

Les biotechnologies : la part industrielle

Une approche

par Gérard Coutouly

Depuis les années 50, le domaine de la biologie a beaucoup évolué. Grâce à la mise au point et à l'utilisation systématique de techniques comme la chromatographie, l'électrophorèse et les méthodes optiques, l'approche physico-chimique – le réductionnisme – s'est avérée particulièrement féconde. Ainsi a-t-on assisté à une explosion de connaissances concernant la structure et le fonctionnement de la cellule¹, et du matériel biologique (enzymes, en particulier). Ainsi, il a été possible de justifier, d'expliquer, puis de rationaliser et donc d'améliorer des pratiques anciennes.

De plus, après 1973, année qui marque les débuts du génie génétique, il est devenu possible de (re)programmer le génome des cellules, c'est à dire de créer ce qui sera appelé des *organismes génétiquement modifiés (OGM)*. De tels organismes sont maintenant capables d'exprimer n'importe quelle séquence d'ADN

De ce fait, ont été mises au point de nouvelles voies d'obtention de substances jusque là extraites de matériel biologique (insuline, hormone de croissance, interféron, interleukine ou autres). Les souhaits exprimés par certains, dans les années 20, de voir se mettre en place une biotechnologie, c'est à dire un mode de production plus efficace et fonctionnant dans des conditions plus douces, c'est à dire plus économes en énergie et moins polluantes que la production industrielle traditionnelle, peuvent alors être sérieusement envisagés comme réalité industrielle, économique et sociale.

Sous le vocable de "biotechnologie" sont rassemblées des techniques spécifiques "informées" par les progrès de la microbiologie, de la biochimie, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la génétique, du génie chimique, de l'informatique... Celles-ci ont en commun le fait qu'elles sont partie prenante dans un "*procédé biotechnologique*", c'est à dire la production à grande échelle d'un "*produit d'intérêt*" qui est susceptible d'être commercialisé. Ceci amène plusieurs remarques.

D'abord, les produits issus des biotechnologies, sont, par définition, destinés à faire l'objet d'une très large diffusion : tous les principaux produits qui concernent notre alimentation, santé, environnement... sont ou seront peu ou prou des « produits d'intérêt », c'est à dire issus des biotechnologies. C'est dire leur *impact sur la société*, à la fois sur son *fonctionnement* et sur son *évolution*.

D'autre part, qui dit "production à grande échelle" implique la prise en compte de la triade : *recherche, développement et production*.

Ensuite, avec le génie génétique apparu en 1973 et la création d'OGM, il faut prendre conscience du caractère radicalement nouveau de la technique. La nouveauté ne réside pas dans le fait de modifier la matière vivante : celle ci, par la sélection et l'hybridation des

¹ L'intuition de **Linus Pauling** (1901-1994), concernant les mécanismes ultimes de la vie, s'est révélée prophétique : tous les phénomènes biologiques sont liés à la création / destruction d'interactions spécifiques de faible énergie entre (macro)molécules ; ces nombreuses interactions, le plus souvent imperceptibles, peuvent aboutir à la création de liaisons covalentes, à l'origine des réactions biochimiques observées au niveau macroscopique.

espèces était déjà réalisée par l'homme ; la nouveauté réside dans la vitesse à laquelle cette modification est maintenant possible : ce qui pouvait demander quelques centaines ou milliers d'années est maintenant possible en quelques années. Ce pouvoir de transformation du vivant, donc de la nature, par la technoscience ne paraît pas avoir de limites. Ceci n'est pas sans faire réagir un certain nombre de nos contemporains. Il faut également noter l'absence de recul que nous avons pour apprécier les impacts réels de ces nouvelles techniques industrielles, en particulier sur la nature et sur l'homme.

Enfin, la mise en oeuvre de ces techniques impose des moyens matériels importants tant au niveau de la recherche que du développement et de la production industrielle : ces *biotechnologies* sont *largement dépendantes de l'économie*, c'est à dire qu'elles sont entre les mains de sociétés multinationales, seules capables d'assumer un investissement important, mais qui se doivent d'avoir des activités rentables. Cette notion de rentabilité est fondamentale dans notre monde capitaliste : elle est la condition *sine qua non* de toute activité biotechnologique à l'échelle industrielle : innombrables sont les projets qui, faute de rentabilité, ne seront jamais réalisés.

Ainsi, si s'interroger sur les biotechnologies renvoie à une interrogation sur un "**procédé biotechnologique**", c'est à dire sur une production à grande échelle, cela ne fait pas oublier l'importance prise ces dernières années par le développement des techniques. Toute formation en biotechnologie, principalement celle d'opérateurs ou de techniciens, qui nous occupera essentiellement ici, suppose l'apprentissage de la maîtrise de gestes techniques plus ou moins complexes. Cette maîtrise ne saurait être complète sans que soient assimilées les connaissances théoriques qui transforment toute technique en technologie ainsi qu'une idée des diverses implications économiques, sociales, éthiques et écologiques liées à leur mise en oeuvre, d'où la difficulté d'assurer une formation réellement adaptée. Selon la précision de la connexion entre aspects théoriques et pratiques, la formation relèvera de l'enseignement dit "technologique" ou de l'enseignement dit "professionnel". L'enseignement dit "général" ne s'occupe, lui, essentiellement que d'aspects théoriques.

Nombreux sont les sites Internet consacrés aux "biotechnologies". Ces sites sont surtout des sites pédagogiques, des sites d'entreprises industrielles, des sites d'opposants aux biotechnologies, en particulier au génie génétique. Les biotechnologies sont réduites à des aspects conceptuels, à savoir l'utilisation des "découvertes" de la biologie. Ainsi passe-t-on, par un tour de "passe-passe", de travaux de laboratoire à l'anticipation de la disponibilité du produit (du traitement) d'intérêt pour tout un chacun... Rares sont les informations et les sites qui présentent l'aspect "mise à disposition en grande quantité", à savoir l'aspect industriel. C'est pourtant sur cet aspect industriel que nous avons choisi d'insister dans la mesure où c'est la prise en compte de cet aspect qui fait la spécificité des formations technologiques.

Ainsi seront proposés dans les pages qui suivent des éléments d'information permettant aux enseignants de STL BGB² et de SMS de prendre conscience des dimensions pluridisciplinaires des biotechnologies. Ces enseignants seront alors encore plus à même d'assurer un enseignement proche de la "vraie vie". Les professeurs de l'enseignement général trouveront des éléments pour prendre conscience de certains aspects concrets de cette biologie du XXIème siècle qui commence.

² Enseignant, entre autres, en classes préparant au baccalauréat technologique Sciences et Techniques de Laboratoire (STL), option Biochimie génie Biologique (BGB) ou Sciences Médico Sociales (SMS) ; professeurs LC 7100 Biotechnologies, option A - Biochimie – Génie biologique (BGB), titulaires du CAPET ou de l'Agrégation

Les informations qui suivent ne prétendent pas donner une vision complète et homogène des biotechnologies dans leur généralité, mais seulement être une introduction aux biotechnologies envisagées comme type particulier et nouveau procédé d'obtention de biens et de services, c'est à dire de procédé industriel. Il s'agit de fournir une information de base au lecteur, celle-ci étant susceptible d'être utilisée en cours, ou tout au moins d'en constituer la trame. On souhaite alors inciter le lecteur à approfondir les aspects seulement effleurés. Pour ce faire sont présentés des considérations générales et quelques exemples concrets de production mettant en jeu les biotechnologies situés dans leur contexte. Figurent ensuite quelques indications bibliographiques ainsi que des propositions d'activités pédagogiques.

Le fait que certains développements soient relativement détaillés amène à deux remarques :

- le texte proposé s'est voulu à jour au moment de sa rédaction (novembre 2002), compte tenu des sources disponibles ; il conviendra d'actualiser ces données, c'est à dire de consulter régulièrement la presse - quotidienne ou spécialisée, via par exemple des sites Internet ; cela est particulièrement valable pour la chronologie des événements marquants de l'actualité des biotechnologies,

- les informations techniques concernant les procédés biotechnologiques actuels (telle l'obtention du **Quorn**[®], des **HFCS**, des **tPA**... tels qu'ils sont abordés dans les pages qui suivent et dans les fichiers annexes) sont certes accessibles en allant consulter les brevets, mais il s'agit d'informations onéreuses à obtenir et techniquement complexes, donc peu accessibles et, finalement, hors de notre propos. Les données économiques générales (état du marché à un moment donné, les quantités produites, rentabilité escomptée...), les options technologiques prises ainsi que le détail de l'utilisation du brevet et les modifications apportées relèvent de la confidentialité et sont donc inaccessibles de même que le coût de revient réel.

Les seuls éléments accessibles sont des synthèses très générales publiées dans des journaux de syndicats professionnels à diffusion restreinte ou bien ceux publiés a posteriori par des scientifiques faisant œuvre d'historiens. Il s'agit alors de la description de procédés passés, c'est-à-dire techniquement dépassés, pour lesquels il n'y a plus d'enjeu économique. De tels témoignages servent de source à une littérature secondaire, sorte de synthèse souvent pluridisciplinaire ("étude de cas") centrée sur un produit ou une production donnée. C'est ce type de documents dont on s'est largement servi dans ce qui suit. Faute d'information, l'actualité concernant les procédés présentés ne peut donc être que relative mais il s'agit néanmoins de données susceptibles de retenir notre intérêt ainsi que celui de nos élèves ou étudiants.

1. Les biotechnologies : définitions

Bien évidemment, nombreuses sont les définitions qui sont données (et qui ont été données) des biotechnologies. Nous nous limiterons ici aux définitions modernes, schématiquement à celles qui correspondent aux biotechnologies depuis le début du XX^e siècle.

Le terme "biotechnologie" a été imaginé en 1913 par un ingénieur agricole hongrois, **Karl Ereky**, qui voulait transformer son pays natal, la Hongrie, en riche contrée exportatrice de produits agricoles à l'image du Danemark¹. Un des éléments de cette transformation était, selon lui, l'avènement d'un nouveau mode de production, un âge non plus basé sur le travail du fer, mais sur la biochimie et sur les transformations des diverses matières premières qu'elle permet. Cette idée restera très présente dans la vision allemande traditionnelle des biotechnologies.

Cette première définition amène à une remarque préliminaire : chacune de ces définitions, comme tout acte de nomination, renvoie à un contexte scientifique, institutionnel, politique, économique ou éthique particulier. Il est important de situer cet acte dans son contexte. Celui-ci nous permettra de justifier le caractère plus ou moins restrictif des diverses définitions des biotechnologies.

1.1. "Mise en œuvre de matériel biologique pour une production de biens et de services"

Cette définition a été donnée par l'*OCDE* au milieu des années 1980. Il s'agit de la période des premiers succès du génie génétique et de la prise de conscience des possibilités nouvelles offertes par cette nouvelle possibilité d'obtention de protéines jusque là obtenue par voie extractive. C'est le moment de la prise de conscience par les penseurs de l'économie mondiale de l'émergence d'un nouveau domaine.

Il s'agit d'une définition générale prospective, centrée sur l'économie, proposée par une organisation internationale qui cherche à faire à la fois une synthèse de l'existant et à anticiper. Cette définition inclut tant des procédés nouveaux que l'amélioration de procédés existants

Par production de biens, on entend la production de "choses" commercialisables, en fait de produits tels que médicaments, aliments et additifs alimentaires, produits d'usage courant...

1.2. "Utilisation des techniques de l'ADN recombinant"

Cette définition est une définition qui est d'origine américaine. Elle est issue des espoirs suscités par le clonage de l'insuline, de l'hormone de croissance, de l'interleukine et a présidé, à la fin des années 1970 et au début des années 1980 à la création aux USA de nombreuses start up, parmi celles-ci des sociétés comme Genentec.

¹ **Bud**, pages 33 – 34

Cela met l'accent sur l'ADN et sur l'importance des techniques de transformation et d'amplification de cet ADN au sein de systèmes cellulaires procaryotes ou eucaryotes. Les autres aspects (cultures cellulaires, fermentation, développement et production industrielle) sont considérés, de fait, comme ne relevant pas de cette radicale nouveauté technique, c'est-à-dire comme secondaires. Témoins de cette évolution américaine, à savoir de cet accent mis sur l'ADN recombinant, la transformation de la revue "généraliste"² *Bio/Technology* en *Nature Biotechnology*, revue primaire de recherche maintenant centrée sur le génie génétique et ses applications et la définition donnée sur le site :

<http://www.library.ucsf.edu/sc/bio/principles.html>

On pourra également consulter le livre d'Arthur Kornberg *The Golden Helix*.

1.3. "Utilisation des techniques de fermentation et dérivées"

Cette définition est une définition d'origine allemande, c'est-à-dire européenne. Elle est dans la tradition de l'industrie chimique de ce pays et de l'Europe centrale.

Cette définition dérive d'une idée ancienne, qui est celle d'un type de production par une technologie différente de celle utilisée jusqu'à maintenant, à savoir plus propre et moins coûteuse en énergie. Il s'agit d'un vieux rêve émis par des industriels visionnaires dans les années 20 (Ereky).

1.4. "Utilisation contrôlée à grande échelle de matériel biologique éventuellement génétiquement modifié"

Cette définition, utilisée dans un contexte, par exemple, pédagogique, précise les divers éléments de ce que l'on peut actuellement appeler biotechnologie :

- l'utilisation de matériel biologique comme catalyseur, c'est-à-dire, pour employer le vocabulaire chimique, comme agent facilitant la transformation de substrats en produits ;
- une production à grande échelle, c'est-à-dire l'obtention de produits obtenus en grande quantité qui seront, dans notre société marchande, commercialisés ; cette production regroupant celle de produits nouveaux (tPA, interleukine, interféron) ou bien l'amélioration de celle de produits déjà obtenus par d'autres moyens ;
- le contrôle de cette transformation, c'est-à-dire son suivi quantitatif afin de pouvoir intervenir sur le procédé en cas de besoin ; il s'agit là, contrairement à ce qui pouvait se pratiquer antérieurement, d'un processus maîtrisé ;
- la modification génétique du matériel biologique utilisé, ceci afin d'en améliorer les propriétés.

Compte tenu de nos objectifs et de notre situation institutionnelle de pédagogues, c'est cette définition qui nous semble plus intéressante et la plus fonctionnelle. *C'est elle qui nous servira de guide dans ce qui suit.*

1.5. "Génomique et protéomique"

Avec la possibilité du séquençage, puis avec son développement, les succès rencontrés et les ouvertures que la connaissance du génome promet, une nouvelle acception vient

² dans la mesure où elle publiait des articles concernant la fermentation (génie fermentaire)

d'apparaître aux USA - leader en cette matière -, centrée sur l'étude du génome, de celle des protéines exprimées dans une cellule à un stade déterminé et celles des ORF³.

Il s'agit d'un champ de recherche qui est en amont de tous ceux envisagés précédemment. C'est à partir des résultats obtenus (d'abord, identification d'une séquence d'ADN donnée, ensuite "amélioration" de cette séquence) que pourra se mettre en route le processus figurant dans la définition 4.

En conclusion, on voit que, pour ne prendre que les dernières décennies, plusieurs acceptions du terme "biotechnologie" ont émergé. Ces diverses acceptions sont liées, entre autres, aux traditions industrielles et aux développements des connaissances (et surtout, en amont, à celui des techniques) mais, on peut penser que ce sont maintenant les perspectives économiques qui ont un poids de plus en plus important avec cette définition donnant les biotechnologies comme "la manière de faire de l'argent avec la biologie".

Ainsi, après avoir reconnu les possibilités ouvertes par la mise en culture de cellules recombinantes, les perspectives ouvertes par le séquençage des génomes est en train de faire émerger, à travers la génomique et les disciplines connexes, une acception nouvelle qui se situe en amont des précédentes.

Dans la mesure où la génomique en est encore à ses balbutiements, la définition que nous retiendrons fait la synthèse des divers aspects maintenant classiques : *"utilisation contrôlée à grande échelle de matériel biologique éventuellement génétiquement modifié"*.

³ Open Reading Frames : cadres ouverts de lecture

2. Le développement des biotechnologies : quelques repères historiques

Même si le terme a été fondé en 1913 par **Ereky**, les biotechnologies prises dans le sens de l'utilisation de la matière vivante pour la production de biens et de services, ne datent pas de cette époque.

Hormis la dimension de "contrôle" qui est récente, les biotechnologies sont beaucoup plus anciennes et datent des débuts de l'humanité avec la fabrication du pain, des fromages et de boissons alcoolisées. Il s'agit là d'une période où sont nées ce qui peut être appelé les **proto-biotechnologies**, à savoir une utilisation purement empirique (et initialement magique) de ce que nous savons maintenant être les micro-organismes. Cette période aura duré jusqu'au milieu du XIXe siècle.

Lui fait suite une **période intermédiaire**, celle de **Pasteur** et de ses successeurs, où sont reconnus et étudiés les micro-organismes. Une discipline nouvelle se développe : la microbiologie avec sa composante que l'on peut commencer à qualifier d'« industrielle ».

Enfin, avec la seconde guerre mondiale, et surtout après elle, se met en place une production plus systématisée, sous tendue par des avancées majeures dans le domaine des connaissances scientifiques (biochimie des protéines, enzymologie, voies métaboliques, biologie moléculaire, génie génétique...) et de la technologie (aération des fermenteurs, régulation, modélisation) ; ainsi en arrive-t-on aux **biotechnologies modernes**.

Le nombre de faits cités et le développement seront relativement limités en ce qui concerne les deux premières périodes. Les biotechnologies modernes feront l'objet d'un repérage chronologique un peu plus conséquent, quoique incomplet.

Deux remarques préliminaires :

1. Si la plupart des éléments cités ci-après concernent donc essentiellement les biotechnologies envisagées sous l'angle industriel, certains d'entre eux renvoient à l'histoire des diverses disciplines à la base des biotechnologies : la biochimie, la biologie moléculaire, la biologie cellulaire.

2. Il ne saurait être question d'aborder ici tous les aspects des biotechnologies : seuls sont présentés ici, volontairement ou involontairement, certains aspects, principalement ceux en rapport avec leurs développements ultérieurs : *la chronologie présentée ici est donc partielle et partielle...* Elle sera, dans la mesure du possible, corrigée, précisée, complétée et mise à jour...

2.1. Proto-biotechnologies

Caractéristique générale : aucune connaissance théorique (au sens moderne du terme) - pratique uniquement empirique

Période

Date

Description

Intérêt biotechnologique

Référence bibliographique

Antiquité

Débuts de la culture des céréales (blé) au Proche Orient

Débuts de la fabrication du pain, de la bière, du fromage, du yoghourt et du vin (usage familial)

Utilisation par les Égyptiens de levures pour la fabrication du pain ; intérêt pratique : conservation des aliments

Début de la sélection des espèces animales et végétales

Sélection des espèces les plus performantes (goût , croissance , quantités produites...)

Moyen âge

v. 1300

Les Aztèques récoltent des algues dans les lacs près de Mexico.

Utilisation comme nourriture

v. 1400

Distillation de l'alcool par les alchimistes en Occident

XVI^{ème} siècle

Corporations d'artisans

Aspect artisanal : existence d'un savoir faire empirique pur la fabrication de la bière, pain...); transmis de génération en génération au sein de corporations socialement organisées et gardiennes de leur savoir empirique

XVII^{ème} siècle

Culture des champignons de couche en France

XVIII^{ème} siècle

Développement de la pharmacie et de la préparation de composés chimiques plus ou moins purs accessibles aux « savants » de l'époque

Découverte d'un grand nombre de corps chimiques dont certains noms persistent (sel de Seignette, par exemple) ; préparation artisanale par les pharmaciens

Isolement et dosage du sucre de betterave par **Margraff** (Allemagne publié en 1747) ; son élève **Charles Frédéric Achard** réalise, en Silésie, une installation industrielle ; sucre plus roux que le sucre de canne et prix de revient prohibitif

Réforme de la nomenclature chimique par **Guyton de Morveau** ; naissance de la chimie moderne (**Lavoisier** et son *Traité élémentaire de Chimie* de 1789) ; la fermentation alcoolique y est citée.

2.2. Période intermédiaire

Caractéristique générale : développement des connaissances théoriques - pas encore d'applications à grande échelle

XIX^{ème} siècle

Développement de la chimie avec les travaux de Gay-Lussac, Berthollet, Berzelius, Dumas

Étude qualitative et quantitative de la fermentation alcoolique par **Gay-Lussac** (1815) en complément des travaux de **Lavoisier**

Développement de l'obtention de lignées pures de céréales.

1809

Travaux de **Nicolas Appert** (1749 – 1841) (France)

Mise au point d'une technique utilisant la chaleur ("appertisation") permettant la conservation des aliments.

1811 – 1812

Premières lois concernant la production du sucre de betterave ; décision politique de Napoléon mise en œuvre par le Comte de **Chaptal** (1756 – 1832).

1835

Hydrolyse de l'amidon par l'extrait de malt et fondation du terme « catalyse » (travaux de **Berzelius** (Suède))

L'amidon peut être dégradé plus efficacement en utilisant un extrait de malt qu'en utilisant l'acide sulfurique.

1836

Nature biologique des fermentations - **Cagniard-Latour** (France), **Schwann** et **Kutzing** (Allemagne)

Payen et **Persoz** (France) isolent une "diastase" de blé.

Cette préparation convertit l'amidon gélatinisé en sucres.

Schwann (physiologiste allemand) isole de l'estomac ce qu'il nomme la pepsine

1822 -1895

Travaux de **Pasteur** : naissance et développement de la microbiologie

Asymétrie moléculaire 1846

Identification de microorganismes responsable des fermentations alcoolique, lactique, butyrique et acétique ; début d'une rationalisation (échelle laboratoire)

Pasteurisation inventée en 1863 : le chauffage du vin à une température donnée suffit à inactiver les microorganismes qui, sans cela transformeraient le vin en « vin aigre », sans en dénaturer le goût.

Autoclave

Vaccination contre le charbon et la rage

v. 1860

Débat **Pasteur -Liebig** sur la nature des fermentations :

Phénomène biologique ou physico-chimique ? La question sera résolue par les travaux de **Büchner**

1865

Travaux de Mendel : mise en évidence des lois de l'hérédité

Travaux publiés mais non connus de la communauté scientifique ; seront "redécouverts" en 1900

1868

Frederick Miescher, découvre la nucléine

1871

Découverte de l'invertase par **Hoppe Seyler**

1873 -1881

Travaux de Robert Koch (en collaboration avec Gram, Cohn et Weigart)

- Identification de microorganismes, comme ceux causant la maladie du charbon (l'"anthrax" des anglo-saxons) ;
- Mise au point de milieux de culture solides ; utilisation de tranches de pomme de terre, de gélatine et d'agar-agar ; cette dernière substance deviendra le support le plus utilisé des milieux de culture solides.
- Travail de rationalisation (suite) (échelle laboratoire)

1876

Kuhne propose le terme d'"**enzyme**" désignant les "ferments inorganisés", c'est-à-dire les ferments isolés des organismes qui les produisent.

