

Bactéries et Archées marines extrêmophiles: modèles enzymatiques spécifiques et applications industrielles

Prof. Mohamed Jebbar

**Laboratoire de Microbiologie des Environnements
Extrêmes**

<http://wwz.ifremer.fr/umr6197>



Introduction

- La sécurité alimentaire, l'énergie, l'utilisation efficace des ressources et la création de plus-values économiques et d'emplois durables pour une population croissante représentent des défis mondiaux interdépendants exigeant de nouvelles approches et de nouveaux paradigmes.
- L'une des approches est la bioéconomie, qui occupe une place très importante dans les programmes, stratégies et plans d'action nationaux et internationaux.
- L'humanité est actuellement confrontée à plusieurs grands défis dans les secteurs de l'alimentation, l'énergie, la santé, l'environnement, etc, qui doivent être abordés dans des contextes de changement global et de développement durable
- Nos sociétés ont fonctionné en se basant sur l'hypothèse que les besoins croissants de la population en énergie, alimentation, matières premières, etc. seraient toujours satisfaits à l'aide des nouveaux progrès technologiques et scientifiques
- Cependant, les crises pétrolières successives, le ralentissement de l'augmentation de la productivité agricole, les récentes découvertes sur le changement climatique, l'expansion continue de l'urbanisation et l'augmentation de la population humaine mondiale ont évolué parallèlement avec l'amélioration des niveaux de vie dans plusieurs parties du monde

Introduction

- La transition de l'économie basée sur le pétrole vers une économie durable reposant entièrement sur la biomasse en tant que matière première renouvelable nécessite une action concertée des universitaires, industriels, politiques et de la société civile
- Face aux défis mondiaux, un processus de remise en question a été initié et des stratégies vers une bioindustrie durable ont été développées dans plusieurs pays à travers le monde
- Selon la définition de la Commission européenne, ces défis sont l'accroissement de la population mondiale, la raréfaction rapide de nombreuses ressources, les pressions environnementales croissantes et le changement climatique.
- Par conséquent, les objectifs à long terme de la transition vers une bioéconomie mondiale seront d'assurer la sécurité alimentaire et sanitaire, de rendre l'approvisionnement énergétique plus durable, d'utiliser plus efficacement les ressources et de produire de nouveaux matériaux d'origine biologique.
- Une approche interdisciplinaire dans divers domaines tels que la microbiologie, la biologie moléculaire, la chimie, la génétique, le génie chimique et l'agriculture, en plus des technologies transversales telles que l'économie, la logistique et la numérisation, est nécessaire pour relever les défis mondiaux futurs.

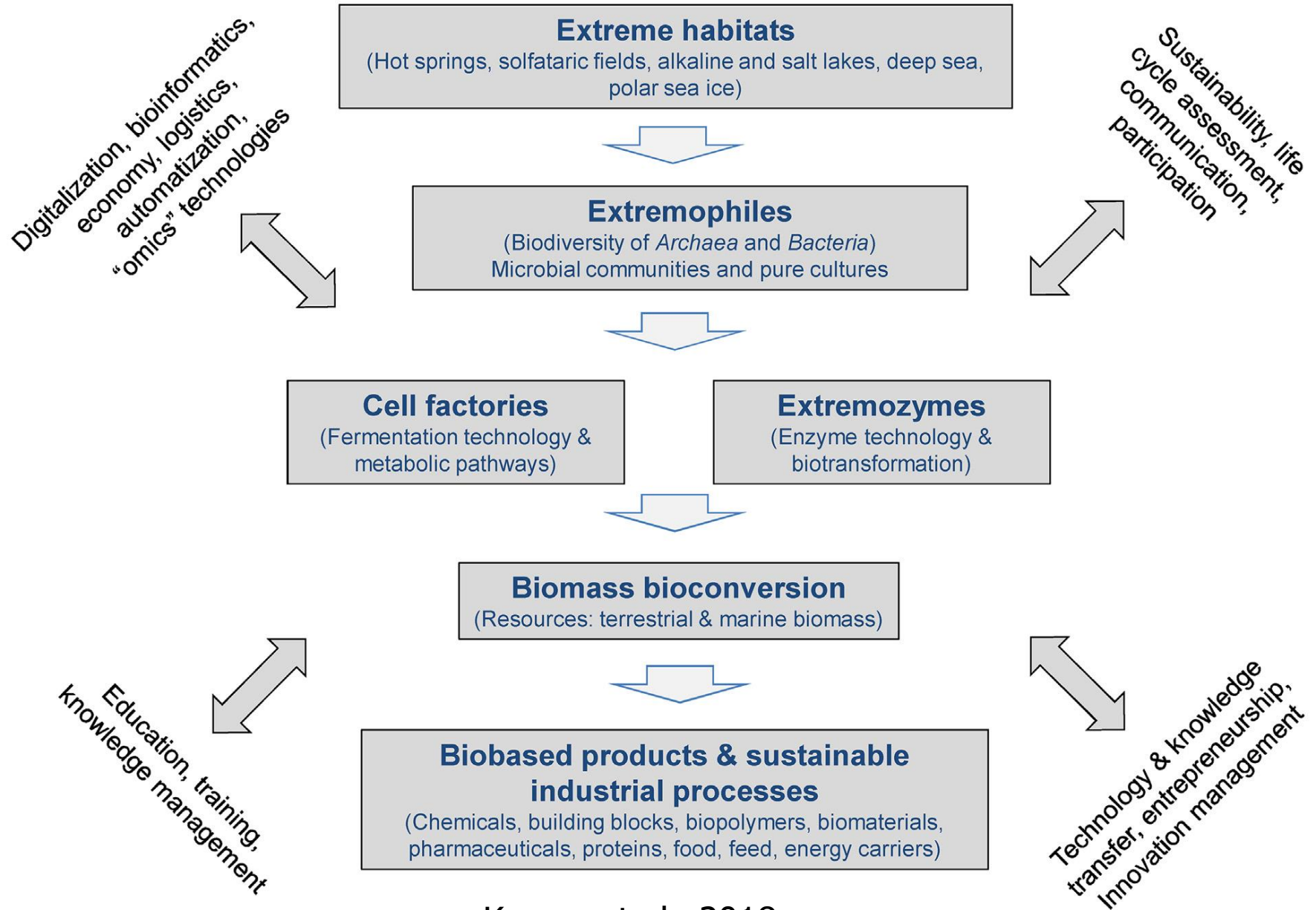
Introduction

- La transition prévue d'une économie basée sur le pétrole vers une économie basée sur les biomasses ne peut être réalisée que si les centres de recherche, les universités, la classe politique, les entreprises et la société civile sont disposés à travailler ensemble aux niveaux national et international. Une approche interdisciplinaire est essentielle à l'élaboration de stratégies politiques durables et intégratives en matière de bioéconomie.
- Les concepts initiaux en vue de promouvoir des procédés industriels écologiques comprenaient les bioraffinages, en s'inspirant des raffinages traditionnels de pétrole pour le développement de raffineries qui utilisent des ressources renouvelables comme matière première
- Au début, la biomasse contenant de l'amidon était utilisée pour la production de biocarburants. Les bioraffineries de première génération ont donc nécessité une discussion sur la question de savoir si du matériel biologique potentiellement comestible devrait ou non être utilisé pour la production d'énergie.

Introduction

- Toutefois, ce problème pourrait être résolu en passant à la biomasse à base de lignocellulose, comme les résidus agricoles, les plantes oléagineuses et les matériaux ligneux, comme substrats durables. Les substrats lignocellulosiques sont les matières organiques les plus abondantes sur la planète
- Outre la biomasse terrestre, la biomasse marine, y compris les micro- et macroalgues, est proposée aussi comme ressource renouvelable pour une bioéconomie renouvelable.
- D'autres secteurs importants qui fournissent des matières premières pour une bioéconomie sont l'industrie alimentaire et l'industrie des déchets. Dans l'industrie alimentaire en particulier, des quantités énormes de déchets sont générées par divers processus.
- L'utilisation de systèmes et de procédés biologiques robustes fournis par des microorganismes extrêmophiles ouvrira de nouvelles voies dans la recherche industrielle et ses applications. L'exploitation de la biodiversité de la nature à partir d'habitats exotiques donnera naissance à des produits nécessaires à divers secteurs industriels et à la santé humaine.

Contribution des extremophiles et de leurs enzymes à la Bioéconomie



Kruger et al., 2018

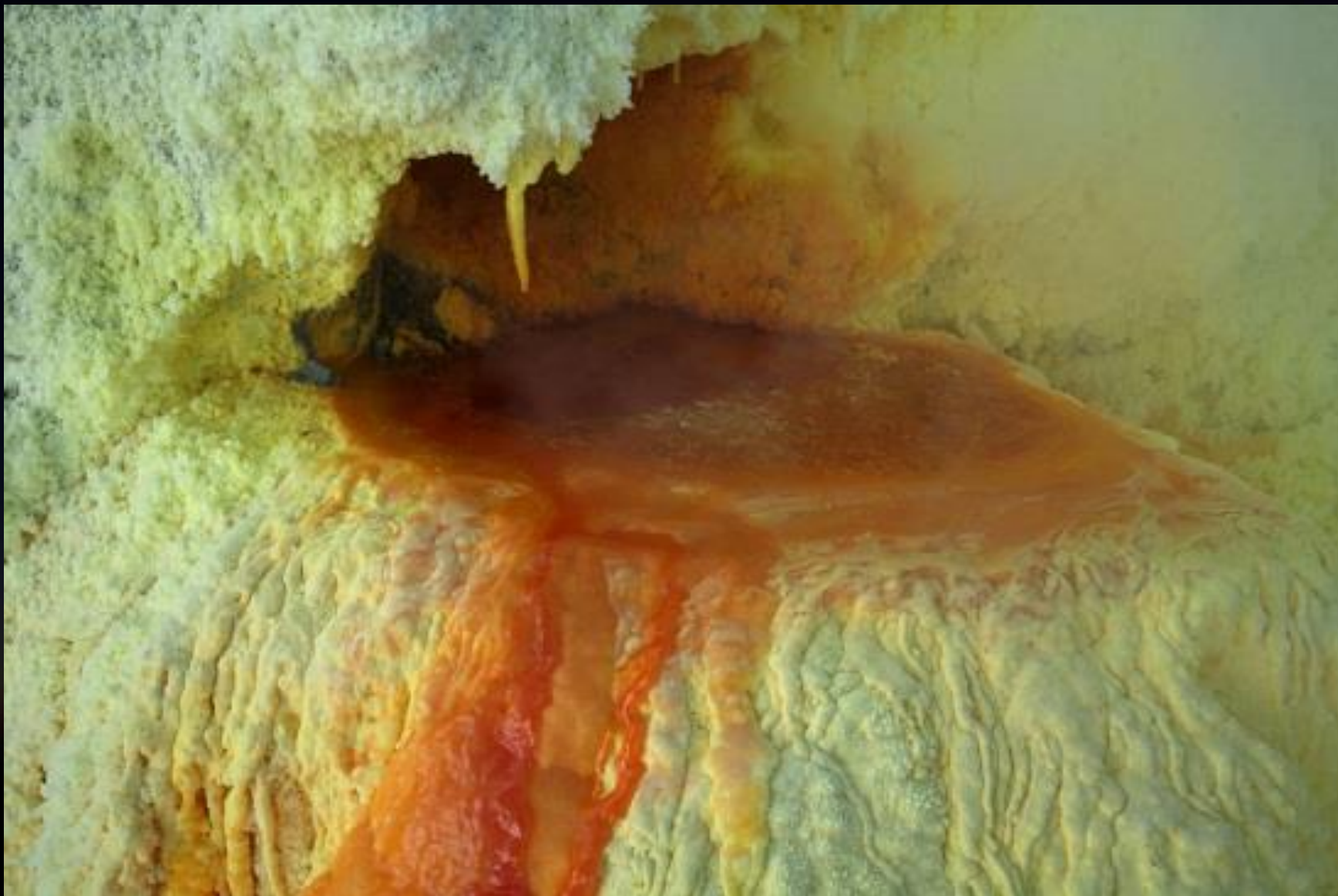
Les extremophiles

Un extrêmophile est un organisme qui se développe en **environnement extrême** (NB : anthropocentrisme)

