

PROPOSITION DE PROJET ECCOREV

Titre : Mise au point d'une méthode de suivi du métabolisme biologique par micro-calorimétrie

Ce projet de recherche réunit trois Laboratoires de la Fédération ECCOREV qui souhaitent proposer un projet commun de recherches permettant de mettre en commun leurs savoir-faire respectifs :

- Le Laboratoire de Mécanique, Modélisation et Procédés Propres (M2P2 – UMR CNRS 6181), situé dans la Technopole de Château-Gombert et l'Europole de l'Arbois, et dirigé par Patrick Bontoux ,
- Le Laboratoire de Biotechnologie des Champignons Filamenteux (LBCF – UMR 1163) situé dans le Bâtiment B de l'ESIL sur le Campus de Luminy, et dirigé par Jean-Claude Sigoillot
- Le Laboratoire de Microbiologie et Biotechnologie des Environnements Chauds (LMBEC – UMR 180) situé dans le Bâtiment B de l'ESIL sur le Campus de Luminy, et dirigé par Jean-Luc Tholozan.

I. LE CONTEXTE

Les trois Laboratoires de ce projet disposent de longue date dans leurs domaines respectifs d'un savoir reconnu dans leurs domaines d'intervention : le traitement des eaux pour le laboratoire M2P2, la biotechnologie des champignons filamenteux pour l'UMR 1163, et la microbiologie des environnements extrêmes pour l'UMR 180. Le premier Laboratoire (M2P2) a une expertise importante dans le domaine de la mécanique des fluides et de la modélisation des écoulements en milieu poreux appliquée aux procédés d'épuration biologique des eaux dont les sites incorporant des végétaux. Les réalisations de l'Equipe de Traitement des Eaux lui fournissent une expertise importante sur la description mathématique des procédés biologiques d'épuration liquide. Le besoin de compétences complémentaires dans le domaine de la microbiologie pour décrire plus finement le fonctionnement de ces systèmes motive ce rapprochement avec les deux autres Laboratoires dans le dépôt de ce projet ; l'acquisition récente d'un calorimètre à haute sensibilité va permettre d'introduire de nouveaux indicateurs biologiques dans ces modélisations. L'UMR 1163 possède une grande expertise dans la mise en œuvre des champignons filamenteux, et dans l'amélioration de souches productrices d'enzymes industrielles par génétique formelle. Son intérêt pour le métabolisme des composés à noyaux aromatiques lui a permis de se concentrer sur les vecteurs d'expression hétérologues permettant d'améliorer les propriétés catalytiques des enzymes-clés impliquées dans les propriétés de conversion ou de transformation de composés industriels. La famille des cinnamoyl-esterases qui jouent un rôle notable dans la déstructuration des lignines, permet d'envisager la fermentation des composés libérés comme matière première pour la production de carburants de substitution aux énergies fossiles. Après la mise en œuvre de ces composés à partir de cellules entières, l'UMR s'intéresse aujourd'hui à l'emploi des enzymes purifiées dans ces procédés de bioconversion. L'UMR 180 s'intéresse au métabolisme aérobie et anaérobie des microorganismes extrêmophiles, l'isolement, la description et la caractérisation de ces microorganismes permettant la découverte de propriétés métaboliques originales susceptibles d'apporter des améliorations notables aux procédés biologiques existants. Les *Bacteria* et *Archaea* de la Collection de microorganismes (certifiée ISO 9001:2008) du laboratoire présentent des cinétiques plus rapides de conversion, et des spécificités parfois originales, comme déjà démontré dans les réactions de conversion de composés aromatiques hydroxylés. Outre les bactéries déjà en collection, le Laboratoire est susceptible de poursuivre le screening et la collecte de nouveaux échantillons permettant de découvrir de nouvelles propriétés catalytiques.

II. LES OBJECTIFS

II.1. Présentation du projet

Les objectifs de ce projet de recherche sont de faire converger trois approches différentes de la mise en œuvre des microorganismes dans un procédé de déstructuration des lignocelluloses par des champignons filamenteux ou des enzymes purifiées obtenues à partir de ces microorganismes, puis d'associer à cette étape des cultures de bactéries utilisant les molécules libérées par la première étape de déstructuration pour optimiser le rendement de conversion de cette matière première en molécules organiques susceptibles d'être utilisées comme biocarburant : hydrogène gazeux ou éthanol. Il s'agit d'obtenir le flux de carbone et d'hydrogène le plus important lors de la conversion en biocarburants des différentes sources synthétiques et naturelles mises en œuvre dans le projet.

