



Concours externe du Capet et Cafep-Capet

Section biotechnologies option biochimie - génie biologique

Exemples de sujets
(Épreuves d'admissibilité et d'admission)

À compter de la session 2014, les épreuves du concours sont modifiées. L'arrêté du 19 avril 2013, publié au journal officiel du 27 avril 2013, fixe les modalités d'organisation du concours et décrit le nouveau schéma des épreuves.

CAPET de BIOTECHNOLOGIES
option BIOCHIMIE – GENIE BIOLOGIQUE
Concours EXTERNE

SUJET ZERO

conforme à l'arrêté du 19 avril 2013

PREMIERE EPREUVE

Durée : 5 heures

Coefficient : 1

L'épreuve a pour objectif de vérifier que le candidat est capable de mobiliser l'ensemble de ses connaissances scientifiques et techniques, d'exploiter les documents qui lui auront été éventuellement fournis pour construire un développement structuré, argumenté dans le cadre d'un sujet de synthèse relatif aux disciplines fondamentales alimentant les champs de spécialité.

Selon le cas, le sujet pourra être placé dans la perspective de l'histoire des sciences ou élargir l'analyse vers des dimensions culturelle ou sociétale. Le développement doit pouvoir être réinvesti dans un cadre professionnel dans un contexte d'enseignement.

Au titre de la même session, le sujet de cette épreuve peut être commun aux deux options ainsi qu'à celui de la première épreuve du concours externe de recrutement de professeurs de lycée professionnel dans la section et les options correspondantes.

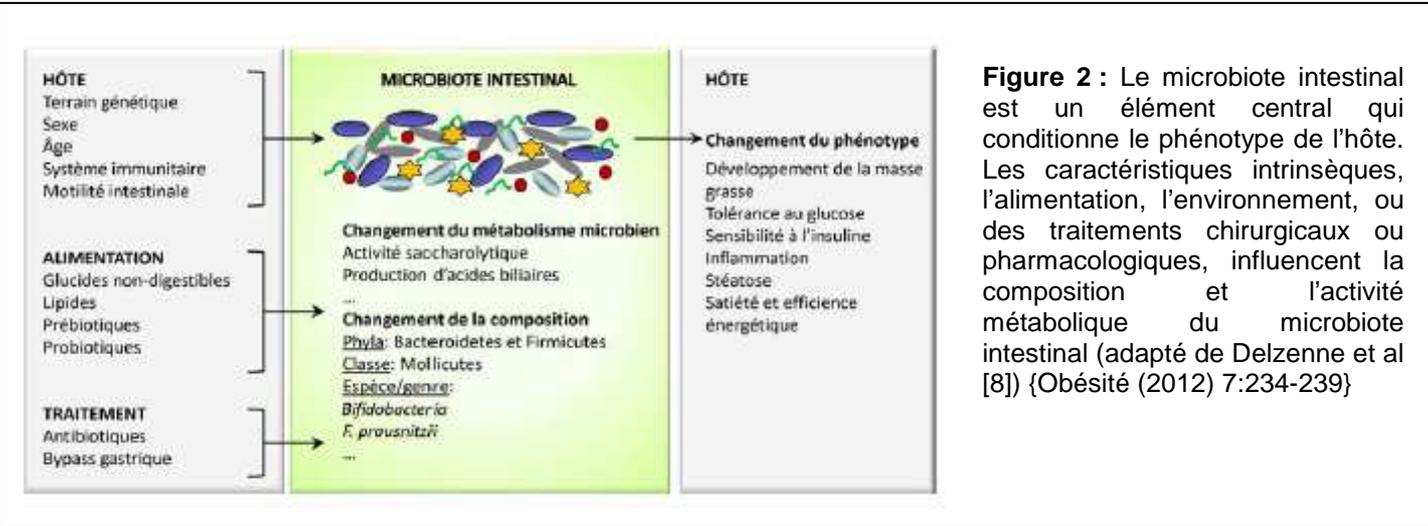
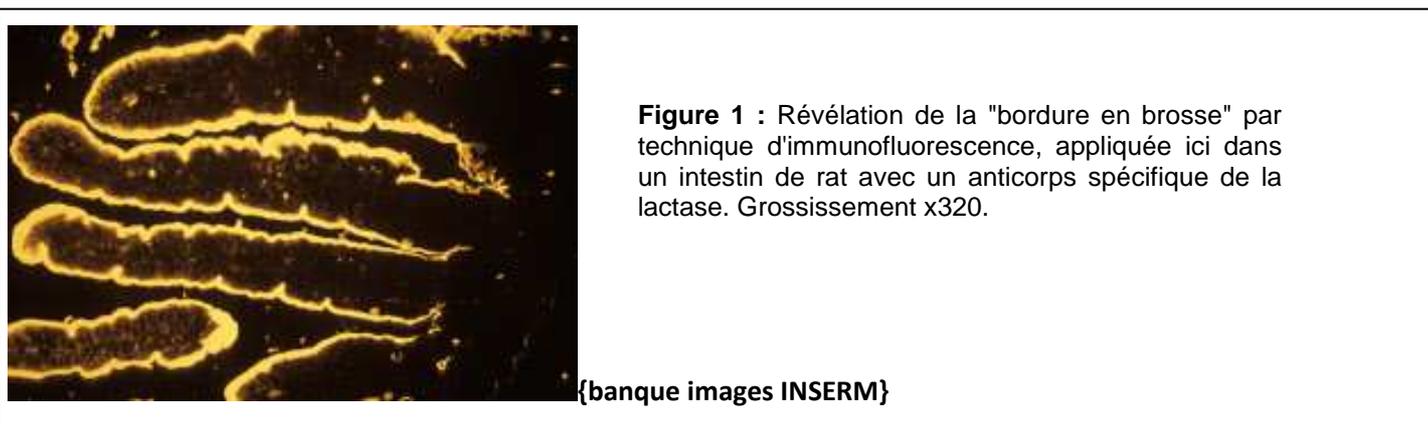
Avertissement : le présent sujet a été construit à partir d'un sujet utilisé lors d'une précédente session. Ce choix relève de la volonté de favoriser la comparaison avec un sujet élaboré selon le cahier des charges de l'ancienne définition d'épreuves

La muqueuse intestinale a un rôle de barrière et de zone d'échange à l'interface entre milieu intérieur et lumière intestinale - microbiote.

Des études récentes évoquent un lien entre microbiote intestinal et certaines pathologies :

« Les cent mille milliards de bactéries qui colonisent l'intestin interviennent dans la régulation du métabolisme énergétique et de fonctions biologiques importantes de l'hôte.(...) Des données récentes décrivent les changements de composition et d'activité bactériennes associées au surpoids et aux pathologies associées, en évaluant les approches expérimentales qui pourraient mener à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques (et nutritionnelles) dans le contexte de l'obésité. » (N.M. Delzenne et al 2012).

En appui sur ses propriétés structurales, présenter l'implication de la muqueuse intestinale dans la digestion des aliments et l'absorption des nutriments puis, commenter l'influence du microbiote sur la santé humaine.



Extrait d'un communiqué de presse INRA le 28/08/2013

PAUVRE OU RICHE (EN BACTERIES) : PAS TOUS EGAUX FACE AUX MALADIES LIEES A L'OBESITE

Deux études publiées simultanément dans *Nature* le 29 août 2013 ouvrent des perspectives importantes dans le domaine de la médecine préventive et personnalisée. Conduites par l'Inra conjointement avec l'Inserm, l'UPMC et l'AP-HP ainsi qu'avec le CNRS, l'IRD, l'université d'Evry et des partenaires internationaux, ces études ont permis de distinguer pour la première fois, au sein d'une population, deux groupes d'individus différant par la faible ou grande richesse de leur flore intestinale (encore appelée microbiote intestinal) et par leur susceptibilité face aux maladies métaboliques liées à l'obésité. Les chercheurs ont ainsi observé que les individus ayant un déficit en bactéries intestinales (appauvrissement de la diversité) ont un risque accru de développer des complications liées à l'obésité. Parallèlement, ils ont réussi à améliorer la composition du microbiote grâce à un régime alimentaire spécifique. Il serait ainsi possible de développer un test simple d'identification de ces personnes à risque et de proposer une solution préventive adaptée.

L'épidémie d'obésité touchait environ 400 millions d'individus adultes en 2005, elle concernera plus de 700 millions de personnes en 2015 et continuera d'augmenter. Les causes sont en partie environnementales (vie sédentaire,

nourriture riche en énergie et facile à se procurer,...) et en partie génétiques. Mais l'obésité liée à des mutations génétiques humaines semble représenter une minorité de cas. De plus en plus de données indiquent que des variations dans notre « autre génome », le microbiome, c'est-à-dire le génome global de tous les microorganismes de notre corps, peuvent avoir plus de conséquences sur le développement de l'obésité que des variations dans le génome humain.

Deux types d'individus selon la composition bactérienne du tractus digestif

Une première étude menée par le consortium international MetaHIT* a porté sur une cohorte de 292 adultes danois comprenant 123 personnes non-obèses et 169 obèses. Les chercheurs ont analysé le génome bactérien intestinal de ces individus grâce à une nouvelle technique appelée métagénomique quantitative. D'après les résultats, il ressort que deux groupes d'individus se distinguent par le nombre de gènes microbiens différents de leur microbiote, ce qui correspond à la richesse des bactéries qu'ils portent et l'abondance de certaines espèces bactériennes intestinales. Un quart des individus de la cohorte sont « pauvres » en espèces bactériennes, tandis que les trois quarts possèdent une flore intestinale « riche » en bactéries (c'est-à-dire plus diversifiée). C'est la première fois qu'une telle distinction est mise en évidence dans la population. Par ailleurs, cette distinction n'est pas dépendante de la corpulence des individus car on retrouve des maigres et des obèses dans les deux groupes, même si le groupe déficitaire en bactéries comprend plus d'obèses (80 %).

