

# 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](mailto:hernandg@insa-toulouse.fr)

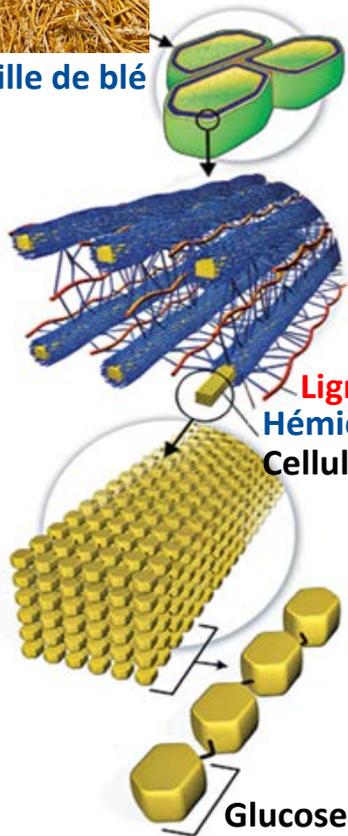


LABORATOIRE D'INGÉNIERIE  
DES SYSTÈMES BIOLOGIQUES  
ET DES PROCÉDÉS

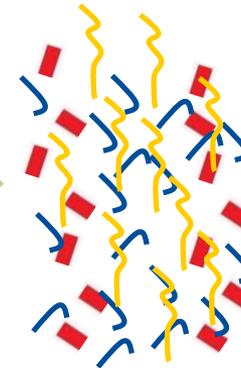




Paille de blé



Déstructuration & Hydrolyse



Transformation

Cellulose & Hémicellulose

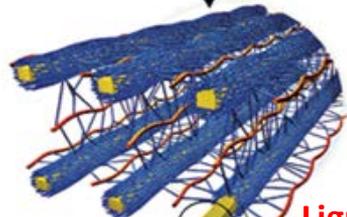


60 %

Prétraitements physico-chimiques & Hydrolyse enzymatique



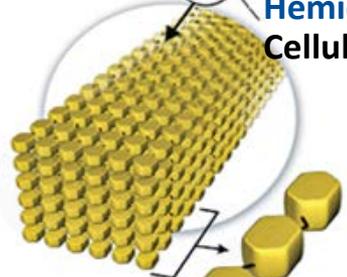
Paille de blé



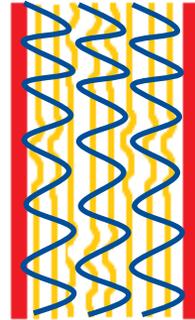
**Lignine (24%)**

**Hémicellulose (26%)**

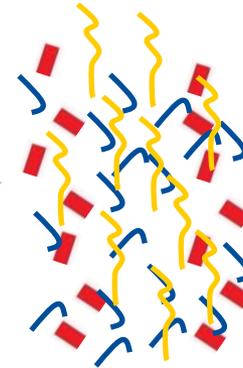
**Cellulose (35%)**



**Glucose**

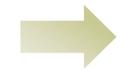


*Déstructuration & Hydrolyse*



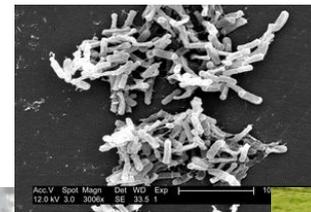
*Transformation*

*Cellulose & Hémicellulose*



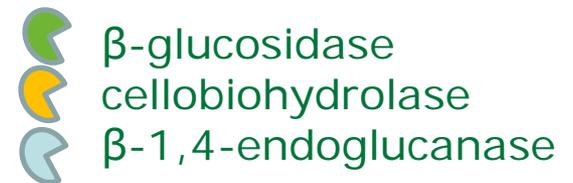
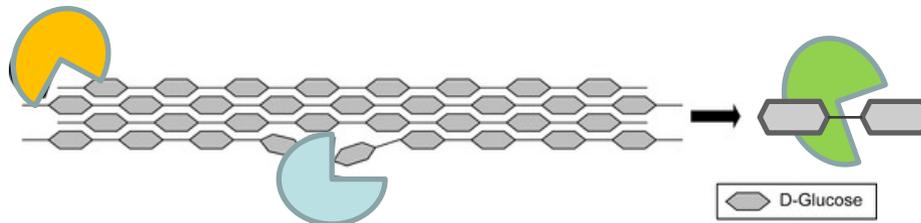
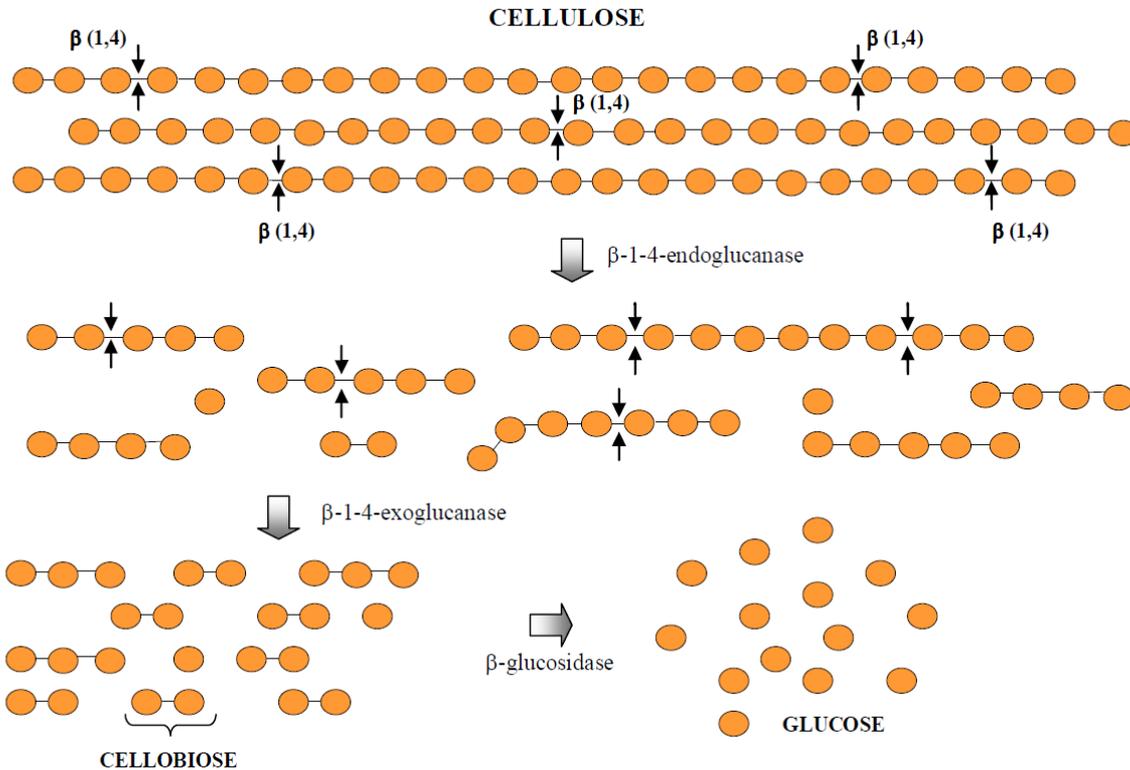
**60 %**

*Prétraitements physico-chimiques & Hydrolyse enzymatique*

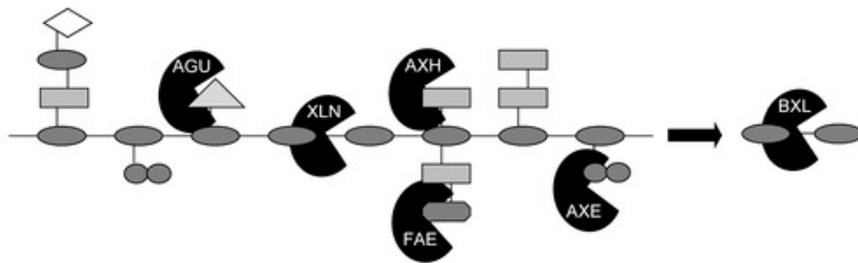


**Alternative :**

***Consortium lignocellulolytique sélectionné***

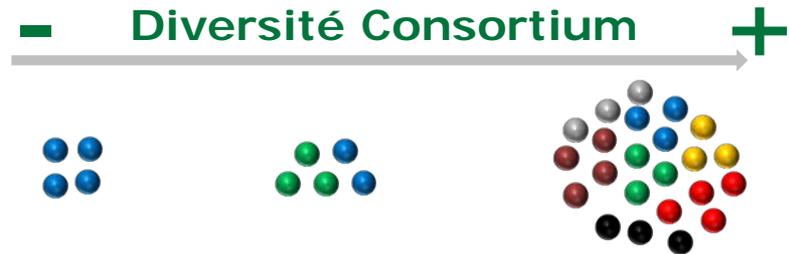
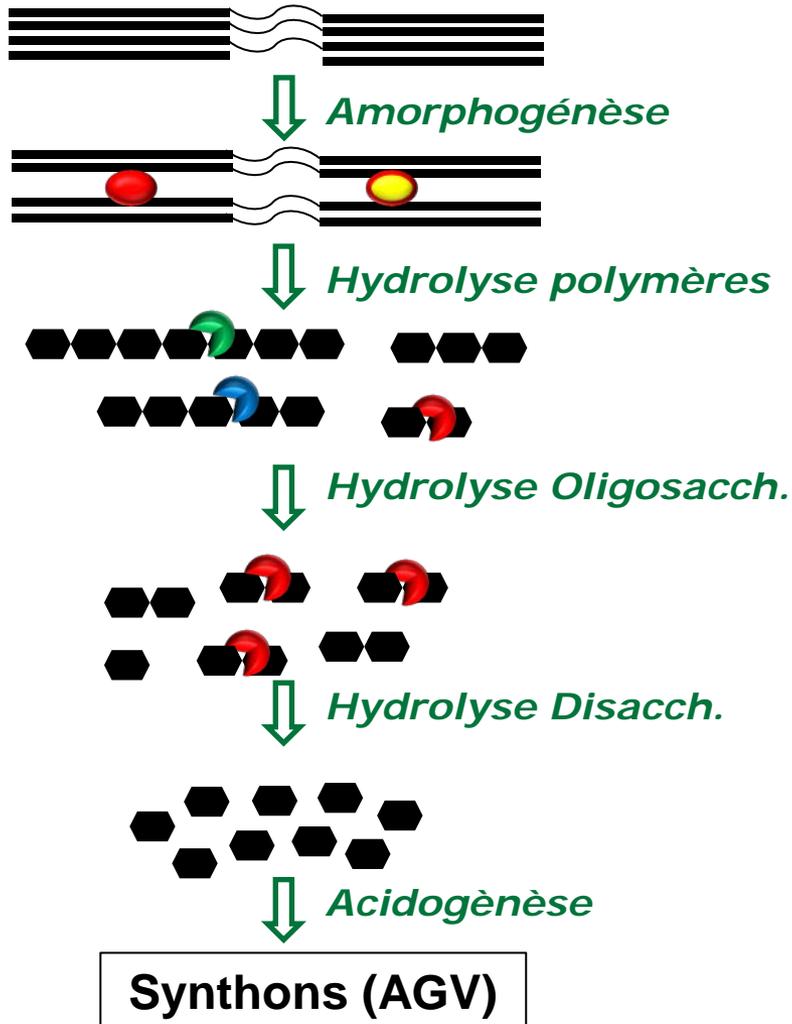


