

Journées Recherche et Industrie biogaz méthanisation

16-17-18 octobre 2013

Palais des Archevêques de Narbonne

Transformation de la lignocellulose par des consortia microbiens

Guillermina Hernandez-Raquet
hernandg@insa-toulouse.fr

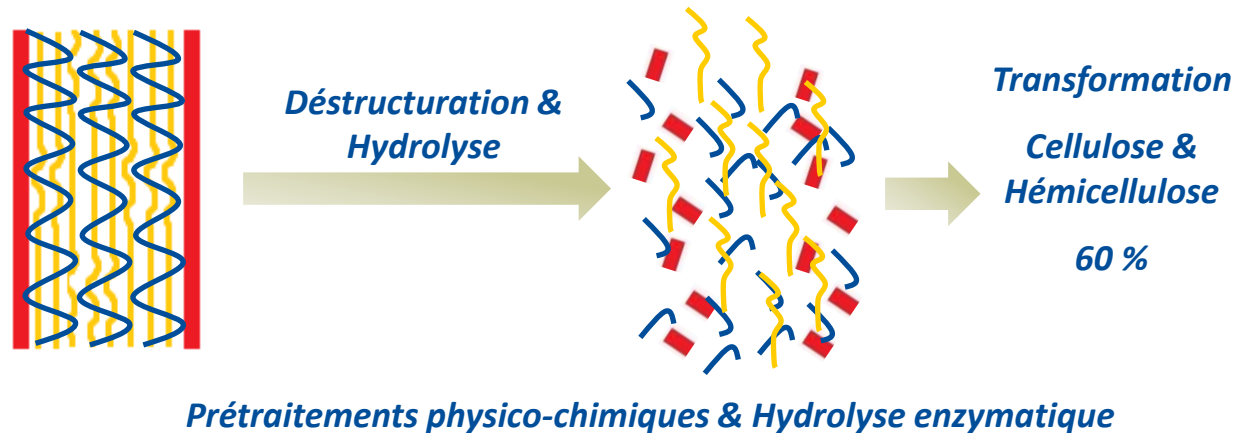
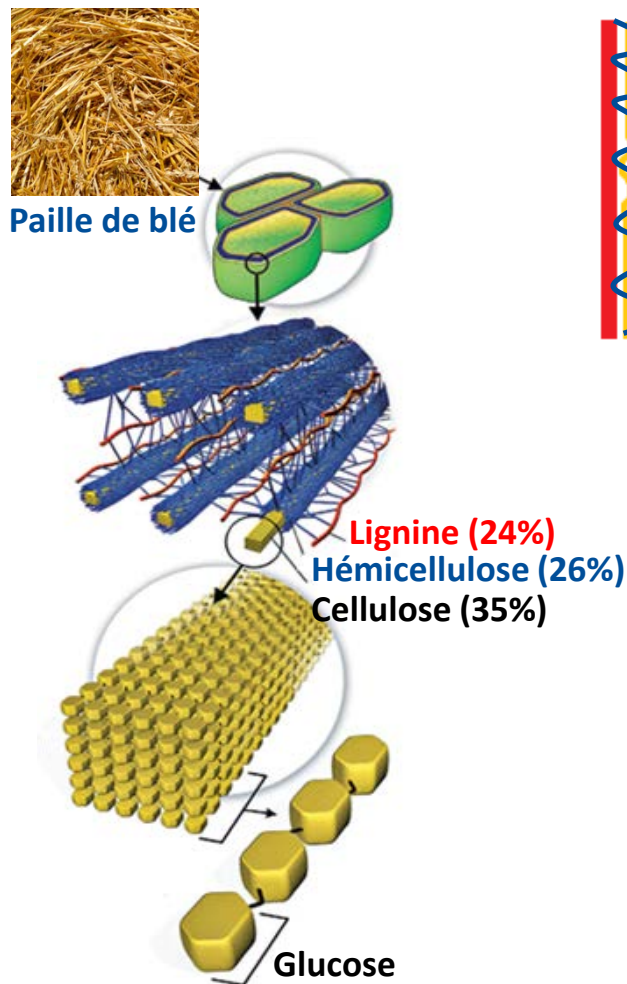


LABORATOIRE D'INGÉNIERIE
DES SYSTÈMES BIOLOGIQUES
ET DES PROCÉDÉS



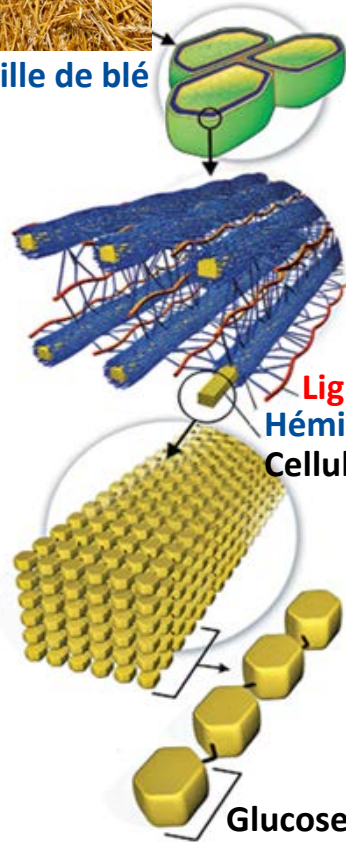
INRA



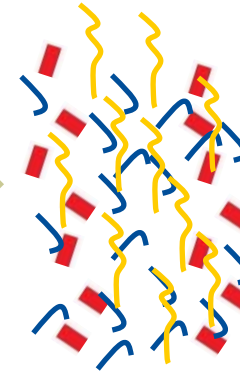




Paille de blé



Déstructuration & Hydrolyse



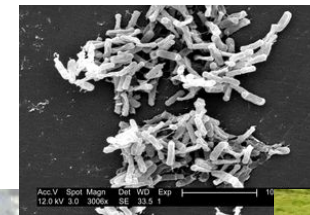
Transformation

Cellulose & Hémicellulose

60 %

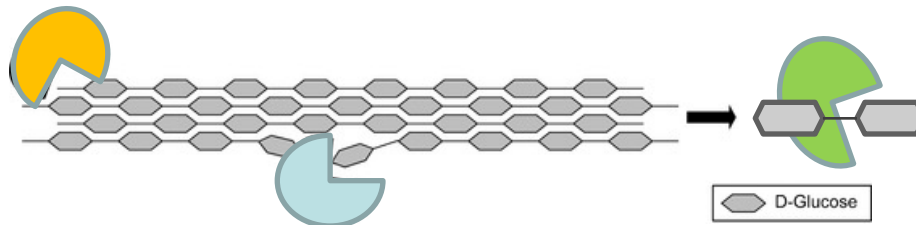


Prétraitements physico-chimiques & Hydrolyse enzymatique



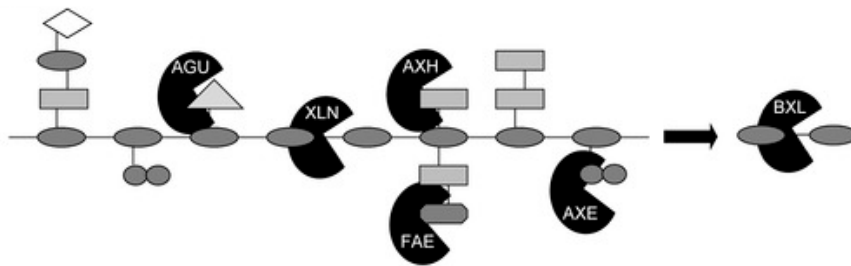
Alternative :

Consortium lignocellulolytique sélectionné

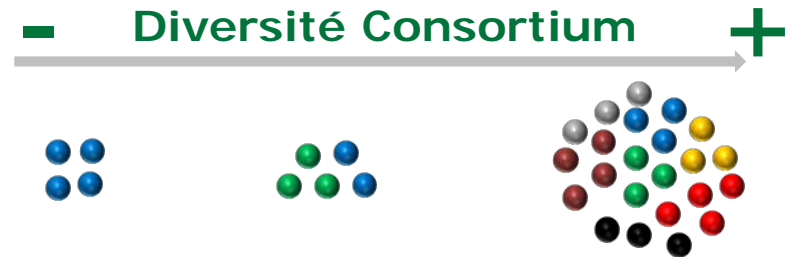
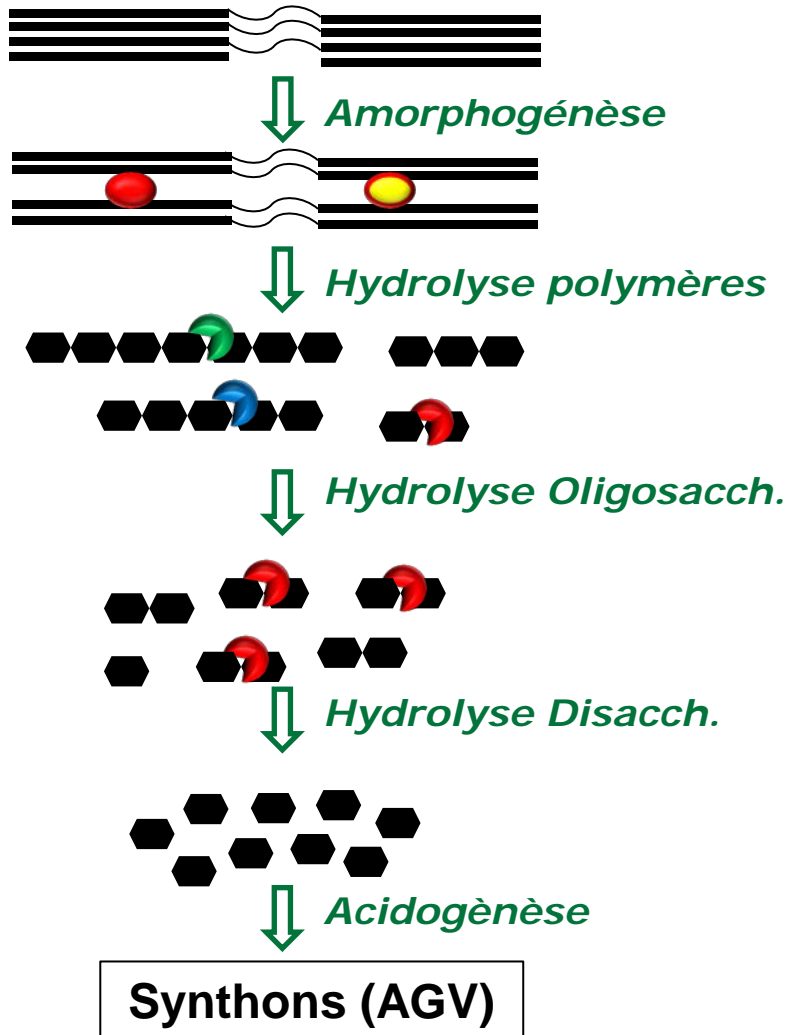


