# Introductions

## Produit issue de la biotechnologies

* Produit pharma (1982 : insuline)
* Utilisations de cultures cellulaires : ex

## Technique

* **Clonage ADN** (insertion dans plasmide 🡺 bactérie **recombinante**) 🡪
  + Amplification ADN via **PCR** (dénaturation / hybridation / renaturation)
  + **Digestion** sur site de **restriction** (donne des **Extrémités cohésives**) via endonucléase :
    - Coupe des liaisons covalente & hydrogène
    - **EcoRI, BamHI, TaqI**
    - **Bords francs / Extrémités cohésives**
  + Ajout du nouvel ADN
  + Action **ligase**
  + Analyse sur gel ( - vers le +)

## Biotech 2.0

* 1912 (Stéphane Leduc) : aliment, production indus, génie génétique. 1990 : **Biobrick** . Synthèse génome bactérie 2008. Bactérie. 2010 :entièrement synthétisé
* Build système **prédictible** et de **confiance** (In silico design 🡪 Synthèse d’ADN 🡪 systéme)
  + **Metabolic engineering** : Analysis of metabolic network
  + **Synthetic biology**:Use cell as factory

## **Abstraction / Standardisation / Quality control**

* **Abstraction** 🡪 Séquence **d’ADN** fonctionnel (= **parts**) 🡪 module (= **devices**) 🡺 **système**
* **Standardisation 🡪** Uniformité de réglé standard & universelle. ++ ré usabilité
* **Quality control 🡪 Cahier des charges** (besoin à satisfaire) + **spécification** (caractéristique attendu du produit) + **conformité**
* Mais boite noir : (Mutation etc…)

# Transcription & Traduction

## Rappel transcription

* **promoteur 🡪 Leader 🡪 Coding région 🡪 Traileur 🡪 Terminator**
* **ARN polymérase :** **Holoenzyme = enzyme cœur + facteur σ**
  + A évoluer avec le temps (diffèrent selon les diffèrent règne.
  + **RNA polymérase bactériale**:
    - **α2ββ′ω = Enzyme Cœur** 🡪 catalyse la transcriptions
    - **Facteur sigma** = Permet la fixation à l’AND en augmentant l’affinité
    - **Hypothèse :**
      * **Sigma = 4 domaines** : D2 🡪 -10 et D4 🡪 -35 &
      * **Partie C**-ter de alpha 🡪 lié à élément UP
  + **Terminaison :**
    - **Intrinsèque terminaisons**: Formation de **Hairpin loop** 🡪
      * GC rich région + brin simple poly U 🡪 reconnaissance de NusA 🡪 Stimule la terminaison
    - Rho dépendant 🡪
      * Reconnaissance séquence rut par prot **Rho** complexé avec **NusG** 🡪 Stimule la terminaison

## Opéron = **Gènes adjacents appartenant à la même unité de transcriptions**

* **Opéron lactose**(rég négatif) **:**
  + **Promoteur PlacI ou Plac**
  + **LacI 🡪 Répresseur** de de l’opérateur. **Agis en Cis**. (Inhibé en présence de lactose)
  + **Opérateur O**. **Agis en trans**
  + **LacZ :** B-gal 🡪 Passage du lactose en galactose + glucose
  + **LacY :** **Perméase** (passage du beta-gal)
  + **LacA**: **Trans-acétylase**
* **Opéron Tryptophane**(reg négatif) **:**
  + Si pas de Trp 🡪 **trpR (repressor)** inactive 🡪 synthèse Trp. (Inversement si Trp)
* **AMPc** (reg positif) : 0 glucose 🡪 CAP + AMPc 🡪 stimule opéron Lac 🡪 consomme lactose

## Rappel traduction

* **AA** : Code génétique **dégénéré** dépendant de l’ORF.
* **ARNt :** CCA 3’ end. T Loop. D Loop. **Anticodon Loop** : reconnaissance des AA
  + **Règle d’appariement : U** en 3éme 🡪 **A ou G**. **I** en 3éme 🡪 **C, U ou A.**
* **Ribosome :** **Grande SU** 🡪 catalyse **liaisons peptidique**. **Petite SU** 🡪 **Liaisons ARNt / ARNm**
* **Traduction** :
  + **Initiation : 30S** + IF1 & IF3 🡪 + (IF+GTP+Met-RNAt+RNAm) 🡪 + **50S** – tous les IF
    - **Fixation** **RNA** : **RBS** + **coding région avec AUG**
  + **Elongation :** (Site E P A) (= exit, peptide, aminoacyl tRNA)
    - Arrivé du ARNt 🡪 transfert de **l’ AA du site A vers site P 🡪** Translocation
  + **Terminaison :** UAA, UAG, UGA : stop (**ochre**, **amber**, **opal**)
    - Chez les bactérie UAA > UGA > UAG
    - Reconnu par **release factors** (RF1 : UAA and UAG / RF2 : UAA et UGA) + autre prot 🡪 **libération du peptide** 🡪 **dissociation du ribosome**.
* **Important** : selon les espèces 🡪 **préférence de certains codons** pour un même AA 🡪 Impact notamment dans **les gènes les + exprimés**

