

Partie : Abdelouahid D.E.

**Le cours suivant ne représente qu'une petite partie du module : L'étudiant(e) doit assister au cours, car beaucoup de détails expliqués pendant le cours ne figurent pas dans ce résumé.**

Première séance: Rappels de microbiologie générale

-Définitions microorganisme procaryote, eucaryote et acaryote; Calcification ancienne et nouvelle ( Eukarya, Bacteria et Archeae); différences essentielles entre les trois domaines

Caractéristiques différentielles entre les trois domaines

| Caractéristiques             | Bacteria         | Archea       | Eukarya    |
|------------------------------|------------------|--------------|------------|
| Structure cellulaire         | procaryote       | procaryote   | eucaryote  |
| Noyau entouré d'une membrane | Non              | non          | <b>oui</b> |
| Acide muramique pariétal     | <b>oui</b>       | non          | non        |
| Lipides membranaires         | ester            | <b>éther</b> | ester      |
| ADN circulaire               | oui              | oui          | <b>Non</b> |
| Histones                     | <b>non</b>       | oui          | Oui        |
| Opéron                       | oui              | oui          | <b>Non</b> |
| ARN pol.                     | <b>1</b>         | plusieurs    | <b>3</b>   |
| Initiateur ARNt              | Formylméthionine | Méthionine   | Méthionine |

-Méthode de calcul simple du nombre total de bactéries après croissance sur un milieu complet (exercices d'applications)

-Formation de colonies chez les bactéries, explication

Biotechnologie : Définitions

Biotechnologies « *traditionnelles* »

Dans la biotechnologie traditionnelle, on trouve, entre autres, les différents processus de fermentation connus depuis des milliers d'années :

- fermentation anaérobie : en absence de dioxygène :
  - fermentation alcoolique : des sucres forment de l'alcool éthylique et du dioxyde de carbone :
    - fabrication des boissons alcooliques comme la bière et le vin (vinification),
    - fabrication du pain (panification) ;
  - fermentation lactique : des sucres forment de l'acide lactique, un acide alpha hydroxylé : fabrication des yaourts, des fromages, de certaines charcuteries, de la choucroute ;
- fermentation aérobie : en présence de dioxygène :
  - fermentation acétique : l'alcool éthylique forme de l'acide acétique et de l'eau (acétification):
    - fabrication des vinaigres...

De nombreuses autres technologies utilisées par l'agroalimentaire ou à la cuisine font aussi partie de la biotechnologie traditionnelle. Dans la seconde moitié du XX<sup>e</sup> siècle, d'importants progrès ont été fait dans la connaissance des rôles des protéines (signalisation cellulaire, identification des récepteurs cellulaires) et les capacités d'isoler et de purifier des protéines.

## Biotechnologies contemporaines nouvelles

Elles apparaissent à la fin du XX<sup>e</sup> siècle à la suite de la découverte de l'ADN et de l'ARN. Elles incluent

- la protéomique, avec le séquençage et la synthèse de protéines et peptides complexes, dont des hormones macromoléculaires
- la génomique et la pharmacogénomique mais aussi l'utilisation de sondes géniques, du séquençage de l'ADN (grâce aux Séquenceur d'ADN), du séquençage d'ARN, de la synthèse d'ADN/ARN, de l'amplification d'ADN/ARN, du profil de l'expression génique et des technologies antisense qui ont permis d'élargir et accélérer les possibilités du génie génétique

Depuis le milieu des années 1990, le domaine de la transgénèse est le plus médiatisé et toujours en expansion. Mais des progrès sont attendus ou espérés (ou craints parfois) dans les domaines des nanotechnologies et de la bio-informatique et des Nanobiotechnologies qui pourrait par exemple permettre une fabrication programmée de nano ou micro composés, ou de biomolécules, avec de nouveaux risques sanitaires, environnementaux ou géopolitiques en cas de dérives ou de mésusage de ces nouvelles possibilités.

En Europe, des industriels et certains laboratoires ont proposé de classer les biotechnologies en catégories "colorées" <sup>5</sup>:

- « Biotechnologies vertes » (d'intérêt agricole),
- « Biotechnologies rouges » (d'intérêt médical)
- « Biotechnologies blanches » *consistent à appliquer des procédés naturels à la production industrielle* ». Les biotechnologies blanches permettent la fabrication de produits tel que les biocarburants, les biogaz... A partir de la matière première (maïs, colza...) qui va être transformer en produits fini (bioéthanol...) grâce à des micro-organismes.
- « Biotechnologies jaunes » (traitement et élimination des pollutions de toutes natures)
- « Biotechnologies bleues » Liées à l'utilisation de la diversité génétique des organismes marins, par exemple pour créer de nouveaux cosmétiques, médicaments, produits aquacoles, agroalimentaires, etc...
- « Biotechnologies orange ». D'intérêt pédagogique, visant à développer le matériel éducatif et des stratégies sur les questions de biotechnologie (par exemple production de protéine recombinante) pour la société y compris les personnes ayant des besoins particuliers tels que ceux ayant une déficience auditive et / ou visuelle.