1883

Publication d'une article par **Osborne Reynolds** proposant le **nombre de Reynolds**

Nombre de Reynolds Re : nombre adimensionnel caractérisant l'écoulement laminaire et turbulent par mise en relation les forces cinétiques (ou inertielles) avec la viscosité d'un fluide.

Méthode de **Kjeldahl**

Dosage des protéines mis au point au **Laboratoire Carlsberg** à Copenhague par **Johan Kjeldahl** (publié dans le Zeitschrift für analytische Chemie)

Kjeldahl J., 1883, Ztschr. anal. Chem., 22, 366, A new method for the determination of nitrogen in organic substances

Vickery H. B., 1946, Yale Jour. Biol. Med., 18, 473 – 516, The early years of the Kjeldahl method to determine nitrogen

Hansen met au point la production de cultures pures à usage industriel

Laboratoire Carlsberg à Copenhague ; utilisation dans le domaine industriel

Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie (Teil 1 1888 – Teil 2 1893) traduit en anglais sous le titre

Practical studies in fermentation being contributions to the life history of micro-organisms, London and New York, 1896

Commentaire :

Teich, Hist. Of Technology, 1983, Eight Annual Volume, Mansell Publishing Limited, London and New York, Fermentation Theory and Practice : The Beginnings of Pure Yeast Cultivation and English Brewing, 1883 – 1913,

1887

Avancée technique en microbiologie

Mise au point de la boîte de **Petri** par R.J. Petri.

Ouverture de l'Institut Pasteur à Paris

1888

Début de la formation en génie chimique en Angleterre (Manchester) et aux USA (MIT)

1894

Production du premier enzyme industriel : la takadiastase
Culture en surface ou semisolidé ; amylase fongique ; brevet pris en 1891

1897

Travaux de **Büchner** sur les levures et obtention du "jus de levure" contenant la "zymase"

Büchner E. V., 1897, Ber. chem. Ges., 30, Alkoholische Gärung ohne Hefezellen (Vorläufige Mitteilung, 117 - 124

Büchner E. V. and Meisenheimer J., 1904, Ber. chem. Ges., 37, Die chemische Vorgänge bei der alkoholischen Gärung, 417 - 428

Commentaires historiques

Koehler, R. E., 1973, Isis, 64, 181 – 196, The enzyme theory and the origin of Biochemistry

Koehler, R. E., 1971, J. Hist. Biol., 4, 35 – 61, The Background to Eduard Buchner's

Discovery of Cell-free Fermentation

Koehler, R. E., 1973, J. Hist. Biol., 5, 327 – 353, The Reception of Eduard Buchner's

Discovery of Cell-free Fermentation

1899

Bayer commercialise l'aspirine

XX^{ème} siècle

Enzymes : suite aux travaux de Büchner, beaucoup de travaux sur la zymase
Développement de la notion d'enzyme (zymase) et de coenzyme

1900

Redécouverte des travaux de **Mendel** (indépendamment, **Hugo DeVries**, **Erich von Tschermak** et **Carl Correns**)

1903

Travaux de **Victor Henri** (Paris)
Existence d'un complexe enzyme substrat

1907

Début des travaux de génétique de **Morgan** (USA)

1908 - 1913

Novo développe **Oropon**, mélange d'enzymes pancréatiques pour le traitement du cuir

Ce produit remplace, pour le battage des peaux, les préparations à base d'excréments d'animaux ; les préparations utiliseront ensuite des enzymes bactériens et fongiques

1909

Le terme de "gène" est créé par **Wilhelm Johannsen**, biologiste danois ; distinction entre génotype et phénotype

1912

Invention du terme "**vitamine**" et découverte des vitamines ; les années suivantes, création des entreprises pharmaceutiques

Découverte de la technique d'obtention des hybrides artificiels

1913

La Standart Oil Co (Indiana, USA) commence le crackage thermique du pétrole à Burton Stills

Mise en pratique du génie chimique ; à mettre en relation avec la production en série de la Ford T par Henri Ford

Otto Röhm fait breveter une préparation enzymatique pour la lessive

Sa compagnie donne le nom de "**Burnus**" à cette préparation. Sa commercialisation durera pendant 50 ans.

Travaux de **Leonor Michaelis** (Allemagne) et de **Maud Lenora Menten** (Canada)

Équation de Michaelis et Menten.

Réaction de **Maillard** (1878 – 1936) (France)

Réaction entre les sucres et les protéines (groupements aldéhyde et amine) à chaud : coloration brune ; important dans les industries alimentaires.

1915

Concept d'opérations unitaires mis en place par Arthur Little

Première guerre mondiale

Procédé **Weizmann** (fermentation acétono –butanolique) durant la première guerre mondiale

Obtention par fermentation anaérobie de sucres d'acétone – butanol en Angleterre ; permet l'obtention de solvants organiques permettant de préparer des explosifs (dynamite) ; réalisé par **Chaim Weizmann** (1874 – 1952), scientifique juif qui sera le premier Président de l'État d'Israël.

Entre deux guerres**1921**

Découverte de l'**insuline** : **Banting et Best** (Canada)

Les années suivantes, début de la production d'insuline (méthode extractive) par des entreprises pharmaceutiques créées à cette intention

Mise en évidence de l'hormone de croissance (« Growth hormon » - GH)

Evans, H. M., Long J. A., 1921, Anat. Rec., 21, 62

1925 -1930

Travaux de **Svedberg** (Suède) sur l'**ultracentrifugation**

Protéines comme systèmes monodisperses ; détermination des constantes de sédimentation de protéines.

1926

Les enzymes sont des protéines (**James Batcheller Sumner** – USA)

Cristallisation de l'**uréase**

Sumner, J. B., 1926, J. Biol. Chem., 69, 435

Travaux de Linderstrom-Lang sur l'ionisation des acides aminés / protéines

1930

Reconnaissance de l'importance de la thermodynamique en génie chimique : transfert de chaleur, transfert de moment, analyse systématique des réacteurs chimiques, travaux de **Damkoehler** en Allemagne

Existence d'une production par fermentation industrielle de bière, spiritueux, acétone-butanol, acide acétique, acide citrique, acide lactique, alcools, levures,

1935

Obtention d'ADN pur

1937Mise au point de l'électrophorèse en veine liquide (**Arne Tiselius**)

Cette électrophorèse de frontière, difficile à mettre en œuvre, sera abandonnée dans les années 60 et sera remplacée par les électrophorèses de zone sur papier, acétate de cellulose, agarose et polyacrylamide (PAGE et SDS-PAGE). Techniques fondamentales pour l'analyse des protéines et des acides nucléiques.

1939

Première culture de cals de carottes

2.3. Biotechnologies modernes

Caractéristique générale : accumulation de connaissances théoriques (biochimie, biologie cellulaire et moléculaire, ...), applications industrielles sous contrôle, apparition et développement du génie génétique

1940 – 1945 : seconde guerre mondiale

Pénicilline : la reconnaissance de son rôle antibiotique ((**Florey, Chain, Heatley**) Oxford - GB) et sa production industrielle (USA)

Mise en évidence du rôle thérapeutique et production à grande échelle du premier antibiotique dans le contexte de la seconde guerre mondiale ; résolution de nombreux problèmes technologiques ; pour certains, le début des biotechnologies, au sens moderne.

The History of Penicillin Production, 1970, American Institut of Chemical Engineering, Symposium serie 100, New York

L'OPERON, N°3, XXII, 1997, 2 – 10 et L'OPERON, N°4, XXII, 1997, 3 - 13

1941Expérience de **Beadle et Tatum** sur *Neurospora crassa*

Hypothèse "Un gène – un enzyme"

1944"What is Life ?" par **Erwin Schroedinger**

Livre ayant la réputation d'avoir inspiré les fondateurs de la "biologie moléculaire" des années 1960.

Expérience de **Avery O. T., MacLeod C. M., Mac Carthy**

L'ADN est bien le support de l'information génétique

Avery O. T., MacLeod C. M., Mac Carthy M., 1944, Studies on the chemical transformations of pneumococcal types, J. Exp. Med., 79, 137 - 158

1953Structure de l'ADN en double hélice (**James Watson – Francis Crick**)

Proposition de la structure de l'ADN comme deux hélices antiparallèles ; cette structure sera confirmée.

Watson J. D., Crick F. H. C., 1953, Nature, 171, 737 – 738, Molecular structure of nucleic acids, A structure for desoxyribose nucleic acid, 8

Définition des virus par **André Lwoff****1955**

Détermination de la structure primaire de l'insuline, puis de nombreuses autres protéines

Les protéines sont bien des enchaînements d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques (confirmation de l'hypothèse de Hofmeister – Fischer)

Ryle, A. P., **Sanger, F.**, Smith, L. F., and Kitai, R., 1955, *Biochem. J.*, **60**, 541

1958

Première méthode d'extraction – purification de l'hormone de croissance humaine (hGH) due à **Maurice Raben** (Université Médicale de Boston)

Conservation des hypophyses dans l'acétone ; extraction par un tampon acétate ; "purification par dialyse" (?); sera ensuite modifiée, mais utilisée jusqu'en 1977 ; rendement et pureté faibles : injection de 50 mg de produit.

1961

Publication des travaux sur "l'opéron lactose" (**François Jacob et Jacques Monod**)

Travaux de l'École française de biologie moléculaire ; Institut Pasteur ; prix Nobel en 1965 pour Jacob, Monod et Lwoff .

1963

Commercialisation de l'**Alcalase**[®], enzyme industriel de *Novo*, dans un détergent
Méthode suédoise d'extraction – purification de hGH : **Dr Roos** (Suède)

Hypophyses congelées et lyophilisées ; "filtrées sur des gels censés retenir des virus et les bactéries" ; donnera naissance à la "*méthode LOWRY*" utilisée en Grande Bretagne (1959 (recherche) – 1977)

1964

Déchiffrage du code génétique

Lien entre un triplet de bases et un acide aminé

Nirenberg, Marshall, W., Matthaei, H., 1961, The Dependence and Stabilization of DNAase Sensitive Protein Synthesis in E. coli Extracts, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 47, 1588 – 1602. ;

Khorona, H., G., 1968, Polynucleotide Synthesis and the Genetic Code, Harvey Lectures 1966 – 1967, série 62, Academic Press, New york, 79 – 105

Début des recherches concernant un protéine alimentaire d'origine microbienne (projet **Quorn**[®])

1965

Structure tridimensionnelle du lysozyme

Détermination de la première structure tridimensionnelle d'une protéine enzymatique : mise en évidence des interactions intermoléculaires enzyme substrat

Référence : *Blake, Koenig, Mair, North, Phillips, D., C., Sarma, 1965, Nature, 206, 757 – 763, Structure of the egg-white lysozyme : a three dimensional Fourier synthesis,*

Mise en évidence des enzymes de restriction

Arber, 1965, Ann. Rev. Microbiol., 19, Host-controlled modification of bacteriophage, 365

Premier isolement en 1968

Présence d'enzymes (en poudre) dans les lessives ; certaines personnes s'avèrent allergiques

Mise en évidence des ligases

1967

Projet **Quorn**[®] : sélection du microorganisme : *Fusarium graminearum*

1969

Projet **Quorn**[®] : travaux sur la flaveur et la texture

1972 -1974

Première molécule d'ADN recombinant

Paul Berg réalise la première molécule d'ADN recombinant.

Création des premiers OGM¹ (microorganismes - MGM²)

Travail de **Paul Berg** et son équipe (Stanford – Californie) : introduction d'un gène de virus de singe dans une bactérie en utilisant le phage lambda comme vecteur ; Premières expériences de génie génétique

Jackson David, Symons Robert H., Berg Paul, 1972, Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40 : Circular SV40 Molecules Containing lambda Phages Genes and the Galactose Operon of Escherichia coli, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 69, 2904 - 2909

Travaux des groupes de **Herbert Boyer** et de **Stanley Cohen** qui mettent en évidence des vecteurs différents de ceux dérivés du phage lambda : les plasmides ; expériences publiées en 1973 - 1974 montrant que la transcription d'ADN en ARN (de *Xenopus laevis*) était possible, ouvrant la voie à l'expression de l'ADN en protéines.

Morrow John F., Cohen Stanley N., Chang Annie C. Y., Boyer Herbert W., Goodmann Howard M., Helling B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 1974, 1743 - 1747

1973

Utilisation du BET pour visualiser les fragments d'ADN après électrophorèse

Commercialisation par **Novo** de **Teramyl**[®], α -amylase thermostable, pour l'industrie de l'amidon

Création de France – Hypophyse (1973-1986)

Extraction de hGH à l'Institut Pasteur, dans des locaux de l'Unité de Radioimmunologie (URIA) ; utilisation d'une méthode de Roos – Lowry modifiée

1975

Conférence d'Asilomar (23-27 février 1975)

Dangers des OGM³ (MGM⁴) mise au point de mesures de sécurité, dont la classification des manipulations ; celle ci sera reprise dans les divers pays et donnera lieu à l'élaboration de règles précises (NIH en janvier 1976, Rapport Williams en GB, Commission de la DGRST en 1975)

Berg, Paul, Baltimore, David, Brenner, Sidney, Roblin, Richard O., Singer, Maxime F., 1975, Asilomar Conference on Recombinant DNA molecules, Science, 188, 44 - 47

Premiers anticorps monoclonaux réalisés par **Kohler** et **Milstein**

Projet **Quorn**[®] : installation pilote

1976

Découverte des oncogènes (**Bishop** et **Varmus**)

Fondation (USA) de la société **Genentech, Inc** par Herbert Boyer et Robert Swanson

Première société de biotechnologie ; pour plus de détails voir également : <http://www.accessexcellence.org/AB/BC/1977-Present.html>

1977

Clonage de la somatostatine (**Itakura**)

Séquençage de l'ADN

Publication de deux techniques de séquençage de l'ADN : l'une chimique et l'autre enzymatique ; les techniques utilisées actuellement dérivent de la seconde.

Maxam, A. W., and Gilbert, W., 1977, A new method for sequencing DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560 - 564 ; Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 - 5467

1978 – 1980

¹ OGM = organisme génétiquement modifié

² MGM = micro organisme génétiquement modifié

³ OGM = organisme génétiquement modifié

⁴ MGM = micro organisme génétiquement modifié

Obtention des premiers OGM d'intérêt industriel (MGM) (société *Genentech, Inc*)
 Obtention de MGM synthétisant l'insuline (1979), l'hormone de croissance (1979) et l'interféron (1980)

travail de laboratoire ; production non optimisée

- *insuline* : *Villa Romanoff*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **275**, 1978, 3727 – 3731, *Goeddel Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1979, 106 - 110

- *hormone de croissance* : *Goeddel et al*, *Nature*, **281**, 1979, 544 – 548

- *interféron* : *Nagata, et coll*, *Nature*, **284**, 1980, 316 – 320 ; *Goeddel, et coll*, *Nature*, **287**, 1980, 411 -416

1980

Un brevet est susceptible d'être accordé à une bactérie dégradant le pétrole (USA)

Cas Diamond contre Chakrabarty

Introduction d'ADN étranger dans des cellules végétales

Début de la transgénèse végétale (utilisation du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*)

Van Montaignu, *Nature*, **287**, 1980, 654 - 656

1981

Commercialisation des premiers kits de diagnostics utilisant des anticorps monoclonaux

Première souris transgénique

Brinster, Brinster, Palmiter, *Cell*, **27**, 1981, 223 - 231

1982

Commercialisation de l'insuline humaine recombinante

Hypothèse du "prion" ("Proteinaceous infection particle") formulée par Stanley

Prusiner

Une protéine serait l'agent infectieux de maladies à "virus lents" comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob

1983

Première plante transgénique : tabac transgénique mis au point en Belgique

"Désarmement" du plasmide Ti

Zambryski, P. Et al, 1983, *EMBO J.* **2**, 2143 – 2150 ; *Fraley et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4803 – 4807

Marqueurs de sélection des plantes

Bevan M. et al, 1983, *Nature*, **304**, 184 - 187

Création du Comité consultatif national d'éthique en France

Invention de la PCR

1984

Séquençage du génome du virus du SIDA

Premiers décès aux USA de personnes ayant été traités avec hGH extractive

Interdiction de l'utilisation aux USA, Canada et Grande Bretagne (1985), suivi de la Belgique, l'Allemagne, la Finlande, le Nouvelle Zélande et les Pays Bas

Les interdictions dans d'autres pays seront encore plus tardives (les derniers pays étant Israël et Japon 1992).

1985

Empreintes génétiques découvertes par **Alec Jeffreys** (GB)

Développement de sondes multilocus RFLP

Gills P., Jeffreys A. J., & Werrett D. J., 1985, Nature, 318, Forensic application of DNA « fingerprints », 577 - 9

Les plantes génétiquement modifiées peuvent faire l'objet de brevets (USA)

Autorisation de mise sur le marché de hGH obtenue par la voie du génie génétique

Projet **Quorn®** : autorisation de mise sur le marché

1986

Premières autorisations, aux USA et en France, d'essais en champ d'OGM

Dissémination, aux USA, en plein champ de "Ice minus", bactérie assurant la protection contre le gel de plantes cultivées.

Commercialisation de l'hormone de croissance recombinante

Création, en France, de la Commission de génie biomoléculaire

Des porcs transgéniques sont obtenus aux USA .

Projet **Quorn®** : création de Marlow Foods ; introduction de la marque **Quorn®**

1987

Premières plantes transgéniques

Résistance aux insectes par utilisation de *Bacillus thuringiensis*

Vaецk, M. et al., 1987, Nature, 328: 33-37

Fischhoff, D. et al. 1987. Bio/Technology 5:807-813.

Résistance aux herbicides

De Block, M. et al., 1987, EMBO J., 6, 25, 13-2518 ; Shah, D. et al., 1986, Science, 233, 478-481.

Transformation du coton

Urnbeck, P. et al., 1987, Bio/Technology, 5, 263-266.

Canon à ADN (méthode biolistique d'introduction d'ADN dans une cellule)

Klein, T. et al., 1987, Nature, 327, 70-73.

1988

Première transformation du soja et du riz : travail à l'échelle laboratoire

Contrôle du mûrissement de la tomate

Technologie antisens chez les plantes

Van der Krol, A. et al., 1988, Nature, 333, 866-869.

Brevet (USA) accordé à «Oncomouse», souris transgénique commercialisée par

Dupont de Nemours pour l'étude du cancer

Début du programme de cartographie du génome humain

Création de HUGO (« Human Genome Organization »), agence publique de coordination du projet de séquençage du génome humain

Identification du gène de la myopathie de Duchenne

1989

Identification du gène de la mucoviscidose

Création de la société Genset

1990

Transformation du maïs

Gordon-Kamm, W. et al. 1990. The Plant Cell!, 2, 603-618.

Modification de la stérilité mâle

Directives européennes pour la dissémination délibérée et la commercialisation des

OGM

Premier essai en champ effectué par Calgene Inc. de coton génétiquement modifié pour résister à l'utilisation d'un herbicide (le Bromoxynil)
 Naissance du concept de « puces à ADN »
 Projet **Quorn**[®] : première commercialisation, sous forme de morceaux

1991

Projet **Quorn**[®] : première campagne publicitaire : diffusion régionale

1992

Transformation du blé

Vasil, V. et al., 1992, Bio/Technology, 10, 667-674.

Modification de la composition en glucides et du profil en acides gras

Premier vaccin transgénique commercialisé en Europe

400 essais d'OGM effectués en champ

Après le scandale du sang contaminé, celui de l'hormone de croissance

Article de J Y Nau dans LE MONDE : 6 Fev 92

Projet **Quorn**[®] : diffusion au Benelux

1993

Brevet US concernant les plantes génétiquement modifiées résistantes aux insectes

1994

USA
 Approbation de la commercialisation de tomates transgéniques **Flavr Savr**[®] aux

USA
 Approbation de la commercialisation de la **Nutropin**, hormone de croissance recombinante de Genentech.

1995

Détermination de la séquence de *Haemophilus influenzae*

Fleischman et al., 1995, Science, 269, 496-512.

Projet **Quorn**[®] : diffusion dans toute la Grande Bretagne après campagne publicitaire nationale

1996

Maïs transgéniques commercialisés aux USA

Détermination de la séquence de *Saccharomyces cerevisiae*

Autorisation d'importation de maïs et soja américains transgéniques

Séquençage du génome de la levure de bière

Goffeau et al., 1996, Science, 274, 546-567.

Goffeau et al., 1997, Nature, 387 suppl, 5-105.

Lancement du **Quorn**[®] en Suisse

1997

Dolly et Polly : brebis clonées à partir d'une cellule adulte ("<http://www.roslin.ac.uk/>")

Clonage d'un animal par transfert de noyau ; obtention de la brebis Dolly

Nature, 1997, 385, 810 – 813

Transgénèse et clonage d'un animal par transfert de noyau ; obtention de la brebis Polly

Science, 1997, 278, 2130 - 2133

Premières destructions sauvages de plantes transgéniques en serre et en champ

1998

La France, premier pays européen à autoriser la culture d'OGM : un maïs résistant à un insecte (la pyrale), un insecticide et à un antibiotique

Transformation du soja et du riz : début de commercialisation

Séquençage du génome de *Caenorhabditis elegans*

Moratoire français concernant la culture de colza et de betteraves transgéniques
Réussite de la culture de cellules embryonnaires (Cellules ES)

1999

5 pays de l'UE, dont la France, suspendent les procédures de mise sur le marché de nouveaux OGM

Séquençage du génome de la drosophile

Publication en 2000 : cf infra

Monsanto renonce à la technologie *Terminator*

Quelques nouvelles récentes extraites, entre autres, du journal **LE MONDE**.

2000

Séquençage du génome de la drosophile (*Drosophila megalogaster* mouche du vinaigre)

Science, 2000, 287, 2185 - 2195

Séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* (plante modèle)

2001

Séquençage du génome humain : publication de deux versions concurrentes de travail

Science, 2001, 291, 1145 - 1434

Nature, 2001, 409, 745 - 964

Les Nations Unies en faveur des OGM

LE MONDE, Ma 10 juil 01 ; Me 11 juil 01

"Le premier projet de clonage reproductif fermement condamné"

LE MONDE, 09 août 01

"Polémique à propos d'un test de dépistage du cancer du sein"

Myriad Genetics (US) s'est assuré l'exclusivité commerciale du gène BCRA1 jouant un rôle crucial dans le dépistage du cancer du sein. L'Institut Curie contre attaque

LE MONDE, 07/09/2001

Le Quorn[®] est disponible en France, dans certains supermarchés Monoprix et chez Pizza Paï

2002

Des problèmes pour les animaux clonés

LE MONDE : Sa 05 janv 02 ; Ve 15 fev 02

Génome du riz : publication d'un séquençage très avancé de deux variétés asiatiques de riz

Science, 2002, 296, 1 - 204

Interférence de l'ARN (?) :

LE MONDE : Me 10 avr 02

"Bruxelles souhaite la levée du moratoire sur les OGM"

LE MONDE : Ve 13 sept 02

Génome du *Plasmodium falciparum*

Nature, 2002, 419, 417 - 542

Génome d'*Anopheles gambiae*

Science, 2002, 298, 1 - 310

"Faute d'accord sur l'étiquetage, le moratoire sur les OGM est maintenu"

LE MONDE : 15 oct 02

"Après le procès de l'hormone de croissance, l'État refuse de payer sa part"

LE MONDE : 18 oct 02

3. Différents aspects de la notion de “procédé biotechnologique”

Les biotechnologies sont associées à un "*procédé biotechnologique*". Il s'agit de la mise en œuvre de matériel biologique (protéines, cellules, organismes) à grande échelle (en grande quantité) permettant, dans des conditions de rentabilité économique (profit), l'obtention de (grandes) quantités de "*produits d'intérêt*" nécessaires à la satisfaction de la demande d'un marché préalablement identifié.

