

# Biotechnologies

1

Réalisé par : Marie-Line DAVERAN-MINGOT  
Université Toulouse III - Paul Sabatier  
Laboratoire: Toulouse Biotechnology Institute (TBI)

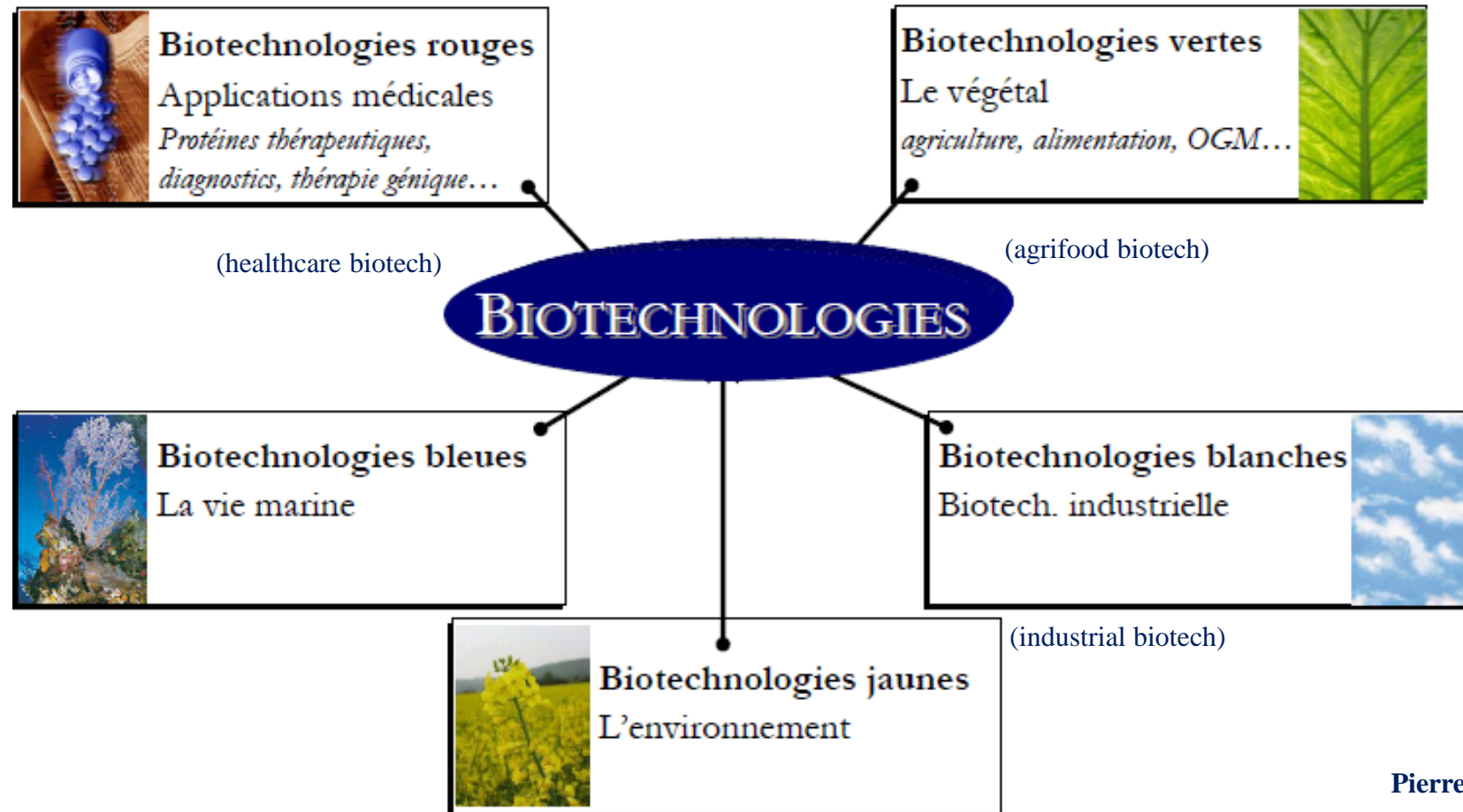
Document de préparation à la sélection française  
aux Olympiades Internationales de Biologie

# BIOTECHNOLOGIES ?

Biotechnologies: (- bios = la vie)



= la technologie du vivant



# BIOTECHNOLOGIES ?

## Microorganismes et Biotechnologies

Champignons,  
Streptomyces...



**Biotechnologies rouges**  
Applications médicales  
*Protéines thérapeutiques,  
diagnostics, thérapie génique...*

**Biotechnologies vertes**  
Le végétal  
*agriculture, alimentation, OC...*

*Bacillus thuringiensis*

Bactéries lactiques, Levures  
Corynébactéries...



**MICROORGANISMES**



**Biotechnologies bleues**  
La vie marine

**Biotechnologies blanches**  
Biotech. industrielle

*Clostridium, Archées...*

Microorganismes  
extrêmophiles



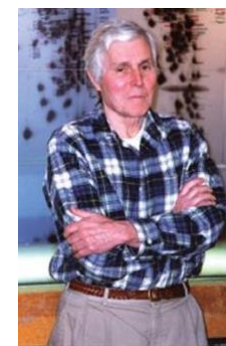
**Biotechnologies jaunes**  
L'environnement

*Pseudomonas...*

*Biologie de synthèse  
Microorganismes modifiés  
(E.coli, Levures, bacillus)*

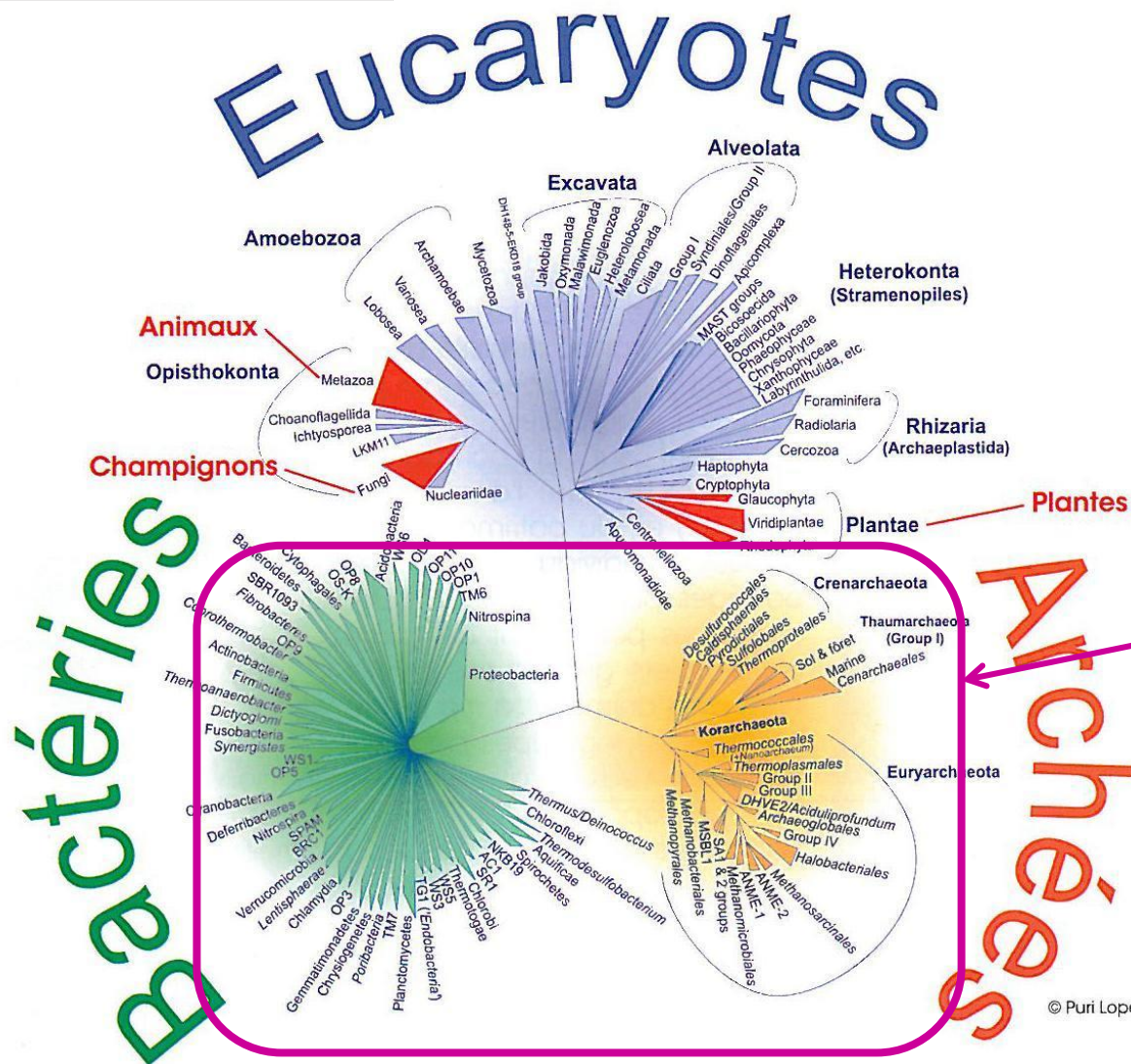
# INTERÊT DES MICROORGANISMES EN BIOTECH

Grande diversité



Woese, 1978 : bactéries et Archées (ARNr)

3 domaines



A quels domaines, appartiennent les microorganismes utilisés en biotechnologie?

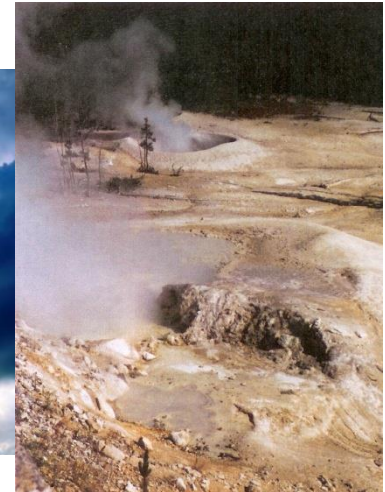


# INTERÊT DES MICROORGANISMES EN BIOTECH

Ils sont partout

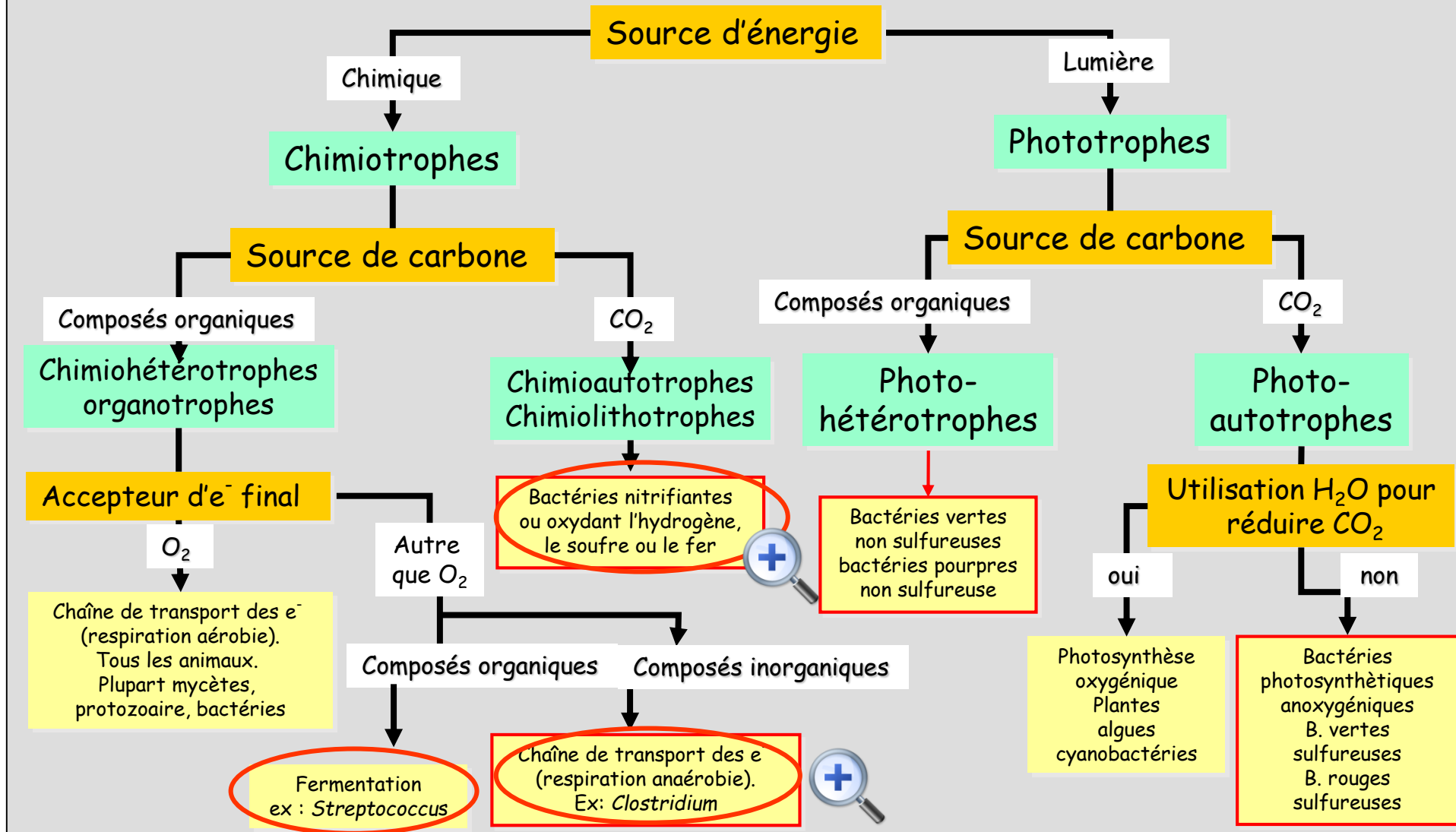
- Air
- Sol, sous-sol, sédiments
- Minéraux
- Régions volcaniques
- Antartique
- Eau
  - Eaux sulfureuses chaudes
  - Cheminées hydrothermales abysses, fumeurs
  - Eaux extrêmement salées, acides ou alcalines

... mais aussi chez nous!!!  
(microbiote intestinal)



# INTERÊT DES MICROORGANISMES EN BIOTECH

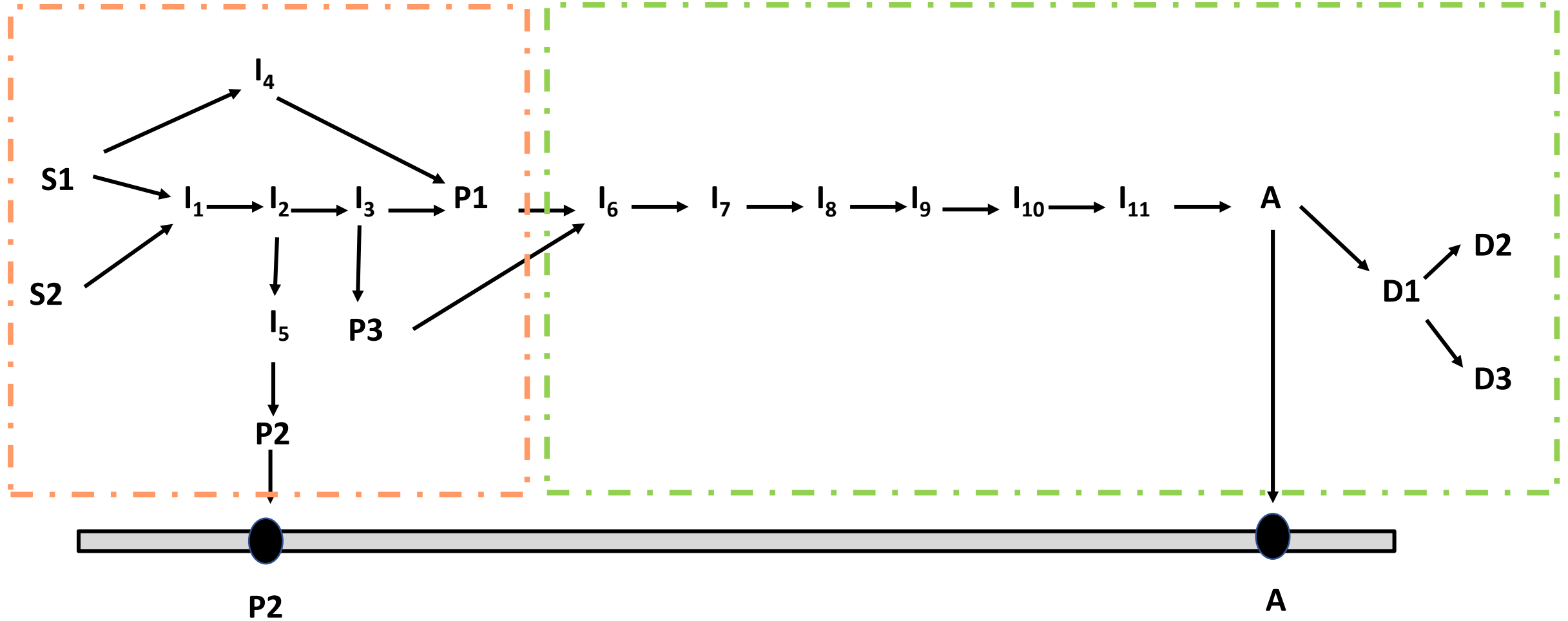
Une grande diversité métabolique et de nombreuses spécificités



# INTERÊT DES MICROORGANISMES EN BIOTECH

Métabolisme primaire

Métabolisme secondaire



# INTERÊT DES MICROORGANISMES EN BIOTECH

## Différents types de métabolites produits par les microorganismes

### Métabolites primaires

- Synthétisé pendant toute la croissance
- Présence tout au long du cycle cellulaire
- **Nécessaire à la croissance**
- « Turn over » élevé
- Ubiquitaire
- Voies de synthèse simples et courtes
- Concentrations élevées

AA, nucléotides...  
Produits du métabolisme énergétique  
(éthanol, acide acétique..)

