Biotec

prog

14 Fev : rappel myco + bio¢
21 Fev : rappel sur les levures
28 Fev : génie génétique
21 Mars : biotec vegs
28 Mars : cultures ¢ (Mérieux)
11 Avr : génie génétique
18 Avr : cultures ¢ au labo
9 Mai : les biomatériaux
16 Mai : les spirullines
30 Mai : les Ac monoclonaux (annulés).

examen

1h à l'écrit, le 20 juin à 9h.

Introduction

Définition

biotec = exploitation technologique des p organismes (bact, champ, algues) ou & animales et vegs en utilisation directe des fractions & (A_g, Ac, enz), dans le but de produire des biens et des services.
moyens de mise en œuvre : bioch, p bio, ingénierie.

Le marché des biotec

- traditionnelle (exploite p org pour bière, fromage, vin) = 38% du marché
- fermentation moderne (antibios, vaccins) = 25%
- biotec nouvelle (p org transformés génétiquement = recombinés).
- semences
- production E

) % faibles.

Des biosciences aux industries.

↳ génie p biologique, biochimique industriel, enz, génétiq.
vers → la santé, agroalimentaire, chimie, extraction minière (cuivre des océans).

la plio

les porg st nbx dans la nature. champ + lact st en nb presque illimité ds nature → biodiversité

↳ réservoir immense de gênes.

↳ identifier, classer, sélectionner, conserver ces porg.

∃ fonction d'amélioration des souches (mutagénèse, combinaisons, etc...).

ex: amélioration de Penicillium chrysogenum pour la fabrication d'antibiotiques.

1ère souche : 100 UI/ml de production.

après ≠ étapes, maintenant : 42 000 UI/ml.

le génie enz

= tt ce qui est technique permettant la mise en oeuvre de biocatalyseurs = enz dans des conditions optimales.

rôle important dans la catalyse + caractère de stéréosélectivité + spécificité pour le substrat.

inconv : sensible aux conditions environnementales (pH, θ°C)

rôle aussi : isoler, améliorer cad modifier certaines structures (ex: détergents de lessive, + subtilysine si 1 AA de changé, ↗ activité et protection ≠ l'environnement, et ↗ résistance).

inconv: prix de revient, mauvaise stabilité, incapacité de prévoir le comportement du substrat = empirisme.

grâce au génie génétique → production d'enz à coût réduit.

la bioch industrielle.

↳ cultures en fermenteurs, liq ou solides de ¢ fixes.

↳ optimisation ¢ ds les fermenteurs.

échelles, taille, 0°C, pH pour une meilleure rentabilité
= sciences de l'ingénieur.
+ contrôle des procédés, pilotage des appareils maintenant pH, pO_2, conc en substrat, culture continue ou discontinue
+ extraction des métabolites.

<u>Le génie génétique</u>

qui améliore les biotec.
1973 → études de clonage
↳ Ac monoclonaux + ADN complémentaire (éliminer introns), séquençage, mutagénèse, polymorphisme de la taille des fragments de restriction.
↳ découpe l'ADN en gènes.
78 → clonage du gène de l'insuline.
années 70: clonage bactérien
fin 70: clonage eucaryote, puis d'org supérieurs.
85 → clonage de l'érythropoïétine
89 → thérapie génique.
but: faire produire des substances non produites normalement → prot recombinantes.
↳ avec vecteur d'expression, contenant le gène dans le plasmide: stable, nb élevé de copies avec promoteur fort si production.
↳ introduit [illegible] avec obj important → culture à haute densité [illegible], avec G coût + capacité de se développer sur des milieux peu coûteux.
↳ vérifier 3 choses: % d'expression, qualité, possibilité d'extraction sécrétion + glycosylation.
→ glycosylation: réalisée uniquement par les eucaryotes,

marché biotech en Pharm.

- prot du sg, vaccins, Ac monoclonaux, anticancéreux, antibiotiques, hormones, test ac nucléiques et diagnostic (dépistage cancer, dosages biologiques, dépistage parasito par PCR, test grossesse).
- molécules
  - × anticancéreux
    IL (les 1ers produits), IFN, TNF, CSF, volume du chiffre d'affaire important.
  - × prot du sg
  - × hormones
    insuline humaine, hGH, érythropoïétine, Fact VIII
  - × vaccins
    ≠ Hépatite B, en préparé vaccins anti allergiques.
  - × diag
    Ac monoclonaux, test ac nucléiques avec maladies infectieuses (marché qui ↗).

secteur de la chimie.

la synthèse chimique est fortement consommatrice E avec OC lourds, + source de pollution.
on essaye de remplacer par biosynthèse = 0°C plus lent(40) qui en général ne produit pas de Q importantes de déchets.
les coûts des MP peuvent être importants (guerre) avec les pays, mais milieu culture peu coûteux ex: source de C = glucose ou mélasse, amidon, cellulose.
donne produits chimiques, E, enz ex: bioconversion des stéroïdes

produits chimiques obtenus par fermentation ou synthèse.

- fermentaθ uniquement
  ac citrique (Aspergillus niger), butane 2,3 diol, ac gluconique, ac itaconique.
- fermentation + synthèse.
  ac lactique (strepto ou lactolacille), éthanol (levures)
- fermentation ds le passé
  glycol, isopropanol, acétone, ac acrylique.
- divers
  cyclohexadiène, oxyde de propylène, acrylamide, poly hydroxybutyrate, hydroquinone
- pour les AA.
  Glu (= produit uniquement par fermentation)
  Met
  Ile (1750 Frs/kg, par fermentation ou synthèse)
  Trp (α pour recombinés = hyperproducteurs)
  Hyp
  (Lys, Asp, Leu)

dev et perspectives biotec pour la pharmacie.

80 → 85 : hGH, Insuline, IFN, test grossesse, vaccin HepB

85 → 95 : TPA, TNF, IL, vaccin polio ? sida ?
test diagnostic α sondes ou traditionnels (15% du marché).

95 → 2000 : produits en phase d'essai clinique
recherche + innovation = grd espoirs.
potentiel à long terme, mais non acceptable par le publics : les steacks de pétrole. = prots produits par des levures qui digèrent le pétrole + "texture") avec manips génétiques.

dev et perspectives pour la chimie.

80 → 85 : prod enz indust, AA, polysaccharides pliens.

85 → 95 : ingénierie des prots

- modifier un AA ds une chaîne.
- déterminer l'activité & structures 3D et identifier les sites actifs.
- modif structure ex : ajout pont di S.

95 → 2000 : les bioplastiques, substituer les rx par rx enz.

dev et perspectives pour l'agriculture.

80 → 85 : culture in vitro (orchidées, vigne).
amélioration de plantes ou niv semences.

85 → 95 : génie génétique veg.
ex : incorporer une chitinase ds les plantes, si infectée par champ = rhyzoctonia qui est constitué de chitine
ex : protection des plantes ≠ le gel, gène qui est ↘ ds plante → prot qui ↘ le pt de congélation.

95 → 2000 . engrais vert : incorporer les gènes des bact qui incorporent le N_2 atm ds plante puis rediffusion ds sol (rhizobium).
. porg modifiés pour faire rx symbiose.

dev et perspectives pour l'agriculture.

très restrictif.

80 → 85 : impact majeur : valorisaθ des ss produits, culture des porg sur déchets, puis récupéraθ des porg qui poussent en fonction substrat, et contiennent un fort % en prot → alimentaθ animale. avec épuraθ.

85 -> 95 : additifs alimentaires + arômes (champ filamentaire + clitocybes -> "anis", vanilline ...).

95 -> 2000 : pb car peu porté à innovation technique.

Les biotec de la santé.

→ bio médics en VIDAL 2000
↳ endocrinologie, nutrition, croissance, reproduction, ostéoporose, stéroïdes.

→ vaccin anti HIV
6 à 7 sociétés
Genhetech
Bristolmaher
μ Gen system Corp
British Biotec
Oncogen Corp
Pasteur
Repligen et Merck
Gelto Geigy Chiron...
st Hes en phase I.

Biotec et gr pharmaceutiques.

→ les groupes multispécialistes.

nouvelles entreprises de biotec : NEB

les 3/4 st de petites entreprises dynamiques issues de la recherche (Genketech), st les + innovants, à la pointe car basés sur recherche fondamentale.

étapes et essais : 10 ans avant obtenir AMM.

dès qu'une petite entreprise a un produit innovateur elle est rachetée ou associée à un autre groupe.

la 1ère NEB = BASF (pharmacie, agro alimentaire) → TNF, TPA, anticancéreux.

∃ R&Dev interne + accord avec petites entreprises (ex : genetic institut).

ensuite : KODAK, (sg, sida, chimie finie, agro alim)

R&D interne + accord avec des tiers.

idem pour EASTMAN.

→ supportent 10 ans de recherche.

→ principaux groupes généralistes.

. Rhône Poulenc, Dupont ...

chimie fine, agro alim, élabora Θ médics ≠ sida, anticancéreux, hGH, diag HIV, rétro Vir, ≠ Hépatite.

R et D important interne (100e chercheurs) + accords avec 1/3.

ICE : agro alim, chimie fine, → céphalosporines
empreintes génétiques
R & D énorme avec politique d'acquisition.
Monsanto : chimie fine, anti infectieux + glycoprots

protéines thérapeutiques commercialisées issues de NEB.

Amgen
Cetus (1re Brevet sur PCR, racheté par Roche) } TPA insuline hGH
Genentech : la + ancienne
Biogen } vaccin ≠ HepB
G-CSF,
erythropoïétine.

rappels de Bio¢.

¢ procaryote

↳ organismes uni¢ limités par une paroi rigide et complexe
la mb plasmique est interne, forme un repli = mésosome
ou niv DNA bactérien.
mb contient cyz, prot, chaîne respiratoire.
peptidoglycane → donne certaine rigidité.
mb ext : lipide + polysaccharide, contient des porines
pour le passage des molécules de haut PM.
chez procaryote : 1 seul compartiment, ADN central ¢,
associé à des prots, peut se replier sur lui-m̂ (long =
1 mm) empaquetage obligatoire.
seul organite : ribosome → lecture + traduction.

¢ animale

archétype décrit (n'∃ pas).
- mb plasmique, médiateur des échanges
- cytoplasme
- noyau vrai, enveloppe nucléaire → séparation.
  ↳ ⊕ieurs compartiments.
- ADN + prot (→ histones) → chromatine.
- nucléole = site producteur des ribosomes.
- ribosomes
- mitoC, réservoir d'E pour les aérobies.

- syst endo mb = RE, Golgi, syst lytique = lysosomes

comparaison pro/eu caryotes.

organisme	bact + archaebact	protistes, champignons, plantes, animaux.
taille	1 à 10 µm	100 µm.
DNA	circulaire, peu d'introns	très long, seq non codantes.
ARN + prot	1 seul compartiment	⊕ieurs
cytosquelette	non	oui
	uni¢	pluri¢.

Hes les ¢ d'un org possèdent la m̂ info cellulaire.
support DNA.
transmission info ¢ par réplication.
transformation info par ARN puis prot.

génome bact : ADN ¢ circulaire bicaténaire. possède des gènes uniques, alignés à un fonctionnement régulé.
synthèse, grâce à ARN polymérase unique, se fixe sur seq promoteurs = petite seq 10ᵉ nucléoT = tata box.
l'ARN polymérase parcours la matrice = ADN 3'→5' G→D jusqu'au codon initiateur, synthèse ds sens 5'→3'
↳ transcription info jusqu'à atteindre le codon stop, où synthèse nbx résidus U.
avant, nec 2 seq complémentaire pour avoir structure en épingle à cheveux.

ARN_m transcrit ou non transcrit.
pb de régulation chez procaryotes. le gène va être réprimé ou non → économie d'E.
exp: opéron lactose d'E Coli.
∃ molécule inductrice qui fixe le répresseur.
inducteur = lactose.
si présence inducteur, fixation sur le répresseur qui ne pourra plus se fixer sur l'opérateur d'où synthèse enz.
1 seul compartiment : transcription du même lieu que traduction.

traduction implique RNA_t. lien RNA_t-AA.
autre RNA_r + prot = ribosome. → 2 ss unités.
la grde : RNA 23S + 5S.
la ptite : RNA 16 S.
ribosome contient 2 sites pour RNA : 1 site A (ARN_t entrant) + 1 site P qui va fixer le pptide en voie d'élongation.
3 phases : init, élong, term.
* init : complexe faisant intervenir ≠ facteurs, fixe RNA_t-Met sur ptite ss unité → complexe initiateur recherche codon init AUG sur RNA_m.
puis fixation de grde ss unité.
* élong : . accrochage de 2e ARN_t sur site A.
. formation l. pptidique.
. translocation du site A vers P.
↳ A libre, peut accepter nouveau AA-RNA_t.
* term : codon UGA ou UAA généralement.

génome des eucaryotes : gènes, maculés, répétés, à fonctionnement régulé.

↳ gène en mosaïque, seq non codantes : majorité, ph transcription se fait ds noyau. ∃ +ieurs RNA polymérases :

I → RNA_r

II → RNA_m

III → RNA_t

transcription : ∃ ≠ signaux init (AUG).

l'ARN$_m$ va être coiffé d'une guanosine méthylée terminaison par une queue poly A. très importante pour la traduction.

AUG la + proche tata box → les autres AUG ne sont pas pris en compte après → prot polycistronique.

chez les procaryotes, si +ieurs AUG, ils sont pris en compte → prot monocistronique.

chez eucaryotes maturation RNA$_m$ post transcriptionnelle pour éliminer les introns.

il y a transcrit I → excision les seq non codantes. puis soudure (= épissage) ds noyau.

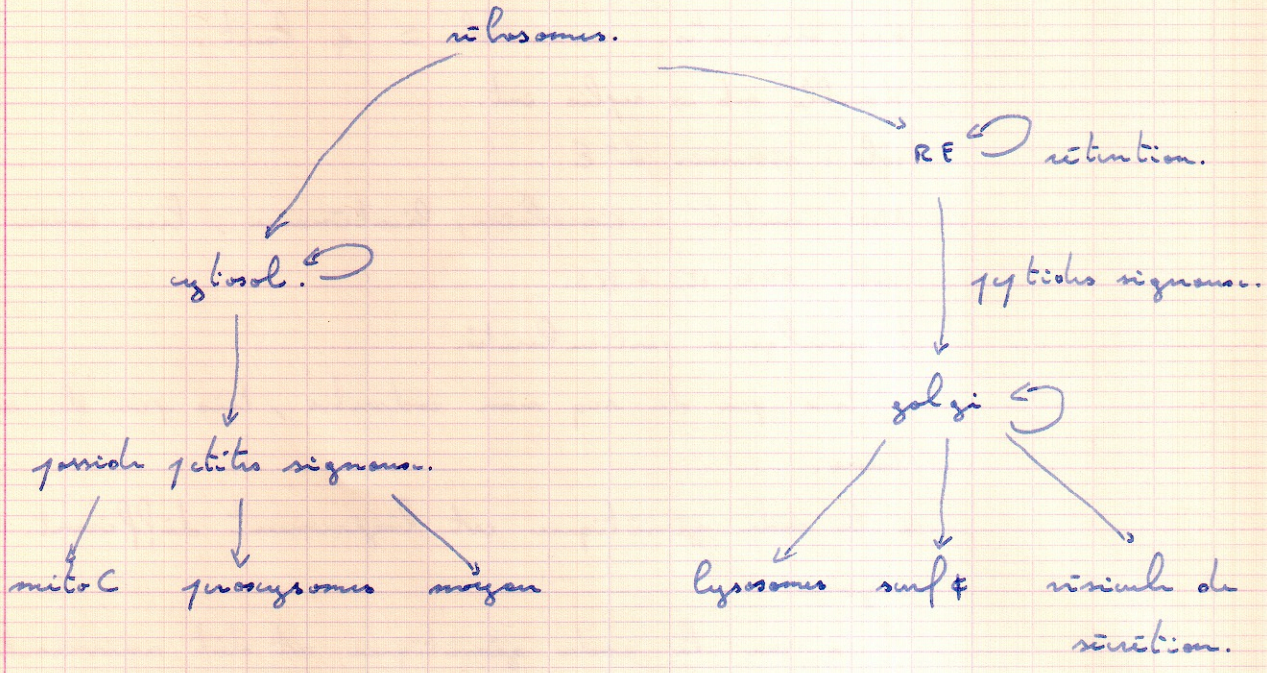
↳ transcrit II

un transcrit I peut donner des produits ≠ ex:

ds thyroïde : calcitonine

ds hypophyse : autre hormone.

itinéraire simplifié des prots synthétisés.