La mise en œuvre de grandes quantités de matières premières et de catalyseur ne s'improvise pas. Il faut commencer par une étude au laboratoire afin de s'assurer de l'obtention réelle du produit d'intérêt. Il faudra ensuite quitter ce laboratoire pour réaliser la production dans des installations industrielles spécialisées. La mise en place de ces installations industrielles doit respecter un certain nombre de contraintes techniques, économiques et légales. Un des moyens de faire face à ces contraintes d'un point de vue technique consiste à envisager la production considérée comme mettant en œuvre un « procédé industriel », c'est-à-dire comme étant, à la fois, :

- une succession d'étapes de transformations physico-chimiques et biologiques
- une opération de catalyse biologique
- une succession d'opérations mises en œuvre à différentes échelles,

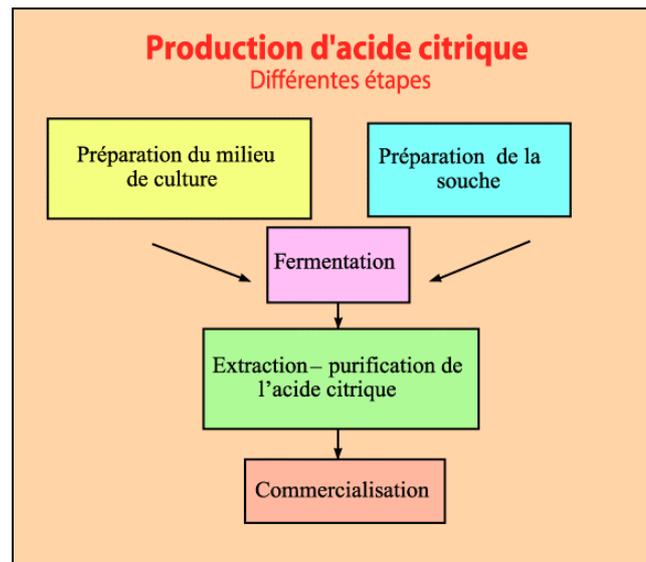
chacune ayant ses objectifs et ses contraintes ; parmi celles-ci la plus contraignante tant d'un point de vue technique, économique et organisationnel, est l'échelle de la production qui renvoie à un monde sensiblement différent du monde du laboratoire, à savoir au monde industriel.

C'est à ces trois approches d'analyse que nous allons maintenant nous intéresser.

3.1. Les différentes étapes de la transformation - décomposition en étapes unitaires - le modèle du génie chimique

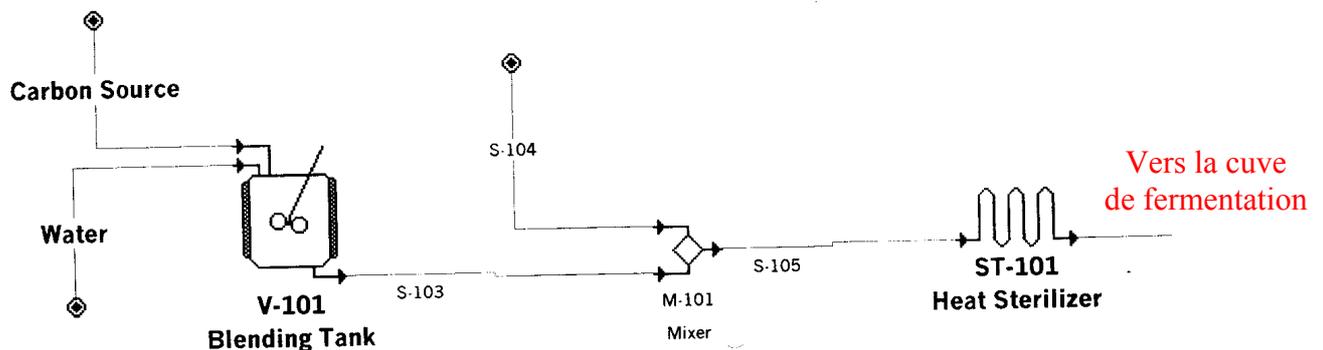
L'analyse des procédés biotechnologiques à n'importe quelle échelle montre que *ces procédés peuvent être divisés en une succession d'étapes logiques d'ordre physico-chimique ou biologique*. Pour simplifier, une telle analyse est réalisée par une discipline technologique, née vers 1960, le *génie biologique*. Ce génie biologique fait partie du *génie des procédés*, ensemble de disciplines trouvant leur origine au milieu des années 20, dans le *génie chimique*. Cette dernière discipline s'occupe des procédés chimiques industriels : il s'agit d'identifier les aspects spécifiques à chaque opération technique précise mettant en jeu un appareil déterminé, d'en théoriser les limitations (agitation, transferts de matière et de chaleur...) ceci aboutissant à l'obtention de "modèles" complexes permettant de prévoir son comportement dans certaines conditions d'utilisation.

Prenons un exemple, celui de la production d'acide citrique. Les diverses *étapes logiques d'ordre physico-chimique ou biologique* sont la préparation du milieu de culture et, en même temps, la préparation de la souche (inoculum), puis la fermentation et l'extraction purification de l'acide citrique.



Chacune de ces étapes est analysable, à son tour et dans le détail, en terme d'opérations techniques élémentaires mettant en jeu des appareils déterminés.

Par exemple, à l'échelle industrielle, la première étape, celle de la préparation du milieu de culture, peut être schématisée comme suit :



Dans le document précédent, on distingue *le récipient de mélange* ("Blending Tank") servant à la préparation du milieu de base, *un mélangeur* ("Mixer") réalisant le mélange après ajout d'un autre constituant grâce à la tuyauterie notée S 104 et *un dispositif de stérilisation par la chaleur* ("Heat Sterilizer") (dispositif en continu). Le milieu de culture, alors stérile, est alors prêt à être introduit dans la cuve de culture (non schématisée ici).

Les symboles utilisés pour schématiser ces appareillages sont normalisés par le génie chimique, science de l'ingénieur qui traite des procédés chimiques, c'est-à-dire de la réalisation de réactions chimiques en grand volume. Chacune des opérations élémentaires peut être modélisée.

Ainsi, après avoir décomposé un procédé en ses diverses étapes, puis chaque étape en opérations élémentaires, celles ci peuvent être modélisées et on peut reconstituer le procédé dans son intégralité. Le modèle mathématique de l'ensemble ainsi obtenu sera fort utile pour quantifier le procédé, c'est-à-dire pour en faire l'évaluation quantitative rendue nécessaire par

l'enjeu économique. Des logiciels permettent de réaliser ces calculs ; ceux ci sont réalisés essentiellement pour prévoir les performances d'une installation projetée, ceci dans le cadre d'un dossier de faisabilité (voir, par exemple le logiciel américain à l'adresse , www.intelligen.com).

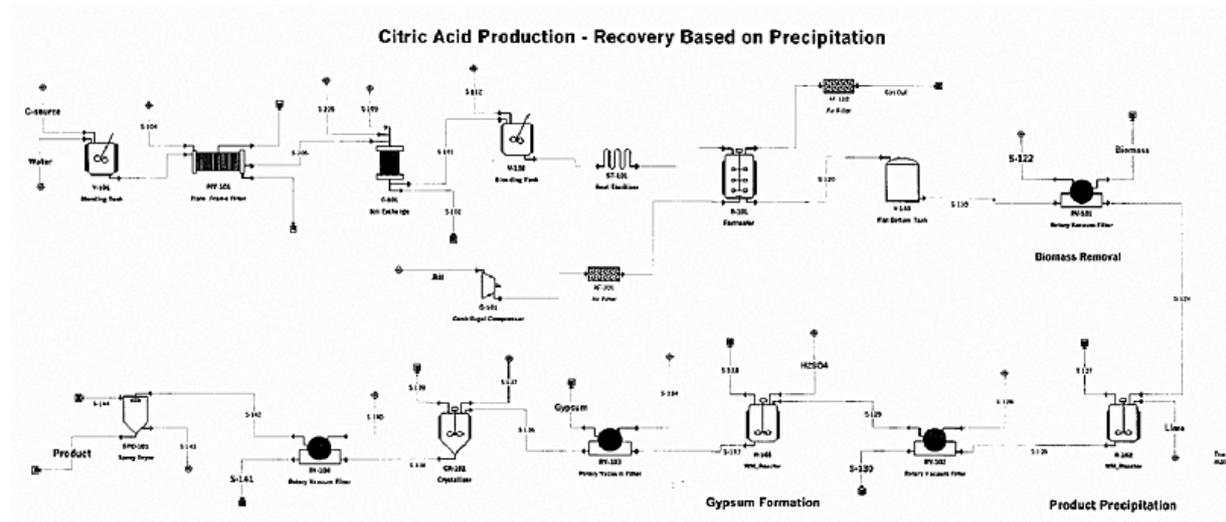


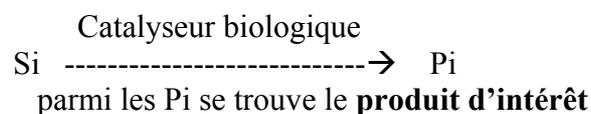
Diagramme général de production de l'acide citrique

Pour nous, si un élément fondamental est le *bioréacteur*, cuve dans laquelle se déroule la réaction, il est néanmoins important de ne pas limiter le procédé biotechnologique à la mise en œuvre de ce seul bioréacteur.

3.2. Les différentes modalités de la catalyse biologique

D'un point de vue général, le matériel biologique utilisé dans les procédés biotechnologiques sert de catalyseur : il est souvent qualifié de biocatalyseur, c'est à dire de catalyseur biologique transformant, en simplifiant, un substrat S en un produit P.

En fait, pour être plus précis, il faut considérer qu'un ensemble de substrats (notés du terme général Si, pour les n substrats notés So, S1, S2, S3, ... Sn) est transformé en produits (notés du terme général Pi, pour les n produits notés Po, P1, P2, P3, ... Pn). Ceci peut se schématiser de la manière suivante :



Ainsi, dans tout procédé biotechnologique, se trouvent mises en jeu des *matières premières (substrats)* qui seront transformées en divers *produits*, dont le *produit d'intérêt*. Le matériel biologique, en tant que biocatalyseur, augmente la vitesse de transformation ; en fait, il permet de réaliser à température normale des réactions qui ne pourraient s'effectuer que dans des conditions plus extrêmes ou bien avec un rendement beaucoup plus faible (exemple : cas de la synthèse protéique par voie chimique comparée à la voie biologique).

Ainsi, tout procédé biotechnologique passe-t-il par la mise en contact d'un substrat plus ou moins complexe avec le biocatalyseur, pendant un temps donné, ce dans une cuve de taille et de forme appropriées, un *bioréacteur*.

Lors de la mise en œuvre de cellules, du fait de la dégradation des substrats, les cellules se divisent, leur nombre augmente en fonction du temps : il y a formation de biomasse, classiquement notée X (quantifiée en $g \cdot L^{-1}$). Cette biomasse se mesure de diverses manières : absorbance vers 600 nm, comptage sur boîtes. Aucune de ces méthodes n'est d'ailleurs entièrement satisfaisante et cette estimation se fait avec une marge d'erreur parfois assez importante.

Cette multiplication cellulaire est quantifiée par le taux de croissance (népérien) μ (h^{-1}) ou vitesse spécifique de croissance. Il est déterminé expérimentalement à partir de la courbe $\ln X = f(\text{temps})$: le taux de croissance népérien est la pente de la partie linéaire de cette courbe. Les limites de cette partie linéaire déterminent la phase exponentielle de croissance, partie de la courbe la plus intéressante de notre point de vue. Cette phase exponentielle de croissance est située entre autres, après la phase de latence et avant la phase stationnaire.

Le taux de croissance correspond à l'accroissement de la biomasse obtenu à partir d'un gramme de biomasse, ce par unité de temps. Bien évidemment, ce sont les taux de croissance les plus importants qui sont les plus intéressants : dans ces conditions, il faut moins de temps pour obtenir une concentration cellulaire donnée.

Quantification de la croissance d'une culture

Nombre de cellules	1	2	4	8	16	32	64	128
Nombre de cellules	2^0	2^1	2^2	2^3	2^4	2^5	2^6	2^7	2^n
Nombre de générations	0	1	2	3	4	5	6	7	n

Au temps t :

si X est le nombre de cellules au temps t,
si X₀ est le nombre de cellules au temps 0,

$$X = X_0 \cdot 2^n$$

D'autre part,

si n est le nombre de générations
si G est le temps de génération (temps nécessaire au doublement de la population cellulaire)

le nombre de générations n est égal au rapport t / G.

$$n = \frac{t}{G}$$

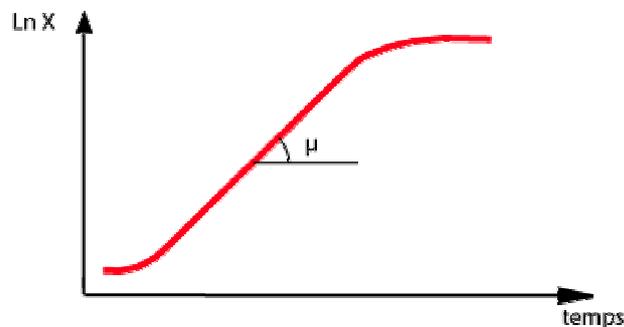
$$X = X_0 \cdot 2^{\frac{t}{G}}$$

$$\ln X = \ln X_0 + \frac{\ln 2}{G} \cdot t$$

$$\ln X = \ln X_0 + \mu \cdot t$$

$$\mu = \frac{\ln 2}{G}$$

D'où la détermination expérimentale de μ à partir de la courbe $\ln X = f(\text{temps})$



La biomasse formée est soit le *produit d'intérêt*, soit "*l'usine*" permettant d'obtenir le *produit d'intérêt*. Celui-ci peut être associé (éthanol, acide lactique) ou non (acide citrique, antibiotiques) à la croissance.

Les biocatalyseurs utilisés dans les procédés biotechnologiques sont de nature protéique et, à ce titre, leur fonctionnement n'est possible que dans des conditions physico-chimiques particulières. Par leur conception et leur équipement, les bioréacteurs se doivent de fournir un tel environnement.

Selon un degré de sophistication croissante, il faudra distinguer :

- la mise en œuvre de bioréacteurs enzymatiques
- la mise en œuvre de fermenteurs

- la mise en œuvre de cytoculteurs

3.3. Les différentes échelles et les contraintes industrielles

La mise en œuvre d'un procédé biotechnologique ne s'improvise pas : il est le fruit de travaux réalisés successivement avec des quantités croissantes de matière. Mais le fait de mettre en œuvre d'importantes quantités de matière n'est pas sans imposer un certain nombre de contraintes matérielles, économiques, législatives et organisationnelles.

3.3.1. Différentes échelles de travail

Il n'est pas réaliste de penser d'emblée réaliser la production des quantités de produit d'intérêt nécessaires à la commercialisation. Cette production doit être "essayée" en mettant en œuvre des quantités croissantes de matières premières, c'est à dire en réalisant des mises au point successives à des "échelles" croissantes. Classiquement, ces échelles sont dites : **laboratoire, pilote et production.**

Ainsi, tout procédé biotechnologique a une histoire, celle des travaux effectués successivement aux diverses échelles (voir le cas du QUORN[®]). Chacune de ces échelles correspond à un moment logique de la mise en œuvre du procédé : la recherche, le développement et la production industrielle.

	Échelle laboratoire	Échelle pilote	Échelle industrielle
Temps	Recherche	Développement	Production
Objectif	Étude de la faisabilité de la production	Étude / mise au point des conditions industrielles	mise en œuvre des conditions industrielles

Quelles sont alors les quantités / volumes mis en jeu ? Contentons-nous pour l'instant de deux remarques :

- les quantités mises en jeu varient selon la valeur ajoutée du produit d'intérêt : d'une manière générale, plus la valeur ajoutée est faible, plus le volume produit est important, ceci pour des raisons de rentabilité

- pour des raisons, entre autres, économiques (la diminution des coûts de main d'œuvre), on a intérêt à traiter en une seule fois des quantités importante.

3.3.2. Les contraintes industrielles

Rappelons d'abord que la notion de « grande échelle » est relative au type de produit d'intérêt : une production à grande échelle d'enzymes de restriction utilisés en génie génétique ne représentera en final que quelques centaines de mL (quelques centaines de mg) alors qu'il s'agira de quelques tonnes pour des enzymes comme la *gluco-amylase* ou la *glucose isomérase*, de quelques dizaines ou centaines de tonnes pour des acides aminés comme l'acide glutamique ou quelques centaines de milliers de tonnes pour le sirop de glucose ou de l'acide citrique.

Dans ce qui suit, on considérera le terme "grande échelle" comme correspondant à une production de quelques dizaines de tonnes ou plus par an (acide aminé, par exemple).

3.3.2.1. Aspects généraux

Comment arriver à une production de quelques dizaines de tonnes d'un produit réputé "pur" par an ? Nous allons tenter de répondre à cette question en partant de quelques remarques.

Il n'est pas possible de traiter de grands volumes de matières premières en gardant le même type d'organisation du travail qu'au laboratoire, c'est-à-dire en traitant à chaque fois des volumes de 1 litre, ou même 10 litres (voir les problèmes rencontrés par les Anglais pour la production de pénicilline à Oxford vers 1940). Le nombre de manipulations à réaliser amène à un coût de main d'œuvre prohibitif. Il faut traiter en une seule fois de plus grands volumes de matières premières (10 000 à 300 000 l.). Pour cela, il faut prévoir des *cuves de grande taille*.

De telles cuves (exemple : 20 m de haut et de 6 m de diamètre pour un volume de 200 000 L.) ne peuvent trouver de place sur une paillasse, dans un coin de laboratoire, ou même dans un bâtiment ou sur un site universitaire : il lui faut un bâtiment spécial De plus pour le stockage des matières premières, pour préparer le milieu de culture, pour produire la vapeur d'eau nécessaire pour stériliser la cuve, le milieu de culture, pour traiter le moût obtenu, il faut des "installations annexes". L'ensemble, qui est, dans un certain sens, l'antithèse du laboratoire de recherche et qui couvre plusieurs dizaines d'hectares, constituera ce qui est appelé un site industriel.

Tout cela a un *coût*, d'abord l'investissement pour la construction de l'installation et le démarrage de la production (matériels, matières premières et personnels), et ensuite le fonctionnement. La poursuite de la production est conditionnée par la rentabilité de l'exploitation. De ce qui précède il ressort que dans un procédé biotechnologique, comme dans toute activité industrielle, une grande place doit être faite aux *considérations économiques*.

Afin de pouvoir s'assurer de la pertinence économique de l'investissement à réaliser ou de celle de la poursuite de l'activité du site, il importe de s'assurer de la *rentabilité du procédé*. Pour cela, il est réalisé une prévision des charges et des recettes liées à la mise en place et au fonctionnement de l'installation. Celle-ci passe par une quantification des coûts du procédé. Le moyen d'obtenir cette quantification est de découper les étapes du procédé en "opérations unitaires", chacune associée à une opération physique ou chimique unique étant de ce fait plus facile à modéliser. Ainsi s'inspire-t-on pour cela de ce qui a été développé dans l'industrie chimique et qui est appelé "génie chimique" ; ainsi parle-t-on à propos des biotechnologies de génie biologique ou de génie des (bio)procédés. Les biotechnologies seraient alors du génie biologique utilisant des catalyseurs biologiques (recombinants ou non).

La mise sur le marché de nouveaux produits, quels qu'ils soient, nécessite une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), document officiel dont la délivrance n'est effectuée qu'après un certain nombre d'investigations afin de s'assurer, par exemple dans le cas d'un produit à usage pharmaceutique, de sa pureté, de sa non toxicité et de son efficacité. De même sont fixées les formes de commercialisation et la limite de péremption. La construction d'une installation industrielle ne peut se faire, elle-même, qu'avec l'assurance de satisfaire à la législation en vigueur, en particulier en ce qui concerne l'environnement. Tout

ceci pour dire que nombreux sont également les aspects légaux. La législation à prendre en compte concerne non seulement la France, mais également, dans la mesure où les produits sont nécessairement exportés, celle de l'Union Européenne et celle, particulièrement exigeante, des Etats Unis définie par la *Food and Drug Administration (FDA)*.

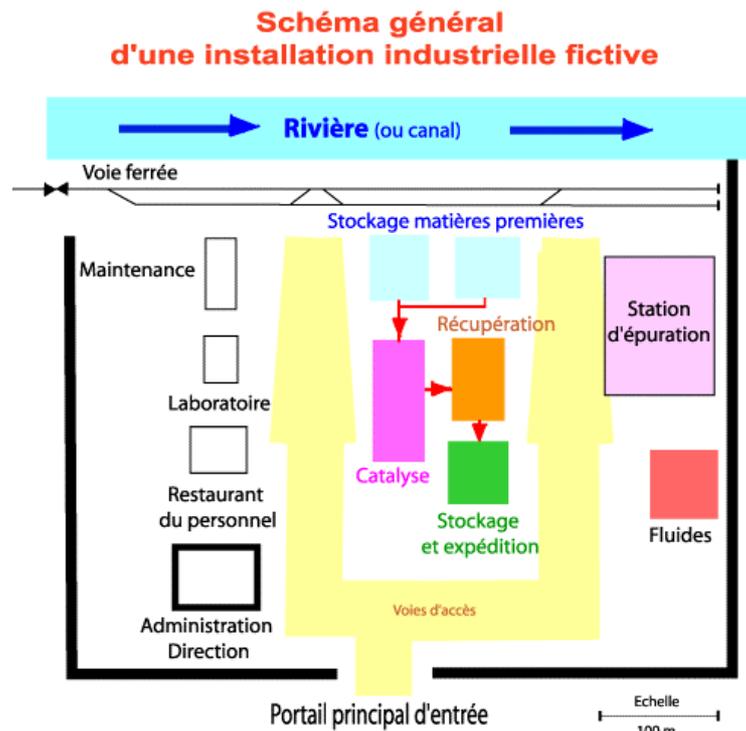
Enfin, le caractère radical et la nouveauté des effets réels ou supposés, volontaires ou involontaires, des biotechnologies, en particulier ceux liés à la libération dans l'environnement et la nature d'OGM, amène certains à se poser la question de la valeur de la sécurité lors de cette mise en œuvre, prémisse à la question éthique qui doit traverser tout travail sur les biotechnologies, à savoir une question du genre "A-t-on raison de faire ce que l'on fait ?".

