

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2016

LUNDI 20 JUIN 2016

Sous-épreuve écrite de Biotechnologies

Coefficient de la sous-épreuve : 4

Ce sujet est prévu pour être traité en deux heures.

**Les sujets de CBSV et de biotechnologies seront traités
sur des copies séparées.**

L'usage de la calculatrice est autorisé.

Ce sujet comporte **10** pages.

PRODUCTION D'INSULINE PAR GENIE GENETIQUE

Le diabète de type 1 est dû à la destruction de cellules du pancréas endocrine qui produisent une hormone polypeptidique hypoglycémisante : l'insuline. Les personnes atteintes de diabète, et présentant un défaut de production d'insuline, doivent recourir à des injections de cette hormone pour réguler leur glycémie.

Historiquement, l'insuline utilisée en thérapeutique a d'abord été extraite de pancréas de porc et de bœuf. La demande de plus en plus importante d'insuline au niveau mondial et le risque sanitaire associé à l'utilisation de produits animaux ont conduit à mettre en place des techniques de production d'insuline par génie génétique.

L'insuline humaine est maintenant produite à partir de souches bactériennes d'*Escherichia coli* transformées par un plasmide recombinant contenant le gène codant le précurseur de l'insuline (proinsuline).

On se propose d'étudier les différentes étapes de la production de l'insuline humaine par génie génétique afin de valider les choix réalisés au cours de la mise en place du procédé :

- obtention d'une souche d'*Escherichia coli* recombinante ;
- optimisation de la culture de la souche sélectionnée ;
- purification de l'insuline humaine produite ;
- dosage de l'insuline humaine purifiée.

1. OBTENTION D'UNE BACTERIE RECOMBINANTE

1.1. Construction du plasmide recombinant

Afin d'obtenir un plasmide recombinant, le gène codant le précurseur de l'insuline (proinsuline) est inséré dans le plasmide pBR322 au niveau du site de restriction de l'enzyme *Bam*H1.

Le **document 1** présente la carte de restriction simplifiée du plasmide natif pBR322. La construction du plasmide et la sélection des clones recombinants sont présentées dans le **document 2**.

Q1. A l'aide du **document 1**, indiquer les éléments justifiant l'utilisation du plasmide pBR322 en génie génétique.

Q2. Réaliser un schéma annoté du plasmide recombinant.

Q3. A l'aide des **documents 1 et 2**, argumenter l'intérêt de l'utilisation de l'enzyme *Bam*H I plutôt que l'utilisation des enzymes *Eco*R I et *Hind* III, pour la construction du plasmide recombinant.

1.2. Transformation bactérienne et sélection de clones de bactéries recombinantes

Le **document 2** présente les différents résultats possibles obtenus après transformation de la souche d'*Escherichia coli*. Quatre types de clones bactériens **A**, **B**, **C** et **D** peuvent être obtenus.

Q4. Argumenter le caractère sensible ou résistant de chaque type de clones A, B, C et D vis-à-vis de l'ampicilline et de la tétracycline.

Le **document 3** présente les résultats de la sélection des clones de bactéries recombinantes après culture sur des milieux gélosés additionnés d'antibiotiques.

Q5. À partir des **documents 2 et 3**, identifier par leur numéro les colonies correspondant au clone de type A.

Q6. En déduire le numéro des colonies de bactéries transformées par le plasmide recombinant.

2. OPTIMISATION DE LA CULTURE DE LA SOUCHE SELECTIONNÉE

Dans le but d'optimiser la culture d'un clone recombinant, un suivi de croissance dans deux milieux M1 et M2 est réalisé à 37° C en aérobose.

Le **document 4** présente les courbes de croissance de ce clone dans ces deux milieux dont la composition est donnée.

Q7. Déterminer la durée de la phase de latence dans ces deux milieux.

La vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle μ_{expo} ($= Q_{X\ expo}$) peut être déterminée par l'équation aux grandeurs suivante :

$$\mu_{expo} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

Q8. Déterminer la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle exprimée en min^{-1} , dans les milieux M1 et M2.

Q9. À l'aide de la composition des milieux M1 et M2, expliquer les différences de résultats concernant la durée de la phase de latence et la vitesse spécifique de croissance.