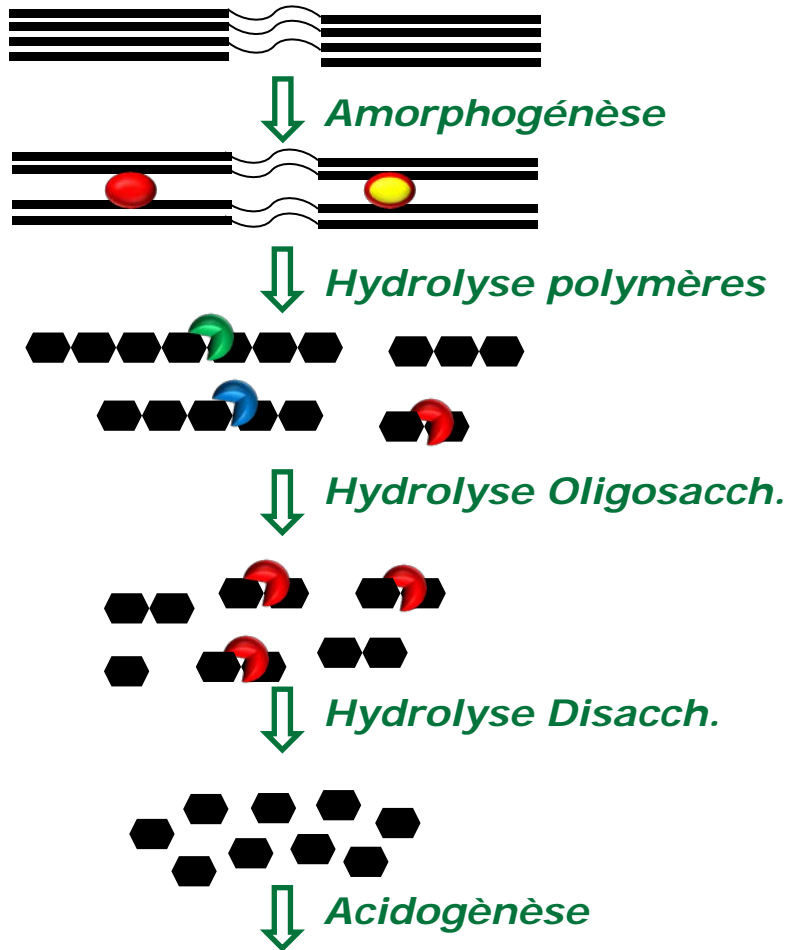
 D-Glucose

Hémicellulose



ABF α -arabinofuranosidase
 AGL α -1,4-galactosidase
 AGU α -glucuronidase
 AXH arabinoxylan
 AXL α -xylosidase
 BXL β -1,4-xylosidase
 LAC β -1,4-galactosidase
 MAN β -1,4-endomannanase
 MND β -1,4-mannosidase
 XEG xyloglucan-active
 β -1,4-endoglucanase
 XLN β -1,4-endoxylanase
 ...



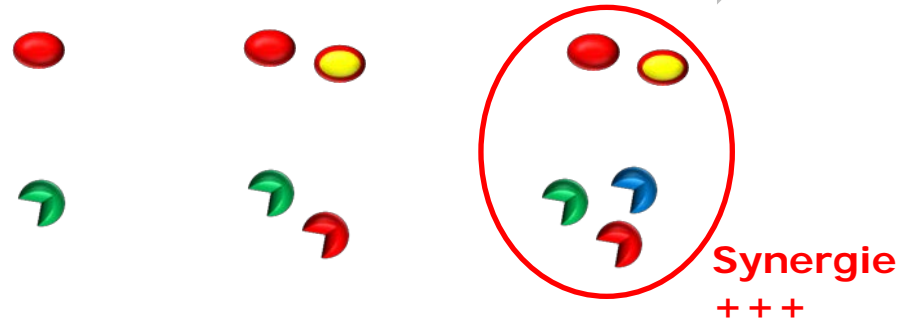


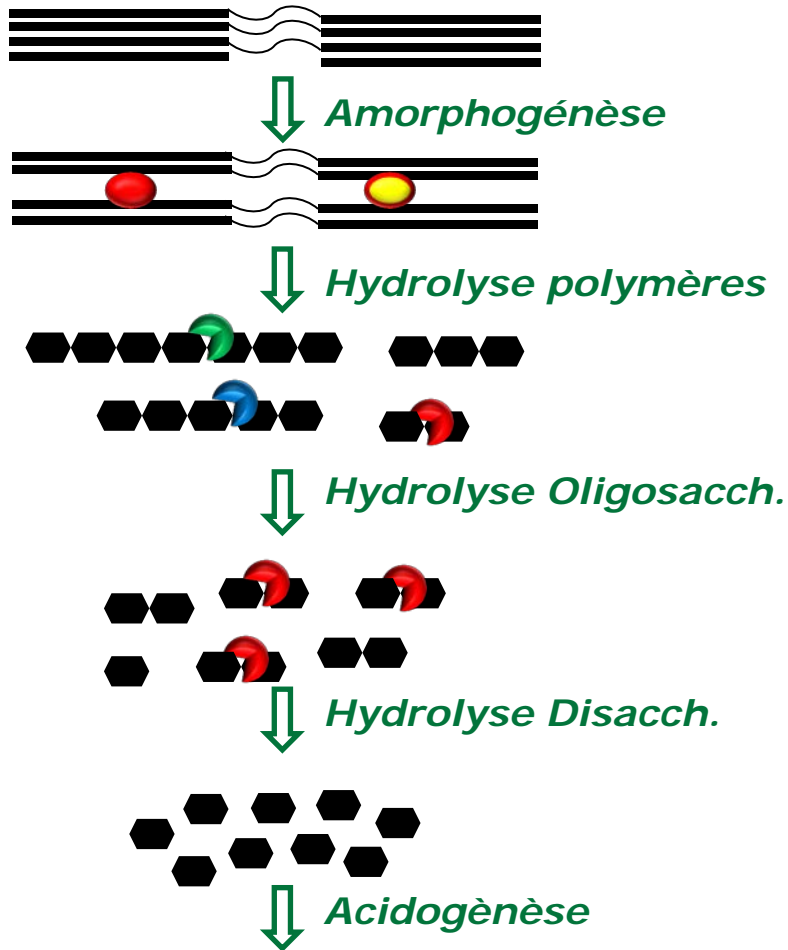
Synths (AGV)

Diversité Consortium



Diversité Fonctionnelle



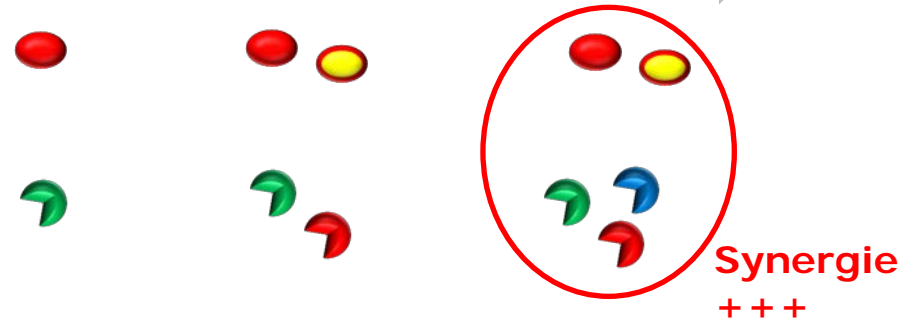


Synthons (AGV)

