

Etude transcriptomique de la dégradation des parois
lignocellulosiques de son et paille de blé durant la
croissance de *Thermobacillus xylanilyticus*

Thomas Méline, Caroline Rémond, Gaëlle Mongelard, Béatrice
Hermant , Laurent Gutierrez, Harivony Rakotoarivonina

Valorisation de la biomasse lignocellulosique



Bioraffinerie végétale

Produits agrosourcés

- Sucres fermentescibles (éthanol, acides)
- Molécules phénoliques
- Fibres....

Applications

- Chimie
- Transport
- Matériaux
- Industries cosmétiques, pharmaceutiques,...

Biomasse=matière première

- diverses productions agricoles et co-produits

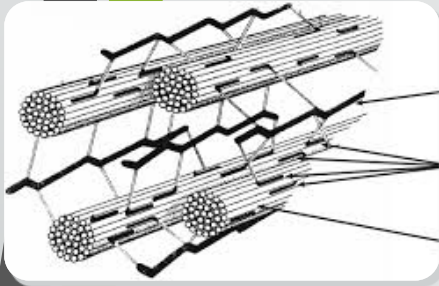


=> Fractionnement : traitements physico-chimiques ,
biologiques (enzymes, micro-organismes)

=> transformations

Fractionnement enzymatique de la biomasse lignocellulosique (BLC)

BLC = riche en molécules d'intérêts



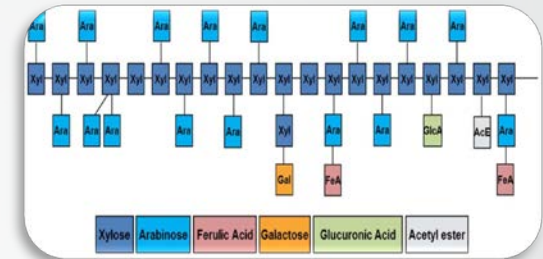
Lignine

Hémicelluloses

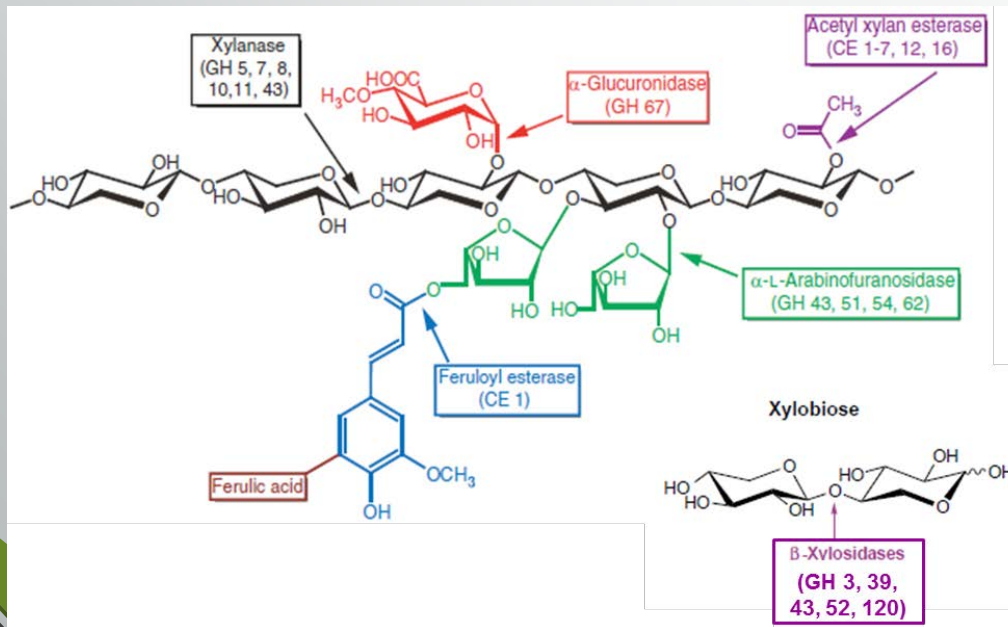
Cellulose



Compositions variables



Arabinoxylanes des graminées



Synergie des enzymes :
endoenzymes et enzymes débranchantes

oligomères ou monomères

Avantages : spécificité d'actions/conditions réactionnelles douces
Inconvénients: efficacité/rendement/coûts,...

