

**Université Constantine 1**

**Faculté des sciences de la nature et de la vie**

**Département de Biochimie et biologie cellulaire et moléculaire**

**Cours de biotechnologie**

**M1 PCPP**

**Par : Dr. DALICHAOUCHE Imane**

## **CHAPITRE I. La signification économique des microorganismes**

Les microorganismes sont des outils de transformation et de production de la molécule Remplaçant la chimie de synthèse par de la chimie « biologique ».

Ils détiennent une place de premier rang dans l'ensemble des biotechnologies et de la bio-industrie.

### **I- DIFFERENTS GROUPES DE MICRO-ORGANISMES**

Les micro-organismes sont présents dans toutes les structures écosystémiques. On distingue deux grands groupes :

1- Micro-organismes procaryotes qui ne possèdent pas de noyau délimité comme les Bactéries et les Archaea.

2- Micro-organismes Eucaryotes possédant un noyau comme :

- les Mycètes (Filamenteux, levures) ;
- les autres protistes dont les algues et protozoaires.

#### **I.1 Les bactéries**

Les bactéries seront abordées comme quatre grands groupes qui se différencient par des caractéristiques qui pourraient faire, éventuellement, d'elles dans un proche avenir des règnes distincts.

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires, procaryotes et ubiquitaires. Elles peuvent être isolées :

- principalement du sol
- des eaux douces,
- des eaux marines ou saumâtres,
- de l'air,
- des profondeurs océaniques,
- des déchets radioactifs,
- de la croûte terrestre,
- sur la peau
- dans l'intestin des animaux, etc.

La structure cellulaire de la bactérie en tant que procaryote (organisme sans noyau), est relativement simple, caractérisées par la présence d'une structure particulière en l'occurrence, la paroi. La paroi permet de diviser les bactéries en deux groupes: gram positif (+ )

et gram négatif (–) et ce, suivant la sa contenance en **peptidoglycane**.

## **I.2 Les archées**

Les archées ont une morphologie apparente de celle des autres bactéries :

- taille similaire (de 0,1 à 15 µm);
- développent des **flagelles pour locomotion**;
- de différentes formes: (**coques, grappes, bâtonnets, filaments**);
- créent des **biofilms** (sécrétion de polysaccharides);
- possèdent un chromosome **circulaire** unique, et peuvent posséder un ou plusieurs éléments extra-chromosomiques, les **plasmides**.

### **Comparaison entre archées, bactéries et eucaryotes:**

- 1- Les archées regroupent les bactéries extrêmophiles (les bactéries des milieux extrêmes);
- 2- Ces bactéries possèdent une structure cellulaire des procaryote (leur cellules ne renferment pas un vrai noyau);
- 3- Elles ont une structure particulière, qui ressemble parfois aux procaryotes, et parfois aux eucaryotes:

### **Importance Biotechnologique**

Les archées produisent plusieurs métabolites d'intérêts performants et stables comme les enzymes utilisées dans la biologie moléculaire comme la Taq polymérase, produite par *Thermusaquaticus*.

## **I.3 Les mycètes ou champignons**

Tout comme les bactéries, les champignons sont présents dans le sol, l'eau et l'air.

Le terme champignons englobe les cèpes, les morilles et autres espèces comestibles ou non qui sont constituées d'un chapeau et d'un pied. Mais nous allons nous intéresser aux champignons microscopiques, parmi lesquels on distingue les levures et les moisissures.

### **1) les levures**

Les levures sont des champignons microscopiques (6 à 10 microns) unicellulaires eucaryotes qui interviennent dans la fermentation des matières animales ou végétales en transformant les sucres en alcool et gaz carbonique.

Elles se reproduisent majoritairement par multiplication asexuée (bourgeonnement ou scission) et pour certaines par reproduction sexuée. La levure est capable de vivre en aérobie (respiration) ou en anaérobie (fermentation).

Les capacités de fermentation des levures peuvent être responsables de gonflements de certains produits alimentaires et de l'apparition d'un goût de fermentation alcoolique.

