

## COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

Certaines cellules telles E. coli peuvent croître sur un milieu minimal avec des sels et du glucose et synthétiser l'ensemble des composants cellulaires. Les cellules animales ont perdu la faculté de synthétiser plusieurs molécules essentielles telles que certains acides aminés, les lipides ou les vitamines. Ils doivent donc être ajoutés au milieu. On dit qu'un organisme est **auxotrophe** lorsqu'il est incapable de synthétiser un ou plus éléments essentiels à sa croissance.

On parle d'**acide aminé essentiel** lorsqu'il ne peut être synthétisé par l'organisme. Il y a également des acides gras essentiels.

## COMPOSANTS DE BASE POUR LE METABOLISME

### SOURCE DE CARBONE

Le carbone est fondamental pour le catabolisme, c'est la source d'énergie première de la cellule.

La majorité des organismes utilisés en biotechnologie sont hétérotrophes, c'est-à-dire que leur source de carbone est organique. Il s'agit le plus souvent de sucres tel le **glucose**. Les cellules animales utilisent également de la **glutamine** comme source d'énergie.

Les organismes autotrophes utilisent une source inorganique comme le CO<sub>2</sub>.

### ELEMENTS POUR LA SYNTHÈSE DES PROTEINES

- L'**azote** provient de l'ammoniaque, d'ions ammonium, d'azote gazeux (N<sub>2</sub>) ou encore directement d'acides aminés ajoutés au milieu.
- Le **souffre** est présent sous forme de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, de HS<sup>-</sup> ou sous forme d'acides aminés (cystéine, méthionine)

### PHOSPHORE

Essentiel pour la synthèse des acides nucléotides, de l'ATP et des acides nucléiques, le phosphore est apporté sous forme de sels (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)

### IONS METALLIQUES

Les ions métalliques jouent un rôle essentiel en tant que cofacteurs d'enzymes des voies métaboliques. Les kinases ont besoin de ions Mg<sup>2+</sup> pour fonctionner, les cytochromes de ions Fe<sup>2+</sup>.

Un problème majeur est lié à leur solubilité et aux problèmes d'oxydations. Par exemple Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> et Fe<sup>2+</sup> précipitent en présence de phosphate, d'ions hydroxyde, etc.. Il faut donc faire attention à la façon dont on les ajoute au milieu de culture. On utilise des agents chélatants (qui forment des complexes avec les ions) pour les stabiliser.

Les chimolithotrophes utilisent ces ions comme source d'énergie en les oxydant (cas par exemple du Fe<sup>2+</sup> oxydé en Fe<sup>3+</sup>).

## VITAMINES

Les vitamines sont souvent considérées comme essentielles car elles ne peuvent être synthétisées. C'est un composé utilisé comme nutriment en faible quantité.

### VITAMINES SOLUBLES DANS L'EAU

Nom	Fonction	Particularité
<b>B1 (Thiamine)</b>	Cofacteur des enzymes de decarboxylation	Transporte un groupe aldéhyde actif
<b>B2 (Riboflavine)</b>	Composant des enzymes de déhydrogénation	Transporte des électrons (FAD, FMN)
<b>B6 (Pyridoxal)</b>	Coenzyme des réactions de transfert de groupe amino	
<b>B12 (Cobalamine)</b>	Coenzyme des enzymes d'oxydation de lipides ou de synthèse d'acide aminés	Transporte des groupes méthyle et propyle
<b>B3 (Niacine)</b>	Cofacteur de <b>NAD(P)</b> pour déshydrogénations	
<b>B5 (Acide pantothenique)</b>	Composant de la co-enzyme A	
<b>B9 (Acide folique)</b>	Co-enzyme des enzymes intervenant dans la synthèse de macromolécules (ADN, ARN...)	Transporte des électrons
<b>B7 (Biotine)</b>	Cofacteur des enzymes de carboxylation (entrée dans un cycle)	
<b>Vitamine C (Acide ascorbique)</b>	Agent réducteur (antioxydant)	

