Exploration de la biodiversité des champignons filamenteux

Applications dans le domaine des biotechnologies

Lesage-Meessen Laurence, Jean-Guy Berrin, Anne Favel, Anne Lomascolo, Craig Faulds

Colloque **Les champignons**
3-4 juin 2015

Présentation

UMR1163 Biodiversité et Biotechnologie Fongiques,

INRA/AMU, Polytech-Marseille Luminy

dirigée par le Professeur Craig Faulds

Thématiques de l'UMR*: Etudes de la biodiversité fongique au plan taxonomique, enzymatique et génomique pour des applications dans le domaine de la chimie verte*

Laurence Lesage-Meessen

Chercheur INRA,

Biotechnologie des Champignons Filamenteux lignocellulolytiques

UMR BBF 1163

UMR 1163 BCF

INRA Institut National de la Recherche Agronomique

Aix*Marseille université

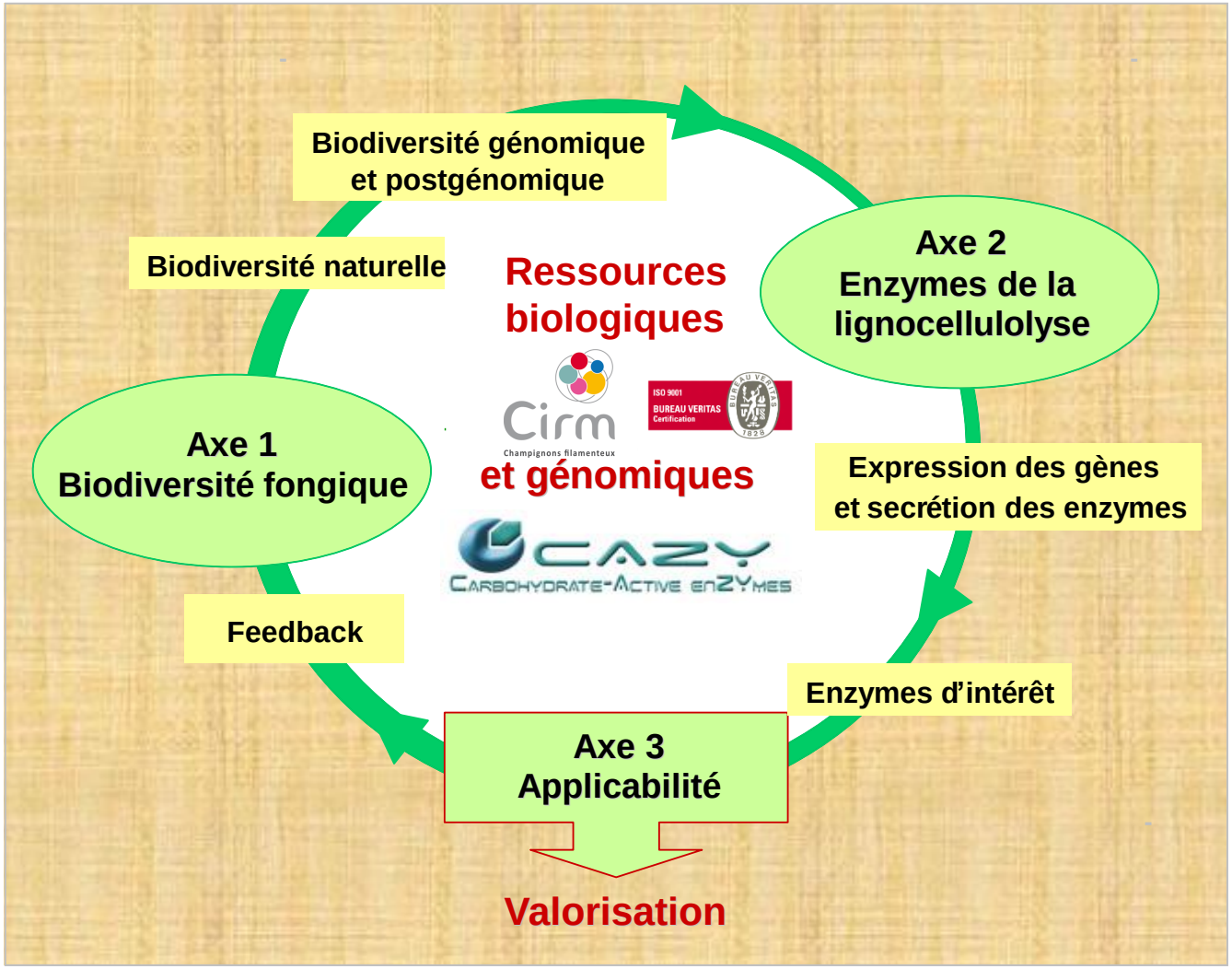
Cirm Champignons filamenteux

UMR1163 Biodiversité et Biotechnologique Fongiques

UMR 1163 BBF

INRA Institut National de la Recherche Agronomique

Aix*Marseille université



Plan

- Collection **CIRM-CF** de champignons filamenteux d'intérêt agro-industriel hébergée par l'unité

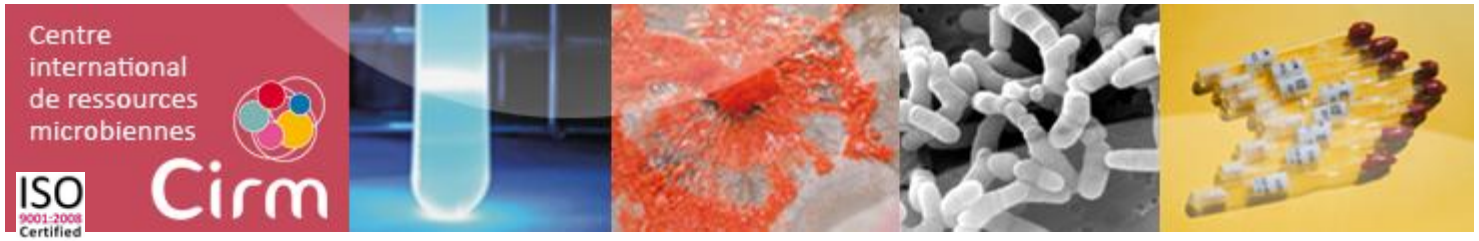
- **Exploration de la biodiversité des champignons filamenteux** pour des applications dans le domaine des biotechnologies

  I. Approche globale : Exploration de la biodiversité enzymatique fongique naturelle pour la production de bioéthanol 2G

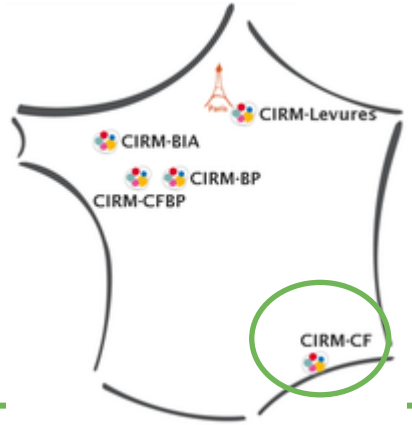
  II. Approche ciblée sur un genre : Exploration de la biodiversité du genre *Pycnoporus* par analyse phylogénétique et recherche de nouvelles enzymes d'intérêt (eg laccases)

  III. Approche ciblée sur un groupe : Exploration de la diversité enzymatique du groupe *Aspergillus niger* aggregate : relation phylogénie / fonction enzymatique (eg activité estérase)

Le CIRM : Centre International de Ressources Microbiennes de l'INRA



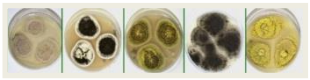
- Le CIRM est un réseau de cinq collections INRA dédiées à la **conservation** et à l'**exploration** de la diversité microbienne (15 000 souches de bactéries, levures et champignons filamenteux). Le CIRM répond à la certification ISO 9001, est labellisé CRB IBiSA et reconnu Plateforme Stratégique Nationale par la CNOC (*https://www6.inra.fr/cirm/*).
- Le CIRM est distribué sur 5 sites sur des thématiques différentes.



