>
4.1	Fermentation de la souche <i>E. coli</i> W3110.....	56
4.1.1	Détermination du taux de croissance .....	56
4.1.2	Corrélation entre biomasse sèche et densité optique.....	56

4.1.3	Evolution du substrat .....	56
4.1.4	Paramètres physiques de la culture .....	57
4.2	Lyse de la fermentation de <i>E. coli</i> W3110 .....	57
4.3	Purification de la GFP-UV .....	58
4.4	SDS-PAGE : purification GFP-UV .....	59
4.5	Fermentation de la souche <i>E. coli</i> B ER2566 pHEVS.....	61
4.5.1	Détermination du taux de croissance .....	61
4.5.2	Corrélation entre biomasse sèche et densité optique.....	61
4.5.3	Evolution du substrat .....	61
4.5.4	Paramètres physiques de la culture .....	62
4.6	Lyse de la fermentation de <i>E. coli</i> B ER2566 pHEVS.....	62
4.7	Fabrication des billes de chitine .....	63
4.8	Purification en mode batch de la GFP-intéine à l'aide de billes de chitine commerciales .....	64
4.9	Contrôle du couplage intéine-chitine et test d'efficacité des billes « maison » .....	66
<b>5.</b>	<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>68</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliographie.....</b>	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>Annexes .....</b>	<b>72</b>
	<b>Remerciements.....</b>	<b>84</b>

## 1. INTRODUCTION

### 1.1 LA GREEN FLUORESCENT PROTEIN



La « green fluorescent protein » (GFP) a été découverte en 1962 par Shimomura à partir de la méduse *Aequorea victoria* [1]. Cette molécule, représentée à la figure 1, est composée de 238 acides aminés pour un poids moléculaire de 27 kDa et possède un chromophore tripeptidique (Ser65-Tyr66-Gly67) qui est responsable de sa fluorescence. Par conséquent, la forme native de la protéine doit être maintenue si l'on souhaite observer une fluorescence.

Figure 1 : Structure secondaire de la GFP composée de 11 feuillets  $\beta$  (en vert) formant l'extérieur du cylindre et d'hélices  $\alpha$  (en bleu) partant du fond et du sommet pour se connecter au centre fluorescent (boules jaunes).

La GFP est une protéine autofluorescente capable d'absorber de l'énergie à 395 nm et dans une moindre mesure à 475 nm. Une excitation à 395 nm provoque une émission fluorescente verte à 510 nm visible sous illumination UV.

Cette propriété fluorescente rend la protéine très importante et utile dans de nombreux domaines. Par exemple, le gène de la GFP peut être employé comme marqueur de protéine par couplage de sa séquence à celui de la protéine d'intérêt, permettant ainsi de suivre son expression et de l'étudier. De manière plus générale, les protéines fluorescentes peuvent également être impliquées dans l'étude du développement des cellules ou des tissus, de l'expression de gènes, dans la détection de pathogènes ou encore en thérapie génique [2]. La GFP a plusieurs avantages en comparaison d'autres marqueurs fluorescents tel que la luciférase. Elle ne requiert pas de co-facteurs pour son expression et possède une taille réduite (27 kDa) ; de plus, le besoin d'une technique de fixation qui peut endommager les cellules est superflu [1]. Devant la grande diversité d'utilisation qu'offre l'emploi de ces protéines fluorescentes, on comprend mieux l'importance que peut représenter l'isolation d'une protéine comme la GFP ainsi que les efforts qui sont déployés afin de déterminer une méthode permettant une purification efficace de la protéine fluorescente.

## 1.2 PRODUCTION DE LA GREEN FLUORESCENT PROTEIN

Différents systèmes d'expression sont utilisables pour la GFP. Actuellement, le gène codant pour la GFP a déjà pu être introduit dans de nombreuses bactéries, levures, plantes, cellules mammifères et champignons [3]. Il faut savoir que la production de cette protéine fluorescente n'est pas directement liée à la croissance des microorganismes, mais se fait de manière distincte selon la souche employée [3]. Lors de ce travail de diplôme, deux souches différentes d'*Escherichia coli* ont été employées afin de produire la GFP.

Tout d'abord, la souche *E. coli* W3110 pBGL21 *phoEA* GFP-UV a permis la production d'une GFP « seule », c'est-à-dire ne comportant pas de marqueur d'affinité. Le système d'expression est sous le contrôle du régulon phosphate. Ce régulon phosphate est composé de 31 gènes arrangés en 8 opérons séparés et tous sont corégulés par le phosphate présent dans l'environnement. La production de GFP commence lorsque la concentration en phosphate devient limitante. En effet, le produit du gène *phoEA* agit comme régulateur négatif en présence d'un excès de phosphate et comme régulateur positif lorsque le phosphate devient limitant [4].

La deuxième souche employée est *E. coli* B ER2566 pHEVS. Cette dernière, obtenue par clonage, possède un plasmide contenant le gène GFP couplé à un tag intéine. La figure 2 représente la carte de restriction du plasmide pHEVS contenu dans la souche B ER2566.

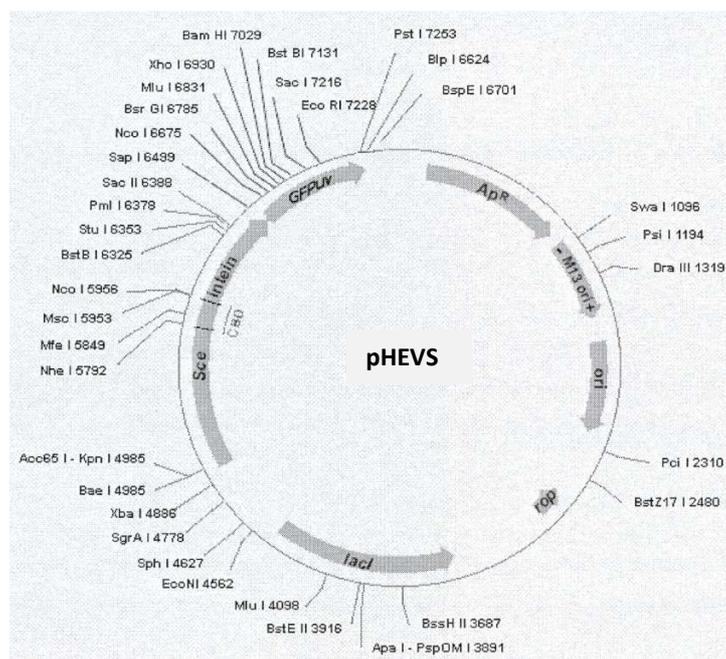


Figure 2 : carte de restriction du plasmide pHEVS pour la souche *E. coli* B ER2566

Le gène codant pour la GFP est fusionné avec le plasmide pTYB11 possédant une séquence codant pour l'intéine. Le plasmide recombinant obtenu nommé pHEVS est ensuite introduit dans un organisme hôte *E. coli* B ER2566. La souche employée possède également le système d'expression T7 qui rend quasiment nulle toute production de GFP sans ajout d'un inducteur. Dans ce cas, la production de la GFP se fait par l'ajout de l'inducteur IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-galactopyranoside). La figure 3 rappelle de manière schématique le principe de fonctionnement du système T7.

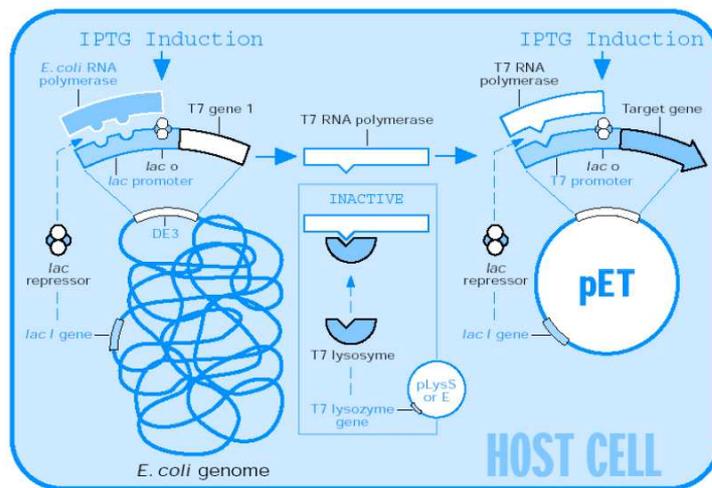


Figure 3 : éléments de contrôle du système pET

Le gène de l'ARN polymérase de T7 (gène 1) est intégré dans le chromosome d'*E. coli* et transcrit par le promoteur *lac*: son expression dépend donc de l'addition de l'inducteur IPTG. La polymérase de T7 peut alors transcrire le gène cloné dans le vecteur pET (*target gene*). Si la protéine produite par le gène cloné est toxique, il peut s'avérer nécessaire de minimiser la transcription basale du gène cloné avant induction. Le lysozyme de T7, codé par un plasmide

compatible pLysS, liera toute ARN polymérase de T7 synthétisée hors induction et l'inactivera. De plus, la présence d'opérateurs *lac* entre les promoteurs de T7 et le gène 1 de T7 ou le gène cloné va minimiser la transcription basale du gène cloné en l'absence d'inducteur IPTG.

Dans les deux cas d'utilisation de ces souches, la production de GFP se fait en deux étapes : une première phase qui consiste à cultiver la souche afin d'obtenir un nombre élevé de cellules et une grande concentration en biomasse ; puis une seconde phase durant laquelle l'expression de la GFP est stimulée, soit par limitation du phosphate, soit par ajout d'IPTG. Par conséquent, la stratégie employée pour la culture d'*E. coli* est celle d'un fed-batch.

La culture est initiée par une phase de batch où l'objectif est d'augmenter la concentration cellulaire, puis elle est suivie par une phase de « feeding » où la croissance des cellules est diminuée au profit de la production de la protéine d'intérêt.

### 1.3 DOWNSTREAM PROCESSING DE LA GFP

Après production de la GFP, le second objectif consiste à la purifier. Pour cela, plusieurs étapes successives sont nécessaires afin d'isoler la protéine d'intérêt. Tout d'abord, le moût de fermentation est centrifugé afin d'isoler les cellules du milieu de culture. Ensuite, ces dernières sont lysées à l'aide du moulin à billes permettant ainsi d'extraire tout le contenu intracellulaire des cellules et par conséquent la GFP. Finalement, l'isolation de la GFP des protéines contaminantes peut être effectuée. Comme deux GFP à la structure et aux propriétés différentes sont produites, diverses approches sont abordées afin d'isoler la protéine cible.

Concernant l'isolation de la GFP sans marqueur, de nombreuses méthodes ont été développées dont la chromatographie par exclusion de taille, l'adsorption en lit fluidisé, l'ultrafiltration, etc.

Samarkina et al. proposent une purification de la GFP en deux étapes [2] : tout d'abord une extraction des protéines avec de l'éthanol dans la phase organique suivie d'un recouvrement dans une phase aqueuse. Lors de leur expérience, les essais de purification ont porté sur plusieurs protéines fluorescentes telles que la TagCFP, la TagGFP, la TurboGFP, la TagYFP, etc. Comme la plupart des protéines fluorescentes, la GFP possède une bonne stabilité dans les solvants organiques grâce à sa structure compacte et aux groupes hydrophobes présents à sa surface. Cette technique d'extraction à l'éthanol a permis d'atteindre un facteur de purification de 2.2 à 6.5 selon le type de protéines. Concernant la GFP, la méthode a permis de purifier la protéine entre 2.2 et 2.9 fois alors que le recouvrement de la fluorescence s'élève à 70%.

Les techniques couramment employées pour la purification de protéines incluent des étapes de chromatographie. La GFP peut être isolée par chromatographie échangeuse d'ions, chromatographie d'interactions hydrophobes, chromatographie d'affinité utilisant un marqueur Histidine (His-tag), etc. Dans leur article, Zhou et al. utilisent une chromatographie par exclusion de taille suivie d'une chromatographie échangeuse d'ions [5]. Le procédé de purification se base à la fois sur la petite taille de la protéine (27 kDa) et sur ces propriétés hydrophobes. Lors de leurs divers essais, la protéine purifiée était une eGFP (enhanced green fluorescent protein). Le facteur de purification déterminé après la chromatographie d'exclusion de taille s'élève à 6.26 et augmente même à 17.90 après la chromatographie échangeuse d'anions. Bien qu'il ne s'agisse pas exactement de la même protéine, cette technique offre un bon moyen de purifier la GFP.

Dans le cas où la souche *E. coli* B ER2566 est fermentée, une GFP possédant un marqueur intéine peut être produite. L'intéine est une protéine qui possède un domaine de fixation à la chitine, ce qui permet une purification par affinité en utilisant une colonne ou des billes de chitine. La protéine cible, ici la GFP, peut être fusionnée à l'intéine soit à l'extrémité N-terminale, soit à l'extrémité C-terminale. Le plasmide vecteur utilisé pour la construction de la souche B ER2566 pHEVS est le pTYB11, ce qui conduit à une fusion du côté N-terminale de la GFP. L'intéine est également une protéine qui possède la capacité de s'auto-exciser de la protéine fusionnée lorsqu'elle est en présence de 1,4-dithiothréitol (DTT), de  $\beta$ -mercaptoéthanol ou de cystéine. L'ajout d'un de ces trois composants clive l'intéine et permet ainsi de récupérer la protéine native par élution.

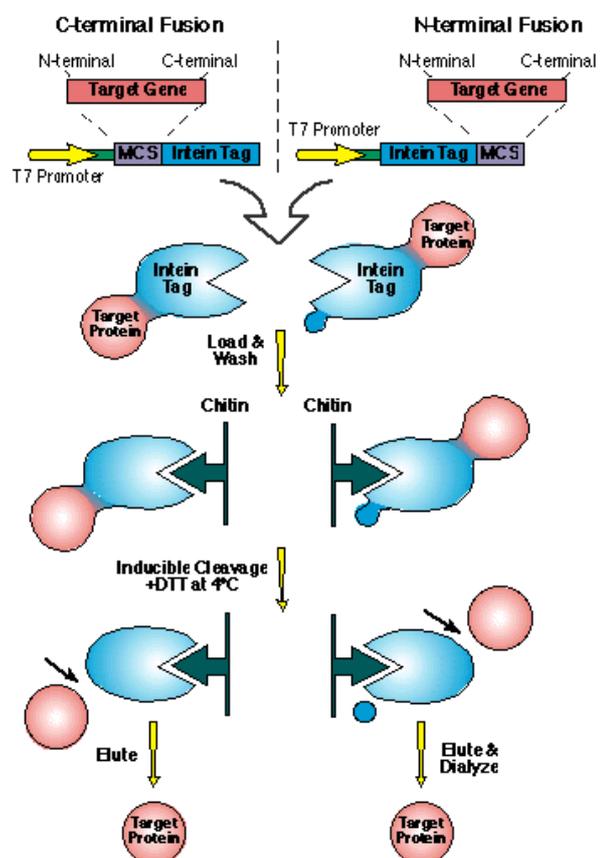


Figure 4 : Schéma de fonctionnement du système IMPACT-CN

Cette approche a été développée par New England Biolabs qui propose un système IMPACT-CN pour la purification de protéines fusionnées à un marqueur intéine. La figure 4 résume de manière simplifiée les principales étapes du procédé.

Comme décrit dans l'article de Sharma et al. [6], l'utilisation d'un marqueur d'affinité lors d'un processus de purification est une méthode qui permet d'éliminer efficacement les protéines contaminantes de la protéine d'intérêt. Une méthode de chromatographie couramment employée est la « IMAC » (immobilized metal affinity chromatography) qui exploite la capacité du marqueur histidine à se lier à des métaux de transition tels que le  $Ni^{2+}$ . Contrairement au marqueur intéine, l'histidine ne possède pas la capacité de s'auto-exciser. De plus, comme un marqueur d'affinité peut interférer avec la structure de la protéine, il est nécessaire de le cliver en ajoutant une protéase. Cela entraîne par conséquent une étape supplémentaire et les protéases ne sont souvent pas totalement spécifiques. Devant ces inconvénients, on comprend mieux l'intérêt qu'offrent des marqueurs auto-clivables tels que l'intéine. Toutefois, l'efficacité de la purification dépend de deux paramètres majeurs : d'une part l'attachement de l'intéine à la chitine et d'autre part la capacité à s'auto-cliver.

#### 1.4 SYNTHÈSE DE BILLES DE CHITINE

La chitine est un sucre aminé, plus précisément un homopolysaccharide constitué d'un enchainement linéaire d'unités N-acétyl-glucosamine reliées entre elles par une liaison du type  $\beta$ -1,4. Il s'agit du polymère naturel le plus abondant après la cellulose dont il est un analogue structural [7]. La chitine est l'un des composants principaux de l'exosquelette des arthropodes (insectes, crustacés, escargots, etc). C'est lorsqu'elle est associée à du calcaire qu'elle devient rigide et forme ainsi les coquilles ou carapaces de certains insectes ou animaux. La chitine est également présente dans les parois cellulaires de certains champignons et levures où elle a pour rôle de rigidifier la paroi et de protéger les microorganismes contre l'environnement.

Les applications de la chitine peuvent être très diverses. Le cas qui nous intéresse ici est l'affinité que possède l'intéine pour ce polymère dans des processus de purification. Toutefois, la chitine est largement utilisée dans le domaine alimentaire, notamment dans la clarification de jus fruits, en raison de sa biodégradabilité et de sa non-toxicité [8].

Les essais de production des billes de chitine se basent sur l'article « Preparation and characterization of physical gels and beads from chitin solutions » de Yilmaz et al. [9]. Lors de leurs expériences, ces derniers ont utilisé deux solvants à savoir le diméthylacétamide et le N-méthylpyrrolidinone. Pour chacun des solvants, ils ont fait varier la concentration de la chitine entre 0.3 et 1.0 % w/v. Comme les meilleurs résultats ont été obtenus avec la solution de chitine à 0.5% w/v dans le diméthylacétamide, les essais de production de billes de chitine ont été faits avec cette composition.

Toutefois, l'objectif recherché n'est pas uniquement la production de billes de chitine. Ces dernières ont également été testées afin de vérifier si elles possèdent les mêmes caractéristiques que les billes de chitine commerciales et savoir si les billes fabriquées peuvent être employées dans des processus de purification basés sur la chromatographie d'affinité.

La souche *E. coli* B ER2566 pMYB5 produit la « maltose binding protein » (MBP) qui est une protéine fusionnée au marqueur intéine. L'expression de la MBP, de même que sa purification, est basée sur le protocole « Recombinant protein expression and purification » d'I. Marison [10].

Le poids du complexe MBP-intéine est d'environ 70 kDa tandis que la MBP seule possède un poids de 42 kDa. Le vecteur pMYB5 utilise également le promoteur T7 qui assure un contrôle stringent de l'expression de la protéine de fusion MBP. Par conséquent, une production de la protéine cible n'est possible que suite à l'ajout de l'inducteur IPTG.

Comme pour la purification de la GFP-intéine, les essais sont faits en mode batch dans des tubes Falcon 15 ml. Les résultats obtenus permettent ainsi de savoir si la technique de purification en mode batch offre une purification efficace de la protéine cible. Lors du processus de purification, des échantillons sont prélevés aux différentes étapes puis mis à migrer sur un gel SDS afin d'observer le rôle de chaque étape et les résultats qu'elles amènent. Le résultat, qui est théoriquement attendu, est illustré par la figure 5 qui représente la photographie d'un gel SDS.

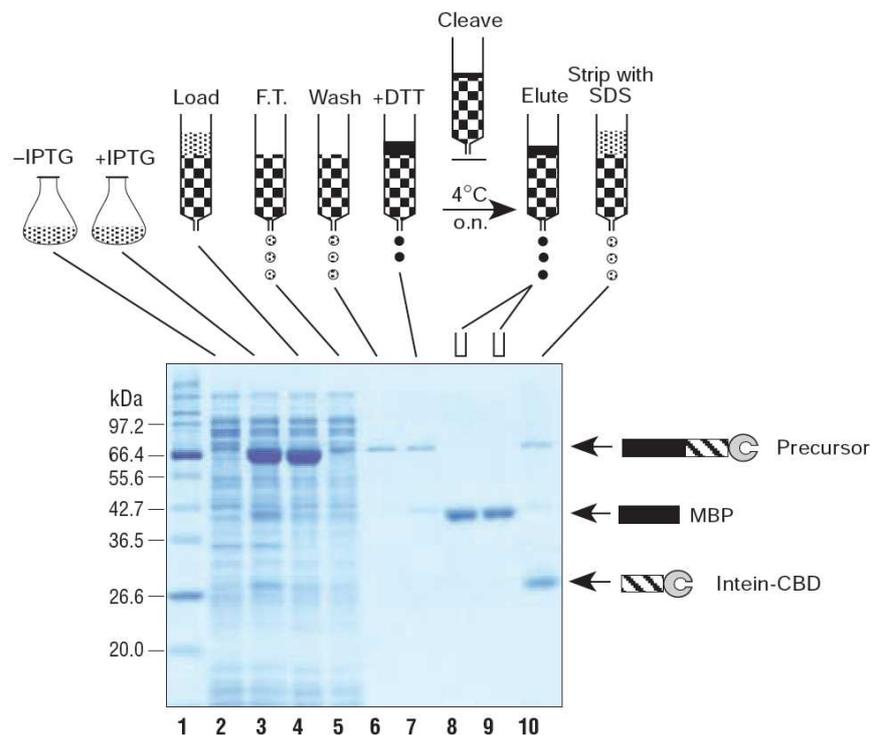


Figure 5 : Gel SDS montrant le résultat de la purification de la « maltose binding protein » à l'aide du marqueur intéine

Les résultats du gel indiquent que la technique de purification au moyen d'un marqueur d'affinité tel que l'intéine permet d'isoler efficacement une protéine d'intérêt à partir d'un lysat de cellules et cela en un minimum de manipulations.

Une deuxième technique de purification de la MBP est basée sur le même principe de fonctionnement qu'une chromatographie classique. Cette fois-ci, les essais de purification ne sont pas faits en mode batch, mais à l'aide d'une colonne remplie de billes comme l'explique New England Biolabs [11].

Les résultats obtenus par cette méthode sont alors comparés avec ceux acquis lors des essais de purification en mode batch. Comme la méthode précédente, le but est également de comparer les deux types de billes (commerciales VS fabriquées) et de déterminer s'il existe des différences significatives.

En théorie, si les deux techniques de purification fonctionnent correctement, des résultats similaires devraient être obtenus et les gels SDS devraient ressembler à celui de la figure 5.

## 1.5 OBJECTIFS DU TRAVAIL DE DIPLÔME

---

Ce travail de diplôme comporte trois objectifs principaux. Tout d'abord, des essais de fermentations des deux souches recombinantes ont été effectués afin de produire les deux types de GFP (avec et sans marqueur d'affinité). Ce premier travail a permis de disposer de quantités suffisantes de GFP pour les prochaines étapes. Le second objectif a été de développer des stratégies permettant l'isolation des deux formes de GFP. Comme ces dernières possèdent des propriétés distinctes, diverses méthodes ont été mises en place afin de les purifier. Finalement, le troisième objectif consiste à fabriquer soi-même des billes de chitine et d'évaluer leur efficacité lors d'un processus de purification par chromatographie d'affinité.

L'isolation à proprement parlé de la GFP n'est pas économiquement intéressante puisqu'il ne s'agit pas d'une enzyme possédant une activité ou d'une protéine qui peut être utilisée à but thérapeutique. Comme dit précédemment, le rôle principal de la GFP est d'être couplé à une autre protéine et de servir ainsi de marqueur fluorescent. En effet, la GFP étant aisément détectable, il est possible de suivre l'expression d'une protéine qui lui est couplée.

La GFP présente essentiellement un intérêt pédagogique car il est facile de l'identifier et de la repérer grâce à sa fluorescence. Lors de ce travail de diplôme, les différents domaines menant à l'obtention d'un produit purifié sont passés en revue. En effet, il faut tout d'abord disposer de la souche d'intérêt qui est dans notre cas *E. coli* B ER2566 pHEVS afin de produire la protéine GFP-intéine. Par conséquent, l'emploi de la biologie moléculaire est nécessaire. Ensuite, la production de la protéine d'intérêt peut avoir lieu lors de la fermentation de la souche dans un bioréacteur. Finalement, on aborde le « downstream processing » où diverses techniques d'isolation sont mises en application afin de purifier la protéine cible.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 MATÉRIEL

#### 2.1.1 Matériel général du laboratoire

- ♦ pH-mètre 744, n°inv 9065, Metrohm, Herisau (CH)
- ♦ Balance XB 4200 C, n°inv 9008, Precisa, Dietikon (CH)
- ♦ Balance XT220 A, n°inv 9022, Precisa, Dietikon (CH)
- ♦ Autoclave Fedegari, n°inv 9003, Vitaris, Barr (CH)
- ♦ Agitateur IKAMAG RCT, Janke & Kunkel, Staufen (D)
- ♦ Centrifugeuse Universal 32R, 0345136-01-00, Hettich, Tuttlingen (CH)
- ♦ Ultracentrifugeuse HiCen XL, Ser n° 08172110202, Herolab, Wiesloch (D)
- ♦ Microscope, Olympus, BH-2, 5915, n°901089, Japan
- ♦ Spectrophotomètre Libra S12 Biochrom, n°inv 4402, Cambridge (UK)
- ♦ Spectrophotomètre à fluorescence Cary Eclipse, Varian, Palo Alto, (USA) avec logiciel cary Eclipse software
- ♦ HPLC: Agilent 1100 Series, no inventaire: 9040, 9041, 9037, 9038, 9002, Agilent, Halle pilote biotechnologie F107, Sion (CH)
- ♦ NaOH 30%, n°124320.1211, lot 13199DKR, Panreac, Quimica, Barcelone (Sp)
- ♦ HCl 0.1 N, code n°404197, lot 107128N, Carlo Erba, Rodano (It)

#### 2.1.2 Matériel pour la fermentation de *E. coli* W3110

- ♦ Souche Escherichia coli W3110 pBGL21 phoEA GFP-UV
- ♦ Biofermenteur Bioengineering KLF 2000 (3.7 L) n° 1, n°inv 9023, Wald (CH)
- ♦ Software Biopilot Labview 6.1, National Instruments, Austin (USA)
- ♦ Sonde pH, type 465-50-S7/120, Mettler Toledo, Bussigny (CH)
- ♦ Sonde pO<sub>2</sub>, InPro6110/S/P, Mettler Toledo, Bussigny (CH)
- ♦ Balance acide/base : Precisa XB 6200D, Dietikon (CH)
- ♦ Pompe feed glycerol, Preciflow, Lambda, n°inv 5905a, Naters (CH)
- ♦ Glycerol anhydre, lot K39344809842, Merck, Hohenbrunn (D)
- ♦ Bacto Yeast Extract, ref 212720, lot 6082526, Becton, Le Pont en Claix (Fr)
- ♦ CaCl<sub>2</sub>, ref 21100, lot 1364454, Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
- ♦ Polypropylène glycol 2000, ref 81380, lot 1400121, Sigma-Aldrich (D)
- ♦ K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ref 60533, lot 1332528, Sigma-Aldrich (D)
- ♦ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%, code n°304061, lot 7F268078B, Carlo Erba, Rodano (It)
- ♦ MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, Lot13142, Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
- ♦ Acide citrique, Lot 1380406, Fluka, Steinheim (D)
- ♦ Solution stock éléments traces préparée le 25.01.10 par Duv, HEVS, Sion (CH)
- ♦ Solution stock Fe-EDTA préparée le 25.01.10 par Duv, HEVS, Sion (CH)
- ♦ HCl 32%, ref 132176.1611, Panreac Quimica, Barcelone (Sp)
- ♦ Ammoniaque 25%, ref 1.05422.2500, lot K36312322631, Merck, Darmstadt (D)
- ♦ Ampiciline, EC-n°2007081, Applichem, Darmstadt (D)

### 2.1.3 Matériel pour la fermentation de *E. coli* B ER2566

- ♦ Souche Escherichia coli B ER2566 pHEVS clone 15
- ♦ Biofermenteur Bioengineering KLF 2000 (3.7 L) n° 2, n°inv 9027, Wald (CH)
- ♦ Software Biopilot Labview 6.1, National Instruments, Austin (USA)
- ♦ Sonde pH, type 465-50-S7/120, Mettler Toledo, Bussigny (CH)
- ♦ Sonde pO<sub>2</sub> InPro6110/S/P, Mettler Toledo, Bussigny (CH)
- ♦ Pompe feed in : Preciflow, Lambda, n°inv 5905d, Naters (CH)
- ♦ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Lot 91320, Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
- ♦ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Lot 1360015, Fluka, Steinheim (D)
- ♦ MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, Lot 13142, Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
- ♦ Acide citrique, Lot 1380406, Fluka, Steinheim (D)
- ♦ D(+)-glucose monohydrate, Lot 0000421044, Brenntag, Bâle (CH)
- ♦ Solution stock éléments traces préparée le 25.01.10 par Duv, HEVS, Sion (CH)
- ♦ Solution stock Fe-EDTA préparée le 25.01.10 par Duv, HEVS, Sion (CH)
- ♦ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2M, Lot 7F268078B, Carlo Erba, Rodano (It)
- ♦ NH<sub>4</sub>OH 24-25% Lot 8B734098I, Carlo Erba, Rodano (It)
- ♦ Struktol SB 2289, Att. 3022741, Schill + Seilacher, Hambourg (D)
- ♦ Isopropyl-β-D-galactopyranoside, Lot 34066, BioVector dcl PE Canada C1E2A6
- ♦ Ampiciline, EC-n°2007081, Applichem, Darmstadt (D)

### 2.1.4 Matériel pour la lyse des cellules

- ♦ Moulin à billes Dyno-Mill, type KDL n°910549, WAB, Bâle (CH)
- ♦ Billes Ø 0.75-0.1 mm Mahlkoerper 4 GX, Willy A. Bachofen, Bâle (CH)
- ♦ Tampon de lyse A pH 8.0 : 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM EDTA
- ♦ Ultrafiltration Amicon, Stirred Cell Model 8050, 50 mL, Millipore, Billerica (USA)

### 2.1.5 Matériel pour la purification de la GFP-UV

- ♦ AKTA Explorer, n° 01073235, Amersham Pharmacia biotech, GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
- ♦ Collecteur de fraction, Frac 950, GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
- ♦ Hi Trap HIC Selection Kit, lot 307238, ref 17-1349-01, Amersham Biosciences, Uppsala (Sw) :
  - Hi Trap Phenyl HP, ref 17-1351-01, GE Healthcare
  - Hi Trap Phenyl FF, ref 17-1355-01, GE Healthcare
  - Hi Trap Butyl FF, ref 17-1357-01, GE Healthcare
  - Hi Trap Octyl FF, ref 17-1359-01, GE Healthcare
- ♦ Hi Trap Q FF strong anion exchanger, lot 308431, ref 17-5053-01, Amersham Biosciences, Uppsala (Sw)
- ♦ Tris-HCl, Lot 042K5434, Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
- ♦ NaCl, 71381, lot 0001419665, Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
- ♦ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 09982, lot 1375188, Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
- ♦ Ethanol 96%, 82341-326, lot 0000508589, Brenntag (CH)
- ♦ N-butanol, réserve chimie organique

### 2.1.6 Matériel pour la fabrication des billes de chitine

- ♦ N,N-diméthylacétamide, Lot BCBB7032, Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
- ♦ Lithium chloride Art 5675, n°935a389375, E. Merck, Darmstadt (D)
- ♦ Tamis moléculaire 3 Å, n°28463.292, lot 0403042, WWR international, Fontenay-sous-bois (F)
- ♦ Pomp Preciflow, Lambda, n°inv 5905d, Naters (CH)
- ♦ Agitateur IKAMAG RCT, Janke & Kunkel, Staufen (D)
- ♦ Buse à flux d'air coaxial Var J1, Nisco Engineering AG, Zuerich (CH)
- ♦ Aiguille de seringue Neolus ref NN-2138R, lot 0808042, Terumo, Leuven (Be)
- ♦ Diaphragm pump, type MZ 2C n°8162, Müller & Krempel, Bülach (CH)
- ♦ Filtre papier rond, Ø 110mm, ref 300110, Schleicher & Schuell, Dassel (D)
- ♦ Filtre 5 µm Minisart, lot 17594, Sartorius stedim
- ♦ Ethanol pur, stock, halle de biotechnologie, F107, HEVS, Sion (CH)
- ♦ Microscope Axioplan Zeiss, n°AM21, Carl Zeiss, Zuerich (CH)

### 2.1.7 Matériel pour la purification de la GFP-intéine

- ♦ Billes de chitine, Lot 3630149, ref S6651L, New Englands BioLabs, (UK)
- ♦ Billes de chitine maison, HES-SO Sion (CH)
- ♦ Rotator SB3 Stuart, série n° R00010094, Bibby Sterilin, Staffordshire (UK)
- ♦ NaCl, Lot 0001419665, Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
- ♦ Tris-HCl, Lot 042K5434, Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
- ♦ 1,4-Dithio-DL-threitol, Lot 416617/1, Fluka Chemie, Buchs (CH)
- ♦ Tampon de colonne : 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 8.5
- ♦ Tampon de clivage : 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 50mM DTT, pH 8.5

### 2.1.8 Matériel pour la purification de la Maltose Binding Protein

- ♦ Souche Escherichia coli B ER2566 pMYB5
- ♦ Isopropyl-β-D-galactopyranoside, Lot 34066, BioVector dcl PE C1E2A6, (Ca)
- ♦ Ampiciline, EC-n°2007081, Applichem, Darmstadt (D)
- ♦ Tryptone, lot 39619, Biokar Diagnostics, Pantin (Fr)
- ♦ Yeast extract, ref 210933, lot 7078866, Becton, Le pont-de-Claix (Fr)
- ♦ NaCl, ref 71379, lot SZE81270, Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
- ♦ Sodium Dodecyl Sulfate, lot S30217031, ref 8.17034.1000, Merck, Hohenbrunn (D)
- ♦ Lysozyme from chicken egg white, lot L6876-1G, ref 088K1358, Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
- ♦ Sonicateur Branson Sonifer 450, n° inv 9059, n° série 100-132-867
- ♦ Rotator SB3 Stuart, série n° R00010094, Bibby Sterilin, Staffordshire (UK)
- ♦ Poly-Prep chromatography columns, n°130042856, 0.8x4cm, Biorad, Hercules (USA)
- ♦ NaCl, Lot 0001419665, Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
- ♦ Tris-HCl, Lot 042K5434, Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
- ♦ 1,4-Dithio-DL-threitol, Lot 416617/1, Fluka Chemie, Buchs (CH)
- ♦ Tampon de colonne : 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 8.5
- ♦ Tampon de clivage : 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 50mM DTT, pH

### 2.1.9 Matériel pour le SDS-PAGE

- ♦ Méthanol, lot K40178718925, index n°603-001-00-x, Merck, Darmstadt (D)
- ♦ Acide acétique, lot 88215SAR, Panreac Quimica, Barcelone (SP)
- ♦ Bleu de Coomassie G-250, lot 434431/1, Fluka Chemika, Buchs (CH)
- ♦ Tampon dénaturant : LDS sample buffer NuPAGE, cat n° NP0007, lot 575559, Invitrogen, Carlsbad (USA)
- ♦ MES SDS Running buffer, cat n° NP0002, lot 536543, Invitrogen, Carlsbad (USA)
- ♦ Marqueur SDS, Novex Sharp Pre-stained Protein Standards, cat LC5800, lot 566813, Invitrogen, Carlsbad (USA)
- ♦ Cuve SDS, Xcell SureLock Electrophoresis Cell, série n°1205866-1424, Invitrogen, Carlsbad (USA)
- ♦ Gel SDS, NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, cat n°NPO323BOX, lot 10043074, Invitrogen, Carlsbad (USA)
- ♦ Power supply

## 2.2 MÉTHODES

---

### 2.2.1 Dosage des protéines totales et de la fluorescence

Le dosage des protéines totales est effectué par la méthode de Bradford qui se base sur un réactif à base de Coomassie Brilliant Blue G-250 qui se lie aux protéines en milieu acide [12]. Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur le changement de l'absorbance à 595 nm. La quantité de colorant est directement proportionnelle à la concentration en protéines. Les courbes de calibration pour le dosage des protéines totales sont présentées à l'annexe 1. Le test de Bradford n'est linéaire que sur une plage de concentration limitée (0 à 1g/l), ce qui oblige souvent à diluer les échantillons.