RE

REL + REG (→ comporte ribosomes).

→ transport

synthèse lip (REL), prot, glycoprot qui s'échappe du golgi (REG)

emmagasinement + stockage, calcium + ions ¢.

détoxification. (REL)

Golgi

saccule + face cis + face trans.

ent "sulfurations."

glycosylation

+ diverses transfos

tri

ent surf mb.

lysosome sécrétion

la mitoC.

étude du DNA mitoC → hypothèse endo symbiotiq des organites. ressemble à ¢ bact.

double mb → replis int.

rôle : réservoir d'E.

ADN mitoC : circulaire, bicaténaire, bien connu car séquencé

code ARN 12S + 16S.

∃ quelques particularités.

- très peu de seq non codantes, très peu de syst régulateurs.
- le code génétique est légèrement différent des autres organismes.

? → car le code génétique est dit universel.

ex : UGA = stop (code universel) ou Trp (code mitoC)

AGA = Arg (code U + mitoC veg)

stop (code mitoC des mamifères)

Ser (drosophile).

↳ dérive du code, qui est aléatoire.

transfert des gènes mitoC vers le DNA ¢.

↳ en fait un organite semi autonome

réplication indépendante, ses nbx gènes st portés par le DNA nucléaire.

hypothèse endosymbiotique

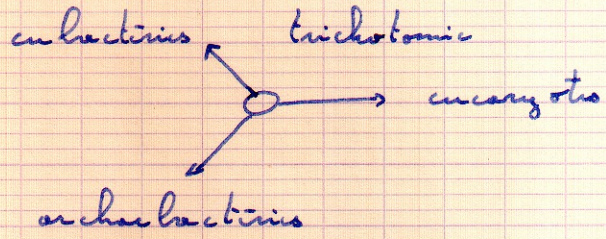
les ¢ procaryotes qui ont acquérit la phosphorylation oxydative ont été endocytées par des ¢ eucaryotes qui étaient anaerobies. + transfert des gènes procaryote vers le noyau

→ ¢ actuelle.

preuve : ∃ des ¢ eucaryotes anaérobies. ds les ¢ intestinales d'animaux, en symbiose avec des ¢ procaryotiques qui possèdent ATP ase.

<u>étude des RNA</u>

importante pour analyse pro/eucaryotes
molécules très conservées, pour comparer les 2.
car au départ, on avait peu de critères de classification
→ établir phyllogénèse universelle.



synthèses et transformations.

I biomasse.

rappel : (en 3e A, c'est pas vraiment un rappel, mais bon...).
champignons (chp) = porg eucaryotes à noyau, mb nucléaire + organelles.
séparés en 3 gr.

- les levures (lev) où la forme unic prédomine.
  - ↳ ascomycètes : reproduction sexuée par ascospore (4 en général) ds une structure spéciale (asque).
  - ↳ basidiomycètes : avec basidiospores, externes qui prennent naissance sur une baside
  - ↳ lev imparfaites, à mode de reproduction inconnu.
- les chp filamenteux : hyphes = filaments
  - ↳ ascomycètes
  - ↳ basidiomycètes
  - ↳ deutéromycètes (= adénomycètes).
- les macromycètes : chp produisant les carpophores
  - ↳ ascomycètes
  - ↳ basidiomycètes.

Les 3 catégories st utilisées en biotec
↳ cultures industrielles, impliquées ds synthèses.

α chp, produire Q importante de chp pour alimentation animale ou humaine.
distinguer 3 volets :
- production industrielle de chp comestibles.
- culture de biomasse fongique pour l'alimentation (lev + chp filamenteux), cultures en fermenteurs.
- utilisation chp ds industrie agro-alimentaire comme ferment (fromage, bière...).

1) production chp comestible.

2 groupes
→ chp mycorhiziens : poussent en symbiose avec des plantes : bolets, truffes, girolles.
implique le travail en champs + arbres → culture limitée. inoculer chp ds sol, dev des mycorhizes
→ chp saprophytes cad dev ou dépend de matière morte (vegs ou ss produits d'élevage).
5 espèces principales.
- Psalliota bispora = chp de couche ⇒ 1,6 M tonne produit ds le monde/an pour Hs chp, avec majorité de P. bispora.
- Lentinus edodus = chp noir = "Shii-take", culture industrielle au Japon.
- Pleurotus astreatus = le pleurote.
- Volvariella (en Orient)
- Flamulina velutipes.

cultivés ds sacs remplis de matière organique à faible coût : déchets agro-alimentaire + rebus.
ensemmencés avec spores ou mycélium, puis dev.

autres cultures : en cylindre (pleurotes)  , en chambre d'inoculation... troncs d'arbres pour le chp noir : on fait des trous à la perceuse, inoculation par suspension de mycélium.
maintenant : tendance à cultiver en étagères pour faciliter les récoltes.

le repiquage des chp = comme pour les bact.
2 coupe chp au stade du bouton (protection par le voile général) → milieu stérile au bec bunsen, oese...
on peut aussi partir de spores, issues 2 sujets adultes
↳ récupérés et réunis en milieu de culture.

2) production de biomasse fongique en bio réacteur.
but : avoir grd Q chp pour alimentation humaine ou animale. → recherche % prot.
chp : 50% prot, 30% glucides, 5 à 10% lipides
5 à 10% ac nucléiques (ADN : 2%)
le reste : sels minéraux.
avantage des prots : bien équilibrés en AA naturels.
chp + 1 kg sucre — 10 j → 140 g prot
porc + " — qq mois → 40 g
poulet + " — qq mois → 50 g
le ρ de conversion est grd, de plus la vitesse de croissance est importante
on utilise la capacité de croissance élevée + capacité d'utiliser de nbx substrats : mélasse, lactosérum (petit lait), etc... avantage pour déchets et substrats polluants de l'industrie.
DCO = demande chimique en oxygène → cad Q d'O_2

suffisante pour oxyder totalement le polluant
(→ CO_2)
ex : lactosérum DCO = 60 000 mg/l
nec fournir 60 g O_2 pour l'oxyder totalement
ds eau normale, conc à sat = 7 mg/l, d'où le
caractère polluant.
↳ le faire métaboliser par chp donc épuration (↘ DCO)
et valorisation par production de protéine.

on peut utiliser d'autres org : lev + bact.
bact G = 30 min
lev G = 2h } → croissent + vite.
chp G = 2 → 8h } → 1er inconvénient
inconvénient chp : optimum de 0°C de croissance autour
de 20°C. pour la culture en fermenteur, nec
réfrigérer car les rx biochimiques produisent chaleur.
aussi : synthèse de molécules indésirables (mycotoxines).
avantages :
→ capacité à utiliser des substrats très variés du fait
de leur dotation en enz, notamment utilisation
de l'amidon. (avec α amylase → riz + céréales).
→ tolérances aux pH acide ≈ 3 voire en dessous.
lors d'une contamination bact, se dev à pH = 6 → 8,
pas en dessous de 4,5. pas de dev des bact nuisibles.
↳ on n'est pas obligé de travailler en milieu stérile.
en agro : salaisonnerie, citrate comme additionnel.
→ faciles à récupérer → amas mycélien récupéré par
filtration. séchage + traitage aisé.
→ la structure des hyphes est apte à les faire
rentrer ds la composition d'aliments.

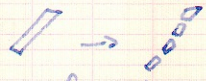
Rq : chp : % DNA élevé → ↗ production ac urique et provoquer la goutte chez homme. chez les ruminants, dégradé en allantoïne, non tonique.

application pratique de la culture en biomasse.
↳ PELIKO process en Finlande où on utilise les liqueurs sulfitiques : rebus d'industrie papetière. au stade industriel, ds fermenteurs de 360 m^3. chp utilisé = Paecylomyces variotii proche du pénicillium.
↳ procédé anglais, en alimentation humaine "Mycoprotéin" production à sucre utilisé en confiserie (qualité alimentaire) chp = Fusarium. volume = 1,5 m^3 pour les fermenteurs.

→ incorporés ds plats cuisinés, soupes, biscuits, également comme agent texturant des pâtes alimentaires, etc...
production réduite : 100 t/an
avantage : qualité diététique du chp (prot + Vit).
1er pb : aspect lors incorporation, couleur pas bien perçue.
2e pb : odeur particulière, nec traitement.
3e pb : ac nucléique, limite débouchés.
→ peu utilisés pour alimentation humaine. sauf pdt les 2 GM.

3) <u>utilisation de la production vers l'agro alimentaire.</u>
↳ agent de maturation pour affinage des fromages par exemple. distinguer :
• affinage en surface → Penicillium camembertii (pour le blanc du brie, belle des champs, camembert) pulvérisation en surface → aspect blanc.

puis maturation ext → int assurée par le chp et donne les caractéristiques du fromage.

- maturation interne → fromages à pâte bleue, chp = Penicillium roquefortii (bleu d'Auvergne, Gorgonzola) on ensemence le lait + ouverture pour laisser passer O_2 → veines aérées ds fromage.
- Geotricum candidum "aux vertus anticancéreuses" (cad pas de travaux sérieux). forme des arthrospores → fragmentation en petites spores  autres : cultures sur thé ou lait → chp du Tibet.
- pour la salaisonnerie (fabrication de saucissons). agent = Penicillium nalgiovense → donne la blancheur engageante et occupe la surface pour éviter le dev d'autres champignons. ds fabrication industrielle → procédé discutable ou talc.

II métabolites I

on utilise les chp pour produire les métabolites primaires. par def : Hs les métabolites issus du processus de dev et de reproduction du chp
↳ production E et élaboration de molécules de structure (mb, paroi), AA, Vit, nucléoT, oses, ac organiques.

1) les ac organiques

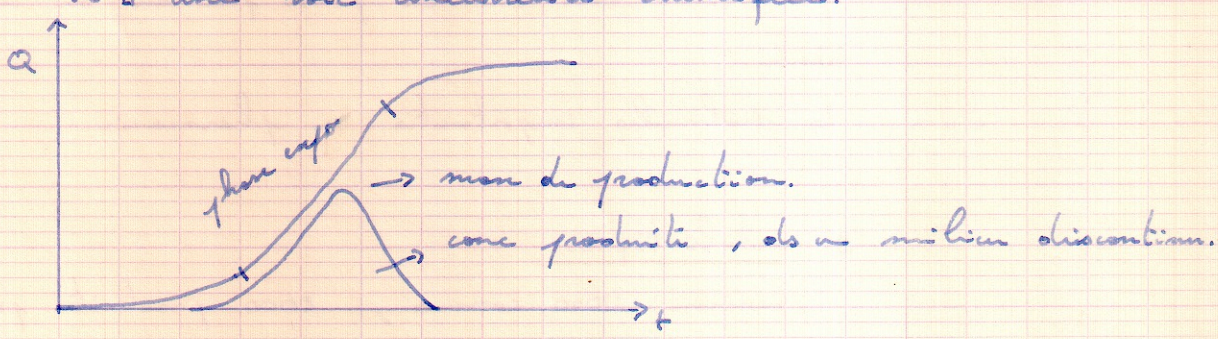
le + important = ac citrique = 99% produit par voie phiologique le 1% restant α des agrumes. il n'y a pas de synthèse chimique rentable.
1980 : 220000 t 1990 : 400 000 t.

production réalisée par Aspergillus niger & substrats variés intermédiaire cycle Krebs → Aspergillus hyperproducteur en ac citrique.
utilisation ds agroalimentaire (acidifiant, antioxydant → effet conservateur ds industrie φ pour 20% de la production). les 10 à 20% restant pour la métallurgie lors de la purification des métaux : agent chélatant des ions.

autres ac : lactique, gluconique, itaconique, glutamique mais en Q plus faible.

On réalise des cultures en surface ou immergée cad ds liq.
immergée : va former des amas = "pellets"
O_2 diffuse à l'ext mais pas à l'int.
sortes de billes qui grossissent
en surf : 1 kg / m³ de fermenteur
immergé : 18 kg " " " , ↑ ρ.
fermenteurs utilisés : 200 m³.
les conc obtenues varient entre 120 et 180 g/l pour ac citrique.

pour ac gluconique : prod de 60 000 t/an utilisation ds les prep pharmaceutiques. chp = Aspergillus niger
il ∃ une voie concurrente chimique.



2) les Vit

la principale = riboflavine.
espèces : chp filamentum.
la pro VitD est un ss produit de la production antibio.

3) les polysaccharides.

molécules importantes sur le plan pharmaceutique ;
le Pullulane, molécule soluble, à propriétés physique particulière, ici : peu perméable à O_2. mélangé à d'autres polymères → films imperméables à O_2.
↳ empaqueter et empêcher l'oxydation des denrées alimentaires. (pullulane + cellophane par ex).
produit par chp = Aureolasidium pullulans.
2 M$ pour le pullulane en utilisation industrielle.
en pharma : on utilise un polysaccharide comme succédané de plasma sg.

III métabolites II.

par def, ne st pas nec pour la reproduction et au dev du chp. ds le métabolisme total, considéré comme déchet.
molécules importantes sur plan écologique : protection de E coli par la colicine.
production lors de la phase plateau ou en phase de décroissance.
↳ molécules importantes en pharmacie.

1) antibiotiques

environ 11000 connus, 2000 produits par chp.

antibios d'origine fongique = 60% du marché (avec les produits hémiS. majorité = Pen + céphalo S.
produits par Penicillium chrysogenum et Cephalosporium acremonium.

4) arômes

intérêt ds industrie, ↗ marché. possibilité infinie pour réaliser synthèses.
anis, amande, odeur de rose, jasmin (par Inocybe corybiana)
par chp groupe des Trametes, Ceratocystis, qui poussent sur bois.
anis par Pstiallota, Clitocybe odora.
Trichoderma virides → filamenteux.
on utilise les filamenteux et les chp à carpophore. les bact st ⊖ performantes pour la production.

5) hormones vegs

depuis longtemps, on sait que les chp st capables synthèse hormonale : les gibérellines avec Giberella fujiphuroi qui provoque une hypercroissance des tiges de riz
(cf 2eA Bio veg)
+ production d'auxines.

IV enzymes

1) hydrolases

• glucidases comme ds les bombons à centre mou : incorporation de l'amylase des chp.
• α amylases pour la brasserie (Aspergillus niger) → malte + germe contenant α amylase. bière synthétique directe-

ment fabriqué avec α amylase seule, origine fongique.
↳ dégrade en sucre + simple ex: saccharose
car les petits organismes n'y arrivent pas.
Aspergillus oryzae, Rhizopus sp.
agroalimentaire → brasserie, confiserie, boulangerie,
(de étape panification → lev utilisent sucre si ajout
α amylase → ↑ CO_2).