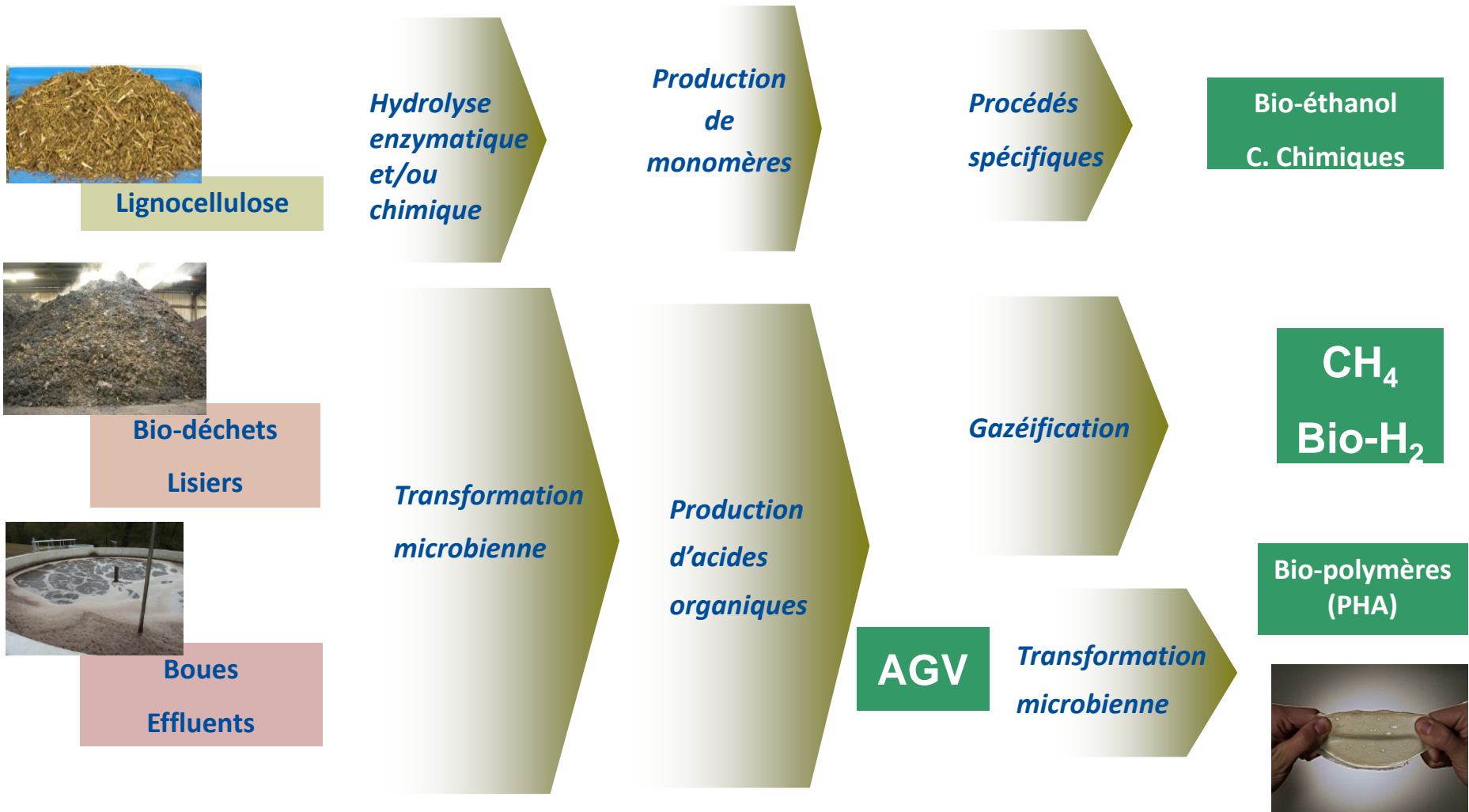
Diversité Consortium → +

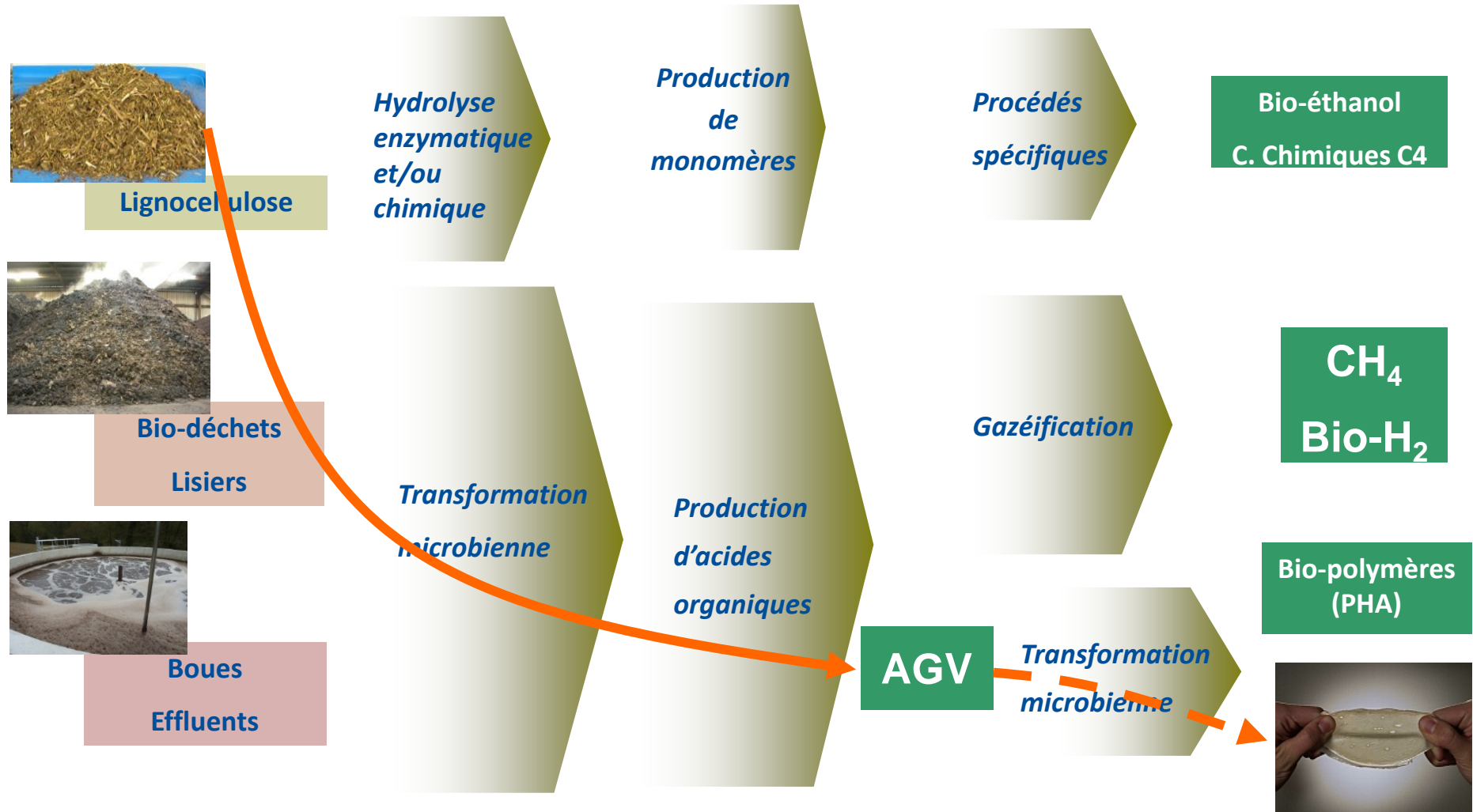


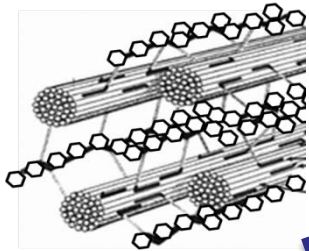
Diversité Fonctionnelle → +



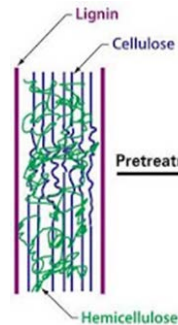
Hydrolyse & Production Synthons → +



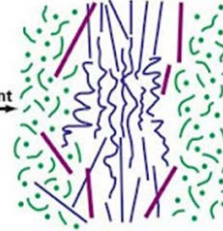




Prétraitement



Pretreatment



Composition chimique - structure

Taille des particules, porosité, surface (colonisation).



Potentiel biologique



Conditions opératoires

Etudier la diversité microbienne et enzymatique des consortia microbiens lignocellulolytiques de divers origines

Paille de blé - la fraction récalcitrante de la lignocellulose

Etudier la diversité microbienne et enzymatique des consortia microbiens lignocellulolytiques de divers origines

Paille de blé - la fraction récalcitrante de la lignocellulose

**Comparer cette diversité utilisant deux stratégies de métagénomique fonctionnelle :
shotgun et basée sur l'écrantage d'activité**

Etudier la diversité microbienne et enzymatique des consortia microbiens lignocellulolytiques de divers origines

Paille de blé - la fraction récalcitrante de la lignocellulose

**Comparer cette diversité utilisant deux stratégies de métagénomique fonctionnelle :
shotgun et basée sur l'screening d'activité**

Aborder l'étude du métabolisme des consortia microbiens lignocellulolytiques par une approche métabolomique



*Termes hospes,
Microcerotermes parvus,
Nasutitermes ephratae,
Nasutitermes sp (proche lujae)*

Blattes		Coléoptères		
<i>Gromphadorina portentosa</i> (Blaberidae) : La blatte géante de Madagascar		<i>Ergate faber</i> (Cerambycidae): L'Ergates forgeron	<i>Potosia cuprea</i> (cetoniidae) : La Cétoine cuivrée	<i>Propomacrus bimucronatus</i> (Euchiridae)
				
Orthoptères		Lepidoptères		Phasmes
<i>Gryllus bimaculatus</i> (Gryllidae) : Le grillon domestique		<i>Locusta migratoria</i> (Acrididae) : Le criquet migrateur		<i>Cossus cossus</i> (Cossidae) : Le Cossus gâte-bois
				