- Bactéries d'intérêt alimentaire (**CIRM-BIA Rennes**)
- Bactéries pathogènes de l'animal et de l'homme (**CIRM-BP Tours**)
- Bactéries associées aux plantes (**CIRM-CFBP Angers**)
- Levures d'intérêt technologique (**CIRM-levures Thivernal-Grignon**)
- Champignons filamenteux d'intérêt agro-industriel (**CIRM-CF Marseille**)

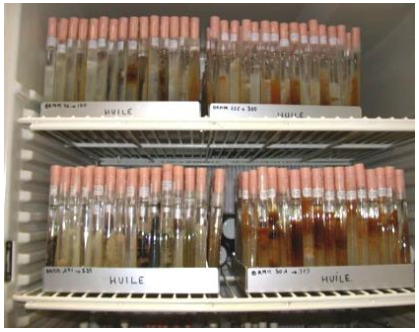
CIRM-Champignons Filamenteux (CIRM-CF) (1)

Cirm
Champignons filamenteux



ISO 9001 BUREAU VERITAS Certification

- **Collection jeune** (2006) née du regroupement de collections (INRA, MNHN, CIRAD, Université Paris Descartes, Université Joseph Fourier de Grenoble…)
- **1685 souches fongiques** (*living cultures*)
  - 75 % de Basidiomycètes (Polyporales) et 25 % d'Ascomycètes
  - 335 genres ; 501 espèces
- **Conservation** selon des hauts standard de qualité et **authentification** au niveau moléculaire (ITS)

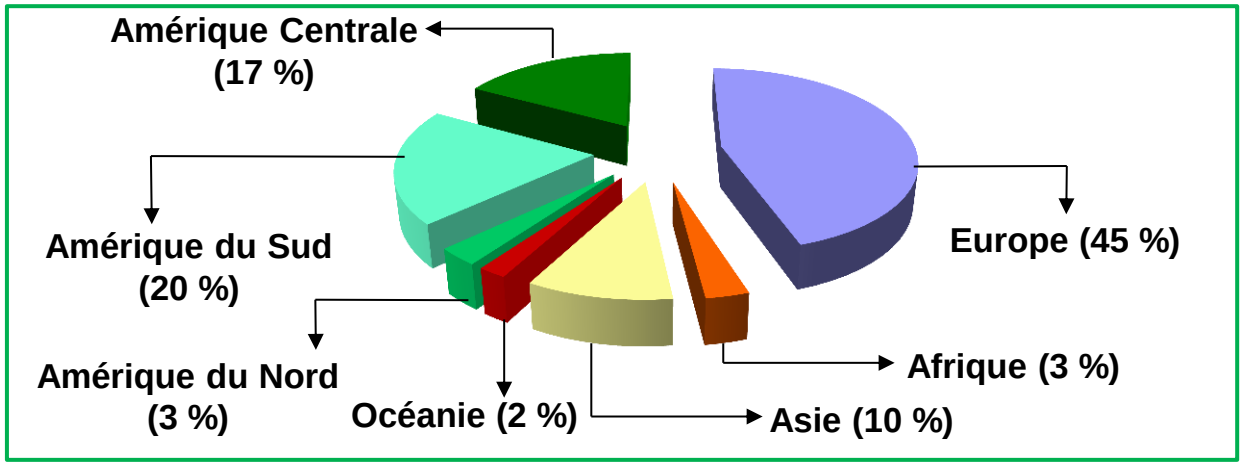


- **Collection attractive par sa spécialisation** (champignons dégradant le bois), son **enrichissement** par des collectes effectuées sur le territoire français, en métropole, mais aussi en Guyane, Guadeloupe, Martinique et Nouvelle-Calédonie.

CIRM-CF: Enrichissement par des collectes de terrain (2)

- 968 spécimens collectés (65 % Polyporales; 35 % ascomycètes)
- 360 cultures positives monomorphes
- 223 pures et authentifiées au niveau moléculaire (ITS)

Une grande diversité géographique



Cirm
Champignons filamenteux

Le CIRM-CF: Riche en données associées et objet de valorisation (3)

❑ Bases de données associées

- ***BRFM database*** (https://www6.inra.fr/cirm/Champignons-Filamenteux:*Catalogue des CIRM*)

- ***Fungene.db*** : outil bioinformatique d'aide à l'identification des souches

  * Constitution d'une base de séquences ITS fiable, adossée à une classification récente et consensuelle (Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 10ème Edition)

  * Identification de séquences type par espèce (contrôle de l'identité d'une souche, aide à l'identification)

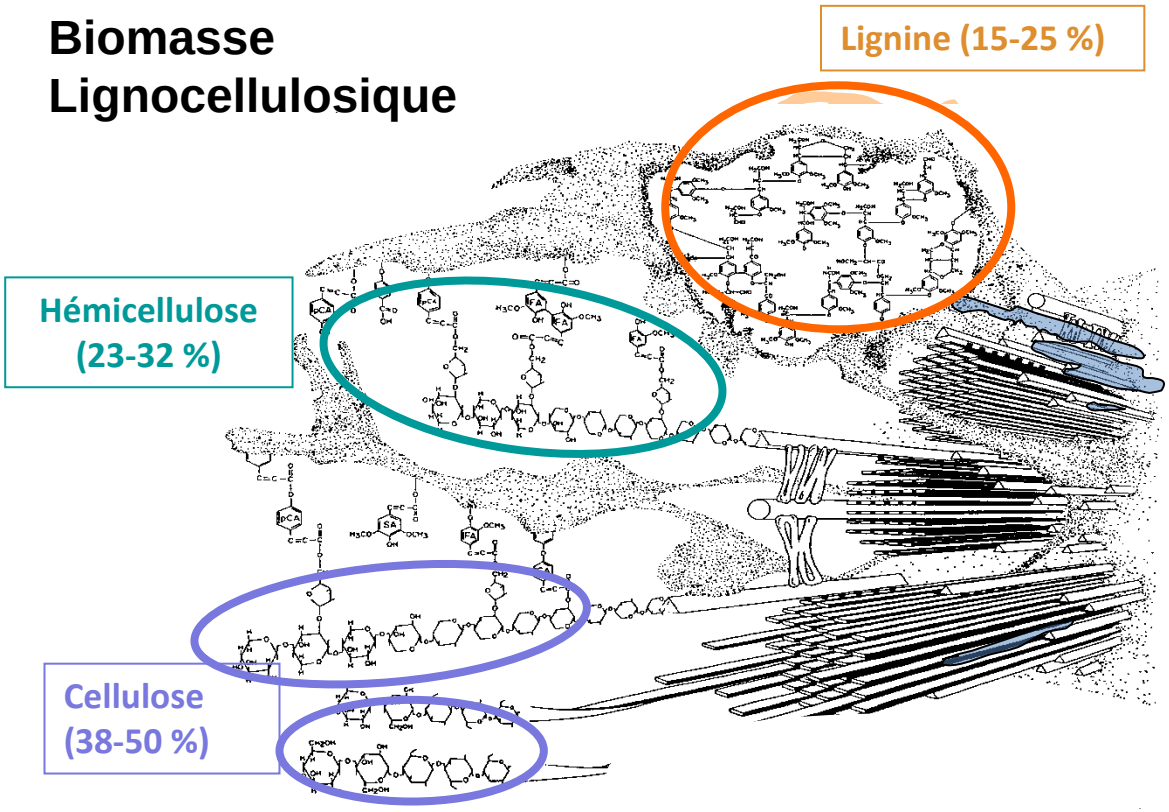
  * Intégration des outils bioinformatiques classiques pour une analyse phylogénétique (pour souche inconnue)