- β galactosidase : pour les personnes déficit de cette enz → ne peuvent utiliser le lactose. Le lait est enrobé prédigéré avec β galactosidases (Aspergillus).
- dextranases : élimination de la plaque dentaire
- pectinases : (A. niger) → clarifier le jus de pomme.
- pentosanases : industrie du vin (≠ trouble) (A niger)
- linamarases : détoxification du manioc.

2) lipases.

très importantes → industries fromagères.
Mucor michei (→ "coagulite)
Geotrichum candidum.

3) protéases

- mucor michei mutt → coagulation lait pour industrie du fromage, premier microbisme action protéolytique. marché énorme.
- acides, basiques, neutres, → hydrolyse du soja, attendrissement de la viande, affinage des fromages industriels (Aspergillus oryzae).

4) oxydases

ex: glucose oxydase → antioxydant très utilisé

pour éliminer les traces de glucose. protection des aliments stabilisation des couleurs + saveurs, bière et boissons sucrées. avant, on extrayait pressure α de la caillette de veau mais pénurie.

V biotransformations.

1) des stéroïdes

11α 11β hydroxylations...
les chp st n° 1 pour ce genre de transfo avec coût faible.
11α → Rhizopus nigrigans (chp sup) → 11α progestérone HO.
11β → Curvularia lunata (chp inf) → cortisol.
autre : testolactone.

2) des antibiotiques

Pen, céphalo S.

3) pesticides.

svt st des molécules synthétiques ; pas d'équivalents naturels → donc pas de pression de sélection, pas de dégradation possible → polluants, danger pour homme. maintenant, on utilise des associations de chp, cocultures ou symbioses = mélanges d'espèces ≠. travail avec mélange : ↗ potentiel de dégradation → rx en chaîne avec complémentation d'activité entre p organisme.

$$A \xrightarrow{chp1} B \xrightarrow{chp2} C \xrightarrow{chp3} D \ldots$$

avantages : spécificité de la rx, du site d'action, stéréochimie, + rx ménagées : pas de dégagement fort

de chaleur. = transfos à bas niv d'E.
on utilise des ¢ entières en dev (pdt ou à la fin de la phase de dev). maintenant on utilise des ¢ immobilisés, spores, ou extraits ¢. et de + en + les extraits isolés.

à inclure

III 1)

1) antibiotiques

∃ autres champ produisant des antibios :

Aspergillus flavus et A. fumigatus

Penicillium griseofulvum, actif ≠ les dermatophytes.

Fusidium coccineum

Paecilomyces variotii.

2) activité pharmacologique.

- hormones libres
- ph de bioconversion des stéroïdes (HO en 5α, 11β...)
- cyclosporines (immuno ⊖)

  ↳ espèce Tolypocladium inflatum.

  La synthèse chimique est possible mais pas rentable.
- inhibiteurs d'enz. (protéases)

  anticholestérol : compactine et mévinoline (idem +OH)

  espèce : Penicillium brevicompactum. permet de lutter ≠ l'athérosclérose.
- hypotenseurs

  Claviceps purpurea → ergot de seigle.
- zéaralénone : agent analabisant utilisé en élevage produit par champ : Fusarium sp.
- immuno ⊕

  Lentinus edodes → lentione

  Schyzophyllum commune → schyzophyllone.

  Coriolus versicolor → krestine

  Pavia cocos →
- inhib d'enz ——→ champ

  calphostine prot. kinase C cladosporium cladosporoïdes.

  cystatine C produite

  tomastachine (act antidiabétique) idem.

3) activité insecticides bio.

champ : entomopathogènes.
se fixe sur insecte, s'introduit et se développe dans les téguments, envahit insecte et le tue.
↳ insecticide biologique.
spore → germe, développement, mort chez insectes.
cultures champ → pulvérisation sur plantes.
↳ pièges mortels pour insectes. une 15ᵉ utilisables.
. Beauveria bassiana ≠ champignons, acariens entomo.
. Verticillium lecanii ≠ punaise des serres.

mycoherbicide → pour certaines cultures.
mycoconcurrents → concurrence entre parasite et champ.
. Endothia parasitica ≠ chancre des châtaigniers
seul inconvénient, pour être actif, doit se développer chez insecte. si conditions pas favorable pour champ → échec.
limitation à certains climats.

Les levures alimentaires.

I introduction.

formes uni & prépondérantes, faciles à cultiver en fermentation contrairement aux chp pluri & (gélules).
les lev st utilisés ds alimentation pour sa composition en prot + Vit élevés chez lev + chp (50 → 70% ds la biomasse sèche).
principe de culture : fournir un substrat qui va donner de la biomasse particulaire ss forme de levure.
nec O_2 : obligatoire avec substrat → rx en aérobiose + N + oligo-éléments → O_2, C, H, N, S, P, Fe, Co, Cu.

on utilise comme substrats des ss produits → pas chers.
ce qui est cher → O_2, nec fournir E : insuffler air + agiter.

II clf

1) Lev ferment

Lev vivantes qui provoquent la fermentation alcoolique en anaérobie. ds tech agro-alimentaires, utilisés pour leur activité : panification, brasserie, vinification...

2) lev thérapeutiques

¢ vivantes ingérées pour ≠ propriétés : lev officinale = saccharomyces cerevisiae.

3) lev aliments

¢ tirées puis séchées, cultivées en aérobiose.
l'env ¢ a éclaté sans altérer la composition du produit pour ↗ l'utilisation de la matière organique.
utilisé pour leur composition : prot, VitB.

utilisation qui remonte à la 1ère GM, lors des pénuries d'aliments, pour incorporer ds rations alimentaires.

III organismes, substrats, procédés.

1) porg

3 groupes : lev, chp sup, bact.

a) levure

- avantages
  - connues depuis longtemps, innocuité prouvée, peu de lev pathogènes. porg très étudié. culture se fait ds bonnes conditions.
  - rarement toxique et pathogène.
  - dev à pH acide = sélectif (≠ bact)
  - facile à récupérer (par filtration ou centrifugation) (bact : nec ultra centrifugation).
  - % en prot élevé + richesse en lys
  - faible % en ac nucléiques (par rapport aux chp) mais reste élevée.

- richesse en VitB
- utilisables en l'état.

• inconvénients
- croissance G = 2 → 5h.
- faible % en AA soufrés (Cys, Met)
- prot ≤ 60 %
- teneur élevée en lipide → rancissement, toxidation.
- thermophilie peu élevée : nec refroidir les fermenteurs 35 → 38 °C nec < 40 °C.
- choix limité d'espèces chp : 20000 lev : 600 dt une 12e utilisée.

b) bactérie
* G faible
* % prot et lip adapté
* choix d'espèces illimité
. mauvaise connaissance des espèces, innocuité difficile à prouver
. risque synthèse molécule toxique
. pH neutre
. petite taille ¢.

c) moisissures.
. G très long
. choix très important
. on ne connaît pas tjrs les risques
↳ mycotoxines
. connues depuis longtemps
. grande variété de substrats
. % prot ≤ 75 %

2) substrats de croissance.

types de substrats :

. N paraffine, méthanol (déchets industrie pétrole).

. mélasse de canne et autres amylacées (déchets agro A).

. substrats cellulosiques, liqueurs sulfuriques de l'industrie papetière, polluants très forts.

. lactosérum, déchets de confiserie.

. déchets de l'industrie antibiotique.

en fonction du substrats, les difficultés ne sont pas les mêmes. nec O_2 pour les biomasses.

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 3\,C_2H_6O$

nec 3 x plus de O_2 pour culture.

C_nH_{2n} → nec O_2 → coût $\mathcal{E}$ d'agitation + aération.

autre inconvénients : très producteurs de chaleur.

pb d'acceptabilité publique (steack de pétrole)

pb d'extraction de molécules toxiques.

N paraffine → non utilisé

méthanol → très utilisé.

déchets agro A → valorisation des déchets toxiques

aspect : épuraθ et valorisation.

3) procédés

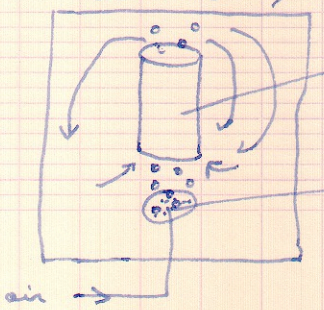
société Bel (vache qui rit).

↳ lactosérum. Q nec grd.

cuve de stockage lactoS.

↳ fermeture de type air lift = inj air sous pression

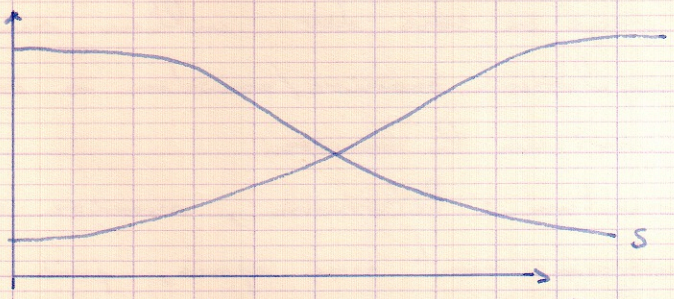
aération, mélange, homogénéisation.



→ cylindre qui crée des mvts en retour → mélange sans action mécaniq

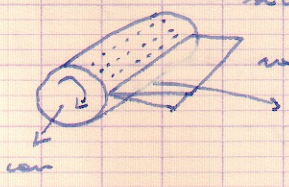
→ diffuseur (Spagor).

plus les bulles sont petites, meilleur est le transfert de O_2.
dedans : lactosérum, pH ajusté à 3,5 chauffage à 38°C
25 m^3 pour 38°C → syst double cuve avec circulation d'eau. S = lactose à 50 g/l.
ajout de $(NH_4)_2SO_4$ pour la source d'azote assimilable.
utilisation parfois d'ammoniac liq = source de N + régule le pH (acidification par les levures).
le substrat carboné va être non régulé.
+ inoculum : Q 3% p/p de levures.



biomasse 20 à 25 g/l.
= suspension levure.

↳ centrifugeuses industrielles en continu.
↳ crème de levure, encore hydratée (30% matière sèche)
↳ ≠ types : filtraθ sur filtres particuliers.
séchages sur rouleaux.



paillettes = crème de levure desséchée et raclée par ce couteau.
conc par évaporation triple effet
chaque étage a un effet : une partie de l'eau est évaporée. à la sortie : séchage sur tour de séchage où on pulvérise ds enceinte à 200° - 230°C. (comme la poudre de lait)
↳ mis ss forme de cps.

Procédé : Symbe Chemap.
utilise une coculture biétagée.
source amidon en sol + ou - pauvre . suspension.
↳ à usine de traitement de pomme de terre.
→ 1ère fermeture : 1er étage, champ = Endoxycapsis fibuliger, capable de dégrader amidon grâce à amylase, le produit est alors envoyé sur le 2e étage. (champ filamenteux pour hydrolyse).
au 2e : levure qui utilise le saccharose + divers sucres.

ds pays en voie dev : culture sur manioc principalement manioc/amidon → enrichissement en prot sur le manioc.
fermenteur : bétonneux, manioc en lamelles ensemencement avec spores, puis utilisation en alimentation animale.

boîtes. Candida albicans → albanis → BP
taux de croissance spécifique = taux de dilution (croissance continue).
(Yield = ρ).

→ déchets papeterie : Candida utilis, vitesse de croissance est plus importante, caractère plus oxydant.
↳ Phillips.
→ Kluyveromyces marxianis → Bel (8000t/an, peu).
→ Pichia pastoris → méthanol BP.
→ Saccharomyces cerevisiae → mélasses.
la plupart des procédés st amerloc

IV produits obtenus

1) composition globale

ex : lev de panification.

glucide : 46 %

prot : 42 % (dt ac nucléiques)

graisses + stérols : 8 %

matières minérales : 5 %

Vit.

2) détaillée

pour les prot : teneur en AA élevée, les levures aliments st riches en AA essentiels comme Lys ou Glu (correcteur de goût) ou gluthation. st pauvres en AA soufrés.

pour les Vit : lev torutil = société calaisienne des pâtes à papier : culture lev sur cellulose.

↳ Vit B_1, B_2, ac panthoténique, PP, B_6, choline, ac folique ← grd Q.

en général, les fabricants ne garantissent pas les teneurs en Vit.

3) préparation

destruction ¢ pour une meilleure digestion.

→ hydrolysats (prot)

= hydrolyse réalisée avec base plutôt qu'acide.

⊖ dangereux pour certains AA (Met et Trp). pour la conservation, ramener au pH neutre. mais prod sels = limite utilisa⊖.

→ autolysat

cad on utilise un p'org sélectionné pour son aptitude

en fin de culture (détermination génétique).
enz → polypeptides plus faciles à digérer, élimine les structures ¢ d'enveloppes de nature glucidique par centrifugation (↑ ρ prot).
puis séchage par atomisation.
→ Isolat
= prot solubilisés en milieu alcalin. élimine les débris solides puis pH acide. lavage, séchage.
↳ poudre blanche contenant AA particuliers.

Fould springer:
autolysat de levure en poudre type pharmaceutique
def : produit de dégradation → composition, description, analyse bactério : conditions non aseptiques, pH acide par autolyse stabilisation du produit.

V applications. (ds agro alim)

humaine : incorporés ds autres aliments, typiquement, c'est un ajout de lev pour leur qualités nutritionnelles mais aussi pour le pouvoir liant + capacité de rétention d'eau.
↳ soupes lyophylisées, biscuiterie, pâtes alimentaires.
ou utilisa θ directe, à état de lev diététique se vend à 30 Frs le 200 g (brut 15 f le kg).

pet food : donne apétence particulière si incorporée.
pas de limite en % avec ac N. provoque ↑ croissance, ↑ résistance, ↘ contamination ds les élevages denses.

VI production française.

100.000 t cad faible

Bel 10.000 t, la 1ère productrice.

perspectives : pas rose, concurrence avec vegs car dumping vert CEE.

VII levure thérapeutique.

on donne sv t ultralevure avec antibio.

< 80, études → intérêt à utilisaθ.

1) historique.

depuis antiquité : on fait boire la bière à des gens qui ont des pb intestinaux.

bière blanche pour femme enceinte : supp de lev pour la fabrication de bière pour palier carence en Vit

2) mode d'action.

phase IV d'expérimentation depuis des 100e d'années.

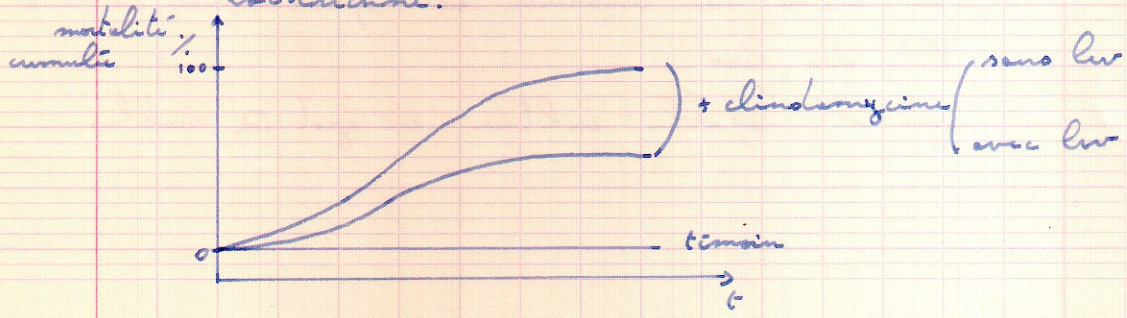
on reprend Hes les étapes de validaθ.

utilisation clinique rationnelle car avant : empirisme.