Un risque accru de complications associées à l'obésité

En comparant ces deux groupes, les chercheurs ont découvert que les personnes pauvres en bactéries intestinales ont un risque plus important que les personnes riches en bactéries de développer des complications liées à l'obésité : diabète de type 2, problèmes lipidiques, hépatiques, cardiovasculaires et peut-être certains cancers... Ces individus ont notamment tendance à développer une inflammation chronique.

Des espèces bactériennes limitant la prise de poids

Les chercheurs ont également observé que les personnes obèses du groupe déficitaire en espèces bactériennes prennent plus de poids dans le temps que les individus non obèses. Chez ces individus pauvres en bactéries, 8 espèces bactériennes spécifiques étaient en faible abondance, voire manquantes. Ces espèces pourraient avoir un rôle protecteur contre la prise de poids. Cette découverte pourrait, à terme, conduire au développement de nouveaux probiotiques permettant de lutter contre la prise de poids.

6 espèces bactériennes suffisent à différencier les « pauvres » des « riches »

La seconde étude menée par le consortium français MicroObes*, portant sur une cohorte de 49 adultes français obèses ou en surpoids, confirme les résultats de la première étude. Les communautés bactériennes pauvres et riches dans les deux populations françaises et danoises sont similaires. De plus, en se basant sur seulement 6 espèces bactériennes particulièrement représentatives de ces communautés, il est possible de distinguer les communautés riches des communautés pauvres en bactéries avec une précision de 95 %. Ces résultats pourraient conduire à l'élaboration d'une méthode simple pour déterminer quel type de communauté microbienne intestinale un individu porte.

Un régime alimentaire permet d'enrichir le microbiote

L'étude des patients français a de plus porté sur l'impact d'un régime riche en protéine et en fibres, et pauvre en calories, sur la diversité génétique du microbiote intestinal. Ce régime a conduit, après 6 semaines, non seulement à l'amélioration attendue des caractéristiques cliniques des individus étudiés (perte de poids et modifications des paramètres métaboliques), mais aussi à une augmentation de la richesse des communautés bactériennes intestinales initialement pauvres. Les chercheurs ont ainsi pu corréliser l'augmentation de la richesse bactérienne avec la réduction du poids et de la graisse...

Références

Emmanuelle Le Chatelier *et al.* **Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers.** *Nature*, 29 août 2013. DOI : 10.1038/nature1250

Aurélien Cotillard *et al.* **Dietary intervention impact on gut microbial gene richness.** *Nature*, 29 août 2013. DOI : 10.1038/nature12480

**CAPET de BIOTECHNOLOGIES
option BIOCHIMIE – GENIE BIOLOGIQUE
Concours EXTERNE**

**SUJET ZERO
conforme à l'arrêté du 19 avril 2013 Session 2014**

DEUXIEME EPREUVE

Durée : 5 heures

Coefficient : 1

L'épreuve a pour objectif de vérifier, dans l'option choisie, l'aptitude du candidat, à partir d'un dossier documentaire scientifique et technique à conduire une analyse critique de solutions et de documents technologiques, à proposer des démarches pédagogiques en lien avec un cahier des charges donné spécifiant le cadre de l'application et qui pourra faire appel à une réflexion sur les enjeux éducatifs, sociétaux, économiques, éthiques, écologiques.

Avertissement : le présent sujet a été construit à partir d'un sujet utilisé lors d'une précédente session. Ce choix relève de la volonté de favoriser la comparaison du avec un sujet élaboré selon le cahier des charges de l'ancienne définition d'épreuves

Les acides gras polyinsaturés dans l'alimentation

Origine, production et intérêts

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont des acides gras essentiels dont les rôles physiologiques peuvent être expliqués par leur structure stéréochimique :

- sous forme estérifiée dans les phospholipides, ils permettent de moduler la fluidité et la déformabilité des membranes cellulaires ainsi que l'activité de certaines protéines membranaires telles que récepteurs, transporteurs ou enzymes,
- ils sont précurseurs de médiateurs cellulaires oxygénés comme les prostaglandines et les leucotriènes ; par exemple, la prostacycline PGI₃ est un dérivé oxygéné oméga-3 inhibiteur de l'agrégation plaquettaire d'où son intérêt dans la prévention des maladies cardiovasculaires.

Favoriser la consommation de matières grasses riches en oméga-3 est donc un enjeu de santé publique indéniable qui offre un important potentiel commercial et marketing.

L'industrie agroalimentaire s'est emparée de cette stratégie économiquement attrayante pour mettre sur le marché de nouveaux produits enrichis en oméga-3 pour devenir des aliments fonctionnels :

- des huiles, des margarines et autres produits enrichis en oméga-3,
- des compléments alimentaires.



La source la plus connue d'oméga-3 est l'huile extraite des poissons, or en réalité, les poissons ne produisent pas ces AGPI mais les accumulent en consommant des algues.

La production des AGPI directement à partir des micro-algues présenterait de nombreux avantages :

- seule source naturelle d'acide éicosapentaénoïque (EPA) et d'acide docosahexaénoïque (DHA),
- absence d'odeur de poisson désagréable et réduction des risques de contaminations chimiques,
- meilleur potentiel de purification,
- répondre à la demande croissante et la diminution des stocks de poissons.

Avec les avancées technologiques de la micro-algoculture, les micro-algues sont considérées aujourd'hui comme une source possible de production de ces oméga-3. La valorisation de cette immense richesse n'en est qu'à ses balbutiements mais sera sans doute un des enjeux économiques et industriels du XXI^{ème} siècle.

A l'aide du dossier documentaire, proposer une démarche appropriée pour la mise au point au laboratoire d'une culture de micro-algues dans un objectif d'extraction d'une huile riche en acides gras polyinsaturés :

- choix du procédé et des conditions optimales de l'algoculture,
- contrôle de la qualité de l'huile obtenue.

Les choix devront être argumentés et les principes des méthodes explicités.

Discuter des intérêts socio-économiques de la consommation d'aliments enrichis en oméga 3.

Proposer un document didactique synthétique, illustré permettant d'expliquer les spécificités de la chromatographie en phase gazeuse.

Sources documentaires :

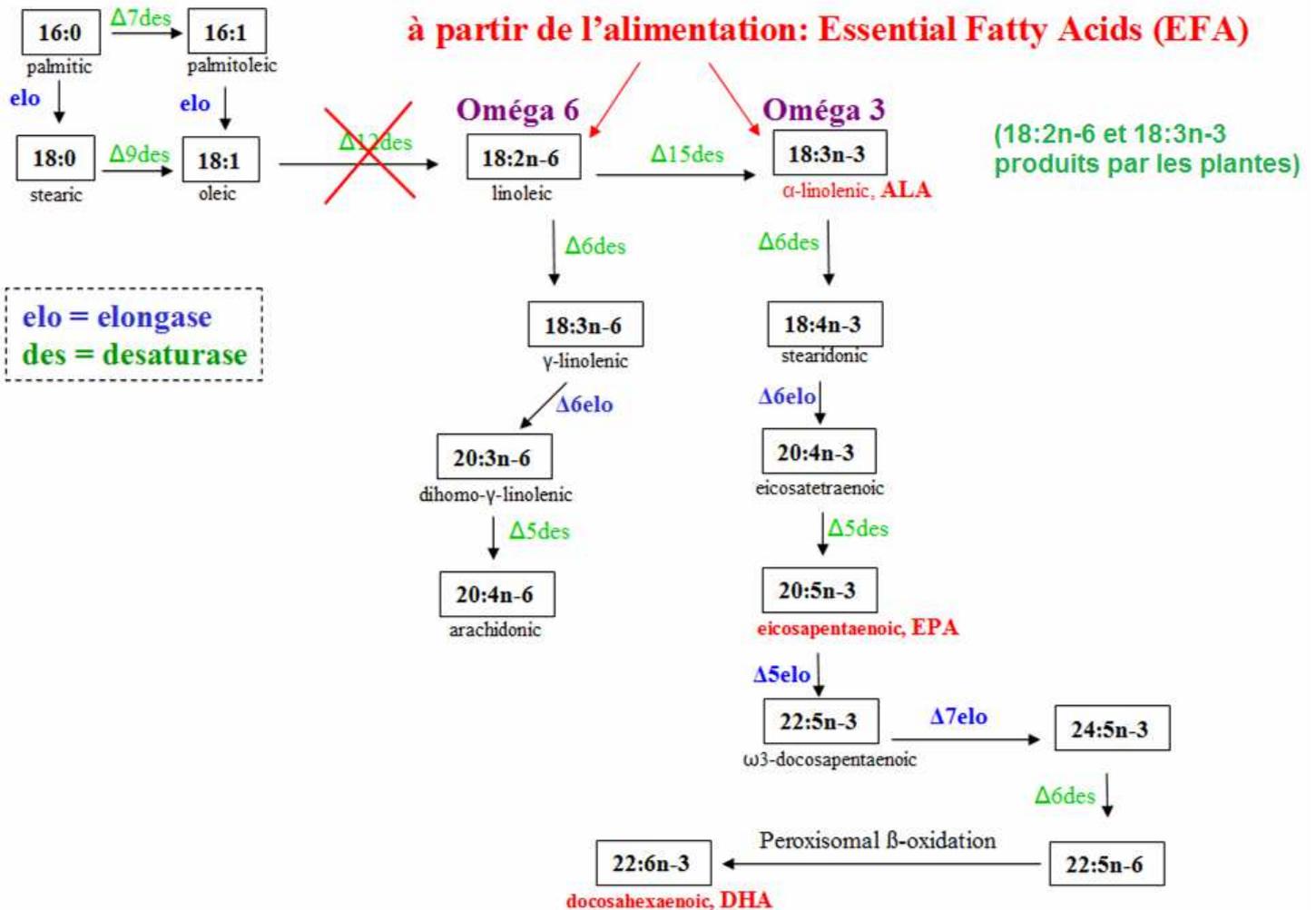
- *Livre turquoise - Algues, filières du futur - Julie PERSON - Adebitech - Juillet 2011*
- *Article paru dans le journal de la Société de biologie, 202 (3), 201-211 (2008)*
- *Kasetsart Journal - Natural Science - The publication of Kasetsart University (Thailand) - April June 2007 - Volume 41 number 2 pages 324-334*
- *Diaporama réalisé par M Thierry Tonon - Station Biologique de Roscoff - UMR 7139 CNRS-UPMC, Végétaux Marins et Biomolécules : A quoi peuvent servir les microalgues et les macroalgues marines ?*
- *Projet d'étude « Dosage des omégas 3 et 6 dans les suppléments alimentaires et les poissons gras » - Aurélie Eude - INSA de Rouen - Janvier-Mars 2005*

Origine et synthèse des oméga-3

Il existe plusieurs acides gras polyinsaturés oméga-3 à longues chaînes carbonées différents :

- l'acide α -linoléique C18:3n-3 (ALA)
→ synthétisé par les végétaux, précurseur des autres oméga-3 et acide gras essentiel pour l'homme,
- l'acide éicosapentaénoïque C20:5n-3 (EPA),
- l'acide docosahexaénoïque C22:6n-3 (DHA).