Choix d'un micro-organisme modèle :

Thermobacillus xylanilyticus

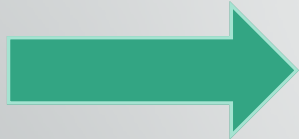
- Bactérie thermophile hémicellulolytique stricte
- Plusieurs hémicellulases caractérisées
- Production d'activités hémicellulolytiques thermorésistantes
- Modulations de la production d'enzymes en fonction des substrats
- Génome séquencé : 4Mpb; 3900 gènes dont 162 gènes putatifs codant pour des enzymes impliquées dans le fractionnement des parois végétales (*en cours d'annotation*)



Intérêt pour réaliser des cocktails enzymatiques efficaces et thermostables

Objectifs

Comment optimiser le fractionnement biologique de la BLC?
Comment designer des cocktails enzymatiques efficaces?



Etudier les fonctionnements et stratégies microbiennes en présence de parois végétales



Etudier les enzymes lignocellulolytiques

Substrats contrastés:

- Xylanes extraits commerciaux
- Son de blé: Ara/Xyl = 0,63, lignines < 5% MS
- Paille de blé: Ara/Xyl = 0,16, 20% lignines MS

Stratégie et démarche expérimentale:

Etude physiologique

Analyse transcriptomique

Croissance microbienne à 50°C :
Glucose, xylane, son et paille (Triplicats)

Evaluation des activités enzymatiques produites

Extraction des ARN

Séquençage des ARNm par RNA seq

Dynamique de mise en oeuvre des hémicellulases clés

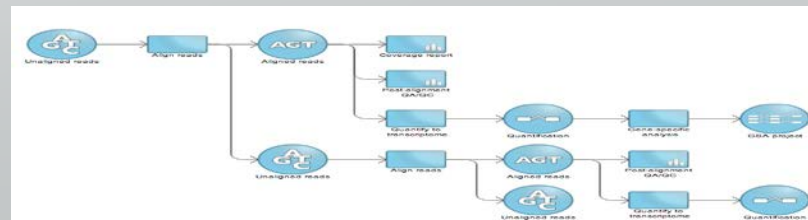
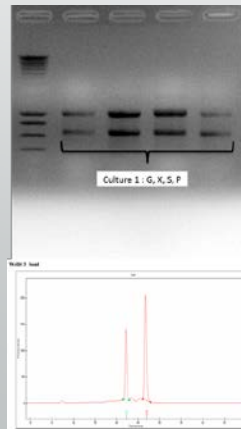
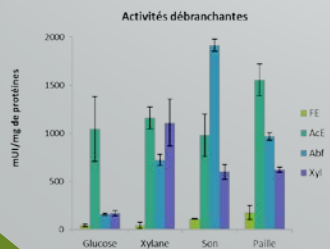
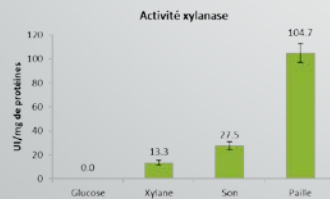
Fin phase exponentielle

Xylanase
Enzymes débranchantes

Contrôle quantité et qualité (RIN)

Banque ADNc
Séquençage MiSeq Illumina
Validation des séquences
Génome de référence

Niveaux d'expression





Résultats :