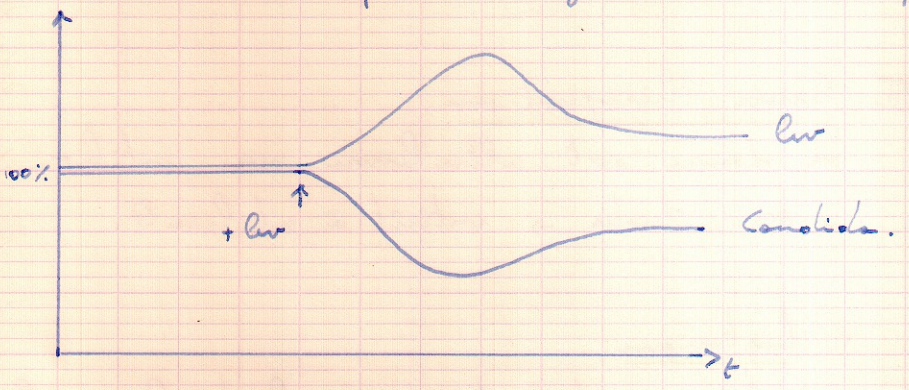
lev s'implante ds le TD et permet de compenser une carence en Vit B ?

↳ faux, ne s'implantent pas. elles y transitent élimination en 24h.

joue un rôle antagoniste vis à vis de la flore bactérienne.



empêche le dev bact pathogène (ex : Clostridium difficile).
antagonisme idem avec Candida albicans.
dénombrement en fonction ingestion ultralevure.
avec num fécale chez souris axéniques.



mécanisme d'action pas tjrs connu.
↗ act enz liée à ingestion de Saccharomyces boulardii
↗ lactase, sucrase, maltase
lors ph diarrhée ↘ enz → traitement par levures.
activité immunomodulatrice → stimule act immuno du TD, favorise résistance organisme après ingestion.

3) <u>intérêt prouvé</u>
antagonisme, occupation du terrain. pas d'implantaθ mais passage. marche sélectivement ≠ certains porg.
inhibe synthèse enz bactérienne, ↗ prod enz.
↳ effet protecteur, préventif et curatif, sur infestaθ intestinales, coliques, diarrhées.
→ mise en évidence act protectrice = liée à la vitalité des lev
on est capable culture en grd Q viable.

Biotec végétales

"souplesse du veg" : coupure d'un bourgeon, bouture de cou
↳ vivacité + forte que animal.
ex : régénération de la plante complète à ¢ non sexuelles.
1 ¢ somatique possède tt le patrimoine génétique, mais
tts les ¢ n'expriment pas le m̄ message. sur obéir à
un prog gen pour la spécialisaθ ¢.
expression d'une partie du prog gen pour assurer 1 type de
fonction ex : pétale → synthèse colorant.

Principe de culture in vitro

isoler explant cad soustraire au prog gen et on peut
réorienter la lecture du message gen → rompre les corrélaθ.
en fonction culture in vitro : reprogrammaθ = dé≠ciaθ
pour diverses fonctions.
ex : Xcaθ unique, organe, cals, ou plante. (totipotence)
↳ guérir plante de virose
↳ Xier
↳ régénérer à 1 seule ¢
↳ sélectionner
↳ fixer (faire phénotypes)
↳ fusionner et transférer le génome
résulte de la souplesse du génome.

Guérison des plantes.

domaine des virus. limitent prod veg. ∃ pas produits chimiques efficaces. si infection virale + repiquage de la plante infectée → propagation virale.

1932-35 : Philip White, ss la direction de Stanley (structures virales) réalise une culture ¢ de racines (cad pas la forme veg totale).

a réussit à faire pousser la racine indéfiniment. (de tomate) infectées.

sur boîte de pétri ; coupe en tronçons pour culture qd repique extrémités (mérystèmes) ou morceau très petits. → pertes infection virale. ¢ vieilles = infectées vérification sur mérysthème de tige.

en 1949 ds plante virosée, on découvre surtt les virus ds les parties agées. ↘ ds les parties jeunes.

par cette meth, Dalhia sauve la Belle de Fontenay (patate): prélève un dôme de mérysthème puis culture in vitro sur milieu approprié (hormones, oligoéléments) on ne sait pas pourquoi le mérysthème est non infecté.

? antagonisme mécanisme d'infection virale / Xca θ passage moins facile des virus ds le mérysthème.

cas particulier : les orchidées. certains symbidium étaient virosés. Xca θ nec par boutturage avant, sinon perte de pedigrée.

culture in vitro du mérysthème d'Orchidées

↳ structure en dev = protocorme (p bulbe) similaire si on fait germer orchidée

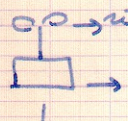
↳ "protocorme de régénération" qui fait un bulbe II

et se Xie. chq petit morceau régénère un protocorme.
↳ résolu pb virose et XcaΘ.
Hes les orchidées st produites ainsi ↘ coût ∝ années 60
la plupart des plantes horticoles st produites en tube.

ce n'est pas une vaccination. nec garder en vitrothèque
pour garder la souche propre.

Isoler par coupure.

s'applique à Hes les plantes.
dev. pas de régénération.
cf hormone auxine c (Bio Veg 2eA)
coupure donne dev bourgeon en dessous.
on est capable de dé≠cier les ¢ spécialisées au lieu de
coupures simples.

explant ⟶  → régénération
→ prod embryon
↳ dev anarchique : cal.

ex : feuille de Drosera (prog tige)
soja (prog embryon)
repiquage pour cal : ¢ de carotte en 1934, elles st
encore repiquées indéfiniment.
on est capable de rédifférencier prog et revenir à la
plante ex : cal de luzerne → ≠cier en embryon.

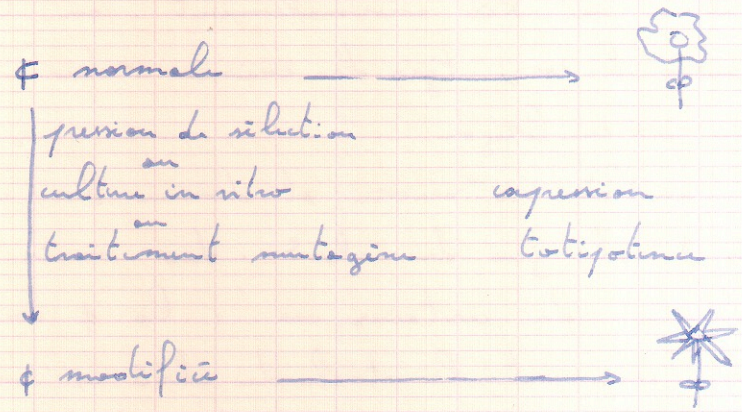
p propagation : tech douce (explant mérysthème, bourgeon
→ "bouturage in vitro" → refaire plante).
tech élaborée → cal maintenu indéfiniment ou bien
rédifférencié en embryon, feuille, racine, tige...

X ca θ

épicéa et autres arbres. qui ont une maturité longue à atteindre. plus nec de reproduction sexuée, cassure du cycle. on est capable de faire sans floraison (cultures difficile) + plantes hybrides difficiles à conserver (en tant que phénotype). → "semences artificielles".
= faire coque protectrice autour de l'embryon technoformé. plante modèle : carotte - phénomène d'embryogénèse somatique.
prendre ¢ de jeune germination + hormone 2KD (à petite dose) → suspension.
filtrer → récupérer ttes les phases dt 1 proembryogène si suppression 2KD, chq masse évolue vers un embryon idée ; prendre ces embryons et les envelopper ds alginate (gel avec ion divalents). ou liq sans dicions → ds susp calcique + embryon → enrobage. (B)
pb de conservation : 95% cou. possibilité de les faire germer.

jusqu'où va la capacité à faire régénérer?
logiquement chq ¢ est capable de redonner le tt ("vraie totipotence") = théorie ¢ de 1938.
totipotence vraie démontrée et réalisée en 1965.
isoler 1 ¢ → donne la plante entière. pb de conditionnement. ¢ isolée sur papier filtre, posée sur cal pour donner un environnement favorable au dev de la ¢ unique
démo complète : ds gtte pendante, milieu culture ¢ → massif ¢ → pcal → plante complète.

Obtention de mutants par culture in vitro.



nec avoir caractères ⊕.

ex: tabac, faire résistance aux herbicides par culture étalée sur boîte de pétri comme bact, avec agent herbicide (= agent de sélection) en dessous dose létale
on récupère le pcal qui s'est développé.
nec avoir un gros pool au départ.
refaire cycle pour être sûr de la résistance.
↳ tabac, maïs.
↳ tech de plio. variantes: stress thermique, toxine, métaux lourds.

cas particulier: on est capable de fixer génotypes grâce aux grains de pollen. résultats obtenus par hasard.
Indiens en 1964. cultures vegs in vitro, on voulait avoir nbx cultures. → certains explants étaient des anthères.
→ laissés à l'abandon → dev d'embryoïdes. les grains de pollen se st réorientés vers la production embryon au lieu de la production γ ♂.
confirmation par autre ex: plants de tabac haploïde, α grains de pollen immatures (∃ 250 cas).
pollen mâture: pas capable de faire autre chose que fécondat°
pollen immâture: lorsque panicule caché par feuilles: 1 seul

noyau. explanter les anthères immâtures, le grain de pollen se Xie anormalement. au lieu des 2 anthérozoïdes & co, tjrs ds excine : dev 100e de ¢ qui donnent un pro embryon.
l'anthère s'ouvre et donne des embryoïdes haploïdes.
↳ 1 seul jeu de chrS. dev mais la plante reste stérile. ds certains cas : les ¢ ont dev et doublé spontanément le stock de chrS → embryoïdes diploïdes
intérêt : ce st des plantes fertiles, qui se st autoficondées, donnent lignées pures. la méiose sera inefficace car c'est un type d'homozygotisme total.
ex: colza, culture directe du pollen, extraits des anthères par broyage et centrifugation.

cas de l'asperge : plante dioïque. les ♂ st plus productives que les ♀.
avec les ♀, perte d'E qui sert à produire fruits, pas chez le ♂.
↳ "hybrides F" : croisser ♂ + ♀. nec lignées pures pour avoir les bonnes caractéristiques.
normal : F_0 asp ♂ XY + ♀ XX
↳ γ X ou Y X
F_1 ↳ 50% XY et 50% XX
si cultures d'anthères : ♀ et ♂ F_0
↳ X et Y
autoficondation ↳ XX et YY lignées pure. F_1
avec un super mâle.
intérêt du super mâle : lignée pure
donnera 100% de ♂ à F_2.
ceci est transposable pour les oocystes.

Fusionner ≠ génomes.

→ voie douce = voie sexuée.

pollen germe sur espèce compatible. "ph de reconnaissance" du soi et du non soi. le tube pollinique germe. le grain de pollen entre ds ovule, puis sac embryonnaire et fusionne avec oosphère.

lorsqu'on veut améliorer : brasser, α 2 var de blé → trier. embryon dev autour albumen.

si croiser espèces proches → les ph se produisent mais avortement de l'embryon

ex : blé + seigle. le pollen germe mais embryon avorte.

si on sauve embryon → 1er niv intervention pour croiser des espèces proches. mais nec prod embryon.

autre cas : pas de parenté, si pollen germe, il peut ne pas aller vers oosphère. si trop de ≠ces, le pollen ne s'accroche pas au style ou ne germe pas.

on doit alors mettre en présence les 2 γ

réalisation : isoler γ ♂ maïs pour polier les pb mécaniques. disproportion ♀/♂ au niv réserves et info cytoplasmiques : mito C chloro P viennent de ♀.

refaire plante complète = fécondation in vitro.

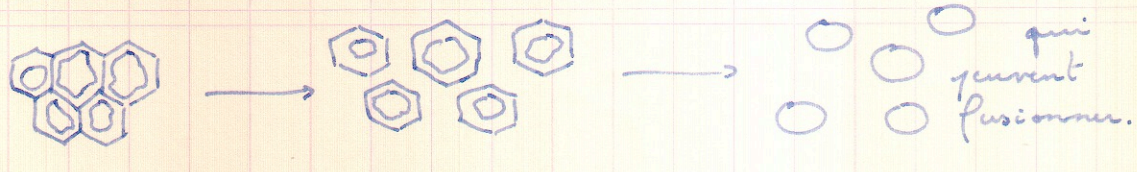
→ voie forcée

α observations de ¢ animales. pas de paroi. mb plasmique pour appliquer au veg : ∃ paroi squelettique qui s'oppose à la fusion des ¢

si cultures : ¢ bordées par une mb. nec faire agir enz.

1ère enz = pectinase (agit sur le ciment pecto cellulosique).

2e enz = cellulase : on obtient un protoplaste, homologue ¢ animal



nec vérifier si on peut les régénérer, car on obtient des états subc.
la 1ère chose qu'elle refait = paroi sq puis les divisions prennent appuis sur la paroi. dev en pcal.
2 milliers protoplastes sur gelose → cals → clonage.
rien ne s'oppose à la fusion, mais après ?
¢ pomme de terre + tomate → Hes les probabilités.
nec trier et régénérer les chimères.
les rencontres se font grâce à des chocs électriques.
→ "pomate" obtenue en 1978, ne produit ni tomate ni pomme de terre.

→ <u>technique du protoplaste</u>.
info génétique ds mito C, chloro P, noyau.
ex : stérilité ♂ contenue ds mito C
résistance herbicide " chloro P.
faire ds 1er temps un hétérocaryon. ds 99% les noyaux refusent de fusionner
pas d'hybride mais mélange du matos cytoplasmique
→ cybrides.
ds 1%, la fusion se passe, n'est possible que si les espèces st proches (ex : tomate et pomme de terre).
→ hybrides partiel (si élimination chr S) ou total (cas de la pommate).

le mélange cytoplasmique crée des cybrides. qui n'est pas possible avec fécondation forcée (♂ ♀ apporte Hc info cytoplasmique)
il y a brassage info cytoplasmique.

ex : colza hybride.
plutôt que de castrer mécaniquement les plantes, on sélectionne des plantes ♂ stériles
(stérilité ♂ chez radis . brassicacées)

colza fertile protoplaste:
chloro P normaux
mito C normales
nucléaires normaux

radis stérile protoplaste
chloro P déficients
mito C "
nucléaires atrophiés.

↘ fusion ↙

↓

7000 colonies screenées
↳ 130 plantes régénérées
↳ 5 plantes à caractère favorable
chloro P normaux
mito C déficient (stérilité)
nucléaires atrophiés.

↓

colza normal + colza stérile

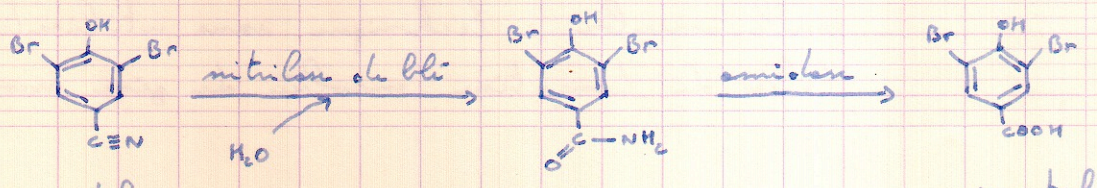
↘ ↙

croisement hybride

recombinaisons mito C
de radis + colza
meth lourde + aléatoire.

