

CHAPITRE 2

Culture, sélection et exploitation des microorganismes d'intérêt biotechnologique

Introduction — Pourquoi parler de « culture » en biotechnologie microbienne ?

En microbiologie classique, cultiver un microorganisme signifie essentiellement le faire se multiplier dans des conditions compatibles avec sa survie et son développement. En biotechnologie microbienne, la culture prend une dimension plus large : il faut d'abord trouver un microorganisme possédant une fonction intéressante, démontrer que cette fonction est utile, conserver la souche, éventuellement améliorer ses performances, puis l'intégrer dans un procédé permettant d'obtenir un produit ou un service biologique.

La difficulté vient de l'immense diversité microbienne. Une même espèce peut regrouper des souches très différentes par leur métabolisme, leur tolérance aux contraintes, leur capacité de production ou leur interaction avec l'environnement. La démarche biotechnologique ne consiste donc pas simplement à « trouver une bactérie », mais à construire progressivement un candidat fiable à partir d'une diversité biologique.

Idée essentielle — Une souche intéressante n'est pas seulement une souche qui possède une activité. C'est une souche dont l'activité est démontrée, stable, exploitable et compatible avec l'application visée.

1. De la diversité microbienne à la souche d'intérêt

Le premier raisonnement consiste à partir d'une fonction ou d'un besoin : produire une enzyme, synthétiser un métabolite, tolérer un stress, dégrader un composé, inhiber un microorganisme indésirable ou fournir une propriété technologique. On recherche ensuite des microorganismes susceptibles de posséder ce caractère.

Cette démarche est importante car l'appartenance à une espèce ne permet pas de prédire complètement les performances d'une souche. Deux souches proches peuvent différer par des gènes accessoires, des voies métaboliques, leur régulation ou leur capacité à exprimer un caractère dans une condition donnée.

La souche devient ainsi l'unité pratique de travail. Elle doit être individualisée, identifiée, conservée et associée à un ensemble d'informations : origine, conditions d'isolement, identité, caractéristiques phénotypiques, résultats des tests et historique des manipulations.

Niveau	Question	Exemple
Espèce	À quel groupe taxonomique appartient le microorganisme ?	Bacillus subtilis
Souche	Quelle lignée particulière a été isolée ou conservée ?	B. subtilis souche X
Souche d'intérêt	Quel caractère mesurable la rend utile ?	Production élevée d'une enzyme

2. Bioprospection : choisir intelligemment la source

La bioprospection consiste à rechercher dans la diversité biologique des organismes ou des fonctions présentant un intérêt potentiel. Une stratégie efficace ne consiste pas nécessairement à prélever au hasard. Elle utilise les caractéristiques de l'environnement comme indice pour augmenter la probabilité de trouver le phénotype recherché. Par exemple, un environnement hypersalin est une source logique pour rechercher des microorganismes tolérant de fortes concentrations en sel. Un site contaminé par un polluant peut enrichir des populations capables de transformer ce composé. La rhizosphère, les environnements extrêmes, les aliments fermentés, les sols ou les milieux aquatiques peuvent également constituer des réservoirs adaptés à des objectifs différents. Le principe est probabiliste : le milieu source augmente la probabilité de trouver une fonction, mais ne garantit pas sa présence. La bioprospection doit donc être associée à une stratégie d'enrichissement et de screening.

Attention — La bioprospection ne consiste pas uniquement à chercher « le microorganisme ». On peut aussi rechercher un gène, une voie métabolique ou une activité, y compris lorsque l'organisme responsable n'est pas facilement cultivable.

3. Enrichissement et isolement : faire apparaître la diversité recherchée

Après le prélèvement, l'échantillon contient généralement une communauté complexe. La fonction recherchée peut être portée par une fraction minoritaire. L'enrichissement consiste à créer des conditions qui favorisent cette fraction : substrat particulier, contrainte physicochimique, source nutritive spécifique ou interaction biologique. L'enrichissement est donc une forme de sélection expérimentale. Il ne permet pas nécessairement de récupérer toute la diversité présente dans l'échantillon ; il favorise surtout les microorganismes capables de se développer dans les conditions choisies. L'isolement transforme ensuite cette diversité enrichie en cultures individualisées. Les colonies ou cultures obtenues constituent une bibliothèque de candidats qui pourront être comparés.

