



Université Abbes Laghrour Khenchela
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie moléculaire et cellulaire



Cours de Microbiologie Appliquée et Analyse de la Biodiversité Microbienne

Dr. LEULMI Nassima

Destiné aux étudiants :

2^{ème} année master Microbiologie

Année universitaire 2019/2020

Avant-propos

Ce polycopié est destiné principalement aux étudiants en master 2 Microbiologie appliquée. Il contient l'essentiel en biologie moléculaire, en microbiologie et en microbiologie appliquée. Il est donc aussi utile pour les étudiants en licence et en master 1 microbiologie.

Les informations sont issues d'un grand nombre de livres et des articles scientifiques. Ce polycopié résume différents aspects de l'application des microorganismes dans différents domaines, les traitements antimicrobiens et les différentes techniques d'analyser la biodiversité des microorganismes.

Le dernier chapitre est consacré à la protection des recherches et des principes éthiques des recherches scientifiques.

LEULMI Nassima

Email : leulminassima@gmail.com

Table des matières

CHAPITRE 1 : PROTOZOAIRE, CHAMPIGNONS, LEVURES, BACTERIE D'INTERET GENETIQUE, INDUSTRIEL ET MEDICAL	
<i>Introduction</i>	01
1. La microbiologie industrielle.	01
1.1. Les microorganismes utilisés en microbiologie industrielles.	01
1.1.1. La croissance des microorganismes dans une installation industrielle.	02
1.1.2. Les principaux produits de la microbiologie industrielle.	04
1.1.3. Les méthodes de bioconversion	05
1.1.4. La conversion microbienne de l'énergie	06
1.1.5. Les microorganismes en tant que produits	06
2. La microbiologie appliquée environnementale	07
3. La microbiologie alimentaire	08
3.1. Les aliments fermentés	08
3.2. Les microorganismes en tant qu'aliment et adjuvant alimentaire	09
4. Microorganismes et génie génétique	09
4.1. Principe du génie génétique	10
4.2. Contribution des microorganismes au génie génétique	10
4.3. La manipulation génétique des microorganismes	11
4.4. Applications médicales du génie génétique	15
CHAPITRE 02 : VALORISATION DES DECHETS ET BIOMASSE EPURATRICE	
Introduction	18
1. Qu'est-ce qu'un déchet ?	18

1.1. Classification des déchets	18
1.2. Aspects de valorisation de déchets	19
1.2.1. Valorisation par compostage	19
1.2.2. Valorisation énergétique	20
1.2.3. Utilisation des déchets comme sous-produits (substrat) en microbiologie industrielle	25
1.2.4. Valorisation les déchets en alimentation	25
1.2.5. Exemples de différentes voies de valorisation des déchets liquides	25
1.3. Aspects d'élimination des matières polluantes par une biomasse épuratrice	27
1.3.1. Composition de la biomasse épuratrice	27
1.3.2. Que peut-on faire à partir de la biomasse épuratrice ?	27
CHAPITRE 03 : TRAITEMENTS ANTIMICROBIENS ET RISQUE MICROBIOLOGIQUE	
<i>Introduction</i>	31
1. Les agents antimicrobiens	31
2. Les conditions affectant l'efficacité des agents antimicrobiens	31
3. Classement des agents antimicrobiens	32
3.1. Les agents physiques	32
3.2. Les agents chimiques	34
4. Normes de base sur les manipulations de microbiologie	34
4.1. Laboratoire de microbiologie	34
4.2. Niveaux de sécurité des laboratoires	35
5. Manipulation de base	37
6. Risque microbiologique	39
6.1. Analyse du risque microbiologique	39

6.1.1. Appréciation du risque (scientifique)	39
6.1.2. Gestion du risque (autorité publiques)	40
6.1.3. Communication du risque	40
CHAPITRE 04 : ANALYSE DE LA BIODIVERSITE MICROBIENNE	
<i>Introduction</i>	41
1. Des définitions	41
2. La classification phénétique	42
3. La classification phylogénétique	42
4. Les méthodes d'étude des communautés microbiennes	42
4.1. L'approche culturelle (culture dépendante)	42
4.1.1. Les caractéristiques classiques	42
4.1.2. Les caractéristiques moléculaires	45
4.2. Etude de la communauté microbienne par une approche métagénomique (culture indépendante)	49
4.2.1. Technique de la DGGE (denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	51
4.2.2. Technique de la SSCP	52
4.2.3. Technique de la TRFLP	54
4.2.4. Les nouvelles méthodes de séquençage à haut-débit	55
5. Les limites des techniques moléculaires	58
5.1. Échantillonnage et conservation des échantillons	58
5.2. Les techniques de PCR	58
6. Les collections des microorganismes : rôle dans la préservation de la biodiversité microbienne	59
CHAPITRE 05 : PROTECTION DES RECHERCHES ET LA VALORISATION INDUSTRIELLE	

<i>Introduction</i>	60
1. Qu'est-ce qu'une recherche ?	60
2. Qu'est-ce qu'un code éthique ?	61
3. Conduites responsables en recherche scientifique	61
3.1. Respect des lois et des principes généraux	61
3.2. Respect des conventions et des principes éthiques	61
3.3. Violation du code éthique	62
3.4. Traitement et publication des résultats de la recherche	62
4. Valorisation des résultats de la recherche	63
4.1. Qu'est-ce que la valorisation de la recherche?	63
4.2. Les acteurs de la valorisation	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	65

Liste des figures

Figure 01 : Un fermenteur industriel	03
Figure 02 : Croissance et production de métabolites	04
Figure 03 : La biotransformation d'un stéroïde.	06
Figure 04 : Principe de génie génétique	10
Figure 05 : Insertion d'un fragment d'ADN dans le plasmide.	11
Figure 06 : Mutagenèse dirigée : Un oligonucléotide est utilisé pour introduire dans un gène une mutation spécifique.	12
Figure 07 : la bioingénierie des plantes.	14
Figure 08 : Les étapes de la technologie de l'ADN recombinant.	17
Figure 09 : Différents aspects de valorisation des déchets.	19
Figure 10 : les étapes de la digestion anaérobie.	21
Figure 11 : Produits issus de la pyrolyse de la biomasse et de leurs utilisations.	24
Figure 12 : Composition moyenne des produits de la pyrolyse lente.	24
Figure 13 : Principales voies de valorisation et de traitement des margines.	26
Figure 14 : Niveau de confinement 1.	35
Figure 15 : Niveau de confinement 2.	36
Figure 16 : Niveau de confinement 4.	36
Figure 17 : Les différents types de PSM.	38
Figure 18 : L'agglutination	44
Figure 19 : Technique immuno-enzymatique.	45
Figure 20 : Principe de la PCR.	46
Figure 21 : Méthode de séquençage Sanger	47
Figure 22 : Une courbe de fusion d'ADN	48

Figure 23 : Hybridation des acides nucléiques.	49
Figure 24 : Les différentes étapes et application de la métagénomique.	50
Figure 25 : électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE).	52
Figure 26 : Analyse moléculaire par SSCP.	53
Figure 27 : les étapes de la TRFLP.	54
Figure 28 : Résumé des étapes de séquençage par technologie 454.	57
Figure 29 : Chimie du pyroséquençage 454.	57

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les principaux produits et procédés importants en microbiologie industrielles.	04
Tableau 02 : L'expression des gènes dans d'autres organismes pour améliorer les procédés et les produits.	13
Tableau 03 : Etapes principales des traitements primaires, secondaires et tertiaire des eaux usées.	27
Tableau 04 : Classement des agents infectieux	39
Tableau 05 : Quelques caractères morphologiques utilisés pour la classification et l'identification	43
Tableau 06 : Tableau comparatif des différentes technologies de séquençage à haut débit	55
Tableau 07 : Exemples de collections de cultures importantes utiles aux microbiologistes industriels.	59

Chapitre 1 : Protozoaire, champignons, levures, bactérie d'intérêt génétique, industriel et médical

Introduction

L'homme a utilisé de manière empiriquement les microorganismes durant des millénaires, dans la fabrication de produits fermentés : pain levé, fromages, boissons alcoolisées, sans même se douter de leur existence.

C'est seulement en 19^{ème} siècle, que Pasteur, a le premier établi clairement le rôle fondamental des microorganismes dans le processus de fermentation de la bière et d'autres produits. Depuis, l'exploitation des propriétés métaboliques et de croissance exponentielle des microorganismes n'a cessé de se développer, des diverses manières : sélection continue de souches performantes, optimisation des procédés. Ces progrès ont d'abord permis l'émergence de l'industrie alimentaire qui s'est imposé dès le début du 20^{ème} siècle comme une activité industrielle de premier plan, en réussissant même à engendrer un modèle de consommation universellement répondu.

Parallèlement, l'exploitation industrielle des microorganismes a gagné peu à peu d'autres domaines : industrie pharmaceutiques, industrie chimique,.....etc. Avant de déboucher dans les années 1970, sur les nouvelles biotechnologies qui, grâce au génie génétique en particulier, ont ouvert des champs d'application nouveaux et considérables à la microbiologie industrielle ; santé, agriculture, environnement,...

Dans ce chapitre, est présenté un aperçu de certains des aspects les plus remarquablement liés à l'exploitation des microorganismes.

1. La microbiologie industrielle

La diversité génétique surabondante du monde microbien constitue une ressource inépuisable et inexploitée de molécules importantes pour la médecine et l'industrie. La microbiologie industrielle exploite la capacité des microbes de synthétiser des molécules qui ont des applications en médecine, en agriculture, en industrie alimentaire et d'autres procédés industriels. Ces composés sont communément appelés **produits naturels**.

1.1. Les microorganismes utilisés en microbiologie industrielle

Les microbes utilisés en microbiologie industrielle provenant le plus souvent de matière naturelle, comme **des échantillons de sol et d'eau, de fruits et de pain avariés**. Des cultures provenant de toutes les parties du monde continuent d'être examinées, **dans le but d'identifier de nouvelles souches dotées de caractéristiques souhaitées**. Toutefois, comme la plupart de ces microbes ne peuvent s'adapter à la croissance dans les conditions standards du laboratoire, les techniques d'enrichissement des échantillons naturels et leurs purifications ultérieures évoluent en continu.

1.1.1. La croissance des microorganismes dans une installation industrielle

Une fois qu'un microbe a été identifié et optimisé pour la biosynthèse d'un produit important, il doit être cultivé dans des milieux spécifiques, avec un contrôle méticuleux des conditions de croissance.

Une fermentation est la culture en masse de microorganismes. Les fermentations industrielles exigent la mise au point de milieux de culture appropriés et le transfert des technologies à petite échelle à une échelle beaucoup plus grande. En effet, le succès d'un produit microbien industriellement important repose sur la mise à l'échelle (**scale-up**), lorsqu'une méthode mise au point dans un petit flacon agité, est modifiée pour être appliquée dans un grand fermenteur.

Il faut maintenir le microenvironnement de la petite culture, malgré l'accroissement du volume de la culture.

Les microorganismes peuvent être cultivés dans des fermenteurs à agitation rotative ou d'autres systèmes de culture en masse. La taille **des fermenteurs** à agitation rotatives varie de 3 litres à plus de 10 000 litres, selon la nécessité de production. Une unité de fermentation agitée typique est illustrée dans **la figure 01**.

Un fermenteur = Unité pour fonctionner dans des conditions oxiques ou anoxiques

Non seulement, il faut stériliser le milieu, mais l'aération, l'ajustement du pH, la prise de l'échantillon et le monitoring de l'opération doivent s'effectuer dans des conditions rigoureusement contrôlées. En cas de nécessité, on doit ajouter des agents anti-mousse, particulièrement avec des milieux riches en protéines.

Des ordinateurs permettent de suivre les informations fournies par les sondes, qui mesurent la biomasse microbienne, les concentrations des produits métaboliques critiques, le pH, la composition des gaz entrants et sortants et d'autres paramètres.

Fréquemment, on ajoute un composant essentiel du milieu (souvent la source du carbone) de **façon continue- c'est l'alimentation continue-** de sorte que le microorganisme ne dispose à aucun moment un excès de substrat.

Les techniques de culture en continu, **utilisent des chémostats**, améliorent fortement les productions cellulaires et les vitesses de consommation du substrat car les microorganismes sont maintenus **en phase logarithmique**.

On classe souvent les produits microbiens en **métabolites primaires et secondaires**

- **Les métabolites primaires** : consistent en composés associés à la synthèse des cellules microbiennes pendant la phase de croissance équilibrée. Ils comprennent les acides aminés, les nucléotides et les produits finaux de fermentation comme l'éthanol et les

acides organiques. De plus les enzymes à valeur industrielle, associé aux cellules, or extracellulaire, sont souvent synthétiser par les microorganismes au cours de la croissance.

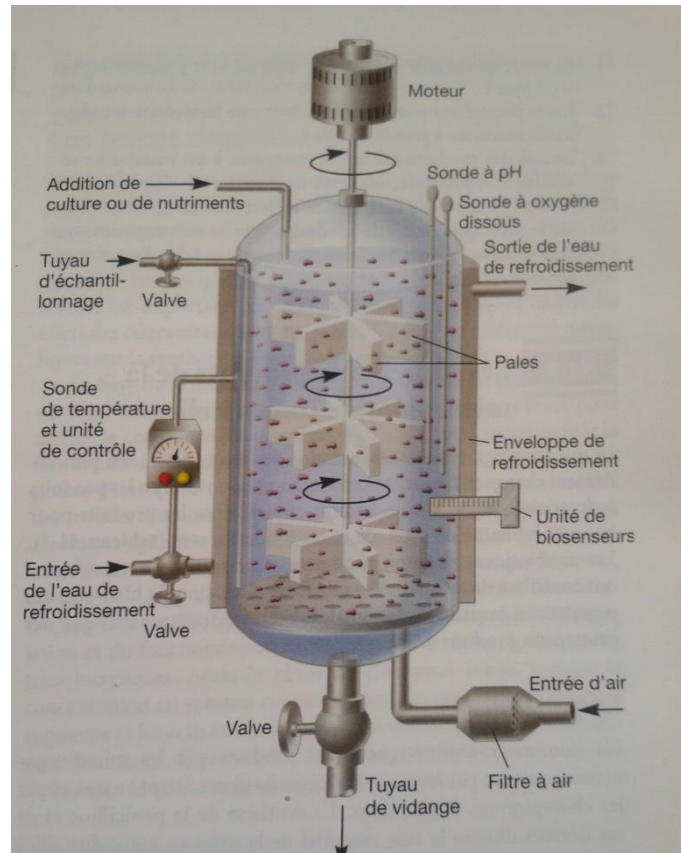


Figure 01 : Un fermenteur industriel

- **Les métabolites secondaires :** s'accumulent habituellement pendant la période de limitation des nutriments ou d'accumulation des déchets, qui suit la phase de croissance active. Ces composés n'ont pas de relations directes avec la synthèse du matériel cellulaire et la croissance normale. La plupart des antibiotiques et les mycotoxines se placent dans cette catégorie (**figure 02**). **Un nombre important de nouveaux antibiotiques** de nature chimique très diversifiée a été découvert récemment. À titre d'exemples, nous citerons, la caboxamycine de la famille de benzoxazole, sécrétée par la souche *Streptomyces* sp. NTK 937 isolée à partir des sédiments marins, la bezerramycine A-C douée d'activité antiproliférative est sécrétée par une souche de *S. griseus* et la quinomycine G, analogue de l'échinomycine, sécrétée par *Streptomyces*. sp. LS298 isolée à partir de l'éponge marine *Gelliodes carnosa*. **Certaines bactéries et moisissures excrètent des toxines.** Dans certains cas, la production industrielle de ces toxines présente un grand intérêt car elles sont utilisées pour la fabrication de vaccins et antitoxines utilisés en médecine.

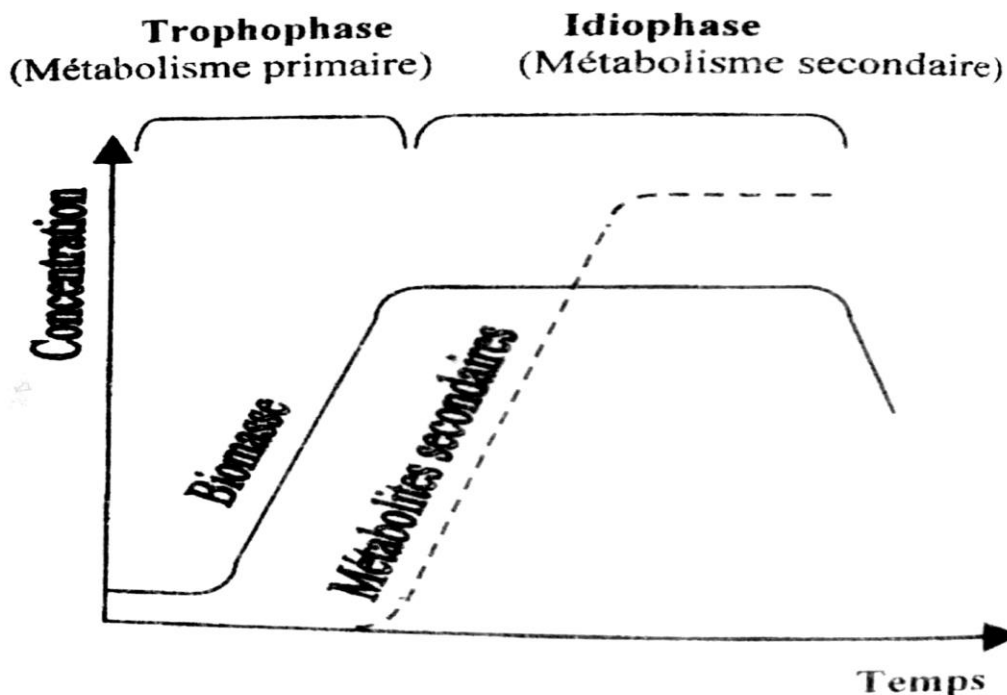


Figure 02 : Croissance et production de métabolites

1.1.2. Les principaux produits de la microbiologie industrielle

La microbiologie industrielle a donné des produits qui ont profondément changé notre vie et notre espérance de vie. Il ya les produits industriels et agricoles, les additifs alimentaires, les produits pour la santé humaine ou animale et les biocarburants (tableau 1).

Tableau 01 : Les principaux produits et procédés importants en microbiologie industrielles.

Substances	Microorganismes
Produits industriels	
Ethanol (à partir de glucose)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ethanol (à partir de lactose)	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
Acétone et Butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
2,3-Butanediol	<i>Enterobacter, Serratia</i>
Enzymes	<i>Aspergillus, Bacillus, Mucor, Trichoderma</i>
Produits agricoles	
Gibbérellines	<i>Gibberella fujikuroi</i>
Additifs alimentaires	
Acides aminés (la lysine)	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Acide organiques (acide citrique)	<i>Aspergillus niger</i>
nucléotides	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Vitamines	<i>Ashbya, Eremothecium, Blakeslea</i>
Polysaccharides	<i>Xanthomonas</i>
Produits médicaux	

Antibiotiques	<i>Penecillium, Streptomyces, Bacillus</i>
Alcaloïdes	<i>Claviceps purpurea</i>
Trasformation des stéroïdes	<i>Risopus, Arthrobacter</i>
-Molécules anticancéreuses	<i>Erotium cristatum, Actinobactéries</i>
Biocarburants	
Hydrogène	<i>Microragnimes photosynthétique</i>
Méthane	<i>Methanobacterium</i>
Ethanol	<i>Zymomonas, Thermoanaerobacter</i>

Des métabolites secondaires possédants des activités pharmacologiques biologiques prometteuses ont été mis en évidence dans plusieurs espèces **d'algues**.

Dans l'industrie alimentaire, l'usage croissant de produits naturels plutôt que synthétiques, a encouragé la recherche de nouveaux colorants naturels produits par les algues. En particuliers, **les phycobiliprotéines** se sont imposés commercialement comme colorants naturels alimentaires. Autres avantages sont leur couleur intense, leur grande solubilité dans l'eau, et leur stabilité aux variations de pH. Leur application dans les produits cosmétiques est également importante. Une phycobiliprotéine rouge très fluorescent, la phycoérythrine, est utilisée principalement dans les analyses cytofluorimétriques.

1.1.3. Les méthodes de bioconversion

On appelle bioconversion, ou **transformations microbiennes** ou encore **biotransformations**, des échanges mineurs dans les molécules (comme l'insertion d'une fonction hydroxyle ou cétone, ou saturation/désaturation d'une structure cyclique complexe), qui sont dus **à des microorganismes qui ne croissent pas**. Les microorganismes agissent donc comme des **biocatalyseurs**. **Exemple** la biotransformation d'un stéroïde (**figure 03**).

Les bioconversions présentent de nombreux avantages par rapport aux méthodes chimiques. L'un des principaux est d'ordre **stéréochimique** : c'est la forme biologiquement active du produit qui est fabriqué.

L'hydroxylation d'un stéroïde (figure 03) est une bioconversion typique. Dans cet exemple, le stéroïde insoluble dans l'eau est dissous dans l'acétone, puis versé dans le réacteur qui contient les cellules microbiennes pré-cultivées. On suit l'évolution de la bioconversion et le produit final est extrait du milieu et purifié.

Les bactéries unicellulaires, les Actinobactéries, les levures et les moisissures ont été utilisé pour diverses bioconversions.
Les enzymes responsables de ces bioconversions peuvent être intracellulaires ou extracellulaires.

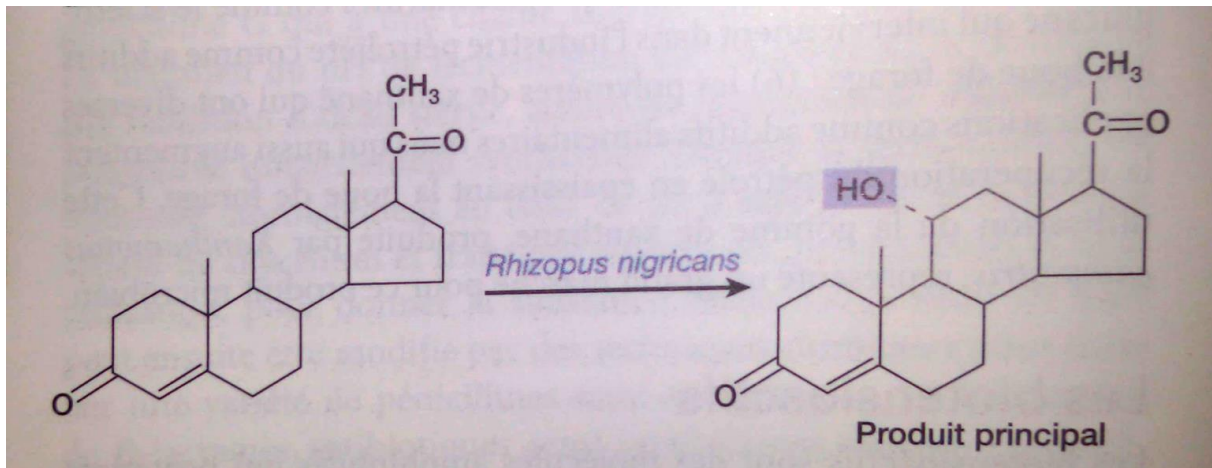


Figure 03: La biotransformation d'un stéroïde.

1.1.4. La conversion microbienne de l'énergie

Inclut la transformation microbienne de matériaux organiques en **biocarburant** comme l'éthanol et l'hydrogène, qui peuvent être brûlés pour promouvoir la traction automobile ou pour actionner d'autres machines.

Les piles à combustible microbiennes sont une autre forme de conversion microbienne de l'énergie : ce sont des bioréacteurs qui utilisent les microbes pour transformer directement en électricité l'énergie chimique emmagasinée dans la matière organique. Certains microbes peuvent oxyder la matière organique et passer directement les électrons à une électrode. Une pile à combustible microbienne capture ces électrons pour produire de l'électricité.