  ⟹ Service web fiable et évolutif dédié à l'analyse moléculaire des Polyporales (au 18/05/15: 4799 séquences ITS contrôlées/3622 acceptées, représentant 141 genres 598 espèces) : *Navarro et al (2012) J Biotechnol, 161:383-* (http://fungene-db.fr/)

❑ **Valorisation** de la collection dans le domaine des biotechnologies avec pour cible la biomasse lignocellulosique

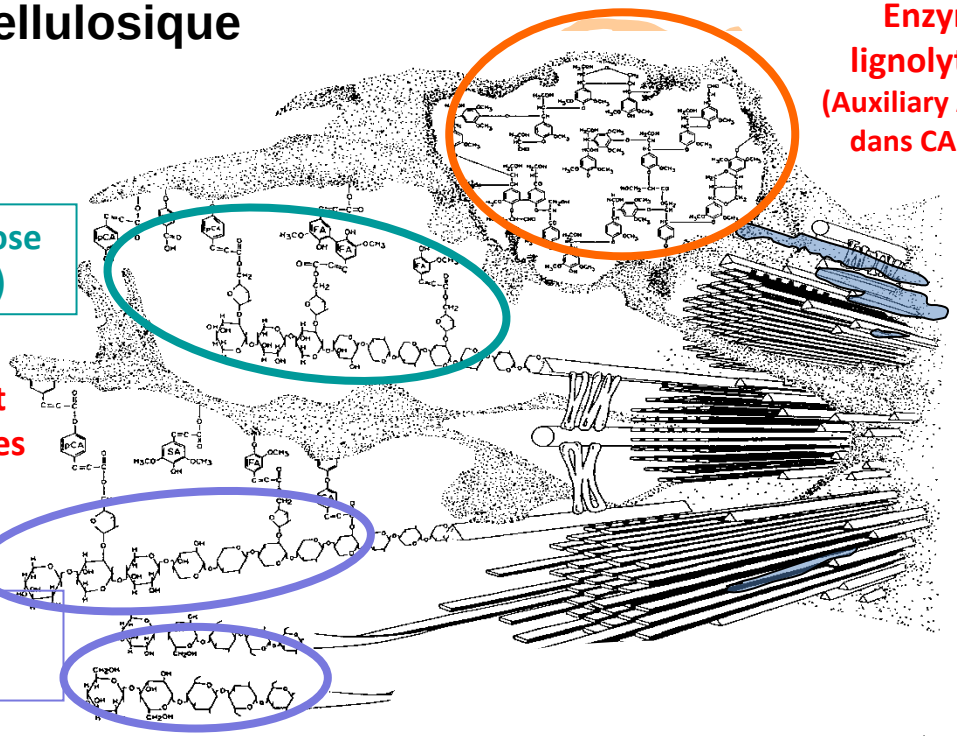
Le CIRM-CF: source de Champignons Filamenteux riches en enzymes ligno-cellulolytiques (4)

Biomasse Lignocellulosique



Le CIRM-CF: source de Champignons Filamenteux riches en enzymes ligno-cellulolytiques (4)

Biomasse Lignocellulosique



Basidiomycètes

"White-rot fungi"

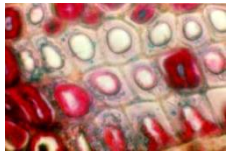
"Brown-rot fungi"

(Polyporales)

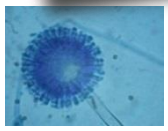
Pycnoporus sp.

Ascomycètes

"Soft-rot fungi"



Trichoderma reesei



Aspergillus niger Tiegh

Plan

- Collection **CIRM-CF** de champignons filamenteux d'intérêt agro-industriel hébergée par l'unité

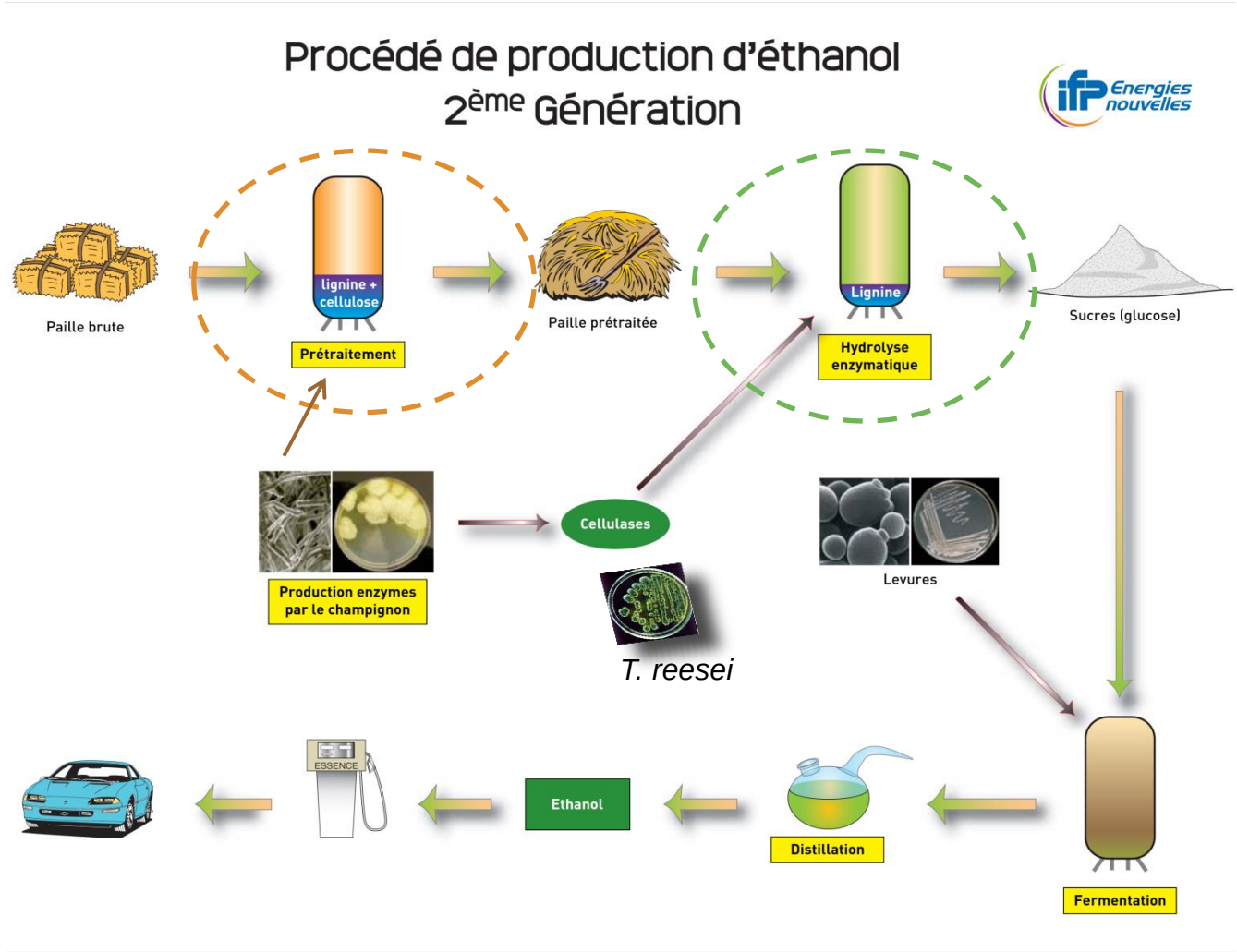
- **Exploration de la biodiversité des champignons filamenteux** pour des applications dans le domaine des biotechnologies