Q10. En déduire le milieu permettant une croissance optimale du clone d'*E. coli*. Argumenter la réponse.

3. PURIFICATION DE L'INSULINE PRODUITE PAR LA BACTERIE RECOMBINANTE

L'insuline humaine est synthétisée sous forme de proinsuline par le clone sélectionné. Une étape de lyse bactérienne libère la proinsuline, laquelle subit un traitement enzymatique qui conduit à la production d'insuline mature.



Le mélange obtenu est ensuite déposé sur une colonne de chromatographie en vue de la purification de l'insuline mature.

Le **document 5** présente le schéma de principe de cette chromatographie et les caractéristiques des différents types de gels Sephadex® G utilisés pour la séparation des molécules.

Q11. Exploiter le **document 5** pour dégager le principe de séparation des molécules par cette méthode chromatographique.

Q12. Sachant qu'un acide aminé a une masse moléculaire d'environ 100 daltons (Da), calculer la masse moléculaire approximative de l'insuline mature et du peptide C.

Q13. Choisir le gel «Sephadex®» le plus adapté à la purification de l'insuline mature. Argumenter la réponse.

4. DOSAGE DE L'INSULINE HUMAINE PURIFIEE

L'insuline humaine ainsi purifiée est dosée par une technique immuno-enzymatique dont le principe est présenté dans le **document 6**.

Q14. À l'aide des symboles fournis dans la légende, schématiser l'édifice moléculaire obtenu en fin de la réaction immuno-enzymatique dans une cupule contenant l'insuline.

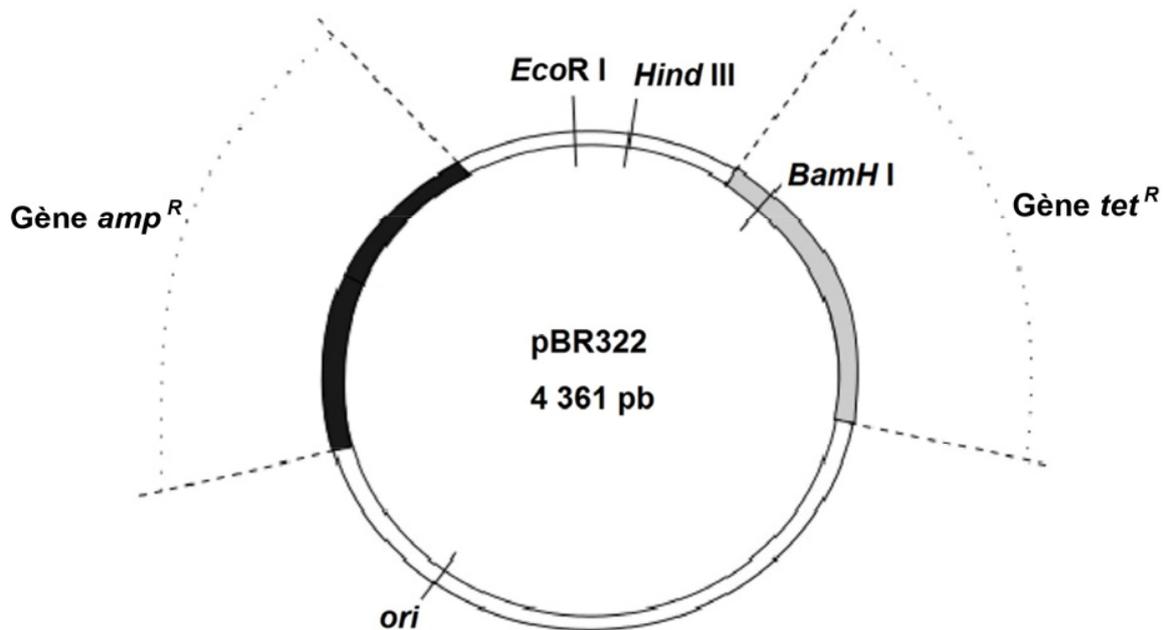
Q15. Expliquer pourquoi l'absorbance mesurée à 450 nm est proportionnelle à la concentration en insuline présente dans l'échantillon.

SYNTHESE

Q16. Réaliser un organigramme des quatre étapes principales de production de l'insuline humaine en y intégrant les choix retenus pour l'optimisation du procédé.