				

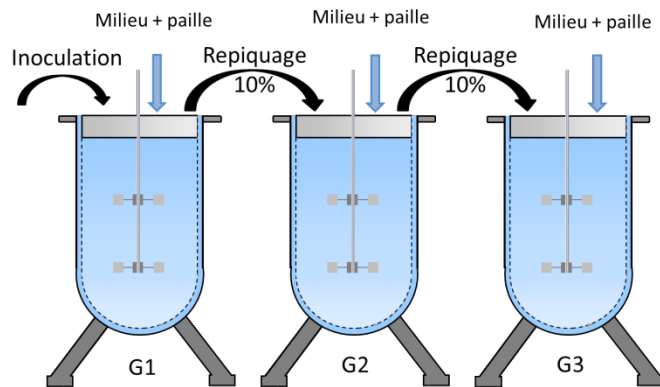


Rumen (10^9 - 10^{10} b/ml)

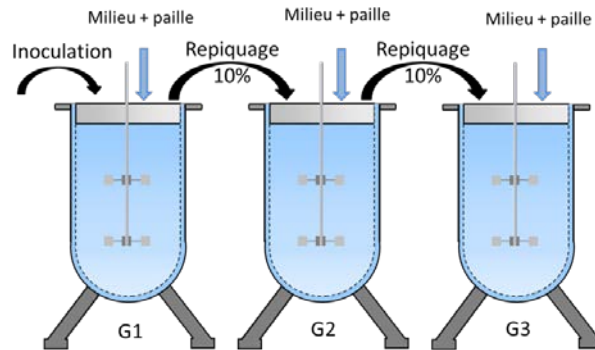
Paille de blé 20 g/l (broyée)

Réacteur séquentiel batch (~7 jours)

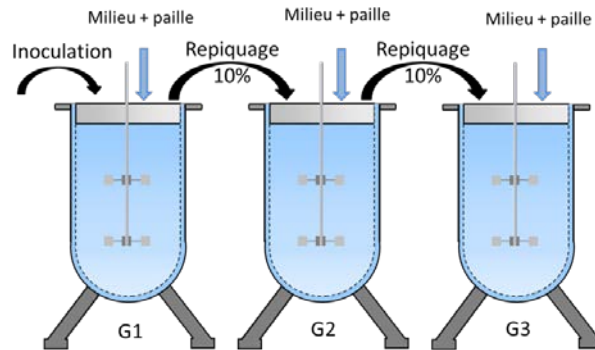
35°C - pH 6 - 6,3 - absence O_2 - obscurité



Paille de blé

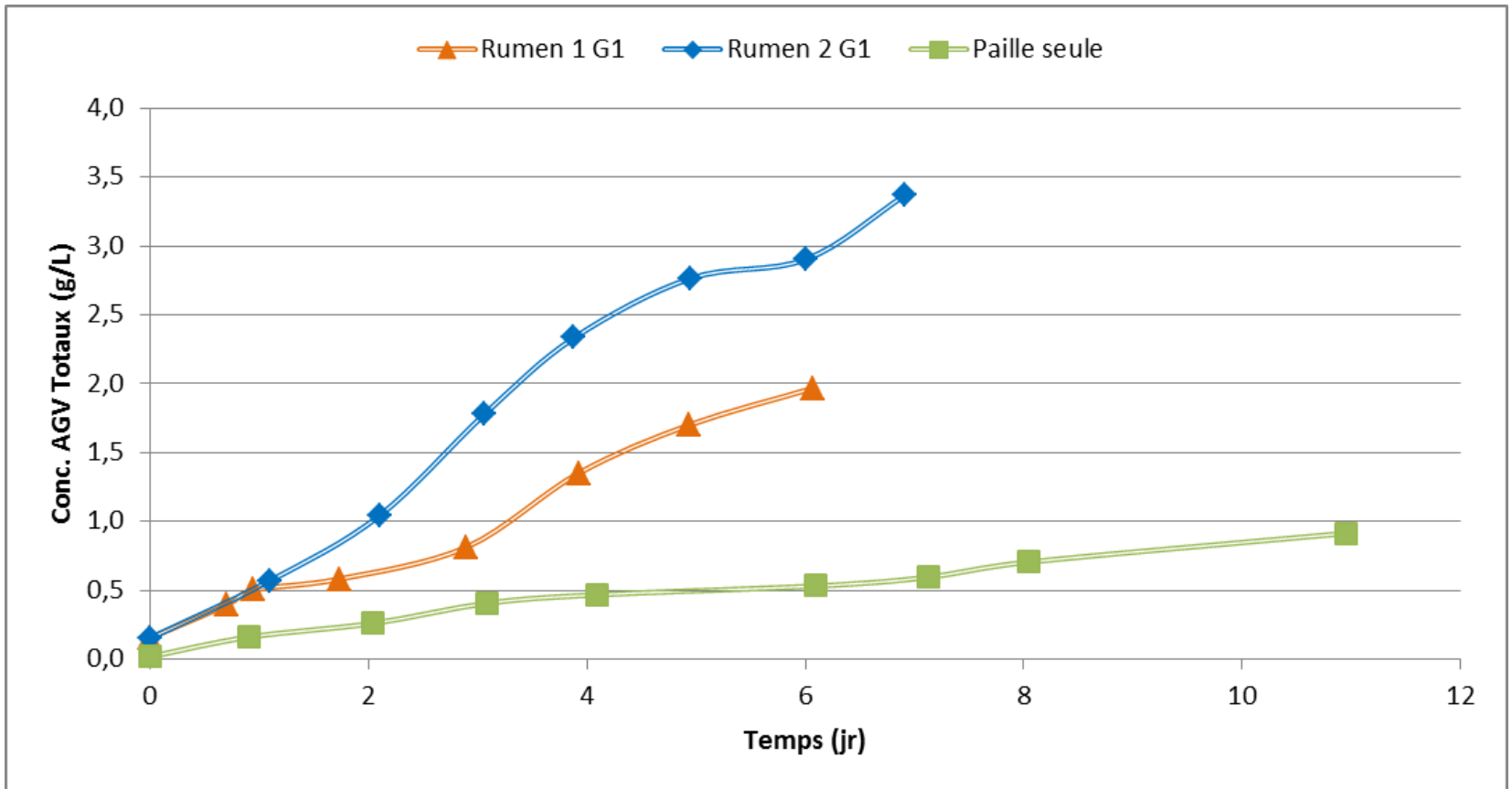


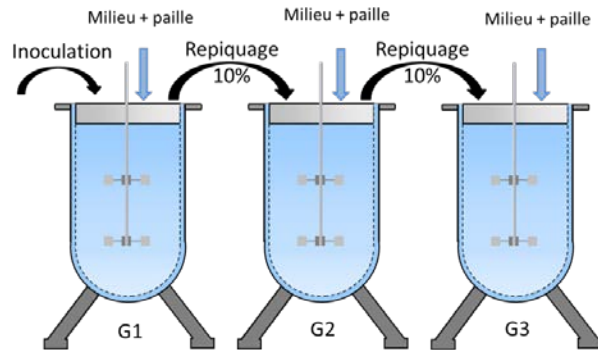
- **Métagénomique ARNr 16S et ARNm**
- **Métagénomique fonctionnelle (screening)**
- **Activités enzymatiques d'hydrolyse**
- **% Dégradation**
- **Production synthons (carboxylates)**



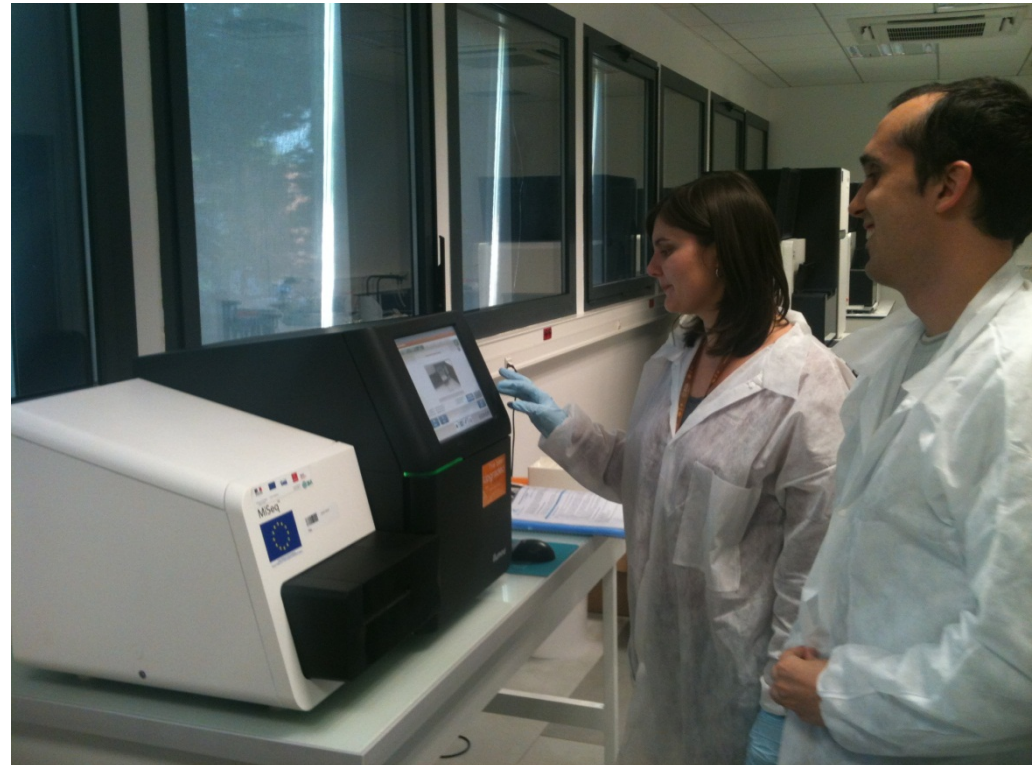
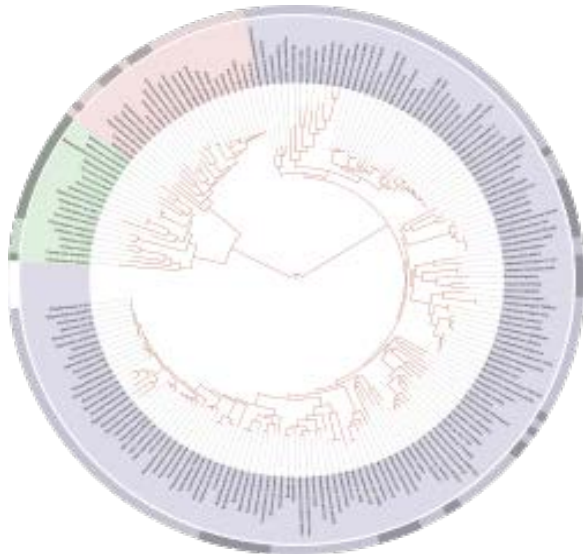
- % Dégradation
- Substrat résiduel
- Production de carboxylates
- Diversité - stable