Analyse transcriptomique par RNA seq

Séquences obtenues en RNAseq

Séquençage réalisé en triple

Glucose: 6 millions, xylane : 3 millions,

Son de blé: 4,3 millions, paille de blé 5,5 millions

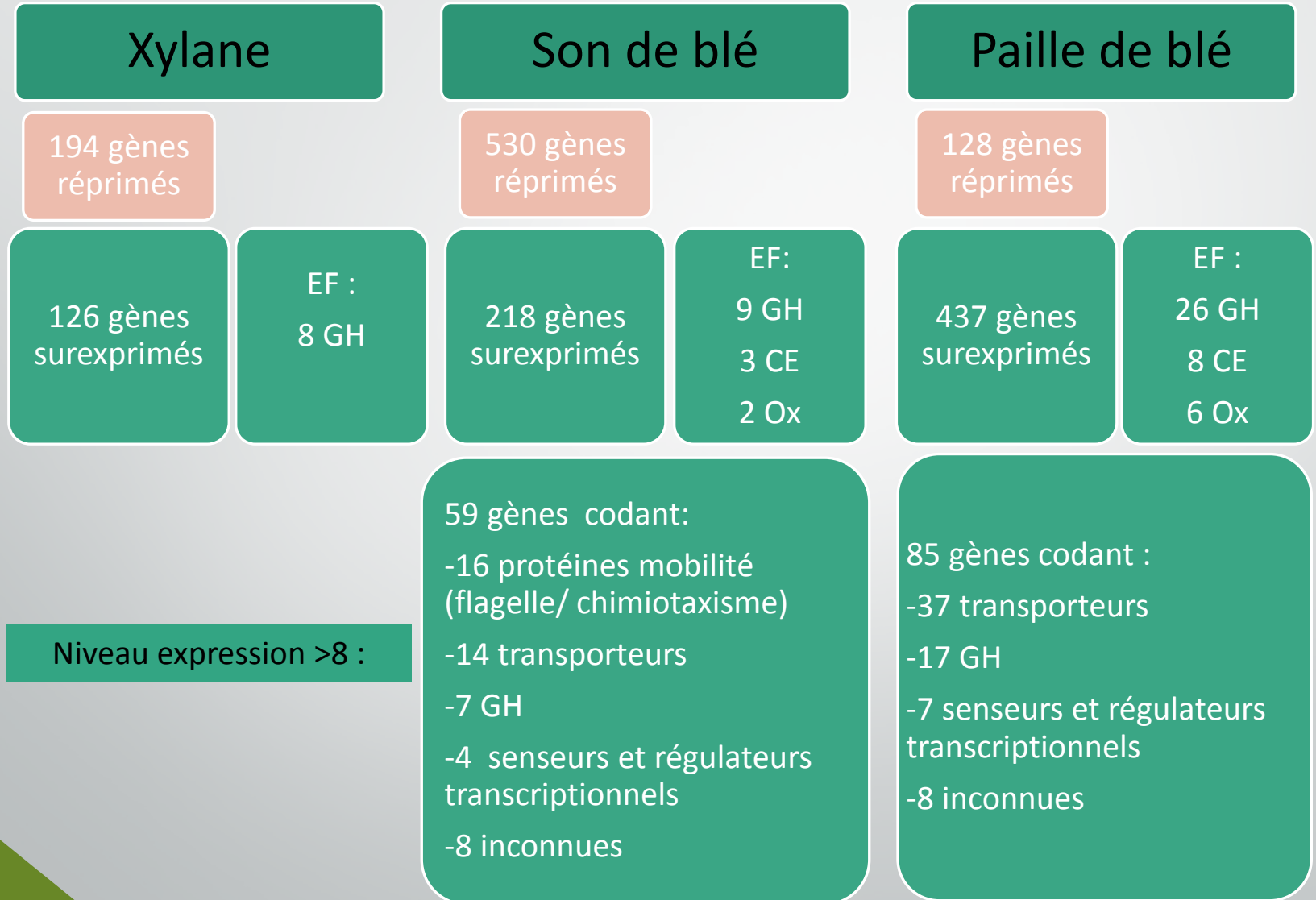
Couverture du transcriptome de Tx de 84 à 98 fois environ

Pré-alignement des séquences	Séquences « brutes »	Séquences « découpage »
%GC	55,5 ± 5,8	55,6 ± 0,1
%N (bases ambiguës)	1,6 ± 3,8	8,2E-05 ± 4E-05
Longueur des séquences (pb)	154,2 ± 30	160,2 ± 14
Q-score	34,5 ± 3,8	36,5 ± 1