Impératifs de la production industrielle :

Les biotechnologies sont des techniques, méthodes ou procédés utilisant le vivant (cellules, organites ou enzyme) dans le but de rendre possible, d'accéléré ou de facilité la synthèse ou la transformation d'un métabolite

La biotechnologie repose sur trois facteurs : la cellule (microorganisme ou organisme supérieur), le milieu de culture et le produit recherché.

Le microorganisme : doit avoir les caractéristiques suivantes

- Capable de produire des quantités importantes de produit recherché (MI ou MII)
- Stable génétiquement en particulier les microorganismes modifient génétiquement
- Croissance rapide
- Absence de pouvoir pathogène\*\*

\*\* règles de sécurité dans le laboratoire

Classification des microorganismes en fonction des risques potentiels

## Danger pour

| Classe | Le personnel | La population | Traitement     |
|--------|--------------|---------------|----------------|
| 1      | -            | -             | Non nécessaire |
| 2      | +            | -             | ++             |
| 3      | ++           | +             | ++             |
| 4      | ++           | ++            | -              |

Le produit recherché : Doit être de valeur commerciale ajoutée et facile à extraire car il est sv t mélanger à des sous-produits dans le milieu de culture

Le milieu de culture : Doit être disponible en tout temps, pas chère, riche en éléments nutritifs

Le microorganisme :

Isolement : Le sol et en particulier la couche humifère (arable, rhizosphère) , constitue une source importante pour l'isolement des microorganismes industriels en particulier les actinomycètes et les moisissures il existe plusieurs méthodes pour le criblage de souches intéressantes ou le screening d'une activité donnée :

-La sensibilité à la chaleur ou à des substances chimiques comme le phénol le chlore n'est pas identique pour tous les microorganismes

-La dégradation des xénobiotiques : Corps étranger dans la nature Pollution par pétrole pesticides ou médicament

-La dégradation du papier

-La production d'une substance à pouvoir antimicrobien

Les cellules utilisées en biotechnologie ' microorganismes cellules végétales ou animales ou des organites de ces cellules

Une fois on isole la ou les cellules intéressantes il faut les tester pour s'assurer de leur pouvoir de production et de leurs stabilité génétiques ces dernières doivent être bien conservées

Conservation des souches : Plusieurs techniques de conservation

Conservation à température ambiante ou à 4C, repiquage successif, ce sont des méthodes qui comportent des risques il faut les éviter, les méthodes les plus intéressantes sont la lyophilisation et la congélation

La lyophilisation : Consiste à déshydrater par sublimation une suspension congelée de microorganismes par sublimation cad : L'eau est évaporée, elle passe de l'état solide à l'état vapeur sans passer par l'état liquide. Par cette technique les cellules lyophilisées peuvent être conservées pendant longtemps si elles sont protégées de l'oxygène, de l'humidité et de la lumière (mise en ampoules scellées sous vide)

Pendant la lyophilisation les microorganismes sont soumis à des variations extrêmes (congélation et dessiccation), qui entraînent des altérations cellulaires variées phénotypiques et génotypiques, dans le cas de survie la phase de latence de la croissance est prolongée.

Rq : Il est indispensable de contrôler les caractères des souches lyophilisées en particulier celle qui ont subi une modification génétique. Les agents protecteurs les plus utilisés le lait écrémé et l'albumine du sérum, cette technique s'applique aux bactéries et aux moisissures sporulés et permet une conservation de plus de 30 ans.

La congélation : Consiste à refroidir à plus au moins basse température une suspension de microorganismes (spores ou cellules) dans ce cas il faut aussi utilisés des agents protecteurs dit cryoprotecteurs

Polyalcools comme le glycérol

Sucres comme le glucose le saccharose

Protéines albumine humaine ovalbumine

Détergents comme le Tween 80

Parfois des mélanges glycérol + protéines

Les détergents sont utilisés à des ( ) faibles 0.5 à 3 % les autres à 10 % le glycérol peut être utilisé jusqu'à 50%

L'ajout des cryoprotecteurs permet de réduire les altérations cellulaires causées par la congélation

Méthode : La suspension des cellule ou de spores additionnée de l'agent protecteur est conservée à des températures variant entre -20 et -196 C<sup>0</sup>

Au cours de la congélation se forment des cristaux de glaces à l'intérieur et à l'extérieur des cellules

Ces cristaux peuvent désorganisés les membranes et les parois cellulaires entraînant la mort des cellules, ce sont surtout les cristaux internes qui sont les plus dangereux pour la structure des cellules, le cryoprotecteur a comme rôles : déplacer le point de congélation, faciliter la formation des petits cristaux de glaces moins dommageables pour les cellules attention certains agents peuvent être toxiques pour certaines cellules.