### Métabolites secondaires

- Synthétisé lors des phases de ralentissement et stat
- Apparition à un moment du cycle cellulaire
- Production dépendante des conditions environnementales
- **Inutile pour la croissance**
- « Turn over » pratiquement nul
- Spécifique
- Voies de synthèse longues et complexes
- Concentrations faibles

Antibiotiques...  
Rôle écologique



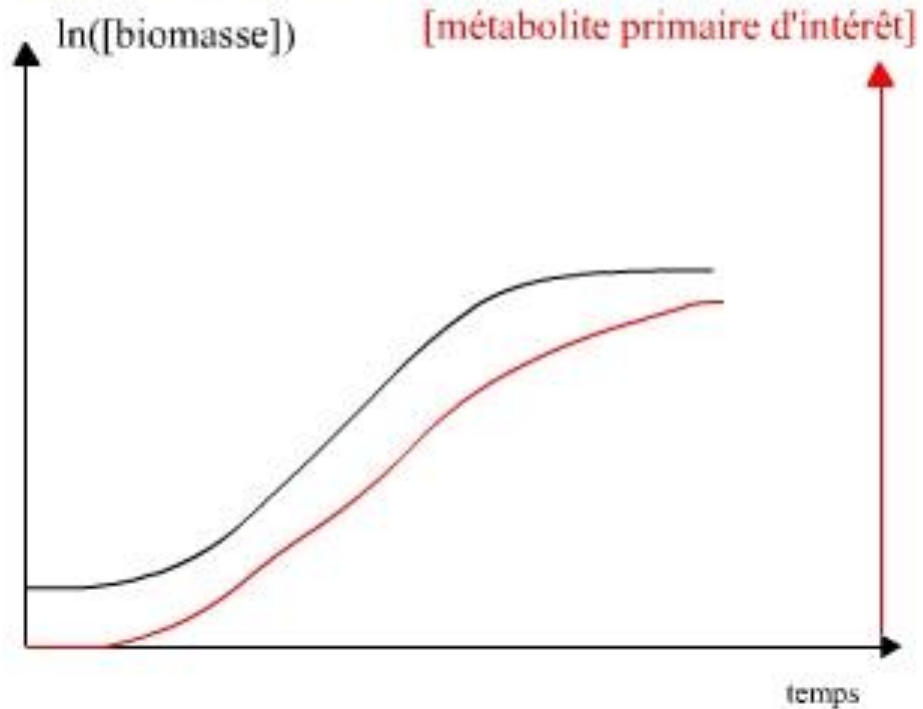
# INTERÊT DES MICROORGANISMES EN BIOTECH

## Différents types de métabolites produits par les microorganismes

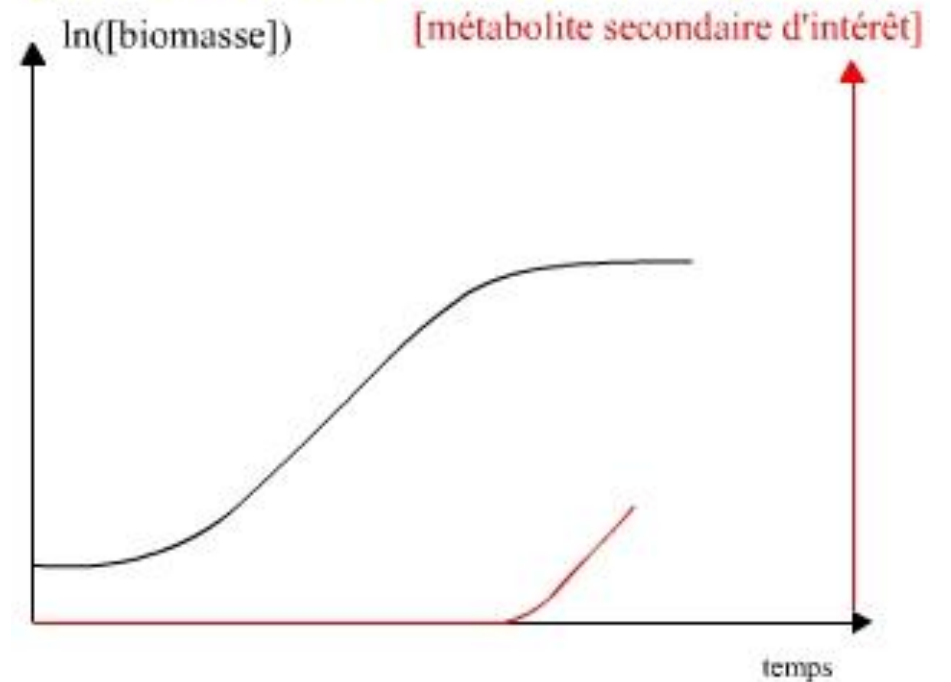
Métabolites primaires

Métabolites secondaires

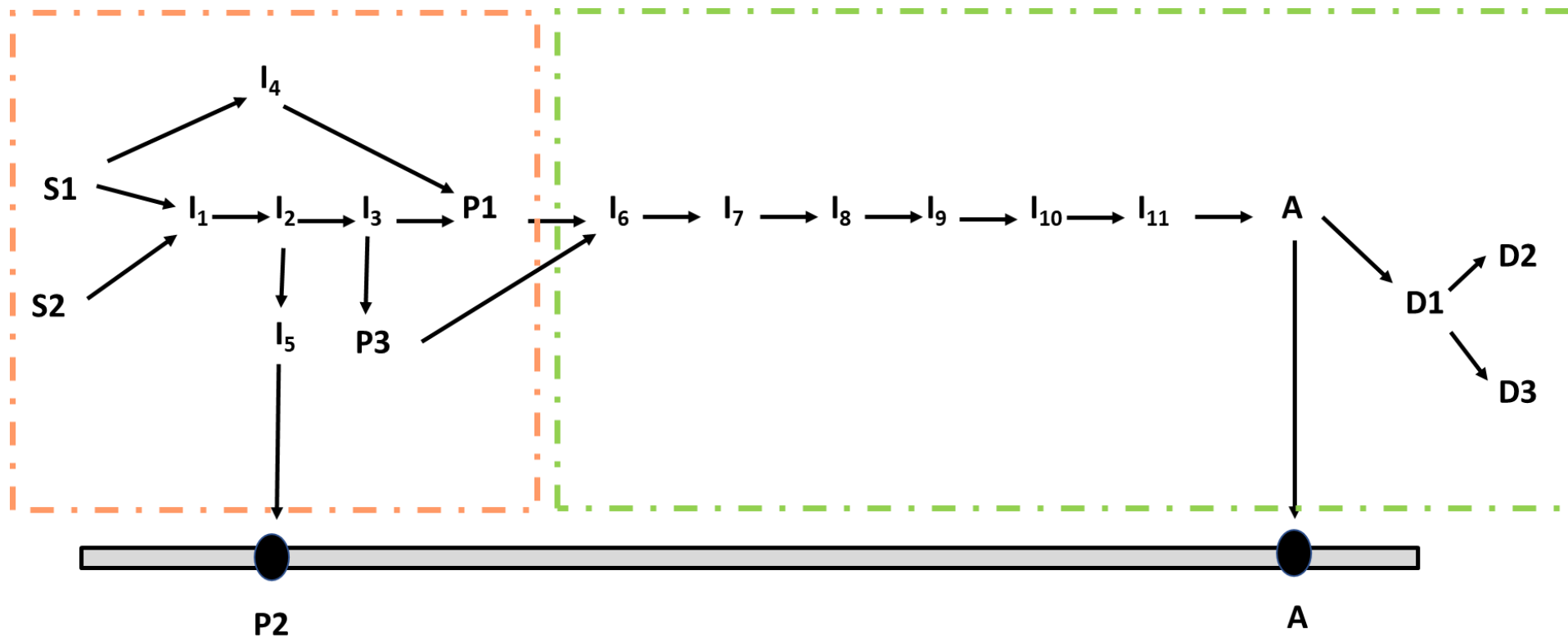
**Modèle de base  
pour une culture non renouvelée (batch)**



**Modèle de base  
pour une culture non renouvelée (batch)**



# AMELIORER LA PRODUCTION



- Observer ce que produit la nature
- Comprendre les mécanismes biologiques naturels
- Améliorer la production

Quels leviers????

- Conditions physiologiques, ou procédé
- Modifier génétiquement la souche
  - En supprimant les voies « parasites »
  - En augmentant la biosynthèse de précurseurs
- Sélection de mutants après mutagénèse aléatoire

# EXEMPLES

- Agriculture

*Bacillus thuringiensis* et les biopesticides

- Alimentation

Bactéries lactiques et aliments fermentés

*Corynebacterium glutamicum* et production de glutamate

- Santé/médecine

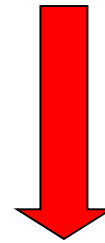
Streptomyces et production d'antibiotiques

**Quel type de métabolisme?  
Comment améliorer la production?**

## *Bacillus thuringiensis (Bt) et les biopesticides*

Bactérie Gram-positive du sol

Biopesticide naturel  
(Crystal : endotoxine)



Chenille

Piéride  
Noctuelle  
Tordeuse  
Teigne  
Processionnaire

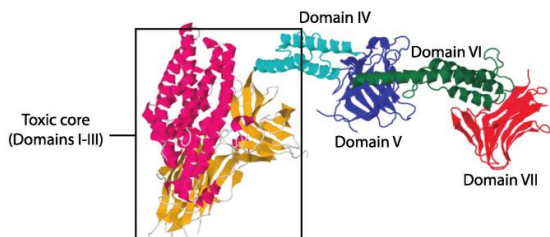
Sporéine: insecticide commercialisé en 1938





# BIOTECHNOLOGIES ET AGRICULTURE

Crystal : endotoxine  
(protoxine inactive)

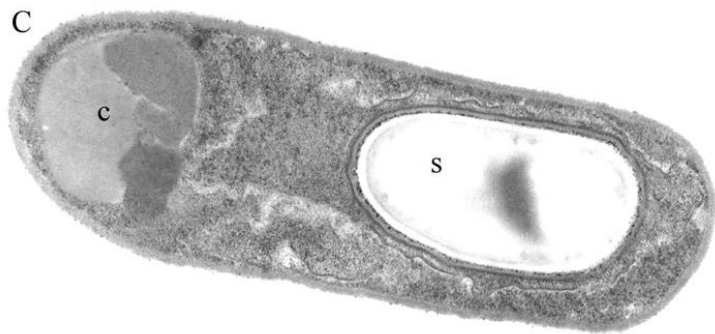


Comment ça marche

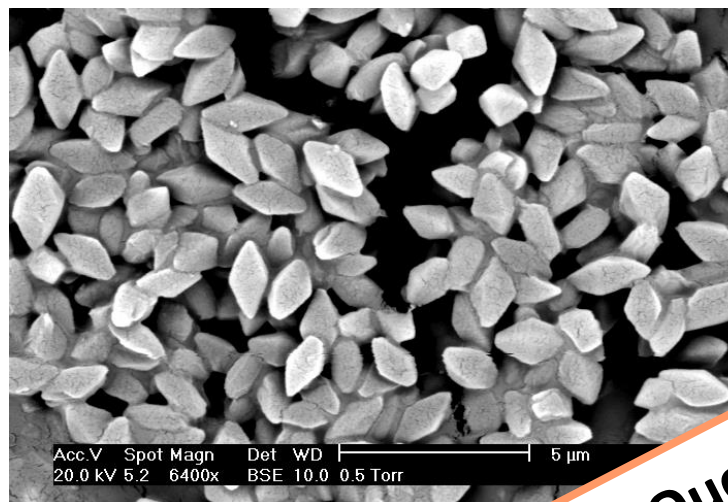
Bactérie Gram-positve du sol

Plus de 100 000 souches *B thuringiensis*

Spores



source: Dr. J.-F. Charles, Institut Pasteur, Paris



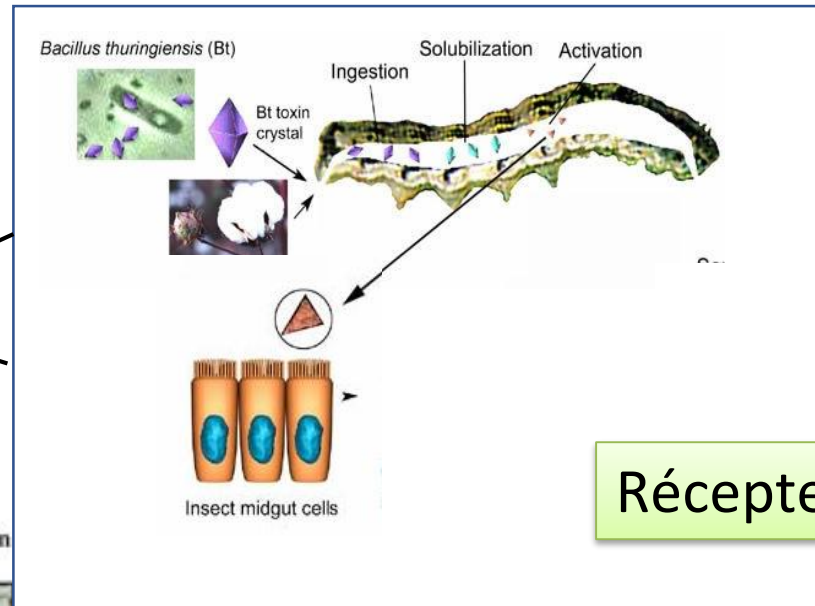
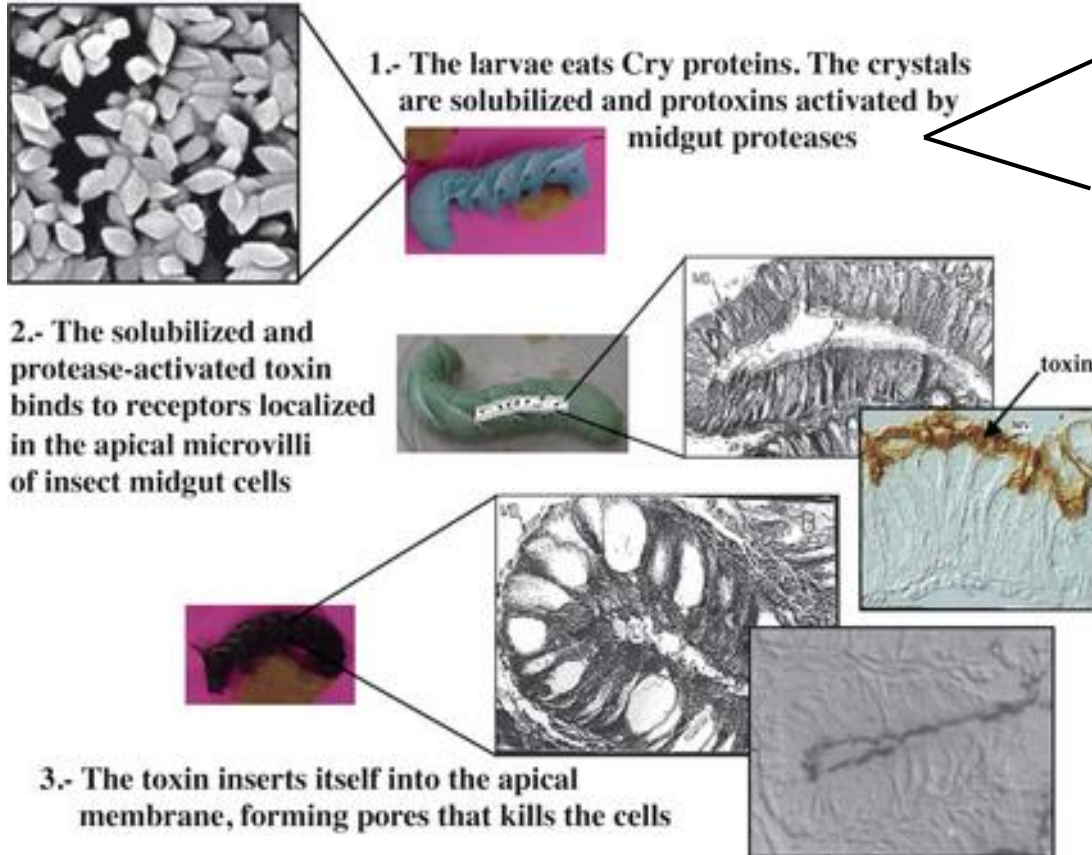
Quel type de métabolisme?  
Comment améliorer la production

Cry monomer (~1100 aa) = protéine active = **métabolite secondaire**

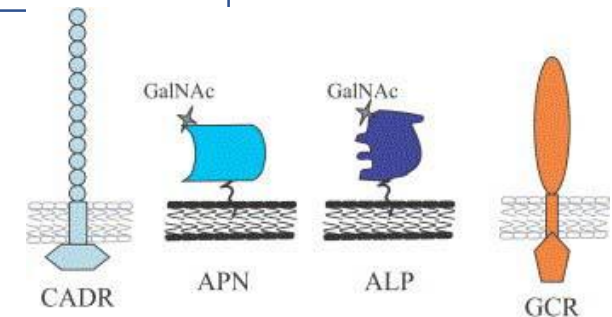
**Toxine Cry et chenilles:  
Une histoire impossible!**