60% (glucose), 64% (son), 83% (paille) et 86% (xylane) d'alignement/référence

Analyse spécifique des gènes exprimés



EF : enzymes de fractionnement; GH : glycoside-hydrolases; CE: carbohydrate estérase; Ox : oxydases

Analyse spécifique des enzymes de fractionnement

Analyse des gènes caractérisés:

Gènes	Xylane	Son	Paille	Contig
<i>tx-xyn11</i> xylanase	15.4x	37.9x	287x	14
<i>tx-abfD3</i> arabinosidase	5.4x	15.3x	5.9x	6
<i>tx-est1</i> estérase	-	-	6.9x	6

Groupe de gènes surexprimés sur toutes les conditions

Gènes	Xylane	Son	Paille	Contig
<i>tx-xyn11</i> xylanase	15,4x	37,9x	287,0x	14
<i>tx-3856</i> xylanase	11,7x	65,9x	42,0x	1
<i>tx-2211</i> arabinosidase/xylosidase	20,9x	42,2x	9,4x	31
<i>tx-3352</i> xylanase	6,5x	7,2x	8,4x	6
<i>tx-3452</i> xylanase	6,0x	4,3x	8,9x	6
<i>tx-3454</i> glucuronidase	13,0x	15,3x	4,8x	6
<i>tx-3354</i> arabinosidase	5,4x	2,3x	5,9x	6

Cluster

Niveaux d'expression différents selon les substrats

Analyse spécifique des enzymes de fractionnement

Groupe de gènes surexprimés uniquement sur la paille

Gènes	Surexpression	Contig
<i>tx-xyn11</i> (copie 2) xylanase	21x	14
<i>txyl-3008</i> xylanase	14,5x	56
<i>tx-3004</i> xylosidase/arabinosidase	26,4x	56
<i>tx-3009</i> xylosidase	12,1x	56
<i>tx-est1</i> estérase	6,9x	6
<i>tx-1733</i> estérase	5,49x	40
<i>txyl-2002</i> estérase	16,8x	26
<i>txyl-2490</i> estérase	20,7x	26

Plusieurs *polysaccharides utilization loci* identifiés :

- Contig 56 : 21 gènes co-régulés : GH + oxydases + senseurs, régulateurs transcriptionnels et transporteurs de sucres
- Contig 26 : 25 groupes de gènes : GH + estérases + senseurs, régulateurs transcriptionnels et transporteurs de sucres

Conclusions :

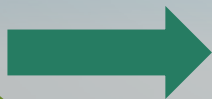
1^{er} séquençage du transcriptome de *T.xylanilyticus*

Corrélation entre activités produites et niveaux de transcription

- Forte activité xylanase sur paille, nombreux transcrits codant pour des xylanases
- Forte activité arabinosidase sur son et transcrits GH51 et GH43 surexprimés
- Augmentation activité estérase sur paille : 7 transcrits CE

Complexité du substrat

- Gradient de surexpression en fonction du substrat lignocellulosique à fractionner
- Surexpression Paille > Son > Xylane



Meilleure compréhension des dynamiques des hémicellulases en fonction des substrats végétaux à fractionner

Retombées

Le projet Hydroseq:

Initiation collaboration entre UMR FARE et CRRBM : co-encadrement étudiant M2

UMR FARE

- Identification d'enzymes clés du fractionnement
- Synergies enzymatiques efficaces
- Réduire les coûts des enzymes
- Essor de la bioraffinerie végétale

CRRBM

- Utilisation des équipements et des compétences de pointe de la plateforme
- Développement de nouvelles méthodologies : RNA seq et traitement des données de séquençage
- Réseau d'utilisation de la plateforme

Publication en cours de rédaction :

- résultats obtenus lors des analyses génomique, transcriptomique et physiologique de *T. xylanilyticus* en présence de BLC
- application des enzymes identifiées (PUL) lors des différentes approches en présence de BLC



Merci de votre attention