La fluorescence émise par la GFP est détectée à l'aide du spectrofluorimètre Cary Eclipse. La mesure de la fluorescence s'est faite à  $\lambda_{509 \text{ nm}}$  après une excitation à  $\lambda_{395 \text{ nm}}$ , dans une plaque 96 puits contenant 200  $\mu\text{l}$  d'échantillon. Etant donné les faibles valeurs parfois obtenues, la sensibilité de l'appareil a dû être réglée sur « high ». A noter qu'aucun standard n'a été utilisé afin de quantifier la GFP. Les unités de fluorescence sont donc arbitraires [RFU].

Selon le kit de quantification de la GFP [13], la mesure de la fluorescence est linéaire dans le domaine situé entre 0 et 40000 ng/ml. En unité relative (RFU) cela revient à dire que la fluorescence se comporte de manière linéaire entre 0 et 600 [RFU]. Les mesures de fluorescence de standards en fluorescéine, visibles à l'annexe 2, semblent confirmer le comportement linéaire de la fluorescence.

Afin d'avoir une idée de la teneur en GFP des échantillons, une fluorescence spécifique a été déterminée en effectuant le rapport entre fluorescence et quantité de protéines totales. Les unités de la fluorescence spécifique sont des  $\text{RFU}/\text{mg}_{\text{protéines}}$ .

## 2.2.2 Dosage de la biomasse

Des tubes Falcon 15 ml ont tout d'abord été pesés à vide et sans bouchon sur la balance analytique. Afin de quantifier la biomasse lors des fermentations, des échantillons de 3 ml provenant du milieu de culture ont été prélevés dans ces tubes Falcon 15 ml. Ces derniers ont été centrifugés 10 minutes à 2'230g et le surnageant a été retiré et conservé pour le dosage du substrat par HPLC. Les tubes ont été ensuite mis à sécher à l'étuve (60-70°C) durant 15 heures puis placés dans un dessiccateur durant 1-2 heures. Finalement, ils ont été repesés sur la balance analytique et le gain de poids permet de déduire la biomasse en gramme pour 3 millilitres. Cette valeur a été divisée par 0.003 afin d'obtenir des grammes par litre [g/l].

## 2.2.3 Dosage du glucose et du glycérol par HPLC

Lors du dosage du glucose et du glycérol, les échantillons provenant du milieu de culture ont tout d'abord dû être centrifugés 10 minutes à 2'230g afin d'obtenir un surnageant clarifié. Ce dernier a dû encore être filtré à 0.2 µm et dilué afin d'obtenir des valeurs qui se trouvent dans le domaine couvert par la droite de calibration. Les courbes de calibration pour le dosage du glucose et du glycérol sont fournies aux annexes 3 et 4 respectivement.

La même méthode a été utilisée afin de quantifier le glucose et le glycérol :

- ♦ Volume d'injection : 10 µl
- ♦ Colonne BioRad Aminex HPX-87H
- ♦ Eluent : 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à pH < 2
- ♦ Gradient isocratique
- ♦ Flux : 0.3 ml/min
- ♦ Durée de l'analyse : 30 minutes
- ♦ Température de la colonne et du détecteur : 35°C
- ♦ Signal de détection : indice de réfraction

## 2.2.4 Protocole pour la fermentation de *E. coli* W3110

Le protocole suivi pour la fermentation d'*E. coli* est basé sur le document « Production of GFP-UV using phosphonate plasmid with *E. coli* strain W3110 » [14].

La souche *E. coli* W3110 pBGL21 phoEA GFP-UV conservée dans un cryotube a tout d'abord été inoculée sur une plaque LB + ampiciline à 37°C pendant 21 heures. Le milieu de préculture a ensuite été inoculé avec les colonies obtenues sur la plaque.

Après 8h d'incubation de la préculture à 35°C et 150 rpm, les 100 ml de préculture ont été injectés dans le réacteur et la fermentation batch démarre. Des modifications des conditions de culture ont

été apportées car le protocole propose un batch de 8 heures à 37°C. Comme la culture a été lancée le soir et s'est déroulée toute la nuit, la température du réacteur a été baissée à 30°C et la durée de fermentation prolongée à 17 heures. Ensuite un feed contenant 70% de glycérol est a été injecté dans le réacteur durant 26 heures. Le feed employé pour la culture est un feed constant de 4 g/l\*h. Le volume de culture étant de 2 litres, un feed de 8 g/h est injecté en continu dans le réacteur. La durée totale de la fermentation a donc été de 43 heures. Des échantillons ont été prélevés à intervalles réguliers afin d'analyser la biomasse sèche, la densité optique ainsi que la concentration en glycérol. Les paramètres physiques de la culture (pH, pO<sub>2</sub>, agitation, etc.) ont également été relevés dans le but d'analyser le comportement de la fermentation.

## 2.2.5 Protocole pour la lyse de *E. coli* W3110

- ♦ Le milieu de culture utilisé pour la lyse des cellules provient d'une fermentation effectuée par A. Acetturo le 5 mai 2010.
- ♦ En raison de l'absence de la centrifugeuse, les 1.7 litres obtenus de la fermentation sont laissés au repos afin que la biomasse sédimente. Le surnageant est ensuite enlevé délicatement.
- ♦ La biomasse est rincée dans de l'eau MilliQ puis centrifugée 15 minutes à 12'000g à 4°C.
- ♦ Le surnageant est enlevé et un total de 150 ml de tampon A (tampon de lyse) est ajouté.
- ♦ Le volume de la suspension est de 340 ml. Par conséquent, les cellules sont lysées en deux fois aux conditions suivantes :

Paramètres	Conditions
Vitesse [tours/min]	3200
Durée [min]	15
Ø billes [mm]	0.75 - 1
Volume de billes [ml]	250
Volume de suspension [ml]	160 - 170

- ♦ Le lysat (200 ml) est filtré à l'aide d'une passoire et les billes sont rincées avec 150-200g de tampon A.
- ♦ Le lysat est centrifugé à 12'000g pendant 20 minutes à 4°C et le surnageant est récupéré.
- ♦ 6g de sulfate d'ammonium et 1.3g de triéthylamine (7.18M) sont ajoutés aux 90 ml de surnageant.
- ♦ Le tout est mélangé puis mis à 4°C pendant 1 heure.
- ♦ Le lysat est ensuite incubé à 70°C pendant 10 minutes (jusqu'à ce que le milieu devienne légèrement trouble/nuageux).
- ♦ Finalement, le lysat est centrifugé à 12'000g pendant 20 minutes à 4°C.
- ♦ Le surnageant (85ml) est récupéré pour analyses et pour les étapes de purification suivantes.

## 2.2.6 Protocole pour la fermentation de *E. coli* B ER2566 pHEVS

Le protocole suivi pour la fermentation d'*E. coli* est basé sur l'article de Sharma S. et al. [6]. Cependant, quelques modifications concernant la composition des milieux ont été apportées. Le tableau 1 résume leur composition.

Tableau 1 : composition de la préculture, du milieu de fermentation et du milieu de feed

Réactifs	Préculture	Culture	Feed
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 g/l	8 g/l	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 g/l	4 g/l	-
Acide citrique	1.7 g/l	1.7 g/l	-
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.4 g/l	0.4 g/l	18 g/l
Glucose	20 g/l	20 g/l	450 g/l
Sol. Stock éléments traces*	3.7 ml/l	3.7 ml/l	5.55 ml/l
Sol. Stock Fe-EDTA*	5.5 ml/l	5.5 ml/l	8.25 ml/l
Ampiciline	100 mg/l	100 mg/l	-
Volume	75 ml	1.5 l	500 ml

La composition des solutions traces et de Fe-EDTA est décrite dans le protocole « Production of GFP-UV using phosphonate plasmid with *E. coli* strain W3110 » [14].

La souche *E. coli* B ER2566 pHEVS conservée dans un cryotube a tout d'abord été inoculée sur une plaque LB à température ambiante pendant 48 heures. Le milieu de préculture a ensuite été inoculé avec les colonies obtenues sur la plaque.

Après 8h20 d'incubation de la préculture à 37°C et 150 rpm, les 75 ml de préculture ont été injectés dans le réacteur et la fermentation batch démarre. La phase de batch est menée sur une période de 19 heures après laquelle le feed est ajouté et signale alors le début de la phase fed-batch.

Le feed employé pour la culture est un feed en escalier calculé à partir du bilan de masse du substrat et en utilisant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire dont la formule est présentée ci-dessous :

$$m_s(t) = \left( \frac{\mu_{set}}{Y_{x/s}} + m \right) \cdot V_{t_F} \cdot X_{t_F} \cdot e^{\mu_{set}(t-t_F)} \quad (1)$$

- Où
- $m_s$  = flux massique du substrat [g/h]
  - $\mu$  = taux de croissance spécifique désirée [h<sup>-1</sup>]
  - $Y_{x/s}$  = rendement biomasse/substrat = 0.5 [g/g]
  - $m$  = coefficient de maintenance = 0.025 [g g/h]
  - $X$  = concentration de la biomasse = 10 [g/l]
  - $V$  = volume de culture = 1.5 [l]

A partir de cette équation (1), les valeurs de débits pour le feed en escalier peuvent être déterminées.

Après environ 2h20 heures de feed en escalier, celui-ci a dû être stoppé car la pO<sub>2</sub> diminuait trop fortement et ne pouvait plus être maintenue à 30%. Après deux heures d'interruption, le feed a pu être repris. Après 6 heures de fed-batch et suite à l'ajout d'IPTG induisant la production de GFP, un feed constant de 26.65 g/h a été injecté dans le réacteur pendant 18 heures. 10 ml d'inducteur IPTG sont ajoutés afin d'atteindre une valeur de 0.5 mM dans le réacteur.

Le tableau 2 résume les débits du feed en escalier lors du fed-batch ainsi que les valeurs de la pompe pour atteindre ces débits.

**Tableau 2 : valeur de la pompe preciflow en fonction du débit**

<b>IPTG</b>	<b>Temps fed-batch [h]</b>	<b>Débit [g/h]</b>	<b>valeur pompe [-]</b>
Avant induction	0	10.83	116
	1h00	12.59	135
	2h00	14.62	157
	2h20	0	0
	4h00	10.83	116
	4h40	14.62	157
	4h50	19.74	211
	5h00	22.93	245
Après induction	6h à 24h	26.65	285

Les valeurs de la pompe ont été déterminées à partir d'une droite de calibration. Cette dernière est présentée en annexe 5.

## 2.2.7 Protocole pour la lyse de *E. coli* B ER2566 pHEVS

- ♦ Le milieu de culture utilisé pour la lyse des cellules provient de la fermentation d'Anabelle Tenisch du 20 mai 2010.
- ♦ Les 1.8 litres obtenus lors de la fermentation sont centrifugés 15 minutes à 6'000g et 4°C. Le surnageant est ensuite enlevé.
- ♦ La biomasse est rincée dans de l'eau MilliQ puis centrifugée 15 minutes à 6'000g à 4°C.
- ♦ Le surnageant est enlevé et un total de 150 ml de tampon A (tampon de lyse) est ajouté.
- ♦ Le volume de la suspension est de 400 ml. Par conséquent, les cellules sont lysées en deux fois aux conditions suivantes :

<b>Paramètres</b>	<b>Conditions</b>
Vitesse [tours/min]	3200
Durée [min]	15
Ø billes [mm]	0.75 - 1
Volume de billes [ml]	230
Volume de suspension [ml]	200

- ♦ Le lysat (180 ml) est filtré à l'aide d'une passoire et les billes sont rincées avec 150-200g de tampon A.

- ♦ Le lysat est centrifugé à 12'000g pendant 20 minutes à 4°C puis le surnageant est récupéré.
- ♦ Comme ce dernier est encore trouble et comporte des débris cellulaires, il est à nouveau centrifugé à 15'000g pendant 25 minutes à 4°C.
- ♦ Le surnageant (80 ml) est récupéré pour analyses ainsi que pour les étapes de purification à l'aide des billes de chitine.

### 2.2.8 Protocole pour la purification de la GFP-UV par extraction à l'éthanol [2]

- ♦ Mélanger 1.5 ml de NaCl 5M avec 11.7 ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à saturation (pH 7.8)
- ♦ Ajouter ce mélange à 5 ml de lysat clarifié (concentration finale de 0.41 M NaCl et 2.63 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )
- ♦ Ajouter rapidement 6 ml d'éthanol 96%
- ♦ Agiter vigoureusement pendant 30 secondes
- ♦ Centrifuger 7 minutes à 3000g
- ♦ Laisser décanter et séparer les deux phases puis récupérer la phase du haut dans laquelle se trouve la GFP. Prendre un échantillon de la phase du bas et du haut pour analyse (noter les volumes des phases)
- ♦ Ajouter 1 volume de n-butanol pour 4 volumes de la phase supérieure
- ♦ Agiter vigoureusement pendant 30 secondes
- ♦ Centrifuger 7 minutes à 3000g
- ♦ Laisser décanter et séparer les deux phases puis récupérer la phase du bas contenant la GFP. Prendre un échantillon de la phase du haut et du bas pour analyse (noter les volumes des phases)

### 2.2.9 Protocole pour la purification de la GFP-UV par chromatographie d'interactions hydrophobes [15]

Lors de la purification de la GFP par chromatographie d'interactions hydrophobe, quatre colonnes différentes ont été testées à savoir la Phenyl High Performance, la Butyl Fast Flow, l'Octyl Fast Flow et la Phenyl Fast Flow (high sub). Le volume de chaque colonne est de 1 ml et un débit de 1 ml/min est appliqué pour toutes.

Pour chacune de ces colonnes, deux méthodes ont été employées afin d'isoler la protéine cible. Ces dernières sont décrites dans les tableaux 3 et 4 de la page suivante.

## Méthode 1

Tableau 3 : méthode 1 pour la purification de la GFP-UV par HIC avec un gradient d'élution en escaliers

<b>Etape</b>	<b>Tampon</b>	<b>Volume colonne</b>
Mise à l'équilibre	tampon 1	5 CV
Injection	tampon 1	0.75 CV (loop 470µl)
Lavage	tampon 1	5 CV
Elution	tampon 1 -> tampon 2	11 CV
	de 0% à 35%	
	de 35% à 70%	
	de 70% à 100%	
Elution finale	tampon 2	3 CV
Régénération	eau	3 CV
Remise à l'équilibre	tampon 1	5 CV

## Méthode 2

Tableau 4 : méthode 2 pour la purification de la GFP-UV par HIC avec un gradient d'élution en escaliers

<b>Etape</b>	<b>Tampon</b>	<b>Volume colonne</b>
Mise à l'équilibre	tampon 1	5 CV
Injection	tampon 1	0.75 CV (loop 470 µl)
Lavage	tampon 1	5 CV
Elution	tampon 1 -> tampon 2	15 CV
	de 0% à 55%	
	de 55% à 75%	
	de 75% à 90%	
de 90 à 100%		
Elution finale	tampon 2	3 CV
Régénération	eau	3 CV
Remise à l'équilibre	tampon 1	5 CV

Tampon 1 : 20 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA pH 8 + 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Tampon 2 : 20 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA pH 8 et 30% d'isopropanol

## 2.2.10 Protocole pour la purification de la GFP-UV par chromatographie échangeuse d'ions [16]

La colonne utilisée lors de la purification de la GFP par chromatographie échangeuse d'ions est la HiTrap Q FF strong anion exchanger. Le volume de la colonne est de 1 ml et le débit appliqué est de 1 ml/min. Afin d'isoler la protéine d'intérêt, trois méthodes différentes ont été testées. Ces dernières sont décrites dans les tableaux 5 à 7 suivants.

### Méthode 1

Tableau 5 : méthode 1 pour la purification de la GFP-UV par IEX avec un gradient d'élution linéaire

Etape	Tampon	Volume colonne
Mise à l'équilibre	tampon 1	3 CV
Injection	tampon 1	0.6 CV (loop 470 µl)
Lavage	tampon 1	4 CV
Elution	tampon 1 -> tampon 2 de 0% à 100% Gradient linéaire	8 CV
Régénération	tampon 2	5 CV
Remise à l'équilibre	tampon 1	5 CV

### Méthode 2

Tableau 6 : méthode 2 pour la purification de la GFP-UV par IEX avec un gradient d'élution en escaliers

Etape	Tampon	Volume colonne
Mise à l'équilibre	tampon 1	3 CV
Injection	tampon 1	0.6 CV (loop 470 µl)
Lavage	tampon 1	4 CV
Elution	tampon 1 -> tampon 2	10 CV
	de 0% à 40%	4 CV
	de 40% à 60%	2 CV
	de 60% à 80%	2 CV
	de 80 à 100%	2 CV
Régénération	tampon 2	5 CV
Remise à l'équilibre	tampon 1	5 CV

Tampon 1 : 20 mM Tris-HCl, pH 8

Tampon 2 : 20 mM Tris-HCl + 1M NaCl, pH 8

### Méthode 3

Tableau 7 : méthode 3 pour la purification de la GFP-UV par IEX avec un gradient d'élution en escaliers

Etape	Tampon	Volume colonne
Mise à l'équilibre	tampon 1	3 CV
Injection	tampon 1	0.6 CV (loop 470 µl)
Lavage	tampon 1	4 CV
Elution	tampon 1 -> tampon 2	8 CV
	de 0% à 60%	4 CV
	de 60% à 80%	2 CV
	de 80 à 100%	2 CV
Régénération	tampon 2	5 CV
Remise à l'équilibre	tampon 1	5 CV

Tampon 1 : 20 mM Tris-HCl, pH 8

Tampon 2 : 20 mM Tris-HCl + 1M NaCl, pH 8

#### 2.2.11 Protocole pour la fabrication des billes de chitine

Le protocole suivi pour la production des billes de chitine est basé sur l'article de Yilmaz et al [9].

##### Purification de la chitine

La poudre de chitine étant peu soluble et contenant des impuretés, elle doit être préalablement traitée avec :

- ♦ Solution 1M NaOH à 80°C pendant 3 heures
- ♦ Neutralisée en lavant avec de l'eau déminéralisée
- ♦ Plongée dans une solution 1M HCl pendant 12 heures
- ♦ Neutralisée à nouveau en lavant avec de l'eau déminéralisée
- ♦ Répéter l'opération encore une fois

##### Préparation du système solvant/sel

- ♦ Sécher 500 ml de N,N-diméthylacétamide (DMAc) à température ambiante pendant 48 heures sur tamis moléculaire 3 Å
- ♦ Sécher le chlorure de lithium (LiCl) à 70°C pendant 3 heures
- ♦ Peser 5% w/w de LiCl dans DMAc
- ♦ Dissolution complète après agitation toute la nuit

##### Préparation de la solution de chitine

- ♦ Peser 0.5% w/v de chitine dans solvant DMAc/LiCl
- ♦ Agiter la solution pendant 48 heures à température ambiante. Chauffer pour aider à dissoudre

### Préparation des billes de chitine

- ♦ Pomper à faible débit la solution de chitine à travers l'aiguille d'une buse Var J1 Nisco (diamètre interne de l'aiguille 0.5 mm)
- ♦ Laisser goutter dans de l'éthanol pur (non solvant)
- ♦ Afin d'éviter que la buse ne se bouche trop fréquemment à cause des débris présents dans la solution de chitine, cette dernière a été filtrée (5 µm).
- ♦ Laisser les billes formées dans le non-solvant pendant 24 heures
- ♦ Filtrer les billes pour les récupérer puis les stocker dans un mélange eau/éthanol

Les détails de la fabrication des billes de chitine sont mentionnés à la section 3.9

### 2.2.12 Protocole pour la purification en mode batch de la GFP-intéine

Le protocole suivi pour la purification de la GFP est basé sur le kit IMPACT de la société New England Biolabs [11].

Deux fermentations de la souche *E. coli* B ER2566 pHEVS ont été effectuées afin de produire la GFP possédant le marqueur intéine. Le lysat obtenu à partir de ces fermentations sert de matériel de départ pour la purification de la GFP. Pour chacun de ces deux lysats, la procédure suivante a été observée :

- ♦ 4 essais de purification en mode batch sont effectués avec des quantités variables de billes de chitine. Le tableau 8 suivant résume la composition des différents essais.

Tableau 8 : composition des essais en mode batch

Essai	Quantité chitine [ml]	Lysat	Volume de lysat [ml]
1	0.5	centrifugé	5
2	1.0	centrifugé	5
3	1.5	centrifugé	5
4	2.0	centrifugé	5

- ♦ Pour chaque essai, la quantité adéquate de chitine est ajoutée dans un tube Falcon.
- ♦ 10 ml de tampon de colonne sont ajoutés puis les Falcon sont centrifugés 15 minutes à 15'000g et 4°C.
- ♦ Le surnageant est enlevé et à nouveau 10 ml de tampon de colonne sont ajoutés.
- ♦ Les Falcon sont centrifugés 15 minutes à 15'000g et 4°C puis le surnageant est éliminé.
- ♦ Après ajout de 5 ml de lysat, les Falcon sont mis à agiter sur une roue rotative durant 4 heures afin de mettre en contact la chitine et le lysat.
- ♦ Les Falcon sont ensuite centrifugés 15 minutes à 15'000g et 4°C. Après la prise d'un échantillon du surnageant (n° 1.1 à 4.1), celui-ci est éliminé.
- ♦ Le culot de chitine est rincé avec 10 ml de tampon de colonne, puis les Falcon sont de nouveau centrifugés à 15'000g pendant 15 minutes.

- ♦ Après la prise d'un échantillon du surnageant (n° 1.2 à 4.2), celui-ci est éliminé et 10 ml de tampon de colonne sont à nouveau ajoutés afin de rincer les billes de chitine.
- ♦ Après centrifugation des Falcon à 15'000g pendant 15 minutes, le surnageant est éliminé puis un volume de tampon de clivage correspondant à trois fois le volume de chitine est ajouté dans chaque Falcon : c'est-à-dire un volume de 1.5 ml, 3 ml, 4.5 ml, 6 ml pour les essais allant respectivement de 1 à 4.
- ♦ Les Falcon sont agités durant la nuit (17-20 heures) à température ambiante puis centrifugés 15 minutes à 15'000g.
- ♦ Un échantillon du surnageant (n° 1.3 à 4.3) contenant la GFP est prélevé pour chaque essai puis analysé.

### 2.2.13 Protocole pour la purification de la Maltose Binding Protein (MBP) en mode batch ainsi qu'à l'aide de colonnes de chitine

L'expression de la MBP est basée sur le protocole « Recombinant protein expression and purification » [10].

En revanche, le protocole suivi pour la purification de la MBP est de nouveau basé sur le kit IMPACT de la société New England Biolabs [11].

La souche *E. coli* B ER2566 pMYB5 conservée dans un cryotube est tout d'abord inoculée sur une plaque LB + Amp (100mg/l) à 37°C durant un jour. Ensuite, 50 ml de milieu de culture LB sont inoculés avec les colonies obtenues sur la plaque. La culture est laissée sous agitation (170 rpm) et à 37°C durant 5 à 8 heures. La production de MBP se fait suite à l'ajout de l'inducteur IPTG. 250 µl d'IPTG à 100 mM sont ajoutés dans la shake-flask afin d'obtenir une concentration finale de 0.5 mM. 4-12 heures après induction, la fermentation est arrêtée et le milieu est centrifugé 15 minutes à 10'000g et 4°C dans des tubes Falcon de 50 ml. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 2,5 - 3 ml de tampon de colonne (20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 8.5). 5 à 6 mg de lysozyme sont ajoutés et les tubes sont laissés 1 heure à 37°C et sous agitation. Un passage au sonicateur (Microchip 5, 50% duty cycle, 4x2') permet de lyser les cellules encore plus efficacement. Finalement, les tubes Falcon sont centrifugés 15-20 minutes à 10'000g et le surnageant correspondant au lysat clarifié est récupéré pour l'étape de purification de la « maltose binding protein ».

Comme pour la purification de la GFP-intéine, des essais de purification en mode batch de la MBP ont été réalisés. Pour chaque essai, trois configurations décrites dans le tableau 9 ont été testées.

Tableau 9 : composition des essais en mode batch

Essai	Quantité chitine [ml]	Provenance de la chitine	Lysat	Volume de lysat [ml]
1	1	Commerciale (NEB)	Non induit	2-3
2	1	Commerciale (NEB)	induit	2-3
3	1	Fabrication maison	induit	2-3

Les étapes suivies pour chaque essai sont identiques à celles décrites dans le point 2.2.12. Pour cette raison, elles n'ont pas été réécrites ici. Des échantillons ont également été pris aux mêmes étapes que lors de la purification de la GFP-intéine, c'est-à-dire : lors du contact lysat-chitine pour les échantillons 1.1 à 3.1, après lavage de la chitine pour les échantillons 1.2 à 3.2 et après l'étape de clivage pour les échantillons 1.3 à 3.3.

La seconde approche employée pour la purification de la MBP est l'utilisation de colonne de chromatographie Biorad remplie de billes de chitine. Deux essais ont été effectués en utilisant soit les billes de chitine commerciales (NEB) soit les billes de fabrication maison. Pour chaque essai, la méthode employée est la même, à savoir :

- ♦ La colonne est remplie de manière à avoir un volume de billes de 1 ml.
- ♦ Les billes sont ensuite lavées avec au moins 10 CV de tampon de colonne.
- ♦ Le lysat clarifié (~3 ml) obtenu à partir de la fermentation induite à l'IPTG est injecté dans la colonne (échantillon Flow through pour SDS-PAGE).
- ♦ La colonne de chitine est ensuite lavée avec au moins 20 CV de tampon de colonne (échantillon chitine lavée pour SDS-PAGE).
- ♦ 3 CV du tampon de clivage sont injectés dans la colonne (échantillon Flow through ajout DTT) puis cette dernière est laissée à température ambiante toute la nuit, soit 16 heures environ.
- ♦ L'élution de la MBP se fait suite à l'ajout du tampon de colonne à travers la chitine (échantillon élution).
- ♦ La dernière étape, le « stripping » de la chitine, permet d'éliminer tout ce qui a pu rester fixé sur les billes de chitine. Pour cela, 1 ml de SDS 1% est ajouté dans la colonne. Après agitation et 10 minutes d'attente, le liquide est récupéré (échantillon chitine + SDS 1%).

