

Biotechnologies

1

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

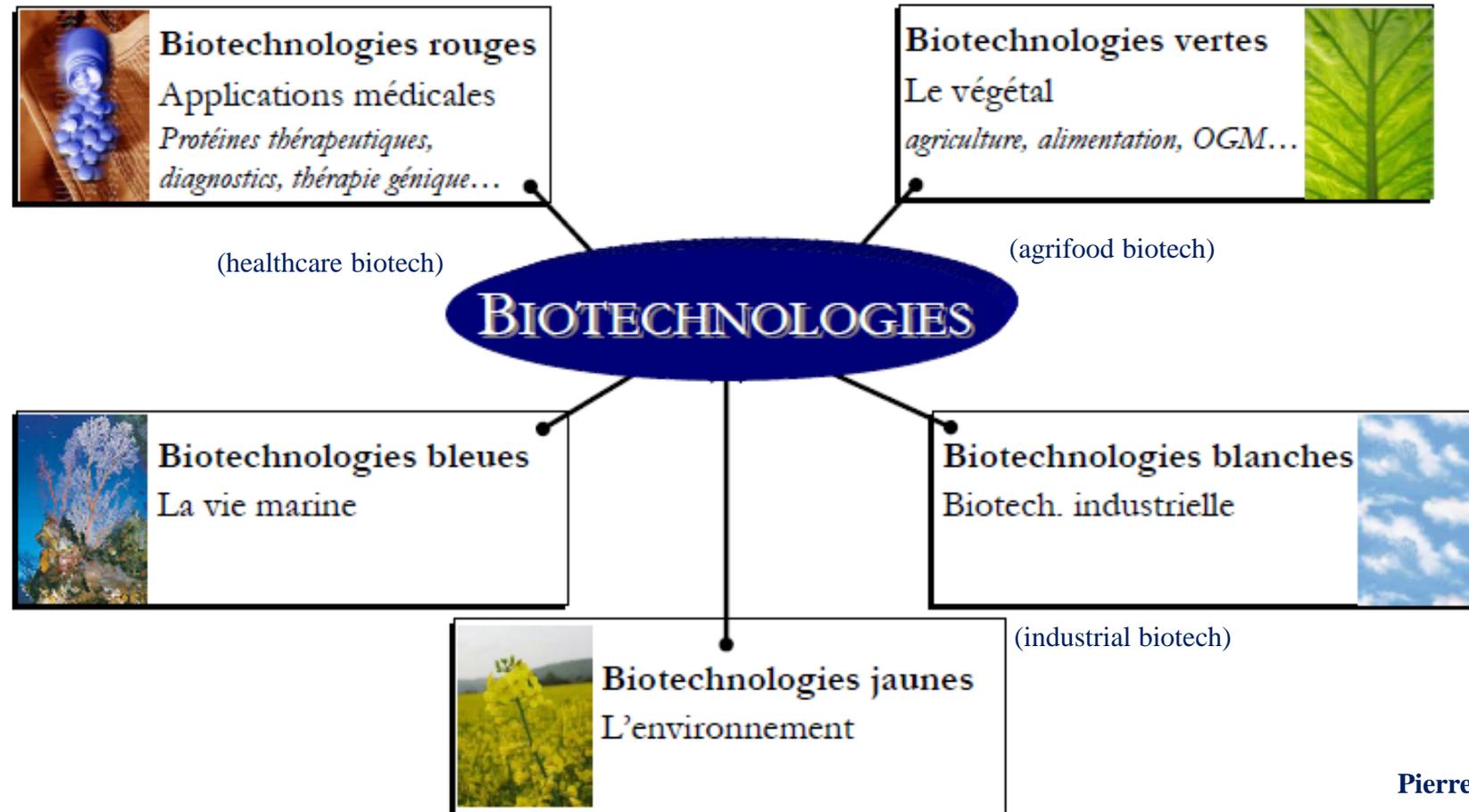
Document de préparation à la sélection française
aux Olympiades Internationales de Biologie

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

Microorganismes
extrêmophiles

Biotechnologies blanches
Biotech. industrielle

Clostridium, Archées...



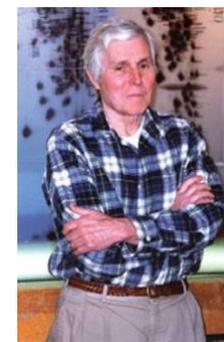
Biotechnologies jaunes
L'environnement

Pseudomonas...

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

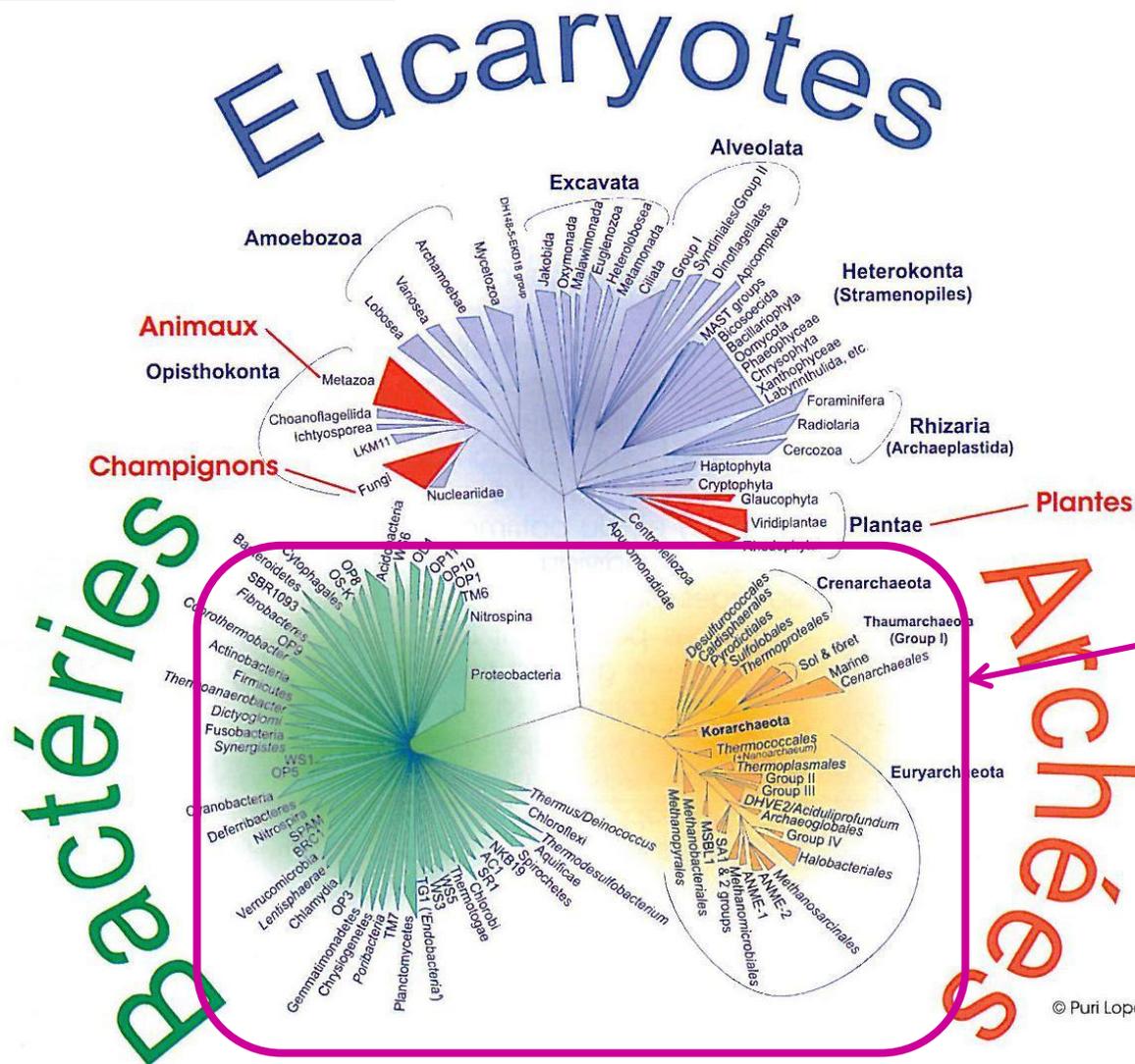
INTERÊT DES MICROORGANISMES EN BIOTECH

Grande diversité



Woese, 1978 : bactéries et Archées (ARNr)

3 domaines



Procaryotes

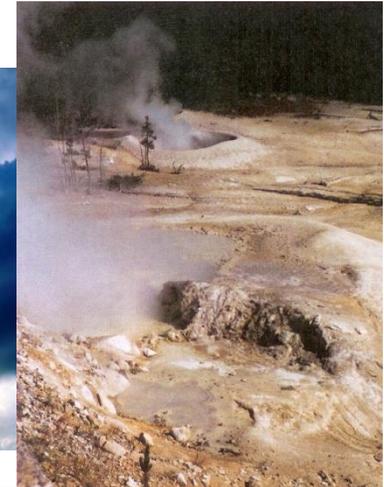
A quels domaines, appartiennent les microorganismes utilisés en biotechnologie?

INTERÊT DES MICROORGANISMES EN BIOTECH

Ils sont partout

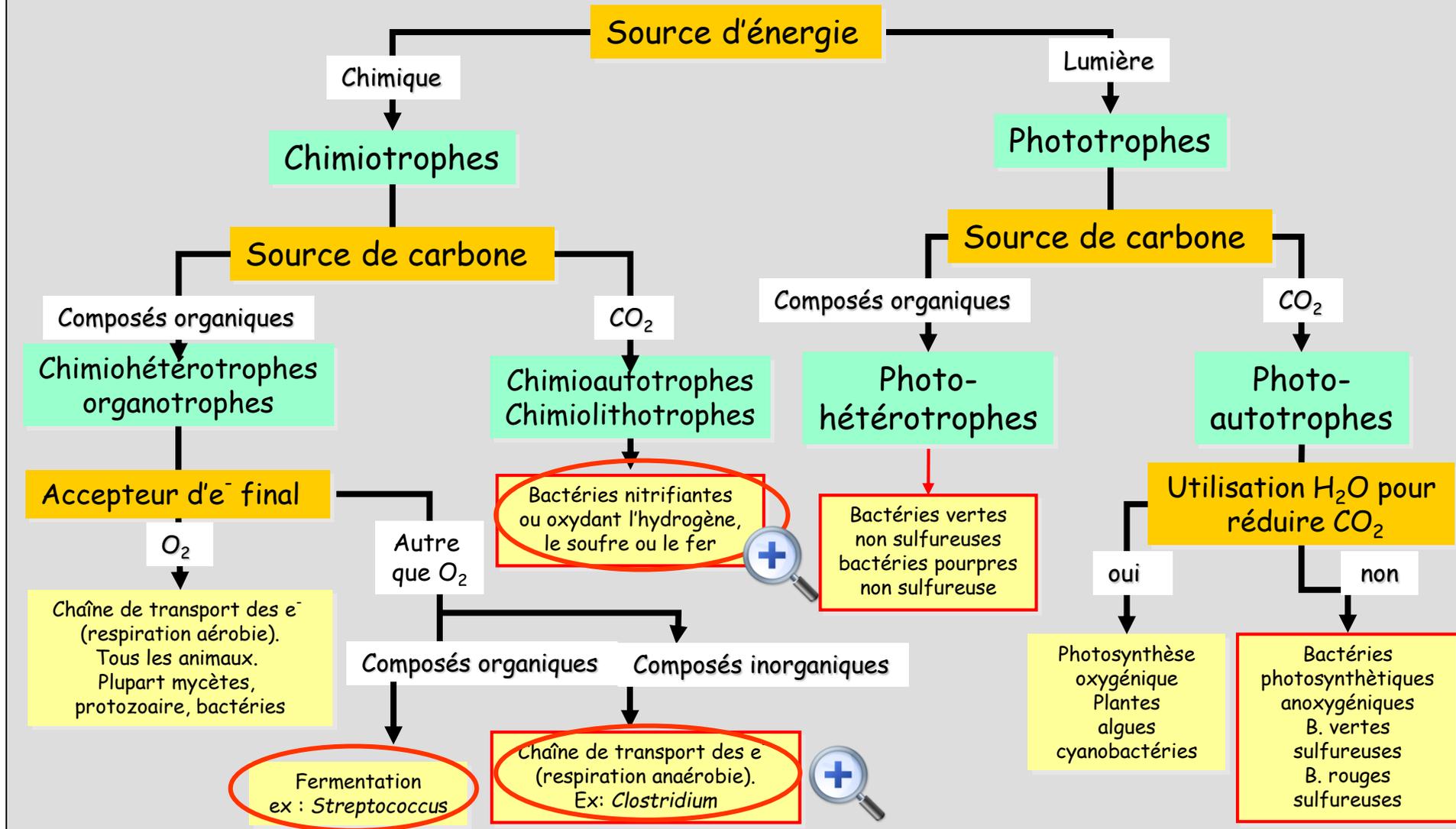
- Air
- Sol, sous-sol, sédiments
- Minéraux
- Régions volcaniques
- Antartique
- Eau
 - Eaux sulfureuses chaudes
 - Cheminées hydrothermales abysses, fumeurs
 - Eaux extrêmement salées, acides ou alcalines

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



INTERÊT DES MICROORGANISMES EN BIOTECH

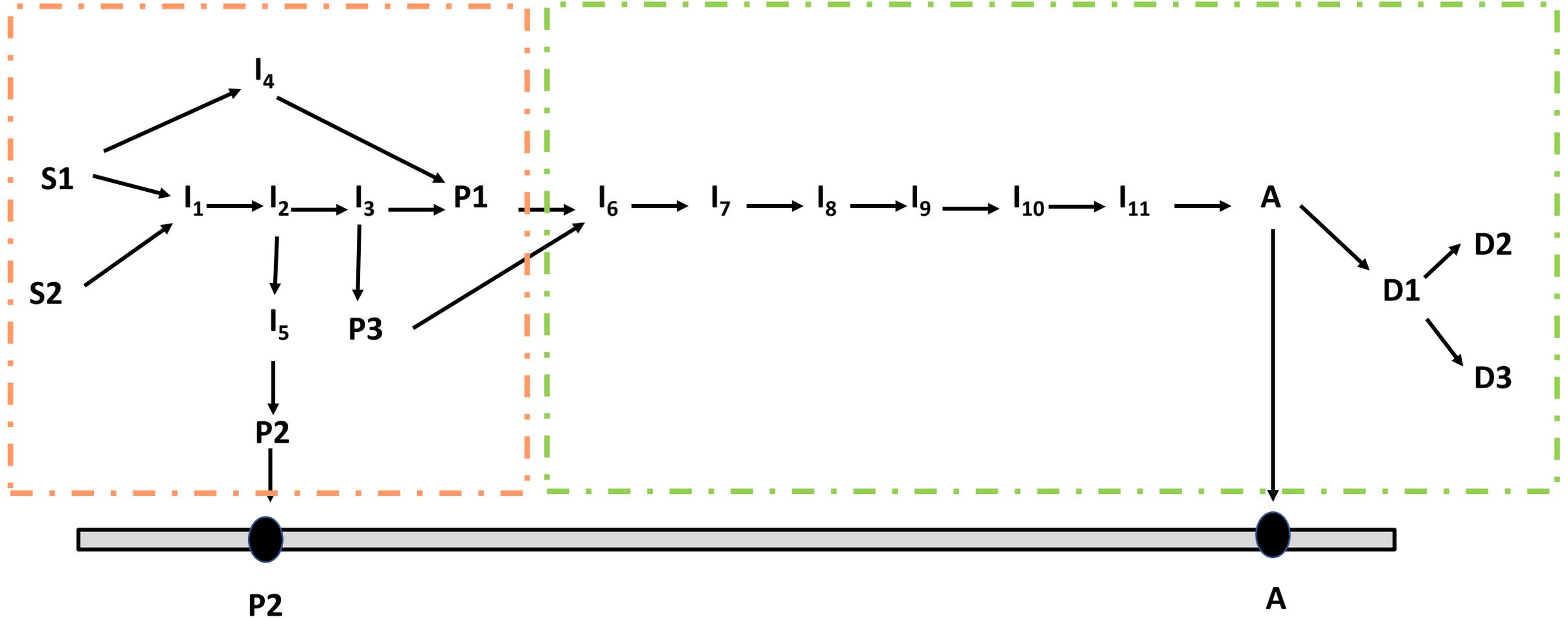
Une grande diversité métabolique et de nombreuses spécificités