Réacteur de Contrôle : *Blanc paille*





Séquençage - 16S rDNA et rRNA – MiSeq en cours d'analyse



Métagénomique fonctionnelle - screening

Decouverte de nouvelles enzymes

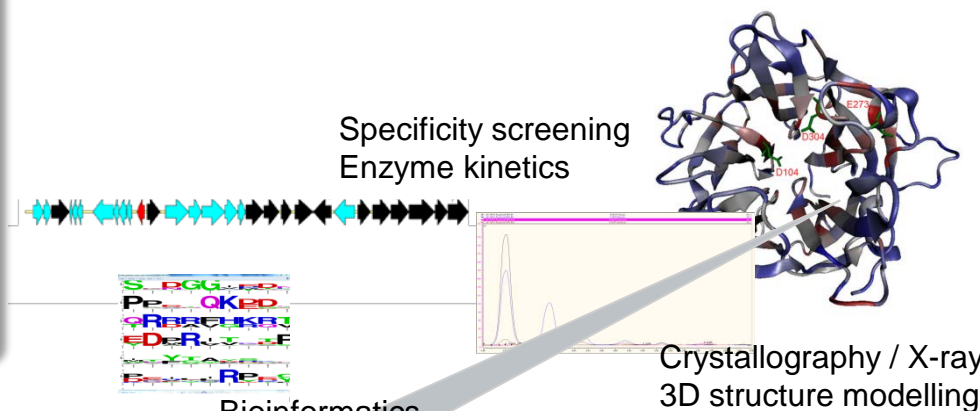
Nouvelles familles/ fonctions

Expansion du catalogue d'enzyme pour la biologie synthétique (2,4 M clones/310 hits/73 enzymes nouvelles)

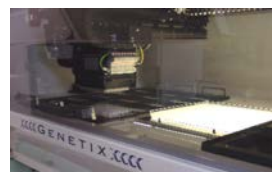
Intégration des données

Métagénomiques/métatranscriptomes/génomiques

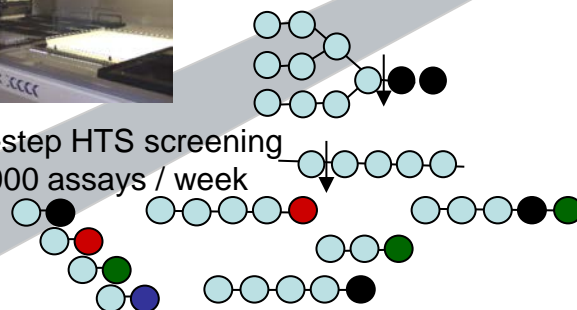
Approfondir les connaissances sur l'écosystème



NG Sequencing



Multi-step HTS screening
400 000 assays / week



Métagénome/métatranscriptome
écosystème naturel ou enrichi

Tasse et al. 2010. Genome Research
Cecchini et al. 2013. PLOS One
Ladeveze et al. 2013 EU Patent
Ladeveze et al. 2013 J Biol Chem



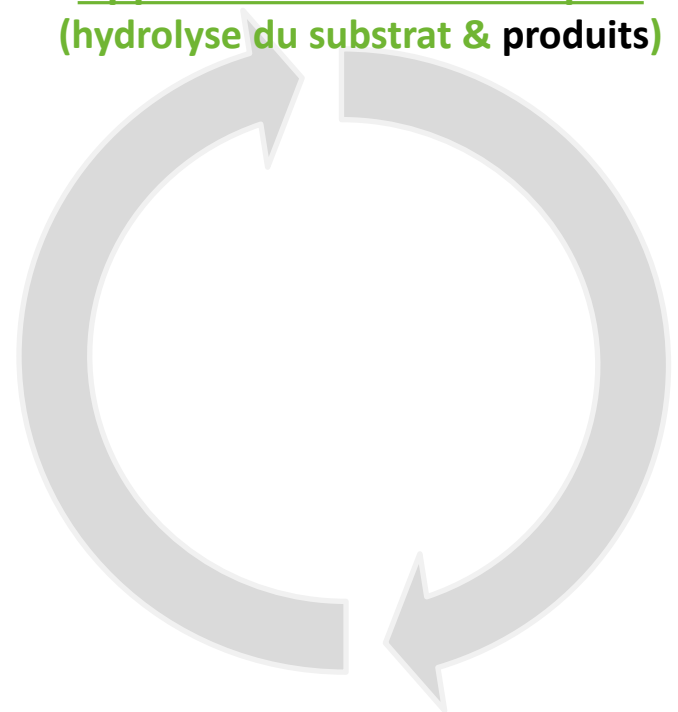


Substrat

Produits



Approches macro-cinétiques
(hydrolyse du substrat & produits)



→
Temps



Substrat

Produits

Populations - gènes

Pionnières

Secondaires

Temps

Approches macro-cinétiques
(hydrolyse du substrat & produits)

Analyses activité globale
Métagénomique et
métatranscriptomique
successions des populations

Substrat

Produits

Populations - gènes

Pionnières

Secondaires

Enzymes hydrolytiques

Temps

Approches macro-cinétiques
(hydrolyse du substrat & produits)

Analyses activité globale
Métagénomique et
métatranscriptomique
successions des populations

Approche Enzymatique
(Cellulases & Hémicellulases)
Métabolomique

Substrat

Produits

Populations - gènes

Pionnières

Secondaires

Enzymes hydrolytiques

Métabolites

Temps

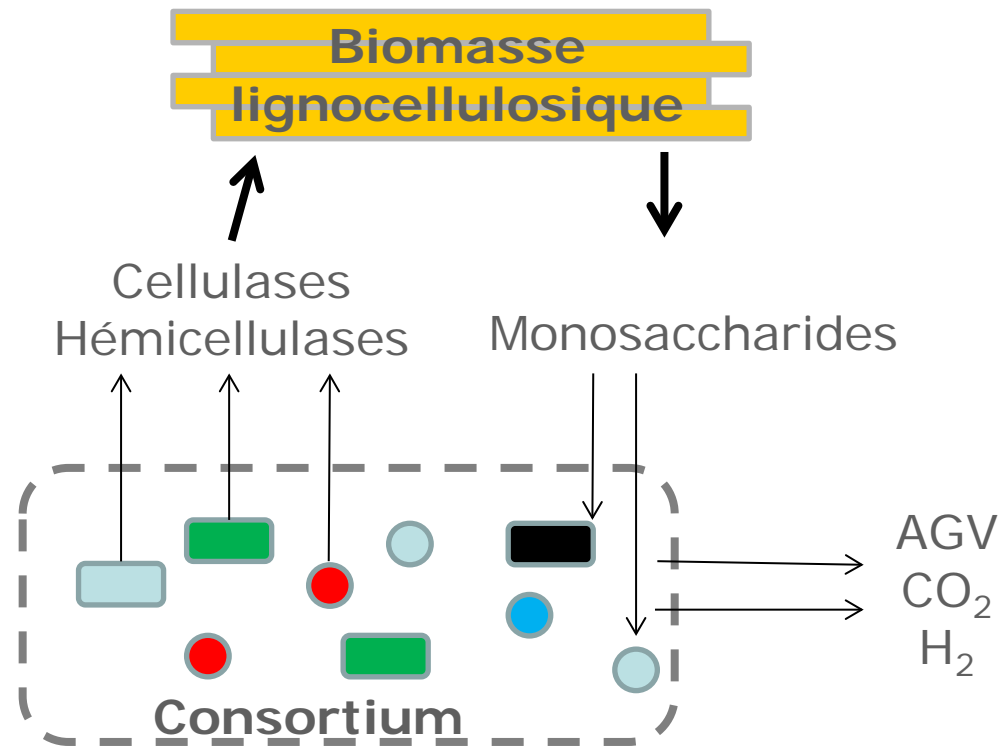
Approches macro-cinétiques
(hydrolyse du substrat & produits)

Analyses activité globale
Métagénomique et
métatranscriptomique
successions des populations