DOCUMENT 1 – Carte de restriction simplifiée du plasmide pBR322

Pour être utilisable en génie génétique, un plasmide doit contenir une origine de réplication lui permettant une réplication autonome dans la cellule, au moins un gène de sélection destiné à discriminer les clones recombinants et des sites de restriction permettant son remodelage.

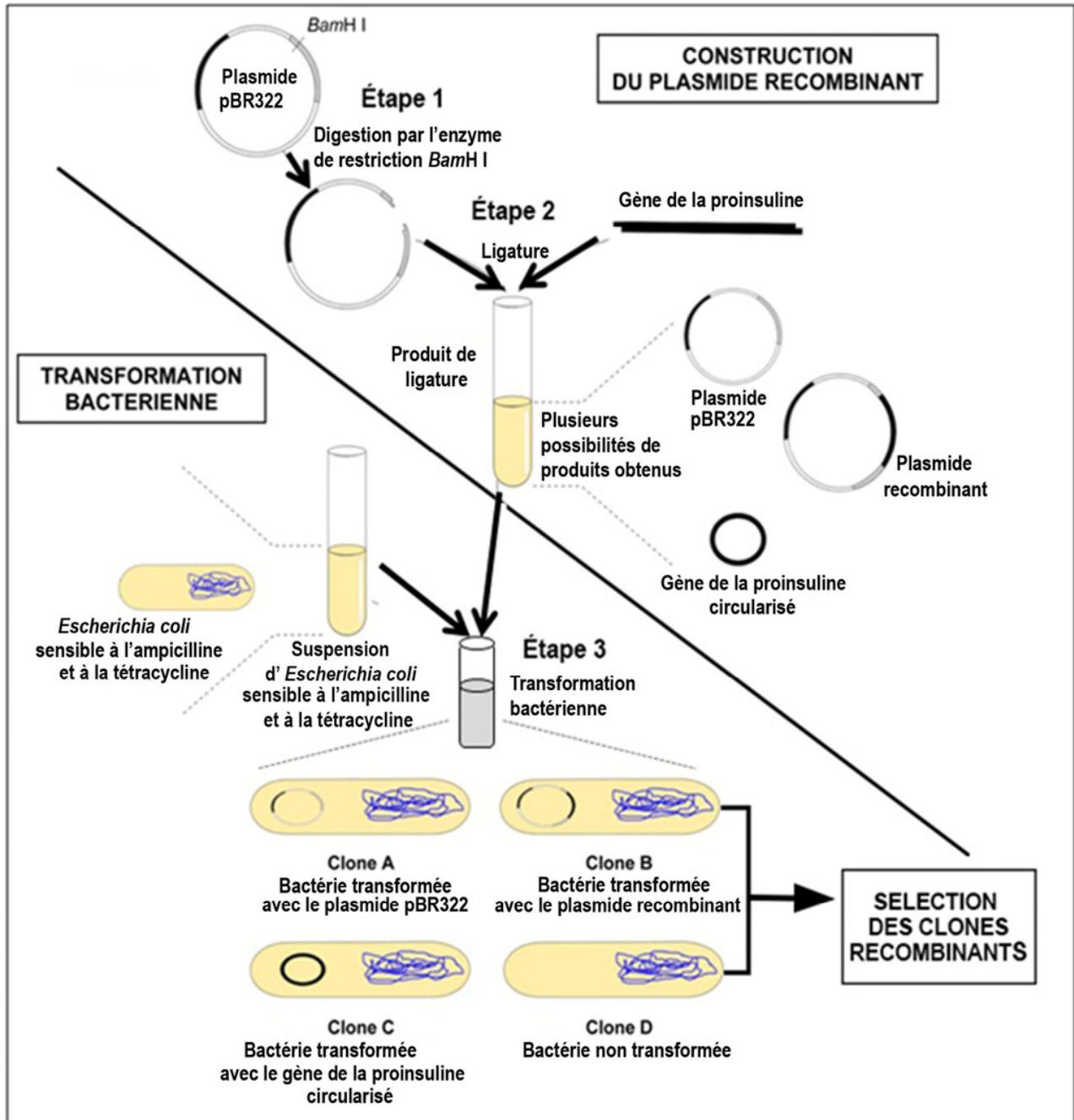


- **Gène *amp^R*** : gène de résistance à l'ampicilline
- **Gène *tet^R*** : gène de résistance à la tétracycline
- ***ori*** : origine de réplication
- ***BamH I*, *EcoR I*, *Hind III*** : sites de restriction spécifiques de chaque enzyme de restriction

Remarque : Un gène n'est traduit en protéine que lorsqu'il est sous sa forme continue, non interrompue.