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

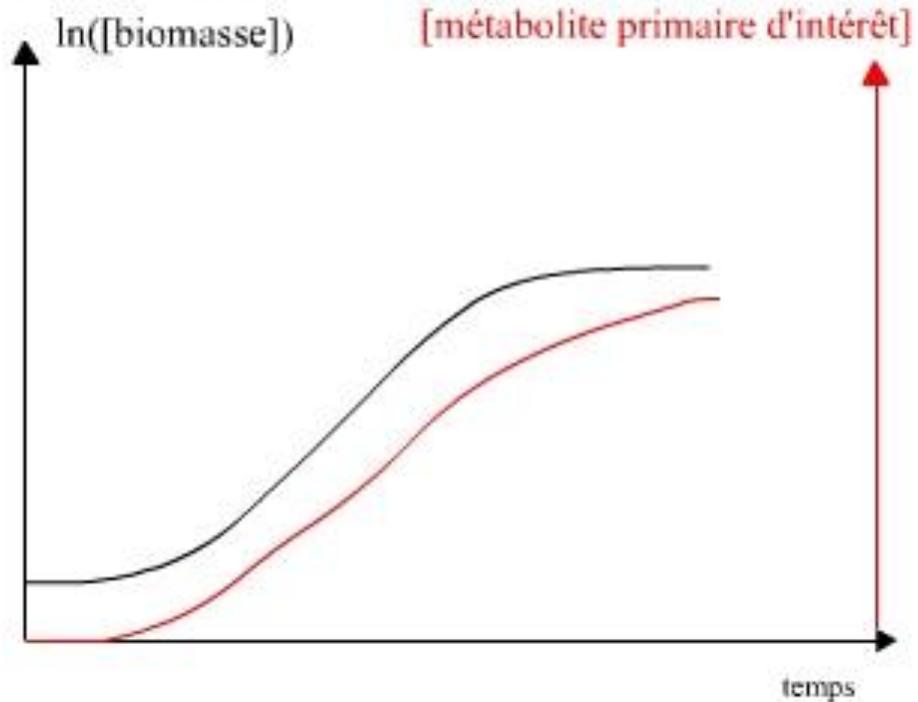
INTERÊT DES MICROORGANISMES EN BIOTECH

Différents types de métabolites produits par les microorganismes

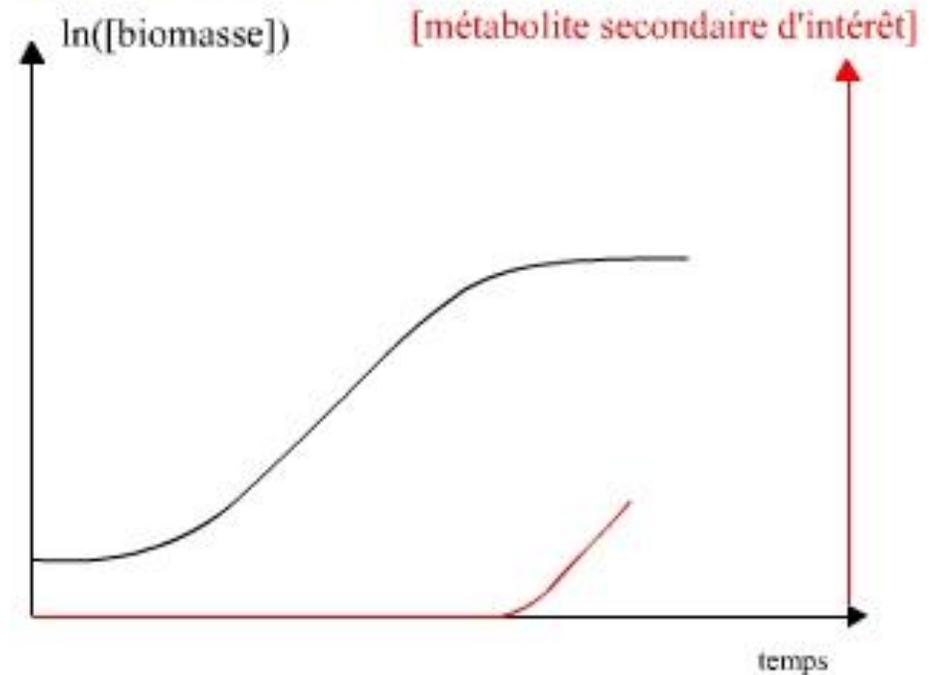
Métabolites primaires

Métabolites secondaires

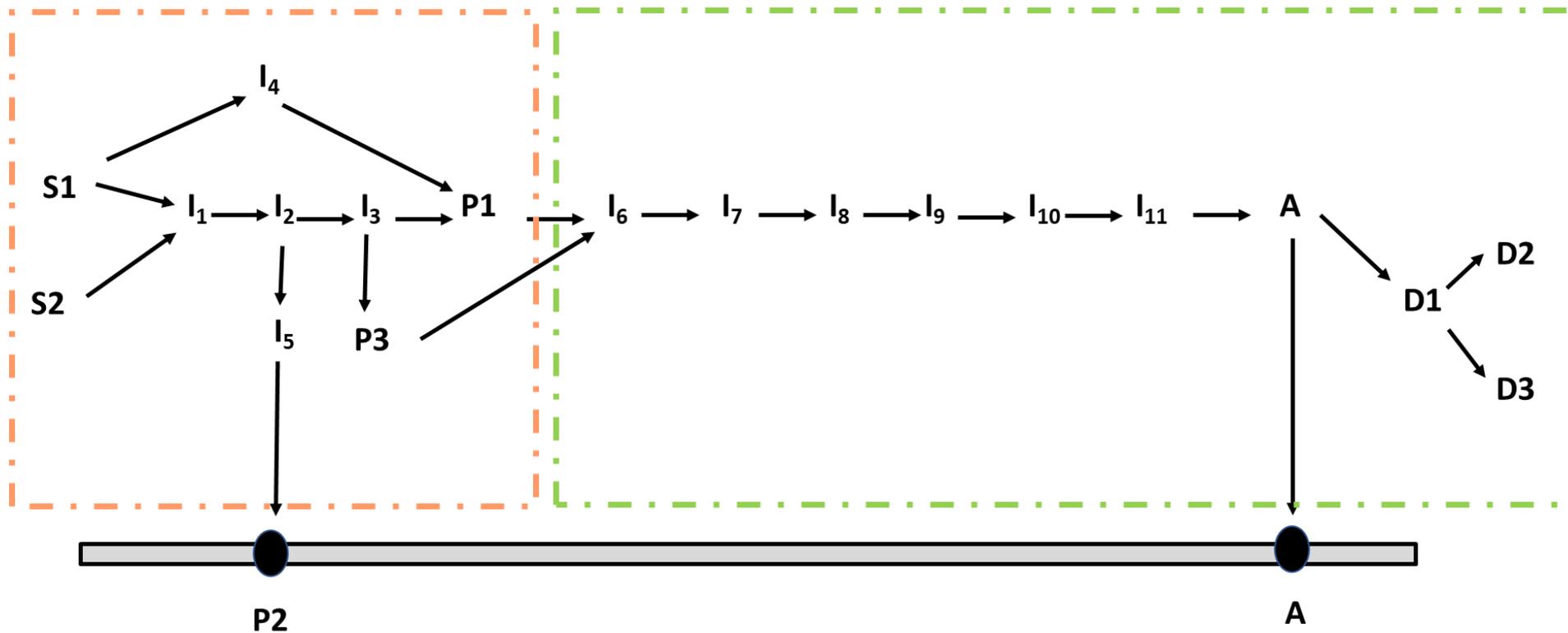
**Modèle de base
pour une culture non renouvelée (batch)**



**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-positif du sol

Biopesticide naturel
(Crystal : endotoxine)



Chenille

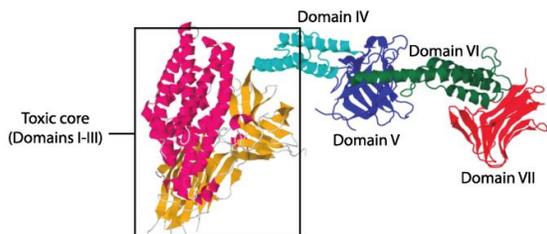
Piérade
Noctuelle
Tordeuse
Teigne
Processionnaire

Sporéine: insecticide commercialisé en 1938



BIOTECHNOLOGIES ET AGRICULTURE

Crystal : endotoxine
(protoxine inactive)

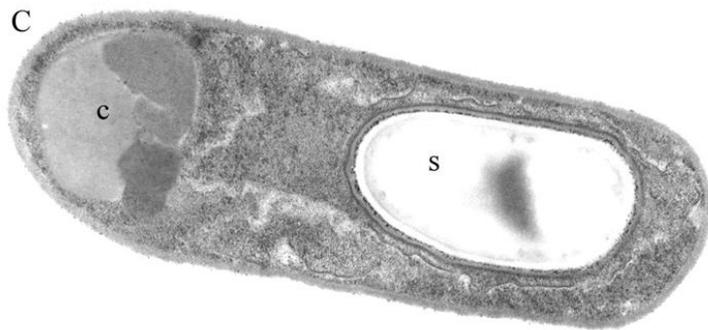


Comment ça marche

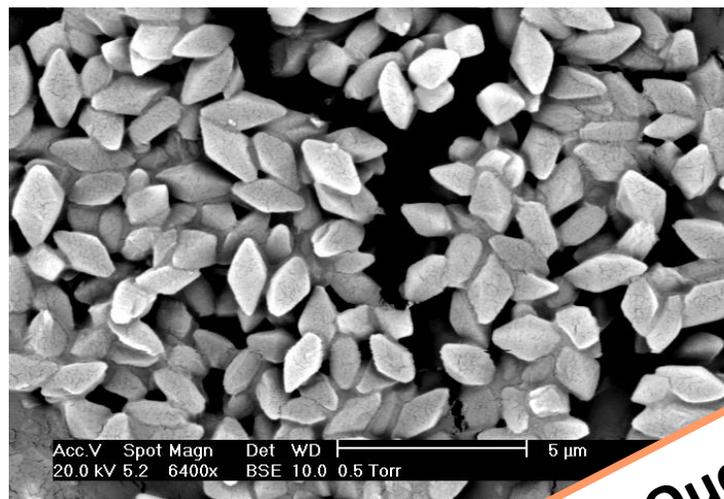
Bactérie Gram-positve du sol

Plus de 100 000 souches *B thuringiensis*

Spores



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



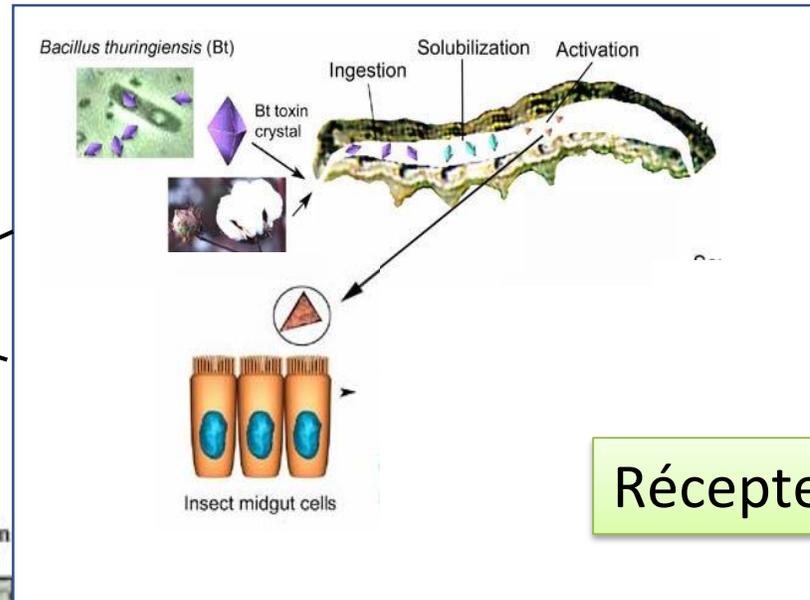
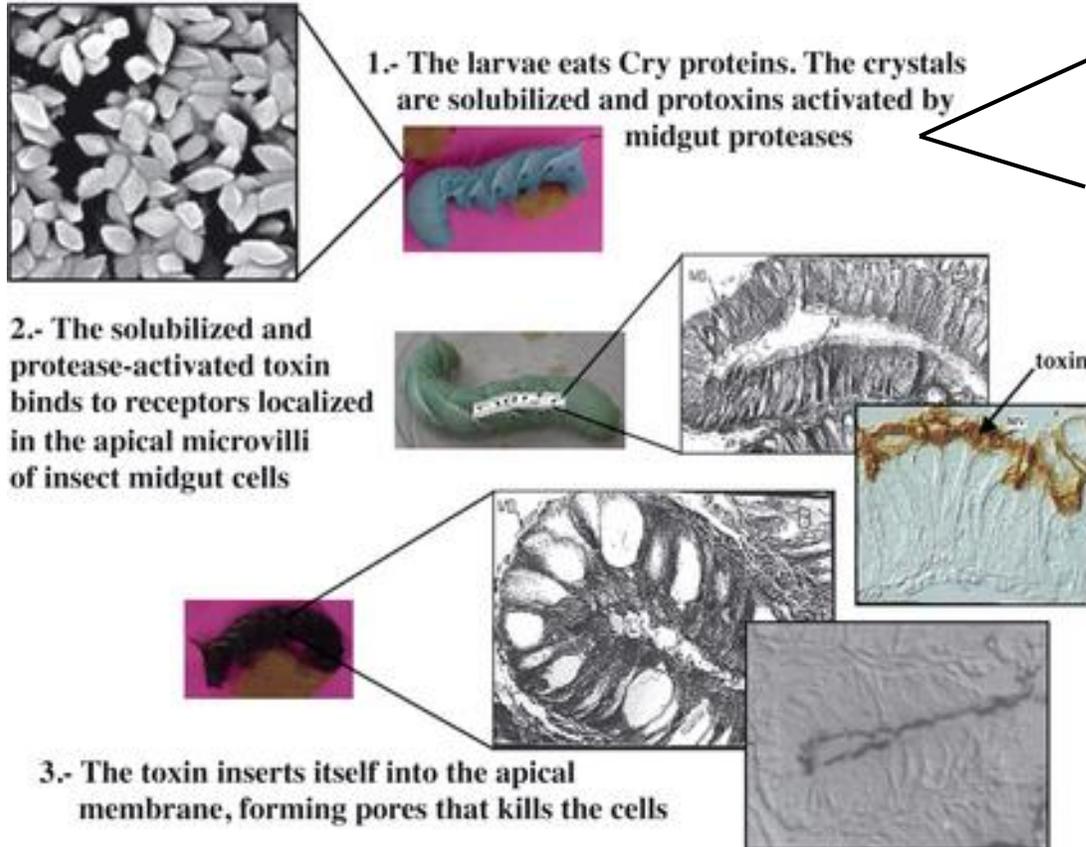
Quel type de métabolisme?
Comment améliorer la production

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

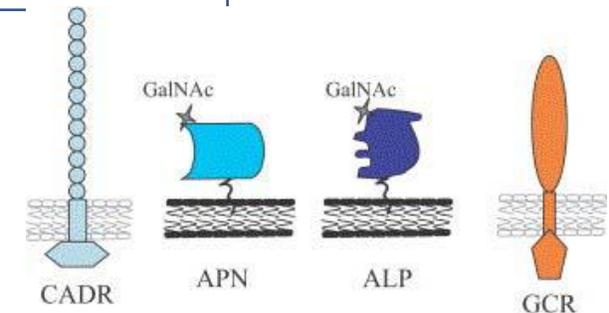
**Toxine Cry et chenilles:
Une histoire impossible!**