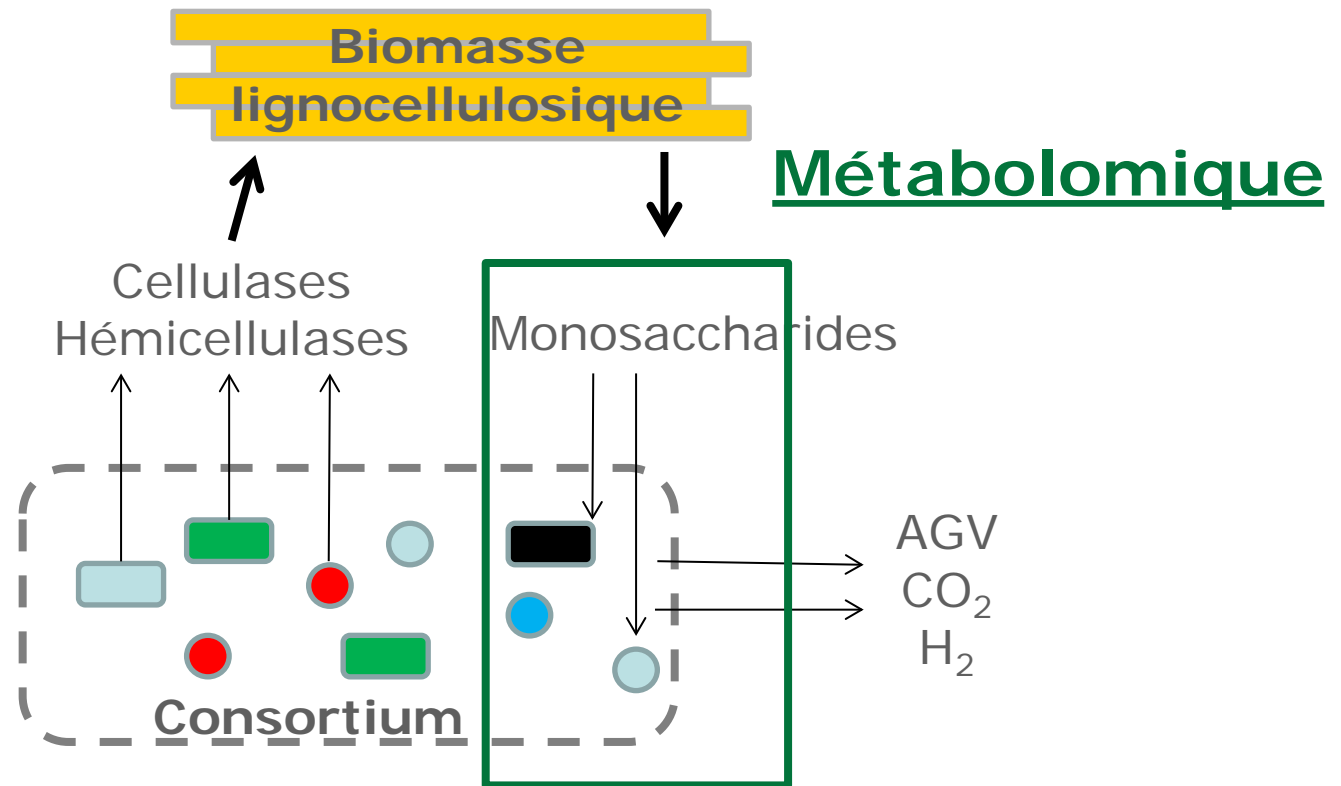
Approche Enzymatique
(Cellulases & Hémicellulases)
Métabolomique

Approche Métabolomique
(Glycolyse/Pentose phosphate)

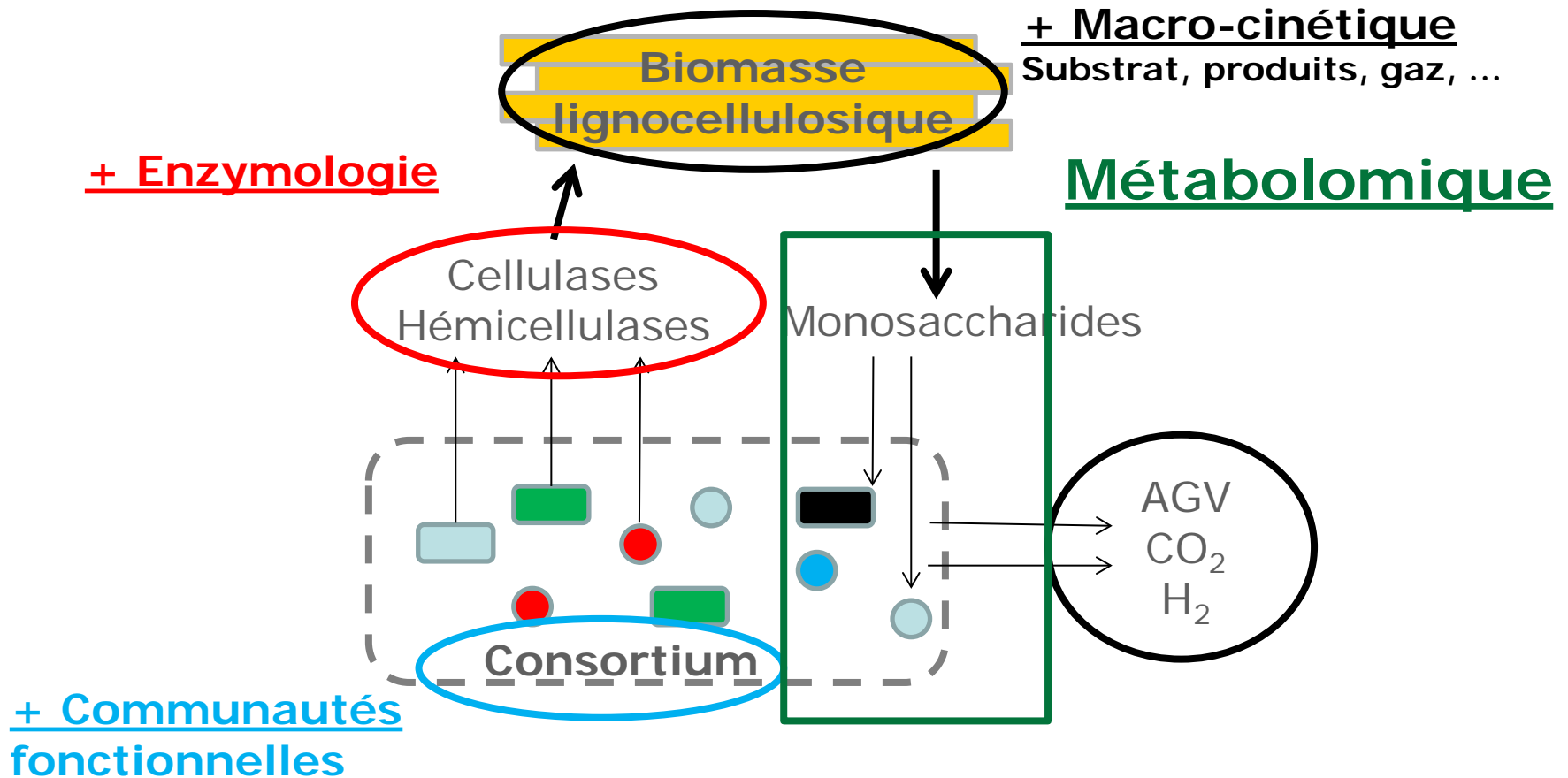
- Objectif : considérer le consortium lignocellulolytique dans son ensemble et comprendre son fonctionnement métabolique



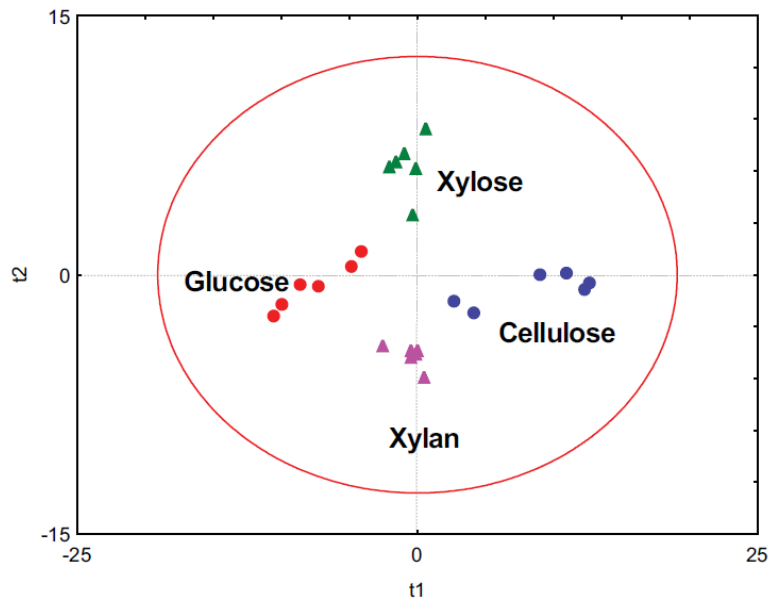
- Objectif : considérer le consortium lignocellulolytique dans son ensemble et comprendre son fonctionnement métabolique