Point méthodologique — Le choix du milieu d'enrichissement influence fortement le résultat final. Un microorganisme peut être présent dans l'échantillon mais ne pas apparaître dans la collection si les conditions utilisées ne permettent pas sa croissance.

4. Identification et validation des isolats

Après l'isolement, chaque candidat doit être correctement caractérisé. La première étape est la vérification de la pureté de la culture, car une culture mixte peut conduire à attribuer une activité à un microorganisme qui n'en est pas responsable. L'identification peut ensuite utiliser des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques, puis des méthodes moléculaires ou génomiques selon le niveau de précision recherché. Le séquençage d'un marqueur taxonomique peut être suffisant dans certaines situations, tandis qu'une analyse génomique plus complète peut être nécessaire pour distinguer des souches proches ou rechercher un potentiel métabolique.

5. Screening : transformer une collection d'isolats en candidats

5.1. Screening primaire

Le screening primaire privilégie la rapidité et la capacité à traiter de nombreux candidats. Il repose sur un signal simple : halo d'hydrolyse, zone d'inhibition, changement de couleur, fluorescence, croissance sur un substrat donné ou autre indicateur facilement mesurable. Son objectif principal est de distinguer rapidement les positifs des négatifs.

5.2. Screening secondaire

Le screening secondaire intervient lorsque le nombre de candidats a diminué. Les mesures deviennent plus précises et souvent quantitatives. On peut déterminer une activité enzymatique, une concentration de métabolite, une capacité d'inhibition, une tolérance ou une productivité dans des conditions mieux contrôlées. Un signal très fort lors du screening primaire ne signifie pas nécessairement que la souche est la meilleure pour l'application finale. Le test primaire sert à sélectionner des candidats ; le test secondaire sert à comparer leur performance.

5.3. Critères de sélection d'une souche d'intérêt

Une activité élevée ne suffit pas à faire d'un microorganisme une bonne souche biotechnologique. La sélection finale prend en compte plusieurs critères : niveau de production, productivité, stabilité du caractère, capacité de croissance dans des conditions compatibles avec le procédé, facilité de culture et coût du milieu. Selon l'application, la sécurité biologique, l'absence de produits indésirables, la robustesse et la possibilité de mise à l'échelle deviennent également déterminantes.

La sélection finale recherche donc un compromis entre performance biologique, faisabilité technique, stabilité et intérêt économique.

5.4. Screening à haut débit (HTS)

Lorsque le nombre de candidats ou de variants devient très important, les essais individuels deviennent limitants. Le high-throughput screening (HTS) associe miniaturisation, microplaques,

automatisation et méthodes de détection rapides pour tester des centaines ou des milliers de candidats. Chaque variant peut être évalué selon un critère défini : croissance, fluorescence, activité enzymatique, production d'un métabolite ou résistance à une condition donnée.

Le HTS ne remplace pas le raisonnement expérimental. Il augmente le nombre de candidats pouvant être testés, mais la qualité du résultat dépend du choix du test, de sa sensibilité, de sa reproductibilité et de la relation entre le signal mesuré et la performance réellement recherchée.

6. Conservation : une souche intéressante doit rester la même

La conservation n'est pas une simple opération de stockage. Elle doit préserver l'identité, la pureté et les propriétés d'intérêt de la souche. Les passages répétés peuvent favoriser des changements génétiques ou physiologiques, une sélection de sous-populations ou la perte d'éléments génétiques responsables d'un caractère. Une stratégie classique consiste à distinguer une banque de référence, peu manipulée, et des stocks de travail utilisés pour les expériences courantes. Cette organisation limite le nombre de repiquages de la souche de référence.

Chaque souche doit être associée à une traçabilité minimale : origine, date d'isolement, identification, caractéristiques, conditions de conservation, numéro de passage et résultats importants.