- Haute température = **hyperthermophile** (*Pyrolobus fumarii*, opt 106°C et max 113°C)
- Basse température = **psychrophile** (*Clostridium psychrophilum*, opt 4°C)
- pH élevé = **alcalophile** (*Alkaliphilus transvaalensis*, opt pH=10)
- pH faible = **acidophile** (*Picrophilus oshimae*, opt pH=0,7)
- Forte salinité = **halophile** (*Halobacterium*, opt 3,5-4,5 M NaCl)
- Forte pression = **barophile ou piézophile** (*Pyrococcus yayanosii*, opt 52 MPa)
- Faible teneur en eau = **xérophile** (*Trichosporonoides nigrescens*, croissance à $aw=0,75$)
- Radioactivité élevée = **radiotolérant** (*Deinococcus radiodurans*, survit à 3.10^6 rad)
- Fortes concentrations en métaux lourds = **métallotolérants**
- Absence d'oxygène = **anaérobie**
- **Polyextrêmophile** = anaérobie hyperthermophile radiotolérant (*Thermococcus gammatoletans*), anaérobie hyperthermophile piézophile strict (*Pyrococcus yayanosii*)



Solfatare, Champs Phlégréens, Italie



Werilang, Java, Photo Rietze



Kawah Ijen, Java, Photo Rietze



Rivière de soufre en flammes et lac du Kawah Ijen, Java, Photo Rietze



Eyjafjallajökull, Islande, Photo Ritzel



Silex spring, Yellowstone, photo J. Querellou



Fountain Pot, Yellowstone, USA, Photo J. Querellou



Mammoth Spring, Yellowstone, USA, Photo J. Querellou



Grand Prismatic, Midway Geysir, Yellowstone, USA, Photo J. Querellou

Interêt de l'étude des extremophiles

- Les extremophiles nous apprennent les limites de la vie telle que nous les connaissons et enrichissent notre compréhension de la biodiversité sur Terre
- La caractérisation des mécanismes permettant aux extremophiles de se maintenir en conditions hostiles apporte non seulement des connaissances approfondies sur le fonctionnement des organismes mais peut conduire à des applications intéressantes en biotechnologie et en exploitation économique des extremophiles
- La compréhension des propriétés inhabituelles des extremophiles conduit à des questionnements sur leur origine (est-ce qu'il s'agit d'organismes qui se sont adaptés récemment aux conditions extrêmes de leur milieu ou peuvent être considérés comme des vestiges d'organismes ayant existé sur la Terre primitive considérée comme plus extrême que maintenant)
- La compréhension des limites de la vie (extremophiles) sur Terre peut apporter des clés sur la possibilité de l'existence d'une vie similaire (passée ou présente) quelque part dans l'univers. L'astrobiologie ou l'exobiologie utilise des outils dont la plupart dérivent des études sur les propriétés de la vie en environnements extrêmes de la Terre

Potentiel biotechnologique des extremophiles

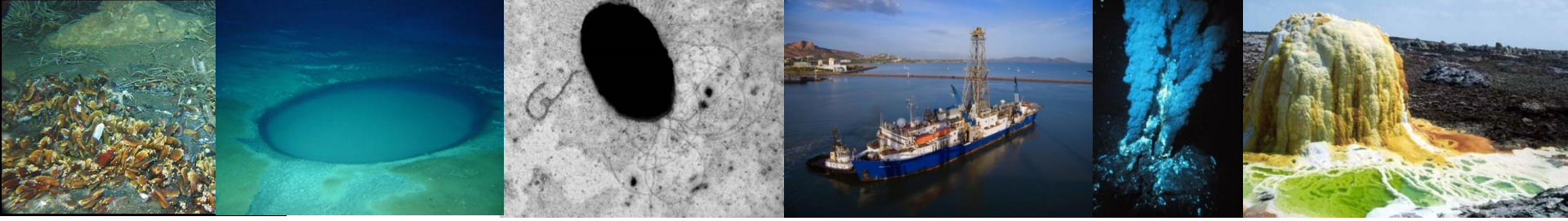
- Taxons originaux = potentiel de biomolécules et de biotransformations nouvelles
- Milieux extrêmes = biomolécules et biotransformations en conditions extrêmes = propriétés originales
- Potentiel biotechnologique
 - Protéines / Enzymes
 - Exo-polysaccharides
 - Lipides
 - Molécules de réserve
 - Métabolites secondaires
- Cahiers des charges industriels

Enzymes Thermostables / ADN polymérases Taq polymérase et PCR

- PCR = technique d'amplification exponentielle de séquences d'ADN par polymérisation en chaîne
- Basée sur l'application de cycles de températures et l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable, la Taq polymérase, issue de la bactérie *Thermus aquaticus* décrite en 1969 par Brock, isolée du parc national de Yellowstone (Etats-Unis)
- Technique inventée par Kary Mullis en 1985
- Invention récompensée par le prix Nobel de Chimie en 1993
- 3 brevets ont été déposés à la fin des années 80 par Cetus Corp. (2 sur la technique, 1 sur la Taq polymérase)
- Les droits d'exploitation achetés par Hoffman-LaRoche en 1991 pour 300 M\$
- Le marché global de la PCR estimé à 38 Md\$ en 2015

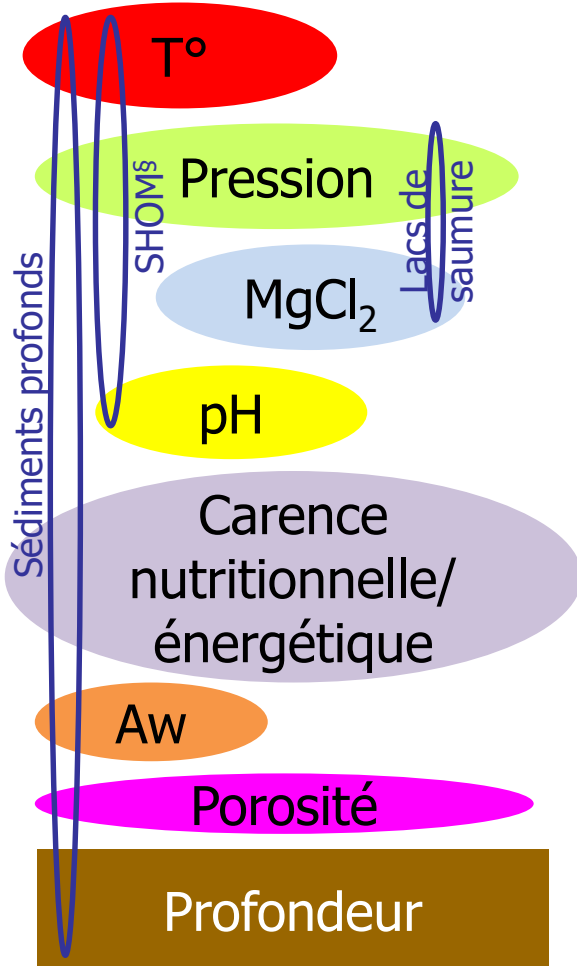
Enzymes Thermostables / Hydrolases

- Alpha-amylase Fuelzyme® de Verenium (Etats-Unis)
 - Obtenue à partir d'échantillons hydrothermaux profonds
 - Liquéfaction de l'amidon pour la production de bio-éthanol
 - Utilisable de 85 à 110°C et de pH=4 à pH=6,5
 - Stable au moins 6 mois à température ambiante
-
- Pyrolase® de Verenium (Etats-Unis)
 - Cellulase active jusqu'à 100°C et à pH alcalin
 - Probablement issue d'un *Pyrococcus*
 - Contrôle de viscosité dans les puits d'extraction pétrolière (hydrolyse de la gomme de guar)
 - Se substitue aux acides et oxydants chimiques, réduction de l'impact environnemental

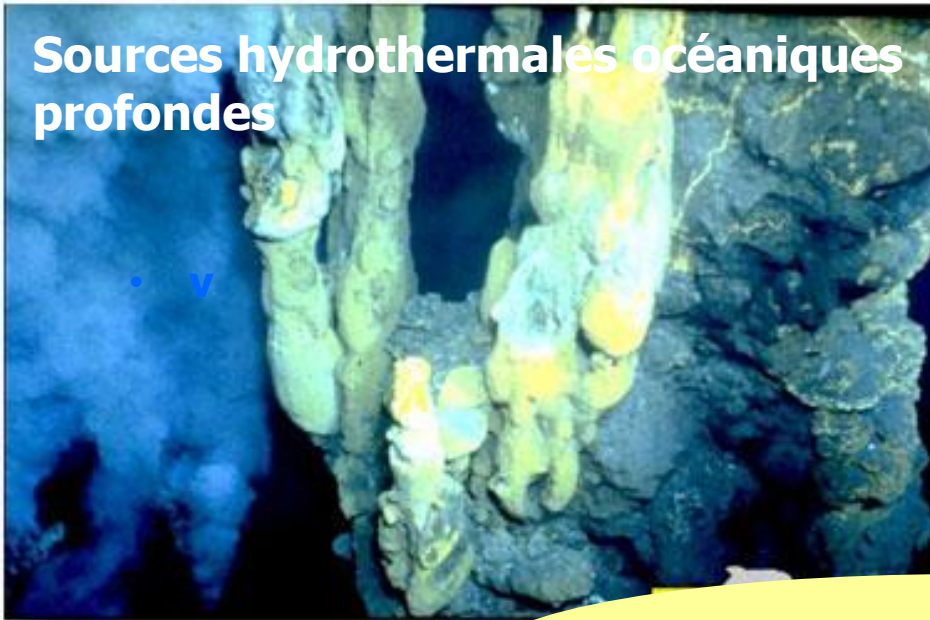


Questions scientifiques

- Quelles sont les limites physico-chimiques de la Vie terrestre actuelle?
- Quelles sont les limites géographiques (dimension verticale) de la Vie terrestre actuelle? Localisation de la frange biotique, zone où le vivant cède la place à l'inerte?
- Quelle est la diversité phylogénétique et métabolique des organismes vivant à ces limites?
- Quels sont les mécanismes adaptatifs mis en jeu dans les milieux les plus extrêmes?



