RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR-ANNABA

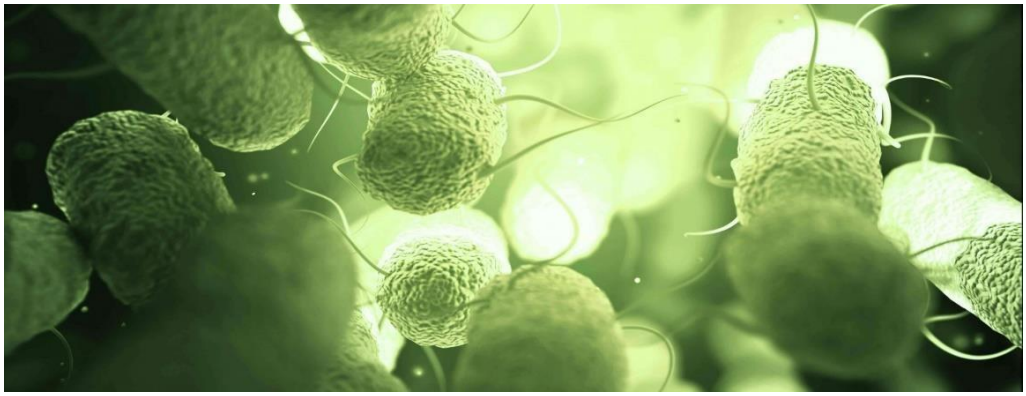
FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE

SUPPORT PEDAGOGIQUE DE COURS DE LA MATIÈRE

MICROBIOLOGIE INDUSTRIELLE

3eme année Licence Microbiologie appliquée





Année Universitaire 2023/2024

SOMMAIRE

Liste des figures
Liste des tableaux
Liste des abréviations
Glossaire

Introduction……. 05

Chapitre I. Les domaines d'activité de la microbiologie industrielle et intérêt de l'utilisation des microorganismes

1. Intérêt de l'utilisation des microorganismes en industrie…….. 05
2. Objectif de la fermentation industrielle

3. Intérêts de l'utilisation des microorganismes …… 08
4. Les domaines d'activités……. 08

Chapitre II : les microorganismes utiles

Introduction……. 12
1. Les microorganismes ……..... 12
1.1.Les Archea ……..... 12
1.2. Les bactéries …….. 17
1.3. Les champignons……..…. 20
1.4. Les moisissures……..…. 21
1.5. Les levures……..….... 22
1.6. Les microalgues…….. 23
1.7. Les virus……... 24
1.8. Les bactériophages……... 25
2. Moyens d'obtention des microorganismes……..... 26
3. Recherche de nouveaux antibiotiques……... 26
4. Méthodes de purification……... 33
5. Rappel de Taxonomie…… 39

Chapitre III. Milieu de culture industriel

1. Définition……..... 40
2. Caractéristiques des milieux de cultures……. 40
3. Composition des milieux de culture industriels……..... 41
3.1. Source d'énergie et de carbone (carbohydrates)…….. 41
3.1. Source d'azote…….. 43
3.3. Sels minéraux……... 43
3.4. Vitamines et facteurs de croissance……..... 43
3.5.-Précurseurs……... 44
3.6. Eau……..... 44
3.7. Oxygène…… 44
3.8 Antimousses ……. 44

4. Asepsie du milieu de culture……..... 45
5. Quelques matières premières utilisées en industrie……..... 45
6. Le choix du milieu de culture……..... 46

Chapitre IV : Les fermentations industrielles

Introduction…… 48
1. Définition de la fermentation……..... 48
2. Définition du fermenteur……..... 50
3. Types de fermenteurs……..... 51
4. Composants du bioréacteur…… 52
5. Fonction principale d'un fermenteur (bioréacteur)…… 53
6. Types de processus de fermentation microbienne……... 54
5.1. La fermentation discontinue (en batch)…… 54
5.2. La Fermentation fed batch…… 56
5.3. La Fermentation continue……..... 58
5.4. La Fermentation en phase solide……..... 59
7. La mise à échelle industrielle ou scale up……... 61
8. Les Protéines d'Origine Unicellulaire (P.O.U) ou (SCP)……... 66

Chapitre V : Les produits de fermentations industrielles

Introduction……70
5.1. Les métabolites primaires obtenus par fermentation microbienne……72
Les acides aminés……..... 72
Les acides organiques……... 78
Production du biogaz…… 87
Les vaccins…… 93
5.2. Les métabolites secondaires 102
Les antibiotiques…… 102
Les vitamines……. 110
Les polysaccharides……... 116
5.3. Les enzymes…… 121

Bibliographie…….. 127

Liste des figures

Figure 1. Importance des microorganismes en industrie…….. 07
Figure 2. Arbre phylogénétique rapportant les organismes extrêmophiles……..... 14
Figure 3. Forme de cellules bactériennes et leurs modes de regroupement……..... 15
Figure 4. Différents domaines d'utilisation des levures…….. 19
Figure 5. Les principales étapes de la production d'un vaccin…… 22
Figure 6. Halo d'inhibition sur boite Pétri……..... 24
Figure 7. Test de mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des stries croisées……..... 26
Figure 8. Test de mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des cylindres d'agar……..... 27
Figure 9. Technique des puits…….. 28
Figure 10. Technique des disques……..... 28
Figure 11. Extraction de molécules (antibiotiques)…….. 29
Figure 12. Séparation des molécules par chromatographie…….. 30
Figure 13. Exemple de spectre HPLC…….. 31
Figure 14. Exemple de spectre en UV-visible…… 32
Figure 15. Exemple de spectre infrarouge…… 32
Figure 16. Exemple de spectre de masse……..... 33
Figure 17. Exemple de spectre RMN…… 33
Figure 18. Schéma général d'un bioréacteur industriel……. 47
Figure 19. Evolution de taux de croissance des cellules…….. 49
Figure 20. Évolution de taux de croissance des cellules (X), par rapport aux taux de conversion de substrat (S)…….. 50
Figure 21. Evolution des concentrations en biomasse et en substrat……..... 51
Figure 22. Evolution de la production fermentation continue…….. 52
Figure 23. Petit fermenteur de recherche (laboratoire)…….. 55
Figure 24. Mise à l'échelle du processus……..... 59
Figure 25. Criblage et optimisation de la production de POU)…… 62
Figure 26. Schéma du métabolisme primaire et secondaire des champignons montrant quand se produit la production de métabolites secondaires…… 64
Figure 27. Rendement théorique de production de la lysine à partir de glucose et d'ammonium…….. 70

Figure 28. Formule semi développée de l'acide citrique……..... 72
Figure 29. Voie de synthèse de l'acide citrique……..... 74
Figure 30. Cycle du Krebs…….. 75
Figure 31. Photos d'une usine de la fabrication de l'acide citrique par la fermentation ensurface……..... 78
Figure 32. Les étapes de la fabrication de l'acide citrique……... 79
Figure 33. Les 4 étapes de la méthanisation……..... 81
Figure 34. Evolution des systèmes de production des vaccins……..... 88
Figure 35. Fabrication biologique. Exemple du Vaccin Polio Inactivé…..……..... 89
Figure 36. Structure de la pénicilline…… 99
Figure 37. Structure de la Streptomycine……..... 101
Figure 38. Structure de la Tétracycline……..... 103
Figure 39. Structure de la vitamine12…….. 107
Figure 40. Organigramme général de la production industrielle de cobalamine applicable au procèdé aérobie chez P. denitrificans…….. 110
Figure 41. Structure chimique du xanthane, gellane et hyaluronane……. 113

Liste des tableaux

Tableau 1. Quelques exemples de l'application des microorganismes en industrie.. 09
Tableau 2. Exemples de formes de moisissures sur le milieu PDA……... 18
Tableau 3. Principaux constituants des milieux de culture utilisés dans les procédés industriels……... 36
Tableau 4. Avantages et inconvénients de l'utilisation de milieu de culture complexe, synthétique et semi synthétique, dans les bioprocédés industriels…… 41
Tableau 5. Comparaison entre la FMS et FML…… 54
Tableau 6. Paramètres de fermentation dépendants de l'échelle……... 57
Tableau 7. Principales différences entre les métabolites primaires et secondaires... 65
Tableau 8. Quelques microorganismes producteurs d'acide citrique……... 76
Tableau 9. Exemples d'antibiotiques produits par le genre Streptomyces…… 96
Tableau 10. Enzymes présentes chez Aspergillus oryzae……... 117
Tableau 11. Exemples d'enzymes industrielles et de microorganismes producteur.. 120
Tableau 12. Marché mondial des enzymes industrielles en 1996…… 121

.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

A: Adénine

ADP: adénosine diphosphate

ATP: adénosine triphosphate

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messager

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ARNr 16S : Sous-unité 16S de l'ARN ribosomique

CH4 : Méthane

C: Cytosine

Cl : chlore; chlorure

CO : monoxyde de carbone

CO2 : dioxyde de carbone

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

Da : Dalton

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments

ELISA: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

EPS: Exo polysaccharides

FAO: Food and Agriculture Organization

FML: Fermentation en milieu liquide

FMS: Fermentation en milieu solide

G: Guanine

H20: Eau

MDR : Multi Drug Resistance

ME : membrane externe

MH : Mueller-Hinton

MS : Spectrométrie de masse

NaCl : Chlorure de sodium

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NCBI : National Center for Biotechnology Information

nm : nanomètre (= millimicron)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pb : paire de bases

PBS (phosphate buffered saline) : tampon phosphate salin

PCR (polymerase chain reaction) : réaction en chaîne par polymérase (ou amplification en chaîne par polymérase), méthode de biologie moléculaire d'amplification d'ADN in vitro

PDA : Potato dextrose agar

pH : concentration en ions hydrogène

P.O.U: Protéine unicellulaire

RMN : résonance magnétique nucléaire

SCP :Singl Cell Protein

Sp : espèces (au singulier)

spp :espèces (au pluriel)

T: Thymine

UFC : Unité Formant Colonie

UHPLC : Chromatographie en phase liquide à Ultra Haute Performance

UHT : Ultra haute température

UI : unité internationale

U: Uracile

Glossaire Microbiologie Industrielle

A

Abiotique : Facteurs physico-chimiques caractérisant un écosystème donné. Opposables aux facteurs biotiques, ils constituent une partie des facteurs écologiques de cet écosystème. Les facteurs climatiques (température, lumière, air..), chimiques (gaz de l'air, éléments minéraux..) sont des facteurs abiotiques. Un milieu abiotique est inapte au développement de la vie.

Acide désoxyribonucléique (ADN). Type d'acide nucléique constituant le matériel génétique de tous les organismes cellulaires : polynucléotide composé de désoxyribonucléotides unis par des liaisons phosphodiesters. Le chromosome des bactéries est généralement formé d'un double brin d'ADN circulaire surenroulé. Cependant, certaines bactéries présentent d'autres structures génomiques : chromosome linéaire (Borrelia burgdorferi), chromosomes multiples (Brucella melitensis qui possède deux chromosomes circulaires).

Acide nucléique : l'acide nucléique est une molécule d'origine naturelle présente dans chaque cellule et ayant la capacité de porter et de transmettre les instructions héréditaires qui sont codées permettant ainsi le développement de l'organisme. Il existe deux types d'acides nucléiques : l'ADN et l'ARN.

Acide organique : Composé organique (comportant des atomes de carbone) présentant des propriétés acides, c'est-à-dire capable de libérer un cation (ion chargé positivement) H^+, ou H_3O^+ en milieux aqueux. L'acide formique, l'acide malique sont des acides organiques.

Acide ribonucléique (ARN) : Type d'acide nucléique, polynucléotide composé de ribonucléotides unis par des liaisons phosphodiesters; on distingue : i) l'ARN messager (ARNm), responsable du transfert de l'information génétique de l'ADN au ribosomes qui assurent la synthèse des protéines; ii) l'ARN de transfert (ARNt), assurant le transport des acides aminés jusqu'au ribosomes; iii) l'ARN ribosomial (ARNr), intégrés dans la structure des ribosomes.

Acido-alcoolo résistante : Bactérie qui sous l'action de l'acide-alcool ne se décolore pas après coloration par une substance comme la fuchsine basique (coloration de Ziehl).

Acridine orange : C'est un fluorochrome (colorant fluorescent) qui peut s'intercaler dans l'acide nucléique natif et dénaturé.

Adhésion: étape de l'infection où le pathogène s'attache sur la cellule qu'il va envahir. L'adhésion implique des protéines du pathogène qui se fixent sur un récepteur à la surface de la cellule.

Aérobie : Caractérise à un système (par exemple un organisme vivant) ou un processus (comme la respiration) qui nécessite du dioxygène. Le terme aérobie est aussi utilisé en

aéronautique, dans le domaine de la propulsion : un moteur aérobie utilise le dioxygène de l'air ambiant comme comburant pour son fonctionnement.

Aérobiose : conditions atmosphériques nécessaires pour le développement des bactéries aérobies.

Amorces : Séquences oligonucléotidiques utilisées lors des réactions de PCR (abréviation anglaise de Polymerase Chain reaction). Elles définissent, en la bornant, la séquence à amplifier.

Amplification : technique le plus souvent à base d'enzymes, permettant de multiplier les acides nucléiques pour augmenter la sensibilité des méthodes de détection.

Anaérobie : Anaérobie signifie « vivant, actif, survenant ou existant en l'absence du dioxygène », par opposition à aérobie qui signifie « vivant, actif ou se produisant uniquement en présence de dioxygène »

Anaérobiose : Conditions atmosphériques nécessaires pour le développement des bactéries anaérobies.

Analyse phylogénétique : Analyse cherchant à établir les relations de parentés entre les êtres vivants. Elle est principalement fondée sur la cladistique, une méthode de reconstruction phylogénétique formalisée en 1950 par Willi Hennig.

Antagonisme : 1) amensalisme. 2) Antibiotique : une association d'antibiotiques est dite antagoniste lorsque son effet en bactériostase ou en bactéricidie est inférieur à celui de l'antibiotique le plus actif.

Antibiogramme : Technique d'étude de la sensibilité d'une souche bactérienne aux antibiotiques. Le résultat est exprimé de façon qualitative : il exprime une probabilité de succès pour une éventuelle thérapeutique (S : succès très probable, R : échec très probable, I : succès limité à certaines indications ou équiprobabilité de l'échec et du succès thérapeutique). Le terme reflète la notion d'antibiose qui peut s'appliquer à n'importe quelle catégorie d'êtres vivants.

Antibiotique : Substance naturelle ou ou produite par synthèse chimique qui empêche la croissance des bactéries (bactériostase) voire les détruit (bactéricidie).

Antibiotype : 1) Ensemble des réactions d'une souche de micro-organismes, de virus ou de parasites vis-à-vis de substances antibiotiques ou antimétaboliques. 2) Identificateur d'une souche à l'intérieur d'une espèce ("typage"). Sur la base des réactions précédentes une souche de micro-organismes, de virus ou de parasites est affectée à un sous-ensemble.

Anticorps : molécule produite par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes, en particulier les virus.

Antifongigramme : Antibiogramme réalisé sur des mycètes inférieurs. Ce terme est à éviter car il est construit sur "antifongique" par homophonie avec "antibiotique" et en pensant qu'un antibiotique est uniquement antibactérien.

Antigène : Substance étrangère à un organisme, telle que protéine, nucléoprotéine, polysaccharide et certains glycolipides, à laquelle les lymphocytes de l'organisme répondent ; le structure est dite immunogène quand elle induit une réponse immunitaire.

Antiseptique : Produit dont l'application sur une surface vivante réduit le nombre de micro-organismes (action bactéricide). L'activité, antiseptique fait l'objet d'une norme AFNOR.

Arbre phylogénétique : Représentation schématique des relations de parenté entre des groupes d'êtres vivants. Chacun des nœuds de l'arbre représente l'ancêtre commun de ses descendants ; le nom qu'il porte est celui du clade formé des groupes frères qui lui appartiennent, non celui de l'ancêtre qui reste impossible à déterminer. L'arbre peut être enraciné ou pas, selon qu'on est parvenu à identifier l'ancêtre commun à toutes les feuilles.

Archées : Microorganismes unicellulaires dépourvus noyau vivant en dans des milieux extrêmes (anaérobies, à forte salinité, très chauds…). Les recherches phylogénétiques de Carl Woese et George E. Fox (1977) ont permis de différencier les archées des autres organismes. Actuellement, on considère que le vivant est constitué de trois groupes : les archées, les bactéries et les eucaryotes.

ATP : Abréviation d'adénosine triphosphate. Nucléoside triphosphate composé d'adénine (base azotée), de ribose (sucre à 5 atomes de carbone) et de trois groupes phosphate formant un groupe triphosphate. Composé à la fois donneur et accumulateur d'énergie présent chez tous les organismes vivants. Sert également de matériaux de construction pour la synthèse des acides nucléiques.

Autoclave : Appareil qui stérilise les objets par de la vapeur d'eau sous pression (la température habituelle de l'autoclavage est de 121°C).

Autotrophie : Capacité pour un organisme à produire de la matière organique à partir de la réduction de matière inorganique et d'une source d'énergie externe lumière (photoautotrophie) ou réactions chimiques (chimioautotrophie).

Auxanogramme : Épreuve qui consiste à étudier l'effet sur la croissance d'un micro-organisme en milieu synthétique composé de divers substrats qui servent de sources uniques de carbone et d'énergie

B

Bacille : Bactérie en forme de bâtonnet. Les morphologies bactériennes sont variées. Les cellules peuvent être courtes, pratiquement sphériques (cocci) ou allongées (bacilles). Les bacilles sont essentiellement des cylindres à extrémités hémisphériques mais on en connaît aussi à extrémités fines, pointues (formes en fuseau) ou au contraire planes (bacilles dits "à bouts carrés"). Certains corps bacillaires sont incurvés (Vibrio, Campylobacter) ou spiralés (Leptospira, Treponema).

Bactéricidie : 1) Activité d'un antibiotique qui entraîne, au-delà d'une concentration seuil, l'apparition d'une mortalité bactérienne. 2) Etat d'une population bactérienne où la mortalité bactérienne est plus fréquente que la croissance bactérienne (diminution du nombre de cellules viables).Voir bactériostase.

Bactérie : micro-organisme unicellulaire dépourvu de chlorophylle et visible uniquement au microscope. Les bactéries sont des éléments qui n'appartiennent ni au règne végétal, ni au règne animal.

Bactérie commensale : la peau et les muqueuses sont en permanence colonisées par des bactéries commensales qui n'occasionnent pas de maladie, sauf si le sujet se fragilise.

Bactérie multi résistante : une bactérie est dite multirésistante aux antibiotiques lorsque, du fait de l'accumulation des résistances naturelles et acquises, elle n'est plus sensible qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique.

Bactériocine : Protéine produite par une souche bactérienne qui tue d'autres souches de bactéries, habituellement étroitement apparentées.

Bactériophage : Les bactériophages sont des virus spécifiques des bactéries. Comme les virus des organismes supérieurs, ils peuvent entrer dans la cellule, s'y multiplier en exploitant les processus synthétiques et métaboliques, sortir de la bactérie en provoquant la lyse. L'emploi de cette lyse bactérienne d'origine virale en thérapeutique s'est révélé totalement impossible tant pour des problèmes d'efficacité que de résistance bactérienne et de réactions immunitaires adverses chez le malade traité. Certains de ces virus peuvent infecter les cellules puis s'intégrer dans le génome sous une forme stable et partiellement exprimée sous forme de protéines appelée prophage . Ces bactériophages sont dits bactériophages tempérés. Des stimuli physiques (UV) ou chimiques (mutagènes) peuvent lever la répression de leur développement. Le virus, s'exprimant à nouveau, lyse la bactérie hôte lors d'un cycle lytique. Cette propriété est dénommée lysogénie. Tous ces virus contiennent un seul type d'acide nucléique (ARN ou ADN) protégé par une capside protéique dont le rôle est aussi la fixation sur des récepteurs bactériens.

Bactériostase : Ralentissement de la croissance bactérienne, pouvant aller jusqu'à l'arrêt de la croissance. Lorsque cette activité est maximale, le nombre de bactéries reste égal à celui de l'inoculum. Voir CMA, bactéricidie.

Bêta lactamase à spectre étendu : les bêta-lactamases sont une famille d'enzymes responsables de la résistance des bactéries vis-à-vis de certains antibiotiques comme la pénicilline.

Biofilms : Les biofilms sont des consortiums fonctionnels de cellules (bactériennes et/ou fongiques) enveloppées dans des matrices de polymères extracellulaires (glycocalyx). Certaines bactéries ne vivent que fixées à un support mais la plupart sont capables d'une vie libre dans un environnement liquide (vie planctonique). Ce sont ces bactéries libres qui sont cultivées au laboratoire.

Biologie moléculaire : technique qui permet de détecter une bactérie, un virus, une levure, un parasite ou un biomarqueur par la présence de séquences génétiques d'ADN ou d'ARN dans un échantillon.

Biomasse : Matière organique qui compose les êtres vivants et leurs résidus, qu'elle qu'en soit l'origine (plantes, bactéries, animaux, champignons…), présents à un moment donné dans un biotope particulier. Elle est toujours composée de carbone. D'un point de vue énergétique, la biomasse représente l'énergie que l'on peut obtenir par combustion ou fermentation de matière vivante.

Biotechnologie : Technique, méthode ou procédé faisant appel au vivant dans le but de rendre possible, d'accélérer ou de faciliter la synthèse ou la transformation d'un produit donné.

C

Capsule : Constituant le plus superficiel des bactéries. C'est un constituant inconstant de la bactérie. Constitué de polysaccharides acides (les sucres sont sous forme d'acides uroniques comme l'acide galacturonique, l'acide glucuronique, l'acide hyaluronique mais aussi sous forme de sucres phosphorés comme le ribitol-phosphate) ce composant est très lié à certains pouvoirs pathogènes car il empêche la phagocytose. Sa mise en évidence s'effectue par coloration négative (le colorant, encre de Chine ou Nigrosine est repoussé par la capsule et celle-ci apparaît en clair sur fond noir). La capsule n'est pas fixée solidement à la bactérie et peut se trouver à l'état soluble dans les liquides de l'organisme (emploi dans le diagnostic). La capsule intervient dans l'identification infra-spécifique ou typage qui est une des méthodes de reconnaissance des épidémies. Les polymères capsulaires purifiés sont la base de certains vaccins (*Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae*). La production de capsule peut être altérée par les antibiotiques au même titre que d'autres composés cellulaires.

Caractère biochimique : Dégradation ou modification d'un composé chimique par une bactérie ou un mycète inférieur, utilisée pour l'identification du micro-organisme. L'incubation d'une bactérie dans des milieux de culture dont la composition permet de mettre en évidence une activité physiologique (fermentation) ou enzymatique est largement utilisée pour identifier les bactéries. Un milieu type pour fermentation contient tout ce qui permet la croissance, dont un sucre et un indicateur coloré des changements de pH. La fermentation du sucre entraîne un abaissement du pH et donc un changement de couleur (virage) de l'indicateur coloré.

Caractère physiologique : Réponse d'une bactérie ou un mycète inférieur à un ou des conditions physicochimiques, utilisée pour l'identification du micro-organisme.

Carbapénémases : enzymes de type b-lactamases hydrolysant les carbapénèmes, une classe d'antibiotiques à spectre d'activité antimicrobienne large, principalement utilisés dans le traitement des infections à bactéries multirésistantes.

Carbone organique total (COT) : Mesure la totalité des matières organiques carbonées présentes dans une eau, par oxydation thermique ou photochimique.

Catalase : Enzyme catalysant les réactions d'oxydoréduction (ou oxydoréductase) héminique (qui renferme un hème (cofacteur contenant un atome de métal, souvent du fer), et qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène. On trouve la catalase chez tous les organismes aérobies (plantes, levure et animaux).

Catalyse : Action d'un élément qui accélère ou ralentit une réaction chimique. C'est en particulier le cas des enzymes.

Catalyseur : Élément (organique ou minéral) qui accélère ou ralentit une réaction chimique. Utilisé en très petite quantité et spécifique d'une réaction donnée, le catalyseur ne figure pas dans l'équation de la réaction ; il n'influence pas le sens d'évolution de la transformation, ni la composition du système dans l'état final. Une enzyme est un catalyseur biologique.

Charbon actif : Solide sous formes de granulés ou de poudre, issus de la calcination de matériaux carbonés (bois, houille, noix de coco, …), présentant des propriétés d'adsorption importantes notamment vis à vis des micropolluants organiques (pesticides par exemple).

Chimiolithotrophes : Métabolisme d'organismes autotrophes différant les uns des autres par la nature des réactions d'oxydation énergétiquement couplées à la réduction de CO_2. Il existe des bactéries de la nitrification des sols qui oxydent des sels d'ammonium en nitrites ou des nitrites en nitrates. D'autres oxydent soit les sulfures, soit le soufre en suspension colloïdale dans l'eau, soit les thiosulfates, et bien d'autres composés minéraux du soufre, selon les espèces biologiques. D'autres bactéries du sol oxydent les sels ferreux en sels ferriques et utilisent l'énergie libérée pour leurs synthèses.

Chromogène : molécule ayant la capacité d'émettre une couleur dans certaines conditions. Incorporée dans un milieu de culture, elle révèle la présence d'une enzyme spécifique d'une bactérie donnée, permettant ainsi l'identification de cette dernière.

Chromosome : Localisés dans le noyau des cellules, les chromosomes sont constitués d'ADN et de protéines. Support de l'information génétique, ils sont porteurs des gènes et se transmettent de génération en génération.

Cinétique : En chimie, la cinétique décrit l'évolution des systèmes chimiques dans le temps, le temps nécessaire au passage d'un état initial à un état final. Les lois de la cinétique chimique permettent de déterminer la vitesse propre à une réaction chimique.

Classification : Partition sur l'ensemble des bactéries, virus ou parasites. Il s'agit de regrouper en genres et espèces les micro-organismes.

CMA (Concentration Minimale Antibactérienne) : Concentration d'antibiotique entraînant les premières modifications morphologiques ou physiologiques de la bactérie.

CMB (concentration minimale bactéricide) : Concentration d'un produit antibiotique entraînant la mort d'un micro-organisme, d'un virus ou d'un parasite. Du fait de problèmes d'échantillonnage la mort n'est appréciée qu'avec une certaine incertitude. Cette CMB est obtenue pour un temps d'exposition donné et n'est donc pas une grandeur fixe. La tendance est à exprimer en fonction du temps. L'expression de la CMB n'a donc de sens qu'accompagnée d'un pourcentage d'efficacité et d'un temps: 99,99 % à 3 h, par exemple. Voir CMI.

CMI (concentration minimale inhibitrice) : Dans le cas usuel des micro-organismes à croissance "rapide" (24 heures), elle correspond à la concentration provoquant l'absence de croissance d'une population initiale (inoculum) de quelques milliers de bactéries, détectable visuellement en 24 heures. Voir CMB.

Coagulase : Enzyme qui induit la coagulation du sérum, produite de façon caractéristique par certaines espèces de staphylocoque.

Cocci : Les morphologies bactériennes sont variées. Les cellules peuvent être courtes, pratiquement sphériques (cocci) ou un peu allongées (coccobacilles).

Coenzyme : Molécules servant de cofacteurs dans certaines réactions catalysées par des enzymes avec lesquelles ils sont structurellement liés au sein d'un complexe stable.

Colonie : Ensemble de bactéries se développant sur une surface solide comme celle d'un milieu de culture gélosé, souvent visible à l'oeil nu mais pouvant aussi être microscopique. colonie. En théorie la colonie provient d'une seule cellule mère. L'accumulation des

cellules au même point rend l'agrégat de cellules visible à l'oeil nu ou à la loupe. Une colonie dérivant d'une seule cellule a une bonne probabilité d'être formée de cellules génétiquement homogènes. Ce terme s'emploie pour bactéries, mycètes inférieurs et certains parasites.

Coloration de Gram : Technique de coloration différentielle distinguant les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif sur la base de leur capacité à retenir le cristal violet, après décoloration par l'éthanol. Cette coloration est fondée sur l'action successive d'un colorant d'aniline (le cristal violet), d'iode puis d'un mélange d'alcool et d'acétone. Dans un premier temps, le colorant pénètre dans la paroi et le cytoplasme. Dans un second temps, l'iode réagit avec le colorant et le rend insoluble. La perméabilité plus grande des bactéries à Gram négatif à l'alcool permet la décoloration. Les bactéries à Gram positif restent colorées en mauve. Une contre-coloration (par exemple en rose) permet de visualiser à nouveau les corps cellulaires des bactéries à Gram négatif. L'intérêt de cette coloration est de donner une information rapide et médicalement importante, car le pouvoir pathogène et la sensibilité aux antibiotiques sont radicalement différents.

Coloration de Ziehl par l'acridine orange : Cette technique permet après coloration des acides nucléiques par l'acridine orange et décoloration par une solution acido-alcool, de mettre en évidence par fluorescence seulement les mycobactéries présentes dans le milieu analysé.

Communautés : Ensemble d'espèces appartenant à un même groupe taxonomique ou fonctionnel en interaction au sein d'un écosystème (par exemple la communauté des plantes ligneuses).

Conjugaison (biologie) : Échange d'ADN (en particulier de plasmides) entre deux bactéries vivantes.

Contaminant. 1) Souche de micro-organismes, de virus ou de parasites considérée comme non significative d'un processus infectieux. 2) A la surface d'une gélose ou d'un tube de culture, bactérie ou mycète dont l'isolement n'était pas attendu; il s'agit d'une présence fortuite, l'ensemencement accidentel étant dû à de mauvaises conditions techniques.

Contamination : 1) Infection par des bactéries pathogènes, des virus ou des contages quelconques. 2) Introduction accidentelle de bactéries dans un milieu biologique pendant ou après le prélèvement.

Croissance : En parlant de micro-organismes, c'est l'augmentation de la masse totale de cellules, et non l'augmentation de la taille ou de la complexité d'un organisme.

Culture pure : Population de cellules identiques, parce qu'issues d'une cellule unique.

Culture : 1) Action de propager à la surface d'un milieu nutritif, dans un milieu nutritif ou dans des cellules en culture, un virus, une bactérie, un mycète inférieur ou un parasite. 2) Le résultat de la propagation : il conviendrait de parler de souche, qui est le synonyme plus précis de culture pure.

Cytochrome oxydase : Plus précisément, cytochrome c oxydase, ou complexe IV de la chaîne respiratoire aérobie. C'est une oxydoréductase membranaire qui catalyse la réaction de réduction du dioxygène. Cette enzyme est située dans la membrane plasmique de nombreuses bactéries et dans la membrane mitochondriale interne chez les eucaryotes aérobies.

Cytochrome : Coenzymes intermédiaires de la chaîne respiratoire. Ils ont comme caractéristique commune d'être constitués d'une porphyrine complexée avec un atome de fer ou de cuivre. C'est cet atome qui confère au coenzyme ses propriétés oxydoréductrices en changeant de valence. Le couple oxydant/réducteur est le suivant : $Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+} + e^-$

Cytoplasme : Milieu intérieur des cellules. Il est constitué d'une phase riche en eau et en protéines (le cytosol) et contient des organites cellulaires (mitochondries, etc).

D

Dendrogramme : Diagramme arborescent utilisé pour résumer graphiquement les similitudes et les relations mutuelles entre les organismes.

Dénombrement : comptage du nombre de micro-organismes (bactéries ou levures) présents dans un échantillon.

Désinfectant. : Produit dont l'application sur une surface inerte réduit le nombre de micro-organismes (action bactéricide).

Désinfection : Abaissement du nombre de micro-organismes viables présents sur une surface vivante ou inerte à l'aide de produits chimiques. L'activité désinfectante d'un produit est définie par une norme (NF).

Dessication : Action de dessécher. Élimination de l'eau, naturel ou pas, contenue dans une substance. Exemple : dessiccation du sol, d'une plante.

Diffusion : Mécanisme de transport de grandeurs comme la chaleur ou les constituants d'un mélange, qui tend à uniformiser la distribution de ces grandeurs. Cette uniformisation résulte des mouvements aléatoires de molécules (diffusion moléculaire) ou de parcelles de fluide (diffusion turbulente).

E

Écologie microbienne : Etude des micro-organismes dans leur environnement naturel.

Écouvillon : Tampon de matériel absorbant habituellement enroulé à l'extrémité d'une petite tige et utilisé pour des applications médicales ou pour enlever du matériel d'une surface (prélèvements biologiques).

Electrophorèse : Technique séparant les substances sur la base de leur différentes vitesses de migration dans un champ électrique en raison des variations du nombre et du type de groupements chargés électriquement qu'elles présentent.

ELISA : (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) technique de détection ou de dosage immunoenzymatique où la réaction antigène-anticorps est révélée par l'action d'une enzyme (couplée à l'anticorps ou l'antigène) sur un substrat chromogène.

Endotoxine : substance située dans la membrane externe de certaines bactéries à Gram négatif, pouvant provoquer de fortes fièvres.

Ensemencement "au râteau" : Technique quantitative d'ensemencement d'un milieu biologique: un volume défini de prélèvement (préalablement dilué) est déposé au

centre d'une gélose et étalé, avec un instrument en forme de râteau sans dents, de façon homogène. Le dénombrement des colonies donne la concentration bactérienne du prélèvement initial et permet l'isolement bactériologique.

Entérobactéries : famille de bacilles (bactéries) mis en évidence par la coloration Gram négative, de nature aérobie et anaérobie (nécessitant ou pas d'oxygène pour vivre et se reproduire).

Enzyme : macromolécule protéique qui accélère une réaction biochimique.

Épidémiologie : Etude des facteurs déterminants et influençant la fréquence et la distribution d'une maladie, d'une lésion ou d'autres événements relatifs à la santé, ainsi que l'étude de leurs causes dans une population humaine définie.

Espèce (bactérienne) : D'une façon générale, ensemble des individus présentant des similitudes génétiques et/ou physiologiques. On appelle "espèce" une souche dite "souche-type", physiquement déposée dans une collection internationale de souches, et toutes les souches qui lui ressemblent suffisamment. Cette ressemblance sera définie par l'utilisation à la fois de critères phénotypiques (taxinomie numérique, taxinomie génomique) et de critères fondés sur la relation évolutive

E-test : Technique de détermination de la CMI basée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini d'un antibiotique ; cette technique associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu gélosé.

Étuve : Enceinte dont la température et éventuellement l'atmosphère sont régulées et permettant la culture des germes.

Eucaryotes : Organismes unicellulaires ou multicellulaires dont les cellules possèdent un noyau et des organites (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, plastes divers, mitochondries, etc.) délimités par des membranes. Les eucaryotes sont, avec les bactéries et les archées, un des trois groupes du vivant.

Exponentielle : Se dit de la variation d'une grandeur lorsque son taux de variation est proportionnel à la valeur de la grandeur. Lorsque ce taux est positif, la grandeur augmente ainsi de façon de plus en plus accélérée par rapport à sa valeur initiale, et lorsqu'il est négatif elle décroit au contraire vers zéro.

Extraction : désigne les étapes qui permettent d'extraire les acides nucléiques des cellules qui les contiennent et de les rendre utilisables par les techniques de biologie moléculaire comme l'amplification.

F

Facteur de croissance : Composé organique non synthétisé par l'organisme et indispensable à sa croissance.

Facteur de transcription : Protéine nécessaire à l'initiation ou à la régulation de la transcription dans l'ensemble du règne du vivant. Les facteurs de transcription sont des activateurs ou des répresseurs du complexe transcriptionnel constitué autour de l'ARN polymérase qui agissent en se fixant sur les séquences régulatrices en amont des gènes à transcrire.

Fermentation : Réaction productrice d'énergie dans laquelle les molécules organiques servent à la fois de donneurs et d'accepteurs d'électrons.

G

Galerie : Se dit d'un ensemble de tests destinés à l'identification d'une souche bactérienne.

Gélose : 1) Agent gélifiant produit à partir d'algues. 2) Milieu de culture contenant de la gélose comme agent gélifiant. Syn : agar-agar, agar.

Gène : Séquence d'acides nucléiques de type ADN pour les bactéries et les mycètes inférieurs, support de l'information génétique.

Génome : Matériel génétique d'un organisme vivant. Il contient l'information génétique codant pour des protéines. Chez la majorité des organismes, le génome correspond à l'ADN. Cependant, chez certains virus appelés rétrovirus (par exemple le VIH), le matériel génétique est de l'ARN.

Génotypage : détermination de l'ensemble des gènes contenus dans les cellules d'un organisme.

Génotype : Information portée par le génome d'un organisme, contenu dans chaque cellule sous forme d'acide désoxyribonucléique (ADN). Dans la molécule d'ADN, c'est la séquence des nucléotides qui constitue l'information génétique.

Genre : En taxonomie, ensemble d'espèces présentant des similitudes génétiques et/ou physiologiques.

Glycocalyx : Ce sont des fibres polysaccharidiques entourant la bactérie. Ces polymères sont extrêmement fréquents. On les observe difficilement au microscope électronique. Le feutrage des fibres de glycocalyx est constant dans le cas de bactéries vivant en biofilm dans les conditions naturelles (environnement ou pouvoir pathogène). Le glycocalyx est responsable de l'attachement des bactéries aux cellules (cellules buccales, respiratoires) ou à des supports inertes (plaque dentaire sur l'émail dentaire, biofilms sur les cathéters, les instruments et les prothèses dans le cas de bactéries d'intérêt médical). Le glycocalyx protège les bactéries du biofilm de la dessiccation, sert à concentrer ou modifier les éléments nutritifs exogènes et rend les bactéries résistantes à l'action des antiseptiques, désinfectants et antibiotiques. Certaines structures de cette couche externe des bactéries sont plus grosses, protéiques, fibrillaires et rigides (fimbriae ou pili), elles permettent l'attachement spécifique des bactéries sur les cellules qui semble une phase essentielle dans certains pouvoirs pathogènes (Escherichia coli de certaines infections urinaires). Des virus bactériens ou bactériophages peuvent infecter la bactérie après fixation sur les pili.

Glycolyse : Série de réactions catalysées par des enzymes qui dégradent une molécule de glucose (6 carbones) en deux molécules de pyruvate (3 carbones). Chez les eucaryotes, cette transformation a lieu dans le cytosol de la cellule.

Glycoprotéines : Protéines sur lesquelles des sucres sont ajoutées, ce qui leur donnent des propriétés biologiques spécifiques. Présentes, entre autre, sur les membranes cellulaires ; elles favorisent les interactions entre les cellules.

Gradient : Le gradient d'une quantité qui dépend de la position est un vecteur qui indique combien cette quantité varie pour un petit déplacement. Si cette quantité est par exemple l'altitude d'un terrain sur une carte, le gradient est un vecteur orienté vers le haut selon la ligne de plus grande pente, de longueur proportionnelle à la pente.

H

Halophile. Micro-organisme exigeant des concentrations élevées en chlorure de sodium pour sa croissance.

Hémoculture : examen de laboratoire utilisé pour détecter une infection sanguine. Il consiste en un prélèvement de sang veineux, qui est ensuite mis en culture afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de micro-organismes pathogènes.

Hémolyse alpha. Zone floue et verdâtre d'hémolyse partielle des hématies autour d'une colonie bactérienne qui libère des agents hémolytiques dans la gélose (ex : les streptocoques oraux).

Hémolyse bêta. Zone claire d'hémolyse totale des hématies autour d'une colonie bactérienne qui libère une hémolysine dans la gélose (ex : *Streptococcus pyogenes*).

Hémolyse. Destruction des globules rouges par éclatement et libération de leur hémoglobine. Plusieurs types d'hémolyse s'observent lorsque des bactéries comme les streptocoques et les staphylocoques se développent sur une gélose au sang.

Hémolysine. Enzyme ou toxine dont l'action est, entre autres, la destruction des globules rouges par éclatement avec libération de leur hémoglobine.

Hémolytique. Caractère d'un micro-organisme correspondant à la présence d'une hémolysine.

Hétérotrophe : Qualifie un organisme (animaux, champignons, procaryotes) incapable de synthétiser lui-même ses composants et qui recourt donc à des sources de matières organiques exogènes produites initialement par des organismes autotrophes.

Hydrophile : Propriété d'un composé ayant une affinité pour l'eau et tendance à s'y dissoudre. Il est également ionique. Il peut être soluble dans l'eau (hydrosoluble) ou les solvants polaires.

Hydrophobe : Propriété d'un composé « qui n'aime pas l'eau » ; il repousse l'eau ou est repoussé par l'eau. Les produits hydrophobes sont souvent lipophiles (solubles dans les corps gras ou les solvants organiques), mais insolubles dans l'eau.

I

Identification : Action d'identifier un micro-organisme. Ceci consiste à l'affecter à une espèce donnée sur la base de diverses propriétés partagées par les membres de l'espèce. Ne peuvent donc être identifiés que les membres des espèces déjà reconnues et individualisées par des méthodes taxonomiques.

Infection nosocomiale / Infection liée aux soins : Infection contractée à l'hôpital ou dans un établissement de soins par un patient qui n'en était pas atteint lors de son admission, et en relation directe avec les soins pratiqués.

Intégron : Système bactérien naturel de capture, d'expression et de dissémination de gènes notamment ceux codant pour des résistances aux antibiotiques.

Interférons : Protéines faisant partie des cytokines, elles ont une action contre tout agent pathogène (virus, bactérie et parasite) et stimulent les cellules immunitaires.

Isolement (bactériologique) : 1) Action de cultiver à partir d'un écosystème donné un micro-organisme sous une forme exempte de contaminant. 2) Le résultat de cette action: il vaudrait mieux parler de culture pure ou de souche. Isoler des bactéries consiste à obtenir un clone à partir d'un mélange de cellules bactériennes, d'un produit pathologique ou de l'environnement. Chaque colonie, si elle est suffisamment éloignée de ses voisines, constitue un clone, ensemble d'individus bactériens issus de la croissance d'une seule cellule bactérienne. L'isolement habituel est l'isolement par épuisement. L'isolement de clones lors d'une culture en milieu liquide est possible par dilution mais plus difficile et très peu employé.

L

Lipopolysaccharide (LPS) : Molécule formée de lipides et de polysaccharides, constituant important de la membrane externe des bactéries à Gram négatif.

Lysogène : Bactérie porteuse d'un bactériophage de façon cryptique (on parle de "prophages") et capable de produire des bactériophages dans les conditions appropriées.

Lysotypie : 1) Technique d'identification des bactéries, au sein d'une même espèce, en fonction de leur sensibilité aux différents bactériophages. 2) Identificateur à l'intérieur d'une espèce : sur la base précédente une souche bactérienne est affectée à un sous-ensemble de l'espèce.

M

Méiose : Processus de double division cellulaire qui prend place dans les cellules (diploïdes) de la lignée germinale pour former les gamètes (haploïdes), ou cellules sexuelles chez les organismes eucaryotes.

Membrane filtrante : Membrane mince de cellulose ou de polymères synthétiques, ayant les pores de taille déterminée, utilisée pour retenir des micro-organismes.

Membranes : Feuillets ou tubes, minérales ou organiques, retenant physiquement les particules et les micro-organismes par filtration directe (microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration) ou séparant par phénomène osmotique les espèces dissoutes (osmose inverse).

Mésophile : Micro-organisme ayant un optimum de croissance entre 20 et 45°C.

Métabolisme : Ensemble des réactions biochimiques qui se déroulent au sein d'un organisme, d'un organe ou d'une cellule pour permettre à l'organisme de se maintenir en vie, de se reproduire, de se développer et de répondre à son environnement.

Microaérophile : Micro-organisme exigeant des quantités réduites (de 2 à 10%) d'oxygène pour sa croissance; une teneur atmosphérique normale en oxygène l'endommage.

Microbiologie : étude des micro-organismes. Dans le domaine du diagnostic in vitro : mise en culture d'échantillons biologiques, alimentaires ou pharmaceutiques dans un milieu permettant aux bactéries éventuellement présentes de se multiplier. Les bactéries font ensuite l'objet de tests d'identification et, dans certains cas, de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme).

Microfiltration : Procédé utilisant des membranes capables de retenir, par filtration directe, des particules de l'ordre du micromètre (cf. membranes).

Micro-organisme : organisme vivant de taille microscopique.

Microscope à contraste de phase. Microscope convertissant de faibles différences d'indice de réfraction (par exemple différences de densité cellulaire) en différences observables d'intensités lumineuses. L'objet observé apparaît contrasté sur fond clair.

Microscope à fluorescence. Microscope où l'échantillon est exposé à une lumière ayant une longueur d'onde spécifique qui permet la formation d'une image par la lumière fluorescente émise. Habituellement, l'échantillon est coloré au moyen d'une substance fluorescente ou fluorochrome.

Microscope à fond noir. Microscope où l'échantillon est fortement éclairé tandis que le fond est noir.

Milieu différentiel. Milieu de culture permettant la distinction entre des groupes de micro-organismes sur la base de caractéristiques biologiques différentes.

Milieu électif. Milieu de culture qui favorise la croissance de micro-organismes particuliers en limitant celle de micro-organismes indésirables ou en avantageant seulement celle des micro-organismes recherchés.

Milieu sélectif. Milieu de culture qui favorise la croissance de micro-organismes particuliers en excluant celle des autres micro-organismes.

Milieux de culture : composition nutritive, simple ou composée, sous forme liquide ou solide, utilisée pour maintenir ou accroître le développement d'une espèce microbienne dans des conditions biologiques adéquates.