Les techniques actuelles de suivi de ces procédés sont basées sur le suivi indirect des produits du métabolisme (volume gazeux d'hydrogène produit ou quantité d'éthanol dans le bioréacteur). Ce projet a pour objectif de mettre en œuvre une technique ayant déjà fait ses preuves dans tous les suivis de réactions biologiques, la microcalorimétrie. Le Laboratoire M2P2 vient d'acquérir ce matériel et se propose de rechercher grâce à ce matériel des indicateurs d'évaluation du déroulement biologique de l'évolution de cette bioconversion, permettant également de détecter l'apparition précoce de défauts de fonctionnement sur les populations bactériennes ou procédé mixtes (enzymes/microorganismes) mis en œuvre en réacteur modèle. Il s'agit de remplacer les déterminations diagnostiques réalisées par les techniques moléculaires, lourdes et longues à mettre en œuvre, par l'acquisition rapide et *in situ*, des signaux thermiques collectés en continu dans les cellules microcalorimétriques.

II.2. Contribution de l'UMR 1163

Les procédés de bioconversion des lignocelluloses en carburants de deuxième génération font l'objet de très nombreuses études nationales ou internationales. La mise en œuvre de champignons filamenteux dans la déstructuration de la cellulose en vue de produire de nouveaux biocarburants fait l'objet d'un grand projet national auquel participe l'UMR 1163. Les efforts portent sur l'optimisation de la mise en œuvre des champignons filamenteux (procédé et production enzymes), associée à l'emploi de bactéries susceptibles d'utiliser les molécules libérées. Les essais prometteurs réalisés sur les champignons filamenteux permettent aujourd'hui d'envisager la mise en œuvre d'enzymes purifiées à la place de cellules entières de champignons. La contribution principale de cette UMR sera donc l'association de ces enzymes à d'autres microorganismes dans les réacteurs de l'étude. Ce projet nécessitera la culture en grand volume de champignons filamenteux, en vue des étapes de purification préparative des enzymes de déstructuration des lignocelluloses. Les volumes importants de cellules obtenus seront cassés, et les contenus cellulaires passés sur la chaîne HPLC streamline de purification liquide, permettant d'isoler les fractions présentant des activités ligninases et cellulases maximales. Les financements demandés par l'UMR 1163 (2800 euros) permettront de financer les productions en grands volumes nécessaires.

III.3. Contribution de l'UMR 180

L'apport de l'UMR 180 dans le projet est la mise en œuvre coordonnée des bactéries permettant de transformer les oses libérés par l'hydrolyse de la cellulose en hydrogène ou éthanol. Les premiers essais réalisés ont permis d'associer un microorganisme thermophile, *Thermotoga*, capable de mettre en œuvre la voie des pentoses phosphates pour augmenter les flux métaboliques vers la production d'hydrogène. Les travaux proposés dans ce projet sont la recherche et l'association d'autres bactéries extrêmophiles pour développer la production d'hydrogène ou d'éthanol pour optimiser le procédé. Le laboratoire se propose aussi de travailler sur les associations simples de bactéries à métabolisme coordonné, et d'en assurer le suivi dynamique et l'évolution de l'écologie à l'aide de sondes moléculaires. Les financements

demandés par l'UMR 180 (2800 euros) permettront de financer les amorces spécifiques et les suivis PCR de quantification de la biomasse mise en œuvre dans les différents réacteurs expérimentaux.

III.4. Contribution du Laboratoire M2P2

Le Laboratoire M2P2 vient d'acquérir, en 2009 pour une valeur de 106 000 € TTC, un microcalorimètre permettant de quantifier au microjoule les avancements de réactions ayant lieu dans les systèmes biologiques qui seront étudiés. Les premiers essais permettent une bonne maîtrise des différentes fonctions de ce nouvel appareil. Ils en montrent également les limites dans le suivi de ces réactions, qui ne permettent le suivi que sur un temps très court des métabolismes aérobies, les cellules étant totalement hermétiques pendant l'acquisition des paramètres de mesure. Ce projet permettra d'acquérir deux cellules de mesures (référence et cellule de mesure) permettant l'aération en continu des échantillons analysés, et donc un suivi continu réaliste des phénomènes se déroulant en conditions aérobies, microaérophiles ou anaérobies. Les financements demandés (4400 euros) par le laboratoire M2P2 permettront l'acquisition des deux cellules de mesure aérées du calorimètre CETARAM QC80.