Sources hydrothermales océaniques profondes



Lacs hypersalés



Chimiosynthèse microbienne

Cold seeps

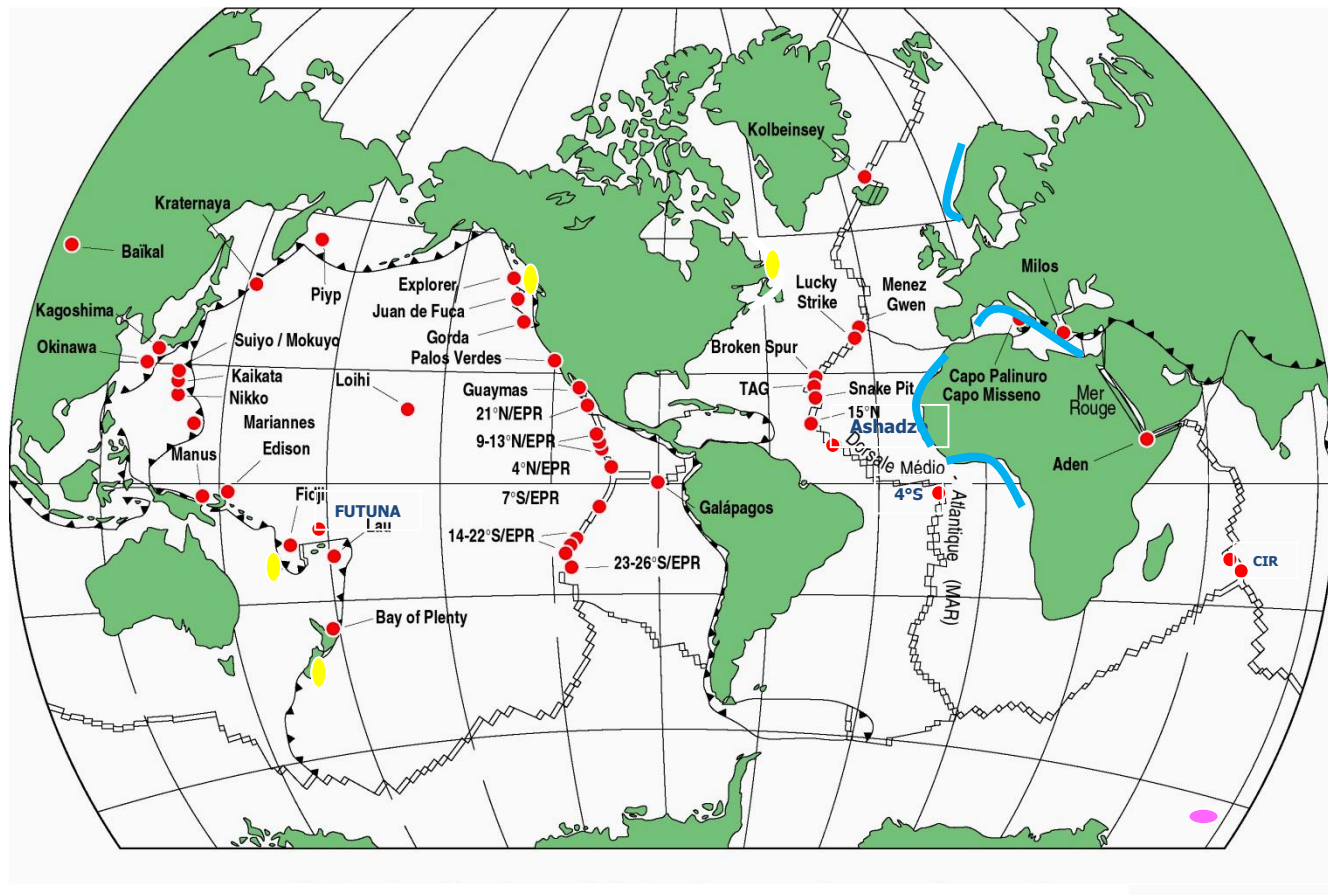


Sédiments de subsurface



Communautés microbiennes dans les environnements océaniques profonds

✓ Observation et exploration de l'océan profond: lien entre les études fonctionnelles et des nouvelles découvertes.



● sites de forage profond, ● sources hydrothermales, / émission de fluides froids et lacs hypersalés, ● sources géothermales

Des moyens communs pour l'étude des milieux extrêmes : les flottes océanographiques

✓ Les navires



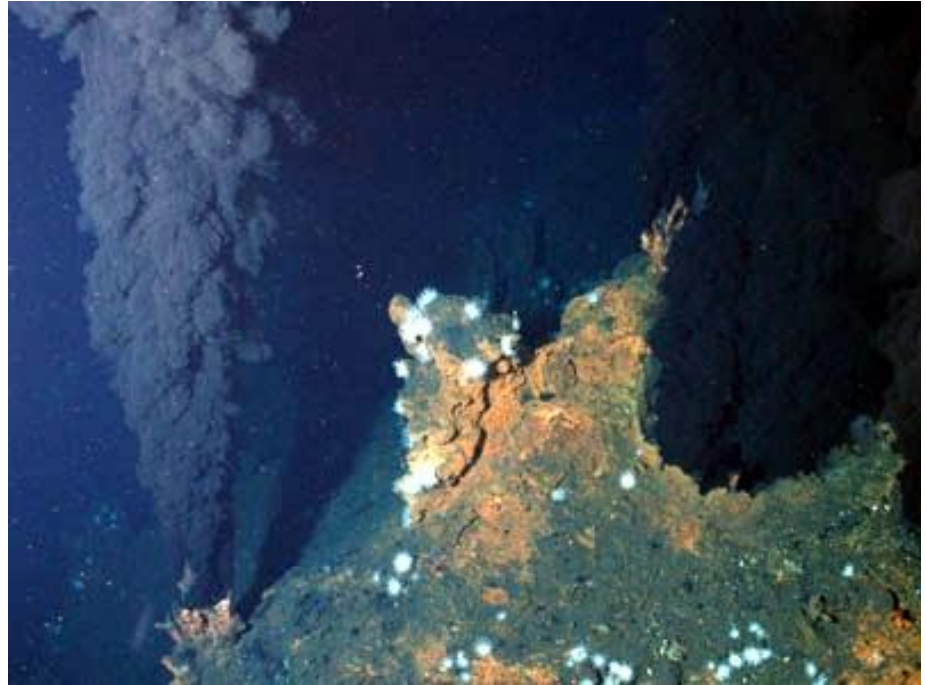
✓ Les engins sous-marins



1977,1979: découverte des sources hydrothermales océaniques profondes



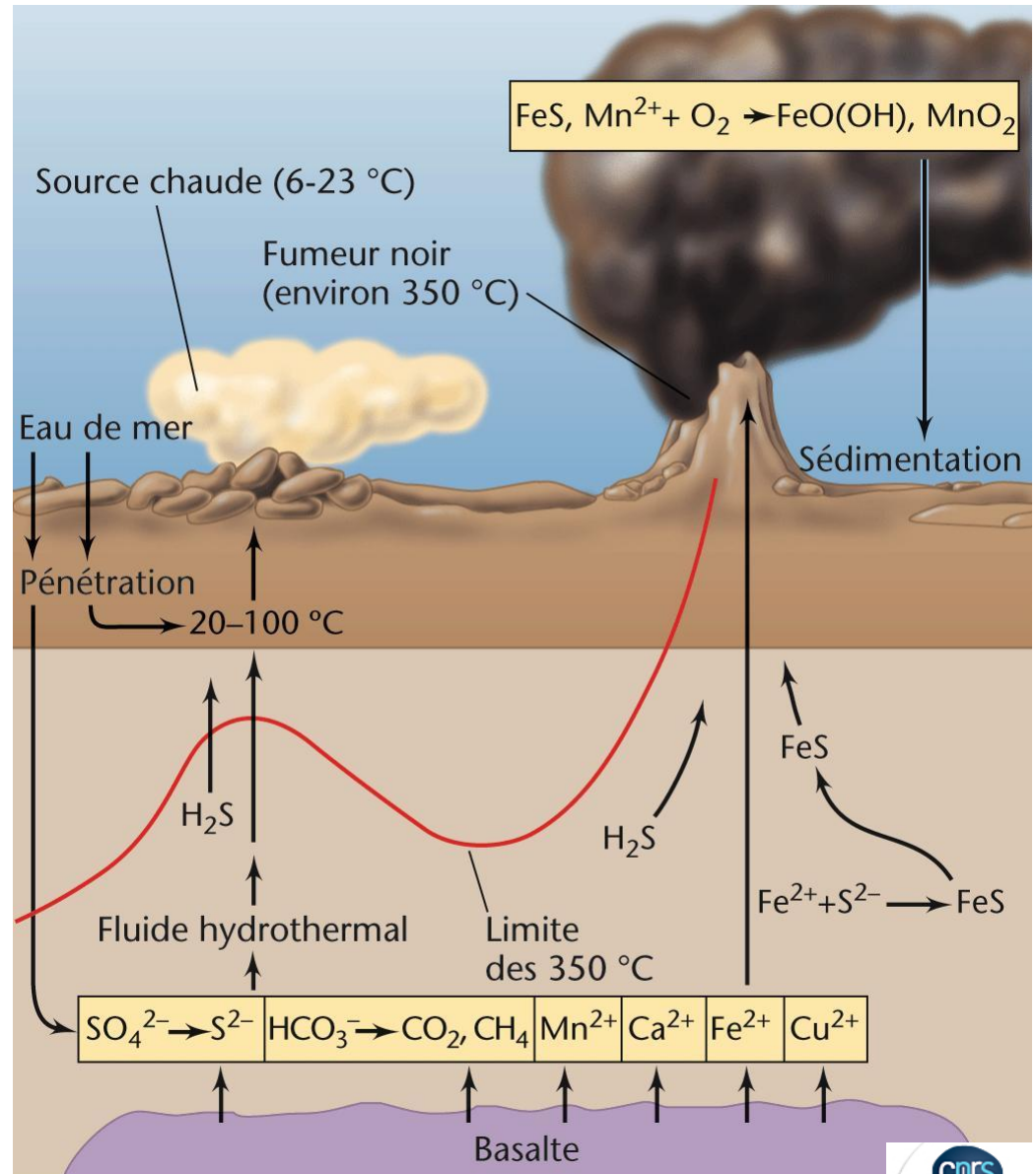
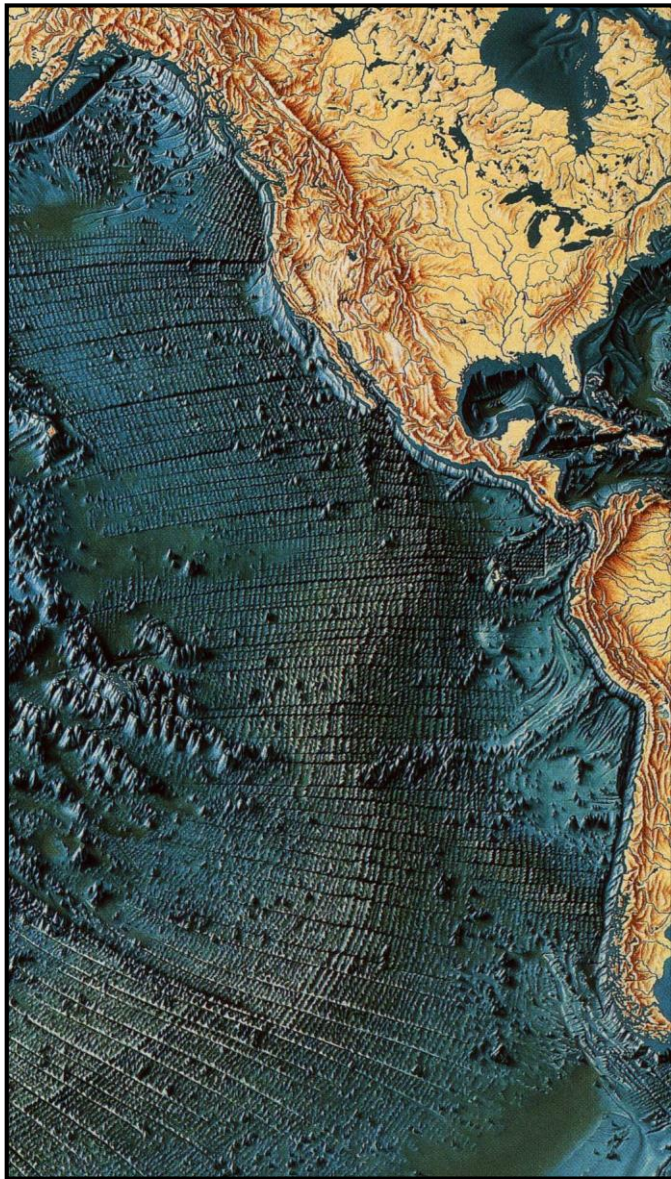
[Riftia pachyptila](#) un organisme fascinant des sources hydrothermales océaniques profondes