1.1.5. Les microorganismes en tant que produits

Un nombre des espèces isolées peuvent être mises sur le marché en tant que produit. L'exemple le plus commun est peut-être celui de l'inoculation de semences de légumineuses, avec des *Rhizobiums*, pour assurer une nodulation et une fixation d'azote efficaces.

Les Diatomées ont éveillé l'intérêt des **nanotechnologistes**. Ces protistes photosynthétiques produisent des coquilles de silice compliquées qui diffèrent selon les espèces. Les nanotechnologistes s'intéressent aux diatomées parce qu'elles créent des structures précises à l'échelle du micromètre. De nombreuses méthodes et idées ont été avancées pour utiliser ces (*usines microbiennes*). On incube les coquilles de diatomées à 900 C^0 , dans une atmosphère de magnésium, pendant plusieurs heures. De façon étonnante, il résulte une substitution du silicium par du magnésium ; atome pour atome, sans perte de la structure 3D. Ainsi l'oxyde de silicium, qui est de peu d'usage en nanotechnologie, est converti en oxyde de magnésium très utile. Les coquilles de diatomées sont donc devenues très attractives pour fabriquer des produits qui requièrent une échelle miniaturisée avec une très grande surface de contact comme des **détecteurs de gaz**.

Les nanotechnologies peuvent être définies comme un ensemble des disciplines dont la vocation est l'étude et la fabrication de structure (appelé *nano-objets*) dont les dimensions sont comprises entre 1 et 1000nm).

Les organismes vivants et les systèmes biologiques sont une source inépuisable d'inspiration pour la construction de *nano-objet*.

La production de **biosenseurs** est un domaine de la biotechnologie en développement rapide. Dans ce champ de la bioélectronique, des microorganismes vivants (leurs enzymes ou leurs organites) sont reliés à des électrodes et les réactions biologiques sont converties en courant électrique. Des biosenseurs ont été développés pour mesurer des composés spécifiques dans la bière, surveiller des polluants, détecter des composés aromatiques dans la nourriture et étudier des processus environnementaux comme changement de gradients de concentration dans les biofilms.

Les Biosenseurs peuvent être des microorganismes vivants ou des éléments semi-biologiques (généralement une enzyme).

Les organismes utilisés comme biosenseur sont modifiés par génie génétique afin qu'ils émettent une fluorescence en présence d'un contaminant particulier.

2. La microbiologie appliquée environnementale

Leur nombre, leur diversité de niche écologique et leur éventail métabolique font des microorganismes **des acteurs clés de la dépollution de l'environnement**.

Ils sont capables de dégrader, partiellement ou totalement, la plupart des polluants organiques, y compris des molécules artificielles (les xénobiotiques). Cette dégradation est généralement réalisée **par oxydation** et aboutit à une transformation, voire une **minéralisation totale**, des molécules (*Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Alcaligenes*).

Certains contaminants organiques ou métalliques peuvent être stockés dans des microorganismes, sans être ni dégradés ni transformés. On parle alors de **bioaccumulation**. Certains procaryotes, notamment rhizosphériques tels *Pseudomonas*, peuvent également absorber de manière active des oligoéléments métalliques, comme c'est le cas pour le fer grâce **à la production des sidérophores**.

Les microorganismes modifient également la spéciation chimique des métaux, c'est-à-dire leur niveau d'oxydation, et donc leur biodisponibilité. Ce phénomène, aussi appelé **biolixiviation**, résulte d'une oxydation ou d'une réduction des métaux, modifiant leur solubilité et souvent leur toxicité. La biolixiviation effectuée par des populations naturelles d'espèces de type *Leptospirillum* et de *Thiobacille*, permet de récupérer 70% du cuivre contenu dans des minerais à faible teneur. Ceci implique l'oxydation biologique de cuivre présent dans ces minerais pour produire du sulfate de cuivre soluble.

De nombreux microorganismes tels que les bactéries, les algues, les champignons et les protozoaires sont associés à **l'épuration des eaux polluées**. Les bactéries restent cependant les micro-organismes les plus impliqués dans ce processus (environ 95 % des microorganismes présents dans une boue activée). **Les protozoaires, prédateurs**, (*Paramecium africanum*, *Colpidium uncinatum*, *Neobursaridium gigas*) peuvent utiliser les pathogènes capturés comme nourritures. Il en résulte une eau purifiée dont la population microbienne est réduite.

3. La microbiologie alimentaire

Les aliment, les microorganismes et l'homme ont vécu une longue et intéressante association. Les microorganismes assurent une production de la biomasse importante. Les levures destinées à l'alimentation sont tuées par la chaleur, déshydratées, puis mélangées aux aliments ou consommées tels quelles: ce sont des supplement riches en protein et en vitamin B. Quelques bactéries (*Methylophilus methylotrophus*) produisent des proteins alimentaires (Pruteen). Les levures sont cultivées pour la panification et la pâtisserie.

3.1. Les aliments fermentés

La fermentation a toujours été un moyen commun de conservation et de transformation les aliments. La croissance des populations microbiennes, naturelles ou inoculées, occasionne des modifications chimiques et/ou de texture, pour former un produit qui peut être conservé pendant des périodes prolongées.

- **Les produits laitiers:** c'est les aliments fermentés de consommation la plus répandue au monde. La majorité des produits laitiers fermentés dépendent des **bactéries lactiques** qui comprennent des espèces appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus*. C'est bactéries sont Gram positive pauvres en GC qui tolèrent des conditions acides.
- **Les différents types du yaourt** peuvent être résulter d'une culture pure et mixte de deux bactéries, reunites en proportion définies: *Streptococcus thermophiles* et *Lactobacillus bulgaricus*.
- **Pour le fromage**, les genres et les espèces impliquées dans sa fabrication sont peu nombreux ; *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus thermophiles*, *Leuconostoc lactis*.
- **Le lavaine de fabrication du pain** est constitué de souche de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. La levure est cultivée sous aérobiose, de manière à favoriser la production de CO₂ qui l'élément principal recherché.
- **Autres aliments fermentés** comme les boissons alcoolisées qui results toute de la fermentation alcoolisée de différents substrats de fermentation (exp, les bières, les vins et les liqueurs): les espèces impliquées: *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces carlsbergensis*.

3.2. Les microorganismes en tant qu'aliment et adjuvant alimentaire

Diverses bactéries, levures et autres champignons ont servi d'aliments pour les animaux et l'homme. Le champignon blanc (*Agaricus bisporus*) est l'un des champignon important utilisé directement comme source alimentaire. De grandes caves offrent des conditions optimales pour la production de ce mets délicat.

Les microorganismes peuvent être utilisés directement comme nourriture ou comme suppléments à d'autres aliments. On parle alors **des protéines d'origine alimentaire (POU)**. **La spiruline** est un des suppléments alimentaires microbiens les plus populaires. Elle est utilisée comme source alimentaire sous forme de gâteau sec en Afrique.

Une application intéressante des microorganismes probiotiques (principalement *Lactobacillus acidophilus*) est de diminuer la présence d'*Escherichia coli* dans le bétail bovin. Les bactéries désirées sont vaporisées sur les aliments et ils ont montré que le bétail était nettement moins porteur de la souche toxique *E. coli*. Ceci peut faciliter la production de bœuf satisfaisant aux standards actuels en matière de qualité microbiologique au moment d'abattage.

4. Microorganismes et génie génétique

Les microorganismes peuvent être utilisés sans aucune modification pour produire des métabolites d'intérêt à partir des techniques classiques de production. Cependant, on fait appel au génie génétique, dans le but de chercher à modifier **soit par addition d'une information nouvelle**, soit par substitution, **afin de lui faire produire des substances recherchées**, ou à lui **faire accomplir des fonctions différentes** de celles pour lesquelles elle est naturellement programmée.

Les gènes d'hormones de croissance de plusieurs espèces ont été isolés, introduits dans les plasmides bactériens où ils ont pu s'exprimer. Leur intérêt est en cours d'appréciation chez l'homme, les bovins et les volailles. Ces nouvelles technologies seront employées de plus en plus **pour produire des vaccins, pour améliorer la valeur nutritive des aliments du bétail, pour accroître la production laitière, pour fabriquer des antitoxines** et d'autres produits. D'autres découvertes en immunologie ont permis de mettre au point la technique des hybridomes utilisés pour la production des molécules **d'anticorps spécifiques**.

Le génie génétique est un ensemble de techniques de biologie moléculaire permettant d'étude de matériel génétique. Ces techniques ont fourni à la médecine et à l'industrie un moyen efficace de produire en grandes quantités des protéines spécifiques, qui, auparavant, n'étaient disponibles (si elles l'étaient) qu'en quantité extrêmement faibles. Ces techniques ont permis également d'étudier la régulation de leur expression et ainsi de mieux comprendre le développement de maladies génétiques.

4.1. Principe du génie génétique

Deux possibilités s'offrent selon le but recherché. Soit, on réalise **l'amplification du gène**, obtention de quantités importantes de ce gène à des fins d'étude. Dans ce cas, on utilise le plus souvent un plasmide comme vecteur, qui se multiplie dans la cellule hôte sans s'intégrer dans son génome. Soit on utilise **l'expression du gène** : cela permet alors d'étudier le produit formé ou de le récupérer dans un but d'utilisation pratique dans différents domaines, médicaux ou industriels (**figure 04**).

La cellule recombinée se multiplie et les cellules filles sont toutes identiques génétiquement : elles constituent **un clone cellulaire**. On obtient des cellules ou **organismes transgéniques**.

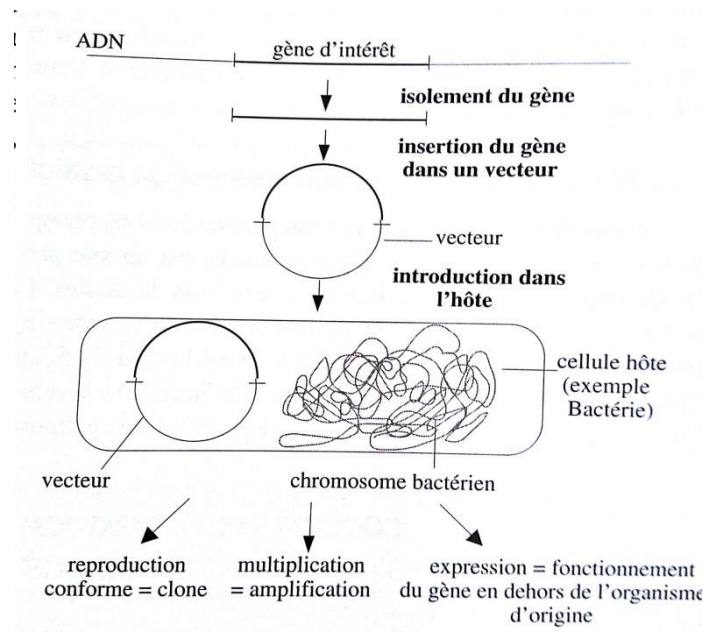


Figure 04 : Principe de génie génétique.

4.2. Contribution des microorganismes au génie génétique

- **Fourniture de différentes enzymes utilisables :** Il fallait pour prélever une séquence d'ADN intéressante des outils moléculaires, véritables ciseaux génétiques d'utilisation fiable. Les microorganismes les ont fournis : ce sont **les enzymes de restriction (classe des endonucléases)**. Ces enzymes sont extraites de microorganismes, bactéries essentiellement. Elles servent au clivage de molécule d'ADN étranger. **Exp :** *Bacillus amyloliquefaciens* (enzyme : Bam HI), *E. coli* (enzyme : Eco RI).
- **Fourniture de vecteurs et insertion dans les cellules hôtes :** Les microorganismes fournissent des vecteurs très efficaces pour insérer les fragments d'ADN obtenus par utilisation des enzymes de restriction (**figure 05**). Des bactéries comme *E. coli*. Des levures comme *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris* sont utilisées comme vecteurs eucaryotiques

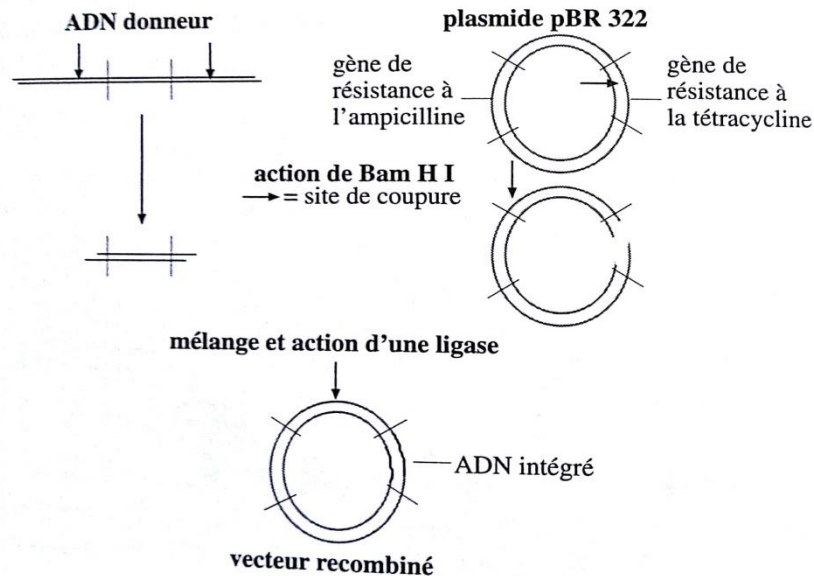


Figure 05 : Insertion d'un fragment d'ADN dans le plasmide.

4.3. La manipulation génétique des microorganismes

Les manipulations génétiques sont utilisées pour produire des microorganismes dotés de caractéristiques nouvelles désirables. Les méthodes classiques d'échange génétiques, couplée aux technologies de l'ADN recombinant jouent un rôle vital dans le développement de produits microbiens d'importance industrielle.

a) La mutagenèse

Dès qu'un organisme prometteur pour la production d'un métabolite est découvert, **on peut utiliser pour améliorer le rendement de cette production une variété de techniques de mutagenèse**, notamment la mutagenèse chimique, lumière UV, et la mutagenèse par transposons. A titre d'exemple, les premières cultures de *Penicillium notatum*, qui ne pouvaient être cultivée que dans les conditions statiques, donnaient de faibles quantités de pénicilline.

La mutagenèse dirigée (une mutation ciblée)

Plusieurs progrès technique ont été essentiels au développement des méthodes d'évolution dirigée. Le premier entre eux est **la mutagenèse dirigée** sur un site donné. Dans cette technique, la séquence nucléotidique d'un gène est modifiée. Le gène concerné est d'abord cloné dans un vecteur plasmidique. Et introduit dans un hôte microbien. Entretemps, une séquence nucléotidique d'environ 20 nucléotides contenant la modification désirée est synthétisée. Le plasmide recombinant est purifié et une PCR est effectuée pendant laquelle l'oligonucléotide modifié se lie à la copie simple brin du gène sauvage (**figure 06**). La polymérase ensuite procède à l'extension de l'oligonucléotide ainsi qu'à la réplication du reste du gène et du plasmide : le résultat sera un plasmide à double brin dont un seul porte la mutation.

Dans l'étape suivante, le brin parental du plasmide est digéré par une nucléase qui ne dégrade que l'ADN méthylé.

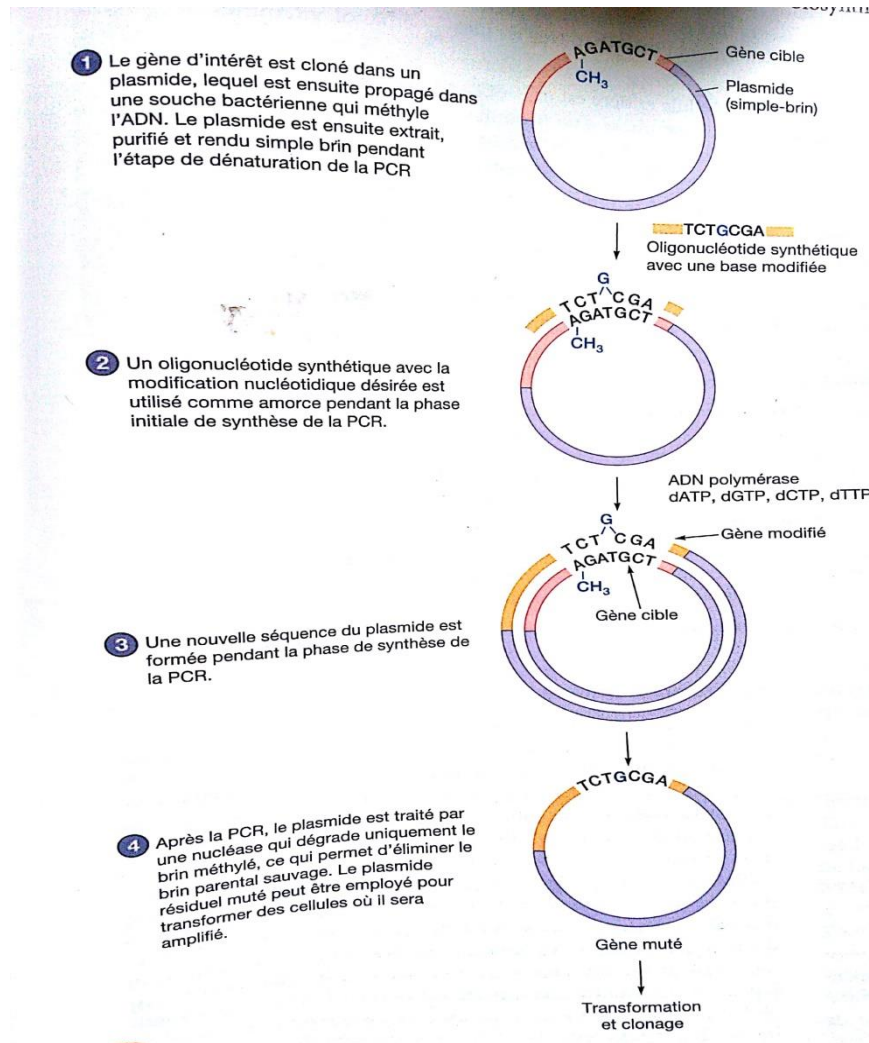


Figure 06: Mutagenèse dirigée : Un oligonucléotide est utilisé pour introduire dans un gène une mutation spécifique.

b) Le transfert d'information génétique entre organismes différents

Le transfert de gènes entre organismes différents et leur expression, peuvent donner naissance à de nouveaux produits, de modifier la régulation des gènes d'intérêt et même changer la modification post-traductionnelle du produit si c'est une protéine (**tableau 2**).

Tableau 02 : L'expression des gènes dans d'autres organismes pour améliorer les procédés et les produits.

Propriété ou produit transféré	Microorganisme utilisé	Processus combinatoire
Production d'éthanol	<i>Escherichia coli</i>	Intégration du pyruvate décarboxylase et l'alcool déshydrogénase II de <i>Zymomonas mobilis</i> .
Production de propanediol	<i>E. coli</i>	L'introduction dans <i>E. coli</i> des gènes de la région <i>dha</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> permet la production anaérobie de 1,3-propanediol.
Synthèse du précurseur de la céphalosporine	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Production des précurseurs 7-ADC et 7-ADCA ^a par incorporation du gène de l'expandase de <i>Cephalosporium acremonium</i> dans <i>Penicillium</i> , par transformation.
Production d'acide lactique	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Un gène de lactate déshydrogénase du muscle de bœuf est exprimé dans <i>S. cerevisiae</i> .

^a 7-ACA 5a cide 7-aminocéphalosporine ; 7-ADCA 5 acide 7-aminodécacétoxycephalosporanique.

La transgènèse

La transgènèse (obtention des OGM) consiste à transférer vers une plante un gène dont l'expression fait apparaître **un caractère déterminé**. L'origine biologique des gènes utilisés est variable. Il est possible de faire exprimer un gène issu d'une autre espèce végétal ou d'un autre organisme (bactérie, champignon) par la machinerie de transcription. En effet, les méthodes de transgènèse se sont développées depuis 25 ans grâce aux études sur les Agrobactéries et à la construction par génie génétique de gènes permettant une sélection efficace des cellules transformées résistance à un antibiotique ou à un herbicide **figure 07**.

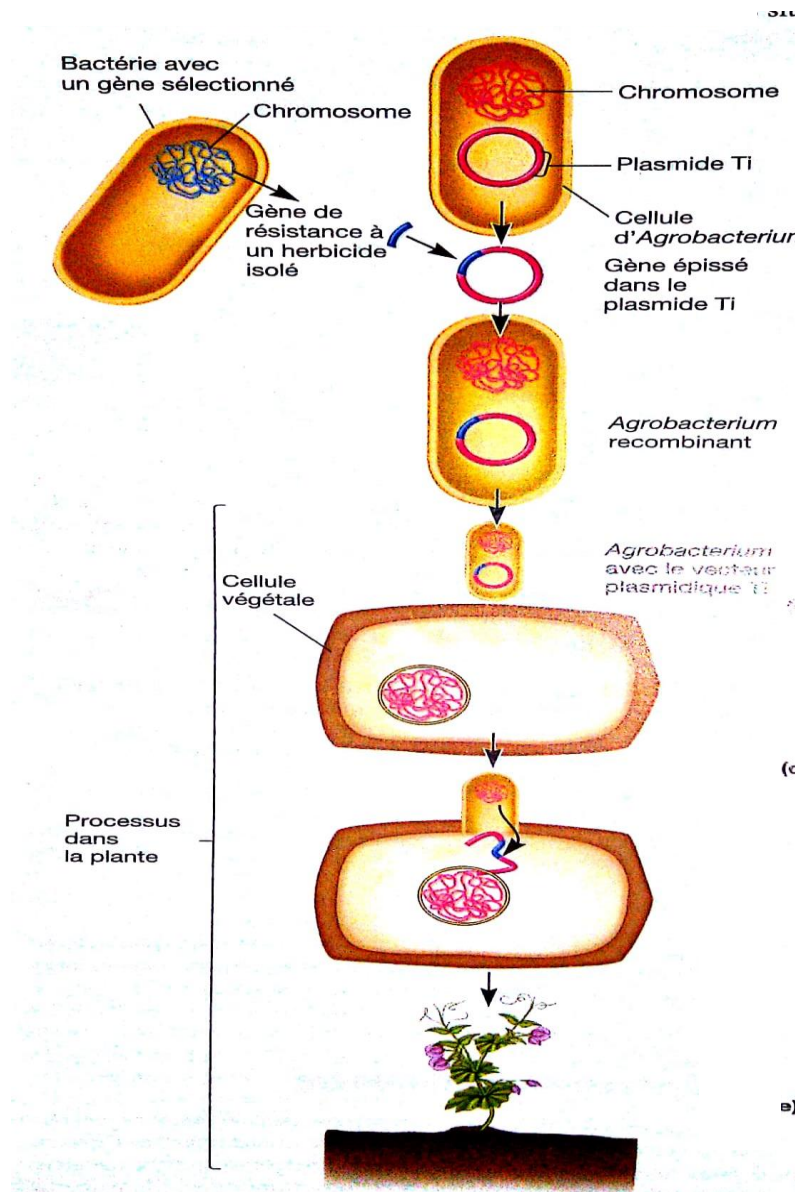


Figure 07 : la bioingénierie des plantes.

c) La fusion des protoplastes

Le protoplaste est l'ensemble du contenu cellulaire situé à l'intérieur de la paroi pecto-cellulosique ; par extension, on applique ce terme aux cellules débarrassées de paroi. **La fusion des protoplastes (Protos= premier et plastos=formé)** est une autre technique utilisée pour promouvoir la variabilité génétique des microorganismes et des plantes. On prépare des protoplastes-celles dépourvus de paroi cellulaires-en cultivent des cellules dans une solution isotonique, en présence d'enzymes qui dégradent la paroi cellulaire (comme le lysozyme pour les bactéries et la chitinase pour les levures).