3.3.2.2. L'installation industrielle

Même si c'est la chose à laquelle on pense en premier, il ne faut pas se limiter, au niveau industriel, aux seuls bioréacteurs. Il s'agit bien des cuves dans lesquelles vont se dérouler la transformation biologique du ou des substrats, c'est-à-dire se faire la production. Celle ci ne pourrait cependant s'effectuer sans la présence, en amont et en aval, d'autres appareillages (récupération du produit) ou de services (fourniture d'énergie, transfert, selon le cas, des matières premières, du milieu de culture, substrats et produits...).

Ainsi se construit une installation industrielle dans le cadre des bio-industries. Ses éléments directement liés au procédé sont : la réception et le stockage de matières premières, la préparation du substrat / du milieu de culture, la production et la récupération du produit, la mise sous forme de commercialisation, le conditionnement et le stockage / expédition. A ceci il faut ajouter les installations annexes : les services administratifs, les services de maintenance et de sécurité, la station d'épuration, la fourniture de fluides et d'énergie...

Cette installation se réalise sur un site où l'eau est abondante : voie d'eau pour recevoir les matières premières / expédier le produit, eau utilisée pour le procédé (brasserie) et pour refroidir les cuves ; les consommations peuvent être importantes et une installation de traitement de l'eau (entrante) est souvent nécessaire.



Le travail dans un environnement industriel suppose un strict respect des consignes et des procédures, celles liées aux impératifs de la production et celles liées à la sécurité. Ce dernier point est particulièrement important : du fait de l'emploi de réactifs dangereux (corrosifs, explosifs...), de fluides (vapeur d'eau, air comprimé, azote liquide...), il importe d'avoir en permanence le souci de préserver l'intégrité des personnels, des personnes autour du site, de l'environnement et de l'installation. Une prévention des accidents est systématiquement menée. Celle-ci est un des éléments de ce qu'il convient d'appeler la "culture industrielle", sensiblement différente de celle des laboratoires.

De plus en plus, la qualité du travail industriel accompli est attestée par la certification de l'installation aux normes ISO 9000. Le produit, lui, est certifié par des labels spécifiques : NF, CE, Label rouge...

C'est là un gage, pour le client, non seulement de la qualité du produit fourni, mais encore de celle de la manière dont il a été obtenu.

4. Un exemple de production et de procédé biotechnologique : le Quorn®

Les biotechnologies se sont fait connaître du grand public essentiellement à travers des productions de substances d'intérêt qu'il était alors difficile d'obtenir, ne serait-ce que pour étude. Ainsi, grâce au génie génétique, des cellules ont pu être reprogrammées en vue de la synthèse de protéines d'intérêt clinique ; le produit d'intérêt était alors extrait, purifié et, si un marché existait, commercialisé. Ainsi, depuis 1985, furent mis sur le marché *interférons*, *interleukines*, *facteurs divers de croissance et de nécrose*, *EPO*... Si la commercialisation d'hormones de croissance (humaine et bovine) recombinantes relève de ce cas de figure, celle de l'insuline recombinante, plus proche de celle de l'homme et première substance de ce type commercialisée, reste en concurrence avec une production d'hormone animale transformée.

Moins connues, les biotechnologies sont également présentes dans la reprise de procédés anciens de microbiologie industrielle. Celle ci était initialement une culture de microorganismes essentiellement sur milieu solide. Ce n'est qu'à l'issue de la seconde guerre mondiale que se développèrent les *cultures submergées* et les méthodes efficaces d'extraction – purification des produits de fermentation. Ainsi, ces procédés anciens bénéficient maintenant de la mise en oeuvre d'une méthodologie nouvelle (contrôle et régulation des paramètres, conduite de la fermentation). De même, les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique (clonage, mutagenèse dirigée) permettent la mise en oeuvre de microorganismes (ou de cellules eucaryotes) nettement plus performants. Ceci pour dire, que, l'extraction / purification de protéines (facteurs protéiques) / hormones / enzymes ou d'autres substances à partir de matières premières naturelle est de plus en plus abandonnée au profit de l'utilisation du clonage et de l'expression du gène du produit d'intérêt. Ceci bouleverse un certain nombre d'habitudes. Les économies des pays en voie de développement sont susceptibles d'être dépossédées d'une possibilité d'exportation.

Sera développé dans ce qui suit une "étude de cas" rassemblant des données d'ordre scientifique, technologique, économique et éthique, ceci illustrant le caractère pluridisciplinaire des biotechnologies. Il s'agira de la production d'un champignon à usage alimentaire, commercialisée sous le nom de Quorn®; il est riche en protéines et pauvre en cholestérol et constitue un substitut de la viande.

Le Quorn® est une "marque d'une gamme d'aliments se positionnant comme une alternative à la viande". Le constituant principal de Quorn® est une protéine issue de la famille des champignons, il a le goût et la texture de la viande blanche et des propriétés nutritionnelles surprenantes : riche en fibres, peu calorique, sans cholestérol (site Web : "<http://www.quorn.com>").

Il est obtenu industriellement par culture d'un champignon (*Fusarium graminearum*) en Grande Bretagne où il est commercialisé ainsi qu'en Belgique, Suisse, Pays Bas, Allemagne et, Suède, USA et très récemment (4 septembre 2001) France.

Le produit d'intérêt est donc ici la biomasse elle même : elle sera commercialisée après traitement, (bio)chimique, mise en forme et après ajout éventuel de saveurs diverses. Cette production, actuellement en expansion, rencontre un accueil favorable dans les pays anglo-saxons où les végétariens sont nombreux, en particulier parmi les jeunes.

La genèse et les modalités d'une telle production sont intéressantes à évoquer, car elle rassemble des éléments économiques, techniques et même éthiques

D'où vient Le Quorn® et comment, techniquement, est-il obtenu ? Quels sont les éléments de ce *procédé biotechnologique* ?

4.1. Les origines du Quorn®

Après avoir été introduite, semble-t-il, en Grande Bretagne et aux USA à la fin du XIXème siècle, la production de levures pour l'alimentation humaine se développa pendant les deux guerres mondiales principalement en Allemagne avec l'utilisation de liqueurs bisulfiteuses de papeteries. De même, il y eut production, pendant la seconde guerre mondiale, d'hydrocarbures à partir de charbon dégradé en monoxyde d'azote et hydrogène par de la vapeur d'eau (*procédé Lurgi*); les gaz étaient utilisés pour la synthèse sous pression de composés paraffiniques (*synthèse de Fischer – Tropsch*) ; ceux ci servaient alors de substrat pour la synthèse de levures. Les Anglais, eux, durant cette même période firent des essais avec comme substrat des sous produits de l'industrie sucrière. Une usine fut construite en 1947 à la Jamaïque. et elle fonctionna pendant 10 ans mais la dénomination de « levure alimentaire » du produit obtenu ne convainquit pas les consommateurs d'autant plus que restait un goût légèrement déplaisant laissé par l'agent antimousse. La production fut arrêtée.

Les projets de production de microorganismes à des fins alimentaires refirent surface dans le secteur de la pétrochimie. L'existence de bactéries susceptibles de se développer sur du pétrole était connu depuis le XIXème siècle. Cependant, en 1955, un Universitaire allemand conclut, que "les connaissances courantes ne pouvaient pas soutenir l'espoir d'un procédé commercialement viable (de production de biomasse). La demande d'oxygène serait très grande et il y avait ce goût tenace dans les levures obtenues". Cela freina l'enthousiasme des chercheurs.

Par contre, dès 1950, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) prit conscience que les sources de protéines allaient manquer dans le monde et une sorte de cahier des charges fut édicté pour la production de ce qui pourrait être de nouvelles protéines pour la consommation humaine. Ainsi fut créé, aux USA, au MIT, le terme de Single Cells Proteins (SCP) (ou de Protéines d'Origine Unicellulaire (POU). Il fallait, en effet, éviter des termes à connotation négative comme "protéines microbiennes" ou "bactériennes".

C'est dans un contexte parallèle, celui d'industriels du pétrole souhaitant participer à des projets leur permettant d'inverser l'image défavorable qui leur était plutôt associée jusqu'alors, que Alfred Champagnat, travaillant pour la *Société Française des Pétroles BP (SFBP)* aidé de Jacques Senez, chercheur en microbiologie au CNRS à Marseille, développa un projet de production de levures alimentaires par croissance sur hydrocarbures. Ainsi Champagnat et Senez s'attelèrent aux aspects technologiques de la culture de levures alimentaires (dénommées *Toprina*) sur hydrocarbures. Ils furent à l'origine de la conception d'une importante usine à Lavera dans le Golfe de Fos (production envisagée : 16 000 t / an). Malheureusement se produisit en 1973 le premier choc pétrolier : la rentabilité du procédé diminua fortement, ce qui amena à l'arrêt de la production en 1975 après obtention de (seulement) quelques milliers de tonnes de levures pour l'alimentation animale. Il n'empêche que les études réalisées furent à l'origine de beaucoup de projets - Grande Bretagne avec le projet *Pruteen* de l'Imperial Chemical Industries¹ (ICI) et Italie, Allemagne (Hoeschst). Ces

¹ Entreprise chimique du Royaume Uni

projets, comme celui de la *SFBP*, furent plus ou moins rapidement abandonnés malgré les investissements énormes en recherche et développement ainsi que la construction d'installations industrielles.

C'est dans ce contexte que Ranks Hovis McDougall (RHM) décida dès 1964 de développer un aliment riche en protéines, d'abord pour la consommation animale, puis humaine. Finalement, il décida de financer l'étude de la culture d'un champignon dans un fermenteur sur un milieu contenant de l'amidon de blé comme source de carbone et source d'énergie, et de modifier la biomasse du champignon pour satisfaire aux exigences nutritionnelles humaines. Si au début, l'idée était de commercialiser les mycobactéries séchées et réduites en poudre, tels la farine de soja et le lait en poudre, RHM décida, ensuite que la texture des mycoprotéines était suffisamment appétissante pour en faire par elles mêmes un produit alimentaire. A cette époque, une installation capable de produire 20 000 - 30 000 tonnes de protéines fongiques par an était estimée rentable si elle mettait en œuvre un fermenteur continu.

En 1984, à la suite du développement du projet (en particulier avec l'identification du micro organisme à cultiver) une "joint Venture" (nommée Marlow Foods) entre RHM et ICI fut constituée en Grande Bretagne à *Bellingham* (Nord de l'Angleterre) avec comme objectif le développement du marché des produits dérivés de la mycoprotéine. *Quorn®* devint alors la marque déposée du produit et "myco-protéine", un terme fondé par le "*Foods Standards Com*". La nouvelle entreprise bénéficiait de l'expérience d'ICI acquise lors du développement du projet de nourriture animale dénommée *Pruteen*, c'est-à-dire de son expertise des problèmes liés à l'augmentation d'échelle ("scale up") du procédé. Ainsi, compte tenu des études de marché et des considérations techniques, un fermenteur avec une capacité de production de 10 000 tonnes de mycoprotéines par an fut considéré comme raisonnable.

4.2. L'obtention du Quorn®

4.2.1. Première étape technique : l'isolement du champignon et la réalisation de cultures mères

A partir de 1964, les recherches commencèrent en vue de sélectionner un microorganisme ayant, entre autres, des caractères cultureux et une palatabilité intéressants. Ces recherches furent menées, en deux années, par sélection parmi 3000 champignons du sol. Voici comment est décrit l'isolement des diverses souches de moisissures présentes dans des échantillons de terre :

"L'échantillon de sol fut séché, et exposé à des vapeurs de p-dichlorobenzène pour éliminer les mites. Un gramme de sol fut mis en suspension dans 99 mL d'eau distillée stérile dans une fiole d'erlenmeyer et agitée durant 30 minutes. Ensuite 0,1 mL de cette suspension futensemencé sur une boîte de Petri contenant de l'Oxoid Malt extract Agar (MEA Oxoid Référence CM 59) avec un antibiotique (oxytétracycline), cette addition étant réalisée pour supprimer la croissance microbienne. Des dilutions de raison 10 de la suspension furent ensuite inoculées dans des boîtes de Petri contenant du MEA et toutes les boîtes furent ensuite incubées à 30°C jusqu'à ce que les colonies soient bien développées. Approximativement 10-30 souches de champignons furent isolées à partir de chaque échantillon de sol. Ces colonies furent purifiées en éliminant les spores avec une anse stérile et en étalant ces spores sur une des boîtes de MEA. Ceci fut répété jusqu'à ce que seulement une moisissure, ou plus exactement, seulement un type morphologique, soit présent sur ces

boîtes d'isolement. Ceci est une procédure relativement simple, mais elle ne peut être utilisée comme screening préalable pour une production de protéines."

Cela réalisé, deux cultures solides étaient effectuées pour chaque isolement. Furent ensuite mises au point des cultures de travail en milieu liquide.

Le screening dura deux ans pour arriver à la souche sélectionnée : une souche de *Fusarium graminearum* fut isolée, avec d'autres, le premier Avril 1968 du sol de Marlow ; la souche fut dénommée 6 - 3/5A

En Avril 70, les conditions de stockage par lyophilisation et par culture en sol sont standardisées et validées. En 1972-73, fut réalisée l'étude de la stabilité de la souche.

Furent définies également, à l'échelle laboratoire, les conditions expérimentales de réalisation de suspensions stock et des cultures de travail. Un souci également fut le maintien de la souche, c'est-à-dire la vérification de l'absence de mutation. Celle ci fut contrôlée, entre autres, par des critères cultureux morphologiques.

Les conditions de conservation de la souche choisie définies, il fut nécessaire de produire des quantités de *Fusarium graminearum* permettant de continuer les investigations dans les domaines de la chimie, de la toxicologie et de la nutrition.

4.2.2. Seconde étape technique : la culture en fermenteur

Cette culture en fermenteur fut réalisée par RHM. Il était nécessaire de conduire des essais en vue de la future production : c'est la phase de *développement*. De plus, et une fois la société Marlow Foods créée, il fallut changer d'échelle passer à la phase de *production*.

4.2.2.1. Le développement de la culture

La souche étant choisie, et les conditions de son maintien définies, il était nécessaire de définir les conditions de culture en plus grand volume. D'essais préliminaires à l'échelle laboratoire, ont été déduites les conditions pour réaliser une culture pilote en bioréacteur agité continu.

Pour ces études de développement, les diverses conditions expérimentales furent celles d'une production industrielle :

- produits chimiques de qualité alimentaire
- eau utilisée directement dans le procédé de qualité « potable »
- eau utilisée pour la fourniture de vapeur traitée par des additifs pour chaudières utilisables dans les industries alimentaires
- air prélevé à l'extérieur du bâtiment et comprimé par un compresseur sans huile et finalement filtré pour le stériliser
- matériaux utilisés pour la construction de l'installation : acier inoxydable de grade 316 ou 304 (EN 58J ou E).

Ainsi, à partir de 1975, fut réalisée une culture continue en fermenteur agité de 1300 L. Cette étape de culture pilote a été suivie par d'autres visant à réduire le contenu en ARN de la biomasse, à séparer le mycélium du milieu de culture et à réaliser la formulation en aliments variés.

Seront envisagés : les éléments théoriques de la culture en continu (valables pour la production), la préparation du milieu de culture, la fermentation.

4.2.2.2. La culture continue : éléments théoriques

La culture continue est un système dynamique dans lequel, à l'état stationnaire, le taux de croissance des micro organismes compense la dilution issue de l'apport du milieu². Le substrat est apporté avec un débit identique au débit de soutirage : le volume reste constant. Ainsi les concentrations de la biomasse et des autres réactants sont elles constantes en fonction du temps (état stationnaire) et le pH, la température, la concentration d'oxygène dissous, la densité de population et la vitesse de croissance peuvent être contrôlées.

La vitesse spécifique de croissance ou taux de croissance népérien μ des micro-organismes dépend de la concentration du substrat limitant la croissance, selon la loi empirique de Monod (1942, 1949) :

$$\text{Equation 1 : } \mu = \mu_{\max} \frac{(S)}{(K_S + (S))}$$

Dans laquelle μ est la vitesse spécifique de croissance en h^{-1} , μ_{\max} est la vitesse spécifique de croissance maximum et (S) la concentration du substrat limitant la croissance. Dans une culture continue dans des conditions d'état stationnaire, le taux de croissance μ est égal au taux de dilution D . De cette égalité, on peut tirer la valeur de la concentration (S) du substrat limitant la croissance en fonction du taux de dilution D .

$$\text{Equation 2 : } (S) = K_S \frac{D}{(\mu_{\max} - D)}$$

La concentration du substrat limitant la croissance est dépendante du taux de dilution, de la vitesse spécifique de croissance et de la constante K . De même, si le rendement du substrat en biomasse est $Y_{X/S}$, ceci signifie que

$$Y_{X/S} = X / (S_0 - S) \text{ soit } X = Y_{X/S} (S_0 - S)$$

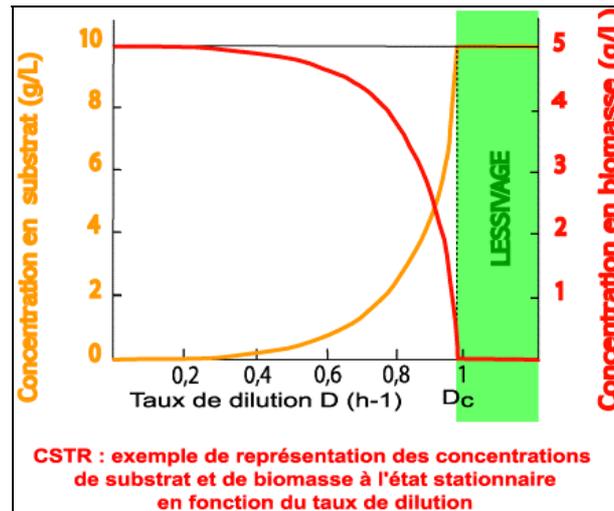
Ainsi peut on obtenir l'expression de la concentration de la biomasse

$$X = Y_{X/S} \cdot \left(S_0 - \frac{K_S}{\frac{\mu_{\max}}{D} - 1} \right)$$

Soit avec les valeurs suivantes des paramètres

$$S_0 = 10 \text{ g/L}, K_S = 0,2 \text{ g/L}, \mu_{\max} = 1 \text{ h}^{-1}, Y_{X/S} = 0,5 \text{ g/g} \cdot \text{h ou } 0,5 \text{ h}^{-1}$$

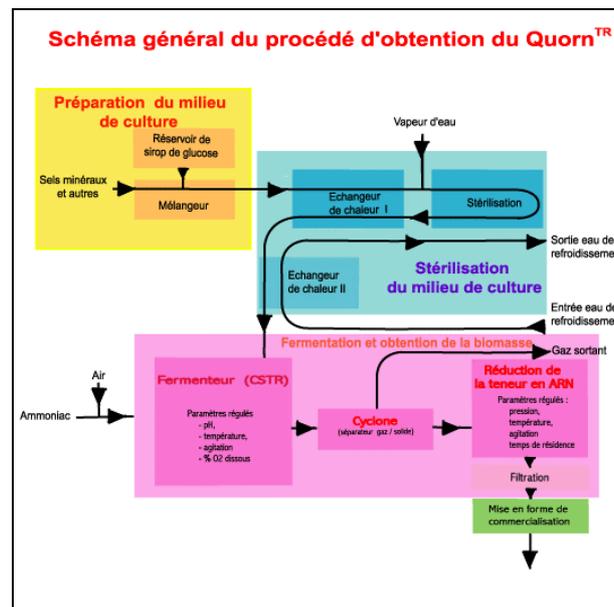
² Cette dilution est quantifiée par le « taux de dilution » appelé D (en h^{-1}) : celui ci se calcule à partir de V volume du fermenteur (en L) et de Q , débit d'alimentation et de soutirage (en L/h) : $D = V / Q$; l'inverse du taux de dilution est le temps de résidence (temps (théorique) passé par la culture dans le bioréacteur). Ainsi dans la fermentation en continu, à l'état stationnaire, le taux de dilution D est-il égal au taux de croissance du microorganisme μ .



Ainsi ces considérations théoriques permettent-elles de faire le calcul des concentrations de substrat restant et de biomasse correspondant à un taux de dilution donné.

Un tel calcul reste néanmoins théorique, en particulier du fait que l'on suppose que le bioréacteur est parfaitement mélangé et qu'il n'y a pas de développement de microorganisme sur les parois. Le modèle doit alors être compliqué pour se rapprocher de la réalité.

4.2.2.3. Les différents temps : schéma général



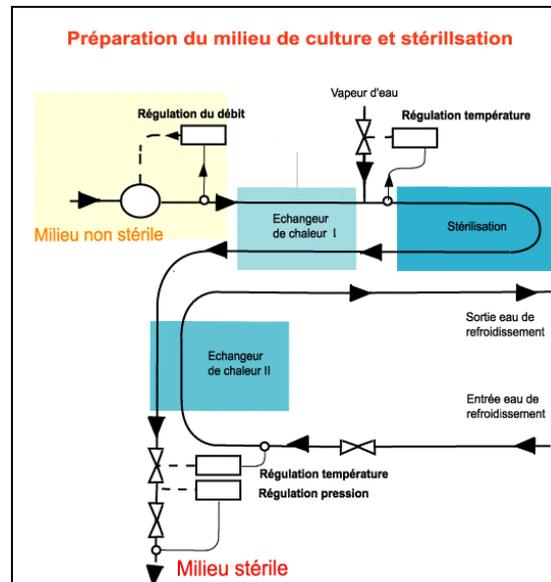
4.2.2.4. La préparation du milieu de culture

Diverses sources de glucides étaient susceptibles d'être utilisées :

- les **mélasses** de betterave ou de canne, sous produits de l'industrie sucrière, riches en saccharose ; elles nécessitent le plus souvent un pré traitement pour éliminer des substances inhibitrices de la croissance du champignon ; ces substances avaient été introduites au cours du procédé d'extraction du saccharose

- le **sirop de glucose** constitué essentiellement de glucose commercial ; le sirop de glucose est issu de l'hydrolyse de l'amidon, par exemple de maïs.

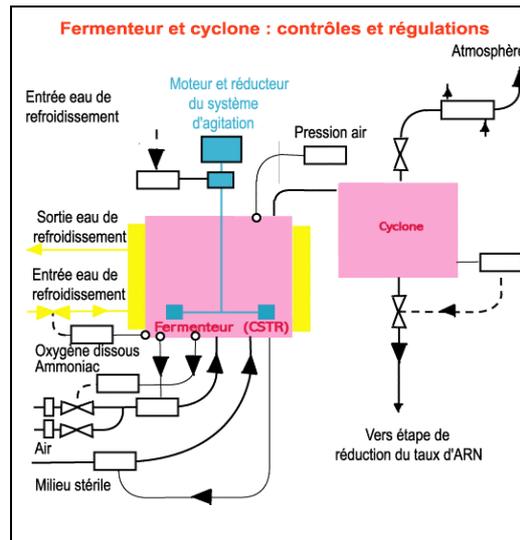
Quelle que soit la source de carbone utilisée, elle est mélangée avec d'autres constituants qui sont des substances minérales et des vitamines. Après mélange, le milieu est stérilisé par un procédé continu.



