



Université Mohamed Khider- Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie



3^{ème} année LMD MICROBIOLOGIE

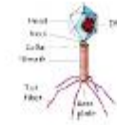
Microbiologie industrielle

Dr. BABA ARBI S.

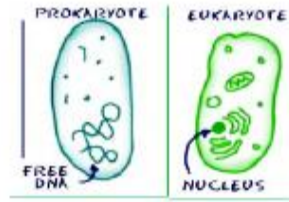
Année universitaire: 2020/2021

2- Les microorganismes utiles

Les microorganismes



Virus
« Non vivant »



Procaryote

Eucaryote

Archées

Bactéries

Algues

Champignons

Animaux

Gram +



Gram -

Unicellulaire

Pluricellulaire

Unicellulaire

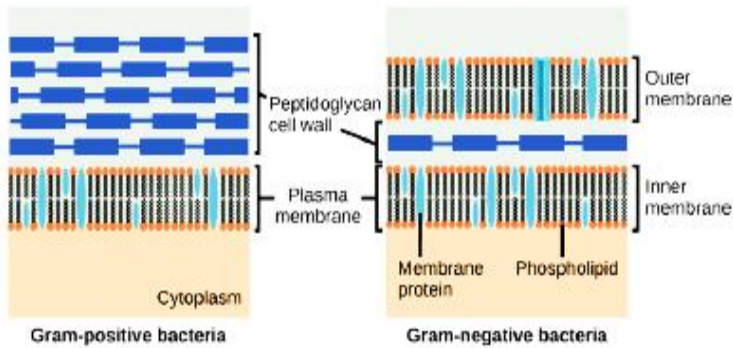
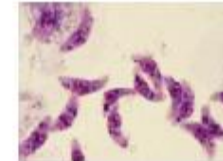
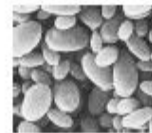
Pluricellulaire

Levures

Moisissures

Protozoaires

Vers



Gram-positive bacteria

Gram-negative bacteria

Protistes: eucaryotes unicellulaires



Coccus Coccobacillus



Vibrio Bacillus

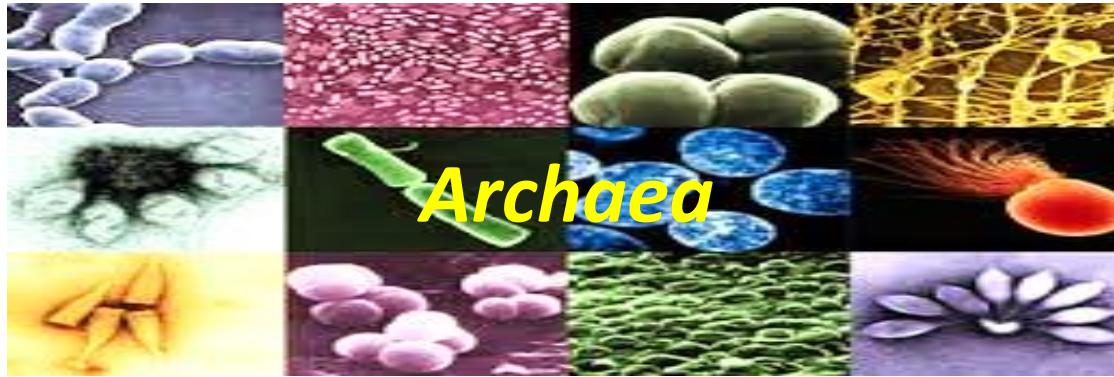


Spiroillum



Spirochete

2-1- Exemples des microorganismes utiles dans l'industrie



- ✓ Sont des microorganismes unicellulaires procaryotes (êtres vivants constitués d'une cellule unique qui ne comprend ni noyau ni organites). D'apparence souvent semblable aux bactéries, les archées ont longtemps été considérées comme des bactéries extrémophiles (thermophile extrême) particulières.
- ✓ Elles sont présents notamment dans les sources hydrothermales océaniques, les sources chaudes volcaniques ou encore les lacs salés, sol, l'eau de mer, des marécages, la flore intestinale.
- ✓ Les archées interviennent par ailleurs de façon non négligeable dans le cycle du carbone et le cycle de l'azote.

Description: La taille et la forme des archées sont généralement semblables à celles des bactéries (1 à 4 μm), aérobie et anaérobie.

Les *Archaea* se composent de trois groupes phénotypiques principaux:

- **Les *Archaea* productrices de méthane (*Methanoarchaea*):** sont anaérobies strictes, vivent dans les environnements les plus anaérobies sur la Terre, incluant les sols inondés, les rizières, les sédiments lacustres, les sédiments marins et le tube digestif des animaux. Elles sont psychrophiles, mésophiles et thermophiles. Elles interviennent dans le cycle de carbone.
- **Les *Archaea* halophiles extrêmes (*Haloarchaea*):** ne se développent qu'à des concentrations de NaCl supérieures à 1,8 M. elles sont aérobies facultatives ou obligatoires. La plupart utilisent les acides aminés, les hydrates de carbones ou les acides organiques comme source d'énergie.
- **Les *Archaea* thermophiles extrêmes:** croissent à des températures supérieures à 80°C, elles sont donc restreintes aux environnements dans lesquels l'énergie géothermique est disponible comme les sources chaudes, les solfatares, les sédiments marins chauffés par géothermie.

