

Caractérisation d'enzymes fongiques dégradant les parois végétales et complémentation du *Trichoderma reesei*



THESE 2007

Titre de la thèse	Caractérisation d'enzymes fongiques dégradant les parois végétales et complémentation du sécrétome de <i>Trichoderma reesei</i>
Doctorant	Laetitia Poidevin
Université-Ecole doctorale	Université de Provence Aix-Marseille I – Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
Directeur de thèse	Dr Eric Record
Laboratoire d'accueil	Département Biotechnologie d'IFP Energies nouvelles (IFPEN) et UMR 1163 - INRA/Universités de Provence et de la Méditerranée - de Biotechnologie des Champignons Filamenteux de Marseille
Responsable de thèse	Senta Blanquet, Ingénieur de recherche, IFP Energies nouvelles
Durée	Trois ans 2007-2010

Résumé

L'étape primordiale de la conversion de la ligno-cellulose en éthanol est l'hydrolyse enzymatique de la cellulose en sucres fermentescibles. Les enzymes utilisées pour cette étape sont produites par *Trichoderma reesei*. En tant qu'organisme modèle et d'un grand intérêt pour l'industrie, son génome a été séquencé par le DOE pour affiner nos connaissances sur sa capacité à convertir la biomasse végétale. Les premières analyses de la composition de ce génome ont révélé que relativement peu de gènes codent pour des enzymes actives sur cellulose et hémicellulose (glycozymes) comparativement à d'autres champignons, et que ces gènes ne montrent pas une grande diversité.

Comblé ce déficit va consister à compléter les enzymes produites par *T.reesei* par d'autres enzymes provenant de champignons différents. Dans ce but, deux voies complémentaires seront explorées dans cette thèse :

L'analyse *in silico* des génomes séquencés et annotés d'une quinzaine de champignons filamenteux. La comparaison des séquences de gènes avec celles existant dans les bases de données permet d'identifier des enzymes cellulolytiques, hémicellulolytiques et lignolytiques qui sont absentes chez *T.reesei*, et susceptibles de compléter son jeu d'enzymes,

Le criblage à haut-débit de champignons filamenteux conservés au Centre International de Ressources Microbiennes-Champignons filamenteux de Marseille, et de ceux provenant d'autres opérations de collectes dans des biotopes ciblés (essentiellement dans des forêts tropicales humides). Ce criblage fonctionnel sur substrats modèles peut déboucher sur des souches ayant une activité enzymatique améliorée ou révéler la présence de nouvelles activités.

Les gènes correspondant aux enzymes ainsi identifiées seront clonés dans un vecteur permettant une forte expression afin d'obtenir des quantités suffisantes d'enzymes pour leur caractérisation et pour une évaluation des activités complémentaires du mélange produit par *T.reesei*. Les enzymes apportant un gain pourront dans un

deuxième temps être clonées dans la souche industrielle afin de produire un mélange d'enzymes plus efficace avec un seul microorganisme.

Résultats

Conclusion de la thèse

L'étape la plus coûteuse dans la mise en place de la production de bioéthanol de seconde génération est l'hydrolyse enzymatique de la biomasse. Les parois des plantes sont composées de polysaccharides, organisés en cellulose, hémicellulose et pectine, plus ou moins intégrés dans une matrice rigide de composés phénoliques, appelé lignine. Le champignon filamentueux *T. reesei* est capable de sécréter de grandes quantités d'enzymes de dégradation. Cependant, l'analyse du contenu de son génome a révélée uniquement 10 gènes codant pour des cellulases, ce qui est le plus petit nombre de cellulases parmi tous les génomes de champignons capables de dégrader le bois décrits jusqu'à aujourd'hui. Or, la dégradation de substrats complexes, comme la biomasse végétale, nécessite un grand nombre d'activités enzymatiques différentes. C'est pourquoi des enzymes spécifiques provenant d'autres champignons ont été sélectionnés pour compléter l'arsenal enzymatique de *T. reesei*.

Piromyces equi est un champignon anaérobie présent dans le rumen. Son système de dégradation de la matière lignocellulosique présente des similarités avec celui des bactéries anaérobies, très étudié chez *Clostridium*. *P. equi* possède un gène codant pour une cinnamoyl estérase, enzyme pouvant hydrolyser des liaisons covalentes entre les chaînes d'hémicelluloses adjacentes et entre lignine et hémicelluloses. Cette enzyme auxiliaire participe à la déstructuration de la paroi et facilite l'accès des enzymes principales vers les chaînes d'hémicellulose et de celluloses. Le génome de *T. reesei* ne possède pas de gène codant pour des les cinnamoyl estérases ce qui en fait un candidat intéressant pour la complémentation. De plus, la cinnamoyl estérase de *P. equi*, EstA, hydrolyse les quatre acides hydroxycinnamiques présents dans les parois végétales ce qui rend cette enzyme potentiellement très intéressante. Afin d'estimer le potentiel d'utilisation d'EstA dans des applications biotechnologiques, la partie du gène codant pour le domaine catalytique de l'enzyme a été clonée et exprimée dans la souche *T. reesei* RutC30.