BIOTECHNOLOGIES ET AGRICULTURE

Mechanism of action of Cry toxins at cellular level

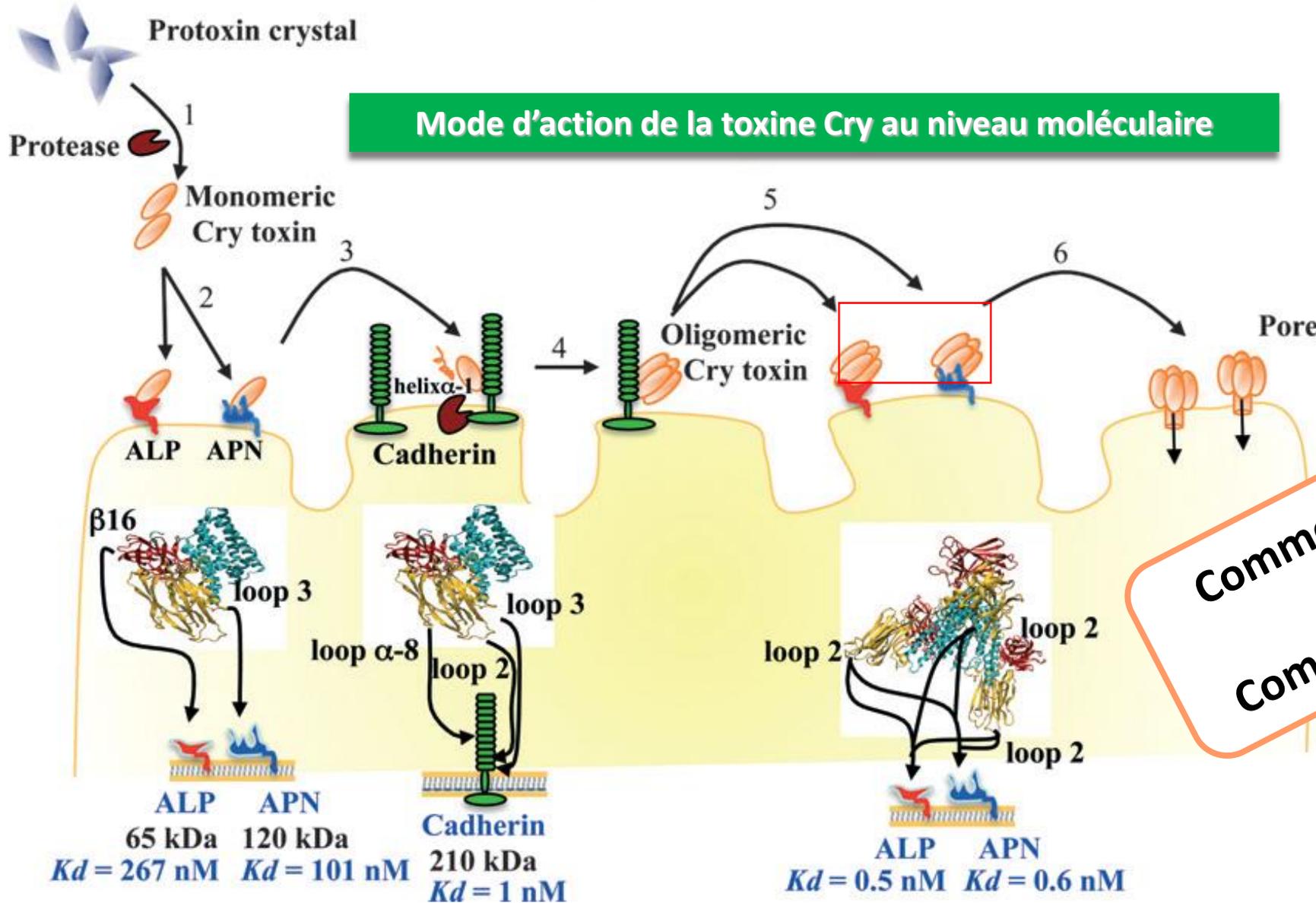


Récepteurs de » Cry1A »



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

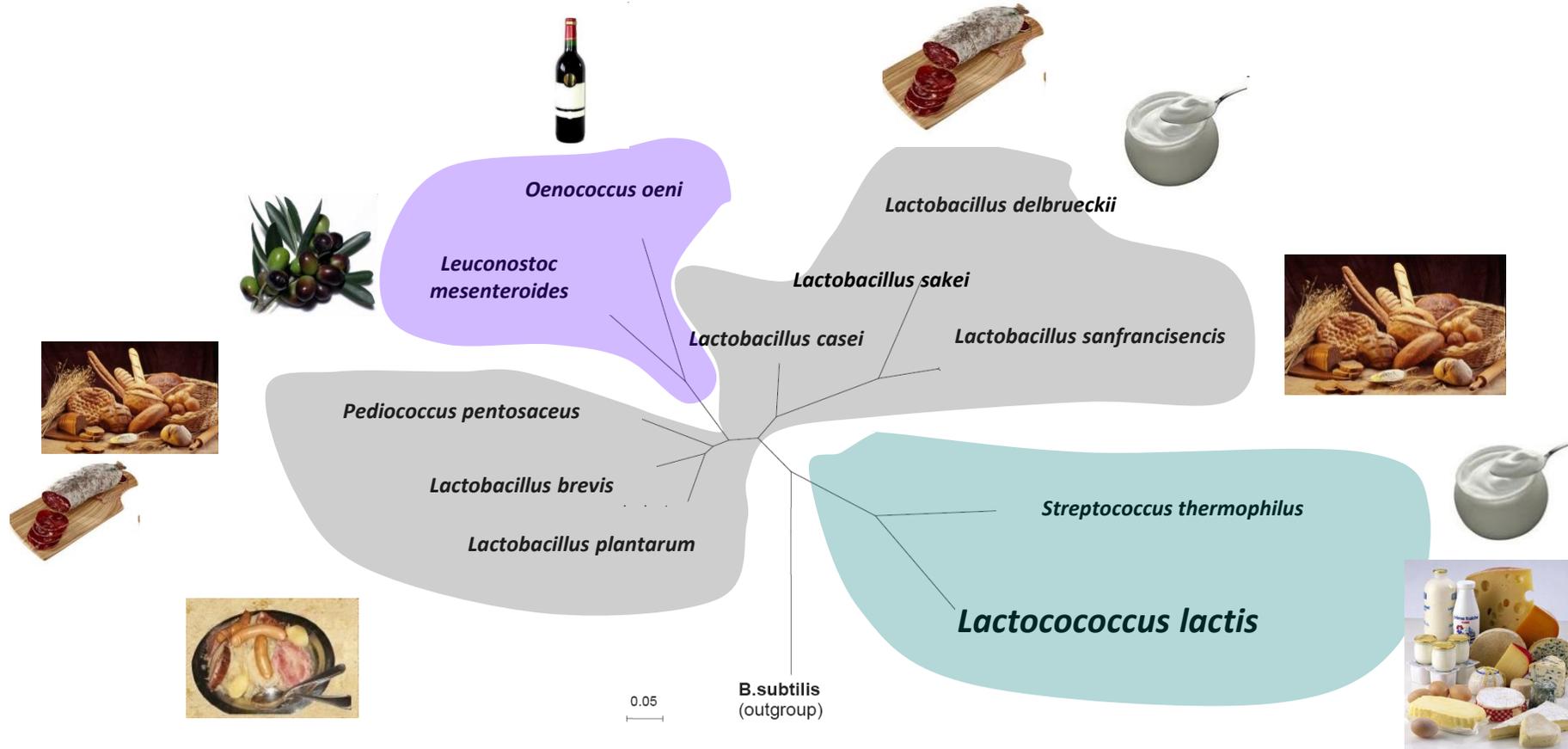
→ *Corynebacterium glutamicum* et production de glutamate

● 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

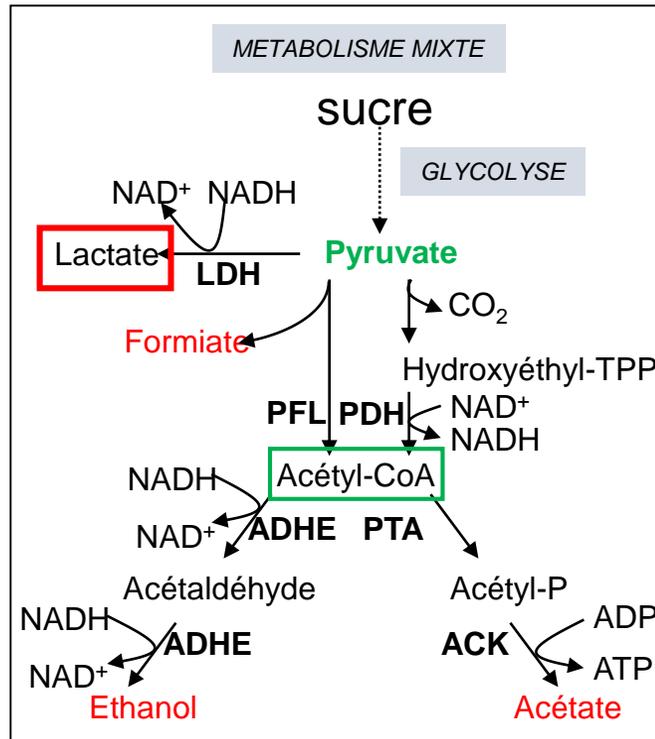
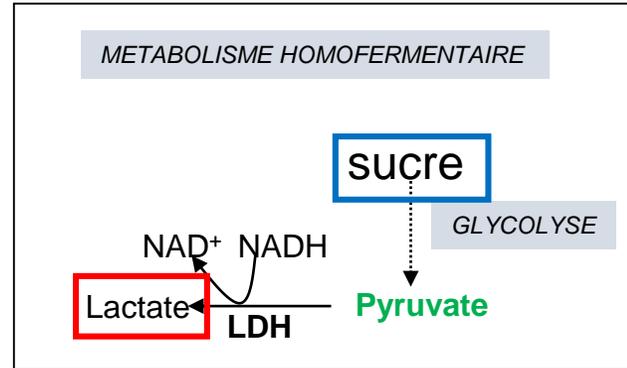
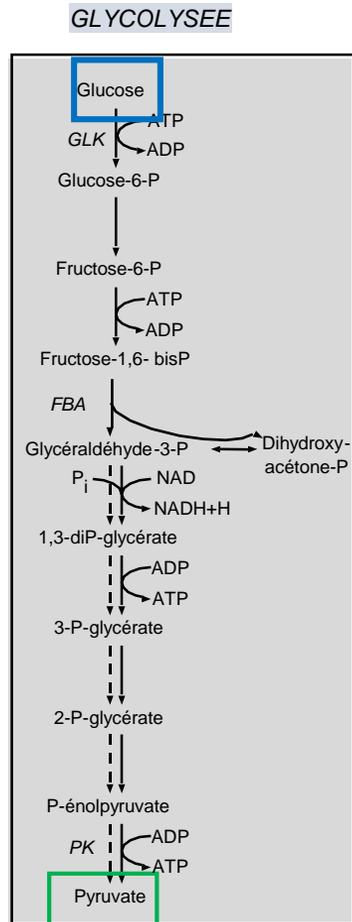
- Métabolisme des Acides Aminés
- Métabolisme des Acides gras
- Métabolisme du citrate (Diacétyl/ acétoïne)



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

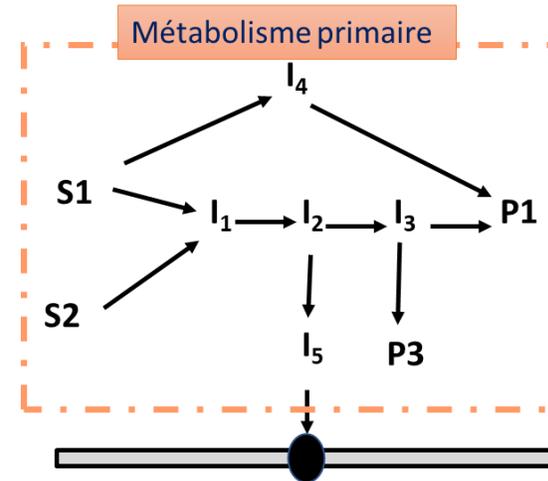
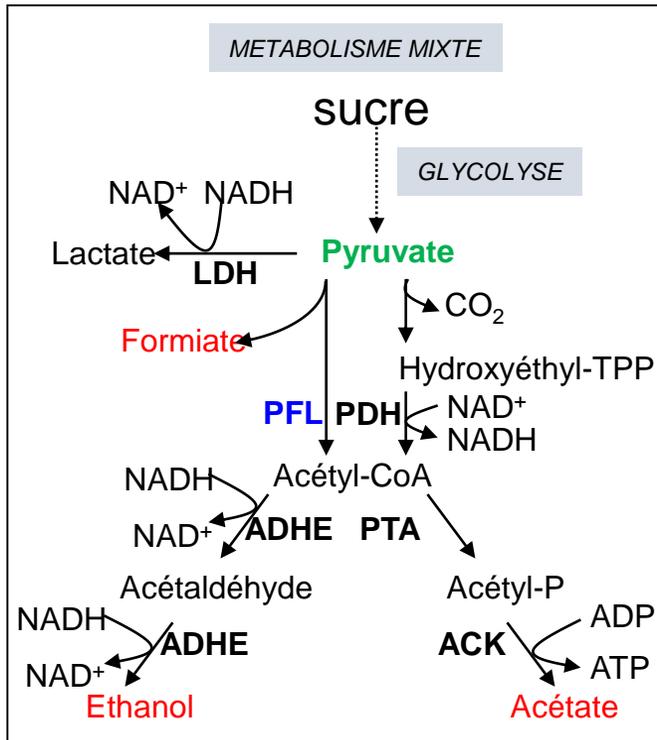
1 glucose → 2 lactate + 2 ATP
✓ métabolisme homofermentaire:
Lactococcus, Pediococcus, Lactobacillus