III. LES REALISATIONS PREVUES

III.1. Les bioréacteurs

Dispositif numéro 1

Les réacteurs de mise en œuvre des réactions de conversion seront des réacteurs colonne en verre de 10 cm de diamètre et de 50 cm de long. Ces réacteurs seront remplis de deux types de supports différents : des billes de verre calibrées pour étudier les cinétiques de colonisation des surfaces et d'implantation de la biomasse, de la bagasse de canne à sucre comme support naturel, permettant à la fois de comparer les cinétiques d'implantation de la biomasse aux supports modèles, et le suivi du devenir de la biomasse immobilisée sur ces supports.

Ces réacteurs seront alimentés par des suspensions cellulaires en milieu de culture pour l'implantation de la biomasse sélectionnée (champignons filamenteux-*Pycnoporus cinnabarinus*, *Trichoderma reesei*, bactéries-*Thermotoga maritima*, puis autres bactéries productrices d'hydrogène *Hydrogenobacter*, ...), puis par un courant de milieu de culture liquide. Le réacteur rempli de billes de verre sera en outre alimenté en source de carbone et d'énergie pour permettre la bioconversion en hydrogène et éthanol.

Dispositif numéro 2

Ce dispositif sera comparé à des réacteurs contenant les suspensions d'enzymes purifiées et des bactéries productrices d'hydrogène à partir des champignons filamenteux. Le dispositif numéro servira de référence pour la comparaison des performances des deux dispositifs.

Pilotage du fonctionnement des deux dispositifs

Une fois les deux dispositifs établis en fonctionnement stabilisé, les paramètres de l'alimentation des réacteurs seront modifiés pour établir les limites des plages de fonctionnement optimum des deux systèmes : rendement maximal de conversion des sources de carbone et d'énergie.

III.2. Les suivis réalisés

Les suivis de la biomasse seront réalisés par des observations microscopiques sur des prélèvements des supports de fixation de la biomasse effectués régulièrement dans les réacteurs expérimentaux. Ces observations préliminaires seront complétées par une quantification précise de la biomasse fixée sur ces supports : identification des microorganismes implantés sur les deux

types de support, et quantification dans le temps du niveau de chacun des microorganismes à l'aide des amorces spécifiques et PCR. Les quantifications de biomasse obtenues seront comparées aux signaux obtenus à partir des cellules du microcalorimètre contenant des échantillons identiques. Ces mesures seront complétées par le suivi en chromatographie des quantités d'hydrogène et d'éthanol produites dans chaque type de réacteur.

Ces phases de calibration et maîtrise du système pour l'interprétation des paramètres de fonctionnement des systèmes biologiques et du suivi en microcalorimétrie vont permettre l'obtention des courbes de signaux correspondant aux conditions optimales de fonctionnement des deux systèmes (suspensions cellulaires sur support synthétique/lignine – suspensions cellulaires/enzymes-suspensions bactérienne). Les plages de latitude du fonctionnement optimum de ces réacteurs dans l'étape de pilotage des réacteurs, vont ensuite permettre d'établir en comparant les données obtenues par les techniques moléculaires et microcalorimétriques, les modulations des courbes signaux du microcalorimètre permettant d'établir des indicateurs précoces de déséquilibre du fonctionnement des bioréacteurs.

IV. LE CONSORTIUM

Le projet réunit trois Laboratoires de la Fédération ECCOREV, le Laboratoire (M2P2), situé sur le plateau de l'Arbois, le Laboratoire de Biotechnologie des Champignons Filamenteux (LBCF – UMR 1163) situé dans le Bâtiment B de l'ESIL sur le Campus de Luminy, et le Laboratoire de Microbiologie et Biotechnologie des Environnements Chauds (LMBEC – UMR 180) également situé dans le Bâtiment B de l'ESIL sur le Campus de Luminy.

Les Equipes concernées dans ces trois Laboratoires sont l'Equipe de Traitement des Eaux, animée par Nicolas ROCHE pour le Laboratoire M2P2, l'Equipe de Modelage des Génomes Fongiques animée par Eric Record, et l'Equipe Processus de Transformation Fongiques animée par Jean-Claude Sigoillot (de l'UMR 1163), l'Equipe de Microbiologie Anaérobie animée par Bernard Ollivier pour l'UMR 180.