DOCUMENT 2 – Obtention d'un clone recombinant

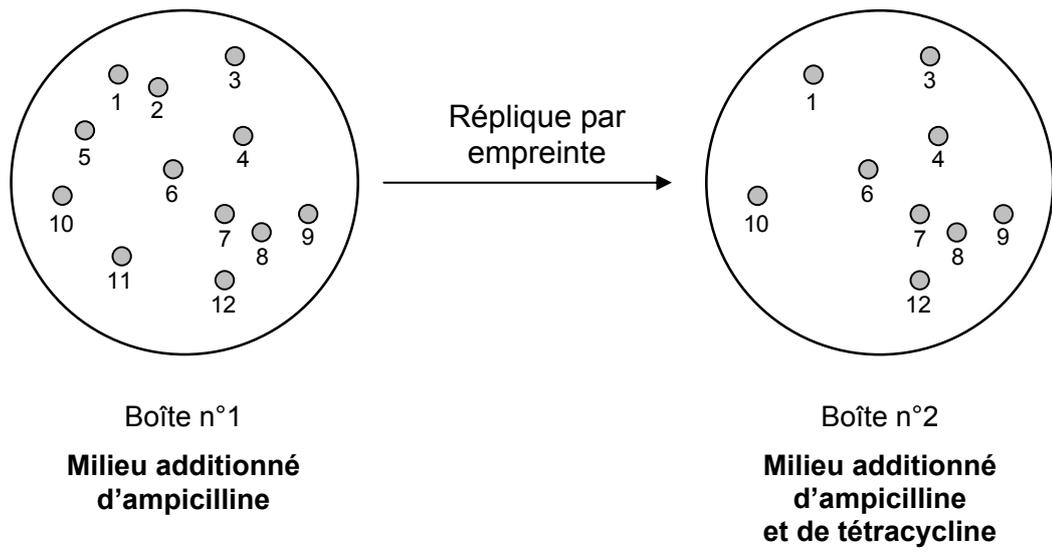
Construction du plasmide, transformation et sélection des clones recombinants



Caractéristiques des 4 types de clone transformés

	Type A	Type B	Type C	Type D
Résistance à l'ampicilline	oui	oui	non	non
Résistance à la tétracycline	oui	non	non	non