Les protoplastes des cellules de la même espèce ou même d'espèce différentes peuvent se fusionner (se joindre) pendant la co-incubation. Les parois cellulaires sont ensuite régénérées en présence de stabilisateurs osmotiques, comme le saccharose.

La fusion de protoplastes est essentiellement mutagénique et est particulièrement utile pour stimuler la recombinaison. Par exemple, de nouvelles souches de *Penicillium* intéressantes du point de vue industriel ont été créées lorsqu'on s'est mis à fusionner des protoplastes de *Penicillium requefortii* et de *P. chrysogenum*.

L'absence de paroi **permet d'induire des fusions** entre protoplastes appartenant à des espèces différentes sexuellement incompatibles grâce à des traitements favorisant les fusions.

L'objectif de fusion de protoplaste est d'obtenir des recombinaisons génétiques entre cellules qui ne peuvent pas fusionner naturellement.

➤ **Etapes de protoplaste**

1/ La première étape commune consiste en l'obtention de protoplastes qui sont des cellules dont la paroi a été digérée par attaque enzymatique (milieu isotonique) ce qui entraîne la lyse des polysaccharides pariétaux.

2/ Mélange de deux populations cellulaires (les protoplastes mélangés avec l'ADN) en présence de Ca^{++} et du polyéthylène glycol 4000. Une autre méthode pour intégrer de l'ADN dans les protoplastes est l'utilisation de liposomes. L'ADN sera encapsulé dans des vésicules phospholipidiques matricielles qui vont fusionner avec la membrane plasmique des protoplastes et libérer ainsi l'ADN dans le cytosol.

3/ Régénération de la paroi.

4/ Criblage de recombinants : Cette méthodologie nécessite le marquage génétique des souches parentales afin de sélectionner et identifier les produits issus de la fusion.

4.4. Applications médicales du génie génétique

Dans les nouvelles biotechnologies, les applications industrielles résultent essentiellement de l'exploitation de l'expression d'ADN recombinants, obtenu et cloné par des techniques de l'ingénierie génétique dans des cellules de diverses origines.

Parmi les applications industrielles liées à l'utilisation de microorganismes génétiquement modifiés, on peut citer les exemples remarquables suivants :

➤ **Production d'insuline**

L'insuline est une hormone de nature protéique produite par le pancréas. Elle joue un rôle essentiel de régulation du métabolisme des glucides chez les mammifères. Son déficit entraîne le diabète, traité chez l'homme par un apport régulier d'insuline exogène d'origine bovine ou porcine. Mais ces deux insulines n'ont pas fait la même efficacité que l'insuline humaine car elles en diffèrent par leur composition en acides aminés : 3 acides aminés pour l'insuline de bovins et 1 acide aminé pour l'insuline de porcs. Ces différences minimes leur confèrent, en plus, des propriétés immunogènes indésirables.

Sa production par voie biotechnologique s'est dès lors imposé. Les gènes humaine codant pour sa synthèse ont été isolés et cloné chez une souche adéquaté d'*E. coli* (*E. coli* K12) à l'aide d'un vecteur plasmique.

➤ **Vaccins recombinants**

Les vaccins sont classiquement fabriqués à partir de microorganismes inactivé ou à partir de leurs fractions antigéniques isolées. Dans les deux cas une réponse immunitaire spécifique est induite chez l'hôte. Les fractions antigéniques sont souvent des protéines de surface dont les sous unités immunogène spécifiques peuvent être produits chez d'autres organismes, **grâce au clonage d'ADN recombinant (figure 08)**. Par ce processus, on peut fabriquer des vaccins de conformité parfaite, en quantité voulues et sans moindre risque de maladie. Puisqu'ils sont exclusivement composés des protéines virales antigéniques et non pas d'une préparation de virus tués dont le produit fini peut être contaminé par la manipulation des virus. Le clonage des gènes codant les antigènes du virus de l'hépatite B , chez *E.coli* et d'autres bactéries a permis la production de composés inactifs car non glycosylé, cette fonction semblant essentielle à l'expression de leur antigénicité. La réalisation des mêmes procédés chez les cellules eucaryotes, dont essentiellement la levure *Saccharomyces cerevisiae*, à déboucher sur la biosynthèse de composés glycosylés et antigéniques.

➤ **Autres molécules**

Il ya a également des bactéries transgéniques qui produisent **l'hormone de croissance humaine (HCH)**. Celle-ci est normalement produite par l'hypophyse de l'individu (située à la base du cerveau) pour stimuler la croissance. Le nanisme, anomalie qui empêche l'enfant d'atteindre une taille normale, est provoqué par un déficit en HCH.

Il existe de nombreuses autres protéines utiles sur le plan médical produites à l'aide de microorganismes transgéniques, comme **les interférons** (glycoprotéines qui aident le corps à combattre les infections virales).

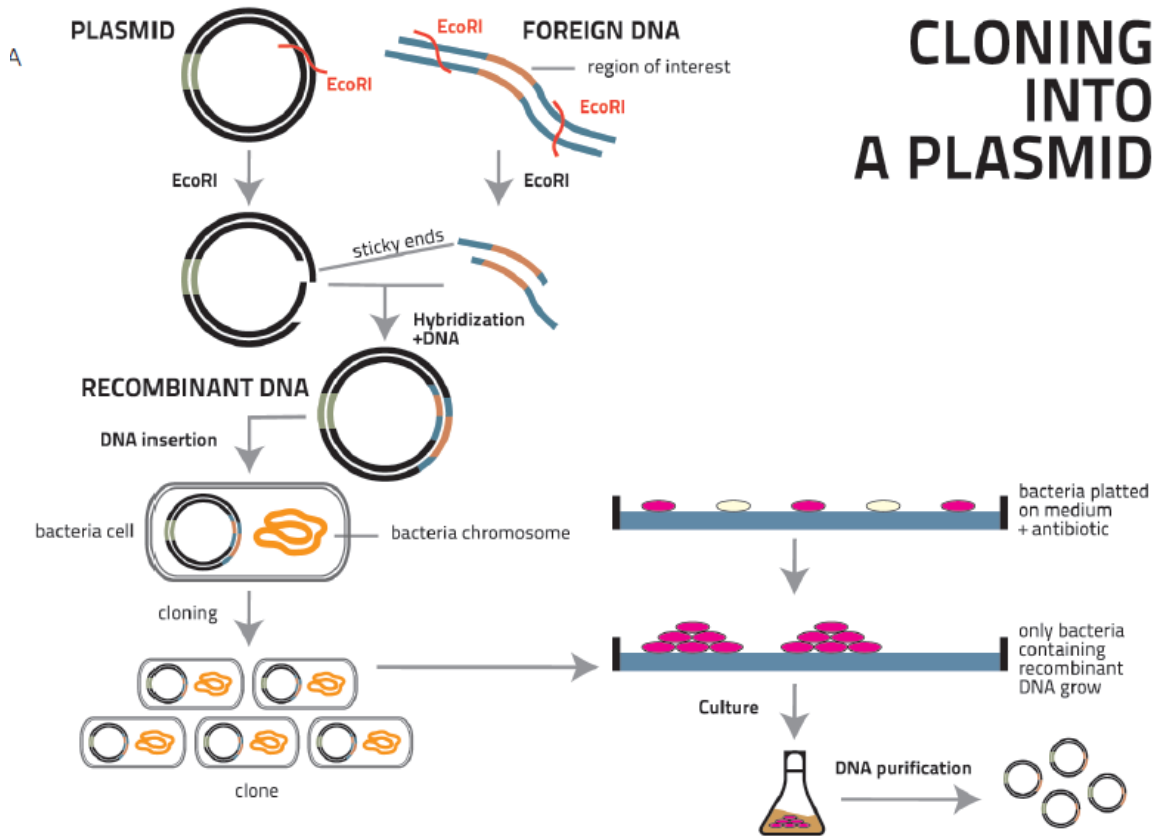


Figure 08 : Les étapes de la technologie de l'ADN recombinant.

Chapitre 02 : Valorisation des déchets et biomasse épuratrice

Introduction

L'énergie est inhérente à toutes les activités humaines et sa consommation plus élevée par habitant est en bonne corrélation avec l'élévation du niveau de vie. Les déchets contiennent une part importante de matières organiques assimilées à la biomasse. La quantité considérable et sans cesse croissante de déchets (agricoles, alimentaires, industriel) est devenue une préoccupation majeure dans le monde entier.

La gestion des déchets est un problème prioritaire principalement pour les villes qui accueillent une population toujours plus nombreuse. Par conséquent, des stratégies de traitement et de réutilisation à valeur ajoutée sont nécessaires pour permettre une utilisation durable des matières premières et réduire le problème environnemental.

En raison des diverses applications possibles et de son impact économique, la valorisation des déchets alimentaires attire de plus en plus l'attention. Les sous-produits de la pomme de terre, de la tomate, des céréales et de l'olive proviennent de quantités importantes sont par conséquent d'une grande pertinence.

Les dernières années ont été marquées par une activité de recherche importante dans la conversion de la biomasse en combustibles liquides utiles dans le but de remplacer totalement ou partiellement la consommation de pétrole.

Outre la bioénergie, les chercheurs recherchent le concept de bioraffinerie qui perçoit les chaînes de valeur agroindustrielles. Dans ce concept, plusieurs produits pourraient potentiellement être obtenus à partir de biomasse, y compris des produits provenant de ses propres déchets de traitement: bioplastiques, bioénergie et produits biochimiques.

Les déchets des eaux usées représentent également un problème environnemental écologique. Une eau usée est généralement un mélange de **matières organique polluante** qui doit **être éliminé**. Le traitement des eaux usées représente un véritable défi environnemental et qui fait appel à un écosystème biologique complexe **nommé biomasse épuratrice**.

1. Qu'est-ce qu'un déchet ?

Tout résidu d'un processus de production, de transformation ou d'utilisation, toute substance, matériau, produit ou plus généralement tout bien meuble abandonné ou que son détenteur destine à l'abandon.

1.1. Classification des déchets

- Les déchets ménagers et assimilés
- Les déchets industriels : exemple l'agriculture, agroalimentaire,..
- Les déchets hospitaliers (DH), déchets d'activités de soins (DAS) ou déchets infectieux.

- Les boues : Les boues se situent à la frontière des domaines respectifs des déchets solides et des eaux résiduaires. On les assimile généralement à des déchets solides.

1.2.Aspects de valorisation de déchets

La valorisation des déchets est toutes les opérations de réutilisation, de recyclage ou de compostage des déchets (**figure 09**).

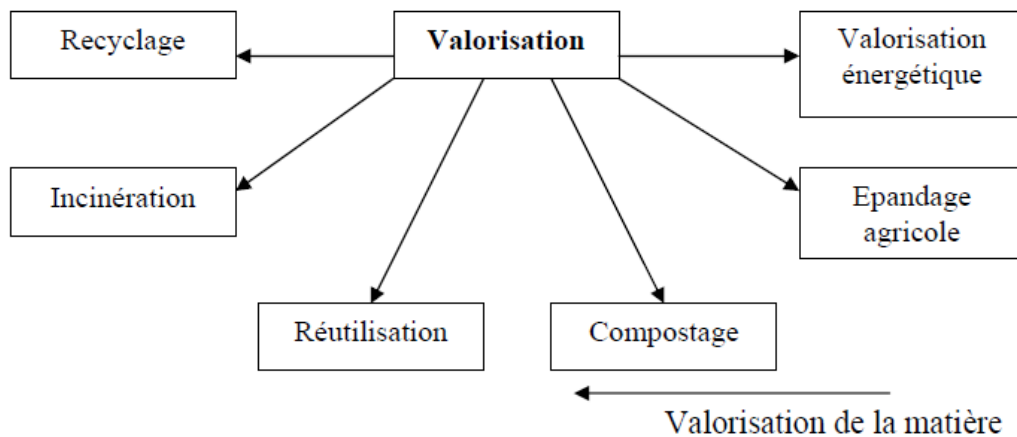


Figure 09 : Différents aspects de valorisation des déchets.

1.2.1. Valorisation par compostage

Les fractions organiques de déchets agricoles et agroindustriels (DAA) peuvent être transformées **en matières fertilisantes par compostage**. Le compostage est un traitement aérobie qui permet de convertir les déchets organiques en un produit stabilisé, assimilable à de l'humus, **appelé compost**.

Le processus de compostage comporte principalement **2 étapes biologiques**, telles que décrites dans, auxquelles s'ajoutent des prétraitements et post-traitements éventuellement nécessaires (broyages, mélange avec d'autres produits, tris, etc.) :

- 1) **Une première étape dite de « fermentation chaude »** : favorise la stabilisation et la réduction de la masse des déchets. Les fractions organiques facilement dégradables sont oxydées par **des micro-organismes aérobies** et libèrent de la chaleur. La température réactionnelle peut atteindre 70 °C, dans les conditions optimales d'aération et de pertes réduites de chaleur. Cette étape peut durer entre quelques jours et quelques semaines, en fonction de la nature des déchets et des conditions opératoires.
- 2) **La deuxième étape correspond à une maturation et une biosynthèse de la matière humique** : Elle permet de modifier les caractéristiques de la matière organique résiduelle pour lui conférer des propriétés proches de celles de l'humus,

après décomposition de la matière organique plus facilement dégradable et la destruction des cellules indésirables des micro-organismes pathogènes, semences végétales, etc.). Elle est caractérisée par une dégradation lente de la matière organique, une faible demande en oxygène et une température réactionnelle proche de la température ambiante.

Le compost est un produit stable riche en humus issu de la décomposition rapide de toutes les matières organiques : fumiers, résidus de récolte, déchets agro-industriels, déchets animaux, déchets ménagers. C'est une source importante de matière organique produite par la dégradation ou la décomposition de la matière organique fraîche par des micro-organismes.

Les résidus de cultures (pailles de céréales, cannes de maïs et de millet, pulpes, fanes, etc.) et de jachère sont parfois enfouis, au même titre que les déjections animales (bovins, porcins, caprins, volailles, etc.), comme amendement organique pour les sols sans aucun traitement préalable.

1.2.2. Valorisation énergétique

a) Valorisation énergétique des déchets solides par méthanisation

La méthanisation est une digestion anaérobie (DA), ou fermentation méthanique, c'est une dégradation et stabilisation des composés organiques par des microorganismes en absence d'oxygène. **Cela conduit à la production de gaz** et à la libération du reste de la digestion, le **digestat**. Le gaz est principalement du méthane et du dioxyde de carbone, ce mélange est appelé «biogaz» et est riche en énergie. Il peut être utilisé comme gaz de cuisson ou pour produire de l'électricité. Le digestat est une matière très nutritive appréciée comme engrais.

La DA est un processus naturel qui se produit dans l'estomac des ruminants par exemple. La technologie de l'AD consiste à appliquer ce processus dans des installations appelées **digesteurs** pour traiter la matière organique et produire du gaz.

Le processus AD est réalisé en 4 étapes (figure 10) : Chaque étape est réalisée par une sorte de **l'hydrolyse**; les molécules organiques sont hydrolysées en petits polymères ou monomères. Selon leur nature d'origine, il sera hydrolysé en différents composés. Cette étape est particulièrement longue pour les composés riches en lignine. C'est pourquoi il est recommandé de ne pas utiliser ce type de substrat.

Ensuite, les petites molécules organiques sont converties en intermédiaires sous forme d'alcools, d'acides, d'acétate, d'hydrogène et de dioxyde de carbone. C'est **l'acidogenèse**. Plus tard, lors de **l'acétogenèse**, tous les intermédiaires sont transformés en acide acétique, hydrogène et dioxyde de carbone. La dernière étape est **la méthanogenèse**. La synthèse du méthane est réalisée par 2 types de bactéries utilisant différents produits initiaux (H₂ et CO₂ ou acide acétique).

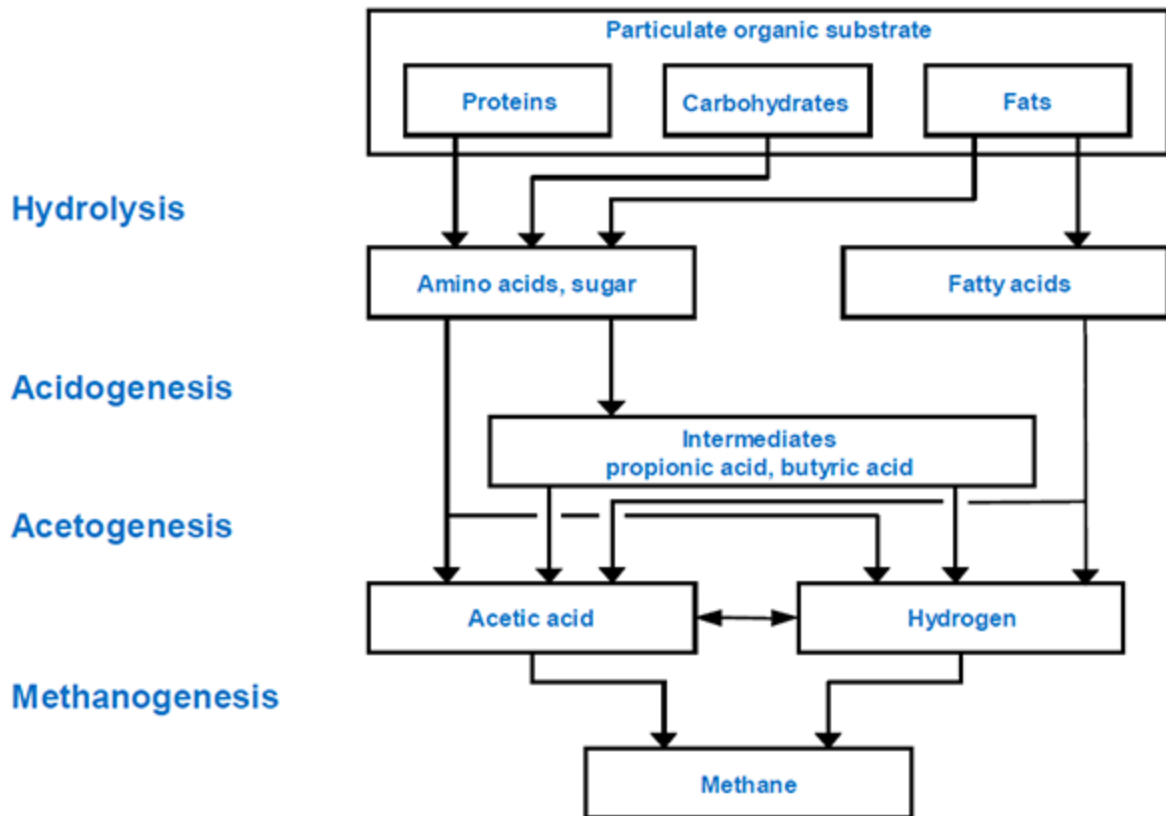


Figure 10 : les étapes de la digestion anaérobie.

b) Valorisation de la biomasse en bioraffinerie

La préoccupation de la société concernant les questions environnementales et la durabilité s'est accrue au cours des dernières décennies. La consommation croissante de combustibles fossiles, principalement ceux dérivés du pétrole brut, a été remise en question, en particulier dans le contexte de sa durabilité environnementale, énergétique et matérielle à long terme, au centre des débats mondiaux sur les politiques relatives aux changements climatiques. Qui visent à mettre en œuvre des solutions nouvelles et alternatives pour répondre à ces préoccupations.

Il est fondamental d'accroître et de développer la production d'énergie renouvelable, dans le but d'améliorer la production d'énergie et l'efficacité d'utilisation, d'accroître la sécurité d'approvisionnement et d'améliorer la diversification des sources d'énergie primaire.

Les nouvelles sources d'énergie ont été considérées comme un produit de base susceptible de réduire la dépendance aux combustibles fossiles et d'atténuer les effets négatifs sur l'environnement.

b₁) D'où provient la biomasse ?

Les principales provenances de la biomasse utilisée en bioraffinerie sont :

- l'agriculture,
- la forêt,
- les milieux marins et aquatiques,
- les haies, les parcs et jardins (déchets verts),
- les industries et activités humaines ayant traité de la matière d'origine vivante, y compris du bois (industries agro-alimentaires, papetières, de transformation du bois, etc...) et générant des co-produits,
- Les déchets organiques sont, tels que le fumier, les boues d'épuration, le combustible dérivé des rejets (RDF). En effet, la plupart des déchets sont extrêmement humides, comme les boues d'épuration et le fumier humide (boues d'épuration, combustible dérivé des ordures ménagères et déchets animaux).
- **La biomasse cellulolysique** : La biomasse et les résidus lignocellulosiques tels que le bois, l'herbe et la paille sont des matières premières abondantes et non alimentaires pour les carburants renouvelables.
- **La biomasse marine** : Comme son nom l'indique, ce bioraffineur est basé sur la biomasse marine telle que les plantes aquatiques, les macroalgues (par exemple les algues) et les microalgues. Ce type de biomasse présente certains avantages, tels que l'absence de concurrence pour les terres arables, la productivité élevée des zones et la production d'une large gamme de produits biosourcés et d'énergie, mais la culture et la transformation en sont encore à leurs débuts.

Les biocarburants à base de micro-algues auront également moins d'impacts sur l'environnement et sur les disponibilités alimentaires mondiales que les cultures produisant des biocarburants classiques.

Comparée aux propriétés des biocarburants végétaux, la biomasse de microalgues a une valeur calorifique élevée, une faible viscosité et une faible densité. Ces caractéristiques rendent les microalgues plus adaptées à la production de biocarburants que les matériaux lignocellulosiques, ainsi que leur teneur intrinsèque élevée en lipides, leur production à l'état d'équilibre et leur aptitude à croître dans divers climats.

b₂) Processus de conversion de la biomasse

Les produits biosourcés ont une grande importance pour plusieurs industries; Cependant, plusieurs défis techniques, stratégiques et commerciaux doivent encore être résolus avant toute commercialisation à grande échelle.

b_{2.1}- La conversion thermodynamique : La conversion thermochimique est caractérisée par des températures plus élevées et des taux de conversion plus rapides. Les trois voies principales sont: la combustion (oxydation complète), la gazéification (oxydation partielle) et la pyrolyse (dégradation thermique sans oxygène).

- **Combustion de biomasse** : est la technique de conversion thermochimique la plus étudiée et la plus utilisée pour générer **de la chaleur et de l'électricité**. Les procédés de combustion représentent plus de 97% de la production de bioénergie dans le monde. La combustion est une **réaction exothermique** entre l'oxygène et l'hydrocarbure dans la biomasse. Ici, la biomasse est convertie en H₂O et CO₂, la principale source directe d'H₂O étant le séchage de la biomasse et la principale source indirecte d'H₂O étant l'oxydation des substances volatiles. **La chaleur et l'électricité sont deux formes principales d'énergie dérivée de la biomasse.**
- **La gazéification** plusieurs processus de transformation. D'après sa signification de base, le terme gazéification signifie transformer la biomasse en gaz. La gazéification implique une réaction chimique dans un environnement pauvre en oxygène. La gazéification est l'oxydation partielle exothermique de la biomasse. Environ un tiers de l'oxygène nécessaire à une combustion complète produit un mélange de CO₂ et d'hydrogène, appelé **syngas**. Le gaz peut être nettoyé et utilisé directement comme biocarburant fixe ou peut être une matière première chimique **par fermentation biologique**.
- **La pyrolyse** Le sens du terme pyrolyse peut être déduit de son étymologie : de pyro (feu) et de lyse (coupure), pyrolyse signifie décomposition thermique. Cette réaction, qui a lieu sous atmosphère inerte, conduit à la production d'un solide riche en carbone (charbon), de gaz condensables (eau + goudrons) et de gaz non condensables (CO₂, CO, H₂, CH₄, ...) dont les proportions relatives dépendent des transferts de chaleur et de masse au sein du composé organique. La pyrolyse est un processus de chauffage de la biomasse en l'absence d'oxygène à une température relativement basse. La pyrolyse est une technique de bioconversion prometteuse pour la récupération d'énergie, la gestion des déchets et la conversion de la biomasse en produits énergétiques utiles qui a attiré une attention considérable au cours des dernières décennies en raison de sa **capacité de production de bioénergie**.