Mitochondrie : Organite du cytoplasme des cellules eucaryotes (plantes, algues, animaux). Site de la respiration cellulaire, les mitochondries convertissent l'énergie des molécules organiques issues de la digestion (glucose) en énergie directement utilisable par la cellule (l'ATP) au cours du « cycle de Krebs ». Cette réaction nécessite la présence d'oxygène et libère du CO_2, elle joue donc un rôle essentiel dans le cycle du carbone. Les mitochondries ont pour origine un organisme procaryote (a-protéobactérie) intégrées dans des protocellules eucaryotes il y a 2 milliards d'années.

Mitose : Désigne les événements chromosomiques de la division cellulaire, étape du cycle cellulaire des cellules eucaryotes. C'est l'étape de duplication non sexuée/asexuée (contrairement à la méiose) des chromosomes de la cellule mère et de leur répartition égale dans chacune des deux cellules filles.

Mort : Dans le cas d'un micro-organisme, virus ou parasite, état dans lequel une cellule de micro-organisme est incapable de répliquer son matériel génétique.

MRSA: souches particulières de Staphylococcus aureus qui sont résistantes à l'antibiotique méthicilline MRSA = Methycilline Resistant Staphylococcus Aureus.

Mutagène : Agent physique ou chimique causant des mutations.

Mutant : Individu résultant d'une mutation. Le standard de référence est la condition "sauvage", c'est à dire l'état des organismes tels qu'ils sont trouvés dans la nature ou choisis arbitrairement, tout individu porteur d'une variation héritable de cet état est un mutant. Organisme qui a subi une mutation.

Mutation ponctuelle : Mutation du génome où une seule paire de bases azotées est modifiée.

Mutation : Tout changement détectable et héritable du matériel génétique. La mutation est transmise aux cellules filles et aux générations suivantes générant des cellules mutantes ou des individus mutants. D'un point de vue moléculaire la mutation correspond à une modification de la séquence des nucléotides d'un gène bactérien (séquence d'ADN). Un changement de la séquence des nucléotides modifie le produit du gène correspondant selon le principe de colinéarité entre ADN et protéines.

Mutualisme ou symbiose : Interaction entre deux espèces dont chacune bénéficie de la relation qui est indispensable. On emploie aussi le terme de symbiose.

Mycobactéries : bactéries de type bacilles fins. Certaines espèces de mycobactéries sont pathogènes : M. leprae responsable de la lèpre ; M. tuberculosis, responsable de la tuberculose.

N

Nosocomiale : maladie contractée à l'hôpital ou dans un établissement de soins, par un malade qui n'en était pas atteint lors de son admission.

Nucléotide : Élément de base d'un acide nucléique tel que l'ADN ou l'ARN. Il est composé d'une base nucléique (ou base azotée), d'un ose à cinq atomes de carbone, dit pentose, dont l'association forme un nucléoside, et enfin de un à trois groupes phosphate.

O

Opportuniste: micro-organisme présent dans notre corps en temps normal, mais sans causer de maladies. En cas d'affaiblissement des défenses ou lors de blessures, les opportunistes peuvent causer des maladies.

öse ou anse : (de l'allemand öse, subst. fém. ; anneau). Anneau de métal ou de matière synthétique, habituellement d'un diamètre de 5 mm, fixé au bout d'une tige portée par un manche. L'öse permet le transfert de colonies ou de liquides. Dans ce dernier cas l'eau et les liquides aqueux sont retenus par capillarité dans l'anneau. Pour un même liquide, le volume retenu est constant.

Osmolarité : Nombre de moles de particules « osmotiquement actives » en solution dans 1 litre de solution. Notion reliée à la pression osmotique exercée par les particules en solution, et responsable de l'osmose. Le saccharose est une petite molécule osmotiquement active alors que l'amidon est un énorme polymère de glucose osmotiquement inactif. L'accumulation du saccharose dans un compartiment entraine une augmentation de la pression osmotique dans ce compartiment, ce qui n'est pas le cas de l'amidon.

Oxydant : En chimie, un élément chimique est oxydant lorsqu'il donne un ou plusieurs électrons lors d'une réaction d'oxydoréduction (voir aussi oxydoréduction et réducteur dans le glossaire).

Oxydase : Enzyme activant l'oxygène moléculaire et catalysant sa fixation sur certaines substances organiques.

P

Paillasse : Plan de travail d'un laboratoire d'analyse ou de recherche.

Parasite : organisme vivant qui se nourrit, s'abrite ou se reproduit en établissant une interaction durable avec un autre organisme (l'hôte).

Pasteurisation : Mode de conservation des produits consistant à leur appliquer un traitement thermique léger (un certain temps à une certaine température) Cette valeur pasteurisatrice est fixée pour être juste suffisante pour détruire les microbes pathogènes, sans trop dénaturer le produit.

Pathogène : micro-organisme qui provoque ou peut potentiellement provoquer une maladie infectieuse.

PCR : Abréviation pour *Polymerase Chain Reaction* ou réaction en chaîne par polymérase. L'abréviation anglaise est passée dans le langage courant. Technique de réplication ciblée *in vitro* qui permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN double brin, spécifique et de longueur définie. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase.

Peptide : Polymère constitué d'au moins deux résidus d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Il existe une énorme variété de peptides différents.

Peptidoglycane : Composé de la paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Constitué d'une partie glucidique (= polysaccharide) et d'une partie peptidique. Il maintient la forme des cellules et assure une protection mécanique contre la pression osmotique.

pH : Abréviation pour Potentiel d'Hydrogène, une mesure de l'activité de l'ion hydrogène (ou proton) dans une solution. Le pH est un indicateur de l'acidité (pH inférieur à 7) ou de l'alcalinité (pH supérieur à 7) d'une solution. Une solution de pH 7 est dite neutre.

Phénotype : Ensemble des caractères ou traits observables d'un individu (aspects anatomiques, physiologiques, moléculaires, comportementaux, etc.).

Photosynthèse : Processus bioénergétique qui permet aux plantes, aux algues et à certaines bactéries de synthétiser de la matière organique à partir du CO_2 de l'atmosphère en utilisant la lumière du soleil. L'énergie solaire est ainsi utilisée pour oxyder l'eau et réduire le dioxyde de carbone afin de synthétiser des substances organiques (glucides). L'oxydation de l'eau conduit à la formation du dioxygène O_2 que l'on retrouve dans l'atmosphère. La photosynthèse est à la base de l'autotrophie, elle est le résultat du fonctionnement intégré du chloroplaste au sein de la cellule et de l'organisme.

Phylogénie : Étude des liens existant entre espèces apparentées. Permet de retracer les principales étapes de l'évolution des organismes depuis un ancêtre commun et d'établir les relations de parentés entre les êtres vivants.

Pipette Pasteur : Tube de verre d'un diamètre de 5 à 7 mm bouché à une extrémité par du coton cardé et effilé du côté opposé. Elle peut être ouverte du côté effilé (prélèvement de liquides) ou fermée (boutonnée). Une poire doit servir à aspirer le liquide si elle est utilisée ouverte. Pour l'ensemmencement orthogonal, la pointe est fermée et terminée par un bouton de verre (pipette Pasteur boutonnée).

Plasmide : Molécule d'ADN habituellement circulaire distincte de l'ADN chromosomique, non indispensable à la survie de la bactérie, et capable de réplication autonome.

Polymérase ADN : Complexe enzymatique intervenant dans la réplication de l'ADN au cours du cycle cellulaire, mais aussi dans des processus de réparation et de recombinaison de l'ADN. Les ADN polymérases utilisent des désoxyribonucléosides triphosphate, en utilisant un autre brin d'ADN comme matrice. Ce processus réplicatif utilise la complémentarité des bases nucléiques pour guider la synthèse du nouveau brin à partir du brin matrice.

Polysaccharides : Polymères constitués de plusieurs oses liés entre eux par des liaisons osidiques. Aussi appelés glycanes, polyosides, polyholosides ou glucides complexes. Les polyosides les plus répandus du règne végétal sont la cellulose et l'amidon, tous deux polymères du glucose.

Prélèvement : En microbiologie, acte permettant l'obtention d'un échantillon biologique.

Procaryote : Désigne un organisme (du Grec Pro "Avant") dépourvu de noyau.

Protéine : élément de base de toutes cellules vivantes. Une macromolécule biologique composée par une ou plusieurs chaine(s) d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques.

Protéobactérie : Groupe important de bactéries dites Gram négatif, car elles possèdent une paroi cellulaire riche en lipopolysaccharides et pauvre en peptidoglycanes. Les mitochondries des cellules eucaryotes actuelles dériveraient d'un de ces types de bactéries les alpha-protéobactéries.

Protistes : Microorganismes eucaryotes à organisation cellulaire dite simple, unicellulaire le plus souvent, multicellulaire parfois mais sans tissus spécialisés. Ce sont des Eucaryotes autres qu'un animal, un champignon ou une plante. Ce groupe est très hétérogène, tant du point de vue anatomique que physiologique. Certains protistes sont des organismes autotrophes (on parle de protophytes), d'autres sont hétérotrophes (appelés protozoaires) et d'autres encore sont mixotrophes comme certains dinoflagellés. Le terme « protiste » a été forgé par Ernst Haeckel en 1866, à partir du grec *protestos*, superlatif de protos, « premier », le biologiste plaçant dans ce taxon les organismes qu'il considérait comme les premiers êtres vivants sur Terre.

Psychrophile. Micro-organisme ayant une bonne croissance à 0°C, un optimum de croissance à 15°C ou moins, et un maximum à environ 20°C.

Réactions d'oxydo-réduction : Réaction chimique reposant sur le transfert d'électrons entre une molécule qui s'oxyde (qui perd un électron) et une autre qui est réduite (elle gagne un électron).

Recombinaison homologue : Type de recombinaison génétique où les séquences de nucléotides sont échangées entre des molécules d'ADN identiques ou similaires.

Réducteur : En chimie, un élément chimique est dit réducteur lorsqu'il perd un ou plusieurs électrons lors d'une réaction d'oxydoréduction (voir aussi oxydoréduction et oxydant dans le glossaire).

Repiquage : 1) Action qui consiste à repiquer des cellules bactériennes, fongiques ou parasitaires d'un milieu dans un autre. 2) Par extension le résultat de ce transfert, la plupart du temps des colonies d'un seul type génétiquement homogène..

Réplication : Processus permettant d'obtenir deux molécules identiques à la molécule initiale.

Résistance à la méticilline : S'emploie pour les souches de Staphylocoques résistantes à toutes les bêta-lactamines (dont les pénicillines). Historiquement la méticilline (qui n'est plus employée actuellement) permettait sa détection. Elle est dite hétérogène car dans les conditions de cultures usuelles, seule une partie de la population bactérienne d'une souche de *S. aureus* résistante est capable d'exprimer sa résistance aux bêta-lactamines.

Résistance acquise : La résistance à un antibiotique d'une souche bactérienne appartenant à une espèce habituellement sensible à cet antibiotique peut être acquise par une modification du capital génétique de la souche. Cette modification peut être soit une mutation chromosomique, soit l'acquisition de plasmides de résistance.

Résistance associée : C'est la résistance d'une souche bactérienne à au moins deux antibiotiques différents, appartenant à des familles différentes, par des mécanismes indépendants dont leur présence concomitante chez la bactérie est de fréquence élevée.

Résistance aux antibiotiques : Les souches dites résistantes aux antibiotiques sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quel que soit le type de traitement. Voir sensibilité et sensibilité intermédiaire aux antibiotiques.

Résistance chromosomique : La résistance d'une souche bactérienne donnée à un antibiotique peut être acquise par mutation d'un gène intéressant le mécanisme d'action de l'antibiotique. Ce phénomène rare, spontané, se fait au hasard, est stable et héréditaire. La résistance n'est pas transmise aux bactéries en dehors de la descendance.

Résistance croisée : C'est la résistance, par le même mécanisme, d'une souche bactérienne à deux ou plusieurs antibiotiques d'une même famille.

Résistance naturelle : C'est un caractère de résistance pour une famille d'antibiotique, inné et présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce bactérienne.

Résistance plasmidique : Résistance due à la présence d'un plasmide dans la bactérie. Dans une même bactérie, il peut y avoir plusieurs plasmides différents et plusieurs copies d'un même plasmide. Cette résistance est transmise aux bactéries filles, mais n'est pas définitive.

Respiration : Désigne à la fois les échanges gazeux résultant de l'inspiration et de l'expiration de l'air par les organismes vivants (rejet de dioxyde de carbone CO_2 et absorption de dioxygène O_2) et la respiration cellulaire qui permet, en dégradant du glucose grâce au dioxygène, d'obtenir de l'énergie.

S

Sensibilité aux antibiotiques. Les souches sensibles sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est acceptable dans le cas d'un traitement par voie systémique

avec la posologie recommandée. Voir résistance et sensibilité intermédiaire aux antibiotiques.

Sequençage de l'ADN : détermination de l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné.

Sérotypage : Technique ou procédé sérologique qui est utilisé pour distinguer des souches de micro-organismes (sérotypes ou sérovar) présentant des différences dans la composition antigénique d'une structure ou d'un produit.

Souche : Groupe d'individus en principe génétiquement homogènes (clones).

Species (*sp*) : Terme utilisé pour préciser qu'on a identifié une souche jusqu'au niveau du genre seulement et qu'elle peut appartenir à n'importe quelle espèce du genre (ex : *Staphylococcus sp* = species).

Species (*spp*) : Terme employé pour désigner l'ensemble des espèces d'un genre (ex : *Staphylococcus spp* = species plurial).

Species nova (*sp nov*) : Locution employée pour désigner une espèce nouvellement créée.

Spectrométrie de masse : technique analytique permettant d'identifier les molécules et de caractériser leur structure chimique, par l'analyse de la masse et de la charge de leurs ions.

Spore : Certaines bactéries, entre autres d'intérêt médical (genre Clostridium et Bacillus), ont la propriété de se différencier en formes de survie appelées spores. Les spores sont très résistantes à la température (plusieurs heures à 100°C), aux rayonnements, aux agents chimiques (antiseptiques, désinfectants) et au temps (survie atteignant plusieurs siècles). Métaboliquement inactives, les spores résistent naturellement aux antibiotiques.

Staphylocoque : genre bactérien gram positif, se présentant le plus souvent en amas sous forme de grappe.

Stérile : Dépourvu de toute forme de vie (mais pouvant contenir des cellules mortes de micro-organismes ou leur DNA).

Stérilisation : Destruction des micro-organismes qui existent à la surface ou dans l'épaisseur d'un objet quelconque (instrument, vêtement...), par des moyens physiques (chaleur sèche ou humide, irradiation) ou chimiques (antiseptiques).

Stress oxydatif (ou stress oxydant) : Agression des cellules par des radicaux libres, aussi appelés « espèces réactives de l'oxygène » (voir ROS). Aussi appelé stress oxydant. Les radicaux libres sont produits en permanence dans la cellule à partir d'oxygène, notamment au niveau de la mitochondrie, dans la chaîne respiratoire.

Substrat : molécule utilisée comme produit de départ, qui, après s'être liée au site actif d'une enzyme, est transformée en un ou plusieurs produits.

Synergie : Effet d'une association d'antibiotique (bactériostase ou en bactéricidie) qui apparaît supérieur à celui prévisible par la simple addition des effets de chacun des antibiotiques isolés.

T

Taux de croissance : On mesure la rapidité de croissance par le temps mis pour une bactérie pour se diviser (temps de génération), qui est aussi le temps que met une population bactérienne pour doubler (temps de doublement). Le taux de croissance correspond à l'inverse d'un temps de génération.

Taxinomie (ou **taxonomie**). Science de la classification biologique, comprenant trois parties : classification, nomenclature et identification.

Taxon : Groupe dans lequel des organismes apparentés sont classés.

Taxonomique : Relatif à la taxonomie ou taxinomie, branche des sciences biologiques qui consiste à décrire les organismes vivants et à les organiser en catégories hiérarchisées appelées taxons. Généralement le terme « taxon » est employé aux rangs spécifique (l'espèce) et subspécifique

Thermophile : Se dit d'un micro-organisme qui peut se développer à des températures élevées.

Toxine : Les toxines sont des protéines produites par les bactéries (soit sécrétées, soit libérées par la lyse bactérienne), qui vont agir à un site cellulaire précis du sujet infecté, différent pour chaque bactérie toxinogène ; ces caractéristiques les opposent à l'endotoxine. L'activité des toxines protéiques est inhibée par des anticorps spécifiques (antitoxines), ce qui peut être utilisé pour le traitement. Cependant, les antitoxines ne peuvent agir sur la toxine fixée sur son récepteur, ce qui limite l'intérêt de l'immunothérapie. Enfin, dans certaines conditions, le traitement des toxines protéiques par un traitement entraînant une polymérisation (formol et chaleur) fait perdre à ces molécules leur pouvoir toxique tout en conservant leur antigénicité : ce sont les anatoxines. Ceci est à la base de la vaccination contre certaines infections, comme la diphtérie ou le tétanos.

Transduction : Transfert d'ADN d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire d'un virus bactériophage.

Transformation : C'est le transfert d'un fragment d'ADN d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice. L'ADN d'une bactérie donatrice, libéré naturellement lors d'une lyse bactérienne, est transféré sous forme libre à une bactérie réceptrice. La bactérie réceptrice doit être dans un état réceptif, dit de compétence, caractérisé par la présence de récepteurs spécifiques de l'ADN à la surface bactérienne. Ce phénomène n'a été mis en évidence que pour quelques espèces. La transformation est cependant un processus fréquent chez certaines espèces à Gram positif (Streptococcus, y compris Streptococcus pneumoniae, Bacillus, etc.) mais s'observe aussi chez certaines bactéries à Gram négatif (Haemophilus, Neisseria, Moraxella).

Transposition : Déplacement autonome dans un génome d'une séquence d'ADN nommée transposon, sous l'action notamment d'une enzyme, la transposase.

Transposon : Séquence d'ADN capable de se déplacer de manière autonome dans un génome par transposition.

Typage : Identification infraspecifique (a l'intérieur d'une espece) de bactéries, virus parasites ou mycètes (voir: sérotypage, ribotypage, lysotypage...).

U

UFC : Abréviation de **Unité Formant une Colonie** (en anglais, CFU, Colony Forming Unit). C'est l'unité utilisée pour dénombrer les cellules, bactéries ou parasites viables. Une UFC correspond à une colonie observée mais peut correspondre à plusieurs cellules si elles restent agrégées lors du dénombrement. On parle habituellement d'une concentration en "colonies/ml" mais il s'agit en fait d'UFC/mI. En virologie, on emploie le terme d'Unité Formant Plage (UFP) avec la même signification.

Ultrafiltration : Procédé utilisant des membranes capables de retenir, par filtration directe, des particules de l'ordre de plusieurs dizaines de nanomètres (cf. membranes).

V

Virus: organisme composé d'un génome, acide nucléique (ADN ou ARN), et d'une coque de protection. Parasite obligatoire, il ne se multiplie qu'à l'intérieur de cellules.

Semestre : 6

Unité d'enseignement Fondamentale 1 (UEF 3.2.1) : Microbiologie Appliquée

Matière 1 : Microbiologie industrielle

Crédits : 5

Coefficient : 3

Objectifs de l'enseignement :

Cette matière permet l'étude :

- Du fonctionnement des fermenteurs et de la pratique industrielle desfermentations.
  Des potentialités des souches microbiennes en matière de biosynthèse de métabolites importants (vaccins, antibiotiques, enzymes, protéines, levures,
  P.O.U fromage, arômes…)
  Des optimisations et des améliorations de souches sauvages (facteurs et conditions du milieu, mutagénèse, recombinaison génétique) en vue d'une production maximale de métabolites.
- Des méthodes d'isolement, de purification et de l'obtention des métabolites.

Connaissances préalables recommandées :

Matières recommandées :

- Systématique et écologique bactérienne,
- Biochimie microbienne,
- Génétique microbienne S5

Contenu de la matière :

1. Introduction : les domaines d'activité de la microbiologie industrielle et intérêt de l'utilisation des microorganismes, cellule bactérienne : produit microbien d'intérêt industriel

2. Les microorganismes utiles (Archaea, bactéries, champignons, algues et virus) : Rappel de taxonomie, importance des microorganismes en industrie.

3. Les milieux de cultures industriels

4. Les fermentations industrielles :

- Le fermenteur

- Les protéines d'organismes unicellulaires : les P.O.U ou SCP, les organismes utilisés et les substrats bon marché les plus adaptés

5. Les produits de fermentations industrielles :

5.1. Les métabolites primaires obtenus par fermentation microbienne :

- Les acides aminés

- Les acides organiques

- Les Biogaz (H2, CH4…)

- Les vaccins

5.2. Les métabolites secondaires :

- Les antibiotiques (pénicilline, streptomycine, tétracycline)

- Les vitamines (B12)

- Les polysaccharides

5.3. Les enzyme

Préface

La présente polycopie de microbiologie industrielle s'adresse aux étudiants de 3ème année licence Microbiologie, il est scindé en deux parties.

La première partie permettant à l'étudiant l'acquisition des principes fondamentaux de la microbiologie à vocation industrielle, et cela par la connaissance des trois principaux axesde la microbiologie industrielle, qui sont : les microorganismes industriels, les fermenteurs industriels, et les milieux de cultures industrielles.

La deuxième partie de la matière sera dédié aux différents produits de la fermentation industrielle, qui sont (i) : la biomasse microbienne : utiliser généralement comme sourcede protéines d'origine unicellulaire, (ii) : la production industrielle de certains métabolites primaires (iii) la production industrielle de certains métabolites secondaires.

Afin de rendre le contenu plus accessible aux étudiants, l'élaboration de ce présent coursest basée sur l'utilisation d'un langage simple, avec diverses illustrations (des schémas dephotos et des tableaux).

INTRODUCTION

La microbiologie industrielle tient des origines séculaires, apparue depuis le début de lavie de l'Homme sur la planète. La technologie de la fermentation est arrivée avec les premières civilisations qui ont exploité de manière fortuite la capacité des microorganismes à produire des boissons alcoolisées, du pain et du fromage...etc.

Les civilisations antiques avaient produisaient de la bière et du vin à partir d'orge et de raisin fermentés, ainsi que des fromages, ils salaient, fermentaient et fumaient de la viande et même le poisson afin de conserver leurs denrées alimentaires. (Dal Pont et *al*, 2020)

Au début du vingtième siècle, et sa révolution économique ; la microbiologie industrielle a commencé à prendre un nouvel essor avec notamment la découverte des microorganismes. (Leveaux, 1993)

Avec les études de Pasteur en 1857 sur la production de bière et de vin, il est devenu évident que la fermentation alcoolique était le résultat d'une activité microbienne (*Saccharomyces cerevisiae*), plutôt que d'un processus chimique.

Les applications industrielles de la microbiologie ont ciblé la fermentation visant à produire de nombreux produits biologiques d'importance économique avec des quantitésimportantes tels que l'acide lactique, éthanol, antibiotiques, hormones...etc.

Des procédés microbiens ont été mis en œuvre à grande échelle dans l'industrie de production d'acide citrique et lactique. Les alcools tels que l'acétone et le butanol étaient auparavant produits en grandes quantités par fermentation, mais sont aujourd'hui principalement synthétisés chimiquement. L'émergence des antibiotiques en tant qu'outils puissants de lutte contre les maladies a marqué un tournant important pour l'humanité. L'exploration et la fabrication de nouveaux composés antibactériens, antifongiques, antitumoraux et antiviraux ont évolué vers des secteurs de premier plan. Divers autres produits d'origine microbienne, notamment les vitamines, les probiotiques, les hormones et les conservateurs, ont gagné en popularité sur le marché paramédical. (Dal Pont et *al*, 2020)

Les microorganismes ont apporté un immense bénéfice à l'humanité jouant un rôle très important dans notre vie quotidienne. Avec l'apparition de la crise alimentaire dans le monde, les chercheurs ont découvert que ces microorganismes (bactéries, champignons, algues,) peuvent aider à résoudre ce problème en produisant des protéines unicellulaires(Singl Cell Protein) car ils se développent et se multiplient rapidement par rapport animaux et plantes qui ont besoin de beaucoup de temps pour doubler leur poids. (Sharifet *a*l, 2021).

Les microorganismes jouent également un rôle important dans la biodégradation des polluants

industriels tels que les hydrocarbures et les substances phénolées. Cette biodégradation ou la dépollution par les microorganismes est basée sur la leurs capacités d'utiliser les polluants comme substrats pour tirer l'énergie nécessaire. La biodégradation des polluants industriels empêche notre monde d'une partie importante d'accumulations des produits toxique rejetés soit dans les eaux, soit dans les sols. (Ouartsi, 2019)

Une nouvelle science est apparue : **la microbiologie industrielle**, qui est une spécialité de la microbiologie appliquée, dans laquelle **les microorganismes d'intérêt** sont exploités, pour un **intérêt commercial**, afin d'accomplir un procédé de **biosynthèse, de biotransformation ou de dégradation à grande échelle**

CHAPITRE I. LES DOMAINES D'ACTIVITE DE LA MICROBIOLOGIE INDUSTRIELLE ET INTERET DE L'UTILISATION DES MICROORGANISMES

Introduction

La microbiologie est plus que jamais un domaine clé des biotechnologies, microorganismes sont omniprésents dans notre environnement, et jouent un rôle primordial dans les différents aspects de notre vie et nos activités. (D. Thomas, 2018)Les avancées de la biotechnologie ont contribué à prendre conscience du rôle des microorganismes dans l'économie pour leurs contributions importantes dans l'agronomie, des industries alimentaires et biologiques, de la santé, de la chimie fine de l'énergie et dans la protection de l'environnement. (Leveau, 1999)
La fermentation dans l'industrie est un terme générique appliqué aux processus commerciaux qui reposent sur la capacité des microorganismes à produire des molécules utiles, à grande échelle, en présence ou en absence d'air. Ainsi, contrairement au sens biochimique, le terme de fermentation industrielle ne se réfèrepas au métabolisme du micro-organisme (Humphrey et al, 1992).

La fermentation se déroule dans des fermenteurs ou des cuves, sous des conditions physicochimiques (température, pH, aération, source de carbone, source d'azote…) rigoureusement contrôlées (Wilson et al, 2019).

1. Intérêt de l'utilisation des microorganismes en industrie :

En microbiologie industrielle, le premier intérêt consiste à trouver des microorganismes convenables pour un processus bien déterminé (cible). Néanmoins, les sources principales des cultures microbiennes utilisées en microbiologie industrielle étaient des matières naturelles (sol, eaux …).
Dans le but d'identifier des souches possédant les caractéristiques souhaitées (Figure 1).

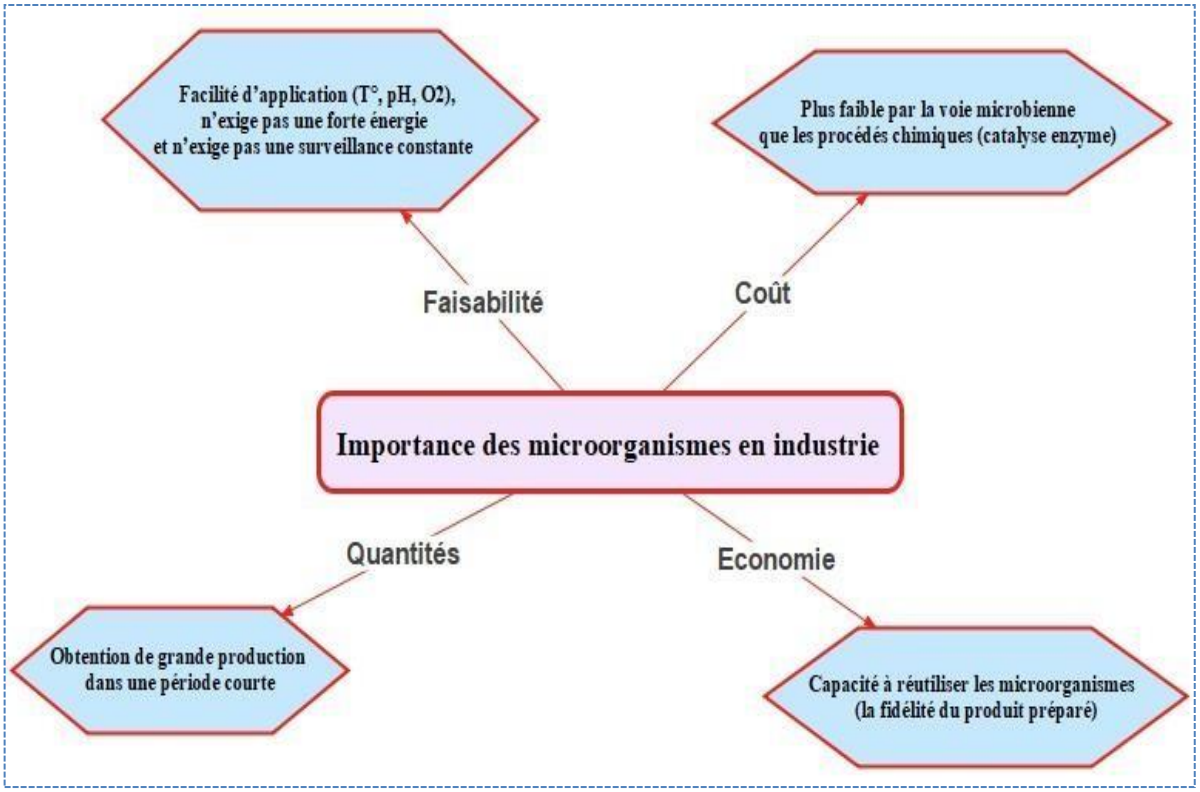


Figure 1. Importance des microorganismes en industrie

(Sidaoui Abouamama, 2022)

Les micro-organismes impliqués en industrie apportent un large panel de produits, ainsi que des multiples services. Ils ont prouvé leurs utilités en raison de (Demain *et al*,2008) :

- Culture facile ;
- Temps de génération très court ;
- Vitesse de croissance élevée.
- Capacité d'être cultivé sur des substrats bon marché, qui peuvent être desdéchets issus de l'industrie agroalimentaire. ;

2- L'objectif de la fermentation industrielle :

L'objectif recherché dans la fermentation industrielle doit être ciblé dès le débutafin de Choisir une ou plusieurs options :

- Récupérer un sous-produit de la réaction (alcool, antibiotiques...) (Keller et *al*, 2019).
- Récupérer les microorganismes eux-mêmes (levure de boulangerie,probiotiques par exemple) (Leveau, 1999).
- Transformer des produits complexes en éléments simples en utilisant les techniques de biodécontamination, biolixiviation… etc. (traitement des eaux

usées, valorisation des déchets industriels) (Ouartsi et *al*, 2019).

3- Intérêt de l'utilisation des microorganismes

a. Coût plus faible que les procédés par voie chimique : catalyse enzymatique, …
b. Faisabilité
c. Synthèse et biotransformations (ex : prostaglandines, stéroïdes) de certaines molécules ne peuvent se faire que par voie microbienne
d. Spécificité de la réaction stéréospécificité …

4- Les domaines d'activités

Le but recherché d'une industrie est le facteur déterminant des domaines d'activité qui ont recours à utilisation des microorganismes selon :

4. 1- La recherche de produits :

- La production de substances organiques (éthanol, glycérol, acétate, propionate…etc.),
- Agroalimentaire (Fermentations, additifs alimentaires, …)
- Agriculture (phytosanitaires, hormones)
- Industries pharmaceutiques (antibiotiques, vitamines, acides aminés…etc.)

4.2- La récupération de microorganismes comme produit final :

- Fabrication de levure de bière (*Saccharomyces cerivisae*)
- Fabrication de probiotiques (bactéries lactiques)

4.3- Et un autre aspect a visée écologique :

- Environnement (traitements des eaux usées, bioremédiation des sols pollués, biolixiviation)

5. Avantages :

- Cout plus faible que les procédés chimiques (catalyse enzymatique ……)
- Synthèse de certaines molécules que par les microorganismes (prostaglandines, stéroïdes ……)

La fermentation consistera à utiliser des micro-organismes comme moyen de fabrication dans un processus industriel. C'est à dire **qu'il faut produire à moindre coût une molécule donnée en quantité et de façon reproductible pour répondre aux besoins du marché.**

Pour les raisons qui vont être exposées, la fermentation est une méthode de production relativement onéreuse. Elle ne présente d'intérêt que dans la mesure ou la synthèse chimique à partir de dérivés du pétrole est impossible ou d'un coût plus élevé. La mise en œuvre de la fermentation dans un objectif industriel doit résoudre à la fois des problèmes biologiques et des problèmes de génie chimique.

Tableau 1. Quelques exemples de l'application des microorganismes en industrielle

(Tarafdar, et *al*, 2021)

Microorganismes	**Le produit de la fermentation**	**Application**
Saccharomyces cerevisiae	Ethanol	Chimie fine
Pseudomonas	Acide 2 ceto-gluconique	Un intermédiaire dans la production de l'acide ascorbique (vitamine C) ; précurseur de la synthèse d'acide isoascorbique.
Aspergillus niger	Pectinase, protease	Clarification des jus de fruits
Bacillus subtilis	Amylase	Préparation de l'amidon modifié ; Utiliser pendant l'encollage de papier.
Bacillus subtilis	Protease	Hydrolyse des proteins
Micrococcus glutamicus	Lysine	Additif alimentaire
Leuconostoc mesenteroides	Dextran	Stabilisant alimentaire
Gluconobacter suboxydans	Sorbose	Production acide ascorbique
Streptomyces olivaceus	Cobalamine (Vitamine B12)	Complément alimentaire
Recombinant *d'E. coli*	Insuline	Médecine humaine
Streptococcusthermophilus , *Lactobacillus bulgaricus*	Yaourt	Starter dans l'industrie laitière
Candida utilis *Fusarium* graminearum	Les protéines d'origine unicellulaires (P.O.U)	Alimentation humaine et animale
Cephalosporium acremonium *Saccharopolyspora erythrea*	*Cephalosporin* *Erythromycin*	Antibiotiques pour le traitement des infections

CHAPITRE II : LES MICROORGANISMES UTILES

Introduction.

Les micro-organismes sont très utilisés en industrie pour réaliser des objectifs relatifs aux besoins de l'homme. Ils sont particulièrement utiles en raison de la facilité de leur culture, de la rapidité de leur croissance, de leur pouvoir à utiliser des substrats bon marché (qui dans de nombreux cas sont des déchets de l'industrie agro-alimentaire), et de leur capacité à subir facilement des manipulations génétiques (Becker et *al,* 2017). Les microorganismes utilisés en industrie sont généralement :

1- Les microorganismes

1-1- *Les Archea*

Les *Archaea* (du grec *archaios*=ancien), un groupe distinctif de cellules procaryotes. Le domaine des archéobactéries regroupe des organismes qui se développent souvent dans des conditions environnementales très difficiles (certaines espèces se développent à des températures allant de 200°C à 350°C, d'autres peuvent proliférer en présence de NaCl à 30 %, à un pH=0). (Elie ,2022)

L'absence de paroi cellulaire rend ces organismes insensibles aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi tels que la pénicilline, vancomycine et au lysozyme. Les archéobactéries présentent une grande diversité morphologique où la plupart de ces microorganismes ont des structures ordinaires : sphérique, hélicoïdale ou en forme de bâtonnets mais dans quelques cas elle est tout à fait exceptionnelle. Certaines sont à Gram positif et d'autres à Gram négatif.

Les chromosomes archéo-bactériens sont des ADN uniques, circulaires avec une grande variation dans le contenu en GC, ainsi que la présence de quelques plasmides. (Querellou, 2010) Les Archées sont différents également par leur ARNr (ARN ribosomial, et par le fait que leur paroi est constituée de pseudopeptidoglycane, ou pseudomuréine, ce qui leur permet de résister et se développer dans des conditions extrêmes. Certaines Archées ont des complexes protéiques de type histone interagissant avec l'ADN

Les ARN polymérase des Archées sont proches de ceux des Eucaryotes. En plus des critères physicochimiques et morphologiques utilises pour le classement (phénotypique) des Archées, il y a surtout le classement phylogénétique qui les repartit en plusieurs phylums : (Selosse, 2021)

Phylum ***Euryarchaeota*** :

Classes :

■ Archaeoglobi (thermophiles)

■ Halobacteria (halophiles extrêmes)

■ Methanobacteria (méthanogènes)

■ Methanococci (méthanogènes)

■ Methanomicrobia (méthanogènes)

■ Methanopyri (méthanogènes, hyperthermophiles)

■ Nanohaloarchaea (halophiles)

■ Thermoplasmata (acidophiles)

■ Thermococci (environnements marins, légèrement halophiles)

Phylum ***Crenarchaeota*** :

Classe : ■ Thermoprotei (hyperthermophiles)

Phylum ***Korarchaeota*** (thermophiles) Phylum ***Nanoarchaeota***

Phylum ***Thaumarchaeota*** (hyperthermophiles)

► ***Archées méthanogènes*** : ce sont des anaérobies stricts, vivant dans les milieux complètement dépourvus d'oxygène. Habitats : sols inondés (rizières, sédiments lacustres, marécages), sédiments marins, tubes digestifs des animaux (exemple : *Methanomicrobium* du tube digestif des ruminants).

Certaines Archées méthanogènes sont également thermophiles et psychrophiles. Les Archées méthanogènes tirent leur énergie à partir de la biosynthèse du méthane CH_4, et produisent donc ce gaz à effet de serre (Elie, 2022).

Cette production est effectuée par la réduction du dioxyde de carbone CO_2 (autre gaz à effet de serre) selon : $\mathbf{CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O}$

Exemple : *Methanobacterium thermoautotrophicum*

► ***Archées halophiles*** :

Elles supportent, ou ont besoin pour leur croissance des milieux salés ou très salés (exemple : *Halobacteriumsalinarum*). La concentration en sel de l'eau de mer (salinité)est cm = 34,7 g/L

► ***Archées hyperthermophiles*** :

Les Archées hyperthermophiles sont des Archées dont la croissance nécessite des températures supérieures à 80°C (exemple : *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Pyrodictium*, *Pyrolobus fumarii*, *Sulfolobus*). Certaines vivent même dans un environnement à 122°C. L'adaptation à la chaleur est rendue possible par les propriétés suivantes chez l'Archée :

- Augmentation de la rigidité de la membrane, ce qui permet de supprimer la fuite des solutions aqueuses de la cellule (eau, composés ioniques...) que favorise une température élevée ;
- Saturation des chaînes lipidiques (nombre très réduit des doubles liaisons), dans l'isomérisation favorise la position des doubles liaisons ;
- Allongement des chaînes des composés organiques, celles-ci étant linéaires au lieu d'être ramifiées, ceci augmente la stabilité thermique des protéines, y compris des enzymes, par compactification des repliements de la protéine, et permet donc de minimiser le nombre de cavités internes.

Par ailleurs, les Archées adaptées au froid (psychrophiles), les adaptations sont inverses de celles ci- dessus.

Les Archées hyperthermophiles se répartissent en aérobies (facultatives ou obligatoires) et anaérobies obligatoires. Les hyperthermophiles aérobies sont pour la plupart aussi acidophiles ($pH \leq 2$). Les hyperthermophiles anaérobies sont en général neutrophiles (pH aux alentours de 5).

- Les Archées, santé humaine et biotechnologie

L'existence d'Archées pathogènes n'a pas encore été mise en évidence. Les Archées ont plutôt un rôle favorable dans les cycles du carbone et de l'azote, et, par leur faculté de mutualisation, dans les métabolismes digestifs.

Les Archées s'avèrent d'un grand intérêt en biotechnologie, notamment par leurs facultésà vivre et se développer dans des milieux défavorables aux bactéries et Eucaryotes. Exemples (Boone *et al*, 2001 ; Querellou ,2010) :

● Biolixiviation : augmentation de la concentration en métaux rares (cuivre, or, uranium) à partir de minerais de faible concentration, par culture des archées *Pyrobaculum*, *Pyrococcus*, *Sulfolobus*, etc. hyperthermophiles et acidophiles, qui peuvent donc tenir dans les rédacteurs thermiques des traitements de certains minerais.

● Action contre la contamination par des produits chimiques, des métaux lourds, radionucléides, composés halogénés. Pour ce faire, les Archées fortement halophiles s'avèrent efficaces.

● Élaboration de films lipidiques pour des membranes artificielles intervenant dans les matériaux biomimétiques. Ces procédés utilisent les propriétés spécifiques des lipides membranaires des Archées.

● Utilisation des propriétés spécifiques de polymères d'archées pour l'élaboration de plastiques biodégradables, et aussi dans les produits de l'agroalimentaire, la cosmétique, la santé (encapsulation des médicaments...).

● Utilisation des Archées dans les procédés d'obtention des biocarburants grâce à leur faculté de biodégradation des polysaccharides.

● Utilisation des enzymes d'Archées pour l'intérêt qu'elles présentent dans leur faculté d'amplification des gènes.

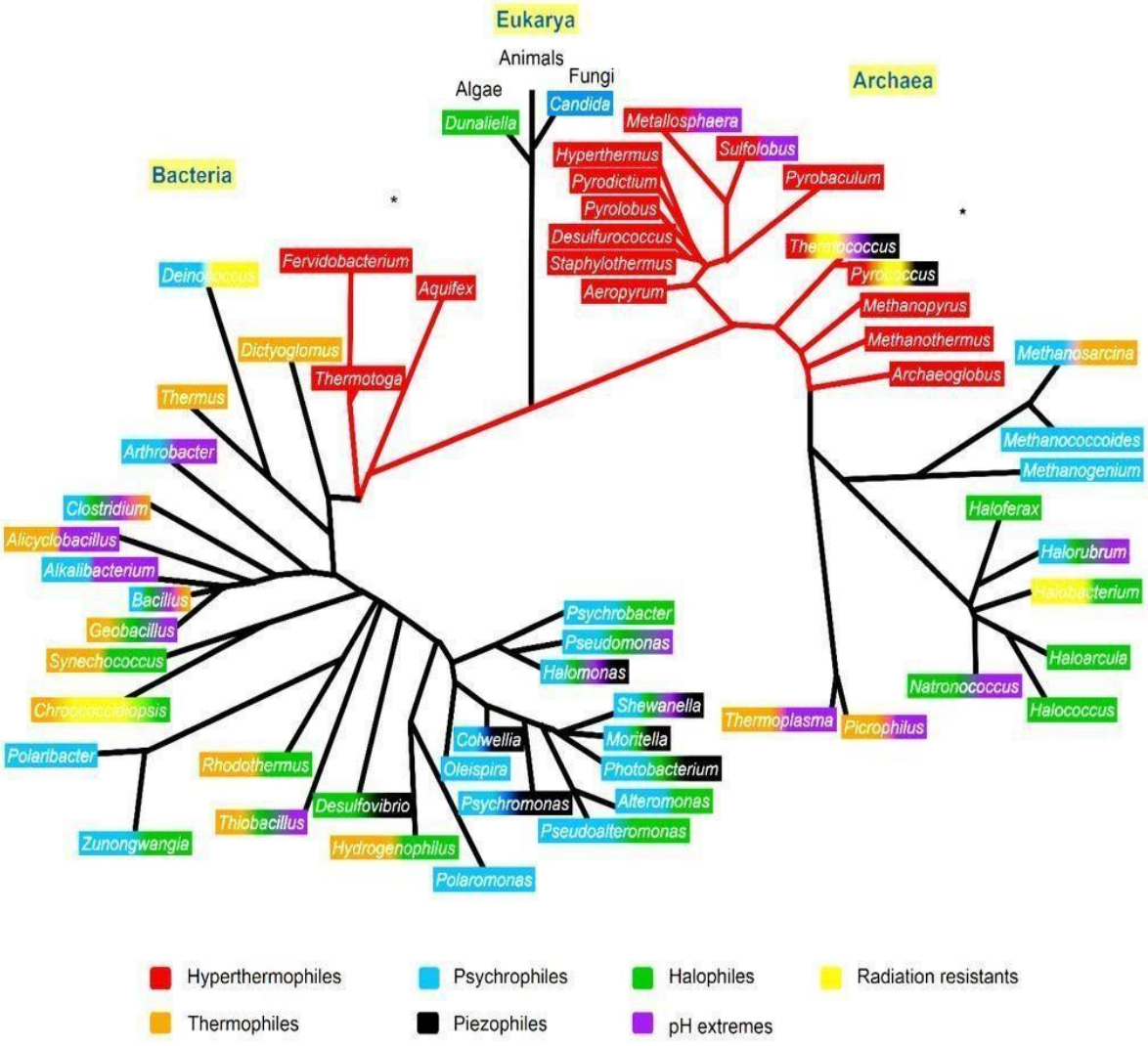


Figure 2. Arbre phylogénétique rapportant les organismes extrêmophiles et les caractéristiques de résistance qui apparaissent chez au moins une espèce de chaque genre identifié par un code couleur (Dalmaso et *al.*, 2015 in Djinni, 2017)

1-2- Les bactéries

Les bactéries sont des organismes unicellulaires qui possèdent les éléments essentiels à la vie cellulaire, relativement simple dont le matériel génétique (ADN), représenté par un seul chromosome circulaire et éventuellement des plasmides, sans enveloppe nucléaire (nucléoïde). (Madiga, 2007)

Les cellules bactériennes se présentent sous plusieurs formes, vues sous microscope optique : bacilles, cocci, spirochètes… (Figure 3), avec une très grande diversité de taille. La plupart d'entre elles ont de 0,2 à 2 µm de diamètre et de 2 à 8 µm de long. On distingue deux grandes classes de bactéries qui se caractérisent par une différence de la paroi cellulaire : les bactéries à **Gram positif** et les bactéries à **Gram négatif**.