Synthèse des acides gras polyinsaturés chez les mammifères



La synthèse chez l'homme d'EPA et de DHA à partir d'ALA a un rendement très faible, les enzymes étant aussi utilisées pour la synthèse de certains oméga-6 ce qui provoque une compétition entre les deux voies métaboliques en faveur des oméga-6 (car les aliments sont souvent plus riches en précurseurs d'oméga-6 que d'oméga-3).

Les EPA et DHA synthétisés peuvent donc s'avérer insuffisants et doivent être complétés par des apports alimentaires directs.

Les produits de la mer sont les seules sources naturelles de ces deux AGPI (les végétaux terrestres apportent uniquement l'ALA). Ils sont produits exclusivement par les micro-algues et se concentrent ensuite tout au long de la chaîne alimentaire.

Production industrielle de micro-algues : une filière en pleine émergence

1. Diversité des micro-algues

Les algues sont des végétaux beaucoup moins connus que les plantes terrestres et constituent un ensemble d'organismes extrêmement divers. Il en existerait au moins 200 000 espèces différentes sur le globe.

Un grand nombre d'entre elles sont des formes unicellulaires (micro-algues) et photosynthétiques peuplant les océans et cours d'eau depuis plus de trois milliards et demi d'années. Ces organismes constituent un groupe polyphylétique et très diversifié de procaryotes (les algues bleues ou cyanobactéries) et d'eucaryotes (dans lesquels on retrouve les algues vertes, rouges et brunes). Le classement des micro-algues est basé sur diverses propriétés telles que les caractéristiques morphologiques, la pigmentation ou encore la nature chimique des produits de stockage issus de la photosynthèse.

2. Composition biochimique

Les micro-algues présentent une très grande diversité de molécules au sein de leurs cellules. Cette biomasse se différencie principalement des autres végétaux par sa richesse :

- en lipides : Les micro-algues peuvent accumuler plus de 50% de leur masse sèche en lipides. Ces lipides contiennent une proportion importante d'AGPI comme :
 - des oméga-3 : ALA mais aussi ses homologues supérieurs : EPA et DHA,
 - des oméga-6 : acide arachidonique (C20:4).
- en protéines : Le contenu élevé en protéines, peptides et acides aminés (entre 12 et 65% de matière sèche) de plusieurs espèces de micro-algues est une des principales raisons pour les considérer comme une source non conventionnelle de protéines dans l'alimentation humaine et animale (pisciculture).
- en vitamines : source importante de quasi toutes les vitamines essentielles : B₁, B₆, B₁₂, C, E, K₁
- en pigments : phycocyanine de la *spiruline* (colorant bleu), phycoérythrine (couleur rouge) de *Porphyridium purpureum*, β -carotènes de *Dunaliella salina*... Avec la demande croissante de molécules d'origine naturelle, le marché des pigments issus des micro-algues offre des perspectives commerciales élevées.
- en antioxydants.

Certaines espèces présentent aussi une richesse en oligosaccharides et polysaccharides, d'autres encore peuvent produire des molécules à activité antivirales ou antibiotiques chez l'homme.

Beaucoup de molécules restent probablement encore à découvrir et font l'objet de recherches dans de nombreux laboratoires à travers le monde.

3. Historique de la culture des micro-algues

La consommation des algues remonterait à des millénaires. Les scientifiques ont découvert que le phytoplancton était consommé au Mexique depuis le temps des aztèques et que les tchadiens consomment la spiruline séchée (cyanobactérie *Arthrospira*) depuis plusieurs décennies. Sa forte teneur en protéines (jusqu'à 60% de la masse sèche) auraient permis de palier les problèmes de malnutrition.



Les micro-algues ne sont cependant cultivées et exploitées industriellement que depuis quelques dizaines d'années. La première installation industrielle d'algoculture a vu le jour dans les années 1960, au Japon.

L'Asie est le premier producteur de micro-algues au monde, et représente à elle seule environ 50% de la production mondiale. La France a développé ses premières unités de production de micro-algues plus tardivement – à la fin des années 80 – et l'on dénombre aujourd'hui une trentaine de sites de production sur le territoire et pour une production d'environ 10 à 15 tonnes par an.

4. Mode de vie et production de la biomasse

Toutes les espèces de micro-algues présentent un métabolisme photo-autotrophe qui repose sur la photosynthèse. Certaines espèces sont capables de passer d'une croissance photo-autotrophe à une croissance hétérotrophe utilisant le glucose ou d'autres substrats carbonés pour leur métabolisme énergétique.

Les micro-algues présentent l'avantage d'avoir un cycle de division très court, de l'ordre de quelques heures, permettant la production rapide de biomasse (plusieurs grammes de matière sèche par litre).

Le développement des micro-algues nécessite des conditions de culture contrôlées comme l'eau (en fonction des souches cultivées l'eau sera douce, marine ou saumâtre), les nutriments, la lumière, le CO₂, la température et le pH de la culture, ainsi que l'agitation ; elle peut parfois nécessiter plusieurs facteurs de croissance.

Certaines carences en nutriments sont parfois appliquées volontairement dans le but de stimuler la production de certains métabolites ; par exemple une carence en azote stimule la production de lipides.

Les premières cultures de micro-algues étaient en mode discontinu et en conditions semi-contrôlées dans des bassins à ciel ouvert. Depuis, les techniques de production ont évolué pour arriver aujourd'hui à des productions en mode continu et contrôlé en photobioréacteurs ; les systèmes ouverts ont également bénéficié d'optimisation et d'automatisation des cultures.

Les derniers développements technologiques s'orientent vers une culture hétérotrophe, en fournissant une source de carbone organique ; cela permet de s'affranchir de la lumière donc une culture dans des fermenteurs à cuves immenses et d'utiliser les techniques de fermentation déjà très abouties.

5. Utilisations biotechnologiques possibles

La diversité des espèces de micro-algues et leur richesse en métabolites permet un vaste panel d'applications et peut s'adresser à de nombreux secteurs industriels. Il est non seulement possible de valoriser la biomasse algale brute, mais aussi de l'utiliser pour la production de molécules d'intérêts : les industries agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques utilisent différentes molécules issues de l'algoculture.

Leur utilisation comme source de biocarburant a aussi été envisagée : les micro-algues étant capables de produire une très grande quantité de lipides, cela permet d'obtenir une productivité en photobioréacteurs très supérieures aux meilleures plantes oléagineuses et de répondre aussi à de nombreux problèmes environnementaux (limiter l'agriculture intensive, capter le CO₂ émis par les industries polluantes pour permettre la photosynthèse).

	Palmier à huile	Colza	Micro-algues
Productivité en lipides (T.ha ⁻¹ .an ⁻¹)	4-7	0,5-0,6	40-60

Ces algo-triglycérides peuvent ensuite être utilisés pour fabriquer du biodiesel après transméthylation chimique.



6. Aspects réglementaire

La valorisation des micro-algues est soumise aux mêmes contraintes réglementaires que les autres ressources naturelles utilisées à des fins industrielles.

Ainsi, les autorisations des micro-algues en alimentation humaine dépendent de la procédure CE 258/97 «Nouveaux aliments» (JOCE du 27/01/1997). Ce règlement européen concerne tous les aliments et ingrédients alimentaires composés de micro-organismes, de champignons, d'algues ou isolés à partir de ceux-ci.

L'autorisation porte sur l'espèce et sur son mode de production (raceways extérieurs, milieu marin naturel, conditions spécifiques...).

En alimentation humaine, seules trois micro-algues sont autorisées :

- la cyanobactérie *Arthrospira platensis*, plus connue sous le nom de spiruline, autorisée en Europe depuis 1981
- la diatomée *Odontella aurita* qui a obtenu une autorisation en tant qu'ingrédient alimentaire en 2002,
- la chlorophycée *Chlorella vulgaris* autorisée en France depuis 2004.

Deux extraits de micro-organismes marins et deux pigments sont également autorisés au niveau européen comme additif alimentaire :

- l'huile extraite de *Schizochytrium sp.*, à teneur élevée en DHA (au minimum 32% DHA (m/m)), est autorisée par la CE depuis 2003,
- l'huile extraite d'*Ulkenia sp.*,
- le β -carotène issu de la micro-algue *Dunaliella salina* (E160a),

- l'astaxanthine extraite de la micro-algue *Haematococcus pluvialis* (E161j).

Production industrielle de micro-algues : les procédés utilisés en micro-algoculture

1. Culture d'algues phototrophes

Comme pour tout végétal chlorophyllien, la photosynthèse chez les micro-algues permet de fixer le CO₂ grâce à l'énergie lumineuse pour produire de la biomasse. La température, le pH, le CO₂ dissous et l'homogénéisation sont des facteurs importants pour la performance de la culture. Il existe deux types de procédés :

Systèmes ouverts : étangs à haut rendement de type « raceway »

Ce sont les systèmes les plus utilisés à ce jour pour la production de micro-algues commerciales. Le milieu de culture d'une profondeur de quelques dizaines de centimètres circule grâce à des roues à aubes. Les éléments nutritifs sont apportés de manière à garantir une croissance optimale et un bullage assure l'apport en CO₂.