Le résidu solide issu de la pyrolyse est appelé généralement **charbon**.

La combustion ou la pyrolyse sont des gazéifications plus ou moins complètes.

Les produits de pyrolyse peuvent être valorisés à différents niveaux comme l'illustre la **Figure 11**.

Les conditions opératoires influence fortement sur la répartition et la composition des produits de pyrolyse comme l'illustre **la figure 12**.

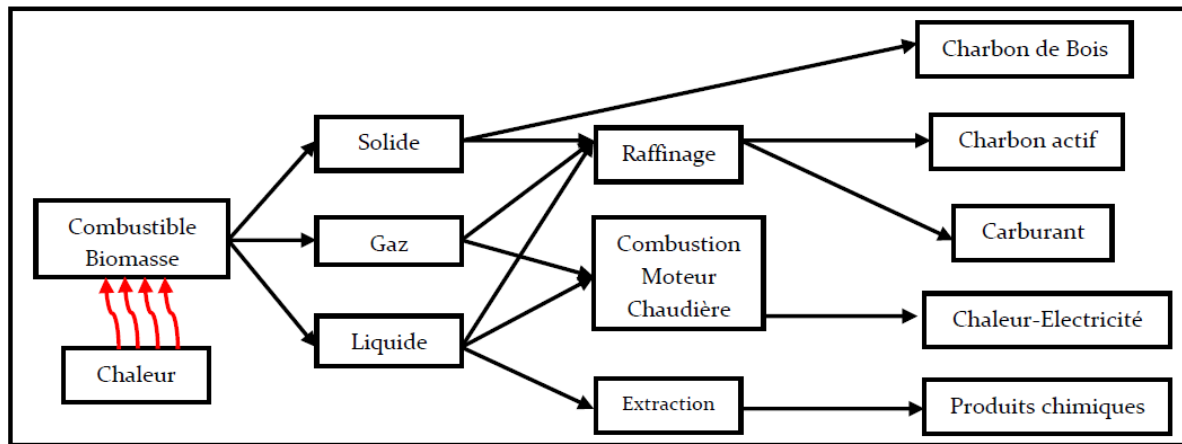


Figure 11 : Produits issus de la pyrolyse de la biomasse et de leurs utilisations

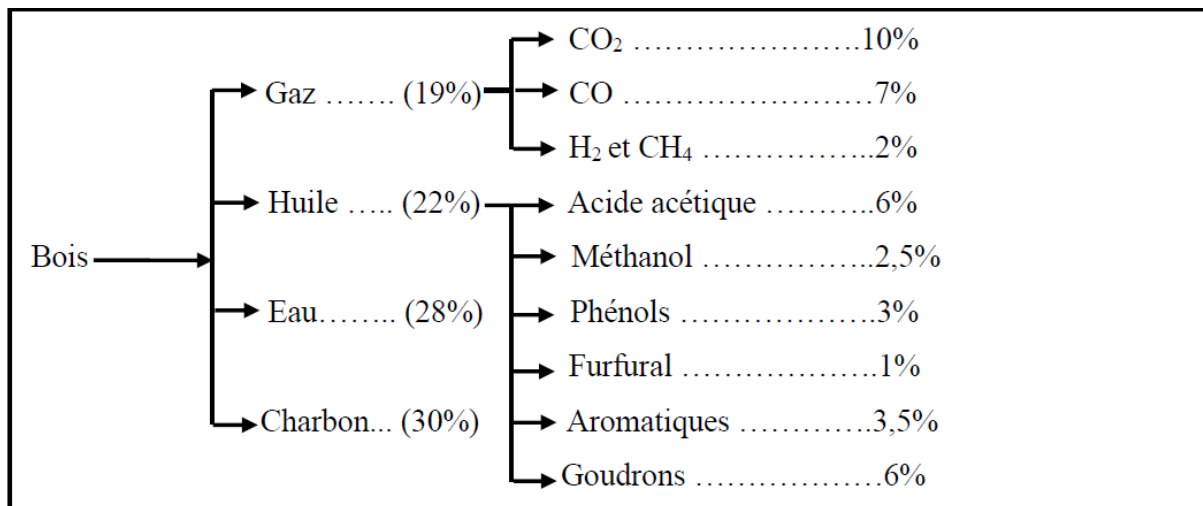


Figure 12 : Composition moyenne des produits de la pyrolyse lente (400°C à 600°C).

b_{2.2} La conversion biochimique

Dans la conversion biochimique, les molécules de la biomasse sont décomposées en molécules plus petites par **des bactéries ou des enzymes**. Dans la technologie de conversion biochimique, ces biocatalyseurs, en plus de la chaleur et d'autres produits chimiques, convertissent les glucides de la biomasse (hémicellulose et cellulose) en sucre. Ces sucres sont des produits intermédiaires qui peuvent être fermentés ou catalysés chimiquement, en utilisant des biocatalyseurs, dans une gamme de biocarburants avancés et de produits chimiques à valeur ajoutée tels que l'éthanol et d'autres combustibles, les produits chimiques, la chaleur et / ou l'électricité.

1.2.3. Utilisation des déchets comme sous-produits (substrat) en microbiologie industrielle

Les sous-produits de la pomme de terre, de la tomate, des céréales et de l'olive sont très importants et revêtent par conséquent une grande importance. En raison de leur composition avec divers ingrédients bénéfiques, les déchets peuvent être valorisés par différentes techniques conduisant à des avantages économiques et environnementaux.

La transformation commerciale de la tomate pour les jus, la pâte et/ou de ketchup produit une grande quantité de déchets en provenance de canaux d'eau, du lavage, du tri sur table, du pulpeur-raffineur et du nettoyage du matériel. Les déchets de tomates peuvent être utilisés comme substrat pour la production des enzymes par des souches bactériennes. C'est le cas de la xylanase.

La valorisation des déchets date s'effectue par le processus de fermentation pour la production de l'éthanol. Ce procédé transforme des sucres fermentescibles par des levures (*Sachharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida pelliculosa*) en alcool et gaz carbonique avec dégagement de chaleur. Il existe un grand nombre de microorganismes utilisés pour la fermentation. Cependant peu sont réellement compétitifs en termes de rendement en éthanol par rapport au substrat consommé, de capacité fermentaire, de tolérance élevée à l'éthanol et d'adaptation aux conditions de fermentation.

Vu sa composition adéquate en eau, protéine, lactose, minéraux, acide lactique et matière grasse, le lactosérum est choisi comme un milieu de culture pour les microorganismes (levure), qui dégradent le lactose.

1.2.4. Valorisation les déchets en alimentation

Le lactosérum ou sérum ou encore petit lait, c'est un sous-produit laitier liquide de couleur jaune verdâtre obtenu pendant la production du fromage, de la caséine ou de produits similaires, par séparation du caillé après coagulation du lait. Le lactosérum, lorsqu'il est déversé dans une rivière; il engendre des effets polluants: les bactéries et autres microorganismes vivants dans l'eau, attaquent certains constituants du lactosérum (lactose principalement) en consommant l'oxygène de l'eau. Ce dernier manquera aux poissons et aux plantes aquatiques qui mourront d'asphyxie.

L'utilisation du lactosérum fermenté avec *Lactobacillus acidophilus* pour l'alimentation des veaux a montré une meilleure croissance sans aucun désordre gastro intestinal. Alimentation humaine (incorporation dans la fabrication des laits fermentés).

1.2.5. Exemples de différentes voies de valorisation des déchets liquides

Les effluents des industries laitières sont parmi les rejets agroalimentaires les plus riches en matière organique (protéine, lactose, vitamine, minéraux ...etc) et en microorganisme. Cette charge redoutable, fait de ces effluents une source de pollution environnementale. En

effet, l'industrie laitière génère des quantités importantes de rejets liquides organiques, (plus de 160 millions de tonnes de lactosérum par an), ces rejets peuvent être valorisés en bioéthanol par fermentation alcoolique (valorisation énergétique).

Les margines, ou eaux de végétation, sont des rejets liquides de l'industrie oléicole, très riches en matières organiques (composés phénoliques, lipides), souvent répandues en l'état dans la nature, de manière incontrôlée sur les sols agricoles ou parfois stockées provisoirement dans des cuves, exposant ainsi les systèmes eau-sol-plante, à une pollution inéluctable. **La figure 13** représente les principales voies de valorisation des margines.

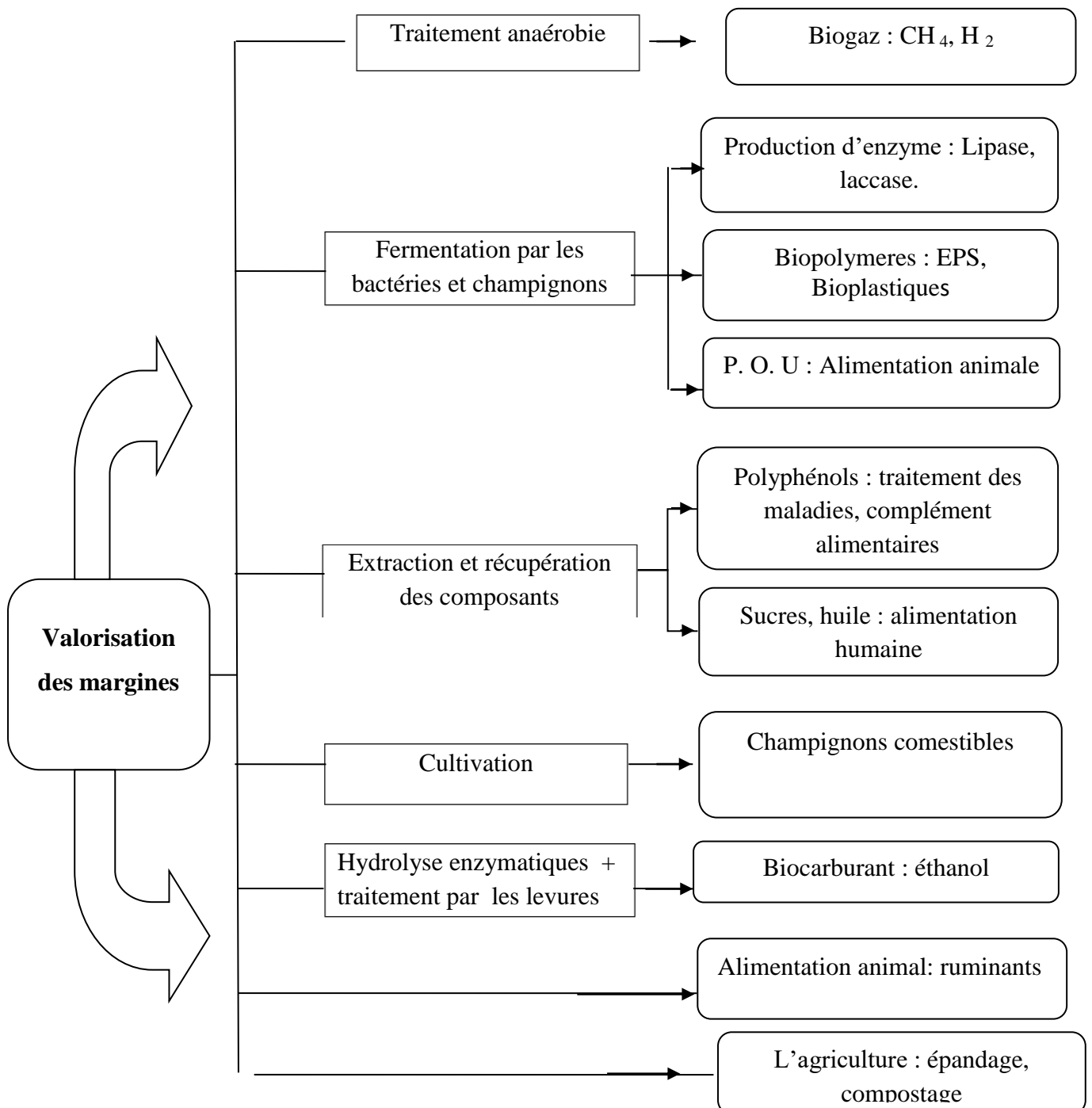


Figure 13: Principales voies de valorisation et de traitement des margines.

1.3. Aspects d'élimination des matières polluantes par une biomasse épuratrice

1.3.1. Composition de la biomasse épuratrice

Dans les stations d'épuration, ce sont des microorganismes qui retirent des eaux usées, les polluants les plus courants, avant qu'elles ne rejoignent la rivière, le lac ou la mer. Les pollutions croissantes (dues à l'industrie et à l'agriculture) nécessitent le développement de procédés capables d'éliminer des polluants spécifiques comme l'azote, le phosphore, les métaux lourds et les composés chlorés.

La biomasse épuratrice se compose le plus souvent d'une population complexe associant procaryote et eucaryote pour laquelle **les bactéries constituent la base épuratrice**.

Différents types de bactéries, de champignons et de microalgues : *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Flavobacterium* sp., *Xanthomonas* sp., *Nocardia* sp., *Mycobacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Arthrobacter* sp., *Comamonas* sp., *Bacillus* sp., *Candida tropicalis*, *Aspergillus awamori*, *Neurospora crassa*, *Trichosporon cutaneum*, *Scenedesmus obliquus*, *Spirulina maxima*, *Chlorella* sp.

Ces microorganismes peuvent dégrader les pesticides, les hydrocarbures, les alcanes et les composés polyaromatiques. Souvent, elles utilisent le polluant comme source de carbone et d'énergie. Les bactéries anaérobies sont moins fréquentes que les aérobies. Cependant, elles présentent un grand intérêt dans la bioremédiation des polyphénols polychlorés, du trichloroéthylène et le 1,2 dichloroéthane.

1.3.2. Que peut-on faire à partir de la biomasse épuratrice ?

Les applications de la biomasse sont multiples et souvent anciennes. La biomasse épuratrice a un rôle primordial dans **le traitement des eaux usées**. Les eaux usées contiennent des déchets et effluents industriels et agricoles, des ordures humaines ainsi que le ruissellement des voiries recueilli par les collecteurs d'eaux pluviales. Ces eaux ont souvent de hautes teneurs en matière organique, métaux lourds, nutriments et particule solide. Egalement, des quantités importantes de sols contaminés doivent aujourd'hui être nettoyées.

a) Dépollution des eaux usées

➤ Composition des eaux usées

Les cours d'eau sont pollués par de nombreuses sources différentes, qui varient à la fois en puissance et en volume. La composition des eaux usées reflète les styles de vie et les technologies pratiquées dans la société productrice. C'est un mélange complexe de matériaux organiques et inorganiques naturels ainsi que de composés synthétiques. Trois quarts du carbone organique dans les eaux usées sont présentes sous forme de glucides, lipides, protéines, acides aminés et acides volatiles. Les constituants inorganiques comprennent fortes concentrations de sodium, calcium, potassium, magnésium, chlore, soufre, phosphate, bicarbonate, sels d'ammonium et métaux lourds. Les étapes de traitement des eaux usées sont résumées dans **le tableau 03**.

Tableau 03 : Etapes principales des traitements primaires, secondaires et tertiaire des eaux usées.

Etape de l'épuration	procédés
Primaire	Elimination des matières particulaires insolubles par décantation, tamisage, d'addition d'alun, et autres agents de coagulation et par d'autres techniques physiques.
Secondaire	Elimination biologique des matières organiques dissoutes, lits bactériens, boues activées, lagunage, système d'aération prolongée, digesteurs anaérobie
Tertiaire	Elimination biologique des éléments nutritifs inorganiques. Elimination chimique des éléments nutritifs inorganique. Elimination/inactivation des virus. Elimination des produits chimiques en traces.

➤ Utilisation des micro-algues pour l'épuration des eaux usées

Les algues désignent un ensemble d'organismes que l'on retrouve préférentiellement dans les milieux aquatiques. Elles rassemblent à la fois les macroalgues benthiques (fixées sur un support) ainsi que des organismes microscopiques pélagiques (en eau libre, du fond à la surface) : les microalgues. Ces dernières, dénommées également phytoplancton, sont définies comme étant des organismes unicellulaires ou pluricellulaires indifférenciés.

L'histoire de l'utilisation commerciale des cultures d'algues est environ 75 ans d'application au traitement des eaux usées et production en série de différentes souches telles que *Chlorella* et *Dunaliella*. Actuellement, un intérêt significatif est développé dans certains pays avancés comme l'Australie, les États-Unis, la Thaïlande, Taiwan et Mexique.

Les eaux usées contiennent des quantités significatives de nutriments propices à la croissance des algues. Les nutriments peuvent être classés dans les catégories suivantes: (i) source de carbone issue du CO₂, (ii) une source d'énergie provenant de la lumière, (iii) une source d'azote (par exemple de l'ammoniac, nitrates) des eaux usées ou d'autres milieux de culture, (iv) des minéraux provenant des milieux de culture et (v) des vitamines potentiellement ajoutées.

Le bio-traitement à base de microalgues est particulièrement intéressant en raison de ses capacités de photosynthèse, convertissant l'énergie solaire en biomasses utiles et incorporant des nutriments tels que l'azote et le phosphore, provoquant **une eutrophisation**.

Des études ont été faites sur différents genres de microalgues dans une large distribution des bassins de stabilisation des déchets. Par ordre d'abondance, la présence des algues trouvées sont : *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micractinium* et *Golenkinia*.

Les systèmes d'algues peuvent traiter les eaux usées humaines, les déchets d'élevage, les déchets agro-industriels et les déchets industriels. En outre, les systèmes de microalgues pour le traitement des déchets tels que les effluents de porcherie, l'effluent des usines de transformation des aliments et autres déchets agricoles ont été étudiés. En outre, système à base d'algues pour l'élimination de minéraux toxiques tels que le plomb, le cadmium, le mercure, le scandium, l'étain, l'arsenic et le brome sont également en cours de développement.

➤ **Système d'immobilisation des algues**

L'un des problèmes majeurs de l'utilisation des microalgues pour le traitement tertiaire biologique des eaux usées est leur récupération de l'effluent traité. Parmi les moyens de résoudre ce problème qui ont été récemment étudiés les **techniques d'immobilisation**.

L'immobilisation semble offrir plusieurs avantages par rapport à la fermentation discontinue ou continue dans laquelle des microorganismes libres sont utilisés. Les cellules de *Scenedesmus* (est un genre d'algues vertes d'eau douce microscopique) immobilisées avec de la k-carraghénane étaient capables d'absorber de l'azote et du phosphore à des vitesses similaires à celles des microalgues libres. Les cellules vivantes immobilisées possèdent certains avantages en comparaison avec cellules suspendues; par exemple, les microalgues immobilisées sur un support approprié simplifient le traitement des substances liquides en raison du piégeage des cellules vivantes, ce qui contribue d'augmenter le temps de rétention des cellules dans le réacteur.

b) Dépollution biologique du sol

La contamination des sols résulte de l'incorporation dans le sol de différents composés (organiques et métalliques) considérés comme polluants et issus des activités humaines (agricoles, urbaines, industrielles).

Le problème des sols pollués par les composés organiques (les hydrocarbures pétroliers, hydrocarbures aromatiques, et autres composés (alcool, cétones, phénols) est la conséquence d'un passé, et trop souvent encore d'un présent industriel, peu soucieux des rejets d'éléments toxiques dans les sols, rendant de nombreux sites potentiellement pollués et dangereux pour la santé publique et animale. Ces composés ont engendré une contamination de quantités importantes des sols, pouvant même se propager aux sols environnants et contaminer les nappes phréatiques. Des quantités importantes de sols contaminés doivent aujourd'hui être nettoyées.

b₁) Techniques de bioremédiation du sol

La décontamination des sols consiste principalement à atténuer la concentration en polluants au niveau d'un seuil ne représentant ni un risque pour la santé humaine ni un danger environnemental. Les techniques de bioremédiation utilisent les propriétés dépolluantes de micro-organismes (des bactéries essentiellement, mais également des champignons) au terrain contaminé dans le but de dégrader ou transformer les contaminants à une forme moins contaminée. Les micro-organismes ont besoin de nutriments et de source carbonée pour fournir l'énergie nécessaire à leur croissance et leur survie.

Ces techniques peuvent être subdivisées en sept catégories selon le principe biologique ou le mode de dépollution mis en œuvre:

- biodégradation: Utilisation de la capacité de certains micro-organismes à transformer le polluant en substrat (source de carbone, d'énergie).
- bioimmobilisation: Utilisation de la capacité de certains micro-organismes à immobiliser un ou plusieurs composants présents à l'état soluble (bactéries).
- biolixiviation: Solubilisation et entraînement dans la phase aqueuse par les micro-organismes de polluants fixés ou piégés dans le sol.
- bioslurry (traitement en bioréacteur): Création d'une boue épaisse en mettant la partie fine du sol dans l'eau (concentration de solide entre 10 et 50 % en poids). L'eau utilisée étant de l'eau de rivière ou de l'eau souterraine, contaminée ou non et ajout de nutriments pour stimuler la croissance de la population microbienne. Un système d'aération est employé pour les procédés aérobies. En fin de traitement, les phases solides et liquides sont séparées et le sol est remis en place.
- biorestauration: Ajout de nutriments (azote/phosphore) pour stimuler la croissance des microorganismes indigènes et favoriser la dégradation des polluants.
- La bioaugmentation : Introduction dans le sol de micro-organismes exogènes adaptés aux polluants à traiter.
- biostimulation: Réensemencement de populations prélevées sur le site dont la croissance a été stimulée en laboratoire ou en bioréacteurs installés sur site. L'intervention des microbiologistes tend à augmenter les populations de micro-organismes dégradant l'agent polluant pour en accélérer la dégradation, peut prendre deux formes : - Le renforcement des populations autochtones aptes à dégrader l'agent polluant par apport d'éléments nutritifs et modification des conditions de milieu, afin de diminuer la durée de la phase de latence et leur permettre de dégrader plus rapidement le contaminant. - L'inoculation microbienne qui peut utiliser des souches: - sélectionnées et choisies pour leurs performances après une étude au laboratoire.

Chapitre 03 : Traitements anti microbiens et risque microbiologique

Introduction

Au tout début du siècle dernier, les maladies infectieuses, causées par de bactéries, des virus, des parasites eucaryotes et les champignons, représentaient la principale cause de décès chez l'homme. Les plus redoutables étaient la grippe, la pneumonie et la tuberculose.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a pris conscience depuis longtemps que la sécurité, et en particulier la sécurité biologique, constitue une question importante au plan international. L'OMS a en effet publié la première édition de son Manuel de sécurité biologique dès 1984. Ce manuel a constitué, pour les pays, une incitation à accepter et à appliquer les concepts de base de la sécurité biologique et à mettre au point des recueils nationaux de directives pratiques ou codes de bonnes pratiques destinés aux laboratoires de leur territoire où sont manipulés des micro-organismes pathogènes.

Une population microbienne n'est pas tuée instantanément lorsqu'elle est exposée à un agent létal. Il est essentiel d'avoir une mesure précise du pouvoir létal d'un agent. Une de ces mesures est **le temps de réduction décimale (D) ou valeur D**.

Le temps de réduction décimale est le temps requis pour tuer 90% des microorganismes ou de spores dans un échantillon dans des conditions spécifiques.

Afin d'étudier l'efficacité d'un agent létal, il faut pouvoir décider quand les microorganismes morts, une tâche qui peut présenter certains défis. Une bactérie est souvent considérée comme morte si elle ne se multiplie pas après inoculation dans un milieu de culture lui permettant normalement de se développer. De la même manière, un virus inactif ne peut infecter un hôte approprié.