  I. Approche globale : Exploration de la biodiversité enzymatique fongique naturelle pour la production de bioéthanol 2G

  II. Approche ciblée sur un genre : Exploration de la biodiversité du genre *Pycnoporus* par analyse phylogénétique et recherche de nouvelles enzymes d'intérêt (eg laccases)

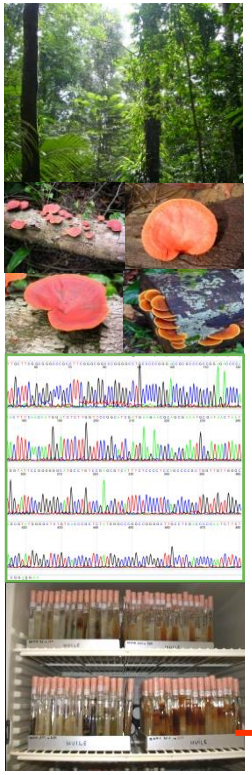
  III. Approche ciblée sur un groupe : Exploration de la diversité enzymatique du groupe *Aspergillus niger* aggregate : relation phylogénie / fonction enzymatique (eg activité estérase)

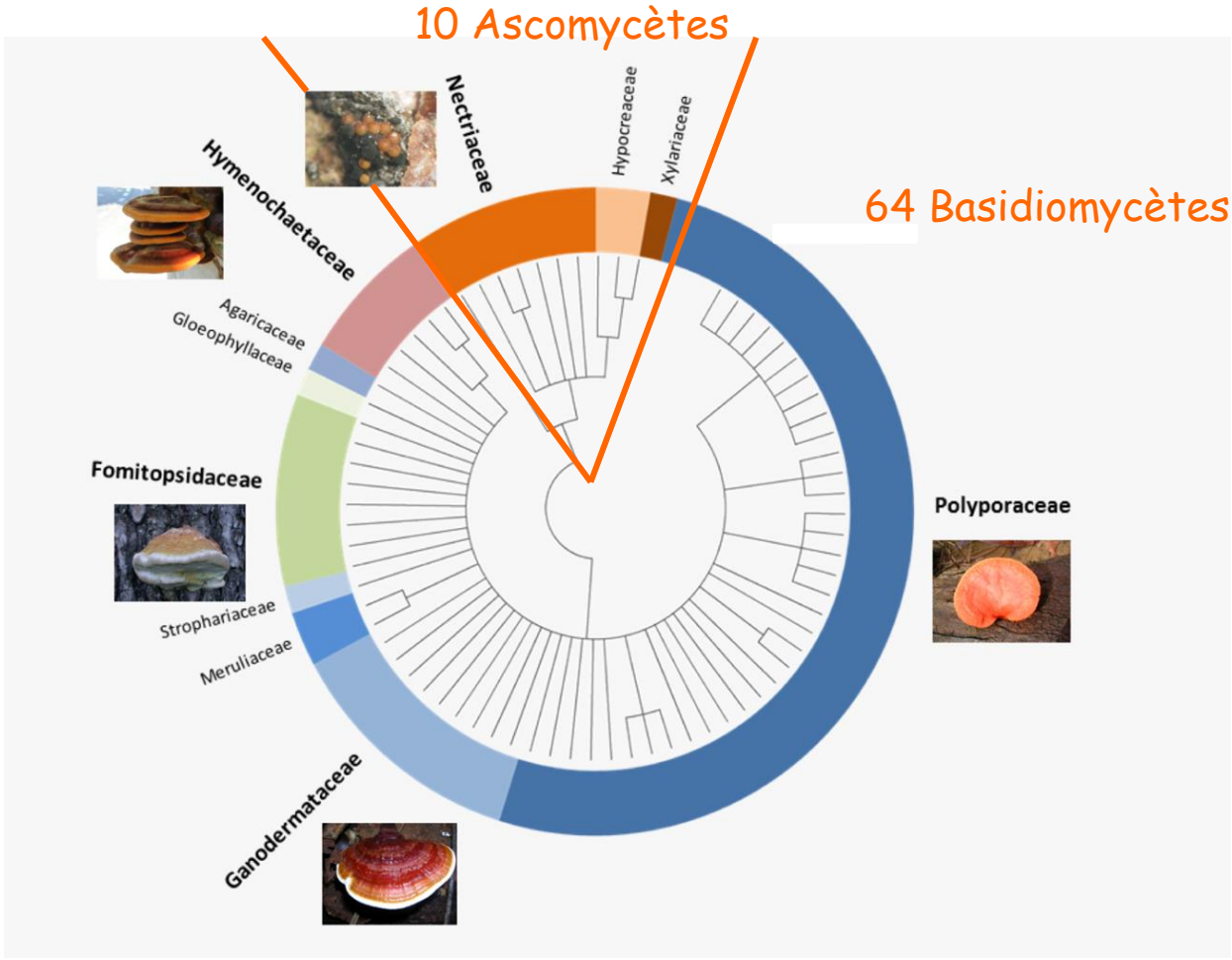
I. Exploration de la biodiversité enzymatique fongique pour la production de bioéthanol 2G (1)



I. Exploration de la biodiversité fongique du CIRM-CF collectée en milieux naturels, tropicaux et tempérés (2)

Collecte de la biodiversité naturelle

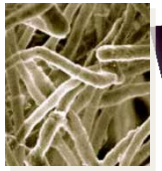




74 souches isolées de spécimens fraichement collectés, authentifiées et conservées au CIRM-CF (cladogramme construit sur base de séquences ITS)

I. Exploration de la biodiversité enzymatique fongique : stratégie d'étude (3)

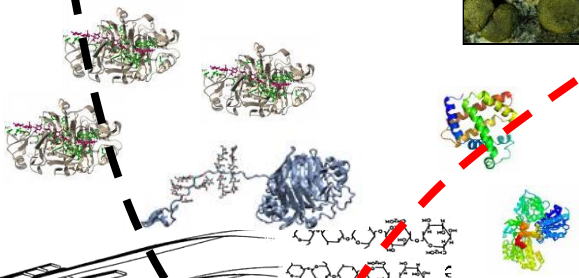
Trichoderma reesei (modèle industriel producteur de cellulases)



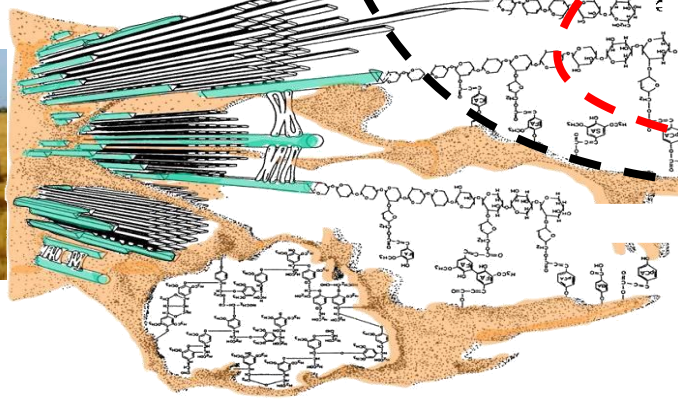
+

Cirm
Champignons filamenteux

Biodiversité naturelle du CIRM-CF

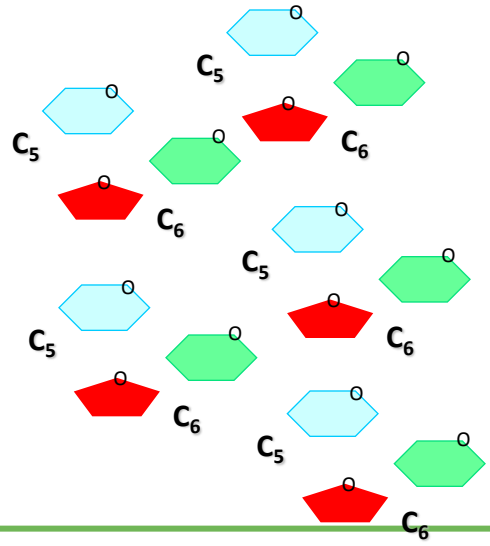


Paille de blé



Saccharification

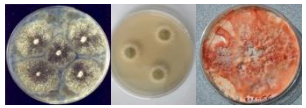
Sucres fermentescibles



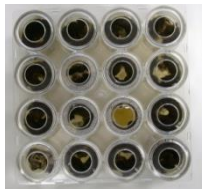
I. Exploration de la biodiversité enzymatique fongique : cultures et test de saccharification haut-débit (4)