DOCUMENT 3 - Représentation schématique de la sélection des clones



Légende

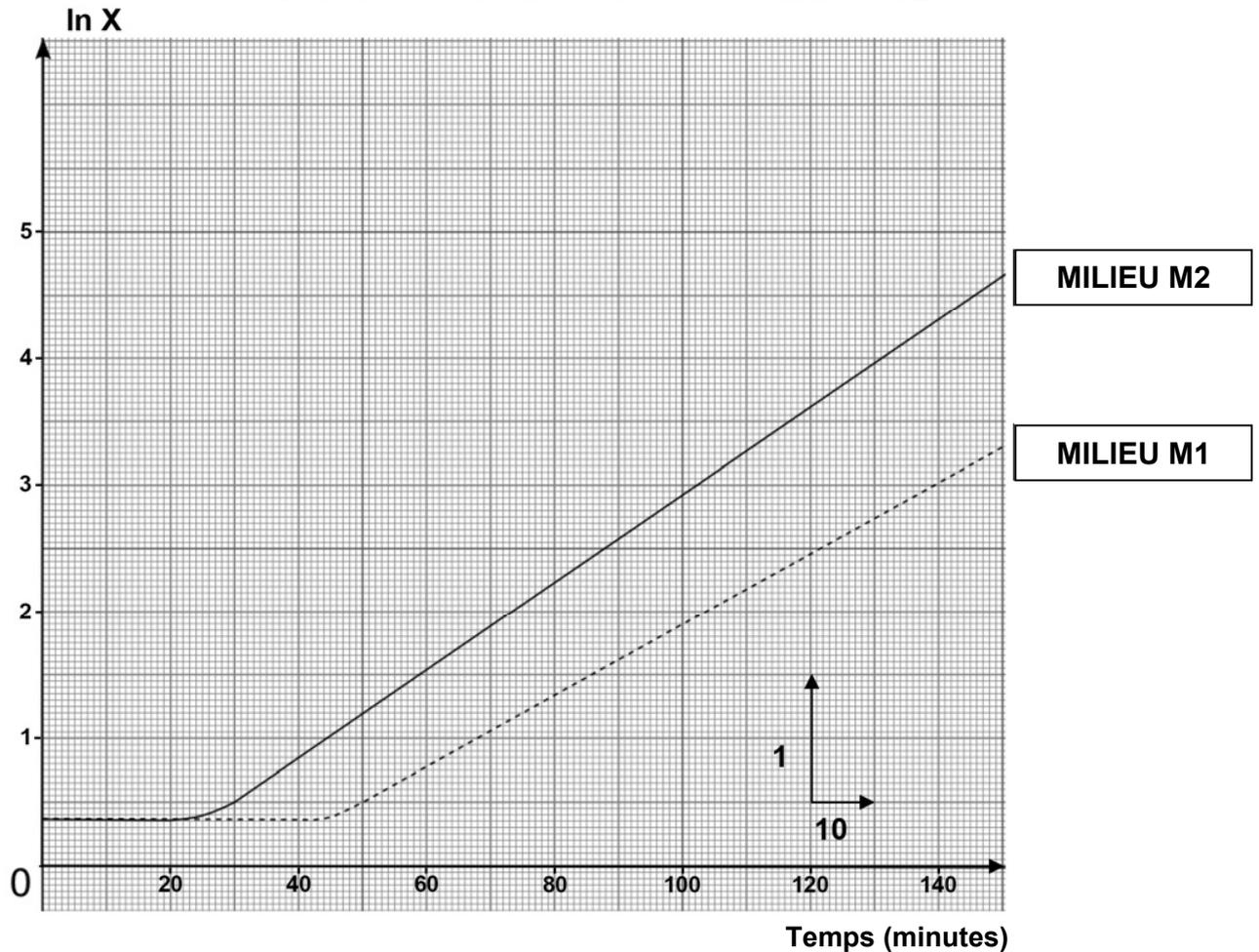
○ : colonie bactérienne d'*E. coli*

DOCUMENT 4 - Culture d'un clone recombinant dans deux milieux

Composition des milieux M1 et M2

Milieu M1 (bouillon nutritif)	Milieu M2 (bouillon cœur-cervelle)
<ul style="list-style-type: none">- Peptones- Extrait de viande- Chlorure de sodium- Eau <p>Ajusté à pH 7,2</p>	<ul style="list-style-type: none">- Peptones- Extrait cœur-cervelle- Chlorure de sodium- Glucose- Phosphate disodique- Eau <p>Ajusté à pH 7,4</p>