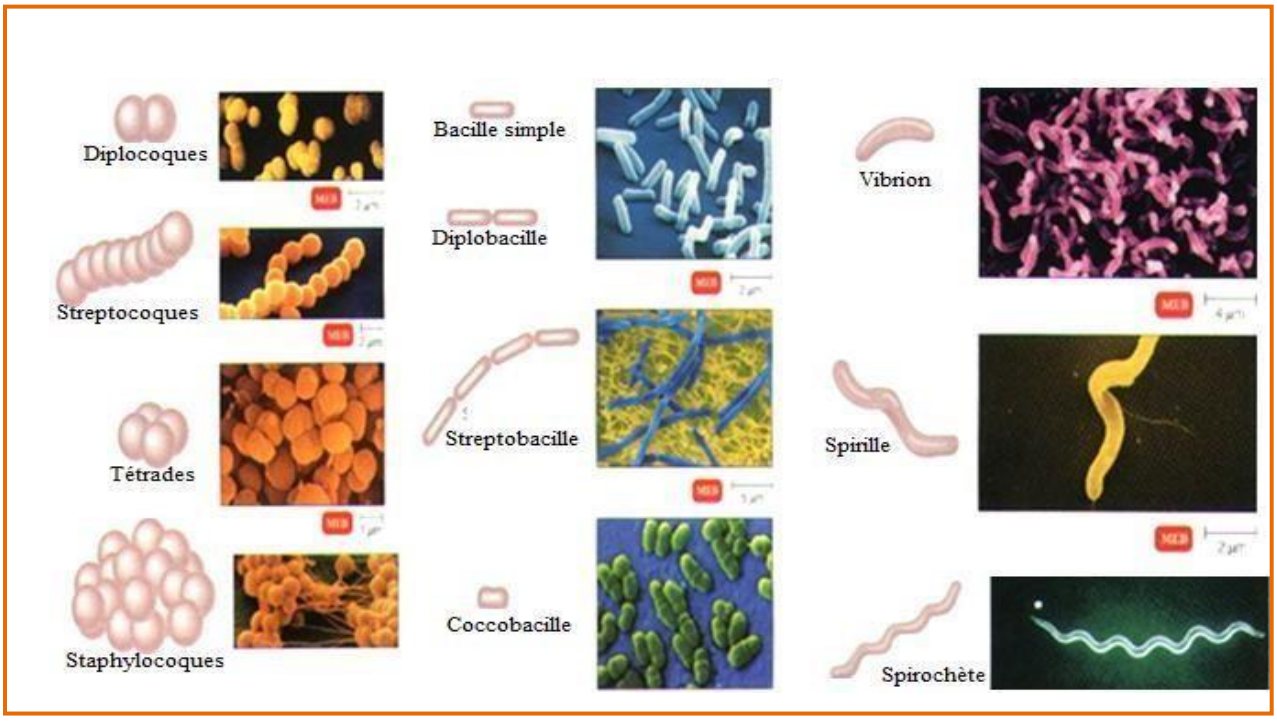


Figure 3. Forme de cellules bactériennes et leurs modes de regroupement (Madigan, 2007)

Les bactéries sont très nombreuses et peuvent coloniser différents milieux : sol, milieux aquatiques et air. Certaines d'entre elles sont indispensables pour notre corps et améliorent notre santé par l'élaboration de produits qu'on ne peut pas synthétiser par nous-mêmes tels que les vitamines.

Mais aussi un important apport *via* des mécanismes de fermentation industrielle afin de produire des aliments fermentés (ex : fromages et yaourts). Cependant, il existe parmi les bactéries identifiées, des centaines qui jouent un rôle péjoratif en contaminant et en dégradant les aliments et pathogènes, provoquent des maladies chez l'animal et l'homme. (Scriban.1999).

Plusieurs bactéries peuvent être utilisées dans le domaine industriel, telles que les actinomycètes dont le genre *Streptomyces*, qui fournit à lui tout seul 70% des antibiotiques utilisés (Al Farraj, *et al*, 2020).

Les bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, sont utilisées pour la fabrication du yaourt (Yamauchi et *al,* 2019) combinées aux levures et moisissures interviennent dans l'élaboration d'aliments fermentés comme les fromages, les yaourts, la bière, le vin, la sauce de soja, le vinaigre,la choucroute.

Les bactéries acétiques (*Acetobacter, Gluconobacter*) peuvent produire de l'acide acétique à partir de l'éthanol. Elles sont rencontrées dans les jus alcoolisés et sont utilisées dans la production du vinaigre. Elles sont également exploitées pour la production d'acide ascorbique (vitamine C) à partir du sorbitol transformé en sorbose.

Des bactéries, capables de dégrader des hydrocarbures du pétrole, peuvent être utilisées lors du nettoyage d'une marée noire. Le processus de nettoyage de milieux pollués par des micro-organismes est **la bioremédiation**.

Des bactéries peuvent être utilisées pour récupérer des métaux d'intérêts économiques à partir de minerais. C'est la **biolixiviation.** L'activité de bactéries est ainsi exploitée pour la récupération du cuivre.

Des bactéries peuvent être utilisées à la place de **pesticides en lutte biologique** pourcombattre des parasites des plantes. Par exemple, *Bacillus thuringiensis* produit une protéine Bt qui est toxique pour certains insectes. Cette toxine est utilisée en agriculture pour combattre des insectes qui se nourrissent de plantes.

De nombreuses enzymes utilisées dans divers processus industriels ont été isolées de micro-organismes. Les enzymes des détergents sont des protéases de certaines souches de Bacillus. Des amylases capables d'hydrolyser l'amidon sont très utilisées dans l'industrie alimentaire.
Les espèces, *Corynebacterium glutamicum* et *Propionibacterium shermanii*, sont caractérisées par son pouvoir de sécréter l'acide glutamique et la vitamine B12(Zhang *et al*, 2020).

1-3- Les champignons

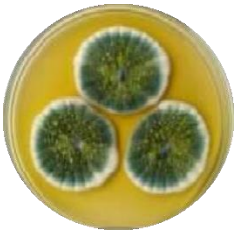
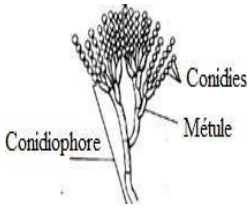
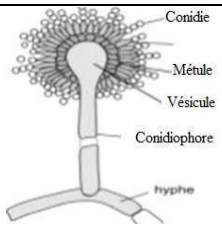
Les champignons sont des micro-organismes eukaryotes qui sont classés en trois groupes par rapport à leurs importances industrielles : les champignons filamenteux, les levures et les champignons supérieurs (BROCK et coll., 1994c). Les champignons filamenteux sont caractérisés par une structure mycélienne. Leur appareil végétatif (thalle) est constitué par des filaments ramifiés, les hyphes. Leur organisation est coenocytique, à l'intérieur de la structure filamenteuse, entourée d'une paroi rigide, se trouve une masse cytoplasmique multi-nuclée mobile, sans cloisonnement en unités cellulaires.
Les champignons se reproduisent par germination des spores. Une spore germe et émet un filament (hyphe) qui croit, s'allonge par l'extrémité apicale et se ramifie pourdonner un nouveau mycélium. Les champignons ont aussi la possibilité de se propager par bouturage. Un simple fragment de mycélium est capable de se développer et de former une colonie. Il peut exister deux types de reproduction, asexuée et sexuée (Alexopoulos Et Coll., 1996a).
Unicellulaire (des levures) ou pluricellulaire (moisissures). Ce sont soit des moisissures, soit des levures. L'espèce, *Saccharomyces cerevisiaea,* et la levure la plusutilisée dans le domaine industriel, principalement dans la production de protéines, protéines recombinantes et plusieurs produits biopharmaceutiques (Gervasi et al, 2018). *Apergillus niger,* est une moisissure utilisée pour la production industrielle del'acide citrique (Steiger *et al* 2019).
La bioconversion de sous-produits agro-alimentaires par champignons peut contribuer de façon significative à la forte demande en protéines alimentaires pour l'élevage.
Dans le futur, lorsque les connaissances technologiques et nutritionnelles seront suffisantes t on peut envisager la fabrication de nouveaux types d'aliments protéinéspour la consommation humaine t basé sur l'utilisation des champignons filamenteux t ce qui est déjà pratiqué depuis des siècles de façon artisanale dans certaines partiesdu monde. (Steiger et *al* 2019).

1-4- Les moisissures

Ce sont des eucaryotes hétérotrophes dont la structure forme des filaments, ils appartiennent au règne des Mycètes (Fungi), la reproduction de ces organismes se fait par voie asexuée par des spores (conidies) qui sont disséminées dans l'environnement, ou par voie sexuée par brassage

génétique pour certaines espèces.Les moisissures ont des capacités d'adaptation élevées, et se trouvent généralementà des pH acides. Cependant, ils sont largement utilisés dans la médecine, fabrication des alimentset des produits de santé, grâce à leurs capacités de produire une large gamme d'enzymes hydrolytiques, des antibiotiques, des arômes alimentaires…etc. **(Nguyen, 2007).**

Tableau 2. Exemples de formes de moisissures sur le milieu PDA.
(Sidaoui Abouamama, 2022)

Moisissures	microscopique	Observation macroscopique	Observation
Penicillium sp.			
***Aspergillus* sp.**			

1-5- Les levures

Ce sont des champignons unicellulaires, capables de se reproduire par bourgeonnement ou scissiparité. Les cellules de levure sont délimitées par une paroi rigide qui représente 20% de son poids sec. Elles jouent un rôle capital dans les procédures de fermentation (Figure 4) principalement dans l'industrie agroalimentaire (boulangerie, vinification, fromagerie), par l'élaboration de nombreux produits, elles contribuent à la revalorisationdes déchets agricoles et industriels et à la production de protéines. Cependant, elles jouent un rôle négatif en contaminant et en dégradant les aliments et certains sont pathogènes et provoquent des maladies chez les humains et les animaux. (Bergler, G. 2020).

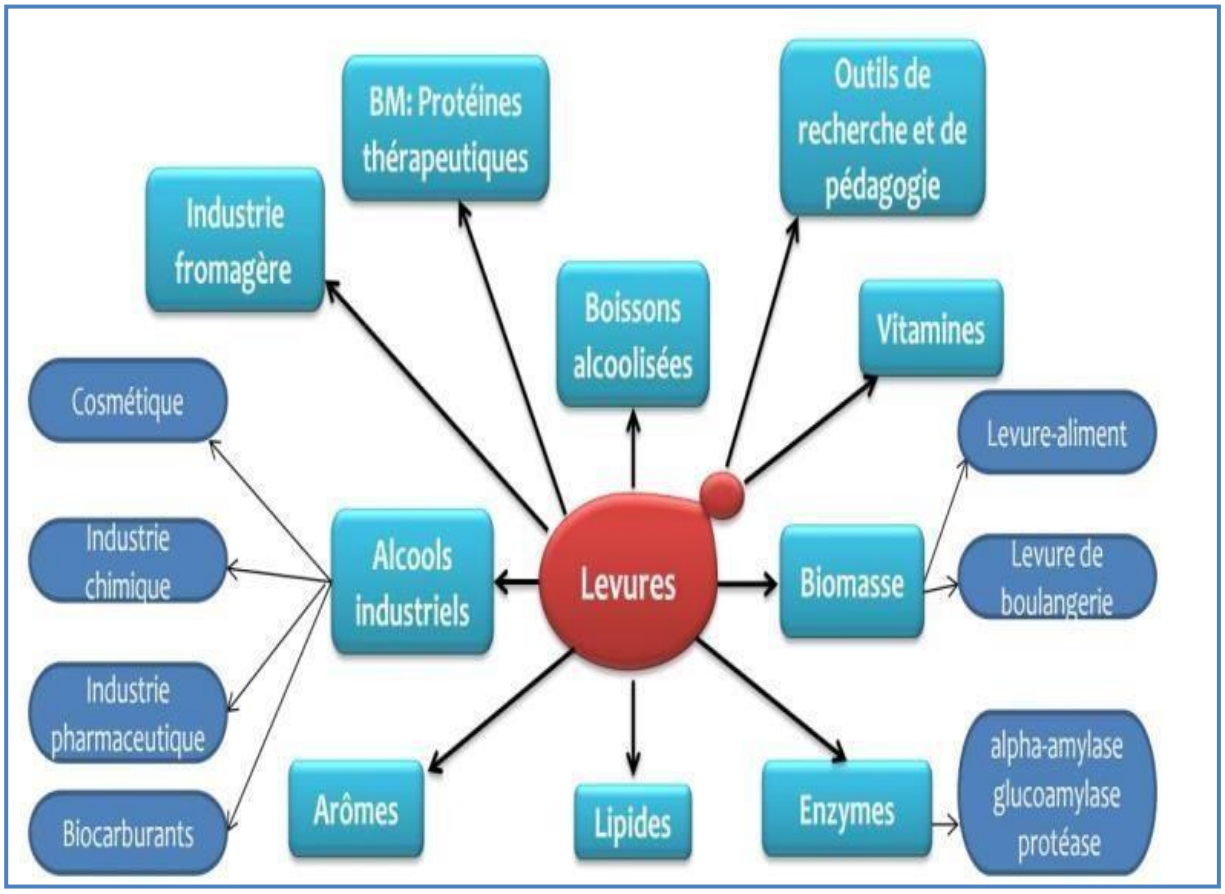


Figure 4. Différents domaines d'utilisation des levures (Sidaoui Abouamama, 2022)

1-6- Les microalgues :

Sont des microorganismes photosynthétiques eucaryotes ou procaryotes unicellulaires ou pluricellulaires. Les cyanobactéries du genre *Arthrospira* sont utilisées comme compléments alimentaires pour lutter contre la malnutrition sous forme de spiruline alimentaire (spirulina) (De La Jara *et al*, 2018).

Initiée dès les années 1960, l'exploitation industrielle des micro-algues a vraiment débuté dans les années 1970 avec l'aquaculture marine.

Les technologies actuelles entrouvrent la possibilité d'une production à grande échelle, à haut rendement et à faible coût de production de toutes les souches de micro-algues d'intérêt.

Le XXIe siècle devrait être celui des micro-algues, et c'est une vraie révolution eu égard aux importantes opportunités qu'elles offrent dans les domaines de la nutrition,de la cosmétologie, de la santé, de la chimie verte et de l'énergie. Nous allons bientôt les retrouver dans tous les produits que nous utilisons au quotidien.

Ils existent plus de 60 000 espèces dans seuls 30 000 sont connues et une dizaine d'espèces, étudier et cultivé toutes avec une composition biochimique et des propriétés différentes et donc avec de nombreuses applications potentielles de plus leur productivité est élevée et permettent même une récolte quotidienne.

Les microalgues constituent une ressource à peine explorée. Malgré la grande biodiversité de ces organismes dont le nombre estimé d'espèces va de plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions, seulement quelques-unes sont cultivées à ce jour à l'échelle industrielle.

La capacité de nombreuses espèces à fixer du CO_2 et à le stocker efficacement sous forme de polysaccharides et de lipides est particulièrement intéressante. Les microalgues ont jusqu'à présent été cultivées pour des applications à haute valeur ajoutée, notamment pour des pigments et des antioxydants. (Chen et *al*, 2022).

Les microalgues sont de plus en plus regardées pour leur potentiel énergétique et leurs nombreuses applications. La culture de microalgues pour des applications énergétiques implique des productions importantes de biomasse ainsi qu'une logique d'intégration systémique. (Lucchetti, 2014).

Actuellement une nouvelle technologie émerge, capable de résoudre les principaux problèmes environnementaux. L'émission de CO_2 ainsi que la nécessité d'une source d'énergie inépuisable pourront être des problèmes du passé grâce à ce combustible àpartir de micro-algues qui remplacent parfaitement le pétrole fossile.

En effet depuis quelques années, la biotechnologie microalgale est devenue un thème de recherche privilégie permettant d'explorer et d'exploiter l'énorme potentiel de ces microorganismes intervenant au sien de nombreux systèmes et dans de multiples secteurs industriels.

L'utilisation de micro-algues en tant que biodiesel et pour le chauffage des bâtimentsaurait un rendu bénéfique pour notre environnement. Les biocarburants à base de microalgues, possèdent aujourd'hui une productivité deux fois plus élevée que celle des biocarburants à base d'huile de palme, qui sont pourtant plus utilisés.

1-7- Les virus

Les virus sont aujourd'hui définis comme des parasites intracellulaires détournant la machinerie d'un hôte afin de se multiplier. Entre leurs cycles de reproduction, lesvirus ont une phase d'existence extracellulaire sous la forme de particules virales ou virions qui leurs permet de se transmettre d'un hôte à un autre, (Poranen et *al*, 2002).Le caractère parasitaire des virus s'explique notamment par le fait que ces derniers ne possèdent pas le bagage génétique nécessaire à la constitution des ribosomes impliqués dans les mécanismes traductionnels. Ceci empêche, de fait, qu'ils puissentêtre intégrés au sein de l'arbre universel du vivant proposé par Carl Woese regroupant tous les organismes cellulaires en fonction de critères ribosomiques (Woese et *al,* 1990). En plus d'être dépourvus des gènes impliqués dans la synthèse protéique, les virus ne possèdent généralement pas non plus de gènes dévolus à la synthèse d'énergie ou au métabolisme du carbone.

La découverte récente du monde viral a eu pour conséquence un retard dans leurs exploitations à des fins biotechnologiques, on note toutefois :

- Les vaccins à base de virus contiennent soit des virus atténués, soit des virus inactivés. Ces vaccins ont la capacité d'activer toutes les phases de la réponse immunitaire et confèrent une immunité durable et rapide à long terme en déclenchant la production d'anticorps neutralisants dirigés contre le pathogène cible.

Le procédé de fabrication de vaccins à base de virus atténués est complexe, se compose de plusieurs étapes et doit conserver le potentiel infectieux du virus atténué. Chaque procédé doit donc être adapté en fonction de la forme, de la taille, de la nature, du comportement physicochimique, de la stabilité et de la spécificité entermes d'hôte du virus.

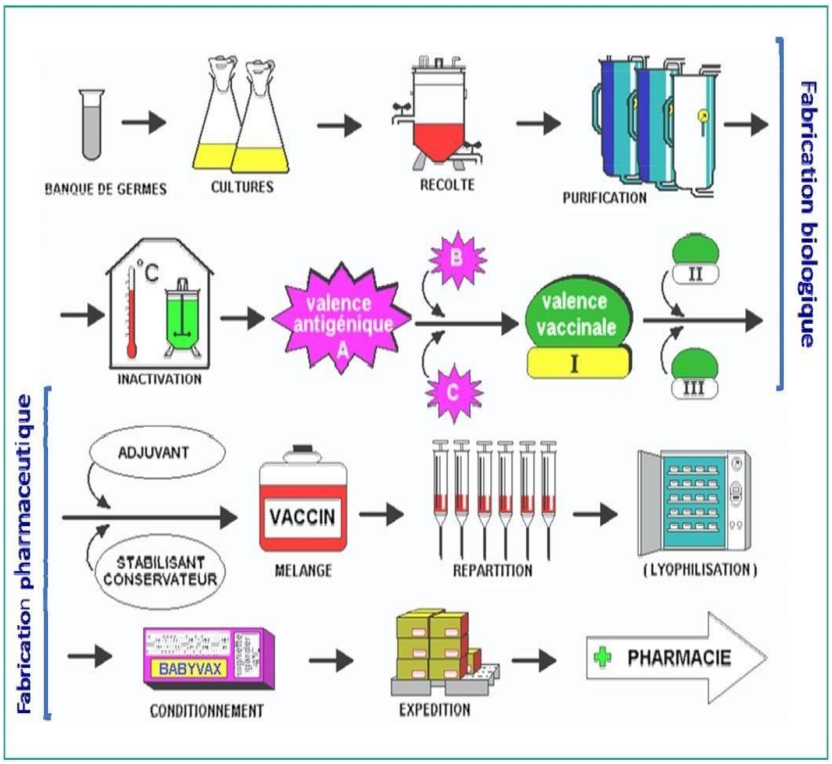


Figure 5. Les principales étapes de la production d'un vaccin (Chalumeau, 1994).

1-8- Les bactériophages

Face à l'émergence de souches bactériennes résistantes à de nombreux antibiotiques (Benzaid et *al*, 2022), les approches basées sur des alternatives à l'utilisation de ces molécules prennent de plus en plus d'importance.

Les bactériophages étant capables de lyser rapidement les cellules bactériennesfont partie de ces alternatives. S'ils ont été découverts au début du siècle précédent, leur utilisation en tant qu'agent antibactérien a été considérablement entravée par l'avènement des antibiotiques.

En 2014, le parlement européen a proposé une motion demandant aux membres de la communauté européenne de prioriser le développement de la phagothérapie comme complément à l'antibiothérapie (Pourraz 2020).

Le premier exemple discuté ici traite de l'utilisation d'un phage en aquaculture, afin d'empêcher l'infection des poissons contre une bactérie pathogène très commune.

Le second, vise à limiter la multiplication d'une bactérie pathogène dans un aliment. Ces deux études sont caractéristiques de la démarche scientifique mise en place pour l'utilisation des phages en tant qu'agent bactéricide. Elles permettent d'évaluer les potentialités et les faiblesses de cette approche. (Debarbieux, et *al*, 2013).

2- Moyens d'obtention des microorganismes

Il existe deux façons pour se procurer des microorganismes d'intérêt industriel ;

- A partir de culture de collection, ce qui veut dire des microorganismes déjà isolés et identifiés ; elles portent le nom de l'espèce plus un numéro d'identification unique. C'est ce qu'on American Type Culture Collection (ATCC) aux États unis, ou le centre de ressources biologiques de l'Institut Pasteur en France, ou encore le Central bureauvoor- Schimmel cultures (CBS) aux Pays-Bas. (Microbiologie-clinique.com)

- Faire des isolements à partir d'écosystème divers (eau, sols, roches de sel…etc) : La pratique de techniques d'isolement relève de de la bactériologie classique. Et parallèlement les techniques modernes sont plus axées sur la biologie moléculaire.(Bent Mohamed *et al*, 2008)

3- Screening de souches à intérêt industriel

La technique utilisée pour l'isolement et la mise en évidence d'activité biologique dépend essentiellement du produit recherché

Dans ce qui suivra quelques exemples de techniques d'isolement et de sélection desouches productrices de produits (substances) d'intérêt industriel :

- Isolement et sélection de souches productrices de facteurs de croissance

Un facteur de croissance est un compose nécessaire à la croissance d'une souchemais qui n'est pas synthétisée par cette dernière (microorganismes auxotrophes) :

Technique :

- Afin d'obtenir des colonies distinctes et isolées, on réalise des dilutions de l'inoculum sélectionné.
- Dans Pétri un ruban de papier filtre est déposé de telle sorte que ses deuxextrémités dépassent du bord de la boite ;
- Couler la gélose (milieu de culture).
- Étaler un volume donne d'une dilution (de la terre par exemple) qu'on désire étudier ;
- Incuber a température et temps correspondants au germe recherche.

Dans une autre boite Pétri, avec de la gélose nutritive (ne contenant pas le facteur de croissance en question, exemple lysine) ;

- Ensemencer avec une souche indicatrice auxotrophe au facteur de croissance recherche (lysine dans ce cas) ;
- A l'ide d'une spatule, ont enlevé la première couche de gélose (étape 1) et on la dépose sur la surface de la seconde.

  Les substances que l'on cherche diffusent à travers la gélose et les souches intéressantes se manifestent par une zone de croissance de la souche auxotrophe.
- **Test de confirmation :**

  Ensemencer une boite de pétri avec la souche indicatrice et les souches sélectionnées en spots. (Ouartsi et *al*, 2019).

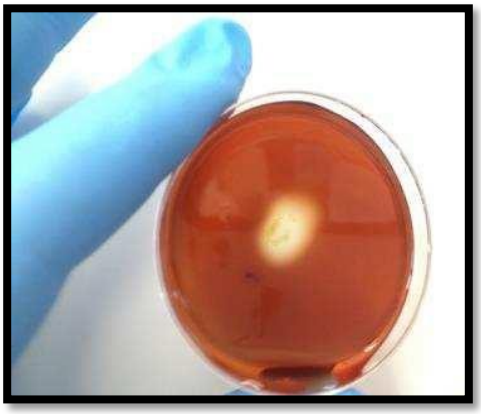


Figure 6. Halo d'inhibition sur boite Petri

- **Isolement et sélection de souches productrices d'enzymes**

  Le choix du microorganisme producteur d'enzymes est capital. Les enzymes étant produites essentiellement par des champignons et des bactéries. On peut citer : essentiellement par des champignons et des bactéries. On peut citer :

  Les enzymes bactériennes :

- *Bacillus* : amylases, glucanase, protéases ... Actinobacteries : glucose invertase, cellulases, xylanases...
- Les Archea : les enzymes thermostables, résistantes aux pH extrêmes (extremozymes).

  Le plus souvent les enzymes sont induites par la présence du substrat, de ce fait, les microorganismes producteurs d'enzymes sont recherches la ou les substances à hydrolyser sont abondantes (microorganismes producteurs de cellulases sont

recherches dans des sols forestiers riches en cellulose ; les producteurs de lactasesdans les produits laitiers...).

Si l'on cherche également certaines propriétés chez l'enzyme (comme par exemplela thermostabilite) on cible des milieux appropries (sources thermales...).

Le principe de la sélection repose sur l'utilisation de milieux de culture sélectifs (selon le microorganisme producteur cible : champignons, Actinobacteries...). Le milieu de sélection doit contenir le substrat de l'enzyme comme seule source de carbone. (Rihani, 2018)

- **Tests d'activité (mise en évidence de l'activité antimicrobienne)**

Il existe deux techniques très réalisées à savoir la technique des stries croisées, et la technique des cylindres d'agar technique. Tandis que lors ce qu'on utilise l'extrait (sumageant ou filtrat de culture), il existe également deux techniques bien adaptées, la technique des puits et celle des disques imprégnés. (Benzaid, 2019)

- **Test des stries croisées**

Ce test consiste à ensemencer le germe test (l'isolat) en un seul trait sur un milieu gélose adéquat. Après incubation a température et temps idéaux au germe test, les germes sont ensemencés en stries perpendiculaires à celle du germe test (figure 7).

Les boites sont incubées (24h à 37°C pour les bactéries / 48 à 72h à 28°C pour les champignons). Les zones d'inhibition entre le bord de strie du germe test et celle desgermes cibles sont mesures avec « un pied à coulisse ».

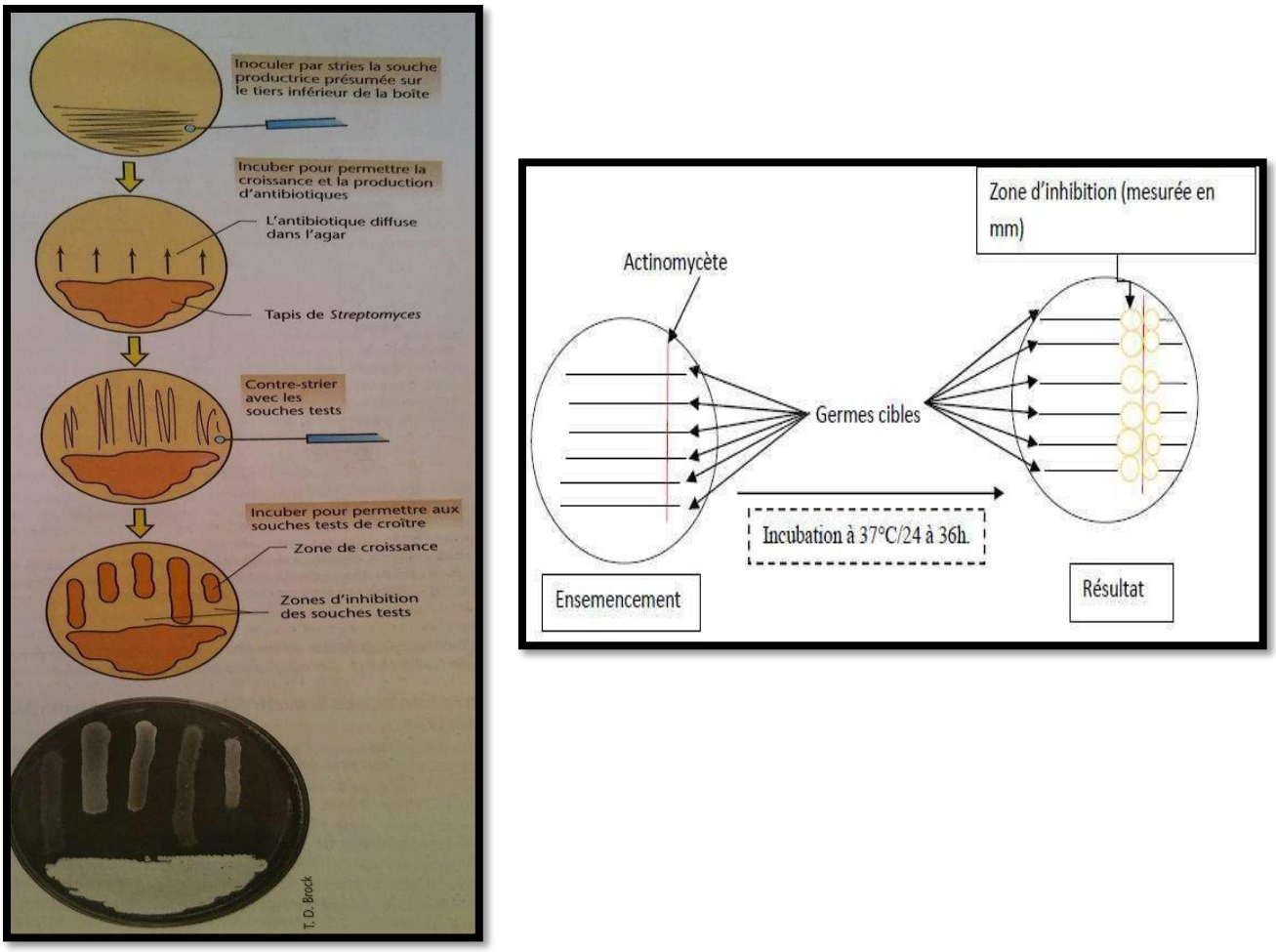


Figure 7. Test de mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des stries croisées (Sidaoui Abouamama, 2022)

- **Technique des cylindres d'Agar**

La souche test et ensemencée en stries serrées sur le milieu gélose et incubée a température et temps sélectifs à la souche.

Des cylindres d'agar de 6mm de diamètre environ, sont ensuite prélevés avec un emporte-pièce et déposés à la surface d'un milieu (Muller Hinton) préalablement ensemence par les germes cibles.

Les boites ensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2 heures avant d'être incubéespour permettre la diffusion des substances actives tout en empêchant momentanément la croissance des microorganismes cibles (figure 8).

Les zones d'inhibition sont mesurées avec « un pied à coulisse » après un temps d'incubation relatif au micro-organisme cible (24h à 37°C pour les bactéries / 48 à 72h à 28°C pour les champignons).

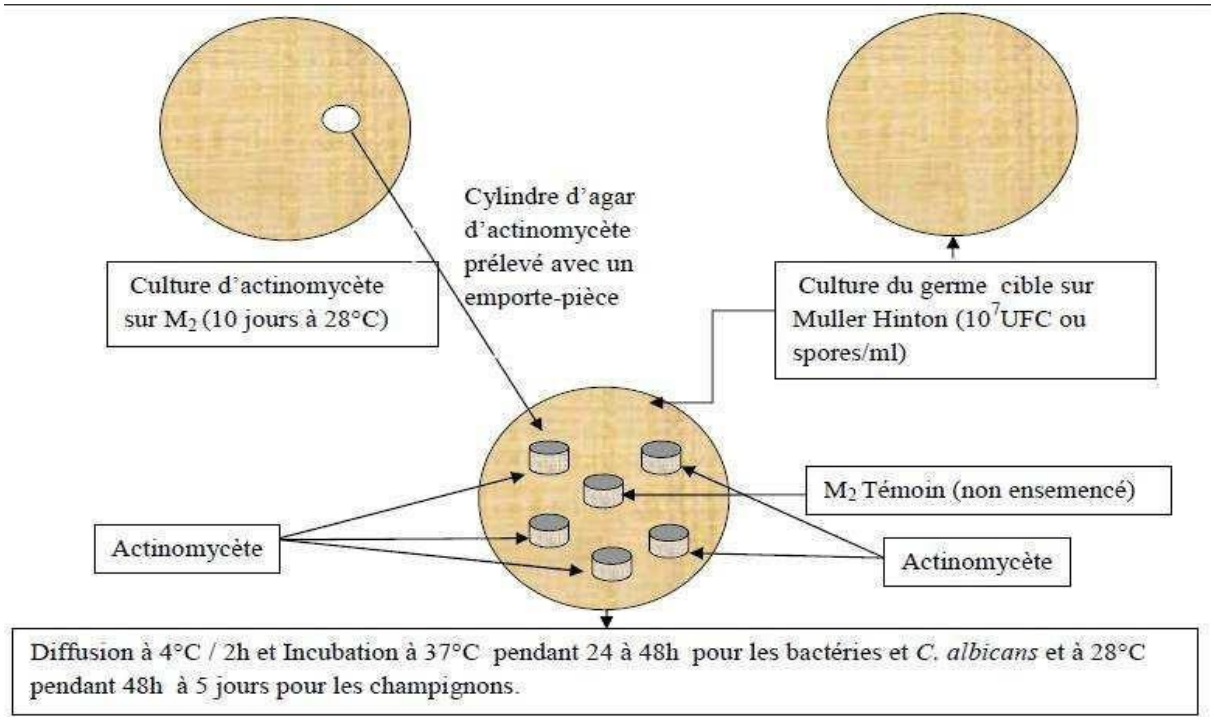


Figure 8. Test de mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode descylindres d'agar (Sidaoui Abouamama, 2022)

Les méthodes qui permettent de rechercher des activités dans des extraits

Méthode des puits :

C'est une méthode de diffusion sur boite Petri (milieu gélose) probablement ensemencée avec le germe cible et à la surface de laquelle on creuse (à l'aide d'u emporte-pièce) des puits de6mm de diamètre environ. (Figure 9)

Les puis sont ensuite remplis avec (50-lO0µL) du sumageant ou filtrat de culture. Les boites ensemencées sont maintenues a 4°C pendant 2 heures avant d'être incubées (24h a 37°C pour les bactéries / 48 a 72h a 28°C pour les champignons). Les zones d'inhibition sont mesurées par la suite avec « un pied à coulisse ». (Guinoisau, 2015)

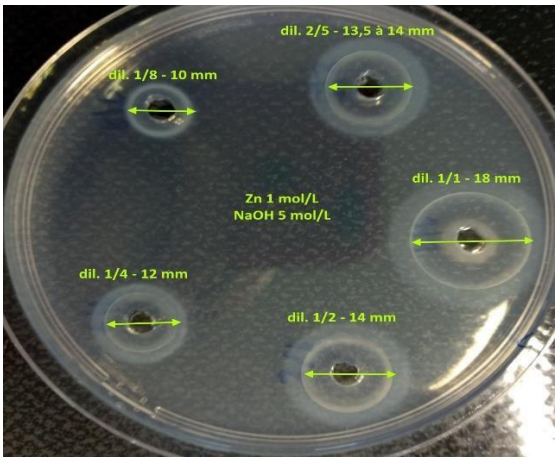


Figure 9. Technique des puits

Méthode des disques :

Des disques de papier Wattman (N°1) (préalablement stérilisés) sont imbibes avec l'extrait à l'aide d'une micropipette, puis séchés avec un séchoir (éliminer le solvant dans lequel est dilue l'extrait). Déposer ensuite les disques charges, aseptiquement, àla surface de la gélose préalablement ensemencée avec le germe cible. (Figure 10) Les boites ensemencées sont maintenues a 4°C pendant 2 heures avant d'être incubées (24h a 37°C pour les bactéries / 48 a 72h a 28°C pour les champignons). Les zones d'inhibition sont mesurées par la suite avec « un pied à coulisse ». ». (Guinoisau, 2015)



Figure 10. Technique des disques

4- Recherche de nouveaux antibiotiques

Bien que les sociétés pharmaceutiques découvrent aujourd'hui leurs nouveaux produits par modélisation informatique, les antibiotiques ont été découverts traditionnellement par criblage ou *screening*. L'une des stratégies pour améliorer la probabilité d'obtenir des isolats particuliers (rares) adaptes à des niches écologiques extrêmes et des métabolites secondaires nouveaux est d'exploiter les écosystèmes peu communs qui existent dans des conditions extrêmes (pH, température, salinité, etc.).

Les isolats qui montrent une activité antibiotique sont ensuite testes afin de savoir st cet antibiotique est nouveau, ce qui réclame beaucoup de temps et de ressources, car la plupart des antibiotiques sont déjà connus. S'il est nouveau, l'antibiotique est produit enquantité suffisante pour des études de structure, de toxicité et d'activité clinique sur des animaux infectes. (Guinoisau, 2010).

5- Méthodes de purification

Les méthodes de purification choisies dépendent des caractéristiques physicochimiques prédéterminées du complexe actif et de sa concentration dans le milieu de production.

a) Extraction des antibiotiques

L'extraction liquide-liquide à l'aide des solvants organiques non miscibles avec l'eau est considérée comme une étape de purification partielle (figure 11).

A l'issue de la fermentation, l'antibiotique est présent à des concentrations relativement faibles dans un mélange polyphasique (comprenant les cellules, des éléments du milieu et différents métabolites).

Généralement, les molécules bioactives passent dans la phase aqueuse. Le choix du solvant d'extraction est primordial. Il doit non seulement avoir une forte capacite d'extraction et une sécurité d'emploi, mais aussi assurer la stabilité des molécules lorsde l'extraction ainsi que leur concentration par distillation.

La localisation des antibiotiques peut être différente selon leur nature et le microorganisme producteur. C'est pour cette raison que les activités antibiotiques sontà rechercher aussi bien dans le sumageant de culture que dans les cellules.



Figure 11. Extraction de molécules (antibiotiques) par des solvants dans des ampoules à décanter.

b) Purification des antibiotiques

Pour purifier les antibiotiques, de nombreuses techniques ont été décrites en littérature. Elles varient selon les propriétés physico-chimiques des molécules étudiées. Celles se rapportant à la chromatographie liquide restent les plus utilisées et permettent une purification totale des antibiotiques.

Après extraction, les produits bruts obtenus sont traités en chromatographie liquide. Deux types de chromatographie sont possibles.

- Sur plaque : ou sur couche mince (CCM).
- Sur colonne : à pression atmosphérique ou basse pression ou encore à haute pression (HPLC)

▶ **Purification des antibiotiques par chromatographie sur couche mince et sur Colonne**

Après extraction avec le meilleur solvant choisi, il est souvent indispensable d'effectuer une semi- purification par :

▶ Chromatographies préparatives qui permettent la séparation des molécules ayant des propriétés physicochimiques voisines. Elles peuvent être réalisées sur colonne ousur plaques épaisses de gel de silice (figure12) ;

- Filtration sur gel (sephadex, polyacrylamide, agarose, etc.), ce qui permet la séparation des molécules en fonction de leur poids moléculaire.

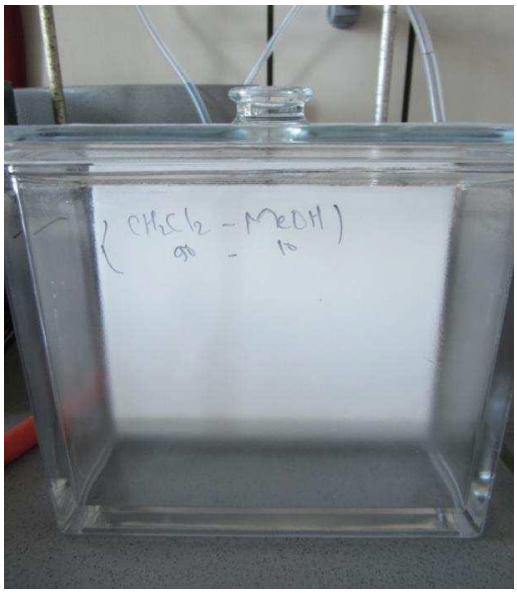




Figure 12. Séparation des molécules par chromatographie sur plaque ou sur couche mince (CCM) et sur colonne.

▶ **Purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

L'HPLC est une méthode d'analyse très sélective. Elle est utilisée comme dernière étape de purification car elle permet la séparation de nombreux produits, y compris des isomères d'un mélange complexe. Les composes sont détectes par la mesure de leur absorption en lumière UV à des longueurs d'ondes précises.

Les techniques de séparation sont souvent accompagnées de tests de révélations chimiques (Chromo-géniques), spectroscopiques (UV-visible, infrarouge), et microbiologique (bio• autographie et anti-biographie) pour la détection des antibiotiques et pour avoir des informations sur leur nature, ce qui peut orienter la purification.

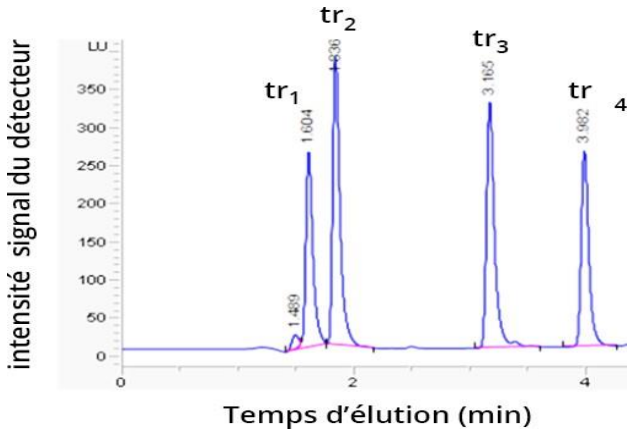


Figure 13. Exemple de spectre HPLC

C- Identification des antibiotiques par méthodes spectrales

Les méthodes spectroscopiques sont utilisées pour rechercher la présence de certains groupements chimiques caractéristiques dans les molécules d'antibiotiques (liaison conjuguée, certains groupements fonctionnels ; etc.), ou encore pour détecter la présence de certains types d'antibiotiques comme les polyenes présentant des spectresd'absorption caractéristiques en UV-visibles.

▶ **Spectroscopie en UV-visible**

Cette étude est insuffisante pour identifier une structure, mais elle permet de détecter les composés aromatiques (absorption entre 240 et 260 nm) et les systèmes insaturés dont certaines (substances colorées) absorbent même dans le visible. Les polyenes entre 290 et 405nm sont aisément détectés par cette méthode.

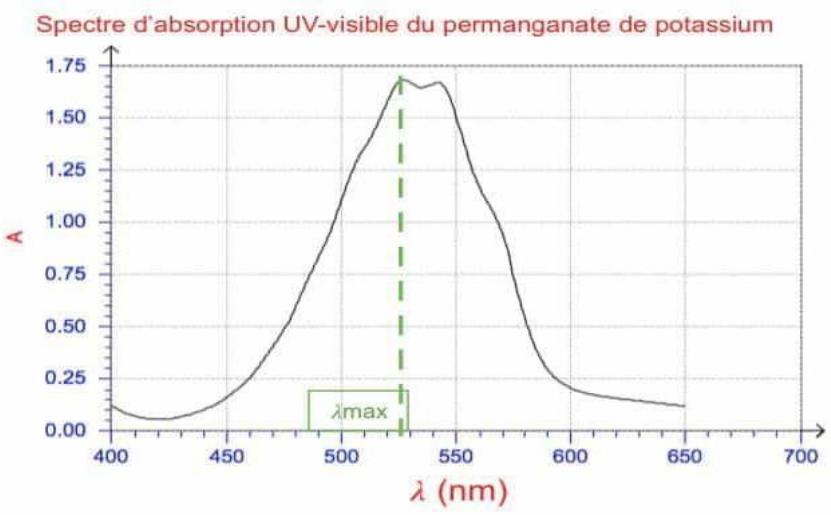


Figure 14. Exemple de spectre en UV-visible

- **Spectroscopie dans l'infrarouge (IR)**

Elle permet de déterminer la présence de groupements et fonctions caractéristiques (CH3, CH_2, CH, OH, NH_2, NH, CHO, COOH, etc.), et d'aromatiques, etc. et ce, à l'aide de tables de corrélation.

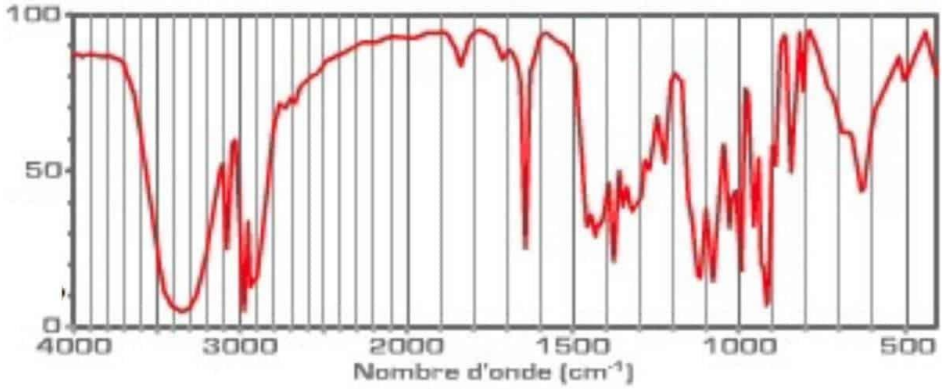


Figure 15. Exemple de spectre infra rouge

- **Spectroscopie de masse**

Par ces différentes techniques, la spectrométrie de masse, permet d'avoir les masses molaires et parfois même la structure des substances analysées avec une grande certitude et après examen très approfondi du pie moléculaire et de ces fragments.