- **Microcultures** en condition d'induction (son de céréale)

FastPrep®



Fragments mycéliens

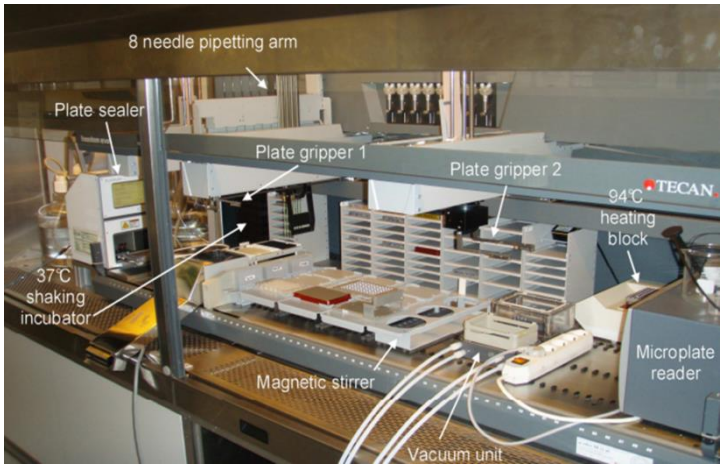


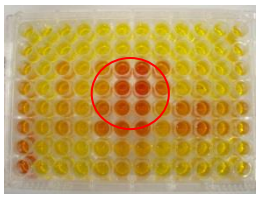
- Cultures miniaturisées de 10 mL
- Incubation 7-10 jours à 30°C et 140 rpm

Secrétomes (filtrés, concentrés)

+ paille de blé micronisée

- **Criblage au robot des sécrétomes** : test de saccharification par dosage des sucres totaux



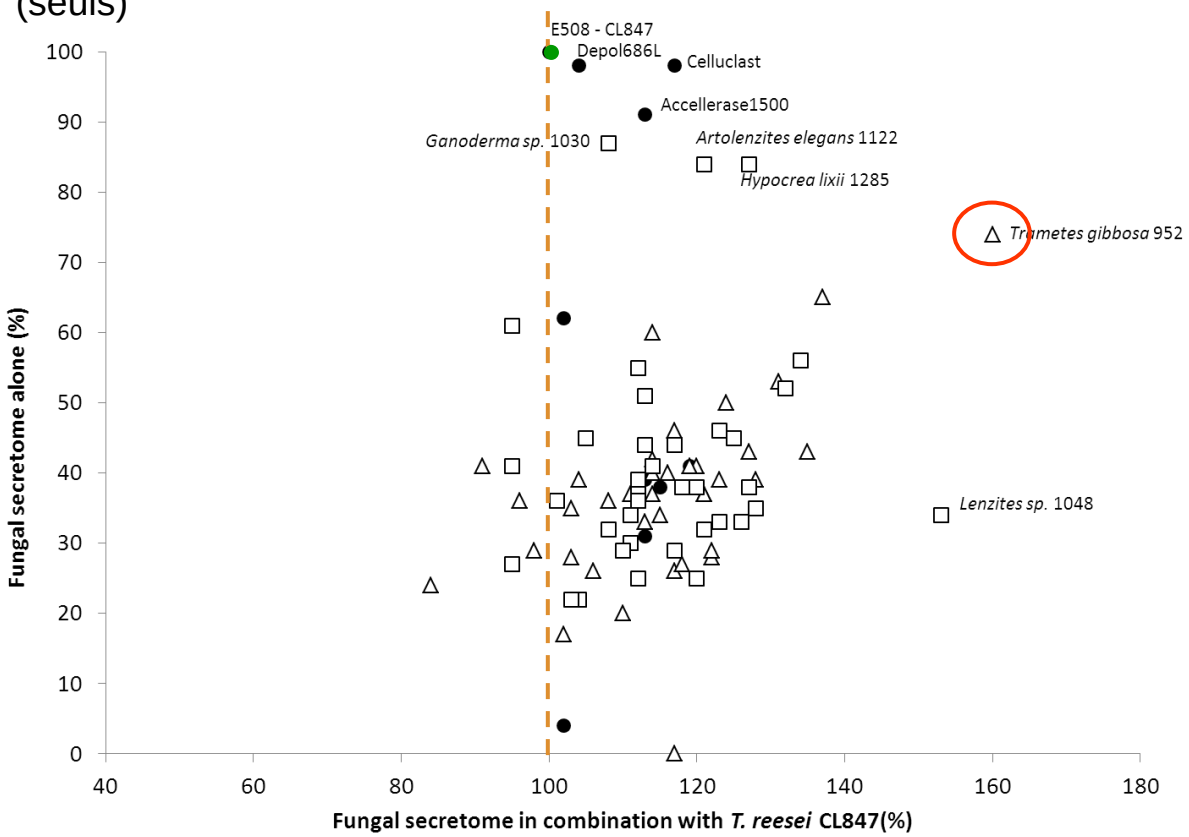


Sélection de 19 sécrétomes

(Navarro et al, 2010. Microb Cell Fact 9:58)

I. Exploration de la biodiversité enzymatique fongique : distribution des espèces selon leur capacité d'hydrolyse (5)

Secrétomes (seuls)



- ● Secrétomes commerciaux
- □ Secrétomes de champignons collectés en régions tropicales
- △ Secrétomes de champignons collectés en régions tempérées

Secrétomes + cocktail *T. reesei*

➢ Caractérisation enzymatique des sécrétomes

Berrin et al, 2012. Appl Environ Microbiol, 78:6483

Plan

- Collection **CIRM-CF** de champignons filamenteux d'intérêt agro-industriel hébergée par l'unité

- **Exploration de la biodiversité des champignons filamenteux** pour des applications dans le domaine des biotechnologies

  I. Approche globale : Exploration de la biodiversité enzymatique fongique naturelle pour la production de bioéthanol 2G

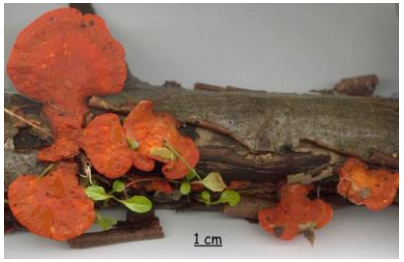
  II. Approche ciblée sur un genre : Exploration de la biodiversité du genre *Pycnoporus* par analyse phylogénétique et recherche de nouvelles enzymes d'intérêt (eg laccases)

  III. Approche ciblée sur un groupe : Exploration de la diversité enzymatique du groupe *Aspergillus niger* aggregate : relation phylogénie / fonction enzymatique (eg activité estérase)

II. Exploration de la biodiversité du genre *Pycnoporus* (1)

- Champignon saprophyte de la pourriture blanche du bois (homobasidiomycète, Polyporales, Polyporaceae) au basidiocarpe orangé
- Quatre espèces définies sur la base de caractéristiques morphologiques (taille des pores des basidiocarpes, forme des basidiospores) et de leur origine géographique