# BIOTECHNOLOGIES ET AGRICULTURE

## Mechanism of action of Cry toxins at cellular level

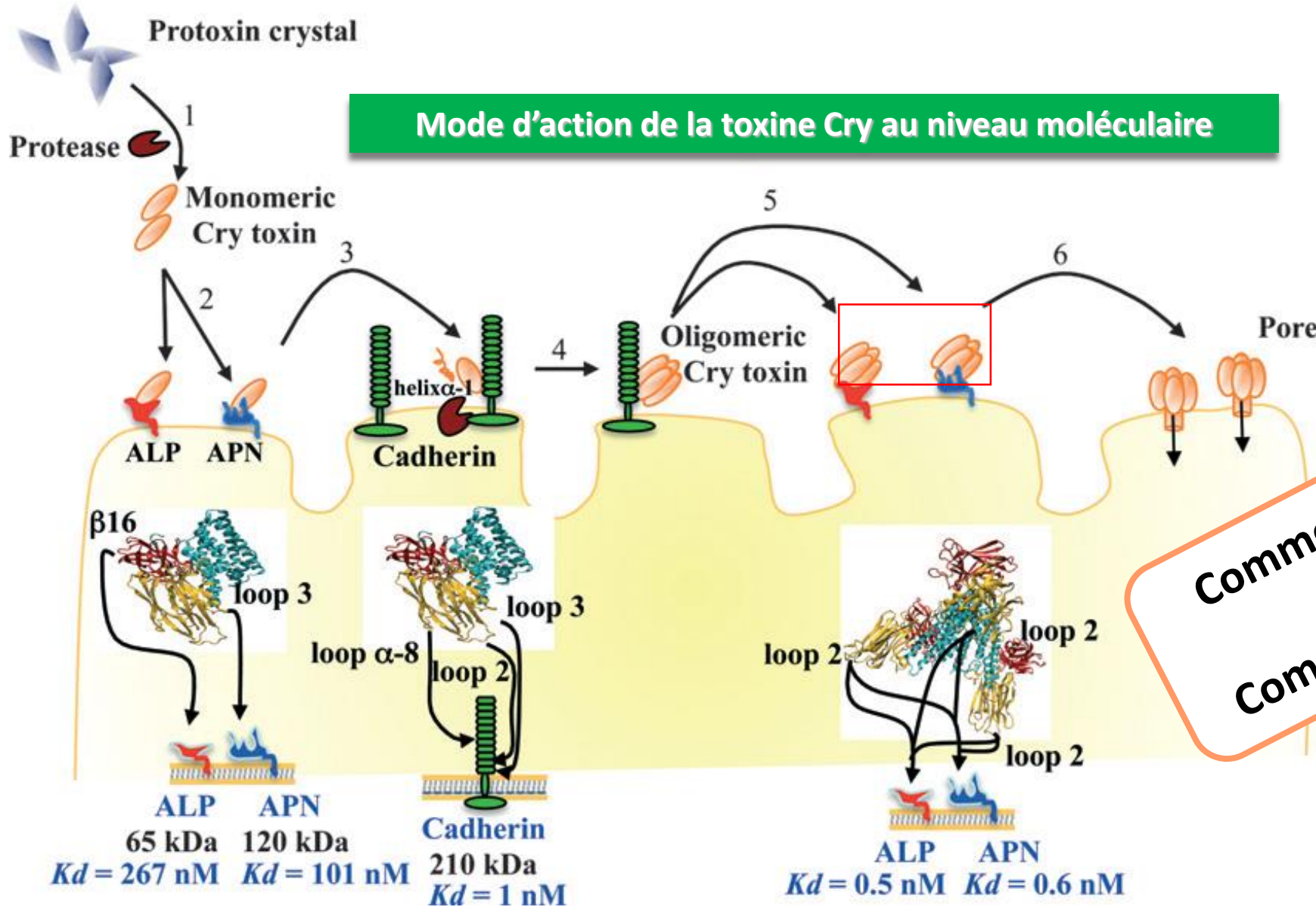


## Récepteurs de » Cry1A »



CADR: Cadherine like  
 APN: aminopeptidase  
 ALP: alkaline phosphatase  
 GCR: glycoconjugué de 270 kDa

# BIOTECHNOLOGIES ET AGRICULTURE



Comment utiliser ce mécanisme naturel en biotech?  
Comment le rendre plus efficace?



# EXEMPLES

● Agriculture → *Bacillus thuringiensis* et les biopesticides

● Alimentation → Bactéries lactiques et aliments fermentés

→ *Corynebacterium glutamicum* et production de glutamate

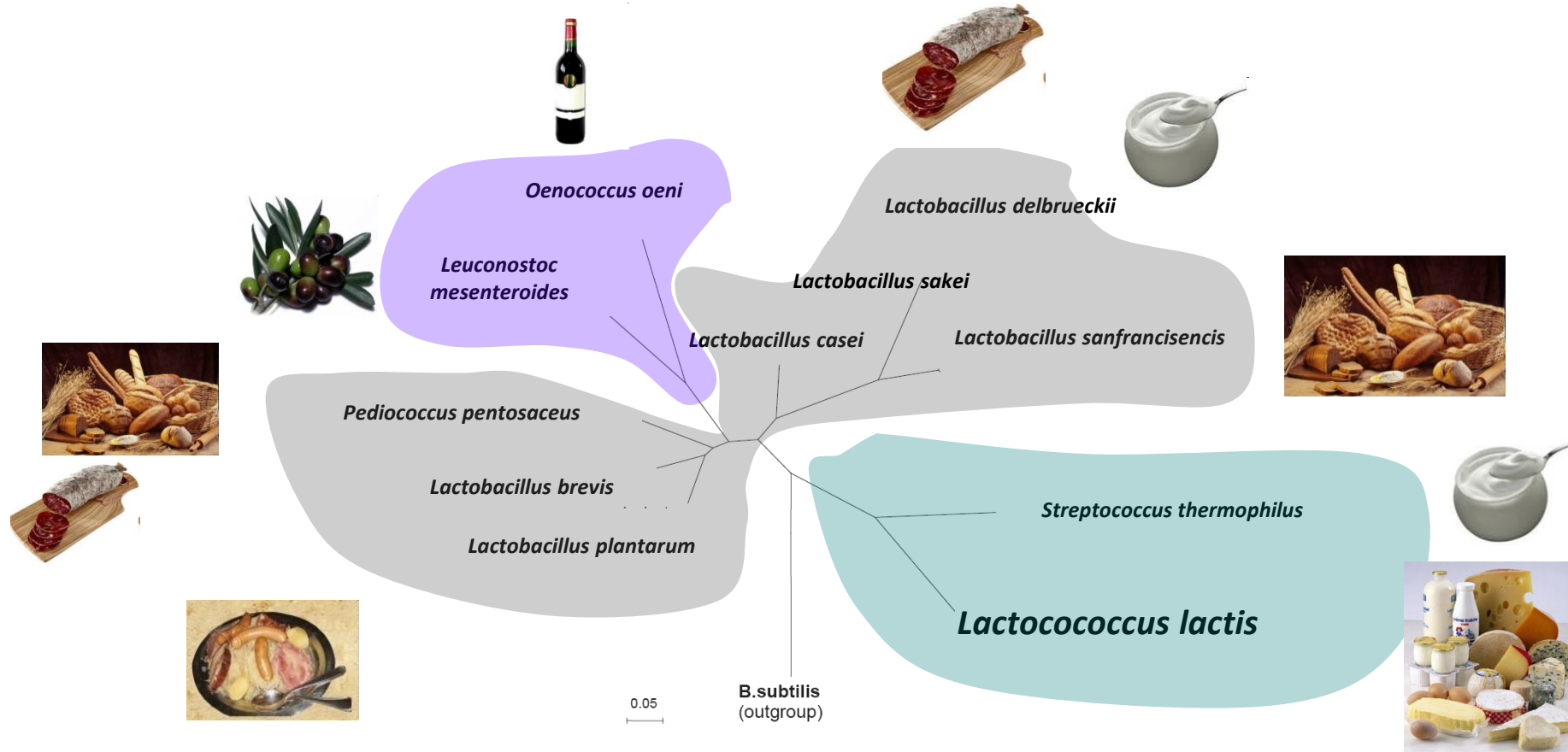
● Santé/médecine → Streptomyces et production d'antibiotiques

**Quel type de métabolisme?  
Comment améliorer la production**



# BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

Lactic Acid Bacteria = organismes GRAS (Generally Recognized As Safe)



Arbre phylogénétique des bactéries lactiques

## Le rôle des bactéries lactiques pour la production d'aliments fermentés

### ● Conservation des aliments

- Abaissement du pH après formation acide organique
  - \* Choucroute
- Préservation de contaminations bactériennes



Fermentation lactique

Production de bactériocines

### ● Amélioration de la digestibilité

- Hydrolyse enzymatique



\* Saucisse

Protéolyse

### ● Révélateur de goût

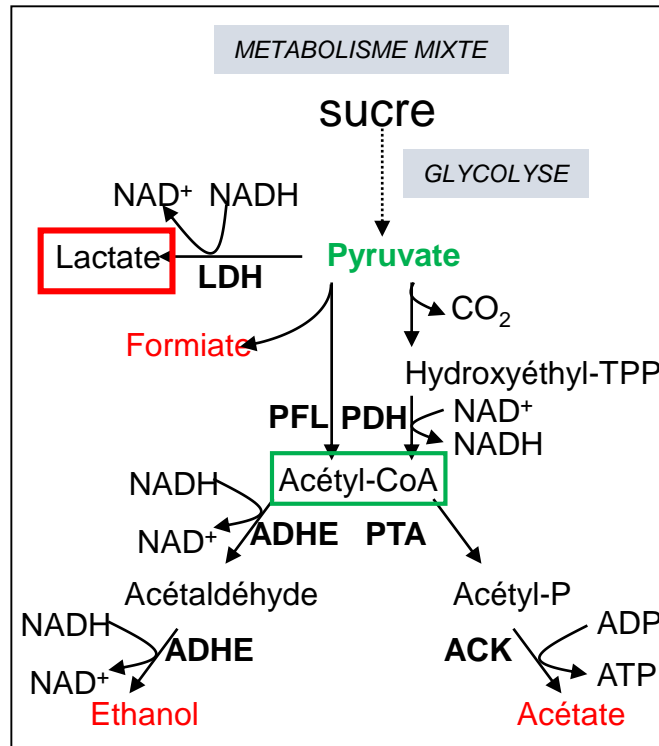
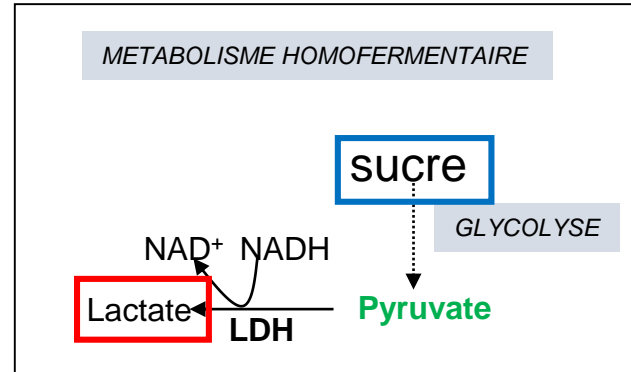
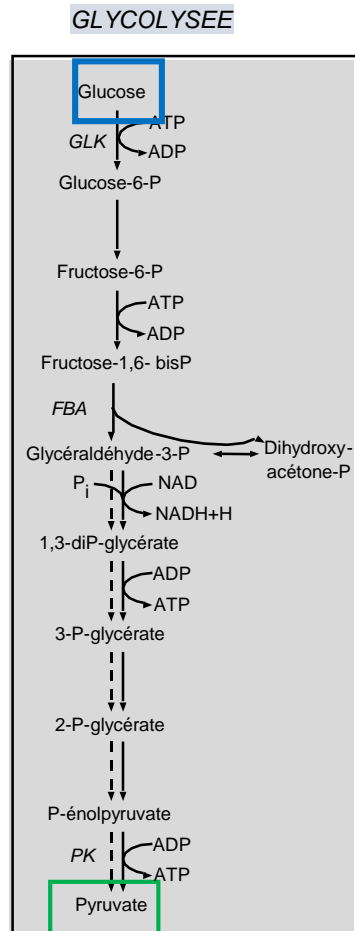
- Métabolisme des Acides Aminés
- Métabolisme des Acides gras
- Métabolisme du citrate (Diacétyl/ acétoïne)



Arômes

# BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

## La fermentation lactique pour conserver les aliments



La fermentation est dite homolactique si au moins 90% du glucose consommé est converti en lactate

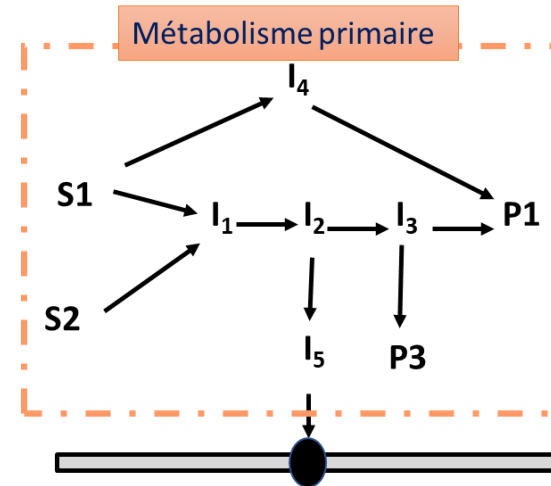
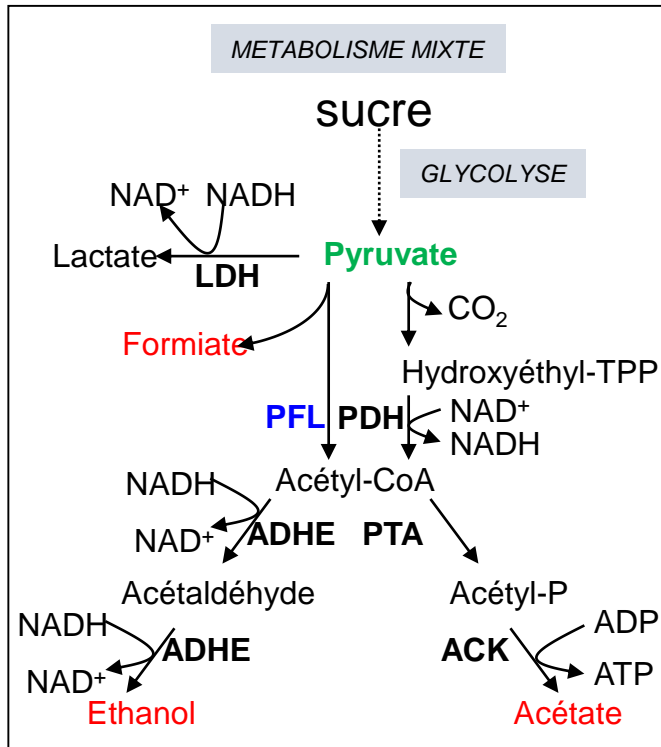
**1 glucose → 2 lactate + 2 ATP**  
✓ métabolisme homofermentaire:  
*Lactococcus, Pediococcus, Lactobacillus*

Parfois on peut avoir un métabolisme mixte. Ceci dépend des conditions de croissance

Le pyruvate est converti en Acétyl-CoA par PFL ou PDH

# BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

## Comment réorienter un métabolisme mixte vers un métabolisme homofermentaire?



- **Conditions physiologiques**

- « Augmenter » le rendement de la glycolyse
- En aérobiose, la PFL est inhibée par l'oxygène
- En anaérobiose, la PDH est inhibée par le ratio  $NADH/NAD$  et production de formiate

- **Modifier génétiquement la souche**

- Déleter le gène codant la PFL et la PDH
- Surexprimer le gène codant la LDH



# BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

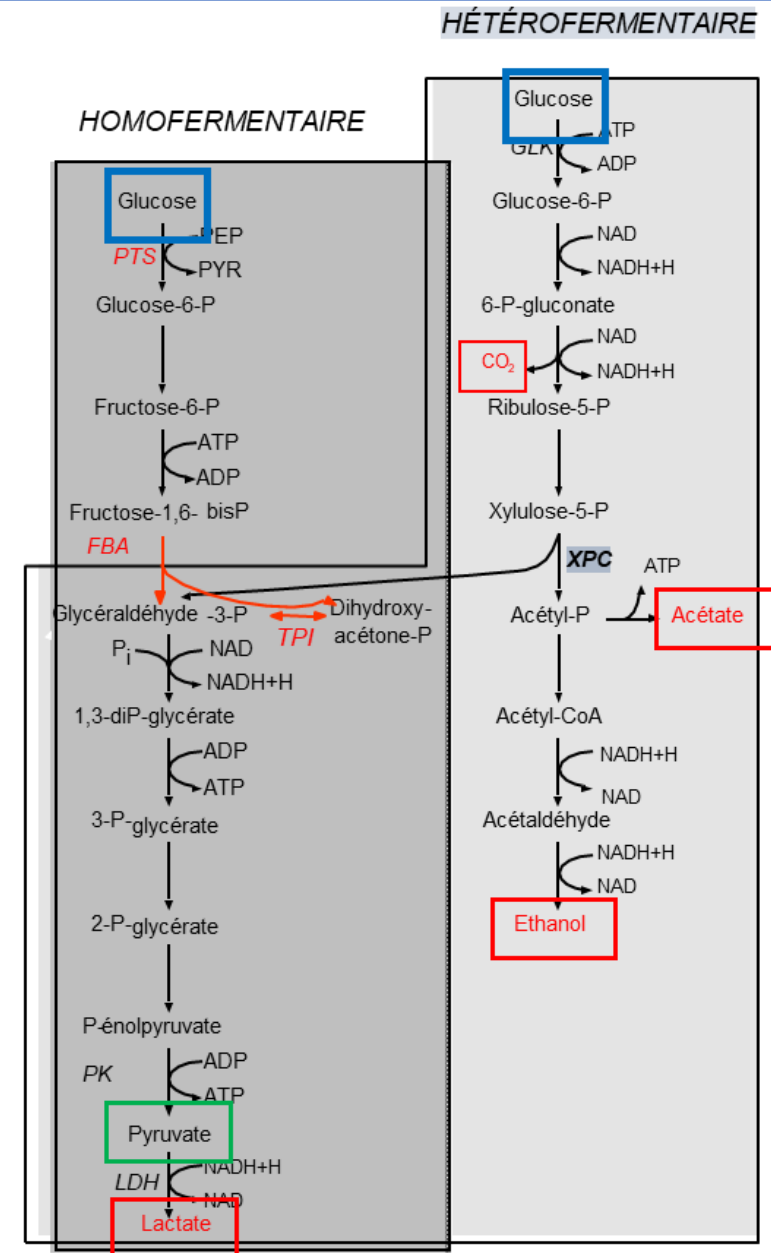
## La fermentation lactique

Lorsqu'il y a absence de FBA, TPI (et de PTS en général)  
On a un métabolisme hétérofermentaire