La technique de « nano spray » a permis la détection et l'analyse d'antibiotiques même àl'état de traces. Le couplage LC- MS (liquide chromatography- mass spectrometry) permet la détermination des masses moléculaires de tous les composants d'un profil chromatographique.

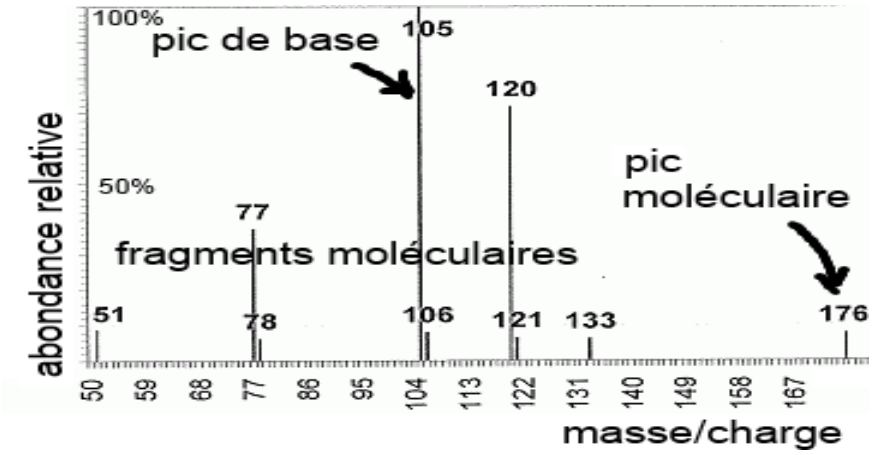


Figure 16. Exemple de spectre de masse

- **Spectroscopie par résonnance magnétique nucléaire (RMN)**

Ce type de spectrométrie permet de localiser les atomes, de préciser la formule développée et la stéréochimie du compose étudie ainsi que sa conformation privilégiée(stable).

Un spectre RMN se présente sous forme de pies caractérisant les déplacements chimiques (exprimes en ppm) et les constantes de couplage des protons ou des carbones.(Figure 17)

Il existe des tables de corrélations qui aident à identifier chaque type de proton ou decarbone en fonction de leur déplacement chimique. L'intensité des signaux est proportionnelle au nombre de protons. **(Bakour .2021)**

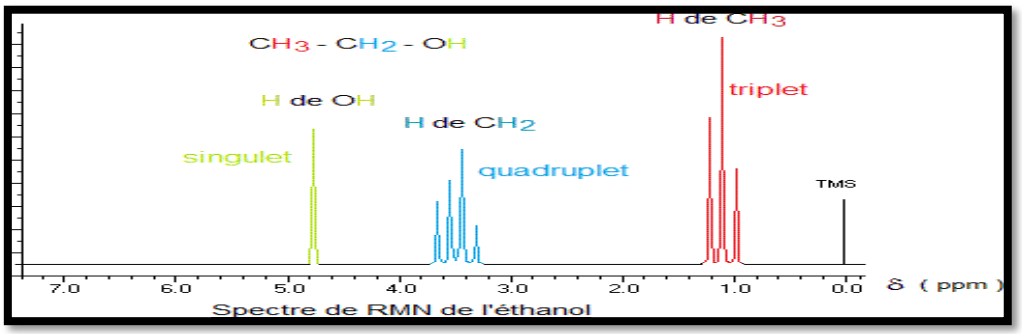


Figure 17. Exemple de spectre RMN

6. Rappel de Taxonomie

La principale application de la systématique est l'identification, qui consiste à étudier les caractères d'un microorganisme (caractères morphologiques, biochimiques, moléculaires, cytologiques…) afin de pouvoir le placer dans un taxon préalablement décrit.

Les microorganismes, dans chaque niveau ou rang, partagent un ensemble de caractères spécifiques. Les rangs sont organisés en une hiérarchie non chevauchante. Le rang le plus élevé est le domaine, dans chaque domaine, le microorganisme est placé (en descendant la classification) dans un phylum, une classe, un ordre, une famille, un genre et une espèce. Certains microorganismes sont aussi attribués à une sous espèce. (Rinke et *al*, 2021).

Le système de **nomenclature** des organismes utilisés aujourd'hui a été mis au point en 1735 par **Carl von Linné**. C'est l'ensemble de règles qui permet de **nommer** les **groupes** ou **taxons.** Les noms scientifiques sont en **latin** parce que c'était la langue employée traditionnellement par les savants. L'appellation de chaque organisme est formée de **deux mots** : le premier désigne le **genre** et il porte toujours la **majuscule** ; le second désigne l'**espèce sans majuscule**. On utilise les deux mots **soulignés** ou écrits en ***italique***.

Ainsi, un organisme donné est désigné par un nom de genre et une épithète spécifique, et il appartient à une famille (se terminent par ***aceae***), un ordre (« ***ales*** » parfois les ordres sont subdivisés en sous-ordres dont les noms se terminent par ***ineae***), une classe et un embranchement. Tous les embranchements apparentés constituent un règne, et les règnes apparentés sont regroupés dans un domaine. (Bank et *al*, 2021).

CHAPITRE III. MILIEU DE CULTURE INDUSTRIEL

1. Définition

Un milieu de culture est défini comme étant la préparation liquide, solide ou semi solide, utilisée De manière spécifique ou générale afin d'assurer : la croissance, le transport et la conservation des microorganismes. (Boukalkola, 2022).

Les milieux de cultures industriels ont pour objectif de satisfaire les exigences nutritionnelles du microorganisme afin d'assurer une croissance optimale de la biomasse cellulaire, et en même temps, fournir les nutriments nécessaires à la biosynthèse des métabolites cibles (Okafor et *al*, 2020).

Les milieux de culture utilisés en industrie sont essentiels pour la grande majorité des microorganismes industriels qui sont des chimio hétérotrophes.

La fermentation industrielle est réalisée, le plus souvent, sur un milieu de culture liquide, bien que certaines fermentations sont réalisées sur des milieux de culture solides (Demain et 1981). La concentration en vitamines, la disponibilité en nutriments azotés ou carbonés ou encore l'état de croissance de la culture, sont des facteurs (paramètres) qui contrôlent un produit spécifique. En plus, la température, la concentration en oxygène, le pH et l'activité de l'eau sont des paramètres qui favorisent ou inhibent la croissance des microorganismes. Ce qui nécessite une connaissance parfaite de ces interactions pour optimiser chaque procédé.

2. Caractéristiques des milieux de cultures

- Le milieu de culture doit assurer :
- La production de la biomasse cellulaire,
- La synthèse du produit ciblé.
- Il doit contenir au moins une source de carbone, d'azote, d'oxygène (pour une culture aérobie), d'hydrogène, des certains oligo-éléments, des vitamines, des facteurs de croissance et des précurseurs métaboliques. (Assamoi, et *al*, 2009).
- De plus, un agent anti mousse et des produits chimiques tampons peuvent également être ajoutés dans le milieu.
- Lorsque la biomasse constitue le produit cible, le milieu de production doit permettre une croissance optimale du microorganisme.

- Pour la production de métabolites secondaires, (les antibiotiques, leur biosynthèse n'est pas liée à la croissance), les milieux sont conçus pour fournir une période initiale de croissance cellulaire, suivie de conditions optimisées pour la production de métabolites secondaires. **(**Microbiologiste, 2020).

3. Composition des milieux de culture industriels

La composition exacte d'un milieu, dépendra directement de l'espèce ciblée pour la culture, ou le produit récupéré (Tableau 3).

Il doit toutefois favoriser la croissance des microorganismes et assurer une production maximale de métabolites. Il peut être synthétique, Semi- synthétique, complexe, liquide ou solide. (Bourdeau, 2016).

Tableau 3. Principaux constituants des milieux de culture utilisés dans lesprocédés industriels. (Bourdeau, 2016).

Sources	Matières brutes
Carbone et énergie	Mélasse, Petit-lait, Déchets agricoles
Azote	Farine de soja, Déchets d'abattoir, nitrate,Vinasse
Vitamines	Produits végétaux et animaux.
Fer, oligo-éléments	Dérivés chimiques inorganiques
Anti-mousses	Alcools, Silicones, Huiles végétales
Tampons de pH	Craie, carbonates bruts, phosphates

3.1 - Source d'énergie et de carbone (carbohydrates) :

Pour la plupart des organismes, le poids de la biomasse produit à partir d'un poids donné de substrat carboné, sous aérobiose, est de 0.5g poids sec par g (de glucose). Par conséquent la quantité de substrat doit être le double du poids de l'organisme. (Camille, 2014). Les sources decarbone peuvent être :

- Le glucose est une excellente source de carbone pour stimuler la croissance microbienne.

Mais le glucose peut avoir des effets indésirables sur la production de métabolites secondaires.

Le glucose est additionné au début de la fermentation pendant la phase de croissance pour favoriser au maximum la croissance et ne fournir pendant la phase de production que des quantités minimales non inhibitrices

- Le lactose est l'un des sucres lentement métabolisables, et n'inhibe pas la production de la pénicilline après hydrolysation du lactose en galactose et glucose
- Le saccharose et dextrane sont souvent utilisés comme source de carbone simple, mais ils peuvent être fournis dans un substrat industriel complexe tel que la mélasse, (non seulement la source de carbone, azotées, des vitamines et des oligo-éléments)
- Le choix de la source de carbone, qui représente généralement le coût principal des matières premières, dépend des cultures :

Exemple : les microbes producteurs d'amylase peuvent utiliser de l'amidon et des dextrines au lieu du glucose plus coûteux

- La bactérie *Yarrowia lipolytica*, est capable de dégrader les lipides, les protéines et les n-paraffines en tant que source unique de carbone.
- Les levures du genre Candida peuvent assimiler les n-alcanes et acides gras en tant que sources de carbone. (Tadjer et *al*, 2023).

Mais pour des raisons de cout les sources de carbones qu'on retrouve en industrie sont :

- **Mélasse** : résultat de l'industrie du sucre, c'est un sous-produit du sucre extrait de la betterave sucrière, ou de la canne à sucre, il contient environ 60% de glucides principalement du saccharose, et 2% de substrat azoté, ainsi que des sels minéraux et des vitamines.
  Ils permettent d'obtenir des biomasses protéiques ou des levures pour la panification.
- **L'extrait de malt** : c'est un substrat utilisé pour la culture des champignons, levures et actinomycètes. Il est concentré en sucre simples et disaccharide, il contient également des acides aminés, peptides et quelques vitamines
- **Amidon et la dextrine :** obtenu à partir de céréales comme la mais, il va être utilisé comme source de carbone après hydrolyse ; il contient principalement du glucose, la dextrine.
  - Le lactosérum : connu sous le nom du petit lait : produit de la coagulation du lait ; il est très riche en protéines, lactose et calcium

3.2- Source d'azote :

Le nitrogène est un élément essentiel parce qu'il représente le compose principal des protéines et des acides nucléiques. Pour les bactéries, la composition moyenne en nitrogène est de 12.5%. Pour produire 5g de biomasse par litre il faut utiliser 625 mg de nitrogène. (Camille, 2014)

L’azote peut être sous deux formes :

- L'azote inorganique :

Il peut se présenter sous les formes :

- Sels d’ammonium de sulfate (NH +SO -)
- Le phosphate de d'ammonium ($(NH_4)_2HPO_4$)
- Ou l'ammoniac (NH_3).

Ce dernier est utilisé pour ajuster le pH de la fermentation

- Azotes organiques :
- Les acides aminés,
- Les protéines
- Et l’urée

La majorité des microorganismes utilisés en industrie ont la faculté d’utilise l’azote sous ces formes organique et inorganique.

La source d’azote sera essentiellement fournie sous une forme brute qui sera des sous-produits de l’industrie agro-alimentaire

Exemple : le maïs, les extraits de levure, les peptones et la farine de soja (riches en protéines, desacides nucléiques, des vitamines, des oligoéléments, des lipides, des sucres, du soufre et du phosphate)

3.3. Sels minéraux :

Les sels minéraux sont très essentiels ayant des rôles très divers :

-Éléments constitutifs des antibiotiques (P, S, Cl…). ;

- De la biomasse (Mg, P, Cl, Ca, Fe,..)
- Responsable de la pression osmotique (NaCl, KCl,….);
- Modificateur de pH ($CaCO_3$….)

-Agents de précipitation (NH_4-SO_4-2);

- Catalyseurs de réaction (Mg+2, Mn+2, Fe+2/ +3, Zn).

3.4.-Vitamines et facteurs de croissance

- Les vitamines sont des composés organiques essentiels pour la croissance des microorganismes
- Ils peuvent être ajoutés comme suppléments au milieu de fermentation pour certains microorganismes (bactéries, champignons et levures). (Leveau 1999).

3.5.-Précurseurs

Les précurseurs sont des molécules dites intermédiaires, elles servent de substrats de départ à des réactions au cours de la biosynthèse de métabolites secondaires tels que des antibiotiques. Ils sont souvent ajoutés de manière contrôlée et sous une forme relativement pure.

Par exemples :

- L'acide phénylacétique est ajouté pour la chaîne latérale dans la production de pénicilline.
- D-thréonine est utilisé comme précurseur dans la production de L-isoleucine par la bactérie : *Serratia marsescens.* (Camille, 2014).

3.6. L'Eau

L'eau est le composé essentiel dans tous les milieux de culture, il est responsable de toutes les réactions métaboliques des processus de fermentation industrielle (sauf les fermentations sur substrat solide). Elle peut fournir des oligo-éléments nécessaires pour la croissance, et sa qualité est très importante pour obtenir des cultures optimales et reproductibles (ex: L'eau déminéralisée, désionisée sont obtenues par des techniques de filtrations sur membranes) (leveau, 1999).

3.7. L'Oxygène :

L'apport en O2 est déterminé en fonction du type respiratoire du micro organisme, l'oxygène sera ainsi ajouté au fermenteur sous une forme d'air qui contiendra environ 21% (v/v) d'oxygène, il peut être injecté également sous forme d'oxygène pur si ça correspond à des microorganismes avec des besoins élevés. Cet apport en oxygène doit respecter les conditions d'asepsie afin d'éviter toute contamination au sein du fermenteur. (Leveau, 1999).

3.8. Les antimousses :

Pendant la fermentation, et principalement à cause des protéines du milieu de culture, une mousse peut être observée à l'intérieur du fermenteur. Si cette formation échappe au contrôle, elle pourrait entrainer un blocage des filtres à air, qui aura pour conséquence la perte d'asepsie. (Ali et *al*, 2011). Afin d'y remédier on note trois méthodes :

- Apporter des modifications à la composition du milieu de culture
- Utilisation d'un mécanisme brise mousse
- Addition de produits antimousses chimiques qui sont généralement des molécules tension actives telles que les huiles végétales (huile de soja, tournesol, colza …etc.)
-

4. La stérilisation du milieu de culture

Un milieu doit être stérile avant d'être ensemencé par la souche productrice.

Le traitement thermique est le moyen le plus fréquemment utilisé pour stériliser le milieu croissance. (Ali et *al*, 2011).

5. Le choix du milieu de culture

Les milieux de culture utilisés dans les procédés industriels doivent obligatoirement répondre aux besoins nutritionnels nécessaire à la croissance et la multiplication des cellules microbiennes avec le cout le moins cher possible **(industrie= rentabilité**) tout enassurant les critères suivants :

- Substrat de bon marché (peu coûteux).
- Qualité physico-chimique constante même après stérilisation.
- Disponibilité durant toute l'année.
- Coûts de transport et de stockage faible, surtout vis-à-vis de température.
- Facilité à manipuler sous forme solide ou liquide.
- Facile à stérilisé.
- Une viscosité qui ne gêne ni l'agitation ni l'aération de milieu de culture industriel durant le procédé de la fermentation. (El-Mansi *et al,* 2018):

Un contrôle continu devrait être effectué tout au long du processus de production, assuré par des appareils et mesurant des paramètres les plus important lors de la fermentation comme :

Potentiel hydrogène (pH) : Sondes à électrodes

Température : Thermocouples, thermistors ou résistances de platine **Oxygène dissous** : Sondes polarographiques, électrodes galvaniques **Bilan gazeux** : Spectrophotomètre de masse **Niveau de la mousse** : La tension superficielle (substances « anti-mousses »)

Bilan CO2 : Analyseur infrarouge

Substrat et métabolites : Dosages chimiques et physico-chimiques, électrodes spécifiques.

La pression : Manomètres

Communauté cellulaire : Examen microscopique, poids sec, volumes de culots de centrifugation. (El-Mansiet al, 2018).

Tableau4.
El Manssi, 2018

Avantages et inconvénients de l'utilisation de milieux de culture complexes, synthétiques et semi-synthétiques dans des bioprocédés industriels

Milieu synthétique	Milieu semi-synthétique	Milieu complexe
Avantages		
– Composition exacte du milieu connue – Milieu chimiquement défini – Permet d'étudier avec précision la croissance d'un microorganisme en fonction d'un facteur précis – Contient très peu d'impuretés	– Permet d'augmenter la croissance cellulaire en ajoutant des éléments d'un milieu complexe – Représente un bon compromis entre le niveau d'impuretés présent au départ et l'augmentation de la productivité d'une fermentation – Moins d'impuretés à éliminer qu'un milieu complexe	– Substrat bon marché (moins coûteux à formuler) – Contient la plupart des éléments nécessaires à une bonne croissance (diversité de nutriments) – Sources appréciables de carbone et d'azote – Valorisation de biomasses nuisibles en substrats à haute valeur ajoutée
Inconvénients		
– Plus coûteux à formuler	– Composition chimique du milieu partiellement définie – Coût de formulation un peu plus élevé que celui des milieux complexes	– Composition exacte de tous les éléments nutritifs inconnue – Milieu non chimiquement défini – Teneur en nutriment pouvant être variable d'un lot à un autre, ce qui réduit la reproductivité des productions – Composés résiduels (impuretés), que l'on doit éliminer à l'étape de purification

CHAPITRE IV : LES FERMENTATIONS INDUSTRIELLES

Introduction

Sans même connaître l'existence de micro-organismes, les Égyptiens, en 4 000 avant Jésus-Christ, utilisaient les levures pour fabriquer du pain et des breuvages alcoolisés. Sans asepsie, mais avec un sens développé de l'observation, des savoir-faire ont été perpétués et améliorés aucours des siècles, mais ce n'est qu'au 19ème siècle qu'à vraiment démarré la mise en valeur despropriétés des micro-organismes à des fins utilitaires. (Baltz et *al*, 2010).

Au cours des deux guerres mondiales, de nombreux procédés aérobies sont utilisés pour la production de composés chimiques à différents rôles ; nutritifs, médicaux et pharmaceutiques, alimentaires, et voire même énergétiques, grâce aux particularismes métaboliques qui sont mis à profit et la maîtrise des techniques de génie génétique qui ont permis d'ouvrir de nouvelles perspectives, notamment dans le secteur des acides aminés, des protéines recombinantes et des antibiotiques.

Au progrès des connaissances s'est ajoutée la nécessité de satisfaire des besoins d'hygiène, de santé et d'alimentation qui ont permis l'essor des procédés de fermentation et le développement de technologies appropriées aux cultures microbiennes massives : les fermenteurs, qui facilitent la maîtrise des cultures de bactéries, levures, champignons et même de cellules animales et végétales. (Ouartsi, 2019).

Compte tenu de cette diversité, des caractéristiques spécifiques de chaque classe d'organismes et des particularités d'espèces, de très nombreux réacteurs ont été élaborés, et la recherche d'une conception industrielle adéquate pour toutes les cultures (bactéries, levures et champignons) reste toujours un objectif recherché afin de mettre en valeur les potentialités du vivant, les technologies et les équipements associés.

1. Définition de la fermentation

Le terme de fermentation est apparu au 16ème siècle ; du latin FERVERE qui signifie : « Bouillir ». Paradoxalement, la fermentation est possible sans chaleur.

L'origine du terme vient du fait qu'au début de la fermentation du vin, des bulles de gaz sont continuellement libérées à la surface, donnant l'impression d'une ébullition.

Pasteur, le fondateur de la microbiologie, l'a défini comme « la vie en absence d'oxygène ». Cet aspect ne convient plus actuellement tant sur le plan scientifique et technologique. Une acception plus pragmatique est préférable, incluant outre la vie en absence d'oxygène (anaérobiose), la vie en présence d'oxygène, et par extension, ce terme est utilisé par le monde industriel pour désigner l'opération permettant de réaliser les cultures cellulaires et réaliser les réactions de bioconversion, qu'elles soient aérobies ou anaérobies. (Wilson et *al* ,2019)

1.1 Fermentation et physiologie microbienne

La fermentation est définie Comme le type de métabolisme d'une source de carbone dans lequel l'énergie est générée par laphosphorylation au niveau du substrat (l'un des trois mécanismes de phosphorylation atomiquepour générer de l'ATP à partir de l'ADP).

La respiration est aérobie si l'accepteur final est l'oxygène. **Et anaérobie lorsqu'elle implique un autre composé inorganique que l'oxygène, par exemple le sulfate ou le nitrate. Accepteur final d'électrons ou (en tant qu'accepteurs d'équivalents réducteurs).**

Les micro-organismes génèrent de l'ATP en respirant. Ils utilisent également des hydrates de carbone (sucre) comme source d'énergie et un combustible chimique organique comme l'adénosine triphosphate (ATP) fournit cette énergie à chaque partie de la cellule en cas de besoin. La fermentation est similaire à la respiration anaérobie, celle qui a lieu lorsqu'il n'y a pas assez d'oxygène présent. En fonction des conditions environnementales, les cellules individuelles et les microbes ont la capacité de passer d'un mode de production d'énergie à l'autre**.** (Leveau, 1999)

1.2.Fermentation et microbiologie industrielle

Qui définit la fermentation comme tout processus dans lequel des micro-organismes sont cultivés à grandeéchelle, même si l'accepteur final d'électrons n'est pas un composé organique (c'est-à-dire si la croissance s'effectue dans des conditions de température et de pression normales).

La fermentation est une étape d'un procédé industriel ; elle s'insère dans un ensemble d'opérations qui aboutiront à la valorisation de la biomasse et/ou de ses composantes et/ouà la valorisation des produits de bioconversion.

Cette opération se déroule dans des enceintes appelées : bioréacteurs (fermenteurs). (Singh et *al*, 2017).

1.3.Fermentation et microbiologie alimentaire

Qui définit la fermentation comme tout processus métabolique dans lequel l'activité d'un micro-organisme crée un changement souhaitable dans les aliments et les boissons, qu'il s'agisse d'augmenter la saveur, de conserver les aliments, de fournir des avantages pour la santé ou plusencore. Dans ce cas, les micro-organismes déterminent la nature et le caractère général de l'aliment, mais ne représentent qu'une faible proportion du poids du produit fini. Les aliments tels que le vinaigre, le fromage, le pain et le yaourt sont des aliments fermentés. Trois (3) types distincts de fermentation

i. Fermentation lactique : des souches de levure et des bactéries transforment l'amidon oules sucres en acides lactiques, sans nécessiter de chaleur pour la préparation. Ces réactions chimiques anaérobies utilisent l'acide pyruvique, le nicotinamide adénine dinucléotide + hydrogène (NADH) pour former de l'acide lactique et du NAD+. Cette méthode est utilisée pour la fabrication de cornichons, de yaourts et de pain au levain.
ii. Fermentation de l'éthanol/alcool : les levures décomposent les molécules de pyruvate en molécules d'alcool et de dioxyde de carbone pour produire du vin et de la bière.
iii. Fermentation de l'acide acétique : les amidons et les sucres des céréales et des fruits sont fermentés pour produire du vinaigre acide et des condiments, par exemple le vinaigre decidre de pomme.

2. Définition du fermenteur

Un fermenteur est un récipient fermé et stérilisé qui maintient des conditions optimales pour la croissance d'un micro-organisme. Ce sont des enceintes (cuves) en verre (pour les fermenteurs destinés le plus souvent au laboratoire), ou le plus souvent en acier inoxydable, de dimension très variable en passant de l'ordre de 5 à 25 litres pour les fermenteurs laboratoire, à environ de 100-200 litres pour les fermenteurs des chaines pilotes, et à l'ordre de mètres cubes pour les fermenteurs industriels. Ces récipients sont munis le plus souvent d'appareillages et de dispositifs de contrôles (pH-mètre, extracteur des gaz, sondes, agitateurs, etc.) et de matériels annexes (vannes, pompes, filtres, etc.) nécessaires pour assurer une facilité et le bon fonctionnement de la fermentation, ainsi que la récupération des produits, fermentation, ainsi que la récupération des produits, tout en assurant le contrôle des conditions nécessaires à la production. La figure 19, illustre un schéma typique d'un fermenteur avec les accessoires nécessaires. (Hess, 2007).

Il est à noter que :

- Tout au long de l'enchaînement des opérations de production fermentaire, il est nécessaire de pratiquer des contrôles afin de vérifier le bon déroulement du procédé.
- Du stade laboratoire, où les cultures sont de l'ordre de quelques centimètres cubes, au stade production, où les fermenteurs atteignent plusieurs centaines de mètres cubes, il seranécessaire d'effectuer des étapes de propagation.
- Les critères de conception d'un fermenteur industriel découlent de la réaction biologiquede fermentation que l'on souhaite mettre en œuvre dans le but de produire soit de la biomasse soit des molécules contenues dans le microorganisme ou produites par ce dernier(acide organique, acides aminés). En fonction du métabolisme sélectionné, les critères de stérilité, de transfert de matière, de gaz et de transfert de chaleur imposent des conditions de calcul qui gouvernent la conception du fermenteur. (Amrane, 1991).

6. Types de fermenteurs

Selon l'objectif d'utilisation de fermenteur, on distingue trois types de fermenteurs :

- **Fermenteur laboratoire (**Échelle recherche) : Étude de la faisabilité de la production (Collection de la souche et Préparation des milieux, stérilisables à l'autoclave jusqu'à 18 L ; ou les bioréacteurs de laboratoire stérilisables in situ jusqu'à 30 L
- **Fermenteur pilote** (Échelle Développement) : Étude et la mise au point des conditions industrielles, les bioréacteurs pilotes jusqu'à 300 L,
- **Fermenteur industriel** (Échelle Production) : Mise en œuvre des conditions Industrielles, ils peuvent atteindre jusqu'à 500 000 L (500 m3).

6. Composants du bioréacteur

L'organigramme des principaux composants d'un bioréacteur est illustré et listé ci-dessous dansla figure 18.

- Sondes et capteurs (pH, O_2, chaleur, température, masse cellulaire, pression, sondes Anti- mousse). Dispositifs de contrôle pour vérifier les niveaux de nutriments clés et la concentrationdu produit : Elles sont utilisées pour surveiller les conditions à l'intérieur du fermenteur afin demaintenir un niveau optimal de croissance microbienne.

- Chemise d'eau externe

- Plaque de tête
- Orifice d'échantillonnage / sortie du produit
- Sortie d'échappement
- Entrée acide / base : permet de réguler le niveau de pH à l'intérieur de la chambre (la formation du produit peut modifier le pH)
- Entrée des nutriments
- Arbre/ Ne permet pas au produit de s'échapper ni aux micro-organismes de pénétrer dans les bords
- Moteur
- Palettes à cordes : Elles servent à répartir uniformément la chaleur et les matériaux dans la chambre de réaction. - Impulseur : Diminuer la taille des bulles d'air pour donner une plus grande surface interfaciale pour la transplantation de l'O_2 et réduire les voies de diffusion. Celapermet également de maintenir un environnement uniforme dans tout le contenu du récipient
- Roue à aubes
- Brasseur d'air / système d'aération
- Déflecteurs
- Couverture d'eau externe : Elle peut être utilisée pour absorber l'excès de chaleur et maintenir une température viable constante : Pour couvrir le haut de la cuve des bioréacteurs.
- Pot d'échantillonnage : Un robinet pour prélever l'échantillon de la fermentation
- Sorties d'échappement / entrée des nutriments : permettent l'introduction de sucre ou l'élimination des déchets métaboliques.
- Diffuseur d'air : Pour assurer une meilleure dispersion de l'air pour les micro-organismes dans le fermenteur,
- Un aérateur : Peut être utilisé pour introduire de l'air comprimé dans la chambre, tandis qu'un antimousse peut empêcher la formation de mousse.
- Joint d'étanchéité : Entre la plaque supérieure et le récipient pour maintenir l'étanchéité, l'asepsie et le confinement.

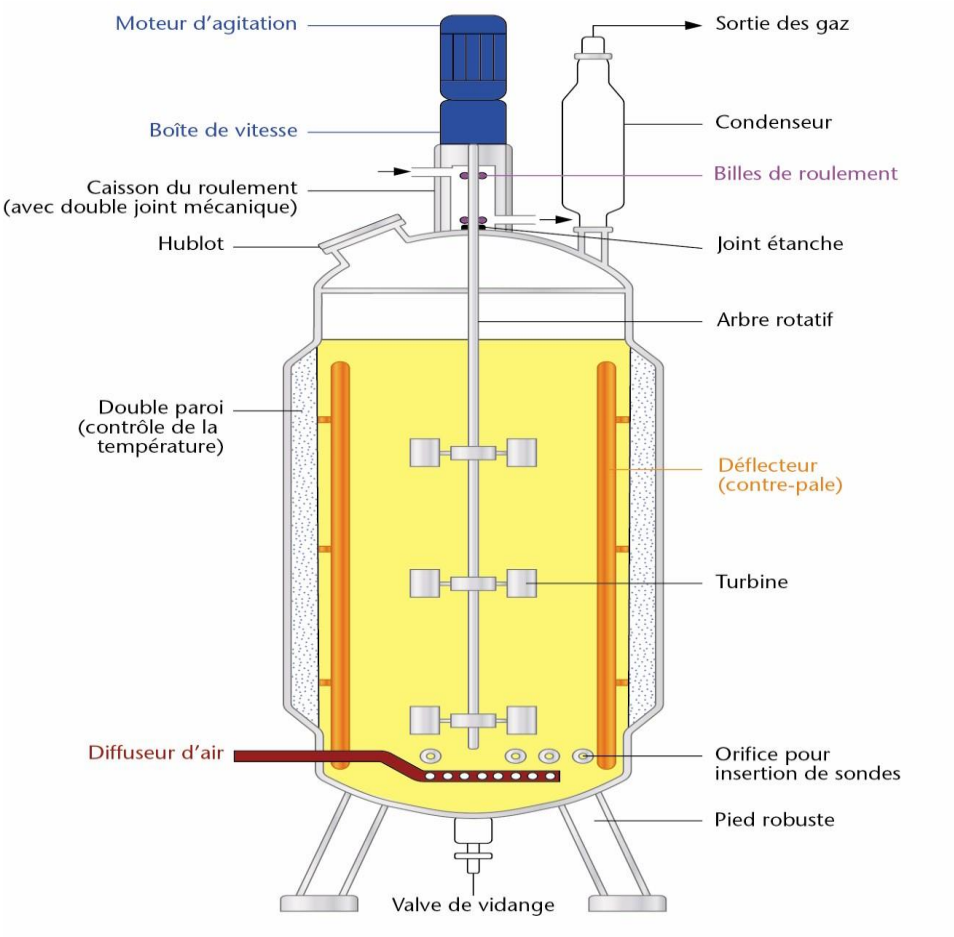


Figure18. Schéma général d'un bioréacteur industriel(Ouartsi ,2019)

5- Fonction principale d'un fermenteur (bioréacteur)

1. Fournir un environnement propice et contrôlé pour l'agent biologique (micro-organismes) telque l'humidité, la température et la pression.

2. Servir de mélange défini de micro-organismes avant un mélange adéquat pour le transfert denutriments et de produits.

3. La fermentation est un processus qui permet d'obtenir un produit désiré après la fermentation.

4. Obtenir une culture homogène avec un apport en énergie minérale.

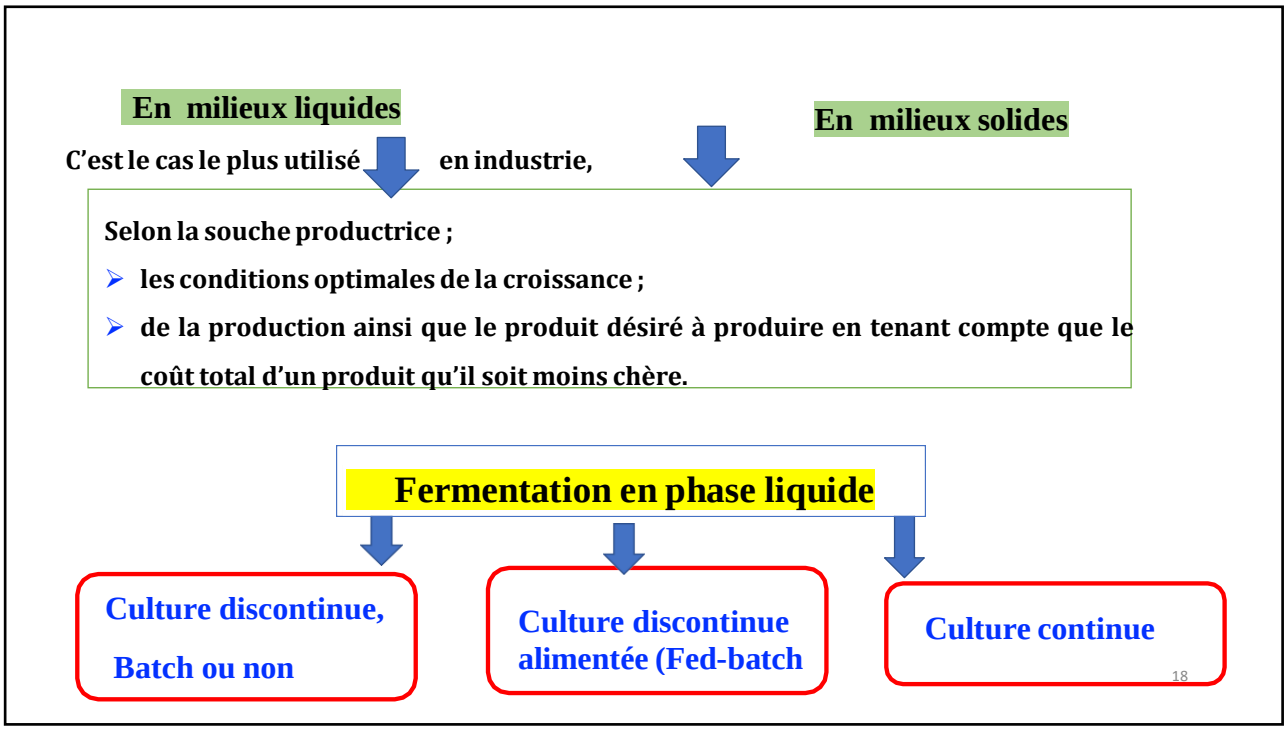
5. Permettre de maintenir des conditions optimales pour la croissance des cellules et la formation du produit.

6. Un récipient qui est robuste, assez fort pour résister aux différents traitements nécessaires :chaleur élevée, pression, stérilisation.

7. Un point d'inoculation pour un transfert aseptique dans les inoculums et une vanne d'échantillonnage pour prélever un échantillon pour les différents tests. (Leveaux, 1999).

6- Types de processus de fermentation microbienne

Le processus de culture microbienne peut être réalisé de différentes manières.



6-1- La fermentation discontinue (en batch)

C'est un système fermé dans lequel un grand volume de milieu nutritif est inoculé pour procéder à la récolte et à la récupération du produit. La fermentation discontinue s'achève alors que le récipient est nettoyé et stérilisé à nouveau pour les lots suivants.

Il s'agit d'un système fermé dans lequel tous les nutriments sont initialement ajoutés au récipient et inoculés. Les traitements ultérieurs comprennent le maintien d'une aération adéquate en fournissant des agitateurs et le contrôle du pH par l'ajout d'un acide ou d'un alcalin. Dans les tiges aérées, des agents antimousses tels que l'huile de palme ou l'huile de soja sont ajoutés.

La croissance à grande échelle des micro-organismes à tendance à générer de la chaleur dansle système. Dans la fermentation par lots, la croissance des micro-organismes suit la courbe de croissance caractéristique avec une phase de latence suivie d'une phase logarithmique, pour finalement atteindre la phase stationnaire en raison de la limitation des nutriments et d'autres facteurs. (Ouartsi, 2019)

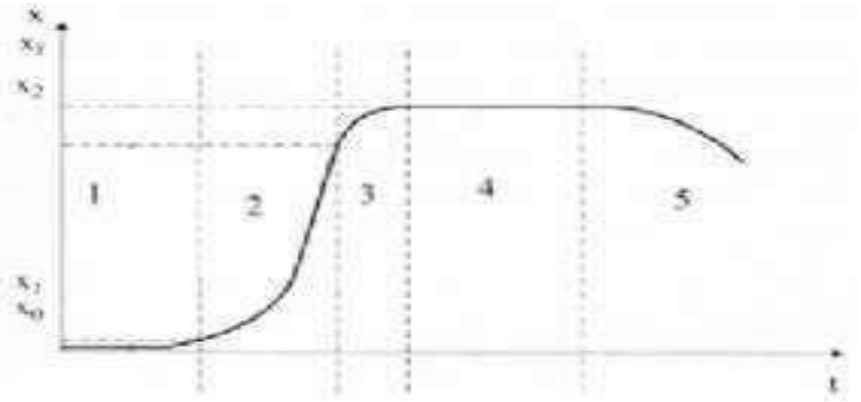


Figure19. Évolution de taux de croissance des cellules

(Leveau, 1999)

1 : Phase de latence : μ=0, Xo cte => adaptation des cellules et synthèse d'enzymes. 2 :Phase exponentielle : μ=max, μ=cte, Gest court, $dX/dt = \mathbf{\mu X}$

3 : Phase de ralentissement : vitesse de croissance basse, début d'épuisement du milieu de culture. 4 :Phase stationnaire : μ=0, n=0

5 : Phase de déclin : μ < 0, épuisement total du milieu de culture, lyse cellulaire, accumulation demétabolites toxiques => mortalité cellulaire.

Une courbe de croissance dialectique peut être observée lorsque des solutions nutritives complexes sont utilisées, deux phases de latence se produisent fréquemment, séparées par une seconde phase logarithmique, ce qui est dû à l'utilisation préférentielle de l'un des substrats. La présence d'un substrat réprime la dégradation de l'autre.

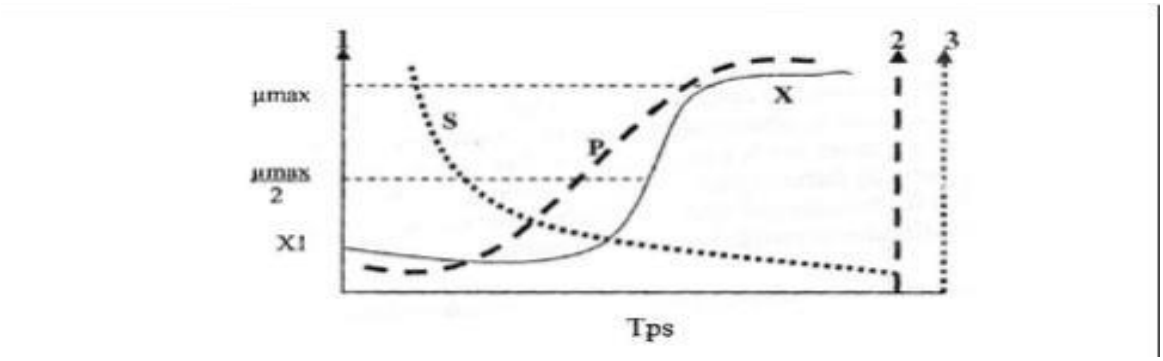


Figure 20. Évolution de taux de croissance des cellules (X), par rapport aux taux de conversion de substrat (S), la production de métabolites (P), au cours d'une fermentation industrielle (Oosterhuis et *al*, 2011).

À la fin de culture on vide le fermenteur et on extrait le produit désiré (Oosterhuis et *al*, 2011). **En résumé, les micro-organismes passent par toutes les étapes de la croissance (phase de latence, phase d'accélération transitoire, phase exponentielle, phase de décélération,phase stationnaire), avant la collecte du produit.**

Les avantages de la fermentation en mode discontinu (Batch).

- Le produit désiré peut-être recueilli à tout moment.
- Le risque de contamination est faible.

Les inconvénients de la fermentation en mode discontinu (Batch).

- Le temps de latence est très long.
- La durée de la phase exponentielle est très courte, donc la biomasse et le produit finale sont produits en quantités faibles : rendement limité.

6-2- **Fermentation fed-batch** :

Dans la fermentation fed-batch, le substrat est ajouté par incréments au fur et à mesure que la fermentation progresse (petites concentrations et petites doses) car, pendant la formation de nombreux métabolites secondaires, la concentration élevée de glucose, d'autres hydrates de carbone ou de composés azotés entraînent la répression des catabolites. Les éléments critiques de la solution nutritive sont ajoutés en faible concentration au début de la fermentation et ces substances (substrats) continuent d'être ajoutées en petites doses pendant la phase de production. Il est difficile de mesurer la concentration de substrat directement et encontinu pendant la fermentation. Les paramètres indirects, qui sont corrélés avec le métabolisme des substrats critiques, doivent être mesurés afin de contrôler le processus d'alimentation.

Par exemple, dans le processus des acides organiques, le pH doit être utilisé pourdéterminer le taux d'alimentation en glucose. D'autres hydrates de carbone ou des composés azotés. (Oosterhuis, et al, 2016)

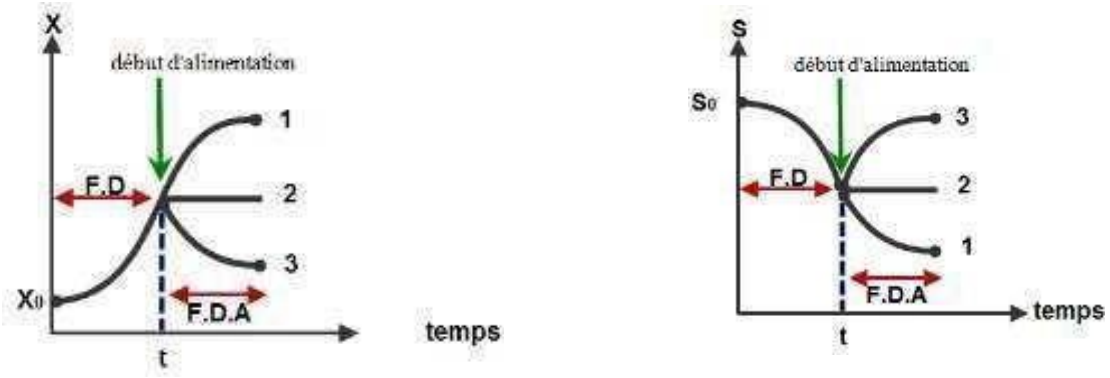


Figure 21. Évolution des concentrations en biomasse et en substrat dans le fermenteur discontinu alimente (Oosterhuis, et *al*, 2016)

(1) Débit d'alimentation faible

(2) Concentration constante

(3) Débit d'alimentation élevé

FD : Fermentation discontinue

FDA : Fermentation discontinue alimentée

Comme les éléments critiques de la solution nutritive sont ajoutés en faible concentration au début de la fermentation et que ces substances (substrats) continuent d'être ajoutées en petites doses pendant la phase de production, il est difficile de mesurer la concentration du substrat directement et en continu pendant la fermentation.

Des paramètres indirects, qui sont corrélés avec le métabolisme des substrats critiques, doivent être mesurés afin de contrôler le processus d'alimentation. Par exemple, dans le processus des acides organiques, le pH doit être utilisé pour déterminer le taux d'alimentation en glucose. Parfois, l'O2 dissous ou la teneur en CO2 de l'air d'échappement sont contrôlés. (Bank et *al*, 2021)

6-3- **Fermentation continue** :

Au cours de la fermentation continue, une partie des composants (y compris les milieux et les inoculums) du processus en cours est retirée par intermittence et les substances retirées sont remplacées par l'ajout d'un milieu frais ou de nutriments. La partie retirée du fermenteur est utilisée pour la récupération des produits.