### VITAMINES SOLUBLES DANS LES LIPIDES

Nom	Fonction	Particularité
<b>Vitamine A (Retinol)</b>	Affecte l'expression des gens, absorbe les photons	Classée comme <b>hormone stéroïde</b>
<b>Vitamine D (calciferol)</b>	Régule expression des gènes, calcium et phosphate	Classée comme <b>hormone stéroïde</b>
<b>Vitamine E (tocopherol)</b>	Antioxydant éliminant les radicaux libres et oxygène moléculaire	
<b>Vitamine K (menadione)</b>	Coenzyme des réaction régulant la synthèse des facteurs de coagulations (facteur II, VII, IX) et protéine de la structure membranaire	

## FACTEURS DE CROISSANCE

Ce sont des hormones (source localisée et spécifique) ou cytokines (produit par cellules non-localisées). Pas indispensables, ils permettent souvent d'améliorer la croissance ou la productivité.

- **Insuline** : simule l'absorption du glucose du milieu par les cellules mais fonctionne rarement in-vitro (les cellules ayant perdu leur récepteurs)
- **Transferrin** : utilisée pour transporter les ions  $Fe^{2+}$  dans la cellule
- **Fibonectin** : aide les cellules à adsorber aux surfaces
- **Albumine issue du serum bovin** : transporteur pour les composants insolubles (lipides, vitamines solubles dans les lipides, ...)
- **Facteur de croissance "xxx"** : facteurs de croissance spécialisés pour une lignée cellulaire donnée (fibroblastes, interleukines, ...)

## AUTRES COMPOSANTS

D'autres composants non essentiels peuvent être ajoutés au milieu pour faciliter la culture en réacteur ou augmenter la production :

- **Pluronic** : protège des forces de cisaillement. Il s'agit d'un polymère avec une partie hydrophobe et une partie hydrophile qui augmente la solubilité des protéines et protège les cellules.
- **Antimousse** : additif chimique qui empêche la formation de mousse lors de la culture (souvent de la poudre de silicone)
- **Butyrate** : inhibe les enzymes "histone decatylase", ce qui favorise l'état acétylé des histones de la cellule. L'ADN est alors plus accessible aux facteurs de transcription, ce qui a pour effet d'améliorer l'expression des gènes qui sont généralement inhibé ou silenced à cause de l'déacétylation.
- **Chélatants** : stabilise les ions métalliques du milieu en formant des complexes
- **Précurseurs phospholipidiques** (inositol, ...) : facilite la croissance en simplifiant la synthèse des phospholipides
- **Fibronectin** : joue un rôle pour les cellules adhérentes
- **Albumine** : permet de solubiliser les protéines et lipides
- **"MYSTER COMPOUND"**

## SERUM

C'est un **milieu complexe** composé de protéines, d'albumine, lipides, vitamines, facteurs de croissance, composants de faible poids moléculaire, ions minéraux. Les protéines protègent les cellules des forces de cisaillement (le pluronic n'est donc pas nécessaire) et les produits des attaques des protéases. Il contient souvent des anticorps bovins IgG ou IgA. Il est donc nécessaire de le purifier préalablement lorsqu'il est utilisé pour la production d'anticorps monoclonaux. De plus le DSP en est d'autant compliqué. **Le plus grand défaut provient du fait que la composition varie d'un lot à un autre.**

Les serums foetaux contiennent un niveau élevé de cytokines et de facteurs de croissance.

## SECURITE ET GOOD PRACTICES

Si le processus doit être caractérisé, il est important de porter une attention particulière à la source et à la pureté des composants du milieu. Pour se faire il est possible d'obtenir des certificats de qualité de la part des fabricants. Un problème lors de l'établissement d'un procédé est que ce dernier doit rester constant tout le long de la production (sous peine de devoir le re-certifier). Il est donc primordial d'avoir l'assurance que le fabricant du milieu puisse fournir dans le long terme un milieu en quantité suffisante et sans variation d'un lot à l'autre.

Il faut également avoir un certificat attestant que le milieu ne contient aucun prion, virus ou autre protéine (peut engendrer des problèmes de validations et/ou de DSP).

## SOURCES

Eyer K., Dubuis P. « Development of an Industrial Biotechnology Process : Metabolic basis of product formation and development of medium », HES-SO Valais. Sion, Mars 2008