## 2) Les moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques (1 à 60 micromètres) filamenteux uni ou pluricellulaires eucaryotes hétérotrophes (qui se nourrissent en décomposant de la matière organique ou en parasitant un hôte). La multiplication des moisissures se fait par reproduction asexuée, c'est-à-dire par émission de spores, ou par reproduction sexuée (pour certaines espèces). Une moisissure est composée d'une partie végétative qui puise dans le milieu les éléments nutritifs nécessaires et de structures reproductrices qui servent à la multiplication.

Lorsqu'un aliment est conservé dans de mauvaises conditions, des moisissures contaminent l'aliment et le dégradent. Certaines moisissures peuvent même libérer dans l'aliment des mycotoxines qui ont des conséquences sanitaires importantes.

## I.4 Les algues

Ensemble d'organismes préférentiellement vivant dans les milieux aquatiques. Elles rassemblent les macroalgues benthiques (fixée sur un support) et les organismes microscopiques pélagiques (en eau libre) c'est les microalgues ou phytoplancton.

Elles ont beaucoup de potentiel dans les biotechnologies. En chimie durable verte aussi. L'utilisation de la biomasse algale n'est pas quelque chose de nouveau. Dans les années 1920, en Californie, il existait déjà une raffinerie d'algues brunes, qui fut supplantée par les raffineries de pétrole après-guerre. Actuellement, 16 millions de tonnes d'algues sont produites chaque année dans le monde. Pour l'alimentation humaine, surtout asiatique, pour servir d'additifs gélifiants et épaississants, un peu pour la cosmétique et pour l'agriculture, les algues permettant de limiter les pesticides en stimulant les défenses des végétaux.

## II. ACTION DES AGENTS EXTÉRIEURS SUR LES MICROBES

### II.1 Action des agents physiques

► **La température** : entre 100 et 150 °C, les microbes et leurs spores meurent. Les températures inférieures ou égales à 0 °C arrêtent la prolifération des microbes mais ne les tuent pas ; ceux-ci reprennent leur activité dès qu'ils sont remis à la température ambiante.

► **La lumière du soleil** : c'est un puissant **bactéricide** c'est-à-dire qu'elle tue les bactéries.

## **II.2 Action des agents chimiques**

► **Les antibiotiques** : ce sont des produits chimiques naturels ou artificiels qui s'opposent à la vie des microbes (bactéries) et stoppent leur multiplication (effet **bactériostatique**) ou en les tuant (effet **bactéricide**).

**Exemples** : la pénicilline, la auréomycine, la streptomycine, ...

► **Les antiseptiques** : Les antiseptiques sont des molécules naturelles ou de synthèse qui détruisent les germes microbiens ou empêchent leur multiplication.

**Exemples** : le formol, l'alcool à 90%, l'eau de javel, l'eau oxygénée, le mercurochrome, ...

Le mot **asepsie** vient du grec **sêpsis** qui signifie **putréfaction** et du préfixe privatif **a-**. Par **asepsie**, on désigne toutes les méthodes qui stérilisent, donc qui détruisent totalement les microbes. C'est une pratique indispensable en milieu hospitalier.

L'**antisepsie** est l'ensemble des méthodes de lutte contre les infections en détruisant les microbes.

## **III. LA REPRODUCTION DES MICRO-ORGANISMES**

L'objectif recherché de l'étude de la reproduction des microorganismes en biotechnologie microbienne est la compréhension des mécanismes permettant d'aboutir à une biomasse conséquente, en particulier lorsque l'objectif de la fermentation est la production de la biomasse uniquement, exemple; cas de levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*).

### **a- Reproduction des bactéries**

Les bactéries se reproduisent, généralement, par Scissiparité :

-L'unique molécule d'ADN circulaire se réplique (se double), de nouvelles molécules de la paroi et de la membrane plasmique sont synthétisées et les constituants cytoplasmiques voient leur stock doublé ;

-La bactérie s'allonge et se divise en deux par suite d'une invagination de la membrane plasmique et de la paroi formant un septum avec répartition des constituants dans chacune des bactéries filles ;

-Séparation des 2 bactéries filles.