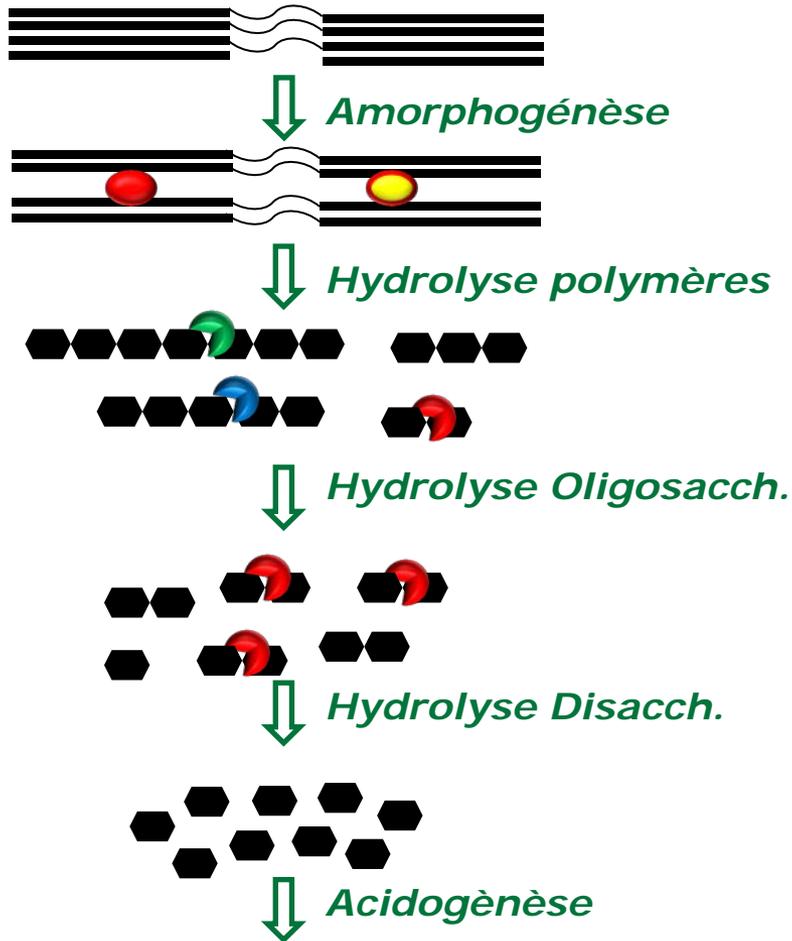
## Hémicellulose



- 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

...