Pycnoporus cinnabarinus
(Jacq.) P. Karst



Hémispère nord

Pycnoporus sanguineus
(L.) Murrill

Régions tropicales et sub-tropicales

Pycnoporus coccineus
(Fr.) Bondartsev & Singer

Pays proches de l'Inde et bordant l'océan pacifique

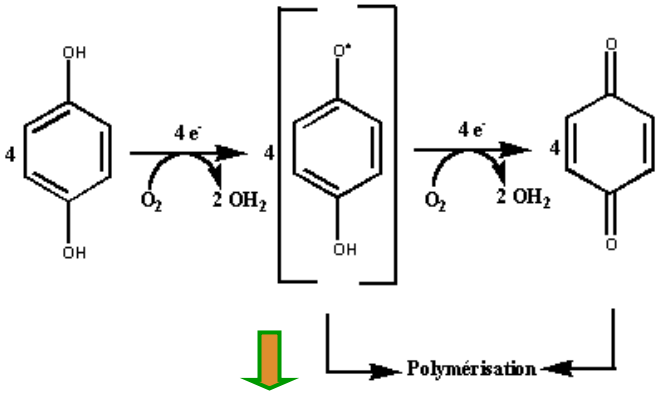
Pycnoporus puniceus
(Fr.) Ryvarden

Espèce rare trouvée en Afrique, Inde, Malaisie, Nouvelle-Calédonie, Nouvelle-Zélande

II. Exploration du genre *Pycnoporus*, producteur de laccase (2)

- Laccase, oxydoréductase (EC 1.10.3.2) à cuivre, impliquée dans la dégradation du bois
- Capable d'oxyder des constituants de la matière organique naturelle (polyphénols, phénols méthoxy-substitués) et antropique (colorants industriels, composés aromatiques polycycliques)

Laccase
(*p*-diphénol:oxygène oxydoréductase)



Haut potentiel comme bio-agents dans les biotechnologies blanches et vertes

Biofuels

Décoloration du textile

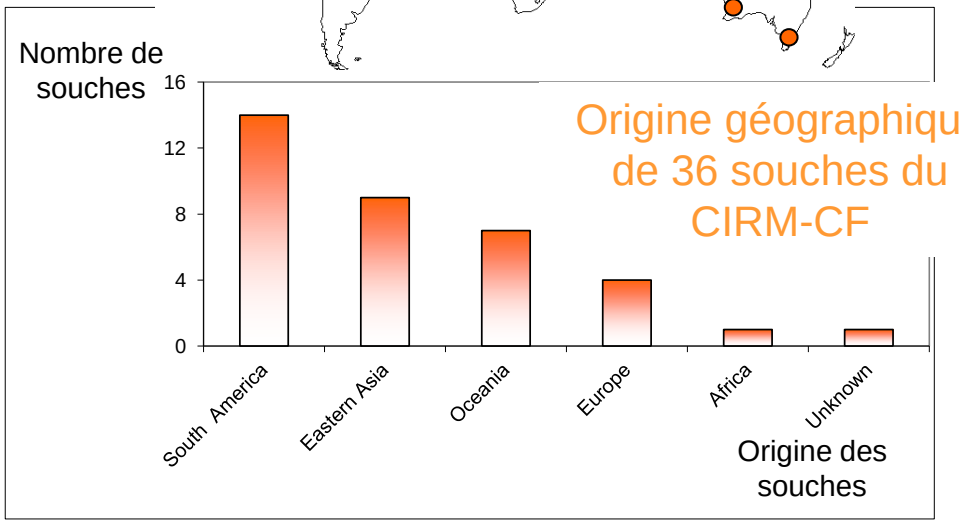
Blanchiment pâte à papier

Bioplastiques

II. Exploration du genre *Pycnoporus* : souches d'origine très diversifiée (3)

Etude de la Biodiversité naturelle du genre *Pycnoporus au sein du CIRM-CF*

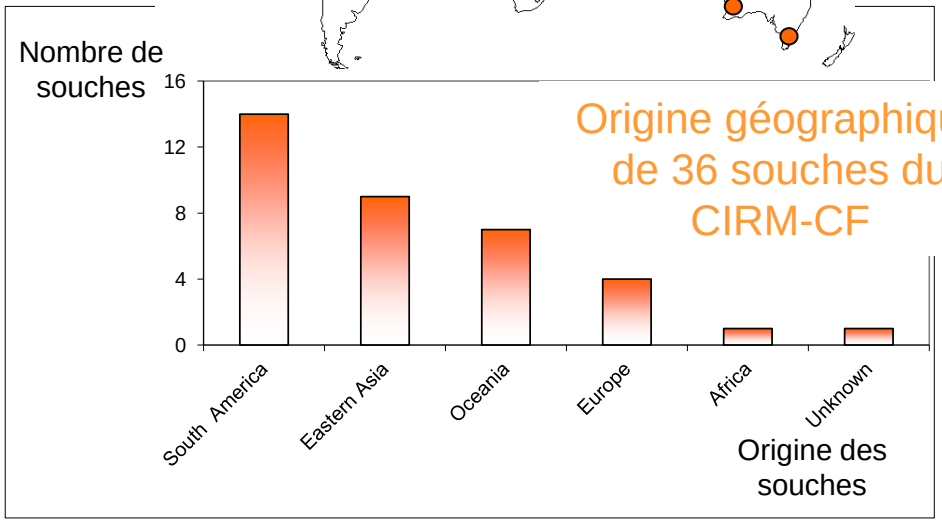
Cirm
Champignons filamenteux



Origine géographique de 36 souches du CIRM-CF

II. Exploration du genre *Pycnoporus* : souches d'origine très diversifiée (3)

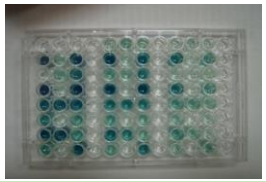
Etude de la Biodiversité naturelle du genre *Pycnoporus au sein du CIRM-CF*



- Criblage de l'activité laccase avec acide férulique comme inducteur à la recherche de laccases aux propriétés innovantes (eg souches tropicales)
- Analyse phylogénétique au sein des quatre espèces du genre sur la base des séquences ITS et d'une région du gène codant pour la laccase (*Lac 1*)

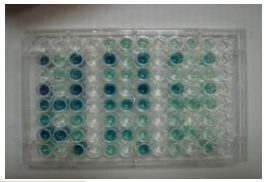
II. Exploration du genre *Pycnoporus :* à la recherche de nouvelles laccases (4)

