

AT 07	Terminale - Biochimie Biologie Biotechnologies	Année 2023 - 2024
	<u>Clonage et production de l'insuline</u>	



Contexte :

Il y a 100 ans, en 1923, le prix Nobel de physiologie ou médecine a été attribué à Frederick G. Banting et John J.R. Macleod pour la découverte et l'utilisation thérapeutique de l'insuline. Avant cette découverte, les patients atteints de **diabète** mourraient prématurément. Ces patients ne pouvaient vivre que 3 à 4 ans après le déclenchement de la maladie en suivant un régime sévère. Jusqu'en 1982, l'insuline injectée aux patients était extraite des pancréas de bœuf ou de porc et manquait d'efficacité. Ce n'est qu'après **le clonage du gène humain de l'insuline** en 1978 et la mise au point de la **production bactérienne d'insuline** par génie génétique en 1982 que l'on a pu injecter aux patients de l'insuline humaine, bien plus efficace.

Nous vous proposons dans cet AT de réaliser quelques étapes clé du clonage et de la production d'insuline : **la sélection des bactéries exprimant le gène humain de l'insuline et le dosage de l'insuline produite à partir des bactéries transformées.**

I- Vue d'ensemble des étapes du clonage moléculaire

Q1- A l'aide de la vidéo <https://www.youtube.com/watch?v=y4AMgE6B5jl> , compléter le **Document 1** qui présente les grandes étapes du clonage du gène humain de l'insuline avec les noms des étapes et les descriptions ci-dessous.

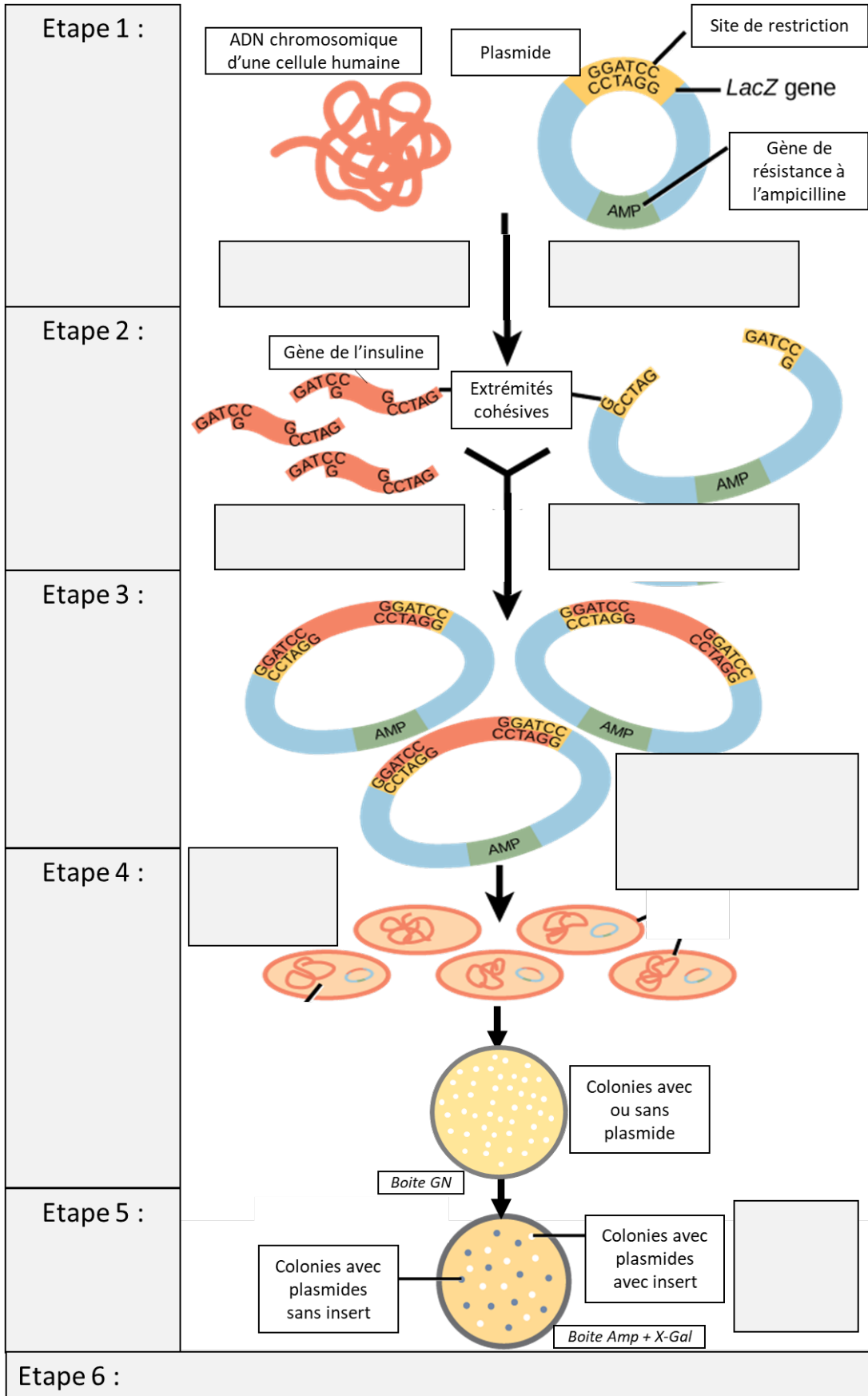
Noms des étapes :