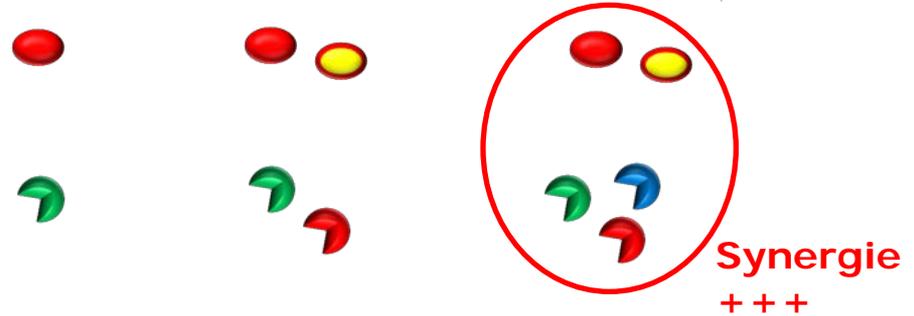


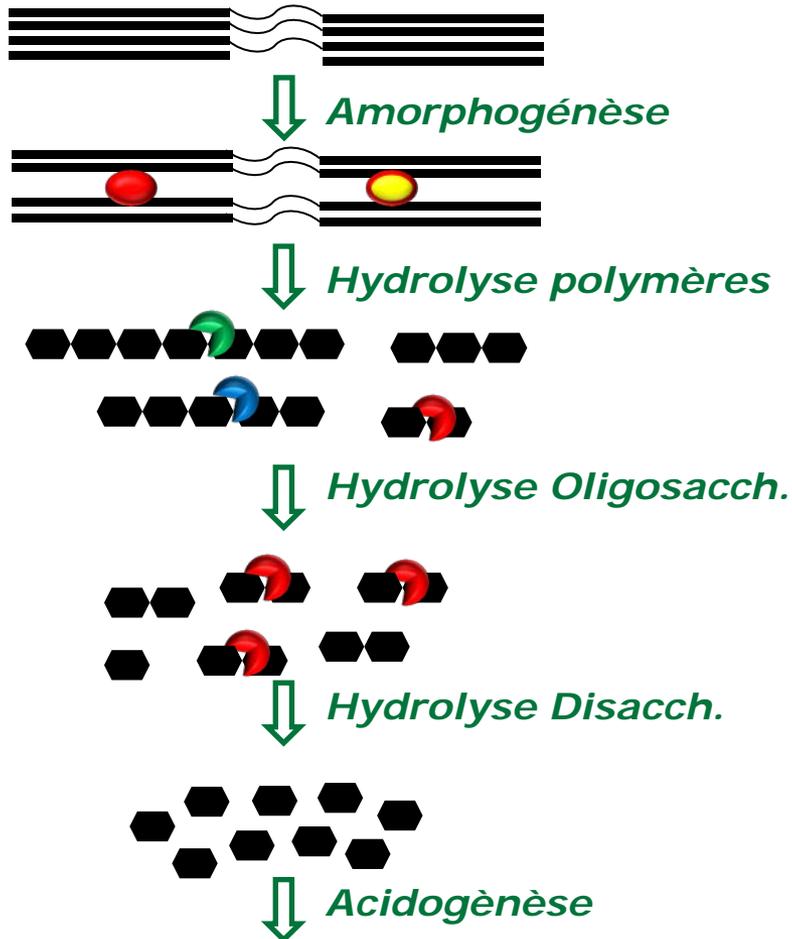
**Synthons (AGV)**

- Diversité Consortium +

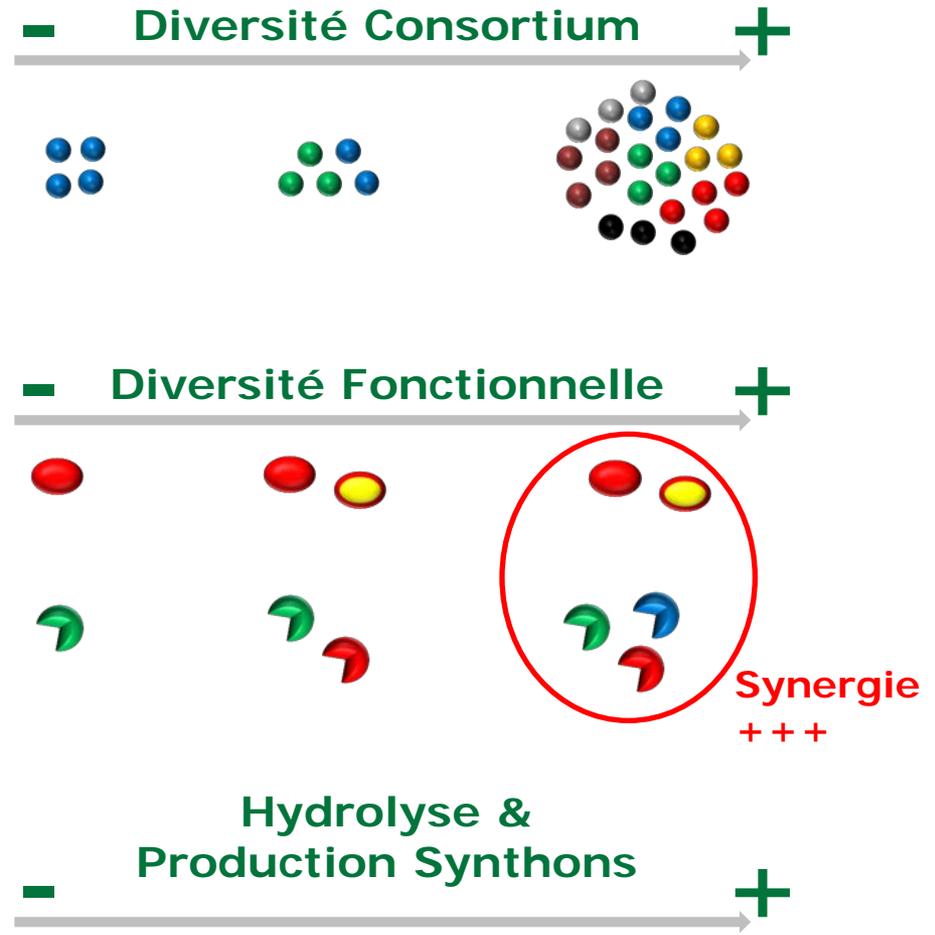


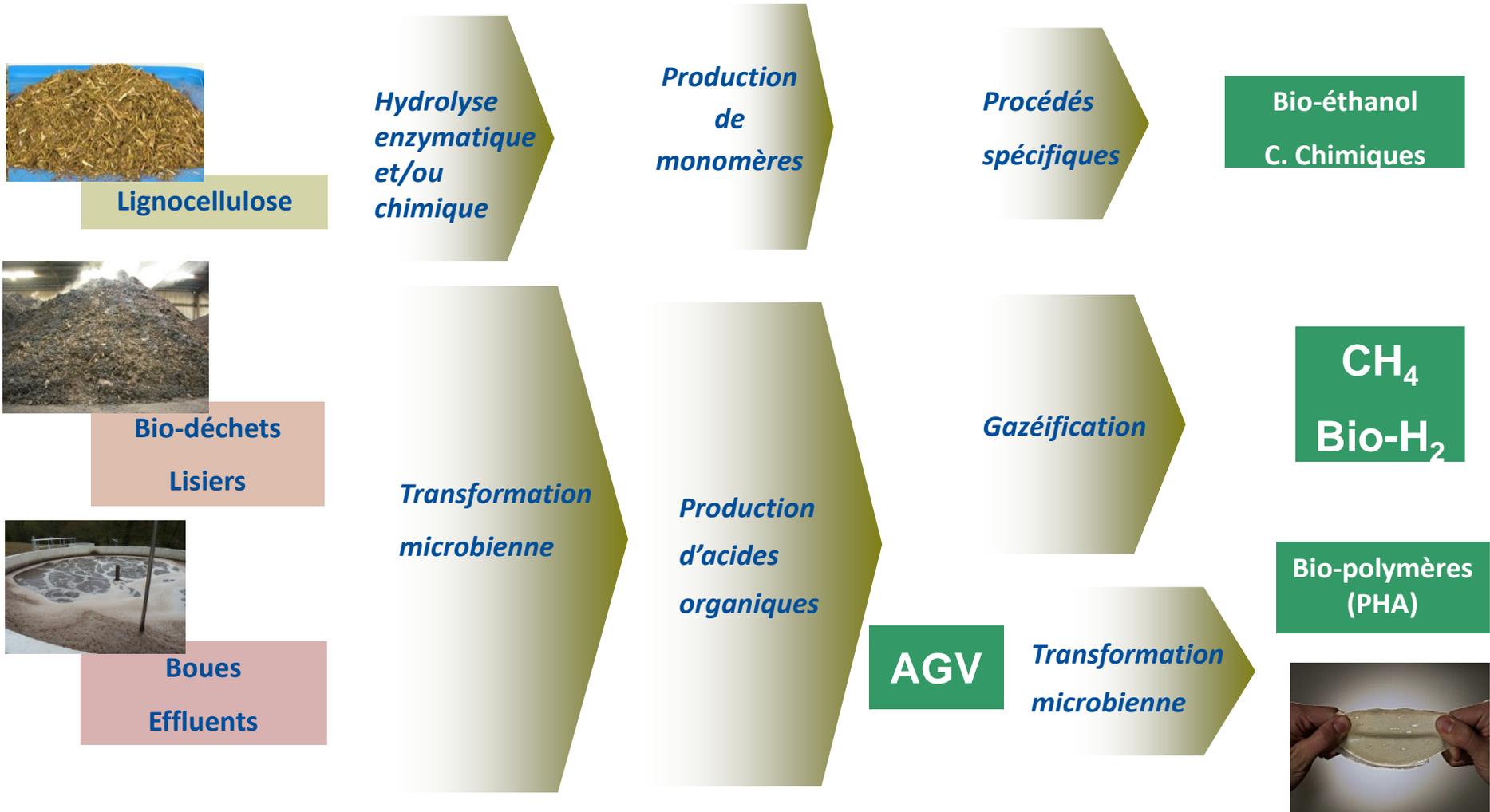
- Diversité Fonctionnelle +

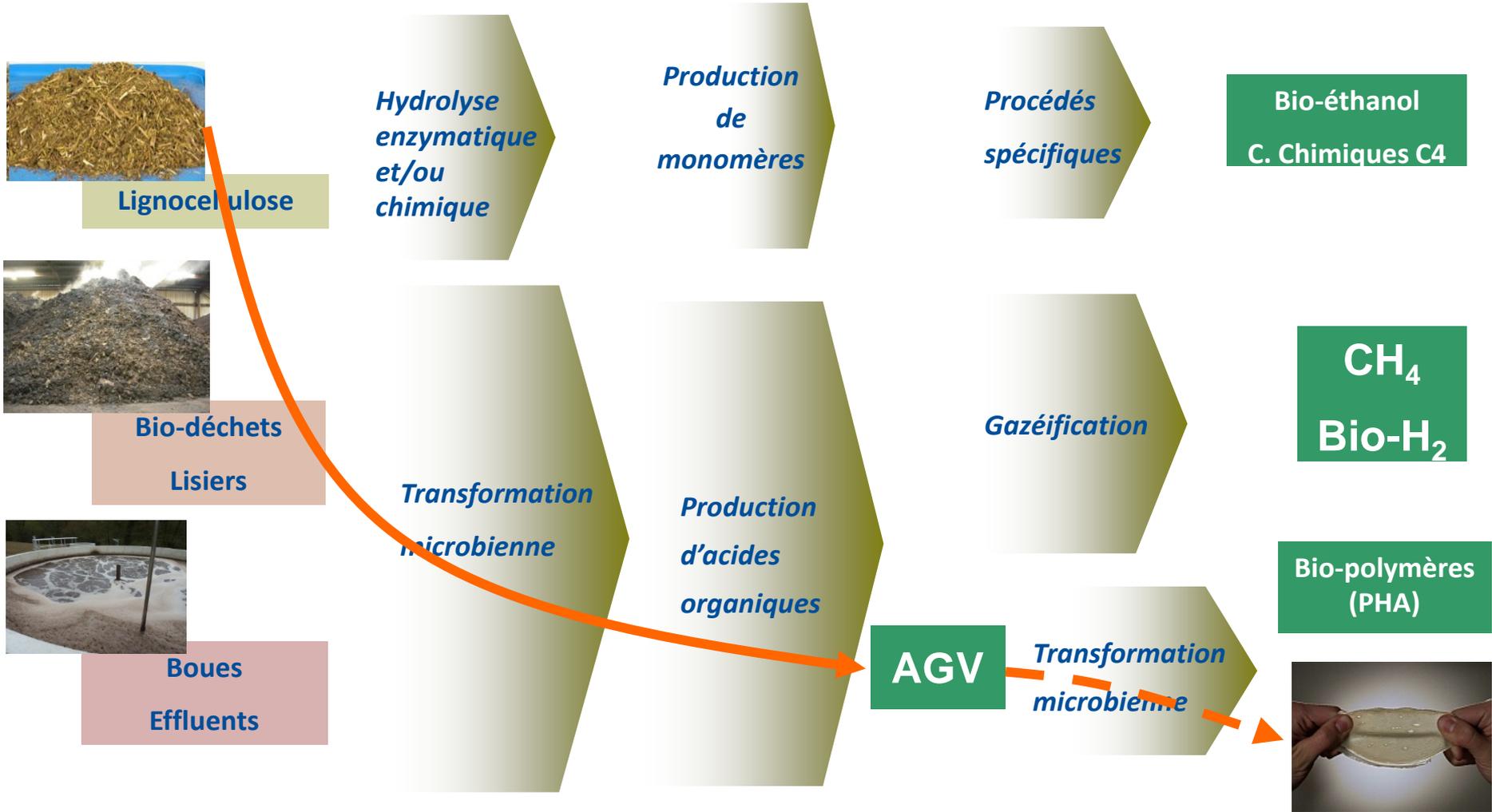


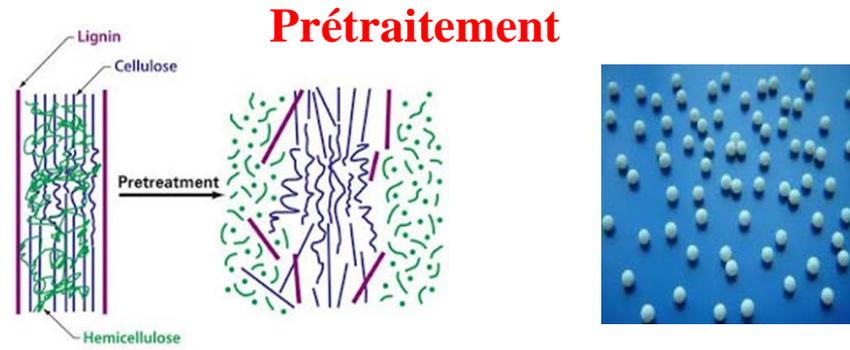
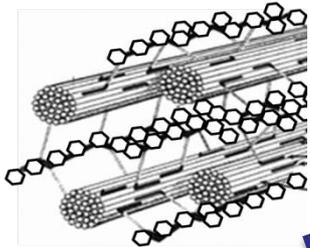


**Synthons (AGV)**









## Prétraitement

*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'screening 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'écrantage d'activité**

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

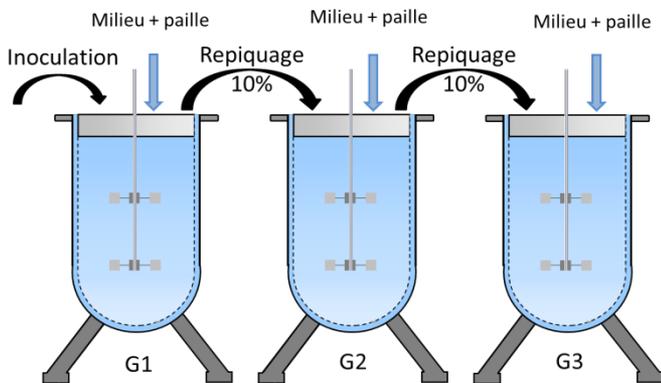


*Termes hospes,  
Microcerotermes parvus,  
Nasutitermes ephratae,  
Nasutitermes sp (proche lujae)*

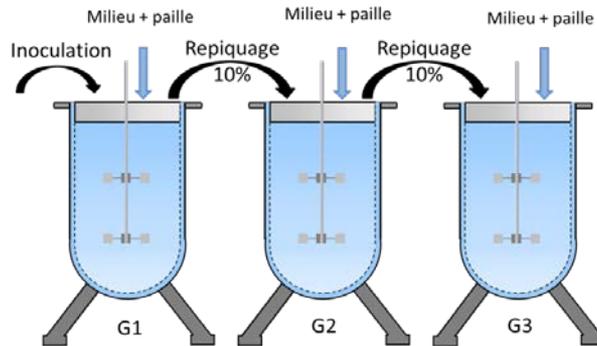
Blattes		Coléoptères	
<i>Gromphadorina portentosa</i> (Blaberidae) : La blatte géante de Madagascar	<i>Ergate faber</i> (Cerambycidae) : L'Ergates forgeron	<i>Potosia cuprea</i> (cetoniidae) : La Cétoine cuivrée	<i>Propomacrus bimucronatus</i> (Euchiridae)
			