La partie retirée du fermenteur est utilisée pour la récupération des produits. Pendant la fermentation continue, l'équipement est toujours utilisé et, d'autre part, l'inoculum n'est pas nécessaire pour l'ajout ultérieur des nutriments. Cette fermentation industrielle est réalisée dans des bioréacteurs, qui comprennent :

1. Des fermenteurs ou réacteurs ou bioréacteurs.
2. D'autres récipients tels que des tubes à essai, des flacons et des boites Pétri.
3. Elle est facile à réaliser et ne nécessite pas d'équipement sophistiqué, pas obligatoirement unestérilisation du substrat ;
4. Elle ne produit pas de mousses et n'a pas de contaminations bactériennes suite au manque d'eau libre ;
5. Elle a une forte productivité en métabolites tels que les aromes, la pénicilline les aflatoxines, l'acide gibbérellique, etc.
6. Les frais de séchage éventuels sont réduits. (Ouartsi, 2019)

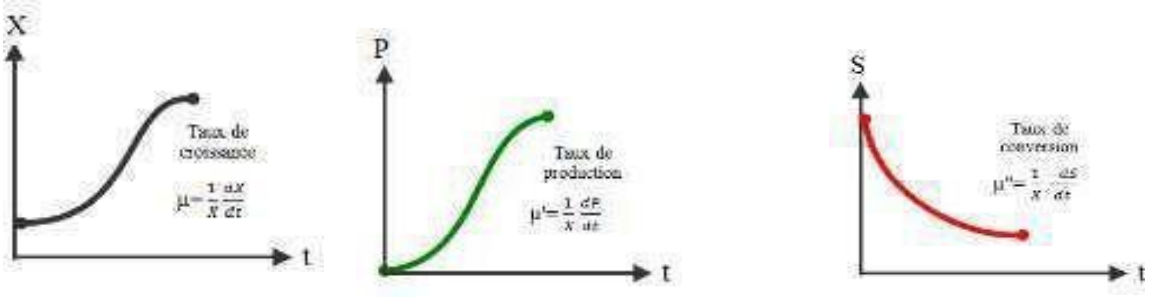


Figure 22. Évolution de la production fermentation continue (Ouartsi, 2019)

6.4. Fermentation en phase solide

La fermentation en phase (ou sur substrat) solide implique la croissance de micro- organismes sur des matériaux solides organiques qui sont simplement humidifiés et non solubilisés ou en suspension. Les substrats utilisés sont souvent les céréales, le son, les légumineuses et les matières lignocellulosiques telles que les copeaux de bois, etc.

Ce type de fermentation ne dispose pas des mécanismes de contrôle sophistiqués généralement associés aux fermentations submergées.

Les microorganismes utilisés dans ce type de fermentation sont peu tolérés à l'activité de l'eau. Ils peuvent être employés sous la forme de :

1. Monocultures, comme dans la production de champignons, par ex. *Agaricus bisporus;*
2. Cultures duales : Ex, bioconversion ;
3. Cultures mixtes, utilisées dans le compostage et la préparation de l'ensilage, la plupart des fermentations sur substrat solide sont des procédés discontinus

Avantages

- Elle est facile à réaliser et ne nécessite pas d'équipement sophistiqué, pas obligatoirement une stérilisation du substrat ;
- Elle ne produit pas de mousses et n'a pas de contaminations bactériennes suite au manque d'eau libre ;
- Elle a une forte productivité en métabolites tels que les aromes, la pénicilline les aflatoxines, l'acide gibbérellique, etc.;
- Les frais de séchage éventuels sont réduits.

Inconvénients

- Très peu de microorganismes peuvent être utilisés,
- Difficultés de transfert et de la diffusion d'oxygène et de la chaleur dans la culture microbienne
- Difficultés de suivi des paramètres de fermentation suite à la nature solide et hétérogène des substrats utilisés. (Magdouli *al,* 2018)

Tableau 5. Comparaison entre la fermentation solide et la fermentation liquide (Magdouli et *al*, 2018)

Facteur	Fermentation liquide	Fermentation solide
Substrats	Substrats solubles (sucres)	Substrats polymères insoluble
Conditions aseptiques	Stérilisation par la chaleur/ Asepsie contrôlée	Traitement à la vapeur, conditions non stériles
Eau	Grand volume d'eau utilise et d'effluents pollues	Consommation limitée d'eau/ peu d'effluents
Chaleur métabolique	Contrôle de la température Facile	Faible capacite de transfert Thermique
Aération	Limitée à l'oxygène soluble, haut niveau d'air requis	Aération simple et haute (échange d'air/substrat)
Contrôle du pH	Facile	Substrat solide tamponne
Agitation mécanique	Bonne homogénéisation	Conditions statiques
Échelle	Équipements Disponibles	Besoin de conception de nouveaux équipements
Inoculation	Inoculation simple/ procédé Continu	Par de spores ou mycélium
Contamination	Risques de contamination Par une seule souche de bactérie	Risque si le microorganisme pousse lentement
Consommation en énergie	Consommation élevée	Faible consommation
Volume de I ‘équipement	Grand volume et grand cout	Petit volume et petit cout
Effluents et pollution	Grands volumes d'effluents Pollue	Absence d'effluents, moins de pollution
Concentration S/Produit	30-80 /L	100-300 / L

7. La mise à échelle industrielle ou scale up :

Le Cambridge Dictionary définit la mise à l'échelle comme l'augmentation de quelque chose en taille, en quantité ou en production. Les processus microbiens impliquent la culture de microbes dans des bioréacteurs (également appelés fermenteurs) pour produire un produit,ainsi que la récupération et la purification ultérieure du produit et l'élimination des déchets associés.

La mise à l'échelle des processus microbiens est généralement entreprise à des fins commerciales, notamment pour offrir des avantages aux clients et générer un rendement financier pour les investisseurs. Un processus développé en laboratoire (par exemple des fermenteurs de 0,5 à 10 L) doit être traduit en un processus de fabrication à grande échelle (par exemple des fermenteurs de 20 000 à 2 000 L), avec des facteurs d'échelle allant de plusieurs milliers à plusieurs millions. (Crater et *al*,2018)



Figure23. Petit fermenteur de recherche (laboratoire)

(Chem Process staff Genomatica's Lievense receives prestigious biotechnology award. (*Chem Process* 2018.)

La mise à l'échelle des grands procédés industriels se fait de préférence en deux étapes s'il existe un degré élevé de nouveauté dans le procédé et/ou le produit commercial.

La première étape est une usine pilote (échelle pilote) avec des fermenteurs de 100 à 10 000 L et des équipements en aval adaptés. Son objectif est de traduire le processus à l'échelle du laboratoire en une version réaliste et réduite du processus de fabrication. Dans la plupart des cas, le processus n'est pas entièrement intégré ; c'est-à-dire que chaque opération unitaire individuelle est effectuée par lots. L'échelle pilote sélectionnée est un jugement basé sur la taille, la disponibilité et le coût d'un équipement représentatifréduit et la taille des échantillons de

produits requis. La deuxième étape de la mise à l'échelle est une usine de démonstration (échelle de démonstration) dotée de fermenteurs de 10 000 à 100 000 L et adaptée en aval. Il sert à minimiser le risque d'un investissement important en capital dans l'usine de fabrication à grande échelle en validant davantage.

Le processus, la chaîne d'approvisionnement (des matières premières à l'application commerciale du produit) et la demande du marché. Le processus de démonstration est exécuté en continu et avec des flux de recyclage.

Le temps nécessaire pour passer de l'échelle du laboratoire à la fabrication est généralement de 3 à 10 ans. Dans ces circonstances, le risque financier est élevé, de sorte que la détérioration des performances du processus lors de la mise à l'échelle sera coûteuse et perturbatrice, pouvant même conduire à l'échec du projet.

La fermentation est également une opération unitaire complexe (Yang et *al*, 2010). De nombreux paramètres ont un impact sur les performances, et la plupart d'entre eux sont susceptibles de changer lors de la mise à l'échelle. Tableau décrit les paramètres liés aux performances qui dépendent de l'échelle. Ces paramètres changent soit en raison de contraintes de coûts, soit de la conception et de l'échelle des équipements, et peuvent avoir un impact négatif sur les performances du processus et sur la rentabilité globale de l'usine.

Tableau 6. Paramètres de fermentation dépendants de l'échelle. (Yang et *al*, 2010).

Paramètre	Déviation	Impact
Qualité des matières premières	Qualité industrielle ou qualité réactif, pureté, concentration, variabilité d'un lot à l'autre	L'accumulation d'inhibiteurs et de composants non fermentescibles peut avoir un impact négatif sur la fermentation, le traitement en aval (DSP) et le traitement des eaux usées (WWT) ; les différences de concentration peuvent avoir un impact sur le bilan hydrique et la dynamique temporelle des processus fed- batch
Stérilisation des matières premières	Profils de stérilisation par lots ou en continu, de température et de temps De séjour	La dégradation des composants et/ou la formation d'inhibiteurs peut avoir un impact négatif sur la fermentation, le DSP et le WWT.
Temps de mélange du fermenteur	Augmentation de l'ampleur	Les gradients des paramètres critiques de contrôle du processus (par exemple, température, pH, concentration de substrat ou de nutriments) peuvent avoir un impact négatif sur les performances de Fermentation.
Coefficient de transfert de masse volumétrique gaz-liquide (k L a)	Dégradé dû à la dissipation de puissance ; limitation supérieure due à la conception de L'équipement	Les limitations et les gradients des taux de transfert de masse peuvent avoir un impact négatif sur les performances de fermentation
Pression hydrostatique du bouillon	Augmentation de l'ampleur avec le gradient le long de l'axe vertical	Des pressions partielles de gaz élevées (par exemple pO 2, pCO 2) et des gradients de pressions partielles et de gaz dissous peuvent avoir un impact sur les Performances de fermentation.

Contrainte de cisaillement	Augmentation del'ampleur	Une contrainte de cisaillement plus élevée peut Endommager les cellules, affectant ainsi la fermentationet/ou les performances du DSP.
Manipulation du bouillon	Durées de conservationet de récolte prolongées	Le temps et les conditions de séjour (température, aérobicité, concentration du produit) peuvent avoir un impact sur la lyse cellulaire et la chimie du bouillon, ce qui peut avoir un impact négatif sur le DSP et le WWT.
Désactivation du bouillon	Profils de désactivation par lots ou en continu, detempérature et de temps de séjour	Les conditions de désactivation (durée, température) peuvent avoir un impact sur la lyse cellulaire et la chimie du bouillon, ce qui peut avoir un impact négatif sur le DSP et le WWT.

Processus unique en son genre, la nécessité d'une validation du processus à une échelle intermédiaire.Le pilotage, généralement à 1 % à 10 % de la pleine échelle de fabrication offre des avantages uniques et une réduction supplémentaire des risques :

Un processus entièrement intégré, comprenant des flux de recyclage, peut être exploitépendant une période prolongée avec des équipements et des matériaux industriels entièrement représentatifs.

- Des conceptions et fournisseurs d'équipements alternatifs peuvent être évalués.
- La future équipe d'exploitation des grandes usines peut être formée ; Grâce à l'expérience pilote de l'équipe, elle saura que le processus fonctionne et enregistreraune expérience précieuse dans la résolution des perturbations du processus.
- Les données de l'usine pilotent et le savoir-faire d'exploitation sont utilisés pouraméliorer la conception de l'usine à grande échelle.
- De grandes quantités de produits peuvent être produites pour évaluation par le client dans les applications d'utilisation finale, ce qui renforce les relations avec les clients, la confiance et la demande pour la production des usines commerciales.

  Le projet pilote peut prendre de 6 mois à 3 ans, selon qu'une installation existe ou doit être construite,de la disponibilité et de la nouveauté de l'équipement requis et de la nécessité de résoudre les problèmes qui surviennent au cours du projet.

Le coût du pilotage est également important, environ 5 à 20 % du coût total du projet.
En conséquence, il peut être tentant de sauter cette étape ou de piloter uniquement certaines opérations d'unités pendant une courte période. L'expérience a prouvé que cela n'était pas judicieux ; les inconvénients l'emportent de loin sur les modestes avantages.
La conception de l'usine de fabrication à grande échelle doit être basée sur les données générées dans l'usine pilote. Il est également important de prendre en compte les perspectives d'améliorations technologiques futures. Mais évitez la tentation de concevoir une usine à grande échelle pour un procédé qui n'a pas été validé à l'échelle pilote. (Noorman et *al*, 2017)

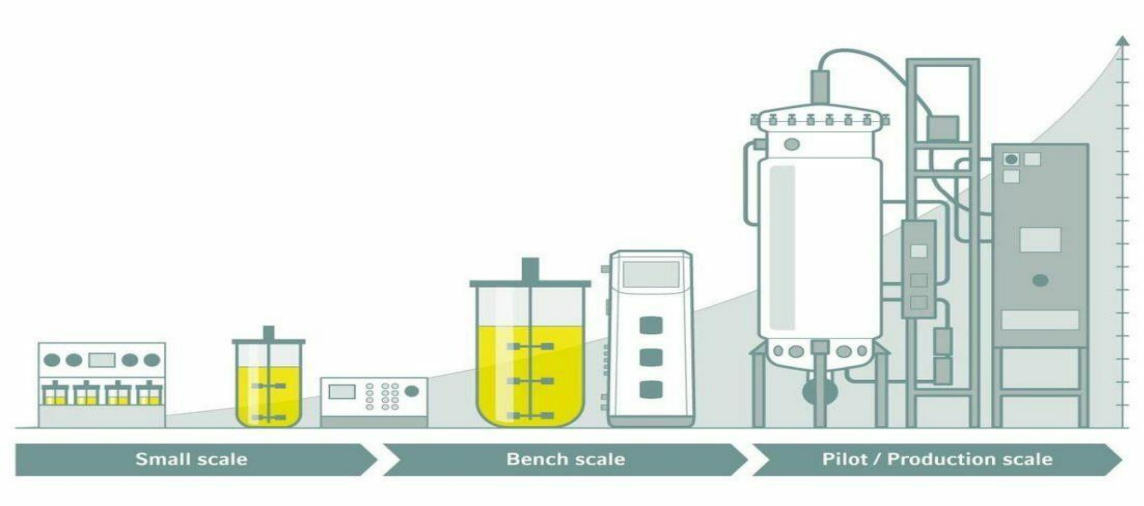


Figure 24. Mise à l'échelle du processus
https://akronbiotech.com/blog/manufacturing-scale-up

7. Les Protéines d'Origine Unicellulaire (P.O.U) ou (SCP)

En raison de l'augmentation rapide de la population mondiale, de nombreux pays en cours de développement sont concernés par des problèmes de malnutrition (famine, insécurité alimentaire, etc.). En particulier, l'insuffisance en sources de protéines devient un problème majeur pour la nutrition humaine et animale et leur demande augmente de plus en plus. Dans ce contexte, les Protéines d'Organismes Unicellulaires (POU) produites par des micro-organismes peuvent exploitées comme une source de protéines alternative et non conventionnelle. (Sharif et *al*, 2021)

- **Définition**

Une protéine d'origine unicellulaire (Single Cell Protein, SCP), est une substance riche en protéines qui est principalement utilisée depuis les années 1970 en tant que protéines et en vitamines contenant des aliments pour animaux. (Ravindra et *al*, 2000).

Les micro-organismes construisent des protéines et des acides aminés dans des cultures de masse dans des bioréacteurs à partir de substances organiques simples et peu coûteuses et sont ensuite "récoltés".

Les micro-organismes utilisés comprennent, par exemple, des levures alimentaires telles que Candidaou Pichia et des bactéries telles que *Methylophilus* et *Methylomonas.* Même les algues sont utilisées. Les protéines d'organismes unicellulaires (POU) sont une source non conventionnelle de protéines. Ces protéines sont obtenues à partir de culture de micro-organismes (levures, champignons filamenteux, bactéries, cyanobactéries) utilisant le plus souvent des substrats qui sont des produits de l'industrie agroalimentaire et des productions agricoles afin de combler le déficit alimentaire (aussi bien humain qu'animal) en protéines au niveau mondial (Taran et *al*, 2012)

- **La raison du besoin mondial des protéines d'origine unicellulaire.**

Les sources de protéines sont essentiellement couvertes par les protéines animales, représenté principalement par la viande de différents types, cependant, à cause de son prix élevé, le régime alimentaire de beaucoup de pays accuse un grave déficit en protéines animales, et la recherche de nouvelles ressources protéiques est l'une des préoccupations de ces pays. Donc la motivation de l'utilisation de P.O.U dans l'alimentation humaine, à principalement comme objective de surmonter la sous-alimentation dans ces pays, et permet donc de satisfaire leurs besoins en protéines. Dans les pays où il n'y a pas de graves problèmes de sous-alimentation, l'utilisation des P.O.U en alimentationhumaine est très limitée, et elle est plutôt destinée à l'alimentation animale (Ravindra et *al*, 2000).

- **Les microorganismes utilisés pour la production des P.O.U.**

Quatre types de micro-organismes sont utilisés : des microalgues, des bactéries, des levures et des champignons filamenteux.

Prenons quelques exemples (Gervasi et *al*, 2018):

- Les levures généralement utilisées comme P.O.U, sont principalement :
- *Saccharomyces cerevisiae*: utilisé surtout comme additif alimentaire.
- *Candida utilis* : le chauffage l'inactive et par la suite, elle est exploitée en tant qu'alimentnutritif, vu sa richesse en protéines et en acides aminés libres, elle possède

une saveur légère de viande.

- La moisissure, *Fusarium venenatum*, possédant un gout qui ressemble à la viande de poulet (Reihani et *al*, 2019) est utilisée pour la production de Quorn, qui est une marque de substitut de viande à base de mycoprotéine,
- Les cyanobactéries peuvent être utilisées comme des compléments alimentaires, c'est le cas par exemple de la spiruline, produit principalement à partir des espèces, *Arthrospira platensis* (Nangulet *al*, 2021) :

- **Étude de la production de protéines d'organismes unicellulaires**
- **Fermentation et purification des P.O.U.**

Après avoir stérilisé le milieu de culture, la production de biomasse est réalisée dans un fermenteur. Les POU sont récupérés, ensuite, par centrifugations multiples, puis sont emmagasiné dans des barils, ou bien sont séchés afin d'obtenir une poudre exempte de toute cellule vivante (Ravindra et al, 2000). Chaque souche est inoculée dans un ballon de 250 ml contenant 100 ml de milieu semi-synthétique. Dans le milieu, le glucose a été substitué par les résidus de tubercules (mélange de résidus de patate douce et d'igname) de manière à obtenir une concentration de 22 mM en sucres totaux. Le tout est incubé à 30 °C pendant 16 h et servira d'inoculum pour la fermentation batch. Le milieu de fermentation est celui préconisé par (Konlani et *al*, 1996) dont la composition par litre est la suivante: di-hydrogéno-phosphate de potassium, 2 g ; di-sodium hydrogénophosphate, 0,75 g ; sulfate d'ammonium, 3 g ; sulfate de magnésium, 0,5 g ; extrait de levure, 3 g ; glucose, 4 g et Tween 80, 1 ml. Les paramètres physiologiques optimaux des souches ont été utilisés : le pH a été fixé à 5, la température à 30 °C et une concentration finale en sucres totaux de 22 mM a été utilisée en tenant compte de la teneur en sucres des résidus (environ 5 %). Ces milieux sont préparés dans des ballons de 1 l à raison de 675 ml par ballon. Un inoculum de 75 ml (10 % v/v) a été introduit dans les ballons et le processus de fermentation est déclenché (Nangul et *al*, 2021)

La fermentation a été effectuée à 150 rpm jusqu'à l'épuisement complet du substrat carboné (Konlaniet *al*, 1996). À la fin de la fermentation, la biomasse a été évaluée par centrifugation de 200 ml de la culture à 10 000 x g pendant 30 min. Le culot est récupéré et lavé à l'eau, puis séché à 105 °C pendant 24 h. Une courbe de référence des DO en fonction du poids sec de la biomasse a été établie. Le glucose résiduel a été déterminé par la méthode colorimétrique utilisant le DNS (Konlani et *al*, 1996). La teneur en protéines de la biomasse a été déterminée par la méthode de Kjeldhal après centrifugation et séchage dans une étuve à 105 °C jusqu'à un poids constant (AOAC, 1990).

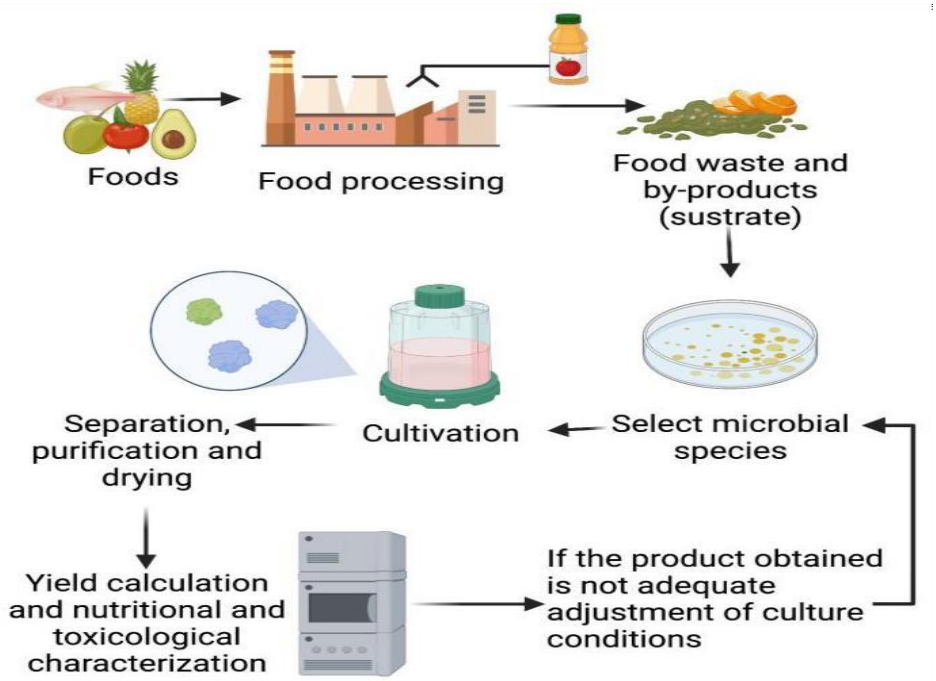


Figure 25. Criblage et optimisation de la production de POU à partir de résidus alimentaires (déchets alimentaires et sous-produits agricoles) (Salazar-López et *al*, 2022)

- **Avantages et inconvénients des POU.**

L'utilisation de microorganisme comme source de protéines d'origine unicellulaire possède certains avantages par rapport aux sources de protéines d'origine animale ou végétale (Salazar-López et *al*, 2022)

- Taux de croissance rapide, par rapport aux animaux d'élevage.
- Teneur élevée en protéines (30- 80% du poids sec) ;
- La possibilité d'utiliser une large gamme de substrats bon marché (peu coûteux), y compris les déchets organiques, pour leur croissance.
- Demande peu d'espace et peu d'eau, par rapport à l'élevage.
- Permets de résoudre un problème environnemental.
- La production des P.O.U est indépendante des variations climatiques.

Quelques inconvénients pouvant accompagner l'utilisation des P.O.U, comme source de protéines (Salazar-López et *al*, 2022)

- Ils peuvent produire des toxines ou autres métabolites nuisibles.
- Le contenu en acides nucléiques des POU limite leur utilisation en alimentation

humaine.

En effet, une grande consommation d'acides nucléiques, élève la concentration en acide urique dans le plasma du sang. Il y a alors un risque de précipitation d'urée dans les tissus et les articulations, ce qui aboutit à des symptômes analogues à la maladie de la goutte.

CHAPITRE V : LES PRODUITS DE FERMENTATIONS INDUSTRIELLES

Introduction

Durant le cycle de croissance bactérienne, de nombreux métabolites de diverses natures sont produits, en fonction de différentes phases de croissance, pour servir à la biosynthèse du matériel cellulaire ou en réponse aux fluctuations des conditions du milieu. Ces métabolites sont généralement répartis en métabolites primaires et métabolites secondaire (Benzaid et *al*, 2019).

- Les métabolites primaires sont produits pendant la phase de croissance des bactéries (trophophase), quand l'ensemble des voies cataboliques et anabolique sont catalysée par des enzymes spécifiques et soumis à divers contrôles. Ces voies fournissent à la cellule les métabolites intermédiaires, ainsi que l'énergie nécessaire à la biosynthèse des macromolécules essentielles telles que les protéines, les lipides, les polysaccharides ou les acides nucléiques. Les métabolites primaires sont pratiquement identiques pour tous les organismes vivants (animaux, végétaux, microorganismes) (Choulet et *al*, 2006)).

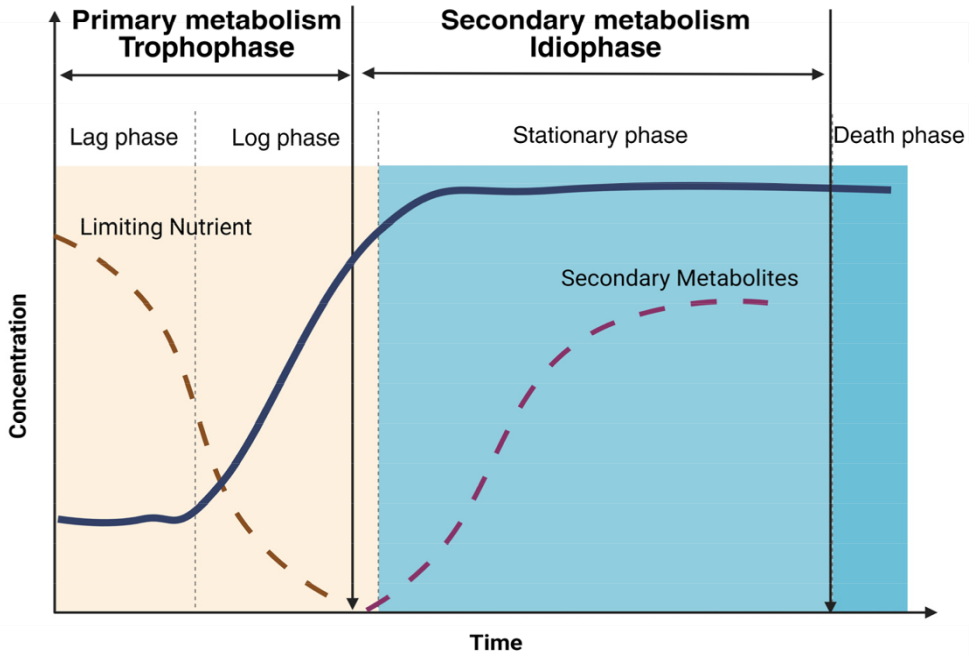
- 

Figure 26. Schéma du métabolisme primaire et secondaire des champignons montrant quand se produit la production de métabolites secondaires, adapté de (Oliveira et *al* ;2024). La ligne bleue continue représente la courbe de croissance d'un micro-organisme hypothétique. La ligne pointillée brune représente la concentration en nutriments. Et la ligne pointillée violette représente la concentration de métabolites

secondaires, qui se produit pendant la phase de croissance stationnaire du micro-organisme.

- Les métabolites secondaires sont les métabolites produits après la fin de la phase de croissance des bactéries (idiophase), le métabolisme secondaire n'est pas indispensable à l'organisme producteur, bien qu'il joue vraisemblablement un rôle pour sa différentiation et sa survie dans le milieu naturel (Colombié, 2005). Ces métabolites possèdent en général des structures chimiques diverses formant souvent des familles de composés, Les métabolites secondaires possèdent une plus grande variété de voies que les métabolites primaires et ils possèdent une bioactivité (Strub,2008). Les antibiotiques constituent le groupe le plus important des métabolites secondaires synthétisés par les microorganismes notamment les actinomycètes (Hoshino et *al,* 2015b).

Tableau 7. Principales différences entre les métabolites primaires et secondaires

Métabolite primaire	**Métabolite secondaire**
Synthétisé pendant la trophophase (phase de croissance cellulaire) et présence tout au long du cycle cellulaire	Synthétisé lors de l'idiophase (phase de ralentissement et stationnaire), apparition À un moment du cycle
Nécessaire à la croissance	Inutile pour la croissance
Rô le physiologique connu	Role physiologique mal connu
<Tum-over» élevé	Tum-over >> pratiquement nul
Produit dans des conditions de culture diverses	Produit dans des conditions de culture bien définies
Ubiquitaire	Spécifique
Enzymes á spécificité étroite	Enzymes à spécificité large
Voies de synthèse simples et courtes	Synthèse longue et complexe
Synthèse d'un produit parfaitement défini	Synthèse d'un mélange de produits
Structure chimique généralement simple	Structure chimique souvent complexe
Concentration élevée	Concentration faible

5.1. LES METABOLITES PRIMAIRES OBTENUS PAR FERMENTATION MICROBIENNE

Les acides aminés

Les acides aminés font référence à des composés dont les molécules contiennent un groupe amine (-NH2) et un groupe carboxyle (-COOH). (Demain et *al*, 2008).

Les acides aminés utilisés dans les produits à base d'acides aminés sont principalement fabriqués en fermentant des ingrédients d'origine végétale de la même manière que le miso et la sauce soja.

Plusieurs acides aminés sont utilisés comme ingrédients dans les produits pharmaceutiques et cosmétiques, et dans l'industrie chimique pour la fabrication de polymères, le cas par exemple de l'acide glutamique, lysine, et tryptophane (Demain et *al*, 2008).

Dans la fermentation les acides aminés sont fabriqués en fermentant des ingrédients avec des micro-organismes (comme des bactéries probiotiques). Ces micro-organismes transforment les ingrédients en aliments et autres substances nécessaires aux micro-organismes. Dans la fermentation, des ingrédients tels que la mélasse sont ajoutés à un milieu qui cultive des micro-organismes. Cela aide les micro-organismes à se multiplier et à fabriquer des acides aminés. Les micro-organismes contiennent des enzymes qui accélèrent les réactions pour décomposer et synthétiser de nouvelles substances. Le processus de fermentation est une série de réactions impliquant environ 10 à 30 types d'enzymes. (Leveau, 1999)

1-Etapes de fabrication des acides aminés

Pour fabriquer des acides aminés à l'aide de micro-organismes, il faut d'abord trouver des micro-organismes qui ont un fort potentiel de fabrication d'acides aminés.

Un gramme de sol naturel contient environ 100 millions de micro-organismes.

À partir de là, nous devons ensuite trouver les micro-organismes les plus efficaces.

Lorsque le bon micro-organisme est trouvé, de meilleures souches doivent être développées pour obtenir les micro-organismes ayant le meilleur potentiel. La quantité d'acides aminés produitedépend de la quantité et de la qualité des enzymes.

Plus d'acides aminés peuvent être produits si les enzymes nécessaires à la fabrication des bons acidesaminés sont conservées dans des conditions idéales. Cependant, on peut faire moins si ces conditionsne sont pas réunies. Disons qu'un micro-organisme a une voie métabolique

De A → (a) → B → (b) → C → (c) → D, où (a), (b) et (c) sont des enzymes. Afin de produire de grandes quantités d'acide aminé C, les enzymes (a) et (b) doivent être plus actives et l'enzyme (c) ne doit pasêtre active. Cela peut être fait en développant des souches améliorées grâce à diverses techniques.

Pour fabriquer des acides aminés, les cuves de fermentation sont remplies de mélasse et d'ingrédientsde sucre tels que la canne à sucre, le maïs et le manioc. Les conditions idéales sont atteintes pour l'agitation, l'apport d'oxygène, la température et les niveaux de pH. Les acides aminés souhaités sontensuite purifiés à partir de ce bouillon fermenté. (Leveaux, 1999)

- **Les différentes méthodes de fabrication des acides aminés**

En plus de la fermentation, il existe d'autres moyens de fabriquer des acides aminés, comme parréaction enzymatique, extraction et synthèse. (Demain et *al*, 2008)

Dans le processus de réaction enzymatique, un ou deux types d'enzymes sont utilisés pour transformer un précurseur d'acide aminé en acide aminé approprié. Dans cette méthode, il n'est pasnécessaire de multiplier les micro-organismes en convertissant l'acide aminé spécifique, et il n'y a pasde long processus à partir du glucose. Le processus de réaction enzymatique est idéal si la substanceprécurseur a un faible coût.

Les acides aminés peuvent être produits en décomposant les protéines, ce que l'on appelle la méthode d'extraction. Cependant, la quantité d'acides aminés dans la protéine source limite la quantité d'acides aminés fabriqués. L'extraction n'est pas bonne pour fabriquer des quantités massiques d'acides aminés spécifiques.

La synthèse utilise des réactions chimiques pour fabriquer des acides aminés et a été largement utilisée dans le développement précoce des moyens de fabriquer des acides aminés. Cette méthode plus coûteuse nécessite donc des étapes de traitement et des équipements supplémentaires et a donc été progressivement abandonnée de la production. Cependant, toujoursutilisée pour fabriquer de la glycine.

2. Production d'acides aminés par génie fermentaire, cas pratique de la lysine

2.1. Généralités

Les acides aminés font partie de la catégorie dite des métabolites primaires.Leur production répond à 3 types d'utilisation :

- Agents de saveur en alimentation humaine : ainsi le glutamate agent de saveur de type "goûtde bouillon"

- Agents édulcorant (pouvoir "de goût sucré") en nutrition humaine : ainsi l'aspartam est unédulcorant fabriqué par condensation à partir d'asparagine et de phénylalanine
- Agents de complémentation en nutrition humaine et animale : pour le cas des acides aminés essentiels. On rappelle que les acides aminés essentiels aux porcs, volailles, lapins et humains comme la méthionine et la lysine sont généralement (à l'exception notable du soja) insuffisants chez les végétaux. (Krömer et *al*, 2004)

2.2. Exemple de la production de lysine, obtention de mutants hyper producteurs

La lysine est l'un des 4 acides aminés essentiels majeurs de l'alimentation humaine et animale. Les souches productrices appartiennent au genre *Brevibacterium* et *Corynebacterium*. Les souches utilisées sont des mutants sophistiqués. (Wittmann et *al*, 2007)

L'étude de la voie biologique de biosynthèse de la lysine et de sa régulation va permettre de comprendre comment on a pu obtenir des souches mutantes hyper productrices de lysine et sécrétoires (une qualité a priori peu compatible avec la bonne économie physiologique des cellules): on a abouti à des mutants avec une voie de biosynthèse mal régulée : "rétro inhibition perdue" et/ou absence de répression anabolique.

Les mutants hyper producteurs sont :

- Mutation de l'aspartokinase rendant l'enzyme insensible à la rétro inhibition concertée par la lysine et la thréonine. Ainsi la voie ne sera pas bloquée malgré la production physiologiquement inutile de lysine.
- L'excrétion d'acides aminés a été observée par hasard, pour la première fois, chez *Corynebacterium glutamicum* (excrétion d'acide glutamique). Cette aptitude à l'excrétion est caractéristique de ce genre et des genres voisins. D'ailleurs, des mutants dérégulés obtenus chez d'autres genres se sont souvent montrés mauvais excréteurs et donc très mauvais candidats pour une production industrielle !
- Mutation de déficience en homosérine déshydrogénase. Ainsi tout l'aspartate-semi aldéhyde sera détourné vers la production de lysine. Évidemment il faudra fournir les acides aminés ; thréonine et méthionine devenus facteurs de croissance.
- Mutation de déficience de la voie "détournant" le phosphoénol pyruvate vers la biosynthèse de la leucine. Le plus possible de "carbone phosphoénol pyruvate" est dirigé vers la synthèse de lysine (voir schéma ci-dessus).

D'autres mutations pour des auxotrophies se sont montrées favorables à la production de lysine sans que les voies de biosynthèse en cause ne semblent avoir de rapport avec la production de lysine : adénine-, uracile-, tryptophane-

Les milieux des cultures industriels sont généralement à base de mélasses, d'ammonium, plus les sels minéraux. Ils sont enrichis en biotine et thiamine.

La teneur des métabolites essentiels qui comblent les auxotrophies est très strictement optimisée notamment la teneur en méthionine et thréonine. Les milieux industriels sont des "secrets de fabrication".

4.3. Exemple de la production de lysine, une étude à l'échelle du laboratoire

Ce qui suit est tiré de de Q. Hua, C. Yang, K. Shimuzu, Metabolic control analysis for lysine synthesis using Corynebacterium glutamicum and experimental verification, Journal of Biotechnology and Bioengineering (2000) vol. 90 N° 2, 184-192.

- La souche utilisée : *C. glutamicum ATCC21253-pJC33, souche dérégulée productrice de lysine : auxotrophe pour la thréonine et la méthionine (homosérine deshydrogénase déficiente) et aussi la leucine et superproductrice d'aspartokinase (grâce à un gène porté par le vecteur pJC33). Comme expliqué au paragraphe 2 ci-dessus.*
- Le milieu de culture (pour 1 L) :

(A) 75 g glucose, 1 g citric acid, 0.6 g $MgSO_4,7H_2O$, 50 mg $FeSO_4,7H_2O$, 2 g NaCl, 1 g $CaCl_2$ and 20 ml concentré de sels minéraux, ajustement du pH 4.0 with HCl;

(B) 4 g K_2HPO_4, 2 g KH_2PO_4, 733 mg threonine, 1.5 g leucine, 600 mg methionine, 1 mg biotin, 2 mg thiamine, HCl and 40 g $(NH_4)2SO_4$.la composition des sels : 200 mg/L $FeCl_3,6H_2O$, 200 mg/L $MnSO_4$, 50mgl ; $ZnSO_4,7H_2O$, 20 mg/L ; $CuCl_2,2H_2O$, 20 mg/L ; $Na_2B_4O_7,10H_2O$ and 10 mg/L $(NH_4)_6Mo_7O_{24},4H_2O$, ajustement du pH : 1.5 et HCl.

- Le procédé "batch" très classique. "

Avec le milieu proposé, le glucose est source de carbone ; Il apparaît clairement que le rendement de conversion du glucose en lysine est le plus médiocre pendant la phase de croissance active (<0,09 g de lysine par g de glucose). C'est assez évident : en phase de croissance, il y a bien sûr les besoins (faibles) pour la maintenance des bactéries mais surtout beaucoup de glucose est utilisé comme source d'énergie pour fabriquer de la biomasse. Ce glucose-là n'est pas dirigé vers la biosynthèse de lysine. Quand la croissance est quasi arrêtée ou arrêtée, la dérégulation de la voie fait que le glucose n'est plus consommé que pour les besoins (faibles) de maintenance des bactéries et pour les besoins de la voie dérégulée de biosynthèse de

la lysine. Le rendement de conversion est donc à son maximum dans les conditions proposées. On peut calculer la productivité horaire volumique globale du réacteur pendant son temps de fonction : 14 g/L en lysine en 35h soit PVH = 0,4 g-1h-1. Le rendement global de conversion du glucose en lysine sur les 35h de production est de 14/85 = 0,16 g de lysine par g de glucose.

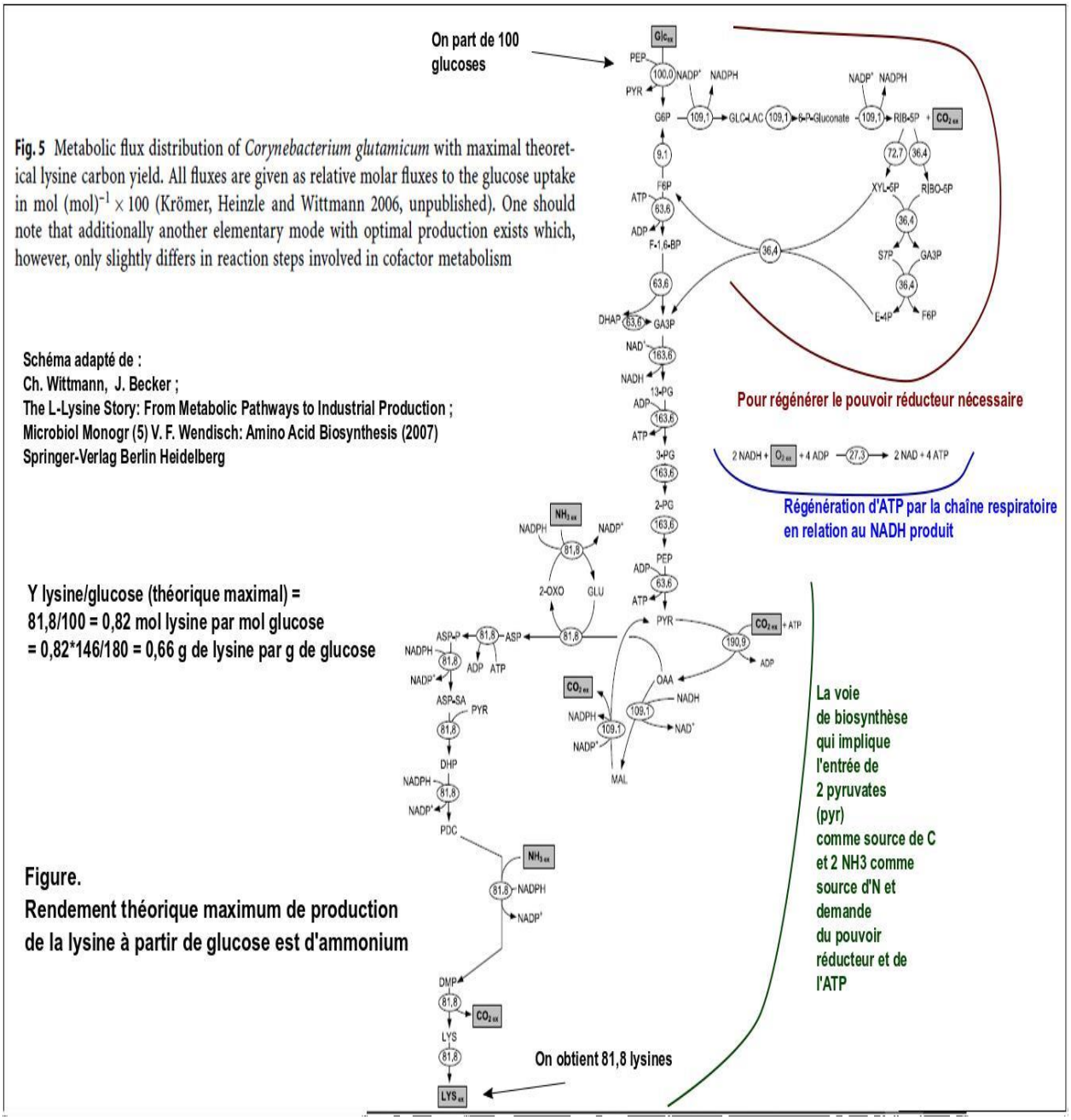


Figure 27. Rendement théorique de production de la lysine à partir de glucose et d'ammonium (Demain et *al*, 2008)

Les acides organiques

Introduction

Les acides organiques sont des molécules organiques ayant des groupements acides (COOH) dansleur squelette carboné. (Dutta et *al*, 2019)

La plupart des acides organiques ont une application agroalimentaire, et servent surtout comme agents de conservation, aromatisant, acidulant et antioxydant. (Béhera et *al*, 2021)

Parmi les principaux acides organiques utiles à l'homme on trouve : l'acide citrique, l'acide acétique l'acide lactique et l'acide propionique (Sauer et *al,* 2008).

Pour ce cours l'exemple de la production industrielle de l'acide citrique a été retenu, ce choix est justifié par le fait qu'il soit l'acide organique le plus utilisé. Il faut dire qu'il joue un rôle primordial dans notre vie au quotidien depuis son isolement, à partir du citron, par Scheele en 1784. (Sauer et *al,* 2008).

On le retrouve dans un panel de produits aussi utiles que variés les uns que les autres. Nous devons cet intérêt à ses propriétés qui font de lui un acide unique en son genre, et c'est pour cela qu'il occupe actuellement la première place dans le marché mondial des acides organiques.

La principale source industrielle de cet acide est la fermentation. En fait, 99% de la production mondiale se fait par voie microbiologique, le reste est extrait des agrumes. Depuis la découverte de la production de l'acide citrique par voie microbiologique, un grand nombre de micro-organismes ont été utilisés aussi bien à l'échelle laboratoire qu'industrielle.

Les plus importants sont les bactéries et les champignons filamenteux ; Le plus étudié des champignons est *Aspergillus niger*, cultivé sur un milieu à base de glucose, saccharose ou mélasse. En fait, il s'agit principalement de mutants *d'Aspergillus niger* améliorées génétiquement qui sont employées dans l'industrie pour leur facilité de culture, leur constance génétique, leurs rendements élevés et leur absence de métabolites indésirables. Cette amélioration se fait par mutation ou par hybridation. (Ciriminna et *al,* 2017)

1- L'acide citrique :

Le citrate ou acide citrique est une molécule biologique de formule $C_6H_8O_7$ est très diffus dans la nature. Il est incolore, inodore, d'une saveur excessivement aigre. Il intervient dans le métabolisme de nombreux animaux et plantes. (Béhera et *al*,2021)

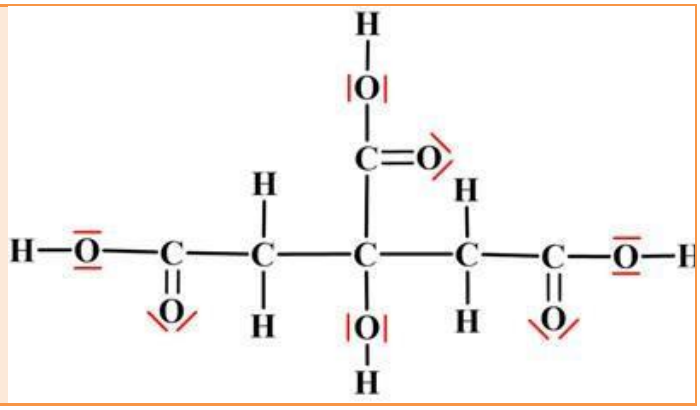
Acide citrique $C_6H_8O_7$	

Figure 28. Formule semi développée de l'acide citrique (Jean-Claude, 1996).