- *Intégration de l'ADN recombinant dans une bactérie hôte.*
- *Extraction des molécules d'ADN*
- *Sélection des bactéries transformées : Mise en culture des bactéries hôtes transformées sur un milieu de culture qui sélectionne les cellules transformées. Chaque colonie isolée forme un clone.*
- *Les clones obtenus doivent être testées (criblées) après repiquage pour vérifier que le clonage s'est correctement déroulé*
- *Découpage des ADN avec des ciseaux moléculaires : les enzymes de restrictions (= digestion par des enzymes de restriction)*
- *Ligation : collage de l'ADN du vecteur et de l'insert avec de la « colle moléculaire » : une enzyme ADN ligase pour obtenir de l'ADN recombinant*

Descriptions (cases grises du schéma à compléter) :

- *Les cellules hôtes rendues compétentes sont transformées puis étalées sur GN.*
- *Digestion de l'ADN du vecteur (Celui-ci possède un site unique de restriction)*
- *Extraction de l'ADN chromosomique d'une cellule eucaryote comportant la séquence de l'ADN de l'insuline (gène d'intérêt ou insert)*
- *Culture des clones et sélection simultanée des clones*
- *Digestion de l'ADN comportant le gène de l'insuline (celui-ci possède deux sites de restriction)*
- *Mélange de l'ADN du vecteur et de l'ADN avec le gène de l'insuline et ligation*
- *Extraction à partir d'une bactérie de l'ADN plasmidique appelé vecteur*