1 glucose → 1 lactate + 1 éthanol + 1 acétate + 1 CO<sub>2</sub> + 1 ATP

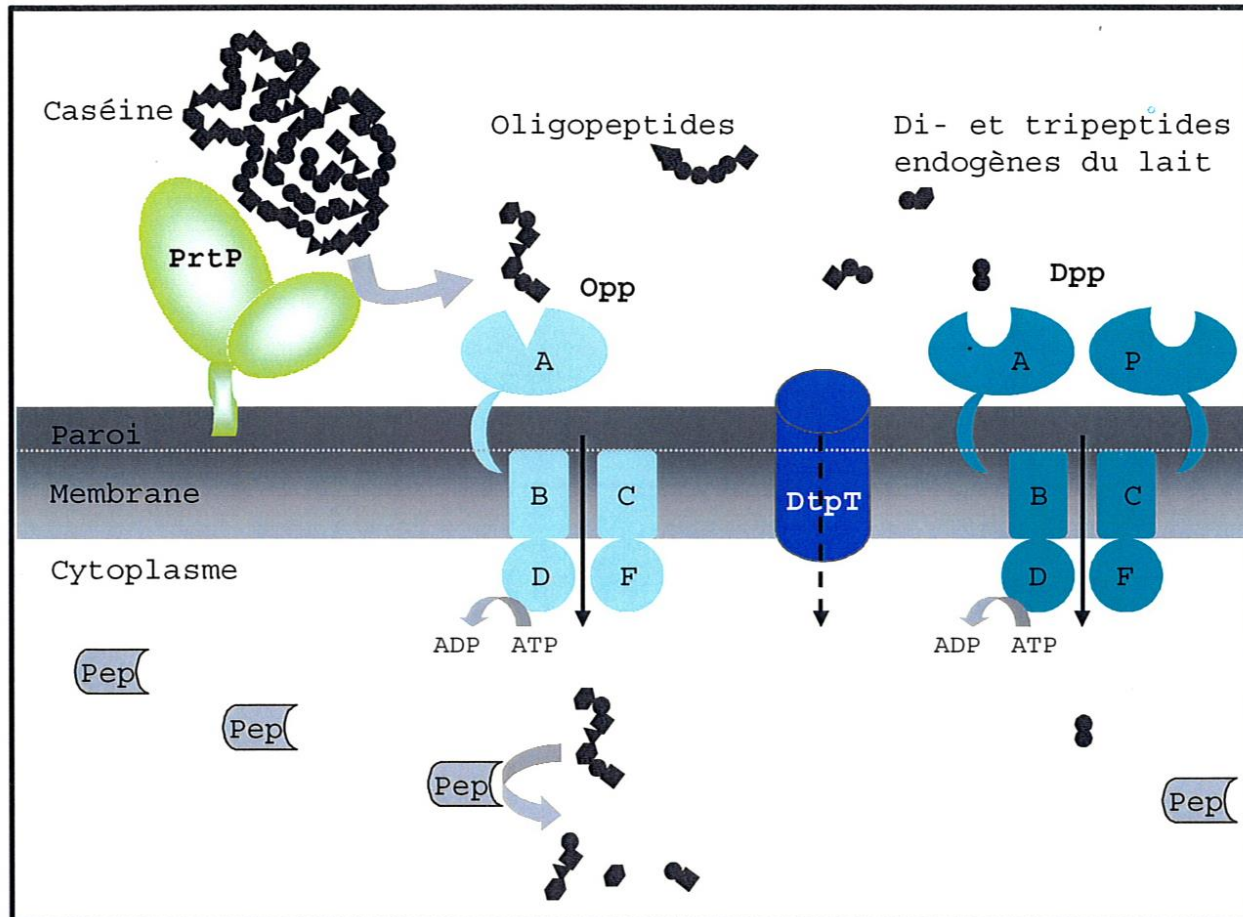
- ✓ métabolisme hétérofermentaire:  
*Leuconostoc, Lactobacillus*

Métabolisme primaire



## La protéolyse

Cas de la bactérie *Lactococcus lactis* dans le lait



✓ **Protéase de paroi: Prt (P ou S ou B)**

✓ **Transporteur(s) d'oligopeptides: Opp**

✓ **Transporteurs de di- et tri-peptides: Dpp, Dtpt**

✓ **Peptidases cytoplasmiques: Pep**

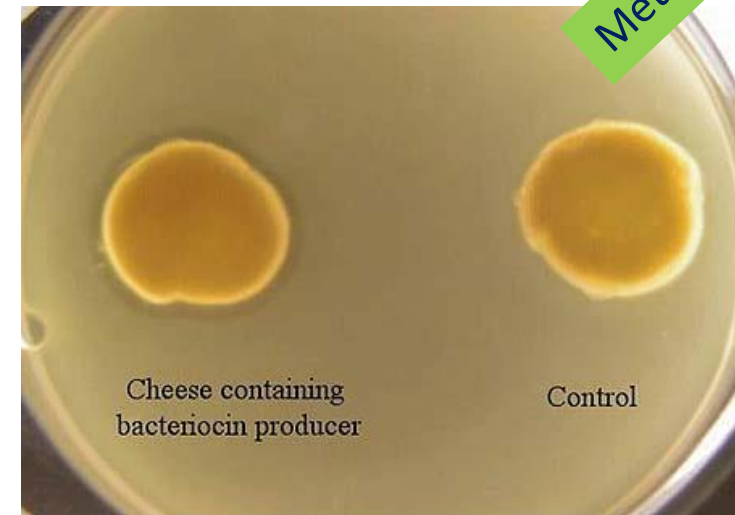
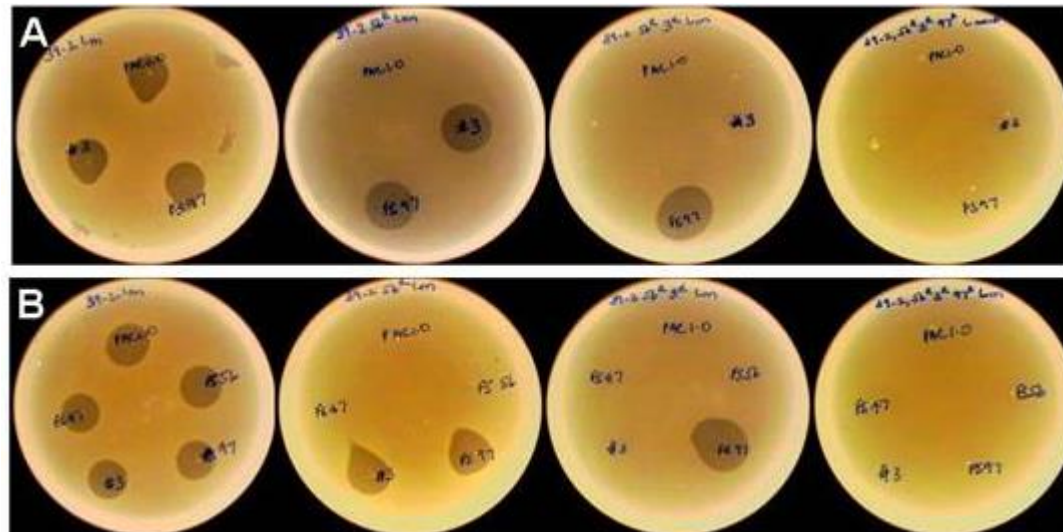
Métabolisme primaire

## La production de bactériocines et la conservation des aliments

Les bactériocines se définissent comme des protéines ou complexes de protéines avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice

Les bactériocines de bactéries lactiques ont une activité contre les bactéries Gram+ (anti-listeria par ex)

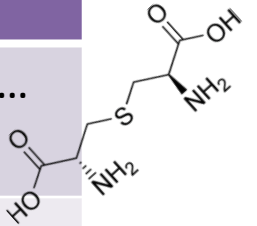
Métabolisme secondaire





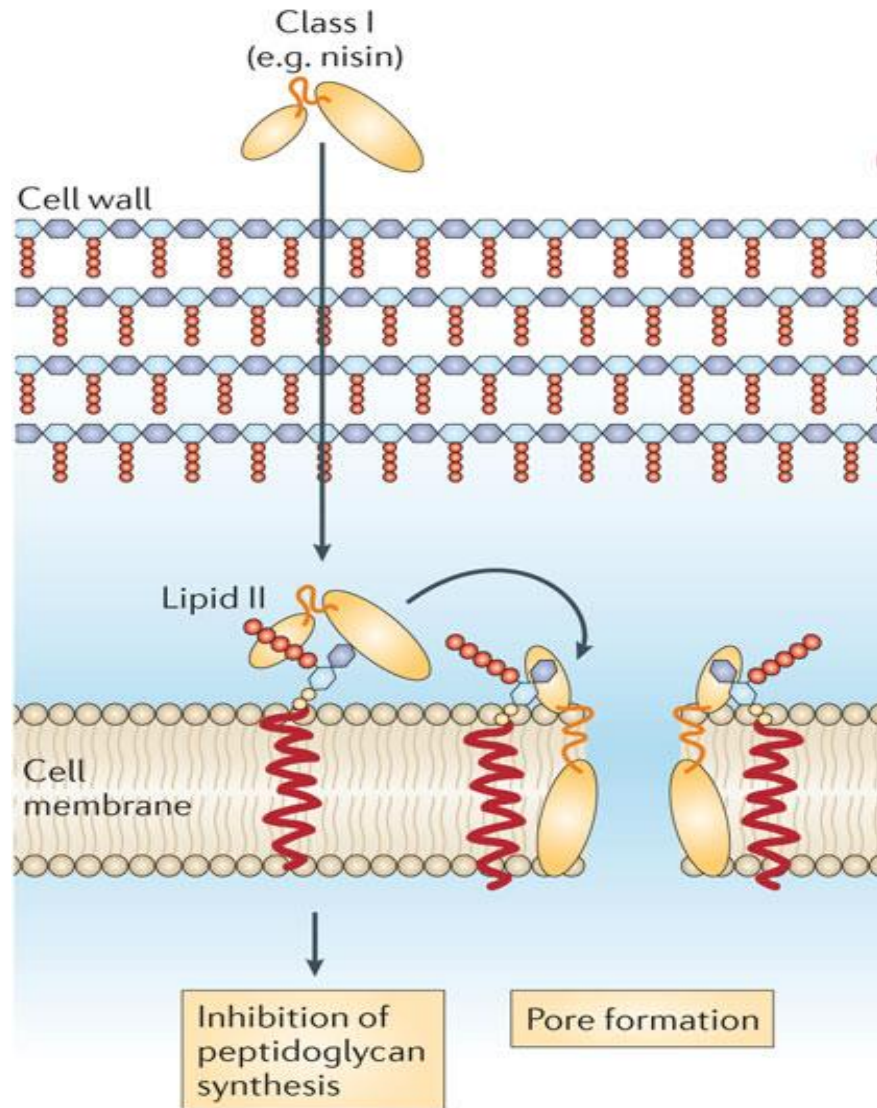
## Classification des bactériocines (d'après Klaenhammer, 1993)

CLASSE	DEFINITION	TYPE	CARACTERES PARTICULIERS
I	-petits peptides < 5kDa (lantibiotiques)	-Nisine <b>E 234</b> -Lacticine	-acides aminés inhabituels, lanthionine...
II	-petits peptides < 10kDa	-Pédiocine -Lactococcine	-Résistant à la chaleur -ponts disulfures
III	-grandes protéines > 30kDa sensibles à la chaleur	-Helveticine	
IV	-bactériocines complexes avec entités non protéiques		-Existence controversée





## a Gram-positive targets



## La mode d'action de la nisine

Comment augmenter l'effet  
« bio-protecteur » ?

# BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

## La production d'arômes

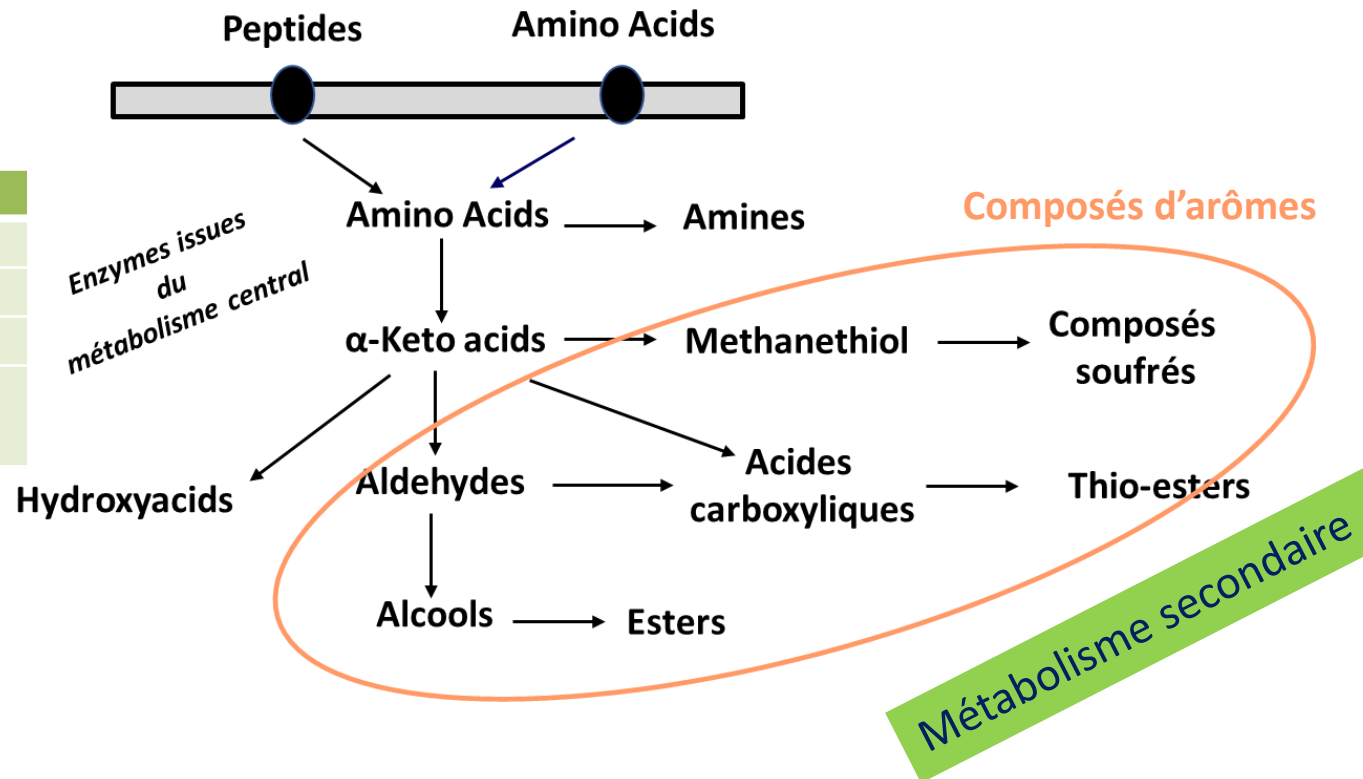
### ✓ Dégradation des protéines

Goût	Acides Aminés
Amer	L-Trp, L-Phe, L-Leu, L-Ile, L, Arg, L-His
Sucré	L-Pro, L-Met
Salé	Gln (Lys, Pro, Glu)
Umami (gout "bouillon de poule")	Sels de sodium d'Asp et Glu