Site Ashadze sur la dorsale médio-atlantique 4100 m, deux fumeurs noirs actifs colonisés par des anémones

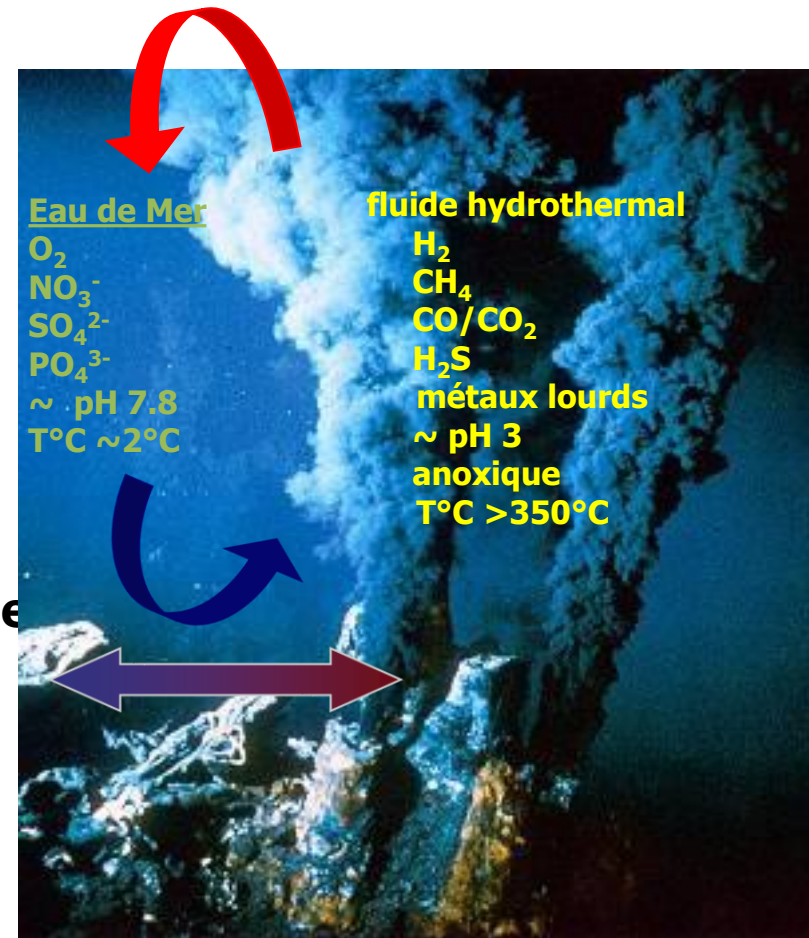
**Biotopes inattendus sur Terre:
Ecosystèmes chimiosynthétiques**

Hydrothermalisme



Caractéristiques physico-chimiques des sources hydrothermales océaniques profondes

- Concentration en sel (35 g/L)
 - **halophiles modérés**
- pH 3 à 8 en eau de mer
 - Principalement des **neutrophiles**
- Température : 2 à plus de 350°C
 - **Psychrophiles au hyper/thermophile**
- Pression : dépend de la profondeur
 - **Piezophiles**



Isolement et culture des extremophiles

Échantillons de cheminée



Conditions de Culture

Température

pH, salinité

Gaz

(donneurs et accepteurs
d'électrons)

Dilution rate

(concentration de substrat)

Composition du milieu

Sources de Carbone

(nature et concentration)

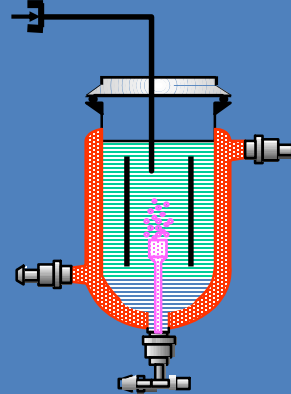
Donneurs et accepteurs
d'électrons

Inoculation

Cultures d'enrichissement Batch



Culture en continue



Observation microscope
Constraste de Phase
epifluorescence

Analyse moléculaire:

Diversité ARNr 16S

- DGGE/SSCP
- Clonage/sequençage
- Analyse phylogénétique
- Hybridation *In situ*
- PCRq

Analyse du milieu par HPLC

Analyse de production de gaz par CG

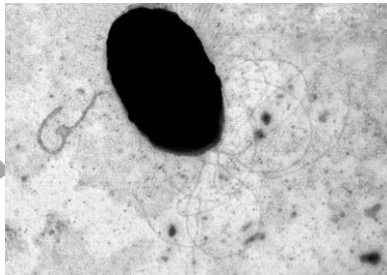
Sub-cultures et isolement des souches

Description de nouveaux taxons - Modèles

❖ 3 nouveaux genres, 13 nouvelles espèces

- Thermophiles/hyperthermophiles & mesophiles
- Piezophiles ou non
 - Heterotrophes & autotrophes
 - Respirations O_2 , S^0 , $Fe(III)$, SO_4^{2-} ou fermentations

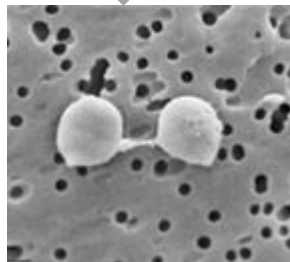
Paleococcus pacificus sp. nov.
Thermococcus prieurii sp. nov.
Halomonas lionensis sp. nov.
Pyrococcus yayanosii sp. nov.
Phaeobacter leonis sp. nov.
Anoxybacter fermentans gen. nov.
Anaeromicrobium sediminis gen. nov.
Thermococcus piezophilus sp. nov.
Caloranaerobacter ferrireducens sp. nov.
Kosmotoga pacifica sp. nov.
Methanohalophilus sp. sp. nov.
Pseudodesulfovibrio indicus gen. nov.
Desulfurobacterium indicum sp. nov.
Pyrococcus kukulkanii sp. nov.
Thermococcus barophilus (1999)



80-**98**-108 °C
20-**52**-120 MPa

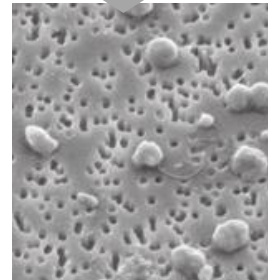
Seul hyperthermophile
piezophile strict

Zeng et al. ISME J (2009),
IJSEM (2011)



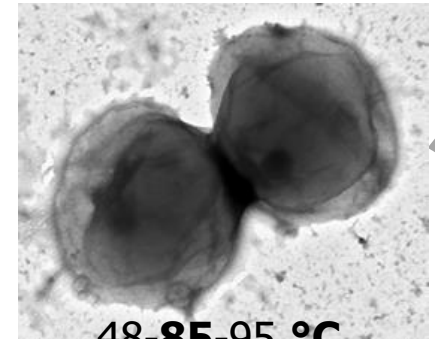
60-**75**-95 °C
0,1-**50**-135 MPa
Gamme de pression
de croissance la plus
large

Microbiol (2016)



70-**105**-112 °C
0,1-**40/50**-80 MPa
Record de T° chez
les *Thermococcales*

Callac et al. IJSEM (2016)



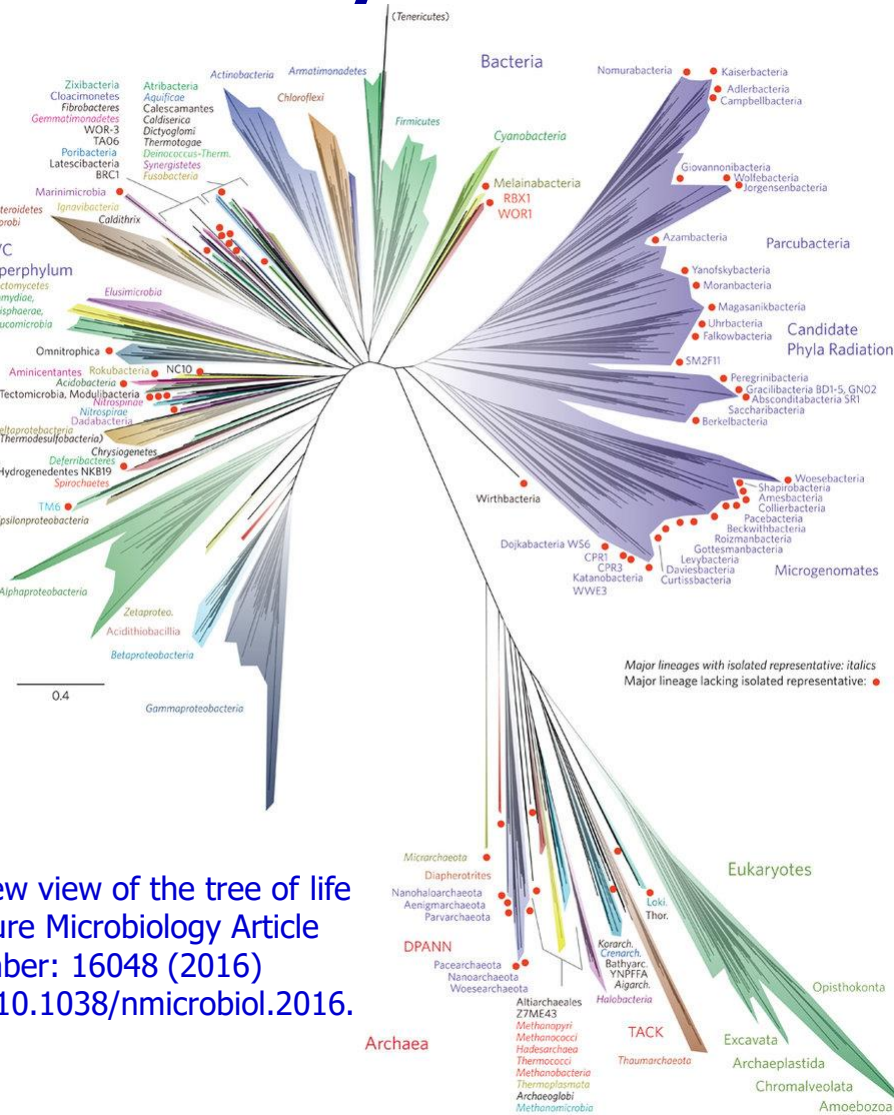
48-**85**-95 °C
0,1-**40**-80 MPa
Système génétique