Document 1 : Les étapes d'un clonage



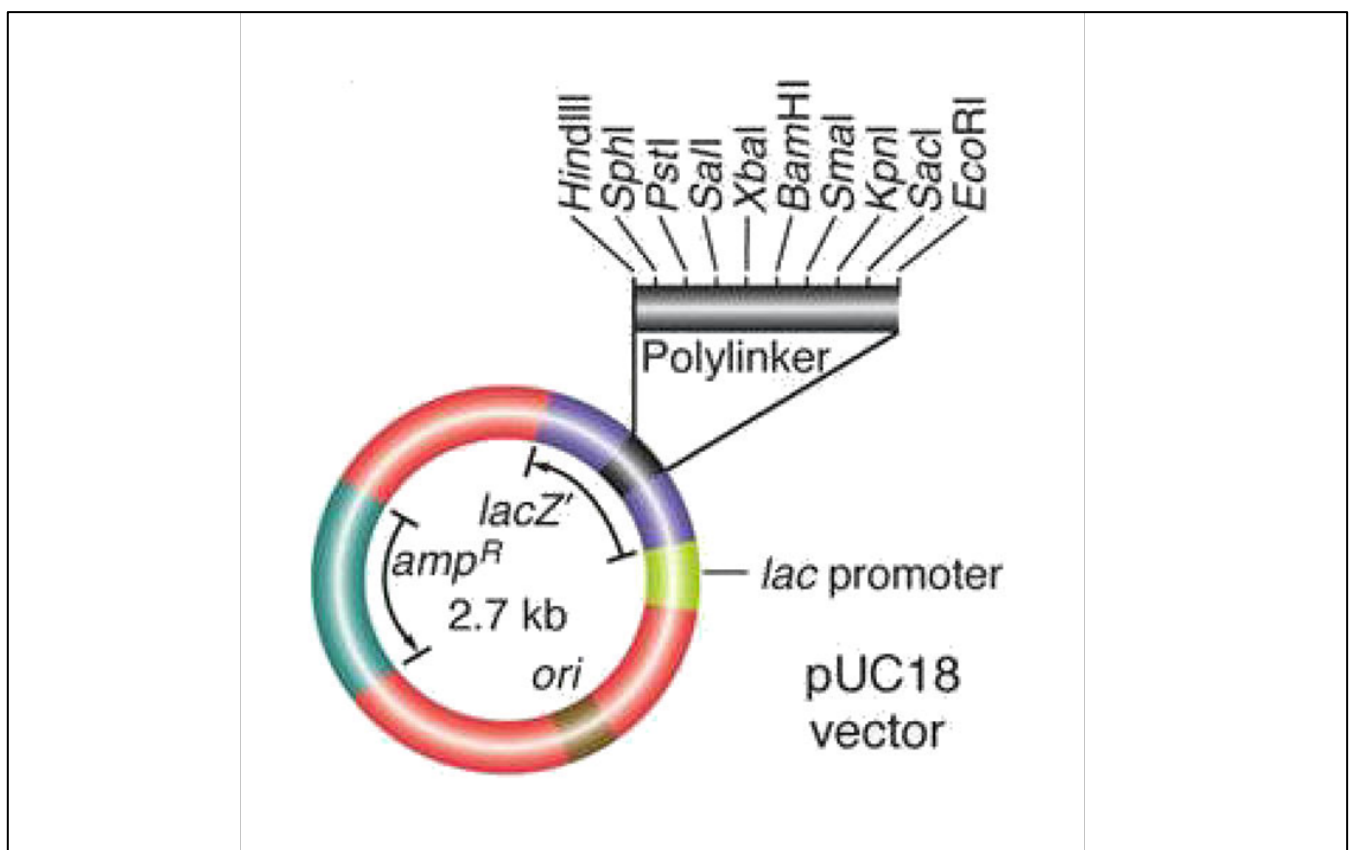
AT 07	Terminale - Biochimie Biologie Biotechnologies	Année 2023 - 2024
	<u>Clonage et production de l'insuline</u>	

II- Sélection des bactéries transformées avec le gène humain de l'insuline

1- Réflexions préliminaires

- Indiquer à partir du **document 1**, quelle est l'étape du clonage que vous allez réaliser.
- A partir de la carte du plasmide utilisé pour le clonage (pUC18) présentée dans le **document 2**, nommer les gènes utilisés pour sélectionner les bactéries transformées.

Document 2 : Carte du plasmide pUC18



amp^R : Gène de résistance à l'antibiotique ampiciline

lacZ' : Gène codant pour l'enzyme Beta-Galactosidase. Cette enzyme catalyse la réaction de transformation du X-Gal en précipité bleu.