Cependant, la reproduction des actinomycètes se fait par la formation de spores. En effet, l'élongation des filaments aériens finit par se fragmenter et chaque fragment donne une spore.

La germination de la spore aboutit à la formation d'un tube germinatif et le cycle se reproduit.

Figure 8 Cycle biologique des actinomycètes

### **b- Reproduction des mycètes**

La plupart des mycètes développent deux formes de reproduction :

- **Reproduction asexuée**, dite imparfaite, ou végétative, caractéristique de l'*anamorphe*.
- **Reproduction sexuée**, dite parfaite, caractéristique de *téléomorphe*.

**N.B.** Chez une grande partie de mycètes anciennement appelés Deutéromycètes la reproduction sexuée n'est pas mise en évidence.

La reproduction asexuée se fait par la formation de spores par les hyphes aériens, rapide et productive. Cette reproduction est développée lorsque le mycète se trouve sur un milieu solide. Dans le milieu submergé comme le milieu de fermentation le mycètes produit sa biomasse grâce à l'élongation des hyphes.

Quant à la reproduction sexuée, elle est réalisée par la formation de gamètes mâle et femelle, suivie par l'élaboration du zygote. Cette reproduction ne s'observe pas dans les conditions de fermentation où les conditions de développement sont optimales.

### **C. Reproduction des algues**

La reproduction peut être asexuée par la mitose qui produit deux cellules (bipartition) pour les algues unicellulaires, ou par bourgeonnement ou fragmentation pour les autres algues. Toutes les algues, en principe, développent ce genre de reproduction. Il existe cependant, toujours un vrai cycle de reproduction sexuée qui se compose de 2 parties distinctes.

Le cycle commence par la germination de la spore (N) qui produit un gamétophyte (N) qui donne les cellules mâles (N) et femelles (N) ; ces dernières, après fusion, donnent un zygote (2N) qui forme un sporophyte (2N). Lorsque le sporophyte subit une méiose, il donne des spores (N). Les spores germent pour reproduire le cycle biologique.

**N.B.** Les algues comme les cyanobactéries sont autotrophes et par conséquent, elles ne nécessitent pas forcément un milieu de fermentation pour se reproduire.

## **IV. ISOLEMENT ET SELECTION DE MICROORGANISMES A INTERET BIOTECHNOLOGIQUE**

Les microorganismes recherchés pour des applications biotechnologiques sont, généralement, ceux dont le type trophiques est hétéroorganotrophes. Ces derniers fournissent la plupart des métabolites d'intérêt par la production fermentaire.

Par conséquent il existe quatre groupes de microorganismes d'importance biotechnologique et

industrielle :

- Les levures
- Les moisissures
- Les bactéries
- Actinomycètes

Dans la production en biotechnologie microbienne on tend toujours à utiliser des microorganismes connus pour leur utilité en tant que biomasse ou/et pour leurs métabolites, cependant, la recherche de nouvelles souches forme un terrain préféré par les chercheurs et les industriels. Cette recherche repose préférentiellement sur deux étapes successives :

1- L'isolement des microorganismes ;

2- La Sélection d'un microorganisme d'intérêt.

L'isolement se fait prioritairement à partir du sol quant à la sélection, elle est réalisée par trois procédés :

A- Sélection naturelle ;

B- Sélection par mutation ;

C- Sélection par génie génétique.

Avant de procéder à quelconque sélection de microorganisme, il faut impérativement définir l'objectif biotechnologique de la sélection. C'est-à-dire sélectionner quel microorganisme et pour quelle raison.

Exemple, définir le produit : enzyme, antibiotique, alcool, acide organique, autres métabolites ; puis, dans quelles conditions seraient produits (choisir les facteurs environnementaux ; température, pH, aération, etc.).

#### **A-Sources d'isolement (échantillon, échantillonnage)**

L'isolement se fait prioritairement à partir du **sol** (étant le réservoir naturel des microorganismes), cependant, d'autres sources peuvent être utilisées pour l'isolement comme: L'eau, le lait, les fruits, le tube digestif, etc.