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

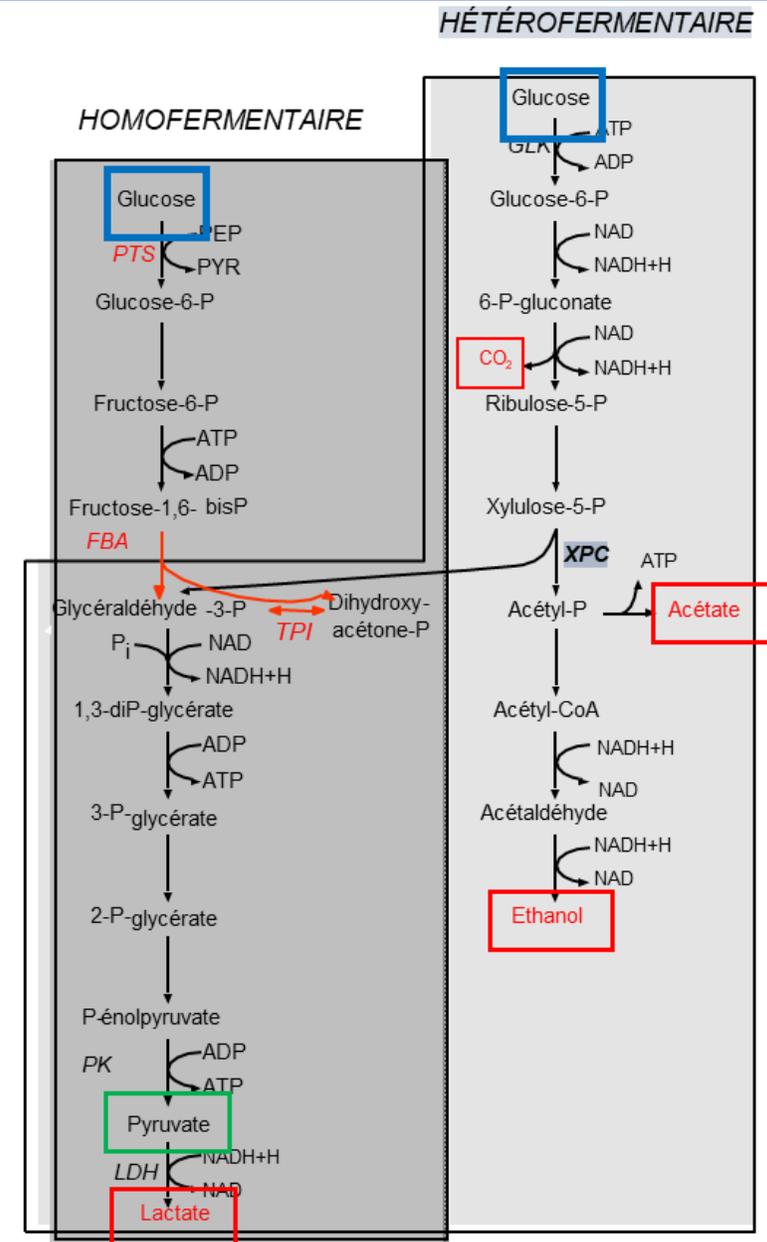
La fermentation lactique

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

1 glucose \rightarrow 1 lactate + 1 éthanol + 1 acétate + 1 CO₂ + 1 ATP

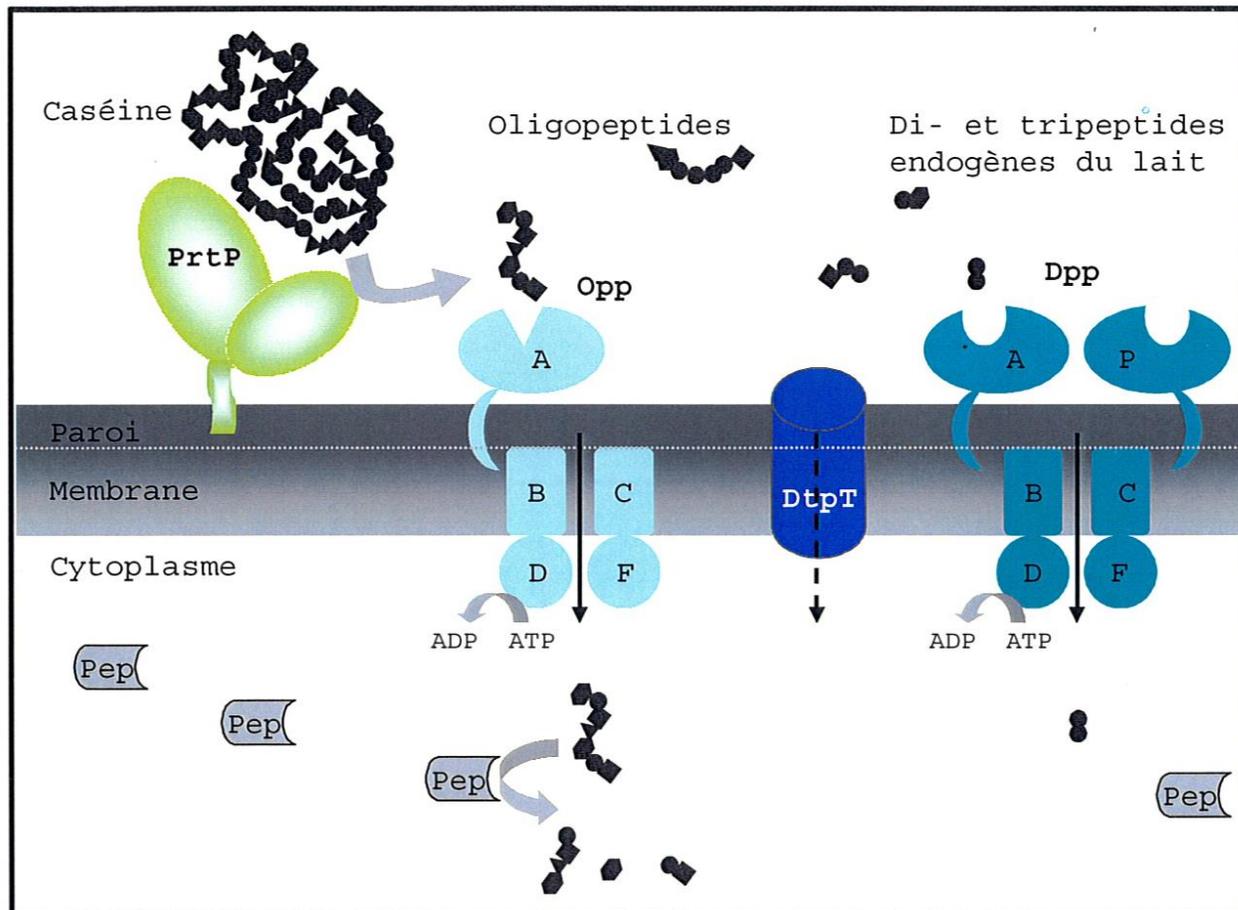
- ✓ métabolisme hétérofermentaire:
Leuconostoc, Lactobacillus

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*

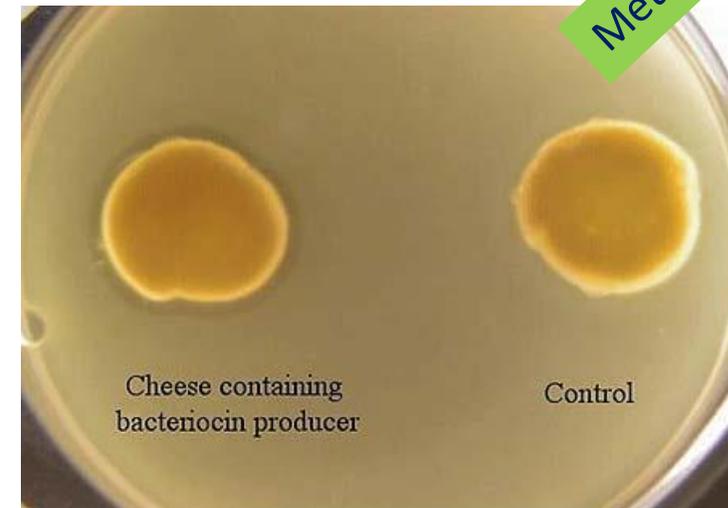
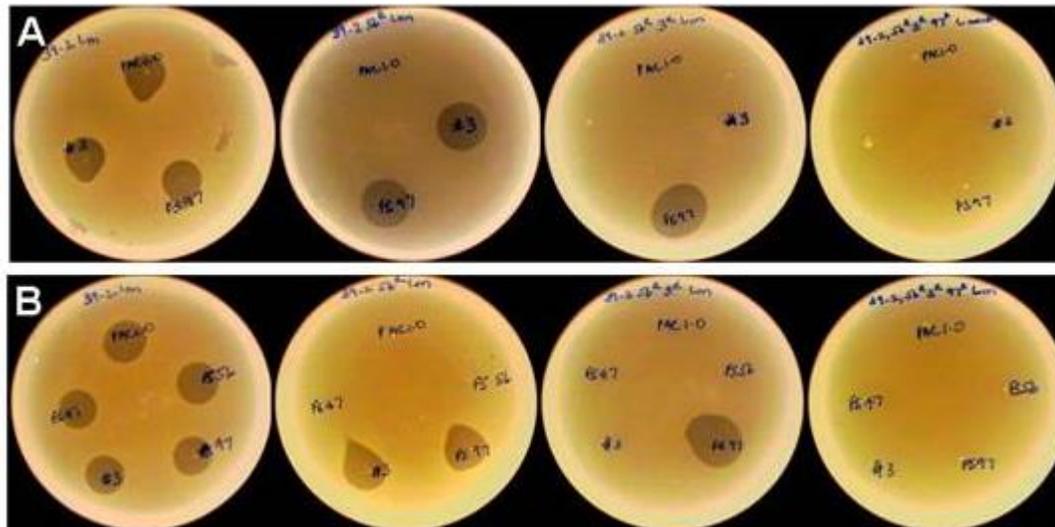
Métabolisme primaire

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)

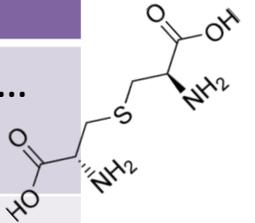
Métabolisme secondaire



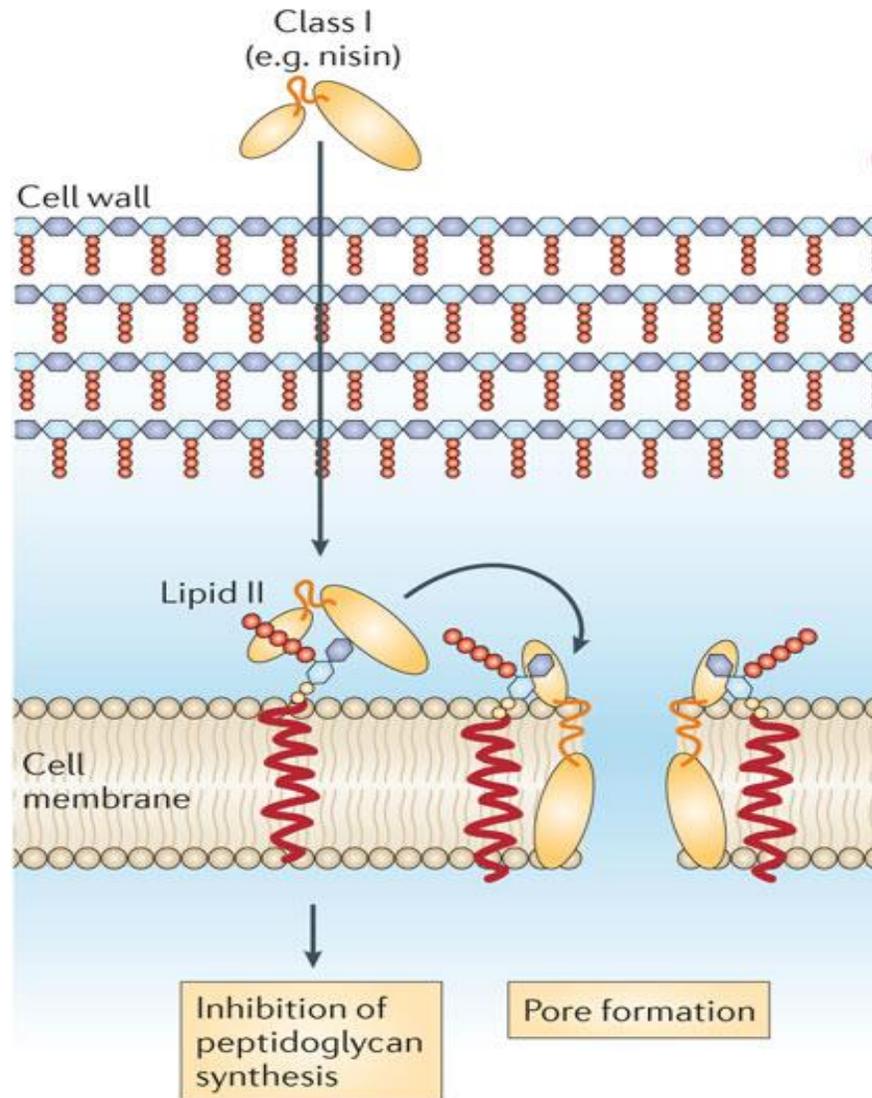


Classification des bactériocines (d'après Klaenhammer, 1993)

CLASSE	DEFINITION	TYPE	CARACTERES PARTICULIERS
I	-petits peptides < 5kDa (lantibiotiques)	-Nisine E 234 -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