Thiel et al. IJSEM (2014)

Sources hydrothermales océaniques profondes :

A new view of the tree of life
Nature Microbiology Article
number: 16048 (2016)
doi:10.1038/nmicrobiol.2016.
48

The tree includes 92 named bacterial phyla, 26 archaeal phyla and all five of the Eukaryotic supergroups. Major lineages are assigned arbitrary colours and named, with well-characterized lineage names, in italics. Lineages lacking an isolated representative are highlighted with non-italicized names and red dots.



Plus de 100 espèces de *Bacteria* (17 phyla, 72 genera, 113 espèces) et *Archaea* (3 phyla, 17 genera and 62 espèces) ont été isolées et cultivées à partir des sources hydrothermales océaniques profondes, principalement de l'océan pacifique (69–77% des espèces) et, dans une moindre mesure des océans atlantique (19–28% des espèces) et indien (2–4% des espèces).

Total : $4\text{--}6 \times 10^{30}$ cellules,
Milieu marin : 1.18×10^{29} cellules
Zone euphotique : 3.6×10^{28} cellules,
océan profond (>1000m) : $6,5 \times 10^{28}$ cellules
seulement ~11000 espèces décrites
(31 phyla Bacteria, 5 phyla Archaea),
validés et on estime à $10^6\text{--}10^9$ le nombre de
procaryotes de différents types

Par procédé biotechnologique, Venuceane™ exploite le pouvoir de *Thermus thermophilus* afin d'apporter ces effets bénéfiques à la peau humaine.

VENUCEANE™ est un extrait biotechnologique thermostable contenant des extremozymes qui a été obtenu par procédé de fermentation

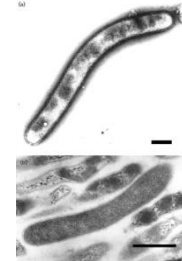
En usage, il offre le double avantage d'être activé par la chaleur et protégé contre les rayonnements UV en conditions réelles du climat

Venuceane est recommandé en:

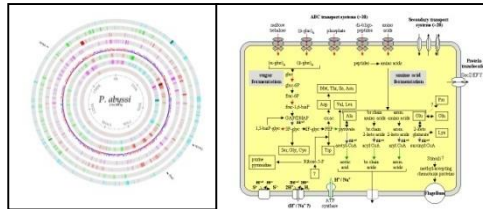
Formulations Anti-age

Formulations durant ou après bronzage.

Crème de protection quotidienne et dans les traitements antioxydants



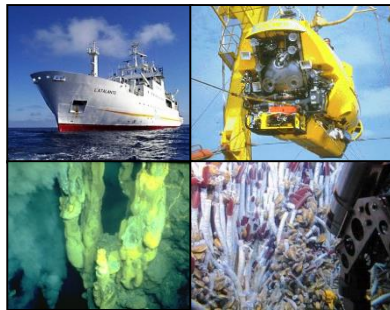
Procédé de découverte de nouvelles enzymes en haut débit (Projet MAMBA 7^{ème} PCRD, 2009-2013)



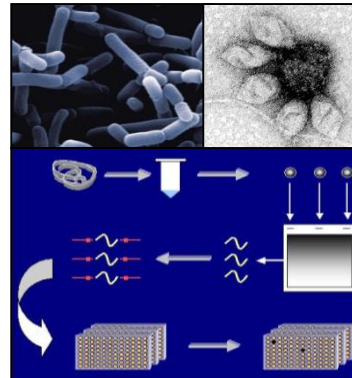
Genomes-metagenomes



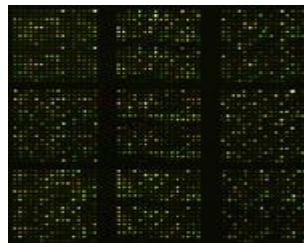
Expression des protéines
et caractérisation



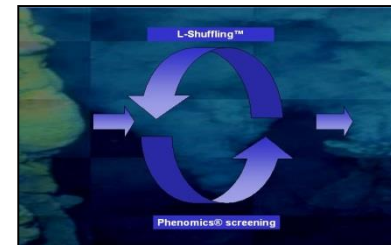
Échantillonnage
Préparation des échantillons



Enrichissements
Isolats, banques



Plateformes d'identification

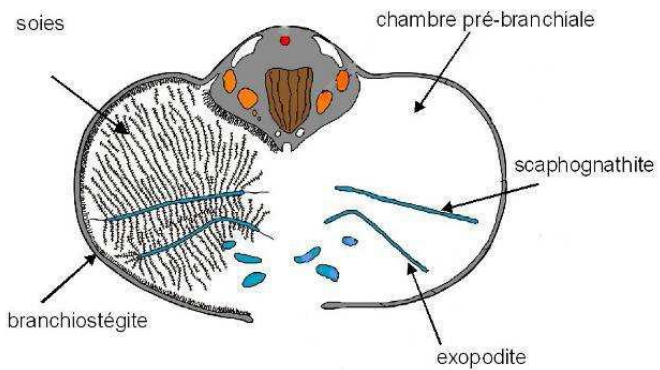


Amélioration enzymatique

**Production
Enzyme**



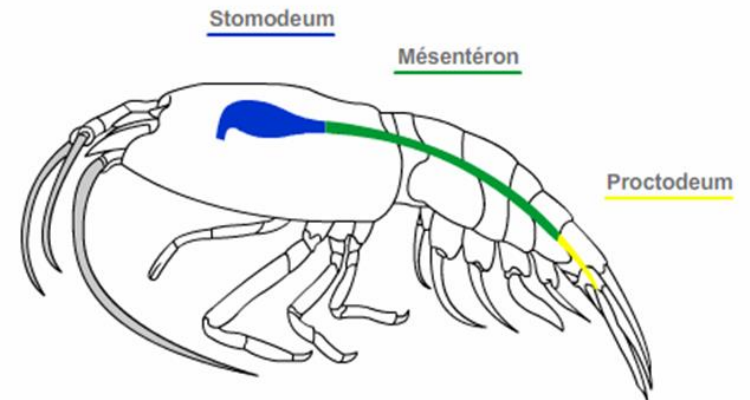
Le modèle *Rimicaris exoculata*



Cavité céphalothoracique

Double symbiose

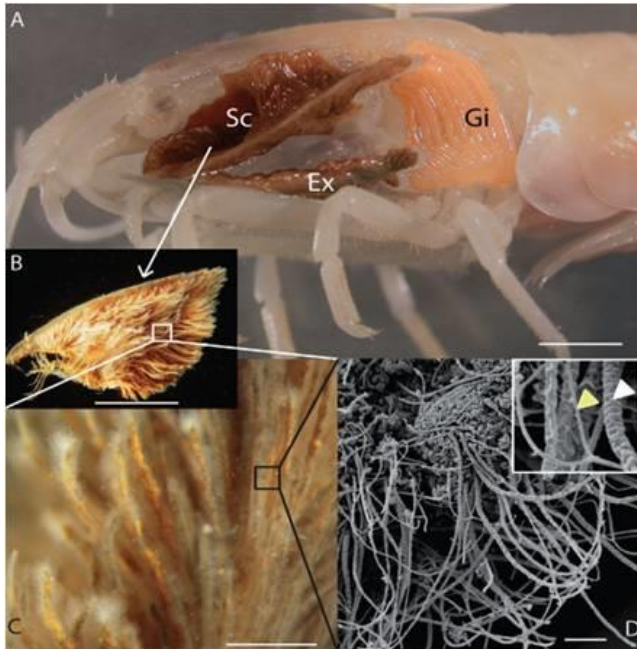
Epibiose



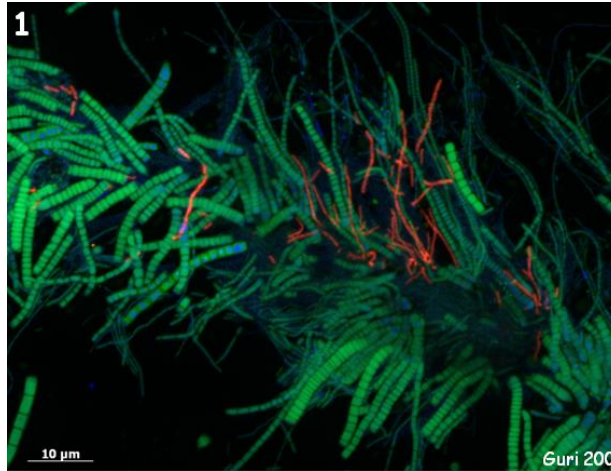
Tractus digestif



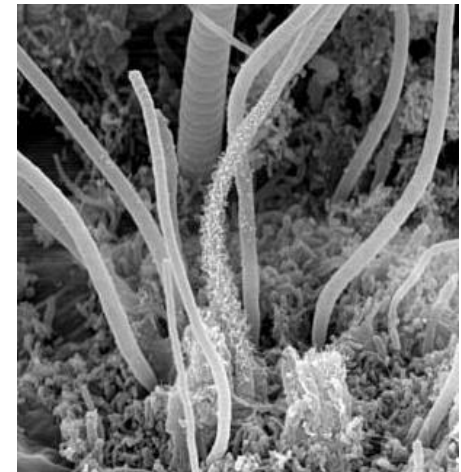
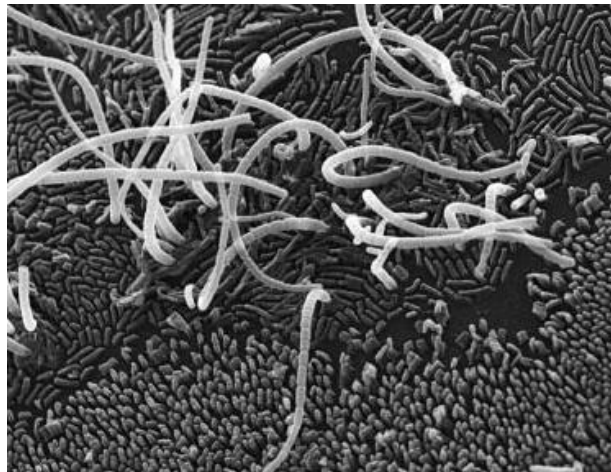
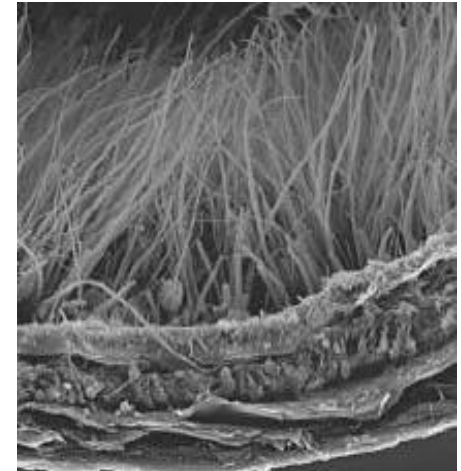
Le modèle *Rimicaris exoculata*