Systèmes de production ouvert de type Raceway

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • Simplicité de construction et d'utilisation • Investissements peu onéreux • Maintien de la température grâce au refroidissement par évaporation • Culture de masse sur des surfaces importantes 	<ul style="list-style-type: none"> • Faible productivité en biomasse à cause d'une mauvaise pénétration de la lumière en profondeur • Sujet aux conditions naturelles du milieu (température, luminosité) → productivité variable et saisonnière, et besoin important en eau pour compenser l'évaporation • Vulnérabilité des cultures aux contaminations (par des espèces locales ou des prédateurs) → surtout utilisé pour des espèces extrémophiles adaptées à des milieux très alcalins (<i>Spiruline</i>) ou hypersalins (<i>Dunaliella salina</i>)

Systèmes fermés : photobioréacteurs « PBR »



PBR « airlift » à colonnes verticales



PBR tubulaires



PBR plats

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • Systèmes adaptés à la culture de micro-algues sensibles aux contaminations • Meilleurs contrôle de la culture et transfert du CO₂ dans la phase liquide • Plus grand rapport surface/volume permettant d'obtenir des concentrations volumiques de cellules plus importantes • Peuvent être exposés à la lumière artificielle, ce qui garantit une luminosité constante et contrôlée 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût élevé et procédés complexes • Nécessitent un dispositif pour limiter l'élévation de la température accentuée par l'effet de serre • Nécessitent un dispositif pour éliminer l'oxygène produit par la photosynthèse en système clos • Demandent un nettoyage régulier à cause de la formation possible de bio-film

→ Rendement plus élevé	
------------------------	--

2. Culture d'algues hétérotrophes

Il est aussi possible de cultiver des micro-algues selon des procédés biotechnologiques classiques, en utilisant des algues hétérotrophes et en les cultivant dans des fermenteurs au lieu de photobioréacteurs.

L'énergie est alors fournie par une source de carbone organique (sucres, acides organiques, glycérol...) et dans ce cas, les algues ne photosynthétisent pas mais respirent ; on s'affranchit ainsi du problème de diffusion de la lumière.

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none">• Technologie totalement maîtrisée à l'échelle industrielle sur les levures et les bactéries depuis plusieurs décennies• Plus facile de prévenir les contaminations• Meilleure productivité en biomasse• Faible coût de production	<ul style="list-style-type: none">• Coût et disponibilité des matières premières utilisées comme substrat énergétique comme les sucres (concurrence avec d'autres procédés biotechnologiques)



Fermenteur industriel

Document 4

Production industrielle de micro-algues : procédés de récolte et d'extraction

1. Récolte

L'étape de récolte et/ou concentration est conditionnée par le choix de l'espèce et le mode de culture, et elle conditionne ensuite toutes les étapes en aval (extraction, purification, recyclage..).

La problématique de cette étape est d'autant plus marquée qu'il existe une très grande diversité des souches, présentant des cellules de taille pouvant aller de 1 à 100 μm et des suspensions allant de 0,1 à 10 g par litre, autant de paramètres à prendre en considération pour le choix de la technologie.

Plusieurs moyens de récolte sont donc possibles, ils répondent à deux principes de séparation bien distincts :

- séparation par différence de masse volumique des cellules par rapport à celle du milieu : techniques de sédimentation, de floculation-décantation, de flottation ou de centrifugation,
- séparation par exclusion en fonction de la taille : le tamisage, les procédés à membranes pouvant utiliser la micro- ou l'ultra-filtration frontale ou tangentielle.

2. Séchage

La particularité de la biomasse micro-algale est de présenter un taux d'humidité très élevé qui est problématique pour la conservation et aussi pour l'extraction des produits à valoriser : une étape de séchage est souvent pratiquée : séchage solaire, atomisation ou lyophilisation,

3. Extraction

Les molécules d'intérêt sont pour la plupart localisées à l'intérieur des cellules, il faut donc réussir à casser la barrière naturelle que représentent les différentes membranes pour atteindre les molécules cibles et les extraire : broyage (mécanique, ultrasons...), lyse enzymatique, chocs osmotiques, congélation/décongélation...

Un solvant d'extraction est ensuite choisi en fonction de sa polarité et de son affinité avec les molécules d'intérêt à extraire.

Il existe aussi certains cas particuliers de production où la biomasse micro-algale n'est pas récoltée physiquement, mais où l'on récupère seulement les substances d'intérêt produites par les cellules avant de redémarrer un cycle de culture. On parle alors de « milking » (littéralement « traite », comme pour des vaches laitières...).

Ce mode d'extraction peut être appliqué pour la production de lipides : dans ce cas, les algues sont mises en contact avec un solvant organique apolaire (type hexane), et on procède à une opération d'extraction

liquide/liquide, suivie d'une séparation de phases. Les algues traitées sont ensuite remises en culture, avec dans certains cas des taux de survie proches de 100%.

Etude de la synthèse de DHA chez la micro-algues *Schizochytrium* et optimisation du rendement de production

Polyunsaturated fatty acids including DHA are essential dietary fatty acids. At present, fish oils are a major source, but an alternative supply is needed because of increasing demand and fish dwindling stocks.

This need might be satisfied using a thraustochytrid found in mangrove forests of Thailand and identified by 18S rDNA sequencing : *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2. Thraustochytrids such as *Schizochytrium* are aquatic heterotrophic microorganisms commonly found in marine and estuarine environment. The capacity of thraustochytrids to accumulate large amounts of polyunsaturated fatty acids, especially omega-3 fatty acids including docosahexaenoic acid (DHA), is well recognized.

This microorganism could provide a commercial source of this valuable lipid as a red pigment astaxanthin identified by TLC and HPLC. This study aims to improve both the DHA production (and astaxanthin) by optimizing media and culture conditions in the laboratory for later application to industrial production.

1. Analytical procedures

Determination of cell mass

Growth was determined as the dry weight of the cells (drying conditions).

Fully grown cultures (50 mL volumes) were filtered through 0,8 µm membrane filters and washed twice with 50 mL of saline solution. Cells were dried at 60°C to constant weight.

Extraction and analysis of lipids

Lipid was extracted by the modified method of Bligh and Dyer (**figure 1**), followed by transmethylation.

The fatty acid methyl esters were analyzed in a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and a split injector at 1/40 ratio, and connected to an integrator. The column was a fused silica megabore, 30 m long and 0,52 mm inside diameter, coated with 1 µm thickness of 25% cyanopropyl - 25% phenyl - 50% methyl polysiloxane. Analysis conditions were 210°C column temperature, 250°C injection and detector temperatures, helium as carrier gas, and pentanoic acid (C15:1) as internal standard.

Fatty acids were identified and quantified by comparing retention times with standards (**figure 2 et 3**).

2. Optimization of growth and DHA production by *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2

Schizochytrium limacinum BR2.1.2 was tested in various culture conditions to find the optimal yield of DHA.

The following conditions were applied throughout unless otherwise stated. Thirty milliliters of GPY medium composed of 3% **G**lucose, 1% **P**eptone, 0,5% **Y**east extract and 50% of natural sea water was used as the basal medium and placed in a 125 mL Erlenmeyer flask. All experiments were carried out in triplicate flasks.

Cultivation was initiated by addition of 1 mL of inoculum (adjusted cells concentration to 1,0 at OD 600 nm). Incubation was done on a rotary shaker at 140 rpm at room temperature for 6 days. To test different media, the basal media was modified in the following manner :

1. The carbon source replaced by either glucose, fructose, sucrose, glucose syrup and agricultural products i.e. molasses, and sugar cane juice (**figure 4**).
2. The nitrogen sources replaced by peptone, soybean meal : SBM (*tourteau de soja*), skimmed milk (*lait écrémé*), ammonium sulfate, potassium nitrate, sodium nitrate, monosodium glutamate : MSG (**figure 5**).
3. Sea salt concentration (salinity) 0- 200% of sea water (**figure 7**).

The effect of C/N ratio, temperature and incubation time on growth and DHA production were also determined (**figure 6,8 et 9**).

Figure 1 : Extraction of lipids in solution by Methode of Bligh and Dyer

(Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.*37:911-917)

Use new (or solvent-cleaned) all-glass tubes :

1. For each 1 ml of sample, add 3,75 ml 1:2 (v/v) CHCl₃:MeOH and vortex well. If you will be subjecting the lipids to GC analysis, this solvent should include the final amount of internal standard (e.g., 5 µg b-sitosterol).
2. Then add 1,25 ml CHCl₃ and vortex well.
3. Finally add 1,25 ml dH₂O and vortex well.
4. Centrifuge at 1000 RPM 5 min at room temperature to give a two-phase system (aqueous top, organic bottom).
5. Recover the bottom phase as follows : insert Pasteur pipette through the upper phase with gentle positive-pressure so that the upper phase does not get into the pipette tip. When the pipette tip is at the bottom of the tube, carefully withdraw

bottom phase through the pipette, making sure to avoid interface or upper face (should only try to recover ~90% of bottom phase, not all of it).