Courbes de croissance dans les milieux M1 et M2

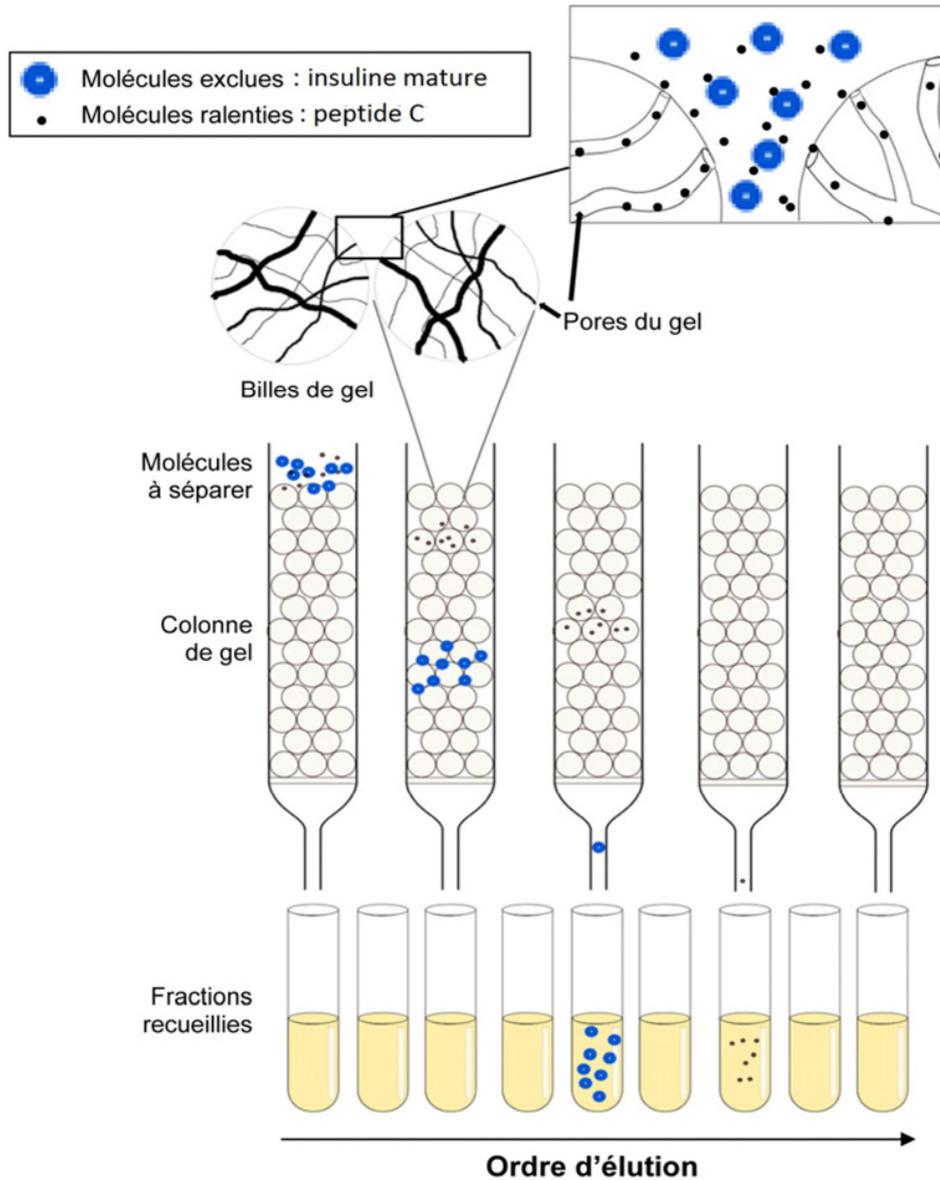


Légende : X = biomasse

DOCUMENT 5 - Chromatographie par gel-filtration

Schéma de principe

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est composée de billes de gel poreuses ; la phase mobile est une solution tampon dont le flux entraîne les molécules à séparer.



Caractéristiques de tamisage moléculaire de trois gels

Type de gel	Intervalle de masses moléculaires des composés ralenties par le gel (Da)
Sephadex® G15	0 à 1 500
Sephadex® G25	1 000 à 5 000
Sephadex® G200	5 000 à 800 000

DOCUMENT 6 - Principe du dosage immuno-enzymatique de l'insuline

Ce dosage est basé sur la reconnaissance simultanée de l'insuline humaine par deux anticorps.

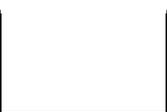
Dans une microplaque, sont ajoutés successivement :

- le premier anticorps anti-insuline ;
- le milieu contenant l'insuline à doser ;
- le second anticorps anti-insuline, qui est couplé à la peroxydase ;
- le substrat incolore TMB.

Chacune des étapes est suivie de lavages.

La peroxydase catalyse la réaction de transformation du TMB en un produit coloré qui absorbe à 450 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en insuline présente dans l'échantillon.

Les différents acteurs intervenant dans ce dosage sont schématisés dans la légende ci-dessous :

Symbole	Signification
	Cupule de microplaque
	Insuline humaine
	Anticorps anti-insuline humaine fixé au fond des cupules
	Anticorps anti-insuline humaine couplé à la peroxydase
 Substrat  Produit coloré	Réaction catalysée par la peroxydase