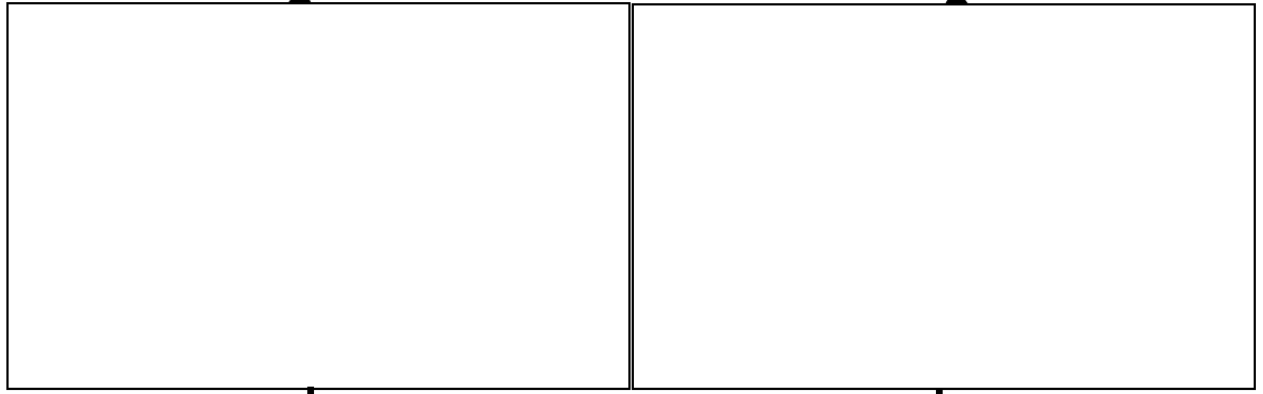
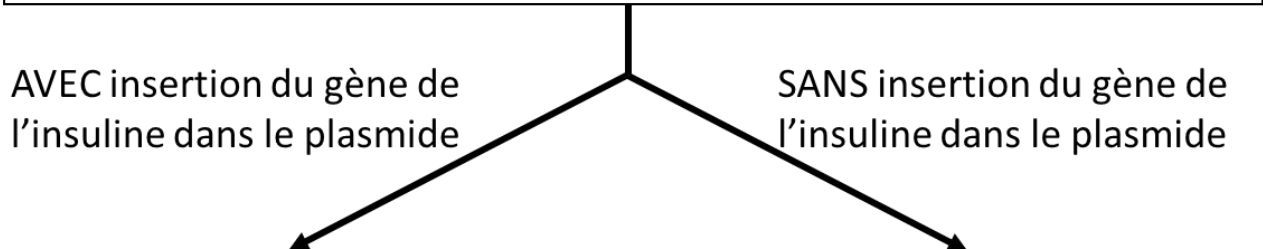
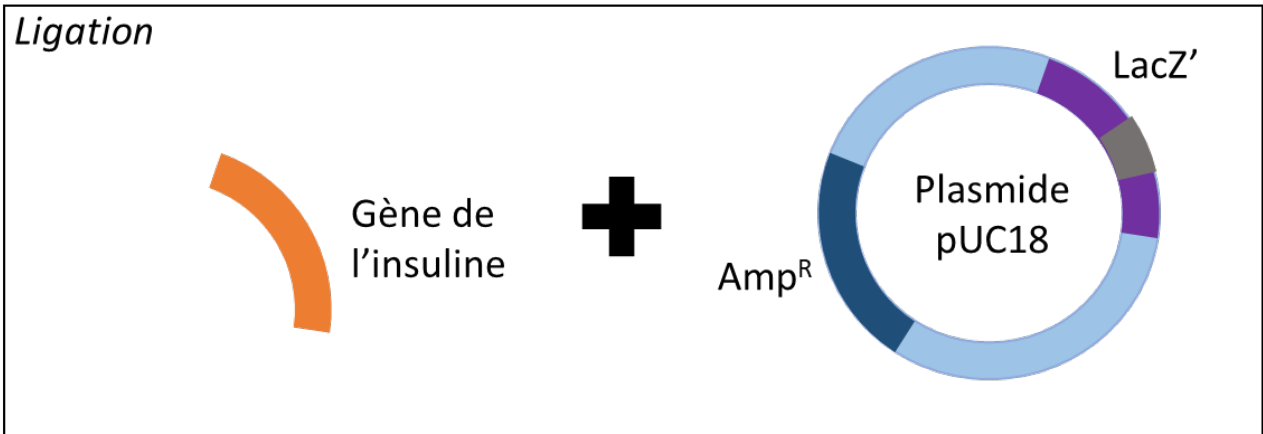
Polylinker : site de clonage multiple comprenant de nombreux sites de restriction

lac promoter : promoteur du gène lacZ

Ori : origine de répllication bactérienne

Lorsque le gène de l'insuline est cloné dans le vecteur, il est introduit au niveau de l'un des sites de restriction du polylinker.

- Compléter le schéma ci-dessous pour modéliser les possibilités de transformation bactérienne.



Transformation bactérienne



Ensemencement sur boîte

		Croissance sur GN + Ampiciline	
		Couleur sur GN + X-Gal	

AT 07	Terminale - Biochimie Biologie Biotechnologies	Année 2023 - 2024
	<u>Clonage et production de l'insuline</u>	

d- Après avoir lu le mode opératoire, calculer le volume de solution mère d'antibiotique à ajouter dans les petites boîtes de GN.