2- Principe de production d'acide citrique :

Le résidu acétate à deux carbones de l'acétyl CoA se condense d'abord avec l'acide oxaloacétiqueà quatre carbones pour former l'acide citrique à six carbones.

Le cycle de l'acide citrique =

- Le cycle de KREBS
- Cycle de l'acide tricarboxylique

3- Production d'acide citrique

En termes de tonne l'acide citrique est le plus important produit commercial à partir des champignons. La production mondiale dépasse 90.000 tonnes/an à partir du champignon *Aspergillus niger.*

Fermentation solide (fermentation Koji) :

Ce procédé qui est relativement simple consiste à cultiver une souche de *A.niger* sur des résidus d'amylacés fibreux (exp résidu de la pomme de terre).

- La température dans la masse ne doit pas dépasser 28^0C.
- Le pH chute à 1.8-2.0 lors de l'accumulation d'acide citrique.
- Après 5 à 8 jours la masse fermentée est extraire à l'eau dans des percolateurs.
- La purification de l'acide citrique selon des procédés classiques.

4- Choix de substrat

Le choix du substrat doit répondre aux certains critères pour avoir un bon rendement pour une moindre dépense :

1. Présence de substrat riche en sucre fermentescible (amylacée)
2. Une faible teneur en trace toxique pour le microorganisme.
3. Substrat doit être moins cher.
4. Facilité de traitement et de manipulation.

5- Choix de microorganismes :

Aspergillus niger représente le microorganisme de choix à l'échelle industrielle pour :

- Son insensibilité aux traces métalliques ;
- Sa facilité de culture
- Sa stabilité génétique
- Ses rendements élevés
- Sa capacité d'utilisation de matériel à bon marché et l'absence de métabolites
- Indésirables. (Angumeenal et *al*, 2013)

6- Utilisations de l'Acide citrique :

Industrie alimentaire

- Il est utilisé comme additif (boisson, confiture, etc.…). Dans les boissons, il est utilisé en général comme rafraichissante ou effervescente

- Dans la fabrication des bonbons, dans la conservation des fruits, de poisson, des glaces, des friandises en général, les sauces, les jus et sirops de fruit

-Il peut être utilisé comme agent nettoyant de l'acier inoxydable en raison de son pouvoir séquestrant.

Industrie pharmaceutique

- L'acide citrique favorise indirectement la croissance des os en facilitant l'assimilation du calciumet en régulant la taille des cristaux de calcium dans les os.

-il est utilisé comme composant de solutions d'irrigation vésicale.

-L'acide citrique et ses sels empêchent une coagulation sanguine du sang conservé

7- **Synthèse de l'acide Citrique**

La synthèse de l'acide citrique peut être divisée en trois grandes étapes du point de vuebiochimique et métabolique (figure 26). (Béhera et *al*, 2021)

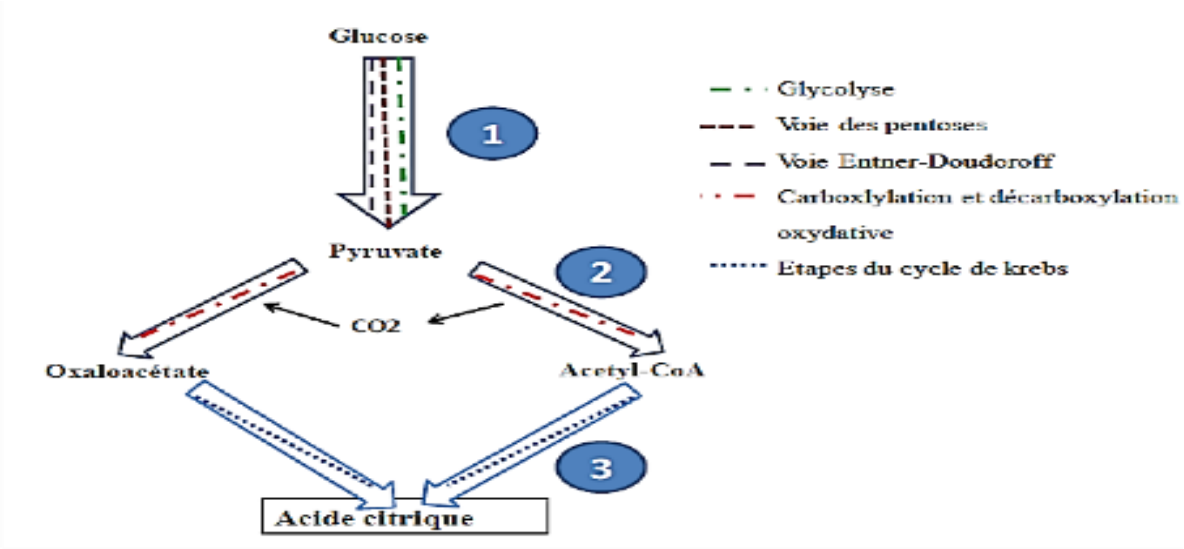


Figure29. Voie de synthèse de l'acide citrique(Béhera et *al*, 2021)

7-1 Dégradation des sucres

Trois voies principales de dégradation des sucres sont possibles pour obtenir l'acide pyruvique : la glycolyse, la voie de pentoses et la voie d'Entner-Doudoroff. La glycolyse encore appelée voie d'Emben-Meyeroff-Parnas permet la dégradation du glucose avec production d'adénosine triphosphate ATP et de pyruvate.

Ce dernier sera utilisé dans la chaine de synthèse de l'acide citrique. Glucose passe par la voie de pentoses. Ce métabolisme tient au fait que le mécanisme permet d'obtenir des précurseurs pour la synthèse d'acides aminés aromatiques et de vitamines.

La voie d'Entner-Doudoroff permet d'obtenir l'acide gluconique, un des principaux métabolites annexes produits lors de la fermentation.

7-2 Chainière centrale

La chainière centrale est le siège de la décarboxylation/oxydation du pyruvate et de sa carboxylation. A partir d'une molécule de glucose sont formées deux molécules de pyruvate. Le premier est décarboxylée afin de produire de l'acétyl-CoA et la seconde est carbonylée en d'oxaloacétate. Ainsi l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate interviennent dans le cycle de Krebs.

7-3 Cycle de Krebs

Aussi appelé cycle du citrate ou cycle de l'acide citrique, le cycle de Krebs comporte huit réactions décrites par Hangs Krebs en 1940, montrant qu'il s'agit d'un cycle se déroulant dans le cytosol. Il est constitué de deux grandes étapes enzymatiques à savoir la réaction d'oxydation de l'acétyl-CoA et la réaction de régénération de l'oxaloacétate. (Degu et al, 2011).

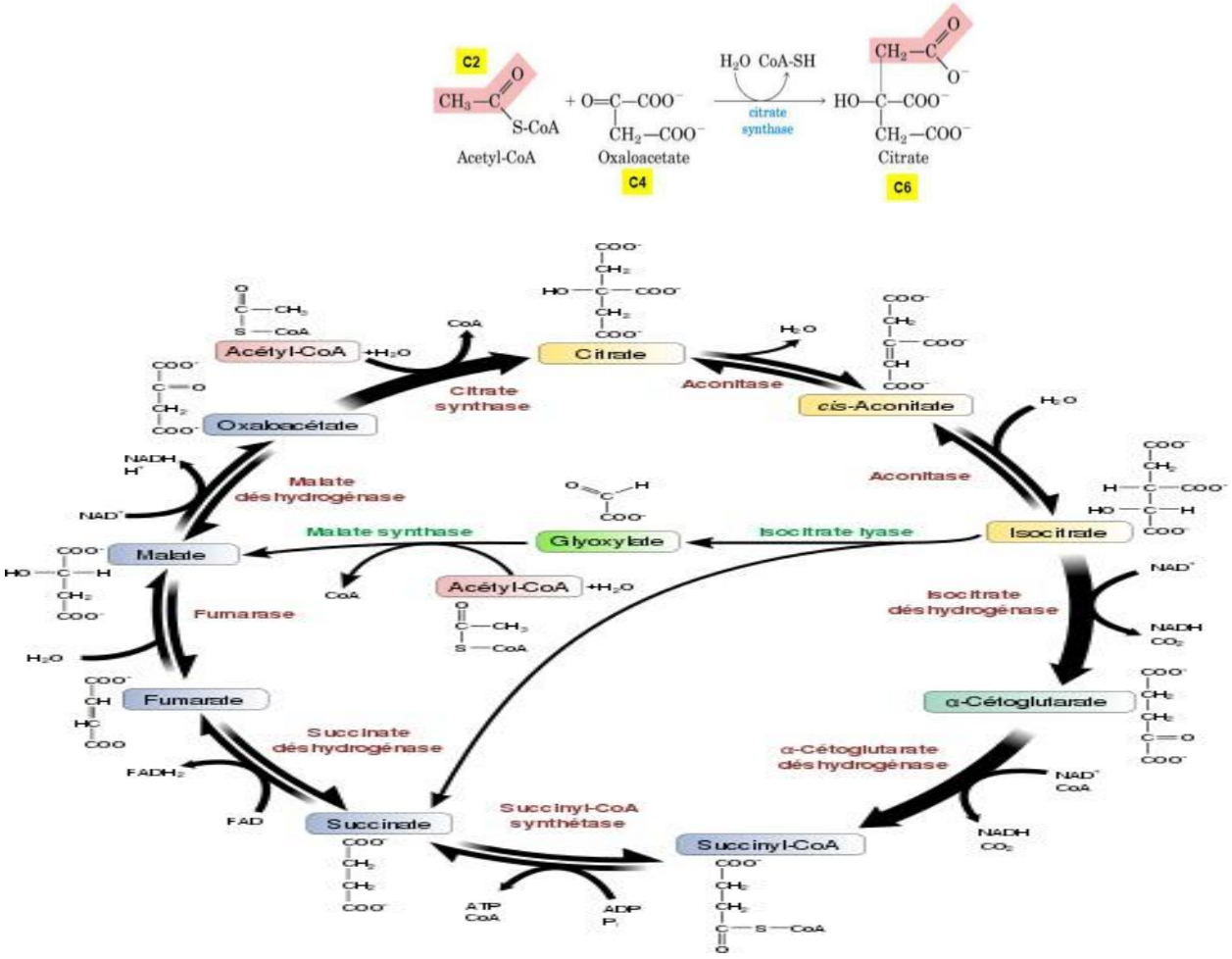


Figure 30. Cycle du Krebs (Degu et *al*, 2011).

8- Microorganisme producteur d'acide citrique

Dans l'histoire de la fermentation de l'acide citrique, un grand nombre de microorganismes (bactéries, champignons et levures) ont été rapportées. Ce sont : *Penicillium luteum, Penicillium purpurogenum, Penicillium restrictum, Penicillium janthinellum, Penicillium citrinum, Mucor piriformis, Trichoderma viride et Sacharomycopsis lipolytica* .

Beaucoup de levure de Saccharomyces et de moisissures peuvent produire d'Acide citrique, la quasi-totalité à une sensibilité aux ions métalliques et un rendement très faible.

Avec les progrès de la biotechnologie, de nouvelles souches génétiquement modifiées et l'amélioration de souches existantes par mutagenèse et par sélection de souches sont utilisées pour des productions industrielles. Cependant, l'utilisation effective de ces nouvelles souches présente des insuffisances. Il existe plusieurs contraintes dans la production de l'acide citrique. Le Tableau 7 présente quelques microorganismes producteurs d'acide citrique.

Tableau 8. Quelques microorganismes producteurs d'acide citrique

(Béhera et *al*, 2021)

Microorganismes	**Références**
Champignons	
Aspergillus niger	Show *et al.*, 2015; Kareem *et al.*, 2010; Bezalwar *et al.*, 2013
A. acuelatus	Morgant, 1988
A. awamori	Grewal et Kalra, 1995
A. carbonarius	Kristiansen *et al.*, 2002
A. wenti	Karow et Waksman, 1947
A. foetidus	Tran *et al.*, 1998
Penicillium janthinelum	Grewal et kalra, 1995
Levures	
Saccharomicopsis lipolytica	Kristiansen *et al.*, 2002; Crolla et Kennedy, 2004
Candida tropicalis	Max *et al.*, 2010
C. oleophila	Max *et al.*, 2010
C. guilliermondii	West, 2013
C. parapsilosis	Max *et al.*, 2010; West, 2013
C. citroformans	Kavanagh, 2017
Hansenula anamola	Grewal et Kalra, 1995
Bactéries	
Bacillus licheniformis	Kristiansen *et al.*, 2002
Arthrobacter paraffinens	Angumeenal et Venkappayya, 2013; Anastassiadis *et al.*, 2008)
Corynebacterium sp.	Porto de Souza, 2000

9- Bioproduction de l'acide citrique

La bioproduction de l'acide citrique peut être décrite en trois grandes étapes :

- La préparation de l'inoculum,
- La fermentation
- Et l'extraction

Deux types de fermentation sont les plus utilisées, à savoir la fermentation submergée ou fermentation en milieu liquide (FML) et la fermentation en milieu solide (FMS). Chacune des deux techniques présentes des avantages et des inconvénients ; cependant la fermentation la plus utiliséeest la fermentation en milieu liquide (FML).

9- 1 Fermentation en milieu liquide (FML)

Actuellement, 99% de l'acide citrique total produit dans le monde est obtenu par fermentation On estime qu'environ 80% de cette production est obtenue par la FML.

En effet, cette technique permet de réduire de 2,5 à 25% les coûts d'investissement total et de la main- d'œuvre. Elle a plusieurs avantages, comme une productivité et un rendement élevé, ainsi qu'un risque moindre de contamination. En général, elle est réalisée entre 5 et 12 jours.

Cependant, les inconvénients sont les coûts énergétiques plus élevés et la commande plus sophistiquée qui exige un personnel plus fortement qualifié. Trois facteurs importants interviennent dans la maîtrise de cette technique de production, qui sont :

- La qualité de l'acier inoxydable pour la construction du bioréacteur, la structure de mycélium
- Le transfert de l'oxygène dans le réacteur

- **9-2 Fermentation en milieu solide (FMS**)

La fermentation en milieu solide (FMS) est généralement définie comme la croissance de microorganismes sur des substrats humides en absence d'eau libre. La production d'acide citrique par FMS (la méthode la plus simple est le procédé Koji) a été développée au Japon. Cette fermentationpeut être effectuée en utilisant différentes matières premières.

Au cours des dernières années, la technique a fait l'objet d'un grand intérêt, car elle offre de nombreux avantages pour la production de l'acide citrique et des enzymes. En effet, les procédés de fermentation à l'état solide ont de faibles besoins énergétiques, produisent beaucoup moins d'effluents et donc engendrent moins de préoccupations environnementales.

La capacité d'utiliser les résidus agro-industriels comme substrats pour la bio production de l'acide citrique contribue ainsi à leurs éliminations. En outre, la biotransformation des déchets agricoles tels que : la peau de banane. (Anwar et *al*, 2014)

10. Le milieu de culture industriel utilisé pour la production de l'acide citrique.

Le processus de la fermentation industrielle de l'acide citrique, implique la culture de la moisissure,

A. niger, en condition aérobie, dans un milieu de culture qui doit contenir :

- Une source de carbone.

La source de carbone pourrait être l'amidon, l'hydrolysat d'amidon, le jus de la canne à sucre, le glucose, le saccharose ou la mélasse. En industrie, la source de carbone la plus utilisée c'est la mélasse. Afin d'avoir un de bon rendement de production en acide citrique, la concentration de sucre dans le milieu de culture doit être d'au moins 140 g / L (14%) (Ikram et *al,* 2004).

- Une source d'azote.

Sont généralement des sels d'ammonium, surtout, le sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium...etc, qui sont généralement fournis à des concentrations de 0,1 à 0,4 g / L (Anwar et *al,*2014).

- Les sels minéraux.

Les sels minéraux, surtout Fe^{+2}, doivent être débarrassés du milieu de culture, car ce dernier exerceune inhibition de la formation d'acide citrique au-delà d'une concentration critique. L'élimination dessels minéraux est réalisée par la chromatographie échangeuses d'ions (Choudhary et *al,* 1966).

- Le pH

Afin d'initier la croissance *d'Aspergillus niger*, le pH initial de milieu de culture est généralement compris entre 5 et 7. Ensuite, il doit être maintenu en dessous de 2, ceci à l'avantage de contrôler la contamination et d'inhiber la formation d'acide oxalique et d'acide gluconique (des produits indésirables) (Anwar et *al*, 2014).



Figure 31. Photos d'une usine de la fabrication de l'acide citrique par la fermentation en surface (Kiliç et al, 2002).

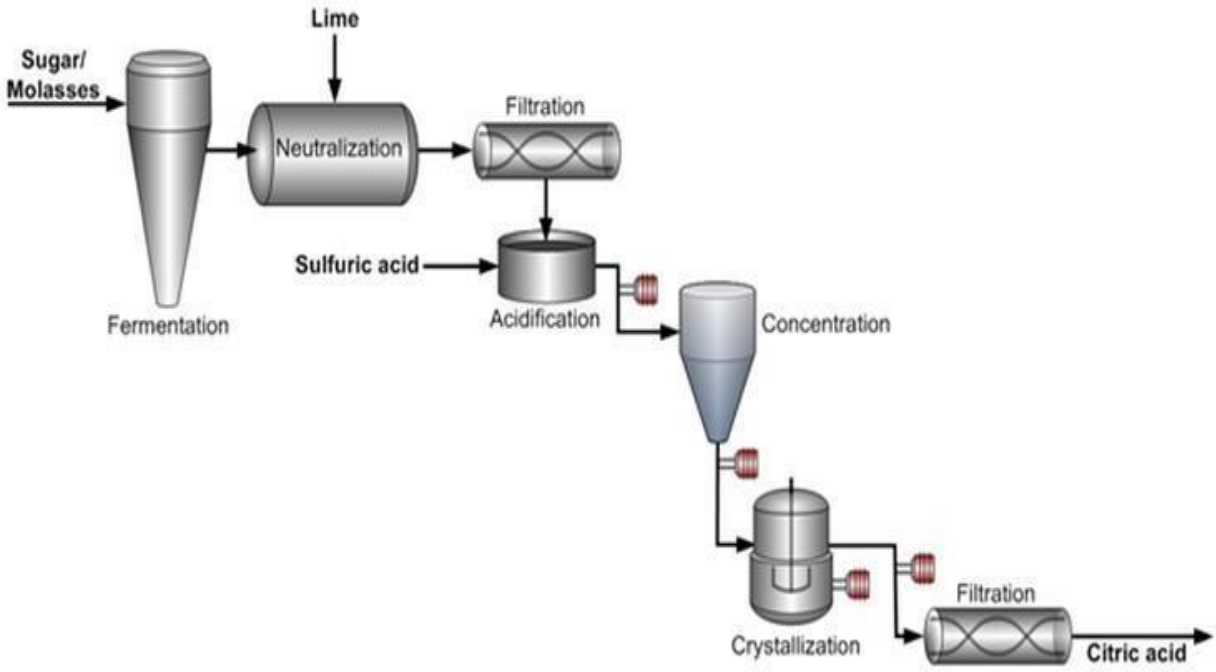


Figure 32. Les étapes de la fabrication de l'acide citrique(Sidaoui, 2022)

Production du biogaz

Introduction.

Le biogaz est un gaz issu le plus souvent de la fermentation d'éléments organiques sous l'action de micro-organismes. Ce processus de fermentation, qui se produit spontanément dans les écosystèmes naturels (marais, rizières, sols, intestins de mammifères, etc.), est appelé méthanisation. Il est aujourd'hui maîtrisé par l'homme et permet de valoriser nos déchets tout en remplaçant certaines sources d'énergie fossiles. À la clé : une réduction de nos émissions de gaz à effet de serre. (Schulz et *al*, 2006)

En Europe, le biogaz représente en 2016 près de 8 % de la production d'énergies renouvelables et l'équivalent de 4 % de la consommation de gaz naturel. L'Allemagne est le principal producteur (la moitié de la production européenne), puis viennent le Royaume-Uni et l'Italie. À eux trois, ces pays couvrent 80 % du total européen. (Madigan et *al*, 2020)

1- Définition

Comme son nom le suggère, le biogaz est produit selon un processus biologique. En l'absence d'oxygène « anaérobie », la matière organique se décompose pour former un mélange gazeux appelébiogaz. Ce processus est très répandu dans la nature, dans les landes, par exemple, ou au fond des lacs, dans les fosses à purin et dans la panse des ruminants. La matière organique est presque entièrement convertie en biogaz par différents types de microorganismes. Le processus produit également de l'énergie (chaleur) et une nouvelle biomasse. Le mélange de gaz obtenu comprend essentiellement du méthane (50 à 75 % en volume) et du gaz carbonique (25 à 50 % en volume). Le biogaz contient également de petites quantités d'hydrogène, de sulfure d'hydrogène, d'ammoniac et des traces d'autres gaz. Sa composition est essentiellement déterminée par les substrats, le processus de fermentation (digestion) et les divers modèles techniques des centrales... (Schulz et *al*, 2006)

2- Aspect biochimique et microbiologique de la méthanisation.

La méthanisation est le fruit d'un extraordinaire travail collectif et successif de nombreuses populations de microorganismes. En effet, c'est une succession de réactions chimiques catalysées par des enzymes produits par différents organismes vivants. La digestion anaérobie (méthanisation), peut-être décrite en quatre phases de dégradation (Figure 33): l'hydrolyse, l'acidogène, l'acétogénèse et la méthanogenèse. Chaque phase fait intervenir un groupe de microorganisme particulier (Tian et *al*, 2017).

Les différentes étapes de décomposition (dégradation) :

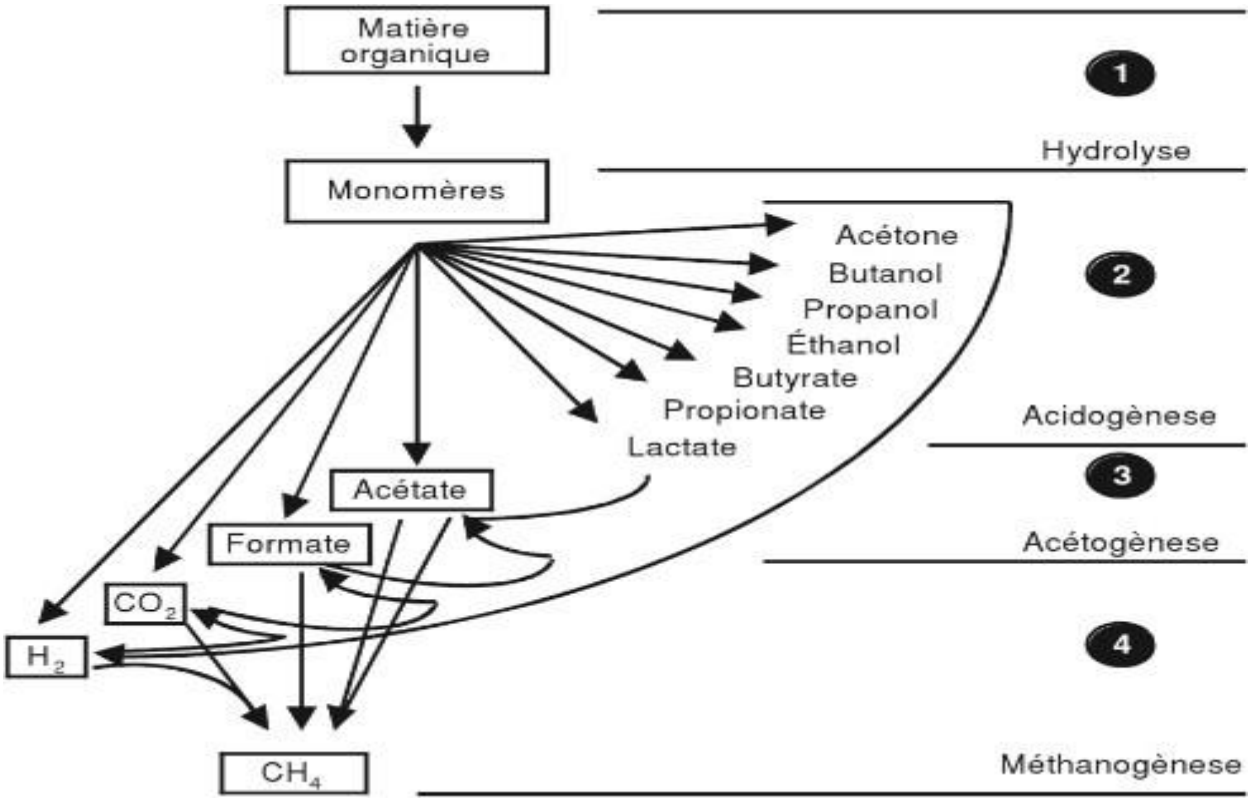


Figure 33. Les 4 étapes de la méthanisation. (Christy et *al*, 2014).

- La première étape, l'hydrolyse, les composés complexes de la matière première (Hydrates de carbone, protéines et lipides, par exemple) sont décomposés en composés organiques plus simples : monomères (par ex. acides aminés, sucres et acides gras). Les bactéries hydrolytiques intervenant à ce stade libèrent des enzymes qui décomposent la matière par des moyens biochimiques.

Les bactéries impliquées dans cette étape ont un métabolisme du type anaérobie strict ou facultatif comme : *Clostridium, Bacillus, Bacteroides, Butyrivibrio, Ruminococcus, Pseudomonas* etc. (Schulz et *al*, 2006)

- Les produits intermédiaires formés par ce processus sont ensuite décomposés pendant l'acidogènese (phase d'acidification) par des bactéries fermentatives (génératrices d'acides) pour former des acides gras inférieurs (acide acétique, propionique et butyrique), ainsi que du gaz carbonique et de l'hydrogène. De plus, de petites quantités d'acide lactique et d'alcools sont également formées. La nature des produits formés à ce stade dépend de la concentration de l'hydrogène intermédiaire.

Plusieurs genres bactériens interviennent lors de cette étape : *Bacteroides, Bacillus, Pelobacter, Acetobacterium, Enterobacteriaceae* (Christy et *al*, 2014).

- Pendant l'acétogénèse (formation d'acide lactique), des bactéries acétogènes convertissent ensuite ces produits en précurseurs du biogaz (acide acétique, hydrogène et dioxyde de carbone). La pression partielle de l'hydrogène est particulièrement importante à cet égard. Une teneur excessivement forte en hydrogène empêche la conversion des produits intermédiaires de l'acidogénèse pour des raisons liées à l'énergie. En conséquence, des acides organiques tels que l'acide propionique, l'acide isovalérique et l'acide hexanoïque s'accumulent et empêchent la formation de méthane. C'est pour cette raison que les bactéries acétogènes (bactéries productrices d'hydrogène) doivent coexister dans une étroite communauté biotique (biocénose) avec les archées méthanogènes qui consomment de l'hydrogène et du dioxyde de carbone pendant la formation du méthane (transfert d'hydrogène entre espèces), garantissant ainsi un environnement acceptable pour les bactéries acétogènes .
- La phase subséquente de méthanogénèse, qui est la phase finale de production du biogaz, c'est avant tout l'acide acétique, mais aussi l'hydrogène et le dioxyde de carbone, qui est converti en méthane par des archées méthanogènes strictement anaérobies. Les méthanogènes hydrogénotrophes produisent du méthane à partir de l'hydrogène et du dioxyde de carbone, alors que les bactéries acétoclastes produisent du méthane par clivage de l'acide acétique. (Madigan et *al*, 2020)

Les quatre phases de dégradation anaérobie ont lieu simultanément selon un processus à une seule étape. Toutefois, comme les bactéries intervenant dans les diverses phases de la dégradation n'ont pas les mêmes exigences en termes d'habitat (en ce qui concerne le pH et la température, par exemple), il faut trouver un compromis dans la technologie du processus.

En pratique, cependant, toute tentative de séparation physique de l'hydrolyse et de l'acidogénèse de la méthanogénèse en mettant en œuvre deux étapes distinctes du processus (gestion du processus en deux étapes) sera relativement peu efficace dans la mesure où, malgré la faible valeur du pH dans l'étape d'hydrolyse (pH < 6,5), il se formera quand même du méthane. Le gaz d'hydrolyse obtenu contient par conséquent du méthane en plus du dioxyde de carbone et de l'hydrogène, ce qui expliquepourquoi il doit être utilisé ou traité pour éviter toute conséquence néfaste pour l'environnement et tout risque pour la sécurité (Christy et *al*, 2014).

Pour son utilisation comme source d'énergie, le biogaz subit une Purification du biogaz (Méthane).

- Élimination de particules solides et de la poussière,
- Déshydratation (pour éliminer l'eau).
- Élimination des composés soufrés (H_2S),
- Élimination du CO_2.

De nouvelles méthodes de production de biogaz par gazéification de ressources lignocellulosiques (paille, tiges de plantes, copeaux de bois, etc.) ou par méthanation (production de méthane de synthèse par conversion du monoxyde ou du dioxyde de carbone bio en présence d'hydrogène) sont actuellement en phase d'expérimentation ou de démonstration. La méthanisation de microalgues est également envisagée à plus long terme.

Toutes les matières organiques, qu'elles soient d'origines animale ou végétale, peuvent être méthanisées pour être transformées en biogaz. À l'heure actuelle, on utilise le plus souvent

- Des déchets agricoles (déjections animales, résidus de récoltes comme les pailles,
- Des déchets verts (tontes de gazon, etc.),
- Des déchets d'industries agroalimentaires (abattoirs, vignes, laiteries, etc.),
- Des boues de stations d'épuration.

La méthanisation doit avoir lieu dans une installation confinée appelée digesteur, en l'absence d'oxygène. Les micro-organismes naturellement présents dans la matière organique dégradent celle-ci et produisent le biogaz, ainsi qu'un résidu appelé digestat. (Christy et *al*, 2014).

3. Les différents types d'unités de méthanisation

La méthanisation peut être pratiquée à plusieurs échelles. Les unités les plus modestes se trouvent en milieu agricole (on parle de méthanisation « à la ferme ») et sont exploitées par un agriculteur ouun groupe d'agriculteurs.

Il existe aussi des installations collectives de plus grande taille valorisant principalement des déchetsurbains ou industriels :

- Unités centralisées (déchets de différentes origines liés au territoire d'implantation),
- Unités industrielles (déchets de l'industrie agro-alimentaire, de la chimie ou de la papeterie),
- Unités spécialisées dans le traitement des boues d'épuration des eaux usées,
- Unités de méthanisation d'ordures ménagères (gérées par les collectivités ou des entreprisesspécialisées). (Dutta et *al,* 2019)

4. Les différents usages des biogazs :

- La production de chaleur : le biogaz est brûlé dans une chaudière pour dégager de la chaleur. Celle-ci doit être utilisée au plus proche de la source de production pour limiter lesdissipations / pertes thermiques,
- La production d'électricité : le biogaz est brûlé et l'énergie dégagée alimente un générateur qui produit de l'électricité,
- La cogénération : il s'agit de la production combinée d'électricité et de chaleur.C'est le mode de valorisation le plus fréquent du biogaz.
- La production de carburant véhicule : avant d'être utilisé en tant que carburant dans un véhicule, le biogaz doit être épuré de certains éléments (le gaz carbonique, l'eau et le sulfure d'hydrogène, corrosif pour les moteurs). On obtient alors du biométhane quasiment identique au gaz naturel pour véhicule. Cette valorisation est encore peu développée et concerne surtout les flottes captives (transport urbain, etc.).
- Les résidus non digérés par les bactéries (digestat) peuvent subir un traitement (notamment pour éliminer les agents pathogènes) avant de servir comme engrais agricole. Ils se substituent ainsi aux fertilisants chimiques.
- La méthanisation est une solution qui permet à la fois de valoriser de la matière organique (ce qui réduit la quantité de déchets organiques à traiter par d'autres filières) et de produire de l'énergie.

- Elle contribue dans ce cadre à diminuer les émissions de gaz à effet de serre en permettant de remplacer les énergies fossiles par du biogaz pour la production de chaleur, d'électricité ou de carburant. Sa production et son utilisation maîtrisées évitent de plus des émissions non contrôlées dans l'atmosphère de méthane, un gaz à effet de serre au potentiel de réchauffement 28 fois plus puissant que le CO_2 sur 100 ans d'après le GIEC.
- Enfin, l'utilisation du digestat (résidu non transformé en biogaz) évite quant à elle le recours à des engrais minéraux chimiques, dont la fabrication nécessite des ressources fossiles.(Schulz et *al*, 2006)

Les vaccins

Introduction

***« La vaccination a été l'un des grands succès de la santé publique. Elle a permis de sauver la vie de millions d'enfants et de donner à des millions d'autres la perspectived'une vie plus longue en meilleure santé, ainsi que de meilleures chances d'apprendre, de lire et d'écrire, mais aussi de jouer et de se déplacer librement sans souffrir* », Nelson Mandela, Johannesburg, 2003**.

En 1885, Louis Pasteur a révolutionné la médecine grâce à sa découverte du vaccin contrela rage. 135 ans après sa découverte, la vaccination suscite toujours une grande défiance. En 1953, l'Américain Jonas Salk crée un vaccin contre la poliomyélite à partir de virus cultivés in vitro. Cela permettait de le fabriquer à grande échelle. Dans les années 60, les découvertes s'enchaînent avec des vaccins contre la rougeole, la rubéole ou encore les oreillons. Mais ils suscitent une défiance. "Ça élimine un risque sur le moment mais pour les enfants, on ne sait pas ce que ça donne après comme suite", se demandait une femme en 1962. (Canouï et *al* ,2019). Dans les années 80, grâce à la génétique, les chercheurs décryptent l'ADN des microbes. Désormais, ils interviennent au cœur des virus et les modifient pour créer des vaccins nouvelle génération comme celui de l'hépatite B. Au pays de Pasteur, les anti-vaccins donnent de la voix, même si les vaccins restent essentiels contre les épidémies.

1- Définition

Un vaccin est un produit biologique contenant un ou plusieurs antigènes. Ils sont fabriqués soit à partir de bactéries ou de virus entiers, soit à partir de leurs constituants (protéines, polysaccharides..) ou de leur produit de sécrétion. Dans le cas des toxines, celles-ci sont inactivées par un traitement chimique (formaldéhyde) tout en préservant lacapacité d'induire une réponse immunitaire. À ce principe actif, s'ajoutent suivant le typede vaccin deux classes de composants qui participent à la formulation du produit final : l'adjuvant en charge de stimuler et d'orienter la réponse immunitaire et l'agent stabilisantchargé de maintenir les propriétés du produit sur une longue durée dans des conditions définies. En particulier, les agents stabilisants sont utilisés dans les formes de vaccins appelées multidoses destinées à injecter plusieurs fois le vaccin à partir du même flacon (Housset et *al*, 2019).

2- Différentes classes de vaccins

Les vaccins sont généralement classés en

- Vaccins vivants atténués,
- Vaccins inactivés,
- Vaccins à antigènes purifiés

- Vaccins recombinants. (Canouï et *al* ,2019).

On distingue aussi

- Les vaccins monovalents vaccinant contre une seule maladie
- Et les vaccins multivalents ou combinés vaccinant contre plusieurs maladies. Un vaccin monovalent contient souvent plusieurs antigènes comme pour la polio (troistypes) ou la grippe saisonnière (trois souches) ou le pneumocoque avec 23 sérotypes.

Dans la préparation des vaccins vivants atténués, la réduction du pouvoir pathogène est obtenue par passage du microorganisme sur des cultures cellulaires successives ou par voie chimique. Pasteur avait montré l'intérêt d'un tel procédé en diminuant progressivement la virulence du virus de la rage par passages répétés sur moelle épinièrede lapin.

Actuellement, un grand nombre de vaccins viraux sont fabriqués à partir de formes atténuées : citons les vaccins contre les oreillons, la rougeole, la rubéole, la polio par voirorale et la fièvre jaune.

Et les vaccins à base d'acides nucleiques :

La vaccination utilisant des acides nucléiques s'est développée au cours des dernières décennies. Elle représente une méthode prometteuse et particulièrement attractive pour prévenir ou guérir des maladies infectieuses ou cancéreuses. Cette approche a suscité un regain d'intérêt mondial au cours de ces dernières années, suite aux progrès réalisés dans la compréhension du système immunitaire humain. Les vaccins à base d'acides nucléiques reposent essentiellement sur deux types de molécules, ADN et ARN messager (ARNm), qui, lorsqu'elles sont injectées chez un individu, permettent la synthèse de la protéine immunogénique. La principale différence entre les vaccins à ADN et à ARNm réside dans le compartiment cellulaire où ces molécules doivent parvenir pour être actives : le noyau pour l'ADN, et le cytoplasme pour l'ARNm. (Pitard, 2019)

3- Préparation de vaccin

La préparation de vaccins inactivés ou tués s'obtient par exposition de l'agent pathogèneà un traitement physique ou chimique entraînant une perte définitive de la virulence sansdénaturer son pouvoir immunogène.

La mise au point de vaccins à antigène purifié consiste à isoler l'antigène de la cellule pouren obtenir une forme purifiée qui sera ensuite inactivée s'il s'agit de toxines. Les deux familles de molécules utilisées sont les protéines et les polysaccharides et dans certains cas, le couplage chimique des deux (vaccins conjugués).

Les protéines sous forme brute peuvent être soit des toxines secrétées ou libérées dans lemilieu

de culture par autolyse (cas des toxines diphtériques ou tétaniques), soit des protéines recombinantes obtenues par génie génétique, synthétisées dans une levure ou dans des cellules d'insectes (vaccin hépatite B ou plus récemment vaccin contre infections à papillomavirus). La famille des polysaccharides concerne exclusivement les vaccins bactériens puisqu'ils sont purifiés à partir de bactéries capsulées.

Apparaissent les vaccins contre les infections à méningocoques (groupe A, C, W, Y) et à pneumocoques. La mise au point de formes conjuguées (association polysaccharide- protéine porteuse) a permis le développement de vaccins pédiatriques à partir des années 1990, comme celui du vaccin Act-Hib® (Sanofi Pasteur) dirigé contre les méningites à *Haemophilus* du nourrisson (Soubeyrand, 2018).

Plus récemment d'autres vaccins conjugués ont été mis sur le marché pour prévenir les infections à méningocoques et pneumocoques : Prevenar® (wyeth), Neisvac® (baxter), Meningitec® (wyeth), Menjugate® Kit (novartis).

Une autre catégorie de préparations vaccinales consiste à associer plusieurs vaccins dans le même flacon ou la même ampoule afin de limiter le nombre d'injections. La classe de ces vaccins combinés peut prévenir jusqu'à six infections (tétanos, diphtérie, polio, coqueluche, hépatite B, méningite à Haemophilus). (Pasquet et *al*, 2019)



Figure 34. Évolution des systèmes de production des vaccins. Génisse vaccinifère amenée au sein de la population pour la vaccination des enfants (1893) ; production de la vaccine animale, congrès de Lyon, 1864 (Bazin H. 2008) ; Moelle épinière de lapin pour préparation du vaccin rage (1885) ; Boîte de Roux pour les cultures virale (XXe siècle) ; Une bille « micro-porteur » (2,5 de diamètre) recouverte de cellules Vero (XXe siècle) ; Bio-fermenteurs industriels pour la culture des bactéries et des virus (XXe siècle).

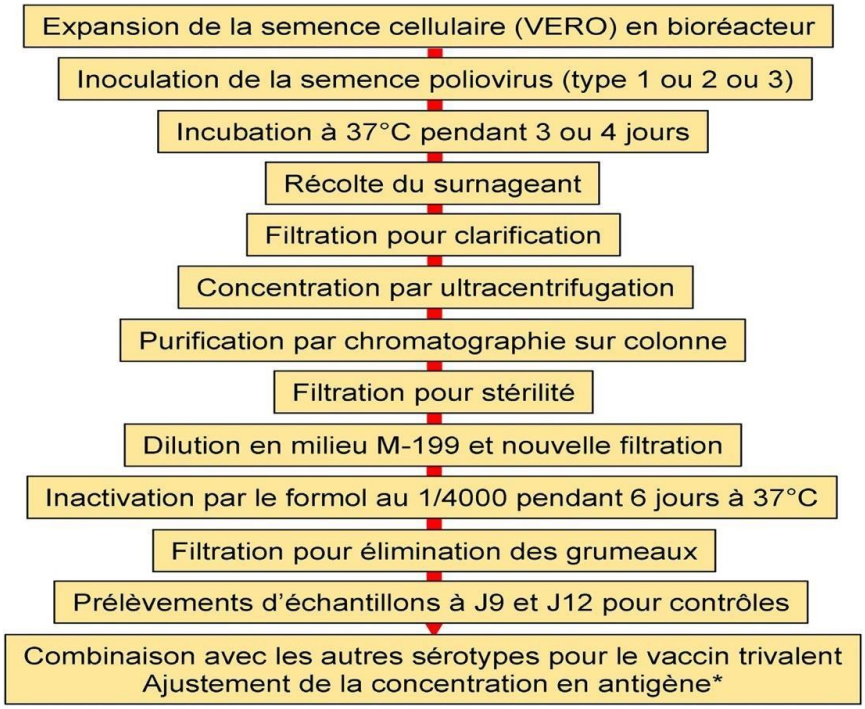


Figure 35. Fabrication biologique. Exemple du Vaccin Polio Inactivé.(Vidor, 1994)

Deux grandes étapes de nature très différentes sont à distingué dans la fabrication d'un vaccin - la fabrication biologique et la fabrication pharmaceutique (Figure35).

La fabrication biologique comprend elle-même plusieurs étapes qui aboutissent à la production d'une unité, « un lot » d'antigène(s) vaccinal (aux) mélangé(s) dans certains cas avec un adjuvant pour constituer, « un vrac » de principe actif (*drug substance*). Le principe actif sera ensuite formulé et réparti lors des étapes de fabrication pharmaceutiques en produit fini, « le vaccin » (*drug product*). (Silva et *al*, 2000)

4-La fabrication biologique

Les matières premières entrent dans la composition des lots de semence, des produits intermédiaires, des « antigènes vrac » (antibio- tiques, sérum de veau fœtal. . .).

Elles doivent être caractérisées, démontrées sans danger, efficaces, stables et produites en quantités compatibles avec un approvisionnement régulier de longue durée. (Silva et *al*, 2000)

4-1- Le système des lots de semence

La première étape consiste à établir un lot de semence viral ou bactérien et/ou une banque cellulaire primaires (« master seed » ou « semence mère ») à partir d'une souche initiale de microorganismes ou de cellules caractérisée. L'objectif est de disposer d'une source génétiquement stable à long terme, indemne de toute contamination par des agents adventices qui pourraient être présents soit dans l'isolat initial soit dans les milieux de culture utilisés dans la semence initiale.

La seconde étape consiste à préparer un lot de semence viral ou bactérien et/ou une banque cellulaire secondaires ou de travail (*working bank*) à partir d'une des ampoules prélevées dans le stock de la semence ou de la banque mère. Des cultures successives, passages, dont le nombre est strictement défini et règlementé, vont permettre d'amplifier le matériel de la semence ou de la banque mère pour la production proprement dite des lots d'inoculum, destinés à la culture microbienne finale. Les banques de travail font à nouveau l'objet d'une caractérisation complète.

4-2-La production des antigènes bactériens

Une première culture commence par l'inoculation d'un milieu de culture semi- synthétique liquide ou solide approprié du matériel congelé ou lyophilisé du lot de semence de travail. Des amplifications successives sont ensuite effectuées par étapes d'une durée de quelques jours.

Les paramètres de culture (temps, température, pression en oxygène, mousse, agitation, pH, aération, etc.) sont strictement contrôlés durant tout le cycle de production par des automates. La fraction antigénique est ensuite récoltée par filtration ou par centrifugation. De nombreuses étapes d'extraction et/ou de purification succèdent au recueil de l'antigène brut présent dans le milieu de culture ou dans les bactéries, selon les vaccins.

4-3-La production des antigènes viraux

Parce que les virus ne peuvent se multiplier qu'à l'intérieur d'une cellule vivante, les progrès de la production des vaccins viraux sont étroitement associés à ceux de la culture des cellules.Dans les années 1930, la moelle épinière de lapin ou de mouton était toujours utilisée pour produire le vaccin de la rage et la vaccine était encore produite en 1950 sur flancs de genisses.Il était donc très difficile de quantifier la teneur en virus « utile » au culture (moelle épinière, cellules cutanées bovines. . .) sein d'un mélange de substances non identifiées contenant des composants du support de

culture (moelle épinière, cellules cutanées bovines. . .) et potentiel- lement contaminé par des micro-organismes non décelés.

La culture sur œuf embryonné, *in ovo*, a été une étape décisive dans la transition de la culture virale *in vivo* et *in vitro*. Initialement développée dans les années 1930 avec le virus de la fièvre jaune, cultivé sur embryons de poulet, puis avec le virus grippal, cultivé sur membrane chorio-allantoide, la culture sur œuf embryonné est toujours largement utilisée, notamment pour la production de ces deux vaccins (Soubeyrand, 2018).

4-4-La mise au point de lignées cellulaires

L'utilisation des antibiotiques et de milieux de culture relativement bien définis comme le milieu M-199 ou le milieu de EAGLE qui ont d'abord permis d'éviter les contaminations microbiennes et une production de meilleure qualité (Soubeyrand,2018).