Classification phylogénétique

Domaine : *Archaea*

Règne : *Archaea*

Phylum : *Crenarchaeota*

Classe : *Thermoprotei*

Phylum : *Euryarchaeota*

Classe : *Archaeoglobi*

Classe : *Halobacteria*

Classe : *Methanobacteria*

Classe : *Methanococci*

Classe : *Methanomicrobia*

Classe : *Methanopyri*

Classe : *Nanohaloarchaea*

Classe : *Thermoplasmata*

Classe : *Thermococci*

Phylum : *Korarchaeota*

Phylum : *Nanoarchaeota*

Phylum : *Thaumarchaeota*

Ordre : *Cenarchaeales*

Ordre : *Nitrosopumilales*

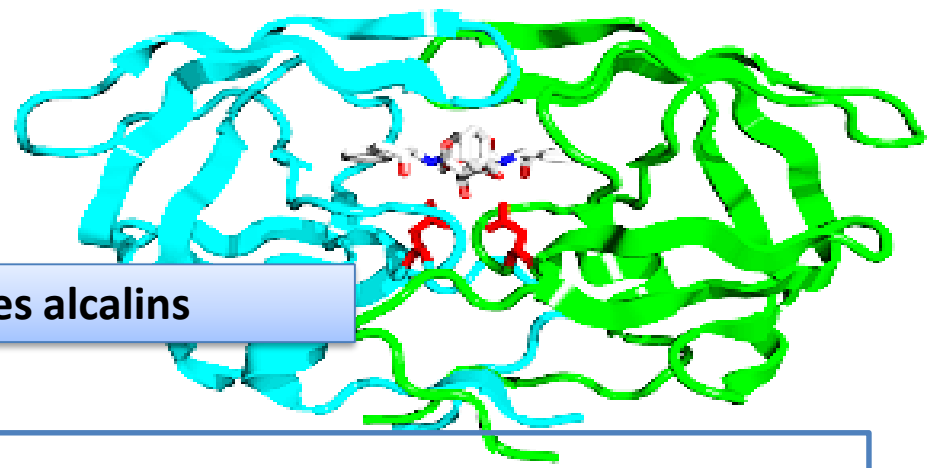
Ordre : *Nitrososphaerales*

Applications industrielles

Les *Archaea* qui présentent un intérêt industriel sont essentiellement les thermophiles extrêmes.

- Les enzymes des *Archaea* thermophiles extrêmes peuvent avoir des applications commerciales importantes à cause de leur température optimale élevée et leur thermostabilité:
 - L'activité à haute température est une caractéristique capitale parce que plusieurs procédés industriels se déroulent à des températures entre 50 et 100°C.
 - Les enzymes qui ont une température optimale élevée sont moins coûteuses que les autres (elles donnent la même activité avec un nombre moins d'enzymes).
 - La résistance à la chaleur est corrélée à une résistance plus élevée aux températures moyennes et aux produits chimiques dénaturants

Exemples:



Protéases alcalins

- Sont des enzymes thermophiles d'une utilisation principale dans les détergents pour blanchisserie.
- Ces enzymes ont une activité élevée à une température de 50°C (température des eaux de lavage).
- Elles sont très stables à température ambiante, ce qui augmente leur durée de vie en stockage de supermarché.
- Elles sont résistantes aux autres composants des lessives qui dénaturent les enzymes

Exemples:

ADN polymérase (*Pyrococcus* et *Thermococcus*)

- C'est une enzyme couramment utilisée dans l'industrie de la biotechnologie pour la PCR (réaction de polymérisation en chaîne) et le séquençage de l'ADN.
- En plus de leur forte activité et de leur thermostabilité, ces enzymes sont intéressantes grâce à leur activité de correction et leur taux d'erreur faible (en comparaison avec les enzymes bactériennes).
- Cette enzyme est largement utilisée en recherche, diagnostique et en médecine légale.





Bacteria

- Les bactéries sont des organismes procaryotes unicellulaires (une cellule équivaut à un individu).
- Les cellules bactériennes présentent différentes formes (les coques, les bacilles, les coccobacilles, les vibrions, les spirales...), elles présentent ainsi différents modes de regroupement (en amas, en chapelet, en grappe...).
- L'appareil nucléaire des bactéries est constitué d'un chromosome unique (circulaire, refermé sur lui-même, ne contient pas des région répétitives de grande taille) situé dans le cytoplasme.
- Il peut y avoir du matériel génétique extra-chromosomique: plasmide (ADN bicaténaire circulaire, transmissible).
- Selon la source de carbone et d'énergie nous avons les bactéries: photoautotrophes, les photohétérotrophes, les chimioautotrophes, les chimiohétérotrophes.