2- Mode opératoire

Les boîtes GN dont vous disposez ont étéensemencées avec les bactéries transformées avec l'ADN issu de la ligation du gène humain de l'insuline dans le plasmide pUC18.

Vous criblerez **4 colonies** ayant poussé sur la boîte GN. Pour chacune, vous réaliserez une suspension bactérienne dans 1 mL d'eau physiologique stérile. Pour chaque suspension, vous ensemencerez en surface :

- Une boîte GN (à couler)
- Une petite boîte GN + ampicilline : l'ampicilline ($C_{\text{solution mère}} = 20 \text{ mg/mL}$) est étalée sur la petite boîte GN (contenant 10 mL de gélose) à l'aide d'un râteau stérile afin d'obtenir une concentration finale d'ampicilline de $100 \mu\text{g/mL}$ de gélose.
- Une petite boîte GN+ X-Gal

3- Exploitation des résultats (J2)

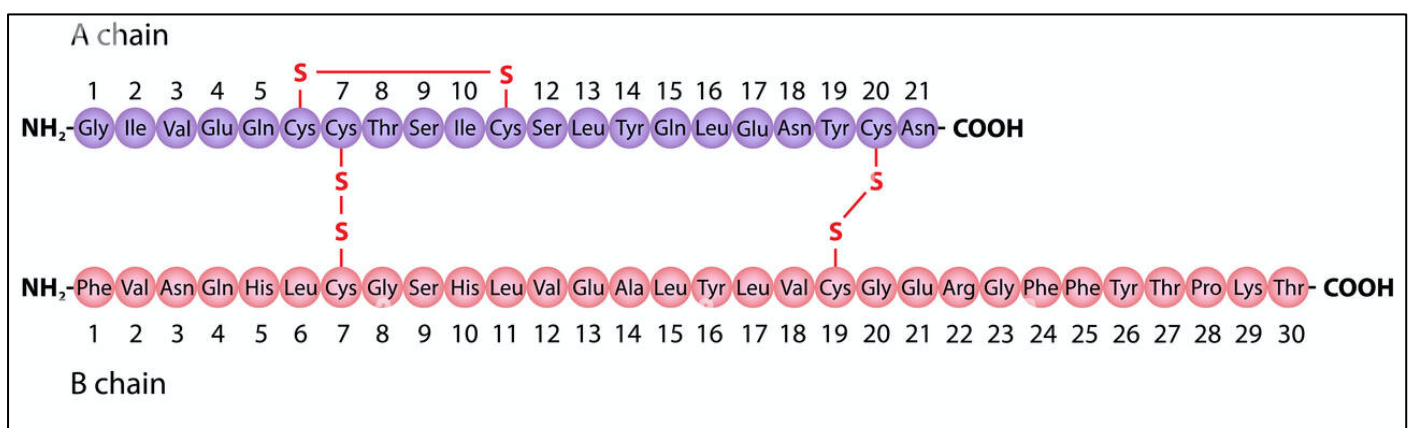
Q2- Présenter, sous forme de tableau, les résultats de lecture des milieux pour les 4 colonies criblées.

Q3- Conclure sur le clonage en indiquant si vous avez obtenu un clone valide.

III- Dosage de l'insuline produite à partir d'un clone bactérien

1- Réflexions préliminaires

Document 3 : Structure primaire de l'insuline



e-A partir du **document 3**, indiquer et justifier à quelle famille de biomolécule appartient l'insuline.

f- Compléter le tableau de préparation de la gamme d'étalonnage dans la partie 2.1. « Étalonnage du spectrophotomètre ».

AT 07	Terminale - Biochimie Biologie Biotechnologies								Année 2023 - 2024
	<u>Clonage et production de l'insuline</u>								

2- Mode opératoire

2.1. Étalonnage du spectrophotomètre

A l'aide d'une solution étalon de protéines de concentration massique $\rho_{\text{protéine}} = 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, préparer en microcuve, la gamme d'étalonnage suivante :

Tube	Blanc	1	2	3	4	5	6	7	8
Solution étalon de protéine (μL)		25	50	75	100	125	150	175	200
Eau physiologique qsp 200 μL									
Réactif de Gornall	1 mL par cuve								
$m_{(\text{protéine}; \text{cuve})}$ (en mg)									

2.2. Dosages « essais »

En parallèle de la gamme d'étalonnage, réaliser deux essais sur 200 μL de purification d'insuline. Les essais seront traités dans les mêmes conditions que la gamme.