Figure 2 : Part of the chromatogram of the mixture of standards, PUFA No 1, Marine Source – Supelco

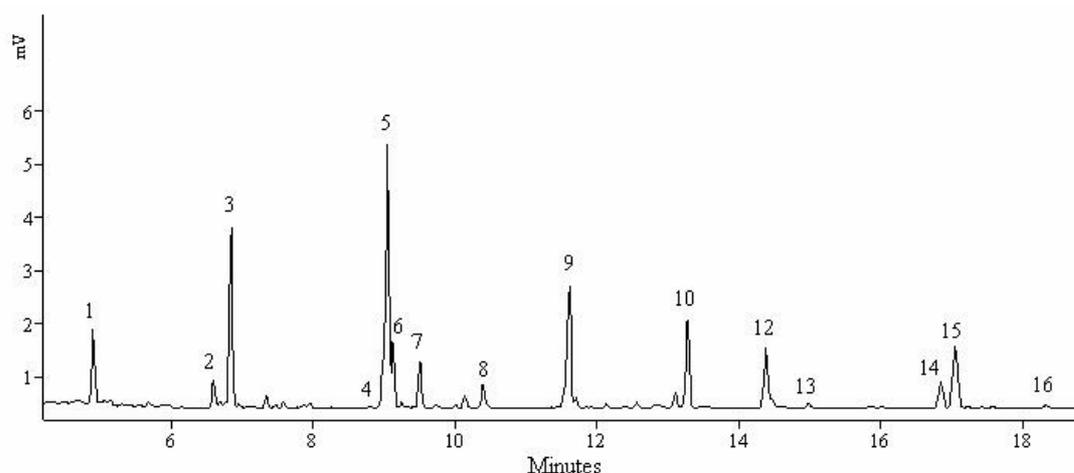
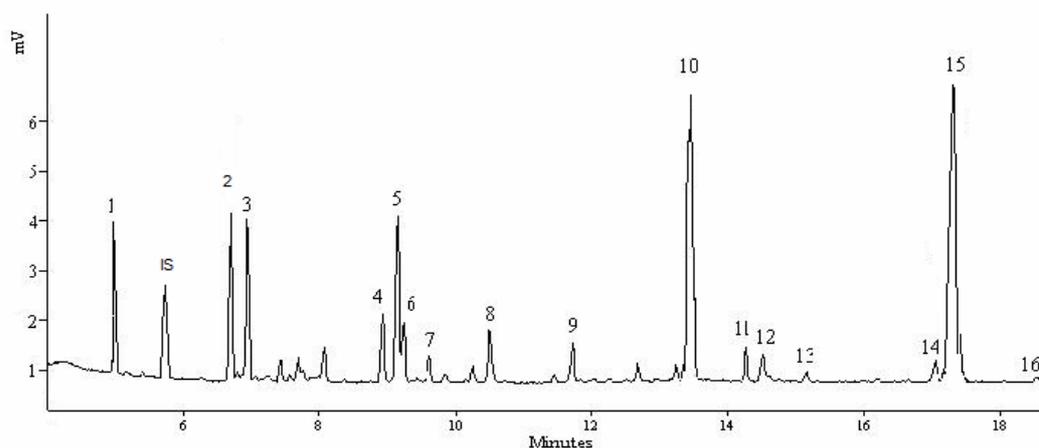


Figure 3 : Part of the chromatogram of lipids produced by *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2



No.	Fatty Acid		A/A _{IS}
1	myristic acid	C14:0	2,14
IS	internal standart : pentanoic acid	C15:1	-
2	palmitic acid	C16:0	2,23
3	palmitoleic acid	C16:1 ω 7	2,31
4	stearic acid	C18:0	1,22
5	oleic acid	C18:1 ω 9	1,96
6	vaccenic acid	C18:1 ω 7	1,08
7	linoleic acid	C18:2 ω 6	0,51
8	stearidonic acid	C18:4 ω 3	1,16
9	11-eicosenoic acid	C20:1 ω 9	0,81
10	EPA (eicosapentaenoic acid)	C20:5 ω 3	8,29
11	behenic acid	C22:0	0,63
12	11-docosenoic acid	C22:1 ω 11	0,72
13	erucic acid	C22:1 ω 9	0,28
14	docosapentaenoic acid	C22:5 ω 3	0,41
15	DHA (docosahexaenoic acid)	C22:6 ω 3	11,81
16	nervonic acid	C24:1 ω 9	0,16

A/A_{IS} = Ratio between the peak area of fatty acid and the peak area of internal standard

3. Results

Figures 4 : Effect of (A) carbon sources and (B) glucose concentration on growth and DHA production by *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2 cultivated at room temperature in shaker 140 rpm.

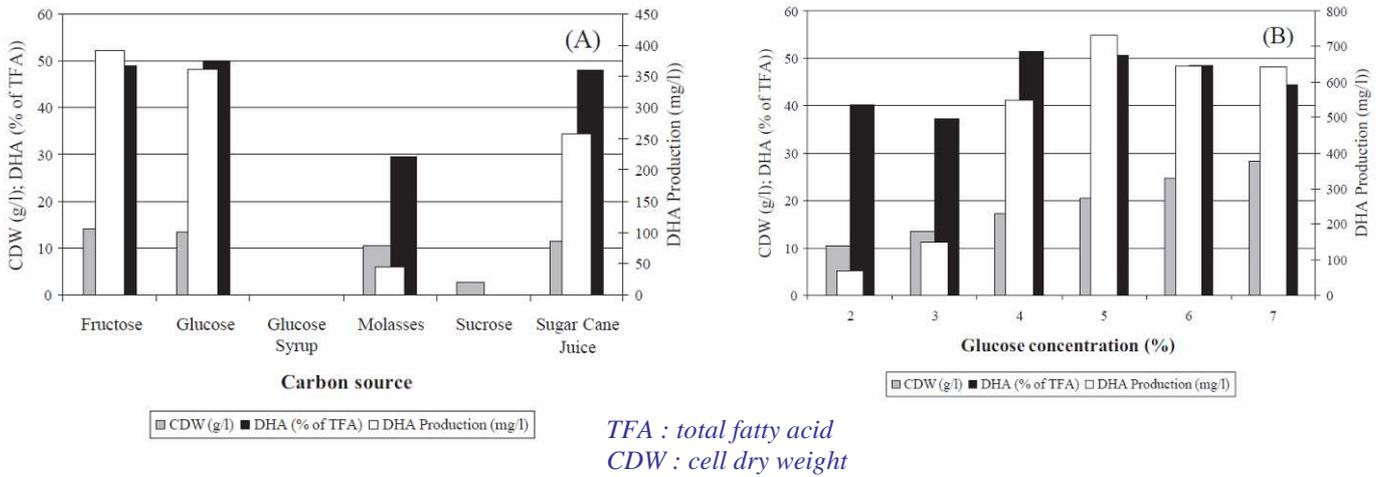


Figure 5 : Effect of (A) single nitrogen source and (B) combined nitrogen source on growth and DHA production by *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2 cultivated at room temperature in shaker 140 rpm (P = peptone; SBM = soybean meal).

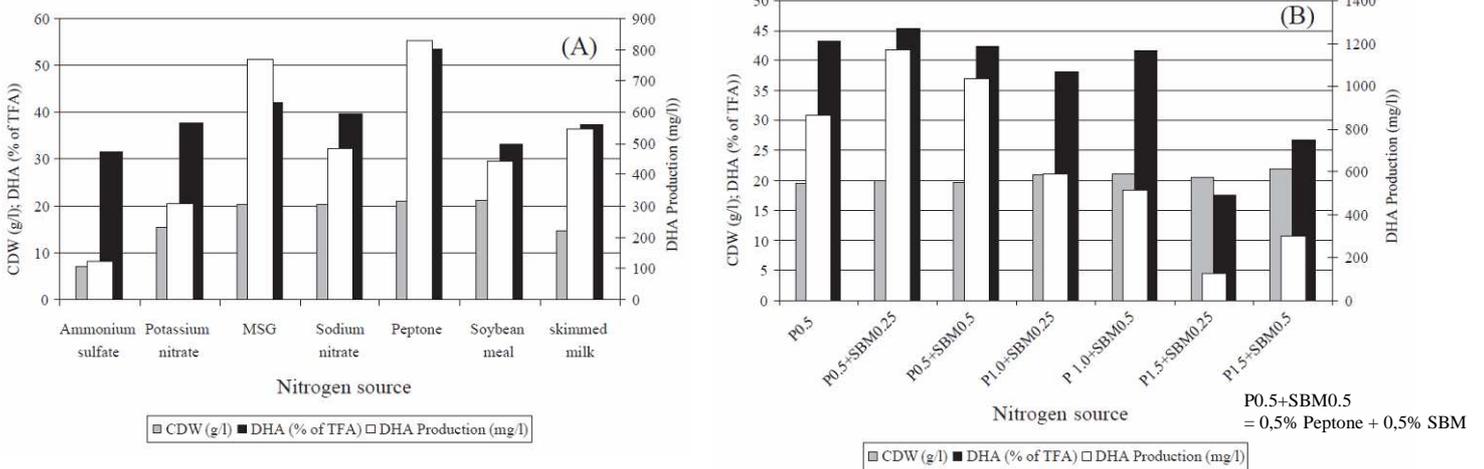


Figure 6 : Effect of C/N ratio on growth and DHA production in *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2 cultivated at room temperature in shaker 140 rpm.

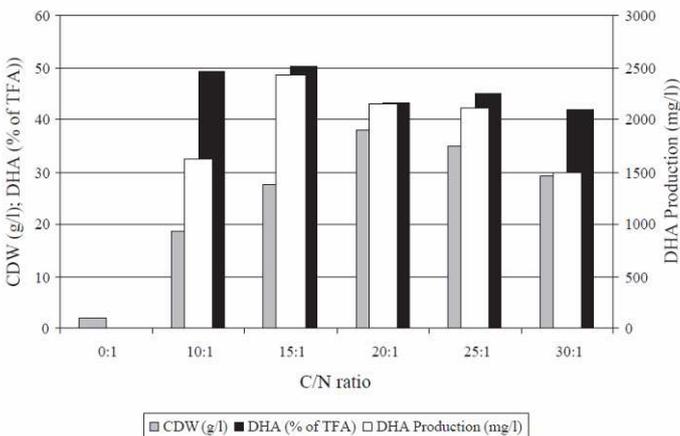


Figure 7 : Effect of salinity (as % of seawater) on growth and DHA production in *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2 cultivated at room temperature in shaker 140 rpm.