Remarque : les échantillons indiqués entre parenthèses correspondent à ceux analysés lors du SDS-PAGE (voir 3.11)

## 2.2.14 Protocole d'utilisation du SDS-PAGE

### **Préparation du tampon de fixation :**

- ♦ 500 ml MeOH
- ♦ 70 ml acide acétique
- ♦ Compléter à 1 litre

### **Préparation de la solution de coloration :**

- ♦ 10% acide acétique
- ♦ 0.025% CBB-G250

### **Préparation de la solution de décoloration :**

- ♦ 10% acide acétique

**Préparation des échantillons :**

- ♦ Diluer les échantillons de façon à avoir une concentration finale de protéines de 0.1 g/l
- ♦ Pipeter 26  $\mu$ l des échantillons et ajouter 9  $\mu$ l du tampon dénaturant puis laisser 10 minutes au bain-marie à 70°C
- ♦ Charger les puits à raison de 15  $\mu$ l par échantillon et 5  $\mu$ l pour le marqueur
- ♦ Faire migrer les bandes pendant environ 30 minutes à 200 volts
- ♦ Rincer le gel avec de l'eau MilliQ
- ♦ Ajouter le tampon de fixation : durée 30 minutes
- ♦ Enlever le tampon de fixation et rincer avec de l'eau MilliQ
- ♦ Ajouter la solution de coloration (durée de coloration : 1-2 heures)
- ♦ Enlever la solution de décoloration et rincer avec de l'eau MilliQ
- ♦ Ajouter la solution de décoloration et laisser décolorer suffisamment (jusqu'à obtenir un contraste satisfaisant)

### 3. RÉSULTATS

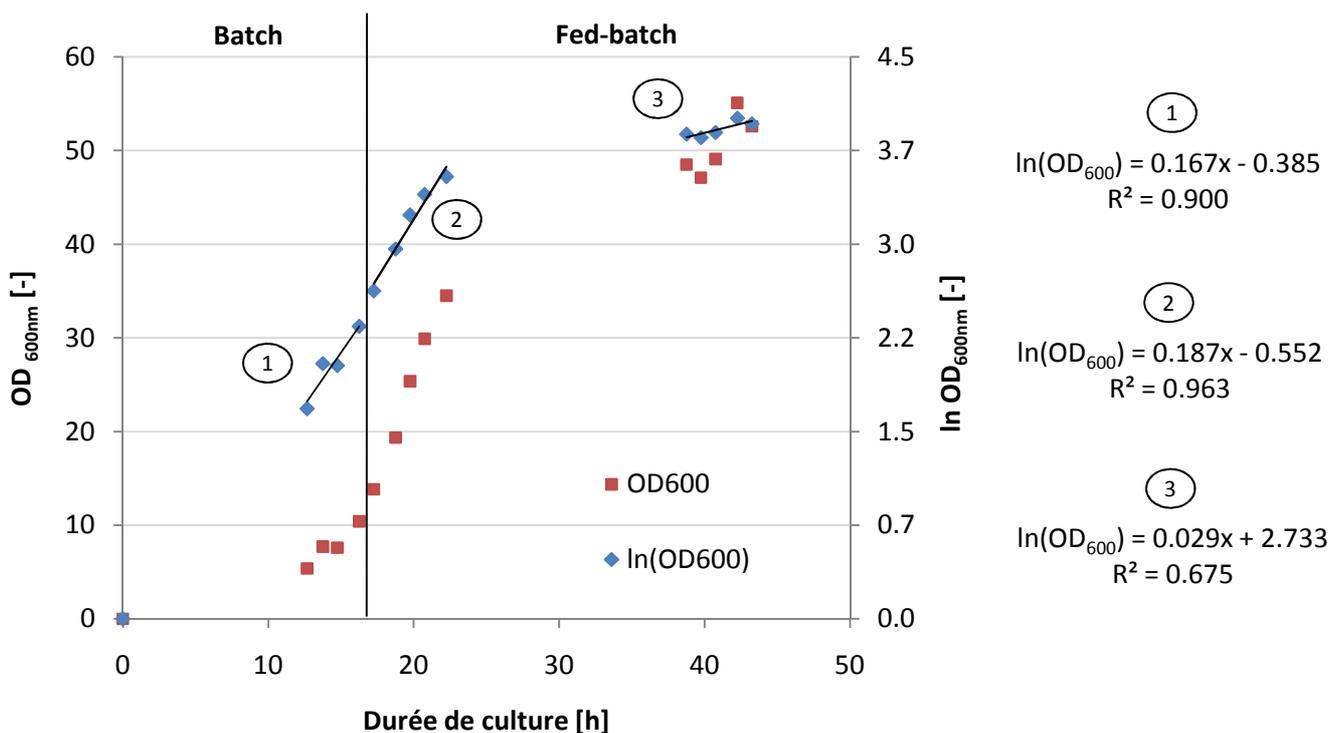
#### 3.1 FERMENTATION DE LA SOUCHE *E. COLI* W3110

La culture de la souche *E. coli* W3110 pBGL21 phoEA GFP-UV a été conduite en mode fed-batch durant 43 heures. La fermentation a été lancée le soir, par conséquent peu d'échantillons ont pu être prélevés durant la phase de batch. La durée du batch était de 17 heures, ce qui correspond au double du temps mentionné dans le protocole « Production of GFP-UV using phosphonate plasmid with *E. coli* strain W3110 » [14]. L'alimentation par le feed au glycérol, correspondant à la phase du fed-batch, a duré au total 26 heures.

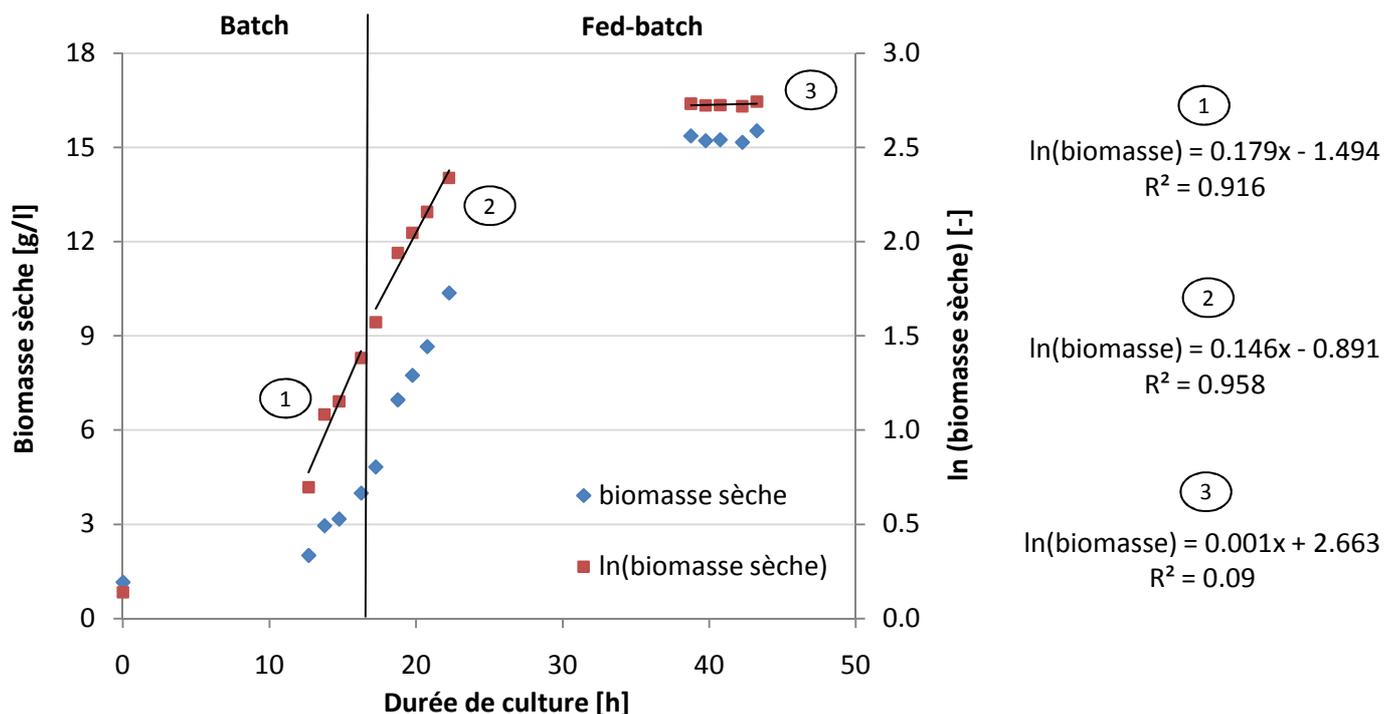
Les résultats bruts de la fermentation sont présentés à l'annexe 6.

##### 3.1.1 Détermination du taux de croissance

Lors d'une fermentation, il est intéressant de déterminer certains paramètres de culture. En général, le paramètre qui permet de rendre compte du comportement des microorganismes durant une culture est le taux de croissance spécifique, noté  $\mu$  [ $\text{h}^{-1}$ ]. Ce dernier peut être déterminé à l'aide de formules mathématiques basées sur l'équation de Monod ou de manière graphique par régressions. Les graphes 1 et 2 montrent l'évolution de l'absorbance ainsi que de la biomasse en fonction du temps de culture. Sur ces graphiques, les phases de batch et de fed-batch ont été distinguées. Grâce aux valeurs mesurées, il est possible de déterminer le taux de croissance spécifique ( $\mu$ ) de la culture à l'aide de régressions logarithmiques.



Graphique 1 : évolution de l'absorbance en fonction du temps de fermentation d'*E. coli* W3110



Graphique 2 : évolution de la biomasse en fonction du temps de fermentation d'E. coli W3110

Ces régressions logarithmiques permettent de déterminer le taux de croissance des cellules à divers moments de la culture, à savoir à la fin du batch, au début du fed-batch et à la fin du fed-batch. Les différentes valeurs de  $\mu$  sont regroupées dans le tableau 10.

Tableau 10 : valeurs des taux de croissance déterminées à partir des régressions logarithmiques de l'absorbance et de la biomasse

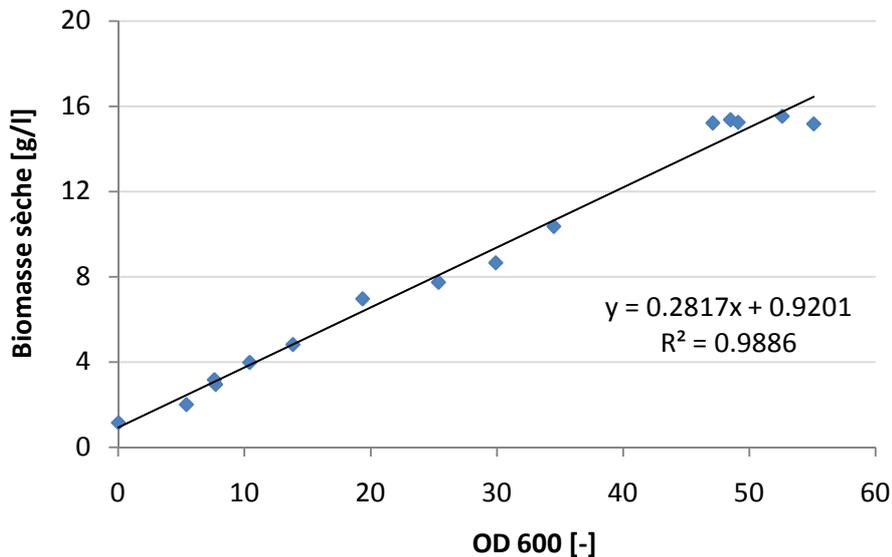
Paramètre	$\mu$ [ $\text{h}^{-1}$ ]		
	fin du batch	début du fed-batch	fin du fed-batch
$\ln(\text{OD}_{600})$	0.167	0.187	0.029
$\ln(\text{biomasse})$	0.179	0.146	0.001
moyenne	0.173	0.167	0.015

En effectuant la moyenne des taux de croissance, on constate qu'un taux de croissance maximal de  $0.173 \text{ h}^{-1}$  est atteint pour la période de la fin du batch. A partir de cette valeur, il est possible de déterminer le temps de doublement minimal de la souche selon l'équation suivante :

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} = 4.01 \text{ heures}$$

### 3.1.2 Corrélation entre biomasse sèche et densité optique

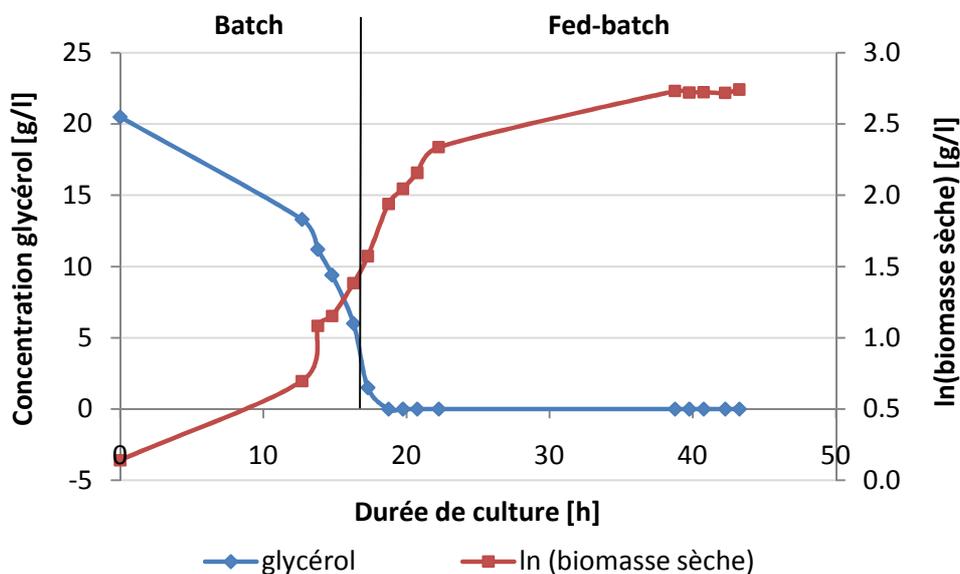
Le graphique 3 compare l'évolution durant toute la culture de la biomasse sèche avec la densité optique. On y voit globalement une bonne corrélation puisque le coefficient ( $R^2$ ) est de 0.989. Cependant, on constate que, sur la fin de la culture, la biomasse tend à rester stable alors que la densité optique continue d'augmenter légèrement.



Graphique 3 : corrélation entre biomasse sèche et densité optique durant la culture

### 3.1.3 Evolution du substrat

Le graphique 4 suivant montre l'évolution de la biomasse ainsi que du substrat (glycérol) en fonction du temps de fermentation. Le glycérol a été déterminé par HPLC à l'aide d'une courbe de calibration fournie en annexe 4.



Graphique 4 : évolution de la biomasse et du substrat en fonction du temps

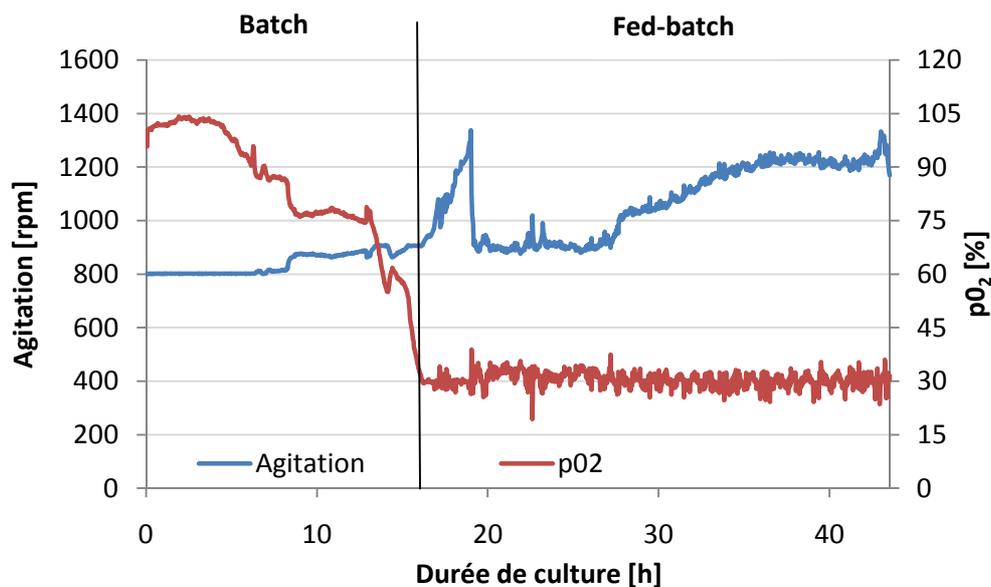
A partir des valeurs calculées, le rendement  $Y_{x/s}$ , correspondant à la quantité de biomasse formée par la quantité de substrat consommé, peut être déterminé pour la période du batch :

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta s} = \frac{4.67}{14.5} = 0.32 \text{ g biomasse/g glucose}$$

### 3.1.4 Paramètres physiques de la culture

Au cours de la fermentation, le logiciel Biopilot Labview 6.1 a permis l'acquisition simultanée de l'agitation, de la  $pO_2$ , de la température, du pH ainsi que de l'aération. Durant toute la fermentation, la température et l'aération ont été maintenues constantes à 30°C et 1vvm (120 l/h) respectivement. La consigne du pH a été fixée à 7.00 et l'ajout automatique d'ammoniaque 25% ou de HCl 1M a permis de maintenir cette valeur globalement constante. Néanmoins, lors de la culture, le pH avait tendance à se basifier alors que normalement le métabolisme des cellules acidifie le milieu. Une des causes peut être la présence de contaminations dans le réacteur qui en modifient le pH mais également le déroulement de la fermentation. Une observation au microscope a montré la présence de bâtonnets (*E. coli*) mais aussi de nombreuses petites taches noires beaucoup plus petites que les bâtonnets. Ces dernières peuvent être soit des débris cellulaires soit des contaminants. De plus, à la fin de la culture, on a observé dans le milieu de fermentation récolté la présence de la biomasse qui a sédimenté au fond de la bouteille et au-dessus une bande plus foncée qui est vraisemblablement constituée par les contaminants, débris cellulaires, etc.

Concernant les paramètres physiques de la culture, le graphique 5 représente l'évolution de l'agitation ainsi que de la pression partielle d'oxygène en fonction du temps de fermentation.

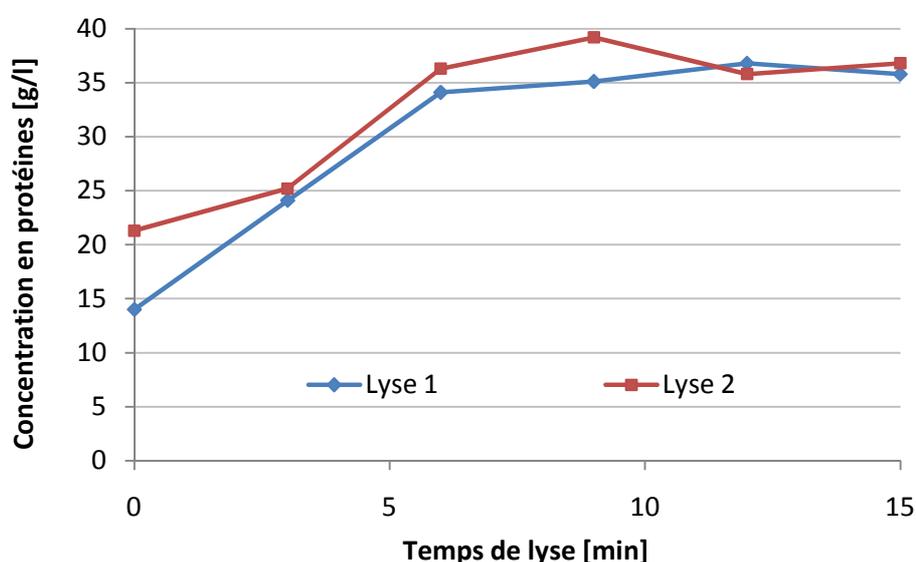


Graphique 5 : évolution de l'agitation et de la  $pO_2$  durant la fermentation

### 3.2 LYSE DE LA FERMENTATION DE *E. COLI* W3110

La culture de la souche *E. coli* W3110 n'a pas donné les résultats attendus et le milieu de fermentation obtenu présente des éléments inhabituels. Pour ces raisons et afin d'éviter de mauvaises surprises lors des étapes ultérieures du downstream processing, un autre milieu de fermentation a été utilisé. En effet, la biomasse employée pour la lyse provient d'une fermentation d'A. Acetturo effectuée le 5 mai 2010.

Comme dit précédemment dans le point 2.2.5 (protocole pour la lyse des cellules), il a fallu lyser les cellules en deux fois car le volume de la suspension était de 340 ml. Au cours de la lyse, des échantillons ont été prélevés toutes les 3 minutes afin d'observer l'évolution de la concentration en protéines dans le milieu. Ces résultats sont présentés par le graphique 6.



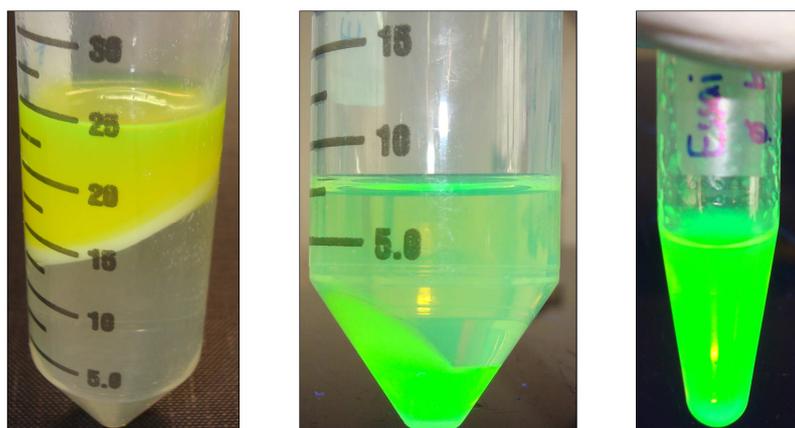
Graphique 6 : évolution de la concentration en protéines dans le milieu en fonction du temps de lyse  
vitesse rotation 3200 [tours/min] ;  $\varnothing$  billes 0.75-1 [mm] ; vol. billes 250 [ml]

### 3.3 PURIFICATION DE GFP-UV PAR EXTRACTION À L'ÉTHANOL

Après la lyse des cellules obtenues par la fermentation de la souche *E. coli* W3110, 5 ml de lysat clarifié ont été ajoutés à un mélange de 1.5 ml de NaCl 5M et 11.7 ml d'une solution saturée en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . Ensuite, 6 ml d'éthanol ont été ajoutés avant d'agiter et de centrifuger le mélange.

Deux phases clairement distinctes ont été obtenues, comme le montre la photographie 1a à la page suivante. On constate que la GFP est entièrement présente dans la phase supérieure. Les 7.5 ml de cette phase ont été récupérés afin d'effectuer la seconde étape de purification. Suite à l'ajout de n-butanol, on constate clairement à nouveau une séparation de phases, comme l'illustre la photographie 5b. Cette fois-ci, c'est la phase du bas qui contient majoritairement la GFP. On remarque néanmoins que la phase supérieure contient de la GFP et que cette couleur verte est également causée par la fluorescence de la phase inférieure, tant celle-ci est importante.

Finalement, la photographie 5c correspond à la phase inférieure qui a pu être isolée et récupérée dans un tube eppendorf.



a) étape 1

b) étape 2

c) résultat

Photographie 1 : répartition de la GFP lors de sa purification par extraction à l'éthanol

La technique d'extraction à l'éthanol a été effectuée à double et à chaque essai, des échantillons des différentes phases ont été prélevés puis analysés afin de doser les protéines totales ainsi que la fluorescence. Les résultats sont présentés dans le tableau 11 ci-dessous.

Tableau 11 : composition des diverses phases lors de l'extraction à l'éthanol

	Echantillon	Phase	Quantité protéines [mg]	Fluorescence [RFU] sensibilité high	Fluorescence spécifique [RFU/mg]
	Lysat initial	-	142.6	5172	36.3
Essai 1	1.1	haut	42.2	525	12.4
	1.1	bas	1.1	98	88.9
	1.2	haut	3.7	49	13.3
	1.2	bas	2.1	1496	712.5
Essai 2	2.1	haut	24	366	15.2
	2.1	bas	1.1	43	38.9
	2.2	haut	4.9	43	8.9
	2.2	bas	6.9	3868	560.6

A partir de ces valeurs, il est possible de déterminer un facteur de purification en effectuant le rapport  $\frac{\text{fluorescence spécifique de la phase considérée}}{\text{fluorescence spécifique du lysat initial}}$ . Le tableau 12 qui suit indique les facteurs de purification calculés pour la phase du haut obtenue lors de la première étape ainsi que de la phase du bas obtenue lors de la seconde étape, et cela pour les deux essais.

Tableau 12 : facteurs de purification déterminés lors de l'extraction à l'éthanol

	Essai 1	Essai 2
1 <sup>ère</sup> étape (phase haut)	0	0
2 <sup>ème</sup> étape (phase bas)	20	15

### 3.4 PURIFICATION DE GFP-UV PAR CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTIONS HYDROPHOBES

La GFP-UV présente dans le surnageant du lysat bactérien est globalement plus hydrophobe que la plupart des autres protéines hydrosolubles exprimées par *E. coli*. Malgré les changements d'environnement, elle garde sa fluorescence durant toutes les étapes du protocole, ce qui permet de la détecter et de la quantifier.

Des résultats différents ont été obtenus pour chacun des dix essais de chromatographie d'interactions hydrophobes. En variant la méthode ainsi que le type de colonne, il est possible d'isoler plus ou moins efficacement la GFP d'intérêt. Les meilleurs résultats ont été obtenus lors de la neuvième chromatographie en utilisant la colonne Hi Trap Phenyl FF et la méthode n°1.

La figure 6 suivante représente le chromatogramme obtenu lors de cet essai. Tous les autres chromatogrammes obtenus lors des différents essais sont présentés en annexe 7.

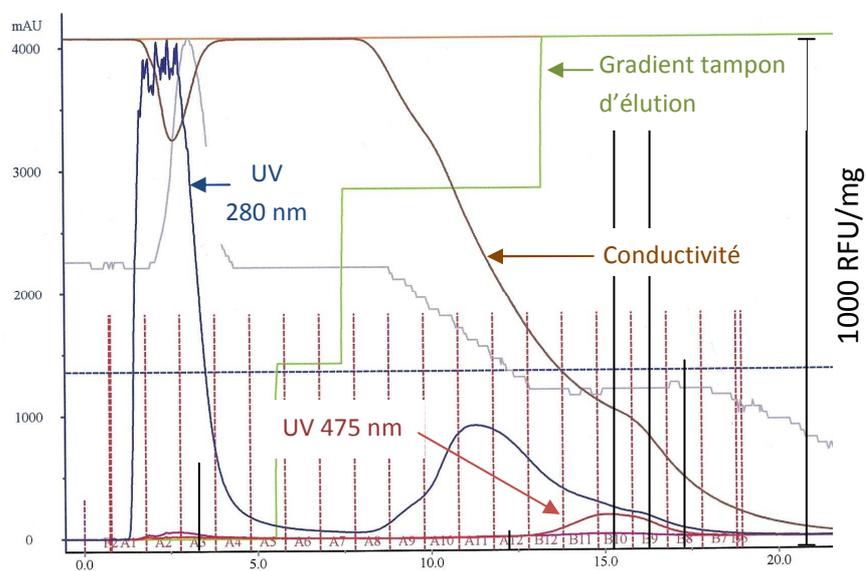


Figure 6 : chromatographie n°9, colonne HiTrap Phenyl FF avec méthode 1

Des échantillons provenant des fractions A3, A12, B10, B9 et B8 ont été prélevés et analysés pour le dosage des protéines totales et de la fluorescence. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 13 de la page suivante. A la figure 6, les traits noirs verticaux au milieu des fractions analysées correspondent à la fluorescence spécifique [RFU/mg<sub>protéines</sub>].

Tableau 13 : composition des fractions pour la chromatographie HIC n°9

Fractions	Quantité protéines [mg]	Fluorescence [RFU] sensibilité high	Fluorescence spécifique [RFU/mg]
A 3	0.82	140.6	172
A 12	0.95	31.8	34
B 10	0.85	769.2	904
B 9	0.71	629.1	886
B 8	0.52	191.7	369

En connaissant la quantité de protéines injectées dans la colonne, de même que la fluorescence de l'échantillon, il est également possible de déterminer une fluorescence spécifique. Pour l'échantillon injecté, cette dernière est de 380.53 [RFU/mg<sub>protéines</sub>].

En effectuant le rapport  $\frac{\text{fluorescence spécifique de la fraction considérée}}{\text{fluorescence spécifique de l'échantillon injecté}}$ , il est possible de déterminer un facteur de purification. Celui-ci a été calculé pour chacune des fractions et les valeurs obtenues sont représentées dans le tableau 14.

Tableau 14 : facteurs de purification obtenus lors de la chromatographie HIC n°9

Fractions	Facteur purification
A 3	0.5
A 11	0.1
B 10	2.4
B 9	2.3
B 8	1.0

### 3.5 PURIFICATION DE GFP-UV PAR CHROMATOGRAPHIE ÉCHANGEUSE D'IONS

La GFP-UV possède un point isoélectrique (pI) de 5.7 environ. Par conséquent, dans un milieu basique, la protéine se chargera négativement et sa purification pourra se faire au moyen d'une colonne échangeuse d'anions. Contrairement à la chromatographie hydrophobe, une seule colonne, à savoir la HiTrap Q FF strong anion exchanger a été employée. En revanche trois méthodes différentes ont été utilisées. Dans la première, un gradient d'élution linéaire en NaCl est injecté dans la colonne, tandis que pour les deux autres, l'augmentation du gradient d'élution se fait par l'intermédiaire de « steps ».

Les meilleurs résultats ont été réalisés lors de la première chromatographie. La figure 7 de la page suivante représente le chromatogramme obtenu lors de cet essai. Tous les autres chromatogrammes acquis lors des différents essais sont présentés en annexe 8.

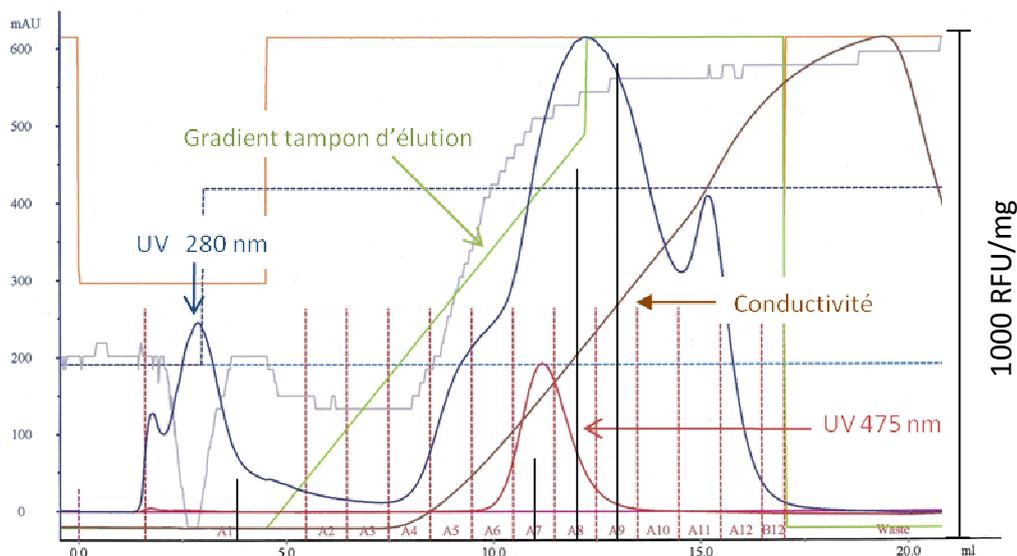


Figure 7 : chromatographie IEX avec méthode 1

Des échantillons provenant des fractions A1, A7, A8 et A9 ont été prélevés et analysés pour le dosage des protéines totales et de la fluorescence. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 15. A la figure 7, les traits noirs verticaux au milieu des fractions analysées correspondent à la fluorescence spécifique [RFU/mg<sub>protéines</sub>].

Tableau 15 : composition des fractions pour la chromatographie IEX n°1

Fractions	Quantité protéines [mg]	Fluorescence [RFU] sensibilité high	Fluorescence spécifique [RFU/mg]
A 1	0.10	11.59	120
A 7	0.65	103.25	159
A 8	0.79	576.39	732
A 9	1.04	978.88	940

A nouveau, en connaissant la quantité de protéine injectée dans la colonne, de même que la fluorescence de l'échantillon, il est possible de déterminer une fluorescence spécifique. Pour l'échantillon injecté, cette dernière est de 402.3 [RFU/mg<sub>protéines</sub>].

En effectuant le rapport  $\frac{\text{fluorescence spécifique de la fraction considérée}}{\text{fluorescence spécifique de l'échantillon injecté}}$ , il est possible de déterminer un facteur de purification. Celui-ci a été calculé pour chacune des fractions et les valeurs obtenues sont représentées dans le tableau 16.