#### **B-Sélection**

Elle est réalisée par trois procédés:

- Sélection naturelle;
- Sélection Par mutation;

- Sélection par génie génétique.

#### **IV.1 Isolement des microorganismes d'intérêt**

Se fait par la préparation de la solution du sol en ajoutant 10 g du sol dans 90ml d'eau physiologique stérile. La solution est laissée reposer pendant 10 minutes, ensuite ; la préparation est agitée pendant 30 minutes et la dilution 10-1 est obtenue à partir de laquelle d'autres dilutions sont préparées. L'ensemencement est réalisé sur gélose. Après incubation, la purification des isolats est réalisée pour obtenir des souches pures.

N. B. le même procédé est appliqué pour l'isolement à partir d'autres échantillons.

Lorsque les souches sont pures, des sélections à partir de celles-là sont opérées en respectant l'objectif biotechnologique.

#### **IV.2 Sélection naturelle de souches microbienne**

Repose sur la recherche de l'activité antagoniste: Elle consiste à détecter un effet inhibiteur d'un microorganisme sur un autre par la sécrétion d'une et/ou plusieurs substances inhibitrices, ou bien par la présence de la substance tout court. La meilleure méthode appliquée pour cet objectif est la technique de diffusion sur gélose. Cette technique est très sur gélose. Cette technique est très utilisée dans la sélection de microorganismes d'intérêt biotechnologique.

### **V. SIGNIFICATION ECONOMIQUE DES MICROORGANISMES**

L'homme utilise beaucoup les micro-organismes pour fabriquer des produits alimentaires tels que le pain, la bière, le vin, les fromages,...

L'une des fonctions primordiales des micro-organismes est celle d'éboueurs de la planète. Ce sont eux qui transforment toutes les matières organiques mortes (plantes, animaux) ou les déchets provenant du monde vivant en matières minérales. Sans cette minéralisation des matières organiques, il n'y aurait plus de possibilité de vie sur Terre.

#### **➤ Au bénéfice du secteur industriel**

L'objectif fondamental de tous les processus industriels est de fabriquer à moindre coût un produit parfaitement défini en grande quantité avec une qualité constante. Les entreprises utilisent la biotechnologie industrielle pour :

- Réduire leur coût.
- Augmenter leurs bénéfices



- Augmenter la qualité de leurs produits
- Optimiser leur procédé et son suivi
- Améliorer la sécurité et l'hygiène de la technologie
- Respecter la législation sur l'environnement

La production agricole est dans une large mesure tributaire de la biodiversité microbiologique et, sans ces micro-organismes, ni les plantes ni les animaux ne peuvent bénéficier d'une croissance optimale ou satisfaire à leurs besoins physiologiques essentiels. Ils sont par exemple indispensables à la décomposition et au recyclage de la matière organique des sols ainsi que pour faciliter la bonne digestion des espèces ruminantes. Les micro-organismes peuvent jouer en rôle essentiel en tant qu'agents de lutte biologique et constituent donc une composante importante des programmes de protection intégrée contre les ravageurs. Ils offrent une vaste gamme de services bénéfiques pour la transformation des aliments et commencent à être utilisés dans le secteur forestier et celui des pêches.

Si les micro-organismes sont généralement des organismes bénéfiques, ils peuvent également être la cause de nombreuses maladies humaines, animales et végétales. Lorsqu'ils remplissent des fonctions qui sont bénéfiques aux humains, on dit qu'ils fournissent des services bénéfiques. Lorsqu'ils ont une incidence négative sur les humains, on parlera de services non bénéfiques. Il n'est pas exceptionnel que des micro-organismes fournissent ces deux types de services.

Les principaux micro-organismes intéressant l'agriculture sont les micro-organismes du sol (qui favorisent la croissance végétale et le recyclage des éléments nutritifs); les agents de lutte biologique; les agents pathogènes des plantes et des animaux d'élevage; les micro-organismes utilisés pour les processus agro-industriels (biodépollution; production de bioénergies; microorganismes facilitant les processus biotechnologiques (génie génétique). En matière de transformation des aliments, les principaux groupes fonctionnels sont les micro-organismes bénéfiques (fermentation et probiotiques) ainsi que certains micro-organismes nuisibles (agents de dégradation et microbes posant des risques pour la santé).