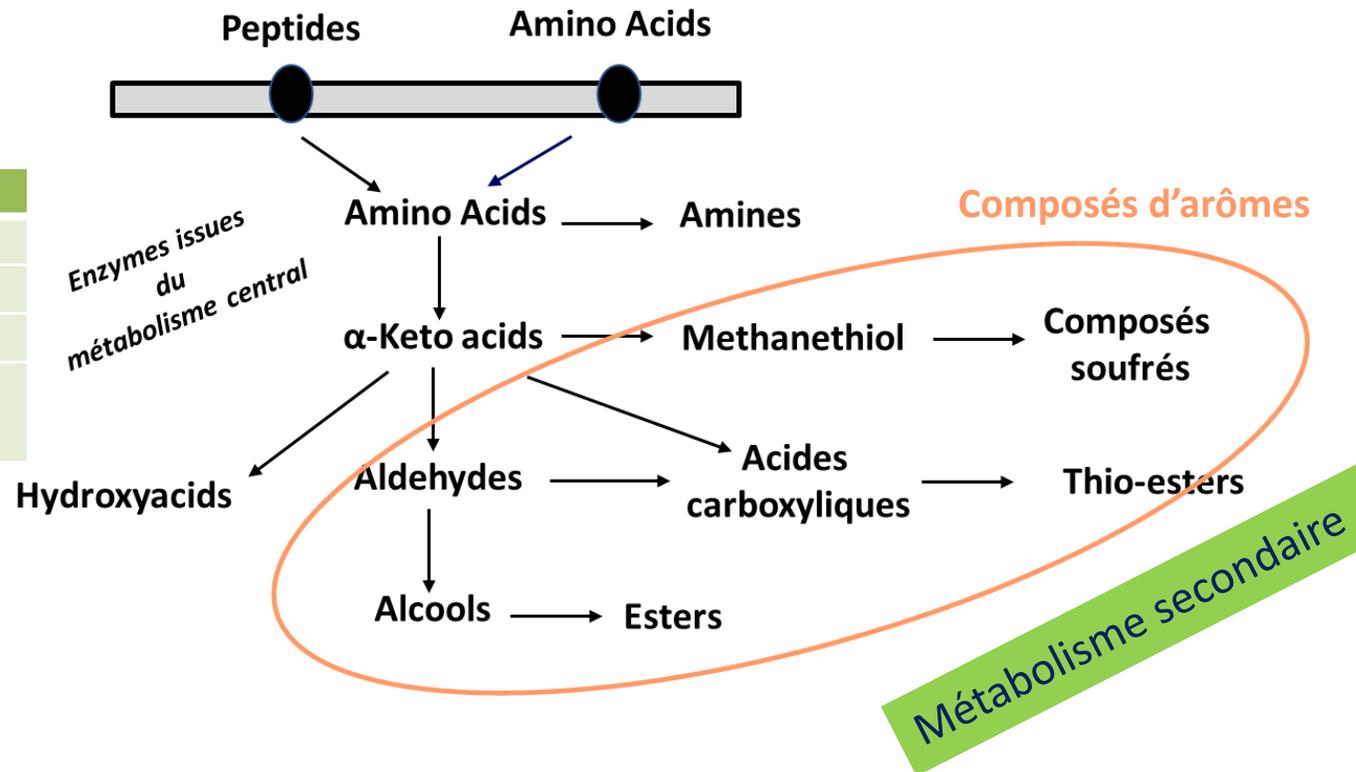
✓ Dégradation des protéines

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

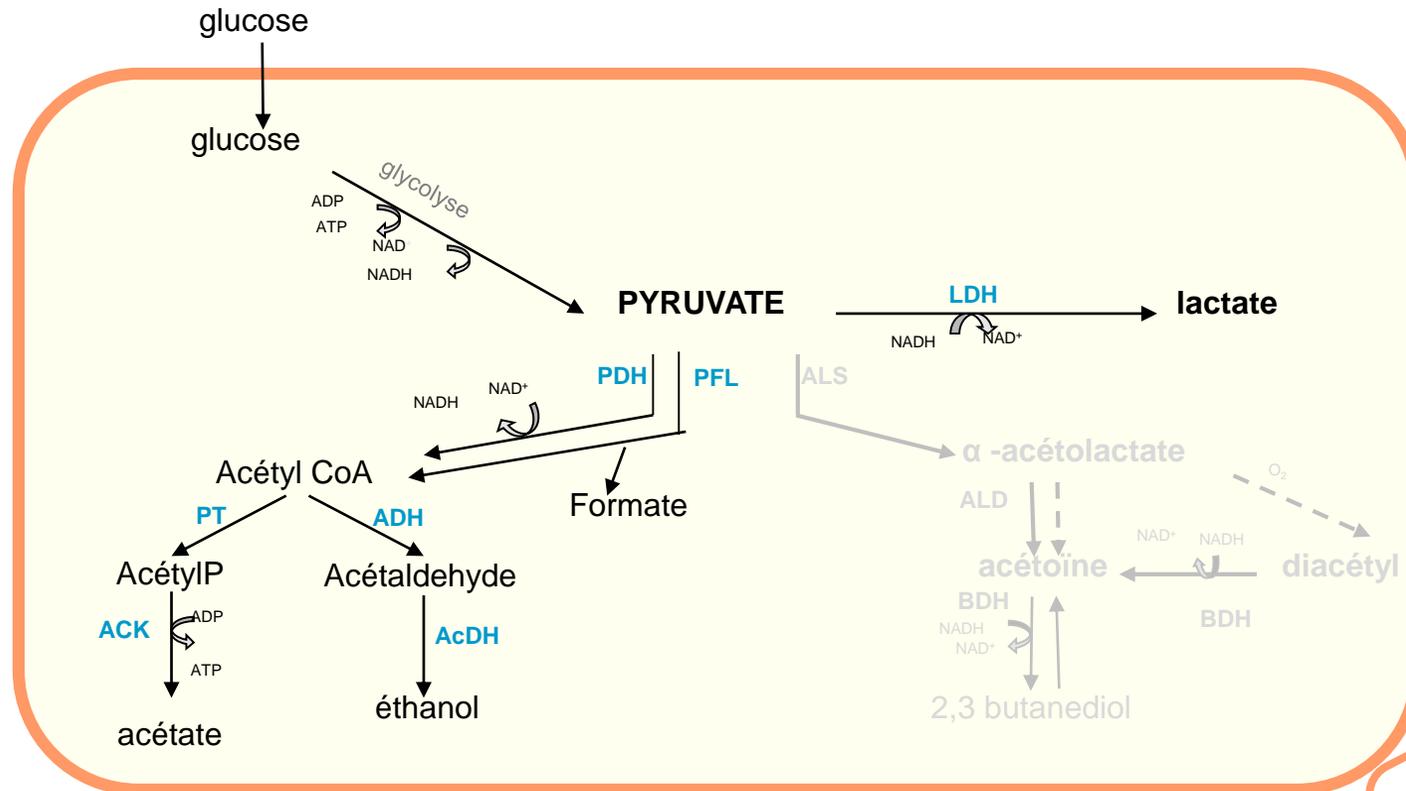
✓ Métabolisme des lipides

✓ Dégradation des acides aminés



BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

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

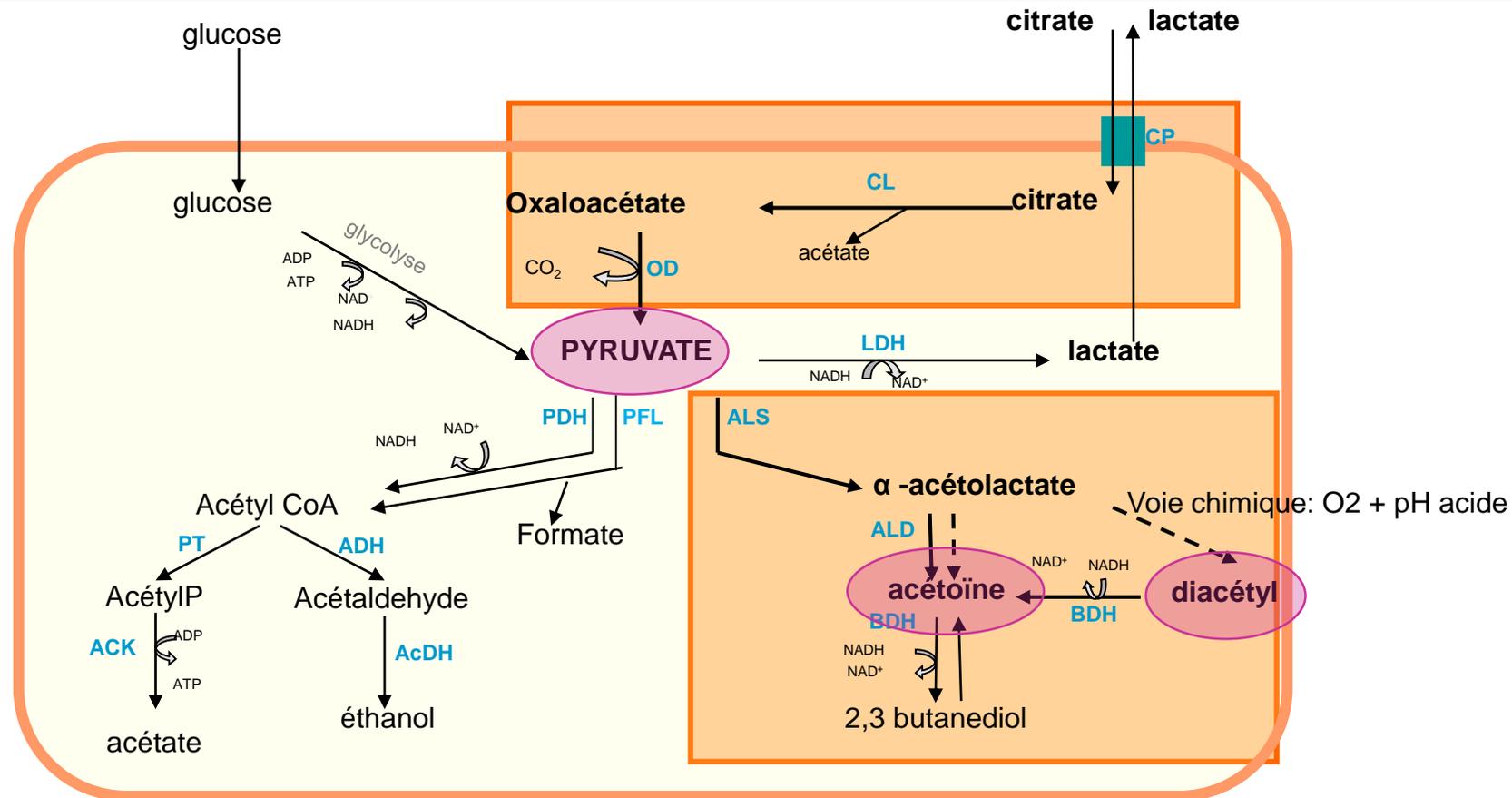


Diacétyl/acétoïne
=
Goût de beurre

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

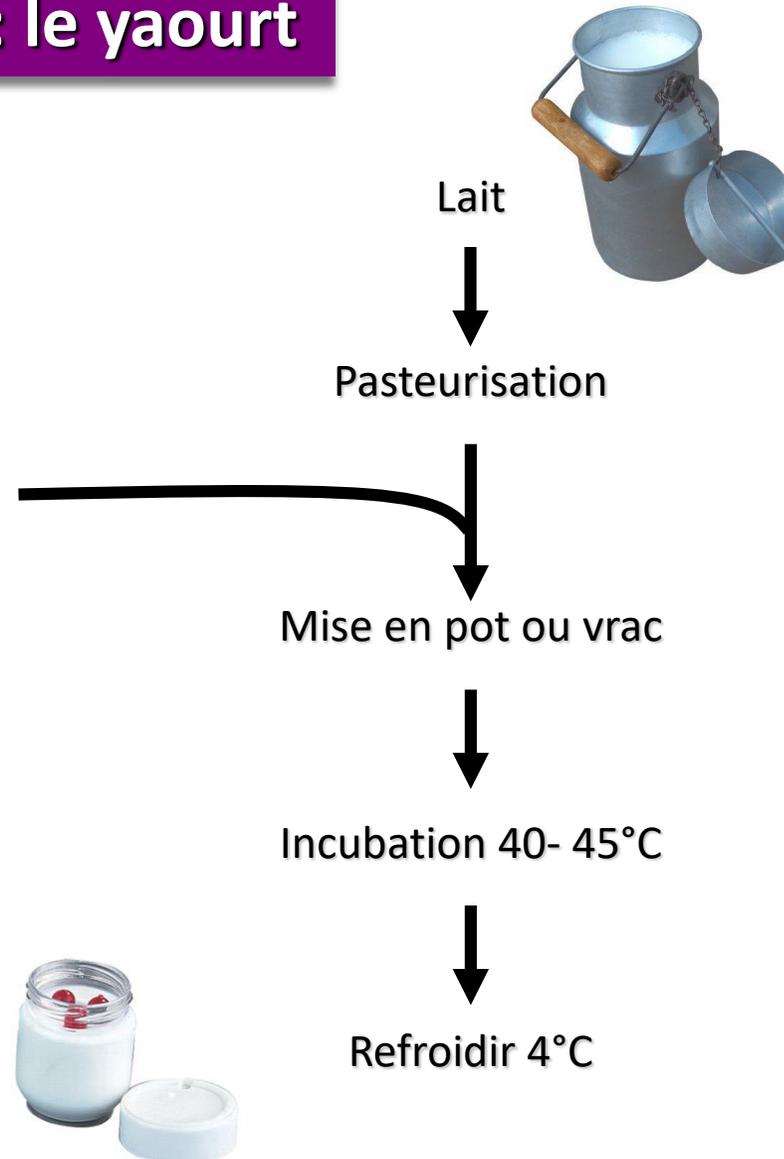
Culture de démarrage

L. bulgaricus
S. thermophilus

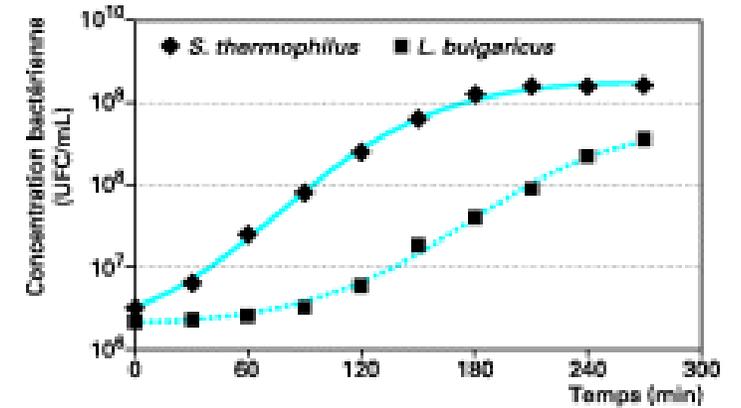
(Protocoopération)

10^8 - 10^9 CFC/mL

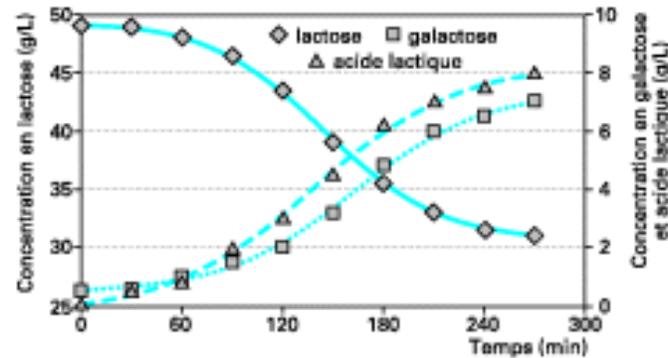
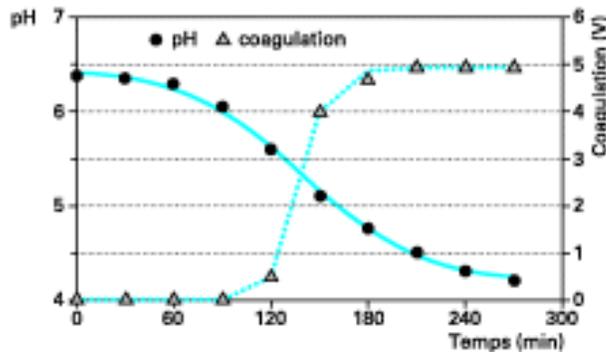
Teneur minimale en ac lactique: 0,7%



Les cinétiques de production du yaourt



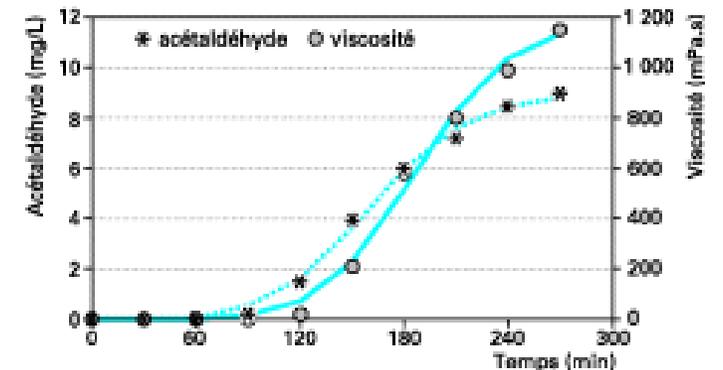
Pourquoi ça coagule?



C'est *S. thermophilus* qui commence!

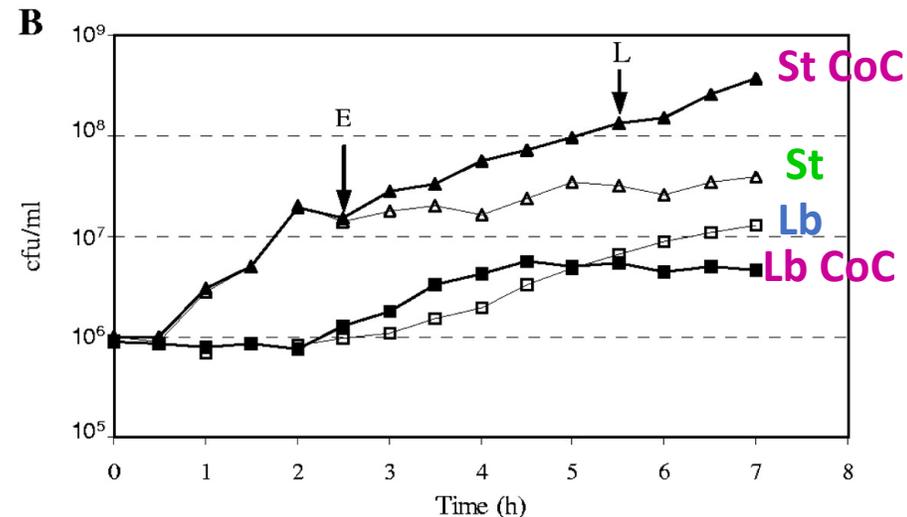
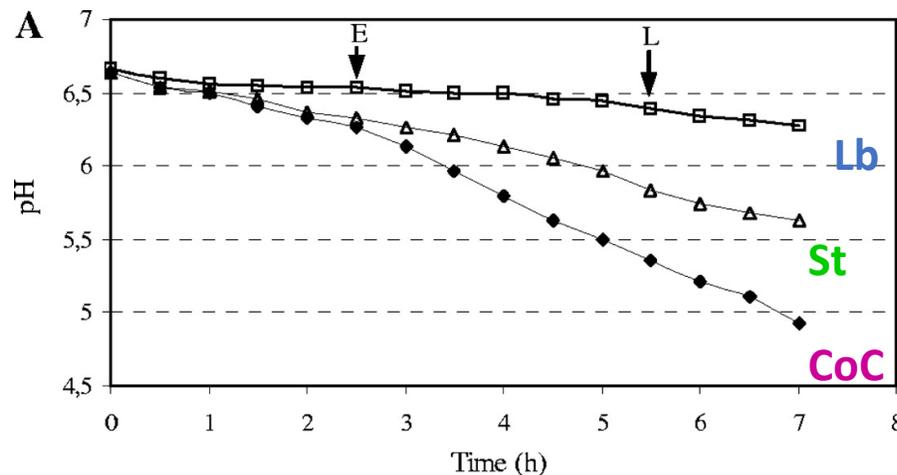
Le yaourt est onctueux: vive les exopolysaccharides

Le yaourt a bon goût: vive l'acétaldéhyde!