Classification phylogénétique

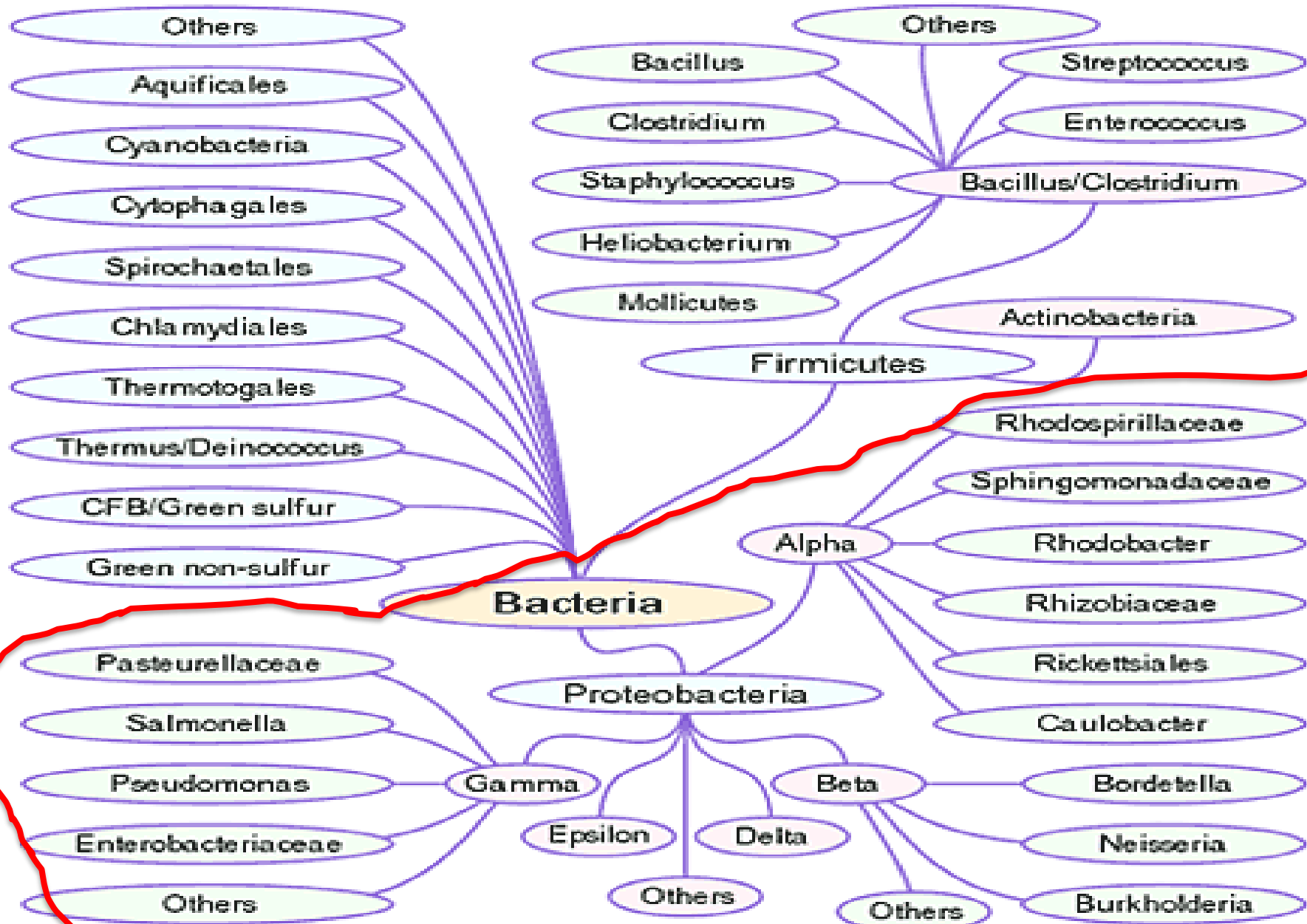


Le domaine de *Bacteria* regroupe plusieurs phylum (environ 20 phylums) dont on cite: les *Proteobacteria* et les *Firmicutes*.

Domaine: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

- Les *Proteobacteria* forment un groupe très vaste et très hétérogène où on trouve les quatre types de nutrition bactérienne, ainsi que plusieurs formes cellulaires.
- La classification basée sur l'ARNr 16S révèle cinq sous-groupes principaux de *Proteobacteria*, appelés subdivisions (sous-classes): ***alpha***, ***beta***, ***gamma***, ***delta*** et ***epsilon-Proteobacteria***.
- La majorité des bactéries dans ce groupe sont des Gram-négatives.



Exemples des *Proteobacteria* d'intérêt industriel

Les bactéries de vinaigre: *Acetobacter* et *Gluconobacter*

- Le vinaigre est utilisé comme conservateur et pour l'assaisonnement.
- Les deux genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* sont les principaux microorganismes responsables de la production de vinaigre.
- Ces deux genres sont des hôtes naturels des fleurs, fruits, miel, cidre et autres.

Acetobacter et *Gluconobacter* sont des Gram-négatifs capables d'oxyder l'éthanol en acide acétique.

- Sont des agents néfastes en vinification industrielle. De plus, ils causent la viscosité, la turbidité et les goûts désagréables dans les boissons y compris les boissons non alcoolisées (sodas, jus de fruits).
- Le genre *Acetobacter* est utilisé aussi industriellement pour la production des acides cétoniques comme l'acide ascorbique (vitamine C).

Exemples des *Proteobacteria* d'intérêt industriel

Les inoculums des rhizobia

- Les rhizobia sont des bactéries à Gram-négative, appartiennent souvent aux sous-classes α et β -*Proteobacteria*.
- Les espèces de rhizobia (comme *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*) commercialisées comme inoculums sont utilisées pour stimuler la formation de nodules racinaires et la fixation d'azote chez les plantes légumineuses et par conséquent l'amélioration de la production de ces plantes.



Exemples des *Proteobacteria* d'intérêt industriel

Bactéries de production des acides aminés, sucres et dérivés

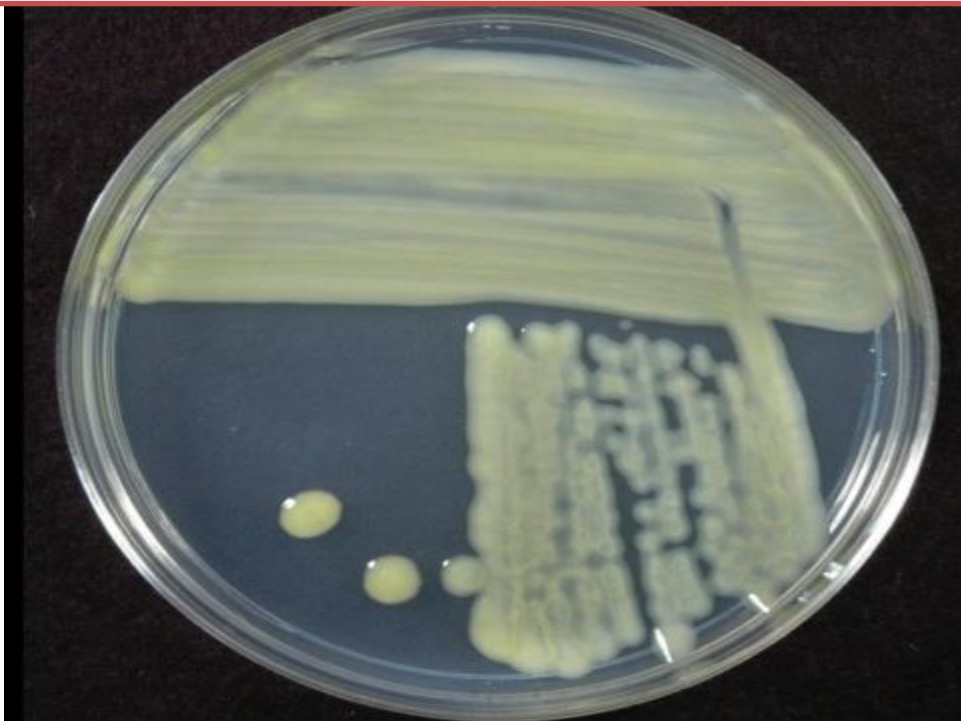
- ***Escherichia coli***: est une bactérie à Gram-négative appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, sous-classe γ -*Proteobacteria*.
- *E. coli* (enzymes) est utilisées pour la production de plusieurs acides aminés, notamment le L-tryptophane (tryptophanase) et le L-thréonine.
- *E. coli* est utilisée aussi pour la production de certains sucres comme la bioconversion du L-rhamnose en L-rhamnulose.
- L'enzyme glucose isomérase d'***E. intermedia*** et ***E. freundii*** est utilisée dans la production de fructose (conversion du glucose en fructose).