Pour la stérilisation, on a recours à un procédé continu et les conditions opératoires utilisées dérivent d'une étude de la cinétique de l'inactivation bactérienne réalisée au laboratoire. La preuve de son efficacité est montrée par la capacité à réaliser des périodes de fermentation de plus de 1000 h sans contamination.

4.2.2.5. La fermentation

Le milieu de culture stérile est introduit en continu depuis le réservoir de milieu stérile jusqu'au fermenteur ; de même sont introduits de l'air et du gaz ammoniac à un débit et à une pression déterminés. Dans le fermenteur, la croissance des cellules se produit aux dépens des nutriments apportés et la biomasse formée quitte le fermenteur en continu à un débit égal à celui de l'entrée du milieu de culture. En quittant le fermenteur, la biomasse en suspension dans le milieu de culture est séparé du gaz utilisé dans un *cyclone* et ensuite passe à l'étape de réduction de la quantité d'ARN. Un diagramme schématisant le flux du procédé et les principales boucles de contrôle est donné dans les figures suivantes



Dans ce procédé de culture continue, le micro-organisme se développe dans des conditions d'état stationnaire, c'est-à-dire la constance des concentrations des divers réactants en fonction du temps. Ceci est obtenu par contrôle et régulation de divers paramètres :

Paramètre régulé	par action sur
température	le débit de l'eau de refroidissement
pH	le flux d'ammoniac
pression	la position de la valve contrôlant la pression de couverture
flux d'air (oxygène dissous)	le débit d'entrée d'air
vitesse d'agitation	le taux de réduction

Pour vérifier que la culture se déroule comme prévu, et commencer à assurer l'historique du développement - en attendant la traçabilité -, la vitesse de consommation de glucose, oxygène et ammonium, la vitesse de production de biomasse et de dioxyde de carbone, la morphologie des hyphes et la contamination de la culture font l'objet d'enregistrement en fonction du temps.

Dans ces conditions, la productivité, le rendement, la composition et la morphologie de cette culture sont-ils maintenus constants grâce aux régulations précédentes.

Ainsi, une campagne de culture continue pouvait durer plusieurs semaines sans interruption significative et sans contamination. À l'issue de cette campagne, l'installation était arrêtée, nettoyée et soumise à maintenance.

Au cours des 10 années où ces études furent menées (1975-1985), les valeurs optimales des paramètres physico-chimiques furent déterminées et, une fois l'AMM donnée, il était alors possible de passer à l'échelle industrielle.

4.2.2.6. La culture à l'échelle industrielle

Après autorisation de commercialisation de la mycoprotéine en 1985, une "joint venture", *Marlow Foods*, fut créée en 1986 entre Imperial Chemical Industries (ICI) et RHM pour développer le marché. C'est à ce moment qu'apparurent le nom commercial Quorn® et la première préparation culinaire : une tarte végétarienne.

Pour augmenter la production finale, il fallait augmenter la quantité de mycoprotéines produites et récupérées. Par rapport à ce qui a été décrit précédemment, il s'agit d'augmenter les volumes de production. Il était possible

- soit de multiplier les appareils (plusieurs fermenteurs de 1300 l.)
- soit d'augmenter la taille de l'appareillage.

En fait, la solution retenue pour le fermenteur a été d'augmenter sa taille ("scale-up"), alors que nous verrons que pour l'appareillage de récupération, c'est la multiplication qui sera retenue.

4.2.2.6.1. Le "scale-up" du fermenteur

Pour augmenter la production, il fallait augmenter le volume du fermenteur.

L'augmentation de taille des fermenteurs, comme de tout bioréacteur n'est pas sans revêtir un aspect paradoxal : en effet plus la taille augmente, plus les performances par unité de volume, par exemple, la productivité volumique (g de produit / litre de bioréacteur et par heure) diminue.

Pourquoi alors mettre en œuvre une telle solution ?

La raison de poursuivre dans cette voie est liée aux très importantes économies de main d'œuvre réalisées à grande échelle... Celles-ci compensent largement les pertes précédemment citées. De plus, une discipline technologique générale nouvelle, le génie des procédés, cherche, avec succès, des solutions techniques pour minimiser cette baisse de performances. Le génie des procédés se décline, selon le type de procédé étudié, sous le vocable de génie biochimique, génie fermentaire ou génie biologique. Globalement, cet argument de la perte de performance ne tient donc pas

Quelles sont les origines de cette baisse de performance à grande échelle ? Ou encore, sur quoi faut-il faire porter ses efforts pour éviter cette baisse de performance ?

Pour un bioréacteur agité, elles sont de deux ordres :

1. Plus le volume augmente, moins l'hypothèse d'homogénéité des concentrations dans le bioréacteur est vérifiée : le catalyseur n'est pas partout au contact de la même concentration de réactants. Cette concentration est inférieure pour les substrats (d'où une diminution de vitesse de réaction) et supérieure pour les produits (d'où risque d'une inhibition).

2. La concentration des réactants réellement au contact du catalyseur (défini comme le micro-environnement) est différente de celle qui est accessible à la mesure (défini comme le macro-environnement) : là encore, elle est inférieure pour les substrats et supérieure pour les produits. Là encore, si on modélise en considérant les concentrations dans le macro-environnement, on croit observer une diminution d'activité ; ces effets sont liés à deux phénomènes physiques : le partage et la diffusion. En effet, avec l'augmentation de volume, la diffusion des réactants aux interfaces peut être le facteur limitant du procédé ; ceci a été particulièrement étudié dans le cas de l'aération des fermenteurs où la possibilité de fournir les quantités d'oxygène nécessaires (satisfaire la demande en oxygène) a été reconnue dès le début des cultures submergées comme susceptible d'être limitante.

Un des aspects importants du "scale up" est donc celui de la fourniture de l'oxygène. L'oxygène est un gaz peu soluble³, et la demande en oxygène augmente lorsque la concentration en biomasse augmente. Or le but d'une production industrielle est justement d'obtenir une grande concentration finale. De plus *Fusarium graminearum* est un champignon filamenteux : sa croissance augmente la viscosité du milieu dans lequel il se développe et diminue la capacité de transfert de l'oxygène.

Un moyen d'augmenter la quantité d'oxygène dissous est d'augmenter la pression d'introduction de l'air. Il n'est cependant pas possible d'augmenter indéfiniment cette pression.

À pression constante, un des moyens d'augmenter le transfert d'oxygène est d'augmenter l'agitation qui fractionne les bulles. Avec l'augmentation de volume prévue, l'agitation mécanique tellement importante à fournir pour assurer un transfert d'oxygène satisfaisant ne saurait convenir du fait d'un coût exorbitant et surtout des forces de cisaillement ainsi créées qui endommageraient le mycélium.

Ainsi, il fut fait appel à un autre type de technologie de fermenteur continu : le fermenteur *air lift*.

4.2.2.6.2. Le fermenteur air lift

Un fermenteur air-lift est un fermenteur sous pression sans mobile d'agitation, qui utilise la montée des bulles d'air pour mélanger la culture et pour réaliser le transfert de chaleur et de matière. Ce type d'agitation de la culture conduit à une formation moindre de chaleur (et ainsi moins de refroidissement est nécessaire) que dans un fermenteur agité.

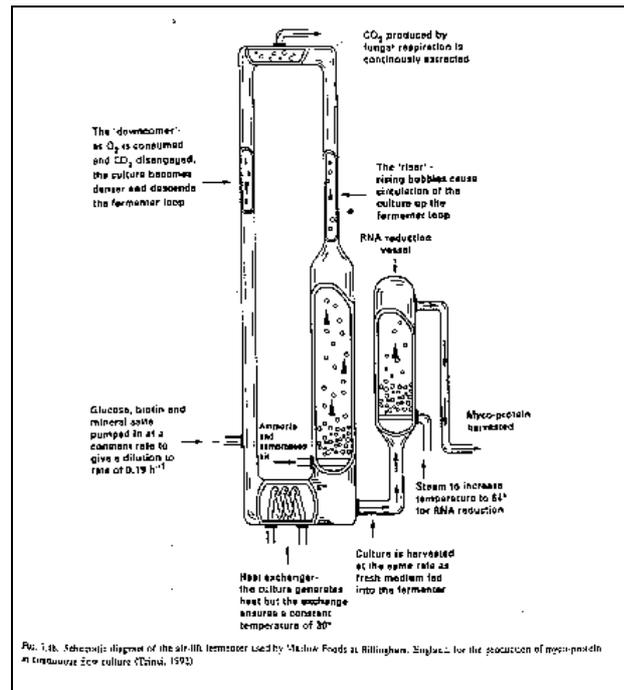
La nouvelle société put utiliser un fermenteur air lift de 40 m³ situé à *Billingham*, fermenteur qui avait été construit précédemment par ICI comme pilote pour le développement de leur projet Pruteen

Le fermenteur air lift de **Billingham** est une boucle allongée de 30 m de haut dans laquelle la culture circule continuellement. L'air est insufflé en bas et c'est lui qui cause le mouvement de la biomasse.

La solution nutritive est introduite dans la culture à un taux de dilution de 0,17 à 0,20 h⁻¹, bien en dessous du μ_{\max} (0,28 h⁻¹).

La fourniture d'ammoniac pour la croissance est assurée en même temps que l'air stérile comprimé ; la vitesse d'introduction d'ammoniac dans la culture est régulée par un dispositif de surveillance permettant de maintenir le pH à 6,0. La culture est maintenue à 30°C par un dispositif d'échange de chaleur situé dans la partie descendante et est recueillie en continu.

³ l'oxygène a une très faible solubilité dans l'eau (7 mg / L) à 30 °C) mais la production d'un gramme de *Fusarium graminearum* nécessite l'apport de 0,78 g de O₂ !



Les forces de cisaillement auxquelles est soumis le mycelium dans des réacteurs agités mécaniquement (méthode du RHM) et air lift (Marlow Foods) diffèrent sensiblement, mais la morphologie et la croissance de *Fusarium graminearum* dans les deux types de fermenteurs sont similaires. Les mutants morphologiques vont survenir dans les types de systèmes approximativement au même moment après inoculation.

Le dispositif permettant l'élimination de l'ARN est couplé au fermenteur.

4.2.3. Troisième étape technique : la réduction du taux d'ARN

La présence d'ARN donne à la biomasse un goût désagréable. Il importe donc de les éliminer. Cette élimination se réalise en conditions stériles. Que ce soit à l'échelle pilote ou à l'échelle production, elle utilise les propriétés de l'ARNase cellulaire.

4.2.3.1. Le principe

En 1970, il fut mis en évidence qu'un choc thermique appliqué aux cellules aboutit à une série complexe de réponses biochimiques par la cellule, à savoir :

- une inactivation des protéases cellulaires,
- la décomposition des ribosomes aboutissant à la libération des ARN,
- l'inactivation d'un inhibiteur thermo-sensible de l'ARNase.

Ce traitement cause également une perte de la viabilité cellulaire. Dans la mesure où les ARNases sont thermo-résistantes, ce processus aboutit à permettre la désinhibition des ARNases pour dégrader les ARN en nucléotides et nucléosides qui diffusent à travers à travers la paroi cellulaire.

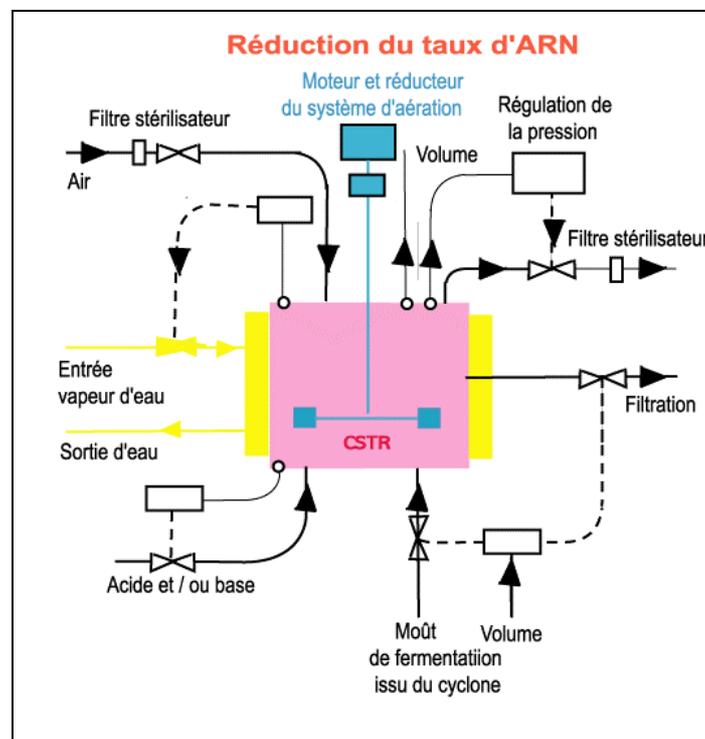
Les conditions de chauffage sont critiques : d'un côté il faut que la température de chauffage soit suffisamment haute pour que les protéases soient dénaturées et de l'autre il faut

empêcher la dénaturation des RNAses. Durant ce processus, le pH initial du fermenteur (6,0) est optimal et ne varie pas significativement en raison du pouvoir tampon du milieu. Ce pH est enregistré mais non contrôlé.

4.2.3.2. Le développement du procédé de réduction d'ARN

Durant ce processus, les composés de faibles poids moléculaire tels les acides aminés et les intermédiaires du cycle de Krebs diffusent également hors de la cellule si bien qu'approximativement 35 % du poids sec initial est perdu. A cause de cela, et parce qu'il y a peu d'hydrolyse de protéines, le pourcentage de protéines est alors augmenté par le processus de réduction d'ARN.

Le procédé mis au point résulte d'une modification d'un procédé original en plusieurs étapes : il est réduit à une seule étape prenant 20 - 30 minutes pour être complet. Le procédé a été breveté en 1976 et permet de réduire chez A3/5 le contenu d'approximativement 10% à environ 1% (les deux chiffres sur une base de poids sec) par un simple procédé d'élévation de la température ne nécessitant donc pas l'ajout d'aucun additif chimique.



La culture et le milieu issus du séparateur cyclone passent, dans des conditions aseptiques, dans une cuve agitée dans laquelle la réduction du taux d'ARN a lieu.

Les essais au laboratoire ont été effectués avec un réacteur tubulaire, mais un réacteur agité a été préféré pour ses capacités de "scale up" et pour la facilité de nettoyage.

Les conditions opératoires sont dérivées de celles d'expériences de laboratoire. Il fut trouvé que la température optimum du procédé est de 64°C, à savoir suffisamment élevée pour dénaturer toutes les protéases cellulaires, mais pas assez élevée pour dénaturer les

ribonucléases endogènes. Un temps de résidence moyen⁴ d'environ trente minutes, dans un réacteur agité ou dans un réacteur tubulaire, est optimal.

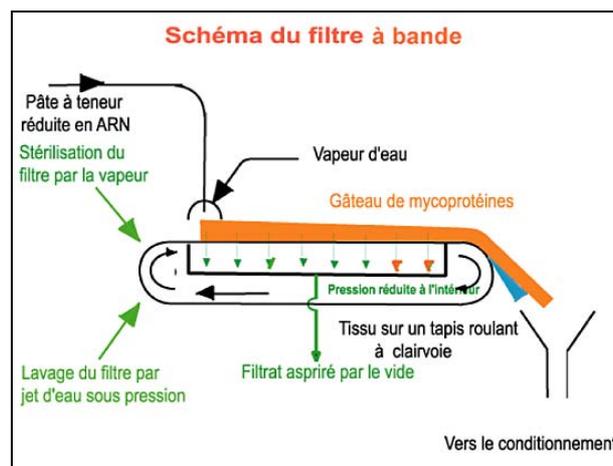
Dans la mesure où il s'agit d'un procédé aseptique, les règles appliquées au fermenteur en ce qui concerne la stérilisation et la maintenance préventive s'appliquent également ici.

Des mesures on line⁵ de pH, température, pression et volume sont effectuées automatiquement, dix fois par heure. Des échantillons sont prélevés pour des mesures off line⁶ au moins une fois par jour et des analyses sont effectuées (pH, contamination, par exemple) sur la suspension, le solide.

4.2.4. Récupération des mycoprotéines

La pâte issue de l'étape de réduction de l'ARN comprend le mycélium de teneur réduite en ARN, les produits solubles issus de la réduction en ARN et le milieu de culture utilisé. L'étape de récupération vise à éliminer de la pâte appauvrie en ARN les liqueurs de réduction d'ARN. Ce qui est récupéré (mycélium de teneur réduite en ARN) est dénommé mycoprotéine et est ensuite utilisable pour la formulation alimentaire.

L'étape de récupération peut être réalisée grâce à un filtre à bande.



Le *filtre à bande* comprend un tissu sur un tapis roulant qui est situé au dessus d'une chambre à pression légèrement réduite : la partie solide de la pâte (champignon) reste collée sur le tissu filtrant sous forme de ce qui est appelé "gâteau". Cette couche continue est ensuite détachée du tambour grâce à un couteau. Pour maintenir les standards d'hygiène, le tissu du filtre est lavé à l'eau et séché à chaque révolution.

Le "gâteau" issu du filtre est analysé à l'issue de chaque période de 8 heures de production en terme de comptage de micro-organismes totaux viables . Ces dispositions sont

⁴ Le temps de résidence est l'inverse du taux de dilution ($D = Q / V$); à savoir V / Q ; il s'agit du temps (théorique) passé par le liquide dans le bioréacteur. Le temps de résidence moyen est un paramètre expérimental exprimant le temps de séjour réel du liquide. Il est déterminé expérimentalement à partir de la distribution des temps de séjour.

⁵ mesures effectuées directement sur le fermenteur, sans prélèvement, grâce à des capteurs (essentiellement des électrodes)

⁶ mesures effectuées sur des prélèvements

valables tant pour le développement que pour la production. En production, cependant, plusieurs filtres tambour peuvent être utilisés en parallèle.

Le "gâteau" passe ensuite par une étape de mise en forme de commercialisation.

4.2.5. Conditionnement et conservation

Le gâteau humide de Quorn® mycoprotéin doit être traité comme tout autre aliment périssable. Ceci est dû à son grand degré d'humidité et à sa grande valeur nutritive pour les micro-organismes contaminants. Il a été montré que le Quorn® mycoprotéines humide peut être gardé jusqu'à 16 h dans des récipients non fermés hermétiquement à 25°C, 48 h à 4°C et plus d'un an si fermés hermétiquement et à - 25°C. Après déshydratation, cependant, le produit est assez stable pour être stocké plusieurs années, à température ordinaire. Il peut alors encore être consommé.

4.3. Composition chimique et aspects nutritionnels

Outre de définir les conditions optimales de culture en grand volume, un des objectifs de la phase de développement a été de produire les quantités de mycoprotéines nécessaires aux diverses analyses chimiques, nutritionnelles, toxicologiques. L'ensemble des résultats obtenus aura permis l'établissement du dossier d'autorisation de mise sur le marché.

Parmi les analyses effectuées, figurent les aspects chimiques et nutritionnels.

Le Quorn® est un aliment basses calories (80 kcal / 100 g), sans acides gras d'origine animale, sans cholestérol, à faible teneur en acides gras saturé et riche en fibres diététiques. Le contenu en protéines est comparable à celui du lait et du fromage.

Pour 100 g	Quorn®	Poulet sans peau	Bœuf émincé	Pomme de terre (baked)	(Mince) végétarien
Energie (kJ)	335	621	955	581	1441
Energie (kcal)	85	148	229	136	345
Protéines (g)	12,3	24,8	23,1	3,9	32,6
Glucides (g)	1,8	0	0	31,7	15,5
Lipides (g)	3,2	5,4	15,2	0,2	16,9
Fibres (g)	4,8	0	0	2,7	3,8

Information nutritionnelle

4.4. Les aspects commerciaux

4.4.1. L'accueil réservé au Quorn®

Au moment où la vente au public fut autorisée, la pénurie annoncée en protéines à la fin des années 70 ne s'est pas produite. L'objectif de Lord Rank n'était donc pas atteint. Pourtant, dans les pays de l'Ouest, la mycoprotéine Quorn® satisfaisait les besoins des années 1990, c'est-à-dire qu'elle fournit des aliments basses calories (80 kcal / 100 g) sans acides gras d'origine animale et sans cholestérol et faible en acides gras saturé et riche en fibres diététiques.

La publicité de Quorn® est ciblée sur les femmes âgées de 25-45 ans qui souhaitent réduire leurs apports de viande dans leur alimentation. On peut penser que les jeunes qui consomment de moins en moins de viande sont ou seront des consommateurs potentiels.

Vu le succès rencontré en Angleterre, Le Quorn® est également commercialisé dans d'autres pays : Pays-Bas, Belgique, Allemagne, Suisse, USA... et même France depuis le 4 septembre 2001.

4.4.2. Les formes commerciales du Quorn®

Le premier produit à base de mycoprotéines Quorn® fut une tarte vendue par Sainsbury en janvier 1985. Pour susciter l'intérêt du consommateur, il valait mieux, en effet, présenter Le Quorn® sous forme d'un mets traditionnel plutôt que sous une forme inconnue. Dans cette logique, diverses préparations ont été développées⁷ sous forme de plats tout prêts, ceci incluant des entrées, des ragoûts ("casseroles"), des desserts et des salades. Cette possibilité de diversification est liée aux importantes capacités d'absorption et de restitution de saveurs que possèdent les mycoprotéines Quorn® : ainsi peut-on préparer du Quorn® "aromatisé" au goût d'herbe, d'épices, de viande. Toutefois aucun additif correspondant au goût de poisson n'est disponible.

Ainsi, bien que le temps ait été long pour arriver à sa mise sur le marché (1963-1985), Quorn® est le seul "survivant" des programmes de POU initiés après 1960 et peut être regardé comme une "success story".

4.5. Bibliographie concernant le Quorn®

Angold Roger, Beech Gordon, Taggart, Food Biotechnology, Cambridge studies in Biotechnology 7, Cambridge University Press, 1988, chapters 5 and 6

Trinci Antony P. J., 1992, Myc. Res. 96 (1), 1 - 13, Myco-protein : A twenty-year overnight success story

Trinci Antony P. J., 1994, Microbioloy, 140, 2181 - 2188, Evolution of the Quorn myco-protein fungus : *Fusarium graminearum* A3/5

Information disponible (concerne plutôt l'aspect diététique) auprès de :

The Quorn Education Service
PO Box 361
Stockton on Tees
TS23 4YE - UK

⁷ En 1989, il y a 35 produits contenant des mycoprotéines offerts au consommateur pour un chiffre d'affaire annuel de 1,2 M GBP.

5. Ressources documentaires

Comme pour tous les domaines technologiques, il y a pléthore d'informations sur les biotechnologies et leur actualité : livres, revues, quotidiens, hebdomadaires, Internet.

Cela a deux conséquences : d'un côté, il est difficile, à notre niveau, d'avoir accès à toute l'information, d'un autre, la précision de l'information obtenue ne correspond pas forcément à ce qui est attendu. De plus, cette information est de plus en plus payante (abonnement à tel ou telle revue, réseau...) ou bien couverte par la confidentialité. Il est à penser que cette difficulté d'accès à l'actualité de l'information ne fera que croître dans l'avenir. Pourtant l'actualisation et l'attrait de nos cours, le maintien de la spécificité de notre enseignement se feront à cette condition.