Métabolisme primaire

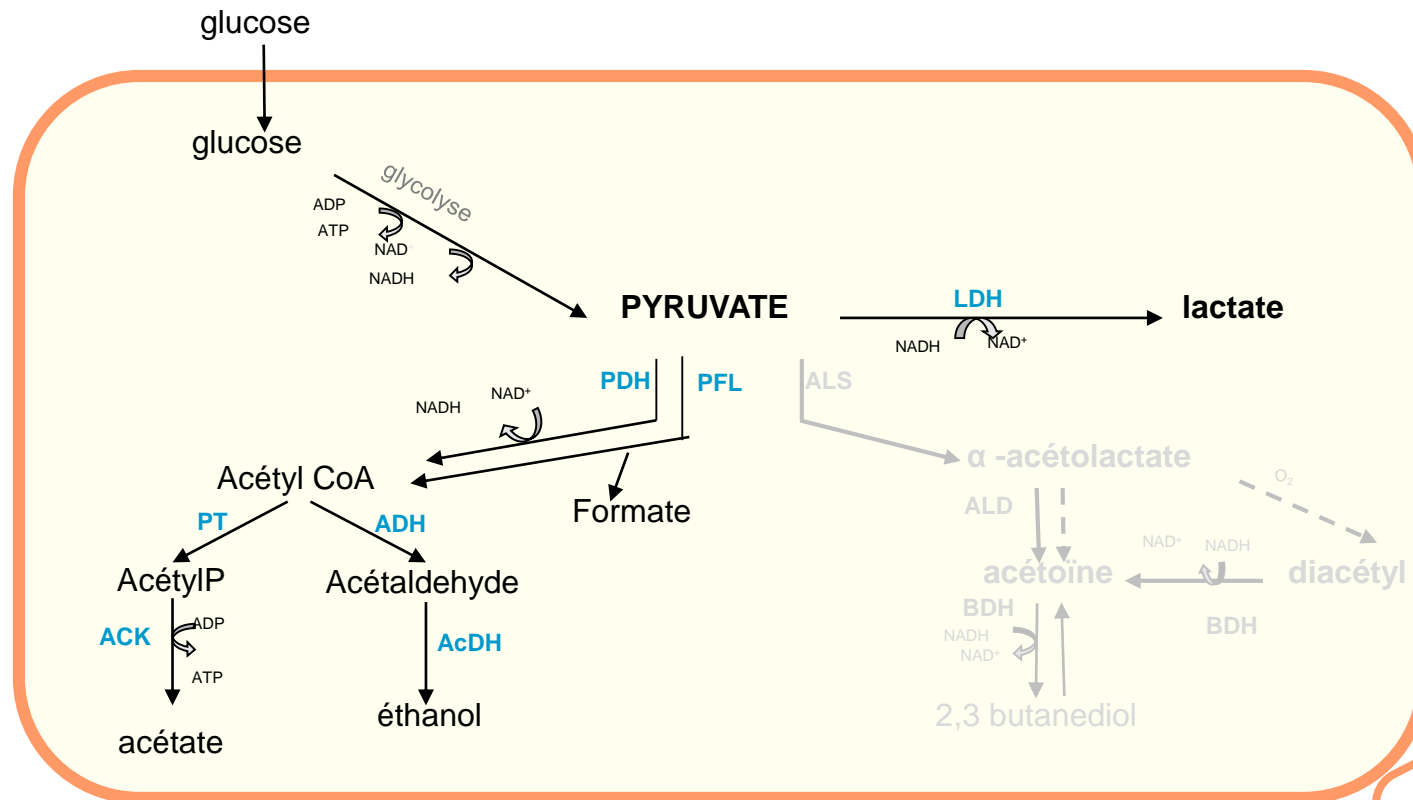
### ✓ Métabolisme des lipides

### ✓ Dégradation des acides aminés



# BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

## Le métabolisme du citrate et la production d'arômes diacétyl/acétoïne

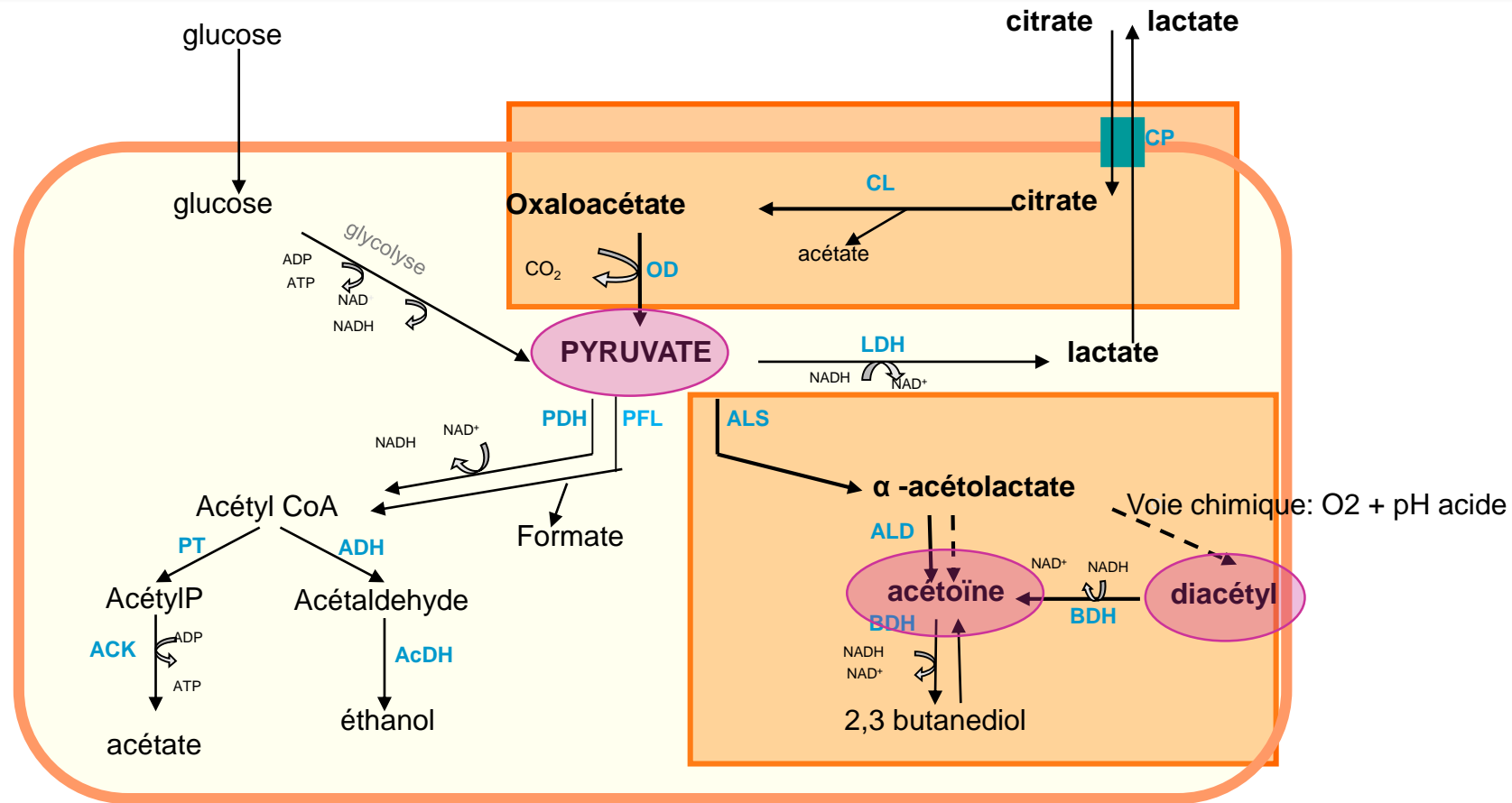


Diacétyl/acétoïne  
=  
Goût de beurre

Comment augmenter la production de diacétyl?

# BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

## Le métabolisme du citrate et la production d'arômes diacétyl/acétoïne



Diacétyl/acétoïne  
=  
Goût de beurre

- ✓ L'utilisation de la voie métabolique « citrate » va permettre l'augmentation du pool de pyruvate
- ✓ Le pyruvate en excès va se répartir dans la voie diacétyl



# BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

## Exemple de produit fermenté: le yaourt



Le Yaourt

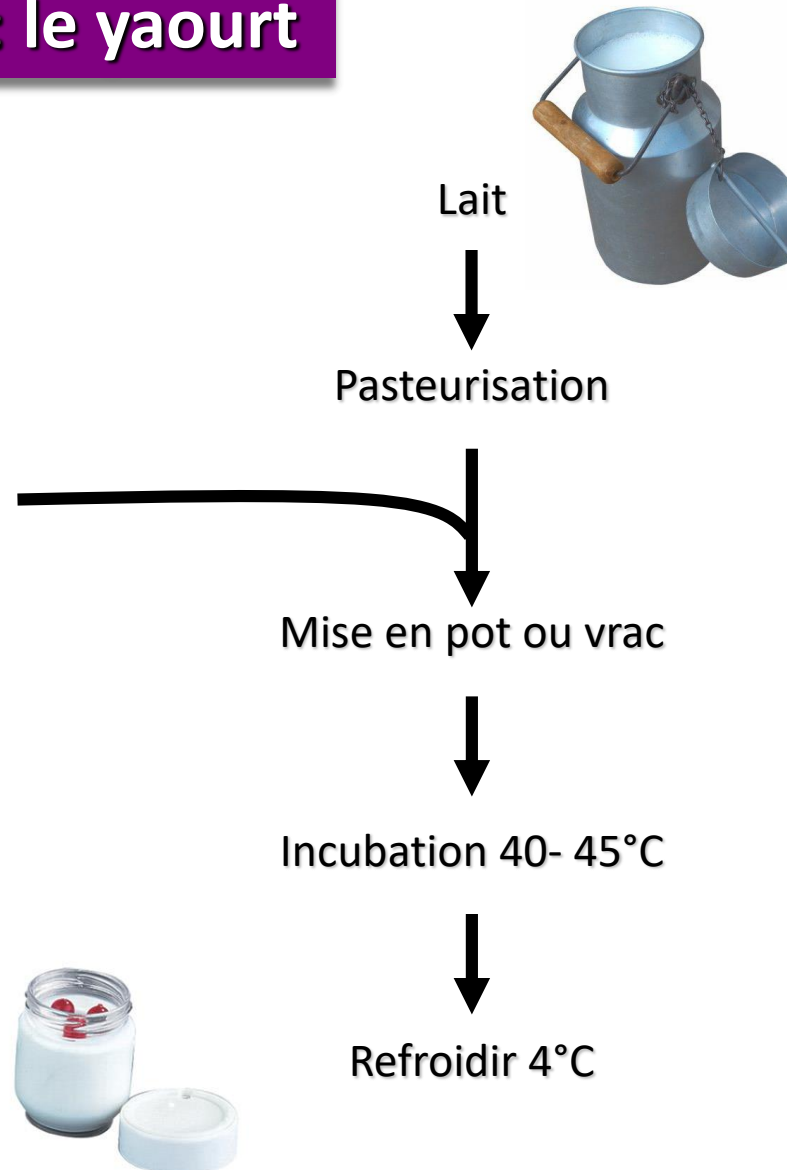
Culture de démarrage

*L. bulgaricus*  
*S. thermophilus*

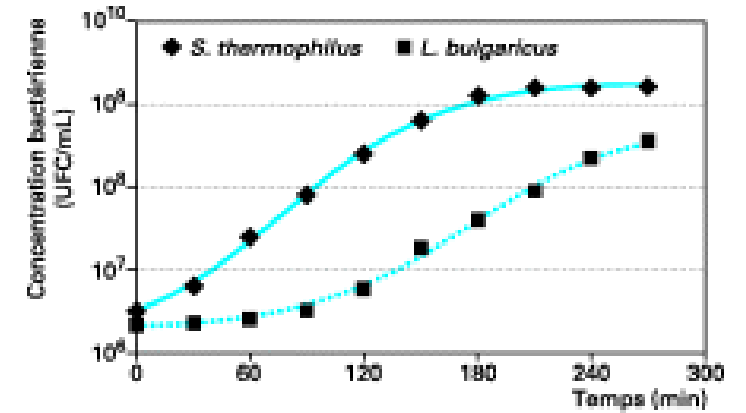
(Protocoopération)

$10^8$ - $10^9$  CFC/mL

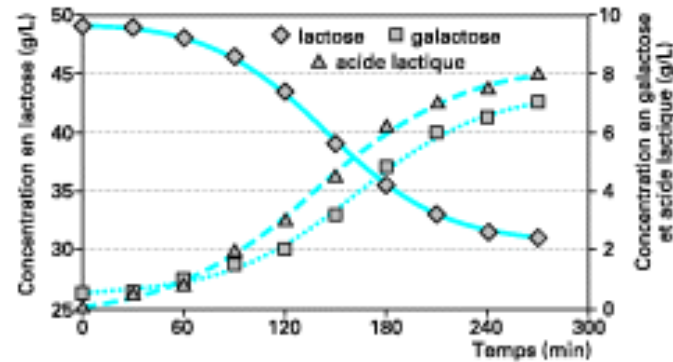
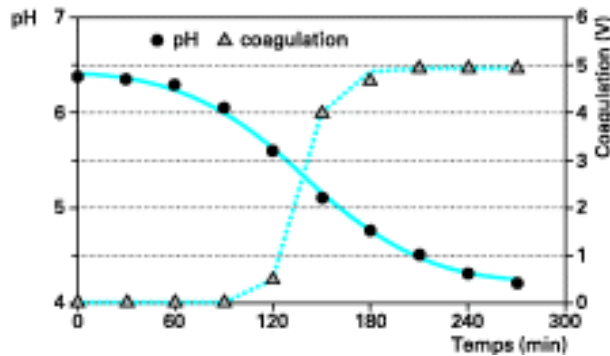
Teneur minimale en ac lactique: 0,7%



## Les cinétiques de production du yaourt



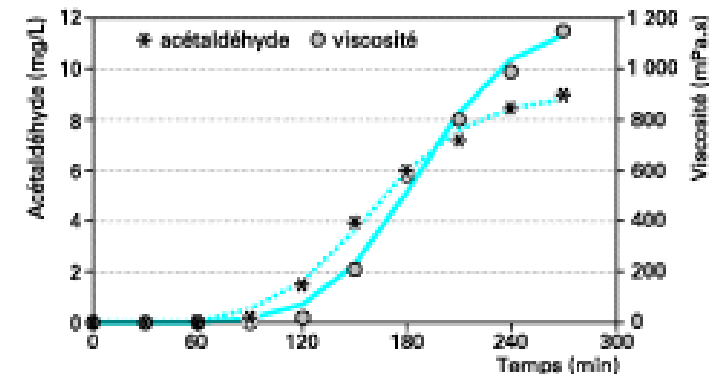
Pourquoi ça coagule?



C'est *S. thermophilus* qui commence!

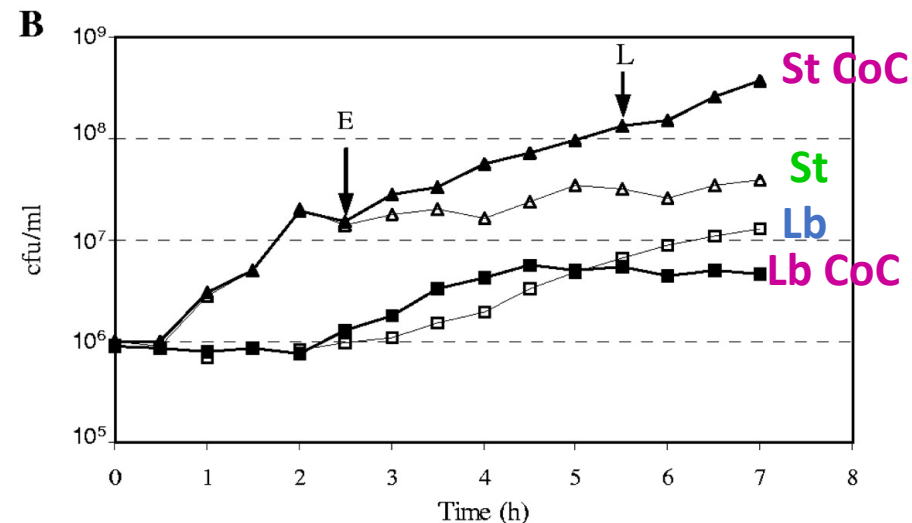
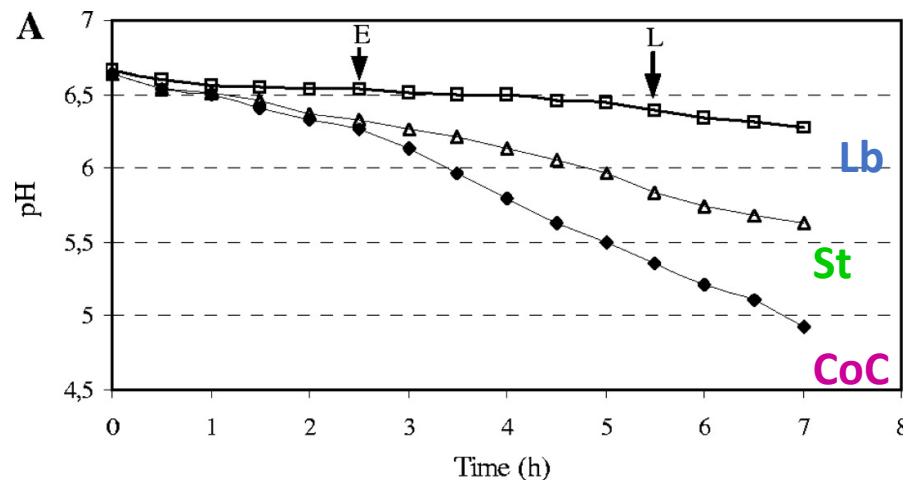
Le yaourt est onctueux: vive les exopolysaccharides

Le yaourt a bon goût: vive l'acétaldéhyde!