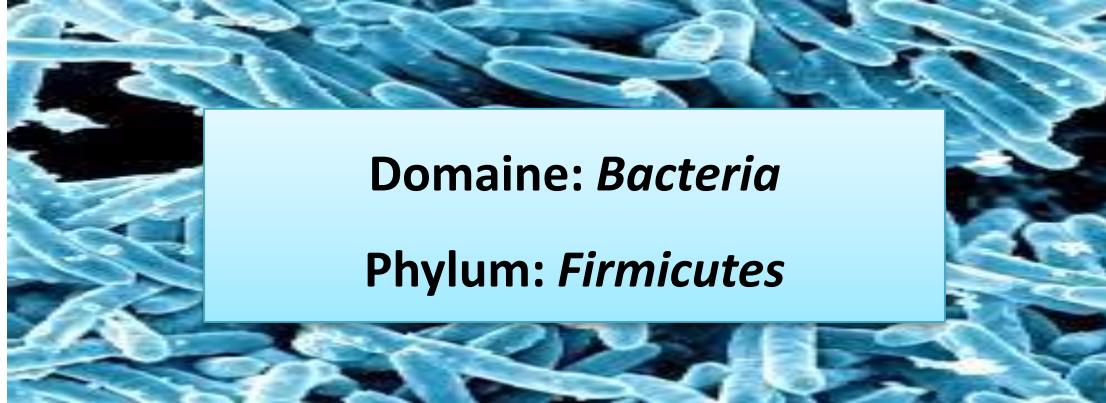


Exemples des *Proteobacteria* d'intérêt industriel

Bactéries de production des polysaccharides

Les *Xanthonomas* fait partir de la famille *Xanthomonadaceae* des protéobactéries .
On trouve notamment dans ce groupe l'espèce *Xanthomonas campestris*, d'une importance pour la production industrielle d'un exopolysaccharide, le xanthane.





Domaine: *Bacteria*

Phylum: *Firmicutes*

- Les *Firmicutes* sont des bactéries à Gram-positive, hétérotrophes, la plupart sont des coques ou des bâtonnets et certains produisent des endospores.
- Elles peuvent être aérobies à anaérobies.