7. Stabilité génétique et phénotypique : identité $\neq$ performance

Une souche peut conserver son identité taxonomique tout en perdant une propriété biotechnologique. Par exemple, une activité enzymatique élevée observée lors de l'isolement peut diminuer après plusieurs passages. L'identification reste correcte, mais la performance n'est plus la même. La stabilité doit donc être évaluée par comparaison avec une référence. Selon le caractère étudié, on peut suivre la pureté, un marqueur génétique, l'activité biologique, la productivité ou plusieurs paramètres simultanément. Cette distinction est essentielle en biotechnologie : la stabilité d'une souche ne signifie pas seulement qu'elle reste « la même espèce », mais qu'elle conserve le phénotype utile dans des conditions comparables.

8. Caractérisation moderne : comprendre pourquoi la souche est intéressante

Après la sélection, l'objectif n'est plus seulement de donner un nom à la souche. Il faut comprendre son potentiel et, si possible, les mécanismes associés à son phénotype. Deux souches peuvent présenter une activité similaire par des mécanismes différents ; inversement, une souche peut posséder un potentiel génétique qui n'est pas exprimé dans les conditions utilisées.

Niveau	Ce qu'il apporte	Question
Phénotype	Mesure directe de la fonction	La souche solubilise-t-elle le phosphate ?

Génome	Potentiel génétique	Quels gènes ou voies pourraient expliquer la fonction ?
Transcriptome	Expression des gènes	Quels gènes sont activés dans la condition étudiée ?
Protéome	Protéines effectivement produites	Quelles protéines sont présentes ?
Métabolome	Conséquences biochimiques	Quels métabolites sont associés au phénotype ?

Ces niveaux sont complémentaires. Le génome indique ce que la cellule peut potentiellement faire ; le transcriptome renseigne sur les gènes exprimés ; le protéome décrit les protéines produites ; le métabolome reflète une partie des conséquences biochimiques ; le phénotype correspond à ce qui est effectivement observable dans la condition expérimentale.

Point important — La présence d'un gène ne prouve pas que la fonction correspondante est exprimée. À l'inverse, l'absence d'un signal expérimental dans une condition ne signifie pas nécessairement que le potentiel génétique n'existe pas.

9. Pourquoi améliorer une souche ?

La souche sauvage ou nouvellement isolée peut présenter une propriété intéressante mais insuffisante pour l'application envisagée. Elle peut croître lentement, produire peu, accumuler un sous-produit, être sensible aux conditions du procédé ou détourner une partie de son métabolisme vers des voies concurrentes.

L'amélioration d'une souche cherche donc à augmenter une propriété utile ou à supprimer une limitation. Les stratégies peuvent être classiques ou fondées sur l'ingénierie génétique et métabolique.