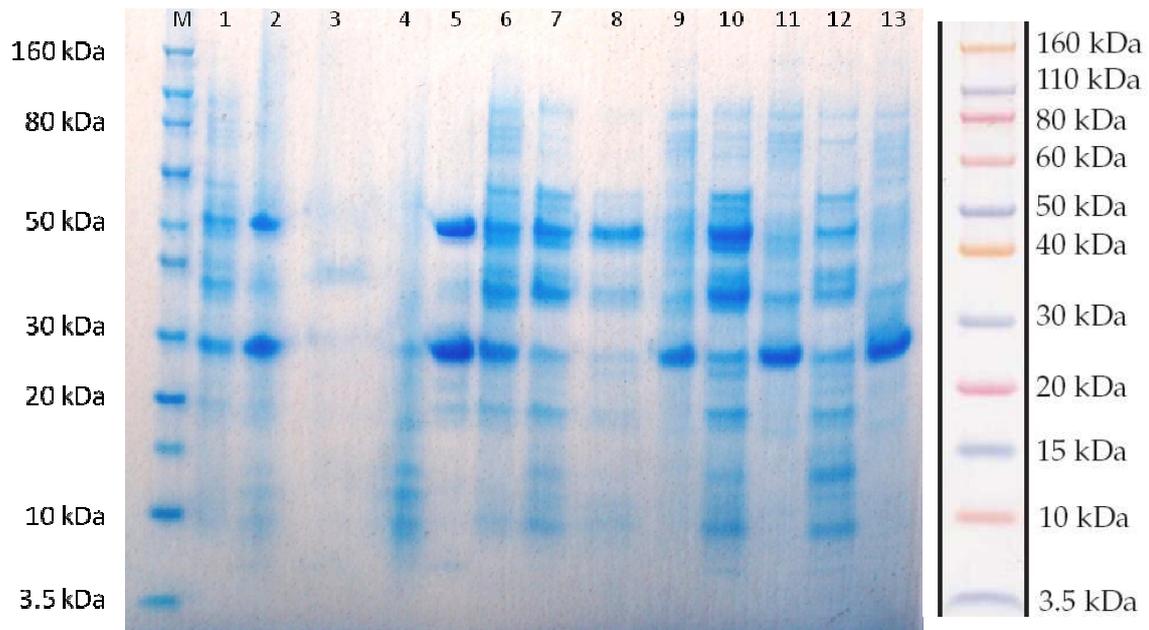
Tableau 16 : facteurs de purification obtenus lors de la chromatographie IEX n°1

Fractions	Facteur purification
A 1	0.3
A 7	0.4
A 8	1.8
A 9	2.3

### 3.6 SDS-PAGE : PURIFICATION GFP-UV

Un premier gel SDS-PAGE a été réalisé afin de vérifier le contenu en protéines des divers échantillons obtenus lors de la purification de la GFP-UV. Les différents puits contiennent ici des échantillons du lysat d'*E. coli* W3110 et de sa purification par extraction à l'éthanol ainsi que par chromatographie d'interactions hydrophobes.

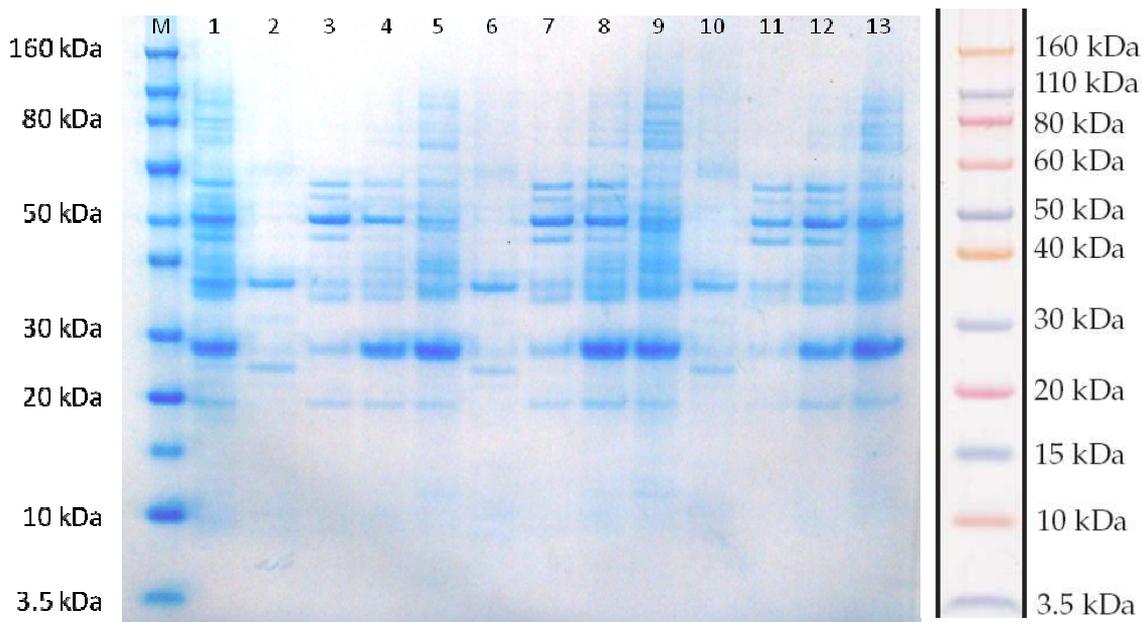
La photographie 2 montre le gel chargé d'un marqueur et de 13 échantillons. La GFP étant une protéine de 27 kDa, l'apparition d'une bande aux alentours de 30 kDa est attendue.



Photographie 2 : [M] marqueur ; [1] lysat W3110 ; [2] EtOH 2.1 Φ haut ; [3] EtOH 2.1 Φ bas ; [4] EtOH 2.2 Φ haut ; [5] EtOH 2.2 Φ bas ; [6] lysat W3110 filtré 0.2 μm ; [7] Chromatographie 1, frac A3 ; [8] Chromatographie 1, frac A7 ; [9] Chromatographie 1, frac A12 ; [10] chromatographie 4, frac A4 ; [11] Chromatographie 4, frac A11 ; [12] Chromatographie 9, frac A3 ; [13] Chromatographie 9, frac B9

Le deuxième gel SDS-PAGE contient à nouveau dans ses puits le lysat d'*E. coli* W3110 mais aussi des échantillons des fractions obtenus lors de la purification de la GFP-UV par chromatographie échangeuse d'anions.

Les résultats du SDS sont présentés sur la photographie 3 de la page suivante. Comme dit précédemment, la GFP est une protéine de 27 kDa, par conséquent, l'apparition d'une bande aux alentours de 30 kDa est attendue.



Photographie 3 : [M] marqueur ; [1] lysat W3110 filtré 0.2 $\mu$ m ; [2] Chromatographie 1, frac A1 ; [3] Chromatographie 1, frac A7 ; [4] Chromatographie 1, frac A8 ; [5] Chromatographie 1, frac A9 ; [6] Chromatographie 2, frac A1 ; [7] Chromatographie 2, frac A9 ; [8] Chromatographie 2, frac A10 ; [9] Chromatographie 2, frac A11 ; [10] Chromatographie 3, frac A1 ; [11] Chromatographie 3, frac A8 ; [12] Chromatographie 3, frac A9 ; [13] Chromatographie 3, frac A10

### 3.7 FERMENTATION DE LA SOUCHE *E. COLI* B ER2566 pHEVS

La culture de la souche *E. coli* B ER2566 pHEVS a été conduite en mode fed-batch durant 43 heures. La durée du batch (phase I) était de 19 heures et de 24 heures pour le fed-batch. Pendant la phase de fed-batch, la période précédant l'induction (phase II) était de 6.5 heures, tandis que la période après induction (phase III) s'élève à 17.5 heures.

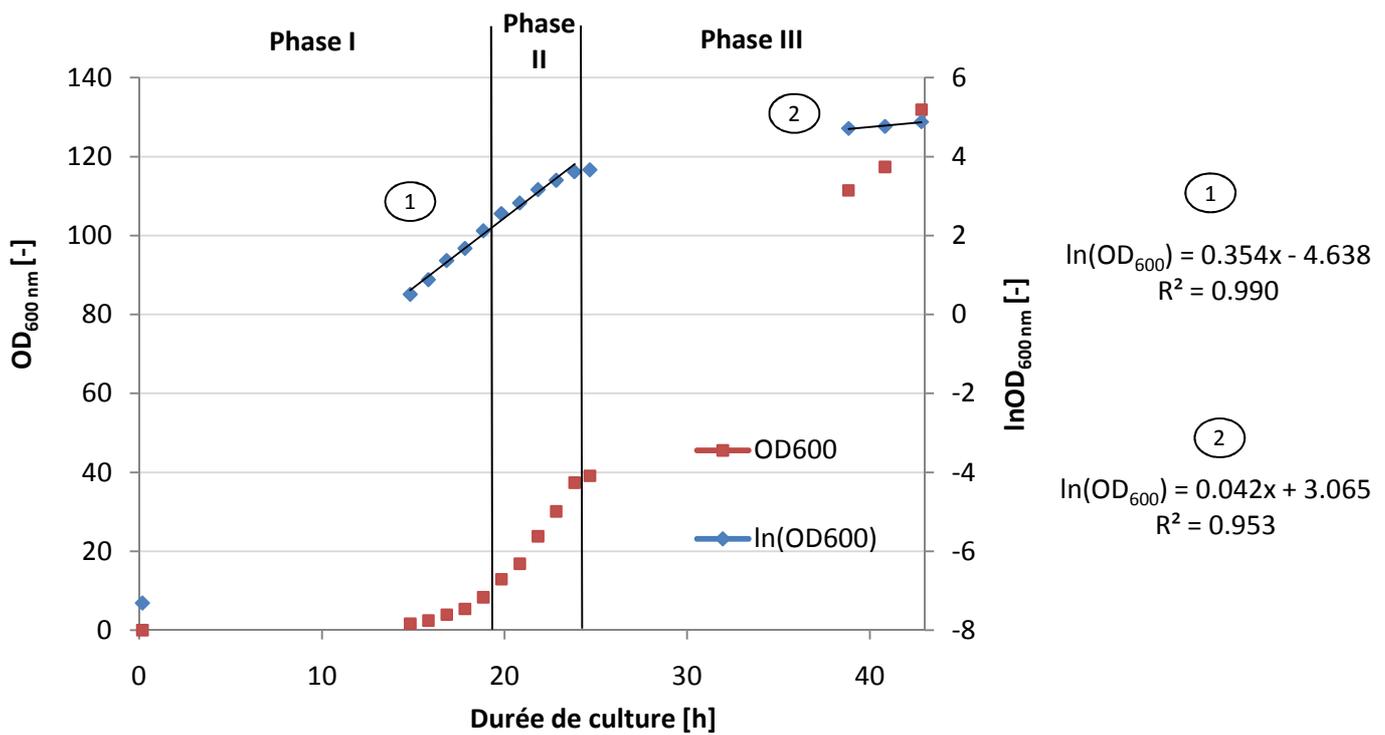
Les résultats bruts de la fermentation sont présentés à l'annexe 9.

Comme pour la fermentation de la souche *E. coli* W3110, les mêmes paramètres ont été étudiés, à savoir : le taux de croissance, la corrélation biomasse/densité optique, l'évolution du substrat ainsi que les paramètres de culture.

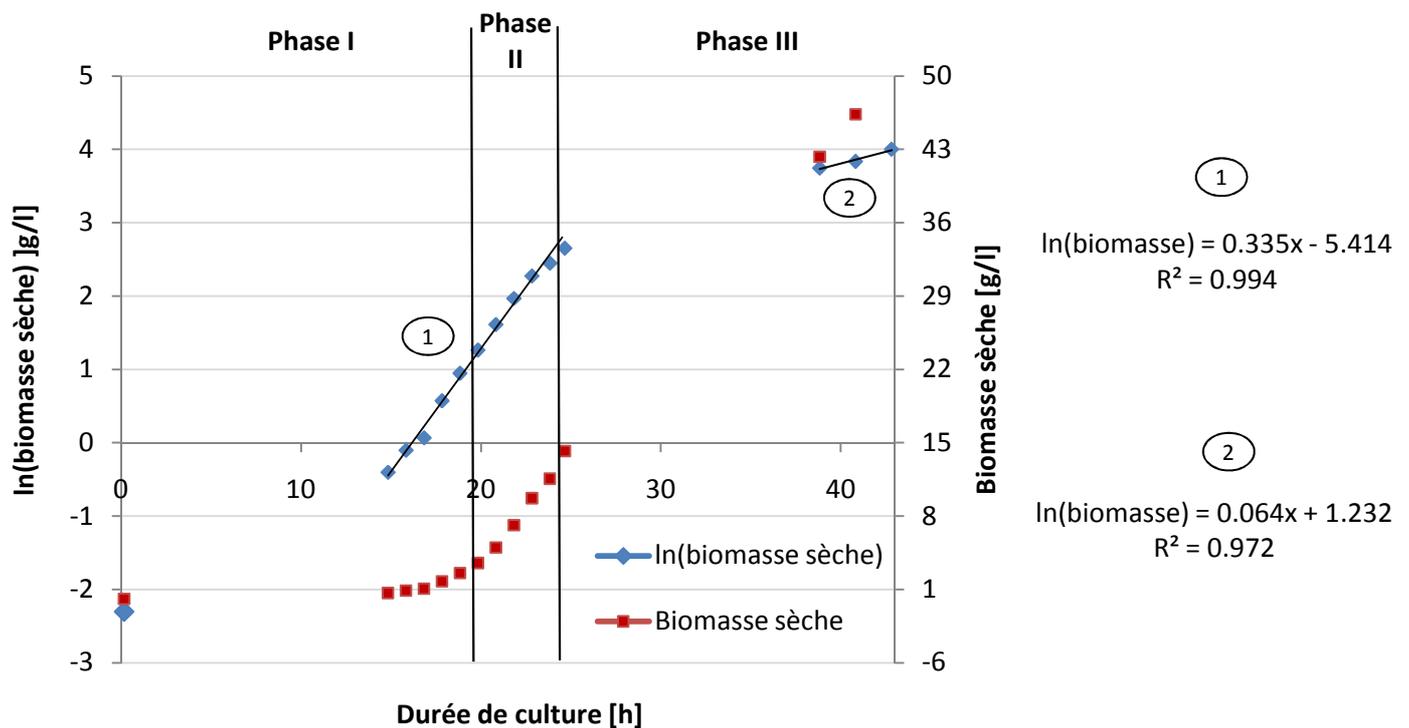
#### 3.7.1 Détermination du taux de croissance

Comme dit précédemment, le taux de croissance spécifique [ $h^{-1}$ ] permet d'évaluer le comportement du microorganisme durant toute la culture. Ce dernier a été déterminé de manière graphique à partir de régressions logarithmiques.

Les graphiques 7 et 8 suivants montrent l'évolution de l'absorbance ainsi que de la biomasse en fonction du temps de culture. Sur ces graphiques, les trois phases de la fermentation ont été distinguées.



Graphique 7 : évolution de l'absorbance en fonction du temps de fermentation



Graphique 8 : évolution de la biomasse en fonction du temps de fermentation

Ces régressions logarithmiques permettent de déterminer le taux de croissance des cellules à divers moments de la culture, à savoir durant la phase I et II, mais également durant la phase III. Les différentes valeurs de  $\mu$  sont regroupées dans le tableau 17.

Tableau 17 : valeurs des taux de croissance déterminées à partir des régressions logarithmiques de l'absorbance et de la biomasse

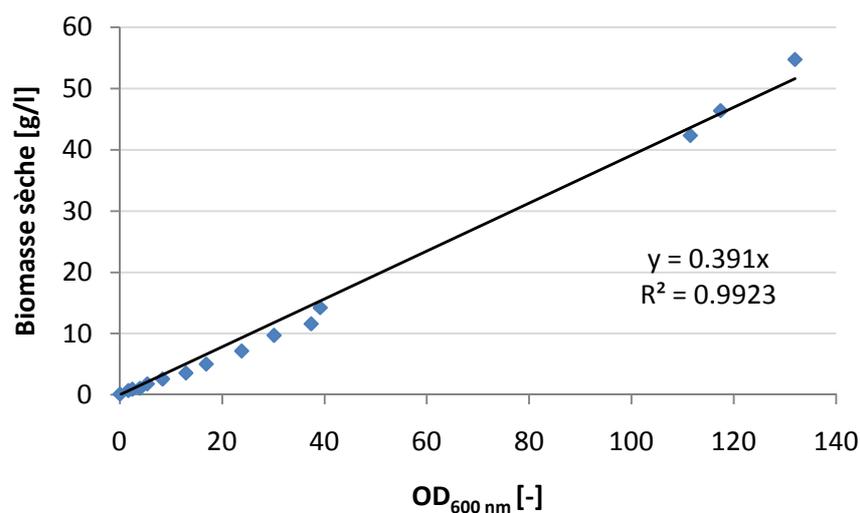
Paramètre	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	
	fin du batch et fed-batch avant induction	fed-batch après induction
ln(OD <sub>600</sub> )	0.354	0.042
ln(biomasse)	0.335	0.064
moyenne	0.345	0.053

En effectuant la moyenne des taux de croissance, on constate qu'un taux de croissance maximal de 0.345 h<sup>-1</sup> est atteint pour la période de la fin du batch et du fed-batch avant induction. A partir de cette valeur, il est possible de déterminer le temps de doublement minimal de la souche selon l'équation suivante :

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} = 2.01 \text{ heures}$$

### 3.7.2 Corrélation entre biomasse sèche et densité optique

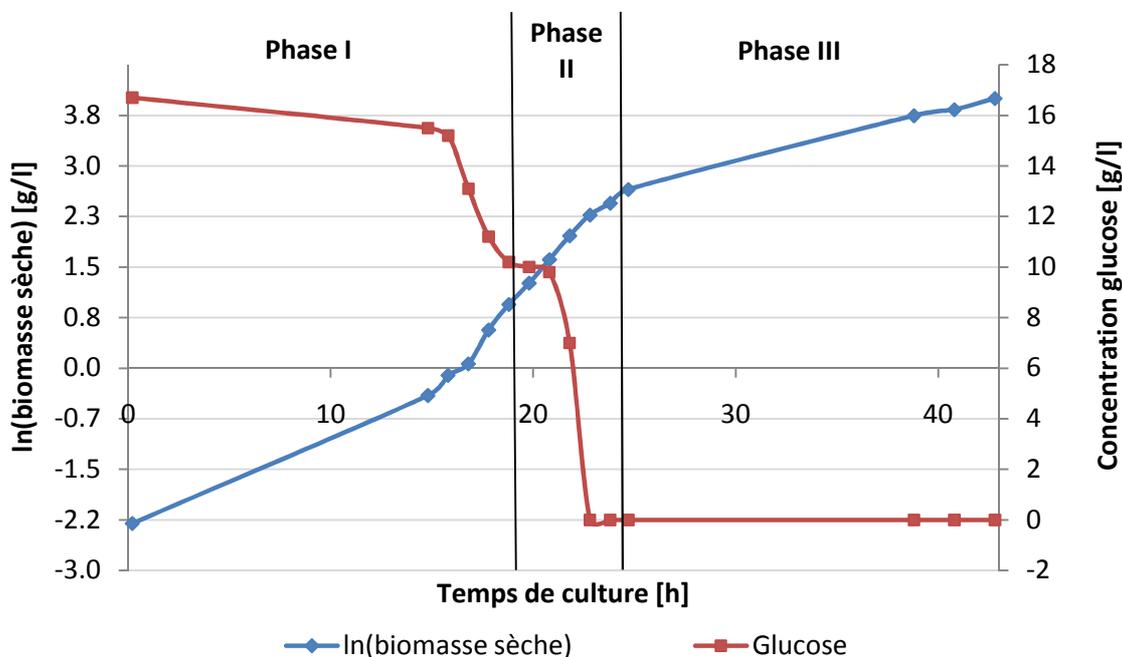
Un graphique représentant l'évolution de la biomasse en fonction de la densité optique permet de déterminer s'il existe un lien entre ces deux paramètres. La comparaison montrée au graphique 9 permet d'affirmer qu'il existe bien une forte relation entre biomasse sèche et densité optique puisque le coefficient de détermination (R<sup>2</sup>) est de 0.992.



Graphique 9 : corrélation entre biomasse sèche et densité optique durant la culture

### 3.7.3 Evolution du substrat

Le graphique 10 suivant montre l'évolution de la biomasse ainsi que du substrat (glucose) en fonction du temps de fermentation. Le glucose a été déterminé par HPLC à l'aide d'une courbe de calibration fournie en annexe 3.



Graphique 10 : évolution de la biomasse et du substrat en fonction du temps

A partir des valeurs calculées, le rendement  $Y_{x/s}$  correspondant à la quantité de biomasse formée par la quantité de substrat consommé peut être déterminé pour la période du batch:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta s} = \frac{2.58}{6.5} = 0.40 \text{ g biomasse/g glucose}$$

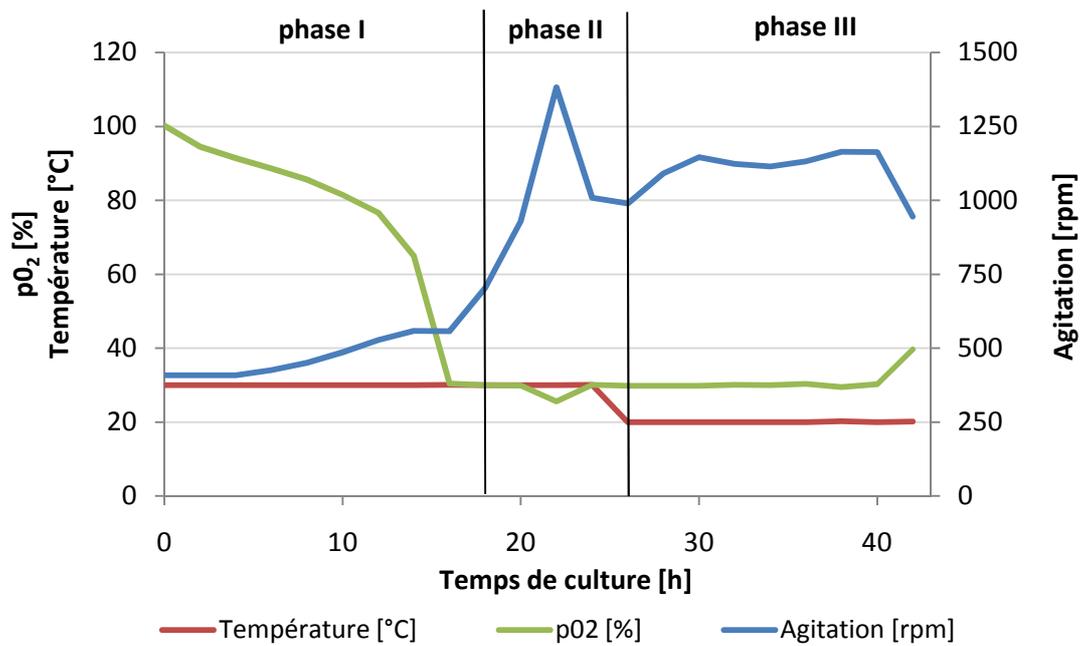
### 3.7.4 Paramètres physiques de la culture

Au cours de la fermentation, le logiciel Biopilot Labview 6.1 a permis l'acquisition simultanée de l'agitation, de la  $pO_2$ , de la température, du pH ainsi que de l'aération.

La consigne du pH a été fixée à 6.75 et l'ajout de base ( $NH_4OH$  25%) ou d'acide ( $H_3PO_4$  2M) a permis de garder cette valeur globalement stable. L'aération a été fixée à 1 vvm et a été maintenue constante durant toute la culture.

Lors de la fermentation, la température a été maintenue à 30°C avant l'induction puis a été diminuée à 20°C suite à l'ajout de l'inducteur IPTG.

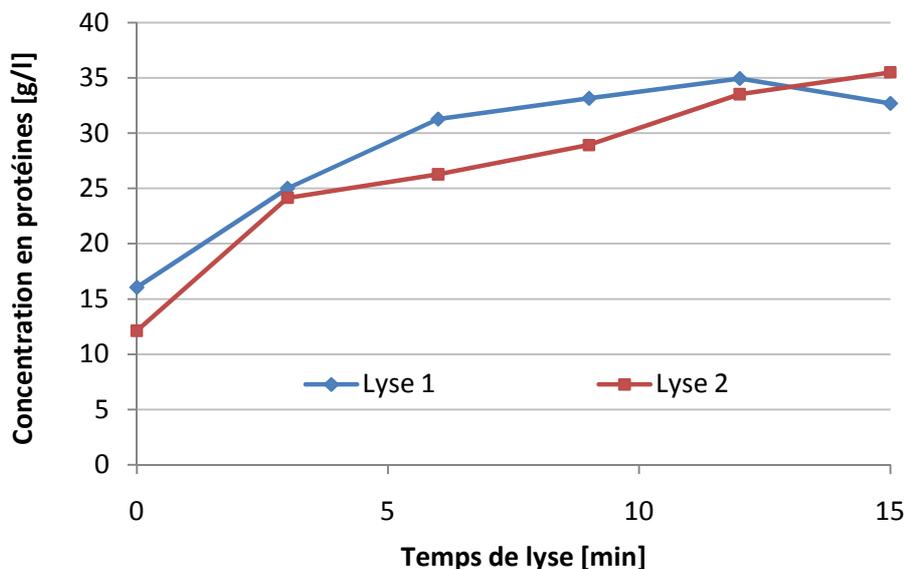
Le graphique 11 présente l'évolution de l'agitation, de la température et de la pression partielle d'oxygène en fonction du temps de culture.



Graphique 11 : évolution de l'agitation, de la température et de la pO<sub>2</sub> durant la fermentation

### 3.8 LYSÉ DE LA FERMENTATION DE *E. COLI* B ER2566 PHEVS

La culture obtenue par Anabelle Tenisch lors de la fermentation de la souche *E. coli* B ER2566 pHEVS a été lysée selon le protocole mentionné au point 2.2.7. Le volume de la suspension étant de 400 ml, il a fallu lyser les cellules en deux fois (deux batchs de 200 ml). Au cours de la lyse, des échantillons ont été prélevés toutes les 3 minutes afin d'observer l'évolution de la concentration en protéines dans le milieu. Ces résultats sont présentés par le graphique 12.

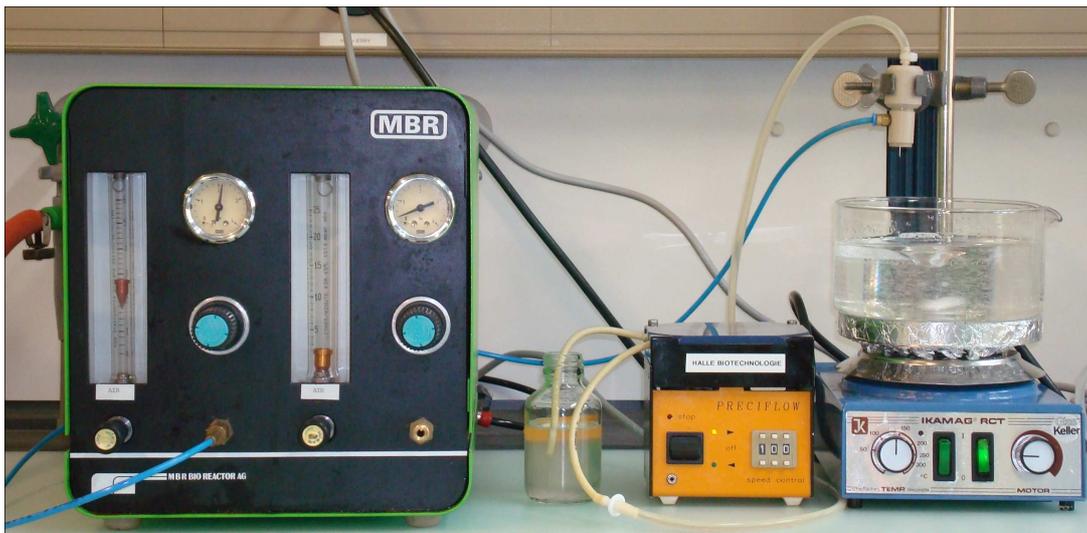


Graphique 12 : évolution de la concentration en protéines dans le milieu en fonction du temps de lyse  
vitesse de rotation 3200 [tours/min] ; Ø billes 0.75-1 [mm] ; vol. billes 200 [ml]

En revanche, lors de la lyse des cellules obtenues durant ma fermentation, la biomasse s'est révélée trop dense et visqueuse, ce qui n'a pas permis de prendre correctement des échantillons au cours de la lyse. Par conséquent, il n'a pas été possible d'établir ce type de graphique et d'observer clairement la libération des protéines au cours du temps. Néanmoins, des courbes très similaires à celles présentées dans le graphique 12 auraient été obtenues.

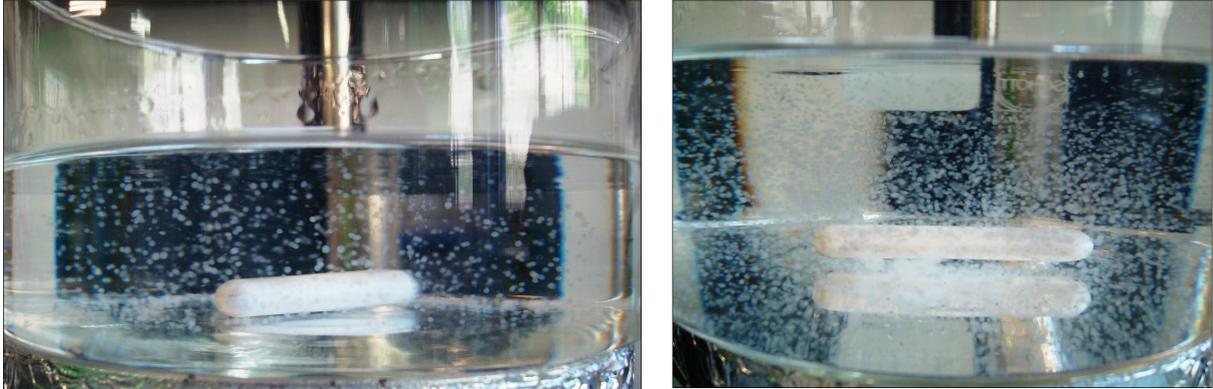
### 3.9 FABRICATION DES BILLES DE CHITINE

La photographie 4 ci-dessous représente le montage utilisé pour fabriquer les billes. La solution de chitine est égouttée à faible débit dans de l'éthanol pur contenu dans un cristallisateur. L'obtention de billes se fait en pompant la solution à travers l'aiguille d'une buse (diamètre interne 0.5mm). Un débit d'air de 3L/min (tuyau bleu) est envoyé à l'endroit de l'aiguille où se forment les gouttes afin de les faire tomber plus rapidement et d'obtenir des billes régulières et plus petites. Lorsque le débit d'air est augmenté, il est possible d'obtenir des billes plus petites.



Photographie 4 : montage pour la fabrication des billes de chitine

La photographie 5 ci-dessous montre la formation des billes lorsque ces dernières tombent dans l'éthanol. Le récipient où se forment les billes est agité afin de les maintenir en suspension et d'éviter qu'elles ne coagulent.



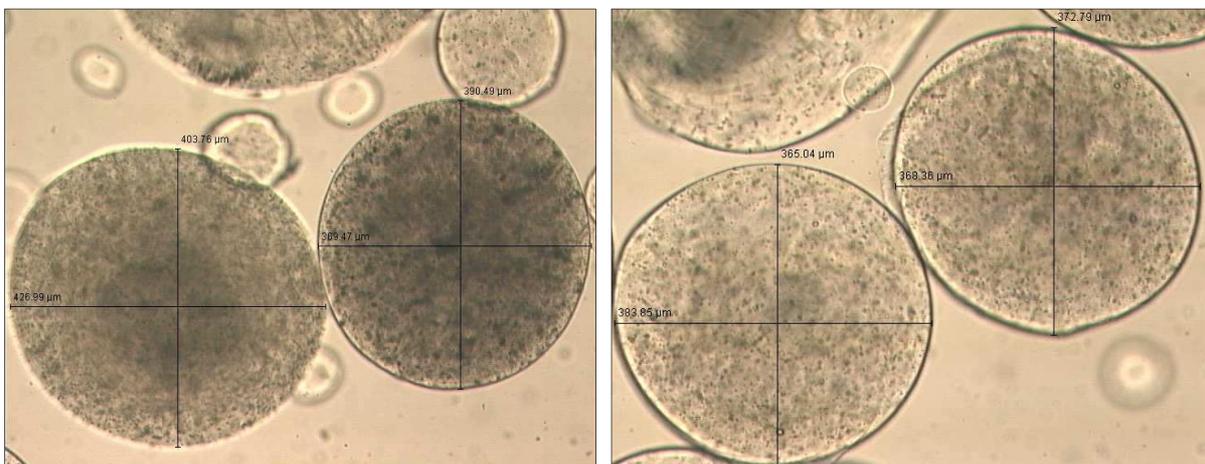
Photographie 5 : billes de chitine en formation

La photographie 6 suivante montre les billes obtenues lors de cet essai. Ces dernières ont été photographiées à l'aide d'un microscope USB afin d'avoir une idée de l'aspect global des billes de chitine.