Classification phylogénétique

Le phylum de Firmicutes regroupe 04 classes essentielles

Phylum : *Firmicutes*

Classe I : *Clostridia*

Ordre : *Clostridiales*

Famille I : *Clostridiaceae*

Famille II : *Peptostreptococcaceae*

Famille III : *Peptococcaceae*

Classe II : *Mollicutes*

Classe III : *Bacilli*

Ordre I : *Bacillales*

Famille I : *Bacillaceae*

Famille II : *Planococcaceae*

Famille III : *Listeriaceae*

Famille IV : *Staphylococcaceae*

Ordre II : *Lactobacillales*

Famille I : *Lactobacillaceae*

Famille II : *Enterococcaceae*

Famille III : *Leuconostocaceae*

Famille IV : *Streptococcaceae*

Classe IV : *Togobacteria*

Bactéries lactiques

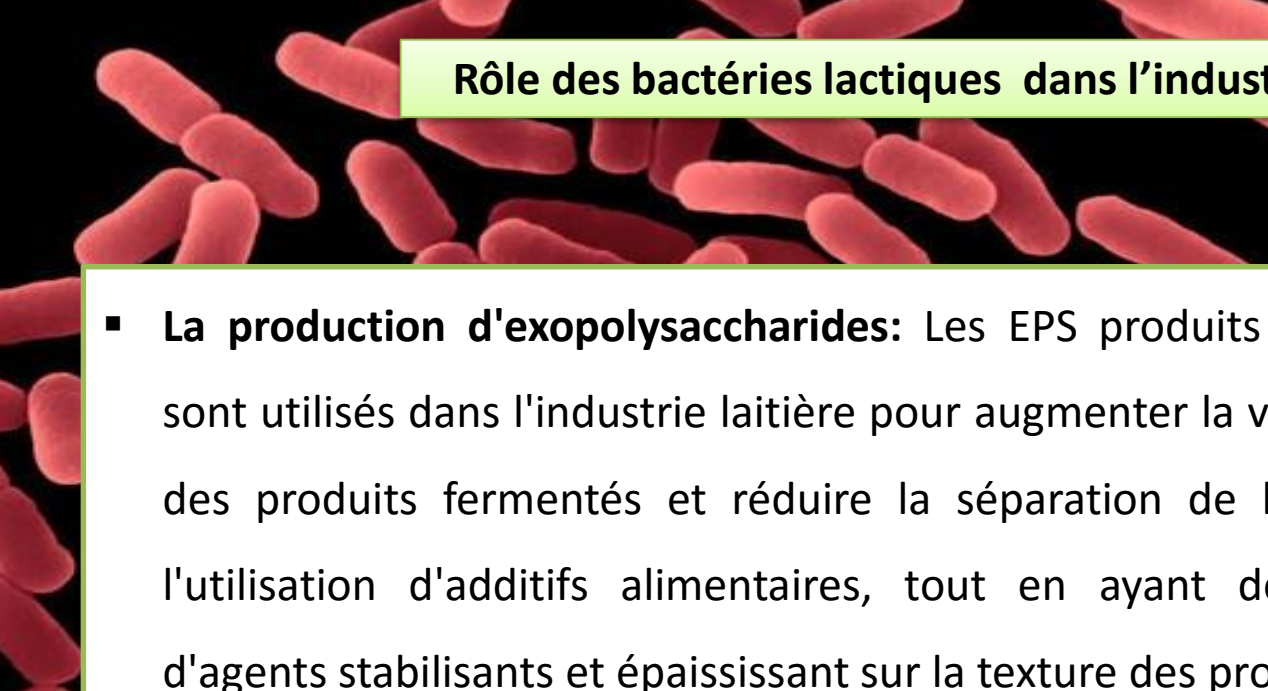


- Elles appartiennent au phylum *Firmicutes*, la classe *Bacilli* et à l'ordre *Lactobacillales*, comportant les familles suivantes : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*.
- Les *Bifidobacteriaceae* de l'ordre des *Bifidobacteriales* sont aussi classées parmi les bactéries lactiques.
- Elles produisent l'acide lactique qui permet d'acidifier le substrat et par conséquent d'inhiber la prolifération de germes pathogènes ou d'agents indésirables provoquant des modifications organoleptiques.
- Les bactéries lactiques sont utilisées dans les produits laitiers (yaourts, fromages), les légumes fermentés (olives, cornichons, choucroute), les boissons alcooliques fermentées (vin, bière, cidre), la charcuterie (jambon, saucissons) et le pain au levain.




Rôle des bactéries lactiques dans l'industrie

- Les bactéries lactiques sont présentes dans de nombreux milieux naturels, allant du sol, des plantes en décomposition, aux animaux. Le tractus gastrointestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques comme *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Leuconostoc*.
- Les bactéries lactiques sont aéroanaérobies ou microaérophiles, exigeantes d'un point de vue nutritionnel car elles sont incapables de synthétiser un certain nombre d'acides aminés.
- **Fermentation des glucides:** Les bactéries lactiques étant incapables d'obtenir leur énergie par la respiration, elles recourent à la fermentation des glucides en acide lactique.
- **Métabolisme du citrate:** Dans l'industrie laitière, l'acide citrique présent dans le lait est considéré comme le principal précurseur de la formation des composés aromatiques appréciés comme l'acétate.



Rôle des bactéries lactiques dans l'industrie (suite)

- **La production d'exopolysaccharides:** Les EPS produits par les bactéries lactiques sont utilisés dans l'industrie laitière pour augmenter la viscosité du lait et la fermeté des produits fermentés et réduire la séparation de l'eau et du gel. Ils évitent l'utilisation d'additifs alimentaires, tout en ayant des propriétés équivalentes d'agents stabilisants et épaississants sur la texture des produits laitiers.
 - Les dextrans (EPS constitué de résidus de glucose liés en α 1,6) sont utiles en assainissement biologique de l'environnement, pour la récupération assistée de pétrole ou pour l'épuration des eaux usées.
- **La production de bactériocines:** Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire. Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram-positives.

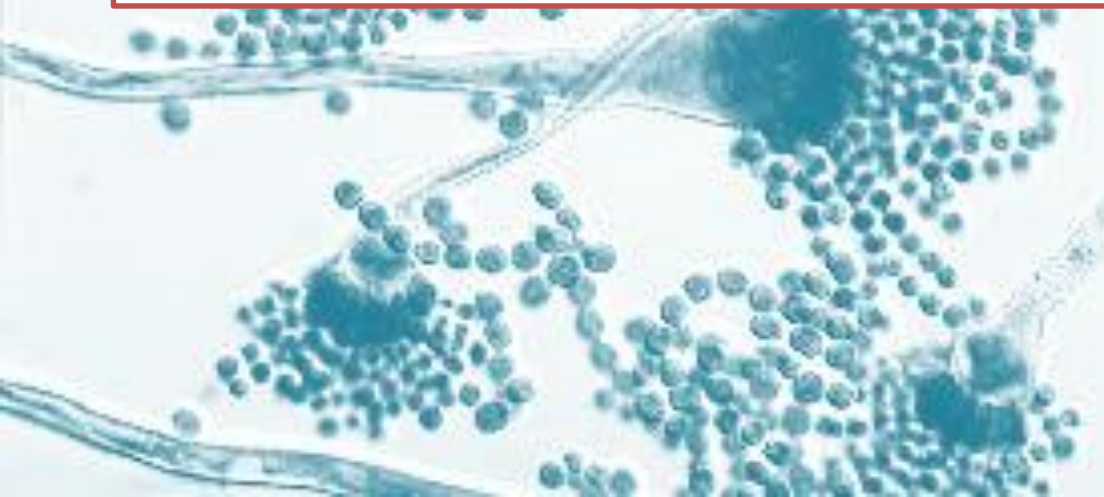


Rôle des bactéries lactiques dans l'industrie (suite)

- De nombreuses bactériocines sont produites par les bactéries lactiques des genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Streptococcus*.
- Elles sont particulièrement intéressantes pour l'industrie agroalimentaire en raison de leur innocuité reconnue pour l'homme.
- Elles intéressent aussi l'industrie pharmaceutique car elles pourraient devenir une alternative à antibiothérapie actuelle face à la résistance des bactéries pathogènes.

Moisissure

- Ce sont en général des organismes pluricellulaires, la plupart des moisissures sont hétérotrophes, certaines espèces possèdent un métabolisme mixte.
- Les moisissures sont à l'origine de la découverte de la pénicilline, le premier antibiotique réellement efficace. Il est produit naturellement par les moisissures du genre *Penicillium*.



Classification phylogénétique

Le domaine des mycète possède 4 divisions principales

Règne: *Fungi*

Division: *Ascomycota*

Sous-division: *Pezizomycotina*

Classe: *Eurotiomycetes*

Sous-classe: *Eurotiomycetidae*

Ordre: *Eurotiales*

Famille: *Trichocomaceae*

Genre: *Trichocomaceae*

Division : *Basidiomycota*

Classe: *Agaricomycetes*

Sous-classe: *Agaricomycetidae*

Ordre: *Agaricales*

Famille: *Marasmiaceae*

Genre: *Lentinula*

Division : *Deuteromycota*

Division : *Zygomycota*

Myciculture

- La myciculture ou fungi-culture est la culture des champignons comestibles (champignons alimentaires).
- La plus grosse part du marché est occupée par le champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), ainsi que par des champignons asiatiques tels que le champignon noir (*Lentinula edodes*).