1. Les agents antimicrobiens

Ce sont des substances dont le contact, dans des conditions définies avec les microorganismes, entraîne, soit l'arrêt de leur multiplication, soit leur mort. Chaque agent est défini par son spectre d'activité (liste des espèces vis-à-vis desquelles cet agent a une action).

2. Les conditions affectant l'efficacité des agents antimicrobiens

La destruction des microorganismes et l'inhibition du développement microbien ne sont pas chose simple, car l'efficacité d'un **agent antimicrobien** est affectée par au moins six facteurs.

- **La taille de la population** : Du fait qu'une fraction égale d'une population microbienne est tuée pendant chaque intervalle, il faut plus de temps pour détruire une population importante que pour une population plus petite.

- **La composition de la population** : l'efficacité d'un agent varie fortement avec le type d'organisme traité, car les microorganismes ont des sensibilités très différentes. Les endospores bactériennes sont beaucoup plus résistantes à la plupart des agents antimicrobiens que les formes végétatives et les cellules les plus jeunes sont habituellement plus facilement détruites que les organismes matures. Certaines espèces résistent mieux aux conditions défavorables que d'autres. Par exemple, *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent responsable de la tuberculose, est beaucoup plus résistant aux agents antimicrobiens que la majorité des autres bactéries.
- **La concentration ou l'intensité d'un agent antimicrobien** : Souvent, mais pas toujours, plus d'un agent chimique est concentré ou plus un agent physique est intense, plus les microorganismes sont détruits rapidement.
- **La durée d'exposition** : Plus longtemps, une population est exposée à un agent germicide, plus nombreux sont les organismes tués. Pour réussir une stérilisation, il faut utiliser une durée d'exposition suffisante pour réduire la probabilité de survie à 10^6 ou moins.
- **La température** : Un accroissement de la température à laquelle une substance chimique agit, augmente souvent son activité. On peut fréquemment utiliser une plus faible concentration d'un désinfectant ou d'un agent stérilisant à une température plus élevée.
- **L'environnement local** : La population à contrôler n'est pas isolée, mais elle est soumise à des facteurs de l'environnement qui peuvent offrir une protection ou favoriser sa destruction. Par exemple, comme la chaleur tue plus facilement à pH acide, il est plus aisé de pasteuriser la nourriture et les boissons acides.

3. Classement des agents antimicrobiens

Les moyens de lutte contre les microorganismes sont très nombreux et peuvent être schématiquement classés en :

3.3. Les agents physiques

- a) **Chaleur** : Il s'agit soit de la chaleur sèche (flambage, four Pasteur) ; soit de la chaleur humide (autoclave). La chaleur s'exerce par la coagulation et la dénaturation des protéines cellulaires, et donc des enzymes, dégradation des acides nucléiques, etc.
 - a₁) **La chaleur sous forme sèche**
 - **Le flambage** : au **bec Bunsen**, convient pour les fils en platine, les pipettes pasteur, cols des tubes et des fioles.
 - **Four Pasteur** (fours électriques) : on peut stériliser la verrerie, le matériel en porcelaine ou en métal. Le matériel destiné à la stérilisation doit d'abord être nettoyé, lavé (même neuf) séché et protégé (bouchons de coton cardé, emballé dans du papier aluminium).

a₂) La chaleur sous forme humide : Autoclavage et autoclave.

Principe

L'autoclave est une enceinte métallique hermétiquement close, dans laquelle on chauffe de l'eau sous pression pour faire agir de la vapeur d'eau saturée. La stérilisation sera obtenue lorsqu'une température de 120 °C sera maintenue durant 20 minutes, à condition que l'atmosphère de l'autoclave soit saturante et débarrasser de l'air.

Dans une atmosphère de vapeur d'eau exempte d'air, toutes les bactéries sont tuées même sous leur forme sporulée en : 20 mn à 115-120 °C. Elle est utilisé soit pour la préparation du matériel pour son utilisation, soit pour du matériel après son utilisation.

Le matériel à stériliser dans l'autoclave est les milieux de culture, sauf ceux qui ne sont pas auto-clavables (contiennent l'albumine, concentrés en glucides, gélatine et lait).

Méthodes spécifiques

Tyndallisation

La tyndallisation (du nom TYNDALL, son inventeur) est une stérilisation à la chaleur humide, appliquée en milieu thermosensible. En pratique, son application est fractionnée en un cycle de trois phases de chauffage, alternées de deux phases d'incubation, réparties dans leur ensemble sur trois jours. Le premier jour, les milieux traités sont chauffés à 90 – 100°C pendant 30 min, puis incubés à 37 °C jusqu'au lendemain où ils sont soumis au même traitement thermique, suivi d'une incubation d'un jour, terminée au troisième jour par une ultime phase de chauffage.

Le chauffage permet de détruire les formes végétatives microbiennes, alors que les phases d'incubation sont destinées à permettre la germination des spores éventuellement présentes, détruites alors par la phase de chauffage suivante.

Pasteurisation

Est un traitement thermique à la chaleur humide. Ce n'est pas une stérilisation puisque son objectif est seulement **la réduction significative (97 à 99%) de la population microbienne** d'un milieu dont la stérilisation est jugée non nécessaire. Elle est particulièrement **appliquée dans la conservation**, pour une durée limite, de diverses boissons et des produits laitiers, selon différents cycles technique 15 min à 75-80 °C à 85-87 °C.

b) Radiations

La stérilisation ou la réduction de la population microbiennes d'un milieu donné peuvent aussi être efficacement menées par l'emploi **de différents type de radiation électromagnétique** : micro-ondes, rayon ultra-violet (UV), rayons Gamma, rayon Béta, rayon Alpha, rayon X.

Chaque type de radiation a une longueur d'onde spécifique qui détermine son énergie, son mécanisme d'action et son domaine d'application. Ces rayonnement modifient ou détruisent l'ADN, entraînant des mutations létales chez les micro-organismes.

3.4. Les agents chimiques

- **Les désinfectants** : sont des agents antimicrobiens utilisés sur les **matériaux inertes**, leur action est létale ou inhibitrice de la croissance microbienne (alcools, composés phénoliques, aldéhyde, détergents, halogènes)
- **Les antiseptiques** : ont la même nature chimique mais leur toxicité plus réduite permet leur emploi sur **les tissus vivants**. (Peroxyde d'hydrogène, détergent cationique, alcool (70 %)).
- **Les agents chimio-thérapeutiques** : incluent les antibiotiques, antifongiques, antiparasitaires et antiviraux.

4. Normes de base sur les manipulations de microbiologie

Les risques biologiques résultent de la manipulation d'organismes biologiques ou de microorganismes naturellement pathogènes (bactéries, virus, champignons, parasites, ou animaux infectés) ainsi que de la manipulation de micro-organisme génétiquement modifiés (pathogène ou non).

Les microorganismes ont des effets pathogènes et des virulences très différentes et sont susceptibles d'entraîner des désagréments, voire des maladies graves et/ou létales pour l'être humain, les animaux et les végétaux.

Les modifications génétiques sont-elles certes porteuses d'espoir dans différents domaines (recherche fondamentale, biomédical) mais pourraient, si utilisées à mauvais escient ou en cas de reproduction incontrôlée, engendrer des effets indésirables susceptibles de modifier irréversiblement notre environnement.

4.1. Laboratoire de microbiologie

Le laboratoire de microbiologie doit comporter au minimum :

-Une salle de manipulation, bien éclairée et à l'abri des courants d'air, avec un sol et des murs au revêtement faciles à nettoyer et désinfecter. Elle doit être munie de paillasse à revêtement lisse, résistant, imperméable, et incombustible. Cette paillasse doit comporter d'un évier plat, des arrivées d'eau et de gaz et des prises électriques. Il est utile de disposer d'un système de vide et d'air comprimé. Une hotte ou un poste spécifique stérilisable aux rayons UV d'un niveau de sécurité correspondant au classement du laboratoire est indispensable.

-Une salle de préparation et une salle de décontamination séparées comportant des paillasses, un bloc-évier fonctionnel à plusieurs bacs, un autoclave, un four pasteur. En principe c'est la salle de décontamination qui sert de laverie et est équipée de machines à laver la vaisselle. Cependant, pour une meilleure sécurité, il est préférable de disposer dans cette pièce d'airs de travail spécifiques et séparées pour le traitement du matériel souillé et son lavage.

-Dans la mesure du possible des locaux annexes reçoivent les armoires servant au stockage des verreries, du matériel jetable, des milieux déshydratés et de certains produits chimiques. Une armoire frigorifique est nécessaire pour la conservation des milieux près à l'emploi, de produits de souche microbienne sensibles à la chaleur. Un congélateur est également utile pour la conservation de certains produits et de souche lyophilisé.

4.2. Niveaux de sécurité des laboratoires

Il existe 4 niveaux en fonction de la pathogénicité des germes manipulés sur l'homme et animaux :

- **Niveau 1** (NSB1) : des microorganismes pathogènes ne sont pas manipulés. Aucun équipement de sécurité ou de confinement particulier n'est exigé. L'application des règles d'hygiène classique et la décontamination des déchets est cependant nécessaire (**figure 14**).



Figure 14 : Niveau de confinement 1

- **Niveau 2** (NSB2) : Les agents pathogènes manipulés dans un niveau de confinement 2 ne sont généralement pas transmissibles par voie aérienne, mais il est important d'éviter la production d'éclaboussures et d'aérosols qui peuvent se répandre sur les paillasse et se révéler dangereux pour la santé s'ils sont ingérés après contamination des mains. Des locaux spécifiques doivent être délimités et isolés : ils doivent être munis d'ouvertures qui restent closes pendant le travail. Le personnel y travaillant ou y pénétrant doit être spécifiquement formé ou informé (danger biologique) : la blouse est obligatoire. Une attention particulière doit être apportée à la désinfection et au traitement des produits souillés et au confinement des cultures. Les principaux dispositifs de confinement sont les enceintes de sécurité biologique et les centrifugeuses à rotors scellés ou munis de godets de sécurité. (**Figure 15**).

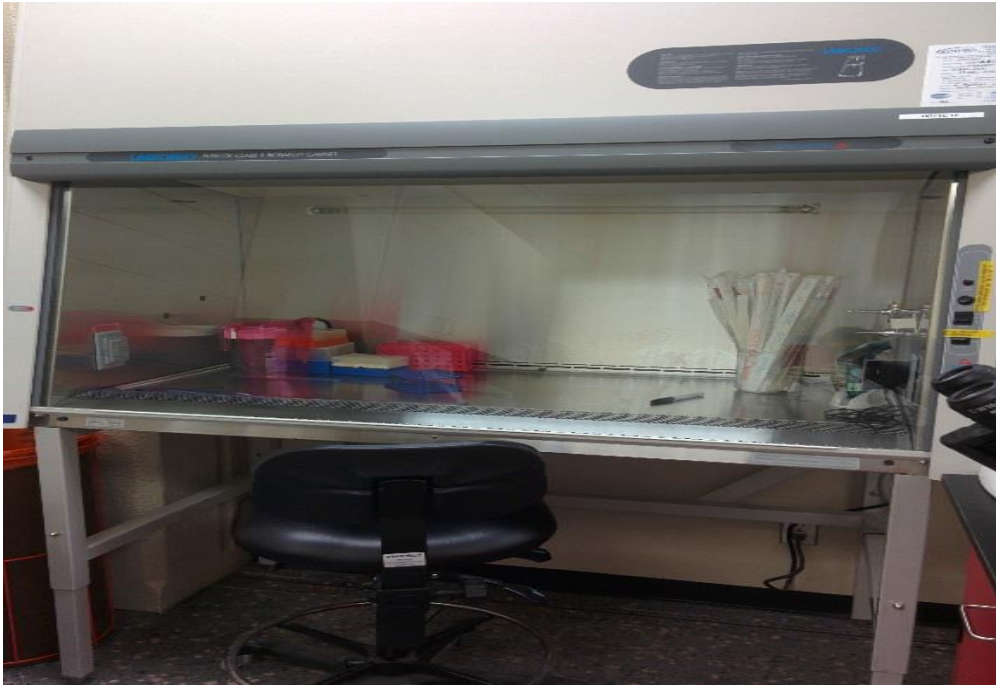


Figure 15 : Niveau de confinement 2

- **Niveau 3 et 4** (NSB3, NSB4) : ces laboratoires, très spécialisés, possèdent des locaux spécifiques en dépression, un système d'air filtré et ont des portes et fenêtre à fermeture hermétique. On y pénètre par SAS (**figure 16**) : l'accès est strictement réglementé. Les règles d'hygiène et de décontamination sont très sévère (porte éventuel d'une combinaison, PSM de type II ou III).



Figure 16 : Niveau de confinement 4.

5. Manipulation de base

Les manipulations de cultures microbiennes ou de produits susceptibles de contenir des microorganismes s'effectuent selon des techniques particulières destinées à éviter deux types de contamination :

- Contamination de la culture ou de produit par le manipulateur ou l'environnement.
- Contamination de manipulateur ou de l'environnement par les microorganismes étudiés.

a) Zone de protection du bec bunsen : Une zone d'asepsie est classiquement créée à l'aide d'un bec Bunsen qui sert également à la stérilisation extemporanée des instruments.

b) Hottes et postes de sécurité microbiologique (PSM) : Les hottes simples ou celles de type (chimie) ne sont pas utilisables pour la microbiologie. Les hottes de microbiologie sont de plusieurs types :

b₁) Hottes à suppression : Il s'agit d'enceinte ouverte vers l'avant dans lesquelles on génère un flux d'air stérilisé, généralement en flux horizontal : elles sont couramment appelées (hottes à flux laminaire horizontal). Ces hottes n'assurent que la protection de la manipulation et ne protègent pas le manipulateur : au contraire, elles peuvent entraîner la contamination de celui-ci et ne doivent pas être utilisées pour la manipulation de germe ou de produit dangereux.

b₂) Postes de sécurité microbiologique (PSM)

Il s'agit d'enceintes destinées à assurer la protection du manipulateur et de l'environnement et éventuellement celle de la manipulation. Il existe 3 types :

- **PSM de classe I :** Une aspiration d'air est réalisée sur l'avant ; l'évacuation se fait par le dessus au travers d'un filtre à haute efficacité. La manipulation n'est pas intégralement protégée, alors que l'environnement l'est (**figure 17**).
- **PSM de classe II :** Une aspiration est réalisée au-dessus du plan de travail au travers d'un filtre ; l'évacuation se fait comme pour les PSM de type I. Selon le cas, il peut y avoir un ou deux ventilateurs et possibilité ou non d'un recyclage total. La protection du manipulateur et de l'environnement est ici complétée par celle de la manipulation (**figure 17**).
- **PSM de classe III :** Il s'agit d'enceintes fermées et totalement étanches offrant une sécurité maximale. Les manipulations se font par l'intermédiaire d'une boîte à gants remplaçables. La filtration de l'air est beaucoup plus efficace (**figure 17**).
- **Enceintes anaérobies :** Il s'agit d'enceinte fermée et étanches contenant un gaz inerte. Elles s'apparentent aux PSM de classe III. Le bec bunsen n'est pas utilisable et peut être remplacé par un stérilisateur électrique. Certains systèmes très sophistiqués sont munis de sac et étuves intégrées.

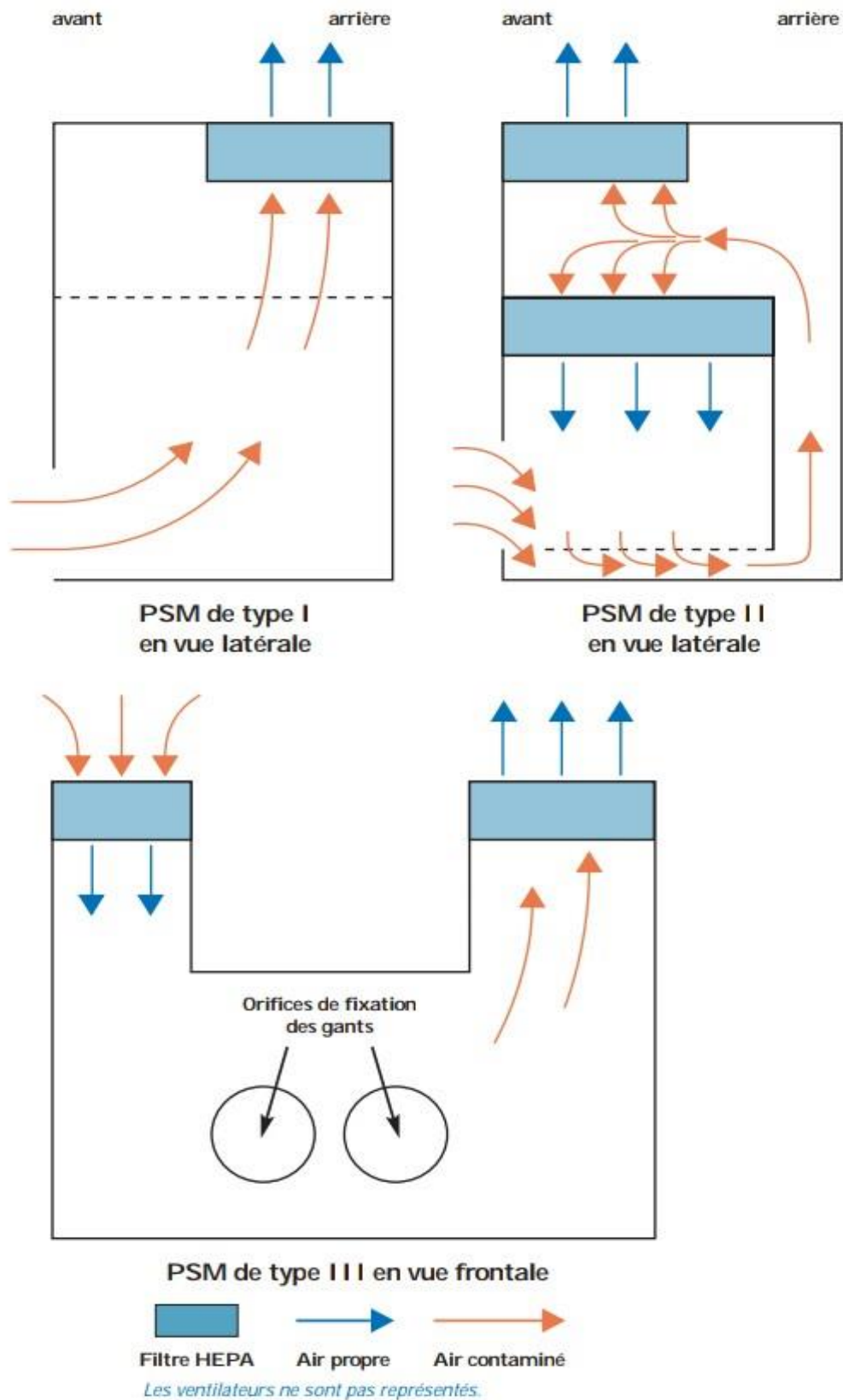


Figure 17 : Les différents types de PSM.

6. Risque microbiologique

Risque microbiologique résulte de l'exposition aux agents microbiologiques qui au sens du code du travail sont des microorganismes (bactéries, virus, prion, champignons) y compris les microorganismes génétiquement modifiés, les cultures cellulaires, susceptible de provoquer une infection, ou intoxication.

En fonction de l'importance du risque, les agents microbiologiques sont classés en quatre classes (**tableau 04**).

Tableau 04 : Classement des agents infectieux.

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Susceptible de provoquer une maladie chez l'homme	non	oui	maladie grave	maladie grave
Constitué un danger pour le travailleur		oui	séieux	sérieux
Propagation dans la collectivité		Peu probable	possible	Risque élevé
Existence d'une prophylaxie ou d'un traitement efficace		oui	oui	non

6.1. Analyse du risque microbiologique

L'analyse de risque comprend :

6.1.1. Appréciation du risque (scientifique)

Évaluation des risques microbiologique (ERM) liés à l'alimentation en termes de gravité, de fréquence et de source. Principaux éléments d'une évaluation des risques:

- a) Évaluation des effets (ou dangers).
- b) Évaluation de l'exposition.
- c) Caractérisation des risques.

a) Évaluation des effets : Évaluation de la capacité à produire un impact négatif sur l'environnement ou la santé humaine.

Critères:

-Pathogénicité: capacité d'un micro-organisme d'infecter des humains et/ou d'autres organismes, de s'y établir, de s'y multiplier et d'y causer des dommages, une maladie ou encore des effets immunologiques pouvant ou non entraîner la mort.

-Toxicité: capacité d'un micro-organisme de causer des effets nocifs en raison de la production de toxines et/ou de métabolites, ou encore en raison de ses composantes structurales (endotoxine).

-Pouvoir envahissant: capacité d'un organisme vivant de s'établir, de persister, de prendre la place d'espèces indigènes, de dominer les nouveaux milieux et de menacer la diversité biologique.

b) Évaluation de l'exposition : Évaluation des processus par lesquels les espèces humaines et non-humaines et l'environnement entrent **en contact** avec un micro-organisme ou avec son matériel génétique.

Dépend:

- Potentiel d'introduction dans l'environnement (air, eau, sol).
- Population ou écosystème exposés.
- Persistance.
- Prolifération.

c) Caractéristique du risque : Combinaison de la probabilité d'un événement et de ses conséquences. Le risque peut être décrit comme "élevé", "moyen", "faible" ou "négligeable".

6.1.2. Gestion du risque (autorité publiques)

-Risque prioritaire à maîtriser.

-Stratégies de contrôle des agents pathogènes.

6.1.3. Communication du risque

Information à diffuser à tous les niveaux :

- Service d'accompagnement (autorités gouvernementales, vétérinaires, industrie...).
- Réponse aux médias.

Chapitre 04 : Analyse de la biodiversité microbienne

Introduction

Les microbiologistes sont confrontés à la tâche intimidante de comprendre la diversité de formes de vie qu'on ne peut pas voir à l'œil nu, mais qui peuvent apparemment se trouver n'importe où sur la terre. Un des premiers outils nécessaire pour étudier un tel niveau de diversité est un système de classification.

Depuis une vingtaine d'années, les populations microbiennes sont fréquemment étudiées par des techniques de biologie moléculaire. En effet, l'étude des populations par isolement de bactéries sur milieux de culture ne permet la mise en évidence que d'une très faible proportion des espèces bactériennes présentes. Par exemple, seulement 0,01 à 0,1 % des cellules bactériennes océaniques permettent d'obtenir une colonie sur des milieux de laboratoire. Un gramme de sol contient 10^{10} bactéries dont seulement 0,1 % à 1 % peuvent être cultivée. En outre, les bactéries isolées sur milieux de culture subissent une pression de sélection forte de la part des espèces à grande vitesse de réplication et des nutriments présents en trop grande ou trop faible quantité. De plus, l'isolement et le suivi d'une souche spécifique nécessitent que celle-ci possède un marqueur particulier ou qu'elle croisse sur un milieu sélectif, ce qui n'est pas toujours le cas.

Il est aujourd'hui possible de séquencer l'ADN de toutes les microorganismes présentes dans un milieu donné (sol, eau, tube digestif de l'homme et des animaux, échantillons cliniques, matrice alimentaire...). Cette approche, nommée «**métagénomique**», nous renseigne sur la diversité et l'abondance relative des micro-organismes présents.

L'analyse de la biodiversité a plusieurs intérêts on peut citer : le développement de PCR diagnostiques ou de tests sérologiques ; la détection de facteurs de virulence et de gènes de résistance aux antibiotiques et l'épidémiologie de bactéries pathogènes. Ainsi, la génomique bactérienne est utile aux microbiologistes, aux infectiologues et aux spécialistes en hygiène hospitalière. Egalement, de caractériser le potentiel bactérien de biodégradation des polluants au sein des eaux usées ou sols pollués. En microbiologie alimentaire, des études ont été faites sur la caractérisation de la flore lactique dominante responsable de la transformation du blé fermenté.