Sceller toutes les cuves, homogénéiser et laisser la coloration se développer à l'obscurité pendant 30 minutes. Lire les absorbances contre le blanc à 540 nm.

3- Exploitation des résultats

Q4- Présenter et exploiter les résultats expérimentaux avec l'outil informatique afin d'obtenir la courbe d'étalonnage, $A = f(m_{(\text{protéine}, \text{cuve})})$, avec l'équation de la droite de régression, puis calculer la masse en protéines dans les essais ($m_{\text{protéines dans l'essai, cuve}}$).

Q5- Calculer la concentration en protéine dans les essais de la purification d'insuline (Exprimer l'équation aux grandeurs, aux unités et aux valeurs numériques).

Q6- Vérifier la compatibilité des résultats pour les deux essais.

Q7- Exprimer le résultat final à l'aide des données fournies et de l'aide-mémoire de métrologie.

Données :

- S_r (concentration massique en protéines de la purification) = $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- U (ρ protéines du de la purification) = $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ à 95% de confiance, $k=2$

Q8- Après lecture du **document 4**, et sachant que nous avons 100 mL de purification d'insuline, calculer le nombre de cartouche de stylo NovoRapid Flexpen que nous pourrions produire.

AT 07	Terminale - Biochimie Biologie Biotechnologies	Année 2023 - 2024
	<u>Clonage et production de l'insuline</u>	

Document 4 : Fiche VIDAL du stylo à insuline NovoRapid Flexpen



NovoRapid FlexPen :

	<i>par stylo</i>
Insuline aspartate*	300 unités

NovoRapid Penfill :

	<i>par cartouche</i>
Insuline aspartate*	300 unités

NovoRapid PumpCart :

	<i>par cartouche</i>
Insuline aspartate*	160 unités

Excipients (communs) : glycérol, phénol, métacrésol, chlorure de zinc, phosphate disodique dihydraté, chlorure de sodium, acide chlorhydrique et hydroxyde de sodium (pour ajuster le pH), eau pour préparations injectables.

1 ml de solution contient 100 unités d'insuline aspartate, équivalent à 3,5 mg.

* Produite dans *Saccharomyces cerevisiae* par la technique de l'ADN recombinant.

AT 07	Terminale - Biochimie Biologie Biotechnologies	Année 2023 - 2024
	<u>Clonage et production de l'insuline</u>	

AIDE MEMOIRE DE METROLOGIE

1 Conditions d'utilisation d'une procédure de mesure et vérifications préalables

Une procédure de mesure ne peut être utilisée dans un laboratoire que si ses qualités de justesse et de fidélité ont été étudiées et reconnues.

Lorsqu'un mesurage est effectué, deux types de vérification de la bonne exécution de la procédure de mesure sont proposés afin de pouvoir accepter les valeurs mesurées obtenues pour des échantillons inconnus.

On effectue, dans la même série de mesurages :

- un essai sur un étalon de contrôle ; la valeur mesurée obtenue est notée y_{EC} .
- un ou deux essais sur chacun des échantillons à doser.

1.1 Vérification de l'exactitude de mesure à l'aide d'un étalon de contrôle

On dispose d'un étalon de contrôle avec sa valeur conventionnelle (y_{ref}) ainsi que ses limites d'acceptabilité (L_{inf} et L_{sup}).

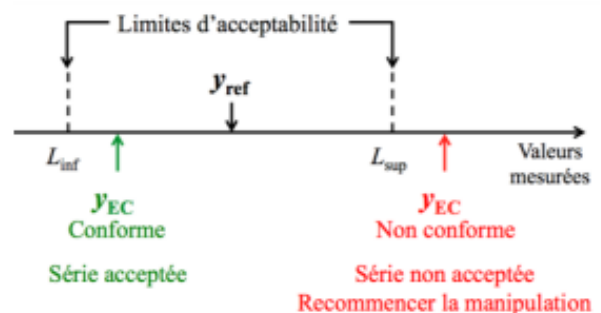
On recherche si la valeur mesurée (y_{EC}) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit : $L_{inf} \leq y_{EC} \leq L_{sup}$

Si la valeur mesurée y_{EC} appartient à l'intervalle d'acceptabilité :

- la valeur mesurée y_{EC} est **exacte**, donc **conforme** ; on vérifie que l'exécution de la procédure de mesure est satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées obtenues pour les échantillons inconnus dans la même série sont **acceptées**.

