

Dégradation de la biomasse végétale enjeux et méthodologies

Dr. Sylvain Brun maître de conférences
Université Paris-Diderot France



LIED
PIERI



université
PARIS
DIDEROT
PARIS 7



C'est l'histoire d'un castor...









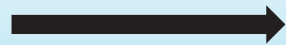
La biomasse végétale

La Biomasse Végétale

Biomasse = matière vivante ou issue d'êtres vivants

Azote N
Carbone C

Anthropocentriste



Production d'énergie
Production industrielle

Biomasse

énergies fossiles (issues d'être vivants)

Source renouvelable

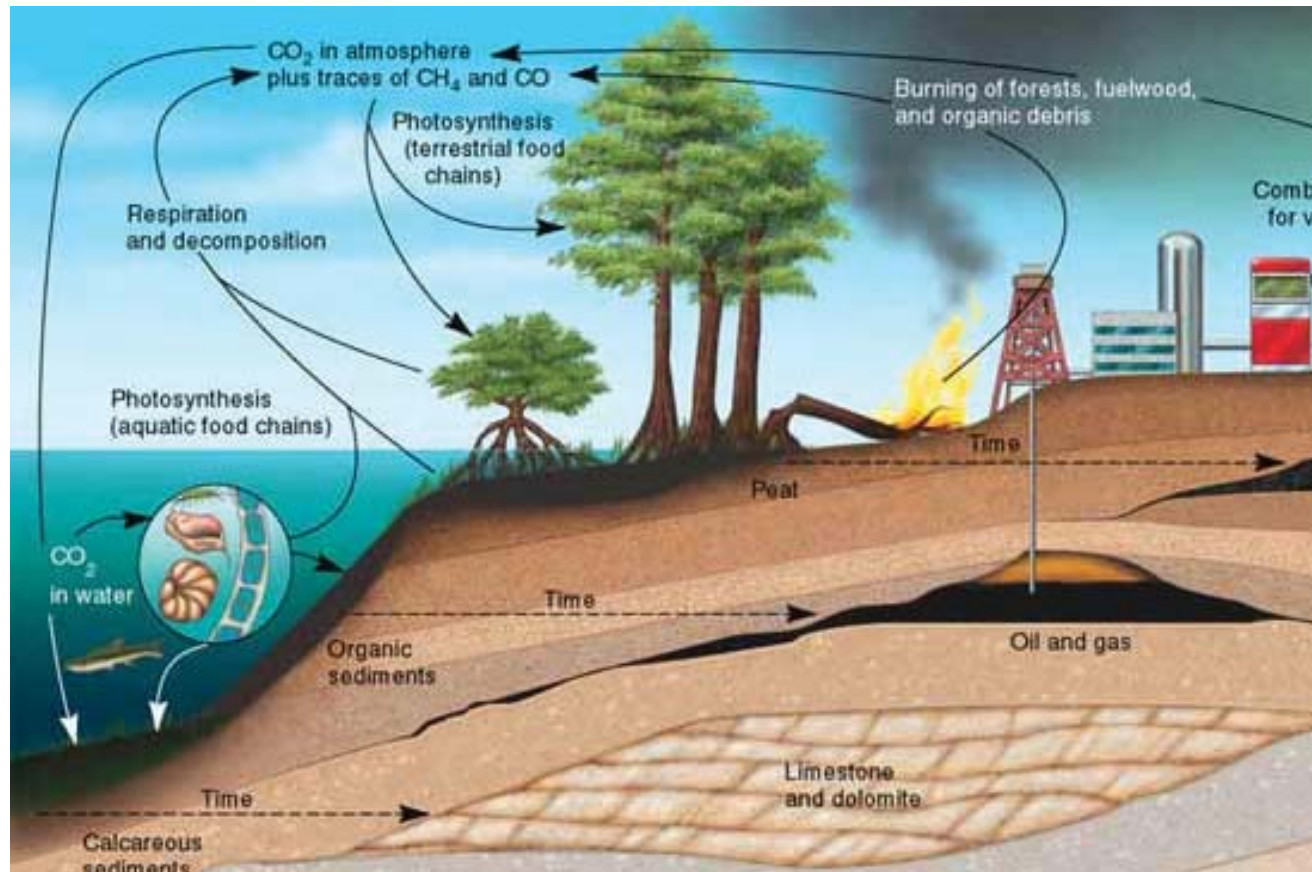
≠

Source non renouvelable

Ecologique: lutter contre l'émission de gaz à effet de serre

Economique: assurer / développer l'indépendance énergétique

Le cycle du carbone

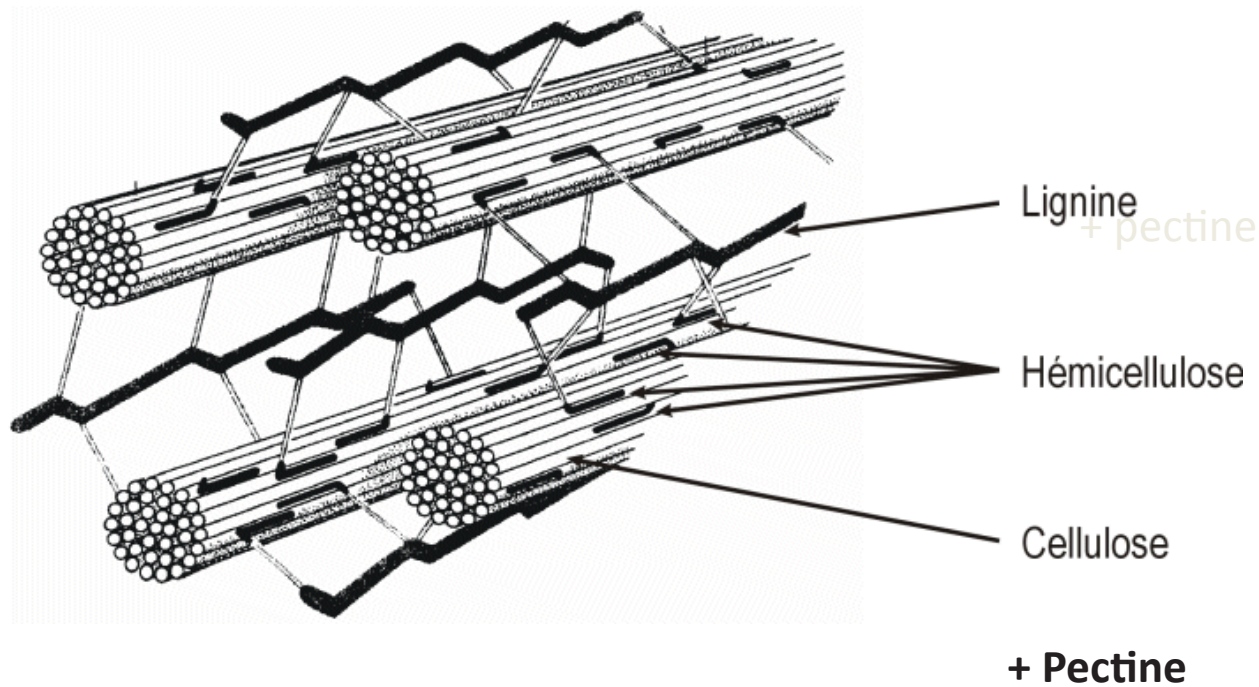


sources fossiles



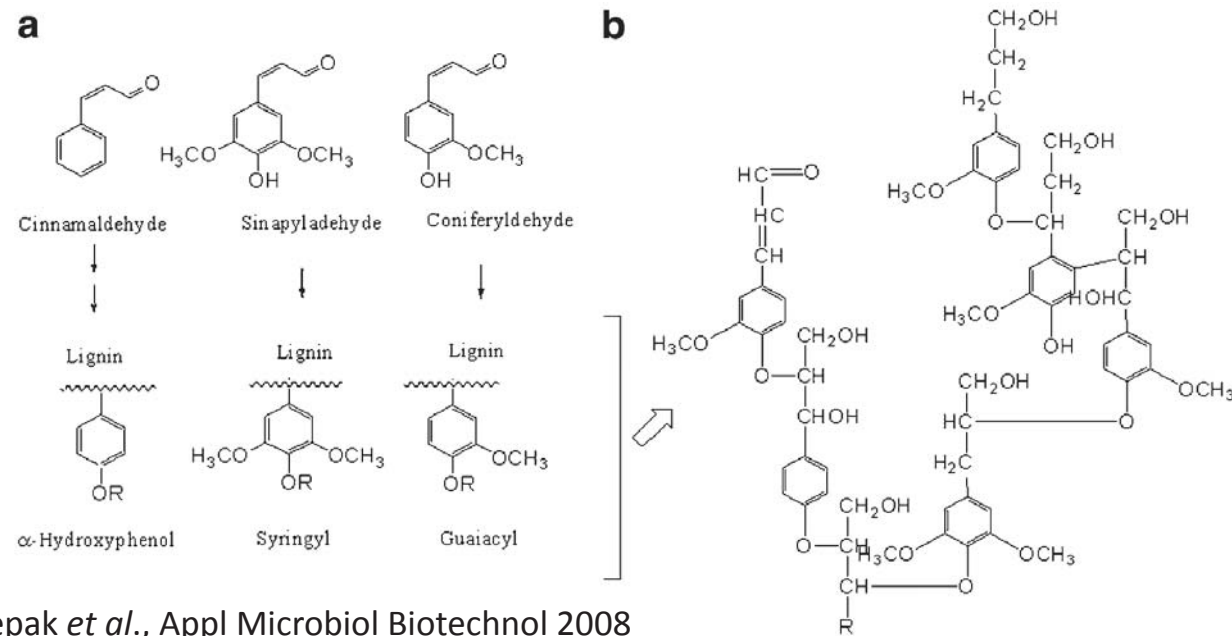
CO_2

Structure de la paroi végétale



- La cellulose est le polymère le plus abondant sur Terre
- 50% matière sèche du bois