Orthoptères		Lepidoptères	Phasmes
<i>Gryllus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



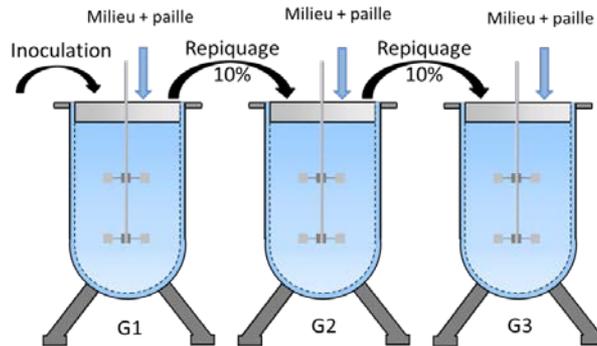
Rumen ( $10^9$ - $10^{10}$  b/ml)  
 Paille de blé 20 g/l (broyée)  
 Réacteur séquentiel batch (~7 jours)  
 35°C - pH 6 - 6,3 - absence O<sub>2</sub> - obscurité



**Paille de blé**

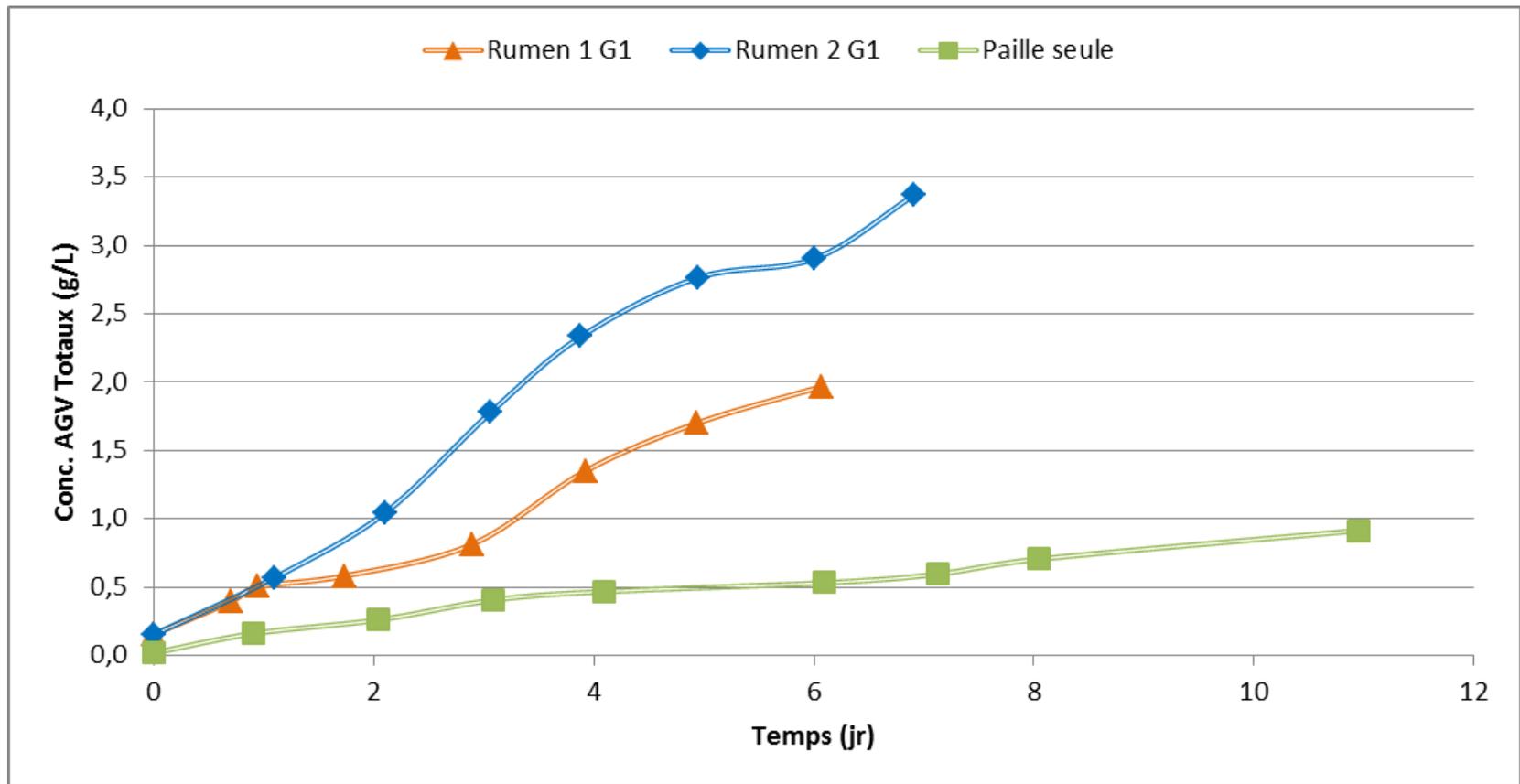


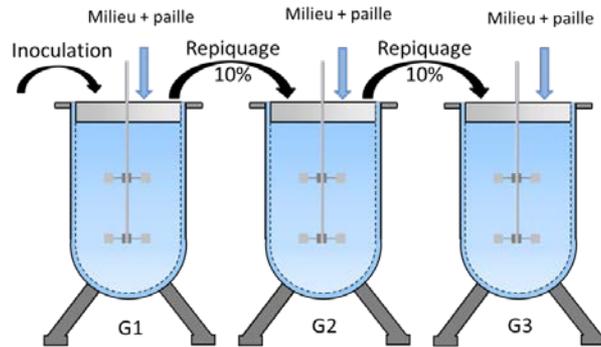
- **Métagénomique ARNr 16S et ARNm**
- **Métagénomique fonctionnelle (screening)**
- **Activités enzymatiques d'hydrolyse**
- % Dégradation
- Production **synthons (carboxylates)**



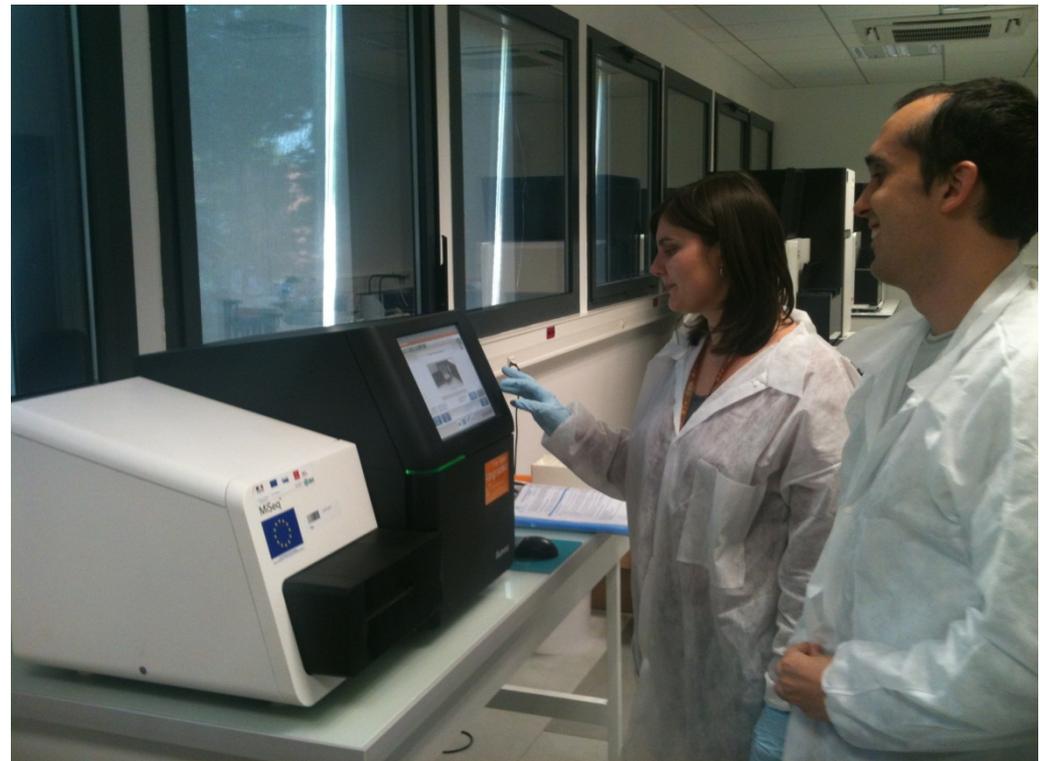
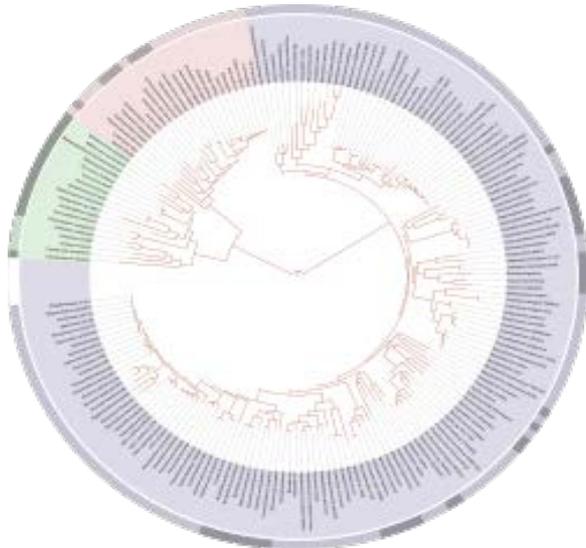
- % Dégradation
- Substrat résiduel
- Production de carboxylates
- Diversité - stable