1. Des définitions

- **La biodiversité** : La biodiversité est définie comme étant la variété et la diversité tant floristique que faunistique du monde vivant, on parle ainsi de diversité biologique.
- **La taxonomie** se définit comme la science de la classification biologique. Au sens large, elle est faite de trois parties séparées, mais reliées entre elle : la classification, la nomenclature et l'identification.
- **La classification** c'est pour répartir les organismes en groupes appelé **taxons**. La nomenclature est la branche de la taxonomie qui donne des noms aux groupes taxonomique, selon des règles publiées.

- **L'identification** est le côté pratique de la taxonomie, elle consiste à déterminer qu'un isolat particulier appartient à un taxon connu, et, si c'est le cas, lequel.
- Le terme **systématique** est souvent utilisé pour taxonomie. Cependant nombreux taxonomistes le définissent en termes plus généraux comme « l'étude scientifique des organismes dans le but ultime de les caractériser et de le arranger de manière ordonnée ».

2. La classification phénétique

Pendant très longtemps, les taxinomistes microbiens ont copté exclusivement sur une **étude phénétique**, qui groupe les organismes suivant la similitude de leurs caractères phénotypiques, qui groupe les organismes suivant la similitude de leurs caractères phénotypiques. Ce système de classification a réussi à mettre de l'ordre dans la diversité biologique et à clarifier la fonction de structures morphologiques.

3. La classification phylogénétique

A la suite de la publication en 1859 de l'œuvre de *Darwin De l'origine des espèces*, les biologistes commencèrent à développer des systèmes de classification phylogénétique ou phylétique, qui cherchaient à comparer des organismes sur la base de relation évolutive. Le terme **phylogénie** désigne le développement évolutif d'une espèce. Il y a actuellement plus de 500 000 séquences d'ARNr 16S et 18S dans les bases de données internationales de Genbank.

4. Les méthodes d'étude des communautés microbiennes

4.1. L'approche culturelle (culture dépendante)

On utilise de nombreuses approches différentes pour classifier et identifier les microorganismes qui ont été **isolées, purifiés et développés sous forme de culture pures**. Pour des raisons de clarté, on les a divisés en deux groupes : les approches classiques et les approches moléculaire. Les identifications les plus solides et durables sont celles basées sur une combinaison des deux approches. Une limite à l'utilisation de l'approche culturelle est le nombre de bactéries qui vont pouvoir se développer en conditions du laboratoire.

4.1.1. Les caractéristiques classiques

Les approches classiques de la taxonomie font usage de caractéristiques morphologiques, physiologiques, biochimiques et écologiques. Ces informations ont été employées en taxonomie microbienne pendant de nombreuses années. Elles sont utiles pour l'identification de routine et peuvent aussi fournir des informations phylogénétiques.

-Les caractéristiques morphologiques : la morphologie est facile à étudier et à analyser. Beaucoup de caractères morphologiques différents sont utilisées dans la classification et l'identification (**tableau 5**).

Tableau 05 : Quelques caractères morphologiques utilisés pour la classification et l'identification.

Caractère	Groupes microbiens
Forme cellulaire	Tous les groupes principaux
Taille cellulaire	Tous les groupes principaux
Caractères ultra structurale	Tous les groupes principaux
Réaction à la coloration	Bactéries, certains champignons
Cils et flagelles	Tous les groupes principaux
Mécanisme de mobilité	Bactéries mobile par glissement, spirochètes, protistes
Formes et localisation des spores	Bactéries, protistes, champignons

-Les caractères physiologiques et métaboliques : Les caractères physiologiques et métaboliques sont très utiles, car elles sont directement en relation avec la nature et l'activité des enzymes microbiennes et des protéines de transports. Comme les protéines sont les produits des gènes, l'analyse de ces caractéristiques fournit une comparaison indirecte des génomes. Exemples :

-source de carbone et d'azote, source d'énergie, tolérance osmotique, pigments photosynthétiques, sensibilité aux inhibiteurs et aux antibiotiques, ...etc.

-Les caractéristiques écologiques : La capacité d'un microorganisme à coloniser un environnement spécifique à une valeur taxonomique. Certains microorganismes peuvent être très similaires sous beaucoup d'autre aspect, mais habiter des niches écologiques différentes, ce qui suggère qu'ils peuvent n'être pas aussi proches parents que supposé à première vue. Comme exemples les propriétés écologiques taxonomiquement importantes : la nature des relations symbiotiques, la capacité à causer une maladie chez un hôte particulier.

-Les Méthodes immunologiques : Elles sont basées sur la réaction d'un anticorps spécifique vis à vis d'un antigène du corps bactérien, d'un antigène soluble ou d'une toxine. Elles ont l'avantage d'être rapides et spécifiques. Elles peuvent manquer de sensibilité, on peut alors les associer à une autre méthode pour augmenter la sensibilité. Ce sont globalement des techniques coûteuses. Deux types : Méthodes direct et méthodes indirectes

Mesure directe

Agglutination : L'agglutination permet une mesure directe de la présence bactérienne dans un échantillon. Des billes de latex colorées et recouvertes d'anticorps agglutinent l'antigène spécifique (bactéries). On observe alors la formation d'un précipité. La méthode est peu sensible (10^7 bactéries sont nécessaires par réaction) mais est simple à mettre en œuvre (**figure 18**).

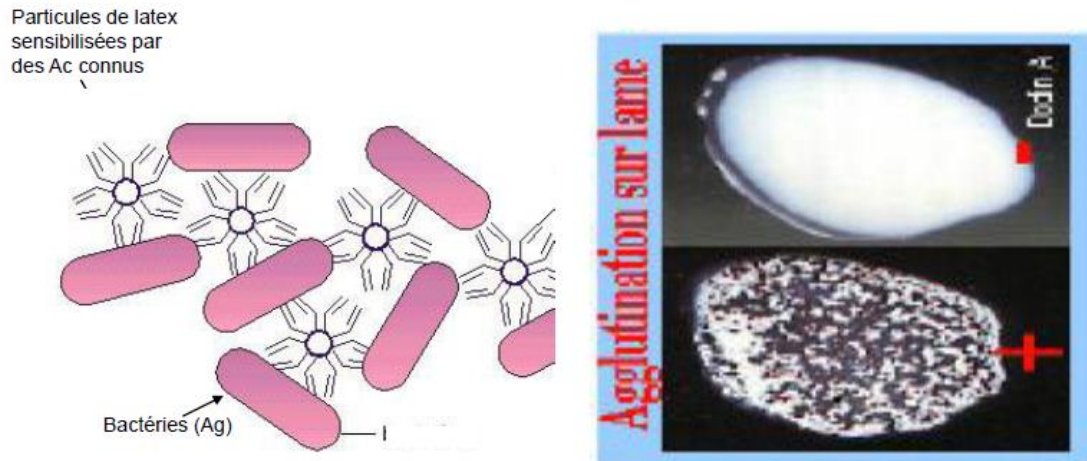


Figure 18 : L'agglutination

L'immunodiffusion : utilise un appareil en forme de « L » comportant deux chambres. La chambre verticale est dite « de mobilité ». Elle contient de l'agar semi-solide inoculé avec un anticorps spécifique de la bactérie que l'on doit détecter. La chambre horizontale est dite « d'inoculation ». Elle contient un milieu sélectif enrichi et est inoculée avec l'échantillon préenrichi par culture. Les bactéries peuvent alors migrer vers la chambre « de mobilité » et réagir avec l'anticorps pour former une ligne de précipitation. Cette méthode est utilisée, en particulier, pour la détection **des salmonelles mobiles dans l'industrie alimentaire**.

Immunoprécipitation : L'immunoprécipitation consiste à saturer à l'intérieur de petits appareils en plastique un nombre important de blocs absorbants au moyen d'anticorps de détection et d'anticorps de capture. Ces deux anticorps sont spécifiques de l'antigène. L'échantillon est absorbé par les blocs. Lorsque l'antigène est présent dans l'échantillon, il réagit, dans un premier temps, avec l'anticorps marqué et, dans un second temps, avec l'anticorps de capture pour former une bande visible d'immunoprécipitation.

Mesure indirecte ou immunodosage (exemple technique d'ELISA)

l'ELISA. (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) : est une technique de dosage sur plaque conçue pour détecter et quantifier des substances telles que des peptides, des protéines, des anticorps et des hormones. Ag bactérien fixé au fond des puits d'une microplaque. • On dépose chaque dilution du sérum de malade dans un puits. • Après incubation et lavages, on dépose dans chaque puits une anti-Ig (Anti-IgG, ou anti-IgM) couplée à une Enzyme • Après une 2ème période d'incubation et des lavages, on rajoute un substrat dans chaque puits. • Si la présence d'Ac sériques spécifiques, l'enzyme agit sur le substrat qui est hydrolysé et change de couleur (Densité optique). Ces techniques très sensibles, automatisées et permettent de différencier les classes d'Ig (IgG, IgM, IgA) (**figure 19**).

Application : recherche de *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma*.

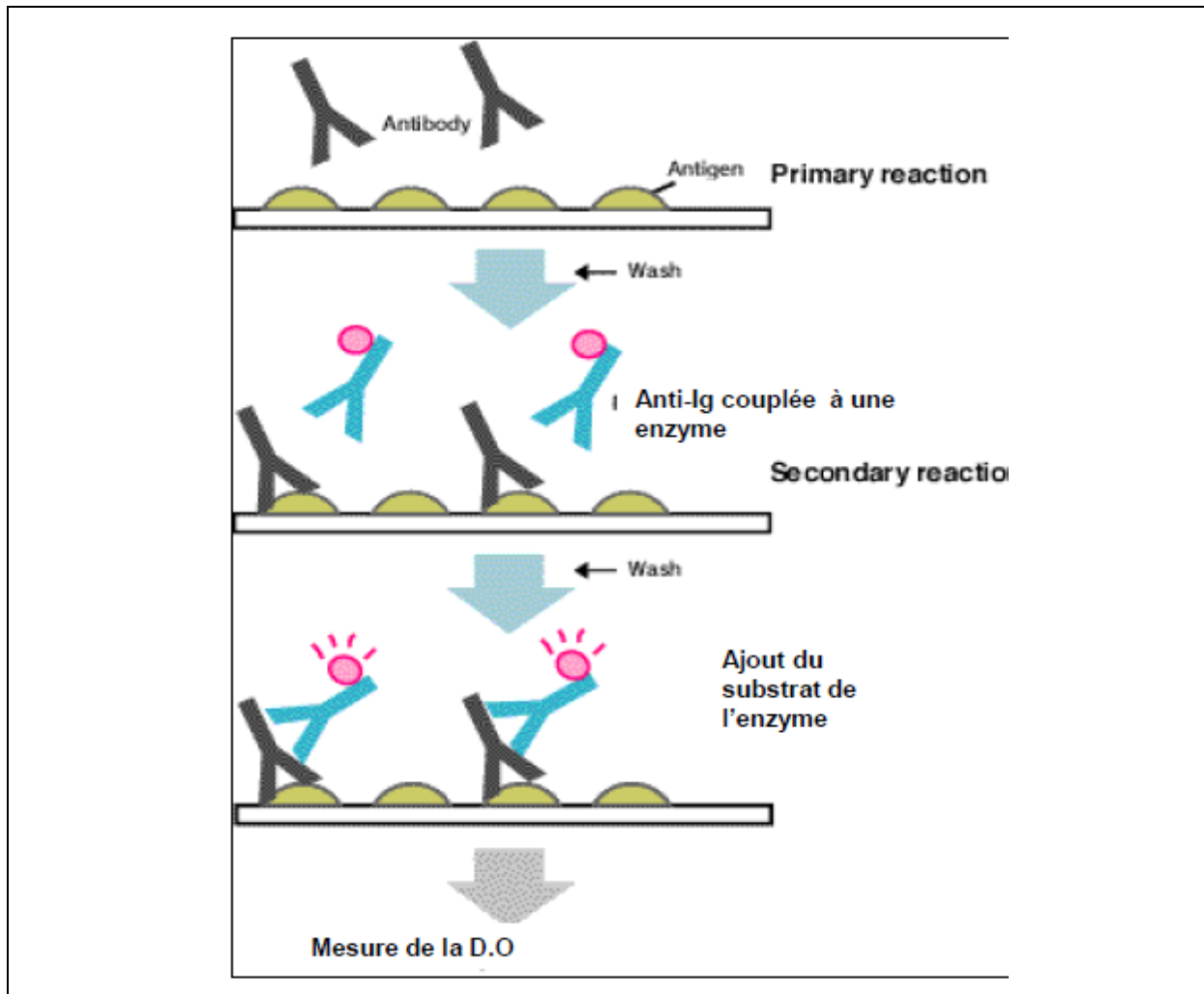


Figure 19 : Technique immuno-enzymatique.

4.1.2. Les caractéristiques moléculaires

-Le gène codant pour l'ARNr 16S (ADNr 16S) : Toutes les cellules contiennent des ARNr. Ce sont des composants essentiels à leur fonctionnement. Les cellules eucaryotes possèdent des ARNr 28S, 18S, 5,8S et 5S tandis que les cellules procaryotes possèdent des ARNr 23S, 16S et 5S. Leurs gènes s'organisent en opérons pouvant être présents en mono- ou multi-copies dans les génomes (1 à 15 copies par génome bactérien).

Le gène codant pour l'ARNr 16S ce sont principalement les gènes codant pour l'ARN de la petite sous-unité du ribosome qui sont utilisés comme marqueurs phylogénétiques, c'est-à-dire le gène codant pour l'ARNr 16S chez les procaryotes ou celui de l'ARNr 18S chez les eucaryotes. Le gène de l'ARNr 16S a l'avantage d'être constitué d'une mosaïque de domaines hautement conservés (ayant peu évolué au cours du temps) et de domaines variables, mais aussi de présenter une taille d'environ 1500 nucléotides aisément séquençable.

Ces régions hautement conservées servent de cibles pour des amorces dites "universelles" servant à l'amplification *in vitro* par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (**figure 20**)

puis **au séquençage par la méthode de Sanger**. Le choix des amorces utilisées pour la PCR est essentiel. Les amorces universelles ciblant des parties conservées de la séquence de l'ADNr 16S vont permettre d'amplifier la plupart des séquences d'ADNr 16S bactérien.

Les Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTOs) basées sur l'identification des ARNr 16S permettent de définir une catégorie proche du rang taxonomique de l'espèce si le degré d'identité est **au moins de 97%**. On considère ainsi que les bactéries qui présentent plus de 97% de similarité dans leurs séquences d'ADNr 16S appartiennent à la même espèce.

L'utilisation de ce gène comme biomarqueur en taxonomie a permis de révéler la biodiversité d'eucaryotes et de procaryotes dans de nombreux environnements et de pallier les limites de l'approche culturale.

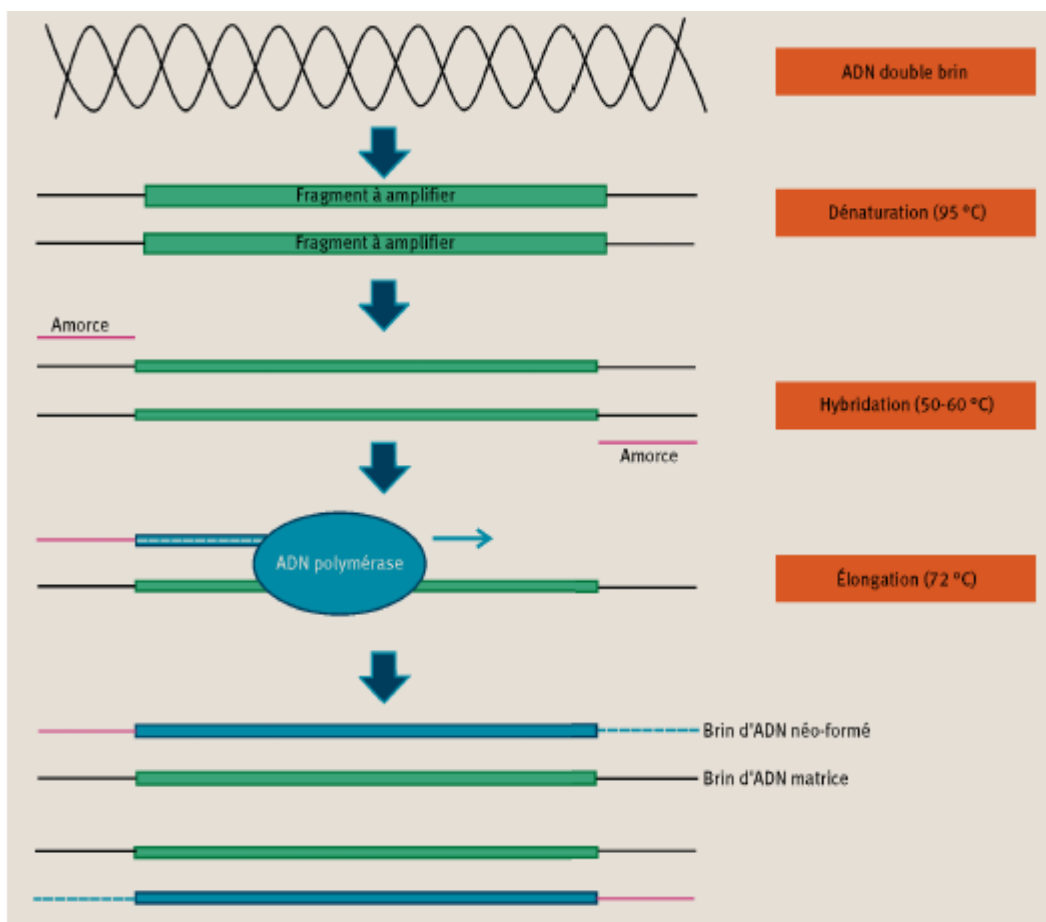


Figure 20 : Principe de la PCR.
un seul brin d'ADN est représenté pour l'étape d'élongation

- Le séquençage de première génération : exemple (méthode de Sanger)

Le séquençage génétique de Sanger est un moyen de déterminer l'ordre des quatre nucléotides dans un brin d'ADN. Ce séquençage a permis aux scientifiques de séquencer une vaste gamme d'organismes, il était la méthode de choix avant la découverte des séquenceurs

de nouvelle génération. La méthode de séquençage par synthèse enzymatique inventée en 1977 par Frédérick Sanger (**figure 21**) (Angleterre, nobel de Chimie 1980).

Les étapes :

- Initiation de la polymérisation de l'ADN à l'aide d'une amorce complémentaire.
- Élongation de l'amorce par des ADN polymérases thermostables (PCR).
- Addition des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et d'une faible concentration de l'un des quatre didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP).
- Ces ddNTP une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, empêchent la poursuite de l'élongation.
- La terminaison se fait de manière statistique sur toutes les positions possibles.

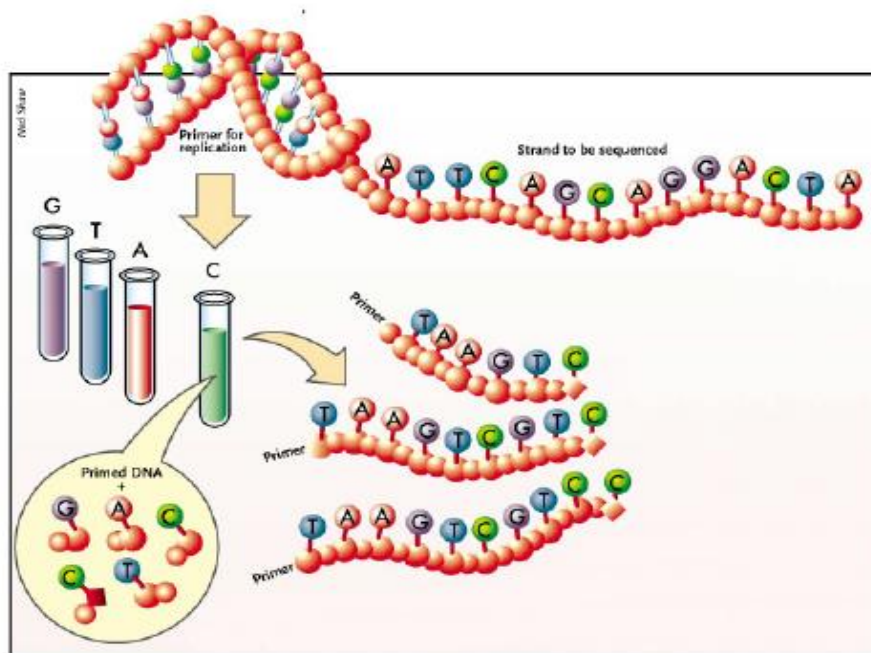


Figure 21: Méthode de séquençage Sanger.

-La composition en base des acides nucléiques : les génomes microbiens peuvent être directement comparés et leur similarité taxonomique estimée de nombreuses façons. L'ADN contient quatre bases puriques et pyrimidiques : l'adénine, guanine, cytosine et la thymine. Dans l'ADN double brins, A s'apparie avec T et G avec C, donc le rapport G+C/ A+T ou **teneur en G+C**, le pourcentage de G+C dans l'ADN, est un reflet de la séquence en bases et varie avec les modifications de séquences comme suit :

$$\text{Mol\% G+ C} = \frac{\text{C+ G}}{\text{G+C+T+A}} \times 100$$

La composition de bases d'un ADN se détermine de plusieurs manières. Bien qu'on puisse s'assurer du contenu G+C après hydrolyse de l'ADN et analyse de ses bases par HPLC, on utilise souvent les méthodes physiques plus aisées. Le contenu en G+C est souvent déterminé à partir de **la température de fusion** (T_m pour melting température) de l'ADN (**figure 22**). Dans l'ADN double brin, les paires G+C comportent trois liaisons hydrogènes et

les paires AT deux, Par conséquent, un ADN avec un contenu en G+C plus grand contient plus de liaisons hydrogènes et ses chaînes se sépareront à des températures plus élevée – c'est –à-dire qu'il a un point de fusion plus élevé.

Par exemple, nous pouvons ainsi comparer *Mycoplasma hominis* avec environ 29% de G+C dans l'ADN et une T_m de 65° et de *Micrococcus luteus* : 79% de G+C et une T_m de 85°

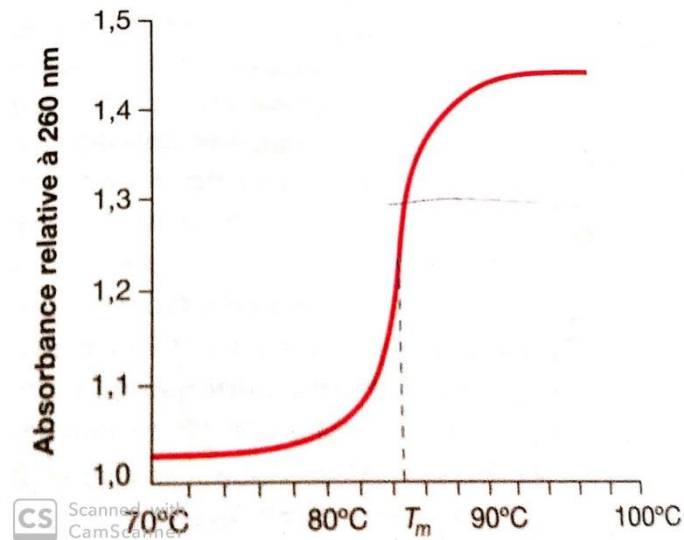


Figure 22 : Une courbe de fusion d'ADN.