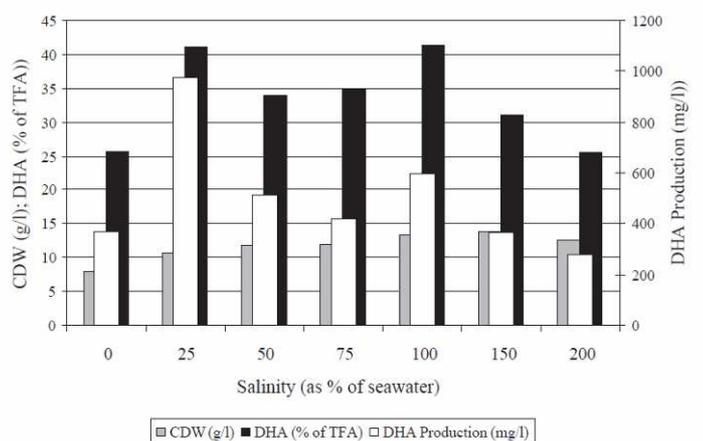


Figure 8 : Effect of temperature on growth and DHA production in *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2 cultivated in thermostated incubator

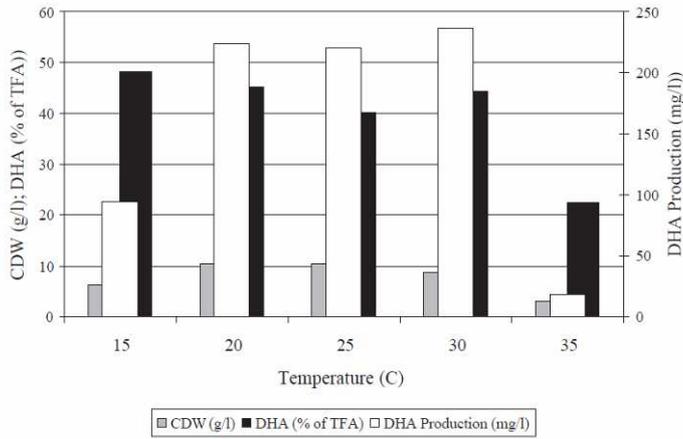
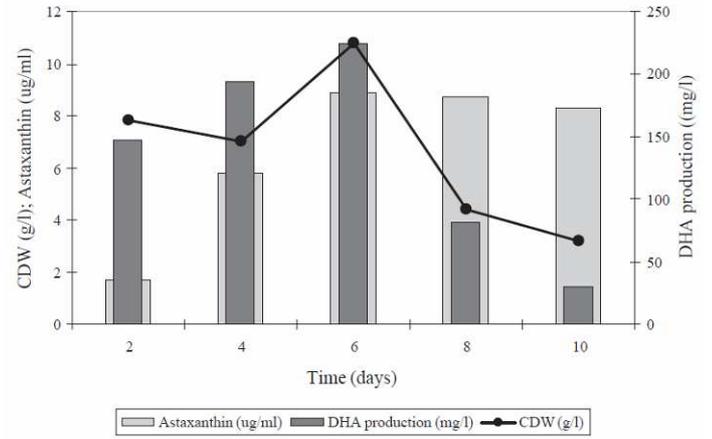


Figure 9 : Growth, astaxanthin and DHA production by *Schizochytrium limacinum* BR2.1.2 mutant strain in GPY broth at 25°C with 2 kLux light intensity and light/dark 16/8 hrs.



CAPET de BIOTECHNOLOGIES
option BIOCHIMIE – GENIE BIOLOGIQUE
Concours EXTERNE

SUJET ZERO
conforme à l'arrêté du 19 avril 2013 Session 2014

DEUXIEME EPREUVE

Durée : 5 heures

Coefficient : 1

L'épreuve a pour objectif de vérifier, dans l'option choisie, l'aptitude du candidat, à partir d'un dossier documentaire scientifique et technique à conduire une analyse critique de solutions et de documents technologiques, à proposer des démarches pédagogiques en lien avec un cahier des charges donné spécifiant le cadre de l'application et qui pourra faire appel à une réflexion sur les enjeux éducatifs, sociétaux, économiques, éthiques, écologiques.

Avertissement : le présent sujet a été construit à partir d'un sujet utilisé lors d'une précédente session. Ce choix relève de la volonté de favoriser la comparaison du avec un sujet élaboré selon le cahier des charges de l'ancienne définition d'épreuves

Les anticorps monoclonaux humains comme molécules thérapeutiques

Les qualités des anticorps monoclonaux, spécificité, affinité, facilité d'obtention et de production industrielle en font des outils diagnostiques et thérapeutiques de choix. Ils constituent un véritable enjeu de société pour lutter contre les maladies chroniques en constante expansion. On se propose d'étudier les avancées technologiques de conception des anticorps monoclonaux thérapeutiques, ainsi que leur production et leur purification industrielles permettant leur administration répétée.

Exposer la stratégie développée pour permettre l'utilisation thérapeutique d'anticorps monoclonaux comme traitement d'affections chroniques en décrivant les aspects scientifiques et technologiques permettant de générer, de produire et de purifier des anticorps thérapeutiques utilisables dans les pathologies chroniques. Le candidat s'attachera à réaliser l'analyse complète et structurée de l'ensemble des documents proposés et expliciter clairement les techniques mises en œuvre.

La purification et le contrôle des anticorps produits fait appel à trois techniques de chromatographie. Elaborer, sur une seule page, un support pédagogique permettant de comparer leurs caractéristiques (nature des phases, de forces, des interactions...).

Justifier brièvement vos choix.

Liste des documents et extraits d'articles scientifiques et techniques fournis :
--

Document 1 : Utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux

Document 2 : Structure des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique

Document 3 : Exemples d'anticorps monoclonaux thérapeutiques autorisés par la FDA (Food and Drugs Administration) en 2010

3A: Quelques anticorps monoclonaux approuvés par la FDA pour le traitement anti-cancer.

3B: Quelques anticorps monoclonaux approuvés par la FDA pour le traitement de pathologies immunitaires.

Document 4 : Modifications génétiques du génome de souris pour la production d'anticorps monoclonaux humains

Document 5 : Un exemple de procédure d'obtention d'hybridomes produisant des anticorps monoclonaux humains, application à la production d'anticorps dirigés contre la protéine membranaire CD69

Document 6 : Comparaison des systèmes de production d'anticorps en cellules de mammifères

Document 7 : Conditions de culture pour la production industrielle d'anticorps monoclonaux en bioréacteur

7A: Conditions de culture en fed-batch

7B: Résultats

Document 8 : Procédé de purification d'un anticorps monoclonal à partir de surnageant de culture des cellules CHO en bioréacteur

8A: Différentes étapes de purification

8B: Etapes de chromatographie

8C: Contrôle de qualité des anticorps monoclonaux humains purifiés

Document 9 : Exemple d'utilisation des anticorps monoclonaux humains

Document 1 : Utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux

Le potentiel thérapeutique des anticorps comme « magic bullets » avait déjà été décrit par Paul Ehrlichen en 1908. En 1975, Köhler et Milstein ont réussi à fabriquer des anticorps monoclonaux à l'aide de la technique de l'hybridome. Au cours des 25 dernières années, les techniques de biologie cellulaire et moléculaire se sont affinées, si bien qu'il est devenu possible aujourd'hui de fabriquer des quantités pratiquement illimitées d'anticorps monoclonaux murins, chimères et humanisés pour de nombreuses applications cliniques, notamment dans la recherche, le diagnostic et le traitement des maladies. Les premières applications thérapeutiques ont fait appel à des anticorps monoclonaux produits chez la souris (anticorps murins). Les injections d'anticorps murins provoquaient cependant des réactions immunes et entraînaient la formation d'anticorps humains « anti-souris » (Human Anti-Mouse Antibodies – HAMA). La découverte du fondement génétique de la diversité des anticorps et la technologie de l'ADN recombinant ont, par la suite, ouvert la porte aux formes partiellement humanisées d'anticorps murins. Les anticorps monoclonaux chimères, humanisés et entièrement humains sont moins immunogènes, et induisent beaucoup moins fréquemment la formation d'anticorps anti-immunoglobuline dans le cadre de la pratique thérapeutique. Ces anticorps peuvent par conséquent être utilisés de manière répétée durant une période prolongée.

De la souris à l'homme: anticorps monoclonaux chimères, humanisés et entièrement humains

Les premiers anticorps monoclonaux ont été fabriqués par la fusion d'une cellule B produisant des anticorps et d'une lignée de cellules myélomateuses. Les cellules myélomateuses sont des lymphocytes B immortalisés. Cette fusion permet de fabriquer des lignées cellulaires à très longue durée de vie, capables de produire des anticorps dont la spécificité peut être choisie.

L'anticorps anti-CD3 (Orthoclone OKT3[®], muromomab-CD3) est un représentant de la première génération. Il est utilisé dans le traitement du rejet aigu après greffe d'organe et a été le premier anticorps monoclonal admis pour l'usage thérapeutique chez l'homme. L'expérience clinique a montré que le muromonab-CD3 doit être utilisé en association avec d'autres médicaments immunosuppresseurs pour prévenir la réponse immunitaire contre l'anticorps murin. Les anticorps HAMA peuvent néanmoins apparaître malgré l'application simultanée d'une immunosuppression intensive. La demi-vie normale du muromomab-CD3 dans la circulation est de 18 heures. Après le développement d'anticorps HAMA, le muromonab-CD3 peut être éliminé de la circulation en quelques heures seulement.

Contrairement au traitement limité dans le temps, propre aux rejets aigus de greffes, celui des maladies cancéreuses ou auto-immunes nécessite des applications sur des périodes relativement prolongées pour obtenir l'effet thérapeutique désiré de façon durable.

La constatation selon laquelle la réaction immunitaire du patient contre les anticorps de souris compromet l'efficacité thérapeutique dans ces affections chroniques a conduit au développement de stratégies visant à diminuer l'immunogénicité des anticorps monoclonaux. Dans un premier temps, on s'est mis à produire des anticorps monoclonaux chimères. La fréquence d'induction d'une réponse anti-anticorps a ainsi considérablement diminué, ce qui a permis d'administrer ces médicaments de manière répétée. [...] Cependant, la formation de HAMA reste par conséquent un problème potentiel significatif, même si les anticorps monoclonaux chimères se sont aujourd'hui solidement implantés dans la pratique clinique. Ils exigent toutefois un suivi attentif et, le cas échéant, l'administration concomitante de corticostéroïdes, voire parfois l'interruption du médicament.