Technique de transfert de gènes.

prendre 1 gène et le transférer de façon chimique.
ex : Buctril = anti dicotylédone sélectif (mes pauvres plantes !)



actif

inactif.

prendre une diC, + lui donner le gène de la nitrilase de blé → tester sa résistance.
on préfère prendre la nitrilase de bactérie.
faire pousser bact + pression de sélection | avec Bactril.
pas de nitrilase → pas NH_3 → ↘ | sans N.
possède " → NH_3 → ↗
↳ découverte bact. possède le gène de la nitrilase sur un plasmide (→ manip seront + faciles).
↳ récupérer le gène codant pour la nitrilase
+ manip sur le gène promoteur
+ seq peptide signal.
puis inj du recombinant ds ¢ veg.
moyen : bact comme agrobactérium qui donne le cancer veg. cette bact réalise le transfert génétique du recombinant qu'ont lui a donné sur un des chrS du végétal.
on remplace les gènes de cancérisation par le recombinant et on infecte par ex : les plants de tabac avec la néo-bact
→ découper feuilles tabac (cicatrices) dans une solut° d'agrobactérium + gelose Bactrilée.
↳ les ¢ qui meurent n'ont pas intégré le gène celles qui l'on intégrée l'ont.
un des explants → culture du tabac modifié.
analyse génétiques : extraction DNA, digestion, puis on essaye de retrouver le gène qu'on a introduit.
(de façon propre, bien placé, à 1 seul exemplaire)
vérif aussi par manip mendélienne.

meth amerbc : technique sans utilisation bactérie.
billes de tungstène enrobée de gène recombinant

st pulvérisées sur les ¢ veg par pistolets à air cps ou des accélérateurs. beaucoup ⊖ précis que bactérie.
autre tec : chinoise, par µ injection.

intérêt : faire plantes phosphorescentes.
résistance à herbicide, champignon, insectes (avec prototoxines de Bacillus)
faire tomates qui ne pourrissent pas (la senescence est gouvernée par l'éthylène = hormone veg).
générer de nouveaux coloris.
faire fleur mâle stériles ou des plants super ♂.
perspective : Pseudomonas antigels qui remplacer aient les normaux causant le gel.

Les spirullines.

(algues)

historique

< 45, monde meurt de faim ?
manque probable de prot, nec trouver nouvelles sources.
le belge Brandilly, au lac Tchad, décrit une pop qui mange uniquement du mil + algue tirée du lac à certains moments : ↗ Q, ramassage et séchage
une expédition rapporte les jerricans d'algues, mise en culture laborieuse → spirullines = algue en forme de spirale.

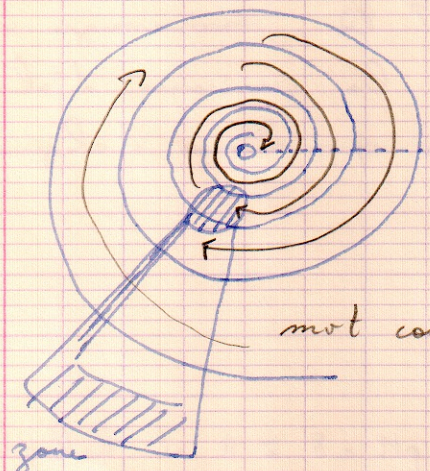
Description

algue qui pousse bien.
nec milieu alcalin pH = 8 à 11 et halophile (40 g sel/l)
composition : caractère exceptionnel.
60 → 72 % de prot
6 → 10 % glucides
12 → 15 % lipides
sels minéraux, pigments, très riche en Vit.
études nutritionnelles → produit remarquable.

Utilisation

en 1967, congrès du Pétrole ds session spéciale divers
car dépollution CO_2 + sel par les algues pdt l'extracθ
du pétrole.
au Mexique : dev ds lac salé nocif
↳ extraction naturelle.
à Mexico : vallée formée par 2 volcans, eau alcaline
et salée à cause de la décomposiθ des roches volcaniques
↳ gisement alcalins
↳ lac HCO_3^- + sel. composiθ identique au lac
Tchad.

conc par énorme évaporateur solaire : le CARACOL ou
escargot.



... collecteur d'eau (pure ou niv toxique
et bactério, épurage par algues).

mvt eau ← arrivée eau usagée égouts
évaporaθ au fur et à mesure

zone
hachurée où conc = 40 g sel/l.
3 km ∅, près piste aéroport.
Δ conc en sel au cours mvt eau. saturaθ en sel.
spirulines + γ algues → donnent couleur ≠.
autour ∃ bassins de contention. la m.o. + sel
est prélevée au centre. mais le sel gêne.
nec mettre au pt meth récolte → créaθ bassins
attenant où conc sel = 40 g/l.

Les Japonais ont essayé de cultiver des chlorelles.
en 40-45 et démontrent qu'elles ne peuvent pas se dev car nec milieu neutre, adhérent aux parois et st très petites.
spirullines : taille 0,3 à 0,5 µm, flottent bien, ne collent pas aux paroi, vivent ds milieu alcalins.
↳ reste à commercialiser.
construction caracol, a duré 5 ans. après plus de spectre de pénurie mondiale.
nouveau client : le Japon pour adjuvants.
avantage : pigments : 4 à 6 g de xanthophylles + carotène par kg = record du monde.
si on donne à poules, les oeufs deviennent rouges pour les colorants :
au Japon : pour colorer leur carpe koï.
amerloc : incorporaθ ds aliments diététiques (peu en France).
France : énormément essais nutritionnels sur l'algue entière.
↳ pour anorexiques restent en vie avec 200 mg/j
↳ aliment complet.
Russie : espace, capter CO_2, recyclage O_2 + photosynthèse. déjections humaines minéralisées par bact → engrais pour spirullines.

Intérêts en Cfic.

Hcs les spirullines conviennent, étude ¢ → la forme n'a pas d'importance, ∃ 1 seule spirulline.
∃ gâteau chocolat avec 2/3% spirulline.

sert pour les carences vitaminiques.
algues bleues : ∃ pigment tétrapyrolique linéaire
chlorophylles : " " cyclique.
le colorant algue bleues est très stable à luz, recherche colorant bleu pour confiserie, mais instable à haute θ°C.

production au départ 1 t/j spirulline puis ↗.
tentatives de culture en peu partant.
Egypte, Martinique, Japon.
Mexicains = les seuls producteurs mondiaux.
∃ sites favorables africains (Ethiopie).

Essais allemands sur Senedesmus 10 µm milieu neutre ou légèrement alcalin.

spirulline, coûte + cher que blé.
↳ à la base couleur flamande rose (caroténoïdes, cf Bio Veg 2e A).
↳ par dissolu⊖ extraction lipide caroténoïdes, on obtient une poudre presque pure en caroténoïdes.
au séchage, certains pigments peuvent être détruits
spirulline sèche : contient ⊖ de germes.
il y a autoépura⊖.

Culture de ¢ animales.

Def biotec

au sens large

application de syst biologiques aux procédés industriels.

au sens restreint

méthodologie particulière : appel au génie génétique pour faire produire à des ¢ des prots + ou tres cytokines qui ne les produisent pas naturellement.

ex : Ag d'une particule virale.

Biotec au sens large.

- vaccins bactériens → humains et animaux.
- " viraux.
- prod AA par fermentation (Soyons)
- antibiotiques
- vinification, transmis de bière.
- fabrication fromages
- Ac monoclonaux.

Biotec au sens restreint.

- recombinaison gen → cytokines ou prots
- → insuline H par E coli (plasmide) 1982 USA.

→ hGH (protopine) 1985 USA.
→ somatotropine 1986 USA.
→ OKT_3 (Ac monoclonal) 1986 anti CD3 antirejet de souris.
→ interferon ("Roferon" "introna A") par E coli 1986
→ TPA (Tissu plasminogène activator) sur ¢ CHO 1987

hybridome ds abdomen de souris → ascite de souris contenant Ac → purification.
ou
culture hybridome in vitro sur
¢ CHO (Chinese Hamster Ovary)
¢ en lignée continue. avantages pour des modifs gen et culture.
TPA = agent de dissolution du caillot humain. par rapport à streptokinase et aspirine, + cher, + efficace.

Vaccins produits.

- Recombivax HB (Merck) sur levure 1986 USA.
- Engerix (RIT) sur levure 1987 USA
- Gen Hevac B (Pasteur / Mérieux) sur ¢ CHO 1988
- ↳ contient en plus de HBS (Ag supplémentaire)
  ↳ immunité qui apparaît plus vite.

Erythropoïétine

sur ¢ CHO 1989 USA + Europe.
lors d'anémies, chez dialysées artificiels
↗ g RH. médic de grd utilité.

En développement

- glucocérébrosidase
- fact VIII + IX
- GCSF
- IL2
- anti TNF

Dans le domaine des vaccins, ds biotec en sens réstreint pas beaucoup d'exemple à part hépatite B. peu de produits commercialisés. cause pb d'innocuité.

Vaccins viraux

bact : pas nec culture ¢ animale, elles ont suffisament de matos enz + ADN pour s'en passer.

virus : nec faire culture ¢ animales sinon échec XcaΘ DNA, extra ¢.

virus vivants atténués
- Vaccin Sabin
- Polio (oral)
- Rouvax
- Rudivax (+ rubéole)
- Stomalil (fièvre jaune)
- ≠ combinaisons

virus inactivés
- Imovax polio (1954, persiste ds pays sans développés)
- vaxigrip (sur embryon oeuf de poule)
- rage : ¢ HDSS ou VERO
- Hépatite B (HEVAC B Pasteur)

vivants atténués : dev sur culture ¢, mais pas dev ds org après inj. immunogène, non pathogène.

inactivés : complètements inactifs sur culture ¢ pas de XcaΘ sur culture ¢.

virus : pas vivant, 1 seul type ac N°, pas de matos enz

st résistants (virus variole actif sur momie égyptienne)
on peut cristalliser des virus.
HEVAG B Pasteur α plasma avec Ac anti HBS sans anti HBC puis extraction et purification.
maintenant dépassé par les vaccins gen.

Vaccin HcpB

1ère gen : Ag obtenus avec virus + plasma.
2e gen : sur levure ou ¢ CHO, prod Ag HBS.
↳ genhevac B.
3e gen : Vecteur pox virus (cavaripox).
seuls les oiseaux st sensibles. vir à DNA, grd molécule, on peut y fixer seq pour faire fabriquer HBS
≙ virus vivant atténué. synthèse HBS puis Ac par organisme. puis disparit° virus = vecteur.
dose exprimée en µg/l. 3 ou 2 inj puis rappels.

Méthodes de production vaccin à virus.

avant : sur animaux entiers, pas commode.
1er essai sur polio par Landsteiner sur chimpanzés (puis cerveaux de lapin ou souriseaux pour rage).
extraction moelle épinière singe (expérience de pasteur avant) : échec total.
les vaccins phéniqués ou formolés → provoque polio au lieu de vacciner les gens qui ont reçu.
seul appliquable : la rage.

oroculture : sur œuf embryonnés . culture de ¢ particulière industrielle . tec utilisée pour la grippe, la fièvre jaune
↳ œuf d'élevage spécifique indemnes d'organismes pathogènes . nec stérilisation complète du matos.
→ œufs fécondés + inoculer à Δt précis.
voir œuf sauropsidés 1er A 200.
grippe : inocule ds cavité allantoïdienne, par voie verticale
fièvre jaune : intra vitellin.
oreillons :
dépot sur mb chorio allantoïdienne / mb coquillière / cavité amniotique / intra embryonnaire.

le créneaux pour la fabrication de vaccin = étroit.
enquête épidémio : changement de souche ! nec attendre période d'évaluation . pas de stock . nec produit en grd Q en peu de temps → grippe, oreillons, fièvre jaune.
nec humidité car perforaθ st non bouchées.

pour les cultures ¢, on a essayé depuis longtemps ces ¢ in vitro : délicat, nec milieu riche (plasma coag, liq d'ascite, broyat d'œuf) st sot contaminés par bactéries.
amélioration après la 2e GM, avec les 1ers antibiotiques
↳ ¢ corticales de rein de singe pour XcaΘ virus polio.
mais ce st des ¢ primaires. pas de XcaΘ . meth lourde
↳ polio "Salk" (inactivé) ou polio Salin (oral).
les virus ne poussent pas ds autres ¢ d'autres animaux.
avec embryons de poulets : millions de dose de vaccins par trypsine → couches mono ¢ → tapis ¢.
csc : virus atténué de la rougeole.

avec ¢ diploïdes humaines:
inactivés : rage, Hep A
atténués : rubéole, varicelle.
institut Vistar en 1961 → caryotype humain (22 chrS autosomes + 1 chrS gonosome) × 2.
lignées ♂ et ♀, grâce à conservation ds N_2 liq.
normalité, caryotique. vie finie ds le temps.
senescence après 60-75 passages. ¢ utilisables pdt les 2 1/3 de la vie.
sauf si contaminées → meurent
pas tumorigènes chez les inj animales.
↳ lignées continues
¢ VERO = ¢ de singe primaire africain. milieu de culture, dev, purifié de mycoplasme, Japon → USA → conservé ds banque mondiale.
↳ polio Salk Salin, rage.
passage presque à ∞, caractéristiques intéressantes au pt de vue culturel.
pas tumorigène ni pathogène au dépôt mais elle peut le devenir.

Par génie gen
¢ CHO → Hep B, TPA
levure → Hep B
vecteurs non virus.

cultures ¢

I support "Ancorage dependant".

↳ vaccins humains.

1) surfaces solides.

plaques, flacons plastiques, ou superposés plaques.
Povlisky Plaque superposés NUNC (Nunc cell factory).
sphériques : billes de verre, peu utilisés
tubulaires : flacons roulants, macrotubulaire (gyrogen) ou μ tubulaire (Sterlin).
disques : MSCP
matrices : multicannelées "opticon" 

2) supports mous.

μ porteurs = billes de dextran dérivé. (diamino éthyl dextran) charge électrique ⊖ à surf → attire corps ⊕
∃ syst à μ encapsulaθ.

II ingrédients.

→ eau : distillée ou ppi.
→ milieux semi synthétiques : sol salines, tamponnés + hydrolysat lactalbuminé ou caséiné.
→ milieux synthétiques : sol tamponnée saline + AA + Vit + sels minéraux.

↳ Eagle BME, Eagle MEM, M199, Mac Coy, RPMI, NCTC, 1969 CMR, Iscove, HAM-F12 (pH).
qui doivent être supplémentés

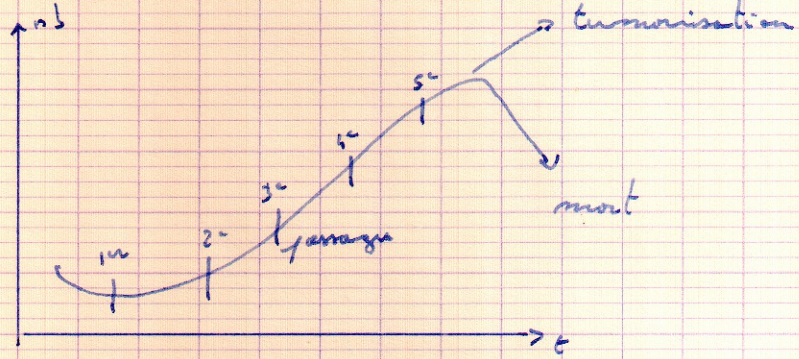
- avec sérum de veau nouveau né ou un bovin veau.
de 0,5 → 1,5, 10%. pb: maladie vache folle.
si pas grosse culture, pas besoin de sérum mais remplacer mettre hormones.
- bicar
- antibios, α 64, les β lactamines st interdites ds vaccins humains, on utilise la néomycine.
- enz protéolytiques.
trypsine (de porc) pour faire les passages.
∃ jeu de concurrence action et blocage trypsine
bloquage avec sérum contenant α_1 antitrypsine.