IV.1. Laboratoire de Mécanique, Modélisation, et Procédés Propres

Le Laboratoire M2P2 est positionné sur l'interface entre la Mécanique des Fluides Numérique et le Génie des Procédés. Il réunit 9 Equipes de recherche qui sont réparties sur deux sites : Château-Gombert pour la partie Mécanique des Fluides Numérique et l'Europole de l'Arbois pour la partie Génie des Procédés. Du point de vue des applications de nombreuses études du laboratoire ont pour objet la protection de l'environnement et le développement de procédés propres.

Les personnels concernés par ce projet sont 1PR à 10% (Nicolas Roche), 1 MCF à 10% (Jean-Henry Ferrasse), 1 MC à 15% (Audrey Soric), et un stage de master par an.

IV.2. Laboratoire de Biotechnologie des Champignons Filamenteux

L'objectif de l'UMR 1163 est de produire des connaissances génériques sur les champignons lignocellulolytiques en y associant des méthodologies appropriées, afin d'améliorer leurs potentialités de transformation des lignocelluloses.

L'activité de l'UMR se décline en trois thèmes :

- Le thème A est dédié à l'exploration des relations phylogénie / fonctions enzymatiques de la biodiversité des champignons lignocellulolytiques. Il s'appuie essentiellement sur le Centre International de Ressources Microbiennes-Champignons Filamenteux de l'unité (CIRM-CF).
- Le thème B concerne le modelage des génomes fongiques afin de construire des lignées spécialisées pour les opérations de transformation des lignocelluloses.
- Le thème C porte sur la production et l'amélioration des enzymes lignocellulolytiques ciblées grâce à l'étude structurale de ces enzymes et la construction hétérologue d'enzymes lignocellulolytiques multi-modulaires (chimères et nanosomes) permettant de disposer d'outils enzymatiques modulables adaptés à la transformation des parois végétales.

Les personnels concernés par ce projet sont 1PR à 10% (Jean-Claude Sigoillot-Procédés), 1 CR à 10% (Eric Record-Génétique, microbiologie), et un stage de master par an.

IV.3. Laboratoire de Microbiologie et Biotechnologie des Environnements Chauds

L'activité de l'UMR 180 est centrée sur la microbiologie des environnements chauds. Le savoir-faire principal de cette UMR est la description, la caractérisation des bactéries vivant dans ce type d'environnements, bactéries anaérobies, bactéries aérobies et bactéries microaérophiles. Le premier objectif est la collecte d'échantillons dans les environnements chauds (sources hydrothermales terrestres et marines, déserts, bassins d'évaporation chauds, éventuellement salés, ou à pH acide ou basique). Les prélèvements sont ensuite analysés par les techniques moléculaires (PCR couplée à de la DGGE, SSCP, différentes RFLP, métagénomique) permettant de caractériser les flores dominantes des écosystèmes étudiés. Cette étude réalisée dans le domaine des *Bacteria* et *Archaeas* permet ensuite de passer à l'étape d'enrichissement de ses prélèvements, afin d'isoler des microorganismes à propriétés taxonomiques et à physiologie potentiellement originales. Les enrichissements permettent donc d'isoler des bactéries en culture pure, puis de poursuivre leur caractérisation taxonomique jusqu'à la description d'une nouvelle souche, espèce, ou genre bactérien. Les bactéries isolées ont en général des propriétés métaboliques originales (voies métaboliques particulières, ou étapes enzymatiques-clés spécifiques) très performantes, dont les mécanismes et l'enzymologie méritent un approfondissement de connaissances mécanistiques par la voie de la biologie moléculaire (génomique, génétique) ou de la physiologie (transcriptomique, fluxomique). La mise en conditions industrielle de ces bactéries (bioréacteurs de paillasse puis plateformes de bioréacteurs à paramètres strictement contrôlés) permet de caractériser ensuite leur comportement (protéomique) en conditions drastiques représentant l'environnement physicochimique rencontré en routine sur les sites industriels.

Les personnels concernés par ce projet sont 1PR à 10% (Jean-Luc Tholozan), 2 CR à 10% (Nathalie Pradel-Biochimie métabolique et Didier Alazard-Métabolisme), 2 MC à 15% (Jean-Luc Cayol-Taxonomie et Anne Postec-Ecologie moléculaire), et un stage de master par an.