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

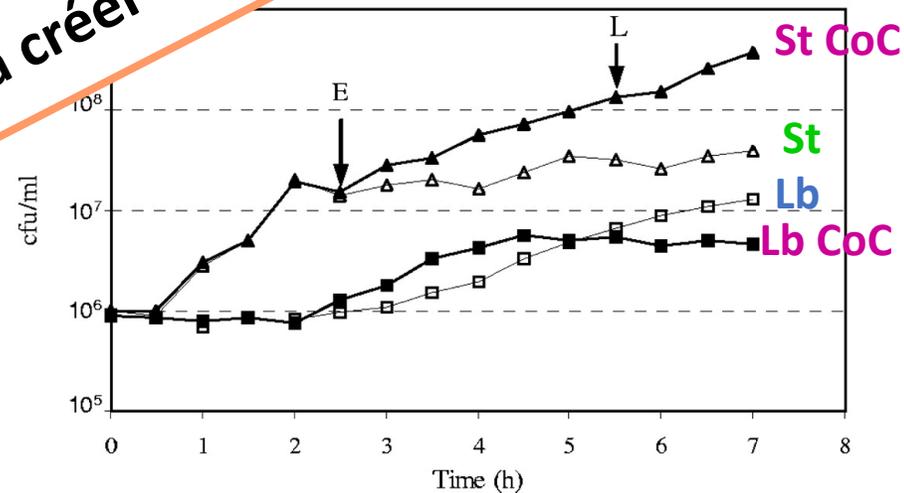
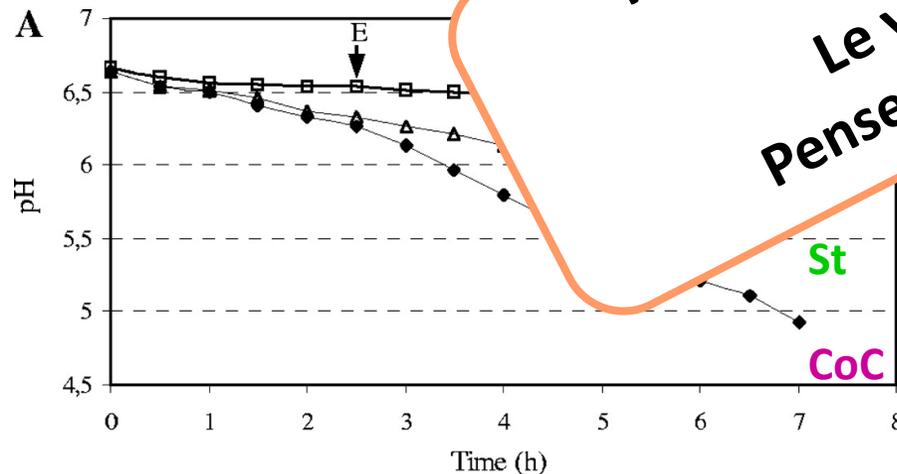
- Accroissement des vitesses de croissance et des concentrations bactériennes finales
- Diminution du pH final du produit en culture mixte
- Augmentation des vitesses d'acidification par rapport aux vitesses observées en cultures pures
- Stimulation de composés d'arômes
- Accroissement de l'activité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

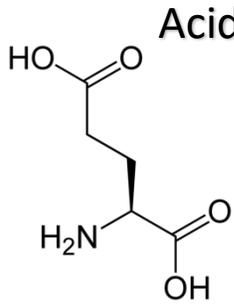
4 méthodes de production

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

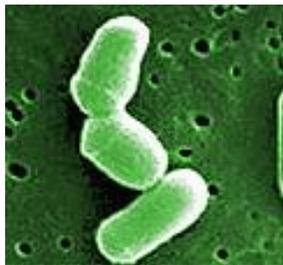
Production d'acide glutamique



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



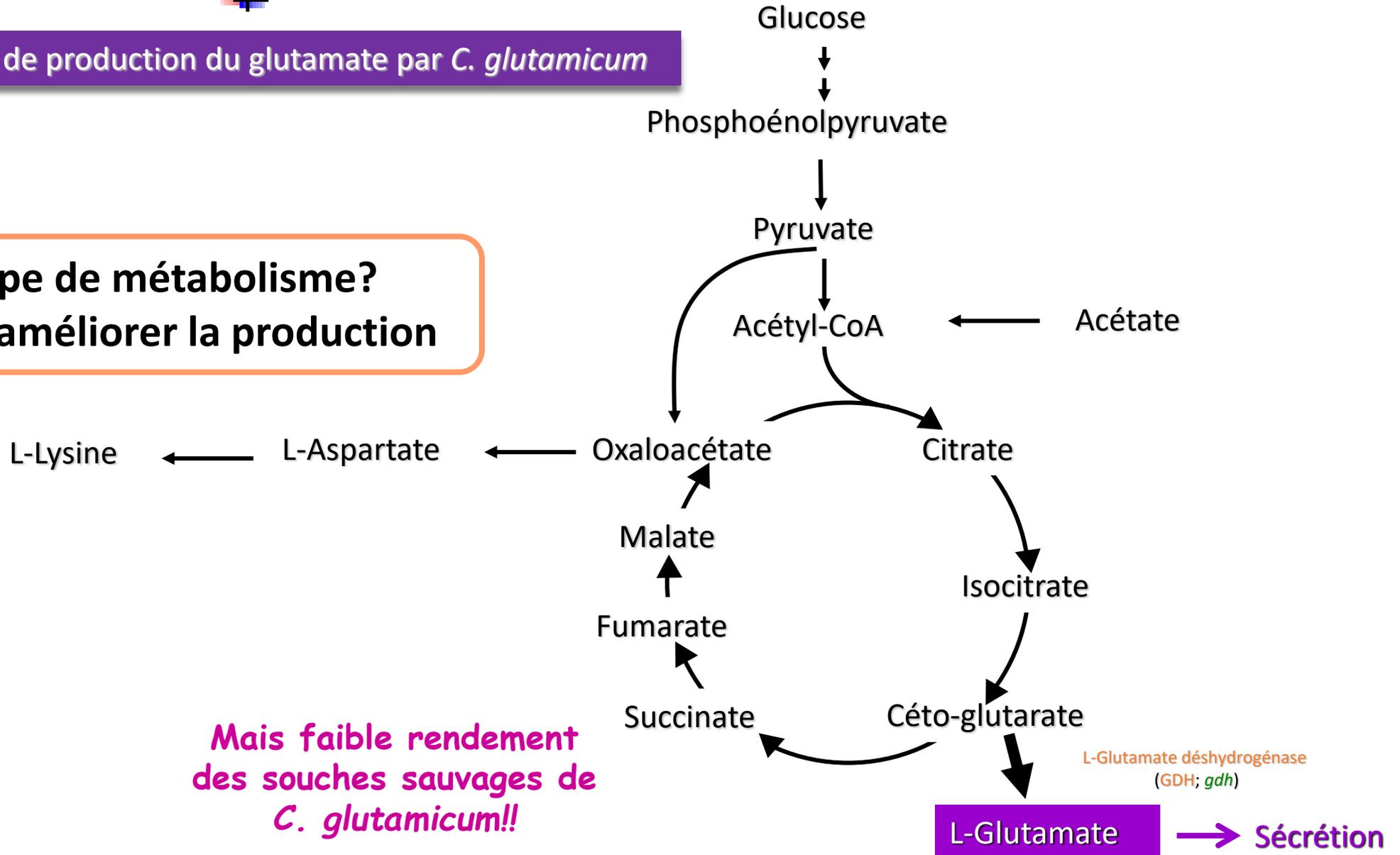
- Corynebacterium glutamicum*, ordre des Actinobacteria,
- G+ avec espace périplasmique et une enveloppe bactérienne contenant des acides mycoliques et de l'arabinogalactan,
- bactérie du sol, facile à cultiver et à modifier génétiquement et considérée comme GRAS.
- Génome: environ 3,3MB



BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

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

Quel type de métabolisme?
Comment améliorer la production

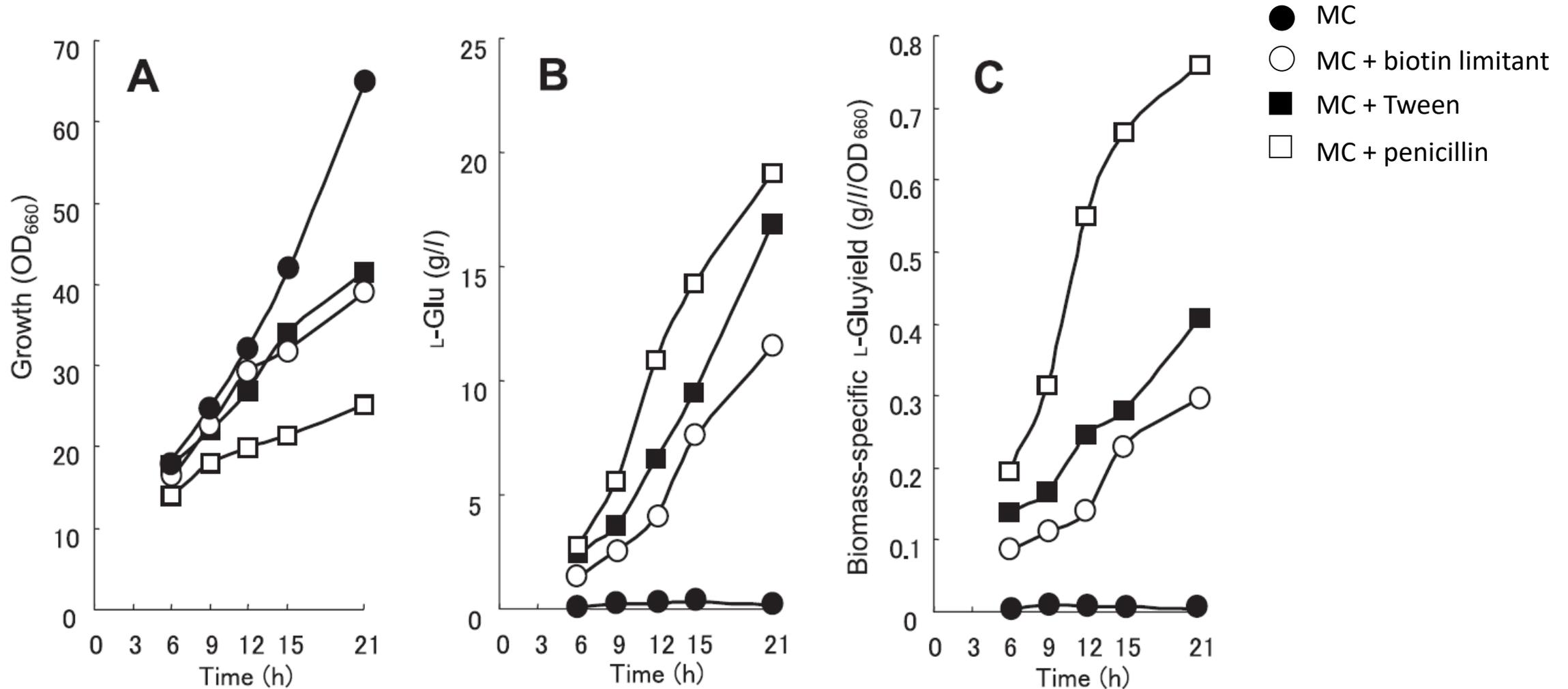


Mais faible rendement
des souches sauvages de
C. glutamicum!!

BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

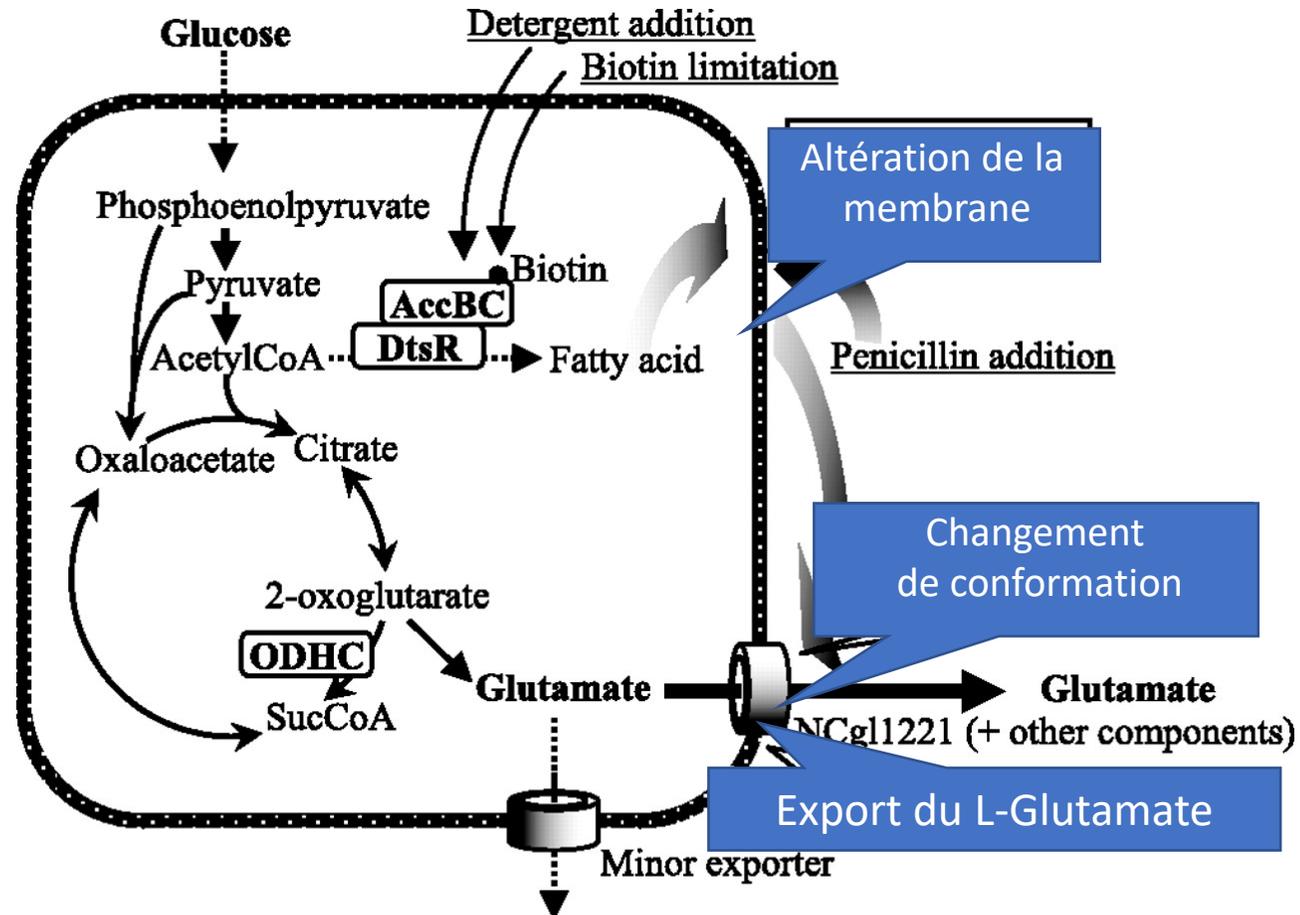


Amélioration de la production de L-Glutamate par *C. glutamicum*: approche physiologique