-Hybridation des acides nucléiques : La similarité entre génomes peut se comparer plus directement par l'hybridation des acides nucléiques, appelé aussi **hybridation ADN-ADN (figure 23)**. Si on refroidit un mélange d'ADN simple brin, formé par chauffage d'ADN double brin, et si on le maintient à une température environ 25°C inférieur à sa T_m , les brins dont les séquences en bases sont complémentaires se réassocieront pour former de l'ADN double brin stable. Tandis que les brins des brins non complémentaires resteront non appariés. Comme des brins dont les séquences sont similaires, mais non identiques, s'associent pour former des ADN doubles brins hybrides moins stables.

Dans une des techniques d'hybridation les plus souvent utilisées, on incube des filtres de nylon ou sont fixés des brins d'ADN non radioactifs, à la température adéquate, avec des fragments radioactifs d'ADN simple brin. On laisse les fragments radioactifs s'hybrider avec l'ADN simple brin fixés puis on lave la membrane pour enlever l'ADN non hybridé et on mesure la radioactivité. La quantité de la radioactivité fixée au filtre reflète le degré d'hybridation, donc la similarité entre les séquences.

Deux souches dont l'ADN accusent une parenté d'au moins 70% dans des conditions optimale d'hybridation et moins de 5% de différence de T_m , sont souvent, mais pas toujours, considérés comme membre de la même espèce.

L'hybridation ADN-ADN n'est utilisée que pour l'étude des microorganismes étroitement apparentés.

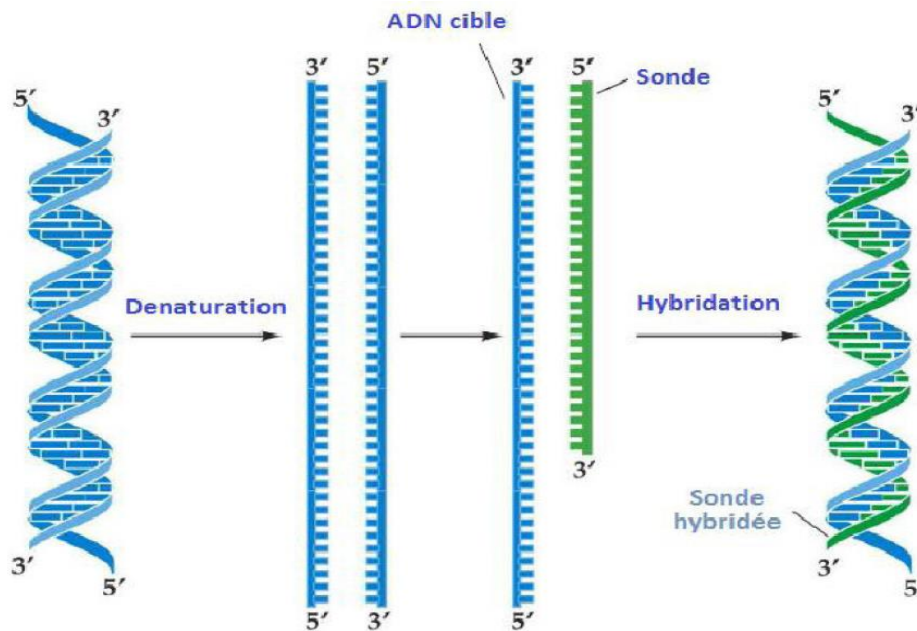


Figure 23 : Hybridation des acides nucléiques.

4.2. Etude de la communauté microbienne par une approche métagénomique (culture indépendante)

Les méthodes de microbiologie traditionnelles, dites pasteuriennes, ne répondent que très imparfaitement à plusieurs questions. L'identification et le dénombrement des micro-organismes se font par microscopie sur des critères morphologiques ou de coloration, ou encore par tests biochimiques après isolement et culture sur boîtes de Pétri ou en milieux liquides. Ces critères de classification ont rapidement trouvé leurs limites du fait de la diversité phénotypique et physiologique des bactéries.

Or, **la très grande majorité des micro-organismes est incultivable** sur ces milieux car les facteurs nécessaires à leur croissance restent inconnus. De plus, ces méthodes requièrent l'isolement du micro-organisme de son milieu naturel et de sa communauté, ce qui biaise forcément l'évaluation de ses activités. Les méthodes moléculaires, en s'affranchissant de la mise en culture, réduisent énormément les biais des méthodes pasteuriennes.

La métagénomique appelée aussi génomique environnementale, consiste à séquencer tout ou partie d'ADN total d'échantillon contenant plusieurs espèces **sans isolement, ni culture**. Le séquençage du gène de l'ARN r 16S est couramment utilisé pour estimer la diversité microbienne total, c'est-à-dire cultivable ou non, d'un écosystème. Au sens courant, le terme métagénomique est toutefois réservé aux approches non ciblées à *priori*, c'est-à-dire s'intéressant à l'ensemble de l'ADN d'un échantillon, et non à un seul gène.

Ces dernières années, l'utilisation de **méthodes de culture indépendantes** pour caractériser les communautés microbiennes a augmenté en raison de leurs avantages pratiques. Le principal avantage des méthodes de culture indépendantes est leur capacité à identifier facilement une grande proportion de la diversité bactérienne qu'il peut être difficile à observer avec des études basées sur une étude de culture dépendante.

Deux approches sont principalement utilisées (**figure 24**). La première approche, plus ciblée et plus utilisée, est basée sur l'amplification par PCR de la séquence complète ou partielle de l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16 S) d'un échantillon (**figure 24A**). La deuxième approche est basée sur l'extraction de l'ADN total d'un échantillon directement suivi de son séquençage (**figure 24B**).

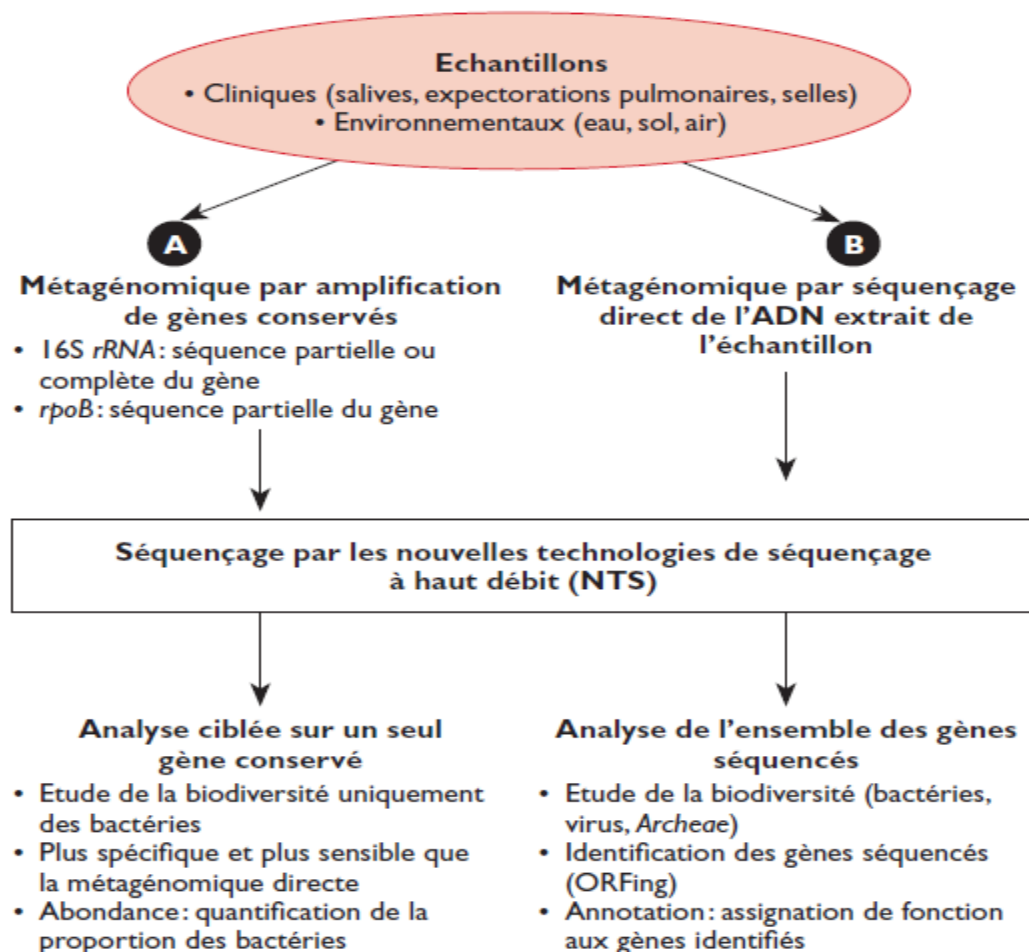


Figure 24 : Les différentes étapes et application de la métagénomique.

Cette approche directe permet de mettre en évidence le contenu en gènes d'une population microbienne et de déterminer ainsi leurs capacités. Cette approche demande plus de ressources de séquençage et est donc moins sensible que la précédente pour étudier la biodiversité. Il est toutefois probable que cette approche devienne la méthode de choix, en raison des multiples informations de fonctions géniques qu'elle seule peut apporter.

Il existe plusieurs méthodes d'analyser la biodiversité microbienne :

4.2.1. Technique de la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

La PCR couplée à la DGGE est une technique d’empreinte moléculaire qui donne une image de la diversité des communautés microbiennes (**figure 25**). La PCR-DGGE fait partie de la nouvelle discipline moléculaire de l’écologie microbienne vise à étudier les interactions entre microorganismes et entre microorganismes et leur environnement. Comparaison de différents types de stations d’épuration, impact de conditions particulières sur les microorganismes.

Elle permet d’évaluer et de comparer la diversité microbienne sur la base du génotype. Elle appartient à une famille de techniques d’analyse moléculaire comme la TGGE, SSCP, TRFLP qui nécessite l’amplification préalable de gènes spécifiques par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Cette méthode est basée sur la différence de mobilité électrophorétique entre deux molécules d’acides nucléiques qui diffèrent par une variation de séquence.

La technique consiste à séparer des fragments d’ADN de taille identique selon leurs propriétés de fusion sur un gel de polyacrylamide contenant **un agent dénaturant**. Au cours d’une étape préalable de PCR, les fragments d’ADN sont flanqués d’une amorce riche en GC qui permettra au fragment de ne pas se dénaturer totalement. Les fragments ainsi obtenus sont soumis à **une électrophorèse contenant un gradient d’agent dénaturant (urée)** qui va entraîner leur dénaturation progressive au fur et à mesure de la migration en fonction de leur richesse en GC. Cette dénaturation entraîne un encombrement stérique qui ne permet plus au fragment de migrer dans le gel d’acrylamide.

Le fragment en question se retrouve ainsi « piégé dans les mailles du filet ». Pour une même teneur en agent dénaturant, un fragment riche en GC se dénaturera moins vite qu’un fragment riche en liaisons AT (du fait du nombre de liaisons hydrogène inter brin) et migrera donc plus loin sur le gel.

D’un point de vue théorique, chaque bande visualisée sur le gel correspond à une espèce bactérienne. La DGGE permet en effet de séparer les fragments d’ADN ne se différenciant que par une seule paire de bases.

Le nombre de bandes correspond à la diversité et l’intensité de ces bandes à l’abondance relative.

Une des limites de la PCR-DGGE est la co-migration de certains fragments d’ADNr 16S. Une bande sur le profil DGGE peut ainsi correspondre non pas à une séquence d’ADNr 16S, mais à plusieurs.

Résumé des étapes :

- 1 - Récupération d'un échantillon
- 2 - Concentration de l'échantillon
- 3 - Extraction de l'ADN génomique
- 4 - Amplification la région 16 par PCR

- 5 - Traitement des produits de la PCR par les enzymes de restriction
- 6 - Électrophorèse à gradient de température (TGGE) ou gradient de concentration d'un composé chimique dénaturant (DGGE).
- 7 - Étude de l'électrophorégramme.

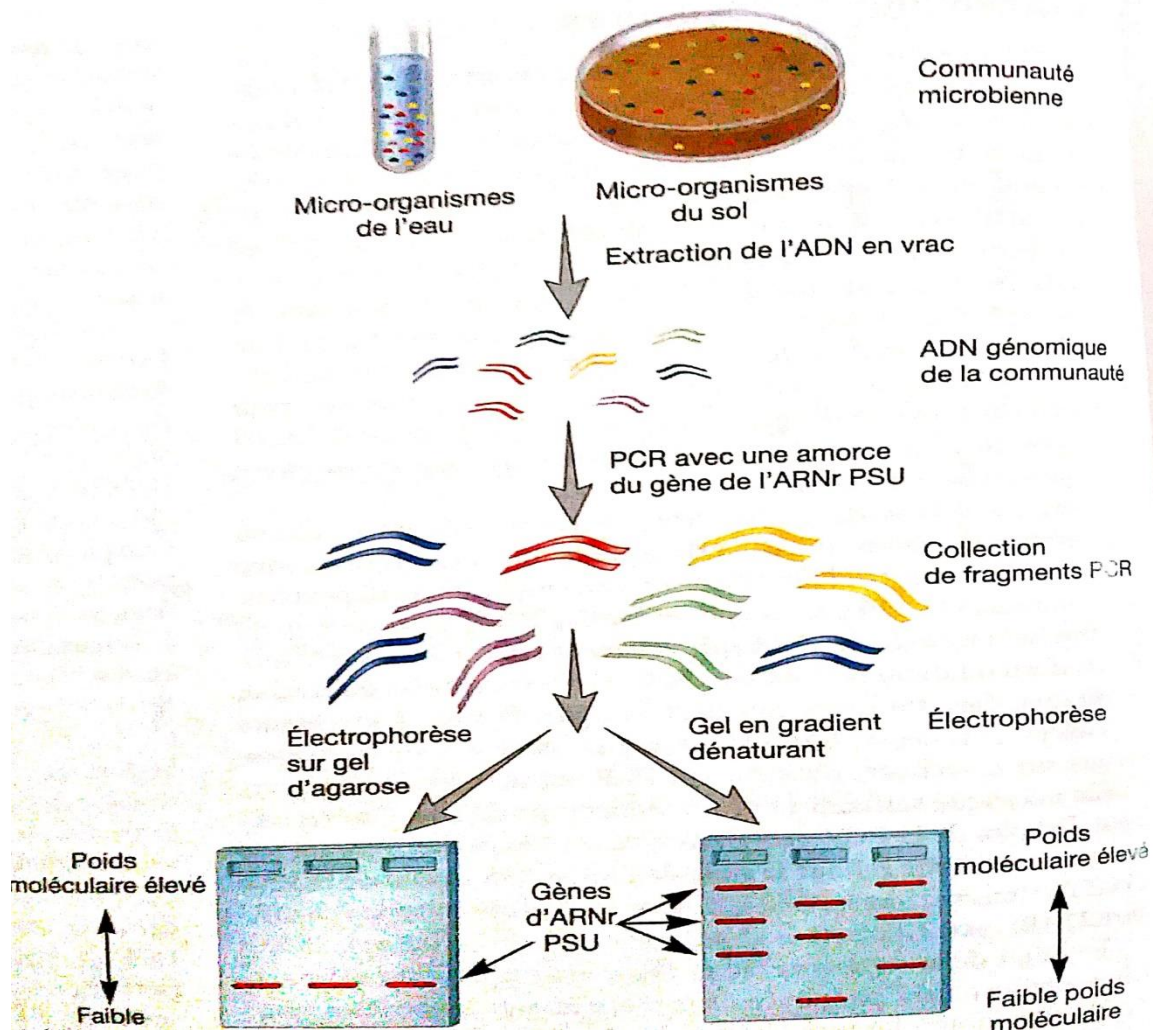


Figure 25 : électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE)/
PSU : la petite sous unité ribosomique de l'ARNr

4.2.2. Technique de la SSCP

La PCR couplé à la SSCP, le polymorphisme de conformation des simples brins ou **SSCP** (acronyme de l'anglais **single strand conformation polymorphism**) est une technique basée sur la capacité des simple brins d'ADN de pouvoir prendre, dans des conditions non dénaturantes, **différentes conformations**, selon la séquence de départ (**figure 26**). Deux brins ADN différents en structure primaire adopteront des structures spatiales différentes, ce qui se traduit en une différence de mobilité électrophorétique.

La SSCP est une méthode d'électrophorèse dont le but est de révéler ces éventuels polymorphismes, et donc de détecter d'éventuelles variations de séquence nucléotidique entre différents individus.

Après dénaturation thermique (par chauffage) des fragments ADN amplifiés, on procède à un refroidissement brusque, pour que les molécules restent monocaténaires et adoptent les conformations les plus stables pour chacune d'entre elles. Les échantillons sont chargés sur un gel de polyacrylamide non dénaturant.

La migration de l'ADN simple brin est dépendante de la conformation qu'il adopte dans la maille de polyacrylamide. Les profils de migration en gel d'acrylamide non dénaturant sont comparés en partant de l'idée **qu'une différence de migration signifie une différence de séquence**. Chaque bande de gel SSCP correspond à une séquence microbienne distincte, indiquant la présence d'une souche ou d'une espèce microbienne récupérée à partir de l'échantillon. Cette méthode a été appliquée lors de nombreuses études sur la diversité de communauté dans l'écosystème naturel (eau, sols), mais assez peu pour les produits alimentaires.

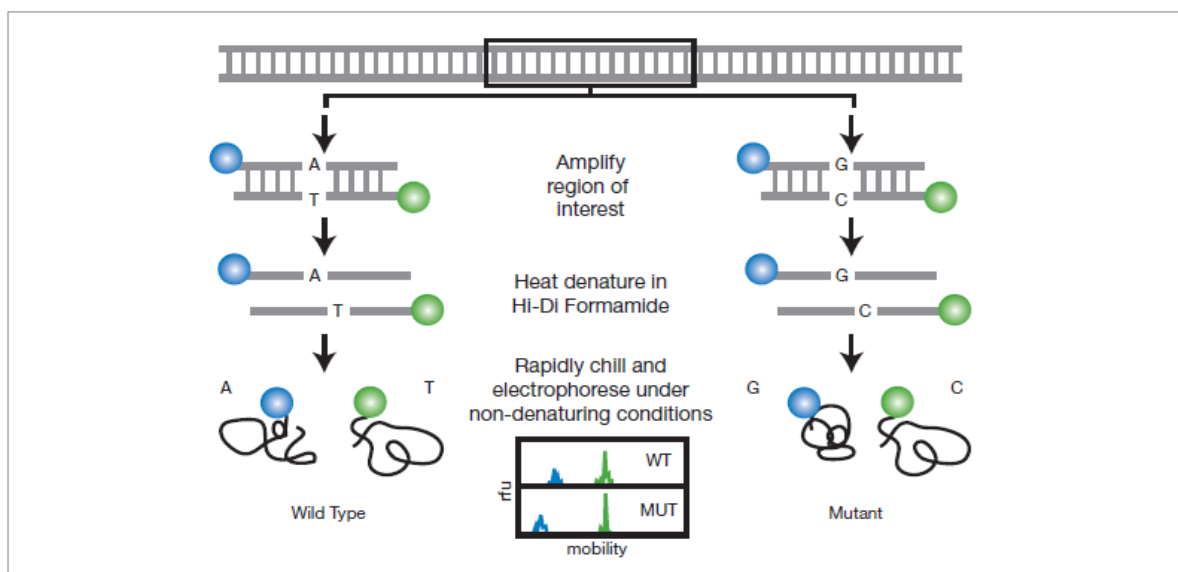


Figure 26: Analyse moléculaire par SSCP.

Résumé des étapes :

- 1 - Récupération d'un échantillon
- 2 - Concentration de l'échantillon
- 3 - Extraction de l'ADN génomique
- 4 - Amplification la région 16 par PCR
- 5 - Séparation des deux brins d'ADN (qui vont se recroqueviller)
- 6 - Électrophorèse.
- 7-Étude de l'électrophorégramme

4.2.3. Technique de la TRFLP

La T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) utilise des enzymes de restriction (**figure 27**). Les enzymes de restriction sont utilisées pour couper l'ADN uniquement au niveau des sites de restriction. Chaque enzyme de restriction reconnaît un palindrome (site de restriction) différent et va couper l'ADN au niveau de ces palindromes. Il en résulte un découpage de l'ADN en fragments, dont le nombre dépend du nombre de sites de restriction contenus dans la région et dont la taille dépend de la position des sites. Ces fragments vont ensuite être séparés par électrophorèse (le plus petit fragment migrant le plus loin).

Une étape supplémentaire, où les extrémités 5' des produits de PCR sont rendus fluorescents, est effectuée dans le but de caractériser plus facilement les fragments quand ils sont en trop grand nombre (provoquent des trainés sur l'électrophorégramme).

Résumé des étapes :

- 1 - Récupération d'un échantillon
- 2 - Concentration de l'échantillon
- 3 - Extraction de l'ADN génomique
- 4 - Amplification la région 16S par PCR
- 5 - Marquage des extrémités par fluorescence
- 6 - Traitement des produits de la PCR par les enzymes de restriction
- 7 - Électrophorèse
- 8 - Étude de l'électrophorégramme.

...

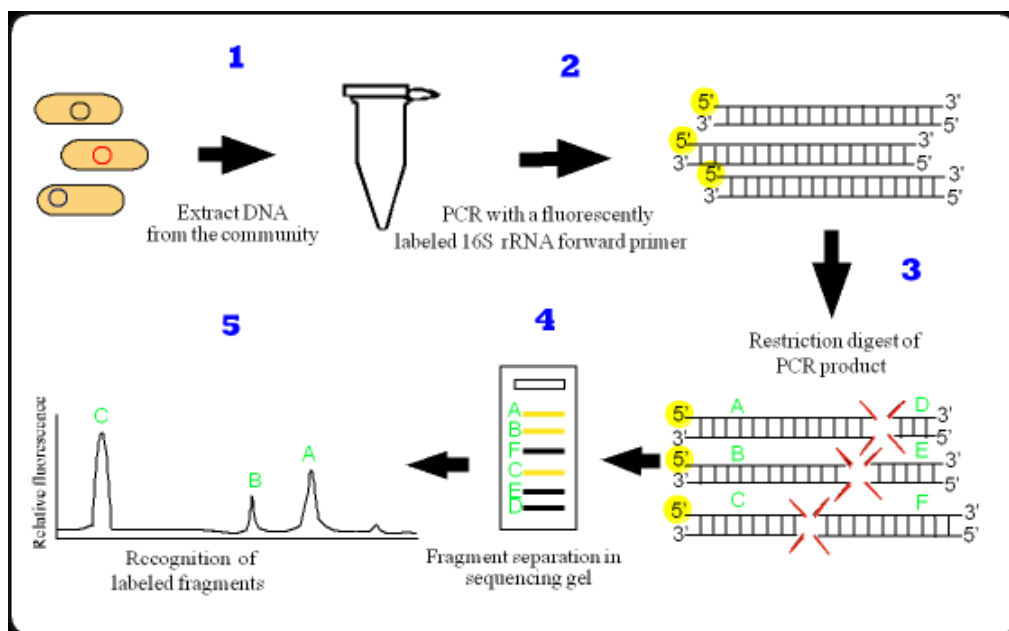


Figure 27 : les étapes de la TRFLP.

4.2.4. Les nouvelles méthodes de séquençage à haut-débit

Le séquençage, permettant de déterminer la succession des bases nucléotidiques de l'ADN, a révolutionné la recherche scientifique. En 1977, Sanger et coll. séquençaient le premier génome d'un virus bactérien (FX174) par synthèse enzymatique. Depuis lors, des améliorations techniques considérables ont permis l'émergence **de nouvelles technologies de séquençage** (NTS) dites «à haut débit» (**tableau 06**).