III préparation.

organe est haché. → ds fiole + agitateur $\vec{B}$ bain marie 35-36°C. pH idéal trypsine ≈ 7,6 nec dissocier mais ne pas altérer les mb.
↳ tube à centrifuger.
↳ susp avec flacon + un peu de sérum conc.
remettre en susp. num avec hématimètre et ajuster conc. pour les ¢ diploïdes → bouteilles. m̂ action entre passage.
conservation ds N_2 liq: ajout cryopréservateur = DMSO ou glycérol pour éviter le choc de la congélation (cristaux de glace) ↗ viscosité du milieu intra ¢.
conc sérum veau = 10% + DMSO puis ↘ lente 0,5°C/min pour bénéficier du pb de surfusion

prise en masse totale. après → 0°C rapide.
entre -5 et -25°C, la glace gonfle.
bouteille en verre, ds N_2 liq, si bien scellé et pas de µfellure, peu durer une 100e d'années.
pour la décongélation : nec rapide ds bain. récipients pour ampoule. puis conserver ampoules.

ex : ¢ diploïdes poumon foetal.



→ boîte de pétri.
gros travail : nec absence de contaminant, qualité ¢ ....

banques USA : ATCC rockville
Medical Reasearch
Europe : Inserm, banque CEE.
département virologie Pasteur.
Japon

diapo made in Mérium

→ obtention de ¢ actives.

bact : fermentation

séparation + inactivation → Whole ¢.

extraction pour vaccins.

purification → polysaccharides

toxines → anatoxines.

virus : cultures ¢

↳ primary chick embryo

↳ VERO

↳ culture in eggs

↳ final "bulk" preparation → "Vrac"

↳ finish product → liq, friezed, dried.

→ principes actifs.

- tox → anatox
- polysaccharides purifiés
- prot conjugués + polyssaccharides plus immunogènes chez le jeune enfant.
- prot virales.

→ sources de ¢, lev, bact, hybridome

- constitution banques primaires.

↳ 2 lieux séparés pour précaution.

- constitution bande de travail
- historique le + complet possible.
- gardes fous pour sécurité d'emploi.
  ↳ feuilles, fiches, + tcc de contrôle.

→ area with controlled atmosphere
- in and out filtration (HEPA)
- airlock system for workers
- autoclave in frontier.
- Dry oven

→ confinement
- protection of production (syst closed)
- " " environement (no rejects)

→ workers
- reduced number
- trained people and regularly readapted by training.
- hygien & phiology.
- no mixing between animals and tissus
- culture operation for workers
- dresses.

→ special cautions
- validated procedures and process
- in process and official controls
- quality assurance
- quality controls
- validation of techniques.

→ material
- high quality (si acier inox bas prix → relargage Fe^{2+})
- cleaning (in place CIP)
- sterilisation (in place SIP)
- autoclaving
- heating in dry oven
- decontamination.

→ water for production.
purified water : désionisation, ultrafiltration.
ppi → apyrogène et stérile.
pour Hs les stades.

→ syst tampon.
- PO_4^{3-} mono / di Na ou mono K / di Na.
- bicar de Na, (CO_2 + H_2O →) ac carbonique.
- Tris (trométhanol ou tri HO amino méthane) à pH = 7 ou inférieur.
- HEPES, meilleur pour pH > 7

→ qualité sérum animaux
pays d'origine
age animal
nourriture
→ nec non contamination par encéphalite bovine fongiforme.
trypsine d'origine porcine → ⊖ dépt

→ VERO (esperanto)
Verde (green)
Reno (kidney)
VERE (must be changed).

historique
cultures ¢

période des précurseurs. 1885 - 1900

↳ Roux : ¢ d'embryon de poulet maintenues en vie dans solution salines (pour recherche croissance et essor du neurone).

période de culture de tissus : à 1907

↳ Harrison 1907 : culture de moelle d'amphibien sur caillot de lymphe.

↳ Alexis Carrel 1913 : tec d'obtention de tissu. Donne règles d'asepsie et besoins nutritionnels de tissus propre considérables (chirurgien → tec d'asepsie stricte pour faire culture. ¢ support ¢ tissu → essai).

période de culture : à 1950

car avant : pas d'antibiotiques → pb d'aseptie.

historique des tec de culture

- MOSCONA 1952, dissociation ¢ avec la trypsine.
- KATO + TAKECHI 1964, clonage
- les lignées ¢ = ¢ transformées, pouvant avec peu de contraintes, durée infinie.
- Earle et Coll 1943 : lignée L (fibroblastes de souris)
- Gey et Coll 1952 : lignée HELA (carcinome cervical h)

à 68 : lignées ¢ différenciées : ¢ musculaire, nerveuses ...

et on s'aperçoit que les lignées ♀ avant année 60 sont des lignées transformées.

- Temin et Rubin 1958 : transfo virale, virus = mitogène
  infection ♀ du poulet de sarcome de ROUS.

fusion ♀ :

- Littlefield 1964 : hybrides de ♀ somatiques
- Harris & Watkins : 1965 : hétérocaryons ♀ humaines.

progrès des milieux de culture.

pour créer environnement en vivo.

Eagle 1955 : def besoins nutritionnels de ♀ en culture.
Ham 1965 : milieu défini sans sérum où on sélectionne cultures clonales de cellules ♀ de mammifères.
Sato 1976 : notion de besoin spécifique des ♀ en hormones et fact de croissance.

⇒ nec sophistiquer les milieux de culture
nec condition d'environnement les + spécifiques et les + précis. et ce, de façon contrôlable.

Données générales sur la culture cellulaire.

I def

culture de ¢ : maintien en dehors de l'organisme de ¢ non organisées en tissus, mais capable de se diviser et d'exprimer in vitro métabolisme et fonctions spécifiques.

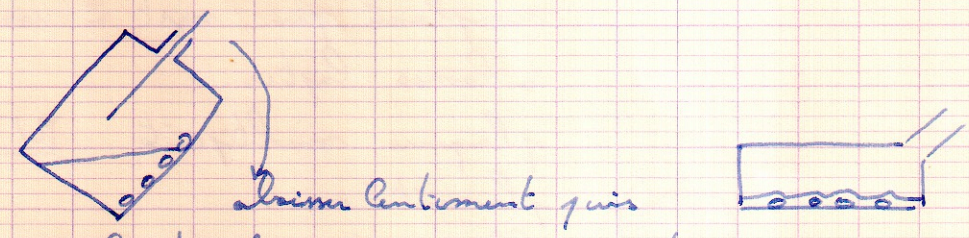
II meth de culture.

A - obtention des cultures.

→ α ¢ en susp (¢ sg, ¢ de liq de ponction) obtenues par centrifugation en gradient de densité.

→ α tissus (meth de dissection). Ξ+ieurs.

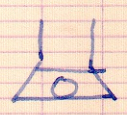
- meth de Carrel, biopsie (ex : peau), mise de coagulum de lymphe et d'extrait d'embryon de poulet sur boîte de pétri.



abaisser lentement puis au bout de 2 semaines : autour morceaux, essaim de ¢.

- meth mécanique : pipette coupée (tissu mou : nerveux)

• meth enz par enz protéolytique : trypsine, collagénase (peau), élastase, pronase, etc...

 sol trypsine → susp
↓ centrifugation
↓ milieu de culture.

par centrifugation différentielles, on peut séparer les types ¢ et ne prendre qu'un seul type.

B- <u>différents types de culture.</u>

1) <u>cultures stationnaires</u> (solide support)

a) <u>type</u> :

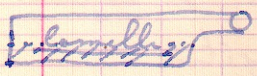
au départ verre, maintenant plastique à usage unique traité ou recouvert de substances (collagène, fibronecine) qui favorisent la pousse. ou recouverts de mb basales, feeder → matrice extra ¢ → couche (de ¢) nourricières

ex : hépatocytes avec ss couche de canalicules biliaires (pour épuration).

cultures 3D, gel d'agarose, collagène.

b) <u>forme de supports.</u>

boîtes pétri, flacons.



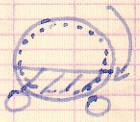
tubes de Leighton (n'est plus utilisé).

remplacé par syst à usage unique

↳ lames laptec.

plaques multipuits  nec fond plat.

planéité nec.



flacons tournants

tubes sur support tournant, plaques superposées

type HLM, les + utilisés st :

porteurs, billes de verre ds gros fermenteurs pour ↗ ρ.

2) en suspension.

a) ¢ sg

b) ¢ en milieu agité

→ barreau aimanté

→ fermenteurs ds industrie.

→ bioréacteurs : densité ¢, apport gaz etc...

III- Besoins nutritifs et environnement.

A- éléments nutritifs.

historique : liq biologiques, lymphe, liq d'ascite extraits d'embryon. solution salines enrichies en AA.

1) milieux synthétiques.

≠ travaux de Carrel, Earle, Sato.

minéraux : 7 ions Na^+ K^+ Ca^{2+} Mg^{2+} HCO_3^- PO_4^{3-} Cl^-

↳ sol de Hanks, solvant général pour le maintient de la PO.

oligo éléments, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}

substances énergétiques : glucose à 1g/l, intermédiaires du cycle de Krebs comme ac α cétoglutarique.

AA ⟶ 8 AA essentiels + Glu, Lys, Tyr, His.

Vit ⟶ biotine, ac folique, panthoténate, Pyridoxal, thiamine, inositol

gr Vit B : hydrosolubles.

indicateurs de pH, tampons

précurseurs ac N^{os}

hormones, insuline, Hydrocortisone

antibios (Pen, streptomycine à la CMI 100UI/l
Fungizone ...).

2) sérums

a) origine

de veau de nouveau né ou foetal
l'effet cytostimulant est inversement proportionnel
à l'âge conc de 2 à 20%

b) apportent

facteurs mitogènes, de croissance.
hormones, lipides, (car ds milieu de base,
pas de lipide), facteurs d'adhésion.

c) inconvénients

. peuvent être contaminés (ex: mycoplasmes)
. variabilité de composition (age, lieu, lot).

3) milieu définis.

. adaptés à chaque type ¢
. de composition connue constante
. ↗ capacité de prolifération.
. ↗ fonction différencieuse.

contiennent par ex:

→ hormones + GF.
Insuline, Hcortisone, oestradiol, EGF, FGF,
NGF, PDGF ...
→ prot de transport: Alb, transferrine.
→ facteurs d'attachement: polylysine, fibronectine
→ facteurs nutritifs de las PM: Se, Vit C
putrescine, ac linoléique ...

B- maintien des constantes physico chimiques.

- pH : 7,2 → 7,4, controlé par ind de pH (ex : rouge de phénol) assuré par un syst tampon HCO_3^- (par étuve à CO_2), Tris, Hepes qd pas étuve à CO_2.
- env gazeux : 95% air (dt 21% O_2) certains en hypoxie, 5% CO_2 (pH et stimule la biosynthèse).
- hygrométrie : 95% vapeur d'eau.
- osmolalité : 270 mosmol/l.
- θ°C = 37°C

C- facteurs de croissance.

concept qui découle des progrès effectués ds recherche condition optimales de culture pour les ¢ différenciés ce st des molécules polypeptidiques qui contrôlent la prolifération, la ≠ciation et la survie des ¢.

EGF, IGF (Insuline), NGF, TGF (Transforming) FGF...

IV évolution des ¢ en culture.

1) entretien des ¢

- changement du milieu de culture 2x/sem
- repiquage ou passage ou trypsination ou transfert cad décollage ¢, remises ds 2 flacons car les ¢ ne poussent qu'en monocouche.

2) cycle ¢

G_1 = biosynthèse normale, S = division DNA, lorsque fin div DNA → G_2 = reprise bioS normale même à la phase de mitose. variabilité sur G_1.

3) évolution de la culture.

a) culture primaire (¢ de la lignée)

b) lignée diploïde normale

. limitation de durée de vie

. ne peuvent pousser que sur support solide que si la densité ¢ est suffisante

. absence de malignité

. caryotype original.

critères de sénescence

. ↗ taille ¢

. ↘ R aux GF et H

. modif des prots du cytosquelette.

. ↘ progressive de l'inhibition de contact.

. ↘ prolifération

. ↘ motricité (les ¢ normales se déplacent)

. ↘ capacité d'étalement.

ph de dédifférenciation. pour l'éviter, il faut:

. moduler en ↘ les Ø de sérum.

. utiliser des milieux conditionnés.

c) lignée diploïde transformée

ceci passage diploïdie normale à anormale

critères de transfo:

. perte d'inhib de contact → couches superposées.

. pas de limitation de durée de vie (éternelles).

ex lignée Hela, connue de l'intime, à 50.

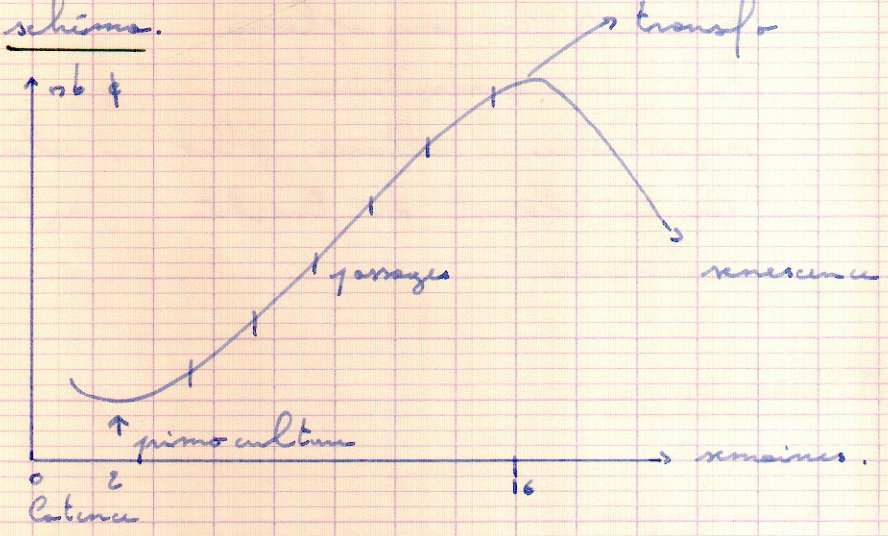
. modif morphologiques

. anomalies chromosomiques

. si inj à animal, provoque des tumeurs

causes de transfo : mutations spontanées, action agent transformant tel que virus, subst mutagène agent physique (UV).

4) schéma.



V contrôles

1) fonctionnels

a) les ¢ st-elles celles qu'on veut qu'elles soient ?

. morpho µo.

. marqueurs biochimiq

. " immunologiq

. prots du cytosquelette.

. chromosomes.

b) test de viabilité

. σ de prolifération : coulter, cytométrie de flux.

. test de viabilité au bleu Trypton qui pénètre seulement ds les ¢ mortes.

. efficacité d'étalement.

2) de stérilité.

recherche de bact, champ, mycoplasmes (invisibles)
↳ utiliser que conditions de travail strict, masques hôtes à flux laminaire stériles, réactifs testé négatifs en mycoplasme.
faire une quarantaine.
mycoplasme : cultures p bio, coloration DNA mycoP par le colorant de Euschte. cytoton ¢, sondes nucléiques.

VI conservation

A. historique

né des progrès de la cryo-bio (USA années 40)

B. conserver cultures sur longues périodes.

C. meth : la cryogénisation.

ds N_2 liq à -196°C en présence de conservateur
- préparation ¢ : nec densité ¢ et stade de culture pas trop avancé.
- cryoprotecteur : glycérol (le + physio, le - actif) DMSO, PVP, qui empêchent la formation de cristaux intra ¢ : ↗ viscosité et ↘ Q eau cristallisable.
- protocole de ↘ en 0°C.
- descente de 0°C 0,5 à 1°/min jusqu'à -30°C (surfusion)
- temps de latence pour sortie de l'eau intra ¢ et réduction du V ¢.
- descente rapide : 5°/min jusqu'à -196°C.