Petersen et al., 2010



Guri 2009

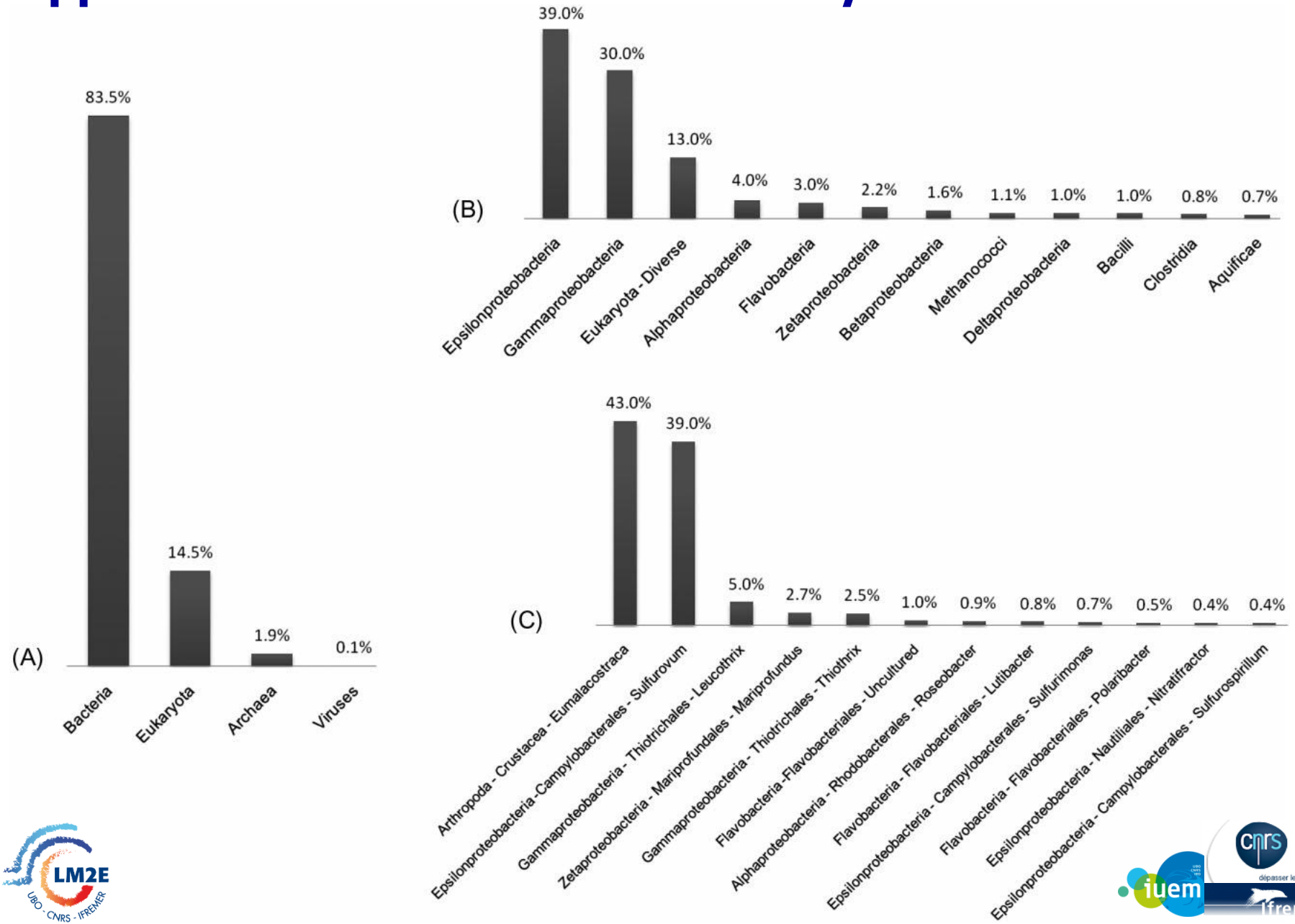


Plusieurs morphotypes bactériens

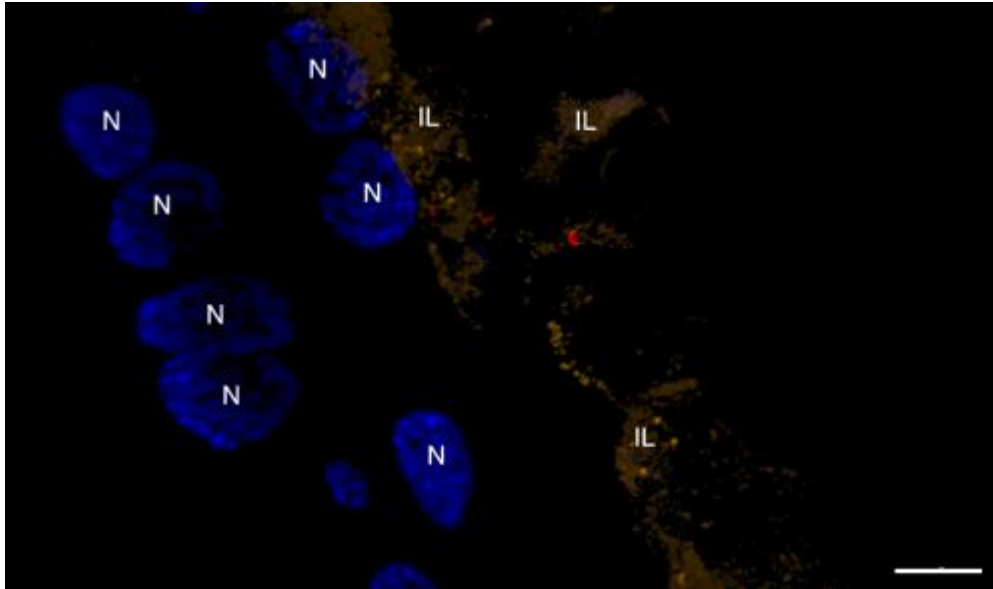
Différents types de filaments
Bacilles



Rimicaris exoculata: une exploration métagénomique approfondie et découverte des *Zetaproteobacteria*



Rimicaris exoculata: une exploration métagénomique approfondie et découverte des *Zetaproteobacteria*