Pour le virus de la polio, par exemple, cultivé sur cellules rénales de singe, en flacons de Roux, cela nécessitait de capturer des singes africains ou indiens, de pratiquer des examens cliniques et biologiques, de les vacciner et de les maintenir en quarantaine avantle prélèvement des reins.

4-5-L'obtention de l'antigène par génie génétique

La variabilité du virus de la grippe oblige à un changement quasiment annuel des souches contenues dans le vaccin. Les nouvelles souches ne se développent pas nécessairement bien sur œufs embryonnés. Afin d'améliorer le rendement, les nouvelles souches sont co- cultivées avec une souche de virus grippal qui croît à titre élevé dans des œufs embryonnés (souche A/PR8/34 ou souche mère de type PR8). Les virus réassortants quiexpriment les antigènes de la nouvelle souche et se propagent facilement sur œuf embryonné sont ensuite sélectionnés pour la production du vaccin (Soubeyrand, 2018). Plus récemment, des levures ou des cellules d'insectes ont été clonées avec le gène de la protéine L1 des papillomavirus humains (PVH), pour produire l'antigène vaccinal sous forme de pseudo-particules virales. Les avantages de la technique sont nombreux :

- Pallier l'impossibilité de cultiver certains virus *in vitro* (comme le VHB et le PVH)
- S'affranchir de la source humaine des porteurs chroniques pour le VHB ;
- Disposer d'une production d'antigène pratiquement illimitée et à faible coût, enfin
- Assurer une absence totale, par construction, du risque des maladies induites parles virus, comme la cirrhose du foie ou un cancer.

Les antigènes de quelques vaccins bactériens récents ont été également obtenus grâce à des techniques de génie génétique comme certaines anatoxines coquelucheuses ou les antigènes des vaccins méningocoque B.

4-6-La récolte de l'antigène

Deux techniques de recueil de l'antigène sont utilisées selon la phase de la culture virale ou de la fermentation bactérienne dans laquelle se trouve l'antigène. Soit les cellules sont récoltées et le milieu éliminé par centrifugation aseptique, pour les antigènes inclus dans les corps microbiens, comme pour les antigènes du vaccin coqueluche à germe entier ; soit le milieu de culture est récolté et les cellules éliminées par centrifugation ou filtration aseptique (pour les antigènes solubles : polyosides capsulaires, exotoxines, etc.) Les cellules peuvent être aussi conservées en bioréacteur pour certains antigènes solubles ou pour les virus non cytopathogènes ce qui permet, dans ce dernier cas, plusieurs récoltes. 4-7-La concentration de l'antigène

La concentration de l'antigène a deux objectifs : permettre de diminuer les volumes à traiter tout le long des étapes de purification et de commencer à purifier la fraction antigénique.

4-7-La purification de l'antigène

Après sa récolte et sa concentration, l'antigène est purifié. La purification consiste à séparer l'antigène des autres constituants présents dans l'extrait brut (protéines, endo- toxines, acides nucléiques, etc.) provenant soit des germes cultives, soit des composés apportes dans les milieux de culture. L'antigène purifié est obtenu par étapes successives basées sur des propriétés physico-chimiques spécifiques des molécules d'antigène : leur taille (chromatographie, ultrafiltration, ultracentrifugation), leur charge électrique (chromatographie, électrofiltrations), leur densité (ultra- centrifugation isopycnique), leur hydrophilie (extraction par des solvants, par chromatographie) et leur solubilité (fractionnement par précipitation. Le degré de purification d'un antigène a également un impact significatif sur le rendement et donc sur le cout de sa production.

4-8-L'inactivation de l'antigène

L'inactivation est l'étape qui vise à annihiler totalement le pouvoir pathogène d'un microorganisme ou d'une toxine tout en gardant ses propriétés immunogènes pour obtenir le principe actif (valence antigénique).

Certains antigènes sont intrinsèquement peu ou pas pathogènes : les polysaccharides bactériens et les germes atténués comme la souche Edmonston du virus de la rougeole ou la souche bactérienne, BCG ; d'autres sont virulents ou pathogènes, comme les toxines d'origine bactérienne, tétanique, diphtérique, pertussique ou des virus comme celui de larage ou de la poliomyélite utilisé pour produire le VPI. Les paramètres d'inactivation sont définis, standardisés et validés afin de s'assurer que l'antigène ne soit plus pathogène et que la conformation de l'antigène soit respectée le mieux possible. Plusieurs procédés sont utilisés en fonction de l'antigène considéré : la chaleur (coqueluche, vaccin à germe entier) par des agents chimiques, (formol, propiolactone...).

4-9-La fabrication pharmaceutique

L'antigène une fois sous forme de vrac, mélangé ou non avec un adjuvant, est ensuite transformé en produit fini par les étapes successives de la fabrication pharmaceutique (Figure 34).

- **La formulation et remplissage**

Les trois étapes, formulation, remplissage et lyophilisation, sont les plus délicates concernant la stérilité de tout le procédé de fabrication. Cela est dû au fait que les vaccins sont des composés thermosensibles que l'on ne peut stériliser dans leurs récipients finaux.

Pour obtenir des doses de pro- duit fini stérile, ils sont répartis aseptiquement dans des récipients pré-stérilises (seringues, flacons, etc.). Le remplissage aseptique de ces solutions biologiques demande un strict respect de procédés valides et un personnel très qualifié. Les locaux sont à atmosphère contrôlée (température, humidité, air filtré stérilement, pressurisation) et les contrôles environnementaux fréquents (particules, flore microbienne).

- **La lyophilisation**

La lyophilisation, mise au point par Leslie Collier dans les années 1950, a permis d'obtenir une vaccine stable pendant plusieurs mois à 37°C, ce qui représentait un progrès décisif, surtout dans le contexte du programme d'éradication de la variole.

La lyophilisation est la déshydratation d'une solution gelée, sous vide, par une évaporation directe de la glace. Ce processus préserve la structure moléculaire des antigènes et des germes. Certains antigènes, tels que ceux des vaccins vivants atténués, trop fragiles pour être conservés sous forme liquide au froid, doivent être congelés (VPO) ou, plus souvent, lyophilisés.

- **La stabilité de l'antigène**

Les antigènes microbiens sont des macromolécules souvent instables en solution : leur potentiel immunogène tend à diminuer au fil du temps et peut souffrir des variations de leurs conditions de conservation. En raison des opérations de manutention, de transport et de stockage indispensables pour leur production et leur distribution, une formulation la plus stable possible est recherchée. Un des premiers progrès a été l'addition de glycérol à la vaccine et son conditionnement en tube capillaire ce qui la rendait plus stable et prévenait la prolifération bactérienne. Il devenait possible alors de l'expédier de son lieu de production à 2 ou 3 jours de voyage par température modérée (Silva et *al,* 2000) Actuellement, de nombreuses mesures permettent d'améliorer la stabilité des vaccins. Le maintien d'une température basse, entre +2° C et +8° C, est requis pour tous les vaccins pour le stockage des en-cours de fabrication. D'autre mesures sont prises, en fonction de la nature de l'antigène

- **Les contrôles**

Le contrôle qualité, par des analyses de laboratoire, indispensables pour des produits biologiques à usage humain, est garant de la qualité des produits intermédiaires et du produit fini concernant la sécurité, l'activité, la pureté et la stabilité.

5.2. Les métabolites secondaires

Les antibiotiques

1. Définition

Un antibiotique (du Grec anti : « contre », et bios : « la vie ») est défini comme une substance naturelle produite par les microorganismes dont l'action est d'inhiber la croissance de bactéries (action bactériostatique) ou de les tuer (action bactéricide) (Benzaid, 2019). Il peut être antibactérien, antifongique, anticancéreux, antiviral ou antiparasitaire. La synthèse des antibiotiques est largement répandue chez les actinomycètes, 50 à 75% des souches isolées en sont productrices et sont à l'origine de 70% des antibiotiques (Leveau, 1999). L'antibiotique doit traverser la paroi bactérienne soit de manière active ou passive. Dans le cas du transport passif, l'antibiotique utilise uneprotéine (porine) qui forme un canal dans la membrane externe. Ceci entraîne généralement une très grande sélectivité favorisant les petites molécules (Masse molaire

< 1000) hydrophiles. Avec le transport actif, l'antibiotique est confronté à la paroi bactérienne et dans la plupart des cas à la membrane plasmique (Leveau, 1999).

Bien que 4000 molécules antimicrobiennes ont été isolées à partir de divers microorganismes, seulement une cinquantaine sont utilisés comme antibiotiques pour letraitement de différentes infections. En effet, une molécule bioactive doit remplir plusieurs critères importants pour qu'elle soit considérée comme antibiotique : (i) : elle doit être sélective, (ii) : ne doit pas être toxique pour l'homme ou les animaux, (iii) : coûts de production faible, (iv) possède un spectre large d'activité, (v) : un mécanisme d'actiondéterminer, (vi) : une solubilité élevée, (x) : doit être stable vis-à-vis les différents facteurs physicochimiques ...cet (Camille *et al*, 2014).

Les familles d'antibiotiques les plus utilisés en médecine sont les b-lactamines, comme les pénicillines obtenu à partir de la moisissure *Penicillium glaucum*, et les céphalosporines purifiées à partir de la moisissure *Cephalosporium acremonium*; ainsi que les aminosides, comme la streptomycine qui a été isolée à partir de *Streptomyces griseus* (Zähner et *al*, 2020).

2. Micro-organismes producteurs

La grande majorité des antibiotiques est produite par des micro-organismes. Les bactéries sont responsables d'environ 80 % de la production, les champignons de 20 %. La classe des actinomycètes représente actuellement le groupe responsable de la majeure partie des antibiotiques produits industriellement. Ce sont des bactéries rencontrées surtous les substrats organiques. Les sols en sont le réservoir principal. Elles sont à Gram positif et de morphologie très variée. Les souches productrices d'antibiotiques sontaérobies et de formes mycéliennes. Leur coefficient de Chargaff (G + C) est généralementcompris entre 60 et 75 %. (Leveau, 1999).

Tableau 9. Exemples d'antibiotiques produits par le genre *Streptomyces* (Leveau, 1999).

Classification	Antibiotique	Organisme producteur	Cible et spectre d'activité
Aminoglycosides	Streptomycine	*S. griseus*	Synthèse protéique ; spectre large, inactifs sur les streptocoques et anaérobies stricts
	Spectinomycine	*S. spectabilis*	
	Néomycine B	*S. fradiae*	
Tétracyclines	Chlortétracycline	*S. aureofaciens*	Synthèse protéique ; large spectre, mycobactéries, mycoplasmes
	Oxytétracycline	*S. rimosus*	
Polyènes	Nystatine	*S. noursei*	Membrane cytoplasmique ; fongicides : levures, champignons
	Amphotéricine	*S. nodosus*	
Macrolides	Spiramycine	*S. ambofaciens*	Synthèse protéique ; spectre étroit, bacilles Gram+ et −, anaérobies stricts
	Érythromycine	*S. erythreus*	
	Rapamycine	*S. hygroscopicus*	
	Natamycine	*S. natalensis*	
	Avermectine	*S. avermitilis*	
	Tylosine	*S. fradiae*	
	Oléandomycine	*S. hygroscopicus*	
Streptogramines	Pristinamycine	*S. pristinaespiralis*	Synthèse protéique ; Gram+, staphylocoques
	Virginiamycine	*S. virginiae*	
Glycopeptides	Vancomycine	*S. orientalis*	Synthèse pariétale ; Gram+, mycobactéries
Lincosamides	Lincomycine	*S. lincolnensis*	Synthèse protéique ; Gram+ (staphylocoques, an-aérobies)
Autres	Chloramphénicol	*S. venezuela*	Synthèse protéique ; utilisé contre la fièvre typhoïde, les méningites cérébro-spinales (*Neisseria meningitidis*)

Les actinomycètes ont la capacité d'excréter de nombreuses enzymes hydrolytiques (protéases, lipases, amylases, cellulases), et ainsi de se développer à partir de substrats complexes polymérisés.

La classification des actinomycètes se fait à partir de critères morphologiques et biochimiques. Dans ce groupe bactérien, le genre *Streptomyces* est le plus abondant et il est responsable de la majeure partie de la production actuelle des antibiotiques.

Le tableau 8 illustre quelques exemples d'antibiotiques produits par les *Streptomyces* avec cibles et spectres d'action. De nombreuses recherches se sont récemment développées en vue de trouver de nouveaux antibiotiques produits par des actinomycètes « rares », n'appartenant pas au genre *Streptomyces.* (Zähner *et al,* 2020). En dehors des actinomycètes, des bactéries du genre *Bacillus* produisent des antibiotiques de nature essentiellement peptidique. Ces bactéries à Gram positif, mobiles, aérobies, anaérobies ou aéro-anaérobies, se caractérisent par une différenciation prononcée, et leur production d'antibiotiques est en relation avec cette différenciation. Leurs spores sont extrêmement résistantes aux conditions défavorables. Il convient cependant de signaler que certains *Pseudomonas,* bactéries à Gram négatif, aérobies stricts, non filamenteuses, non sporogènes, sans différenciation significative, produisent quelques antibiotiques. Les *Pseudomonas* producteurs, comme les *Bacillus* et les *actinomycètes,* se caractérisent par l'excrétion d'enzymes exocellulaires hydrolytiques.

- Les champignons ont été à l'origine de la découverte et de la production industrielle d'antibiotiques.
- Plusieurs milliers d'antibiotiques produits par ces organismes sont connus, mais un petit nombre seulement est commercialisé. Une dizaine d'organismes fongiques est exploitée industriellement.
- Ils appartiennent aux genres *Aspergillus, Penicillium, Cephalosporium, Helminthosporium, Fusidium.*
- Ce sont des champignons imparfaits qui se reproduisent végétativement en formant des spores exogènes bourgeonnées (ou conidies). Selon les genres, ces conidies peuvent être isolées, disposées en chainettes ou en glomérules. (Camille et *al,* 2014).

La mise au point d'antibiotiques a reposé jusqu'ici sur l'identification de substances produites naturellement par des micro-organismes présents dans le sol. Ces substancespermettent de se défendre contre des bactéries. La pénicilline est ainsi à l'origine fabriquée par une moisissure. Les substances naturelles présentent l'avantage d'être lefruit d'une longue évolution qui leur permet de pénétrer dans les bactéries ciblées bienmieux que des produits de synthèse.

Le microbiote tellurique est composé de deux microflores distinctes :

- Le **microbiote transitoire (allochtone)**, constituée de microorganismes végétant, apportés par les déchets et par les cadavres des animaux et desvégétaux ;
- Le **microbiote résidant (autochtone**), constituée de microorganismes adaptésau sol et dont le rôle est capital dans le recyclage de la matière. Ce microbiote comprend de nombreux genres bactériens comme *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas* et certains champignons microscopiques. Le genre *Streptomyces* (bactéries saprophytes du sol) renferme de nombreuses espèces capables de produire des antibiotiques, des antifungiques ou des antiviraux, armement chimique fruit de millions d'années d'évolution, assurant leur survie dans le biotope le plus densément peuplé : le sol(1 g sol végétalisé contient environ 1 milliard de bactéries réparties en 5 à 25 000espèces dont la plupart ne sont pas encore connues, ni même cultivables en laboratoire).

3. Exemple d'antibiotiques

3-1-La pénicilline

Les **pénicillines** sont des antibiotiques de la famille des beta-lactamines. La pénicilline est une toxine synthétisée par certaines espèces de moisissures du genre *Penicillium* et qui est inoffensive pour l'humain.

Les pénicillines sont utilisées dans le traitement d'infections bactériennes, principalement contre des bactéries à Gram positif.

La pénicilline (pénicilline G) fut découverte le 3 septembre 1928, par le Britannique Alexander Fleming. Elle a été introduite pour des thérapies à partir de 1941.(Buxeraud, 2020)

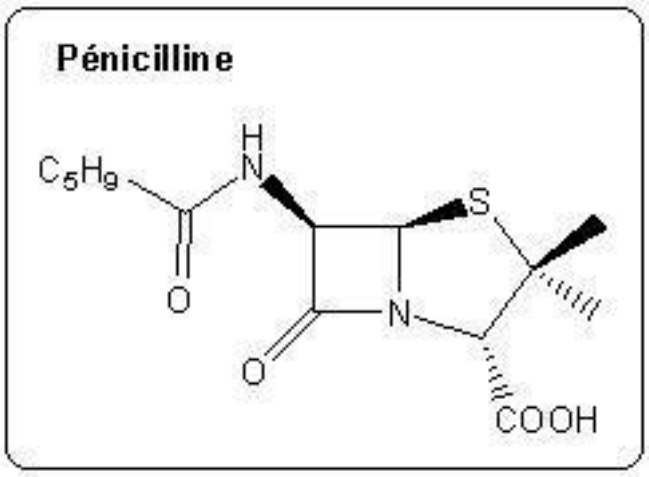


Figure 36. Structure de la pénicilline.

1- Paramétres influençant la production de la pénicilline

Mis à part le fait qu'on peut se procurer rapidement les souches entretenues dans les collections Internationales, il est indispensable d'opérer un travail systématique de prélèvements à partir du milieu naturel et des matières organiques en décomposition (Leveau, 1999). C'est ainsi qu'a été isolée, à partir d'un melon moisi acheté au marché de Peoria (Illinois, Etats-Unis), la fameuse souche de *P. chrysogenum*, la première utilisée pour la production industrielle de la pénicilline (Leveau, 1999).

La production de la pénicilline par *P. chrysogenum* est un excellent exemple d'une fermentation pour laquelle l'ajustement soigneux de la composition moyenne du milieu est employé pour réaliser des rendements maximums (Demain ,2000).

1. **Éléments nutritifs** *P. chrysogenum* est un microorganisme hétérotrophe, elle exige donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance.

1.1. Source de carbone et d'énergie : Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par *P. chrysogenum*. Elle peut métaboliser le glucose, lactose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Boiron, 1996 ; Nicklin et *al*, 2000).

1.2. Source d'azote : *P. chrysogenum* comme la plupart des moisissures assimilent l'ammoniaque sous forme de sels (NH4 +) dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrate, acides aminés, protéines). L'ammoniaque est transformée en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination (Boiron,

1996), alors qu'elle ne peut pas fixer l'azote atmosphérique (Punt et *al*, 2000). Dans recherche

d’une source azotée à bas prix, le choix s’est porté sur les eaux de trempage dumaïs (corn steep liquor).

1.3. Éléments minéraux : La présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de *P. chrysogenum*, il s’agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avecdes concentrations plus au moins différentes selon l’espèce. Des traces d’éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques, etc… (Boiron, 1996).

2. Facteurs physicochimiques Les facteurs physicochimiques ont une grande influence surle développement des moisissures ainsi que sur la germination, nous examinerons successivement quelques paramètres importants.

- Pour la température l’optima de croissance est à 25°C.
- Le pH Est un critère fondamental du développement et de l'activité de P. *Chrysogenum*, cette dernière se développe dans une zone de pH de 4.5 – 8.0 La quantitéd’oxygène mise à la disposition P. *chrysogenum* est un facteur important de sondéveloppement, considérée comme espèce exigeante, sa croissance est aux régions périphériques des substrats. (Botton et *al.*, 1999).
- L’Agitation La culture en milieu liquide dans des récipients agités et le plus souventdes fioles d’Erlenmayer, placées sur des appareils d’agitation qui favorisent la diffusion de l’air à travers les tampons de coton servant à les boucher.

3. **Facteur biologique** La stérilisation des milieux de germination et de fermentation est primordiale. Elle est assurée en générale par un traitement thermique pour éliminer les contaminants présents dans les matières premières puis et l’ensemencement s’effectue aseptiquement.

2- Développement et production industrielle

Le *P. chrysogenum* est adapté pour la fermentation submergée, et est employé couramment dans la production industrielle de la pénicilline (Yang R D, 2001). Initialement, un millilitre de culture permettait d'obtenir 4 unités de pénicilline en 200 heures (Patrick G L, 2003). La première étape a consisté en un changement du milieu de culture. Son enrichissement en nutriments plus adaptés à la souche utilisée a permis de passer à 40 unités / ml de culture, soit un accroissement d'un facteur 10. Mais la culture en surface était intrinsèquement limitée et les chercheurs n'ont eu de cesse de passer à une culture en volume (Patrick G L, 2003).

Aujourd'hui, les sélections successives ont abouti à des souches qui produisent plus de 60000

unités / ml de culture en 200 heures, soit plus de quinze mille fois que la souche de départ (Patrick G L, 2003)

3-2- La streptomycine :

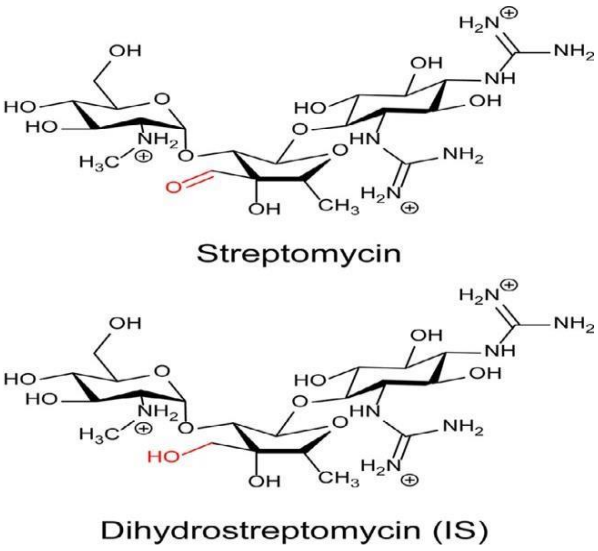


Figure 37. Structure de la Streptomycine.

La streptomycine est un agent antibiotique produit par certaines souches de *Streptomycesgriseus*. Il a été découvert à la suite d'une recherche d'un agent qui serait actif contre les bactéries gram-négatives tout en étant "non toxique pour l'organisme" et qui offrirait donc des possibilités en tant qu'agent chimiothérapeutique. Il a été obtenu pour lapremière fois sous forme de concentré brut en 1944 par Selman A. Waksman et Albert Schatz à la Station d'expérimentation agricole du New Jersey, Université Rutgers (Wilsonet *al*, 2019).

Encouragé par le succès de ces évaluations combinées, Merck a commencé à planifier une production à grande échelle en juillet 1945 et, en août de la même année, la constructiond'une usine de 3 500 000 dollars à Elkton (Virginie) et à Rahway (New Jersey) a débuté.

1. **Application de la streptomycine**

Bien que la streptomycine, comme la pénicilline, soit produite à partir d'organismes communément présents dans le sol, la streptomycine ne remplace pas la pénicilline. Alorsque la pénicilline est principalement efficace contre les bactéries Gram positives, lastreptomycine est surtout utile pour lutter contre les infections dues à des souches sensibles de bactéries gram-négatives.

Toute la streptomycine produite à ce jour par Merck a été fabriquée par fermentation aérobie suivie d'une récupération des liqueurs de fermentation et d'une purification.

Parmi les nombreuses matières premières nécessaires au processus, beaucoup sontuniques et sont utilisées pour la première fois dans un processus de production. Évaporateurs pour la concentration des solutions brutes de streptomycine L'usine Merck produit des solutions de streptomycine.

Fermentation de la streptomycine Bien que la streptomycine soit produite par fermentation aérobie, il est possible, comme pour la pénicilline, d'effectuer la fermentation dans des cuves équipées d'un système d'agitation permettant un contact gaz-liquide optimal. Afin d'obtenir une production maximale de streptomycine par gallonde capacité de fermentation, un système basé sur l'inoculation de masse est utilisé. Ce système comprend six étapes allant des tubes de terre aux fermenteurs de 15 000 gallons,toutes opérant dans des conditions aseptiques. (Johnson et *al,* 2017)

1. **La composition du milieu de fermentation**

Un effet marqué sur la production de streptomycine. Le milieu, tel qu'il a été proposé par Waksman se compose de : Glucose Peptone Extrait de viande Chlorure de sodium Eau du robinet 10 grammes 5 grammes 5 grammes 5 grammes 1.000 ml. Il a été démontré qu'il était possible d'utiliser divers substituts au glucose, à la peptone et à l'extrait de viande. Ces substituts ont toutefois des effets variables sur le processus de récupération et de purification.

Des adjuvants de filtration peuvent être utilisés pour améliorer les caractéristiques de filtration. La méthode choisie pour manipuler les bouillons en grandes quantités consisteà filtrer les bouillons mélangés sur des filtres rotatifs à pression à précouche avec des couteaux qui avancent et un lavage à l'eau.

Après la filtration du bouillon, le taux de streptomycine est mélangé avec du charbon actifen continu. Le carbone est introduit par un mécanisme de mesure qui intègre la quantitéde carbone ajoutée au taux de remplissage du bouillon et à la concentration de streptomycine dans le filtrat.

L'Évaporation de l'éluât neutre est maintenant concentrée en une solution à partir de laquelle la streptomycine est évaporée. La température d'évaporation est critique et doit être soigneusement contrôlée car la streptomycine devient de plus en plus instable avec l'augmentation de la température et de la concentration. Ces basses températures de fonctionnement nécessitent une évaporation sous vide.

La streptomycine brute est finalement précipitée à partir du concentré obtenu par addition d'un solvant approprié. Après filtration et séchage, le produit brut est prêt pour la purification finale. À ce stade du processus, la streptomycine est pure dans une proportion de 25 à 30 %. La streptomycine brute est alors soumise à une longue série d'étapes de purification au cours desquelles les pyrogènes et autres constituants toxiques ou indésirables du produit brut sont éliminés. Enfin, la streptomycine clinique est récupérée sous forme de poudre blanche sèche, stérile et hygroscopique. (Waters et *al*, 2020)

3-3- La tétracycline

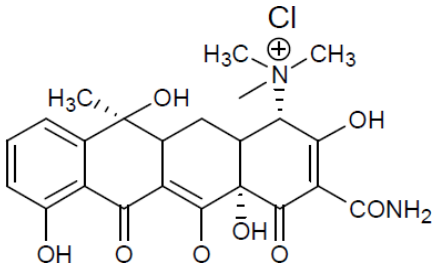


Figure 38. Structure de la Tétracycline.

Premier antibiotique de la famille des tétracyclines découvert, l'auréomycine a été isolée en 1948 à partir d'un échantillon de sol du Missouri par les laboratoires Lederle.

1- Biosynthèse et activité biologique :

Les tétracyclines sont des antibiotiques polykétides, biosynthétisés d'une manière similaire à celle des acides gras, de l'érythromycine et d'un grand nombre d'autres antibiotiques. Les tétracyclines sont produites naturellement par Streptomyces aureofaciens (Nakano et *al*, 2004).

2- Fermentations à agitation

a. Préparation des cultures : a. Les isolats sont placés pour l'isolement des champignons du sol sans ajustement du pH, et sont incubés à 30 C pendant une période de 10 jours pour permettre une bonne sporulation. La formule de ce milieu de culture est (par L) : glucose, 10,0 g ; peptone, 5,0 g ; KH2PO4, 1,0 g ; MgSO4 7H20, 0,5 g ; gélose, 20,0 g ; b. Les isolats sélectionnés sont conservés ou lyophilisés.

b. Inoculum : a. Milieu (par L) : saccharose, 30,0 g ; farine de soja, 5,0 g ; $Na_3C_6H_5O_7$ $5H_20$, 1,0 g ; $(NH_4)_2SO_4$, 3,3 g ; $MgSO_4$ $7H_20$, 0,25 g ; KH_2PO_4, 0,10 g ; K_2HPO_4, 0,10 g ; $CaCO_3$, 1,00 g ; $MnSO_4$ $4H_20$, 0,01 g ; $ZnSO_4r_7H_20$, 0. 04 g ; $K_2Cr_2O_7$, 0,016 mg ; et CH_3COOH, 0,40 ml. b. Volume : 50 ml par erlenmeyer de 250 ml ; 400 ml par erlenmeyer de 2000 ml.

c. Agitateur : alternatif avec une course de 3/1 po à 97 cycles par minute.

d. Température : 30 C.

e. Inoculum : transfert de spores mycéliennes sèches, suspension mycélienne liquide ou lyophile.

f. Période d'incubation : 48 à 72 heures pour obtenir un pH compris entre 4,5 et 5,0.

La première étape est caractérisée par une croissance mycélienne rapide et la seconde par une production active d'antibiotiques. Les sels d'ammonium étant utilisés dans nos milieux de fermentation, un criblage sélectif a permis de développer des souches nécessitant de l'azote ammoniacal pour une production optimale de tétracycline. Divers sels d'ammonium, l'hydroxyde d'ammonium et l'ammoniac liquide ont donné des rendements satisfaisants. Le rapport phosphate-citrate-carbonate s'est avéré très critique et l'étude de ces relations a permis d'augmenter les rendements. Le milieu à forteteneur en carbonate de calcium et en acide nitrique permet à l'ion calcium d'agir comme agent séquestrant de la tétracycline. (Kırmusaoğlu et *al*, 2019).

Les vitamines

1. Définition

Les vitamines sont des composés organiques de faible poids moléculaire, sans valeur énergétique, indispensables à la croissance, à la reproduction et au fonctionnement de l'organisme qui ne peut les synthétiser lui-même. Elles doivent donc être fournies par l'alimentation, exceptées la vitamine D1 synthétisée par la peau et les vitamines B8 et K dont une partie est synthétisée par la flore bactérienne du gros intestin. Leur présence est nécessaire à la plupart des réactions biochimiques responsables de la vie cellulaire (Fujii et *al,* 2020). Essentiels à la croissance et à la nutrition de l'être humain et des animaux. Elles sont nécessaires en petites quantités dans l'alimentation ; surtout quand elles ne peuvent pas être synthétisées par l'organisme. Les plantes et les micro-organismes produisent naturellement une grande diversité de vitamines et en quantités assez importantes selon leurs conditions de culture. Tandis que les humains et les animaux ont besoin d'en consommer (Ledesma-Amaro et *al*, 2013).

L'absence de quantités suffisantes en ces composés dans l'alimentation entraîne différents problèmes de santé et cause un impact économique énorme, notamment en perte d'animaux de fermes. Ainsi, au cours des dernières décennies, une vaste industrie liée à la production des vitamines s'est développée avec succès dans le monde entier. Actuellement, les vitamines sont produites industriellement par les microorganismes en quantités suffisantes pour couvrir les besoins humains et animaux, mais aussi pour permettre leur utilisation comme additifs alimentaires, agents cosmétiques, agents thérapeutiques et produits de santé (Fujii et *al*, 2020). De nombreux microorganismes sont utilisés pour la production de ces molécules dont les principaux sont *Escherichia coli* pour la production de la vitamine B3, *Bacillus subtilis* pour la production de la vitamine B6, Saccharomyces cerevisiae pour la production de la vitamine D, *Ashbya gossypii* pour la production de la vitamine B2. Les voies de biosynthèse sont très complexes et nécessitent des gènes spécifiques tels que ceux de l'opéron de la biosynthèse de la riboflavine (ribD, ribG, ribE, ribA, ribB, ribH, ribT) impliqués dans la biosynthèse de la riboflavine et les gènes PdxR, PdxJ, PdxA impliqués dans la biosynthèse de la pyridoxine. Ces derniers sont retrouvés seulement chez des espèces spécifiques ce qui leur confère la capacité de produire les vitamines.

Les modifications génétiques sont de plus en plus appliquées sur les microorganismes afin d'augmenter le taux et le rendement de leur production en vitamines. Les principaux changements consistent en la surexpression des enzymes (exemple : enzyme Erythrose- 4-Phosphate déshydrogénase *d'Escherichia coli* et les gènes PdxR, SerC, PdxA et PdxJ présents chez *Sinorhizobium melilot*) et en la mutagenèse chimique (exemple : chez l'espèce *Escherichia coli* pour la production de la vitamine B7). Toutes ces modifications ont toujours utilisées et les chercheurs tendent à les améliorer afin d'augmenter de plus en plus le rendement en production.

1. Classes des vitamines

Les vitamines se classent en deux groupes principaux : les liposolubles et les hydrosolubles. Celles qui sont produites par les microorganismes

3.1. Vitamines liposolubles

Les vitamines liposolubles sont très vitales pour le bon fonctionnement du corps. Leurs carences ont été impliquées dans plusieurs troubles de santé. L'apport journalier recommandé des vitamines liposolubles A, D, E et K est 8000–1000 μg/jour, 8000–5000 μg/jour, 8–10 μg/jour et 70–140 μg/jour respectivement (Kamangar et Emadi, 2012).

3.2. Vitamines hydrosolubles

Les vitamines hydrosolubles sont un groupe de substances organiques dont l'homme a besoin en petites quantités pour prévenir les troubles du métabolisme. Une carence en ces vitamines peut entraîner des troubles du système nerveux (Chawla et kvarnberg, 2014).

Les apports nutritionnels recommandés pour les vitamines hydrosolubles, y compris la thiamine, la riboflavine, la pyridoxine, la niacine, la biotine, l'acide ascorbique et l'acide pantothénique sont 1 mg/jour, 1,2 mg/jour, 2–2,2 mg/jour, 13 milliéquivalents, 100–200 μg/jour, 60 μg/jour et 4–7 mg/jour respectivement (Kamangar et Emadi, 2012).

1. Vitamine B12 (Cobalamine)

La vitamine B12, également appelée cobalamine, est une vitamine hydrosoluble essentielle au fonctionnement normal du cerveau, du système nerveux et à la formation du sang. C'est l'une des huit vitamines B. C'est une macromolécule comportant un noyau corrine formé de quatre molécules de pyrrole, au centre desquelles se trouve un atome de cobalt, et d'une structure Benz imidazole-ribose-acide phosphorique liée à ce noyau (Moore et *al,*2019**).** Sa structure chimique est représentée par la figure 38.

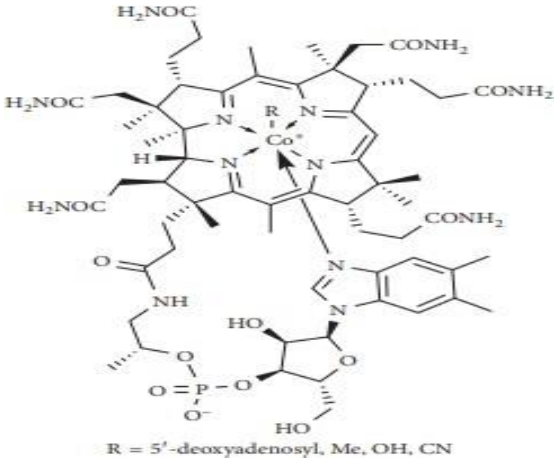


Figure 39. Structure de la vitamine12.

1. Rôles

La méthyl vitamine B12 médié la réaction dans laquelle l'acide aminé méthionine, qui est nécessaire à la synthèse de la myéline, est généré à partir de l'homocystéine. Une déficience de l'un ou l'autre peut produire un défaut dans tous les tissus avec un taux rapide de prolifération cellulaire, par exemple : la moelle osseuse (entraînant une anémie mégaloblastique) et le tractus gastro-intestinal.

2. Sources

La vitamine B12 (cyanocobalamine) est présente dans la viande, les produits laitiers, le poisson et les œufs. Il est essentiel à la production normale de globules rouges par la moelle osseuse et à la croissance des cellules nerveuses (Hariz et Bhattacharya, 2019).

3. Biosynthèse

En raison de la nature chimique complexe de la vitamine B12, plus de 30 gènes sont nécessaires pour l'ensemble de la biosynthèse de novo de la cobalamine, qui représente environ 1 % d'un génome bactérien typique (Martens et *al*, 2002).

Deux voies de biosynthèse différentes pour la vitamine B12 existent dans la nature :

- Voie aérobie, ou plus précisément une voie dépendante de l'oxygène que l'on retrouvechez des organismes comme *Pseudomonas denitrificans*,
- Voie anaérobie indépendante de l'oxygène étudiée chez les organismes comme *Pseudomonas shermanii, Salmonella typhimurium et Bacillus megaterium* (Moore, 2019).

4. Production

La production commerciale de la vitamine B12 est principalement réalisée par l'utilisation de deux souches industrielles qui sont *Propionobacterium shermanii* et *Pseudomonas denitrificans.*

D'autres microorganismes comme : *Bacillus megaterium* peuvent être utilisés, mais ils demeurent moins performants que les deux premières espèces (Balabanova et *al*, 2021).(Selon certaines études, la production de la vitamine B12 par l'espèce *Propionibacterium freudenreichii* a montré que le glucose, l'extrait de levure, le KH2PO4 et la glycine avaientdes effets significatifs sur la production. Le taux de production de la vitamine B12 était optimisé de 120 % par rapport au milieu de culture du départ (Liu et *al,*2021).

Les travaux d'(Assis et *al,* 2020) ont aussi montré que la biosynthèse de la vitamine B12 peut se faire par des bactéries probiotiques en utilisant un résidu agro-industriel tel que le lactosérum ou le résidu protéique acide liquide du soja comme milieu de culture alternatif à faible coût. La culture de *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii ATCC 13673* sur le résidu protéique acide liquide du soja pour la biosynthèse de la vitamine B12 a été étudiée dans des expériences en flacon agitateur et en bioréacteur. Dans ce milieu entièrement végétal, la souche a produit de fortes concentrations de cellules et de grandes quantités de vitamine B12 (0,6 mg/g de cellules) après optimisationdu processus. Ces résultats montraient la possibilité de produire de la vitamine B12 par une bactérie probiotique potentielle dans un milieu sans dérivé animal, très bon marché,en réduisant les coûts de production de cette vitamine essentielle (Assis et al. 2020).

Production par *Propionibacterium freudenrichii*

La production de vitamine B12 à l'échelle industrielle avec des souches de *Propionibactrium freudenreichii* est réalisée dans des conditions anaérobies mais en présence d'oxygène pour la synthèse du ligand DMB (Assis et *al,*2020).

Les Cobalamines actifs produits par les souches de P*ropionobacterium* s'accumulent principalement pendant la phase stationnaire. Comme sources de carbone pour la fermentation industrielle, les souches de *Propionobacterium* peuvent utiliser le lactate, le glucose, le saccharose, le fructose (de la mélasse de betterave à sucre) à des concentrations de 50 à 100 g/L (Liu et *al,*.2021).

D'autres sources de carbone, que *P. freudenreichii* peut métaboliser, sont le mannose, le glycérol, l'inositol et le galactose (Liu et *al*,2021).

Les composés supplémentés pour améliorer la croissance de la culture peuvent inclure des nutriments tels que l'extrait de levure, la liqueur de macération de maïs, la caséine à la concentration de 50 à 70 g/L d'hydrolysat. Les composants stimulant le processus de fermentation comprennent les faibles concentrations de minéraux (fer, magnésium, manganèse, sels de cobalt), de vitamines (bétaïne, choline, riboflavine, nicotinamide), d'acides aminés (acide glutamique, glycine, thréonine). Un excès de propionate est inhibiteur pour la croissance de P. *freudenreichii* et la production de B12 (Chamlagain et *al,* 2018). Par conséquent, il est nécessaire pour la production de maintenir une culture dans une plage de pH de 6,5 à 7 pour neutraliser l'acide propionique et acétique accumulé. **Production par *Pseudomonas denitrificans***

Pseudomonas denitrificans est une souche industrielle qui est utilisée par Sanofi Aventis pour la production à grande échelle. Les études sur la production de B12 ont été réalisées avec la souche *P. denitrificans MB580* pour obtenir la souche dérivée surproductrice SC510.

Le processus industriel de la vitamine B12 à l'aide de *P. denitrificans* se déroule à 30 °C et à des valeurs de pH de 6,0 à 7,0 dans des fermenteurs de 120 m^3, en utilisant du saccharose comme source de carbone et des sources d'azote comme extrait de levure en présence de sels minéraux, et dure environ 6– 7 jours .Le processus de fermentation est aéré pendant la phase de croissance et contrôlé par les concentrations d'oxygène et de CO_2 dissous, ce qui donne un rendement en Cobalamine supérieur à 150 mg/L (Figure 33). La fermentation a commencé avec un niveau élevé de concentration en oxygène dissous (8-10 %) suivi de sa réduction à 2-5 % (49-106 h) et encore en dessous de 2 % (107-168 h**)** (Peng et *al*, 2014).

Après la fermentation, des processus chimiques, y compris la cyanuration, suivis d'étapes d'extraction et de purification à l'aide de solvants organiques.). Cette procédure conduit à un produit d'environ 80% de pureté, qui est utilisé comme additif alimentaire pour animaux. Cependant, une purification supplémentaire via les différentes étapes d'extraction par des solvants organiques (crésol, tétrachlorure de carbone et eau/butanol) est souvent complétée). Enfin, la vitamine B12 est cristallisée par l'ajout de solvants organiques, conduisant à un produit de qualité recommandée pour lesapplications alimentaires et pharmaceutiques (Figure 39)

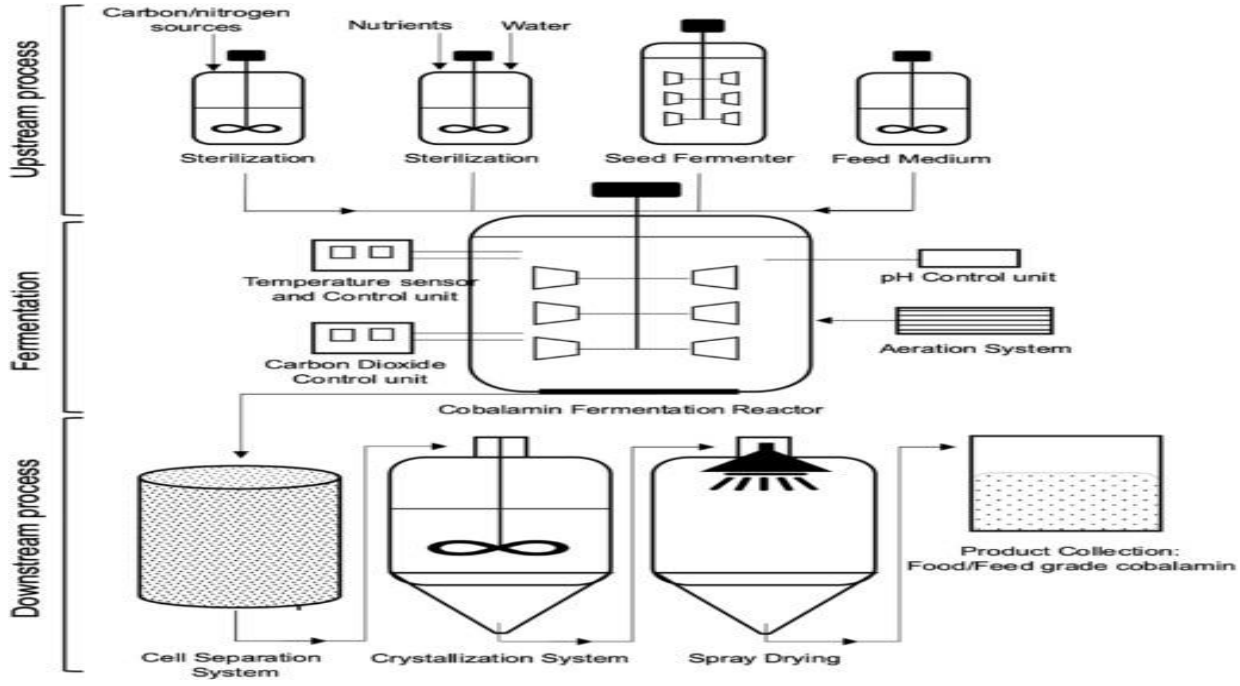


Figure 40. Organigramme général de la production industrielle de cobalamine applicable au procédé aérobie chez *P. denitrificans* (Peng et *al*, 2014)

Les polysaccharides

1. Definition

Les polysaccharides bactériens sont biosynthétisés naturellement par de nombreuses bactéries. Ils sont secrétés soit sous forme d'une capsule fixée à la cellule, soit sous la forme d'une gangue visqueuse en solution. Ce dernier cas est le plus intéressant car la récupération du polysaccharide en est facilitée. (Characklis et *al,* 1989)

Le rôle biologique de ces polysaccharides n'est pas bien élucidé. Des études montrent queles polysaccharides sont impliqués dans l'adhésion des bactéries sur les surfaces : ils composent le biofilm qui entoure la colonie (Characklis et *al,* 1989)

La diversité des structures chimiques, la relative facilitée de leur récupération (pour les polysaccharides exocellulaires), et les conditions contrôlées de leur biosynthèse quiassurent des propriétés reproductibles sont des atouts importants dans le développement de ces polysaccharides. Pour des raisons essentiellement de coût, seul un nombre limité de ces polymères, tels que le xanthane, le rhéozane, le gellane, le hyaluronane, le dextrane..., sont produits et commercialisés à l'échelle industrielle. D'autres sont développés pour des applications plus limitées. Parallèlement, de très nombreux polysaccharides bactériens sont décrits dans la littérature, mais pour la plupart d'entre eux, leur structure chimique et leurs propriétés ne sont pas bien définieset leur production reste difficile.

3. Production et récupération

La production naturelle de polysaccharides par des bactéries est relativement faible et nepeut être compatible avec un développement industriel du polymère. Il est donc nécessaire d'optimiser les conditions de fermentation comme le pH, la température, l'agitation, mais aussi la composition du milieu de culture (source d'azote, de carbone...). Par exemple, le meilleur rendement est souvent obtenu en présence d'un excès de sourcede carbone (très souvent du glucose) et lorsque le développement des cellules est limité par un autre élément nutritif comme l'azote, le soufre, le magnésium, le potassium ou le phosphore (Glazabrook et *al*, 1990).