Réacteur de Contrôle : *Blanc paille*





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



Decouverte de nouvelles enzymes

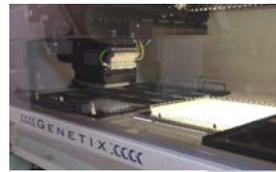
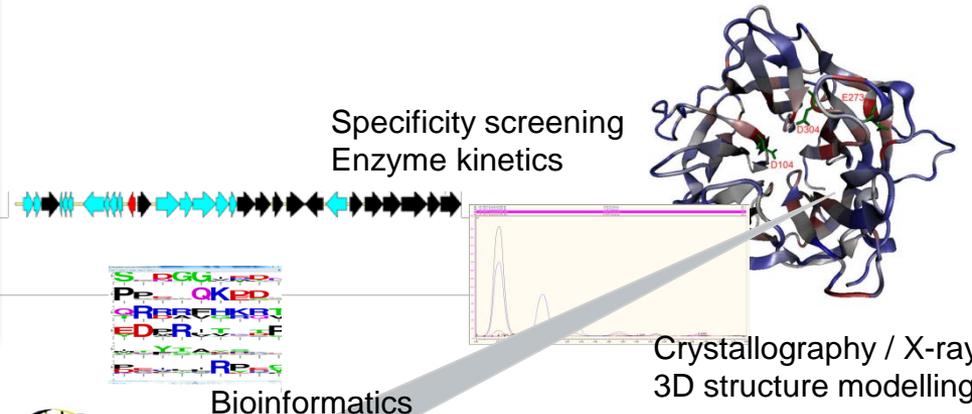
Nouvelles familles/ fonctions

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

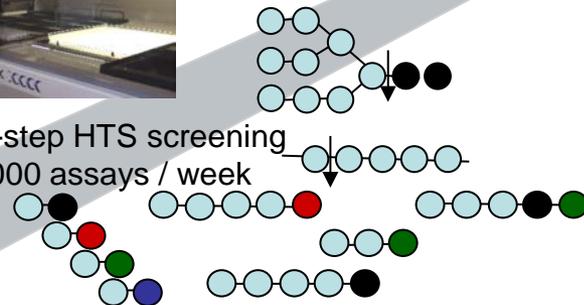
Intégration des donnés

Métagénomés/métatranscriptomes/génomés

Approfondir les connaissances sur l'écosystème



Multi-step HTS screening  
400 000 assays / week



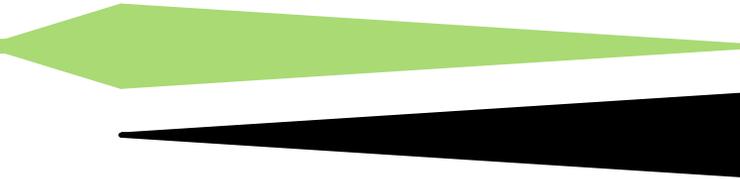
Tasse et al. 2010. Genome Research  
Cecchini et al. 2013. PLOS One  
Ladeveze et al. 2013 EU Patent  
Ladeveze et al. 2013 J Biol Chem

Métagénome/métatranscriptome  
écosystème naturel ou enrichi

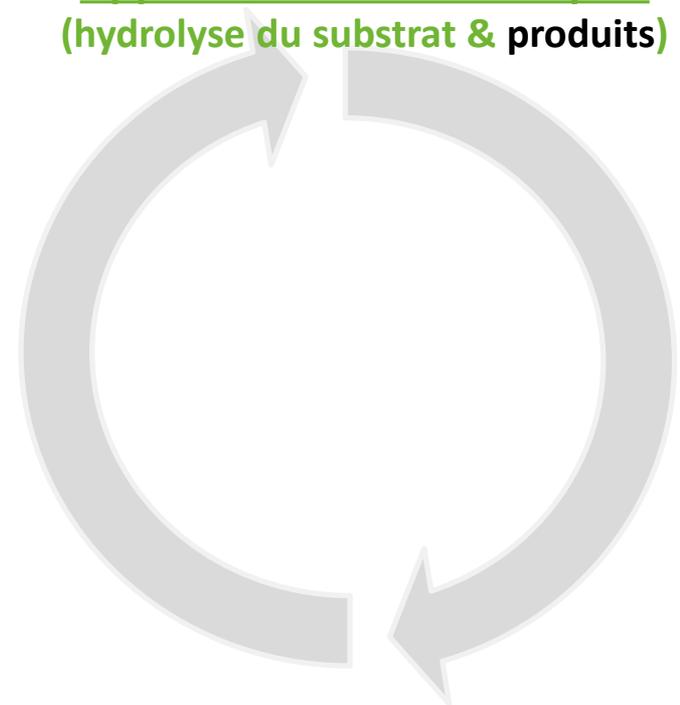


*Substrat*

*Produits*



Approches macro-cinétiques  
(hydrolyse du substrat & produits)



—————→  
Temps

*Substrat*

*Produits*

*Populations - gènes*

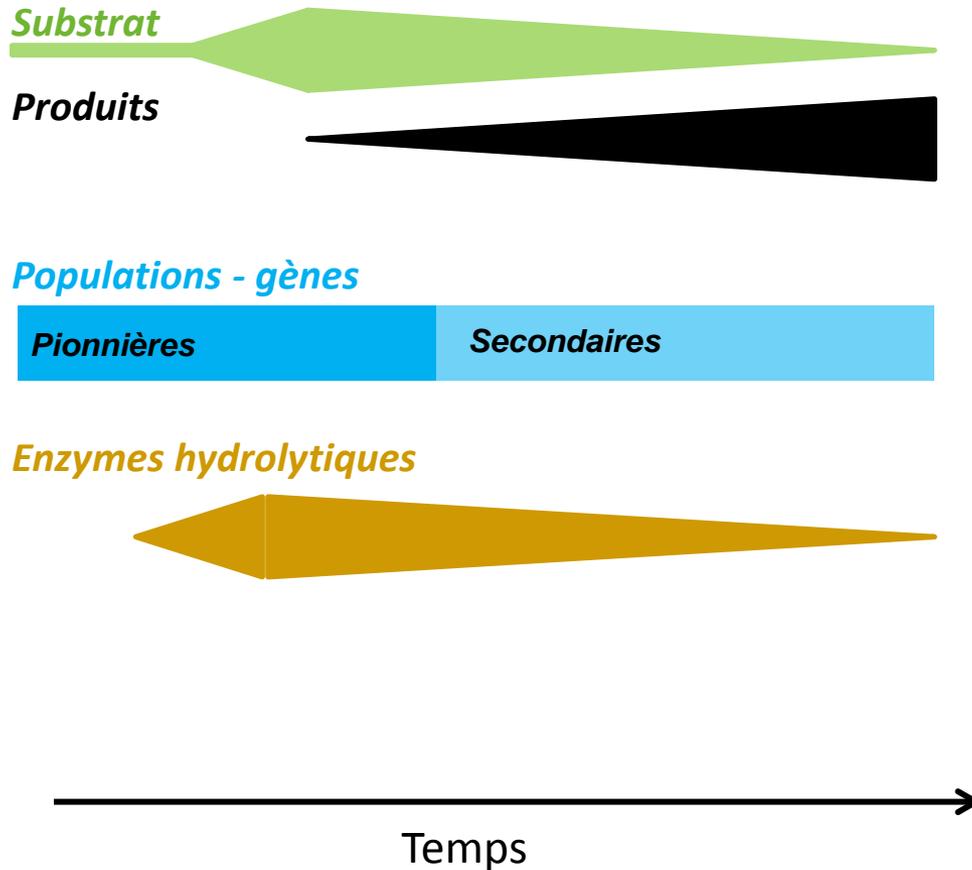
*Pionnières*

*Secondaires*

Approches macro-cinétiques  
(hydrolyse du substrat & produits)

Analyses activité globale  
Métagénomique et  
métatranscriptomique  
*successions des populations*

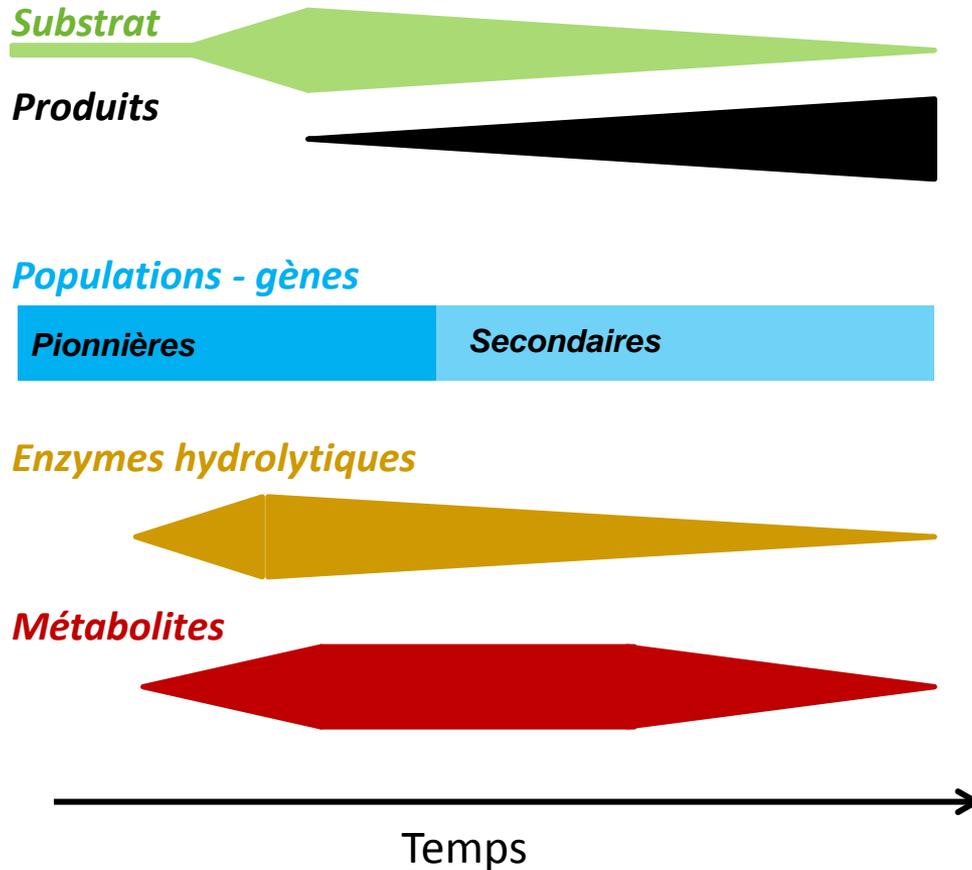
Temps



Approches macro-cinétiques  
(hydrolyse du substrat & produits)

Analyses activité globale  
Métagénomique et  
métatranscriptomique  
*successions des populations*