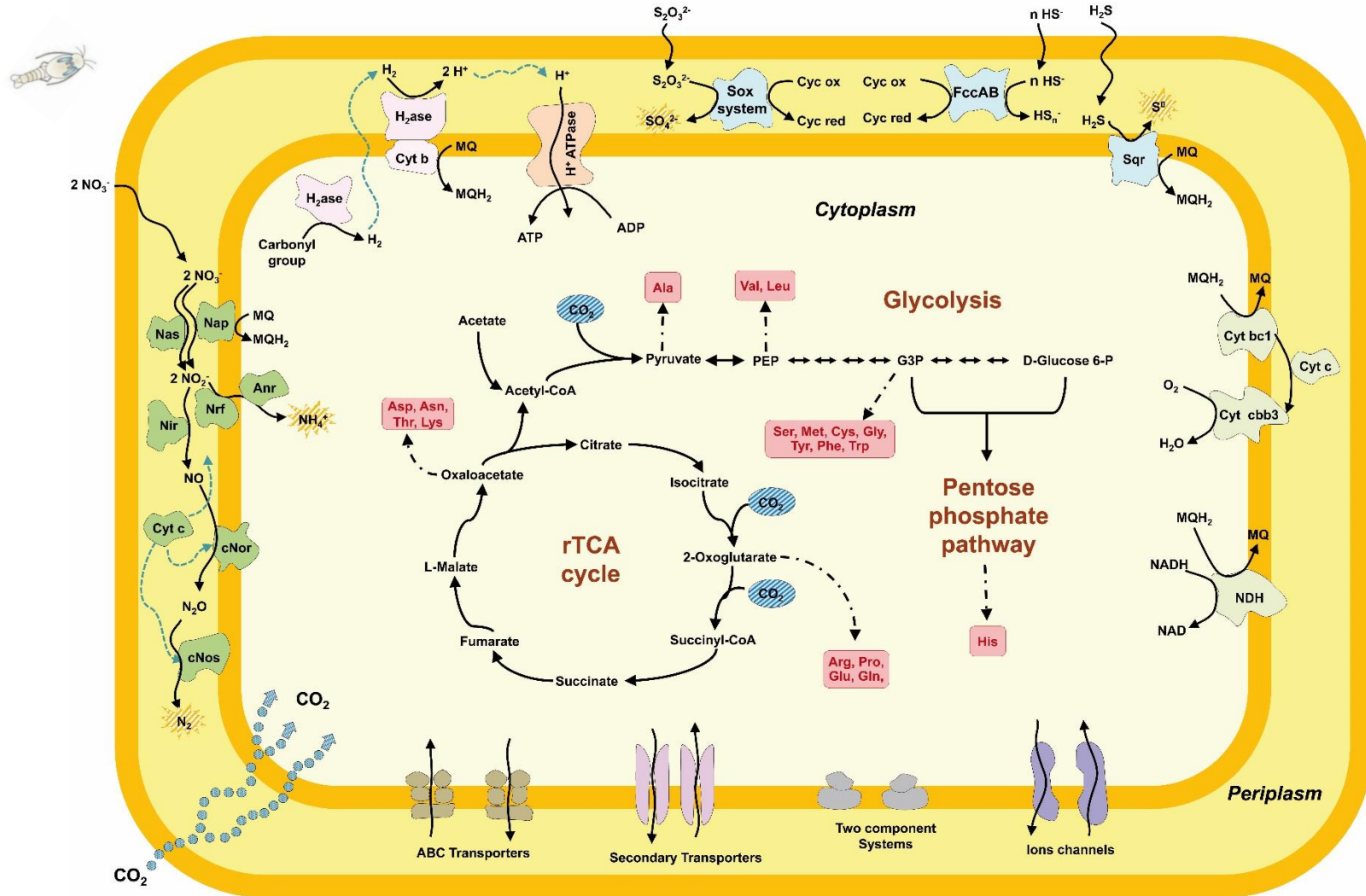


Environmental Microbiology

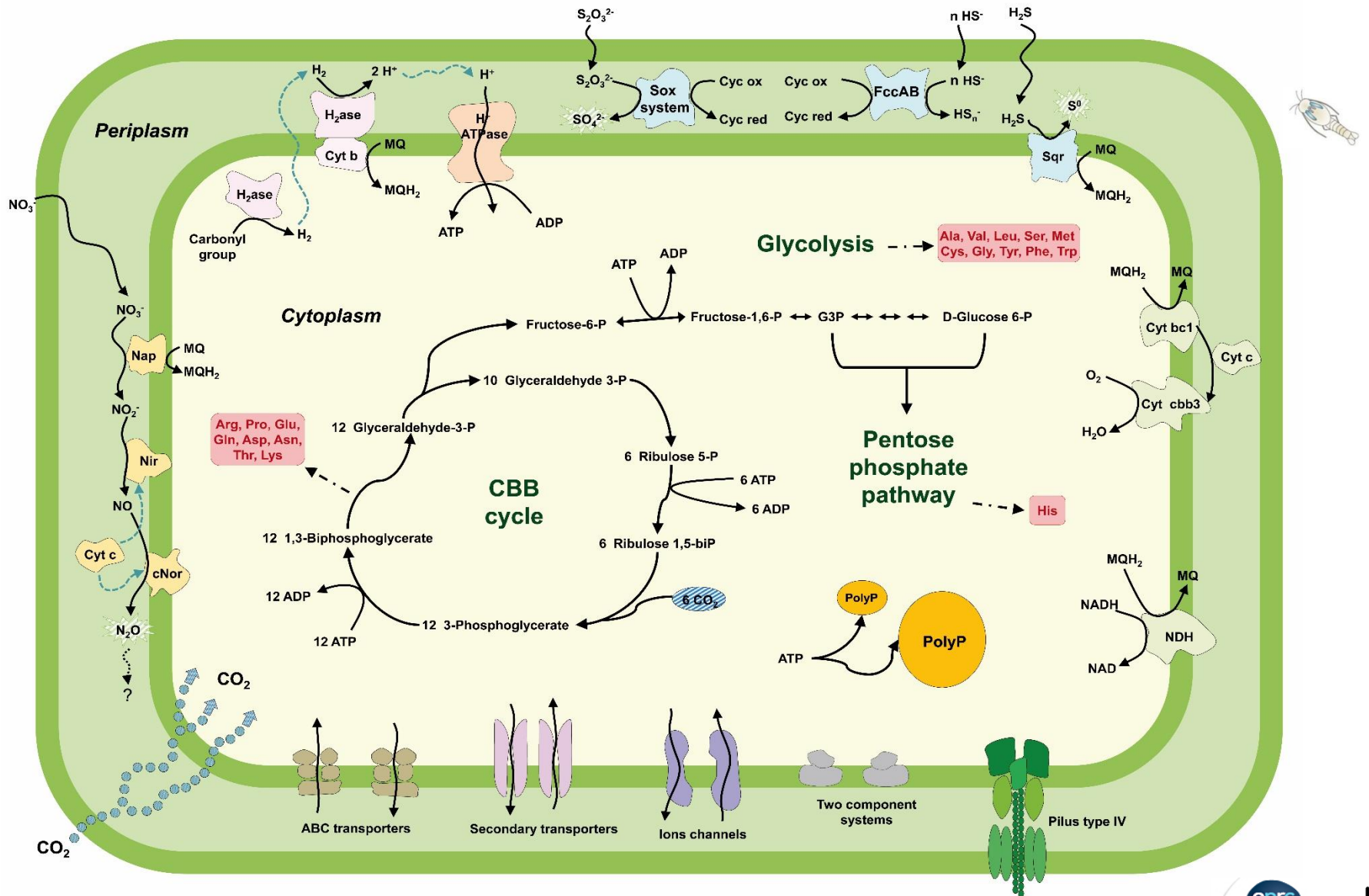
4 MAR 2014 DOI: 10.1111/1462-2920.12406

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.12406/full#emi12406-fig-0002>

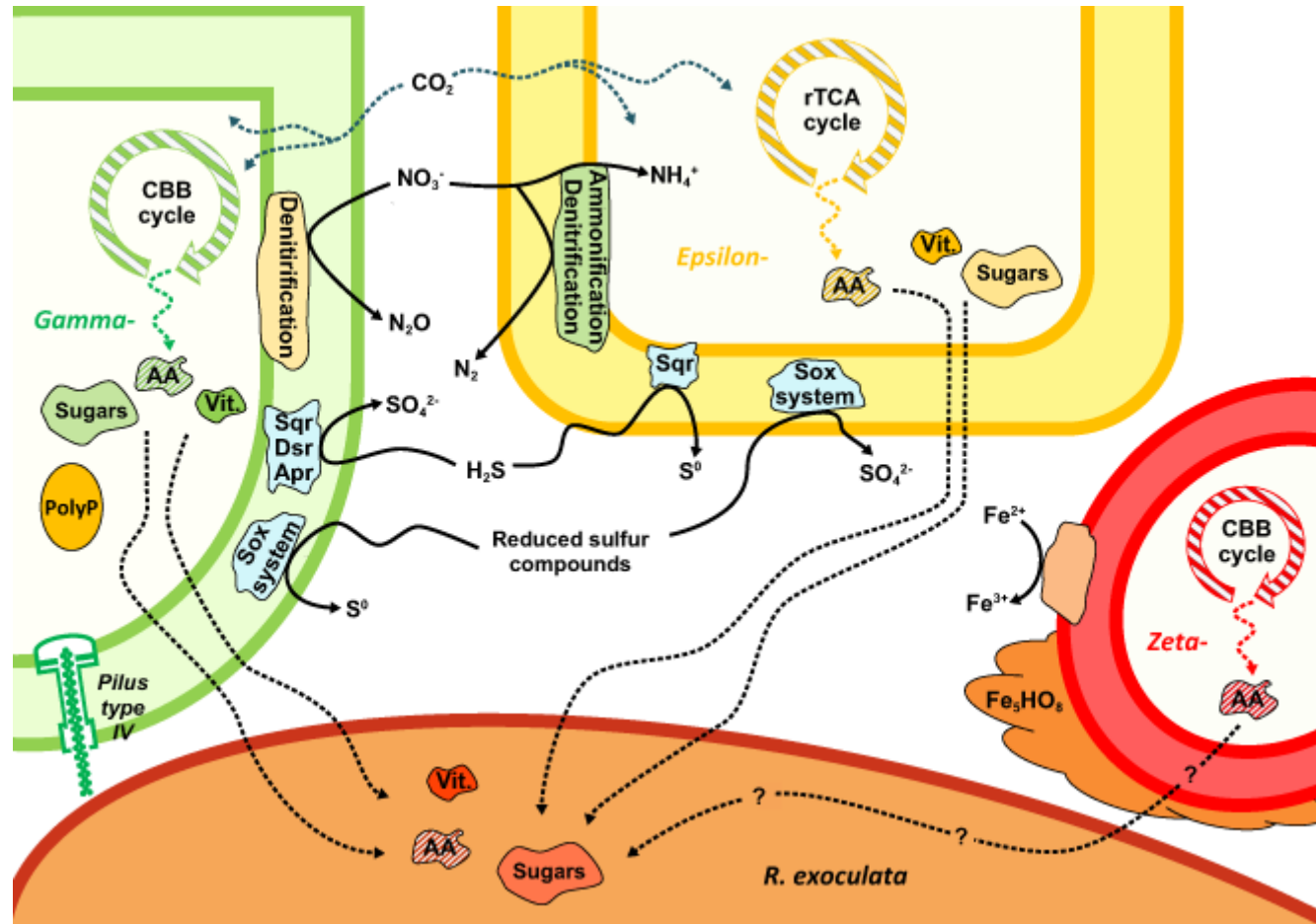
EPSILONPROTEOBACTERIA



GAMMAPROTEOBACTERIA



Rimicaris exoculata: une exploration métagénomique approfondie et découverte des *Zetaproteobacteria*

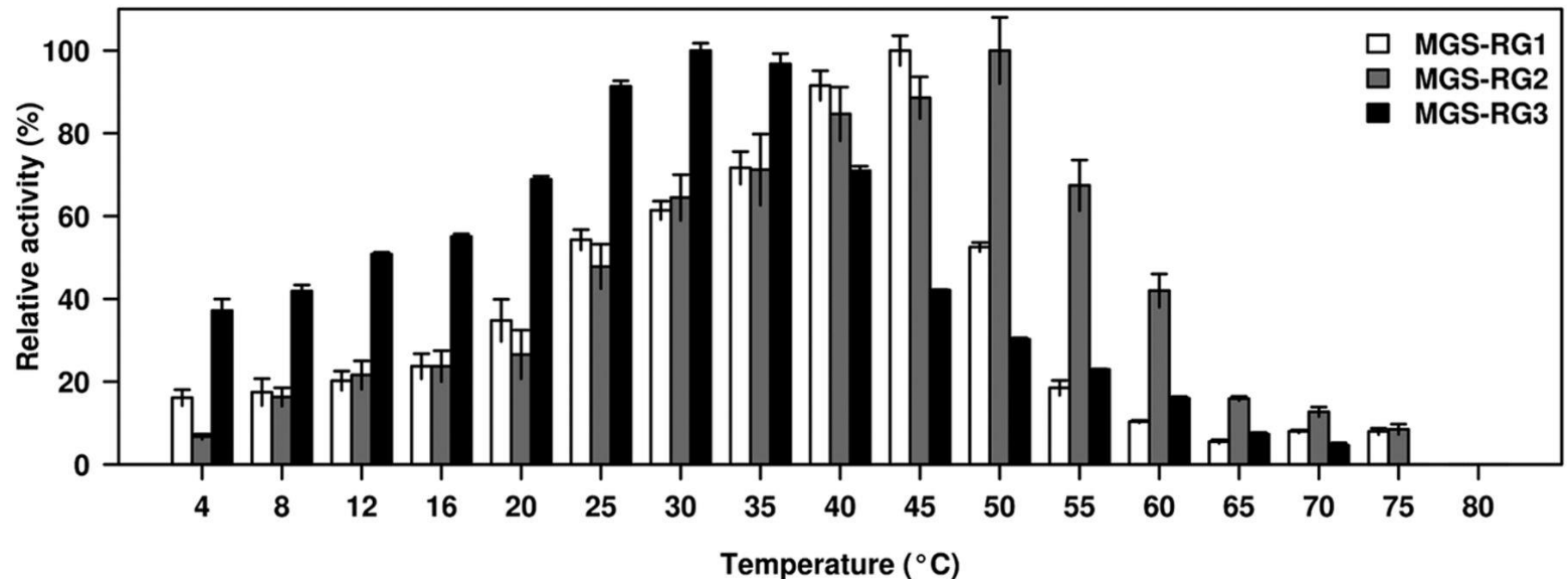


Environmental Microbiology

4 MAR 2014 DOI: 10.1111/1462-2920.12406

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.12406/full#emi12406-fig-0005>