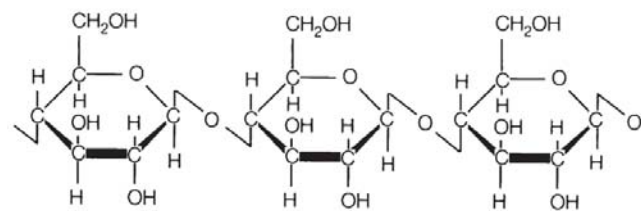
lignine



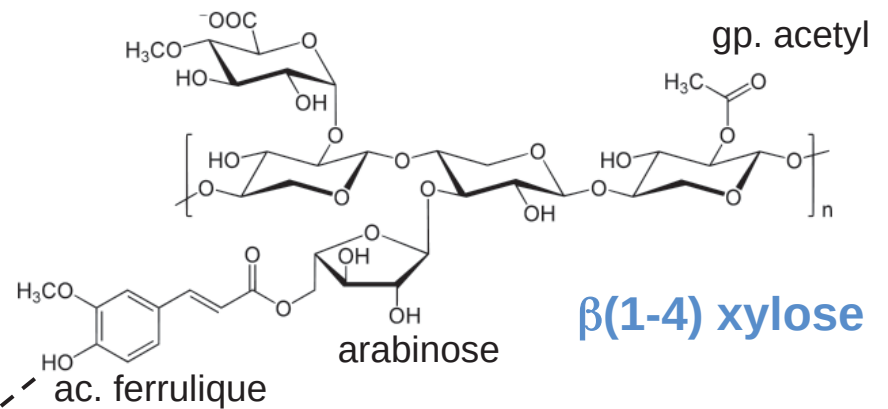
hémicellulose

ac. methyl-glucuronique

cellulose



β(1-4) glucose

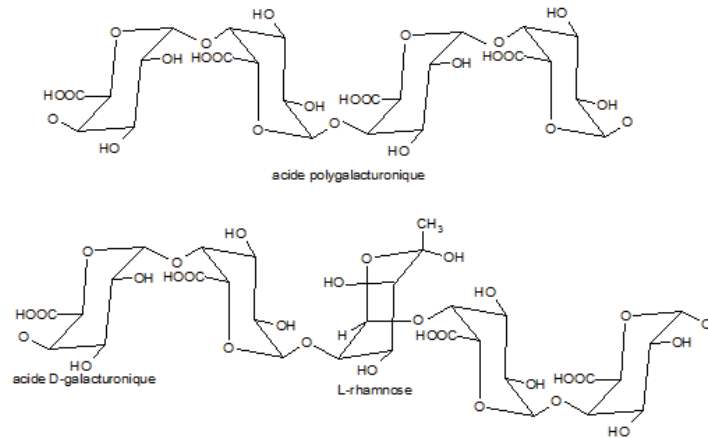


Lignine

pectine

homogalacturonan

$\alpha(1-4)$ ac. galacturonique

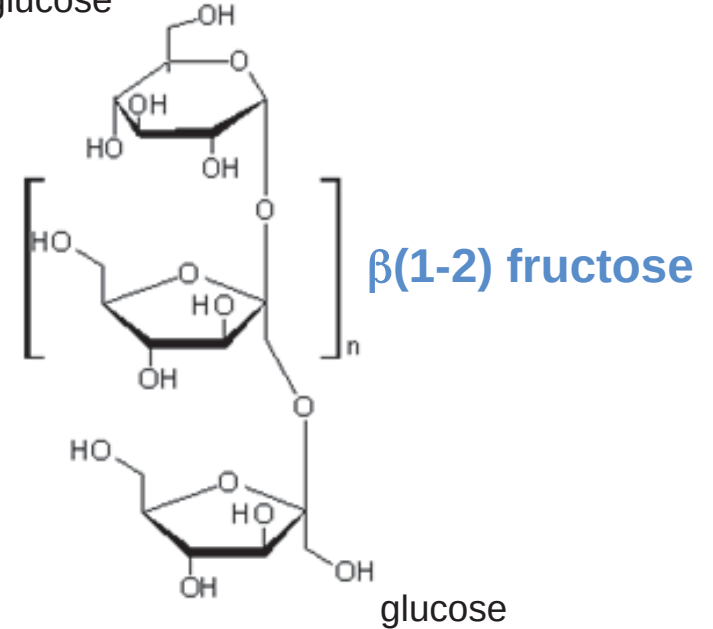


xylogalacturonan

rhamnogalacturonan

inuline

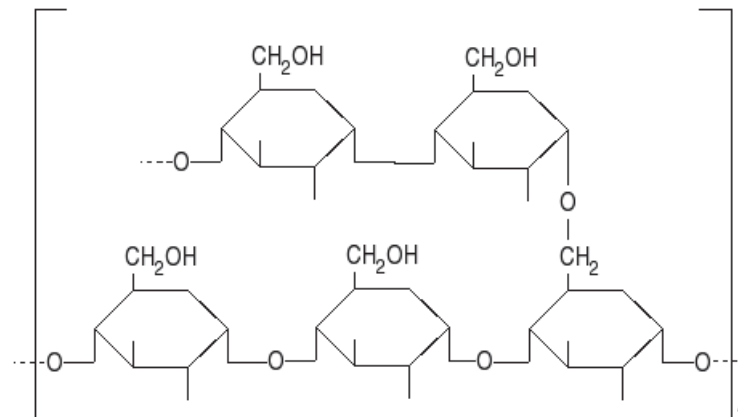
glucose



amidon

amylopectine

amylose



$\alpha(1-6)$ glucose

$\alpha(1-4)$ glucose

Diversité de la composition de la paroi cellulaire des plantes

Table 1

Diversity of representative biomass feedstocks in terms of chemical composition and recalcitrance index (RI).

Biomass type	Mass (%) ^a			RI ^b
	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	
Wood				
Softwood, debarked (19 species)	45–50	25–35	25–35	0.87 (0.49–0.96)
Hardwood, debarked (9 species)	40–55	24–40	18–25	0.56 (0.51–0.62)
Agricultural residues				
Wheat straw	33	23	17	~0.45
Corn stover (stalk and leaf)	31–38	19–25	17–21	~0.26
Herbaceous energy crops				
Big bluestem (whole plant)	29–37	21–26	17–24	~0.25
Switchgrass (whole plant)	31–35	24–28	17–23	~0.35
Switchgrass (stem)	34–38	25–29	16–19	
Switchgrass (leaf)	27–34	22–28	13–20	

^a Chemical composition data are primarily based on 'Biomass program: biomass feedstock composition and property database' by US Department of Energy (http://www1.eere.energy.gov/biomass/feedstock_databases.html); last visited: 25 February 2009. For biomass with multiple varieties and/or measurements, average values are used.

^b RI is calculated as described in the text with a range of value between zero for completely degraded and one for absolutely no degradation. Methods and data for biodegradability tests can be found in literature [18–20].

Les Biocarburants

Les biocarburants

Biocarburants solides:

- Le bois
- Les résidus de la sylviculture ➡ tourteaux
- Charbon de bois

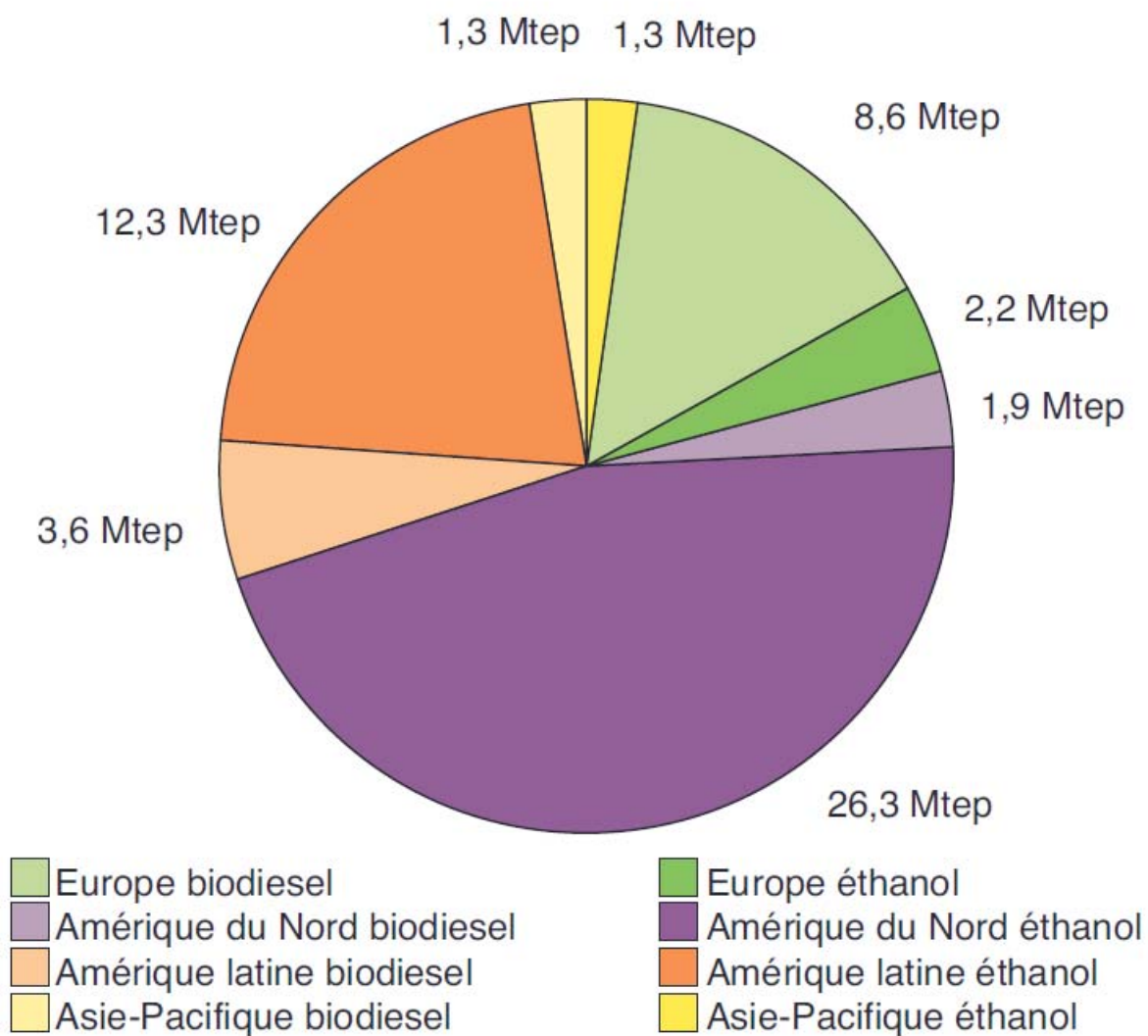
Biocarburants gazeux:

- Méthane CH_4
- Hydrogène H_2

Biocarburants liquides:

- Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol
 $\text{CH}_3\text{-OH}$ $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$
- Diesel

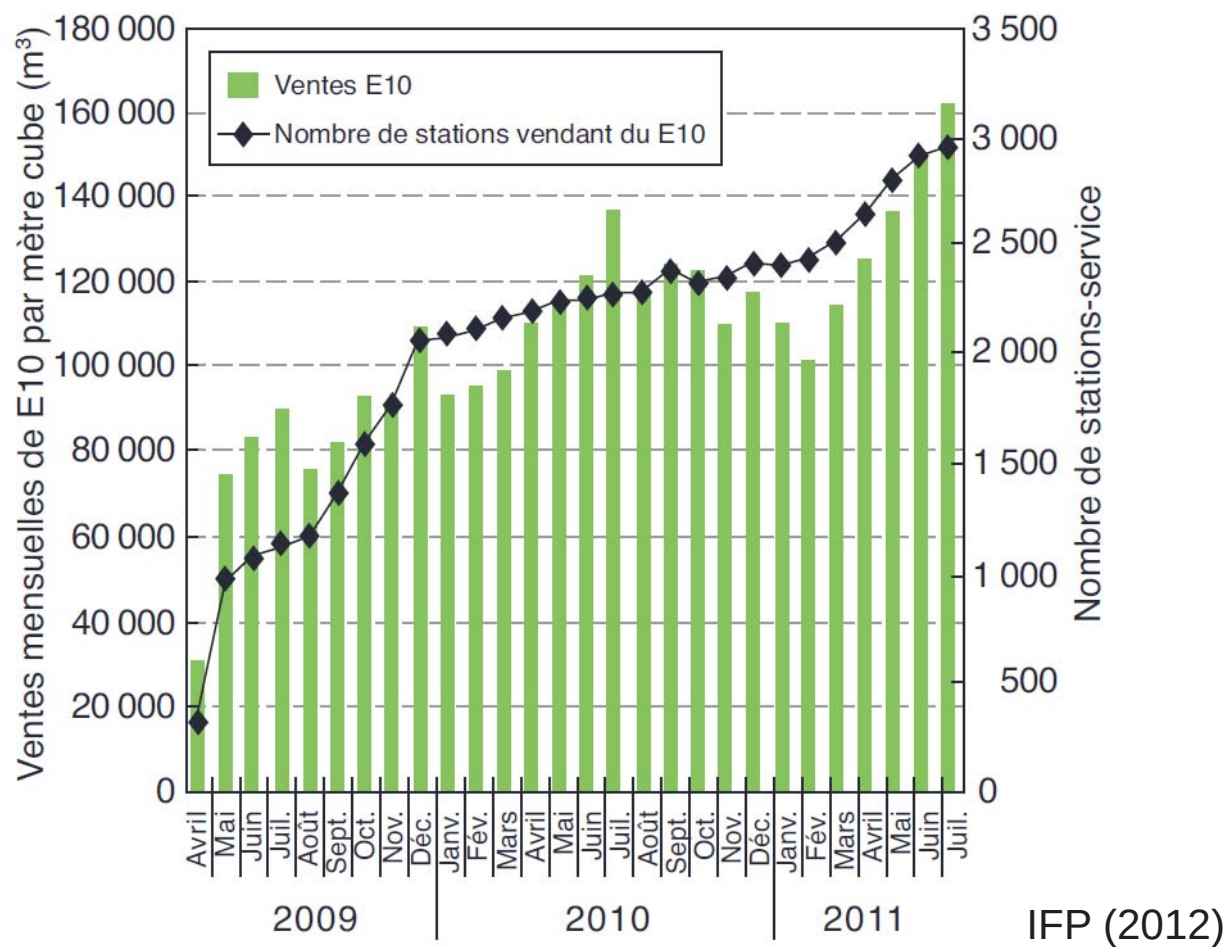
Production mondiale de Bioéthanol et Biodiesel