## Premiers circuits génétiques

* **Toggle switch** : **Pa inhibé par b. a inhibé Pb**
  + Si **IPTG 🡪 cI plu inhibé** & lacI **inhibé**. Si Chaleur 🡪 lacl **plu inhibé** & cl **inhibé**
  + **GFP** quand **cl est stimulé** par ex 🡪 mesure
* **Repressilator : Pa inhibé par c. A inhibe Pb, b inhibe Pc.**
  + **tetR** **inhibe lacI,** qui **inhibe** **plu cl**, qui inhibe tetR. Etc.
  + **GFP** quand **tetR est inhibé** 🡪 mesure
* **Autoregulatory circuit** : **A inhibe Pa**
  + **tetR inhibe sa propre formation** (quand exprimé **GFP**)

## **Biobricks**

* **Standardisation :** règle universelle
  + Définition des « parts » / assemblage 🡪 **BioBricks**, **standards ends and restrictions**
    - **Promoters : Part de régulation** 🡪 fixation ARN polymérase
    - **Ribosome Binding (RBS)**
    - **Coding séquence**
    - **Terminator** (Forward / Reverse / BBa\_B0025)
* **Biobricks standards** basé sur **comptabilité Spe1/Xba1** (Aussi EcoR1 / Pst1)
  + En gros **SpeI & XbaI** peuvent former une **cicatrice non clivable** 🡪 hybridations entre les deux sites après digestion.
  + Doit pouvoir être fiable, certifié 🡺 standardisé
    - Mesure de la DO 🡺 pas fiable au-dessus de 0.6
    - **Utilisation de FITC** 🡺 permet de transformer une fluorescence en unité relative (voir dernier chap de la fiche)
* **Prefixe & suffixe** en amont ou non de la bioBrick 🡪 sequence pour la **lyse** via **Enzyme de Restriction** ou action de la **taq** 
  + Besoin d’un bon choix des enzyme : compatible, facile d’utilisation etc.
* Selon la manip plusieurs standard de bioBrick (**PCR, Clonage recomibnant, LIG, use of T4 pol**)
* **Plasmide**: p**i**èce **d’ADN circulaire** contenant le **device.** Doit avoir :
  + **Origine de réplication**
  + **Copy Number**
  + **Antibiotique résistance**
  + **Multiple-Cloning Site/BioBrick Insertion Site**
* **Chassis =** Organisme ou le circuits génétique va être implémenté.
* **Exemple**: Malaria. Création de multitude de device, d’apport dans E. Coli, puis ce n’était pas opti donc dans S. cerevisiae…

## Environnement

* **Arsenic Biosensor**
  + **Device 1** : Si pas de **glucose** 🡪 **inhibe uréase**. (Sinon 🡪 **augmentation pH)**
  + **Device 2 :** Si 5 ppb **arsenic** 🡪 **inhibe Device** 1 (uréase so)
  + **Device 3 :** Si 20 ppb **arsenic** 🡪 **active lacZ** 🡪 **diminue le pH**
* **E. Coli** 🡪 Black outpuck when light / E. Coli making RGB
* **BioEnergie :** Sunlight 🡪 cellulose 🡪 Sugar 🡪 Fuels
* **Machine Life** 🡪 petite protéines faisant des trucs de fou dans le corps (recombinaisons etc)

## Ethique

* Considérer les bénéfices
* Evaluer les risques (classifications, leur proba etc)
* Classer les risques (Mauvaise conséquences / usages doubles)
* Management des risques 🡪 gérer les risques mais pas les éliminer

## Base cell

* Membrane with **protéine to interact or comunicate** (using **engineered signalling cascade**)
* Cell-free proteins using **rudimentary genetic circuits**
* **Sub-compartmentalization** for multi-step reaction.
* **Ribosome + tRNA + RNA**

## Cours 5

* L’activité d’une gène dépend
  + **Efficacité transcriptions**
  + Stabilité ARNm
  + **Efficacité traduction**
  + Stabilité de la prot
* **PoPs = Polymérases par seconde** 🡺 Force du promoteur, qtt ATP, nb dNTP
* **RiPs = Ribosome initation par seconde** 🡺 Force du RSB, qtt ATP, nb ribosome, nb dRNA
  + **Régulation via RNAi :** interfère avec l’ARNm 🡪 traduction **inhibé** ou ARN **dégradé**
  + **Riboswitch** 🡪 ARN replié sur lui-même interagissant avec un ligand
    - Quand **aptamer** lié au ligand 🡪 ON
    - Interaction structural 🡪 Bloque les RBS quand lié (ou inversement)
* **Analogie électronique**:
  + **AND** : besoin de deux signaux
  + **INVERTER (NOT)**: Marche que il n’y a pas le signal
* Système a **2** **composante** (Senseur **HQ** + Régulateur de réponse **RR**)
  + Permet une **modularité** 🡪 somme de module
  + Analogie bio synthèse 🡪 Ex prot avec un senseur va activer un RR (promoteur de notre séquence d’intérêt).
* **Pb de bruit** 🡪 auto-répression pour réguler le bruit

## Fluorescence

* Permet de standardisé les résultats 🡪 **GFP = standard**
* Mesure sois le **PoPs**, sois le **RiPs 🡪 protéine de fusion au niveau de géne rapporteur**
* Utilisation d’aptamére pour signal fluorescent 🡪 **action direct**

## Cours 5 bordel :

* Deux types de translocation : (en général need peptide signale)
  + **Sec** : need chaperon pour translocation (passe sous forme non mature)
  + **Tat** : permet le passe de la protéine en entier