Les méthodes utilisées pour récupérer le polysaccharide à partir du moût de culture vont dépendre de la pureté requise, du rendement de la fermentation et de la proportion de biomasse insoluble (débris cellulaires par exemple).

Dans certains cas, après un chauffage pour stériliser le milieu, le polysaccharide peut être directement précipité à l'alcool, ce qui entraîne souvent les protéines présentes mais aussi une partie de la biomasse insoluble. Par suite, la poudre contiendra une fraction de composés non polysaccharidiques qui, lors d'une redissolution, rendra la solution trouble. Afin d'obtenir des solutions limpides et plus pures, ce qui est nécessaire dans certaines applications, il convient de clarifier le moût de culture avant la récupération du polysaccharide. Pour cela, deux méthodes sont généralement utilisées :

- Un traitement enzymatique sur le moût de culture pour hydrolyser les protéines et les débris cellulaires ;

-une centrifugation et/ou une filtration pour retirer les insolubles qui peuvent être suivies d'une ultrafiltration pour éliminer les composés de bas poids moléculaire (protéines, sels) et/ou pour concentrer le polysaccharide avant précipitation à l'alcool.

3. Intérêts et potentialités

L'intérêt des polysaccharides bactériens par rapport à ceux issus de plantes ou d'algues provient souvent :

-d'une biosynthèse en fermenteur qui assure une production et des caractéristiques du polysaccharide régulier ;

-de hautes masses molaires, dues en partie à des conditions relativement douces de récupération

- D'une structure chimique régulière qui, dans de nombreux cas, conduit à la formation d'une conformation hélicoïdale qui rigidifie la chaîne ;
- D'une diversité de structure chimique qui peut conduire à des propriétés intéressantes pour des applications spécifiques en milieu aqueux.

Par contre, leur prix de revient limite souvent leur développement. Les potentialités des polysaccharides bactériens sont très souvent reliées aux caractéristiques décrites précédemment. Par exemple, la majorité des applications industrielles utilise les propriétés de suspension, d'épaississement et de viscoélasticité des solutions aqueuses de ces polymères.

Les propriétés rhéologiques des polysaccharides bactériens en milieu aqueux leur permettent de trouver des applications dans l'agriculture, les peintures, teintures, cosmétiques, explosifs, mines, produits phytosanitaires. Dans les industries alimentaires, on retrouve fréquemment les deux polysaccharides bactériens agréés, le xanthane et le gellane, dans diverses formulations pour structurer, stabiliser des sauces, boissons, glaces

et sorbets, produits laitiers, yaourt, mousses, crèmes, confitures et gelées, pâtisseries

, pâtes, dentifrice. D'autres applications plus spécifiques à certains polysaccharides sont possibles dans les domaines cosmétique, pharmaceutique et médical par exemple.
Exemple parmi les polysaccharides bactériens les plus utilisés (Milas et *al*, 2001)

4. Le xanthane

C'est de loin le polysaccharide bactérien qui a connu le plus fort développement industriel, et cela depuis une trentaine d'années. Sa production à partir de la bactérie *Xantomonas campestris* est importante (de l'ordre de 50 000 t/an). Sa structure chimiqueest donnée figure 1. L'origine du succès de ce polysaccharide provient :

- D'une fermentation très performante, conversion du D-glucose à plus de 80 % avec, parallèlement, une faible production de cellules bactériennes (inférieure à 5 % en poids du polysaccharide récupéré) ;
- D'une viscosité intrinsèque très élevée (10 000 à 20 000 mL/g) due à une forte masse molaire (4 à 7 millions)

et à une rigidité des chaînes importante, conséquence de la stabilisation d'une conformation en double hélice qui rend de plus la chaîne peu sensible à la présence d'ions multivalents et à la concentration en sel.

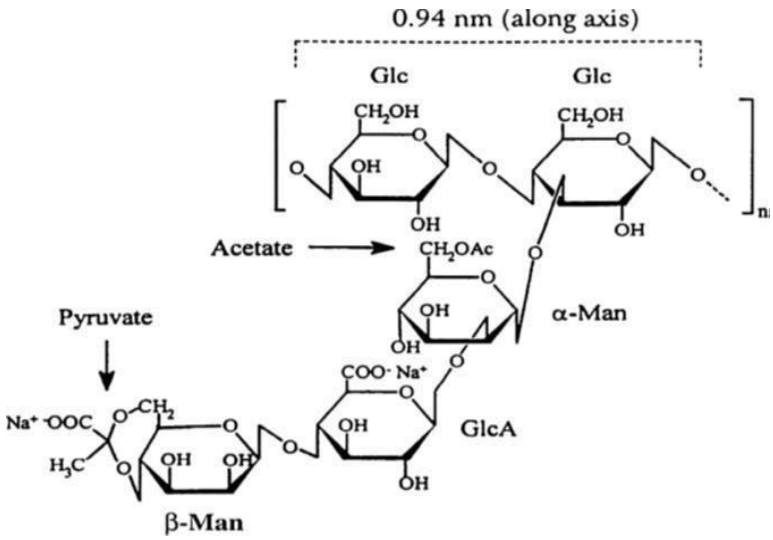


Figure 41. Structure chimique du xanthane, gellane et hyaluronane.(Milas et *al*, 2001)

Les solutions aqueuses de xanthane ont donc un fort pouvoir viscosifiant et viscoélastique. De plus, la synergie avec les galactomannanes conduit à la formation d'un gel ; ce qui, indirectement, donne un pouvoir gélifiant à ce polysaccharide. Pour ces caractéristiques, le xanthane est utilisé pour moitié environ dans les industries alimentaires et pour l'autre moitié dans des domaines très variés.

Dans les domaines non alimentaires, le xanthane est pour certaines applications concurrencé par le rhéozane, polysaccharide bactérien connu aussi sous le nom de succinoglycane, qui présente des propriétés voisines, à l'exception de la synergie avec lesgalactomannanes, mais une stabilité en milieu acide plus importante. (Milas et *al*, 2001)

5. Le gellane

Produit par la bactérie *Pseudomonas elodea*, ce polysaccharide bactérien, après désacylation, forme un gel rigide en présence de faibles concentrations en cations divalents. Sa structure chimique est donnée figure 34. Des mélanges entre la forme nativeacylée et la forme désacylée permettent de modifier les propriétés rhéologiques et la stabilité du gel. Ce type de mélange est envisagé pour le remplacement de la gélatine danscertaines applications alimentaires. La forme désacylée est utilisée principalement dans les industries alimentaires comme gélifiant, mais aussi sous le nom de Gelrite comme support de culture microbienne. Il concurrence l'utilisation des agars et de la gélatine dans ces différents domaines. (Milas et *al*, 2001)

6. Le hyaluronane

Ce polysaccharide (figure 40) est présent dans une grande variété de tissus (liquide synovial, peau, cordon ombilical, crête de poulet) et est encore en partie extrait de ces tissus. Il est aussi excrété par certaines bactéries (streptocoques), ce qui permet actuellement, par cette voie, une production industrielle plus importante à des coûts moins élevés pour un produit de plus grande pureté. Mais les masses molaires sont sensiblement plus faibles que celles du hyaluronane obtenu à partir des crêtes de poulet.

Ce polymère est utilisé en médecine dans le traitement de la gonarthrose et en ophtamologie. La production par voie bactérienne a permis son développement dans les industries cosmétiques. Contrairement au xanthane et au gellane, l'hyaluronane ne présente pas de transition conformationnelle bien définie. Par contre, ses applications sont essentiellement liées à sa biocompatibilité, aux propriétés viscoélastiques de ses solutions et à son pouvoir hydratant de la peau.

Bien d'autres polysaccharides bactériens, non présentés ici, sont utilisés avec plus ou moins de succès dans les cosmétiques, mais aussi pour des applications plus spécifiques et plus limitées. (El-Mansi , 2018).

5.3. Les enzymes

Définition, rôle et action des enzymes

Les enzymes sont des protéines de très hauts poids moléculaires (10 000 à 1 000000 Daltons) et sont constituées de longues chaînes d'acides aminés retenues ensemble par des liens peptidiques (pelczar et Chan, 1981). Ce sont toutes des macromolécules qui appartiennent à la classe des protéines globulaires. Certaines sont des holoprotéines constituées uniquement d'un enchaînement d'acides aminés ; d'autres sont des hétéroprotéines possédant une partie non protéique, le cofacteur, nécessaire à l'activité catalytique et lié plus ou moins fortement à la protéine (Arnaud *et al*, 1993).

Ainsi, parmi les enzymes les mieux connues, on retrouve les enzymes présentes dans le tube digestif où la pepsine, la trypsine et les peptidases brisent les protéines en acides aminés, les lipases dégradent les gras en g1ycérol et acides gras et les amylases transforment les hydrates de carbone en sucres plus simples (Novo Norsdik, 1997).

Les enzymes agissent comme des catalyseurs de réactions chimiques. Leur plus grande particularité est leur très grande sélectivité à catalyser ces réactions chimiques car contrairement aux catalyseurs inorganiques comme les acides, les bases, les métaux et les oxydes métalliques, les enzymes sont très spécifiques. De plus, par leur seule présence lesenzymes accélèrent les réactions chimiques, qui autrement serait très lentes ou même inexistantes, en abaissant l'énergie d'activation nécessaire à la finalisation de la réaction chimique sans être consommées dans le procédé. Après l'achèvement de la réaction chimique, l'enzyme est libérée et est prête à amorcer une nouvelle réaction.

Dans les procédés industriels, l'action très spécifique des enzymes permet d'obtenir des effets très particuliers avec très peu de sous-produits non-désirés (Novo Norsdik, 1997). En fait, les enzymes sont les outils-clés de la biotechnologie et de la bioindustrie. De façon générale, la majorité des réactions enzymatiques peut être représentée par l'équation suivante :

Enzyme (E) + Substrat (S) ~ Complexe (ES) ~ Produit (P) + Enzyme (E) (1)

Où l'enzyme E et le substrat S se combine pour former le complexe enzyme-substrat ES qui se brise pour donner le produit P. L'enzyme demeure intacte au cours de cette réaction et elle est réutilisée jusqu'à ce que tout le substrat ait été consommé.

D'autre part, l'activité biochimique des microorganismes et de leurs enzymes est particulièrement importante. Une molécule enzymatique type peut, en effet, catalyser la transformation de 10 à 1 000 molécules de substrat par seconde (pelczar et Chan, 1981). Ainsi, un gramme humide de *Micrococcus urea* peut décomposer jusqu'à 1200 g d'urée par heure, tandis qu'un gramme de certaines cellules bactériennes peut transformer jusqu'à 14000 g de lactose par heure **(Novo Norsdik, 1997**). De plus, la variété d'enzymes élaborées par un seul microorganisme est prodigieuse. Par exemple, à partir *d'Escherichia coli*, il a été isolé plus de 200 enzymes. D'ailleurs, le Tableau 10 présente les 23 variétés d'enzymes isolées chez *Aspergillus oryzae*.

Tableau 10. Enzymes présentes chez *Aspergillus oryzae* (Novo Norsdik, 1997)
□Amylase, Phosphatase, Amidase, □Amylase, Phosphomonoestérase, Cytase, Dipeptidase Pectinase, Pectosanase, Lactase, Tannase, Catalase, Lipase, Cellulase, Sulfatase, Maltase Phophodiestérase, Rennin (présure), Peptidase, Tréhalase, Phytase, Protéinase, Nucléase

Il faut noter que chacune de celles-ci est douée d'une activité biochimique spécifique ce qui permet de concevoir les immenses possibilités de la microbiologie et de la biochimie industrielle future. Enfin, l'influence des conditions de culture est capitale. En effet, un microorganisme donné peut fournir plusieurs enzymes différentes. Selon le milieu de culture employé. Ainsi *Bacillus subtilis* peut produire, selon les conditions de culture, des enzymes amylolytiques ou protéolytiques (□amylase, □-glucanase, protéase neutre et protéase alcaline) (McKane et al, 1996)**.** À ce jour, plus de 2000 enzymes ont été découvertes dont un tiers au moins sont des enzymes à cofacteurs (Nicotinarnide adénine dinuc1éotide, Nicotinarnide adénine dinucléotide phosphate, Adénosine triphosphate, Coenzyme A). Parmi elles, une quinzaine seulement sont utilisées à l'échelle industrielle et, si une vingtaine d'enzymes à cofacteurs sont employées sur le plan analytique, aucune réaction d'importance n'est encore réalisée à l'aide de ces dernières (McKane et *al*, 1996).

1. Origine des enzymes industrielles

Les enzymes industrielles peuvent avoir plusieurs origines dont les plantes les animaux et les microorganismes (Arnaud et *al,* 1993). La synthèse d'enzymes à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par de nombreux paramètres difficiles à contrôler. Dès lors, la production d'enzymes à partir de la flore microbienne est I'avenue privilégiéepar les producteurs puisqu'elle est plus facile à gérer avec des résultats plus constants.

En fait, les principaux avantages des enzymes de production par rapport aux enzymes d'extraction sont une production indépendante des contraintes saisonnières etgéographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché desrendements de production pouvant être augmentés de façon importante parI'amélioration des souches microbiennes et I'optimisation des conditions de production(Arnaud et *al,* l993). Cependant, parmi les milliers d'espèces de microorganismes connus,capables en principe de sécréter des enzymes un petit nombre seulement de ceux-ci ontjusqu'à ce jour été utilisé à des fins industrielles (McKane et *al,* 1996). De ces milliers de microorganismes, environ 20 seulement sont actuellement commercialises sur une basequi a un impact significatif sur l'industrie des enzymes et sur les utilisateurs d'enzymes. En effet, les possibilités d'utiliser ces germes sont liées aux critères suivants :

- Croissance rapide sur des substrats organiques bon marché ;
- Culture facile et abondante ;
- Fourniture de quantité abondante d'enzymes ;
- Obtention des transformations recherchées d'une manière simple et rapide, avec un rendement élevé et en utilisant le minimum d'énergie ;
- Conservation des propriétés sécrétoires des souches dans le temps ;
- Élaboration de produits faciles à isoler.

Traditionnellement, les enzymes microbiennes étaient produites par culture en surface, soit en couche mince de milieu liquide ou de milieu semi-solide. Les cultures séchées donnaient des préparations suffisamment stables. Cette technique est encore utilisée pour quelques productions, en particulier les enzymes d'origine fongique telles que les amylases d'Aspergillus, les protéases d'Aspergillus et de Mucor ou les pectinases de Penicillium. Mais les contrôles de température d'aération et d'humidité présentent des difficultés et les cultures submergées sont maintenant préférées aux cultures de surface. (Tarafdar et *al,* 2021).

En fait, dès que le développement de la microbiologie a permis de mieux comprendre les systèmes qui président à la synthèse des enzymes chez les microorganismes, la production industrielle d'enzymes s'est orientée vers les processus fermentaires. Les cultures en milieu liquide profondes, agitées, sont mieux adaptées aux différents contrôles par des méthodes modernes et réduisent les risques de contamination.

De plus, elles se prêtent mieux aux opérations d'extrapolation et d'optimisation nécessaires pour le passage du fermenteur pilote de laboratoire au fermenteur industriel (Tarafdar et *al*, 2021)**.** En effet, les enzymes sont en général localisées à l'intérieur des microorganismes et leur extraction présente certaines difficultés. Toutefois, dans le cas de microorganismes qui produisent des enzymes exocellulaires, l'extraction de celles-ci s'efectue beaucoup plus facilement.

La culture des microorganismes producteurs d'enzyme est une tradition plus que millénaire dans les pays d'Orient. Les espèces comme *Aspergiltus oryzae*, ont de tout temps été des auxiliaires dans la preparation par fermentation d'aliments et de boissons variées. Par exemple la fermentation du sake, une boisson alcoolisée, par une dégradation amylasique du riz, fournissant ainsi les éléments nécessaires aux fermentations alcooliques par *Saccharomyces cerevisiae*, puis lactique par *Leuconostoc mesenteroides* et*Inctobacillu*s.

Par ailleurs, le genre Bacillus a connu un développement considérable pour la production d'enzymes industrielle. Diverses raisons peuvent expliquer ce rôle majeur. D'abord le potentiel génétique de ce groupe dont les espèces se rencontrent dans des habitats variés.En effet, y sont représentés des psychroptrohes mésophiles, thermophiles, neutrophiles, acidophile, alcalophiles. Ensuite, ces microorganismes s'adaptent parfaitement à un développement industriel, à cause de leur facilité de culture et du fait qu'ils excrètent à I'extérieur des cellules une quantité importante de leurs protéines enzymatiques. Enfin ces enzymes exocellulaires sont des hydrolats famille qui a connu le plus large développement pour les applications industrielles, notamment les amylases pour le traitement de I'amidon et les proteases dans les detergents (Graminha, et *al,* 2008).

2. Applications industrielles des enzymes

Le Tableau 11 illustre quelques exemples d'enzymes, des microorganismes qui lesproduisent et des applications industrielles

Tableau11. Exemples d'enzymes industrielles et de microorganismes producteurs(Leveau et *al*, 1999)

Types d'enzymes	Microorganismes utilisés	Utilisation
Amylase	*Aspergillus oryzae*	Saccharification de I'amidon
	Aspergillus flavus,	Boulangerie, conserve de Fruits,
	A spergillus roqueforti,	Textiles, papeterie
	Aspergillus niger	Industries alimentaires
	Rhizopus spp.	Industries alimentaire
Invertases	*Bacillus subtilis* *Saccharomyces carlbergensis*	Confiserie
Protéases	*AspergiIlus oryzae, AspergiIlus flavus,* *Aspergillus mucor, Bacillus subtilis* *Pseunomodas Putida, Clostridium spp.* *Bacillus licheniformis, Bacillus* *Subtilis*	Hydrolyse de protéines et de la gélatine Clarification de la bière Tannerie Blanchisserie Détergents
Cellulases	*Trichoderma karungi,* *Myrotheci um vemtcarium*	Dégradation des aliments cellulosiques textiles
Pectinases	*Aspergillus spp., Penicillium spp.,Botrytis psp.*	Clarification des jus de fruit et des vins, industrie textile,
Lactases	*Candida speudotropicallis*	Accélération des filtrations
Lipases	*Candida lipolytica*	Crèmes glacées
Penicillinase	*Bacillus subtilis, Bacillus anthracis*	Fromagerie, laiterie
Streptokynase	*Aspegillus candidus, Bacillus cereus*	Destruction de la pénicilline
Streptodornase	*Sachharomyce shaemoyticus*	Usages médicaux
Catalase	*Acetobacter peroxydans*	Usages médicaux
		Fabrication de matériaux poreux

3. Importance économique de I 'industrie enzymatique

Grâce aux progrès importants qui ont jalonné ces dernières années de son existence, I 'industrie des enzymes est en pleine progression puisque son chiffre d'affaires global a connu une importante augmentation depuis le début des années 80.

Cette croissance est attribuable au développement de nouveaux produits enzymatiques et à l'expansion géographique des nations industrialisées. (Graminha, et *al,* 2008).

La plus grande partie de ce marché est liée aux enzymes de type hydrolytique comme les protéases, les cellulases et les lipases. La plus grande partie de ces enzymes hydrolytiques (80 %) se retrouvent dans I 'industrie des détergents tandis que les 20 % restants sont majoritairement dans l'industrie alimentaire et l'industrie textile. D'ailleurs, globalement, I 'industrie des détergents accapare 34% du marché total des enzymes industrielles, soit plus du double des industries alimentaires et de l'industrie des textiles (Tableau12).

Tableau 12. Marché mondial des enzymes industrielles en 1996

(Graminha, et *al,* 2008).

Industries	**Pourcentage** %
Détergent	**34**
Hydrates de carbone	**12**
Textile	**11**
Autres	**43**

Liste des références

[A]

- Alexopoulos C.J., Mims C.W. & Blackwell M. l996a. Phylum Zygomycota. En'Introductory Mycology'. John Wiley & Sons. New York. 127-171
- Ali, M. B., Aziz, P. B. A., Said, P. C., Saïd, P. C., Omar, P. E. F., Abdellatif, P. B., & Ali, P. T. J. M. (2011). Elaboration et mise en place d'un programme Assurance Qualitéau laboratoire de microbiologie LESAFFRE-MAROC.
- Amaud, A., C. Berset, J. Bocquet, M. Bouix, Y. CerisieE G.F. Cuvellier, D. De Nettancourt, J.M. Engasser, P. GaW, J. Goursaud, M. Cnrenini, J.P. Guiraud, A. Iwen4
C. Jupiq J.-M. Lebeault, J.-Y. Leveau, J. Martial, C. Mawas, F. Normand-Plessieq S. Pierrard, J. Pourqug P.-J. Raugel, H. Richard, H. Steenbrugge, E. Teoule, D. Thomas et J.-P. Vandecasteele .1993. Biotechnologies. 4ièn'" ed., Scriban R. (éd), Technique et Documentation LavoisieE Paris, France, 904 pages.
- Aminetou Bent Mohamed, Aicha mint Sidi Baba.2008. Manuel De Travaux PratiquesDe Microbiologie Bg2. Universite De Nouakchott Faculte Des Sciences Et Techniques Departement De Biologie.
- Amrane, A. 1991. Optimisation de la productivité d'un fermenteur effectant la conversion en acide lactique de perméat de lactosérum supplémenté (Doctoral dissertation, Rennes 1).
- Angumeenal, AR et Venkappayya, D. 2013 . Un aperçu de la production d'acide citrique . *LWT-Food Science Technology* , **50** , 367 – 370 .
- Anwar, S. Ali, S. et Sardar, AA 2009 . Fermentation à l'acide citrique de l'amidon brut hydrolysé par *Aspergillus niger* IIB-A6 en culture stationnaire. *Journal de recherche de l'Université du Sindh (Série scientifique)* , **4** (1), 01 – 08 .
- Assamoi, A. A., Destain, J., & Thonart, P.2009. Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo-β-1, 4-xylanases de moisissures: le cas de Penicillium canescens. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 13(2).
- Assis DA, Matte C, Aschidamini B, Rodrigues E, Záchia Ayub MA.2020. Biosynthesisof vitamin B12 by Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii ATCC 13673 using liquid acid protein residue of soybean as culture medium. Biotechnol Prog. 36(5):e3011.

[B]

- Balabanova L, Averianova L, Marchenok M, Son O, Tekutyeva L.2021. Microbial and Genetic Resources for Cobalamin (Vitamin B12) Biosynthesis: From Ecosystems to Industrial Biotechnology. Int J Mol Sci. 22(9):4522.
- Baltz, R. H., Demain, A. L., & Davies, J. E. (Eds.). 2010. Manual of industrial microbiology and
- Bank, P. C., Jacobs, L. H., Van Den Berg, S. A., Van Deutekom, H. W., Hamann, D., Molenkamp, R., ... & Oosterhuis, W. P. 2021. The end of the laboratory developed testas we know it? Recommendations from a national multidisciplinary taskforce of laboratory specialists on the interpretation of the IVDR and its complications. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), 59(3), 491-497.
- Becker, J., & Wittmann, C. 2017. Industrial microorganisms: Corynebacterium glutamicum. Industrial biotechnology: microorganisms, 1, 183- 220.
- Béhera BC , Mishra R , Mohapatra S.2021. Acide citrique microbien : production, propriétés, application et perspectives d'avenir . *Frontières alimentaires* . ; 2 : 62 – 76 . https://doi.org/10.1002/fft2.66
- Benzaid, C., Tichati, L., Rouabhia, M., & Dahdouh, S. A.2022. Prévalence des infections nosocomiales d'origine microbienne au service de réanimation du Centre hospitalo-universitaire de Annaba (Algérie). In Annales de Biologie Clinique (Vol. 80,No. 6, pp. 527-536).
- Benzaid, C., Belmadani, A., Djeribi, R., & Rouabhia, M. 2019. The effects of Mentha× piperita essential oil on C. albicans growth, transition, biofilm formation, and the expression of secreted aspartyl proteinases genes. *Antibiotics*, *8*(1), 10.
- Bergler, G. 2020. Production d'arômes non-conventionnels par les levures au cours de la fermentation œnologique (Doctoral dissertation, Montpellier SupAgro).
- BooneDR, CasenholzRW,Garrity GM.2001.The archea and deeply branching and phototrophic bacteria..Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.New York: Springer – Verlag;1.
- Boukalkola, F., & Abakhti, A. 2022. Recueil des milieux de culture de bactérie électif; sélectif et général (Doctoral dissertation, UNIVERSITE AHMED DRAIA-ADRAR).
- Bourdeau, N.2016. *Élaboration d'un milieu de culture à base d'eaux usées industrielles pour la production d'un consortium d'algues-bactéries à des fins énergétiques* (Doctoral

dissertation, Université du Québec à Trois-Rivières).

- Brock, T.D., Madingan, M.T., Martingo, J.M. & Parker, J. 1994c. Major

[C]

- Camille, D. E. L. A. R. R. A. S. 2014. Pratique en microbiologie de laboratoire? Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier.
- Canouï, E., & Launay, O. 2019. Histoire et principes de la vaccination. *Revue des maladies respiratoires*, *36*(1), 74-81.
- Chalumeau, HP 1994. Fabrication de vaccins lors d'une pandémie de grippe. Journal européen d'épidémiologie , 10 , 487-490.
- Characklis W.G., McFeters G.A., Marshall K.C., Biofilms, Characklis W.G., Marshall K.C. (eds.) 1989. Wiley-Interscience Publication.p. 195 et 341
- Chawla J, Kvarnberg D. Hydrosoluble vitamins. Handb Clin Neurol. 2014;120:891- 914.
- Chen, C., Tang, T., Shi, Q., Zhou, Z. et Fan, J. 2022. Le potentiel et le défi des microalgues en tant que futures sources alimentaires prometteuses. Tendances enscience et technologie alimentaires , 126 , 99-112.
- Chen, Z., Li, L., Hao, L., Hong, Y., & Wang, W.(2022. Hormesis-like growth and photosynthetic physiology of marine diatom Phaeodactylum tricornutum Bohlin exposed to polystyrene microplastics. Frontiers of Environmental Science & Engineering, 16(1), 2.
- Choulet, F., Aigle, B., Gallois, A., Mangenot, S., Gerbaud, C., Truong, C., Francou, F.-X., Fourrier, C., Guérineau, M., Decaris, B., 2006. Evolution of the terminal regions of the Streptomyces linear chromosome. Molecular Biology and Evolution 23, 2361–2369.
- Ciriminna, R. , Meneguzzo, F. , Delisi, R. et Pagliaro, M. 2017 . "Acide citrique : applications émergentes d'un produit industriel clé de la biotechnologie" . *Chemistry Central Journal* , **11** , 1 – 9. Récupéré de **https ://doi.org/10.1186/s13065-017-0251-y**
- Colombié, V.2005. Description de la production de spiramycine par Streptomyces ambofaciens. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel (PhD Thesis). Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse
- Crater JS, Lievense JC. 2018.Scale-up of industrial microbial processes. FEMS Microbiol Lett. Jul 1;365(13):fny138. doi: 10.1093/femsle/fny138. PMID: 29860483; PMCID: PMC5995164.

[D]

- Dalmaso et al. 2015. In Cours de microorganisms des milieux extrêmes.Ed. Djinni.I. PP14
- De la Jara, A., Ruano-Rodriguez, C., Polifrone, M., Assunçao, P., Brito-Casillas, Y., Wägner, AM et Serra-Majem, L. 2018. Impact de la consommation alimentaire de biomasse d'Arthrospira (spiruline) sur la santé humaine : principaux objectifs de santé et revue systématique. Journal de phycologie appliquée , 30 , 2403-2423.

- De la Jara, A., Ruano-Rodriguez, C., Polifrone, M., Assunçao, P., Brito-Casillas, Y., Wägner, AM et Serra-Majem, L. 2018. Impact de la consommation alimentaire de biomasse d'Arthrospira (spiruline) sur la santé humaine : principaux objectifs de santé et revue systématique. Journal de phycologie appliquée , 30 , 2403-2423.

- Debarbieux, L., Saussereau, E. et Maura, D. 2013. Phagothérapie : un cauchemar pour les bactéries, un rêve pour les médecins ?. Biologie aujourd'hui , 207 (3), 181-190.
- Demain, A. L., & Adrio, J. L. 2008. Contributions of microorganisms toindustrial biology. Molecular biotechnology, 38(1), 41.
- Demain, AL 1981. Microbiologie industrielle. Sciences , 214 (4524), 987-995.
- Dunia A. Al Farraj, Rakesh Varghese , Csaba Vágvölgyi , Mohamed Soliman Elshikh A.M. Alokda , Ahmed Hossam Mahmoud. 2020. Antibiotics production in optimized culture condition using low cost substrates from Streptomyces sp. AS4 isolated from mangrove soil. Journal of King Saud University – Science 32 .1528–1535
- Dutta, A. , Sahoo, S. , Mishra, RR , Pradhan, B. , Das, A. et Behera, BC2019. "Une étude comparative de la production d'acide citrique à partir de différents déchets agro- industriels par *Aspergillus niger* isolé du sol des forêts de mangrove" . *Biologie expérimentale environnementale* , **17** , 115 – 122 .

[E]

- El-Mansi, E. M. T., Nielsen, J., Mousdale, D., & Carlson, R. P. 2018 Fermentation microbiology and biotechnology. CRC press.

[F]

- Frédéric Élie, 2022. Les Archéobactéries ou Archées et les trois grands domaines du vivant, site http://fred.elie.free.fr
- Fujii T, Luethi N, Young PJ, et al. 2020 Effect of Vitamin C, Hydrocortisone, and Thiamine vs Hydrocortisone Alone on Time Alive and Free of Vasopressor Support Among Patients With Septic Shock: The VITAMINS Randomized Clinical Trial. JAMA.;323(5):423-431.

[G]

- Gervasi, T., Pellizzeri, V., Calabrese, G., Di Bella, G., Cicero, N. et Dugo, G. 2018. Production de protéines unicellulaires (SCP) à partir de déchets alimentaires et agricoles en utilisant Saccharomyces cerevisiae. Recherche sur les produits naturels , 32 (6), 648-653.
- Gervasi, V., Agnol, RD, Cullen, SA, McCoy, T., Vucen, S. et Crean, A. 2018. Formulations protéiques parentérales : un aperçu des produits approuvés au sein de l'Union européenne. *Journal européen de pharmacie et de biopharmaceutique , 131* , 8-24.
- Glazabrook J., Reed W.J., Reuber T.L., Walker G.C., Int. J. Biol. Macromol., 1990, 12, p. 67
- Graminha, E. B. N., Gonçalves, A. Z. L., Pirota, R. D. P. B., Balsalobre, M. A. A., Da Silva, R., & Gomes, E.2008. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, *144*(1-2), 1-22.
- Guinoiseau, E. ; Luciani, A. ; Serra, RDA ; Quilichini, Y. ; Berti, L. ; Lorenzi, V.2015. Mode d'action primaire de Cistus ladaniferus L. Fractions actives d'huile essentielle surla souche Staphylococcus aureus. Av. Microbiol. 5 , 881-890.

[H]

- Hess, J. 2007. Modélisation de la qualité du biogaz produit par un fermenteur méthanogène et stratégie de régulation en vue de sa valorisation (Doctoral dissertation,Université Nice Sophia Antipolis).
- Housset.2019.Défiance vis-à-vis de la vaccination : pourquoi ?, Revue des Maladies Respiratoires,Volume 36, Issue 8 .Pages 955-961, https://doi.org/10.1016/j.rmr.2019.06.011.
- Hoshino, S., Wakimoto, T., Onaka, H., Abe, I., 2015b. Chojalactones A–C, Cytotoxic Butanolides Isolated from Streptomyces sp. Cultivated with Mycolic Acid Containing Bacterium. Org. Lett. 17, 1501–1504.
- https://microbiologie-clinique.com/Souche-bacterienne-reference.html
- Humphrey, A. E., & Lee, S. E. 1992. Industrial fermentation: principles, processes,and products. In Riegel's handbook of industrial chemistry (pp. 916-986). Springer,Dordrecht.

[J]

- Jacques Buxeraud, Sébastien Faure. Les pénicillines. Actualités Pharmaceutiques, 2020, 59, pp.23 - 25. ff10.1016/j.actpha.2020.06.011ff. ffhal-03491389f
- Jean yves Levaux.1999. Microbiologie industrielle - les micro-organismes d'intérêt industriel. TECHNIQUE & DOC édition.
- Joël Querellou : Biotechnologie des archées. BIOFUTUR 310, mai 2010.
- Johnson, P. D. 2017. Streptomycin. In *Kucers' The Use of Antibiotics* (pp. 2471-2487). CRC Press.

[K]

- Kamangar F, Emadi A. 2021.Vitamin and mineral supplements: do we really needthem?. Int J Prev Med.3(3):221-226.
- Keller, N. P. 2019. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. Nature Reviews Microbiology, 17(3), 167-180.

- Kırmusaoğlu, S., Gareayaghi, N., & Kocazeybek, B. S. 2019. Introductory chapter:the action mechanisms of antibiotics and antibiotic resistance. In *Antimicrobials, antibiotic resistance, antibiofilm strategies and activity methods*. IntechOpen.
- Konlani, S., Delgenes, J. P., Moletta, R., Traore, A., & Doh, A. 1996. Optimization of cell yield of Candida krusei SO1 and Saccharomyces sp. LK3G cultured in sorghum hydrolysate. *Bioresource technology*, *57*(3), 275-281.
- Krömer JO, Sorgenfrei O, Klopprogge K, Heinzle E, Wittmann C.2004. In-depth profiling of lysine-producing Corynebacterium glutamicum by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome. J Bacteriol.186 (6):1769–1784. doi:10.1128/jb.186.6.1769-1784.2004
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC355958/ <

[L]

- Ledesma-Amaro R, Kerkhoven EJ, Revuelta JL, Nielsen J. 2014.Genome scale metabolic modeling of the riboflavin overproducer Ashbya gossypii. Biotechnol Bioeng. 111(6):1191-1199.
- Leila Bakour .2021. Production, Purification Et Caractérisation Partielle DesAntibiotiques Sécrétés Par La Souche Saccharothrix Tamanrassentensis Dsm 45947 D'origine Saharienne. Thèse De Doctorat De L'université De Toulouse Délivré Par : Institut National Polytechnique De Toulouse (Toulouse Inp Génie Des Procédés Et DeL'environnement.
- Liu J, Liu Y, Wu J, Fang H, Jin Z, Zhang D. Metabolic profiling analysis of the vitaminB12 producer Propionibacterium freudenreichii. Microbiologyopen. 2021;10(3):e1199.
- Lucchetti, A. 2014. Modélisation et conception d'un système de culture de microalgues (Doctoral dissertation, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris).

[M]

- Madigan, M., and J. Martinko. 2007. Brock, Biologie des Microorganismes, 11ème Ed.ed. Pearson Education.
- Madigan, Michael T. ; Martinko, John M. ; Parker, Jack : 2000.Biology of microorganisms. 9e éd. Upper Saddle River, N.J. [inter alia], Prentice-Hall.ISBN 0-13-085264-3

- MadiganM, MartinikoJ.2007.Broke Biologie des microorganismes 11edition)
- Magdouli, S., Saffar, T., Guedri, T., Tarek, R., Brar, S. K., & Blais, J. F. 2018. Practical aspects and case studies of industrial scale fermentation. Microbial sensing in fermentation, 267-298.
- Martens JH, Barg H, Warren MJ, Jahn D. 2002.Microbial production of vitamin B12. Appl Microbiol Biotechnol. 58(3):275-285.
- McKane, L. et J. Kandel .1996. Miuobiologt: essentials and qplications. McGraw-Hill" New-Yorlq NY, Etats-Unis, 843 pages.
- Mémoire sur la fermentation alcoolique . BoD–Livres à la demande.
- Microbial Diseases. En 'Biology of Microorganisms'. Prentice-Hall International, Inc. New Jersey. 524-574.
- Microbiologiste, Y. L. B. 2020. Production de biohydrogène à partir de glycérol: Développement d'une approche par fermentation bactérienne. Vecteur Environnement,53(1), 52-57.
- Milas M., Rinaudo M., Roure I., Al-Assaf S., Phillips G.O., Williams P.A.2001. Biopolymers.59, p. 191.
- Moore SJ, Warren MJ. 2012.The anaerobic biosynthesis of vitamin B12. Biochem Soc Trans. 40(3):581-586.

[N]

- Nangul, A., Bozkurt, H., Gupta, S., Woolf, A., Phan-Thien, K. Y., McConchie, R., & Fletcher, G. C. 2021. Decline of Listeria monocytogenes on fresh apples during long- term, low-temperature simulated international sea-freight transport. *International Journal of Food Microbiology*, *341*, 109069.

- Nguyen, M. T. 2007. Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la régioncentrale du Vietnam: étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines (Doctoral dissertation).

- Noorman HJ, Heijnen JJ. 2017.Grande aventure du génie biochimique . Chem Eng Sci170 :677–93.
- Nouha Ouartsi,Ryad Djéribi, Abdelmalek Boukachabia, Farid Menaa, Karima Gasmi,Dalila Akacem et Mahmoud Rouabhia.2019.In vitro Biodégradation du Gliclazide par Aeromonas hydrophilaet Serratia odorifère Bactérie. SCIENCES DU GÉNIE DE L'ENVIRONNEMENT.Volume 36, Numéro 6, 2019ª Mary Ann Liebert, Inc.DOI : 10.1089/ees.2018.0224.
- Novo Norsdik 1997. Novo Nordik Anrual Report .Enzyme Business.3l pages.

[O]

- Okafor-Elenwo EJ, EJ, Imade Os, OS et Izevbuwa EO, OE 2020. Diversité microbienne dans l'environnement des scieries : implications sur la santé des ouvriers et des commerçants des scieries, Nigéria. Journal de gestion des bioressources .7 ,3, 8.
- Oosterhuis, N. et van den Berg, H.2011. Dans quelle mesure un bioréacteur jetable est-il polyvalent ?. Biopharm International , 24 (3).
- Oosterhuis, N. M., & Junne, S.2016. Design, Applications, and Development of Single-Use Bioreactors. Bioreactors: Design, Operation and Novel Applications, 261-294.

[P]

- Pasquet, G. N. 2021. Volontaires au vaccin?. *Le sociographe*, (1), 4-5.
- Pelcza4 M.J. et E.C.S. Chan1989. Éléments de miuobiologie. Traduit et adapté par J. Fontaine., tes Éditions I{RW Ltee, Montreal" Canada" 5l5 pages.
- Peng W, Cheng X, Zhang H.-Y, Li K.-T. 2014.The metabolic character- istics of high-production vitamin B12 by Pseudomonas denitrificans under dissolved oxygen step- wise reduction. J. Chem. Technol. Biotechnol. 89, 1396–1401.
- Poranen, M. M., Daugelavičius, R., & Bamford, D. H. 2002. Common principles in viral entry. Annual Reviews in Microbiology, 56(1), 521-538.
- Pourraz, J. 2020. Comment faire d'un être vivant un objet industriel : tentatives de production de phagothérapie en France. Lors de la réunion annuelle de la Society for Social Studies of Science (4S), Locating and Timing Matters : Signification et agence des STS dans les mondes émergents, Panel : Être (à venir) industriel : objets, échelles et dynamiques de pouvoir en jeu-1 .

[R]

- Ravindra, P. 2000. Aliments à valeur ajoutée : Protéine unicellulaire. *Progrès de la biotechnologie , 18* (6), 459-479.
- Reihani, SFS et Khosravi-Darani, K. 2019. Facteurs influençant la production de protéines unicellulaires par fermentation immergée : une revue. *Revue électronique de biotechnologie , 37* , 34-40.
- Rihani Alima .2018Isolement et identification de souches fongiques productrices de lipases extracellulaires destinées à la bio-décontamination. THÈSE Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT En Sciences Option : Microbiologie Appliquée. Université Badji mokhtar-Annaba.
- -Rinke, C., Chuvochina, M., Mussig, A. J., Chaumeil, P. A., Davín, A. A., Waite, D. W.Hugenholtz, P. 2021. A standardized archaeal taxonomy for the Genome Taxonomy Database. Nature microbiology, 6(7), 946-959.

[S]

- Salazar-López, New Jersey ; Barco-Mendoza, Géorgie ; Zuñiga-Martínez, BS; Domínguez-Avila, JA; Robles-Sánchez, RM; Ochoa, MAV; González-Aguilar, GA 2022.La production de protéines unicellulaires comme stratégie pour réincorporer les déchets alimentaires et les sous-produits agricoles dans la chaîne de transformation. *Bio-ingénierie .9* , 623. https://doi.org/10.3390/bioengineering9110623
- Schulz, H. and Eder, B. 2006: Biogas-Praxis. Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele, Wirtschaftlichkeit. 3e édition entièrement révisée et complétée, ökobuch Verlag, Staufen bei Freiburg, ISBN 978-3-936896-13-8
- Scriban., 1999. Biotechnologie. 5 éme édition. Tec&Doc. Paris. pp : 920-927.
- Selhi, A. 2020. Evaluation de la qualité microbiologique des aliments commercialisés dans la ville de Blida (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- Selosse Marc-André, Joyard Jacques 2021 : Symbiose et évolution : à l'origine de la cellule eucaryote. Encyclopédie de l'Environnement, [en ligne ISSN 2555-0950] url : http://www.encyclopedie-environnement.org/?p=784
- Sharif, M., Zafar, MH, Aqib, AI, Saeed, M., Farag, MR et Alagawany, M. 2021. Protéine unicellulaire : sources, mécanisme de production, valeur nutritionnelle et ses utilisations en nutrition aquacole. *Aquaculture , 531 ,* 735885.

- Sidaoui Abouamama.2022. Cours de Microbiologie industrielle " Polycopié Réalisé dans le cadre de l'habilitation universitaire " Département de biologie Cours: Microbiologie industrielle-3ème année Licence-Microbiologie
- Silva J, Cerqueira R, Sousa Ma L, Luna E 2000. Vaccine safety: yellow feer vaccine. Report of the Technical Advisory Group on Vaccine Preventable Disease. PAHO, Washington.
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., Tripathi, C. K. M. 2017. Strategies for fermentation medium optimization : an in-depth review. Front Microbiol.,7: 1-16. https://doi.org/10.3389/fmicb.wang2016.02087
- Soubeyrand, B. 2018. *De la fabrication d'un vaccin à sa mise à disposition en pharmacie. Revue des Maladies Respiratoires, (), S0761842518302389–* . doi:10.1016/j.rmr.2018.07.003
- Steiger, M. G., Rassinger, A., Mattanovich, D., & Sauer, M. 2019. Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in Aspergillus niger. Metabolic engineering, 52, 224-231.

[T]

- Tadjer, N., & Seba, K. 2023. Etude de l'activité protéolytique des bactéries lactiques conservées dans le laboratoire de Microbiologie de l'université Ibn Khaldoun-TIARET (Doctoral dissertation, Université Ibn Khaldoun).
- Tarafdar, A., Sirohi, R., Gaur, VK, Kumar, S., Sharma, P., Varjani, S., ... et Sim, SJ 2021. Interventions d'ingénierie dans la production d'enzymes : du laboratoire à l'échelleindustrielle. *Technologie des bioressources , 326 ,* 124771.
- Thomas Dale Brock .2018. Biologie des micro-organismes Ed.Pearson .11e édition
- Valorisation du tourteau de colza par fermentation en milieu solide pour une application en alimentation animale – Thèse de Stéphanie SUTTER (2017) - Plateforme de pré-développement en biotechnologie, Welience (PPB) UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR PAM)

[V]

- Vidor E, Soubeyrand B. 2016.Manufacturing DTaP-based combination vaccines: industrial challenges around essential public health tools. Exp Rev Vaccines .15:1575—82

[W]

- Waters, M., & Tadi, P. 2020. Streptomycin.
- Wilson, D. B., Sahm, H., Stahmann, K. P., & Koffas, M. (Eds.). (2019). Industrial Microbiology. John Wiley & Sons.
- Wittmann, J. Becker 2007. The L-Lysine Story: From Metabolic Pathways to Industrial Production ; Microbiol Monogr (5) V. F. Wendisch: Amino Acid Biosynthesis Springer-Verlag Berlin Heidelberg ; http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.321.2447&rep=rep1&type=pdf
- Woese, C. R., Winker, S., & Gutell, R. R. 1990. Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of" tetra-loops". Proceedings of the National Academy of Sciences, 87(21), 8467-8471.

[Y]

- Yamauchi, R, Maguin, E. , Horiuchi, H. , Hosokawa, M. et Sasaki, Y. 2019. Le rôle critique de l'uréase dans la fermentation du yaourt avec diverses combinaisonsde *Streptococcus thermophilus* et *de Lactobacillus delbrueckii* ssp. Bulgarie . *Journal of Dairy Science* , **102** (2), 1033 – 1043 .**https://doi.org/10.3168/jds.2018-15192**
- Yang X.2010. Intensification du processus de fermentation microbienne. Dans : Baltz RH, Davies JE, Demain AL. (éd.). Manuel de microbiologie industrielle et de biotechnologie, 3 e édition . Washington : ASM Press.669-75.

[Z]

Zhang, T. , Jeong, CH , Cheng, WN , Bae, H. , Seo, HG , Petriello , MC et Han, SG (2020). L'extrait de Moringa améliore les propriétés fermentaires, texturales et bioactives du yaourt . *LWT* , **101** , 276-284 .**https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.01**