Mtep= Mega tonnes équivalent pétrole

IFP (2012)

Consommation de Bioéthanol en France



Biodiesel

- Biocarburant le plus répandu en Europe
- Transestherification des acides gras
- Graisses animales ou végétales
- Moins polluant que le diesel fossile
- Compatible avec les moteurs actuels
- 5%  100% (B100)

Biodiesel



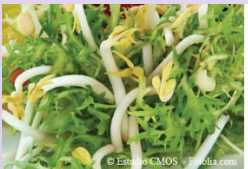
Palme



Tournesol



Colza



Soja

**Compétition
alimentaire**



Jatropha



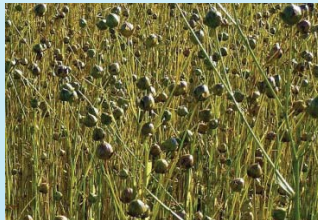
Madhuca



Pongamia



Caméline



Lin

**Compétition
Surfaces cultivables**

3^{ème} génération



Microalgues

**Extraction
purification**

Bioéthanol

- Fermentation des sucres de réserve: **amidon/sucre**
- Partie noble de la plante



maïs

USA



blé



betterave

France



canne

Brésil

- **Compétition alimentaire**
- **Augmentation du prix des denrées alimentaires à travers le monde**

Bioéthanol et Biodiesel

Quelques chiffres:

Etat de la production mondiale:

- En 2010: 105 GL (+17% / 2009)
- 2,7% de la consommation mondiale pour les transports
- Bioéthanol: 86 GL (90% USA et Brésil)

USA: E10 / E85 (Delaware)

Brésil: Véhicules « FlexFuel » E85

Objectifs :

- USA: 25% en 2050
- France: 10% en 2020

Problématiques liées aux Biocarburants

- Lutter contre l'épuisement des ressources fossiles
- Indépendance énergétique
- Emission de CO₂ et gaz à effet de serre
- Source renouvelable



- Compétition avec l'alimentation animale et humaine en particulier
- Compétition des surfaces agricoles
- Déforestation et érosion des sols
- Perte de la biodiversité
- Impact sur les ressources en eau



Développement de biocarburants de 2^{ème} génération



Bioéthanol cellulosique et biocarburants de dernière génération

Efforts de financement à travers le monde:

- **USDA** (U.S Department of Agriculture) + **DOE** (Department of Energy)
850 M\$ (Biocarburants de nouvelle génération)
- **EERE** (Office of Energy Efficiency and Renewable Energy)
Programme « Technologies Biomass and Biorefinery Systems R&D »
2006: **90 M\$** 2007 **150 M\$** 2008 **180 M\$**
- **Commission Européenne**
60 M€ (2010-2013)
- **Création du LIED** **Université Paris-Diderot**
Laboratoire Interdisciplinaire des Energies de Demain



Bioéthanol cellulosique

- Production d'éthanol à partir de la cellulose
- Ne concerne pas la partie noble, comestible
- Valorisation des déchets
- Cultures dédiées



paille



sciure



miscanthus



bois



bagasse

- **Etapas limitantes:**

Dégradation de la lignine

Dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose

Bioéthanol cellulosique: projets R&D

IFP (2011)

Projet/partenaires	Lieu	Type d'unité Capacité (Ml/an)	Matière première	Démarrage
Bioéthanol lignocellulosique				
Poet	Scotland, South Dakota, États-Unis	Pilote 0,76	Épis de maïs	Mise en exploitation : fin 2008
Abengoa Bioenergy, Biocarburantes Castilla y Leon, Ebro Puleva	Babilafuente, Salamanque, Espagne	Démonstrateur 5	Paille d'orge et de blé	Mise en exploitation : fin 2009
DuPont Danisco Cellulosic Ethanol LLC, Université du Tennessee/Genera Energy LLC	Vonore États-Unis	Démonstrateur 0,945	Résidus agricoles, rafles/tiges de maïs, switchgrass	Mise en service : janvier 2010
Inbicon	Kalundborg, Danemark	Démonstrateur 11,4	Paille de céréales	Mise en exploitation : fin 2009
Futurol (R&D) : ARD, IFP Energies nouvelles, Inra, Lesaffre	Bazancourt-Pomacle, France	Pilote 0,18	Multicharges lignocellulosiques	Démarrage construction : 1 ^{er} trimestre 2010 Prototype : 2015
Sinopec, Novozymes, Cofco	Chine	Démonstrateur 11,3	Tiges de maïs	Accord de construction : mai 2010. Mise en service prévue : fin 2011

Verrous R&D: Dégradation de la lignine et de la cellulose

- Etude des microorganismes dégradeurs
- Améliorations des souches
- Nouvelles enzymes (ligninases, cellulases, hémicellulases, ...)

Les microorganismes dégradeurs de la lignocellulose

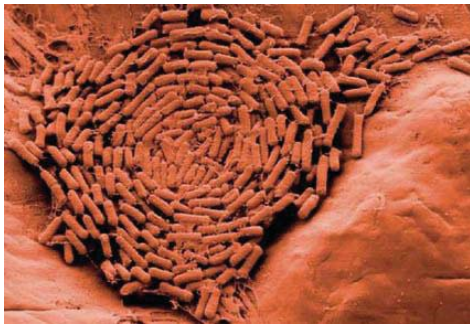
Ecosystèmes cellulolytiques

terrestres	➤ plantes	aérobies
	➤ sol	aérobies / anaérobies
	➤ composte	aérobies / anaérobies
	➤ herbivores (ruminants)	anaérobies
	➤ insectes xylophages	anaérobies

aquatiques	➤ mer	anaérobies
	➤ rivières	anaérobies
	➤ lacs	anaérobies
	➤ marais	aérobies / anaérobies
	➤ eaux usées	aérobies / anaérobies