Photographie 6 : billes de chitine fabriquées

Pour plus de précision, les billes ont aussi été observées au microscope optique (photographie 7).



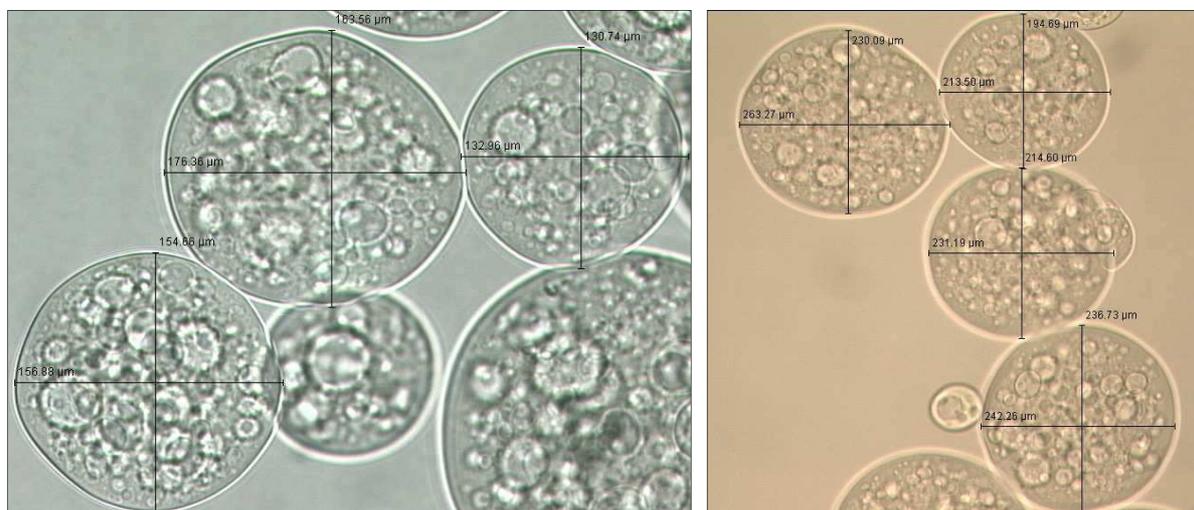
Photographie 7 : photographie au microscope optique des billes de chitine fabriquées

Toujours à l'aide du microscope optique, la hauteur et la largeur de plusieurs billes ont été mesurées afin de connaître le diamètre moyen des billes et d'observer si ces dernières étaient de manière générale sphériques. Le tableau 18 suivant résume les valeurs mesurées.

**Tableau 18 : répartition de la taille des billes de chitine de fabrication maison**

Bille n°	Largeur [µm]	Hauteur [µm]	Rapport L/H
1	408.19	393.81	1.04
2	456.86	434.73	1.05
3	426.99	403.76	1.06
4	369.47	390.49	0.95
5	383.85	365.04	1.05
6	368.38	372.79	0.99
7	371.68	366.15	1.02
8	386.06	382.74	1.01
Moyenne	396.44	388.69	1.02
Ecart-type	29.82	21.60	0.04

Afin de comparer les billes fabriquées artisanalement, les billes commerciales fournies par l'entreprise New England Biolabs (NEB) ont également été analysées. La photographie 8 montre la taille et l'aspect des billes commerciales.



**Photographie 8 : photographie au microscope optique des billes de chitine commerciales NEB**

Comme pour les billes fabriquées, la hauteur et la largeur de plusieurs billes ont été mesurées afin de connaître leur diamètre moyen et de déterminer si ces dernières étaient de manière générale sphériques. Le tableau 19 résume les valeurs mesurées.

Tableau 19 : répartition de la taille des billes de chitine commerciale NEB

Bille n°	Largeur [um]	Hauteur [um]	Rapport L/H
1	156.88	154.66	1.01
2	176.36	163.56	1.08
3	132.96	130.74	1.02
4	110.62	109.51	1.01
5	121.68	116.15	1.05
6	105.09	101.77	1.03
7	128.32	122.79	1.05
8	91.81	82.96	1.11
9	96.24	101.77	0.95
10	263.27	230.09	1.14
11	213.5	194.69	1.10
12	231.19	214.69	1.08
13	242.26	236.73	1.02
Moyenne	159.24	150.78	1.05
Ecart-type	59.86	52.73	0.05

### 3.10 PURIFICATION EN MODE BATCH DE LA GFP-INTÉINE À L'AIDE DE BILLES DE CHITINE COMMERCIALES

Deux fermentations de la souche *E. coli* B ER2566 pHEVS ont été effectuées afin de produire la protéine d'intérêt et de pouvoir effectuer des essais de purification de cette dernière à l'aide de billes de chitine. La première a été réalisée par A. Tenisch tandis que la seconde a été réalisée par G. de Lavallaz.

Le lysat obtenu à partir des deux milieux de fermentation montre des variations au niveau de la concentration en protéines totales et en fluorescence. Le tableau 20 résume les différentes valeurs déterminées.

Tableau 20 : teneur en protéines et en fluorescence de lysats obtenus par fermentation

Provenance du lysat	Concentration protéines totales [g/l]	Fluorescence [RFU] sensibilité medium	Fluorescence [RFU] sensibilité high
Fermentation A. Tenisch	24.1	25.45	328.90
Fermentation G. de Lavallaz	14.8	8.97	116.75

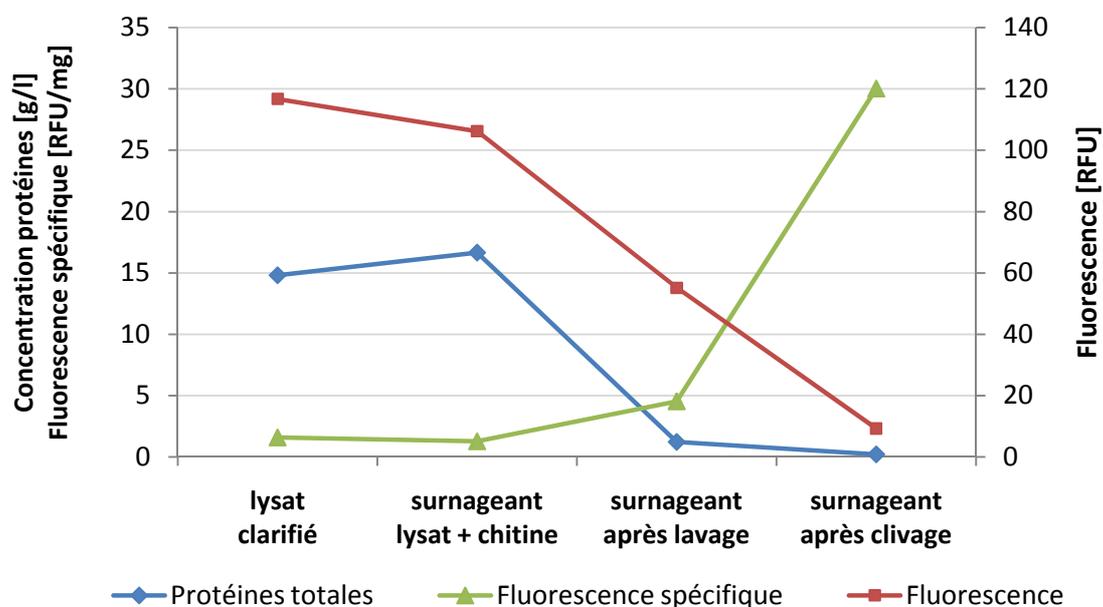
Afin d'évaluer l'efficacité de la purification de la GFP-intéine, plusieurs échantillons ont été prélevés et analysés à différents stades du « downstream processing ».

Le tableau 21 montre les résultats obtenus pour la purification de la GFP à partir du lysat de la fermentation faite par G. de Lavallaz.

Tableau 21 : composition des échantillons aux différentes étapes de purification

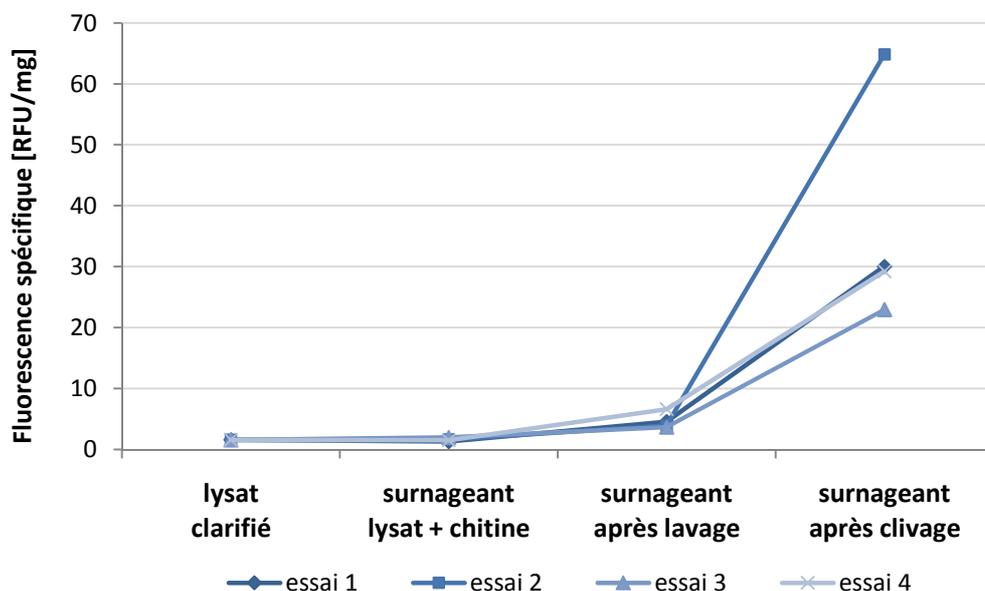
Echantillon		volume [ml]	Concentration protéines [g/l]	Fluorescence [RFU] sensibilité high	Quantité protéines [mg]	Fluorescence spécifique [RFU/mg]
surnageant lysat + chitine	1.1	5	16.6	106.22	83.2	1.3
	2.1	5	15.2	125.06	76.2	1.6
	3.1	5	14.3	142.27	71.3	2.0
	4.1	5	16.1	119.77	80.3	1.5
surnageant après lavage de la chitine	1.2	10	1.2	55.12	12.1	4.5
	2.2	10	1.2	46.99	12.0	3.9
	3.2	10	2.5	92.54	25.2	3.7
	4.2	10	1.5	102.38	15.5	6.6
surnageant après clivage	1.3	1.5	0.2	9.26	0.3	30.0
	2.3	3	0.3	57.26	0.9	64.8
	3.3	4.5	0.2	22.14	1.0	22.9
	4.3	5.5	0.3	47.84	1.6	29.2

Les valeurs présentées dans ce tableau 21 peuvent être également mises sous forme de graphique permettant ainsi de suivre l'évolution de la concentration en protéines totales et en fluorescence dans les divers échantillons. La graphique 13 montre la composition aux différentes étapes pour l'échantillon 1 (lysate ; 1.1 ; 1.2 ; 1.3).



Graphique 13 : évolution de la composition pour l'essai 1

Le graphique 14 suivant présente la variation de la fluorescence spécifique pour les quatre essais en utilisant le lysat provenant de la fermentation menée par G. de Lavallaz.



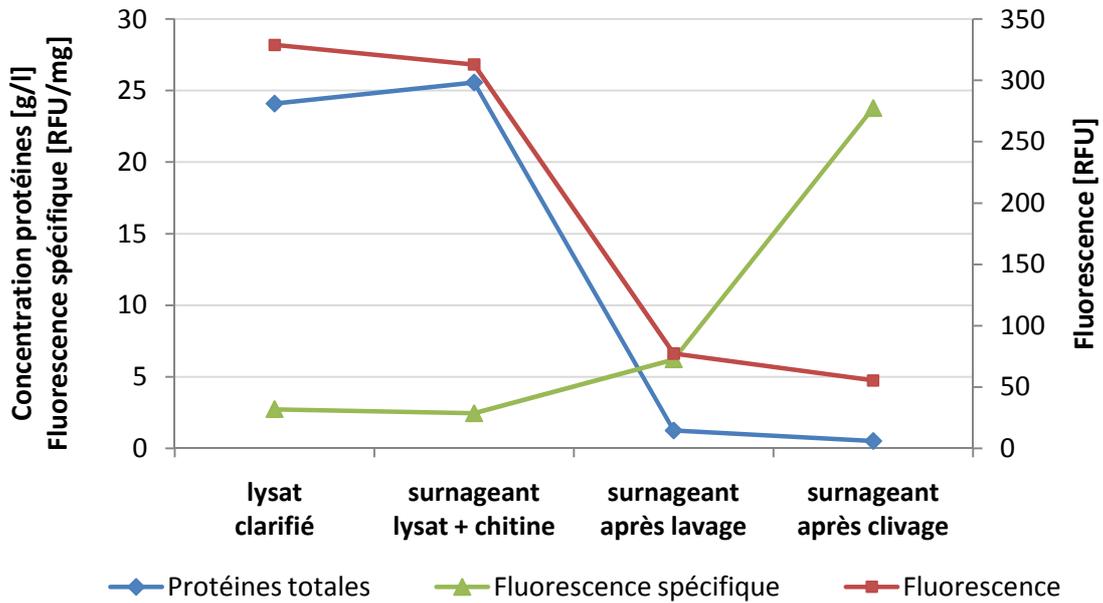
Graphique 14 : évolution de la fluorescence spécifique pour les 4 essais

Les résultats obtenus à partir du lysat provenant de la fermentation d'A. Tenisch sont présentés dans le tableau 22 suivant. A noter que certains essais ont été répétés afin de vérifier si les résultats obtenus étaient identiques.

Tableau 22 : composition des échantillons aux différentes étapes de purification

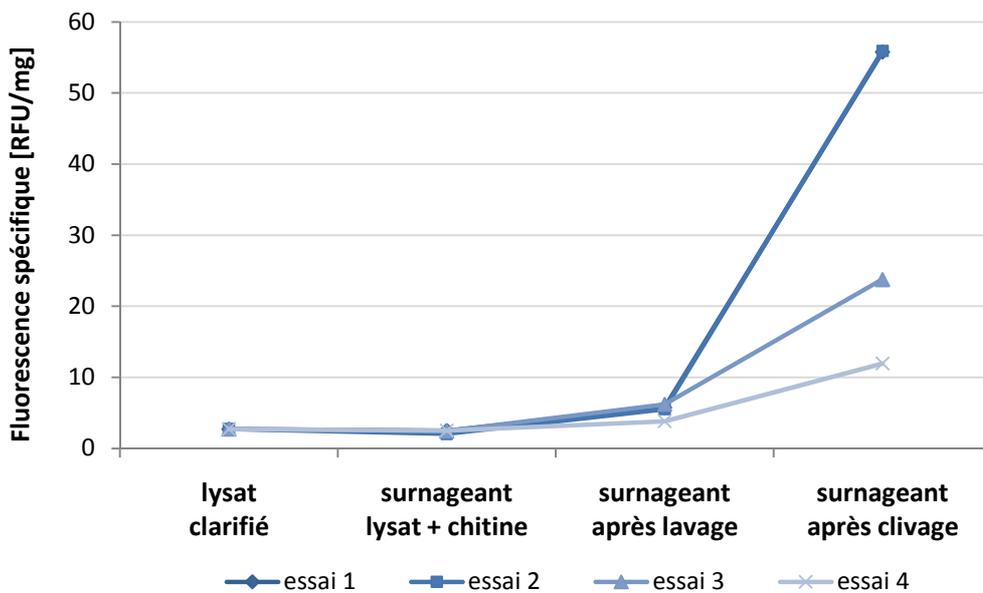
Echantillon		Volume [ml]	Concentration protéines [g/l]	Fluorescence [RFU] sensibilité high	Quantité protéines [mg]	Fluorescence spécifique [RFU/mg]
surnageant lysat + chitine	1.1	5	24.1	303.87	120.6	2.5
	2.1	5	27.6	284.99	138.0	2.1
	3.1	5	25.6	312.91	127.9	2.4
	4.1	5	25.0	316.69	125.2	2.5
surnageant après lavage de la chitine	1.2	10	1.4	80.46	14.0	5.7
	2.2	10	1.8	98.14	17.8	5.5
	3.2	10	1.2	77.32	12.4	6.2
	4.2	10	2.7	104.66	27.3	3.8
surnageant après clivage	1.3	1.5	0.3	26.13	0.5	55.8
	2.3	3	0.3	43.29	0.8	55.9
	3.3	4.5	0.5	55.30	2.3	23.8
	4.3	6	0.7	50.39	4.2	12.0

Comme précédemment, il est possible de représenter graphiquement pour un essai, la variation de la composition en protéines et en fluorescence, comme le montre le graphique 15.



Graphique 15 : évolution de la composition pour l'essai n°3

Finalement, le graphique 16 présente la variation de la fluorescence spécifique pour les quatre échantillons en utilisant le lysat provenant de la fermentation d'A. Tenisch comme matériel de départ.



Graphique 16 : évolution de la fluorescence spécifique pour les 4 essais

Comme pour la purification de la GFP-UV, il est possible de déterminer un facteur de purification de la protéine cible en se basant sur la fluorescence spécifique initiale et finale. En effet, le rapport  $\frac{\text{fluorescence spécifique finale}}{\text{fluorescence spécifique initiale}}$  donne une indication quant à l'efficacité de la purification. Le tableau 23 ci-dessous résume les facteurs de purification obtenus à partir des deux lysats lors des 4 essais.

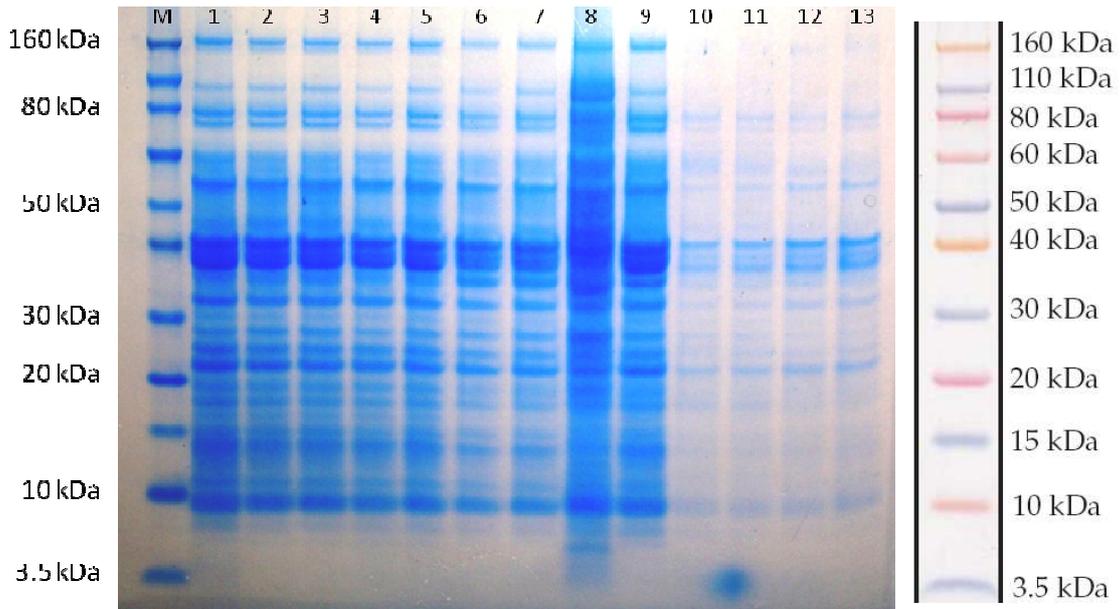
**Tableau 23 : facteurs de purification obtenus lors de l'isolation de la GFP-intéine**

Echantillon	Lysat fermentation G. de Lavallaz		Lysat fermentation A. Tenisch	
	Fluorescence spécifique [RFU/mg]	Facteur de purification	Fluorescence spécifique [RFU/mg]	Facteur de purification
Lysat de départ	1.58	-	2.73	-
1.1	1.3	0.8	2.5	0.9
2.1	1.6	1.0	2.1	0.8
3.1	2	1.3	2.4	0.9
4.1	1.5	0.9	2.5	0.9
1.2	4.5	2.8	5.7	2.1
2.2	3.9	2.5	5.5	2.0
3.2	3.7	2.3	6.2	2.3
4.2	6.6	4.2	3.8	1.4
1.3	30	19.0	55.8	20.4
2.3	64.8	41.0	55.9	20.5
3.3	22.9	14.5	23.8	8.7
4.3	29.2	18.5	12	4.4

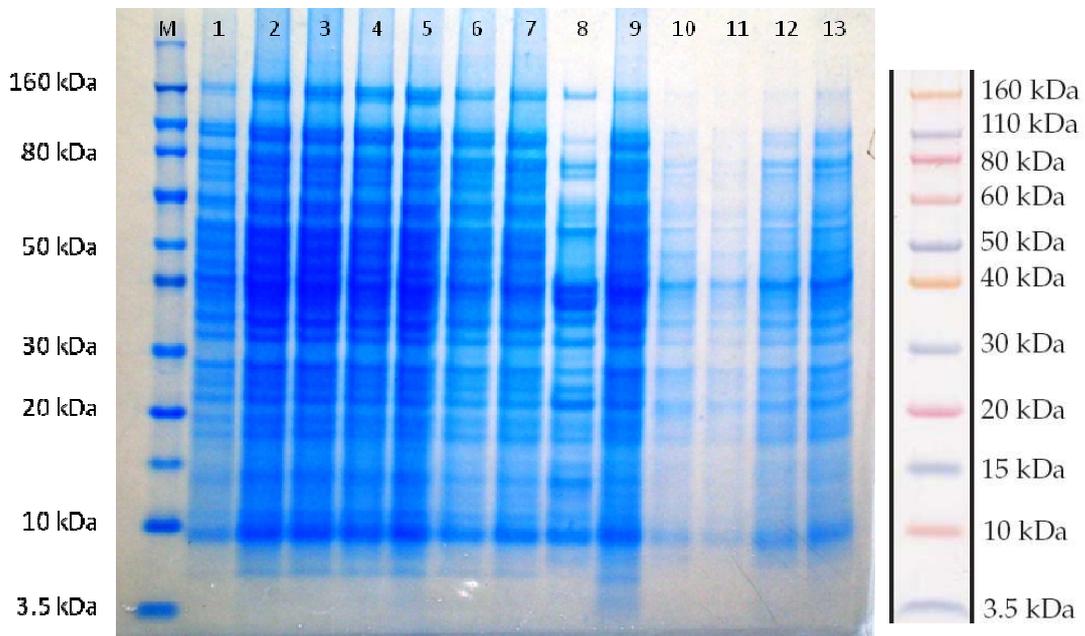
Afin de vérifier le contenu en protéines des divers échantillons, deux gels SDS-PAGE ont été effectués. Pour rappel, la GFP est une protéine de 27 kDa et le marqueur intéine est une protéine de 30 kDa. Par conséquent, lorsque ces deux protéines sont fusionnées, une bande aux alentours de 60 kDa doit être visible alors qu'une bande proche des 30 kDa est attendue suite à l'étape de clivage.

Le gel de la photographie 9 contient dans ses puits les échantillons correspondant au tableau 21, c'est-à-dire aux essais effectués à partir du lysat obtenu de la fermentation de G.de Lavallaz.

Le gel de la photographie 10 correspond au tableau 22, c'est-à-dire que les essais ont été effectués à partir du lysat obtenu par la fermentation d'A. Tenisch.



Photographie 9 : [M] marqueur ; [1] lysat *E. coli* B ER2566 fermentation G. de Lavallaz ; [2] Echantillon 1.1 ; [3] Echantillon 2.1 ; [4] Echantillon 3.1 ; [5] Echantillon 4.1 ; [6] Echantillon 1.2 ; [7] Echantillon 2.2 ; [8] Echantillon 3.2 ; [9] Echantillon 4.2 ; [10] Echantillon 1.3 ; [11] Echantillon 2.3 ; [12] Echantillon 3.3 : [13] Echantillon 4.3



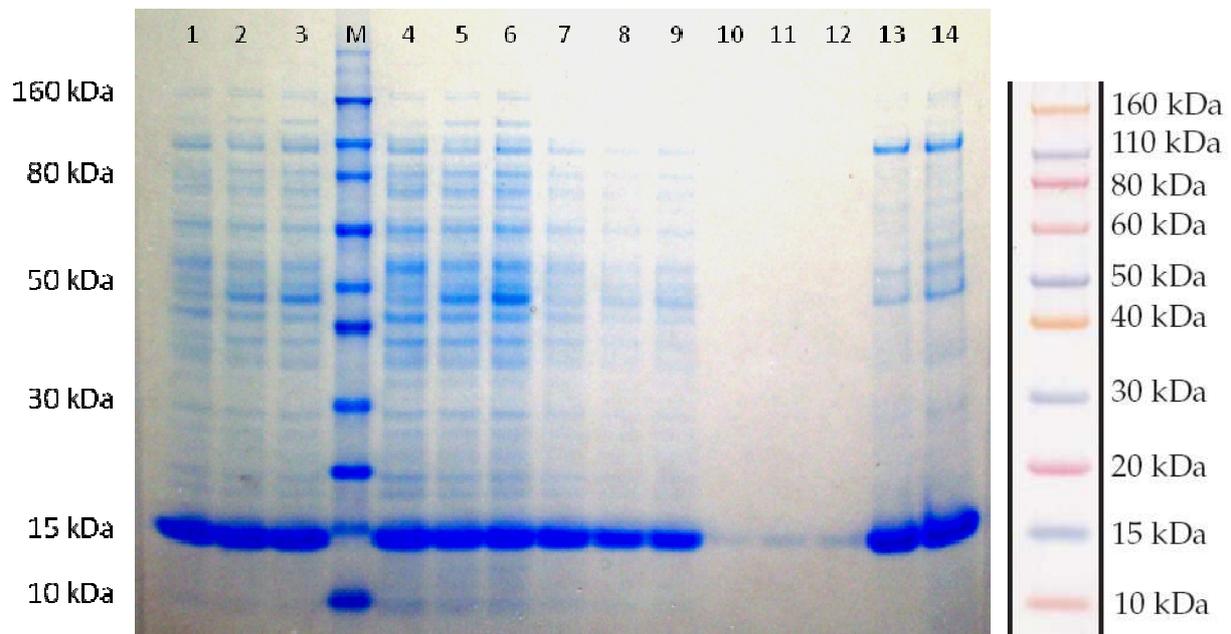
Photographie 10 : [M] marqueur ; [1] lysat *E. coli* B ER2566 fermentation A. Tenisch ; [2] Echantillon 1.1 ; [3] Echantillon 2.1 ; [4] Echantillon 3.1 ; [5] Echantillon 4.1 ; [6] Echantillon 1.2 ; [7] Echantillon 2.2 ; [8] Echantillon 3.2 ; [9] Echantillon 4.2 ; [10] Echantillon 1.3 ; [11] Echantillon 2.3 ; [12] Echantillon 3.3 : [13] Echantillon 4.3

### 3.11 CONTRÔLE DU COUPLAGE INTÉINE-CHITINE ET TEST D'EFFICACITÉ DES BILLES « MAISON »

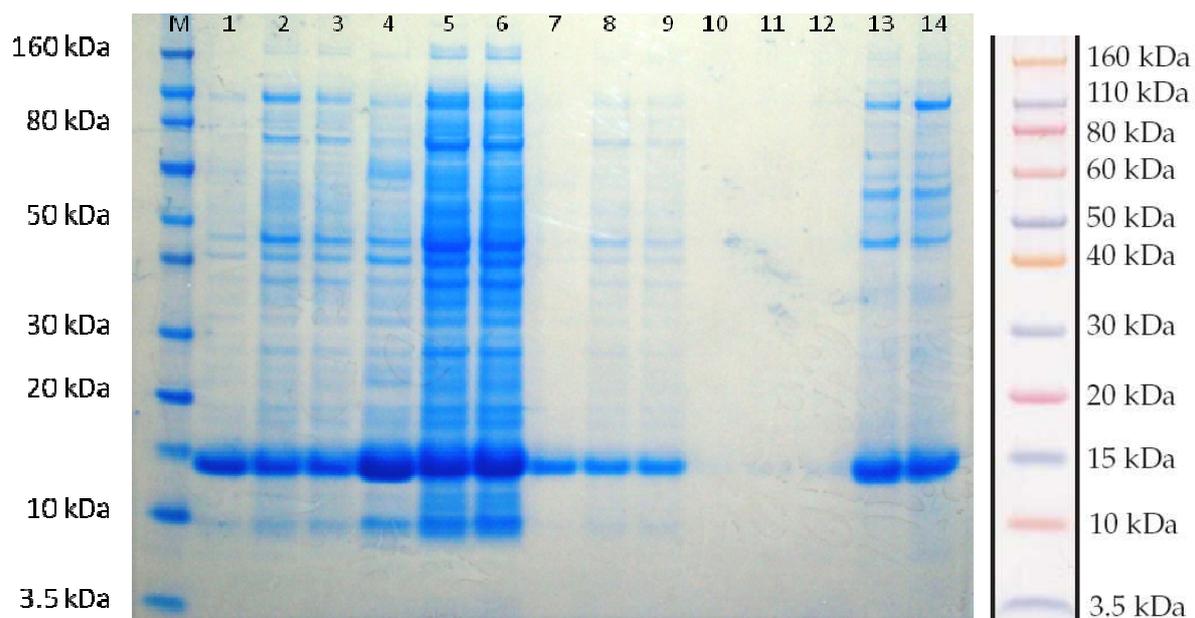
La culture en shake-flask de la souche *E. coli* B ER2566 pMYB5 permet de produire après induction à l'IPTG la « maltose binding protein ». Cette protéine a été utilisée ici comme contrôle dans le but de vérifier si l'intéine se fixe convenablement à la chitine et si la méthode de purification en mode batch était efficace et permettait de purifier correctement une protéine marquée d'un tag intéine. Cette méthode permet aussi de tester l'efficacité des billes de chitine fabriquées en comparant les résultats avec ceux obtenus par l'intermédiaire des billes de chitine commerciales NEB.

Pour cela, deux essais de purification de la MBP ont été effectués en procédant de la même manière que lors de la purification de la GFP-intéine. En revanche, la MBP n'a pas été quantifiée. Seul des gels SDS-PAGE ont été utilisés puisque l'information recherchée est uniquement qualitative.

Les photographies 11 et 12 suivantes montrent les résultats de deux essais de purification de la MBP en mode batch.