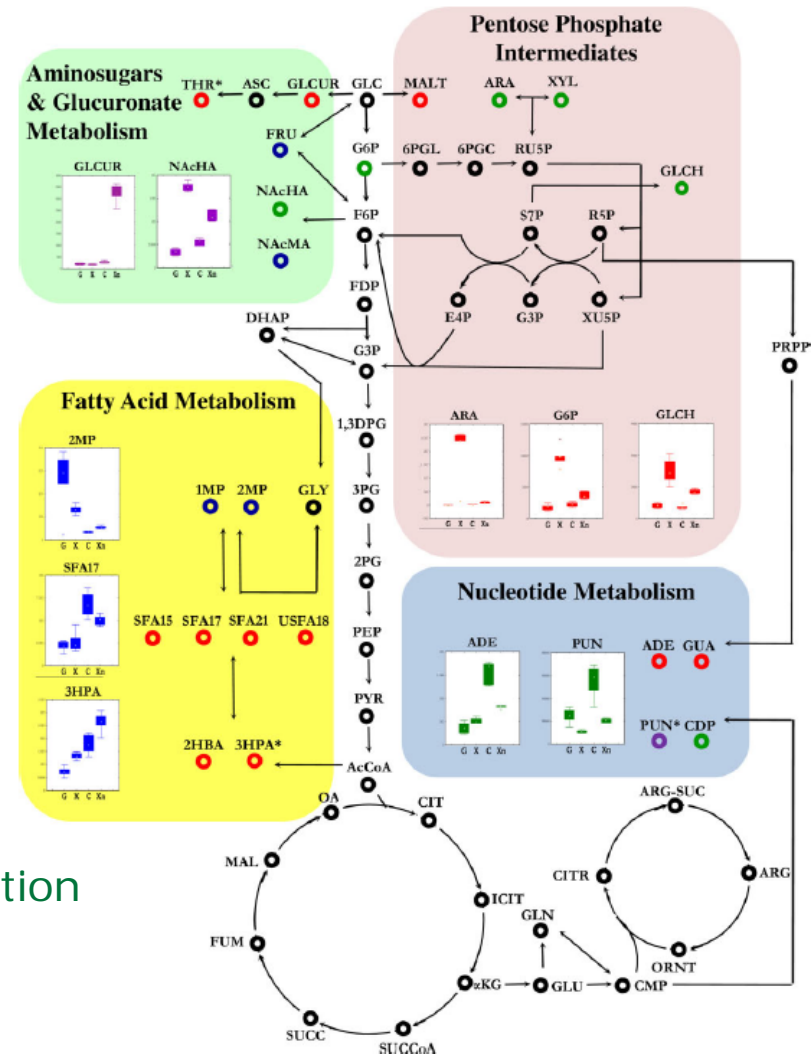
- Objectif : considérer le consortium lignocellulolytique dans son ensemble et comprendre son fonctionnement métabolique



- Souches pures

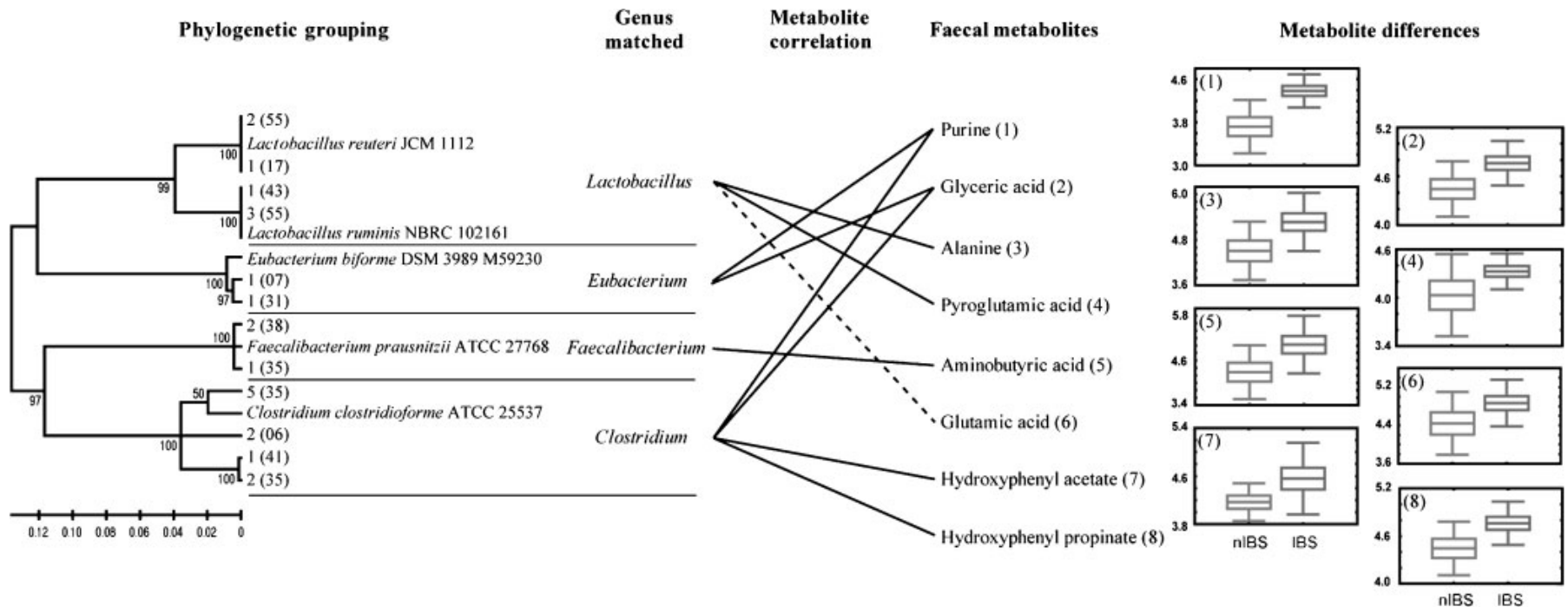


Changement du profil métabolique en fonction de la source de carbone *Saccharophagus degradans*, Shin et al., 2009



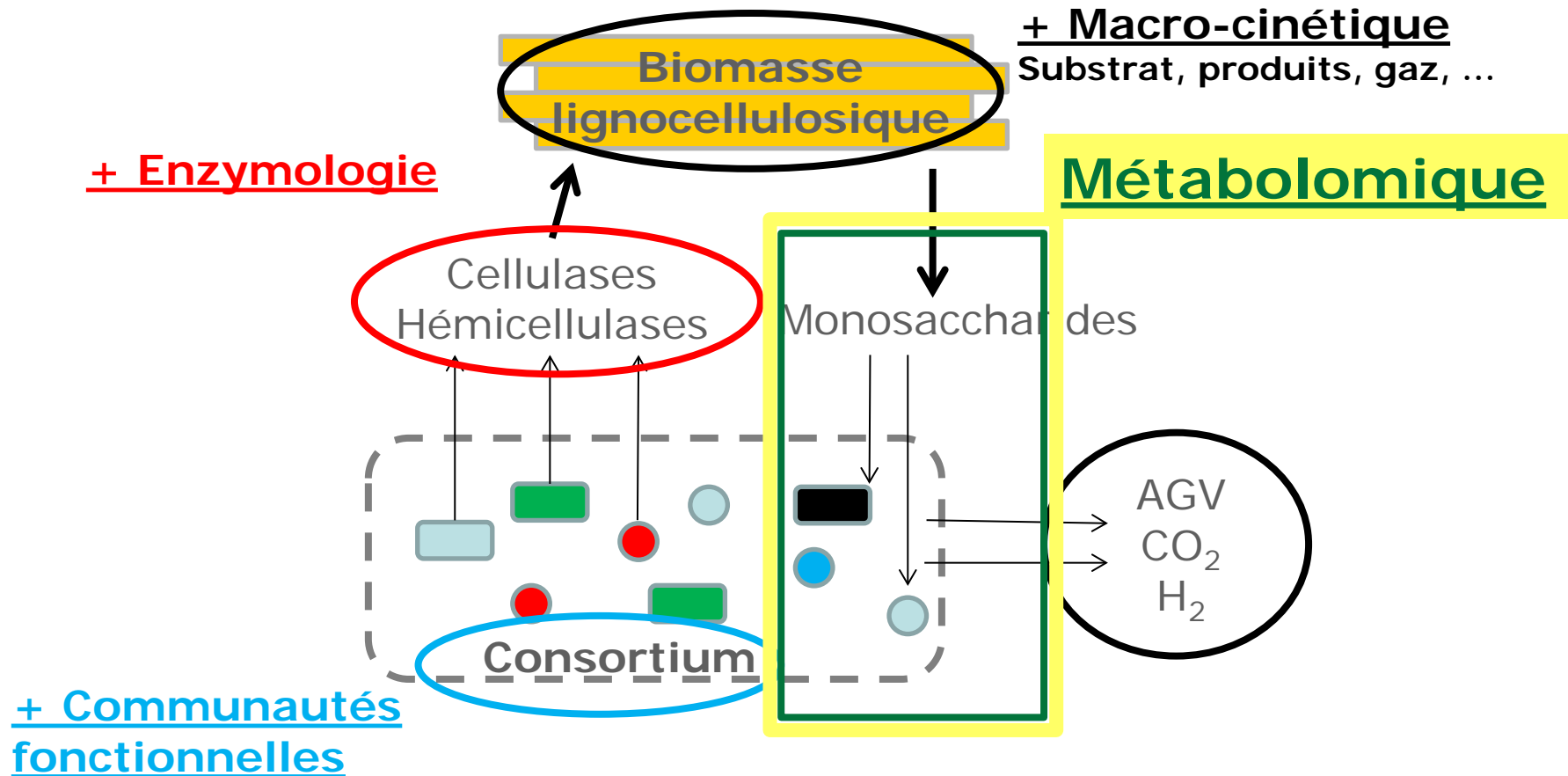
- Microbiote humain:**

- communautés bactériennes symbiontes (*Bowel syndrome*)