Si la valeur mesurée y_{EC} n'appartient pas à l'intervalle d'acceptabilité :

- la valeur mesurée n'est **pas exacte** donc **non conforme** ; l'exécution de la procédure de mesure n'est pas satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées de toute la série **ne sont pas acceptées** ; il faut rechercher l'origine de la mauvaise exactitude et recommencer la manipulation.



1.2 Vérification de la compatibilité métrologique dans le cas de deux essais effectués en répétabilité

On connaît l'écart-type de répétabilité (s_r) de la procédure de mesure, obtenu par des études inter-laboratoires et correspondant au niveau de la valeur de l'échantillon dosé.

On a obtenu deux valeurs mesurées (y_1 et y_2) pour un même échantillon.

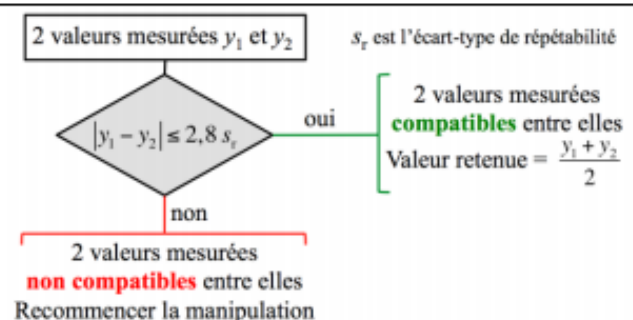
On applique alors le logigramme de compatibilité en répétabilité à deux valeurs.

Si les deux valeurs mesurées sont compatibles :

- elles sont **acceptées** ;
- la valeur retenue est la moyenne.

Si les deux valeurs mesurées ne sont pas compatibles :

- elles ne sont **pas acceptées** ;
- il faut rechercher l'origine de la mauvaise répétabilité et recommencer la manipulation.



AT 07	Terminale - Biochimie Biologie Biotechnologies	Année 2023 - 2024
	<u>Clonage et production de l'insuline</u>	

Aide-mémoire de métrologie

2

Remarque

Dans les deux cas de vérification, si pour des raisons matérielles il n'est pas possible de recommencer les manipulations, le candidat poursuivra l'exploitation d'une de ses valeurs mesurées afin d'exprimer un résultat de mesure de façon complète, mais en signalant clairement que ce résultat n'est pas accepté.

2 Expression du résultat de mesure

2.1 Détermination de l'incertitude élargie

On connaît l'incertitude-type composée (u_c) au niveau de la valeur de l'échantillon (donnée soit avec l'unité de la grandeur, soit en valeur relative).

L'incertitude élargie (U) est calculée en multipliant l'incertitude-type composée par un facteur 2 de façon à avoir un niveau de confiance d'environ 95 % (puisque'il est admis que les résultats de mesure suivent une distribution normale).

L'incertitude élargie est ensuite arrondie. Selon les cas :

- si le premier chiffre significatif est 1, 2 ou 3 : garder deux chiffres significatifs ;
- si le premier chiffre significatif est 4 ou plus : garder un chiffre significatif.

Dans certains cas, l'incertitude élargie (U) est directement donnée avec son niveau de confiance.

2.2 Expression du résultat de mesure

La valeur retenue du résultat est arrondie de la façon suivante : le dernier chiffre significatif doit être à la même position décimale que le dernier chiffre de l'incertitude élargie.

Le résultat est exprimé comme suit :

<p>Grandeur mesurée = (valeur retenue $\pm U$) unité</p> <p>Incertitude élargie d'un facteur $k = \dots$ pour un niveau de confiance de...</p> <p>Toutes autres informations pertinentes disponibles</p>

Remarque

Dans tous les cas (arrondissement de l'incertitude élargie et arrondissement de la valeur du résultat), les règles usuelles mathématiques d'arrondissement au plus proche s'appliquent.