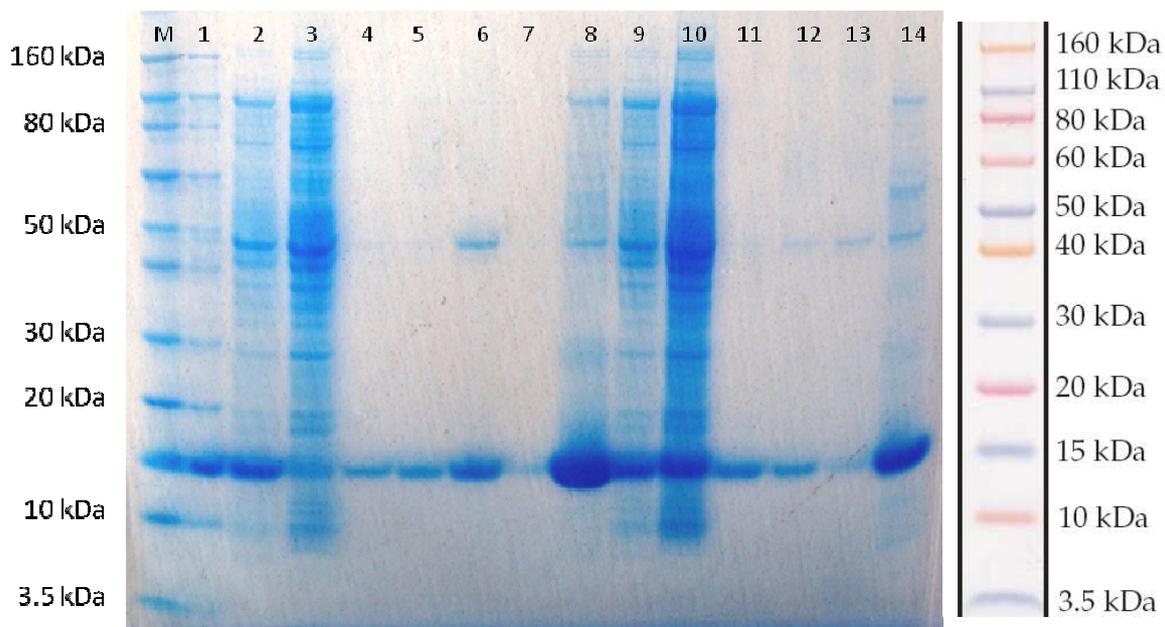


Photographie 11 : [1] lysat non-induit ; [2] lysat induit ; [3] lysat induit ; [M] marqueur ; [4] lysat non-induit + chitine NEB avant lavage ; [5] lysat induit + chitine NEB avant lavage ; [6] lysat induit + chitine fabriquée avant lavage ; [7] lysat non-induit + chitine NEB lavée ; [8] lysat induit + chitine NEB lavée ; [9] lysat induit + chitine fabriquée lavée ; [10] lysat non-induit + chitine NEB après clivage ; [11] lysat induit + chitine NEB après clivage ; [12] lysat induit + chitine fabriquée après clivage ; [13] lysat induit + chitine NEB + SDS 1% ; [14] lysat induit + chitine fabriquée + SDS 1%



Photographie 12 : [M] marqueur ; [1] lysat non-induit ; [2] lysat induit ; [3] lysat induit ; [4] lysat non-induit + chitine NEB avant lavage ; [5] lysat induit + chitine NEB avant lavage ; [6] lysat induit + chitine fabriquée avant lavage ; [7] lysat non-induit + chitine NEB lavée ; [8] lysat induit + chitine NEB lavée ; [9] lysat induit + chitine fabriquée lavée ; [10] lysat non-induit + chitine NEB après clivage ; [11] lysat induit + chitine NEB après clivage ; [12] lysat induit + chitine fabriquée après clivage ; [13] lysat induit + chitine NEB + SDS 1% ; [14] lysat induit + chitine fabriquée + SDS 1%

Comme mentionné dans le point 2.2.13, une seconde approche a été testée afin de purifier la MBP. Dans cette méthode, une colonne a été remplie avec 1 ml de billes commerciales ou fabriquées et la MBP a été purifiée par chromatographie d'affinité. La photographie 13 montre les résultats du SDS-PAGE obtenu par cette méthode.



Photographie 13 : [M] marqueur ; [1] lysat non-induit ; [2] lysat induit ; [3] Flow through avec chitine NEB ; [4] lavage chitine NEB ; [5] Flow through ajout DTT ; [6] élution chitine NEB ; [7] élution chitine NEB ; [8] chitine NEB + SDS 1% ; [9] lysat induit ; [10] Flow through chitine fabriquée ; [11] lavage chitine fabriquée ; [12] Flow through ajout DTT ; [13] élution chitine fabriquée ; [14] chitine fabriquée + SDS 1%

## 4. DISCUSSION

### 4.1 FERMENTATION DE LA SOUCHE *E. COLI* W3110

#### 4.1.1 Détermination du taux de croissance

Les graphiques 1 et 2 montrant respectivement l'évolution de l'absorbance et de la biomasse en fonction du temps permettent de déterminer le taux de croissance spécifique de la souche *E. coli* W3110. On constate que cette dernière semble être en phase de latence durant les 10 premières heures de culture. Ce n'est qu'à partir de la 10<sup>ème</sup> heure qu'elle entre en phase de croissance exponentielle et ne la quitte qu'aux environs de la 25<sup>ème</sup> heure de culture, le manque de mesure ne permettant pas d'être très précis. Toutefois, on peut déduire qu'à partir de la 25<sup>ème</sup> heure, la croissance des cellules devient moins importante et que celles-ci ne sont plus en phase de croissance exponentielle. A partir de la 38<sup>ème</sup> heure, les mesures montrent que la biomasse et l'absorbance tendent à rester globalement constantes. Cette stabilisation confirme que la croissance des cellules devient moins importante mais qu'elle est quand même présente. En effet, lorsque du feed est ajouté, le milieu de culture se dilue, par conséquent l'absorbance et la biomasse auront tendance à diminuer. Comme durant cette période (38h – 43h), ces deux valeurs sont stables, on en déduit qu'il subsiste une croissance limitée.

Le taux de croissance maximal déterminé durant la fermentation est de  $0.173 \text{ h}^{-1}$ , ce qui est inférieur à la valeur attendue pour ce type de souche qui est normalement plus proche de  $0.6-0.7 \text{ h}^{-1}$  [17]. Il est important de rappeler que la fermentation s'est faite à  $30^\circ\text{C}$  et non à  $37^\circ\text{C}$  ce qui peut expliquer cette faible valeur de  $\mu_{\text{max}}$ .

#### 4.1.2 Corrélation entre biomasse sèche et densité optique

Le graphique 3 montre qu'il existe une bonne corrélation entre la biomasse sèche et la densité optique. Par conséquent, la détermination du taux de croissance spécifique à partir de ces deux paramètres devrait mener aux mêmes résultats. Le tableau 10 indique que c'est globalement le cas puisque les taux de croissance calculés sont assez proches.

Néanmoins, on relève un écart important dans les résultats à la fin du fed-batch entre la biomasse et la densité optique. Une raison probable est que les cellules ont quasiment arrêté de croître mais qu'elles modifient la composition du milieu et donc influencent les mesures de l'absorbance.

#### 4.1.3 Evolution du substrat

Le graphique 4 montre une très bonne symétrie durant les 20 premières heures de fermentation ce qui signifie qu'il existe une forte corrélation entre consommation de substrat et croissance cellulaire. En analysant ce graphique, on retombe sur les mêmes remarques faites lors de la détermination du taux de croissance.

En effet, on constate que la concentration de glycérol diminue d'abord faiblement durant les 10 premières heures de fermentation, ce qui indique que les cellules sont encore en phase de latence. Ensuite, la forte diminution de concentration en glycérol dès la 10<sup>ème</sup> heure indique que la culture entre en phase de croissance exponentielle.

En revanche, il n'est pas possible de dire en se basant uniquement sur la concentration de glycérol quand les cellules sortent de la phase de croissance exponentielle. En effet, à partir de la 20<sup>ème</sup> heure, on remarque que la concentration de glycérol reste nulle jusqu'à la fin de la fermentation et ce malgré le feed. Cela signifie que les cellules restent actives et consomment totalement le substrat au fur et à mesure qu'il est introduit dans le réacteur.

#### 4.1.4 Paramètres physiques de la culture

Le graphique 5 montre une première diminution de la  $pO_2$  à partir de la 5<sup>ème</sup> heure ce qui signifie que les cellules commencent à se multiplier. Dès la 10-12<sup>ème</sup> heure, on relève une deuxième diminution de la  $pO_2$ , plus importante cette fois, ce qui semble confirmer le début de la phase exponentielle. Dès le début du fed-batch (17<sup>ème</sup> heure), la  $pO_2$  reste stable à 30% car la consigne a été fixée à cette valeur. On note que pour maintenir une  $pO_2$  de 30%, il est nécessaire d'augmenter l'agitation car les cellules sont en pleine croissance. Dès la 20<sup>ème</sup> heure, on constate que l'agitation chute brutalement de 1350 rpm à 900 rpm afin de maintenir une  $pO_2$  de 30%. Ceci est vraisemblablement le signe d'un changement du métabolisme des cellules.

En effet, si l'on compare avec le graphique 4, on remarque que cela correspond au moment précis où la concentration de glycérol dans le milieu est de 0 g/l. Par conséquent, on en déduit que les cellules diminuent leur vitesse de croissance en raison du manque de substrat et se préparent à entrer en phase de production. Il aurait été intéressant de disposer d'une sonde interne au réacteur mesurant la fluorescence afin de confirmer la production de GFP.

## 4.2 LYSE DE LA FERMENTATION DE *E. COLI* W3110

---

Le graphique 6 montre durant les 7-8 premières minutes de lyse une augmentation de la concentration en protéines dans le lysat. Ensuite, cette concentration reste globalement stable, ce qui signifie qu'aucune ou peu de protéines sont extraites des cellules. On remarque qu'avant le début de la lyse, les concentrations en protéines dans le milieu sont déjà de 15-20 g/l et non de 0 g/l. Cette valeur est expliquée par le fait que la biomasse est resuspendue dans du tampon de lyse qui semble détruire déjà une bonne partie des membranes cellulaires.

La première méthode employée lors de la purification de la GFP-UV a été celle faisant appel à l'extraction à l'éthanol. Il s'agit d'une méthode rapide et simple à mettre en place. Elle ne demande pas d'appareil particulier et apporte de bons résultats pour une première approche.

Les essais de purification à l'éthanol ont été faits à double afin d'obtenir plus de résultats et de vérifier si ceux-ci étaient similaires entre eux. Les résultats des deux essais présentés dans le tableau 11 montrent globalement la même tendance, même si certaines valeurs peuvent diverger. Une grande partie des protéines totales semblent avoir été éliminées puisque l'on passe de 142.6 mg à 2.1 mg de protéines pour l'essai 1 et de 142.6 mg à 6.9 mg de protéines pour l'essai 2. La fluorescence diminue également ce qui amène à des pertes de notre produit. Lors de l'essai 1, la fluorescence diminue de 5172 [RFU] à 1496 [RFU], alors que pour l'essai 2 la fluorescence passe de 5172 [RFU] à 3868 [RFU]. Les résultats montrent que cette méthode d'extraction à l'éthanol possède une certaine sélectivité car la diminution des protéines totales est plus importante que pour la fluorescence.

Le bilan de matière tiré du tableau 11 montre qu'entre 70 et 82% des protéines sont éliminés lors de la première étape de purification. En effet, la quantité de protéines totales passe de 142.6 mg à 43.3 mg pour l'essai 1 et de 142.6 mg à 25.1 mg pour l'essai 2. Ces dernières précipitent et se situent à l'interphase, entre la phase organique et la phase aqueuse.

Lors de la seconde étape de purification, c'est entre 55 et 87% des protéines totales restantes qui précipitent au niveau de l'interphase et qui peuvent être éliminées. Il est probable qu'une partie de la GFP précipite avec les protéines contaminantes. Toutefois, cette méthode semble efficace puisque le tableau 12 indique des facteurs de purification situés entre 20 et 15, respectivement pour les essais 1 et 2. En revanche, les rendements de la fluorescence varient fortement d'un essai à l'autre puisque ceux-ci se situent entre 29 et 75% pour les essais 1 et 2 respectivement.

La deuxième méthode employée pour la purification de la GFP-UV est la chromatographie d'interactions hydrophobes. Comme dit précédemment, plusieurs essais ont été effectués, mais seule la méthode ayant apporté les meilleurs résultats est présentée ici.

Sur le chromatogramme visible à la figure 6, on distingue les protéines totales en bleu (UV 280nm) de la GFP-UV en rouge (UV 475nm). On constate que dès le début de la chromatographie, une grande partie des protéines contaminantes n'est pas fixée par la colonne et peut être éliminée. Toutefois, une faible quantité de GFP semble également ne pas être retenue par la colonne si l'on se fie au trait rouge (UV 475nm) visible pour les fractions A2 et A3. Ensuite, l'augmentation de la concentration du tampon d'élution (en vert) permet d'éliminer d'autres protéines qui ont été fixées par la colonne (fractions A9 à B12). A partir d'une certaine concentration en tampon d'élution, c'est la GFP qui n'est plus retenue par la colonne et qui peut être éluée (fractions B11-B9). L'analyse des fractions présentée au tableau 13 permet de déterminer dans quelle fraction se trouve majoritairement la GFP et laquelle est la plus pure. La fraction B10 semble être la plus pure car elle présente une fluorescence spécifique de 904 [RFU/mg protéines] qui est la plus élevée. Les facteurs de purification (tableau 14) montrent que le facteur le plus élevé est obtenu pour la fraction B10 et est de 2.4 [-]. Toujours concernant la fraction B10, le rendement de la fluorescence n'est que de 15%. La méthode permet d'éliminer correctement les protéines contaminantes, mais diluerait également la GFP.

La troisième et dernière méthode employée pour purifier la GFP-UV est la chromatographie échangeuse d'anions. Trois essais ont été effectués mais à nouveau, seul celui ayant apporté les meilleurs résultats n'est développé ici.

La figure 7 montre le chromatogramme obtenu lors de la chromatographie échangeuse d'anions. Comme pour la chromatographie d'interactions hydrophobes, les protéines totales sont représentées par le trait bleu (UV 280nm) et la GFP-UV est représentée par le trait rouge (UV475nm). On constate que la fraction A1 contient les protéines contaminantes qui n'ont pas été fixées par la colonne. L'augmentation de la concentration du tampon d'éluion permet de nouveau d'éliminer d'autres protéines plus fortement retenues par la résine (fraction A5 et A6). Si on se fie au chromatogramme, on constate que la GFP se trouve principalement dans les fractions A7 et A8, alors que si on regarde le tableau 15, on remarque que la GFP se trouve majoritairement dans les fractions A8 et A9. Ce décalage provient de la distance (tuyauterie) qui sépare le détecteur UV du collecteur de fraction. Par conséquent, cela amène un décalage d'une fraction. A noter que ce phénomène fut également présent lors de la chromatographie d'interactions hydrophobes.

La composition des fractions présentée au tableau 15 permet d'affirmer que la fraction A9 est la plus pure car elle présente la plus haute fluorescence par quantité de protéines totales. Cette dernière s'élève à 940 [RFU/mg protéines]. Le facteur de purification (tableau 16) calculé pour cette fraction est de 2.3 [-]. Le rendement de fluorescence pour la fraction A9 atteint cette fois 30%. C'est deux fois plus que lors de la chromatographie d'interactions hydrophobes, mais reste quand même une valeur assez faible. Comme précédemment, il semblerait que la méthode de chromatographie dilue la GFP.

#### 4.4 SDS-PAGE : PURIFICATION GFP-UV

---

Le premier gel SDS-PAGE (photographie 2) permet d'analyser des échantillons obtenus lors de la purification de la GFP-UV par extraction à l'éthanol et par chromatographie d'interactions hydrophobes.

Les puits 1 et 6 contiennent le lysat des cellules *E. coli* W3110. Il s'agit du matériel de départ utilisé lors de la purification par extraction à l'éthanol ainsi que par chromatographie d'interactions hydrophobes. On constate que de nombreuses bandes correspondant aux protéines contaminantes sont visibles. Le but de la purification est de diminuer leur présence au profit de la GFP d'intérêt qui correspond à la bande visible juste en dessous de 30 kDa.

Les puits 2 et 3 correspondent à la première étape de la purification par l'éthanol. On constate que presque toutes les protéines, y compris la GFP, sont présentes dans la phase supérieure (puits 2) et qu'en revanche peu de protéines semblent se trouver dans la phase inférieure (puits 3). Le dosage des protéines totales par Bradford (tableau 11) semble confirmer cette hypothèse.

Les puits 4 et 5 correspondent à la seconde étape de la purification par l'éthanol. Cette fois-ci, peu de bandes sont visibles dans la phase supérieure (puits 4). En revanche, dans le puits 5, on remarque la présence de la GFP mais également des protéines indésirables. Toutefois, si l'on compare avec le puits 1, il semblerait que des bandes correspondant aux protéines contaminantes aient disparu indiquant une certaine purification de la protéine d'intérêt.

Les puits 7, 8 et 9 correspondent respectivement aux fractions A3, A7 et A12 obtenues lors de la première purification par chromatographie d'interactions hydrophobes. Idéalement, on devrait voir dans le puits 7 de nombreuses bandes correspondant aux protéines indésirables, mais aucune correspondant à la GFP. Néanmoins, il semble qu'une faible bande soit visible à 27 kDa, ce qui révèle la présence de la protéine cible. En revanche, dans le puits 9, on devrait voir une bande importante à 27 kDa et idéalement, un minimum d'autres bandes. Or, on constate que ce n'est pas le cas. Il semblerait toutefois que la GFP soit en concentration assez importante et que les protéines indésirables soient moins présentes que dans l'échantillon de départ (puits 6). De plus, les bandes présentes dans les puits 7 et 8 indiquent que de nombreuses protéines contaminantes ont pu être séparées de la GFP d'intérêt.

Les puits 10, 11, 12 et 13 correspondent respectivement aux fractions A4 et A11 obtenues lors de la quatrième chromatographie ainsi qu'aux fractions A3 et B9 obtenus lors de la neuvième chromatographie. On remarque que les résultats sont très similaires pour les puits 10 et 12 ainsi que pour les puits 11 et 13. Dans les puits 10 et 12, de nombreuses bandes correspondant aux protéines contaminantes sont visibles. Une très faible bande à 27 kDa peut également y être relevée. Dans les puits 11 et 13, une bande principale à 27 kDa est clairement visible même si d'autres sont également présentes. En se basant sur ces quatre puits, on constate qu'une bonne partie des protéines totales a pu être éliminée, mais qu'il en reste néanmoins dans les fractions contenant la GFP. La purification de la GFP semble donc être bonne mais pas totale.

Le deuxième gel SDS (photographie 3) contient uniquement les échantillons obtenus lors de la chromatographie échangeuse d'ions. On constate immédiatement en regardant le gel que les trois essais de purification apporte quasiment les mêmes résultats bien que la méthode ait été modifiée. Dans le puits 1, qui contient le lysat de la souche *E. coli* W3110, on relève la bande à 27 kDa qui correspond à la GFP, mais également de nombreuses autres bandes causées par les autres protéines présentes dans le lysat.

Les puits 2, 3, 4 et 5 correspondent aux fractions A1, A7, A8 et A9 obtenues lors de la première chromatographie. Dans le puits 2, on constate plusieurs bandes mais aucune ne correspond à la GFP. Cela signifie bien que la GFP est correctement fixée par la colonne.

Dans le puits 3, on relève à nouveau plusieurs bandes qui correspondent aux protéines indésirables, mais on peut également relever une très faible bande à 27 kDa qui est certainement la GFP-UV.

Dans les puits 4 et 5, on observe une bande principale à 27 kDa qui est la GFP-UV partiellement purifiée. On remarque d'autres bandes de plus faible intensité qui sont causées par d'autres protéines qui n'ont pas pu être éliminées. Si l'on compare les puits 4 et 5 avec le puits 1, on constate que la GFP-UV n'a pu être isolée que partiellement des protéines contaminantes. Comme lors de la chromatographie d'interactions hydrophobes, la purification semble correcte mais pas totale.

Les puits 6 à 9 et 10 à 13 correspondent aux fractions provenant des deux autres chromatographies. On constate que les résultats obtenus sont quasiment identiques à ceux de la première chromatographie (puits 2 à 5). Par conséquent, les mêmes commentaires que pour les puits 2 à 5 peuvent être faits et n'ont pas été répétés ici.

## 4.5 FERMENTATION DE LA SOUCHE *E. COLI* B ER2566 pHEVS

Les mêmes paramètres que lors de la fermentation de la souche *E. coli* W3110 ont été analysés pendant la fermentation de la souche *E. coli* B ER2566 pHEVS. De nombreuses ressemblances sont présentes entre ces deux fermentations et comme la fermentation de la souche *E. coli* W3110 a déjà été discutée, certains points ne seront pas autant développés dans cette discussion.

### 4.5.1 Détermination du taux de croissance

Les graphiques 7 et 8 montrant respectivement l'évolution de l'absorbance et de la biomasse en fonction du temps permettent de déterminer le taux de croissance spécifique de la souche *E. coli* B ER2566. La phase de latence de la souche semble durer une quinzaine d'heure avant que la souche entre en phase de croissance exponentielle. Le manque de mesures ne permet de faire qu'une approximation sans pour autant être affirmatif. On peut toutefois supposer que la phase exponentielle s'étend de la 15<sup>ème</sup> à la 30<sup>ème</sup> heure de culture environ. Ce n'est qu'entre la 30<sup>ème</sup> et 35<sup>ème</sup> heure que l'on constate une baisse de la croissance des cellules et une stabilisation de la biomasse ainsi que de l'absorbance, signifiant ainsi le début de la phase stationnaire.

Le taux de croissance maximale déterminé durant la fermentation est de  $0.345 \text{ h}^{-1}$ , ce qui est inférieur à la valeur attendue pour ce type de souche qui est normalement plus proche de  $0.6-0.7 \text{ h}^{-1}$  [17]. Pour cette fermentation, la température de consigne était également de  $30^\circ\text{C}$  et non de  $37^\circ\text{C}$  ce qui peut expliquer cette faible valeur de  $\mu_{\text{max}}$ .

### 4.5.2 Corrélation entre biomasse sèche et densité optique

Comme lors de la fermentation d'*E. coli* W3110, un graphique représentant la biomasse sèche en fonction de la densité optique a été réalisé pour la culture d'*E. coli* B ER2566. A la vue du graphique 9, on constate qu'il existe bien une forte corrélation entre ces deux paramètres puisque le coefficient de détermination ( $R^2$ ) est de 0.992 [-]. De plus, les taux de croissance déterminés à l'aide de la biomasse et de la densité optique sont également proches ( $0.335$  et  $0.354 \text{ h}^{-1}$  respectivement) ce qui souligne la corrélation existante entre ces deux paramètres.

### 4.5.3 Evolution du substrat

Le graphique 10 montre globalement une bonne symétrie entre biomasse sèche et concentration du substrat. On constate que les observations tirées de ce graphe rejoignent celles des graphiques 7 et 8. On relève une phase de latence durant les 15 premières heures de culture car la concentration en glucose ne diminue que très faiblement. A partir de la 15<sup>ème</sup> heure, la concentration de glucose chute brutalement jusqu'à la 22<sup>ème</sup> heure, moment où elle devient nulle. Durant cette période, on peut affirmer que les cellules sont en phase de croissance exponentielle.

Ensuite, il n'est plus possible de déterminer l'état des cellules en se basant uniquement sur la concentration de glucose. Il faut se tourner vers un autre paramètre (biomasse ou densité optique) pour dire que la phase de croissance exponentielle s'étend jusqu'à la 30<sup>ème</sup> heure avant que les cellules n'entrent en phase stationnaire.

Même en phase stationnaire, les cellules gardent une certaine activité car malgré le feed continu de substrat, la concentration en glucose reste nulle. Cela signifie que les cellules restent actives et consomment totalement le substrat au fur et à mesure qu'il est introduit dans le réacteur.

#### 4.5.4 Paramètres physiques de la culture

Sur le graphique 11 qui permet d'observer la variation de certains paramètres durant la fermentation, on peut tout d'abord constater la diminution de la température de 30°C à 20°C au moment de l'induction à la 25<sup>ème</sup> heure. Cette baisse de température permet de freiner la croissance des cellules et a un impact positif sur la production de GFP puisqu'une température plus basse permet de diminuer le risque de formation de corps d'inclusion.

Si l'on étudie l'évolution de la pO<sub>2</sub>, on remarque qu'elle ne diminue que faiblement durant les 15 premières heures avant l'apparition d'une forte baisse à la 15<sup>ème</sup> heure, signifiant ainsi le début de la phase de croissance exponentielle. Ensuite, la pO<sub>2</sub> se stabilise à 30% car il s'agit d'une valeur de consigne et n'est pas le signe d'un ralentissement de la croissance de cellules. En effet, pour maintenir une pO<sub>2</sub> de 30%, on constate en parallèle une augmentation de l'agitation entre la 15<sup>ème</sup> et la 22<sup>ème</sup> heure environ. Ensuite, au moment du changement de température et de l'induction à la 25<sup>ème</sup> heure, on remarque que l'agitation reste globalement stable entre 1000-1200 rpm puisqu'il n'y a presque plus de croissance. Cela signifie que les cellules ont quitté la phase de croissance exponentielle pour entrer en phase stationnaire.

## 4.6 LYSÉ DE LA FERMENTATION DE *E. COLI* B ER2566 PHEVS

Comme le graphique 6 montrant la lyse des cellules W3110, le graphique 12 permet d'observer la libération au cours du temps des protéines contenues dans les cellules d'*E. coli* B ER2566.

On relève une augmentation de la teneur en protéines dans le lysat durant les 12 premières minutes puis une stabilisation. Par conséquent, augmenter la durée de lyse au-delà de 15 minutes ne permettrait pas d'extraire beaucoup plus de protéines des cellules. Au final, la teneur en protéines dans le lysat avant clarification est proche de 34 g/l.

On peut encore noter qu'au début de la lyse, la concentration en protéines n'est pas de 0 g/l mais de 15 g/l. Comme elle a déjà été mentionnée dans le point 4.2, la raison la plus probable provient du tampon de lyse dans lequel la biomasse est resuspendue avant le passage au moulin à billes. Il semblerait que le tampon lyse ait détruit déjà une bonne partie des cellules, libérant ainsi des protéines.

La fabrication maison des billes de chitine n'est pas excessivement compliquée, mais plusieurs difficultés ont néanmoins été rencontrées.

Tout d'abord, la dissolution de certains composants peut prendre du temps et ne pas être complète. C'est notamment le cas lors de la dissolution de la chitine dans la solution de N,N-diméthylacétamide où des résidus ont été observés même après une agitation prolongée ou chauffage. Par conséquent, il est possible que la solution de chitine dans le DMAc/LiCl ne soit pas exactement à 0.5 % w/v.

Les « déchets » et autres résidus non dissous contenus dans la solution de chitine ont été en partie enlevés par filtration afin de faciliter le pompage de la solution et d'éviter la formation de caillot dans le tuyau ou la buse. Toutefois, il arrive que la buse se bouche ou que de grosses gouttes s'accumulent au bout de l'aiguille provoquant ainsi la formation de plus grosses billes de chitine. Ces dernières ont été éliminées à l'aide d'une passoire afin d'obtenir des billes de diamètre similaire.

La photographie 4 montre le montage employé lors de la fabrication des billes, tandis que la photographie 5 montre les billes de chitine nouvellement formées. Dès que la solution de chitine entre en contact avec l'éthanol, on observe une formation immédiate de billes translucides. Ces dernières deviennent opaques après quelques heures suite au changement de solvant qui s'opère, le N,N-diméthylacétamide étant progressivement remplacé par l'éthanol.

Une observation au microscope permet de se rendre compte de la taille des billes produites. Les photographies 6 et 7 montrent l'aspect des billes tandis que la répartition de la taille des billes est présentée au tableau 18. On constate que la taille des billes est relativement constante et que le diamètre moyen est d'environ 390  $\mu\text{m}$ . Les billes produites sont également de formes régulières et bien sphériques puisque le rapport  $\frac{\text{largeur}}{\text{hauteur}}$  est très proche de 1.

La photographie 8 permet d'observer au microscope optique les billes de chitine industrielles commercialisées par l'entreprise New England Biolabs (NEB) alors que le tableau 19 résume la répartition de taille des billes de chitine commerciales. On constate que le diamètre moyen est de 155  $\mu\text{m}$ , ce qui est 2.5 fois plus petits que les billes de fabrication maison. Les billes commerciales sont également bien sphériques puisque le rapport  $\frac{\text{largeur}}{\text{hauteur}}$  est lui aussi proche de 1. En revanche, la taille des billes est moins constante puisque des diamètres allant de 90 à 250  $\mu\text{m}$  ont été mesurés alors que pour les billes de fabrication maison, le diamètre moyen varie de 365 à 450  $\mu\text{m}$ .

Des billes plus petites ont l'avantage d'offrir une plus grande surface de contact (aire) pour un même volume de billes et augmentent les possibilités de fixation de l'intéine lors d'une chromatographie d'affinité. Le nombre de plateaux théoriques peut ainsi être augmenté en diminuant la taille des billes. Toutefois, il n'est pas possible, ni préférable d'utiliser des billes trop petites sinon les pertes de charge peuvent devenir trop élevées.

Il est aussi important de disposer de billes de diamètres similaires lorsque l'on effectue une chromatographie afin de disposer de conditions identiques dans toute la colonne. De cette manière, l'échantillon et le solvant se répartissent équitablement dans toute la colonne et il n'y a donc pas de formation de canaux préférentiels. La vitesse d'écoulement est également maintenue constante du début à la fin de la colonne de chromatographie.

L'efficacité des billes fabriquées a été testée et comparée avec les billes commerciales lors de l'essai de purification de la « maltose binding protein ». La MBP sert ici de témoin pour vérifier si le tag intéine qu'elle contient se lie correctement à la chitine dans l'optique d'une purification de la GFP-intéine par chromatographie d'affinité.

Finalement, les billes fabriquées sont stockées dans une solution aqueuse contenant 20% d'éthanol comme c'est le cas pour les billes commerciales NEB. En effet, lorsque les billes sont laissées à l'air libre trop longtemps, le solvant (éthanol) dans lequel la chitine a polymérisé s'évapore causant ainsi un rétrécissement irréversible des billes.

#### **4.8 PURIFICATION EN MODE BATCH DE LA GFP-INTÉINE À L'AIDE DE BILLES DE CHITINE COMMERCIALES**

Le tableau 20 qui résume la composition des deux lysats de départ utilisés pour la purification de la GFP-intéine montre qu'il existe une grande différence dans la teneur en protéines ainsi qu'en fluorescence. Bien que les deux cultures aient suivi le même protocole, on constate qu'une fermentation n'est pas un processus reproductible. En revanche, même si le matériel de départ utilisé pour la purification de la GFP-intéine n'est pas identique dans les deux cas, on remarque aux tableaux 21 et 22 ainsi qu'aux graphiques 13 à 16 que la tendance est globalement la même si l'on se fie à la fluorescence spécifique. En effet, concernant le tableau 21, la fluorescence spécifique initiale pour les 4 essais varie entre 1.3 et 2.0 [RFU/mg prot.] alors que pour le tableau 22, la fluorescence spécifique initiale varie entre 2.1 et 2.5 [RFU/mg prot.]. De même que pour le résultat final (après clivage) où l'on trouve une fluorescence spécifique proche de 37 [RFU/mg prot.] si l'on effectue une moyenne des valeurs obtenues lors des 4 essais pour les tableaux 21 et 22.

Concernant le tableau 21, on constate que la concentration en protéines totales diminue en moyenne de 15 g/l à 0.3 g/l environ entre le début et la fin de la purification. Ces résultats signifient que la quasi totalité des protéines contaminantes semblent avoir été éliminées. Si l'on observe la variation de la fluorescence, on remarque que celle-ci diminue en moyenne de 120 [RFU] à 30 [RFU] environ. En se basant sur ces résultats et ceux indiqués par le tableau 23, on peut prétendre que la purification de la GFP-intéine a été efficace. De plus, sur le graphique 14, on voit bien que la GFP-intéine a été purifiée de l'ordre de 20 fois pour 3 essais et même 40 fois pour le quatrième. Cette dernière valeur, étant nettement plus élevée que les trois autres sans raison apparente, doit être entachée d'erreurs.

Les résultats obtenus à partir du deuxième lysat et présentés dans le tableau 22 montrent la même tendance que dans le tableau 21. Par conséquent, les mêmes remarques faites précédemment s'appliquent également pour ces résultats. Les facteurs de purification présentés au tableau 23 se situent eux proche de 20 fois pour deux essais et entre 5 à 10 fois pour les deux autres essais restants.

Bien que les résultats obtenus semblent montrer une purification correcte de la protéine cible, ces derniers doivent être considérés avec précaution. En effet, la mesure de la fluorescence est souvent influencée par la composition du milieu dans lequel se trouve la GFP. De plus, la méthode de dosage des protéines par Bradford ne donne qu'une approximation de la concentration en protéines. Les très faibles concentrations de protéines (entre 0.2 et 0.7 g/l) mesurées lors de l'étape succédant au clivage de l'intéine peuvent grandement influencer la détermination de la fluorescence spécifique et expliquer les valeurs élevées.

Si l'on analyse les gels SDS (photographie 9 et 10) contenant des échantillons pris à différents stades de la purification de la GFP-intéine, on remarque immédiatement que la purification semble avoir nettement moins bien fonctionné.