Relation phylogénie & métabolomique : compréhension de l'impact des symbiontes dans le développement de la maladie, *Ponnusamy et al., 2011*

- Objectif : considérer le consortium lignocellulolytique dans son ensemble et comprendre son fonctionnement métabolique



Enrichissement consortium lignocellulolytique modèle

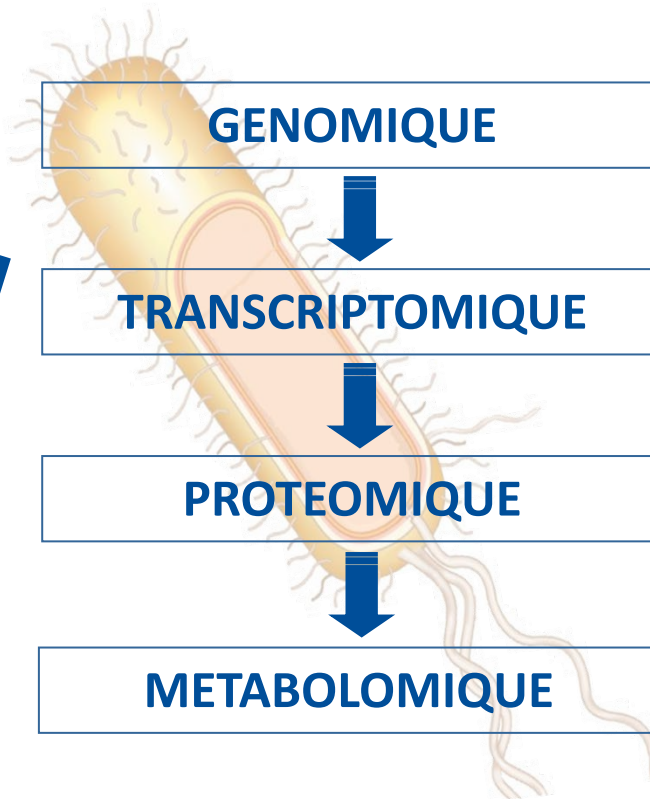
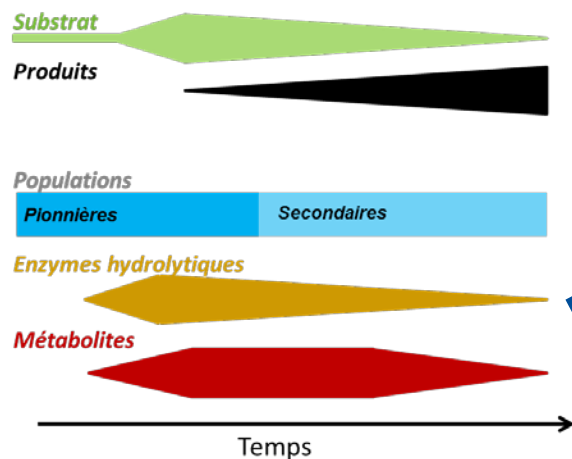


Validation analytique (méthode de quenching)



Substrats			
Cellobiose soluble	Cellulose microcristalline Avicell - insoluble	Hémicellulose Xylan - hêtre	Lignocellulose modèle Cellulose-Hémicellulose- Lignine
Cinétique de production d'acides organiques			
Rapide C6	Limitée par l'hydrolyse C6	Limitée par l'hydrolyse C5	Réaliste C6-C6-c phénoliques
Changement métabolique pendant la phase initiale de dégradation			
Act. Enz / Populations fonctionnelles (ARNr 16S)			





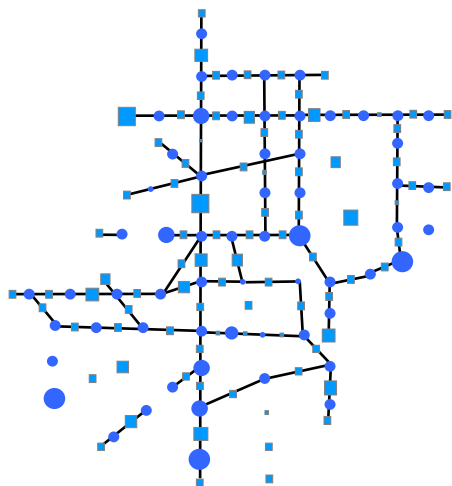
Potentiel

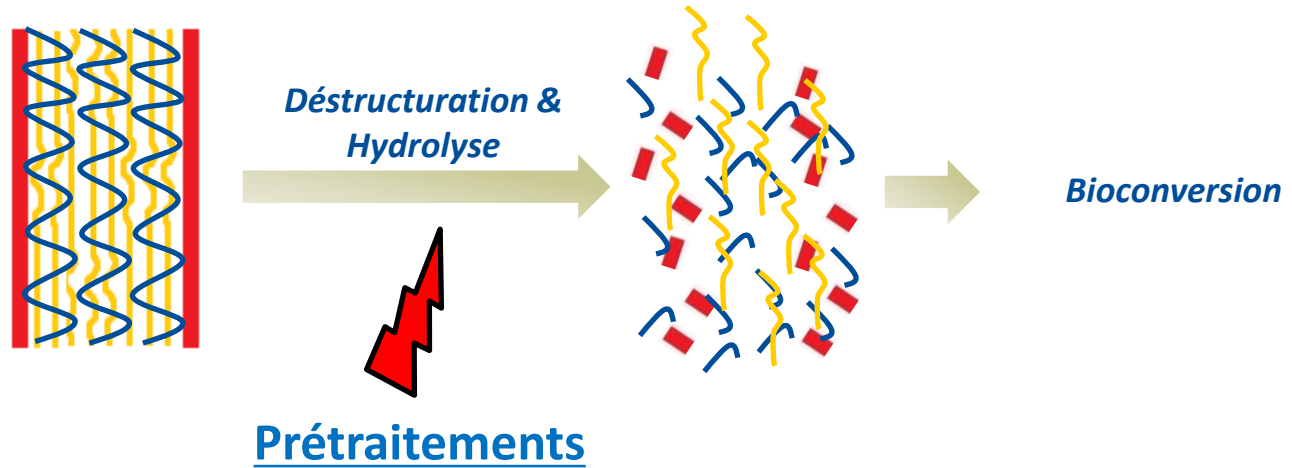
Intention

Activité

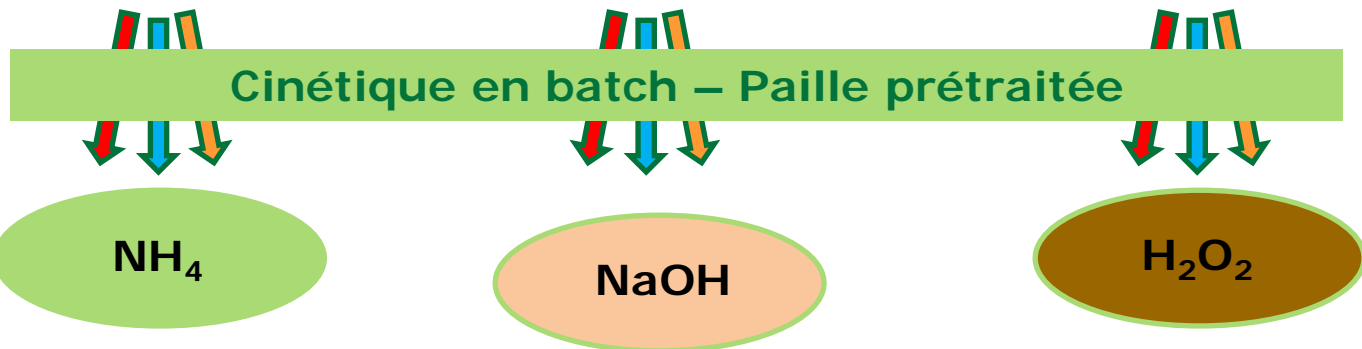
Etat réel d'activité

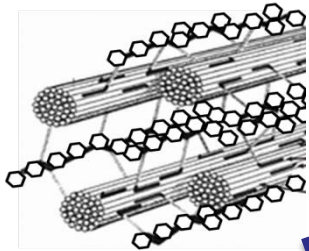
Depuis les potentialités du consortium
à la mise en évidence des réseaux métaboliques



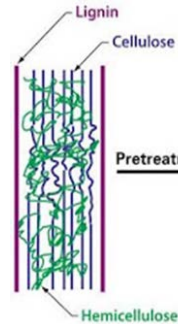


Consortium enrichi rumen-réacteur





Prétraitement



Composition chimique - structure
Taille des particules, porosité, surface (colonisation).



Potentiel biologique



Conditions opératoires

LISBP

A. Lazuka
L. Auer
S. Paissé
S. Bozonnet
M. Spérandio
M. O'Donohue
G. Veronèse
E. Laville
G. Hernandez-Raquet

Métatoul

JC. Portais
S. Heux

GET

S. Valière
O. Bouchez
C. Kloop
J. Mariette

IATE – INRA Montpellier

A. Barakat

INRA – Clermont

D. Morgavi

IRD – Bondy

C. Rouland-Lefèvre
E. Miambi

LBE INRA – Narbonne

C. Dumas
H. Carrère
JJ. Godon



ADEME



Agence de l'Environnement
et de la Maîtrise de l'Energie



Merci pour votre attention !