La poursuite systématique des efforts de recherche a par la suite conduit au développement d'anticorps humanisés. On espérait obtenir ainsi une réduction significative de leur immunogénicité. En pratique, on s'est cependant trouvé confronté à l'induction de réactions à anticorps HAMA, dont l'incidence était néanmoins plus faible par rapport à celle constatée avec les anticorps chimères. [...]

Des anticorps entièrement humains ont été développés au cours des dernières années, afin de diminuer encore plus l'immunogénicité des anticorps monoclonaux thérapeutiques. Différentes méthodes ont été utilisées: des souris porteuses d'un défaut immunitaire (severe combined immune deficiency, SCID) peuvent être reconstruites à l'aide de tissu fœtal humain. L'immunisation de ces souris génère des anticorps humains.

La plus grande partie des anticorps humains est cependant produite *in vitro* par la méthode *Phage-Display* ou par l'intermédiaire de souris transgéniques produisant des anticorps entièrement humains. Plusieurs de ces anticorps exclusivement humains sont actuellement autorisés et d'autres sont testés dans le cadre d'essais cliniques de phase I à III.

Source : http://www.medicalforum.ch/pdf/pdf_f/2008/2008-08/2008-08-023.PDF

Document 3 : Exemples d'anticorps monoclonaux thérapeutiques autorisés par la FDA (Food and Drugs Administration) en 2010

3A: Quelques anticorps monoclonaux approuvés par la FDA pour le traitement anti-cancer.

International non-proprietary name	Trade name	Target and type	Indication under review or first approved	FDA approval year
Ofatumumab	Arzerra	CD20; human IgG1	Chronic lymphocytic leukemia	2009
Tositumomab-I131	Bexxar	CD20; murine IgG2a	Non-Hodgkin lymphoma	2003
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	CD20; murine IgG1	Non-Hodgkin lymphoma	2002
Rituximab	Rituxan	CD20; chimeric IgG1	Non-Hodgkin's lymphoma	1997
Alemtuzumab	Campath-1H	CD52; humanized IgG1	Chronic myeloid leukemia	2001
Panitumumab	Vectibix	EGFR; human IgG2	Colorectal cancer	2006
Cetuximab	Erbix	EGFR; chimeric IgG1	Colorectal cancer	2004
Bevacizumab	Avastin	VEGF; humanized IgG1	Colorectal cancer	2004

CD, cluster of differentiation; EGFR, epidermal growth factor receptor; VEGF, vascular endothelial growth factor.
International non-proprietary naming convention: -umab, human; -zumab, humanized; -ximab, chimeric; -momab, murine.

3B: Quelques anticorps monoclonaux approuvés par la FDA pour le traitement de pathologies immunitaires.

International non-proprietary name	Trade name	Target and type	Indication under consideration or first approved	FDA approval year
Muromomab-CD3	Orthoclone Okt3	CD3; murine IgG2a	Reversal of kidney transplant rejection	1986*
Basiliximab	Simulect	IL2R; chimeric IgG1	Prevention of kidney transplant rejection	1998
Tocilizumab	Actemra	IL6R; humanized IgG1	Rheumatoid arthritis	2010
Ustekinumab	Stelara	IL12/23; human IgG1	Plaque psoriasis	2009
Omalizumab	Xolair	IgE; humanized IgG1	Asthma	2003
Natalizumab	Tysabri	α 4 integrin; humanized IgG4	Multiple sclerosis	2004
Golimumab	Simponi	TNF; human IgG1	Rheumatoid and psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis	2009
Adalimumab	Humira	TNF; human IgG1	Rheumatoid arthritis	2002
Infliximab	Remicade	TNF; chimeric IgG1	Crohn disease	1998

Information current as of September 1, 2010. *Voluntarily withdrawn from US market.

CD, cluster of differentiation; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor.

International non-proprietary naming convention: -umab, human; -zumab, humanized; -ximab, chimeric; -momab, murine.

D'après: *Antibody-based therapeutics to watch in 2011*. Janice M. Reichert- *mAbs* 3:1, 76-99; January/February 2011; © 2011 Landes Bioscience

Document 4 : Modifications génétiques du génome de souris pour la production d'anticorps monoclonaux humains

L'utilisation de souris transgéniques pour les gènes d'immunoglobulines humaines permet de produire des anticorps complètement humains grâce à la technologie de production d'hybridomes bien documentée. Différentes lignées de souris sont disponibles, leur nom commercial est par exemple XenoMouse[®], HuMAb[®] Mouse....

Ces souris transgéniques présentent des propriétés communes :

1. Le locus endogène de la chaîne lourde des immunoglobulines de souris a été inactivé par la technique de d'inactivation des segments J_H ou C_μ (knock-out) ;
2. Le locus endogène de la chaîne légère kappa murine a été inactivé par inactivation des segments J_k et /ou C_k (knock-out) ;
3. Le locus endogène de la chaîne légère lambda reste intact et fonctionnel ;
4. Le transgène de la chaîne lourde humaine contient au minimum : la majorité des segments V_H humains, tous les segments D humains, tous les segments J_H humains, le segment C_μ-C_δ humain et au moins un segment C_γ humain ;
5. Le transgène de la chaîne légère kappa humaine contient la majorité des segments V_k humains et le segment C_k humain.

Traduit d'après: *Antibody Engineering : Methods and Protocols* Editor(s): Benny K. Lo¹ Affiliation(s) Humana Press 2004 Series: *Methods in Molecular Biology* | Volume No.: 248

Document 5: Un exemple de procédure d'obtention d'hybridome produisant des anticorps monoclonaux humains, application à la production d'anticorps dirigés contre la protéine membranaire CD69

- Control and antigen producing cell lines

RBL rat basophilic leukemia cells (RBL-WT) and the stable transfectant of a human CD69 protein (RBL-CD69) were both cultured in DMEM supplemented with 5% foetal calf serum (FCS).

- Immunization

The HuMAb[®] mice were immunized with RBL-CD69 cells. The animals received a primary injection with 10^7 cells emulsified with Complete Freund's Adjuvant and 2–3 weeks later, a secondary injection was performed using the same dose of cells emulsified with Incomplete Freund's Adjuvant (IFA). Sera from immunized mice were obtained and monitored for the presence of specific antibody using ELISA as described below. Two weeks after the second immunization, an i.v. (intra venous) boost with $2 \cdot 10^6$ RBL-CD69 cells in PBS was administered, and 3 days later animals were sacrificed and their spleens were removed.

Cell fusion

The spleens were teased to isolate splenocytes, which were washed and used for fusion (Köhler and Milstein, 1975) with NSO mouse myeloma cells. Fused cells were suspended in DMEM supplemented with 20% FCS plus hypoxanthine–aminopterin–thymidine (HAT) and plated in 24-well plates at different cell concentrations.

Screening

Supernatants of hybridomas from 24-well plates were first screened for human anti-RBL-CD69 IgM secretion. Clones from positive wells were transferred and plated in 96-well plates. Supernatants from individual hybridomas were tested by ELISA for the secretion of Hu-IgM, and the positive wells were tested further by flow cytometry using RBL-CD69 and RBL-WT cells. Those hybridomas that were positive for RBL-CD69 but negative for RBL-WT cells were then subcloned by limited dilution at least three times.

Source : Journal of Immunological Methods 282 (2003) 147– 158

The use of transgenic mice for the production of a human monoclonal antibody specific for human CD69 antigen

Document 6: Comparaison des systèmes de production d'anticorps en cellules de mammifères

Les anticorps thérapeutiques sont principalement produits par 2 types de lignées cellulaires de mammifère, la lignée NS0 (cellules de myélome de souris) et la lignée CHO (cellules d'ovaire de hamster chinois).

Les cellules NS0 sont des cellules de myélome non sécrétrices d'anticorps et produisant un acide sialique non synthétisé par les cellules humaines, l'acide N-glycolylneuraminique. Cet acide sialique, ajouté aux protéines lors de l'étape de glycosylation est supposé augmenter leur immunogénicité pour l'homme. Cette potentielle immunogénicité a conduit à limiter l'utilisation de cette lignée dans le cadre de la production de protéines thérapeutiques.

Les cellules CHO sont préférées pour la production de protéines thérapeutiques dans 70% des cas. Le contrôle de la glycosylation des anticorps lors de la production en CHO a été particulièrement évalué, en effet elle influence la clairance et l'activité biologique des anticorps injectés. De plus les cellules CHO, bien qu'initialement adhérentes, peuvent se multiplier indéfiniment et en suspension dans un milieu sans sérum. Après une vingtaine d'années de travail intense visant à l'optimisation de la lignée, des milieux de culture et des conditions de culture en bioréacteur, une productivité très élevée de 20 pg de protéines produites par jour et par cellule est aisément atteinte en routine, dans un système de fed-batch autorisant des densité cellulaires pouvant atteindre $20 \cdot 10^6$ cellules /mL de milieu de culture.

Source: *mAbs* 2:5, 466-477; September/October 2010; © 2010 Landes Bioscience

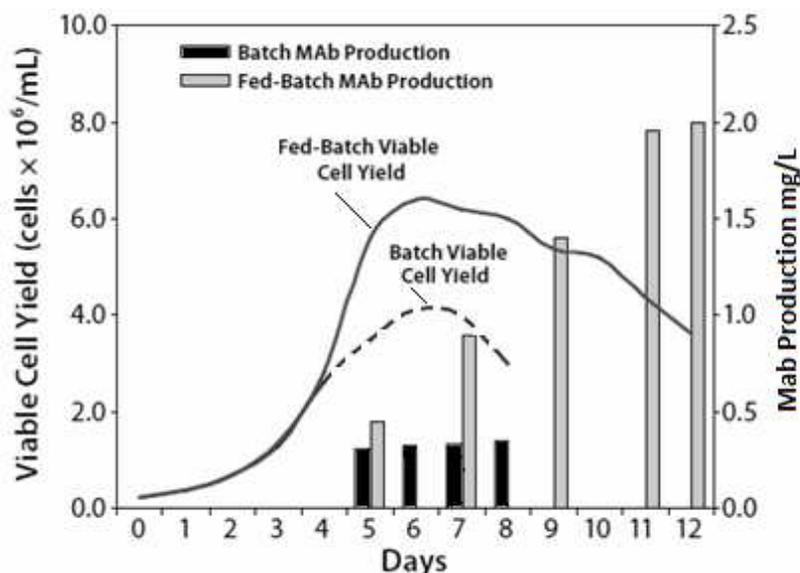
Document 7: Conditions de culture pour la production industrielle d'anticorps monoclonaux en bioréacteur

On se propose de comparer les conditions de culture de CHO recombinées en milieu sans sérum en batch et en fed batch vis-à-vis de la croissance cellulaire et de la production d'anticorps.