Concernant le puits 1 de la photographie 9, on devrait observer une bande représentant la GFP-intéine située à 57 kDa. Pour rappel, la GFP est une protéine de 27 kDa tandis que l'intéine est une protéine de 30 kDa. Parmi toutes les bandes, on en distingue toutefois une située sous le marqueur de 60 kDa qui pourrait correspondre à notre protéine cible.

Les puits 2 à 5, correspondant aux surnageants prélevés après un contact prolongé entre la chitine et le lysat, montrent des nombreuses bandes dont celle identifiée précédemment pour le puits 1 et qui pourrait représenter la GFP-intéine. Si tel est le cas, cela signifierait que le marqueur intéine ne s'est pas correctement fixé à la chitine puisque l'on trouve déjà notre protéine cible dans le surnageant alors qu'aucune élution ou clivage n'a été effectué.

Les puits 6 à 9, qui correspondent à l'étape de lavage de la chitine, montrent les mêmes bandes qu'aux puits 2 à 5. Cela signifie qu'en lavant la chitine, on élimine ainsi la majorité des protéines contaminantes, mais également la protéine d'intérêt.

Finalement, les puits 10 à 13 correspondant à l'étape succédant au clivage de l'intéine montrent les mêmes bandes que les puits précédents, mais d'intensité plus faible car les échantillons ont été dilués lors des différentes étapes. En théorie, si la fixation de l'intéine à la chitine de même que l'étape de clivage ont lieu correctement, on ne devrait observer qu'une bande à 27 kDa correspondant à la GFP seule. Comme ce n'est pas le cas ici, on en déduit que la purification de la GFP-intéine n'a pas fonctionné correctement.

Les bandes obtenues lors du deuxième gel (photographie 10) ne sont pas identiques, mais les résultats vont dans le même sens que ceux du premier gel. A nouveau, dans le cas où la purification et le clivage de l'intéine fonctionne, on ne devrait observer dans les puits 10 à 13 qu'une bande à 27 kDa correspondant à la GFP.

Comme la méthode d'adsorption en mode batch employée lors de la purification de la GFP-intéine semble ne pas fonctionner convenablement, d'autres tests ont été effectués en utilisant une protéine de contrôle : la maltose binding protein. Des essais ont été menés en conservant le même mode opératoire que lors de la purification de la GFP-intéine afin de déterminer si la non-purification pouvait venir d'une mauvaise utilisation du procédé d'adsorption. Un essai de chromatographie d'affinité utilisant une colonne remplie de billes de chitines a également été effectué afin d'observer si la purification était plus efficace en procédant de cette manière. Cette dernière approche a aussi permis de comparer l'efficacité des billes de chitine fabriquées avec les billes de chitine commerciales.

#### 4.9 CONTRÔLE DU COUPLAGE INTÉINE-CHITINE ET TEST D'EFFICACITÉ DES BILLES « MAISON »

Les résultats (photographie 11) du premier essai de purification en mode batch de la MBP sont difficiles à analyser puisque les bandes recherchées ne sont pas identifiables. Théoriquement, les mêmes bandes que celles obtenues sur la figure 5 devraient être visibles. Or, n'étant pas le cas ici, le deuxième essai (photographie 12) sera analysé car les résultats semblent plus corrects.

Dans les puits 1, 4, 7 et 10 contenant des échantillons de fermentation non-induite, la MBP qu'elle soit couplée au marqueur intéine ou non n'est visible nulle part, ce qui est attendu.

Les puits 2 et 3 contenant un échantillon de la culture induite à l'IPTG montrent une bande proche de 70 kDa qui est très certainement la MBP (40.8 kDa) couplée au marqueur intéine (~30 kDa). Ces deux bandes sont également visibles dans les puits 5 et 6 lorsque le lysat est mis en contact avec la chitine. Leur présence signifie que l'intéine ne s'est pas liée efficacement à la chitine puisque la MBP est présente dans le surnageant. De plus, après l'étape de lavage de la chitine (puits 8 et 9) on distingue de nouveaux faiblement ces bandes à 70 kDa confirmant le mauvais attachement de l'intéine à la chitine.

Dans les puits 11 et 12, une bande à 40 kDa représentant la MBP après l'étape de clivage devrait être visible, comme c'est le cas des puits 8 et 9 de la figure 5. Ici, aucune bande n'est visible car soit le complexe MBP-intéine ne s'est pas fixé correctement à la chitine, soit le clivage n'a pas fonctionné. Il s'agit probablement d'un peu des deux et il se peut que l'intéine doive être attachée à la chitine pour qu'un clivage efficace puisse se faire. Si aucune bande n'est clairement visible, c'est aussi parce que les protéines ont été diluées lors des différentes étapes de purification.

Les puits 13 et 14 correspondent au « stripping » de la chitine. Cette étape permet d'éliminer tout ce qui a pu rester attaché à la chitine. En théorie (figure 5), une bande à 30 kDa représentant le marqueur intéine seul doit être visible. Comme ce n'est pas le cas ici, on peut supposer que cette méthode de purification en mode batch n'est pas efficace. En revanche, d'autres bandes sont visibles mais aucune ne semble correspondre au complexe MBP-intéine (70 kDa) ni à la MBP seule (40 kDa). En effet, la bande à 70 kDa visible dans les puits 2, 3, 5 et 6 correspondant au complexe MBP-intéine est absente des puits 13 et 14.

Lors de cet essai, les deux types de chitines (fabriquées et commerciales) ont été testés et les résultats obtenus sont très similaires. Par conséquent, les billes de chitine de fabrication maison semblent se comporter de la même manière que les billes commerciales de New England Biolabs.

A noter encore que dans presque tous les puits, une bande intense est visible à 15 kDa. Cette dernière correspond au lysozyme qui a été ajouté au lysat afin de détruire plus efficacement les membranes cellulaires.

Finalement, les résultats des deux essais de purification de la MBP tendent à montrer que le procédé de purification utilisant les billes de chitine en mode batch ne permet pas de purifier une protéine liée à un marqueur intéine. Par conséquent, il est probable que la GFP-intéine ne puisse pas être purifiée en procédant de cette manière. Pour cette raison, une deuxième approche a été testée afin de purifier la MBP et d'obtenir de meilleurs résultats. Cette dernière utilisant une colonne remplie de billes de chitine se base sur le principe de la chromatographie d'affinité et les mêmes étapes qu'une

chromatographie classique sont présentes à savoir : mise à l'équilibre, injection de l'échantillon, lavage, clivage et élution.

Les résultats employant la seconde méthode sont visibles à la photographie 13. Ces derniers sont plus conformes à la théorie (figure 5) et à ce qui doit normalement être obtenu.

Dans les puits 2 et 9, une bande à 70 kDa correspondant au complexe MBP-intéine est visible alors qu'elle est absente du puits 1 puisque la culture n'a pas été induite.

La présence de cette même bande dans le puits 3 et 10 semble indiquer que toute la MBP-intéine n'a pas été fixée par la chitine, aussi bien par la commerciale (3) que par la fabriquée (10).

Les puits 4 et 11 correspondent à l'étape de lavage de la chitine. Comme aucune bande, hormis celle du lysozyme (15 kDa) n'est visible, cela signifie que toutes les protéines indésirées ont été éliminées.

Les puits 5 et 12 montrent que lors de l'ajout du DTT, le clivage de l'intéine ne se fait pas immédiatement. C'est la raison pour laquelle l'élution n'a pas lieu tout de suite mais uniquement après 12 à 24 heures suivant l'ajout du DTT afin d'obtenir un meilleur taux de clivage.

Les puits 6 et 13 montrent une bande à 40 kDa qui correspond à la MBP débarrassée de son marqueur intéine. Cette méthode de purification semble nettement plus efficace que la première puisque cette fois-ci, il a été possible de récupérer la MBP seule. De plus, aucune bande à part celle à 40 kDa n'est visible. Il reste toutefois celle correspondant au lysozyme (15 kDa) et il serait peut-être préférable de ne pas en ajouter lors de la lyse des cellules afin qu'il ne contamine pas notre produit d'intérêt.

Les puits 8 et 14, qui correspondent au « stripping » de la chitine, ne montrent pas de bande à 30 kDa comme on pourrait s'y attendre. Cette dernière est visible au puits 10 de la figure 5 mais pas sur le gel de la photographie 13 car le marqueur n'est probablement pas en concentration suffisante pour être visible. En revanche, on retrouve la MBP à 40 kDa ce qui signifierait que la MBP est également fixée par la chitine. D'autres bandes sont également présentes alors qu'elles étaient absentes après l'étape de lavage. Il semblerait alors que la chitine ait fixé d'autres protéines que l'intéine et que par conséquent elle ait une affinité pour d'autres protéines que l'intéine. Cela signifierait que la spécificité de la chitine pour l'intéine ne soit pas totale.

## 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans l'ensemble, les fermentations fed-batch des souches *E. coli* W3110 et B ER2566 se sont déroulées correctement. Pour chacune, les différentes phases à savoir, phase de latence, croissance exponentielle et phase stationnaire, ont pu être observées.

Les diverses analyses effectuées telles que la détermination de la concentration en substrat, l'évolution de la biomasse et de la densité optique, etc. montrent que les souches ont poussé convenablement. En revanche, l'absence de mesures de la fluorescence durant les cultures n'a pas pu permettre de suivre on-line la production de GFP.

Lors de ce travail de diplôme, le souhait était de purifier la GFP-UV à l'aide de diverses méthodes et de comparer les résultats avec ceux obtenus lors de la purification d'une GFP couplée à un marqueur d'affinité tel que l'intéine. Bien qu'il existe de nombreuses méthodes pour purifier la GFP-UV, trois ont été retenues.

La première, celle de l'extraction à l'éthanol, est un procédé comportant deux étapes successives permettant d'éliminer en partie les protéines contaminantes. Cette méthode a l'avantage d'être simple à mettre en place et ne demande aucun appareil sophistiqué. Les résultats semblent encourageants puisque la GFP-UV a pu être purifiée de l'ordre de 15 à 20 fois.

La deuxième méthode fait appel au caractère hydrophobe de la GFP. Les essais de chromatographie d'interactions hydrophobes n'ont permis de purifier la GFP-UV que 2.4 fois environ.

Finalement, une troisième méthode de purification par chromatographie échangeuse d'anions a été réalisée. Les résultats obtenus sont assez similaires à ceux de la chromatographie d'interactions hydrophobes puisque la GFP-UV a pu être purifiée 2.3 fois.

Il me semble important de rappeler que les résultats acquis par ces trois méthodes doivent être considérés avec prudence. En effet, lors des mesures de fluorescence pour le dosage de la GFP, on constate que la fluorescence peut varier en fonction de la composition du milieu. Il semblerait que certains éléments (turbidité, viscosité, présence d'autres protéines, etc.) agissent sur la mesure de la fluorescence.

Les essais de purification de la GFP-intéine à l'aide des billes de chitine commerciales n'ont pas apporté les résultats espérés. En se basant uniquement sur les mesures de fluorescence spécifique, on serait amené à croire que la purification s'est bien déroulée, comme le montre les graphiques 14 et 16. De plus, les facteurs de purification présentés au tableau 23, tendent à montrer que la GFP a pu être purifiée en moyenne 20 fois. Ces bons résultats doivent cependant être relativisés si l'on se réfère aux gels SDS effectués avec les différents échantillons prélevés au cours du processus de purification. En effet, aux photographies 9 et 10, une bande unique à 27 kDa visible dans les puits 10 à 13 aurait confirmé une purification efficace de la GFP. Comme ce n'est pas le cas, on en déduit que la méthode de purification en mode batch de la GFP-intéine n'est pas appropriée.

Les essais de purification de la « maltose binding protein » semblent confirmer l'hypothèse émise précédemment. En effet, les résultats obtenus lors de la purification en mode batch de la MBP montrent que l'intéine semble ne pas se fixer efficacement à la chitine, qu'elle soit d'origine commerciale ou artisanale. Par conséquent, le clivage de l'intéine ne peut avoir lieu et il n'est pas

possible de récupérer une protéine d'intérêt sans son marqueur. Comme la purification de la MBP n'a pas été possible, il est évident qu'aucune purification efficace de la GFP-intéine ne puisse avoir lieu avec ce type de procédé.

En revanche, la technique utilisant une colonne remplie de billes de chitine et fonctionnant selon le principe d'une chromatographie d'affinité apporte des résultats bien plus encourageants. La photographie 13 montre des résultats conformes à la théorie (figure 5) et une purification d'une protéine d'intérêt couplée à un marqueur intéine peut être envisagée.

La fabrication des billes de chitine s'est correctement déroulée et des billes de diamètre constant (390  $\mu\text{m}$ ) ont pu être produites. Ces dernières sont plus grandes que celles fournies par l'entreprise New England Biolabs (155  $\mu\text{m}$ ), mais présentent une géométrie plus sphérique et une dispersion de taille moins importante.

Les essais de purification de la MBP montrent des résultats similaires lorsque des billes fabriquées ou commerciales sont employées. Par conséquent, les billes artisanales se comportent de la même manière que les billes commerciales et peuvent être employées dans des processus de purification de protéines contenant un marqueur intéine.

Dans l'avenir, l'accent devra être mis particulièrement sur la purification de la GFP-intéine. En effet, la purification de la GFP-UV ne pose plus de problèmes majeurs et le procédé de fabrication des billes de chitine est maintenant compris, tandis que des difficultés subsistent à la fois dans la production et la purification de la GFP-intéine. Si l'on se réfère à la fluorescence du lysat obtenu après la fermentation d'*E. coli* B ER2566 (117 à 329 RFU), on constate que cette dernière est nettement inférieure à celle du lysat de la fermentation d'*E. coli* W3110 (5172 RFU). Cet écart peut provenir en partie de la différence de composition des deux lysats, mais également de la conformation de la GFP. Toutefois, la raison la plus probable est une différence de productivité de la protéine d'intérêt de la part des deux souches. Si l'on souhaite obtenir une purification efficace de la GFP-intéine, il est nécessaire de disposer d'une quantité suffisante dès le début du processus.

A partir de là, la méthode employant les billes de chitine dans une colonne de chromatographie peut être employée afin de purifier la GFP-intéine. Le gel (photographie 13) contenant des échantillons pris à différentes étapes de la purification de la MBP a montré des résultats encourageants. Par conséquent, une purification de la GFP-intéine peut être envisagée en utilisant la méthode de chromatographie d'affinité.

## 6. BIBLIOGRAPHIE

- [1] Jones J. et al., *Potential of real-time measurement of GFP-fusion protein*, Journal of Biotechnology 109 (2004) 201-211
- [2] Samarkina O. et al., *Universal and rapid method for purification of GFP-like proteins by the ethanol extraction*, Protein Expression and Purification 65 (2009) 108–113
- [3] Pott J., *Production de green fluorescent protein (GFP) par une souche recombinante de Escherichia coli*, Travaux pratiques de Bioprocédés, 2010, HEVS, Sion
- [4] Makino K. et al., *Regulation of the phosphate regulon of Escherichia coli K-12 : regulation and role of the regulatory gene phoR*, Journal of Molecular Biology, 184(2), pp 231-240, (1995)
- [5] Zhou X. et al., *Rapid purification of enhanced Green Fluorescent Protein from Escherichia coli*, Chinese J. Chem. Eng., 14(2) 229-234, (2006)
- [6] Sharma S. et al., *Intein-mediated protein purification of fusion proteins expressed under high-cell density conditions in E. coli*, Journal of Biotechnology 125 (2006) 48-56
- [7] Widmer F. et al., *Aide-mémoire de biochimie et de la biologie moléculaire*, Editions médicales internationales, Lavoisier, 2004
- [8] Rinaudo M., *Chitin and chitosan : properties and applications*, Progress in Polymer Science 31 (2006) 603-632
- [9] Yilmaz E. et al., *Preparation and characterization of physical gels and beds from chitin solutions*, Carbohydrate Polymers, 54 (2003) 479-488
- [10] Marison I., *Recombinant protein expression and purification*, Travaux pratiques de Biotechnologie, 2003/2004, HEVS, Sion
- [11] Protein Expression & Analysis, IMPACT kit, Instruction Manual, New England Biolabs, Ipswich, USA
- [12] Pistoletti G. et al., *Dosage des protéines totales selon Bradford*, Travaux pratiques de DSP, HEVS, Sion
- [13] GFP Quantification Kit, Fluorometric, Product Manual, Catalog Number AKR-120, Cell Biolabs, San Diego (USA)
- [14] Eyer K., Pott J., *Production of GFP-UV using phosphonate plasmid with E. coli strain W3110*, Travaux pratiques de bioprocédés 2009/2010, HEVS, Sion

- [15] Deschamps J. et al., *Rapid purification of recombinant Green Fluorescent Protein using the hydrophobic properties of an HPLC size-exclusion column*, protein expression and purification 6, 555-558 (1995)
- [16] Crelier S., *Chromatographie*, Travaux pratiques de DSP 1 – classe B5, octobre 2009, HES-SO Valais, Sion
- [17] Dong-eun C. et al., *Acetate metabolism in a pta mutant of Escherichia coli W3110: Importance of maintaining acetyl coenzyme a flux for growth and survival*, Journal of Bacteriology, 6656-6663 (1999)
- [18] Pohling E-K., *Klonierung des GFPuv-Gens in einen Intein-Vektor und Aufreinigung des GFP mit dem IMPACT-CN-System von New England Biolabs*, Bericht über das zweite Praktisches Studiensemester, HEVS, Sion, 2003
- [19] De Lavallaz G., *Purification de GFP à l'aide d'un marqueur d'affinité*, Projet 3 de Downstream Processing, avril 2010, HEVS, Sion
- [20] Jain S. et al., *Purification of green Fluorescent protein overexpressed by a mutant recombinant Escherichia coli*, Protein Expression and Purification 36 (2004) 76–81
- [21] Anthamatten D. et al, *Isolation de GFP à partir d'une culture d'E. coli recombinante*, travail pratique de downstream processing, avril 2009, HEVS, Sion

## Annexe 1 : Courbes calibration pour le dosage des protéines totales

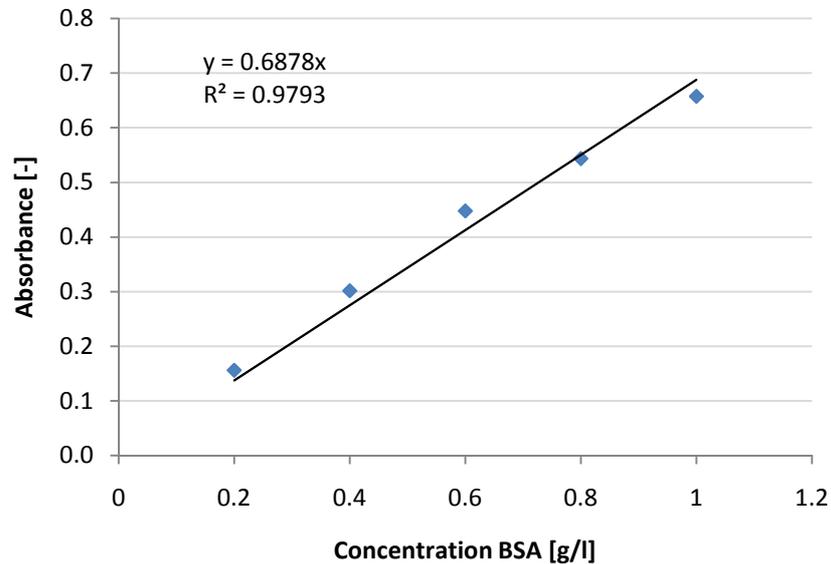


Figure 8 : courbe de calibration pour le dosage des protéines contenues dans les échantillons obtenus par extraction à l'éthanol

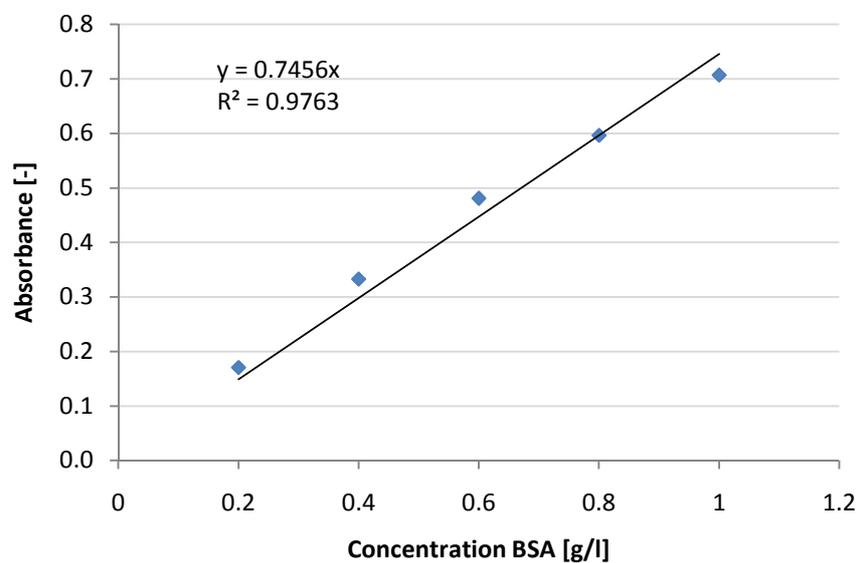


Figure 9 : courbe de calibration pour le dosage des protéines contenues dans les échantillons obtenus par HIC

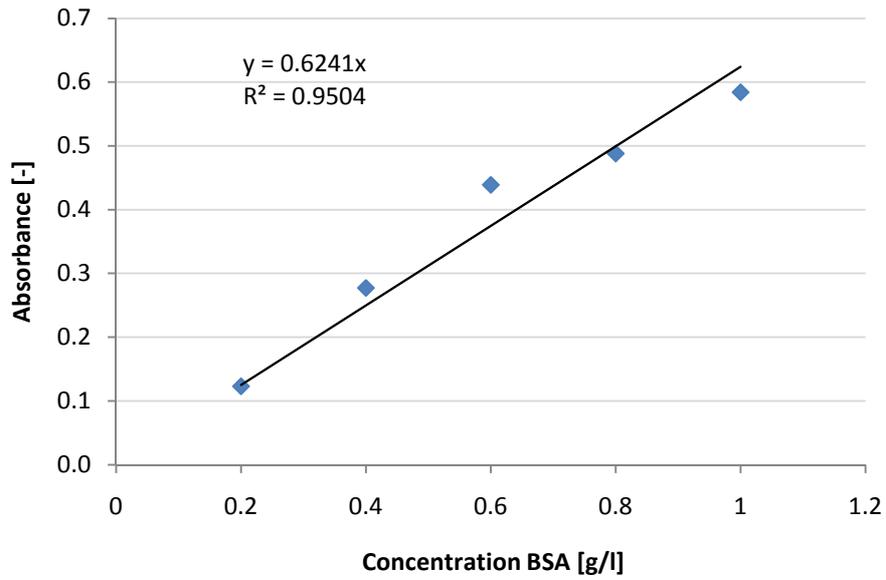


Figure 10 : courbe de calibration pour le dosage des protéines contenues dans les échantillons obtenus par IEX

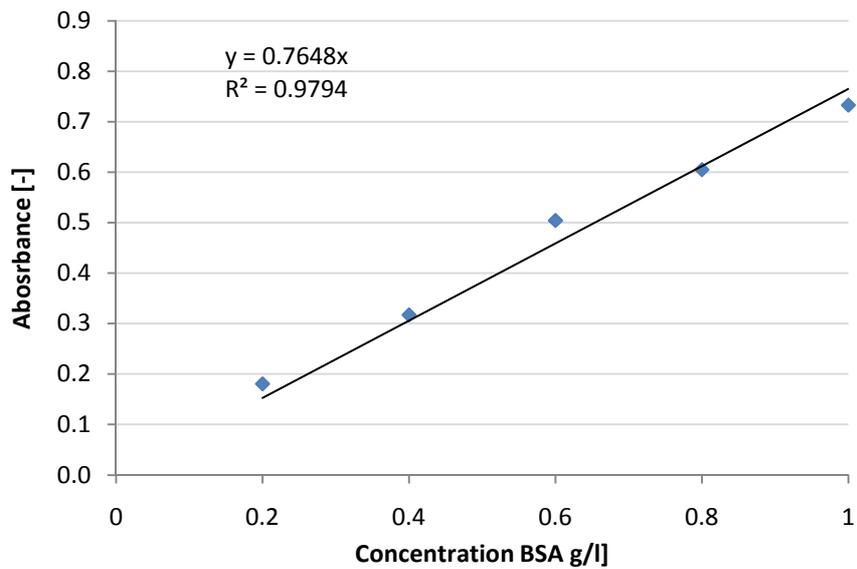


Figure 11 : courbe de calibration pour le dosage des protéines contenues dans les échantillons obtenus lors de la purification de la GFP-intéine

## Annexe 2 : Mesure de standards en fluorescéine

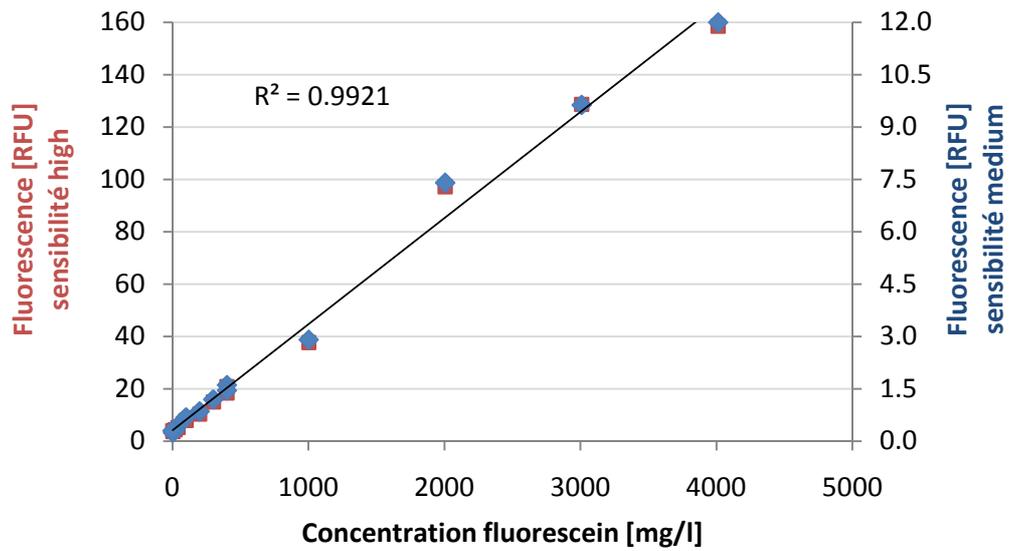
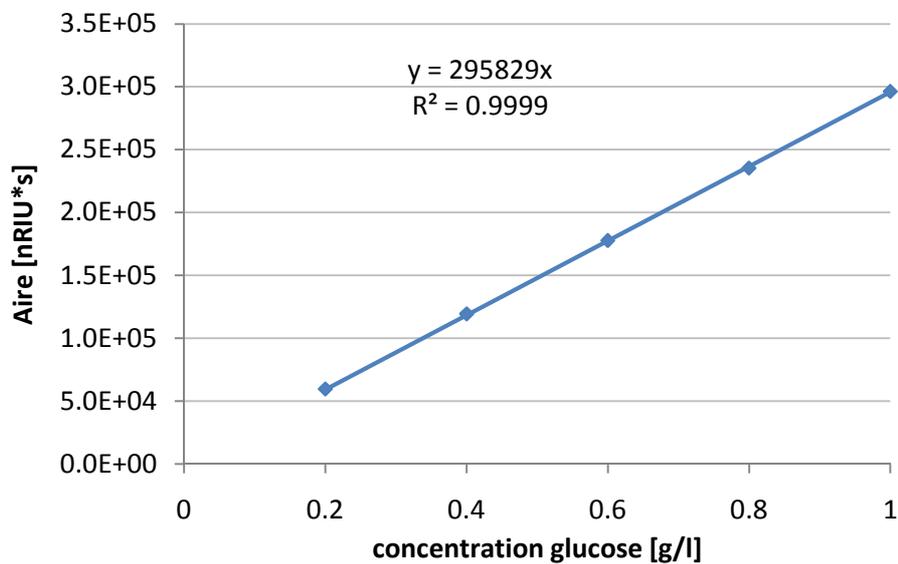


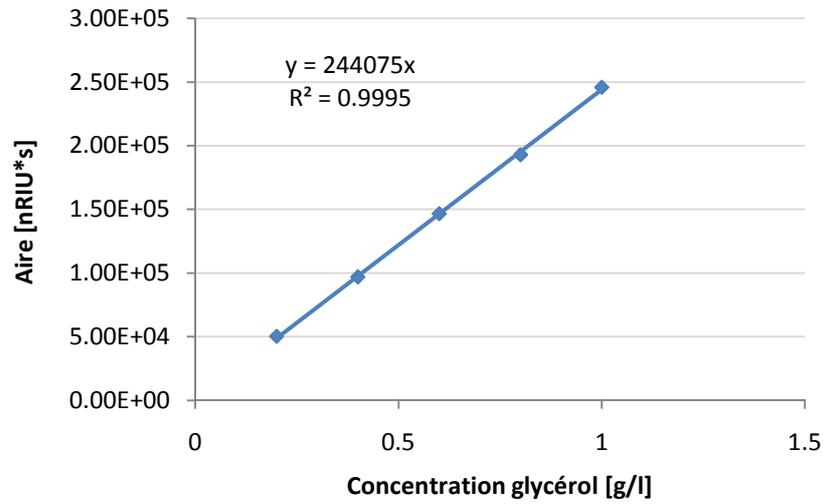
Figure 12 : mesure de la fluorescence à partir de standard en fluorescéine

## Annexe 3 : Courbe calibration pour le dosage du glucose



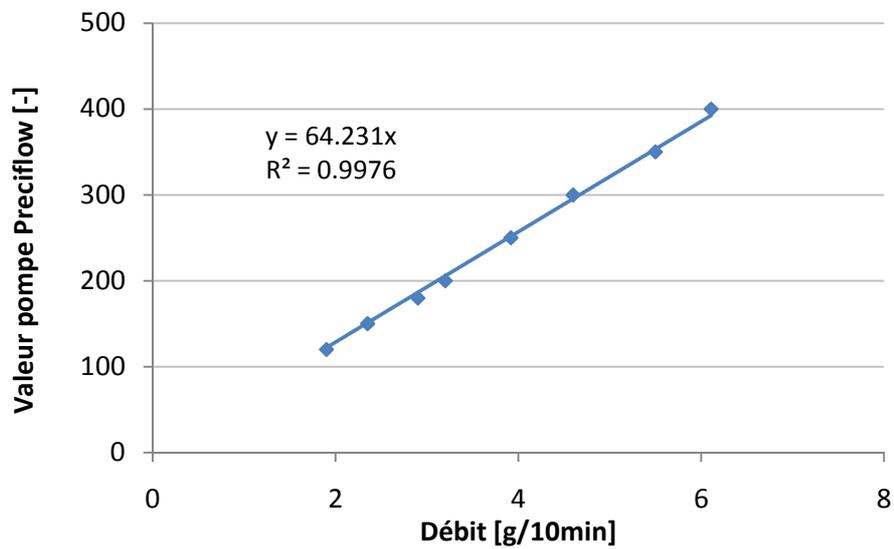
Graphique 17 : courbe de calibration du glucose