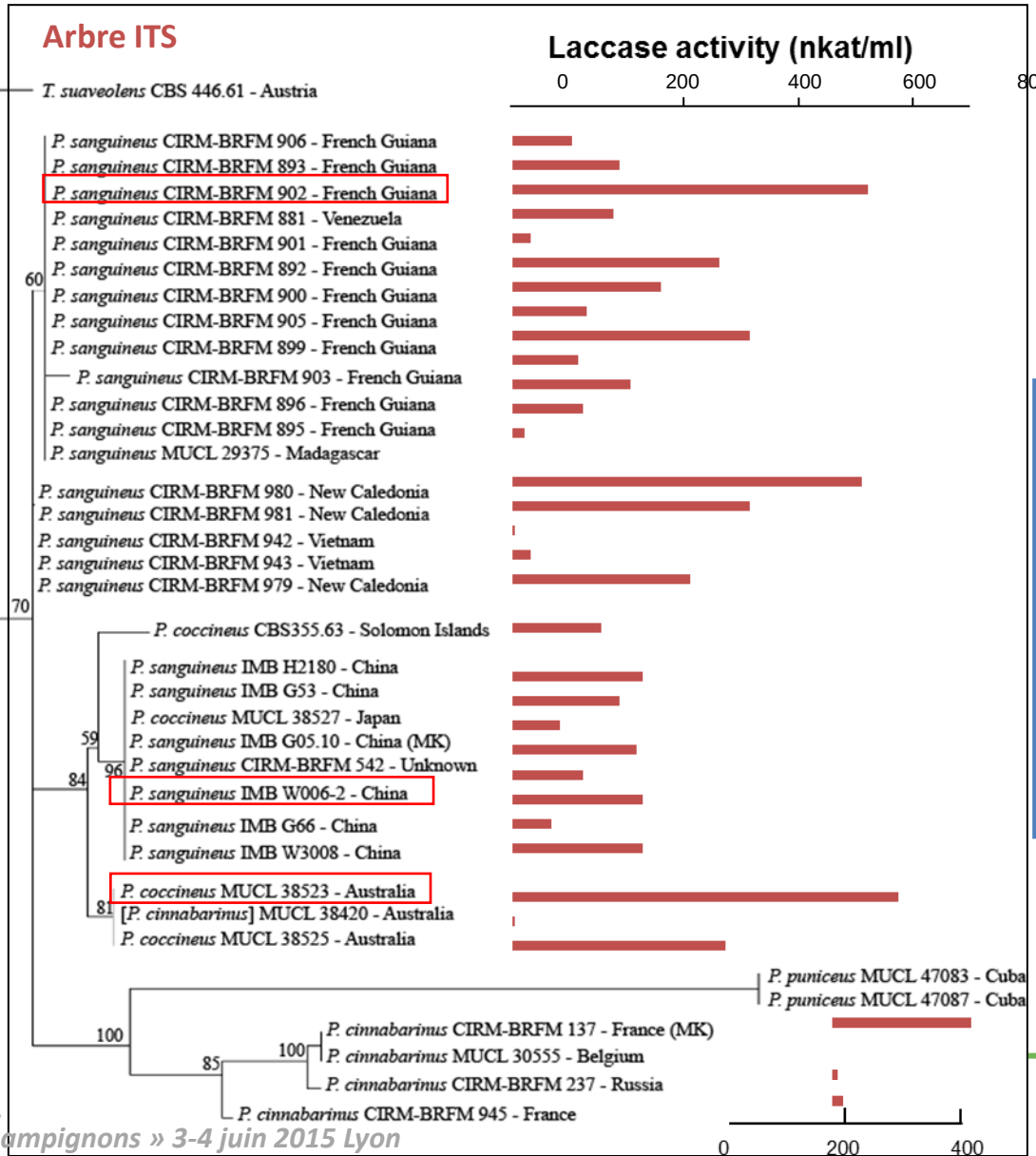
ABTS comme substrat
(2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)



II. Exploration du genre *Pycnoporus :* à la recherche de nouvelles laccases (4)

ABTS comme substrat
(2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)





→ Nouvelles laccases de *Pycnoporus*

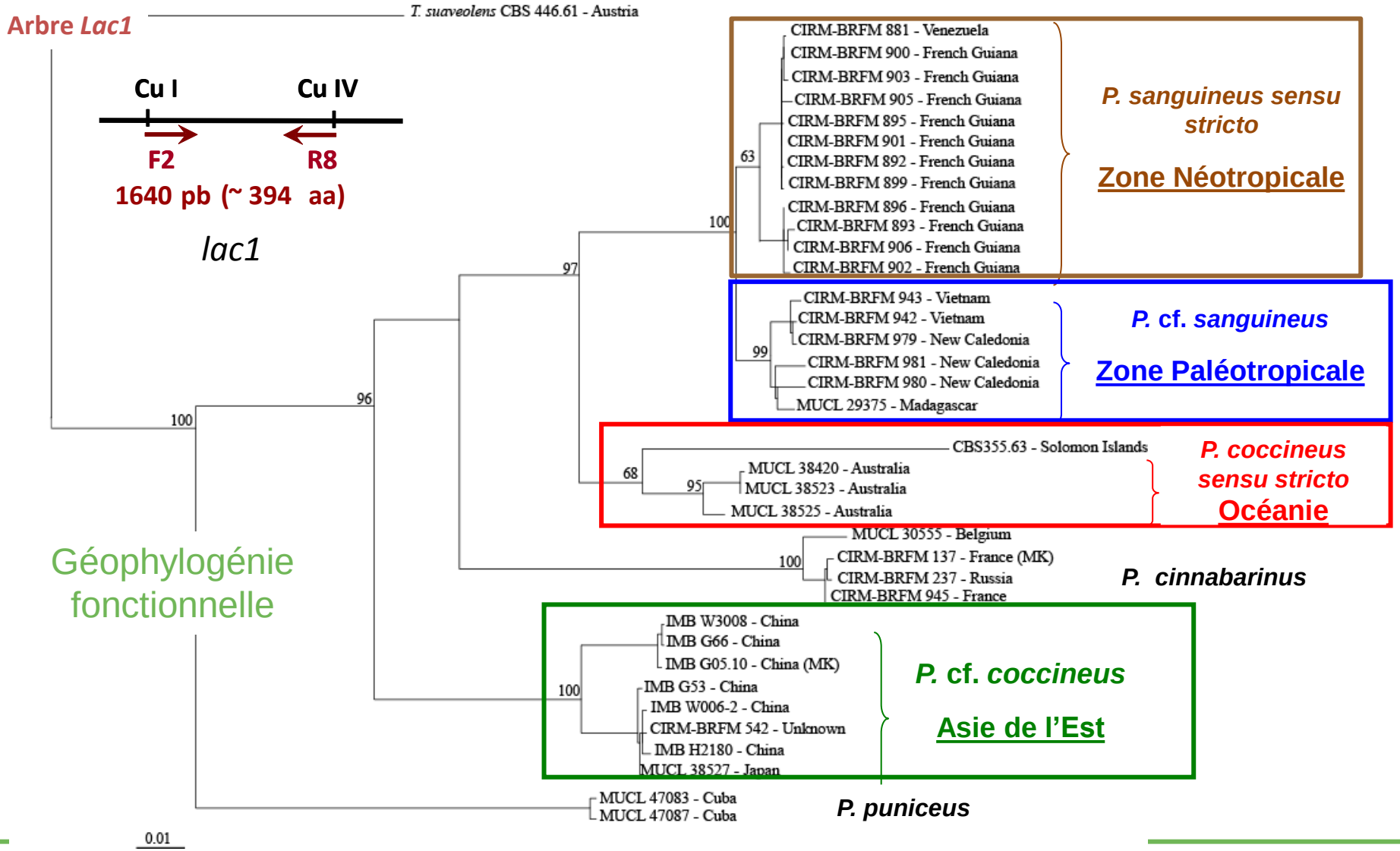
↓
- Purification
- Caractérisation

Nouvelles propriétés biotechnologiques

- Haute thermostabilité
- Haut potentiel redox (0,73-0,75 V à pH 6)
- Forte stabilité au pH (3-7)
- Résistance aux solvants alcooliques
- Dégradation des colorants polyphénoliques

Uzan et al (2010) J. Appl Microbiol 108: 2199
Uzan et al (2011) Appl Microbiol Biotechnol 90:97

II. Analyse phylogénétique du genre *Pycnoporus* sur la base des séquences *lac1:* diversité fonctionnelle (5)



Plan

- Collection **CIRM-CF** de champignons filamenteux d'intérêt agro-industriel hébergée par l'unité

- **Exploration de la biodiversité des champignons filamenteux** pour des applications dans le domaine des biotechnologies

  I. Approche globale : Exploration de la biodiversité enzymatique fongique naturelle pour la production de bioéthanol 2G

  II. Approche ciblée sur un genre : Exploration de la biodiversité du genre *Pycnoporus* par analyse phylogénétique et recherche de nouvelles enzymes d'intérêt (eg laccases)

  III. Approche ciblée sur un groupe : Exploration de la diversité enzymatique du groupe *Aspergillus niger* aggregate : relation phylogénie / fonction enzymatique (eg activité estérase)