Le cryoprotecteur n'est efficace que si la vitesse de congélation est faible C A D : Il est préférable de réaliser une congélation progressive baisser la température d'un (1C<sup>0</sup> par minute jusqu'à -30 ou -40 C<sup>0</sup>)

Cette étape est réalisés dans un congélateur programmable Cryostat, par la suite on peut congeler les cellules à des températures plus basses – 150 -196 C<sup>0</sup> sous azote vapeur ou liquide

La décongélation doit être rapide par exp dans un bain marie à 37C<sup>0</sup>

Banque de souches

A travers le monde il existe plusieurs banques de microorganismes environ 400, et plus de 500.00 souches sont stockées (cellules microbiennes, animales, végétale et certains organites)

Inoculum : Est le matériel vivant (spores, cellules ou hyphes) qui sert à inoculé un milieu de propagation ou de production. La qualité et la quantité de l'inoculum déterminent le succès de la production industrielle.

L'inoculum de base doit être soigneusement conservé à l'état pur, la souche doit être performante, la quantité doit être suffisante et à un stade optimal de développement

Pour la quantité les bactéries sontensemencées à environ 1% v/v ou 10<sup>5</sup> cellules /mm pour les moisissures environ 10<sup>6</sup> /mm

Conditions de culture pour les microorganismes p 72

Une fois on a la souche performante, non pathogène, stable génétiquement et bien conservée il est également nécessaire de lui définir les conditions de culture optimales, le milieu doit contenir tous les éléments nécessaires a sa croissance de la souche et a la production du métabolite désiré.

Éléments nécessaires a la croissance des microorganismes

Source de carbone : Glucose, fructose, maltose, lactose, amidon ...

Source d'azote : NH<sub>4</sub>CL, NaNO<sub>3</sub>, Urée, peptone, extrait de levure...(gramme)

Sels organiques : Phosphate, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, (mg)

Oligo-éléments : Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo.....(ug)

Remarque : Actuellement les industriels utilisent plutôt des substrats naturels ou des rejets industriels, car leurs prix est bas a titre d'exemples : Source de carbone (extrait de malt, mélasse lactosérum..) source d'azote (farine de soja, peptone, caséine, Corn steep liquor..)

Production de Xylanase par *Aspergillus awamori* CMI 142717 en fonction de la source azotée

| Source azotée      | Xylanase ( % de dégradation de xylène) |
|--------------------|--|
| NH <sub>4</sub> CL | 15                                     |
| NaNO <sub>3</sub>  | 7.5                                    |
| Urée               | 69                                     |
| Peptone            | 44                                     |
| Extrait de levure  | 27                                     |
| Corn steep liquor  | 90                                     |

Le cor steep liquor( souce d'azote) est un rejet industriel sont prix est assez bas par rapport aux autres produits .

Le lactosérum (source de carbone) est un rejet .....

Les éléments du milieu doivent êtres apporté a des concentrations optimales, plusieurs facteurs de l'environnement interviennent : Température, pH, aération, additifs; Les optima sont très varies en fonction de la souche utilisée et selon le type du métabolite désiré.

A noté également que les optima nécessaire a la croissance d'un microorganisme ne sont pas forcement les mêmes que les optima pour une production d'un métabolite, car souvent la zone optimale pour une production est plus étroite que celle d'une croissance

Exp. Temp. *Streptomyces sp.* Se développe d'une manière maximale entre 25 et 35C<sup>0</sup>, alors que la production d'un antibiotique la monensine par cette actinomycète est optimale a 32 C<sup>0</sup>

Exp. pH. Fig 1.56 p 74

Dans certains cas et selon les fermentations il est nécessaire d'ajouter : Précurseurs, bio régulateurs et inducteurs, anti mousses, inhibiteurs..... Exemples :

Précurseurs : La production de cyclosporine par *Tolypocladium inflatum*, l'addition dans le milieu de culture de production de l'acide aminé L-valine à une concentration de 4g/l permet de passer de 130 mg à plus de 700mg/l la production

Bio régulateur et inducteurs : La méthionine stimule la production des céphalosporines

Inhibiteurs : L'addition d'inhibiteur de voie de synthèse concurrentielle à la fin de la période de croissance peut conduire à une augmentation de la production d'un métabolite donné

Anti mousse : Quand on utilise des substrats naturels dans un fermenteur les cultures ont tendance à former de la mousse, la mousse constitue un problème : risque de débordement, risque d'humification de filtres à air, dépôt d'une quantité de cellules dans l'espace supérieur du bioréacteur...