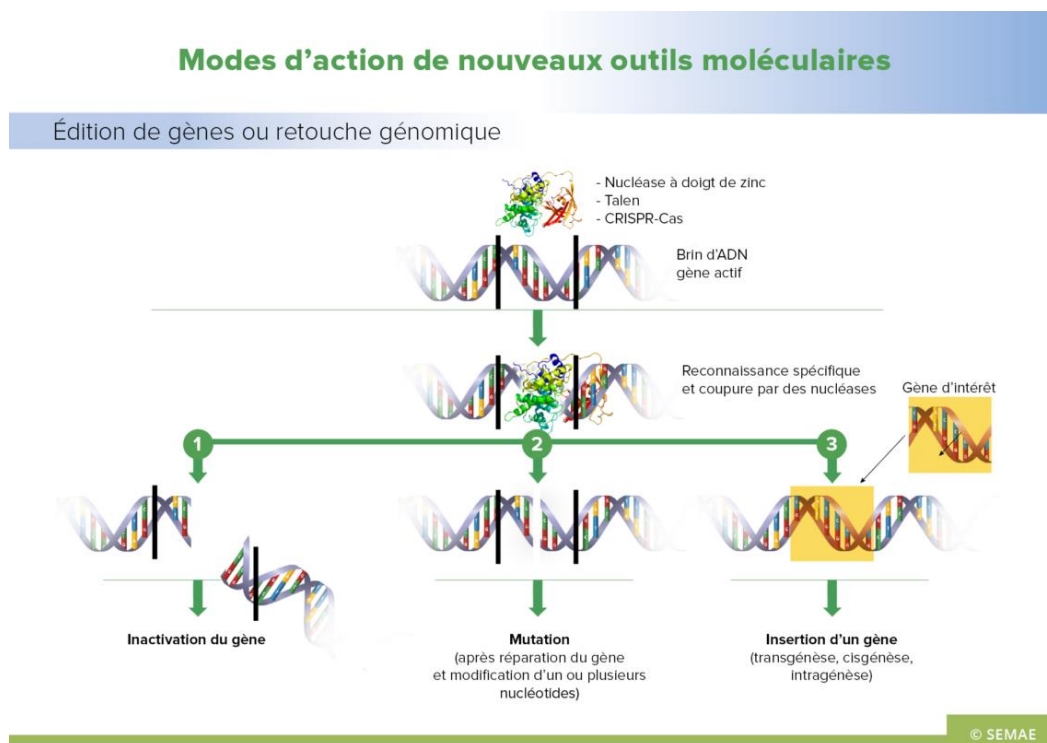
Limitation	Objectif d'amélioration
Faible production	Augmenter le flux vers le produit
Croissance insuffisante	Améliorer l'adaptation aux conditions de culture
Sous-produits importants	Réduire les voies métaboliques concurrentes
Produit toxique pour la cellule	Augmenter la tolérance
Voie métabolique mal exprimée	Modifier l'expression de gènes ou de promoteurs
Production instable	Renforcer la stabilité génétique ou la régulation

10. Outils modernes d'ingénierie des souches

L'ingénierie des souches permet de passer d'une logique de sélection à une logique de conception. L'objectif n'est plus seulement de trouver dans la nature une cellule possédant spontanément la propriété recherchée, mais de modifier ou d'assembler des fonctions pour obtenir un phénotype souhaité.

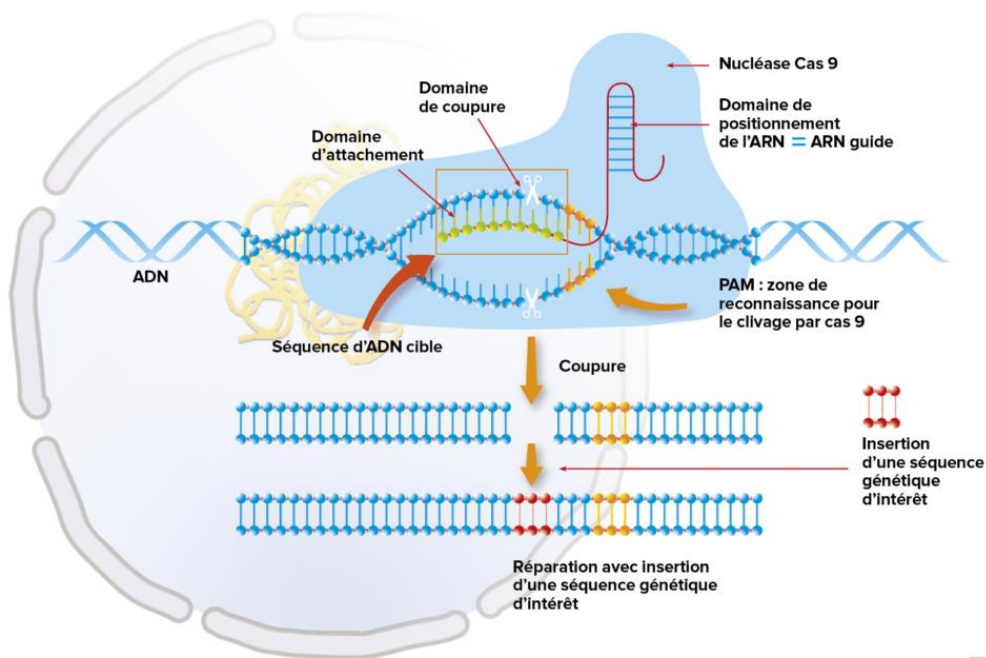
CRISPR-Cas et dérivés

Le système CRISPR-Cas9 utilise un ARN guide pour diriger Cas9 vers une séquence d'ADN complémentaire. La coupure de l'ADN peut être exploitée avec un mécanisme de réparation approprié pour introduire une modification ciblée. Dans de nombreux systèmes microbiens, l'édition est combinée à une stratégie de sélection ou de contre-sélection afin de récupérer efficacement les cellules portant la modification recherchée.