Un des transformants, exprimant jusqu'à 33 mg/l de protéine recombinante, a été retenu pour l'étude de l'estérase. La protéine recombinante EstA a été testée pour son activité hydrolytique sur trois substrats : le son de maïs, le son de blé et la pulpe de betterave. EstA libère plus efficacement l'acide férulique que l'estérase très étudiée d'*Aspergillus niger* FaeB sur les trois substrats testés. EstA est également plus active que l'estérase FaeA d'*A. niger* sur deux des trois substrats.

L'effet d'un ajout de l'estérase au cocktail enzymatique de *T. reesei* pour l'hydrolyse de substrats lignocellulosiques a été testé, dans le but de visualiser une coopération enzymatique entre ces enzymes auxiliaires et les enzymes principales du cocktail enzymatique de *T. reesei*. Aucun effet n'a pu être observé concernant la saccharification du son de maïs et de la paille de blé micronisée. Ainsi, l'action de l'estérase n'est probablement pas suffisante pour quantifier une amélioration au cours de nos tests. Cependant, EstA montre un intérêt pour d'autres applications biotechnologiques car elle montre une activité de libération d'acide férulique des substrats lignocellulosiques. En effet, l'acide férulique est un antioxydant pouvant être utilisé en dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et alimentaire.

Dans la deuxième partie de la thèse, le potentiel du champignon *Podospora anserina* a été étudié par un criblage génomique. Le but des analyses génomiques est d'identifier de nouvelles enzymes sur la base de l'analyse des génomes connus et de sélectionner des séquences potentiellement intéressantes, codant pour des activités complémentaires aux enzymes produites par *T. reesei*. *P. anserina* représente une espèce intéressante pour la recherche de nouvelles enzymes. Premièrement, son habitat est tout à fait atypique puisque dans la nature, il se développe exclusivement sur des excréments d'herbivore. *P. anserina* apparaît dans les étapes tardives de dégradation, après la digestion des végétaux dans le rumen de l'animal et après le passage successif de plusieurs autres espèces fongiques. Ce champignon arrive donc probablement à se nourrir de substrats très récalcitrants, les substances carbonées facilement accessibles étant consommées auparavant. Deuxièmement, l'analyse du génome de *P. anserina* a révélé une importante machinerie (hémi)cellulolytique. Ce champignon saprophyte se classe parmi les trois plus larges CAZomes (ensemble d'enzymes agissant sur les carbohydrates) fongiques. Par exemple, *P. anserina* possède 33 gènes codant pour des enzymes appartenant à la famille GH61, alors que *T. reesei* n'en possède que trois. 6 représentants de cette famille ainsi que quatre gènes codant pour des CAZymes de famille 6 ont été choisis pour clonage dans la levure *Pichia pastoris*. Le clonage de 14 gènes au total ont été menés afin de (1) caractériser d'un point de vue biochimique ces enzymes, (2) d'explorer les

interactions synergiques entre deux familles de glycosides hydrolases, et (3) d'évaluer leur potentiel pour la complémentation de *T. reesei* dans le cadre d'un procédé de fabrication du bioéthanol.

Trois enzymes de la famille 6 des glycosides hydrolases ont été caractérisées au niveau biochimique et comparées à la protéine Cel6A (CBH2) de *T. reesei*. Deux d'entre elles montrent une activité exocellulase, l'activité spécifique étant semblable à celle de *TrCel6A*. En revanche, la troisième enzyme présente les caractéristiques d'une endoglucanase. En effet, elle est active sur carboxyméthylcellulose (CMC) et libère des fortes proportions de cellotriase. En outre, des prédictions de structure sur cette protéine montrent qu'elle possède un site actif en forme de fente, typique pour les endoglucanases. Des tests de remplacement de *TrCel6A* par une des trois enzymes GH6 de *P. anserina* n'ont pas révélé d'activité d'hydrolyse supérieure sur une paille de blé explosée à la vapeur.

Quant aux enzymes de famille GH61, toutes les tentatives de mise en évidence d'une activité se sont révélées négatives. L'ensemble des résultats de complémentation du sécrétome de *T. reesei* ou de reconstitution d'un cocktail enzymatique suggère une absence de synergie entre les GH61 testées et les autres cellulases présentes dans le cocktail. Une étude récente sur une chitinase de *Thermobifida fusca*, présentant des similarités de structure avec les enzymes de famille GH61, suggère néanmoins que leur mécanisme d'action pourrait être différent de celui d'une hydrolase et qu'elles pourraient agir sous d'autres conditions que celles testées dans cette étude.

Livrable

Manuscrit de la thèse (à venir)

Publications et communications

L. Poidevin, A. Levasseur, G. Paës, D. Navarro, S. Heiss-Blanquet, M. Asther et E. Record 2009. Heterologous production of the *Piromyces equi* cinnamoyl esterase in *Trichoderma reesei* for biotechnological applications. Lett. Appl. Microbiol. 49 (6): 673-8

L. Poidevin, P. Coutinho, S. Heiss-Blanquet et E. Record. 2010. Genomic and functional screenings of filamentous fungi to complement the *T. reesei* secretome. Lignobiotech One Symposium 28/03-01/04 2010, Reims, France.

Contact

Senta Blanquet

IFP Energies nouvelles

Département Biotechnologie

1 et 4 Avenue de Bois-Préau

92806 Rueil-Malmaison Cedex

Tel : 01 47 52 72 56

Tel : 01 47 52 71 43 (secrétariat)

senta.blanquet@ifpen.fr