D- décongélation.

me très rapide. de tube plastique cryostable. bain marie à 37°C. collé au fond boîte pétri changement de milieu, remplacer le DMSO.

VII intérêt des cultures.

avantages

- pop homogènes
- observation facile en po.
- environnement contrôlé facilement.
- plus facile à manier que homme et animal.
- élimination des facteurs influents.

inconvénients.

- instabilité (transfo, sénescence)
- dédifférenciation
- asepsie rigoureuse
- Q ≠ faible
- ≠ in vivo / vitro → cultures en 2D, modif des interactions entre ≠.

Défs

primoculture : culture dérivant de ¢ du tissu ou de l'organe pris directement à organisme, conservée comme telle jusqu'au 1er repiquage, après, devient une lignée ¢.

repiquage ou passage : transfert de ¢ d'un flacon de culture à un autre, par action mg.

lignée ¢ : dérive de la primo culture au moment du 1er repiquage. Lignée continue ou à vie limitée.

souche ¢ : lignée normale, opposée à ¢ transformée.

temps de doublement : Δt nec pour que 10^6 ¢ donne 2.10^6 ¢ pdt la phase log = phase de croissance.

Substitut cutané

→ traitement de la brûlure.
→ toxicologie.

I composition peau.

∃ 2 tissus superposés : épiderme + derme.
peau = le + lourd et le + gd des organes.
épiderme : 90% kératinocytes
4 couches : basale, épineux, granuleux, stratum corneum.
derme : essentiellement du TC, ⊖ de ¢ fibroblastes (forme de ¢ en culture). collagène de type I ou III + glycoprots, GAG, élastine.
attaché au derme / épiderme : jonction épiderme dermique.
Seules les ¢ de la couche basale st capable de se diviser.
ce st elles qui interviennent de régénération peau si blessure → cultures.

II qu'est-ce qu'une brûlure

1er degré : n'atteint que les couches superficielles de l'épiderme. la couche basale n'est pas atteinte. seulement érythème + desquamation. 8 j pour régénérer.
2e degré : n'atteint que la 1ère couche au dessus de

la couche basale. ictème. 8j pour régénérer.
peau ébouillantée cloaque.
considérée comme profonde si rupture de la couche basale. si reste des ¢ basales → 8j de régénération.
si n'∃ plus de ¢ basales, nec 3 sem, le derme est touché → 3e degré. plus de cicatrisation, nec greffer
carbonisation parfois jusqu'au muscle.
distinguer notion surf corporelle et profondeur.
on arrive à sauver patients dt 90% surf corporelle est brulée au 3e degré.

Lorsque brûlure du 2e degré, les fibrocytes deviennent fibroblastes, synthèse de tissu anarchique → cicatrice hypertrophique.
les fibroblastes s'accrochent au collagène → d'où rétraction.
il n'y a que les ¢ épithéliales qui ne font régénérer l'organe. il n'y a pas de régénération ∝ du derme.

III <u>la plaie.</u>
idéale = chirurgicale = non septique, linéaire, suturable
cicatrisation rapide et esthétique.
plaies traumatiques : brûlés caustiques.
parfois défaut de substance → creuse
" excès " " → cicatrice hypertrophique.

IV <u>traitement brûlure.</u>
- substituts temporaires = pansements.
- " permanents = remplacer peau de plusieurs sorte.

↳ passif = gaze
↳ interactif = humidité, environnement qui favorise la cicatrisation.
↳ bioactifs = libèrent antibios + cicatrisants.
grd variété pansement, marché énorme.

V cicatrisation : en +ieurs phases. ⇒ (1 phase ≙ 1 pansement)

→ détertion de la plaie : élimination éléments brûlés avant la greffe. tissu brûlé : aggrave la brûlure par des substances toxiques.
↳ excision précoce : chirurgicale, qu'il faut recouvrir
↳ pansements à enz protéolytiques, on fait pourrir le tissu. maintient humidité. respect flore. absorbe le liq d'exhudation. protecteurs. imperméable et épais.
→ bourgeonnement = régénération du TC. nec pansement respecte flore, ne doit pas être adhérent. imperméable. conserve l'humidité.
→ cicatrisation et épidermisation.
idem + topiques (ex : collagènes qui st cicatrisants)

VI substituts utilisés.
→ using tissus.
- homogreffe : temporaire, mais peut être conservé l'épiderme n'est pas rejetté, le derme accepte (pb d'immunologie.
- mb amniotique
- xénogreffes : peau de porc, de pomme de terre.

→ molécules bio
- alginates
- collagène (cicatrisant)
- hydrocolloïdes (adhère à la plaie, mais st très chers)
- chitine (collagène des crustacés)
- mb d'ac hyaluronique.

→ synthétiques
- silicones
- polyuréthane
- PVP

→ semi synthétiques
ex polyuréthane et en dessous collagène.

VII <u>caractéristiques pansement.</u>
- barrière bactérienne et liquide.
- absorbe bactéries (charbon)
- adhère au lit humide ou au lit sec (selon le moment de cicatrisation).
- n'adhère pas au nouvel épithélium.
- absorbe l'exudat.
- semi perméable (respiration).

Pansements substitutifs permanents

I pour remplacer l'épiderme (CAE)

cad culture de hératinocytes de l'épithelium.
prélèvement de peau 2 à 10 cm²
↳ séparer derme / épiderme
↳ 1ère amplification 3 à 10 boîtes
↳ 2e " 20 à 40 boîtes
↳ jusqu'à 2 m² de surf de peau.
réalisés que pour brûlés à plus de 50 %.
nec 21 j = temps pour préparer la plaie.

→ biopsie de peau. + sg (→ recherche Ag, vir, bact)
× date : précise, le plus précocément possible, risques de contamination.
× zone de prélèvement : ∃ zones soumises au UV → vieillissement cutané → ponction sur pli inguinal, creux maxillaire intérieur des cuisses et bras, scrotum et cuir chevelu.
× protocole : aseptie chirurgicale, antiseptiques, rinçage (cytotoxe) champs stérilisateurs, flacons de transport à 4°C.

→ isolement des hératinocytes.
- sol isotonique + antibios.
- délipidation
- découpage
- trypsination : séparation épiderme/derme.
- filtration et centrifugation.
- test au bleu tryptan (colorant d'exclusion pour num)
↳ boîtes de culture.

→ primo culture
= culture sur couche nourricière, faite de fibroblastes irradiés préalablement, sinon ils envahissent la culture.
↳ fact GF + matrice extra ¢.
les hératinocytes ont une capacité d'adhésion + grd et chassent donc les fibroblastes.
↳ à la fin de la culture, n'∃ plus que hératinocytes.
confluence, les mauvaises ¢ st éliminées.

→ subculture
↳ repiquage. par Trypsine/EDTA. les ¢ st jointives par desmosomes (Ca^{2+} dépendants).

→ transfert de ¢ épidermique sur une gaze.
sortir les ¢ ?, on coupe la bouteille de plastique avec un fil chauffant.
par potasse neutre, on détache le film qui commence à se rétracter. nec agrafer sur gaze de transfert.

→ transport
les ¢ ne supportent plus les Δ de pH → ds liquide

tampon à chq étape. on congèle certain pour sécurité.
travail en assurance qualité.

→ greffe.

peu soumis au frottement = thorax, abdomen, dessus des cuisses. les ⊖ favorables : articulations + dos.

préparation des sites de greffe.

× excision précoce : marche le mieux

↳ excision tangentielle (peu de perte derme, mais saigne beaucoup)

↳ excision en orrelsion (beaucoup de derme enlevé, saigne ⊖)

× couverture par homogreffe, nec pas infection, doit être thermorégulé, éviter perte de fluide.

× contrôles bactério réguliers.

le jour de la greffe.

× abrasion des homogreffes (si elle n'a pas été rejetée)

× hémostase parfaite

× installation chirurgicale.

pour les greffes de feuillet : priorité aux zones homogènes, dispositions jointives, agrafes (pour attacher).

× cotention des épidermes : voile extensible attaché, compresses sèches, bandages.

× suites opératoires : ablation du voile au 7e j, ablation des gazes de protection (= de transfert) délicatement et sans forcer du 7e au 10e j.

→ différentes utilisations.

× CAE + homogreffe. (recouvrement temporaire).

greffes en filet

× filet large + CAE

1/6 autogreffe + CAE, les 2 ensemble → 100% peau.

× tech chinoise (ne pas vomir SVP)
prélever morceau peau, orteil et remettre des petits bouts partt.
culture ¢ en complément.

II substrats dermiques = matrice extra ¢.

α collagène + GAG (chondroïtine S)
+ réticulation par le glutaraldéhyde ou le chitosane.

tests physico chimiques :
- résistance à l'étirement
- porosité suffisante pour la peau et permettre le passage des fibroblastes ds les pores et resynthèse nouvelle matrice extra ¢ et revasculariser.

pb des pansements : pas de norme.
polyglucosamine NH_3^+
collagène COO^-
cytotox des biomatériaux
test qualitatif : adhérence, morpho.
test quantitatif : MTT $\xrightarrow{\text{succinate DH}}$ bleu de formosan
test de tox à la LDH, si à l'extérieur, ≙ ¢ st mortes, enz ds milieu E ¢.
essais chez animal : rx inflammatoire nec à la cicatrisation
∃ dossier tech du derme artificiel.
- test physiologique des MP + produit fini.
- test bactério, viro, prion.
- cytocompatibilité.
- tox chez animal

× greffe
× sous cutané → Ag, allergie possible.
× tumoricité et cancérisation.
- essais chimiques.
↳ TIPS, prix.

III dermes équivalents = matrice + fibroblastes.

caractères équivalents à derme.
pas encore commercialisé.
ĉ ac polyglactique ensemmencé par fibroblastes → sécrèθ :
→ GAG + collagène : tissu humain 3D.
→ ARNm, PDGF, IGH, ICFU, bFGF.
utilisaθ pour
↳ brûlures
↳ plaies chroniques = escars, ulcères variqueux.
préparé avec ¢ jeunes. reconstruisent le tissu + produisent fact de croissance.
intérêt :
• ↘ cicatrices hypertrophiques et rétractiles.
• accélère la migration des hératinocytes + leur ≠ ciaθ.
• favorise la formation de la jonction E/D, capitale sinon l'épiderme se décolle.
• non immunogènes, progressivements remplacés, pas de rejet.
• permet d'éviter les homogreffes.

GLP = good practice de labo

types :
→ éponges collagène / GAG + ¢
→ filets ac polyglactique + fibroblastes.
→ gel collagène + fibroblaste, solide car le collagène

est réticulé par ¢.

→ fibroblastes sur mb de polyuréthane. pour les zones donneuses de greffe → production fibroblastes.

IV obtention peau reconstruite.

ici, on a tt. utilisé pour remplacer expérimentation animale.
ajout peau pigmentée (mélanocytes)
surtt en pharmacologie tonique.
≠ modèles.

→ cultivés à interface air/liq.
épidermes ≠ciés, on a ttes les couches. et surtt, on peut mettre les crèmes directement
avec ¢ normales, ¢ patho. travail sur ¢ humaines.

→ gel de collagène avec fibroblastes.
↳ se rétracte, on ensemence avec hératinocytes. culture en immergé puis immergé.

→ culture hératinocytes sur filet de nylon. à la place d'ac polyglactique.

→ hératinocytes sur éponges de collagène.

→ éponge de collagène réticulées par le periodate (ajout collagène IV)

→ culture sur filtre millipore
mb synthétique qui reproduit épiderme, avec milieu défini.

Tests:

× viabilité ¢ : petites substances, cuz, ions, cofacteurs ...
× morpho ¢ : taille, forme, Δ taille des organites intra¢ (desmosomes ⊕; vacuoles ⊖).

× prolifération : num ¢ , Q_{ARN} , Q_{ADN} , $Q_{prot\ T}$
formation colonnie.

× synthèse ¢ : précurseurs marqués. (T^*, U^*, AA^*)

conclusion.

voie et application :

× théra

× bio ¢ et mol : connaissance mécanismes inter ¢

$$\text{fibro B} \xrightarrow[\text{stratifiée}]{\text{donne structure}} \text{hératino C}$$

↑ migration

× pharmacotox
(dermato ou cosméto).

Génie génétique.

Biotec : vaste domaine.

. étude minerai (Cu^{2+} extrait avec bactéries)
. dépollution (par bact) des hydrocarbures.
. domaine veg : sélection
. phytosanitaire
. agroalimentaire.
. santé : rôle d'approvisionner substance pour certains malades
vocation substitutive, préventive, curative.

Biotec santé : 3 périodes.

× extraction : extraire substances substitutives (Alb placentaire, insuline) au début.
× production par génie génétique : ¢ en culture + animaux transgéniques.
3 générations : copie conforme (insuline, Ac monoclonal)
modifiée (IFN)
stéréomimétisme (structures spaciales)
× thérapie génique : reprogrammation d'un organisme ou de ¢ (ac N → mucoviscidose).

Génie génétique

intermédiaire tech extractives pure et thérapie génique permet analyse + manip.

GG : reprogrammer ¢ donc fournir DNA pour faire prot voulue
↳ ¢ à animal transgénique ou culture en fermenteur.

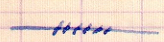
TG : isoler gène, le donner au malade. → faire entrer DNA grâce à un vecteur ou prélever ¢, la reprog et la réinj → autogreffe..

dans le génie gen : 3 opérations : trier, construire, exprimer.

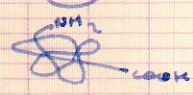
→ Σ tech dérivées de bioch + plio qui vont permettre l'analyse des génomes d'organismes infectieux ou qui vont servir d'outils.
↳ clonage, fonctionnement, typage, grâce aux sonde + diverses enz.

→ permet de faire modif patrimoine gen. manip sur levures + bio industries alimentaires, animaux transgéniques, ou concevoir des prots nouvelles.

→ donner moyens à la thérapie génique = tech du DNA recombinant. permet la production de peptides (analytique ; enz, Ac, bioréactifs) (théra : hGH, insuline).

Trier →  DNA

construire →  vecteur

exprimer → 

prot.

Exemple de stratégie.

1- de la prot au DNA_c

2- DNA recombinant (= DNA_c modifié) ds hôte

↳ tech de génie gén avec clonage.

3- optimisation de la production.

→ étude prot. on laisse de côté la partie glucidique. seulement aux seq AA.

faire ≙ seq AA avec seq ac N

↳ construction d'une sonde. la faire confronter à ARN_m pour le récupérer.

↳ faire conversion avec enz = transcriptase réverse.

↳ DNA_c

↳ le faire rentrer ds autre ¢ grâce à vecteur.

↳ prod prot.

→ extraire la prot de la façon la plus pure (ou sa forme assimilée)

↳ séquençage en domaine restreint.

↳ " ARN_m

↳ " DNA sur un petit domaine.

↳ fabriquer dioxyribonucléotide* → sonde (20 b = 20 mère) + extraction RNA_m par hybridation RNA_m + sonde obtenue marquée.

↳ ADN_T par enz = transcriptase réverse

↳ ADN insert + vecteur = DNA recombinant

↳ séquençage (vérifier) + mutagénèse (modif) + clonage (amplification) + modif optimisantes de production.

↳ introduction ds ¢ hôte (transfection, transformation) sans vecteur = p clonage = p inj avec nanoseringue

↳ production, qui relève des gènes cytoplasmiques.