## La protocoopération entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*

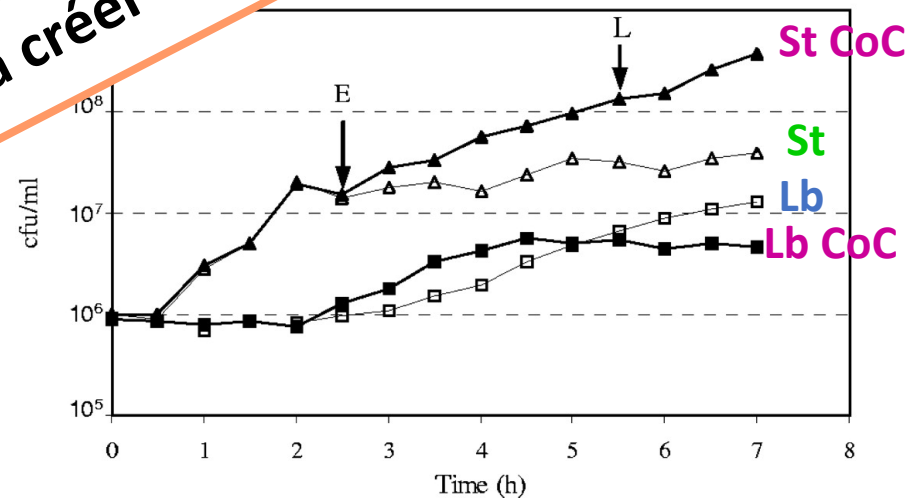
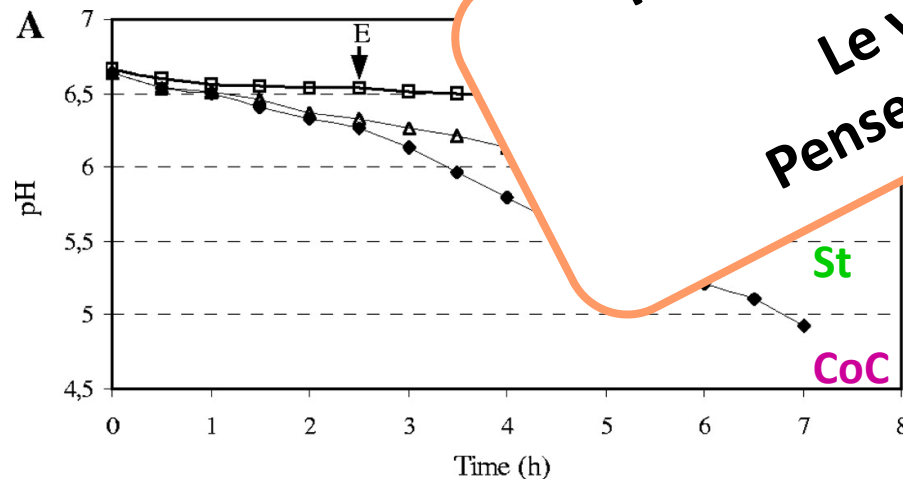
- Accroissement des vitesses de croissance et des concentrations bactériennes finales
- Diminution du pH final du produit en culture mixte
- Augmentation des vitesses d'acidification par rapport aux vitesses observées en cultures pures
- Stimulation de composés d'arômes
- Accroissement de l'activité protéolytique
- Production accrue de composés tels que les EPS



## La protocoopération entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*

- Accroissement des vitesses de croissance et des concentrations
- Diminution du pH final du produit en culture mixte
- Augmentation des vitesses d'acidification par rapport aux souches pures
- Stimulation de composés d'arômes
- Accroissement de l'activité protéolytique
- Production accrue de composés aromatiques

Pensez à la coopération entre souches pour augmenter les effets.  
Le yaourt en est un bel exemple  
Pensez à créer des consortia microbiens



# EXEMPLES

- Agriculture

*Bacillus thuringiensis* et les biopesticides

- Alimentation

Bactéries lactiques et aliments fermentés

*Corynebacterium glutamicum* et production de glutamate

- Santé/médecine

Streptomyces et production d'antibiotiques

**Quel type de métabolisme?  
Comment améliorer la production**



## Production d'acides aminés

Parmi les 20 aa composants les protéines :

9

L-valine  
L-leucine  
L-isoleucine  
L-lysine  
L-thréonine  
L-méthionine  
L-Histidine  
L-tryptophane  
L-phénylalanine

ne sont pas synthétisés  
par l'homme  
et les animaux

Ils doivent être ingérés



## LE MARCHÉ DES ACIDES AMINÉS!

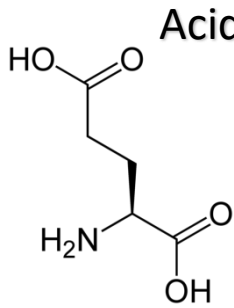
4 méthodes de production

1. Extraction à partir d'hydrolysats de protéines
2. Synthèse chimique
3. Transformation à partir de précurseurs chimiques (réactions cellulaires ou enzymatiques)

4. Utilisation de microorganismes

- Souches optimisées

## Production d'acide glutamique



Acide glutamique

**E 620 = additif alimentaire**

- 1908 : algue konbu exhausteur de goût (Japon)
- 1957 : *Corynebacterium glutamicum* (société Kyowa Hakko)
- Amélioration de *C. glutamicum*  
→ 150g/L après 60h fermentation



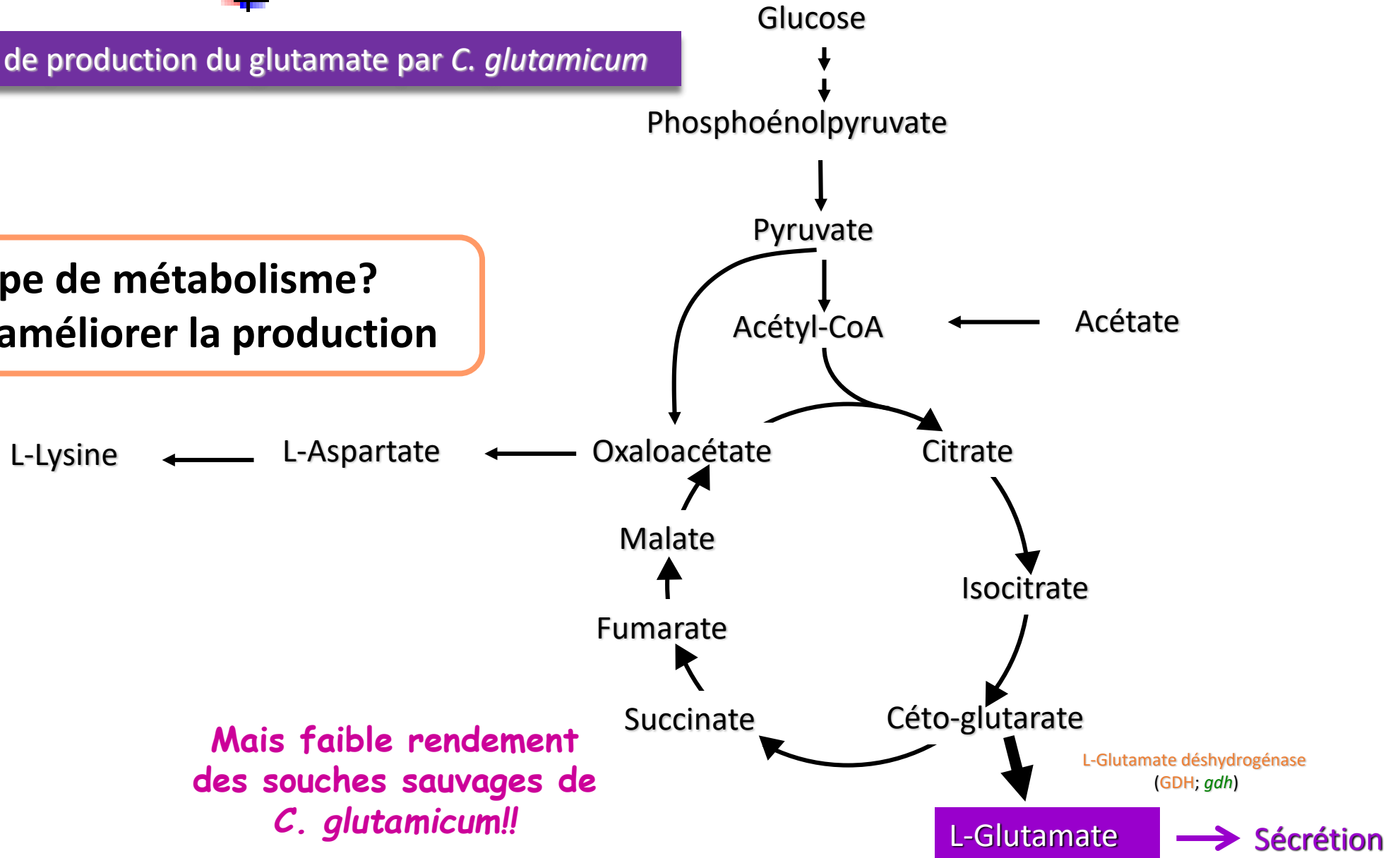
- Corynebacterium glutamicum*, ordre des Actinobacteria,
- G+ avec espace périplasmique et une enveloppe bactérienne contenant des acides mycoliques et de l'arabinogalactan,
- bactérie du sol, facile à cultiver et à modifier génétiquement et considérée comme GRAS.
- Génome: environ 3,3MB



# BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

Voie métabolique de production du glutamate par *C. glutamicum*

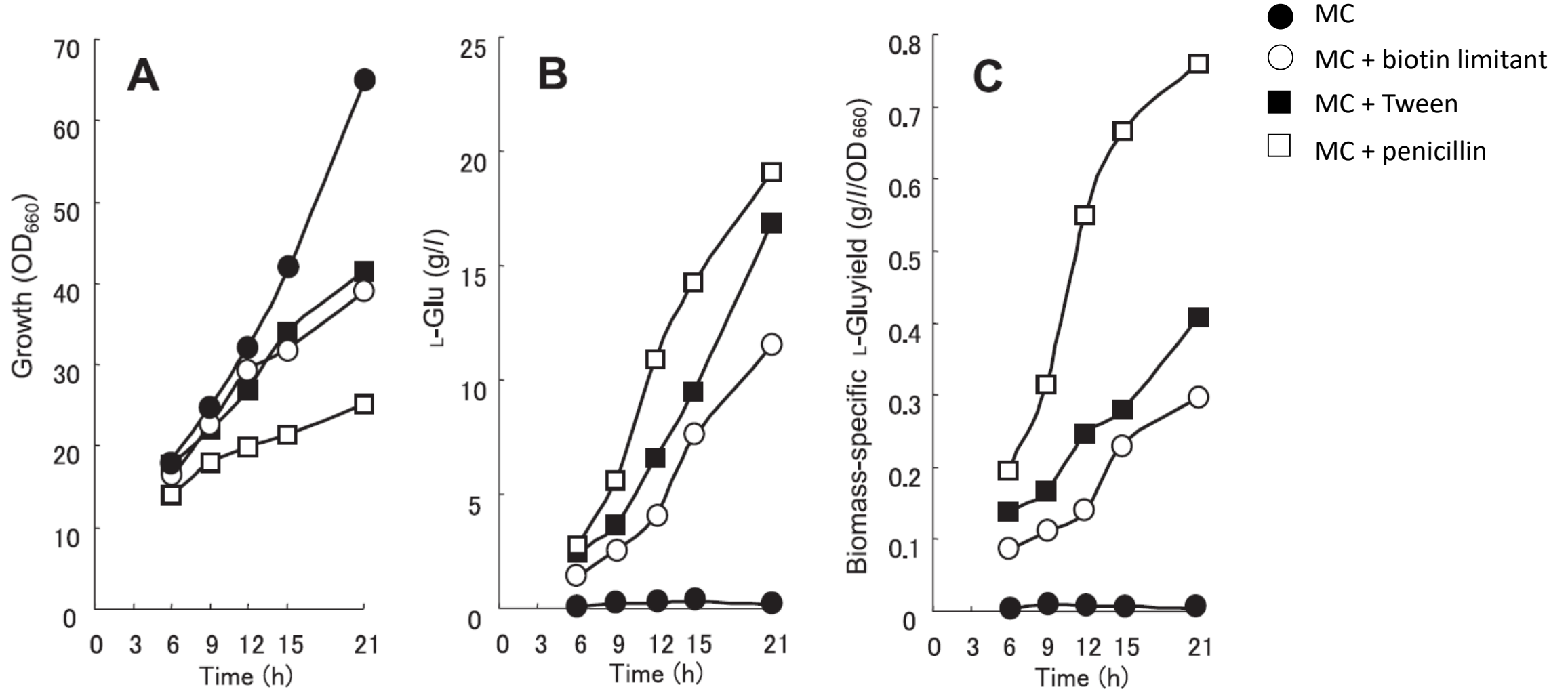
Quel type de métabolisme?  
Comment améliorer la production



# BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

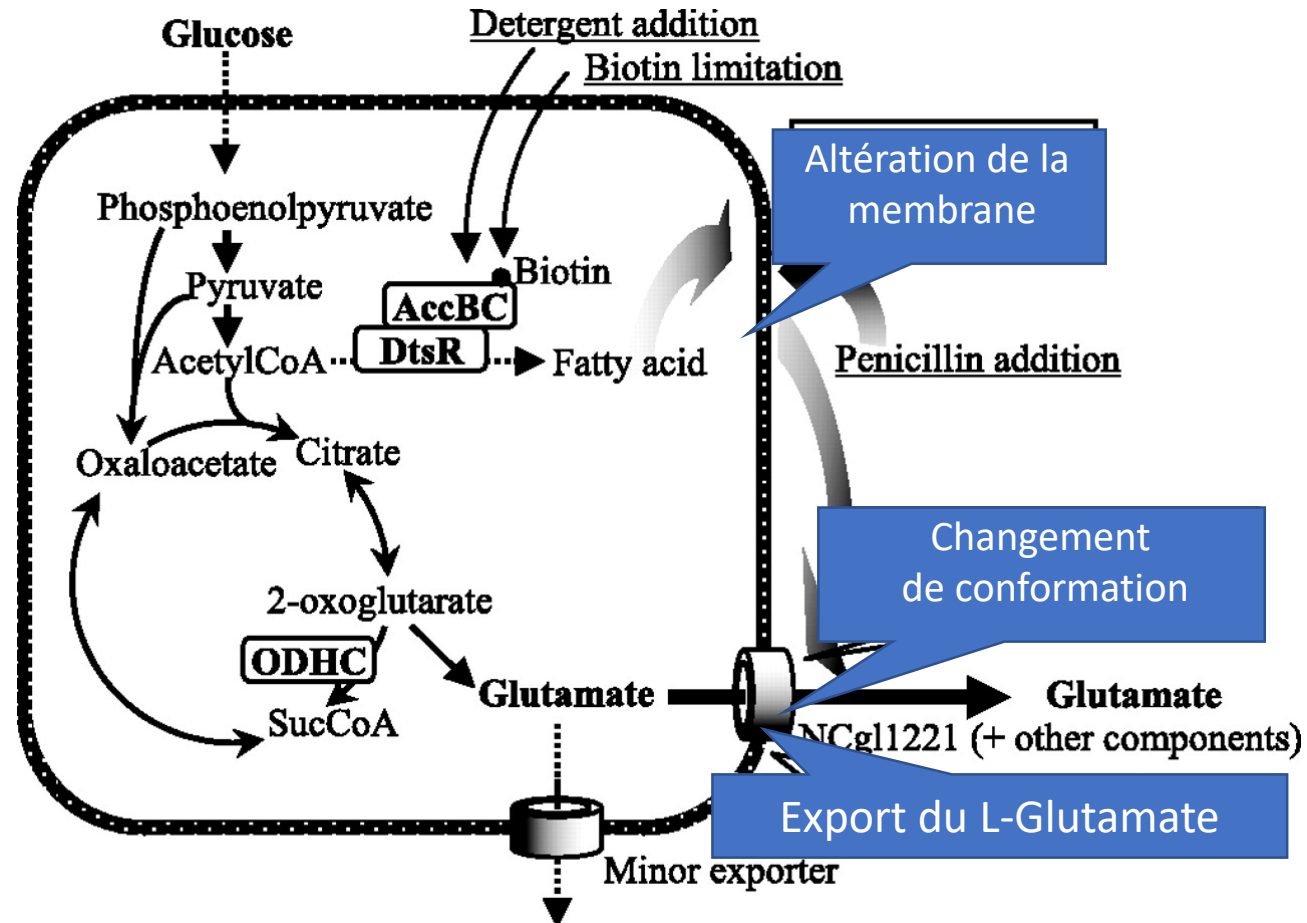


Amélioration de la production de L-Glutamate par *C. glutamicum*: approche physiologique



# BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

## La sécrétion du L-Glutamate: facteur limitant à la production

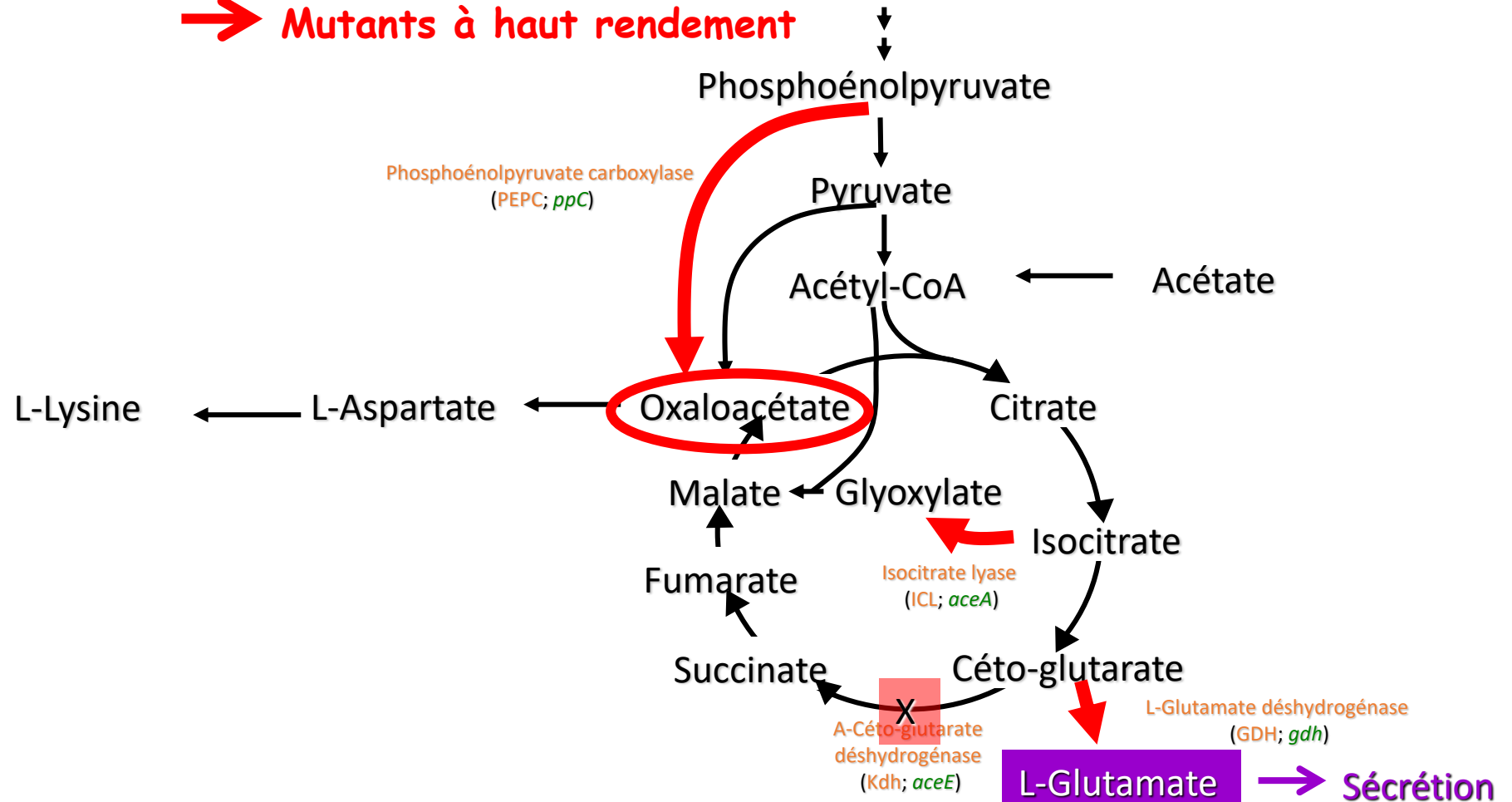




# BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

Amélioration de la production de L-Glutamate par *C. glutamicum*: approche génétique