#### Annexe 4 : Courbe calibration pour le dosage du glycérol



Graphique 18 : courbe de calibration du glycérol

#### Annexe 5 : Calibration de la pompe pour le feed d'*E. coli* B ER2566 pHEVS



Graphique 19 : courbe de calibration pour la pompe Preciflow de Lambda

## Annexe 6 : Données de la fermentation d'*E. coli* W3110

Tableau 24 : résultats fermentation *E. coli* W3110

Tube n°	Temps culture [h]	Masse à vide sans bouchon [g]	OD 600 nm brut [-]	OD 600 nm sans blanc	Facteur de dilution	OD 600 nm [-]	OD 600 nm moyenne [-]	Ln(DO)	Masse tube biomasse sèche [g]	biomasse sèche [g/l]	moyenne biomasse sèche [g/l]	moyenne réelle biomasse sèche [g/l]	ln(biomasse sèche)	pO2 [%]	T [°C]	RPM [-]	pH [-]
0'	0	5.4726	-	-	-	-	-	-	5.4779	1.06	0.68	0.00	-	-	-	-	-
		5.5144							5.5159	0.3							
		-							-	-							
0	0	5.4805	-	0	1	0	0.00	0.00	5.4874	2.3	1.83	1.15	0.140	101	30	800	7.1
		5.4452	-	0	1	0			5.452	1.36							
		5.5147	-	0	1	-			5.5228	-							
1	12.7	5.4636	0.71	0.554	10	5.54	5.38	1.68	5.4767	2.62	2.69	2.01	0.696	74.5	30	880	8.1
		5.4694	0.7	0.55	10	5.5			5.4832	2.76							
		5.4609	0.66	0.51	10	5.1			5.4743	2.68							
2	13.8	5.4672	0.54	0.387	20	7.74	7.71	2.04	5.4867	3.9	3.63	2.95	1.083	57.3	30	900	7.3
		5.4617	0.54	0.384	20	7.68			5.4786	3.38							
		5.4622	-	-	20	-			5.4803	3.62							
3	14.8	5.4732	0.3	0.148	50	7.4	7.60	2.03	5.4932	4	3.85	3.17	1.153	57.5	30	885	7.3
		5.468	0.31	0.154	50	7.7			5.4855	3.5							
		5.4621	0.31	0.154	50	7.7			5.4823	4.04							
4	16.3	5.4739	0.36	0.21	50	10.5	10.40	2.34	5.4965	4.52	4.67	3.99	1.383	29.9	30	938	7.0
		5.4444	0.36	0.206	50	10.3			5.4679	4.7							
		5.4682	0.36	0.208	50	10.4			5.4921	4.78							
5	17.3	5.4707	0.43	0.273	50	13.7	13.83	2.63	5.4975	5.36	5.50	4.82	1.573	32	30	1054	7.5
		5.4615	0.43	0.275	50	13.8			5.4887	5.44							
		5.4407	0.44	0.282	50	14.1			5.4692	5.7							
6	18.8	5.4673	0.35	0.196	100	19.6	19.35	2.96	5.5057	7.68	7.64	6.96	1.940	29.6	30	1283	7.2
		5.4622	0.35	0.191	100	19.1			5.4998	7.52							
		5.4805	-	-	-	-			5.5191	7.72							
7	19.8	5.474	0.42	0.264	100	26.4	25.37	3.23	5.5151	8.26	8.42	7.74	2.046	31.7	30	903	7.3
		5.4966	0.39	0.234	100	23.4			5.5384	8.36							
		5.4689	0.42	0.263	100	26.3			5.5121	8.64							
8	20.8	5.5146	0.45	0.296	100	29.6	29.90	3.40	5.5606	9.2	9.33	8.65	2.158	32.5	30	900	7.0
		5.4787	0.46	0.302	100	30.2			5.525	9.26							
		5.4457	-	-	-	-			5.4934	9.54							
9	22.3	5.471	0.5	0.347	100	34.7	34.50	3.54	5.5259	10.98	11.04	10.36	2.338	31.8	30	903	8.0
		5.47	0.5	0.343	100	34.3			5.5241	10.92							
		5.4811	-	-	-	-			5.5372	11.22							
10	38.8	5.4563	0.4	0.246	200	49.2	48.50	3.88	5.537	16.14	16.04	15.36	2.732	31	30	1226	7.3
		5.472	0.39	0.239	200	47.8			5.5527	16.14							
		5.4466	-	-	-	-			5.5258	15.84							
11	39.8	5.4433	0.39	0.24	200	48	47.10	3.85	5.523	15.94	15.89	15.21	2.722	29.5	30	1129	7.2
		5.4817	0.39	0.231	200	46.2			5.5625	16.16							
		5.4424	-	-	-	-			5.5203	15.58							
12	40.8	5.5144	0.4	0.245	200	49	49.10	3.89	5.5937	15.86	15.92	15.24	2.724	27.7	30	1234	7.1
		5.4677	0.4	0.246	200	49.2			5.5467	15.8							
		5.4615	-	-	-	-			5.542	16.1							
13	42.3	5.5158	0.43	0.276	200	55.2	55.10	4.01	5.5935	15.54	15.84	15.16	2.719	30.2	30	1228	7.0
		5.4625	0.43	0.275	200	55			5.5397	15.44							
		5.4633	-	-	-	-			5.546	16.54							
14	43.3	5.5144	0.43	0.273	200	54.6	52.60	3.96	5.5969	16.5	16.21	15.53	2.743	30	30	1160	8.0
		5.4801	0.41	0.253	200	50.6			5.5597	15.92							
		5.5137	-	-	-	-			5.5947	16.2							

## Annexe 7 : Chromatogrammes de la purification de GFP-UV par HIC

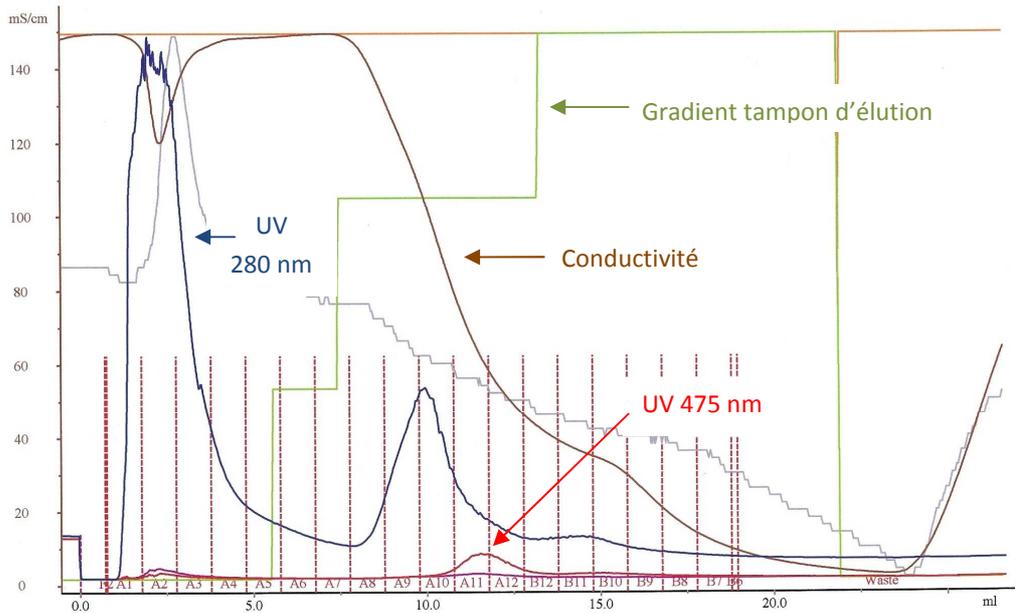


Figure 13 : chromatographie n°1, colonne HiTrap Phenyl HP avec méthode 1

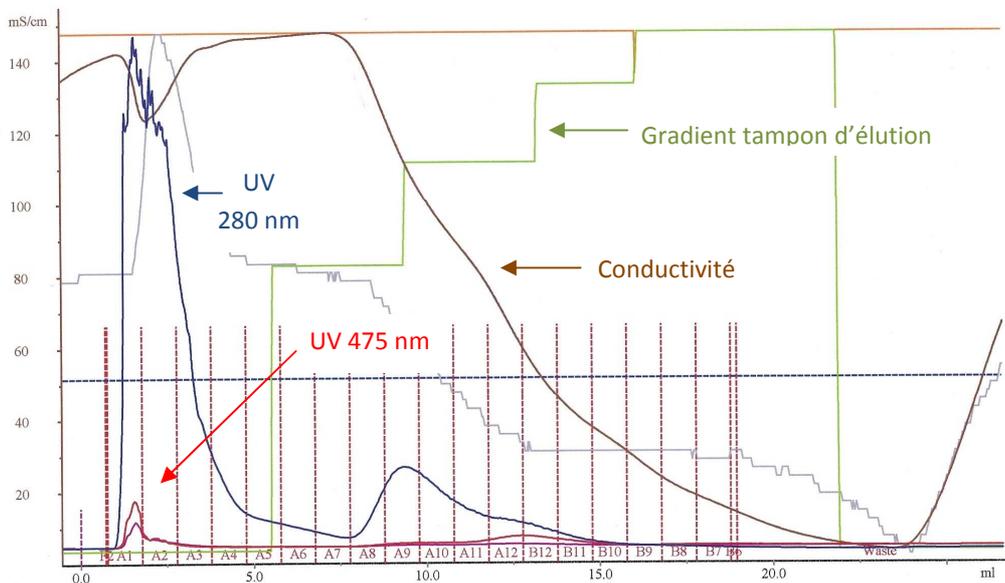


Figure 14 : chromatographie n°2, colonne HiTrap Phenyl HP avec méthode 2

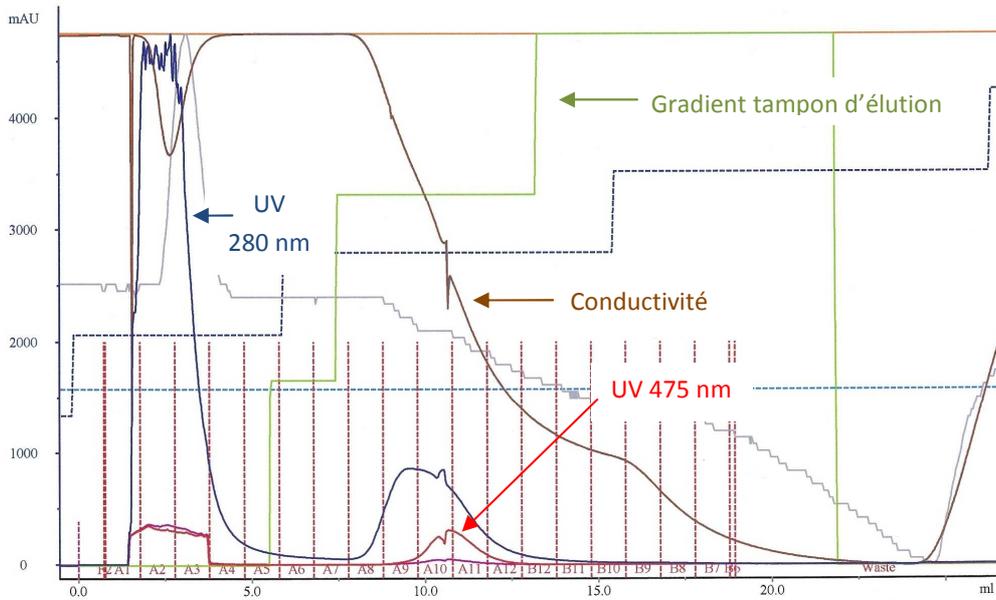


Figure 15 : chromatographie n°3, colonne HiTrap Butyl FF avec méthode 1

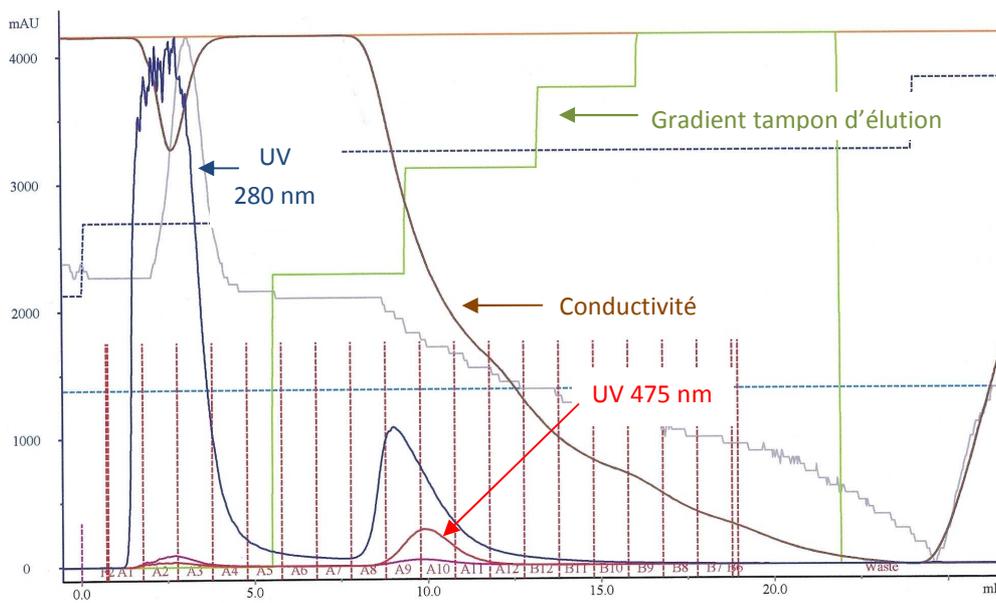


Figure 16 : chromatographie n°4, colonne HiTrap Butyl FF avec méthode 2

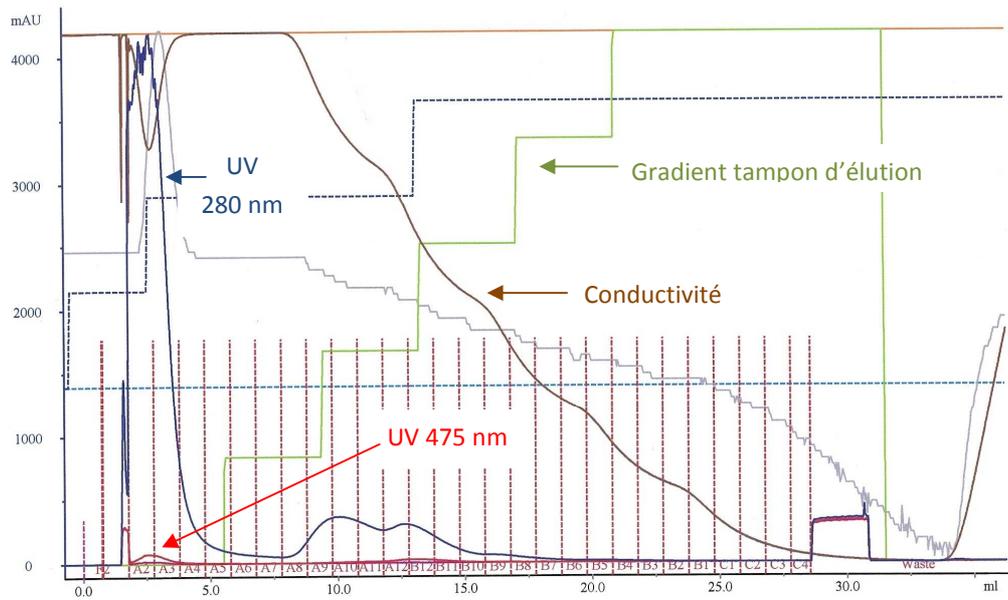


Figure 17 : chromatographie n°5, colonne HiTrap Butyl FF avec méthode 3

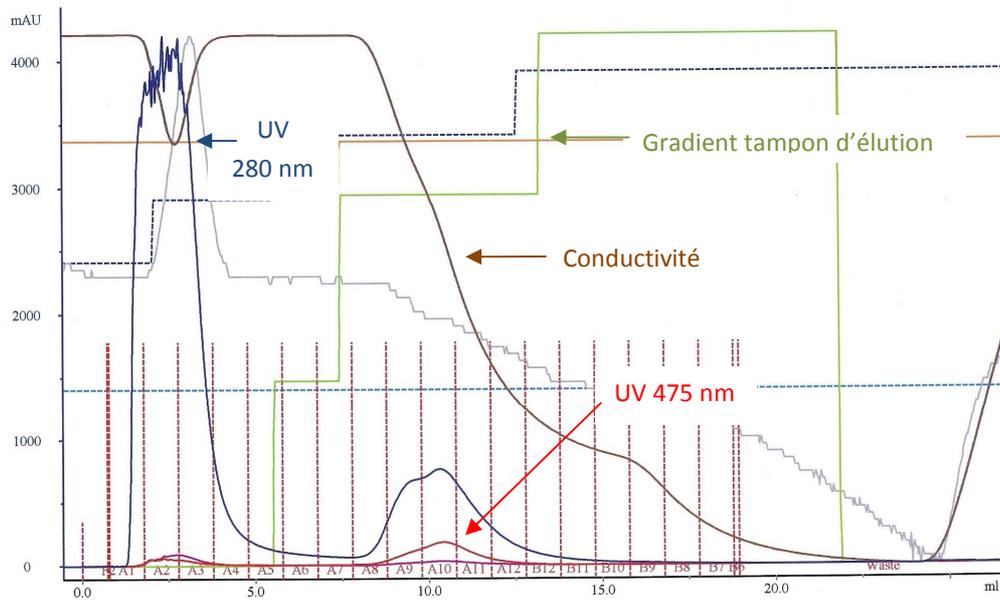


Figure 18 : chromatographie n°6, colonne HiTrap Octyl FF avec méthode 1

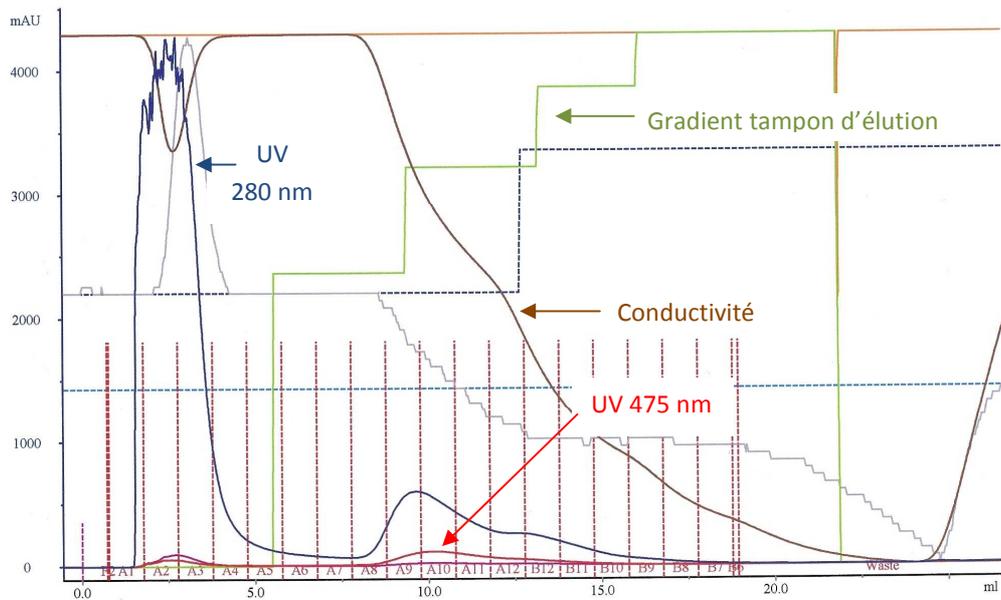


Figure 19 : chromatographie n°7, colonne HiTrap Octyl FF avec méthode 2

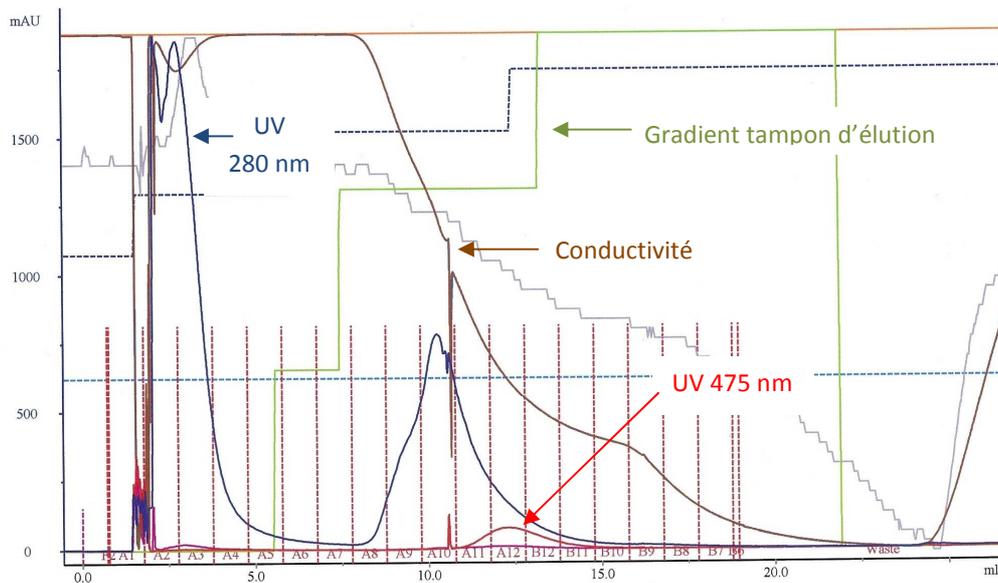


Figure 20 : chromatographie n°9, colonne HiTrap Penyl FF avec méthode 1

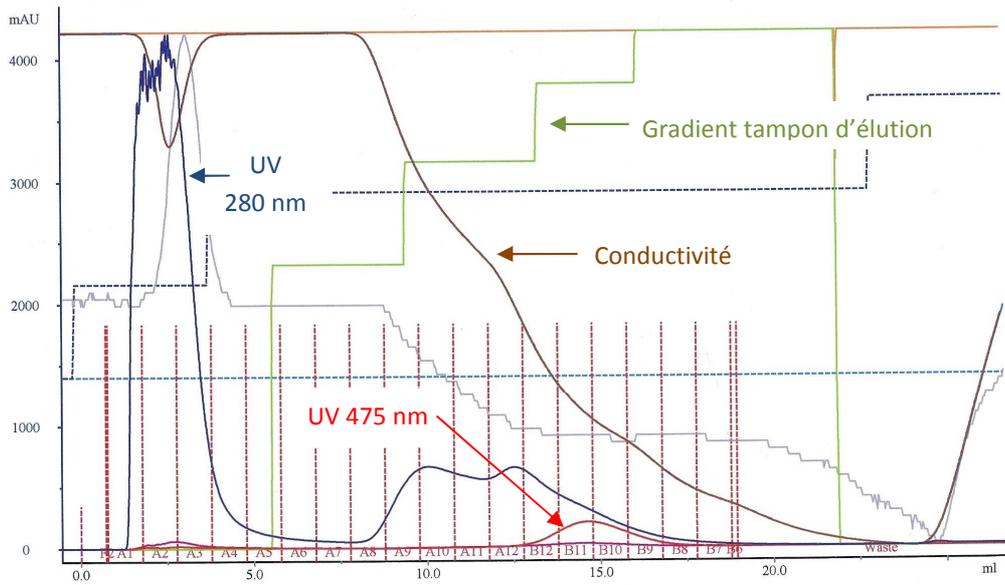


Figure 21 : chromatographie n°10, colonne HiTrap Penyl FF avec méthode 2

## Annexe 8 : Chromatogrammes de la purification de GFP-UV par IEX

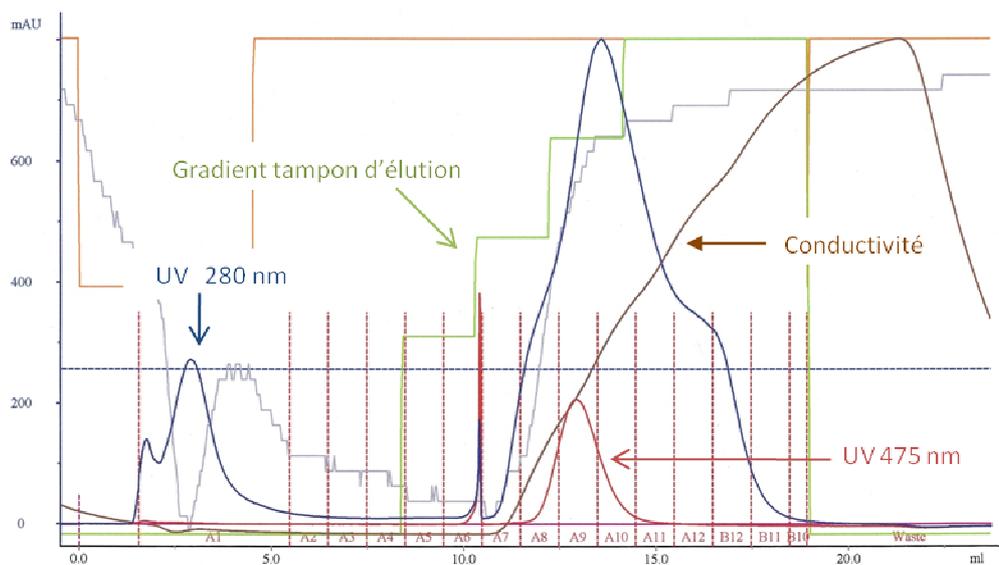


Figure 22 : chromatographie IEX n°2 avec méthode 2

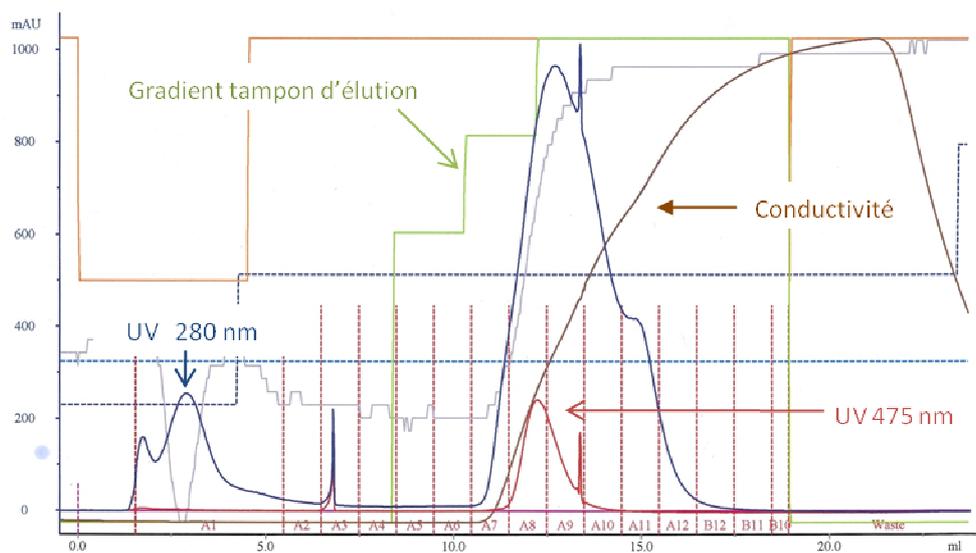


Figure 23 : chromatographie IEX n°3 avec méthode 3

## Annexe 9 : Données de la fermentation d'*E. coli* B ER2566 pHEVS

Tableau 25 : résultats fermentation *E. coli* B ER2566 pHEVS

Tube n°	Temps culture [h]	Masse à vide sans bouchon [g]	OD 600 nm brut [-]	OD 600 nm sans blanc	Facteur de dilution	OD 600 nm [-]	OD 600 nm moyenne [-]	Ln(DO)	Masse tube biomasse sèche [g]	biomasse sèche [g/l]	moyenne biomasse sèche [g/l]	ln(biomasse sèche)	pO2 [%]	T [°C]	RPM [-]	pH [-]
0'	0									0						
										0						
										0						
0	0.2	5.3098	0.557	0.557	1	0.003	0.00	-7.31	5.3107	0.30	0.10	-2.303	99	30	405	6.8
		5.4262	0.555	0.555	1	0.001			5.4267	0.17						
		5.482	0.553	0.553	1	-0.001			5.4815	-0.17						
1	14.8	5.4016	0.224	2.240	10	1.686	1.67	0.51	5.4036	0.67	0.67	-0.405	51	30	555	6.6
		5.3934	0.222	2.220	10	1.666			5.3955	0.70						
		5.4004	0.221	2.210	10	1.656			5.4023	0.63						
2	15.8	5.3958	0.304	3.040	10	2.486	2.43	0.89	5.399	1.07	0.90	-0.105	30	30	557	6.9
		5.3898	0.293	2.930	10	2.376			5.3923	0.83						
		5.4166	0.297	2.970	10	2.416			5.419	0.80						
3	16.8	5.3815	0.454	4.540	10	3.986	3.93	1.37	5.3847	1.07	1.07	0.065	30	30	623	6.8
		5.4566	0.452	4.520	10	3.966			5.4601	1.17						
		5.3807	0.438	4.380	10	3.826			5.3836	0.97						
4	17.8	5.387	0.296	5.920	20	5.366	5.37	1.68	5.3921	1.70	1.77	0.569	30	30	704	6.7
		5.4553	0.291	5.820	20	5.266			5.4608	1.83						
		5.3908	0.302	6.040	20	5.486			5.3961	1.77						
5	18.8	5.4	0.424	8.480	20	7.926	8.34	2.12	5.4073	2.43	2.58	0.947	30	30	799	6.7
		5.4127	0.468	9.360	20	8.806			5.4209	2.73						
		5.4007	0.442	8.840	20	8.286			5.4084	2.57						
6	19.8	5.4002	0.285	14.250	50	13.696	12.90	2.56	5.4111	3.63	3.53	1.262	30	30	923	6.7
		5.4698	0.255	12.750	50	12.196			5.4805	3.57						
		5.4428	0.267	13.350	50	12.796			5.453	3.40						
7	20.8	5.4688	0.342	17.100	50	16.546	16.85	2.82	5.4846	5.27	5.01	1.612	29	30	1110	6.7
		5.4752	0.351	17.550	50	16.996			5.4899	4.90						
		5.4747	0.351	17.550	50	16.996			5.4893	4.87						
8	21.8	5.4634	0.492	24.600	50	24.046	23.78	3.17	5.4845	7.03	7.14	1.966	27	30	1386	6.7
		5.5159	0.479	23.950	50	23.396			5.5374	7.17						
		5.4633	0.489	24.450	50	23.896			5.485	7.23						
9	22.8	5.4638	0.613	30.650	50	30.096	30.11	3.40	5.4924	9.53	9.71	2.273	19	30	1460	6.8
		5.4637	0.614	30.700	50	30.146			5.4937	10.00						
		5.4707	0.613	30.650	50	30.096			5.4995	9.60						
10	23.8	5.482	0.37	37.000	100	36.446	37.38	3.62	5.5175	11.83	11.57	2.448	32	30	910	6.7
		5.4814	0.387	38.700	100	38.146			5.5163	11.63						
		5.4986	0.381	38.100	100	37.546			5.5323	11.23						
11	24.7	5.4741	0.392	39.200	100	38.646	39.11	3.67	5.5148	13.57	14.20	2.653	29	30	1160	6.7
		5.4718	0.4	40.000	100	39.446			5.5153	14.50						
		5.4723	0.398	39.800	100	39.246			5.5159	14.53						
12	38.8	5.4729	0.54	108.000	200	107.446	111.45	4.71	5.6014	42.83	42.30	3.745	31	20	935	6.9
		5.445	0.571	114.200	200	113.646			5.5693	41.43						
		5.4439	0.569	113.800	200	113.246			5.5718	42.63						
13	40.8	5.4764	0.597	119.400	200	118.846	117.38	4.77	5.6125	45.37	46.36	3.836	30	20	1160	6.7
		5.4818	0.586	117.200	200	116.646			5.6179	45.37						
		5.4616	0.586	117.200	200	116.646			5.6066	48.33						
14	42.8	5.4696	0.662	132.400	200	131.846	131.91	4.88	5.6626	64.33	54.72	4.002	30	20	1180	6.7
		5.4822	0.671	134.200	200	133.646			5.6316	49.80						
		5.5153	0.654	130.800	200	130.246			5.6654	50.03						

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le professeur Simon Crelier, responsable de ce travail de diplôme pour son aide, sa disponibilité ainsi que pour les articles trouvés qui m'ont été fort utiles.

Je remercie également M. Thierry Chappuis, expert de ce travail, pour son invitation à Fribourg qui m'a permis un premier contact et pour ses conseils en vue de la soutenance.

Merci également à Julien Pott pour son soutien lors des fermentations et à Gordana Pistoletti pour m'avoir souvent dépanné en boîte de pétri.

Un grand merci à Anabelle Tenisch et Alessandro Aceturro pour avoir mis à ma disposition leurs milieux de fermentations à partir desquels plusieurs expériences ont pu être menées.

Je remercie aussi Ana, Céline et Stéphane pour leur disponibilité ainsi que pour les rares moments de détente passés ensemble lors de ce travail de diplôme.

Merci aussi à ma famille qui a cru en moi dès le début de ma formation, pour leur soutien ainsi que pour la relecture de ce travail.