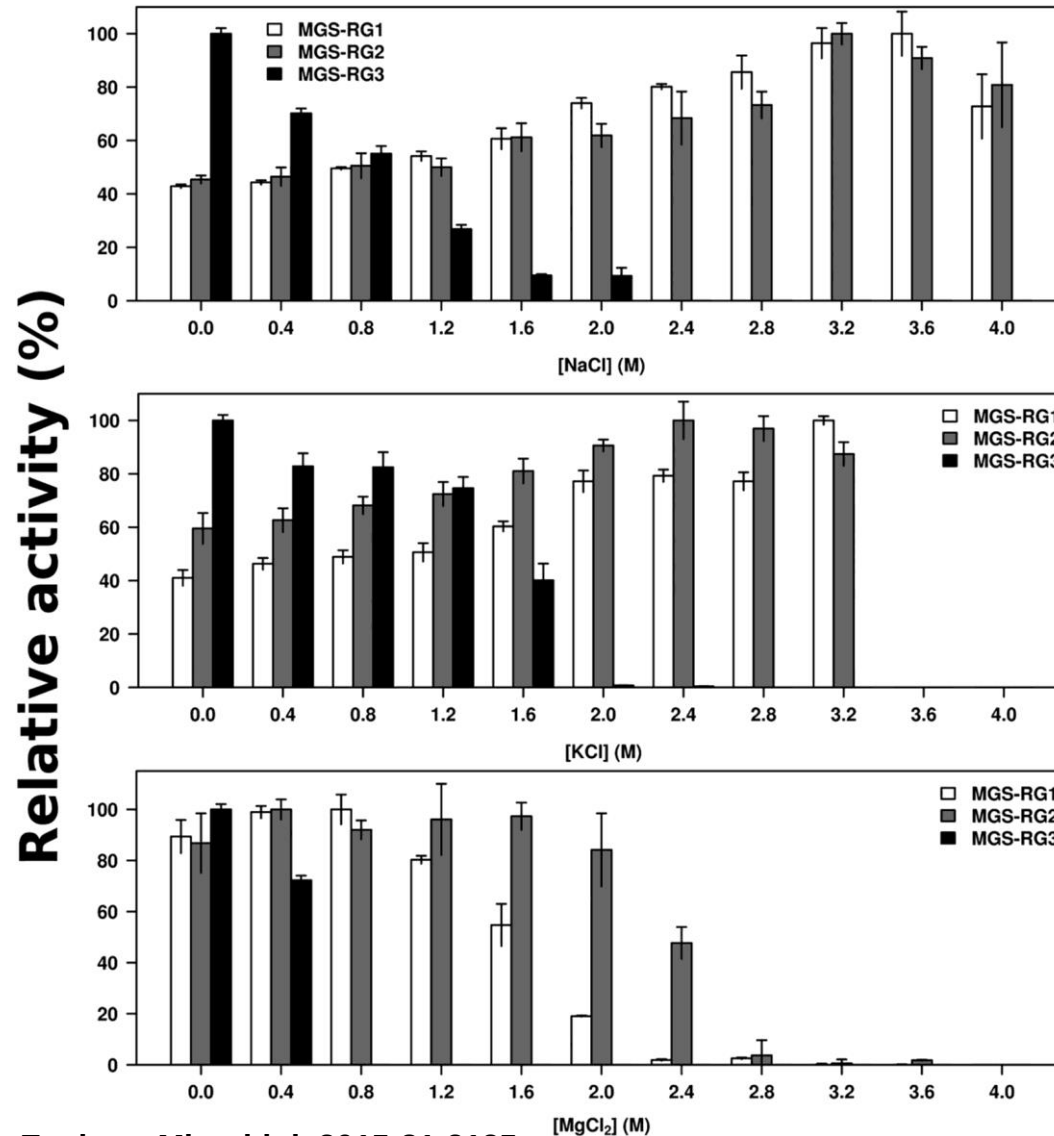
Effet de la température sur l'activité des carboxyl esterases des epibiontes de la cavité cephalothoracique de *R. exoculata*.



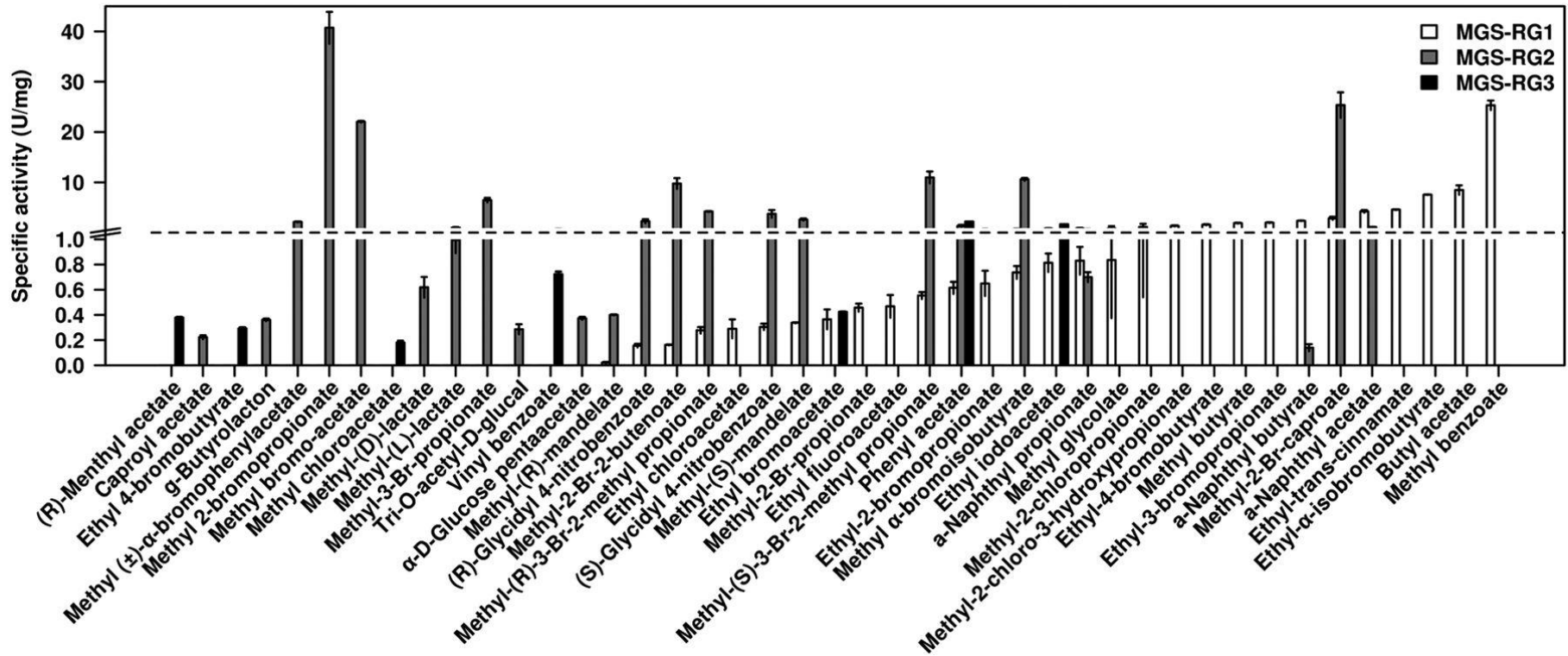
María Alcaide et al. Appl. Environ. Microbiol. 2015;81:2125-2136

Applied and Environmental Microbiology

Effet du NaCl, KCl, et MgCl₂ sur l'activité des carboxyl esterases.



Gamme de substrats des carboxyl esterases issus des epibiontes de *R. exoculata*



Of the enzymes tested, MGS-RG1 was the only enzyme able to hydrolyze methyl-2-Br-propionate. In addition, MGS-RG1 and MGS-RG3 showed various capacities to hydrolyze (*R,S*)-glycidyl 4-nitrobenzoate and methyl-2-bromo-2-butenate, esters that otherwise were hydrolyzed only by MGS-HA1, an enzyme isolated from a hydrothermal vent

A



Cellulase extrêmement thermostable produite par une archée des sources hydrothermales océaniques profondes

Functional screening of hydrolytic activities reveals an extremely thermostable cellulase from a deep-sea archaeon

Benedikt Leis^{1†}, Simon Heinze^{1†}, Angel Angelov¹, Vu Thuy Trang Pham¹, Andrea Thürmer², Mohamed Jebbar³, Peter N. Golyshin⁴, Wolfgang R. Streit⁵, Rolf Danie⁶ and Wolfgang Liebl^{1*}

Parmi une variété d'activités hydrolytiques, un clone de fosmide, dérivé d'une banque mixgénomique préparée d'archées hyperthermophiles provenant de cheminées hydrothermales océaniques profondes, a présenté une activité hydrolytique sur la carboxyméthylcellulose à 70 °C mais pas à des températures inférieures.

La caractérisation biochimique de cette cellulase a révélé une protéine remarquablement thermostable, qui semble être d'origine d'une espèce de *Thermococcus*.

Caractéristiques : activité maximale à 92 °C et a été actif sur une variété de 1,4 β -glucanes linéaires comme la carboxyméthylcellulose, β -glucan, lichenan et la cellulose phosphorylée.

La protéine est capable de se lier à différents β -glucanes insolubles.

L'analyse de la structure du produit a indiqué que cette enzyme est une β -endo-glucanase

La chaîne de valeur depuis l'identification des enzymes jusqu'à la mise en œuvre des procédés biocatalytiques

Value chain



Metagenomes



AFH enzymes



$ee = 99.9 \%$
 $\mu\text{g} \rightarrow \text{g}$



Scale-up
 $\text{g} \rightarrow \text{kg}$



Processes, products & knowledge

Current time line: –7 years

Metagenome
sampling &
library
construction

Enzyme screening
& characterization

Enzyme & expression optimization

Process development

Final
production
process

Time line & costs

Research goal: time line of 0–3 years

A
collection
of AFHs

Enzyme
application

Final
production
process

Reduced development time and costs

Conclusions et perspectives sur les extremophiles

- **Priorité accordée aux protéines, relative facilité de production**
- **Difficultés de culture des extrêmophiles et de production de biomasse => difficulté de production d'autres molécules : polysaccharides, lipides (archées), métabolites secondaires,...**
- **Peu d'intérêt accordé jusqu'à présent aux organismes plus producteurs de biomasses (micro-eucaryotes)**
- **Les extrêmophiles offrent toujours un fort potentiel d'innovations ; apport des technologies « omiques »**

Conclusions : suite

- **Exploration de la biodiversité de la Terre est loin d'être terminée**
- **De nouveaux biotopes et des formes de vie sont encore à découvrir**
- **Les frontières physico-chimiques et géographiques de la vie sur Terre ne sont pas encore connues**
- **La majorité des découvertes à venir émaneront de la biosphère profonde et de subsurface**
- **Les extremophiles de l'océan profond constituent une ressource génétique marine pour caractériser de nouvelles macromolécules ayant des structures et des activités adaptées aux conditions extrêmes**
- **Des biotopes similaires (passé ou présent?) où sont présents des formes de vie procaryotique notamment extremophile, peuvent ou ayant existé au sein du système solaire?**

Merci pour votre attention

Photo du site Logatchev en ride médio-atlantique,
3000m de profondeur