Un moyen de remédier à cette difficulté est de généraliser la méthode de travail mise en œuvre au sein du réseau national STI biotechnologies concernant les réalisations pédagogiques : dans un premier temps, le partage de ce travail de recherche, puis dans un second temps, l'échange les informations obtenues via Internet et un site....

5.1. Bibliographie - Livres

5.1.1. Ouvrages généraux sur les biotechnologies et le génie biologique

Titre	Auteur	Éditeur	Lieu d'édition, date	ISBN
Biotechnologie	Scriban	Tec et Doc Lavoisier	Paris, 1999 (5 ^{ème} édition),	2-7430-0309-X
Biochemical Engineering Fundamentals	Bailey, Ollis	McGraw-Hill Book Company	New York, 1977, 1986 (2 nd édition)	0-07-003212-2
Basics of Biotechnology	Bu Lock, Kristiansen	Academic Press	London, 1987	0 12 140753 5
Biotechnology , a dictionary of terms	Walker , Cox	American Chemical Society Professional Reference Book	1995 (2 nd édition)	0-8412-2982-1
Biotechnology for Engineers ; biological systems in technological processes	Scragg	Ellis Horwood Limited	1988	0-7458-0226-5
Plant and animal cells : Process Possibilities	Webb, Mavituna	Ellis Horwood Limited	1987	0-7458-0145-5
Concepts in Biotechnology	Balasubramanian	Universities Press (India)	1996	81 7371 037 6

Basic biotechnology	Ratledge and Kristiansen	Cambridge University Press	2001 (2 nd edition)	0 521 77917 0
Biotechnology : the Science and the Business	Moses, Cape / Springham	Harwood Academic Publishers	Amsterdam, 1999 (2 nd edition)	90 5702 407 1
La révolution biotech de la santé ; la nouvelle économie industrielle de la pharmacie	Hamdouch, Depret	Elsevier	Paris, 2002	2-84299-284-9
Methods in Biotechnology	Schmauder, Schweizer, Schweizer	Taylor & Francis	London (UK) Bristol (USA), 1997	0-7484-0430-9

5.1.2. Ouvrages de génie génétique et de biologie moléculaire

Titre	Auteur / Editors	Éditeur	Lieu d'édition, date	ISBN
Génie génétique	Loncle, Amaudric, Jacoty	Doin Biosciences et techniques,	Paris, 1983	2-7040-0692-X
Gene cloning and DNA analysis	Brown	Blackwell Science	Oxford, 2001 (Fourth edition)	0 632 05901 X
Principles of Gene Manipulation	Old and Primrose	Blackwell Scientific Publication	Oxford, 1994 (Fifth edition)	0 632 03712 1
Essential Molecular Biology	Brown	Practical Approach Oxford University Press	Oxford, 2000 – 2001, 2 nd Edition	0 19 963642 7 (t. 1) 0 19 963644 3 (t. 2)
Cloning, Gene Expression, and Protein Purification ; Experimental Procedures and Process Rationale	Hardin, Pinczes, Rietl, Presutti, Miller, Robertson	Oxford University Press	New York, 2001	0 19 513294 7
Molecular cloning	Sambrook, MacCallum Russell,	Cold Spring Harbor University Press	Cold Spring Harbor	0-87969-577-3
Forensic DNA typing ; Biology & Technology behind STR Markers	Butler	Academic Press	San Diego San Francisco New York Boston London	0-12-147951-X

5.1.3. Ouvrages de génie fermentaire et de microbiologie industrielle

Une partie des ouvrages généraux est consacrée au génie fermentaire.

Titre	Auteur	Éditeur	Lieu d'édition, date	ISBN
Génie fermentaire	Deneuville	Biosciences et techniques, Doin	Paris, 1991	2-7040-0658-X
Principles of fermentation technology	Standbury, Whitaker and Hall	Pergamon	1995 (2 nd edition)	0 08 036131 5
Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology	Demain and Davies	American Society of Microbiology	Washington DC, 1998 (2 nd edition)	1 55581 128 0
Microbial Biotechnology ; Fundamentals of Applied Microbiology	Glazer, Nikaido	Freeman	New York,	0 7167 2608 4

5.1.4. Ouvrages de génie enzymatique

Une partie des ouvrages généraux est consacrée au génie enzymatique.

Titre	Auteur	Editeur	Lieu d'édition, date	ISBN
Génie enzymatique,	Loncle	Doin	Paris	
Génie enzymatique,	Coutouly	Doin – Masson	Paris, 1991	2 225 81972 6 2 7040 0657 1
Industrial Enzymology	Godfrey, West	Macmillan Press Ltd	Basingstoke, London, 1996 (2 nd edition)	0-333-594649
Enzymes : Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry	Palmer	Horwood Series in Chemical Sciences Horwood Publishing	Chichester, 2001	1- 898563-78-0
Applied Biocatalysis	Cabreal, Best, Boross, Tramper	Harwood Academic Publishers	Chur (Switzerland)	3 7186 5391 5

5.1.5. Bioinformatique

Titre	Auteur	Éditeur	Lieu d'édition, date	ISBN
Introduction to Bioinformatics	Attwood , Parry-Smith	Pearson Education Limited	Harlow, 1999	0-582-327881
Bioinformatics ; Sequence and GenomeAnalysis	Mount	Cold Spring Harbor Laboratory Press	Cold Spring Harbor, 2001	0 87969 597 8
Bioinformatics ; a Practical Guide to the Analysis of genes and proteins	Baxevanis, Ouelette	Wiley Interscience , John Wiley & Sons	New York, 2001 (2 nd edition)	0 471 38391 0

5.1.6. Divers

Titre	Auteur	Éditeur	Lieu d'édition, date	ISBN
Biotechnological Innovation in Food Processing		BIOTOL, Biot by open learning, Butterworth – Heinemann	Reed Educational and Professional Publishing Ltd, 1991	0-7506-1513-3
Product Recovery in Bioprocess Technology		BIOTOL, Biot by open learning, Butterworth – Heinemann	Reed Educational and Professional Publishing Ltd, 1992	0-7506-1510-9
Biotechnological innovation in Chemical Synthesis		BIOTOL, Biot by open learning,	Reed Educational and Professional Publishing Ltd, 1997	0-7506-0561-8
Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry ans Biotechnology	Ninfa, Ballou	Fitzgerald Science Press, Inc	Bethesda, Maryland (USA)	1 891786 00 8
Biotechnology : proteins to PCR, a Course in Strategies and in Lab techniques	Burden ans Whitney	Birkhäuser	Boston, 1995	0 8176 3756 7
Biotechnology and the Consumer	Knoppers and Mathios	Kluver Academic Oublishers	Dordrecht / Boston / London	0 7923 5541 5
A consumer guide to GM food ; from green genes to red herrings	McHughen	Oxford University Press	Oxford, 2000	0 19 850714 3
Les experts face au risque : le cas des plantes transgéniques	Roy	Partage du savoir, Le Monde - PUF	Paris, 2001	2 13 052253 X

Prévenir les risques : de quoi les experts sont ils responsables ?	Decrop et Galland	Société, L'Aube	1998	2 87678 405 X
Théorie générale du risque	Bouyssou	Economica	Paris, 1997	
Plant, Genes and Agriculture	Chripels, Sadava	Jones and Bartlett Publishers	Boston, London, 1994	0 86720 871 6
DNA Technology, The Awesome Skill	Alcarno	Harcourt / Academic Press	San Diego, 2001, 1996	0 12 048920 1
Les plantes transgéniques en agriculture ; Dix ans d'expérience de la Commission du Génie Biomoléculaire	Kahn	John Libbey Eurotext, Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation, Ministère de l'Environnement	Montrouge, London, 1996	2 7420 0149 2
Les animaux transgéniques	Houdebine	Tec et Doc Lavaoisier	Paris, 1998	2'7430-0234-4
Nouvelle encyclopédie de bioéthique ; Médecine, Environnement, Biotechnologie	Hottois, Missa	DeBoeck Université	Bruxelles, 2001	2-8041-3712-0
The Chemical Industry in Europe, 1850-1914 : Industrial Growth, Pollution, and Professionalization	Homnurg, Travis, Schröter	Chemist and Chemistry, Kluwer Academic Publishers	Dordrecht, Boston, London, 1998	0 7923 4889 3
A History of Lactic Acid Making	Benninga	Chemist and Chemistry, Kluwer Academic Publishers	Dordrecht, Boston, London, 1990	0 7923 0625 2
Le progrès et ses ennemis	Sorman	Fayard	Paris, 2001	2 213 61007 X
Biotechnologies ; le droit de savoir	Tobelem et Briand	John Libbey Eurotext	Montrouge, 1998	2 7420 0220 0
L'opinion publique et la science ; à chacun son ignorance	Bensaude Vincent	Les empêcheurs de penser en rond, Sanofi Synthélabo	Paris, Fev 2000	2 84324 141 3
Le siècle Biotech ; le commerce des gènes dans le meilleur des mondes	Rifkin	La Découverte	Paris, 1998	2 7071 2851 1

The uses of Life	Bud	Cambridge University Press	Cambridge, 1993	0-521-38240-8
The Golden Helix ; Inside Biotech Ventures	Kornberg	University Science Book	Sausalito, CA, 1995	0-935702-32-6

5.2. Bibliographie - Revues et journaux

Depuis schématiquement une vingtaine d'années, avec l'affaire du sang contaminé et celle de l'hormone de croissance, l'actualité biologique dépasse largement le monde des chercheurs et des scientifiques : les media se font l'écho de toutes les informations touchant ce domaine, que ce soient des découvertes scientifiques, des progrès techniques, des scandales, des espoirs. Ainsi, à partir de ce moment, les journaux d'information générale (*Le Monde*, *Libération*, *Le Figaro*, *L'Humanité*) et les agences de presse (AFP) ont inclus des pages hebdomadaires traitant de ces sujets. Il s'agit là d'une source d'information à ne pas négliger, même si la précision n'est pas au rendez vous. Cette information est également disponible sur Internet. Il en sera question dans ce qui suit.

Bien évidemment, les revues scientifiques se sont elles aussi adaptées, en ce qui les concerne, à cette nouvelle situation, ne serait ce qu'en modifiant le contenu éditorial des revues ou en créant d'autres.

5.2.1. Journaux et revues scientifiques de recherche

Les journaux scientifiques de recherche - tels que *Nature*, *Science*, *Bio/Technology*¹, *Nature Biotechnology*, *Cell*, *Biotechnology Bioengineering* sont des revues primaires et ils constituent une source d'information essentielle. Pour nous, l'intérêt principal d'une telle littérature est l'accès aux aspects techniques. Sont également fondamentales, les revues de « reviews » (exemple : *Trends in Biotechnology*), publiant des articles de synthèse qui font le point sur une question donnée : ceux ci nous permettent d'actualiser nos cours. Il faut également dire que ces « reviews » sont également de plus en plus présentes dans les journaux scientifiques.

Disponibles dans les laboratoires ou dans les bibliothèques, l'accès à ces revues est maintenant possible sur Internet (cf. *infra*).

¹ La revue **Bio/Technology** est devenue en 1996 **Nature Biotechnology**. Elle fait partie du groupe « Nature » (voir "<http://www.nature.com/>") et a abandonné, de ce fait, sa sensibilité aux aspects « technologie industrielle », se centrant sur les aspects recherche. Par contre les aspects légaux et informations financières y sont développés (voir "<http://www.nature.com/nbt/>").

5.2.2. Revues de vulgarisation

Des revues de vulgarisation telles *Biofutur*, *La Recherche*, *Pour la Science*, *New Scientist*, *Scientific American*... publient des articles de synthèse susceptibles de nous intéresser.

À signaler concernant les sujets qui nous intéressent dans *La Recherche* :

N°	Date	Pages	Titre
327	Janvier 2000	27 - 44	Dossier : Qui a peur des OGM ?
334	Septembre 2000	28 - 40	Dossier : Clonage : la nature résiste
339	Février 2002		Numéro spécial : Le risque alimentaire

Dans la revue *Biofutur* :

N°	Date	Pages	Titre
192	Septembre 1999		Dossier : plantes transgéniques
193	Octobre 1999	42 - 45	"Terminator", une logique inéluctable ?
204	Octobre 2000	42 - 45	Dossier : Brevets : jusqu'où peut on aller ?
207	Janvier 2001		Dossier : Les enjeux écologiques des biopesticides
209	Mars 2001		Dossier : Pour ou contre la viande aux hormones ?
206	Décembre 2001		Les nouvelles frontières de la génomique
218	Janvier 2002		Dossier : La querelle des OGM
221	Avril 2002		Les biotechs en brevet
223	Juin 2002		Clonage : les États-Unis dans la tourmente
224	L'été-Août		Odyssée du végétal
225	Sept 2002	19 - 48	Bioinformatique : du gène au calcul et vice et versa
	Octobre 2002 Hors série 3	30 - 50	Les risques alimentaires

À quoi il faut ajouter les *Technoscope*, synthèses faisant le point d'un point de vue technique sur un sujet donné.

Numéro de Biofutur	Numéro du Technoscope	Date	Sujet
153	80	Fev 1996	Les vecteurs YAC et BAC
154	81	Mars 1996	La mutagenèse dirigée
155	82	Avril 1996	La fermentation industrielle
158	85	Juil-Aout 1996	Les outils du séquençage
159	86	Sept 1996	Les biocapteurs
163	88	Janv 1997	Le clonage végétal
166	91	Avr 1997	Les puces à ADN
167	92	Mai 1997	La rhéologie 1ère partie
168	93	Juin 1997	La rhéologie 2ème partie
170	95	Sept 1997	La chromatographie rapide
171	96	Oct 1997	Les applications et l'avenir de la PCR

173	97	Dec 1997	La cristallographie des protéines
176	101	Mars 1998	Les photobioréacteurs
178	103	Mai 1998	L'électrophorèse capillaire
183	108	Nov 1998	La cytométrie de flux
187	111	Mars 1999	La fermentation automatisée
190	113	Juin 1999	La transgénèse animale
191	114	Juil Août 1999	La génomique fonctionnelle des végétaux
192	115	Sept 1999	Les outils d'étude du protéome
196	118	Jan 2000	Les techniques d'analyse de la réponse immunitaire
197	119	Fév 2000	PCR électronique et séquençage du génome humain
200	122	Mai 2000	30 ans de biotechnologie
201	123	Juin 2000	Étude des canaux ioniques : la patch-clamp
202	124	Juil Août 2000	Promoteurs inductibles et recombinaisons
203	125	Sept 2000	Bioessais, mycotoxines et risque alimentaire
204	126	Oct 2000	Vers la protéomique inverse
207	129	Jan 2001	La production industrielle de vecteurs de thérapie génique
210	132	Avr 2001	Thérapie génique et électrotransfert d'ADN
213	135	Juil Août 2001	Le ribosome Display
214	136	Sept 2001	L'analyse électrochimique des mutations de l'ADN
219	139	Fév 2002	La PCR en temps réel
221	141	Avr 2002	La protéomique différentielle

5.2.3. Revues pédagogiques

Les associations d'enseignants éditent des revues dans lesquelles se trouvent des informations concernant les biotechnologies. En fait, comme on l'a indiqué dans l'introduction de ce dossier, le terme "biotechnologies" n'est abordé que dans sa composante "mise au point au laboratoire" et la mise en œuvre à différentes échelles n'est quasiment jamais abordée. Exceptionnelles sont actuellement, même dans L'OPERON, les informations publiées concernant leurs aspects.

Ainsi, nombreuses sont les questions qui se posent dans le contexte actuel de réforme des programmes de l'enseignement technologique (BTS Biotechnologie / Biochimiste, Baccalauréat STL – BGB). Parmi celles-ci :

- quelle importance accorder à l'aspect "mise en œuvre à grande échelle" dans les enseignements technologiques et professionnels ?
- cette prise en compte doit elle s'accompagner de mise en œuvre d'une pédagogie spécifique ?

- en cas de réponse positive, en quoi consiste cette spécificité ?
- comment en mettre en œuvre les différents aspects dans les diverses formations ?

Quelles sont les contraintes au niveau de notre fonctionnement, de notre formation et du recrutement ? Voilà un chantier qui mérite d'être ouvert.

5.2.3.1. En France

Ainsi les professeurs de biologie de l'enseignement secondaire français appartiennent, pour la plupart, soit à l'UPBM, s'ils sont professeurs de l'enseignement technique ou professionnel, soit à l'APBG, s'ils appartiennent à l'enseignement général. Chacune de ces deux associations édite une revue.

Nom de l'association	Adresse postale	Nom de la revue
Union des professeurs de Physiologie, Biochimie et Microbiologie (UPBM)	Lycée La Martinière-Duchère Avenue Andrei Sakharov 69 338 LYON CEDX 09	L'OPERON
Association des Professeurs de Biologie Géologie (APBG)	Secrétariat national de l'APBG BP 8337 69 356 LYON CEDEX 08	BIOLOGIE - GEOLOGIE

5.2.3.2. À l'étranger

La revue *BIOTEchnology Education* a été fondée en 1989 par Paul Wymer², alors directeur du NCBE de Reading. Elle visait à promouvoir un aspect pluridisciplinaire des biotechnologies, essentiellement centré sur l'échelle laboratoire. Sa parution aura été de courte durée.

La revue américaine classique *Biochemical Education* est devenue récemment *Biochemistry and Molecular Biology Education*

5.3. Webographie

Il faut souligner par rapport à l'utilisation des informations se trouvant sur Internet que l'information est souvent actualisée, ce qui veut dire que les arborescences des sites sont modifiées et que beaucoup de liens peuvent ne plus être fonctionnels. Il est donc sage :

- d'enregistrer immédiatement les pages intéressantes, celles-ci pouvant être introuvables le lendemain,
- de tenter de remonter dans l'arborescence : la page cherchée peut simplement avoir changé de place,

Les moteurs de recherche classiques (comme "<http://www.google.com>") peuvent permettre d'accéder à divers sites. De plus un certain nombre de sites encyclopédiques ou spécialisés rassemblent des liens concernant divers aspects des développements actuels de la biologie et des biotechnologies.

² membre, ultérieurement, de l'E.I.B.E.

5.3.1. Sites d'encyclopédies

Nom	Adresse
Quid	www.quid.fr
Encyclopedia Universalis	www.encyclopediauniversalis.fr

5.3.2. Sites des journaux et revues

Actuellement, tous les journaux et revues possèdent des sites Internet ; ces sites offrent à leur tour de nombreux liens vers d'autres sites intéressants.

5.3.2.1. Journaux d'information générale

En général, en plus de l'accès sommaire des derniers numéros du journal, il est maintenant possible d'avoir accès aux derniers articles concernant les sciences. Des dossiers, par exemple sur les OGM, la thérapie génique, les cellules souches, peuvent être également en accès libre de même que les sommaires des anciens numéros. L'accès aux articles anciens eux mêmes est payant. Intéressant comme points de repères pour reconstituer une chronologie.

Le Monde	www.lemonde.fr
Libération	www.liberation.fr
Le Figaro	www.lefigaro.fr
L'Humanité	www.humanite.presse.fr/journal/

5.3.2.2. Revues scientifiques

En général, l'accès au sommaire des derniers numéros des revues scientifiques est maintenant possible sur Internet. Parfois même, certains dossiers ("génomique", par exemple sur le site de *Nature*) sont également en accès libre de même que les sommaires des anciens numéros (souvent à partir de 1996).

L'accès aux articles est payant, à moins d'être abonné à la revue. Il est cependant parfois possible d'avoir un accès gratuit pour une journée.

Description	Adresse
La Recherche	www.larecherche.fr
Pour la Science	www.pourlascience.com
Scientific American	www.scientificamerican.com
Biofutur	www.biofutur.com
Nature	www.nature.com
Nature Biotechnology	www.naturebiotechnology.com
Science	www.science.org
New Scientist	www.newscientist.org

5.3.3. Fabricants de matériel

5.3.3.1. Génie génétique

Description	Adresse
Matériel et réactifs pour le génie génétique	www.promega.com
Filtration ; membranes filtrantes pour le laboratoire et l'industrie (US)	http://www.amicon.com/
Chromatographie (HPLC) : échelle	www.waters.com/
Réactifs et matériels de génie génétique	www.clontech.com/
Réactifs et matériels de génie génétique Réactifs et matériels pour la chromatographie basse, moyenne et haut pression) , électrophorèse, biologie moléculaire et génie génétique ; échelle analytique, préparative, industrielle	www.apbiotech.com
Qiagen	www.qiagen.com/

5.3.3.2. Génie fermentaire

Description	Adresse
Société américaine spécialisée dans les logiciels de contrôle de bioprocédés industriels ; version de démonstration téléchargeable (version complète sans possibilité de sauvegarde) ; intéressant mais complexe ; intéressera les collègues enseignant le génie fermentaire	www.intelligen.com
Société suisse de matériel de fermentation	www.bioengineering.ch/php/home/index_1-en.php
Vogelbusch : fabricant autrichien de fermenteurs ; Gamme de produits (extrait) Installations de fabrication d'éthanol Installations d'utilisation de vinasse Installations de distillation Installations de déshydratation Installations de fermentation continues Installations de fermentation discontinues Installations de rectification Installations de séparation de levure Installations de fermentation d'acide acétique Installations de production d'acide citrique Installations de production d'acide gluconique Installations de production d'acide lactique Installations de production du fructose Installations de production du sorbitol Installations de production du sucre	www.vogelbusch.com/

liquide Installations de raffinage du sirop de glucose Installations de saccharification de l'amidon Installations de saccharification de l'amidon par enzymes	
Répertoire de fournisseurs de matériels et d'installations de fermentation	http://www.bartens.com/

5.3.3.3. Génie enzymatique

Description	Adresse
Novo, un des principaux fabricants d'enzymes industriels ; à noter la partie du site intitulée "Discover enzymes", "The discovery of industrial enzymes" et le magazine "BioTimes"	www.novo.dk www.novozymes.dk/cgi-bin/bvisapi.dll/portal.jsp
Corn Product International, société US qui transforme les constituants du maïs	www.cornproducts.com/index.html www.enzymebio.com/html/EB/History.html
Firme Lactel qui commercialise "Matin léger", lait appauvri de plus de 80 % en lactose	www.lactel.fr/franc/moul_prod.htm

5.3.4. Quelques sociétés industrielles (pharmaceutiques et autres)

D'une manière générale, les différentes structures publiques ou privées (celles citées ci dessous et les autres) font un gros effort

- pour expliciter (démystifier) les fondements théoriques des connaissances mises en œuvre dans l'élaboration des produits mis sur le marché

- pour présenter les bénéfices que l'on est en droit d'attendre des recherches en cours, par exemple dans le domaine de la génomique

- pour s'enquérir des attentes du public afin de le convaincre des bienfaits des produits en développement.

Ainsi, dans le cadre du *Roche Genetics Education Program*, la société Roche propose-t-elle un CD ROM sur la génétique humaine et les maladies génétiques. De même Aventis, par l'intermédiaire de la Fondation Aventis a-t-elle lancé "Science Génération" opération conjointe avec la Fondation de France pour les années 2001-2004.