Il est essentiel de conduire des travaux de recherche systématiques sur les espèces de micro-organismes intéressant l'alimentation et l'agriculture, notamment sur leur variabilité génétique, à la fois pour déterminer leurs caractéristiques bénéfiques et pour trouver des solutions pour contrer leurs effets négatifs. Un document d'information a été préparé afin de

fournir une vue d'ensemble des principales fonctions et services des micro-organismes, comprenant des exemples spécifiques à but d'illustration.

Diverses initiatives sont actuellement entreprises afin de préserver certains microorganismes essentiels et pour assurer leur future disponibilité. Au cours du siècle dernier, des collections microbiennes ont été constituées dans le monde entier par des instituts nationaux ainsi que par un certain nombre d'organisations internationales, voire par le secteur privé (bien que, le plus souvent, dans le cadre de programmes de recherche et de développement spécifiques) afin de conserver ex-situ les ressources génétiques microbiennes.

Ces collections microbiennes ex-situ sont précieuses car elles permettent non seulement de conserver les ressources génétiques et la biodiversité, mais également du fait qu'elles fournissent les fondements essentiels pour les nouveaux projets et activités du domaine de la biotechnologie. Il existe différents types de collections de ressources génétiques microbiennes ex-situ, à savoir: les collections de recherche et celles de cultures. Plus récemment, le concept plus vaste de Centres de ressources biologiques (CRB) a été mis en avant. L'une de leurs principales fonctions est de préserver la diversité génétique microbienne.

Les institutions établissent chacune leurs propres collections de micro-organismes afin de soutenir leurs programmes de recherche. Ces collections renferment une importante quantité de diversité génétique correspondant à un ensemble de micro-organismes précis (par exemple, des micro-organismes du sol comme *Rhizobium*, ou des micro-organismes de fermentation comme *Lactobacillus*). Des nombreux instituts de recherche nationaux ou publics travaillant dans des domaines liés à l'alimentation ou à l'agriculture détiennent des collections « de travail ».

Seules celles satisfaisant à certaines normes précises peuvent se prévaloir de la dénomination de « collections de cultures ». Celles-ci fournissent divers services, notamment au bénéfice du secteur de l'alimentation et de l'agriculture, et doivent satisfaire à un certain nombre de normes concernant la collection, l'authentification, la gestion et la distribution de cultures de micro-organismes, ainsi qu'en ce qui concerne la documentation, le catalogage et les systèmes d'information.

Un certain nombre de pays, dont l'Italie et l'Uruguay,<sup>10</sup> sont particulièrement intéressés par les modes de gestion des micro-organismes in situ, et ont établi des projets de recherche nationaux pour ce faire. Ces projets ont également tendance à se polariser sur la manière de surveiller la diversité microbienne et de mieux comprendre le rôle des micro-organismes et des services bénéfiques qu'ils fournissent aux écosystèmes dont dépend la production

alimentaire.

Enfin, les micro-organismes offrent une vaste palette de services bénéfiques aux systèmes agricoles et à l'industrie alimentaire; il est donc intéressant de chercher à optimiser leur utilisation. En matière de production alimentaire, il n'est pas rare de gérer et d'utiliser les microorganismes déjà présents au sein de l'écosystème agricole donné. Il existe cependant des cas où l'introduction d'un micro-organisme étranger a eu des conséquences très favorables sur le système agricole qui le reçoit.

Les obstacles contrariant l'utilisation durable de micro-organismes au sein de pays en développement comprennent entre autres: le fait que les capacités de gestion y sont limitées ainsi que l'absence de normes de qualité et de stratégies permettant d'assurer leur production en quantités suffisantes. En outre, des cadres juridiques permettant d'enregistrer et de réglementer l'utilisation de cette importante composante de la biodiversité font souvent défaut ou bien ne sont pas assez spécifiques, ayant été élaborés à d'autres fins. Cette absence de législation adéquate concerne particulièrement les petites et moyennes entreprises souhaitant utiliser des espèces indigènes.