BIOTECHNOLOGIES ET ALIMENTATION

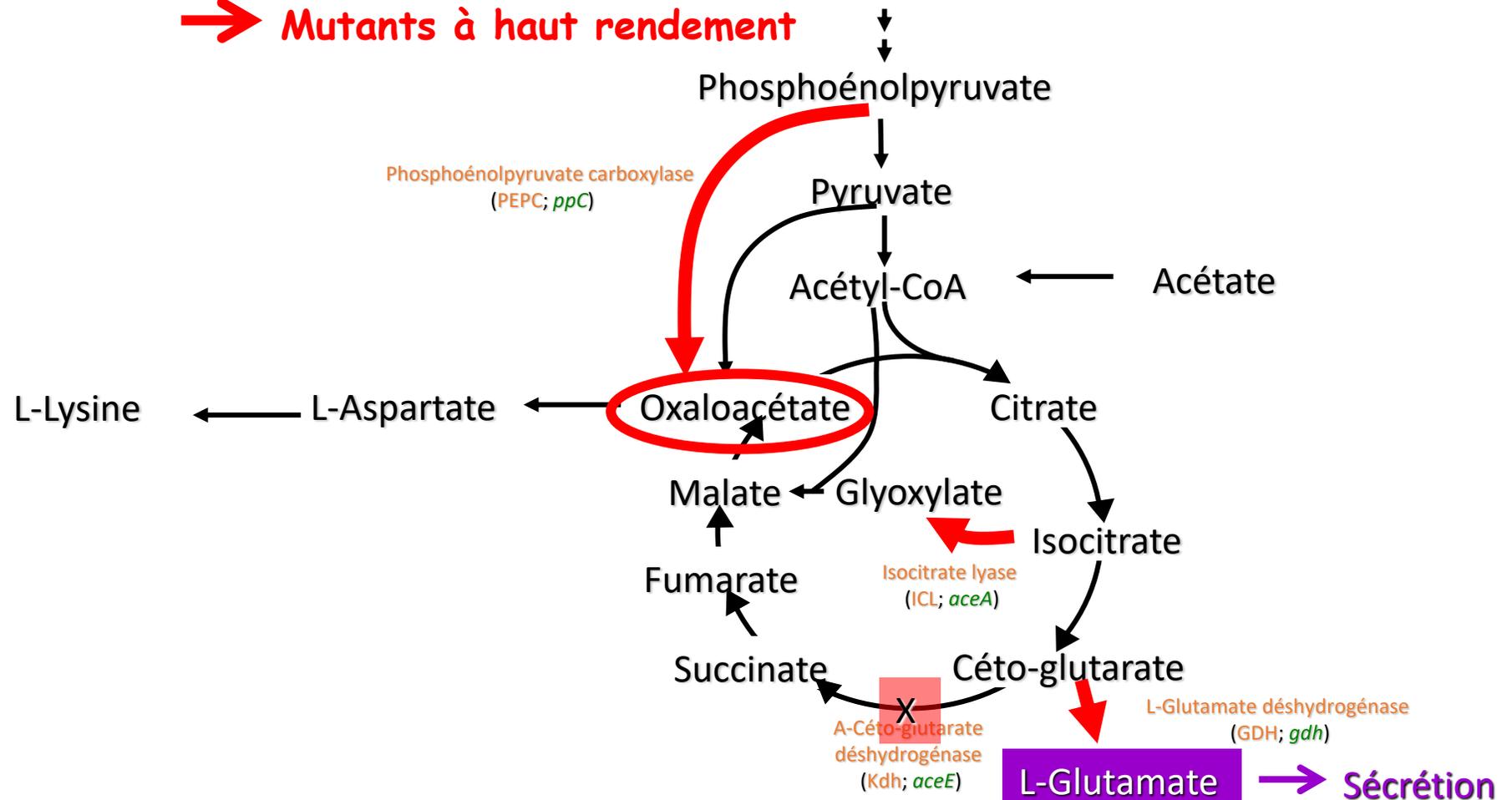
La sécrétion du L-Glutamate: facteur limitant à la production



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

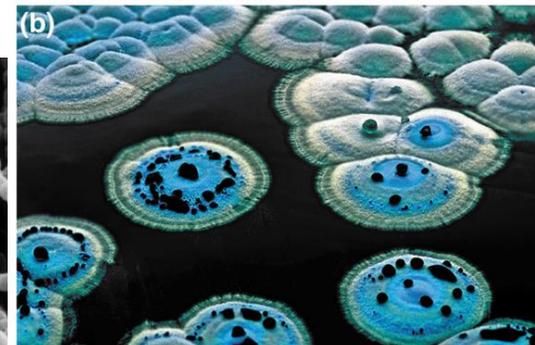
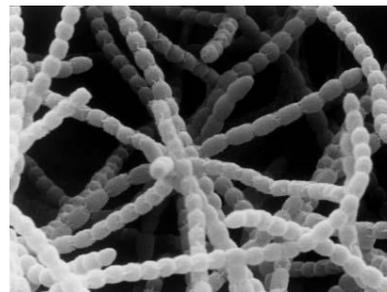
Streptomyces et production d'antibiotiques

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



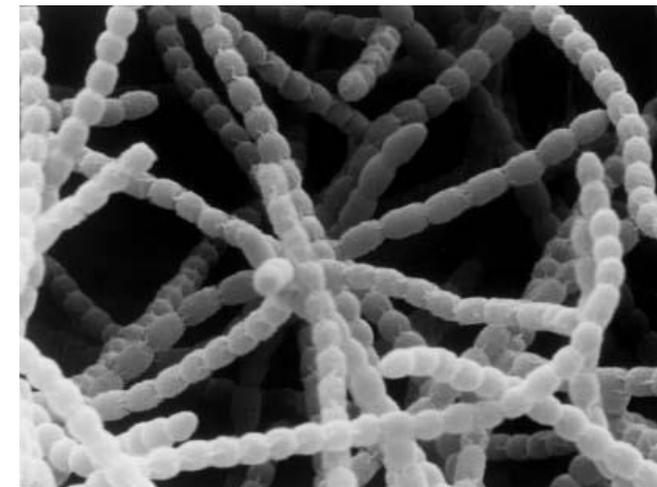
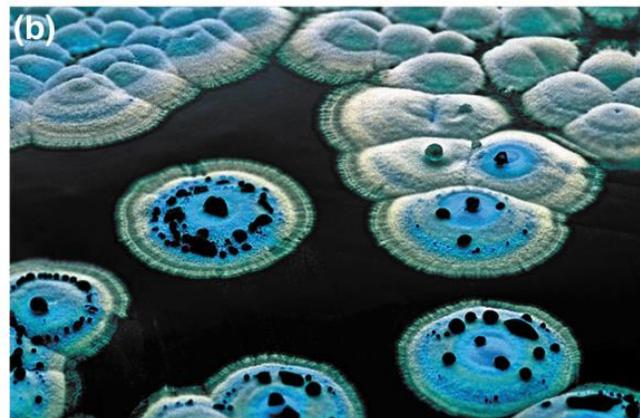
La production d'antibiotiques

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

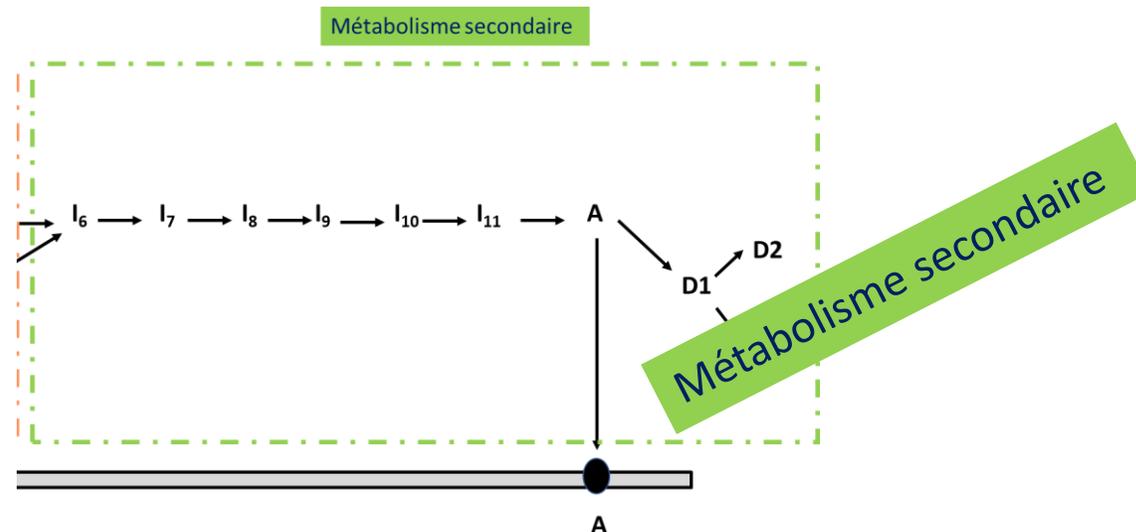


Microorganismes producteurs d'antibiotiques

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

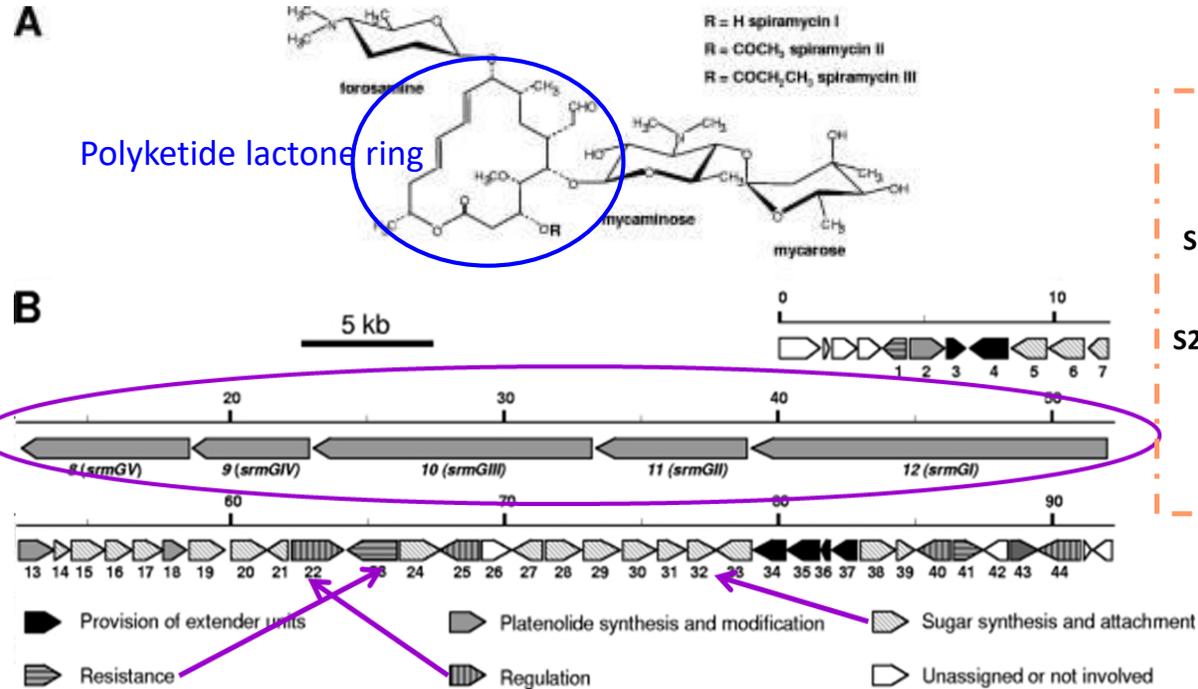


- Les *Streptomyces* (actinomycètes) jouent un rôle central dans la production d'antibiotiques

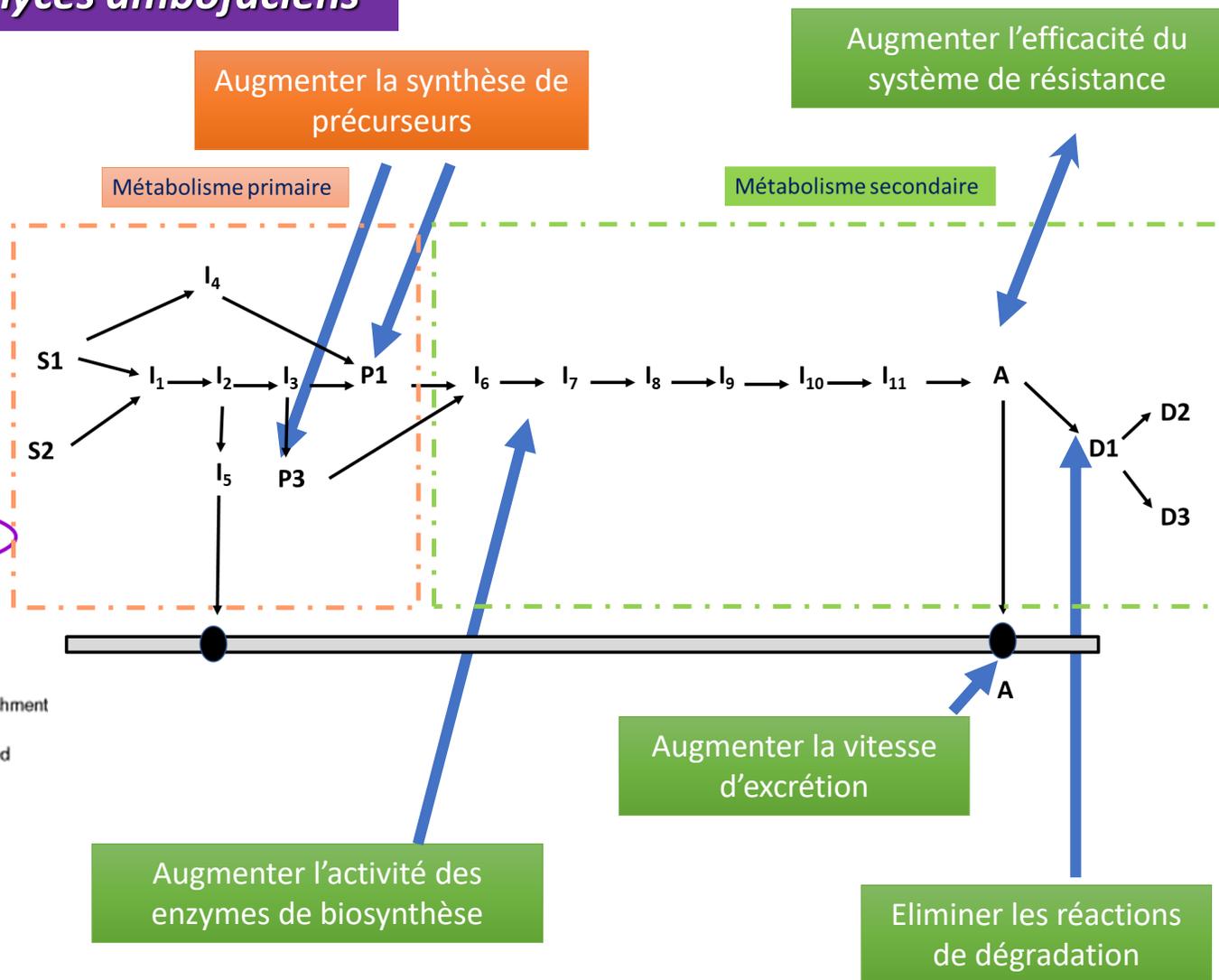


BIOTECHNOLOGIES ET SANTE

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?