Les bactéries cellulolytiques

Solaniangium cellulorum



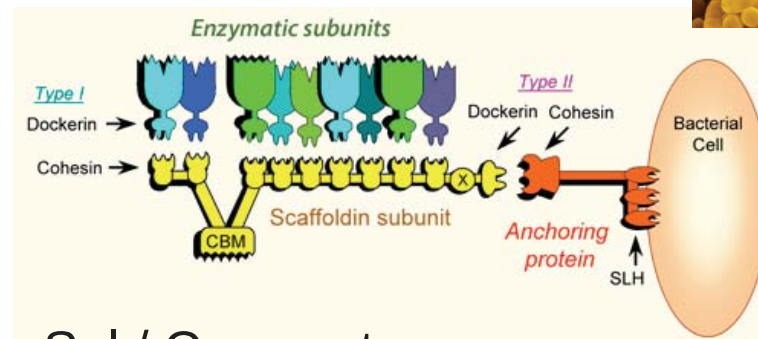
Sol

Aérobe

Clostridium thermocellum *Fibrobacter succinogenes*



Cellulosome



Sol / Composte

Panse

Anaérobe

Les champignons cellulolytiques

Les basidiomycètes

Les pourritures blanches (white rot)

➤ dégradent la lignine la cellulose et l'hémicellulose

Phanerochaete chrysosporium *Schizophyllum commune* *Trametes versicolor*



Les champignons cellulolytiques

Les pourritures brunes (brown rot)

- Ne dégradent pas la lignine, uniquement la cellulose et l'hémicellulose

Gloeophyllum trabeum



Serpula lacrymans



Postia placenta



Les champignons cellulolytiques

Les ascomycètes

- Dégradent la cellulose et l'hémicellulose

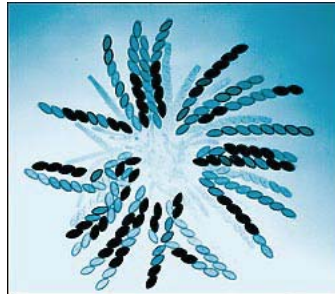
Xylaria polymorpha



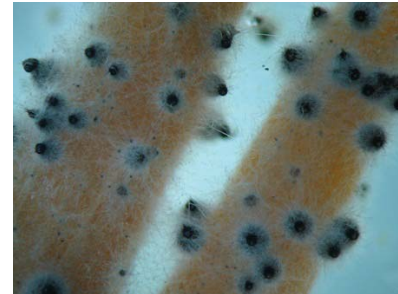
Aspergillus niger *Trichoderma reesei* (H. jecorina)



