

Contexte

En 2019, en France, près de 4 millions de personnes étaient identifiées diabétiques par l'assurance maladie. Selon Santé publique France, la prévalence du diabète traité par médicaments était estimée à 5,3% de la population en 2020, soit 3,5 millions de personnes. L'un des traitements consiste en l'injection d'une hormone, l'insuline. Au début du 20^{ème} siècle, l'insuline était extraite du pancréas de porc et de bœuf, ces protéines n'étaient pas tout à fait identiques à l'insuline humaine. A partir de 1978, le gène de l'insuline humaine est transféré chez une bactérie, *Escherichia coli*. Ce transfert permet la production de l'insuline humaine par la bactérie. La culture de bactéries dans des bioréacteurs permet la production de l'hormone en grande quantité afin d'être proposée comme traitement à grande échelle.

On cherche à déterminer si une production de l'insuline humaine serait possible par un eucaryote, la levure.

Consignes

Partie A : Appropriation du contexte et activité pratique (durée recommandée : 60 min)

La stratégie consiste dans un premier temps à vérifier que les transferts d'ADN sont possibles chez la levure. Pour cela, vous allez réaliser un transfert de plasmide contenant l'allèle *Ade2* fonctionnel chez des levures mutées pour ce gène.

Appeler l'examineur pour vérifier les résultats de la mise en œuvre du protocole.

Partie B : Présentation et interprétation des résultats, poursuite de la stratégie et conclusion (durée recommandée : 30 min)

Présenter et traiter les résultats obtenus, sous la forme de votre choix et les interpréter.

Répondre sur la fiche-réponse candidat, appeler l'examineur pour vérifier votre production et obtenir une ressource complémentaire

A l'aide de la ressource supplémentaire, **complétez la stratégie** afin que ces levures mutées puissent être utilisées pour la production d'insuline.

Appeler l'examineur pour présenter votre proposition à l'oral

Conclure à partir de l'ensemble des données, sur la stratégie à adopter pour faire produire de l'insuline par les levures.

1A- Génétique et Evolution
MECANISMES DE DIVERSIFICATION CHEZ LES ETRES VIVANTS

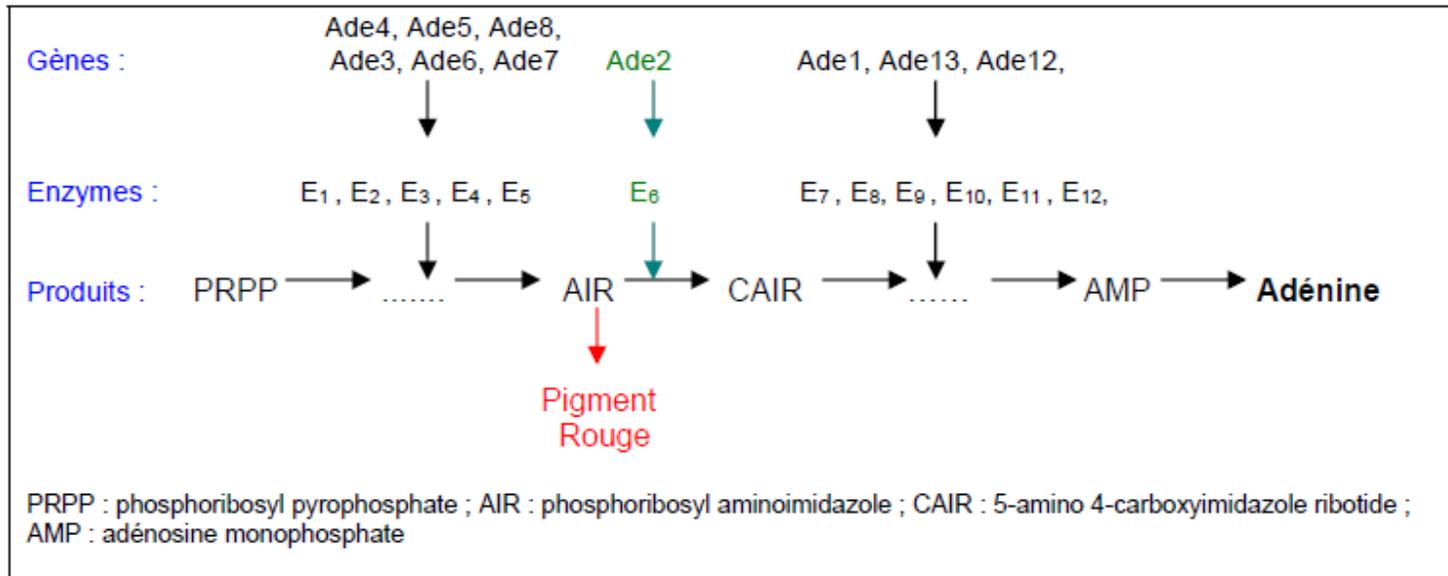
Fiche sujet – candidat (2/3)