Approche Enzymatique  
(Cellulases & Hémicellulases)  
Métabotéomique



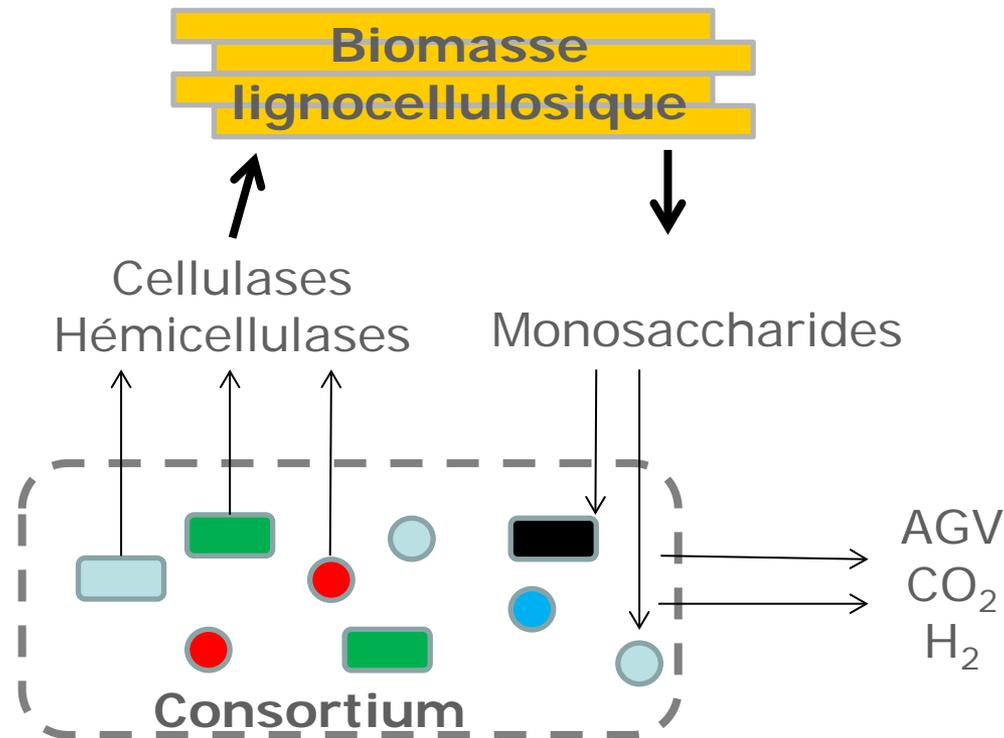
Approches macro-cinétiques  
(hydrolyse du substrat & produits)

Analyses activité globale  
Métagénomique et  
métatranscriptomique  
*successions des populations*

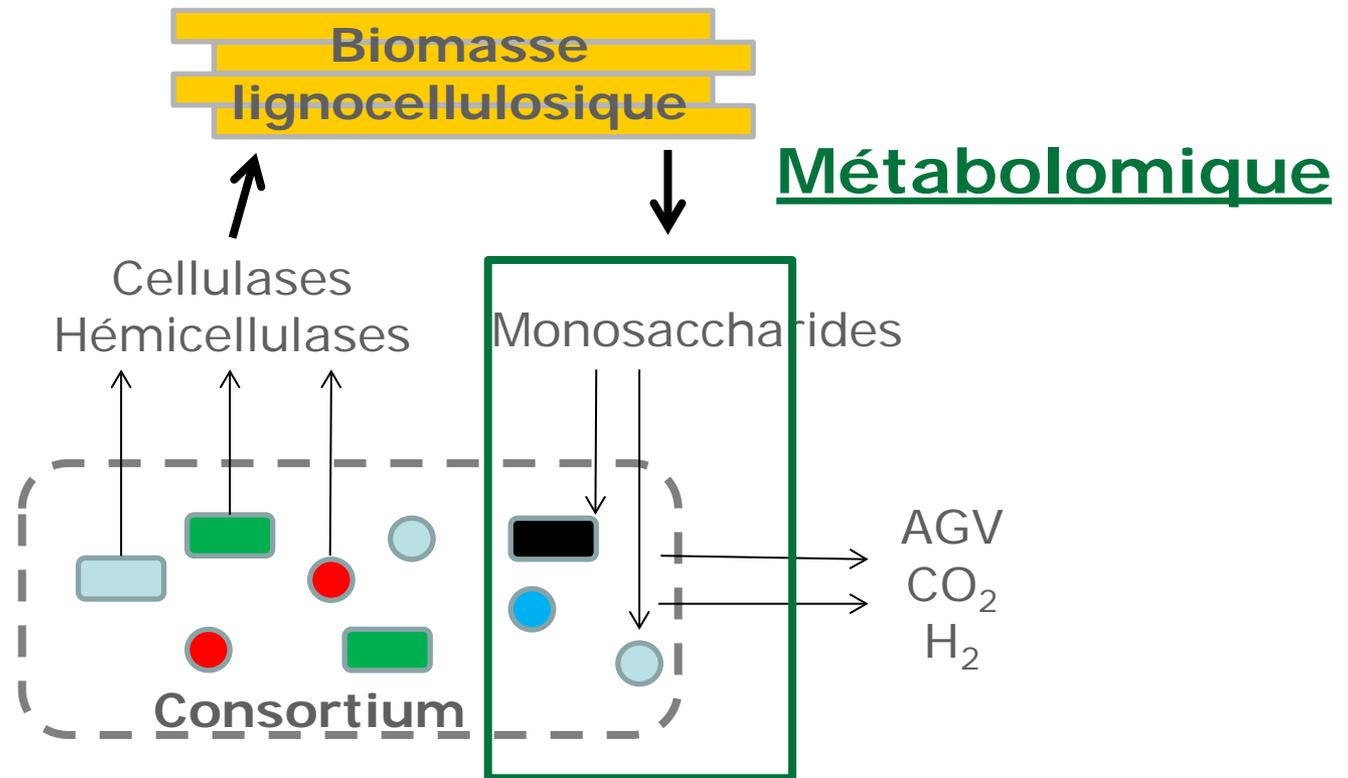
Approche Enzymatique  
(Cellulases & Hémicellulases)  
Métabolomique

Approche Métabolomique  
(Glycolyse/Pentose phosphate)

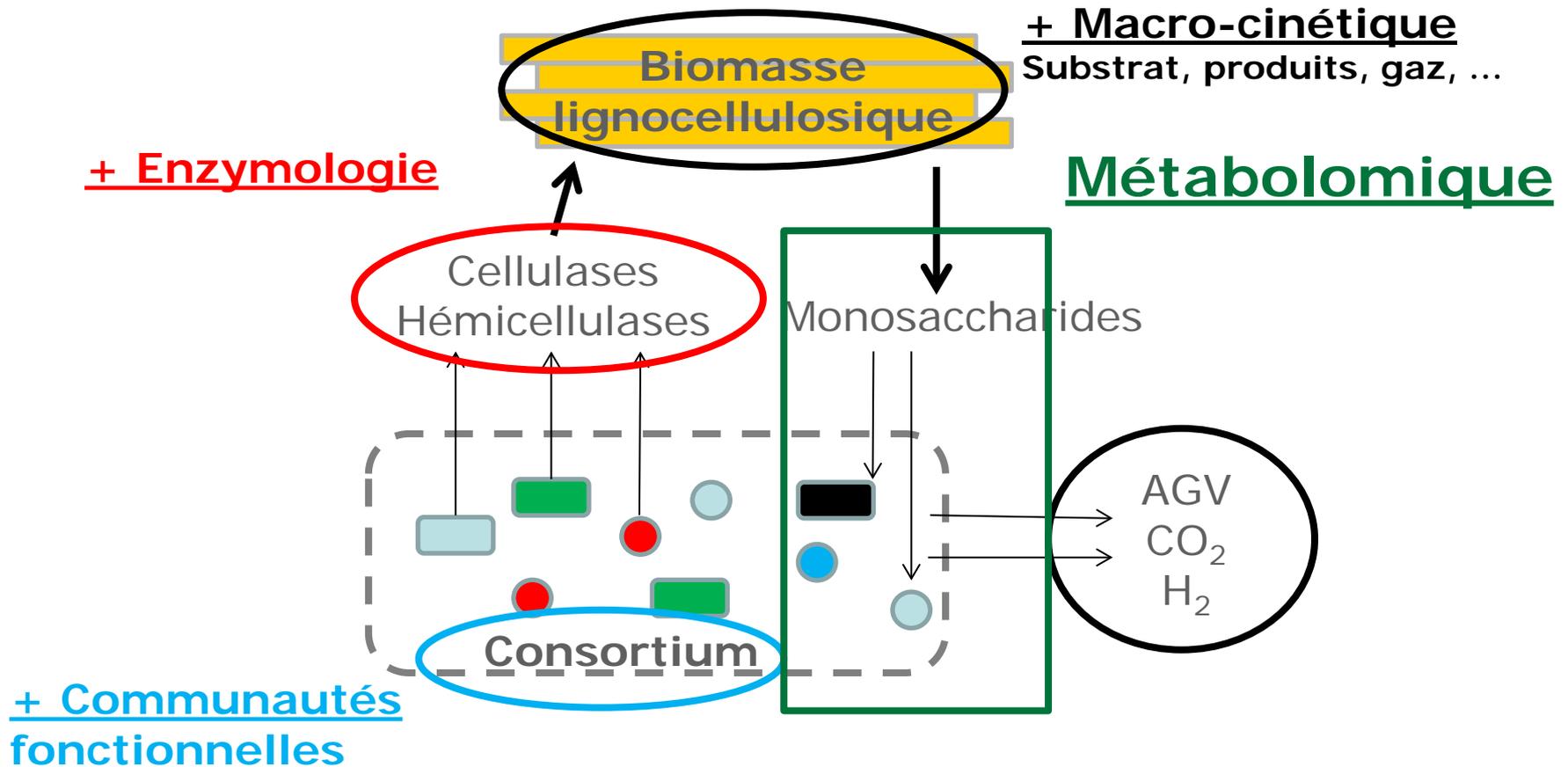
- Objectif : considérer le consortium lignocellulolytique dans son ensemble et comprendre son fonctionnement métabolique