Neurospora crassa

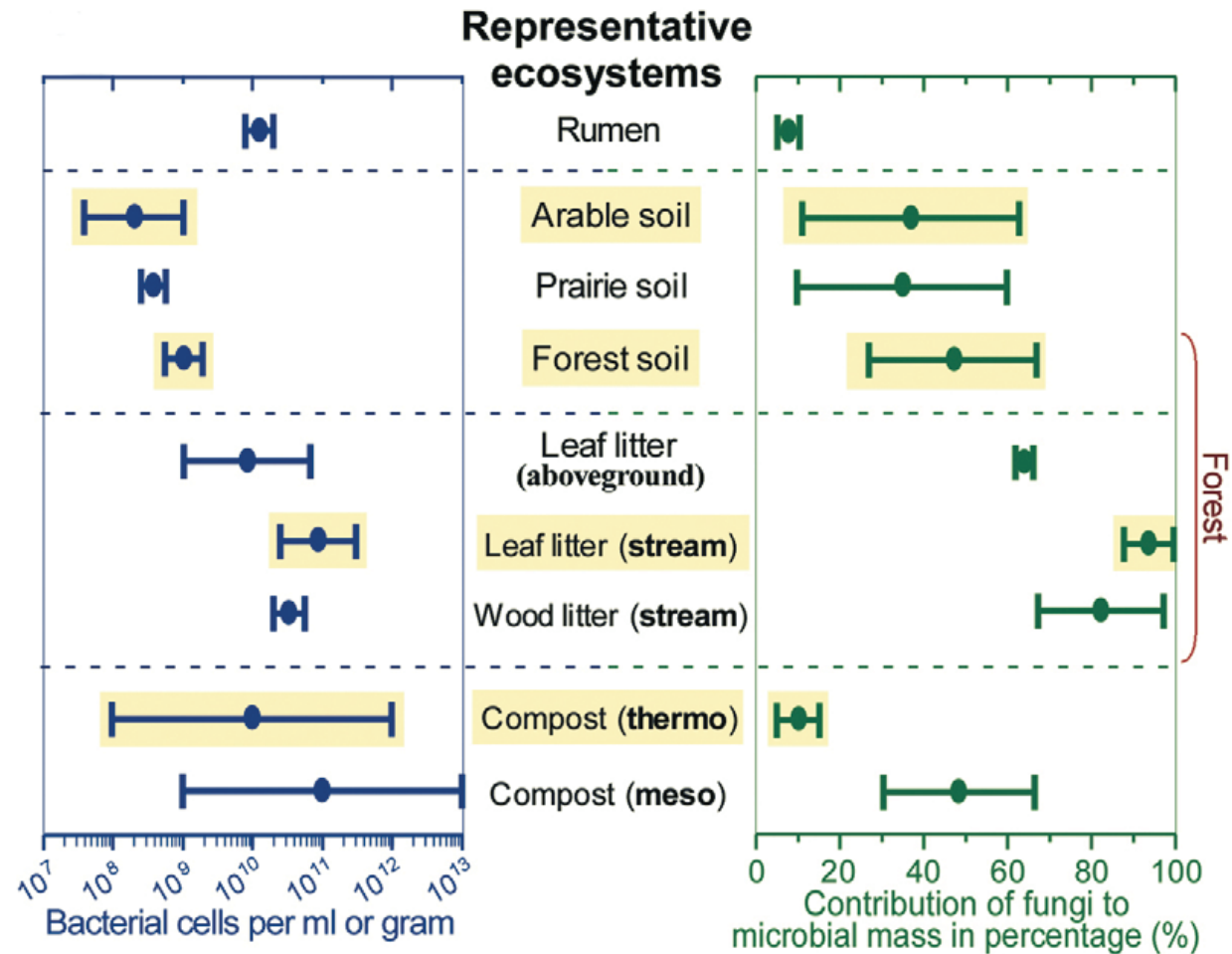


Podospora anserina



- Dégrade la lignine

Les microorganismes dégradeurs de la biomasse végétale



Principes généraux de la dégradation de la lignocellulose

- lignine et cellulose sont les 2 polymères les plus abondants
 - Quantité d'énergie stockée considérable
- écosystèmes cellulotiques ubiquitaires
- bactéries et champignons aérobies et anaérobies
- succession des microorganismes
- sucres simples → polysaccharides → lignine
- synergies entre organismes et enzymes sécrétées