5.3.4.1. Structures privées

Les sites des sociétés privées s'adressent de plus en plus aux actionnaires et aux investisseurs. Ainsi, l'historique de la société est souvent présenté, résumé en une page.

Pour les sociétés les plus importantes, ce site ("officiel") renvoie à plusieurs sites annexes visant à fournir aux clients potentiels des informations spécifiques sur l'intérêt des divers types de produits proposés : intérêt, efficacité, quantités à mettre en oeuvre, la bibliographie sur le sujet. Ces sites annexes sont ainsi consacrés à la santé humaine, la santé animale, l'agriculture. À ces occasions peuvent figurer des informations scientifiques de base (comme celles de la génétique, du génie génétique, du clonage), ce afin de calmer les éventuelles angoisses de l'utilisateur. Le plus souvent ces informations restent finalement basiques : elles peuvent satisfaire des élèves mais pas leurs professeurs. De plus, elles sont parfois relativement difficiles à trouver au sein de l'arborescence.

Description	Adresse
Première société de biotechnologie à avoir été fondée dès 1976 ; a à son actif beaucoup de réalisations (US)	www.genentech.com
Société de biotechnologie (Suisse)	www.roche.com www.roche-genetics.com
Société de biotechnologie (France - Allemagne)	www.aventis.com www.aventis.co.uk/
Société de biotechnologie (Suisse)	www.novartis.com
Société privée issue de la fusion de Zeneca et de Novartis	www.syngenta.com/en/index_flash.asp www.syngenta-agro.fr/index_flashhome.asp
Société privée US spécialisée dans le séquençage du génome humain ; accès payants aux données	www.celera.com
Société de biotechnologie américaine bien connue pour son Round. Up ^{TR}	http://www.monsanto.com
Société américaine créant des logiciels de contrôle d'installations industrielles de fermentation ; version de démonstration téléchargeable (version complète sans possibilité de sauvegarde) ; intéressant mais complexe ; intéressera les collègues enseignant le génie fermentaire	http://www.intelligen.com
Genencor International is a global leader in the invention and application of a powerful, integrated genomics technology that we call our i-biotech solution.	http://www.genencor.com/webpage_templates/home.php3

Corn Product International : traitement de l'amidon de maïs	http://www.cornproducts.com/index.html http://www.enzymebio.com/html/EB/History.html
Heineken : premier producteur européen de bière	http://www.heineken.nl/
Budweiser : premier producteur mondial de bière	http://www.budweiser.com/
Dow AgroSciences	http://www.dowagro.com/homepage/index.htm
Département agronomie de Bayer	http://www.agro.bayer.com/

5.3.4.2. Structures publiques et semi-publiques

Description	Adresse
Centre national de séquençage, en charge du séquençage du chromosome 14	http://www.genoscope.org
INRA	www.inra.fr
Institut Pasteur	www.pasteur.fr

5.3.5. Sites d'institutions

5.3.5.1. Institutions scientifiques

Description	Adresse
Palais de la Découverte	www.palais-decouverte.fr
Institut Pasteur	www.pasteur.fr
Cité des Sciences et de l'Industrie de La Villette	http://www.cite-sciences.fr/francais/indexFLASH.htm
INSERM	www.inserm.fr

5.3.5.2. Administration centrale

Description	Adresse
Sénat	www.senat.fr
Site Comité Consultatif National d'éthique	www.ccne.fr
Site commission de génie biomoléculaire	http://www.agriculture.gouv.fr/alim/part/cgbm.html
Ministère de l'Agriculture et de la Pêche	http://www.agriculture.gouv.fr/accueil.htm
Site du Ministère de l'Agriculture sur les OGM	http://www.agriculture.gouv.fr/OGM/ogm.htm
Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement	http://www.environnement.gouv.fr/
Agence française de sécurité sanitaire des aliments	http://www.afssa.fr/

5.3.5.3. Sites administration européenne

Description	Adresse
Directive 98/81/CE du Conseil du 26 octobre 1998 modifiant la directive 90/219/CEE relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés	http://europa.eu.int/eur-lex/fr/lif/dat/1998/fr_398L0081.html

5.3.6. Sites d'associations ou d'organismes susceptibles d'agir comme groupes de pression

Description	Adresse
Organisation Greenpeace	www.greenpeace.org
The Australian Biotechnology association	http://www.ausbiotech.org/
European Food Information Council (UFIC) association indépendante, à but non-lucratif. Il a été créé pour apporter des informations scientifiques sur l'alimentation aux consommateurs, aux professionnels de la santé, aux enseignants et éducateurs, aux leaders d'opinion et aux médias.	www.eufic.org (en anglais) http://www.eufic.org/fr/home/home.htm (en français)
Life International : association mondiale des industriels de la protection des végétaux	http://www.gcpf.org/
Union des industriels de la protection des plantes (syndicat professionnel constitué le 6 juin 1918 ; 29 entreprises y adhèrent ; « Nécessaire aux plantes comme aux hommes, l'industrie phytosanitaire doit se faire comprendre de son environnement technique, juridique, économique et social. L'industrie phytosanitaire doit convaincre »).	http://www.uipp.org/
“Welcome to the Knowledge Center, sponsored by Monsanto. We hope you will find this evolving collection of news items, technical reports and other documents useful, and that the material assembled here -- which represents many points of view -- will promote a deeper understanding of agricultural biotechnology”.	http://www.biotechknowledge.monsanto.com/

5.3.7. Sites pédagogiques

5.3.7.1. Sites nationaux

Description	Adresse
Site réseau national biotechnologies et divers sites académiques	www.educnet.education.fr/bio/reseau.htm
Site réseau national SVT	www.educnet.education.fr/svt/default.htm
Union des professeurs de Physiologie, Biochimie et Microbiologie (UPBM)	www.upbm.net
Association des Professeurs de Biologie Géologie (APBG)	www.apbg.asso.fr

5.3.7.2. Sites pédagogiques étrangers

5.3.7.2.1. Centres européens

L'European Initiative for Biotechnology Education (E.I.B.E.) ("<http://www.rdg.ac.uk/EIBE/>") groupe de pédagogues européens des biotechnologies ayant réalisé, entre 1991 et 2000, un corpus de 18 modules sur divers thèmes des biotechnologies ; créés en anglais, certains de ces modules ont été traduits en français et sont accessibles au format PDF sur le site - site EIBE hébergé par l'Université de Reading (UK) ("<http://www.rdg.ac.uk/EIBE/>") ou site EIBE hébergé par l'Université de Kiel (D). ("<http://www.eibe.info/>")

En consultant ces modules³ réalisés pour l'enseignement général par des enseignants essentiellement de culture anglo-saxonne, on prendra conscience, d'un côté, de la différence de perspectives entre l'enseignement général et l'enseignement technologique / professionnel et, de l'autre, de la modeste part prise par la transmission de connaissances telle que nous la pratiquons. Ces unités veulent mettre en œuvre une pédagogie centrée essentiellement sur l'aspect expérimental (limité au qualitatif) et sur le jeu et la discussion, sans oublier le théâtre.

Numéro du module	Titre (traduction française)	Version anglaise	Version française
1	Microbes et molécules	X	X
2	Empreintes génétiques	X	
3	Biscuits et biotechnologie	X	X
4	La génétique humaine en questions	X	X
5	Fermentation	X	
6	Un modèle d'ADN	X	X
7	Génétique humaine	X	X
8	Génétique : un débat éthique	X	X
9	Plantes transgéniques :	X	X
10	Plantes transgéniques :	X	X
11	Animaux transgéniques	X	
12	Simulation d'une réunion du Conseil de l'Europe à propos des manipulations génétiques	X	
14	Le projet génome humain	X	

³ ainsi que La Lettre de l'E.I.B.E. ("<http://www.rdg.ac.uk/EIBE/NEWSL.HTM>")

15	Biotechnologies et pays émergents	X	
16	Microorganismes et environnement	X	
17	Biotechnologie : passé et présent	X	
18	La famille EIBE	X	
19	L'enseignement de biotechnologies par le théâtre	X	

Le National Centre for Biotechnology Education - NCBE ("<http://www.rdg.ac.uk/NCBE/>") est une structure, financièrement indépendante, intégrée à l'Université de Reading (UK) : son rôle est de servir de soutien à l'enseignement des biotechnologies dans l'enseignement primaire et secondaire du Royaume Uni. Pour cela, le NCBE publie des documents pédagogiques (tel le fascicule "*Practical biotechnology*" dont il sera question plus loin), d'initiations pour les écoles, commercialise des produits de laboratoire (enzymes industriels de chez Novo, par exemple) et met au point des kits d'initiation, comme le kit sur le phage lambda. Les liens entre le NCBE et EIBE ont été très étroits.

5.3.7.2.2. Centres américains :

Description	Adresse
Site pédagogique US	www.ahpcc.unm.edu/~aroberts
The Dolan DNA Learning Center (DNALC) is the world's first science center devoted entirely to public genetics education and is an operating unit of Cold Spring Harbor Laboratory, an important center for molecular genetics research. (US)	http://www.dnalc.org/
Site pour les enseignants du National Health Museum (US) "The National Health Museum will educate, engage and inspire people to understand the past, present and future of health and health science and empower them to act upon that information to enhance their individual, family and community health".	http://www.accessexcellence.org/
Diapositives PPT sur le tPA (84 et suivantes) ; site de l'Université du Michigan Management and Prevention of Vascular Thrombosis Benedict R. Lucchesi, Ph.D., M.D. Department of Pharmacology University of Michigan Medical School	http://www.umich.edu/~pharm660/AnticoagAntiplatelet/sld084.htm

“A laboratory manual on the WEB” ; Cold Spring Harbour Laboratory Press Site en rapport avec l’ouvrage de techniques de laboratoire "Molecular Cloning"	www.molecularcloning.com/
“Welcome to the Knowledge Center, sponsored by Monsanto . We hope you will find this evolving collection of news items, technical reports and other documents useful, and that the material assembled here -- which represents many points of view -- will promote a deeper understanding of agricultural biotechnology”.	http://www.biotechknowledge.monsanto.com/

6. En pratique : pistes pédagogiques

Un peu de réflexion pédagogique ...

Idéalement, toute pratique d'un enseignement technologique dans le domaine des biotechnologies se devrait d'être ancrée sur les réponses (consensuelles) nationale et régionales à des questions telles que "Qu'est ce que les biotechnologies ?", "Que doivent être les divers niveaux de formation dans ce domaine, compte tenu de la situation actuelle de l'emploi et de son évolution prévisible au niveau national et au niveau régional ?", "Que faut-il enseigner au niveau baccalauréat technologique (STL, BGB) et au niveau post-baccalauréat pour répondre à la demande actuelle et future du milieu professionnel ?". Ces réponses devraient prendre en compte les divers types de spécificité des biotechnologies, à savoir :

- une *spécificité purement technique* (sa complexité - mélange des sciences exactes, de celles de l'ingénieur, de l'informatique -, son évolution - vers la génomique, la protéomique, la bioinformatique)

- une *spécificité culturelle* dans la mesure où ses pratiques ont, au moins potentiellement, un fort impact sur la société et sur l'environnement.

Ces deux spécificités peuvent être rassemblées sous le vocable de l'interdisciplinarité. Ainsi, tout enseignement des biotechnologies se doit, pour être fidèle à son essence même, d'être interdisciplinaire. Telle aura été un peu la trame sous-jacente (le fil d'Ariane) du présent dossier.

Or, cet enseignement des biotechnologies tel que nous sommes amenés à le pratiquer, s'inscrit dans le cadre de programmes élaborés par les autorités pédagogiques et administratives compétentes compte tenu de la législation en vigueur. Si le terme interdisciplinarité est employé, les diverses pesanteurs et contraintes font qu'il reste le plus souvent un vœu pieux...

Ainsi, nous nous trouvons confrontés à la question fondamentale qui reste "Comment enseigner les biotechnologies à nos élèves / étudiants ?". Les éléments du dossier présentés ici devraient faciliter sa mise en pratique nous permettant d'intervenir dans nos classes avec des collègues non seulement des autres disciplines scientifiques, mais encore de disciplines littéraires telles que français, philosophie, histoire-géographie et anglais...

En ce sens la mise en œuvre effective des TPE permettra de mettre cela en pratique.

6.1. Complément du cours

Ces activités en marge du cours pourront être l'occasion d'un apprentissage d'une certaine autonomie et de la capacité d'effectuer des recherches bibliographiques, capacité très développée chez les étudiants d'autres pays, anglo-saxons en particulier. De plus il s'agira d'une occasion de rédaction, de travail en commun et de réaliser une présentation orale dans le cadre du cours, de TD ou des TPE (travaux pédagogiques encadrés).

6.1.1. Aspects généraux des compléments de cours

6.1.1.1. Modalités organisationnelles

L'activité la plus classique consiste en une recherche individuelle ou en groupe de 2 à 3 élèves ou étudiants sur un thème plus ou moins large, la bibliographie étant fournie. Elle pourrait donner lieu à un écrit avec exposé oral. Il s'agit d'un travail pluridisciplinaire à

réaliser avec des professeurs d'économie et de légalisation, d'anglais, d'histoire-géographie, de philosophie...

Cela peut faire l'objet d'une initiation aux techniques de recherche bibliographique dans les journaux, dans les bibliothèques universitaires, sur Internet. Ceci suppose un important travail de préparation (rassemblement du corpus, initiation aux techniques documentaires...). La recherche de l'illustration permettrait une initiation aux problèmes posés par la propriété intellectuelle. Les productions pourraient faire l'objet d'une mise en ligne sur le site de la classe, de l'établissement scolaire.

6.1.1.2. Thèmes suggérés

Pourront être envisagés les divers produits obtenus par les biotechnologies, à savoir :

- des produits à usage industriel comme l'acide lactique, gluconique, citrique, des produits à usage pharmaceutique comme les hormones (insuline, HGH, somatostatine), les interleukines, les interférons...

- des produits à usage alimentaire comme l'acide citrique, les divers additifs alimentaires (agents gélifiants, de texture, épaississants),

- des produits classiques comme la bière, le pain, le sucre...

De même pourront être abordés :

- des domaines nouveaux comme la génomique, la protéomique, la thérapie génique, le clonage,

- l'utilisation de microorganismes (utilisation des *Bacillus*, des *Streptomyces*, des *Aspergillus*), de cellules ou d'organismes,

- la bioinformatique,

- les maladies génétiques (leur connaissance et leur traitement).

Bien évidemment, une fois le thème choisi, il faudra préciser dans le détail les divers aspects à étudier, à savoir, idéalement, au-delà de la technologie et ses fondements scientifiques, les aspects relevant de l'économie, du droit (brevets), de l'éthique, de la géographie, de l'histoire.

6.1.2. Veille pédagogique

Il s'agirait pour un groupe d'élèves ou d'étudiants de se centrer sur un sujet donné comme un des thèmes abordés ici tels que les chèvres transgéniques, le maïs transgénique ou un autre thème d'actualité) et de rechercher dans les journaux et revues - papier et Internet - toutes les informations concernant l'actualité de ce thème afin d'en suivre l'évolution

6.1.3. Visite de laboratoires et d'installations industrielles

Il est toujours intéressant de visiter des installations industrielles, afin de faire prendre conscience de la "culture industrielle". Le succès de l'opération est lié à une bonne préparation tant avec les élèves ou étudiants qu'avec les responsables de ces installations.

D'abord, il importe que les élèves ou étudiants soient bien préparés à ce qu'ils vont voir, en un mot qu'ils sachent apprécier – techniquement et humainement - le travail réalisé dans l'usine et son organisation.

Ensuite, il est indispensable que ce qui est présenté soit intéressant pour les jeunes : des contacts préliminaires devront avoir été pris pour définir ce qui sera présenté et comment

cela sera présenté. Une adaptation est à faire en fonction du niveau et du type de formation des visiteurs.

6.2. Travaux pratiques

Les travaux pratiques ne s'improvisent pas. On aura compris que la mise en œuvre d'enzymes s'avère plus simple que celle de cellules. La manipulation de cellules procaryotes ou eucaryotes nécessite un matériel – et un personnel – spécifiques, en particulier en ce qui concerne la nécessité de stérilisation pour la préparation et la destruction des milieux de culture. Les établissements technologiques ayant des sections STL option Biochimie – Génie biologique possèdent de tels équipements et le savoir-faire nécessaire.

D'autre part, les manipulations de génie génétique doivent faire l'objet d'une déclaration auprès du Ministère de l'Agriculture.

6.2.1. Niveau Baccalauréat :

Il s'agit de manipulations ne nécessitant qu'un matériel simple (classes d'enseignement général), susceptibles, *a priori*, d'être mises en œuvre dans le cadre des TPE en classes de l'enseignement technologique et général.

Ces manipulations sont essentiellement qualitatives. Elles peuvent, sans doute, être rendues quantitatives, moyennant un travail bibliographique (utilisation de l'Internet), analytique, envisageable dans le cadre des TPE de l'enseignement technologique. La réalisation pratique demanderait la mise en œuvre d'un matériel plus sophistiqué que le matériel courant présent dans nos sections.

6.2.1.1. Manipulations présentes dans les modules E.I.B.E.

Le matériel nécessaire est en général réduit, mais l'exploitation n'est que qualitative et ne saurait convenir aux sections STL – BGB. De ce point de vue seul le module 1 peut présenter quelque intérêt. Par contre, les collègues de SMS et de l'enseignement général devraient y trouver des suggestions intéressantes.

En ce qui concerne la stérilisation des milieux de culture et la pratique des techniques de base, on trouvera dans l'appendice 2 du Module 1 des détails techniques.

Type d'activité	Module	Détail de l'activité
Travaux pratiques	1 Microbes et molécules	Isolement d'ADN bactérien à partir d'oignons; mise en évidence de la production d'amylase par des microbes du sol ; production d'antibiotique, fabrication de la pâte à pain ; immobilisation de levures ;
	2 – DNA profiling	Simulation de l'établissement d'une identification grâce aux « empreintes génétiques » d'ADN ; application en médecine légale (« Forensic DNA ») (instructions et documents préparatoires en anglais)
	3 - Biscuits et biotechnologie	Utilisation qualitative de l'amyloglucosidase et le Sweetzyme T [®] (en français)
	8 - Immunologie pratique	Détection de la présence d'œuf dans les aliments : Kit Trichem ELISA à usage scolaire ; (en français)
	18 - The EIBE family	Electrophorèse d'ADN (ADN plasmidique) en gel d'agarose : kit d'électrophorèse utilisable sans matériel de laboratoire spécifique (instructions et documents préparatoires en anglais)

Deux remarques :

Des réactifs spécifiques (enzymes de la firme Novo) peuvent être obtenus auprès du NCBE. D'autres (TP immunologie) peuvent l'être aux adresses suivantes :

Le kit *TriChem ELISA* peut être acheté auprès du fabricant, détenteur des droits d'auteur :

TriChem
Bernhard Olsensvej 23
DK-2830 Virum, Danemark
Téléphone : 45 (0) 45 85 82 83

Le kit *Steffens ELISA* a été conçu et réalisé par *Steffens Biotechnische*. Pour l'acquérir, s'adresser à :

Steffens Biotechnische
Analysen GmbH
Baumgartenstr. 5
D-79285 Ebringen (D)

6.2.1.2. Manipulations présentées dans le fascicule *Practical biotechnology*

réalisé par le National Centre for Biotechnology Education – NCBE

"<http://www.rdg.ac.uk/NCBE/>" (document en anglais, qui peut être commandé)

Parmi les manipulations présentées, on peut retenir principalement :

- multiplication du chou-fleur
- l'extraction-purification de l'ADN d'oignons
- l'augmentation de la quantité de jus de pomme obtenue par utilisation de pectinase

- hydrolyse du lactose du lait par utilisation de lactase
- extraction de l'ADN d'oignon
- production de glucoamylase par *Saccharomyces diastaticus*
- production de cellulase
- la culture de champignons de couche.

Comme indiqué précédemment, ces manipulations sont essentiellement qualitatives

6.2.2. Niveau BTS

De nombreux ouvrages de biochimie / biotechnologie cités dans bibliographie proposent maintenant des manipulations illustrant les opérations de base des disciplines scientifiques classiques des biotechnologies, telles la biochimie, la microbiologie ou la biologie cellulaire et moléculaire. Ces manipulations sont plus ou moins complexes et peuvent nécessiter un matériel biologique particulier, bactéries recombinantes en particulier.

D'autre part, on trouvera dans les *Annales des BTS Biochimiste et Biotechnologie* les sujets d'examen. Celles-ci sont disponibles auprès de l'UPBM :

"<http://membres.lycos.fr/upbm/>"

A titre d'exemple, on trouvera ci-dessous en ANNEXE le sujet d'examen 2001 du BTS Biotechnologies intitulé : "Quelques manipulations à propos de la production d'un immunoconjugué recombinant : courbe de croissance de *Escherichia coli*, conservation de la souche recombinante, extraction de l'immunoconjugué, comparaison de deux méthodes d'extraction, utilisation de l'immunoconjugué".

6.3. Autres types d'activités

Nos collègues anglo-saxons n'hésitent pas à faire figurer dans leur arsenal pédagogique des activités comme la discussion en groupe, le jeu de rôle ou le théâtre...

Les principales propositions d'activités ont été regroupées par thème. Elles s'adressent à des publics scientifiques et/ou non scientifiques et sont essentiellement centrées sur la génétique moléculaire et ses applications.

Type d'activité	Module	Détail de l'activité
Techniques culinaires	3	Fabrication de petits beurres
Dégustation	3	Analyse sensorielle : reconnaissance des divers saveurs

Type d'activité	Module	Détail de l'activité
Etude de cas	2 DNA profiling	Utilisation de l'ADN pour l'identification de personnes ; empreintes génétiques (« Forensic DNA »)
	14	Implications éthiques de la prise de brevet pour des séquences d'ADN (instructions et documents préparatoires en anglais)

L'étude des réactions *a priori* des élèves / étudiants est utilisée comme base de départ pour introduire les considérations théoriques nécessaires pour la réalisation des activités présentes dans le module considéré.

Perception des attitudes et croyances des élèves / étudiants	9	Evaluation de la perception des concepts de plante, de gène et d'expression de caractères génétiques (annexe 2)
	14	Implications éthiques de la prise de brevet pour des séquences d'ADN : les élèves / étudiants doivent faire part de leur sentiment (instructions et documents préparatoires en anglais)

Type d'activité	Module	Détail de l'activité
Jeux	3	Questions sur concernant les ingrédients entrant dans la composition des biscuits
	6	Construction d'un modèle simple de la double hélice d'ADN ; existe avec deux niveaux de complexité ; aucune connaissance de chimie requise (instructions et documents préparatoires en anglais)

Beaucoup de propositions de jeux de rôles ont été faites.