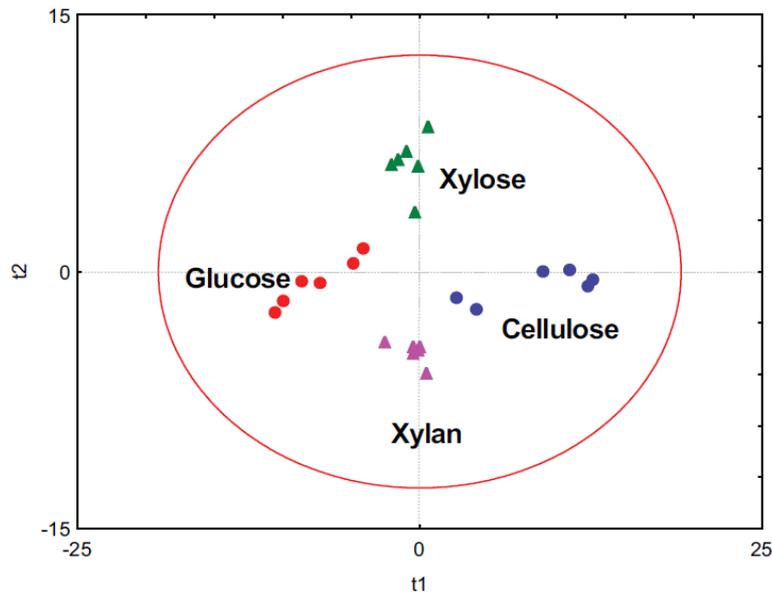
- Objectif : considérer le consortium lignocellulolytique dans son ensemble et comprendre son fonctionnement métabolique



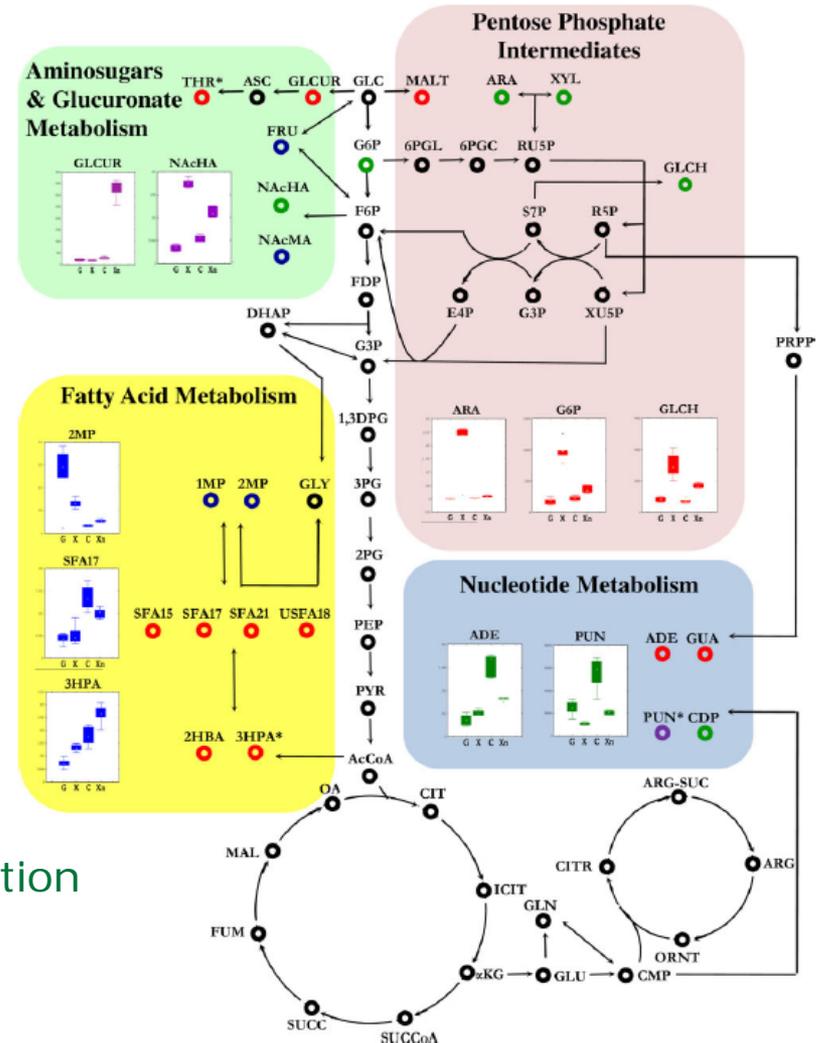
- Objectif : considérer le consortium lignocellulolytique dans son ensemble et comprendre son fonctionnement métabolique



- Souches pures

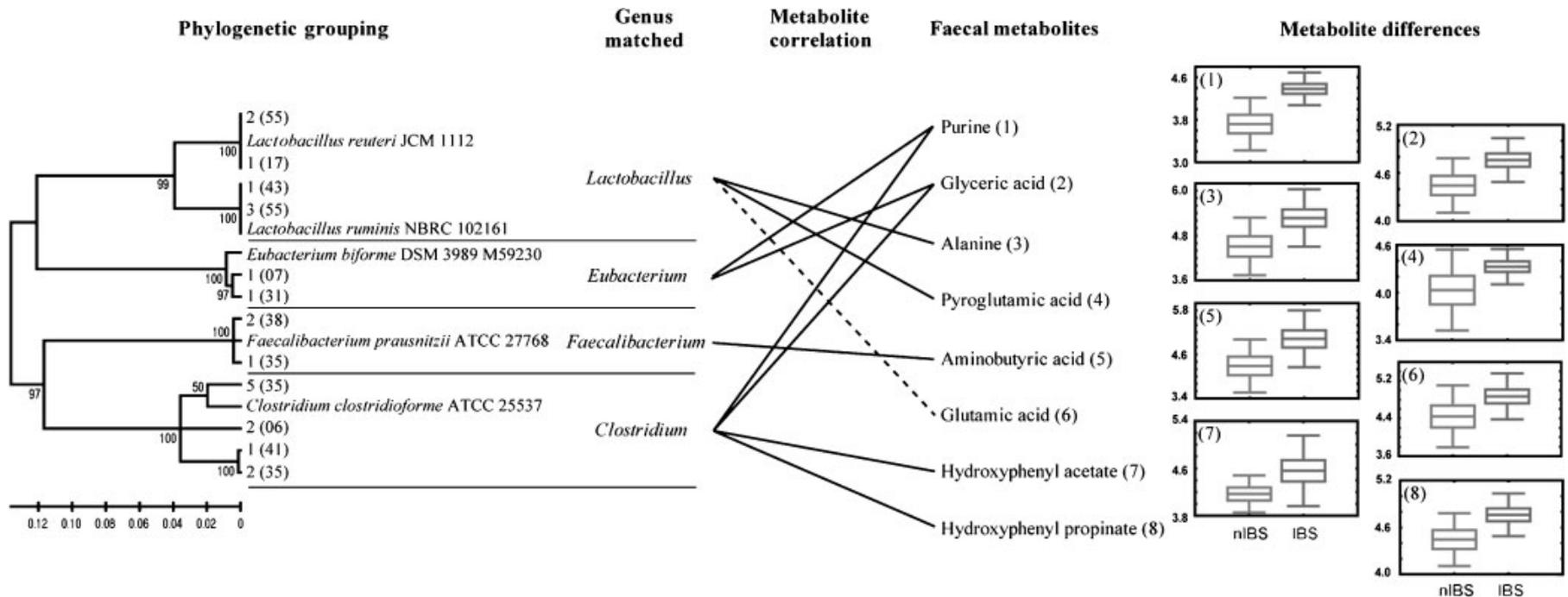


Changement du profil métabolique en fonction de la source de carbone *Saccharophagus degradans*, Shin et al., 2009



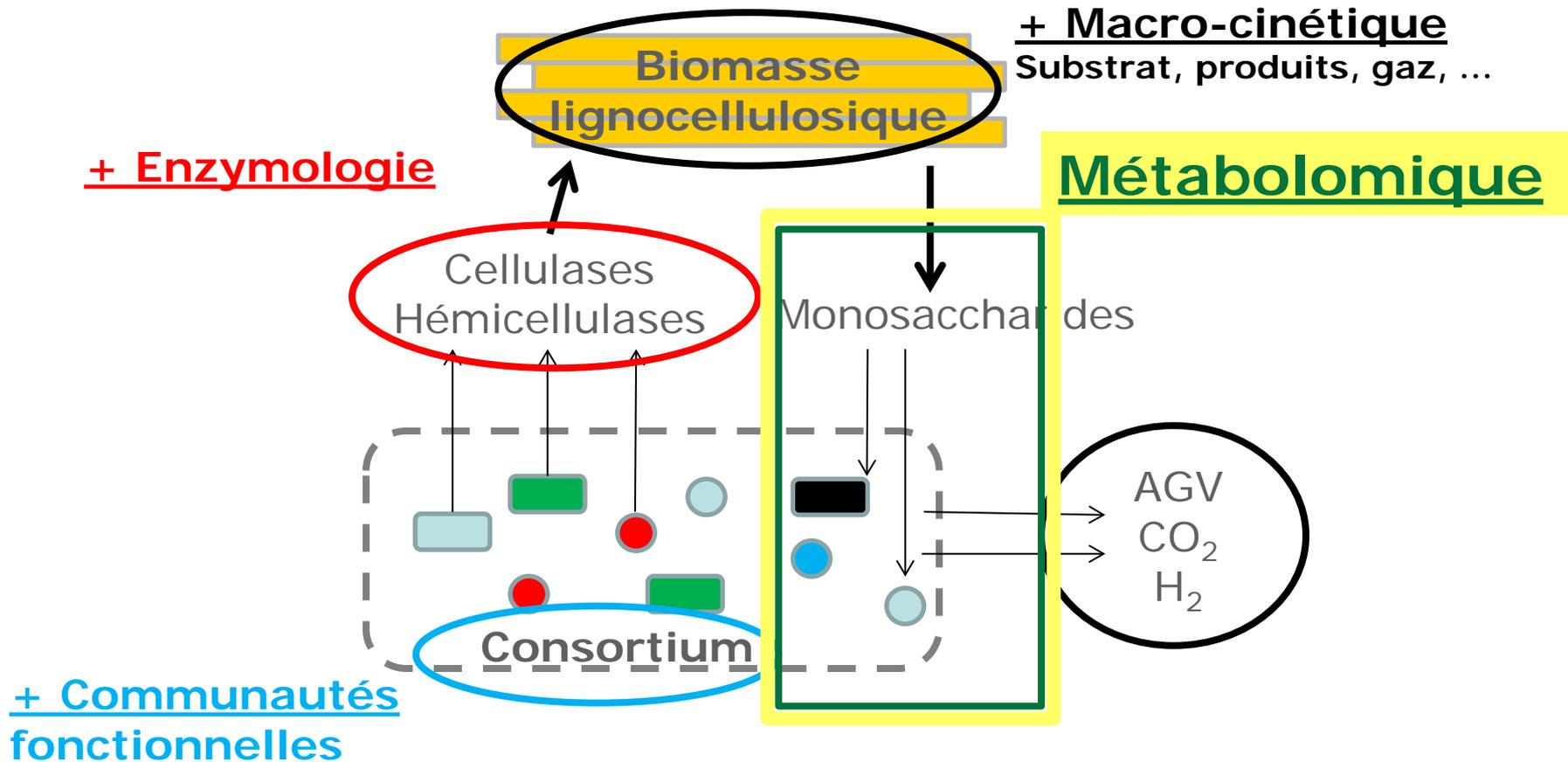
- Microbiote humain:**

- communautés bactériennes symbiotes (*Bowel syndrome*)