 - « cross-feeding »
- sécrètent des cocktails d'enzymes lytiques
 - adhèrent au substrat (Carbohydrate Binding Module - CBM)
 - diversité des sucres = diversité des activités enzymatiques
 - cellulases, hémicellulases, pectinases, peroxydases, ...

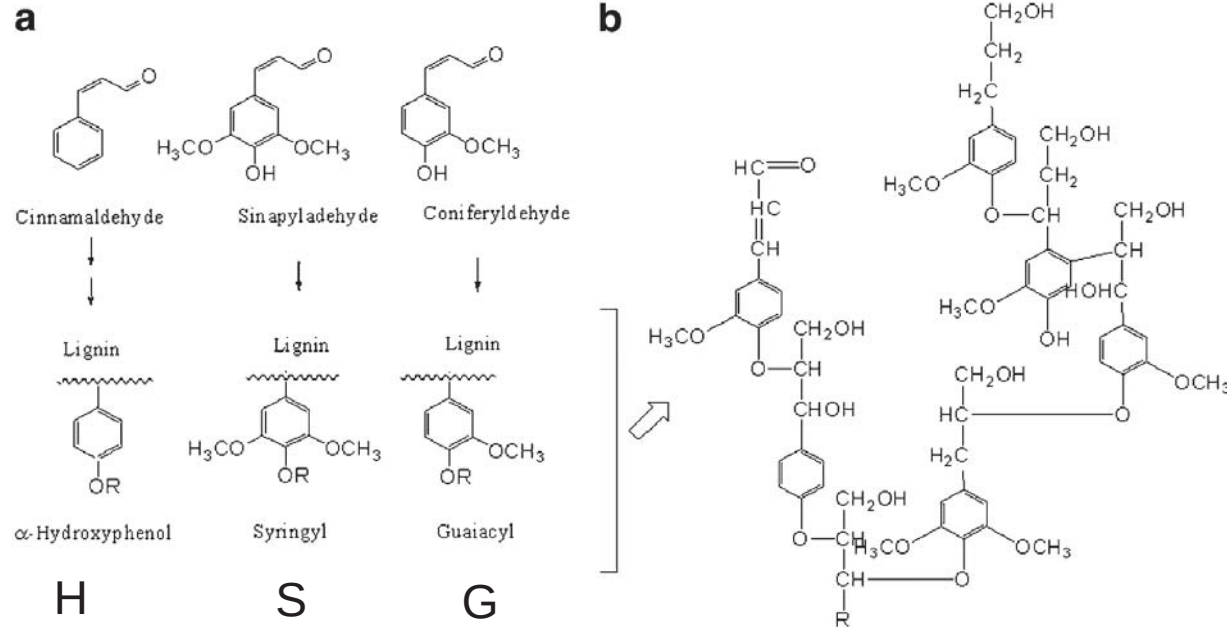
Carbohydrate Active Enzymes CAZymes

Enzymologie de la dégradation de la lignine

Composition de la lignine

unités de bases : **phénylpropanoïdes**

lignine



3 types

H

S

G

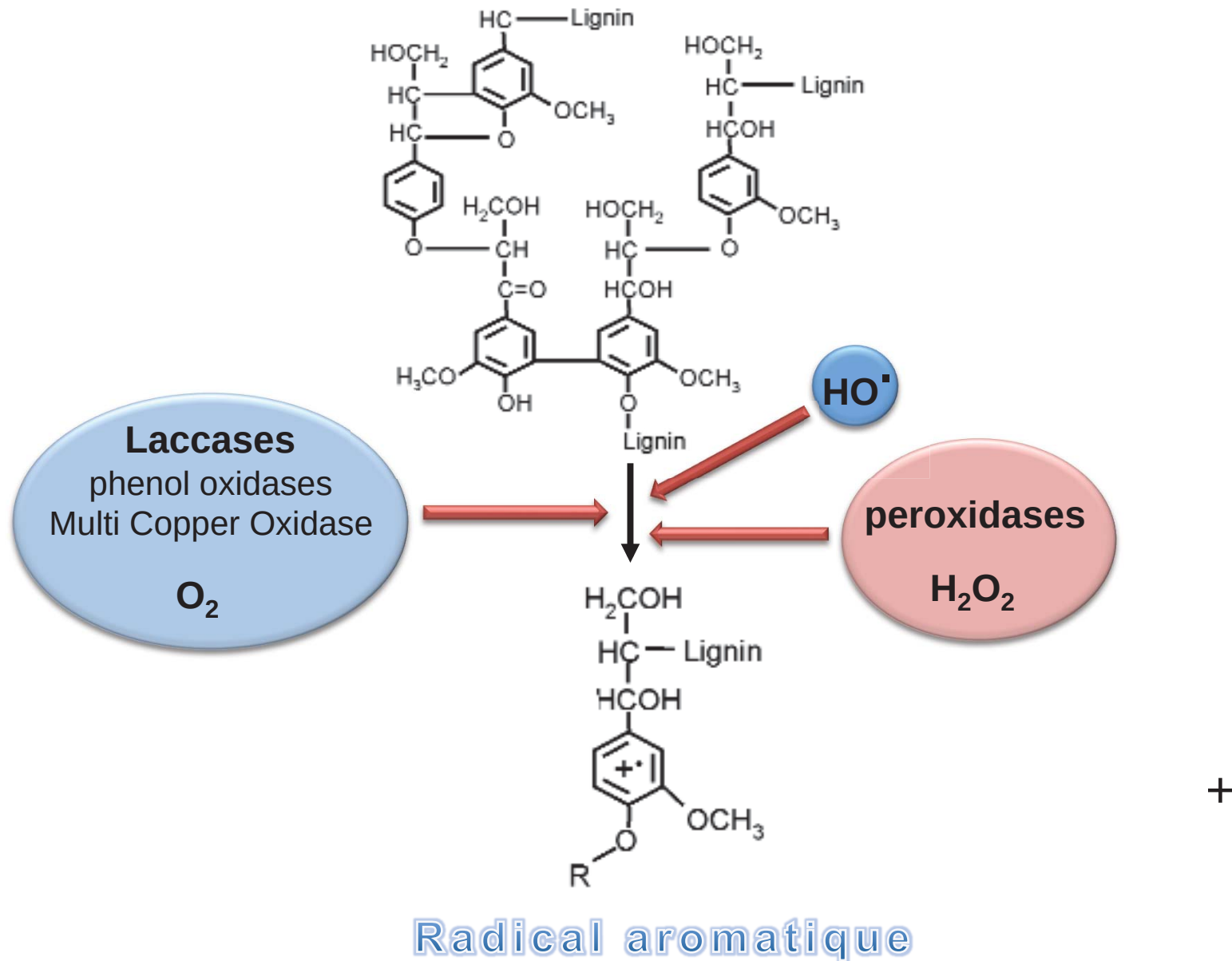
G: gymnospermes (softwoods)