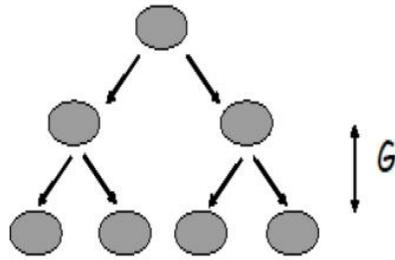
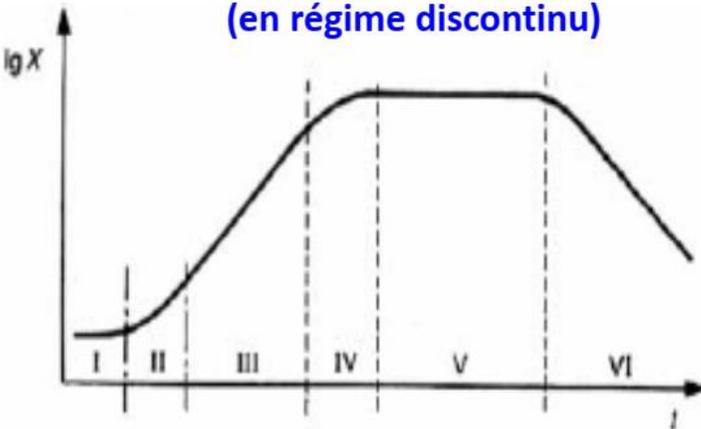
Suivi de la Croissance Microbienne

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

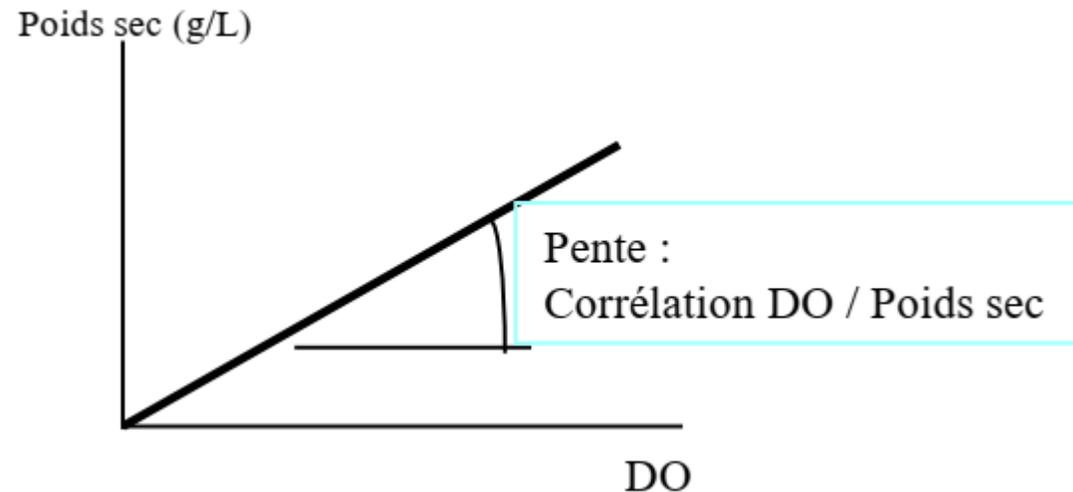
Optique (UDO/ml)

- 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

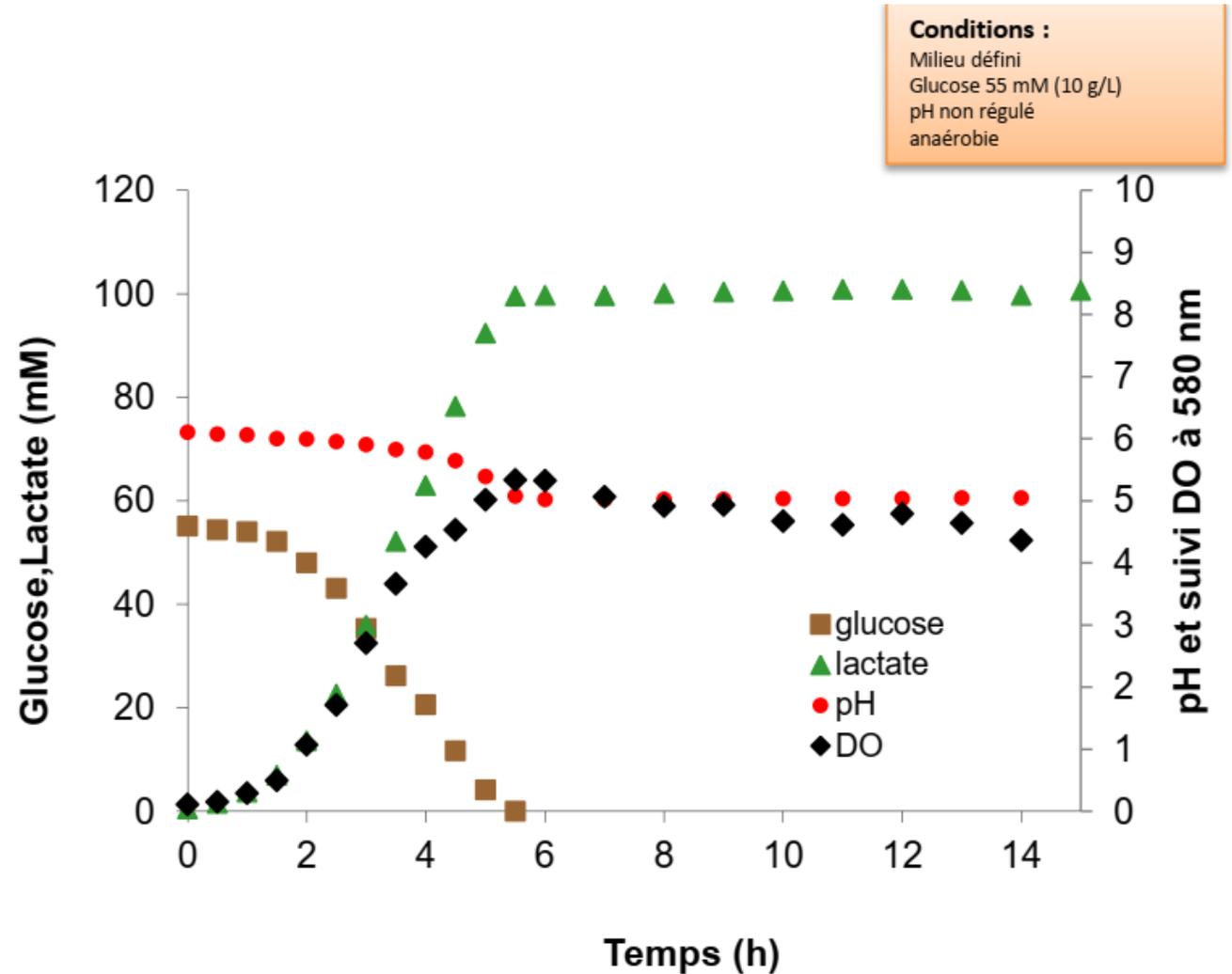
Exemple de suivi d'une production

Données brutes

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

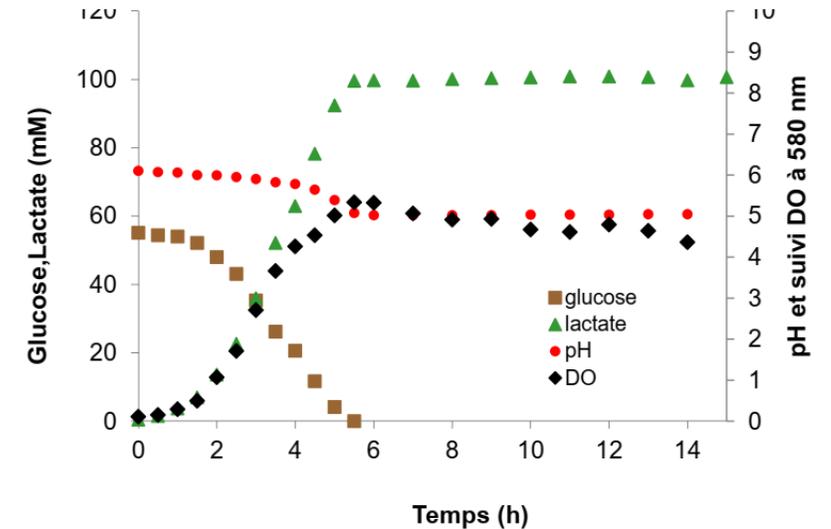
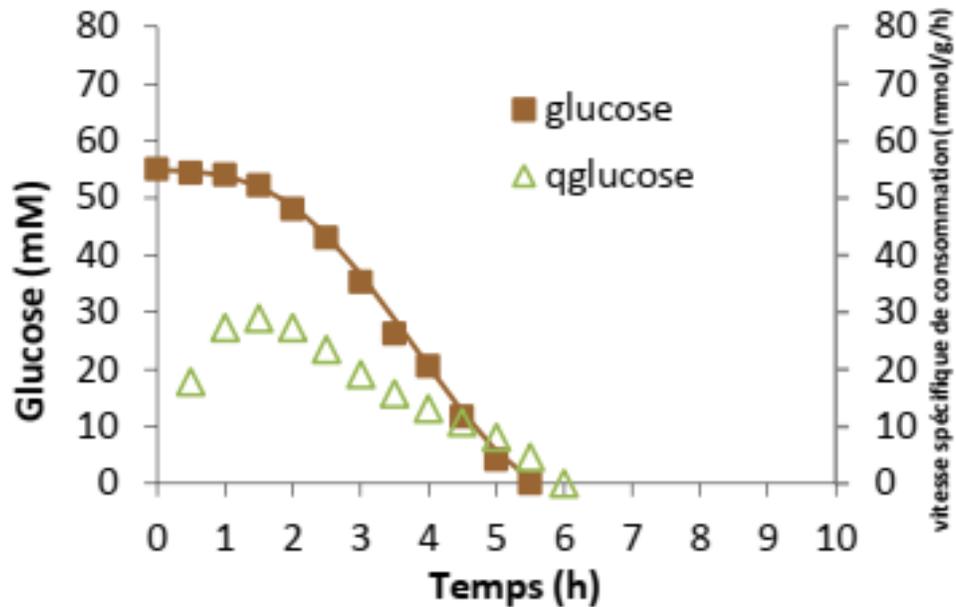
Observations

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



ANALYSE DE FERMENTATION

Exploitation des résultats



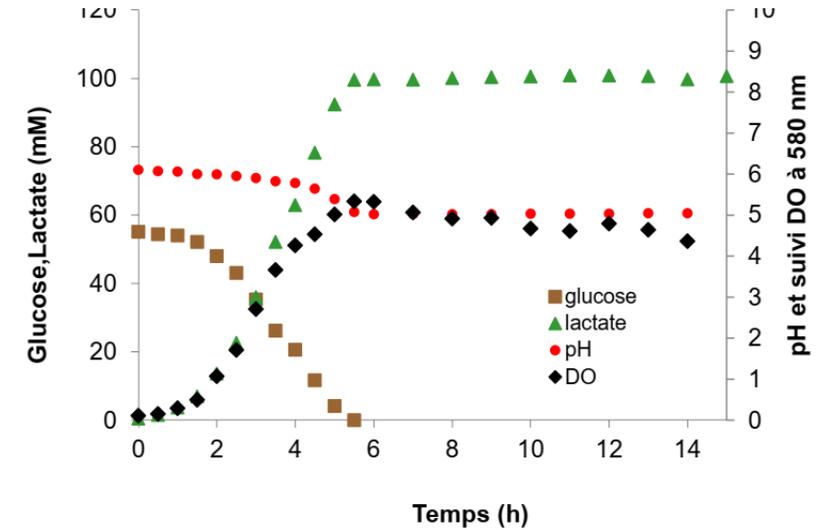
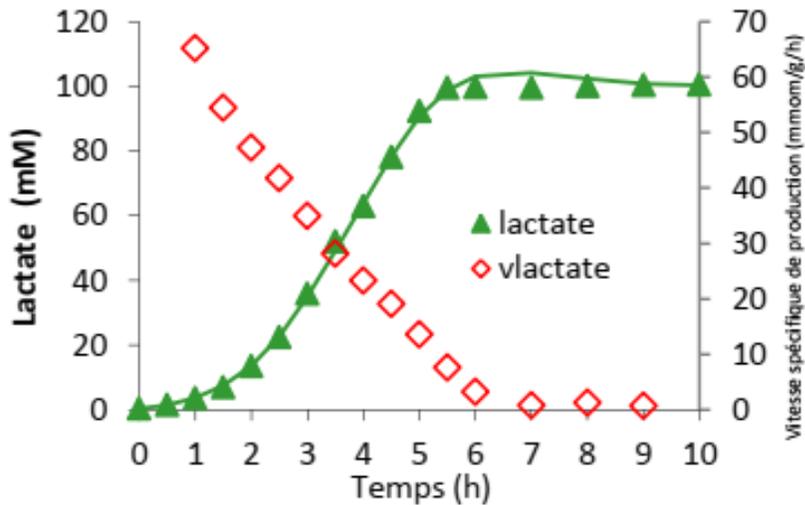
$$r_s = \frac{dS}{dt} \quad (\text{Vitesse de réaction})$$

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

Vitesse spécifique de consommation du sucre ($q_{\text{sucré}}$)

ANALYSE DE FERMENTATION

Exploitation des résultats



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

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

Vitesse spécifique de production (v_{produit})

ANALYSE DE FERMENTATION

Exploitation des résultats

Bilan carbone (en CmM)

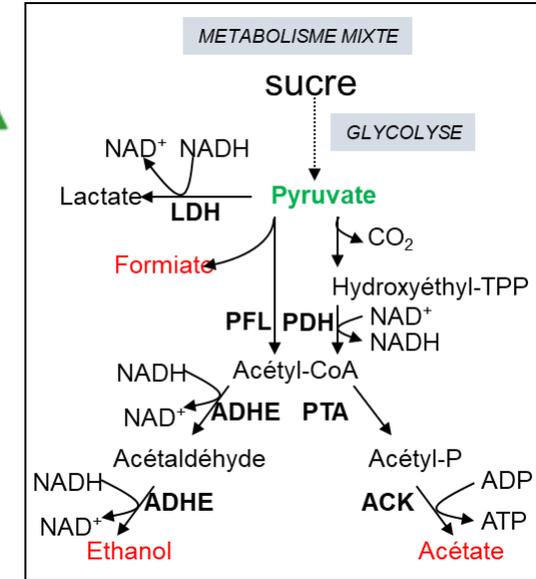
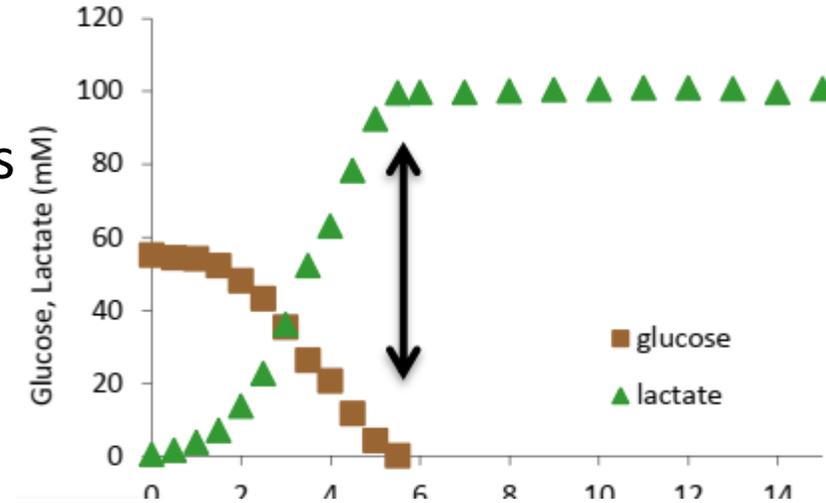
Σ produits formés = Σ substrats consommés

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

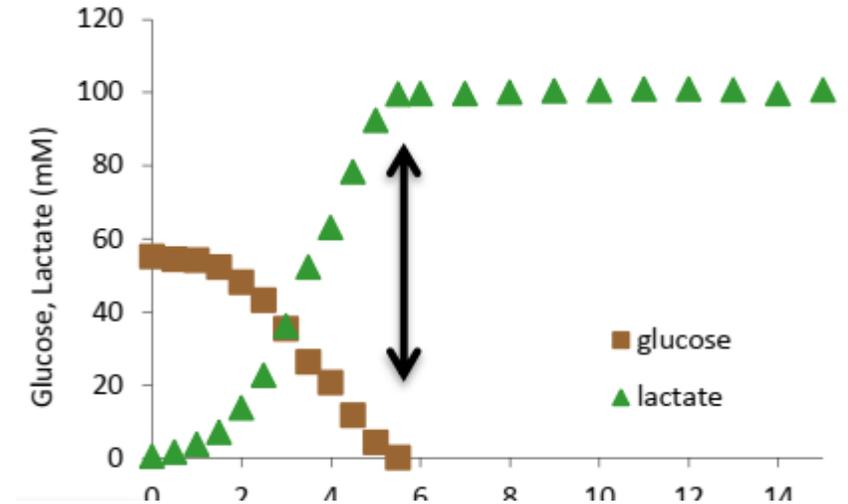
Le Rendement produit est de 100% (rendement théorique) quand on obtient 2x+ de moles de lactate que de glucose introduit

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**