Champignon de Paris (*Agaricus bisporus*)

- *Agaricus bisporus* est une espèce de champignons de la famille des *Agaricaceae*.
- Ce champignon est cultivé sous le nom de champignon de Paris ou champignon de couche .
- C'est le champignon le plus cultivé en champignonnière (des caves ou des bâtiments de récolte) car il est simple et rapide à cultiver.
- La production du champignon de Paris représente environ les trois quarts de la production mondiale.



Aspergillus niger

- C'est un champignon filamenteux ascomycète de l'ordre des *Eurotiales*, il apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et légumes.
- *Aspergillus niger* est une espèce importante sur le plan économique car elle est utilisée en fermentation industrielle pour produire de:
 - ✓ **L'acide citrique:** utilise dans l'industrie agroalimentaire comme acidifiant et antioxydant pour renforcer les saveurs et conserver les jus de fruits.
 - ✓ **L'acide gluconique:** est un constituant naturel des jus de fruit qui est largement utilisé dans les médicaments, la nourriture, les détergents, le textile, le cuir etc.
 - ✓ **Les enzymes:** comme la glucose oxydase, la catalase et les hydrolases (cellulase, xylanase, pectinase) qui sont les principales enzymes utilisées dans la production des bières et des boissons sucrées.

A microscopic image showing the filamentous structure of Penicillium. The image displays a network of thin, branching hyphae. Some hyphae are straight, while others are curved or branched. The filaments are light-colored, possibly due to the staining used in the micrograph. A central label with the word 'Penicillium' is overlaid on the image.

Penicillium

- Les *Penicillium* sont des champignons filamenteux.
- Ce sont des champignons très communs dans l'environnement pouvant être responsables de nombreuses dégradations.
- Diverses espèces sont cultivées au niveau industriel pour la fabrication de:
 - Le fromages (*Penicillium roqueforti*, *Penicillium camembertii*).
 - La production de métabolites :
 - Les antibiotiques de type pénicillines (*Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum*).
 - L'acide gluconique (par *Penicillium purpurogenum*).

Penicillium roqueforti

- *Penicillium roqueforti* est une espèce de champignons ascomycètes saprophytes, très répandue dans la nature.
- Son principal usage fermier, artisanal ou industriel est la transformation laitière attachée aux fromages à pâte persillée comme le roquefort, la fourme d'Ambert...
- Elles sont également utilisées pour la production de saveurs et de parfums.

Penicillium notatum

- C'est une espèce de champignon microscopique du genre *Penicillium*, célèbre pour être à l'origine de la découverte de la pénicilline.
- *Penicillium* se retrouve sur le pain ou les fruits moisissés ainsi que sur certains fromages.

A microscopic image showing several large, oval-shaped yeast cells with a textured, slightly granular surface. The cells are yellowish-green in color and are clustered together. One cell in the center is particularly prominent, showing its rounded shape and surface details. The background is dark, making the cells stand out.

Levures

- La levure est un champignon unicellulaire capable de provoquer la fermentation des matières organiques animales ou végétales.
- Pour la plupart, elles appartiennent à la division *Ascomycota*, de la règne *Fungi*.
- Les levures sont utilisées pour la fabrication du vin, de la bière, des alcools industriels, des pâtes levées et d'antibiotiques.

Exemple:

- La levure de boulanger est une levure obtenue à partir de différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* seules ou en mélange, utilisée pour obtenir une fermentation du pain lors du processus de panification.

Algues

- Les algues sont des organismes capables de pratiquer la photosynthèse et vivent majoritairement dans un milieu aquatique, ce sont donc des végétaux (dépourvues de tige, de racine, de feuille ou de fleur).
- Les algues peuvent être unicellulaires et de tailles microscopiques, elles constituent le phytoplancton, d'autres espèces sont multicellulaires peuvent atteindre des tailles impressionnantes.
- **Classification:** Il s'agit d'un groupe incluant des organismes procaryotes (les cyanobactéries) et eucaryotes. Ces derniers sont répartis en plusieurs taxons dont les plus importants sont : les algues bleues ; les algues brunes ; les algues rouges et les algues vertes.
- De nombreuses espèces sont comestibles pour l'Homme ou les animaux.
- Elles servent également d'engrais.
- Plusieurs projets essaient d'exploiter les algues pour la production de biocarburant.



- Les algues sont exploitées pour fournir de la soude (carbonate de sodium) et l'iode.
- Les algues sont aussi exploités, pour la production de gélifiants nécessaires à l'industrie alimentaire et chimique.
 - Les alginates (type de gélifiant) produits par les algues (*Ascophyllum nodosum*) contribuent à la fabrication de nombreux produits dans des domaines aussi variés que la chimie, l'alimentation, les cosmétiques, l'environnement et la santé.

A background image showing several spherical, textured virus particles in shades of blue and purple against a pinkish-purple background. A yellow rectangular box with the word 'Virus' in black text is overlaid on the top left of the image.

Virus

- Un virus est un agent infectieux nécessitant un hôte (parasite obligatoire).
- Les virus sont classifiés selon la nature de l'acide nucléique de leur génome (ADN ou ARN), la structure de l'acide nucléique (monocaténaire ou bicaténaire), la forme de l'acide nucléique (linéaire, circulaire, segmenté ou non).
- Ce sont des outils utilisés par exemple pour faire acquérir à une cellule la capacité de produire une protéine d'intérêt ou pour étudier l'effet de l'introduction du nouveau gène dans le génome.

Exemple:

- Les baculovirus sont des virus d'insectes très étudiés, ils constituent des moyens pour limiter ou remplacer les insecticides chimiques.

2-2- Caractéristiques des microorganismes utilisés en industrie (critères de sélection)

- Production de substance d'intérêt industriel.
- Pouvoir de sécrétion de cette substance dans des cultures à grande échelle.
- Production des spores ou des cellules végétatives facilitant l'inoculation de grands fermenteur.
- Croissance rapide et production de métabolite désiré sur une échelle de temps courte
- Croissance dans un milieu de culture relativement bon marché et disponible en grande quantité (un milieu simple et de préférence ne requiert pas de facteurs de croissance).
- Ne doit pas être nuisible à l'homme ou l'environnement.
- Possibilité d'être manipulé génétiquement.