→ Mutants à haut rendement



# EXEMPLES

- Agriculture

*Bacillus thuringiensis* et les biopesticides

- Alimentation

Bactéries lactiques et aliments fermentés

*Corynebacterium glutamicum* et production de glutamate

- Santé/médecine

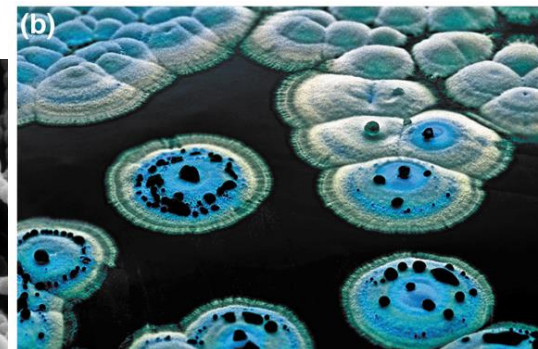
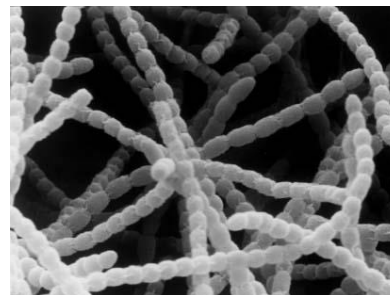
Streptomyces et production d'antibiotiques

**Quel type de métabolisme?  
Comment améliorer la production**



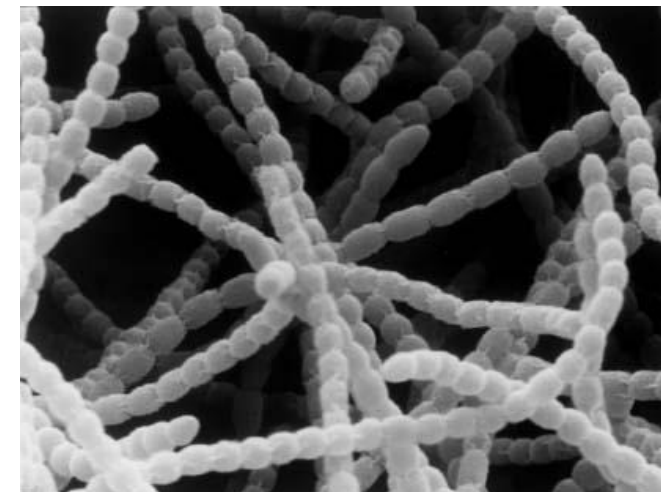
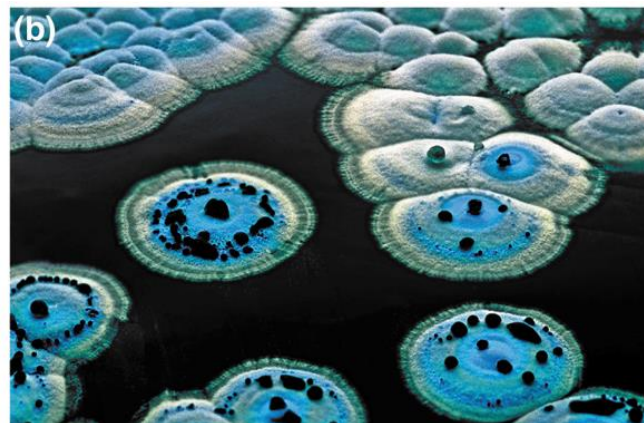
## La production d'antibiotiques

- **1928** Fleming, Pénicilline → Staphylocoque
- **1938** Florey et Chain, Pénicilline → purification
- **1945** Production kg benzyl-Pénicilline (Gram<sup>+</sup>)
- **1947** *Streptomyces griseus* → Streptomycine
- **8000** molécules à effet antibiotique à partir microorganismes
- **4000** à partir d'organismes supérieurs
- **Actinomycètes : rôle central**

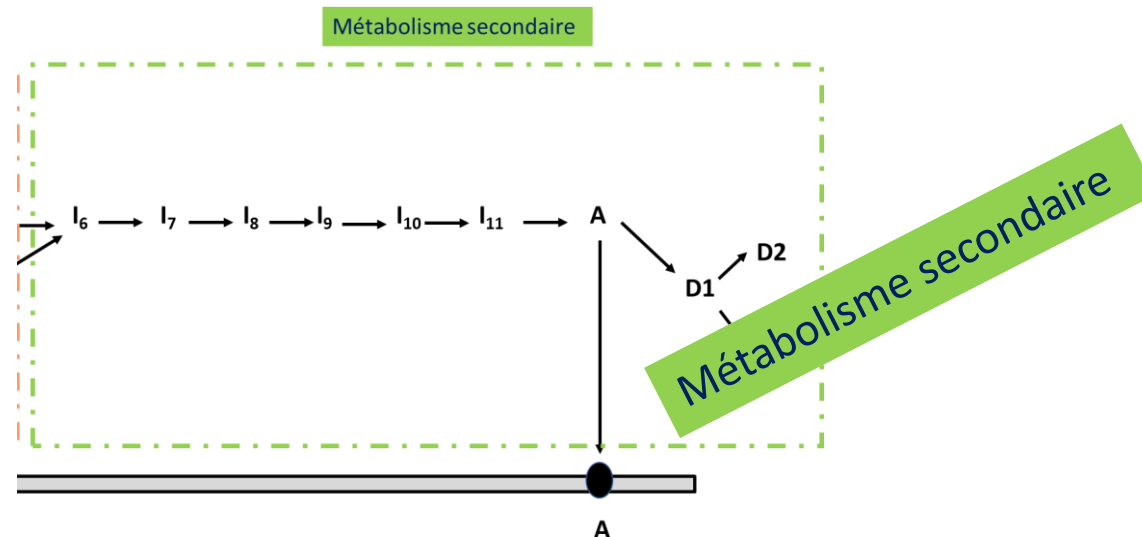


## Microorganismes producteurs d'antibiotiques

Microorganismes	Antibiotique
<b>Bactéries</b>	
<i>Streptomyces sp.</i>	Chloramphénicol Erythromycine Kanamycine Néomycine Nystatine Rifampycine Streptomycine Tétracycline
<i>Micronospora sp</i>	Gentamycine
<i>Bacillus sp.</i>	Bacitracine Polymyxines
<b>Mycètes</b>	
<i>Penicillium sp.</i>	Griséofulvine Pénicilline
<i>Cephalosporum sp.</i>	Céphalosporines

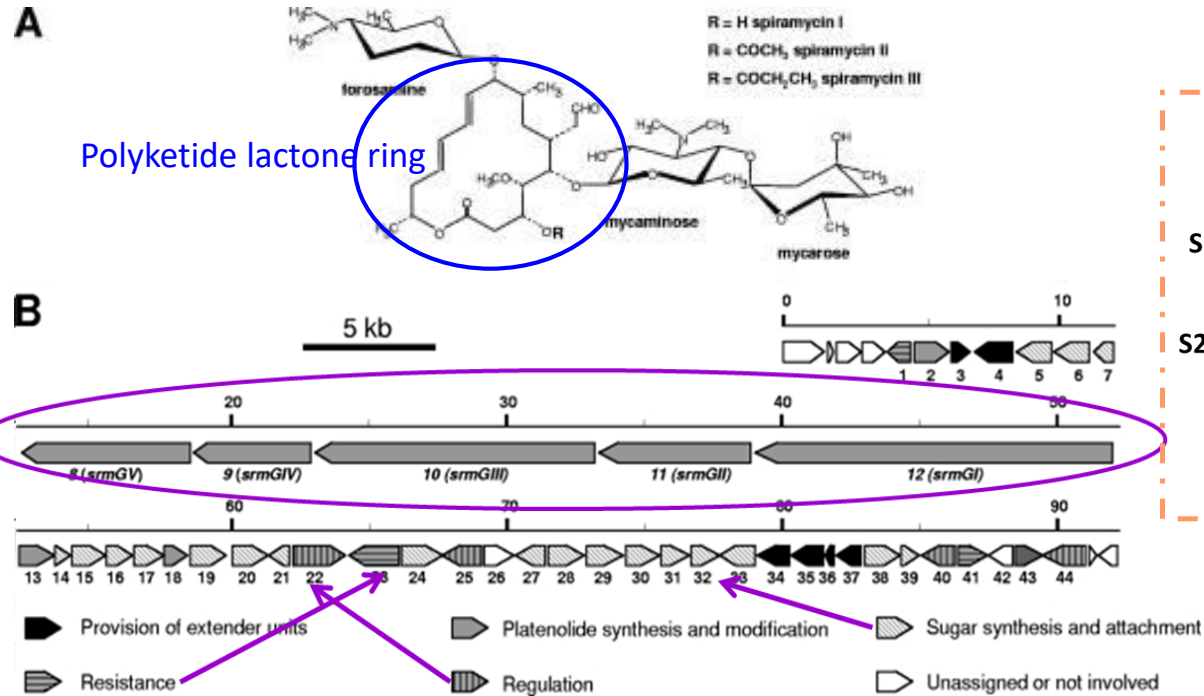


- Les *Streptomyces* (actinomycètes) jouent un rôle central dans la production d'antibiotiques

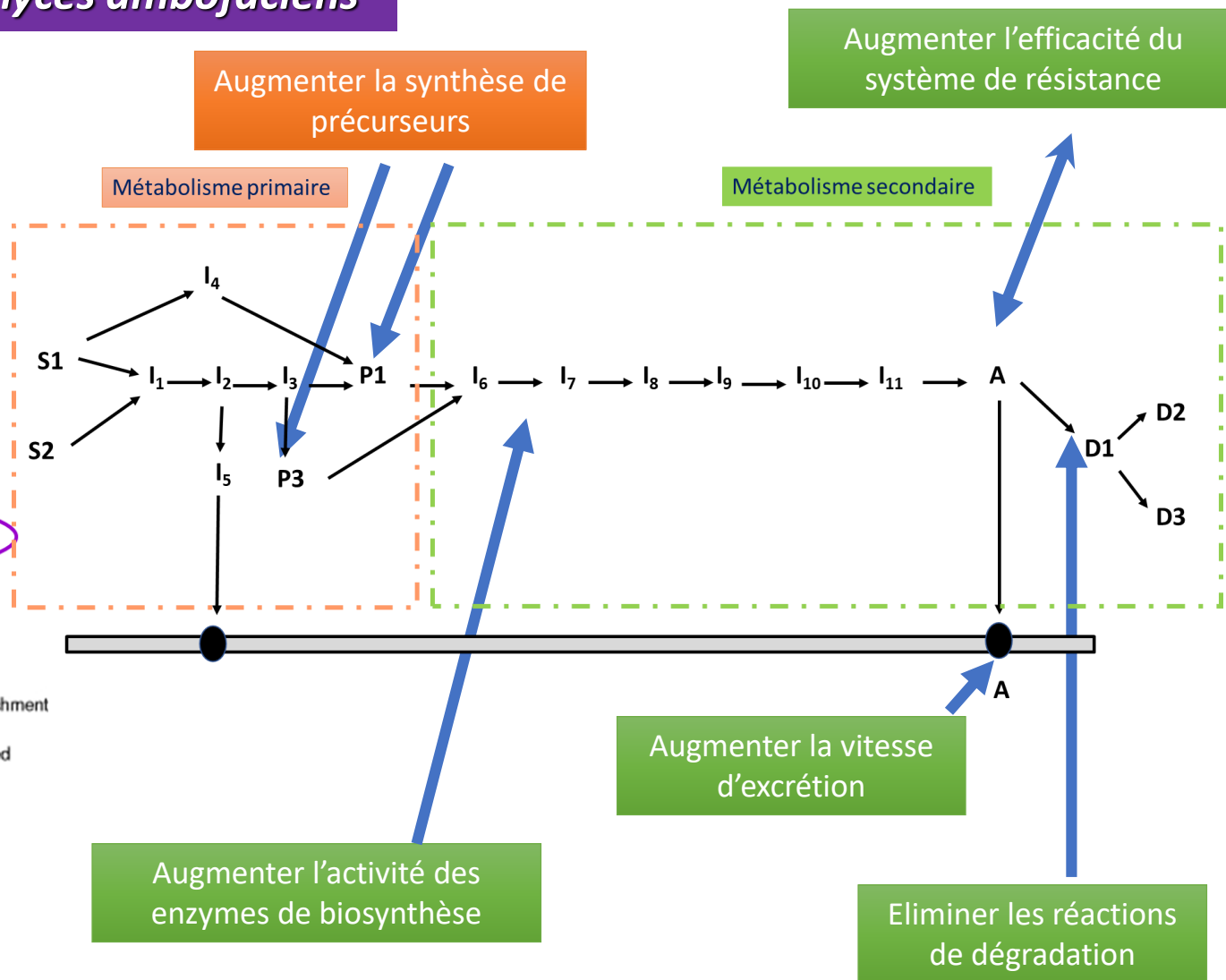


# BIOTECHNOLOGIES ET SANTE

La biosynthèse d'antibiotiques nécessitent de nombreux gènes:  
l'exemple de la spiramycine produite par *Streptomyces ambofaciens*



Karray F et al. J. Bact 2010





# ANALYSE DE FERMENTATION

Comment analyser les performances d'une souche lors d'une production de métabolite en bioréacteur?

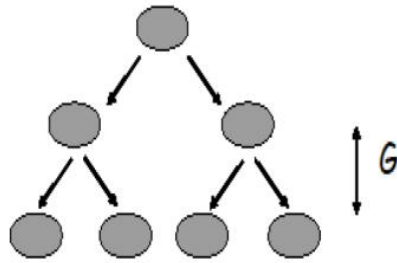
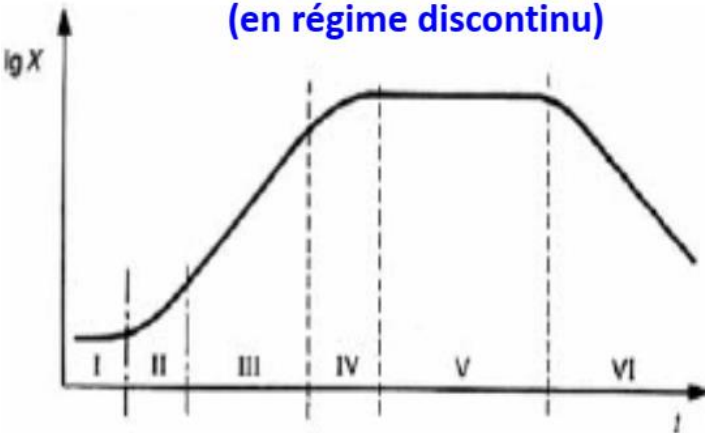
Suivi de la Croissance Microbienne

Phase de croissance  
Biomasse

Suivi de la production de métabolites et de la consommation de substrats

Bactéries

(en régime discontinu)



Biomasse	Nbre de générations
$X_0$	0
$2 X_0$	1
$4 X_0$	2
...	...
$2^n X_0 = X_t$	n

$$X_t = 2^N X_0 \quad N = K/t = t/G$$

$$\ln X_t = Kt + \ln X_0$$

K = taux de croissance

X = biomasse

G = temps de génération moyen d'une population

N = nombre de génération

T = temps de culture

# ANALYSE DE FERMENTATION



## Méthodes de quantification de la biomasse (g/L)

### Gravimétrie (g/L)

- Par pesée selon un protocole précis

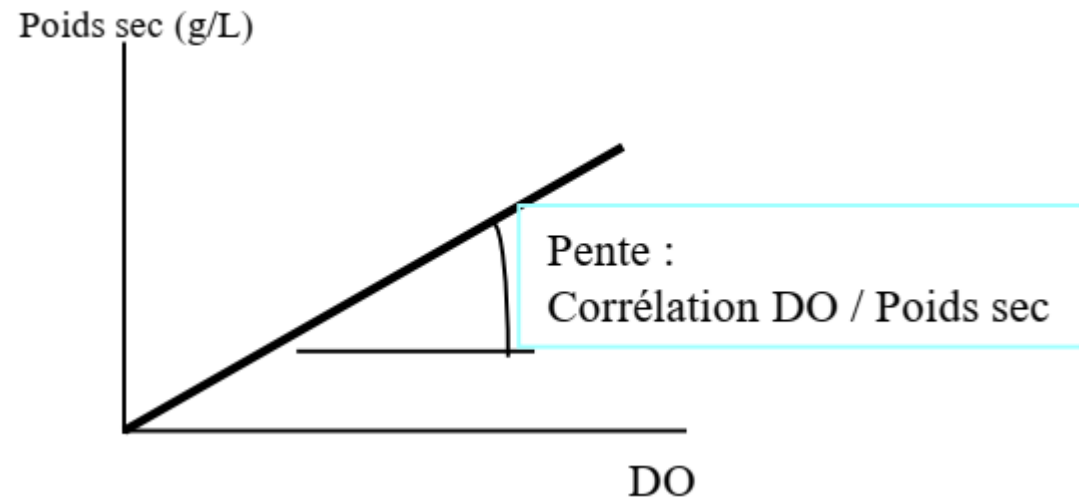
### Optique (UDO/ml)

- Turbidimétrie

### Autre (UFC/ml)

- Comptage direct
- Dénombrement sur boîte
- Cytométrie de flux...