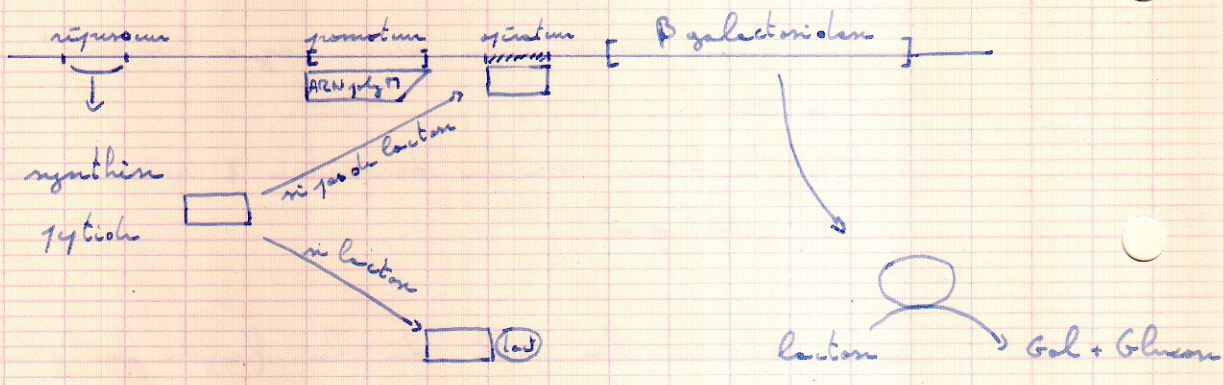
DNA eucaryote

5' → promoteur

polyadénylation, excision, introns

in vitro ARNm mature, on DNAc qui ne ∃ pas en DNA du noyau.

Opéron lactose.



lactose : inhibe le répresseur.

∃ anti-répresseur : l'isopropyl? galactose.

meilleur que lactose : IPTG.

outil très utilisé en génie gen.

β galactosidase, on lui donne Gal-X = chromo, chloro indol galactose.

↳ libération galactose + X par β galactosidase

X = bleu.

la β galactosidase présente un grd nb de site de restriction

↳ moyen de contrôle : si le gène est muté + insert gène inactivé → prot non fonctionnelle

+ Gal X → incapable digérer et donne colonie bleue

si pas insertion, dégradation, colonie bleue.

Extraction prot + séquençage.

utiliser rx Edmann

cad décrochage AA côté NH_2 petit à petit par φ-N=C=S

↳ structure cyclique de phényl hydantoïne (thio).

↳ séparation chromatographique + témoin.

automatisme meth.

↳ facile à déterminer seq d'AA.

sauf dégénérescence du code !

si Met ou Trp → 1 seul codon tri N

si Tyr ou His → 2

si Pro → 4 triplets possible

si Leu → 6

connaissant la seq d'AA, on fabrique un DNA_c fictif = sonde qui peut aller pêcher le DNA recherché.

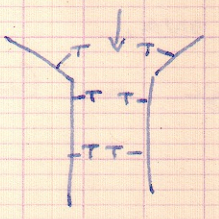
↳ explorer banque de DNA génomique informatique.

∃ synthétiseurs d'oligo N. procédé comparable à une synthèse prot. synthèse rétrograde de 3' vers 5'

aussi complexe que celle des prot, pour orienter condensation fixation sur support 3' term, activation + blocage + 2e N etc... on peut réaliser sonde marquée.

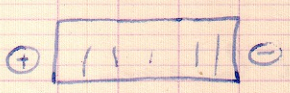
~~l'oligo N contient seq poly A.~~

pour extraction / purification. recherche ARNm.



ARNm contient seq poly A qui sera fixé sur T

↳ puis séparé sur gel d'agarose (car il y a nbx ARNm.



electro φ sur gel agarose.

sur Northern Blot, repérage avec DNA_c^* construite + haut.

Taille de la sonde.

∃ une longueur min. fonction de la taille du génome pour l'organisme considéré.
calcul math, taille pour hybrider de façon précise et spécifique avec une probabilité de 0,99.
(nb : ça n'empêche pas au gène d'être répété en +ieurs millions de fois ds le génome).

vir = 9b

bact = 12b

homme : 17b ≙ (5AA + 2b)

en pratique, on s'intéresse à un domaine de 5 à 6 AA. on ne retient que ce domaine lors du séquençage total de la prot.

∃ longueur max.
liée à la fiabilité du synthétiseur : <50 b.
cas particulier : le mésappariement, la complémentarité n'est pas parfaite. (ex : mutation).
qd nec utilisation de sonde de + de 50 b.
on fait +ieurs morceaux qui se chevauchent.

Spécificité de la sonde

extraction DNA / RNA par enz de restriction. trier par electroφ + blot. puis sonde DNAc.
≙ sonder le blot → repiquage sur boîte de pétri → nitrocellulose.

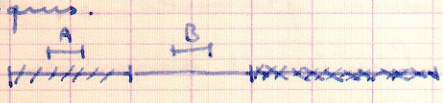
Northern Blot : ARN

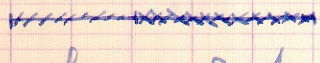
Southern Blot : ADN

PCR : nec amorces encadrant la sonde, évite extraction.

Séquences et vérifier qu'on a la bon morceau.

∃ prot mosaïques.

facteur VIII 

complémentaire 

A n'est pas spécifique. B est spécifique du F VIII.

Manquage sonde de + de 50 b.

pour le facteur IX : pas assez de sg pour l'entraîner.

on utilise sg de lapin.

Q suffisante pour séquençage : 25 000 € de sg.

∃? domaine conservé entre homme et lapin.

↳ séq f IX b

↳ faire sonde relativement longue 52 b (par f tronçons)

on prévoit un mésappariement

une séq soit + ou - conservée.

↳ DNA_c b

↳ isoler RNA_m b

↳ faire DNA_c b

Hybridation.

il y a d'autant plus d'appariement que les conditions sont favorables.

↗ θ°C et ⇒ conc en sel.

Choix d'un vecteur et de sa sonde.

- purification du vecteur
- ouverture du vecteur
- adaptation + ligase
- introduction de pour.

DNA à faire rentrer ds vecteur.

↳ produire plasmide → culture lev ou bact.

↳ purification + ouverture du vecteur par enz de restriction.

↳ introduction DNA

↳ fermeture.

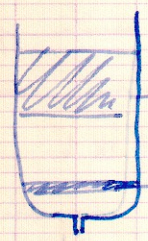
↳ culture de plasmide. clonage.

Extraction plasmide

gel filtration



ultracentrifugation en gradient de CsCl



coloration par Br d'Ethidium.

Etat du plasmide

sur gel d'agarose, electro φ, permet de voir l'état moléculaire du plasmide (≠ forme, m̄ taille).



coupé sur 1 brin ◎

coupé sur les 2 brins = linéaire ═

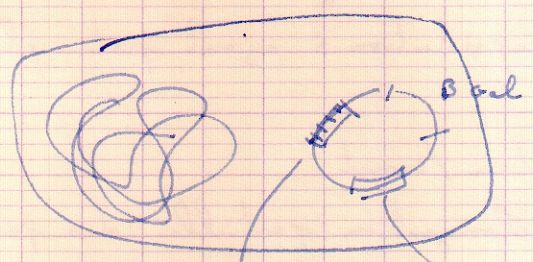
fermé ◎

superenroulé (intégrité totale) pour être sûr que manip soit bonne

circulaire, 1 brin ○

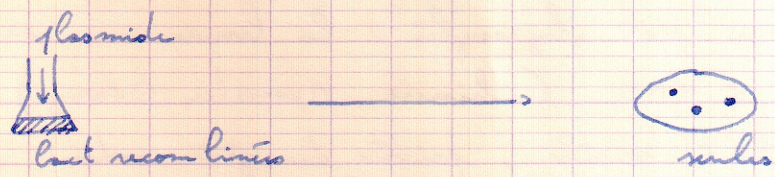
gel d'agarose : préparations séparatives.
le vecteur n'est utilisable qu'en fonction de ses hôtes
plasmide pBR 322 → E coli.
mais on peut faire des formes dérivées par génie génétique
↳ lev saccharomyces.

Gènes de sélection.



→ gène de résistance à Ampicilline
→ gène de résistance à tétracycline.

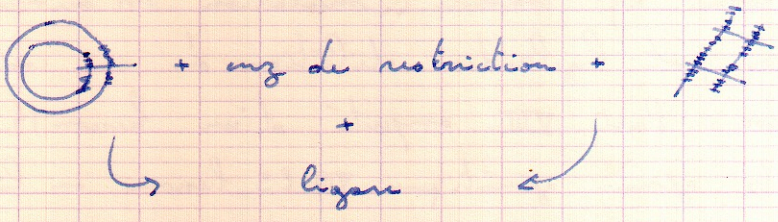
s'il y a autant de site de restriction : on peut faire rentrer des gènes.
polylinker : lieu série d'éléments étrangers.



seules poussent les bactéries qui ont le gène de résistance à Ampi

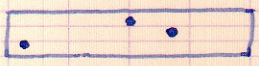
gène de sélection = H gène à l'int bactérie qui permet de faire insertion + contrôle.

Plasmide + DNA insert.



adaptation : modifier les structures, extrémités de façon à ce que on intègre forcément le DNA étranger

moyen de vérif : électro φ en gel d'agarose.



ds le cas de vecteur phagique : 2 bras entre lesquels on insère le DNA étranger.

opération : encapsulation ≠ agent prot phagique.

adaptation vecteur / insert

après coupe, élongation partielle des polinucléotides pour supprimer la partie complémentaire.

+ élongation d'une petite partie DNA insert (complément)

↳ recombinant vecteur / insert.

¢ hôte

pour prot glycosylée : la levure ne convient pas.

↳ ¢ CHO (Chinese Hamster Ovary).

∃ lact mutée, privée de gène codant pour enz de restriction ou enz protéolytiques.

ADN recombinant.

en addition : "enhancer" en amont (stimule la transcription), promoteur fort (viral), cytosol signal pour excrétion prot en dehors ¢ hôte.

modif seq codante (mutation AA environs)

on prot hybrides. délétion de seq codantes.

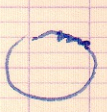
ex : fact VIII amputé d'un fusion 14.

↳ génie génétique VIII 25 fusions en lieu 26.

+ ass d'autres gènes qui ↗ taux d'induction.
→ on peut se passer du vecteur par p clonage.
souris transgénique. p inj avec nanopippette en verre
ds oeuf fécondé, au niv pronucléus ♂.
puis oeuf implémenté ds ovaire.
cf fiche sur brebis pharmaciennes.
↳ ass fact IX + β lactoglobuline
↳ lait, il suffit de traire.

Divers

mutagénèse dirigée et amplification.
ou in vitro. + (clonage moléculaire)
les 2 en ≙ temps par PCR.
principe : ampli 1 domaine ADN situé entre 2 amorces
enz incub : Taq polymérase DNA dépendante.
mutagénèse dirigée : intervenir sur DNA codant, substituer
par PCR.
cf fiche.
jumelage DNA + promoteur.
+ en amont du gène inductible
ex : DHFR qui ↗ ρ d'expression.
↳ contrôle par séquençage Sanger
le faire rentrer ds vecteur d'analyse (≠ d'expression)

 ADN simple brin

↳  + amorce.

+ faire rentrer inhib de polymérisation = N interrupteur
4 types de didéoxy N ds incuba⊖ (4≠).

+ N * + N normaux.

séparation sur gel PAA.

4 couleurs A, T, C, G.

le plus légé à le + mégré, résolu⊖ et sensibilité : 1 N

* peut être remplacé par amorce fluo.

Film clonage.

- extraire DNA
- couper
- trier par electro φ → banque ou PCR + controle electro φ
- identifier
- clonage

p clonage → 1 q → 1 animal entier.

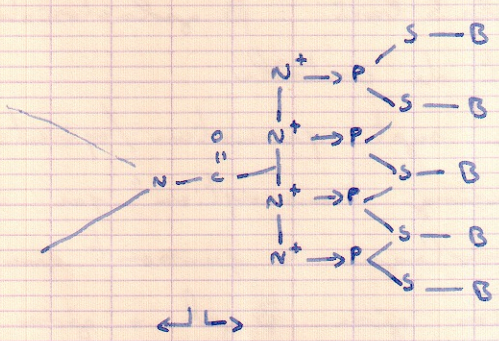
Génie génétique (suite + fin).

faire produire prot par gène recombinant, à faire ds ¢ hôte.
vecteur : | plasmide (lact ou lev)
| DNA bactériophage.
ex : plasmide pBR 322, le reste est rajouté.
après ouverture, on introduit
1 gène du chrS lact : β galactosidase. → visualiser colonnie lact + élément de contrôle.
et avant un syst promoteur/opérateur → pour inductibilité (lactose) "forcing transcription" par isopropyl thio galactoside qui est homologue + puissant que lactose.
↗ transcription gène β gal + gène de la prot.

→ cotransformation
parfois, on peut utiliser d'autres promoteurs/opérateurs.
+ efficaces : chez virus. impératif : le gène de structure nec être transcrit
ex : vecteur + promot/op du bactériophage λ. + une partie du gène viral qui fait suite au sein du bactériophage + une partie du gène (→ prot) qui a une grd affinité.
on s'arrange pour que le gène soit très fortement inductible ici : inhib de répression.
le répresseur est thermosensible → utilise θ à 42°C.

gène codant pour prot d'intérêt : α1 antitrypsine (utile pour emphysème respiratoire).
+ il y a de recombinant + vecteurs, + il y a de prot synthétisés.

pour forcer l'ADN recombinant à rentrer dans ℓ.
→ Ca^{2+} + PO_4^{3-}
→ résines échangeuses d'ions (diéthyl aminoéthyle - dextran)
→ électroporation : grâce à champ électrique qui désorganise la structure phospholipique.
→ liposomes.
→ "vecteurs du vecteurs" : lipopolyamines (lipoplexe).



région grande polyamine type spermine
lipidique.
K_D Σ = 10^{-5} - 10^{-7}. faible mais suffisant.

électroporation: de champ $\vec{E}$ ↑ dissociation de la continuité de la mb plasmique.
↑ cause charge ⊕ choline et ⊖ des phosphates.

exemples de cotransformants
→ promoteur Trp - chymosine (pour caillage lait)
→ β gal → IPTG, meilleur que lactose.
→ DHFR "sélection" par le methotrexate si ¢ hôte est eucaryote, triméthoprime si la ¢ hôte est bactérie.
(voir cycle THF)
DHFR = enz clé d'une ¢ vivante.
méthothrexate ou TMP = poisons violents.
mutation possible → duplication éventuelle, crossing over en tandem
↳ 1 ¢ à 2 exemplaires + 1 ¢ à 0 exemplaire.
↳ 2 gènes → X gènes
amplification possible de l'ordre de x 1000 de fois.
+ il y a de copies, meilleure est la résistance au TMP

enchaînement
DHFR + tPA (tissu plasminogène activator)
on ne fait pas induction, mais pression de sélection par TMP, les bact possédant le + nb x de gène cotransformés seront les + favorisés.
↳ "amplification" négative.

→ p.o. métallothionéines - bGH
très riche en S (cyst) = prot détoxifiantes (poissons mamifères). ↗ nb gènes qd ↗ présence ion divalent Zn^{2+} ou Cd^{2+}. induction vraie par les métaux lourd.
→ DHFR / Ag S_2 HBV sur ¢ CHO (Mérieux)
→ ¢ insectes en culture vecteur = baculovirus
gène de la prot virale = polyédrine → production IL.