Pour résoudre ces problèmes on ajoute des antimousses comme : Acides gras ou lipides, polyéthers...

Un bon anti mousse doit être : non toxique pour les microorganismes, stable, ne joue pas le rôle d'inhibiteur, à une bonne dispersion dans le milieu, ne change pas pendant la stérilisation et ne pose pas de problème pendant l'extraction du produit désiré.

L'eau : L'eau utilisée doit être filtrée

Facteurs physico-chimiques : pH, la croissance de *Penicillium chrysogenum* est optimale à 6.8 mais la production de la pénicilline se fait à pH 7.2-7.4

La température, la zone de température qui permet une croissance est de l'ordre de 10C<sup>0</sup>, alors que celle permettant une production est de 5C<sup>0</sup> p90

Aération : Toutes les productions de métabolites secondaires et la plupart des primaires se déroulent en conditions aérobies, L'oxygène dans le fermenteur se trouve sous forme dissoute mais également il peut être injecté, l'agitation peut aussi améliorer l'aération du fermenteur.

Exp. La productivité en rifamycine par *Streptomyces fradiae* passe de 440 à 1200 mg/l si on augmente le taux en oxygène dissous de 42 à 72 mM/l/h, le CO<sub>2</sub> a une influence négative sur la production

Bioréacteurs et fermenteurs

Le bioréacteur joue 4 rôles : Conteneur, stérilisateur, aérateur, et agitateur, le matériel doit être inoxydable, résistant à la chaleur aux vibrations à la corrosion... Il existe des systèmes en phase solide, liquide ou immobilisée.

Le volume de milieu représente environ ¾ du volume total est le ¼ reste libre pour l'injection de l'air la formation de la mousse

À la fin de la fermentation le produit est extrait et purifié parfois cristallisé

Les produits de la biotechnologie Biomasse, métabolites primaires et secondaires

Voir partie précédente... biomasse et les enzymes (métabolites primaires déjà fait)

Métabolites primaires suite, Elles sont produits plutôt pendant la phase exponentielle et sont nécessaires à la croissance des microorganismes

Quelques exemples d'acides aminés produits industriellement

| Acides aminés    | Microorganismes producteurs                                       | Intérêts  |
|------------------|---|---|
| Acide glutamique | <i>Corynebacterium, Micrococcus</i><br><i>Escherichia coli...</i> | Releveur du gout (glutamate mono sodique)                               |
| Acide aspartique | Beaucoup de microorganismes                                       | Fabrication de l'aspartame, releveur du gout dans les boissons gazeuses |
| Lysine           | <i>Brevibacterium, E. coli</i>                                    | Supplément alimentaire pour prévenir les carences en protéines          |
| Tryptophane      | Beaucoup de microorganismes                                       | Antioxydant   |

#### Exemples de vitamines produites industriellement

| Vitamines                    | Microorganismes producteurs           | Utilités  |
|------------------------------|---------------------------------------|---|
| Vit B2                       | <i>Ashbya gossypii</i>                | Supplément alimentaire                                  |
| Vt B12                       | <i>Bacillus, Streptomyces</i>         | Supplément alimentaire,<br>Traitement de carence en Vit |
| Complexes multi vitaminiques | <i>Saccharomyces</i> et <i>Torula</i> | Supplément alimentaire                                  |

#### Les acides organiques produits industriellement

| Acides organiques | Microorganismes producteurs | Intérêts  |
|-------------------|-----------------------------|---|
| Acide lactique    | <i>Lactobacillus</i>        | Agent de conservation, composant de la levure chimique et supplément alimentaire pour les personnes (Déficiency en calcium) |

|                     |  |  |
|---------------------|--|--|
| Acide citrique      | <i>Aspergillus</i>                         | Agent de conservation, fabrication<br>de boissons gazeuses |
| Acide gibbérellique | <i>Gibberella</i> et <i>Fusarium</i>       | Hormone de croissance et de<br>floraison chez les végétaux |
| Acide acétique      | <i>Acetobacter</i> et <i>Gluconobacter</i> | Fabrication de vinaigre                                    |

.....

Les métabolites secondaires : Sont plutôt produits pendant la phase stationnaire et ne sont pas nécessaire a la croissance des microorganismes; Il s'agit par exemple: Des antibiotiques (pénicillines, céphalosporines...), substance ayant une activité pharmacologique (alcaloïdes, cyclosporine, asperlicine), pesticides biologiques, arômes et hormones

Explications et exemples (voir cours)