Type d'activité	Module	Détail de l'activité
Jeu de rôle jeu de décision débat	4	Information sur trois maladies : mucoviscidose, myopathie de Duchenne, maladie d'Huntington ; les élèves sont amenés à simuler une prise de décision par rapport au fait d'avoir des enfants, pratiquer un diagnostic prénatal, interrompre une grossesse
	7	Prise de décision vis à vis de l'application de la technologique génétique à la vie personnelle ; données du débat 2005 ; extrapolation des données actuelles : fiction / réalité
	10	Discussion au sein d'un conseil municipal fictif, de la participation au financement de l'installation d'une usine produisant des plantes génétiquement modifiées (arbres de Noël avec des bougies !!!!!) (instructions et documents préparatoires en anglais)
	11	Simulation d'un débat public sur l'opportunité de laisser réaliser et de financer un laboratoire afin de produire des saumons transgéniques géants (« saumons sumos »), mais il s'agit de convaincre les opposants (instructions et documents préparatoires en anglais)

	12 Trangenic animals	Simulation d'un débat des ministres de la Santé de l'Union européenne sur la bioéthique ; chacun joue le rôle d'un ministre et argumente à partir de la législation de son propre pays (instructions et documents préparatoires en anglais)
	18 The EIBE family	Détermination fictive de la manière dont se transmet un caractère donné (instructions et documents préparatoires en anglais)
	20	Jeu de simulation de la production et de l'utilisation d'enzyme ; aspects économiques et techniques (instructions et documents préparatoires en anglais)

Il est également possible de réaliser une activité théâtrale.

Type d'activité	Module	Détail de l'activité
Activité théâtrale	19	Une pièce de théâtre sur les biotechnologies réalisée à Amsterdam en avril et mai 2000 par 9 étudiants d'une école en communication (en anglais)

ANNEXE

**Mise en oeuvre d'opérations de génie biologique :
sujet d'examen du BTS Biotechnologie Session 2001**

SUJET : PRODUCTION D'UN IMMUNOCONJUGUÉ RECOMBINANT**PREMIER JOUR**

Durée : 5 h 30mn

Ces manipulations s'inscrivent dans le cadre d'un projet de production chez *Escherichia coli* d'un immunoconjugué recombinant. Cette molécule hybride bifonctionnelle est constituée du fragment F(ab)₂ d'un anticorps murin d'une part et de la phosphatase alcaline (PhoA) d'*E.coli* d'autre part.

La souche productrice d'*E.coli* a été obtenue en transformant une souche hôte par un vecteur plasmidique comportant la construction génétique adéquate.

1^{ère} partie : croissance de la souche recombinante

On souhaite déterminer la vitesse spécifique de croissance de cette souche en milieu LB additionné d'ampicilline (à 200 µg/mL) à 37°C.

1.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- 1 erlen contenant 50 mL de milieu LB + ampicilline préchauffé à 37°C
- 1 tube contenant environ 5 mL de préculture de la nuit en milieu LB + ampicilline de la souche
- 1 flacon contenant environ 10 mL de milieu LB

1.2. Mode opératoire

- Ensemencer l'erlen de milieu préchauffé avec 2,5 mL de la préculture fournie et le mettre à incuber dans le bain thermostaté à 37°C agité.
- Prélever 1 mL de culture dans une semi-microcuve au temps 0 puis toutes les 30 minutes pendant 3 heures.
- Lire immédiatement l'absorbance à 600 nm contre du milieu LB; (placer la cuve dans la glace en cas d'attente).

L'absorbance limite de linéarité est de 0,6.

1.3. Résultats

- Consigner dans un tableau les temps de prélèvement et les valeurs d'absorbance.
- Tracer la courbe de croissance.
- Analyser cette courbe.
- Déterminer la vitesse spécifique de croissance maximale dans les conditions opératoires.

2^e partie : Conservation de la souche recombinante

La souche est conservée par congélation à -20°C en présence de glycérol. On souhaite déterminer le pourcentage de cellules viables après décongélation.

Une numération par culture sur milieu solide est effectuée sur la suspension après décongélation.

2.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- 1 microtube contenant 1 mL de culture congelée fraîchement décongelée.
- 1 flacon d'eau physiologique stérile
- cônes stériles
- tubes à hémolyse stériles
- 6 boîtes de gélose LB + ampicilline
- billes de verre ou étaleur stériles

2.2. Mode opératoire

- Distribuer 900 μL d'eau physiologique stérile dans 5 tubes à hémolyse.
- Effectuer une série de dilutions en progression géométrique de raison 1/10 jusqu'à 10^{-6}

Réaliser ces dilutions devant un examinateur

- Étaler 100 μL de chacune des dilutions 10^{-4} à 10^{-6} sur gélose LB, en réalisant 2 essais par dilution.
- Incuber à 37°C les boîtes clairement identifiées.

3^e partie : Extraction de l'immunoconjugué - comparaison des deux protocoles

La construction génétique est telle que l'immunoconjugué synthétisé est localisé dans le périplasma de la souche productrice, ce qui permet de l'extraire sans lyse cellulaire.

Pour cette extraction, deux protocoles différents seront comparés : le "choc osmotique" et le "choc lysozyme".

Un contrôle de l'affinité de l'enzyme conjuguée pour son substrat sera également effectué.

3.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- 50 mL de culture de la nuit en milieu LB + ampicilline de la souche productrice d'*E.coli*
- 5 mL de tampon TSE = tampon Tris-HCl 0,1M pH 8,2 + saccharose à 200 g/L + EDTA 5mM
- 3 mL de Thypo = tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,2 + MgCl_2 0,5 mM
- 10 mL de Tris-Mg-Zn = tampon 200 mM pH 8,2 + MgCl_2 1 mM + ZnCl_2 0,1 mM
- 100 μL de lysozyme à 10 mg/mL
- 10 mL de pNPP 5mM en eau déminéralisée
- 10 mL de NaOH 2M
- 1 mL de NaCl à 9 g/L
- réactif de Bradford en distributeur
- 0.5 mL de SAB à 0,3 mg/mL

- 2 tubes de 50 mL à centrifuger
- 1 pipette de 10 mL à usage unique

3.2. Extraction par "choc osmotique"

Après séjour en milieu hyperosmotique, en présence d'EDTA qui fragilise la membrane externe, les cellules sont remises en suspension en milieu hypoosmotique. L'entrée d'eau consécutive provoque alors une expulsion des protéines périplasmiques. Réaliser à partir de la culture fournie une extraction selon le protocole ci-dessous.

Mode opératoire

- Centrifuger 15 mL de la culture fournie pendant 5 minutes à 3500 rpm (soit 2500 g), à 10°C. Éliminer le surnageant dans l'eau de Javel.
- Remettre les cellules en suspension dans 1 mL de tampon TSE et transférer en microtube. Laisser séjourner 10 minutes dans la glace.
- Centrifuger 3 minutes. Éliminer le surnageant dans l'eau de Javel.
- Remettre les cellules en suspension rapidement dans 1 mL de tampon Thypho glacé. Vortexer immédiatement énergiquement puis effectuer quelques aspirations-refoulements.

Réaliser cette remise en suspension devant un examinateur

- Laisser séjourner 10 minutes dans la glace.
- Centrifuger 3 minutes.
- Prélever le surnageant qui constitue l'extrait et le transférer dans un autre microtube. Le conserver dans la glace.

Remarques :

- Les centrifugations en microcentrifugeuse sont effectuées à vitesse maximale.
- Tout matériel contaminé sera déposé dans un bac contenant de l'eau de Javel.

3.3. Extraction par "choc lysozyme"

Le séjour en milieu hyperosmotique provoque une sortie d'eau qui entraîne une fuite des protéines périplasmiques à travers la membrane externe rendue poreuse par l'EDTA. Le lysozyme facilite cette fuite en s'attaquant au peptidoglycane.

Réaliser à partir de la culture fournie une extraction selon le protocole ci-dessous.

Mode opératoire

- Centrifuger 15 mL de la culture fournie pendant 5 minutes à 3500 rpm (soit 2500 g), à 10°C. Éliminer le surnageant dans l'eau de Javel.
- Remettre les cellules en suspension dans 1 mL de tampon TSE et transférer en microtube.
- Ajouter 15 µL de lysozyme et homogénéiser.
- Laisser séjourner 30 minutes dans la glace.
- Centrifuger 3 minutes.
- Prélever le surnageant qui constitue l'extrait et le transférer dans un autre

microtube. Le conserver dans la glace.

3.4. Détermination des concentrations d'activité catalytique

La concentration d'activité catalytique (catc) de la PhoA dans les extraits préparés est déterminée à partir de la mesure de la vitesse initiale par la méthode en 2 points.

3.4.1. Mode opératoire

Mesurer les vitesses initiales pour chacun des 2 extraits selon le protocole ci-dessous. Dans un tube à hémolyse, introduire:

- 950 μL de Tris-Mg-Zn
- 1 mL de NPP5mM
- 50 μL d'extrait.

- Incuber 2 minutes exactement à 30°C.
- Arrêter la réaction en ajoutant 1 mL de solution de NaOH 2M.
- Lire l'absorbance à 405 nm contre un témoin convenable.

L'une des 2 déterminations sera effectuée en présence d'un examinateur.

3.4.2. Résultats

- Préciser la composition des témoins.
- Calculer les concentrations d'activité catalytique (catc) de la PhoA dans chacun des extraits préparés en tenant compte des données ci-dessous.
- Une unité de PhoA est définie comme la quantité d'enzyme hydrolysant une micromole de pNPP (4-nitrophényl phosphate) par minute dans les conditions opératoires proposées.
- Le coefficient spécifique d'absorbance molaire du pNP est de 17500 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (soit 1750 $\text{m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$) dans les conditions opératoires.

3.5. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées dans chacun des extraits par la méthode de Bradford.

3.5.1. Mode opératoire

- Protocole : en cuves pour spectrophotomètre, introduire :
x μL de solution protéique à compléter jusqu' à 50 μL avec NaCl à 9 g/L
2,5 mL de réactif de Bradford
- Lire l'absorbance à 595 nm après 10 minutes de séjour à l'obscurité contre le blanc de gamme.
- Gamme étalon : une gamme en 6 tubes, contenant de 0 à 15 μg de protéines par tube, sera réalisée à partir de la solution étalon de SAB fournie.

- Essais : les protéines des extraits enzymatiques seront dosées avec des prises d'essais de 50 μL a priori, volumes à adapter si nécessaire. Effectuer 2 essais pour chaque extrait.

3.5.2. Résultats

- Présenter un tableau de réalisation de la gamme étalon.
- Tracer la courbe étalon.
- Déterminer graphiquement les masses de protéines dans les prises d'essai de chacun des extraits.
- En déduire les concentrations en protéines de chacun des 2 extraits préparés.

3.6. Comparaison des activités spécifiques

- Résultats
- Déterminer les activités spécifiques (exprimées en U/mg) des 2 extraits.
- Les comparer. Conclure.

4^e partie : utilisation de l'immunoconjugué produit (40 points)

On étudiera l'immunoconjugué recombinant produit le deuxième jour.
Pour des raisons techniques, certaines opérations doivent être réalisées immédiatement.

4.1.. Matériels et réactifs

On dispose de :

- 1 plaque de microtitration
- 5 mL de réactif "4J1-A"
- 50 mL de solution tampon phosphate salin (PBS)
- 10 mL de réactif "4J1 -B"

4.2. Mode opératoire

- Distribuer 200 μL de réactif "4J1-A" dans chacun des puits A1 à A10 et B1 à B11.
- Incuber la plaque recouverte de son film autoadhésif à l'étuve à 37°C pendant 4 heures.
- Rejeter le contenu des puits et les rincer en tampon PBS.
- Distribuer 250 μL de réactif "4J1-B" dans tous les puits (A1 à A12 et B1 à B12).
- Recouvrir la plaque (clairement identifiée par le numéro de poste) de son film autoadhésif et la laisser sur le plan de travail.

DEUXIÈME JOUR

Durée : 2 h 30 minutes

2^e partie : Conservation de la souche recombinante

2.2. Mode opératoire

- Compter les colonies.

2.3. Résultats

- Présenter les résultats sous forme d'un tableau.
- Analyser ces résultats et en déduire la concentration en cellules viables dans la suspension après décongélation.
- La suspension congelée avait été préparée en mélangeant 700 μL de culture à 7.10^8 cellules par mL et 300 μL de glycérol à 50%. En déduire le pourcentage de viabilité après décongélation.

4^e partie : utilisation de l'immunoconjugué produit

On se propose de s'assurer que la molécule hybride recombinante produite est utilisable dans un dosage immuno-enzymatique en phase hétérogène.

Dans ce but, une gamme étalon sera réalisée en double essai.

La partie anticorps de l'immunoconjugué est dirigée contre une hormone humaine hH.

Le réactif 4J1-A déposé dans les puits le premier jour était une solution de l'hormone hH.

Le réactif 4J1-B déposé dans les puits le premier jour était une solution de SAB à 2%.

4.1. Matériels et réactifs

On dispose de :

- la plaque de microtitration traitée la veille
- 50 mL de tampon PBS
- 50 mL de tampon PBS-Tween
- 0,5 mL d'hormone hH à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS
- 2,5 mL d'immunoconjugué recombinant
- 5 mL de solution tamponnée de substrat pNPP
- 2 mL de NaOH 2M

4.2. Mode opératoire

La veille, les puits A1 à A10 et B1 à B12 ont été sensibilisés avec 200 μL de solution de d'hormone hH à 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; tous les puits ont ensuite été traités par de la SAB à 2%.

- Rejeter le contenu des puits ; laver 3 fois en tampon PBS-Tween et rincer 2 fois en tampon PBS.
- A partir de la solution étalon d'hormone hH fournie à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, réaliser 10 dilutions en série de progression géométrique de raison 1/2, sous un volume de 125 μL , jusqu'à la dilution $(1/2)^{10}$, en utilisant comme diluant du tampon PBS. Réaliser en double la série de dilutions. Utiliser pour ces dilutions des cupules vides de la plaque.
- Distribuer 100 μL de chacune de ces dilutions dans les puits A1 à A10 d'une part, B1 à B10 d'autre part. Déposer 100 μL d'hormone hH à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans la cupule B 12..
- Distribuer 100 μL de la solution d'immunoconjugué fournie dans les puits A1 à A11 et B1 à B12.
- En A12 : distribuer 200 μL de tampon PBS.
- En A11 et B11 : ajouter 100 μL de tampon PBS.

Le schéma ci-dessous visualise la disposition des puits.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1/2									$(1/2)^{10}$		
B	1/2									$(1/2)^{10}$		

Le puits A12 constituera le zéro optique.

- Placer la plaque pendant 2 minutes sur agitateur rotatif.
- L'incuber, recouverte de son film autoadhésif, à l'étuve à 37°C pendant 45 minutes.
- Laver 3 fois en tampon PBS-Tween et rincer 2 fois en tampon PBS.
- Distribuer dans tous les puits 150 µL de solution substrat pNPP. Recouvrir du film autoadhésif et incuber 15 minutes à l'étuve à 37°C.
- Distribuer dans tous les puits 50 µL de solution de NaOH.
- Placer la plaque pendant 2 minutes sur agitateur rotatif puis lire les absorbances de chaque puits à 405 nm contre le puits A12 dans un lecteur de microplaques à lecture automatique avec imprimante. La feuille d'impression des résultats après identification sera jointe au compte-rendu.

4.3. Résultats

- Présenter sous forme de tableaux les dilutions effectuées et la composition des témoins.
- Calculer et présenter dans un tableau les quantités d'hormone hH exprimées en ng déposées dans les puits le deuxième jour pour chacune des dilutions.
- Tracer sur un même graphe les 2 courbes représentant la variation d'absorbance à 405 nm obtenue en fonction du logarithme décimal de la quantité d'hormone ajoutée le deuxième jour.
- Commenter l'allure de la courbe obtenue en précisant sous forme d'un schéma légendé le principe du dosage réalisé.
- Préciser le rôle du puits A11, B11 et B12 ; discuter les résultats obtenus pour ces puits.
- On utilise la courbe étalon pour doser deux solutions de hH dont les concentrations sont estimées à 15 µg/mL et 65 µg/mL.
Comment opérer pour déterminer ces concentrations à l'aide de la courbe étalon obtenue ? Justifier.

MATIERE d'ŒUVRE

Souche d'*Escherichia coli* constitutive (absence de répression par les phosphates) pour la phosphatase alcaline dénommée "PhoA" dans la suite.

Cette souche pourra être fournie aux établissements susceptibles de réaliser la manipulation par le LETGP Jean Rostand, 67000 STRASBOURG (Tel 03 88 14 43 50 poste 428)

L'ampicilline figurant dans les milieux dans le sujet n'est pas nécessaire.

1^{ère} partie : Croissance de la souche recombinante

Réactifs individuels

- 1 erlen de 150 mL contenant 50 mL de milieu LB préchauffé à 37°C
- 1 tube contenant environ 5 mL de préculture de la nuit en milieu LB de la souche

"PhoA"

- 1 flacon contenant environ 10 mL de milieu LB

Milieu LB

- bactotryptone ou hydrolysate de caséine: 10 g / L
- extrait de levure: 5 g / L
- NaCl : 5 g / L - pH7,5
ex : SIGMA ref. L3022 250g = 138.00 F HT ; largement suffisant pour 30 candidats

Matériel individuel

- 1 pipette stérile de 5 mL
- 10 semimicrocuves sur un support
- parafilm
- 1 pot avec eau de javel pour cuves, pipettes et cônes
- 1 P1000 et cônes bleus stériles
- 1 bac à glace
- 1 feuille de papier millimétré

Matériel collectif

- spectrophotomètre visible
- bain thermostaté agité à 37°C avec support pour erlens de 150

2^e partie : conservation de la souche recombinante**Réactifs individuels**

- 1 microtube contenant 1 mL de culture de "PhoA" congelée à -20°C
- 1 flacon contenant 10 mL d'eau physiologique stérile
- 6 boîtes de gélose LB bien sèches

milieu LB solide = LB liquide + agar 15 g/L ou Sigma L2897 250 g = 180.00 FHT 99

Préparation de la culture congelée (à effectuer au plus tard la veille de l'épreuve)

Culture congelée en glycérol 15% de manière à obtenir après décongélation $5 \cdot 10^6$ à 10^7 cellules viables par mL ou suspension équivalente non congelée.

À titre indicatif :

En erlenmeyer, mélanger soigneusement 35 mL d'une culture de la nuit de la souche "PhoA" ajustée à 1 DO de 0,600 avec 15 mL de glycérol à 50% stérile.

Laisser 15 minutes à température ambiante puis 15 minutes à 4°C puis répartir en microtubes stériles puis congeler à -20°C.

Matériel individuel

- P1000 et cônes bleus stériles
- P100 et cônes jaunes stériles
- 5 tubes à hémolyse stériles sur un portoir
- billes de verre stériles ou étaleur ex: billes de verre ex PROLABO
- 1 erlen avec eau de javel pour récupération des billes

Matériel collectif

- 1 vortex
- 1 étuve thermostatée à 37°C

3^e partie : extraction de l'immunoconjugue – comparaison des deux protocoles**Réactifs individuels**

- 50 mL de culture de la nuit en milieu LB + ampicilline de la souche productrice d'E.coli
- 5 mL de tampon TSE = tampon Tris-HCl 0,1M pH 8,2 + saccharose à 200 g/L + EDTA 5mM
- 3 mL de Thypo = tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,2 + MgCl₂ 0,5 mM
- 10 mL de Tris-Mg-Zn = Tris-HCl 200 mM pH 8,2 + MgCl₂ 1 mM + ZnCl₂ 0,1 mM
- 100 µL de lysozyme à 10 mg/mL
- 10 mL de pNPP 5mM en eau déminéralisée
- 10 mL de NaOH 2M
- 1 mL de Na Cl à 9 g/L
- 0,5 mL de SAB à 0,3 mg/mL

Réactif collectif

- réactif de Bradford en distributeur de 2,5 mL : 30 mL par cdt soit 1 L pour 30 cdt

Matériel individuel

- 2 tubes de 50 mL à centrifuger
- 1 pipette de 10 mL à usage unique
- 1 P1000 et cônes bleus
- 1 P100 et cônes jaunes
- 1P20
- 4 microtubes sur un support
- 6 tubes à hémolyse sur un support
- 18 cuves sur un support
- parafilm
- 1 chronomètre
- 1 bac à glace
- 1 feuille de papier millimétré

Tubes coniques de 50 mL à centrifuger (ex : CML réf. TCU50V)

Matériel collectif

- centrifugeuse
- microcentrifugeuse
- spectrophotomètre visible
- bains thermostatés à 30°C 1 pour 2 ou 4 candidats

Remarque :

Prévoir une petite réserve de chacun des extraits pour les fournir le cas échéant aux candidats qui n'auraient pas mené à bien leur préparation ; voir le sujet pour les protocoles.

4^e partie : utilisation de l'immunoconjugué produit

- Premier Jour

Réactifs individuels

- 1 microplaque pour ELISA avec film autoadhésif sur un support
- 5 mL de réactif "4J1-A"
- 10 mL de réactif "4J1-B"
- **50 mL** de tampon PBS

Réactif "4J1-A" = 1gO de lapin (cf. *infra*) à 20 µg/mL en tampon carbonate pH 9,6 0,05 M 3 mg pour 30 cdt

Réactif "4J1-B" = SAB à 2% en tampon carbonate pH 9,6 0,05 M

microplaques (ex : CML refM29LSE)

Matériel individuel

1 P200 et cônes jaunes

Remarque

Les lavages en PBS et PBS-Tween : par distributions de 300 µL avec une multipette ou pipette.

- Deuxième Jour

Réactifs individuels

- la microplaque traitée la veille (conservée à 4°C pendant la nuit)
- 50 mL de tampon PBS
- 50 mL de tampon PBS-Tween
- 0.5 mL d'hormone hH à 500 µg/mL en PBS
- 2.5 mL d'immunoconjugué
- 5 mL de solution substrat pNPP
- 2mL de NaOH 2M

Tampon PBS :

Tampon phosphate de sodium 10 mM ; pH 7,4 + NaCl 150 mM PBS-Tween : PBS + Tween 20 à 0.1%

Hormone hH :

Solution d'IgG de lapin à 500 J.Lg/mL en tampon PBS

Rabbit IgG SIGMA ref. 18140 p1397 10 mg = 491.00 F HT 99 7.5 mg pour 30 cdt

Immunoconjugué :

Anti IgG-PAL au 1/10000 en PBS

Anti rabbit 1gO alcaline phosphatase conjugate SIGMA ref. A3687 0.5 mL = 549.00 F HT99, largement suffisant pour 30 candidats

Solution substrat pNPP :

pNPP à 1 mg/mL en tampon DEA pH 10.2 ou en tampon Tris-HCl 1M pH 9.8 + NaCl 0.1M+ MgCl₂ 5mM + ZnCl₂ 0,1 mM

Remarque : le pNPP se conserve mieux en eau ; on peut prévoir des solutions stocks 2X à mélanger volume à volume au dernier moment.

Matériel individuel

- 1 P 1000 et cônes bleus
- 1 P200 et cônes jaunes
- 10 carrés de papier filtre de 15 x 15 cm
- 1 feuille de papier millimétré

Matériel collectif

- étuve thermostatée à 37°C
- un agitateur rotatif pour microplaques
- lecteur de microplaque avec imprimante