Protocole	
<p>Matériel :</p> <ul style="list-style-type: none">- une souche de levure (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) possédant la mutation du gène <i>Ade2</i> (de phénotype [rouge]) poussant sur un milieu enrichi en adénine- des boites de pétri contenant un milieu de culture minimum (milieu sans adénine) favorable au développement des souches de levures sauvages (de phénotype [blanc])- de l'ADN (plasmide) contenant l'allèle <i>Ade2</i> fonctionnel- le matériel nécessaire pour réaliser des prélèvements et réaliser des mises en culture en condition stériles (tubes, micropipettes, pipettes, ensemeur, bec électrique, étuves ...)	<p>Étapes du protocole à réaliser :</p> <p>Réaliser un transfert de plasmide contenant l'allèle <i>Ade2</i> fonctionnel chez des levures mutées pour ce gène (protocole fourni).</p>
<p>Sécurité :</p> <div data-bbox="271 906 810 1086"><p>RISQUE DE BRULURE</p></div> <p>+ nettoyez le plan de travail à la javel</p>	<p>Précautions de la manipulation :</p> <div data-bbox="1413 906 1715 1043"></div>

Ressources

Fiche document : caractéristiques des levures cultivées

La levure *saccharomyces cerevisiae* est un champignon eucaryote unicellulaire haploïde. C'est le plus petit génome eucaryote connu : 14000 kb (kilobases) et 6200 gènes.
 Certaines souches portent une mutation qui affecte le gène *Ade2* impliqué dans la chaîne de biosynthèse de l'adénine :



Le gène *Ade2* code pour une enzyme qui a pour fonction de transformer un intermédiaire de cette chaîne : l'Amino Imidazole Ribotide ou AIR qui est un pigment rouge en un autre intermédiaire CAIR.

La mutation du gène *Ade2* a deux effets :

- * La souche étant incapable de synthétiser l'adénine, elle ne poussera pas sur milieu minimum (sans adénine). En effet l'adénine est un précurseur de l'ADN, cette molécule est donc indispensable à la survie de la levure.
- * Si on lui apporte l'adénine en supplémentant le milieu de culture (ou en la faisant pousser sur milieu riche), elle va l'utiliser et présentera un phénotype rouge du fait de l'accumulation de l'AIR.

On différencie ainsi facilement les souches qui portent la mutation du gène *Ade2* après croissance sur boîte de Pétri.

Qu'est ce que le transfert horizontal ?

Un gène peut être transféré d'un individu à un autre individu sans que ces individus n'aient de relation de parenté : on parle de **transferts horizontaux de gènes**.

En particulier de nombreux êtres vivants unicellulaires (comme les bactéries) sont capables d'incorporer des fragments d'ADN libres dans leur milieu (provenant par exemple d'organismes morts).

L'individu receveur acquiert un ou plusieurs gènes donc éventuellement des caractéristiques nouvelles. Quand ces transferts sont provoqués par l'homme, l'organisme receveur est appelé organisme génétiquement modifié (OGM).

1A- Génétique et Evolution
MECANISMES DE DIVERSIFICATION CHEZ LES ETRES VIVANTS

Ressources complémentaires :

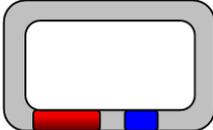
La transgénèse débute par le repérage d'un caractère intéressant, puis l'identification du gène codant pour la protéine associée. Il s'agit du **gène d'intérêt**, par exemple, le gène de l'insuline.

Le transfert volontaire d'ADN dans une cellule est possible mais il ne réussit pas dans tous les cas : il ne se produit qu'à une faible fréquence et ne concerne pas toutes les cellules receveuses. On va donc associer au gène d'intérêt un **gène de sélection**, qui va permettre de repérer et de sélectionner facilement les cellules qui ont réellement intégré le gène d'intérêt.

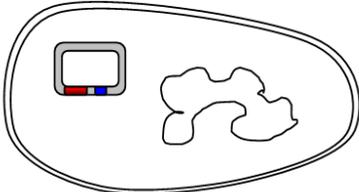
Dans le cas de la transgénèse du gène de l'insuline à des bactéries, le gène de sélection peut être, par exemple, un gène de résistance à un antibiotique.



1. ISOLEMENT DU GENE de l'insuline humaine
= **gène d'intérêt**



2. Insertion du gène de l'insuline dans un plasmide vecteur possédant en plus un **gène de sélection** : un gène de résistance à un antibiotique



3. Transfert du gène dans bactéries E Coli



4. Culture des bactéries hôtes dans un milieu contenant l'antibiotique

- les bactéries qui n'ont pas intégré le plasmide meurent car elles sont sensibles à l'antibiotique
- les bactéries qui ont intégré le plasmide survivent : elles sont sélectionnées par le milieu contenant l'antibiotique. Ainsi le gène de sélection permet de ne conserver que les cellules qui ont intégré le gène d'intérêt.

Sélection de bactéries transformantes via un gène de résistance à un antibiotique

En revanche, un tel gène de sélection ne peut être utilisé avec des levures, qui sont des eucaryotes unicellulaires, puisque seules les bactéries sont sensibles aux antibiotiques.