III. Analyse phylogénétique du groupe des *Aspergillus niger* aggregate et activité féruloyl estérase (1)

Aspergillus niger

Eurotiales, Trichocomaceae

- *Aspergillus awamori* Nakaz.
- *Aspergillus foetidus* Thom & Raper
- *Aspergillus niger* Tiegh.
- *Aspergillus tubingensis* Mosseray

III. Analyse phylogénétique du groupe des *Aspergillus niger* aggregate et activité féruloyl estérase (1)

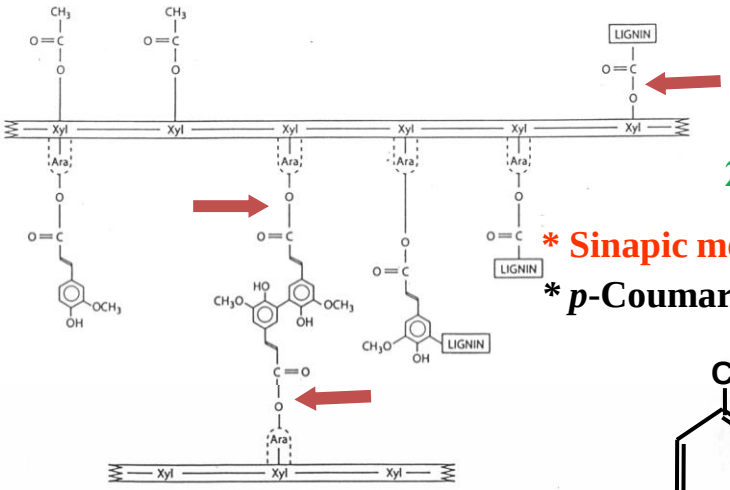
Aspergillus niger

Eurotiales, Trichocomaceae

- *Aspergillus awamori* Nakaz.
- *Aspergillus foetidus* Thom & Raper
- *Aspergillus niger* Tiegh.
- *Aspergillus tubingensis* Mosseray

- Enzyme ciblée : **Féruloyl estérase** (carboxylic ester hydrolase EC 3.1.1.73)

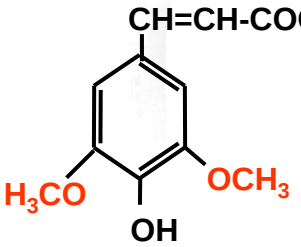
Marmuse et al, 2008, Org Biomol Chem, 6:1208.
Benoit et al, 2007, Appl Microbiol Biotechnol, 73: 5624
Bouzid et al, 2006, Can J Microbiol, 52:886



2 types d'activité

*** Sinapic methyl ester (FAEA)**

*** *p*-Coumaric methyl ester (FAEB)**

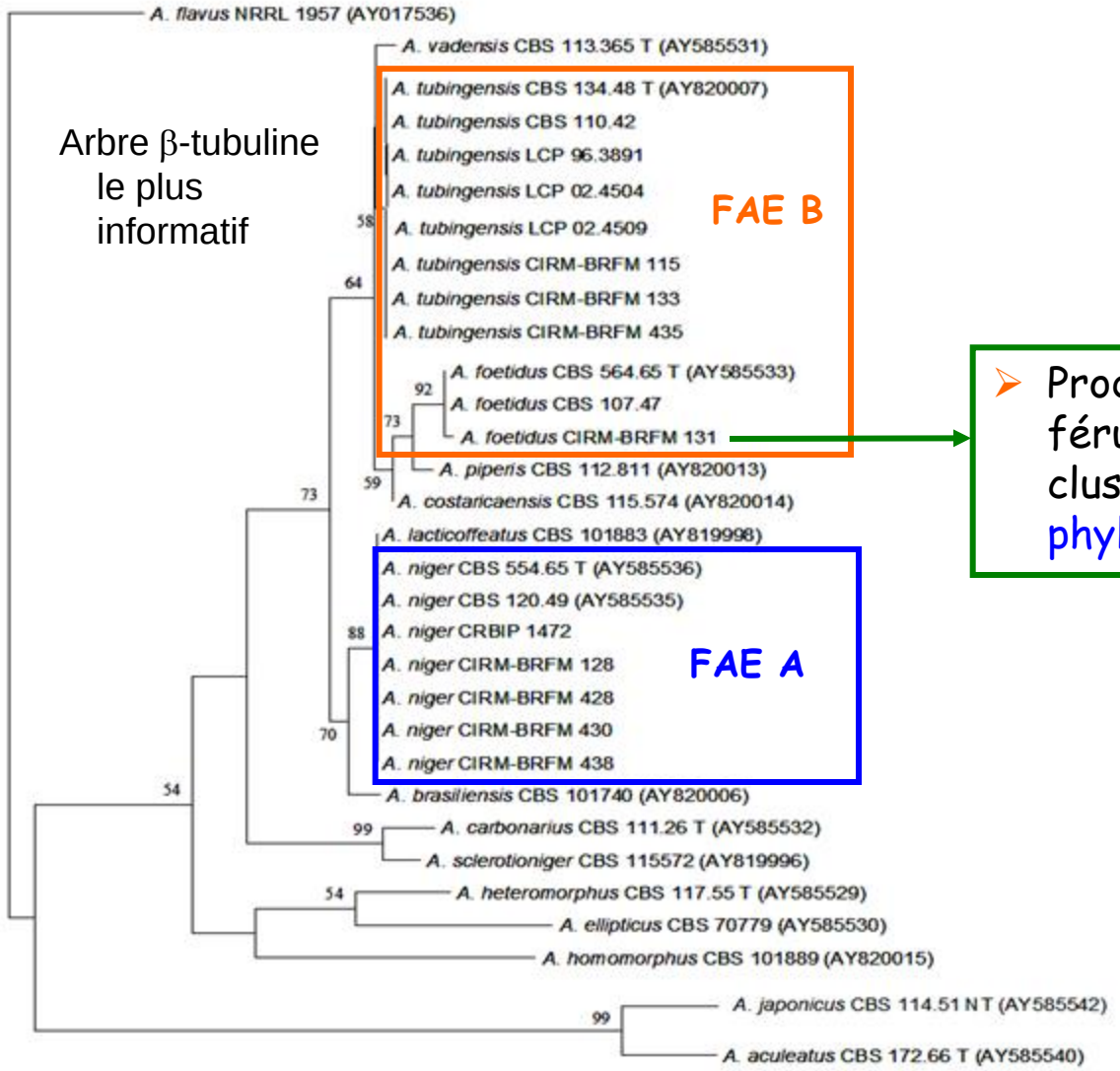


- Phylogénie:

  - Région ITS (ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2)

  - Séquences codant pour la β-tubuline (Bt2a/Bt2b)

III. Relation phylogénie/fonction féruloyl estérase chez *Aspergillus niger* aggregate (2)



Arbre β-tubuline le plus informatif

- Production espèce-dépendante des féruloyl estérases: « Molecular clustering » type A et type B: phylogénie prédictive

Giraud et al,2007, Res Microbiol, 158:413

Conclusions

- ✓ Collection CIRM-CF jeune, mais attractive au niveau académique et industriel par sa spécialisation et sa diversité
- ✓ Richesse naturelle donnant accès à une diversité d'enzymes lignocellulolytiques d'origine eucaryote encore mal connues
- ✓ Transfert de connaissances au travers de bases de données
- ✓ Approche originale de l'étude des fonctions enzymatiques au travers de la phylogénie de groupes d'intérêt
- ✓ Aujourd'hui, approche intégrée (plus ambitieuse) d'exploration de la biodiversité au niveau des génomes, transcriptome et sécrétomes (séquençage du génome de 40 champignons Polyporales du CIRM-CF via DOE JGI (US Department of Energy)

Partenaires du colloque

Merci aux partenaires premium

Questions & réponses