2-2- Caractéristiques des microorganismes utilisés en microbiologie industrielle (critères de sélection) (suite)

- Le produit ne doit pas inclure des produits toxiques ou indésirables, surtout les produits consommables.
- Avoir une stabilité physiologique.
- Avoir une méthode d'extraction facile.
- Si possible, l'organisme possède des propriétés physiologique qui le protège contre la contamination; pH acide ou les températures élevées.
- Etre résistant au bactériophages.
- Si possible, l'organisme ne pas trop demandeur d'oxygène .

2-2-1. Sources des microorganismes utilisés en Biotechnologie

1. Recherche dans la littérature, le stock des cultures de collection ou les organismes des brevets d'invention.
2. Isolement de nouveau de microorganismes producteurs du produit désiré (du sol, les environnement marins et extrêmes).
 - 2.1. Enrichissement par le substrat utilisé par le microorganisme ciblé.
 - 2.2. Enrichissement par des analogues toxiques du substrat utilisé par le microorganisme ciblé.
 - 2.3. Test des métabolites microbien pour une activité bioactive (test de l'activité antimicrobienne, test pour la production enzymatique).
 - 2.4. Amélioration des souches.

2-2-2. Amélioration des souches

a) Objectifs:

- Augmenter la capacité de production (du produit) des microorganismes.
- Amélioration de la spécificité de substrat et de la vitesse de production.
- Amélioration des nouvelles voies de production.
- Régulation de l'activité des enzymes constitutives ou inductibles (présence tout temps: fait partir de la métabolisme de base; ou leur présence est induit par la présence de substrat).
- Amélioration de la résistance aux condition défavorables (température, pH, toxine, bactériophage).

b) Procédures d'amélioration des souches:

- Un système d'extraction plus efficace.
- Un milieu de culture plus productif (en composition).
- Assurer les conditions les plus favorables pour l'activité des microorganismes (température, pH).
- Meilleur control du processus de fermentation.
- Amélioration génétique des souches (le meilleur).
 - ✓ Régulation de l'activité des enzymes sécrétées par le microorganisme.
 - ✓ Augmenter la perméabilité de la paroi si le produit est sécrété à l'extérieur.
 - ✓ Sélection de souches à haute production à partir de la population naturelle.
 - ✓ Manipulation du matériel génétique de la souche.
 1. Manipulation du matériel génétique n'impliquant pas de l'AND étranger.
 2. Manipulation du matériel génétique impliquant de l'AND étranger.

2-2-2-1. Manipulation du matériel génétique n'impliquant pas de l'AND étranger

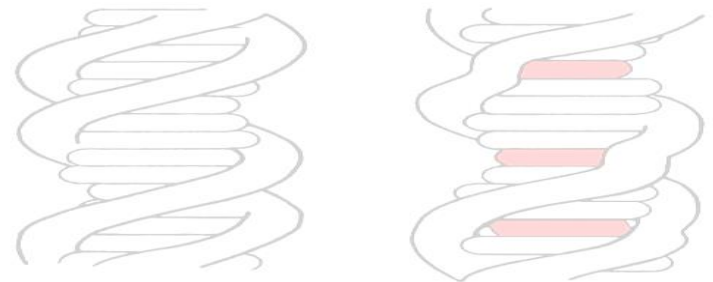
Mutation conventionnelle (mutagènes)

- Agents physiques:
 - Radiations ionisantes: rayons X, rayons gamma, particules alpha, neutrons accélérés.
 - Rayon UV (200 et 300 nm): Formation de liaison covalente entre pyrimidines (C et T).
- Agents chimiques: trois types:
- Agents actifs sur l'ADN en phase de non réplication:
 - Acide nitrique (nitrate de sodium).
 - Agents alkylants (transfert d'un groupement alkyle-dérivent des alcanes par la perte d'un atome d'hydrogène- à l'ADN: EMS (éthyle méthane sulfonate), EES (éthyle éthane sulfonate) et DES (Di-éthyle sulfonate).

- Nitrosoguanidine et le Méthylnitrosoguanidine (NTG et MNTG): Ils agissent en ajoutant des groupes alkyle à la guanine et le thymine, ce qui peut conduire à des mutations de transition entre GC et AT.

• Analogues de l'ADN: des composés qui sont structurellement similaires à l'ADN, ils permettent des modifications de la structure de la chaîne, en remplaçant le squelette phosphate.

• Agents causants le changement du cadre de lecture: des molécules peuvent s'intercaler dans l'ADN, dans l'espace compris entre deux paires de bases, on peut citer l'éthidium et la proflavine.



▪ Choix du mutagène:

- ✓ Efficacité du mutagène: empirique.
- ✓ Mutagène non dangereux.
- ✓ Simplicité de la technique.
- ✓ Disponibilité de l'équipement et de l'agent

2-2-2-2. Manipulation du matériel génétique impliquant de l'AND étranger

Les méthodes utilisées sont:

- 1. Transduction
- 2. Conjugaison
- 3. Transformation
- 4. La recombinaison
- 5. Fusion des protoplastes
- 6. Ingénierie génétique
- 7. Ingénierie métabolique
- 8. Mutation dirigée

- **La transduction:** est le transfert d'information génétique à partir d'un donneur vers un receveur via un bactériophage.
 - Très pratique pour les bactéries mais peu pour les mycètes.
- **La conjugaison:** consiste en une transmission de plasmides de conjugaison d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse et son intégration dans le génome de celle-ci.
- **La transformation :** est le transfert de gènes résultant de l'absorption d'ADN nu par une cellule receveuse à partir d'une cellule donneuse (exposition à une solution d'ADN).
 - La méthode à un bon potentiel industrielle.