Le séquençage nouvelle génération (SNG) décrit plusieurs technologies qui permettent le séquençage massif et parallèle des fragments d'ADN hétérogènes. Ces fragments sont constitués de segments courts amplifiés en utilisant des amorces universelles ciblant des marqueurs de gènes connus, principalement l'ADNr16S des procaryotes et les marqueurs fongiques ITS de l'ADNr fongique. Elles diffèrent de la méthode de séquençage Sanger par, la longueur des lectures obtenues (de 30 à 400 pb selon la technologie utilisée contre 500 à plus 900 pb pour la technique de Sanger), la rapidité et surtout la quantité des données générées par réaction (entre 500 MB et 6 GB).

Le marché des séquenceurs SNG est couvert par 3 grands groupes ; Roche, Illumina et Life Technologies.

Tableau 06 : Tableau comparatif des différentes technologies de séquençage à haut débit.

	Roche		Illumina		Life Technologie		Pacific Bioscience
	454 Junior Titanium	454 GS FLX+	MiSeq	MiSeq 2000-2500	Ion Torrent PGM	5500x SOLiDI	PacBio RS
Date de lancement	2005		2006		2006		2010
Méthode de séquençage	synthèse	synthèse	synthèse	synthèse	synthèse	ligation	SMRT*
Longueur maximale des reads	400pb	700pb	300pb	150pb	400pb	2x60pb	5à 20kpb
Production par run	35 Mpb	700 Mpb	4,5 Gpb	600 Gpb	2 Gpb	95 Gpb	5 Gpb
Durée d'un run	10 heures	23 heures	27 heures	11 jours	4 heures	6 jours	2 jours

* SMRT : Single molecule real time sequencing ; pb : paire de bases.

➤ **Technique de pyroséquençage 454 de Roche ou technologie 454**

Elle est basée sur la synthèse *in vitro* de l'ADN. Cette technique permet d'identifier plusieurs milliers d'UOTs (unités taxonomiques opérationnelles) au sein d'une population microbienne complexe (**figure 28 et 29**). L'avantage de la technique 454 par rapport aux autres techniques **de séquençage à haut débit** est la taille des séquences, plus longue et mieux adaptée à l'identification des espèces et aux attentes en **écologie microbienne**.

La première étape de cette technique est l'obtention de fragments simples brins (sb) par fragmentation de l'ADN génomique à séquencer (ex : par nébulisation) ou PCR d'ADN_r 16S. **Deux adaptateurs** (de courts oligonucléotides) (A et B) sont fixés par ligation aux deux extrémités de ces fragments. Ensuite, **Des microbilles** recouvertes de sonde oligonucléotidiques complémentaires des adaptateurs sont ajoutées en excès aux fragments d'ADN préalablement dénaturées (ADN_{sb}). Les microbilles étant en excès, chaque bille fixe au maximum un seul fragment (par une de ses extrémités), certaines billes ne fixant aucun fragment.

La deuxième étape est une PCR réalisée en émulsion d'eau dans de l'huile. Le mélange est tel que chaque microgouttelette d'eau contient (en théorie) au maximum une seule microbille, certaines microgouttelettes d'eau ne contenant aucune bille. Après la réalisation de l'émulsion, la PCR se déroule classiquement à l'intérieur des microgouttelettes, recouvrant progressivement chaque microbille par des copies de la même séquence issues de l'amplification du fragment fixé dessus. Cette amplification clonale obtenue a pour objectif d'amplifier le signal lumineux du séquençage, lors de la prochaine étape.

Pour la troisième étape et dernière étape, le séquençage proprement dit des fragments amplifiés, les microbilles issues de la PCR en émulsion sont réparties sur une plaque contenant un million de micropuits. Chaque puits peut contenir au maximum une seule microbille (recouverte ou non d'ADN). La plaque est ensuite recouverte d'un milieu réactionnel permettant la synthèse des brins complémentaires des fragments d'ADN fixés aux microbilles. Le milieu réactionnel ne contient toutefois qu'un seul d'NTP à la fois. Pour une microbille donnée, il y a une élongation lorsque le dNTP est complémentaire de la première bases (ou de n première bases) de la séquence. Dans ce cas, des phosphate sont réagi avec de luciférine (réaction catalysé par une luciférase) en produisant de l'oxyluciférine et surtout un flash lumineux (**figure 28 et 29**). C'est ce flash qui est capté par une caméra CCD (charge-coupled Device).

La caméra mesure à la fois la position de chaque flash sur la plaque et l'intensité du signal (donc le nombre de nucléotides non incorporés) puis un nouveau d'NTP est ajouté au milieu réactionnel et ainsi de suite. **A l'issus du séquençage**, le résultat se présente pour chaque puits sous forme d'un pyrogramme. L'intensité du flash lumineux renseignant sur la présence éventuelle d'homopolymères, c'est-à-dire de succession de nucléotides identiques dans la séquence.

Le pyroséquençage offre un rendement beaucoup plus grand que le séquençage Sanger (jusqu'à un million de séquences par séquençage).

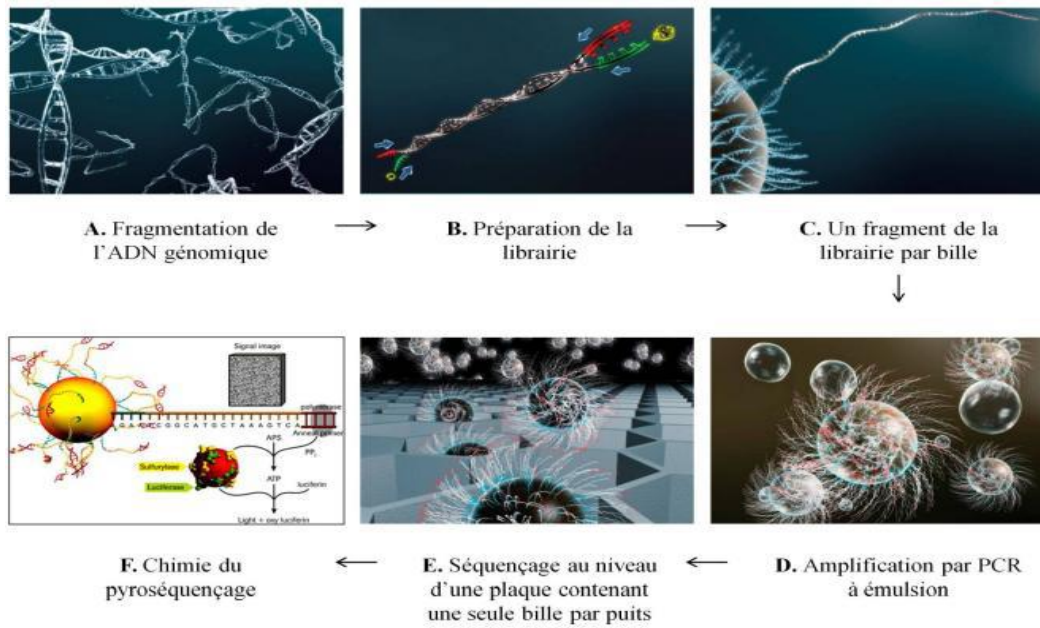


Figure 28 : Résumé des étapes de séquençage par technologie 454.

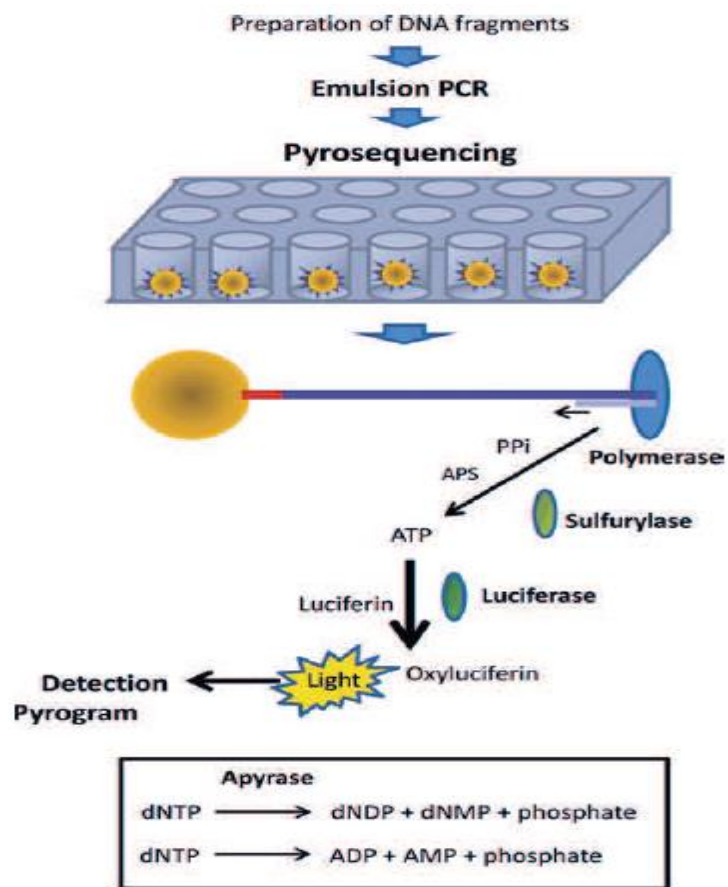


Figure 29 : Chimie du pyroséquençage 454.

5. Les limites des techniques moléculaires

A l'instar des techniques culturales, les techniques moléculaires sont elles aussi soumises à de nombreux biais qui peuvent lourdement entacher l'analyse de la diversité microbienne d'un échantillon. Ces biais peuvent intervenir à différents stades de l'analyse : lors de l'échantillonnage, de la conservation de l'échantillon, de la lyse cellulaire, de l'amplification de l'ADNr 16S, séquençage et analyse des séquences.

5.1. Echantillonnage et conservation des échantillons

En dehors de très rares milieux où la diversité microbienne est très restreinte (par exemple symbiose réduite à un micro-organisme) l'échantillon prélevé dans le milieu devra rendre compte le plus fidèlement possible de l'ensemble des espèces présentes dans l'environnement. Il est donc nécessaire de connaître les conditions physico-chimiques de chaque échantillon.

Dans la mesure où il n'est pas possible de traiter (lyse, extraction) l'échantillon dès son prélèvement, il est nécessaire de le conserver dans les conditions qui permettront de conserver l'intégrité des acides nucléiques. Il a été observé que les échantillons congelés rapidement et maintenus sous atmosphère anaérobie (nonoxydante) présentent une diversité bien plus importante que les échantillons conservés en aérobiose ou congelés plus tardivement. La congélation tardive des échantillons est source selon les auteurs d'enrichissement de certains phylotypes.

5.2. Les techniques de PCR

a. La lyse cellulaire et l'extraction des acides nucléiques

La lyse cellulaire est une étape cruciale de l'analyse de la diversité. Elle devra détruire les parois et membranes des micro-organismes en endommageant le moins possible les acides nucléiques. L'efficacité de la technique de lyse cellulaire sur un échantillon environnemental est d'autant plus difficile à déterminer que l'on ne connaît pas le type et la quantité de cellules à lyser. On sait toutefois que les techniques de lyse bactérienne doivent être modifiées pour lyser des Archaea, que les bactéries Gram + sont plus difficiles à lyser que les Gram -, que les spores et les petites cellules résistent mieux à la lyse.

b. Amplification par PCR

L'amplification est l'une des sources majeures de biais dans l'étude de la diversité. Ces biais sont introduits pour différentes raisons : inhibition de la PCR en raison de la présence de contaminants chimiques ou organiques l'état physiologique de la cellule va influencer sur la qualité de l'amplification : les ADN des cellules à l'état quiescent ou létal vont être plus difficilement amplifiables.

6. Les collections des microorganismes : rôle dans la préservation de la biodiversité microbienne

Les collections des microorganismes ce sont des autorités de dépôt international (**tableau 07**). Ce sont des unités autonomes, assurant la sauvegarde de l'intégrité et l'accessibilité contrôlée de microorganismes. La collection de cultures microbiennes fournit une source très riche de microorganismes qui présentent un intérêt industriel. Il existe près de 500 collections de cultures dans le monde. La plupart d'entre elles sont de petites collections spécialisées qui ne fournissent des services de culture ou d'autres services connexes que par des services convenus. D'autres, comme la collection nationale, publient des catalogues répertoriant les organismes détenus et fournissent des services étendus aux organisations industrielles et universitaires. **Les fonctions principales d'une collection de cultures sont de maintenir la collection existante, de continuer à collecter de nouvelles souches et de fournir des échantillons de culture pure et authentiques de chaque organisme.**

Tableau 07: Exemples de collections de cultures importantes utiles aux microbiologistes industriels.

Culture collection	Type de microorganismes
1/ American type culture collection (ATCC)	Tous les microorganismes
2/ Centraal bureau voor Schimmelcultures (Central Bureau of Fungal Cultures in English).	Moisissures et levures
3/ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) :German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).	Tous les microorganismes

Chapitre 05 : Protection des recherches et la valorisation industrielle

Introduction

Dans les domaines des sciences théoriques et expérimentales, la recherche est devenue un levier clé parmi bien d'autres sur lequel reposent l'économie et la croissance des pays développés mais aussi de ceux en voie de développement. L'ultime objectif de toute recherche scientifique est l'acquisition ou l'enrichissement de la connaissance et la recherche des solutions aux défis sociaux afin d'offrir aux générations futures des conditions de vie meilleures.

1. Qu'est-ce qu'une recherche ?

La recherche est une méthode d'acquisition de nouvelles connaissances. **La recherche scientifique** est conçue pour être le véritable moteur du développement culturel, social et économique du pays. La recherche ne peut se réaliser qu'en prenant appui sur les travaux des autres scientifiques et des étudiants ; dans la plupart des cas elle demande une collaboration étendue qui prend un caractère toujours plus international.

Le chercheur est une personne qui travaille à la conception et à la création de connaissances, de produits, de méthodes ou de systèmes nouveaux sur la base d'une programmation scientifique concourant à la résolution des problèmes. La recherche a pour but le progrès scientifique.

Au sens large, **la science** est la connaissance systématisée obtenue par l'observation et l'expérimentation, l'étude et la réflexion. Elle vise à approfondir notre compréhension et à étendre nos connaissances au-delà de ce qui est d'ores et déjà connu. Cette science progresse avec le temps et avec les travaux des scientifiques ou chercheurs.

La communication scientifique s'établit généralement entre les scientifiques ayant des intérêts communs ou appartenant à la même discipline. Elle peut se présenter sous plusieurs formes : conférence, réunion, poster.

La question n'est pas de savoir si la recherche est ceci ou cela. Les questions sont de savoir, d'une part, **si nos résultats de recherche apportent des réponses aux questions qui se posaient avant la recherche et, d'autre part, si ces réponses ont du sens dans le contexte où les questions ont été posées.** Subsiste aussi la question de savoir si la démarche, allant des questions au sens des réponses, a une valeur en termes de connaissances nouvelles. Et cela, avec quel degré de fiabilité.

Le volume des publications et le nombre de fois que ces publications sont citées sont les meilleurs indicateurs pour évaluer le niveau scientifique d'un chercheur, d'une équipe, d'une université, voire d'un pays.

2. Qu'est-ce qu'un code éthique ?

Explique les grands principes d'une pratique scientifique éthiquement justifié. Malgré la grande diversité des sujets et des méthodes de la recherche scientifique, il existe des principes généraux et des normes de comportement auxquels les chercheurs ont le devoir de se conformer.

3. Conduites responsables en recherche scientifique

Afin de maximiser la qualité et les retombées des activités de recherche ou de création, les milieux académiques ainsi que l'ensemble des personnes impliquées dans le développement des connaissances et de l'innovation favorisent et encouragent l'adoption d'une conduite responsable en recherche et en création.

3.1. Respect des lois et des principes généraux

-Le chercheur s'engage à respecter les lois, les règlements et les politiques institutionnelles adoptées par son institution d'affiliation et par l'Etat.

-La conformité des protocoles et des projets de recherches aux textes internationaux, par exemple : protection des personnes, des animaux et des écosystèmes (déclaration des essais cliniques).

-Le chercheur est censé respecter les systèmes et les normes particuliers définis par les institutions nationales et internationales dans ce domaine. Il faut prendre toutes les précautions pour éviter les effets négatifs de son travail de recherche. Eviter les travaux susceptibles de nuire à l'humanité (en protégeant la santé humaine) et à l'environnement. Egalement, les travaux de recherches doivent se faire dans le respect des normes de protection des animaux.

3.2. Respect des conventions et des principes éthiques

Le respect des normes de fonctionnement de la pratique scientifique constitue un gage de la qualité de la recherche effectuée. A plusieurs pays, les chercheurs doivent obtenir un certificat d'un comité d'éthique de la recherche avant de pouvoir commencer tout projet impliquant des êtres humains. Parmi les principes éthiques on peut citer :

a) Exécutant un projet dans le respect des normes de compétences, l'objectivité, d'ouverture d'esprit et d'honnêteté. Les activités de recherche respectent intégralement les dispositions de la Politique d'éthique de la recherche.

b) L'exposition des résultats d'une manière transparente, juste, véridique et diligente. Le chercheur doit expliquer toutes les techniques les moyens utilisés avec une conclusion.

c) Le chercheur s'engage à éviter l'utilisation des travaux publiés ou non publiés d'une autre personne, notamment les théories, les concepts, les données, les documents originaux, les méthodes et les résultats, y compris les graphiques et les images,

d) Le chercheur veille à ne pas amplifier les résultats.

e) Le chercheur veille à ne pas republier, dans la même langue ou dans une autre langue, de ses travaux, d'une partie de ses travaux ou de ses données qui ont déjà été publiés sans mention adéquate de la source ou sans justification.

f) Une communication transparente lors de la discussion des travaux avec d'autres scientifiques.

3.3. Violation du code éthique

La violation des politiques et exigences applicables à certains recherches est le fait de ne pas se conformer aux réglementations. Les conduites irresponsables en recherche scientifique portent atteinte à la crédibilité des chercheurs et à leurs institutions et entraînent le plus souvent la perte de confiance de la population dans l'utilité de la recherche scientifique.

Parmi les inconduites les plus marquantes il y a notamment :

- Les chercheurs n'ont pas respecté les ententes de confidentialités, les permis ou les attestations appropriés avant d'entreprendre leurs activités.
- Inventer des données, des méthodes ou des résultats comme s'ils étaient réels.
- Falsifier des données : c'est transformer d'une manière ou d'une autre les données obtenues lors d'un processus d'expérimentation, la contrefaçon, la manipulation du protocole de la recherche, la modification des résultats du travail.
- L'utilisation des travaux publiés ou non publiés d'une autre personne pour une utilisation à son propre profil sans citer leurs noms dans leur réalisation.
- Le manquement aux principes de la propriété et aux droits d'auteurs dans les publications scientifiques.
- Le défaut de gérer adéquatement tout conflit d'intérêt réel, potentiel.

3.4. Traitement et publication des résultats de la recherche

La communication scientifique et la recherche sont étroitement liées entre elles voire même complémentaires. Mais il ne suffit pas que le scientifique communique ses résultats de recherche aux autres chercheurs sous une forme ou une autre (communication orale dans un séminaire ou congrès par exemple), il doit publier ces résultats **car "sans publication la science est morte.**

Le chercheur utilise les informations recueillies dans le cadre d'une recherche à des fins scientifiques. Le chercheur doit, chaque fois que cela est possible et pertinent, informer le public sur les connaissances acquises, la démarche suivie pour les obtenir, leur fiabilité. le laboratoire met à la disposition du chercheur et pour chaque projet de recherche un "registre quotidien" particulier. Ce registre, non modifiable ou falsifiable, assure la traçabilité pour atteindre les résultats.

Dans la mesure du possible, le chercheur communique ou publie rapidement ses résultats pour en établir la propriété intellectuelle et/ou les rendre accessibles à d'autres chercheurs. Il est vivement conseillé de publier des résultats des travaux de recherches dans un seul journal.

4. Valorisation des résultats de la recherche

4.1. Qu'est-ce que la valorisation de la recherche?

La valorisation de la recherche peut se définir comme l'ensemble des actions et activités permettant : d'une part, de mettre à la disposition de la sphère économique et sociale, les inventions, techniques, technologies, savoirs et savoir-faire issus de la recherche publique; et d'autre part, de faire de l'innovation sociale, c'est-à-dire transformer une notion afin qu'elle soit acceptée et utilisée par un autre milieu que l'université, et ainsi contribuer au progrès social.

La valorisation de recherche consiste à augmenter la valeur des résultats. Valoriser la recherche signifie « rendre utilisables ou commercialiser les résultats, les connaissances et les compétences de la recherche »

La valorisation ne se résume pas uniquement à l'exploitation commerciale des résultats de la recherche : elle s'appuie également sur le déploiement et l'échange des connaissances dans tous les domaines du savoir.

Les résultats d'un projet de recherche, la propriété intellectuelle et leurs applications commerciales, sont la propriété commune des signataires de l'accord de collaboration sans exception et en fonction de leur contribution individuelle relative définie par l'accord initialement signé. Chaque membre de l'équipe a le droit à la reconnaissance publique de sa contribution à la découverte scientifique.

4.2. Les acteurs de la valorisation

➤ Mission du chercheur

- Participer au développement des connaissances.
- Les mettre à disposition des acteurs sociaux et économiques pour leur application (transfert).

➤ Mission de la structure de valorisation

Aider à organiser le transfert et la valorisation des résultats de la recherche, en s'appuyant sur toute la palette des instruments de valorisation répondant à des besoins différents.

➤ Les partenaires

Contribuent à la recherche, à son financement, son développement, à la mise sur le marché et à l'exploitation socio-économique des résultats de ces recherches ainsi qu'à sa diffusion et son appropriation par la société civile.

De la recherche fondamentale

-En collaboration avec les laboratoires, centres de recherche, universités, écoles...

A la recherche opérationnelle, appliquée

-En partenariat avec les entreprises, producteurs, organisations professionnelles et autres agences (eaux et forêts...).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

➤ Livres

- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., 2002. Microbiology, 5th ed. McGraw-Hill.
- Primrose S.B., Twyman R.M., Old R.W., 2004. Principe de génie génétique, 6th ed.
- Guiraud J.P., Rosec J.P., 2008. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Snel Grafics.
- Paul S., 2005. Bactériologie. 6th ed.
- Yves D., Paul N., 2003. Les microorganismes du gène à la biosphère.
- Girard T., Berdell R., Funk christine L. C., 2003. Introduction à la microbiologie. ADISSONWESLY LOGMAN.
- Bousseboua H., 2004. Cours de la microbiologie générale. Edition université Mentouri Constantine.

Articles scientifiques

- Mishra, V.K., Kumar, N., 2017. Microbial degradation of phenol: a review. Journal of Water Pollution & Purification Research, 4 : 17–22.
- Luo, H., Liu, G., Zhang, R., Jin, S., 2009. Phenol degradation in microbial fuel cells. Chem. Eng. J., 147, 259–264. doi:10.1016/j.cej.2008.07.011.
- Wilson I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microbiol., 63:3741-3751.
- Silva, M.C. and C.A. Batt. 1995. Effect of cellular physiology on PCR amplification efficiency. Mol. Ecol., 4:11-16.
- Rainey, F.A., N. Ward, L.I. Sly and E. Stackebrandt. 1994. Dependence on the taxon composition of clone libraries for PCR amplified, naturally occurring 16S rDNA, on the primer pair and the cloning system used. Experientia, 50:796-797.
- Pitulle, C. et N.R. Pace. 1999. T-cloning vector for plasmid based 16S rDNA analysis. Biotechniques, 26:222-224.
- Abdelraouf, A.A., Elhoumaïdan, IBM., Ibrahim. 2012. Microalgues and wastewater treatment. Saudi journal of biological sciences., 19 :257-275.
- Mouin, H., Nayef, S., Fawaz, F. 2016. Charte des principes éthiques en matière de recherche scientifique au Liban.
- Agnieszka, S., Katarzyna, K., Tadeusz, L., Stanisaw, L. 2013. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. Pharmacological Reports, 65 :1075–1085 ISSN1734-1140.