7A: Conditions de culture en fed-batch

Fed-batch cultures were carried out in a 5-litre-working-volume bioreactor (B. Braun Biotech, Mesungen, Germany). The concentrations of concentrated glucose and glutamine feeding solution were 200 mM and 90 mM respectively. Amino acids were fed according to their stoichiometric consumption ratio to glutamine in a 'cocktail' that included seven quickly consumed amino acids (lysine, threonine, valine, leucine, isoleucine, phenylalanine and methionine). Sparger aeration was employed using air or pure oxygen, depending on the oxygen demand of the cultures. The dissolved oxygen concentration was set at 60% of air saturation. The agitation rate was 40 rev./min, and the temperature was controlled at 37 °C. The pH was set at 7.2 and controlled through the addition of CO₂. The osmolarity was set at 295–320 mOsmol·kg⁻¹ at the beginning of culture.

7B: Résultats

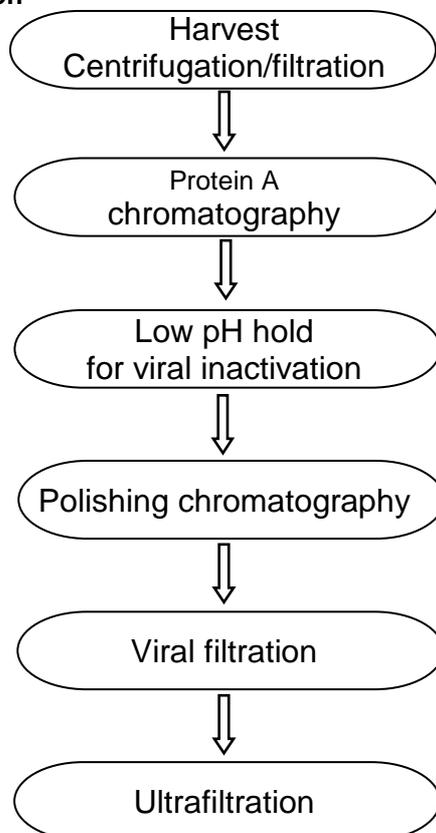


Source: *Process Supplements for Optimized Fed-Batch Culture Systems*; Brandon Pence; *BioProcess International*, Vol. 6, No. 7, July–August 2008, p. 26

Document 8: Procédé de purification d'un anticorps monoclonal à partir de surnageant de culture des cellules CHO en bioréacteur

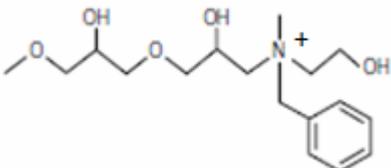
La purification des anticorps monoclonaux dans le surnageant de culture repose sur une succession d'étapes (document 10A) impliquant deux chromatographies détaillées dans le document 10B ; les résultats des contrôles qualité sont donnés dans le document 10C.

8A : Différentes étapes de purification



8B : Etapes de chromatographie

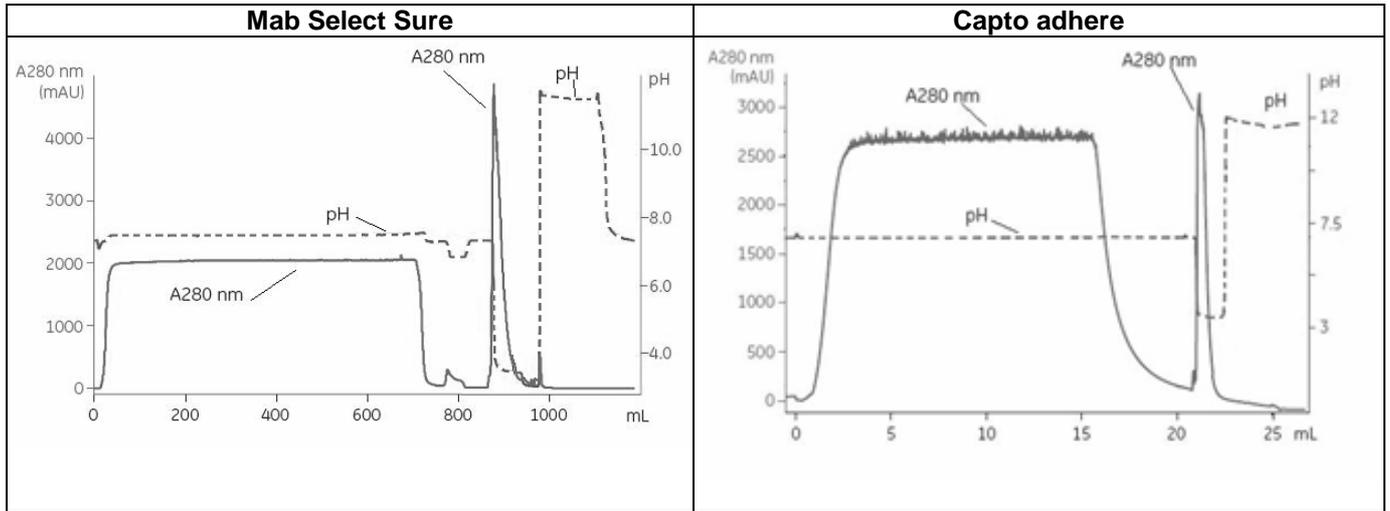
* Caractéristiques des supports chromatographiques utilisés.

step	Protein A chromatography	Polishing chromatography
	Mab Select Sure	Capto adhere
Matrix	Highly cross-linked agarose	Highly cross-linked agarose with dextran surface extended
Average particle size	85 µm	90µm
Ligand (Groupement greffé)	Recombinant protein A	

*Conduite de chromatographie:

	Mab Select Sure	Capto adhere
Sample	Clarified CHO supernatant	Mab Select Sure eluate after virus inactivation and filtration
Loading buffer	0,02 M sodium phosphate 0,15 M sodium chloride pH 7,4	0,025 M TRIS sodium chloride pH 7,5
Elution buffer	0,06 M sodium citrate pH 3,4	0,01 M acetic acid pH 3,0

* Profils d'élution:



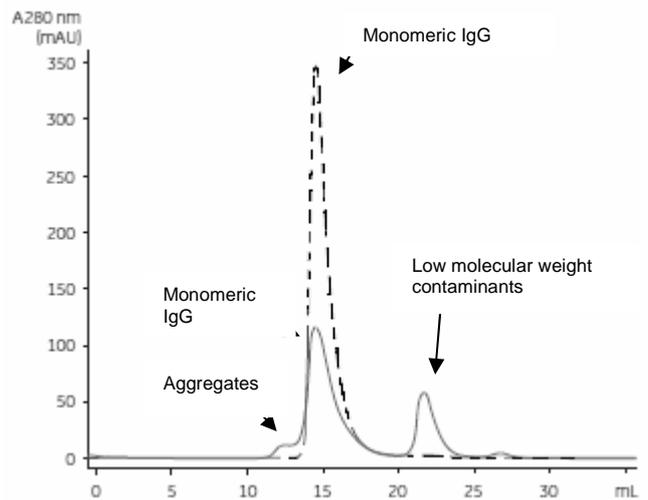
8C: Contrôle de qualité des anticorps monoclonaux humains purifiés

* Contaminants protéiques

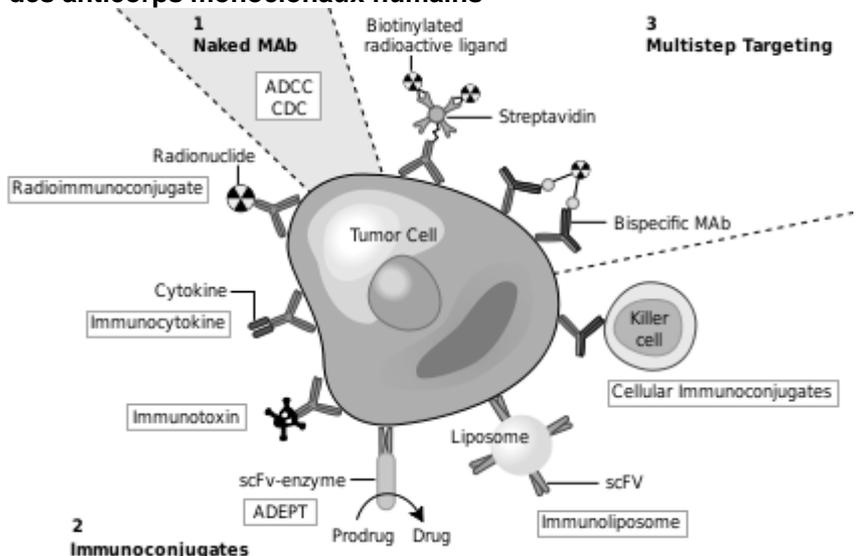
	Accumulated yied (%)	Dimers and aggregates (%)	Protein A (ng/mL)	Host Cell Protein (ng/mL)
Supernatant	100			95 000
MabSelect Sure	95	<0,7	<5	250
Capto adhere	90	<0,1	<5	20

* Contrôle par chromatographie d'exclusion diffusion des fractions non-retenues (- - -) et éluées (—) après étape captoadhere.

Source: application note GE Healthcare Life Sciences Two-step purification of monoclonal IgG1 from CHO cell culture supernatant



Document 9: Mécanisme d'action in vivo des anticorps monoclonaux humains



source : <http://www.answers.com/topic/monoclonal-antibody>