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

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



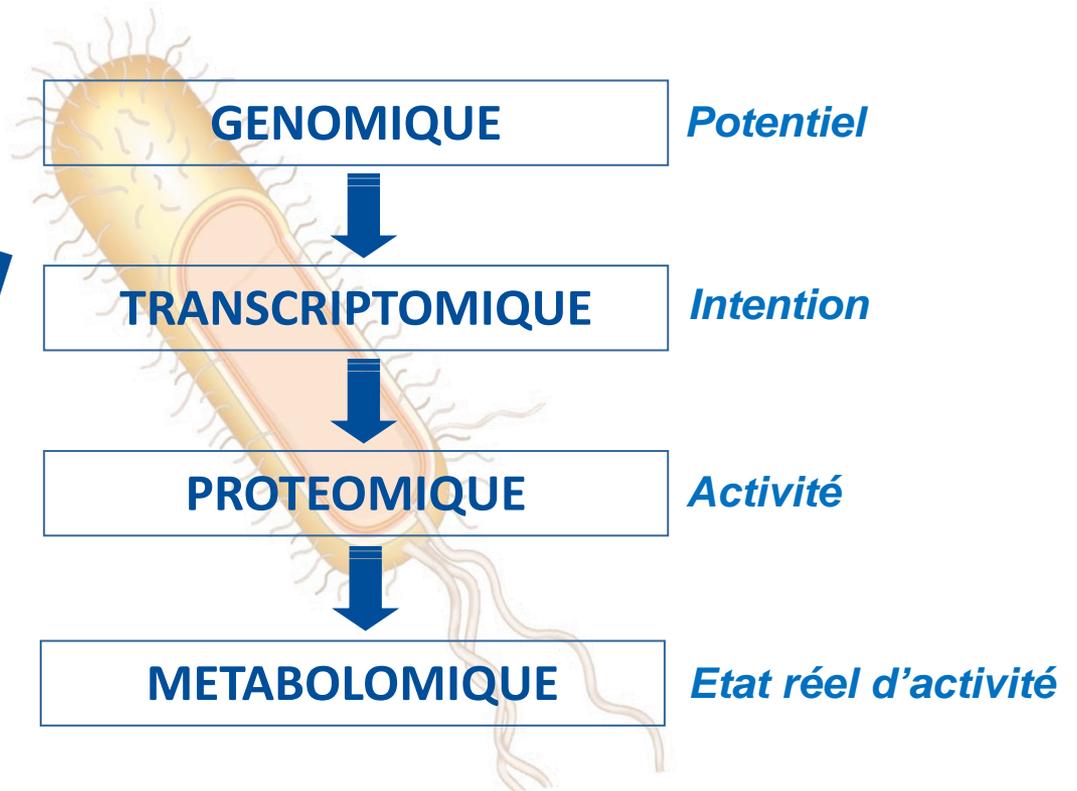
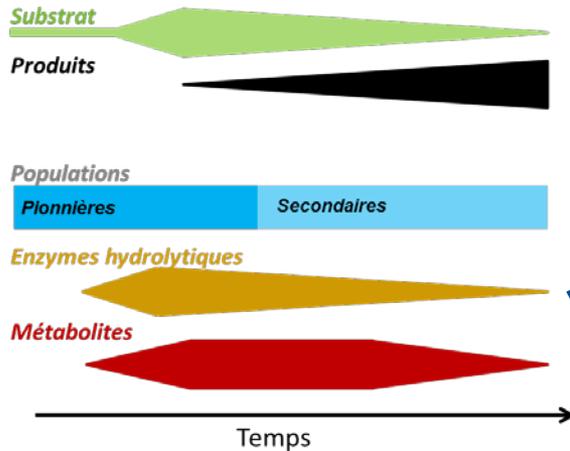
**Enrichissement consortium lignocellulolytique modèle**



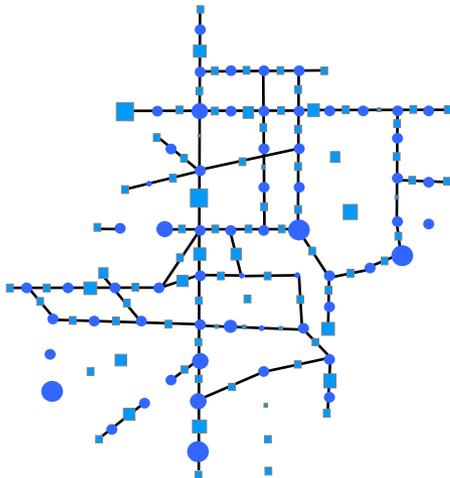
**Validation analytique (méthode de quenching)**

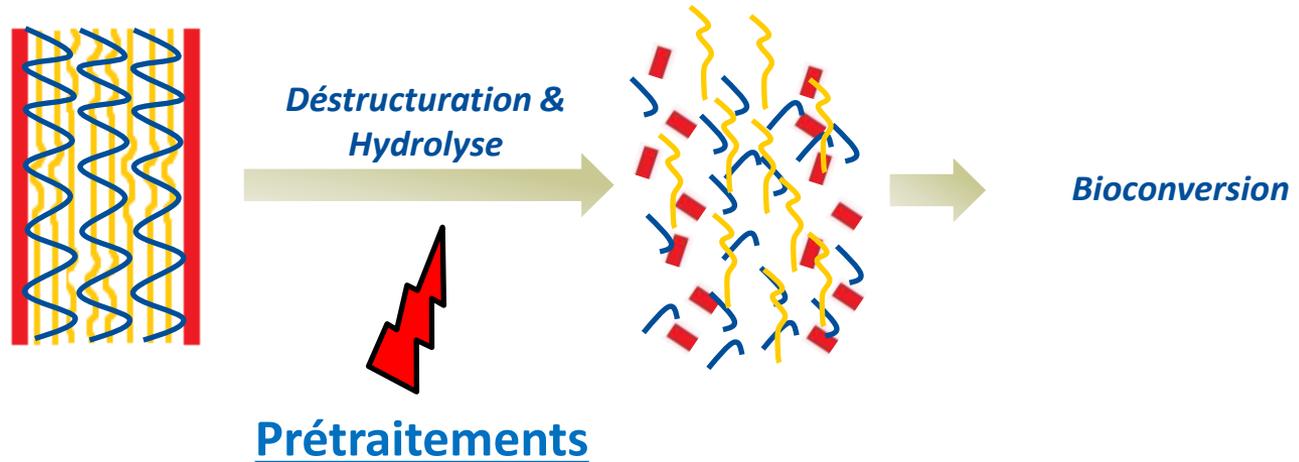


<b>Substrats</b>			
<b>Cellulose</b> soluble	<b>Cellulose microcristalline</b> Avicell - insoluble	<b>Hémicellulose</b> Xylan - hêtre	<b>Lignocellulose modèle</b> Cellulose-Hémicellulose- Lignine
<b>Cinétique de production d'acides organiques</b>			
Rapide C6	Limitée par l'hydrolyse C6	Limitée par l'hydrolyse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

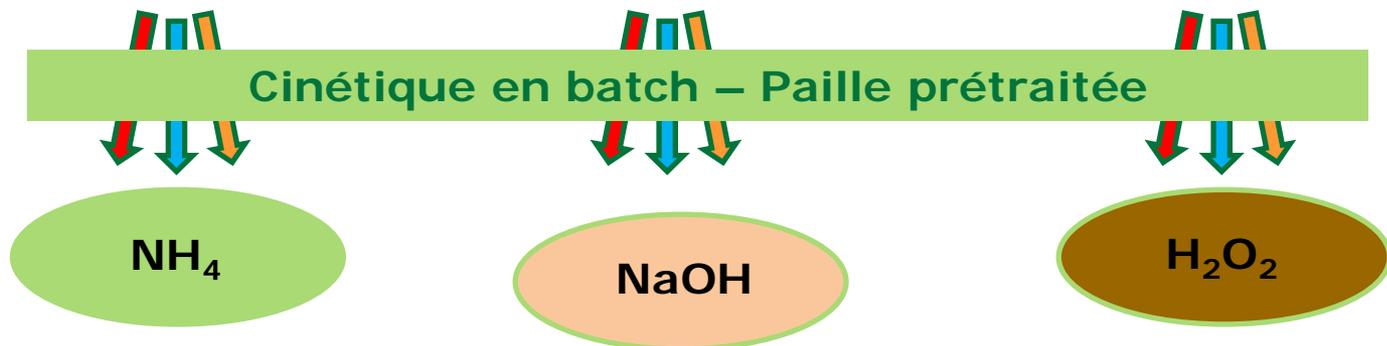


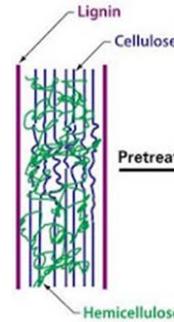
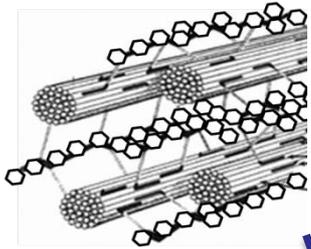
Depuis les potentialités du consortium  
à la mise en évidence des réseaux métaboliques





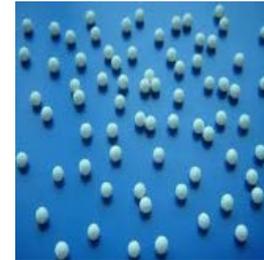
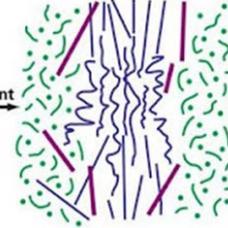
Consortium enrichi rumen-réacteur





## Prétraitement

Pretreatment



*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 !