**Corrélation DO = f(Biomasse)**

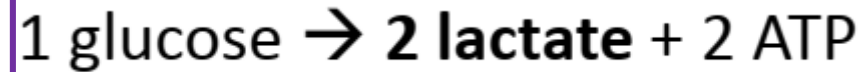


**DO x facteur de corrélation = Biomasse en g/L**

# ANALYSE DE FERMENTATION

## Exemple de suivi d'une production

Production d'acide lactique par un lactocoque: étude du métabolisme de la souche



Suivi de l'évolution de la biomasse et des substrats et des produits de fermentation



Batch

Prélèvement des  
surnageants de culture  
durant toute la fermentation



Biomasse (spectrophotomètre)



Analyses par HPLC

# ANALYSE DE FERMENTATION

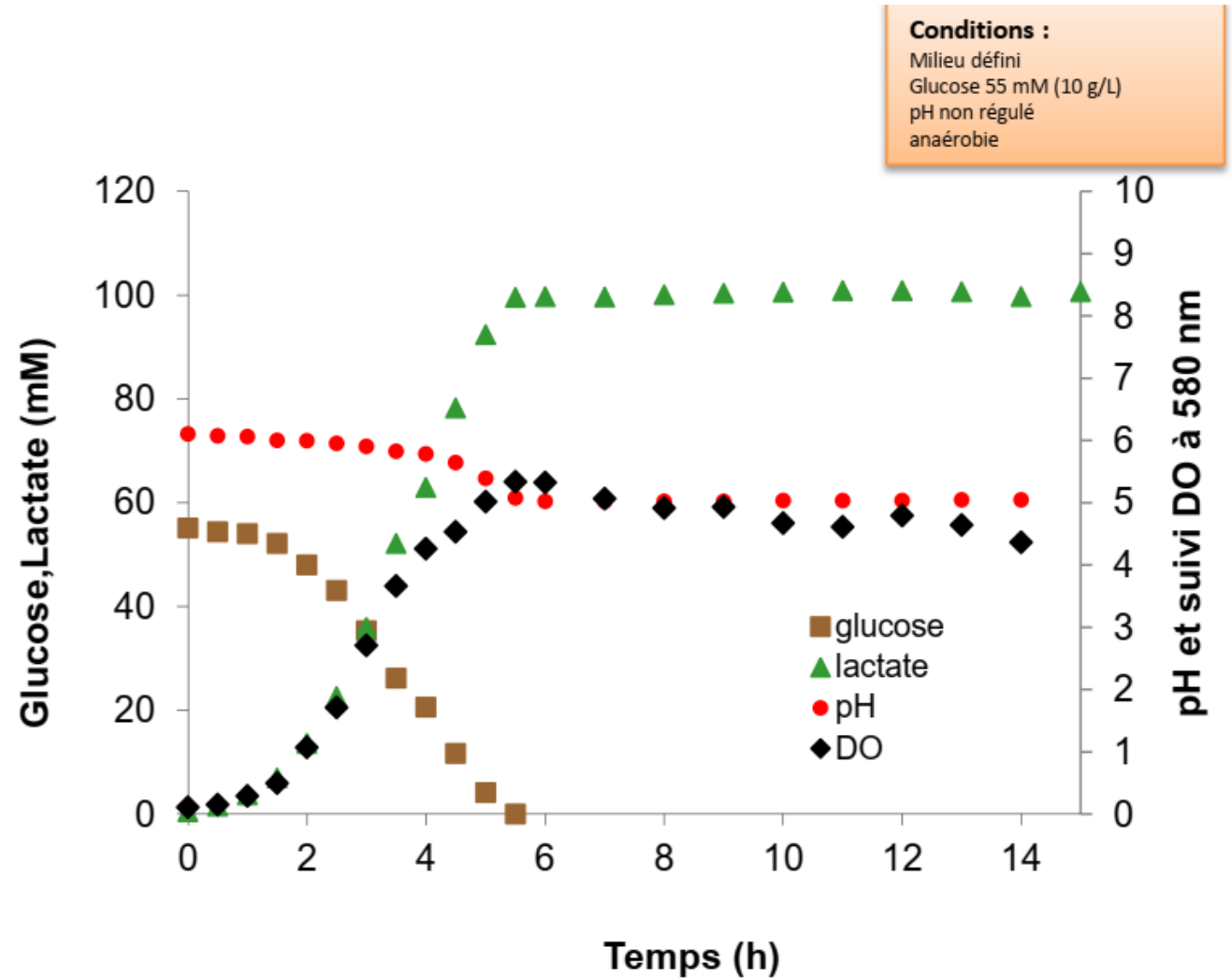
## Exemple de suivi d'une production

### Données brutes

- Croissance : DO
- pH
- Substrat : glucose
- Produit : acide lactique

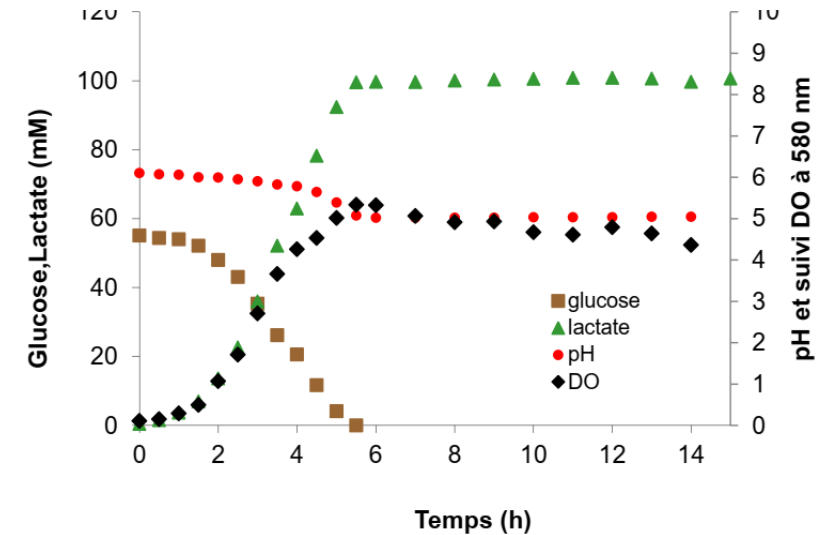
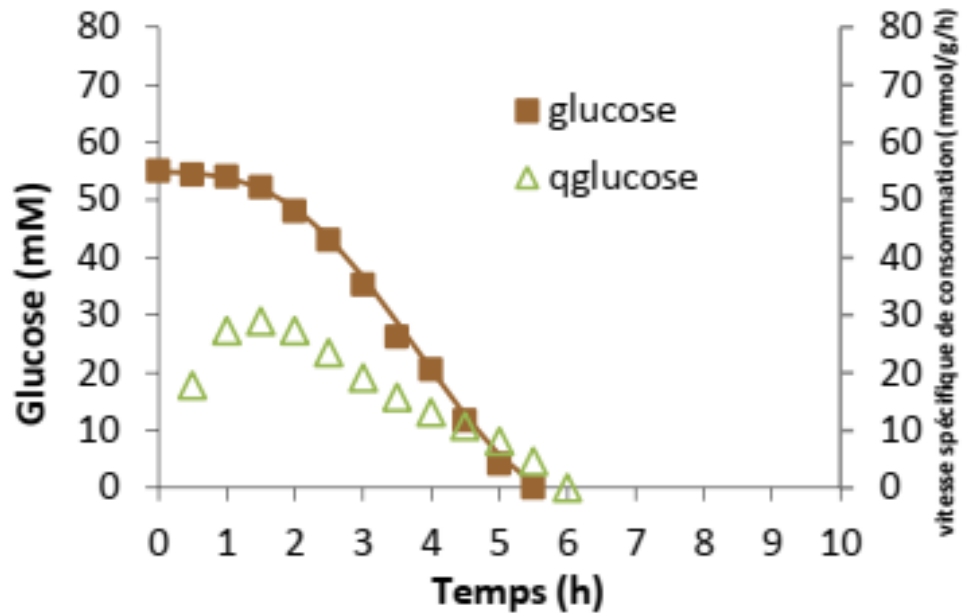
### Observations

- Croissance : arrêt à 5h30
- Consommation totale glucose
- Diminution du pH
- Production maximale d'acide lactique



# ANALYSE DE FERMENTATION

## Exploitation des résultats



$$r_s = \frac{dS}{dt} \quad (\text{Vitesse de réaction})$$

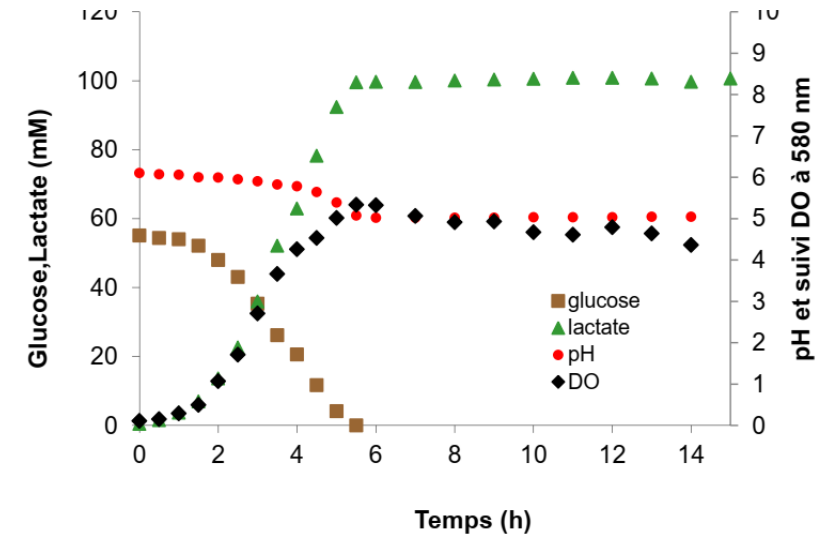
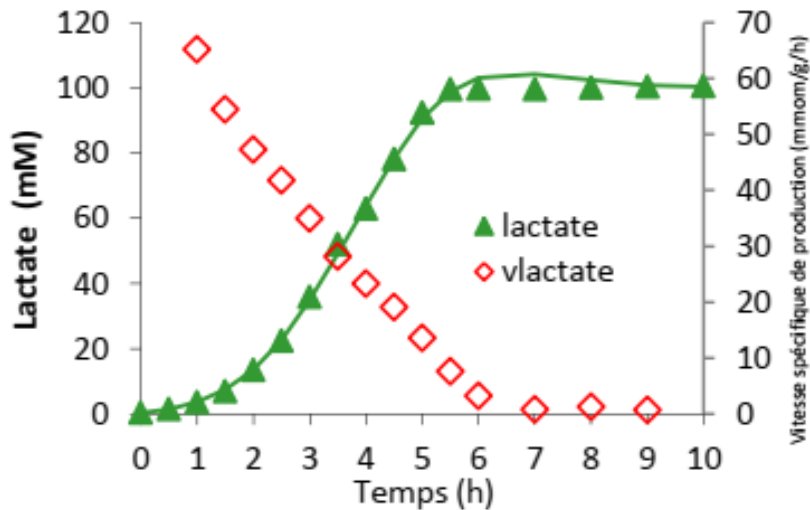
$$\mathbf{q_{sucre} = r_s \frac{1}{X} \text{ en mmol/g/h ou (g/g/h)}}$$

**Vitesse spécifique de consommation du sucre ( $q_{sucre}$ )**



# ANALYSE DE FERMENTATION

## Exploitation des résultats



$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (\text{Vitesse de réaction})$$

➔  $v_{\text{produit}} = r_p \frac{1}{X}$  en mmol/g/h ou (g/g/h)

**Vitesse spécifique de production ( $v_{\text{produit}}$ )**

# ANALYSE DE FERMENTATION

## Exploitation des résultats

### Bilan carbone (en CmM)

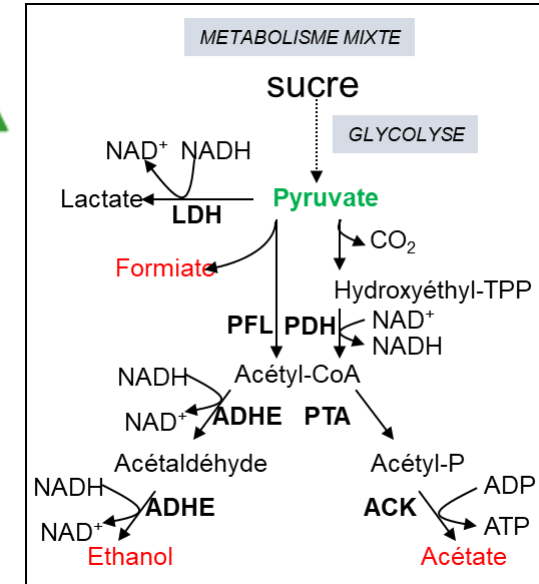
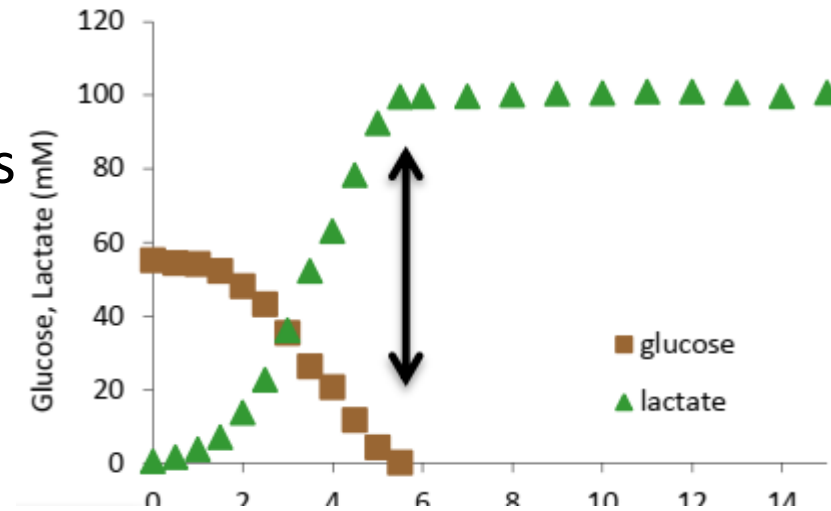
$\Sigma$  produits formés =  $\Sigma$  substrats consommés

Lactate (3C)

Glucose (6C)

À 6h  
103 mM x 3  
Soit 309 CmM

55 mM x 6  
Soit 330 CmM



**Bilan carbone de 94%**

=

94% du Carbone se retrouve dans du lactate et probablement  
6 % du C a du se retrouver dans d'autres produits de fermentation qui n'ont pas été dosés car en  
très faible quantité

On a donc un métabolisme homolactique

## Exploitation des résultats

### Rendement produit

**Glycolyse** 1 glucose  $\rightarrow$  2 lactate + 2 ATP

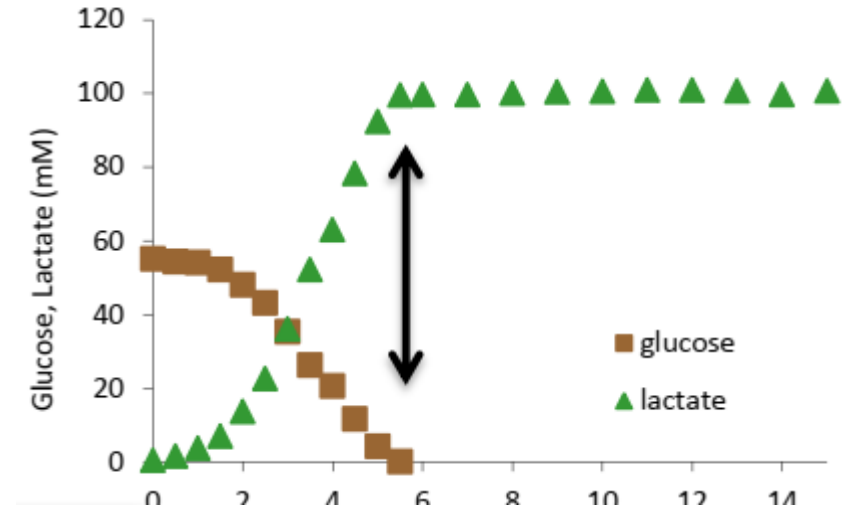
Le Rendement produit est de 100% (rendement théorique) quand on obtient 2x+ de moles de lactate que de glucose introduit

À 6h

103 mM de lactate pour 55mM de glucose introduits

**Rendement lactate réel =  $103/55 \times 2 = 0,936$**

**soit 94% du rendement théorique**



**Dans notre cas un seul produit le lactate  
bilan carbone = rendement produit**