- **La recombinaison:** c'est le réarrangement ordonné de l'ADN, il implique une cassure et une ligature des brins d'ADN pendant le processus de la réarrangement.
- **Fusion des protoplastes:** permet de fusionner deux espèces différentes pour former un nouvel hybride héritant des propriétés génétiques des deux espèces d'origine.
 - Elle a un grand potentielle en industrie.
- **mutation dirigée sur un site:** est l'induction d'une ou plusieurs mutations dans un génome, de façon précise et volontaire.
 - Cette méthode nécessite un groupe d'enzymes spécialisées qui reconnaissent les sites cibles.
- **Ingénierie métabolique:** création ou modification de voies métaboliques par manipulation des gènes de la voie, dans le but d'améliorer la production d'un métabolite, d'éliminer ou de réduire un métabolite indésirable, ou de changer la production vers un nouveau métabolite.

- **Ingénierie génétique (technologie de l'ADN recombinant, clonage moléculaire, clonage de gènes)**
 - Excision d'une portion spécifique de l'ADN du donneur.
 - Insertion de cette portion dans un ADN réplicatif (vecteur, exp: plasmide).
 - Transfert de l'ADN recombinant dans la cellule hôte.
 - Isolement des cellules hôtes qui ont efficacement reçues l'ADN recombinant.

2-3. Conservation des souches

- ❖ **Les cultures de collection:** chaque bioindustrie possède une collection des microorganismes en conservation.

les types des collections :

- **Collection de différents microorganismes:** American Type Culture Collection (ATCC): centre de ressources biologiques, dont la mission se concentre sur l'acquisition, la production, la conservation, le développement et la distribution des micro-organismes et d'autres matériaux pour la recherche dans les sciences de la vie.
- **Collection spécifique:**
 - **Les pathogènes :** National Collection of Type Cultures (NCTC) en London
 - **Souches industrielles:** National Collection of Industrial Bacteria (NCIB) en Scotland
 - **Type particulier (les mycètes):** Center of Braun Svezter (CBS) en Holland

❖ **Méthodes de préservation:** le choix est en fonction de microorganisme et le but recherché:

Principe: diminuer la vitesse du métabolisme de l'organisme.

Les méthodes de préservation (conservation) impliquent un ou plusieurs des techniques suivantes:

- (a) Réduction de la température de croissance.
- (b) Dessiccation ou déshydratation du milieu de culture.
- (c) Limitation des nutriments disponibles au microorganisme.

a) Méthodes basées sur la réduction de la température de croissance

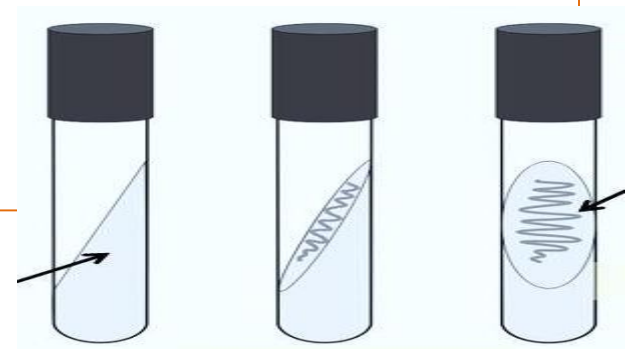
1. Préservation sur l'agar avec réfrigération ordinaire (4-10°C):

- Les microorganismes aérobies: gélose inclinée.
- Les microorganismes anaérobique: gélose profonde + paraffine ou de huile.
- Stockage de 3 a 12 mois

Les avantages: méthodes peu couteuse car ne nécessitent pas d'équipement spéciaux

Les inconvénients:

- La température de réfrigération ne limite pas complètement la croissance des microorganismes et donc nécessité un repiquage répétitif de la souche.
- Risque de contamination et de mutation consécutif au repiquage répétitif.
- Occuper un volume important.
- Le repiquage est fatiguant.



2. Préservation dans des congélateurs (de -20°C jusqu'à -80°C):

- Des morceaux de culture solide + un cryoprotecteur (glycérol, raffinose, lactose, ou tréhalose).
- Des billes en verre dans un bouillon de culture + cryoprotecteur.

Avantages

- La méthode est simple et nécessite peu d'équipement.
- Stockage jusqu'à 3 ans.
- Utilisable pour différents types d'organisme.
- Les tubes requièrent peu d'espace.
- Les billes se dégèlent rapidement, donc économie de temps.
- Utilisation de différentes couleur de billes, donc facilité la reconnaissance des microorganismes.
- La méthode est adaptée pour les aérobies et les anaérobies.



3. Préservation dans la phase liquide ou vapeur de l'azote (-156-196°C):

Méthode: bouillon de culture + 10 à 20% glycérol ou 5-10% diméthylsulfooxyde (DMSO) dans des pailles (cannes) en polypropylène.

- Elle est souhaitable pour les microorganismes qui ne supportent pas la lyophilisation.
- Méthode de choix pour la préservation des organismes précieux.

Inconvénients

- Remplacement régulier de l'azote liquide (il s'évapore).
- Risque d'explosion de la paille durant le dégel.
- L'équipement est très chère.
- Mauvaise méthode pour le transport.

SILICA

L

W AWAY

OT EAT"



b) Méthodes basées sur la déshydratation

Principe: élimination de l'eau nécessaire au métabolisme.

1. Séchage sur un gèle de silice stérile:

- Un tube à vis est demi rempli de gèle de silice et stérilisé au four.
- Après refroidissement, la suspension du microorganisme est versé dans le tube qui sera séché à 25°C, puis stocké dans un container contenant un dessicatif.

2. Séchage sur un papier filtre stérile: pour les spores.

3. Séchage dans un sol stérile: surtout pour les microorganismes sporulants.

4. Lyophilisation (congélation-séchage, cryodessication): consiste à ôter l'eau libre de l'échantillon à l'aide de la surgélation puis une évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre (lyophilisateur).



Avantage:

- Utilisable pour la conservation de quantités importantes des microorganismes dans l'industrie.
- Un équipement relativement peu coûteux.
- Les ampoules occupent peu d'espace.
- La longévité des organismes (jusqu'à 10 ans).

c) Méthodes basées sur la réduction des nutriments

Méthodes: Préservation dans de l'eau distillée stérile (avec ou sans réfrigération).

- Peu d'organismes sont préservés par cette méthode.

❖ Choix de la méthode

- Littérature.
- Par expérimentation.
- Préservation des propriétés industrielles de la souche.