Outil	Principe général	Intérêt
CRISPR-Cas9	Coupure ciblée de l'ADN suivie d'une réparation	Modification précise d'un locus
CRISPRi / CRISPRa	dCas9 bloque ou favorise l'expression sans couper l'ADN	Diminuer ou augmenter un flux métabolique
Base editing	Modification ciblée d'une base sans cassure double brin classique	Introduire certaines mutations ponctuelles
Prime editing	Réécriture ciblée d'une séquence à l'aide d'un guide spécialisé	Modifications précises dans certains systèmes
Cas12a	Système CRISPR distinct, adapté notamment au multiplexage	Modifier plusieurs cibles
Systèmes CRISPR associés à des transposases	Insertion ciblée de fragments d'ADN dans certains systèmes	Introduire de grandes constructions ou voies

Retouche génomique par le système CRISPR - Cas 9



© SEMAE

11. Exemples d'exploitation de microorganismes ingénierés

Produit ou application	Hôte / système	Idée à retenir
------------------------	----------------	----------------

Cannabinoïdes ou précurseurs	Saccharomyces cerevisiae	Reconstituer des voies biosynthétiques complexes dans une levure
Précurseurs d'alcaloïdes végétaux	S. cerevisiae	Combiner de nombreuses modifications et compartimenter certaines étapes
2'-fucosyllactose	Microorganismes ingénierés	Produire des oligosaccharides complexes par fermentation de précision
Protéines laitières recombinantes	Levures ou autres hôtes	Produire une protéine sans utiliser directement l'animal comme source
Éthanol à partir de gaz	Clostridium autoethanogenum et espèces apparentées	Valoriser CO/CO ₂ comme matières premières
Composés aromatiques	Pseudomonas putida et autres châssis	Transformer des substrats complexes en molécules à valeur ajoutée
Métabolites secondaires	Streptomyces	Activer des voies biosynthétiques silencieuses

Ces exemples montrent que l'exploitation biotechnologique ne repose pas sur une seule technologie. Elle associe le choix du châssis, l'ingénierie génétique, la régulation, les conditions de culture et les méthodes analytiques.

12. Cas intégré : réveiller un cluster de gènes biosynthétiques silencieux

Un microorganisme peut contenir dans son génome un cluster de gènes biosynthétiques (biosynthetic gene cluster, BGC) susceptible de produire un métabolite intéressant alors qu'aucun composé correspondant n'est détecté dans les conditions de culture habituelles. L'absence de produit ne signifie donc pas nécessairement l'absence de potentiel. Une stratégie consiste à identifier le BGC par analyse génomique, à rechercher les éléments régulateurs susceptibles de limiter son expression, puis à modifier cette régulation. Par exemple, un promoteur naturel peut être remplacé ou renforcé afin d'augmenter l'expression de la voie. Les extraits de la souche parentale et de la souche modifiée peuvent ensuite être comparés par une méthode analytique telle que la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse. L'apparition d'un nouveau signal dans la souche modifiée, associé à des données complémentaires, peut soutenir l'hypothèse selon laquelle le BGC était fonctionnel mais silencieux dans les conditions initiales.

13. Sécurité et contraintes d'utilisation

Avant l'exploitation, le microorganisme doit également être évalué selon l'application envisagée. La présence éventuelle de facteurs de virulence, de toxines, de résistances préoccupantes ou de métabolites indésirables peut limiter son utilisation. Les exigences de sécurité et de réglementation

dépendent du domaine : alimentaire, pharmaceutique, environnemental, industriel ou recherche. Une propriété biotechnologique intéressante ne suffit pas : la souche doit aussi être acceptable pour l'usage prévu.