S + G: angiospermes (hardwoods)

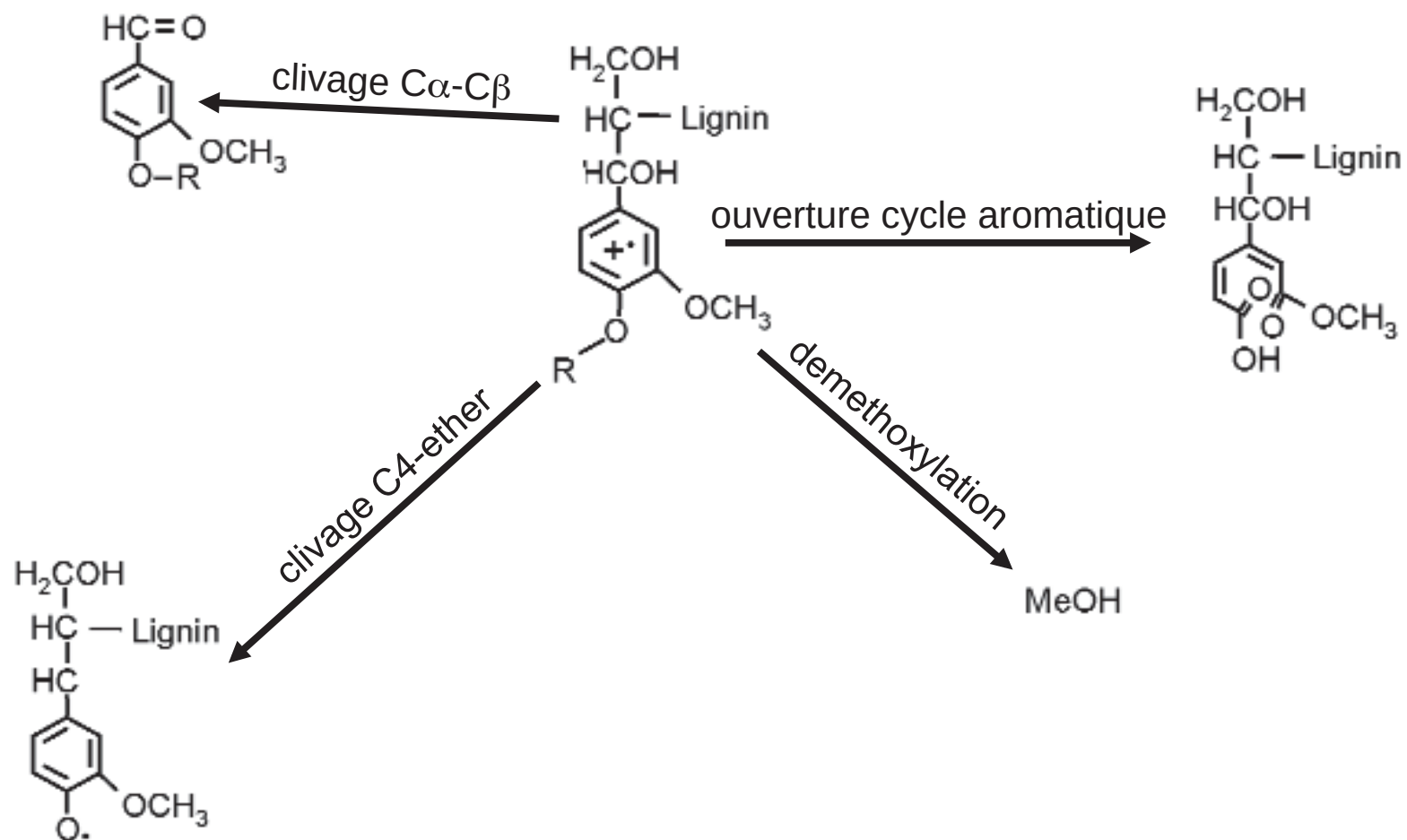
Deepak et al., Appl Microbiol Biotechnol 2008

Dégradation par oxydation

Oxydation de la lignine



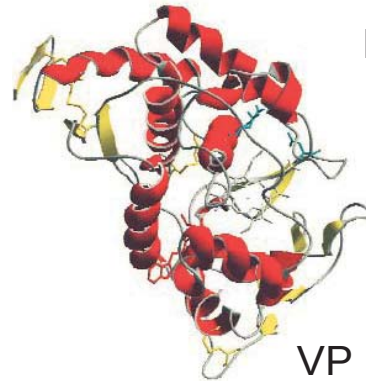
Dépolymérisation de la lignine



Les enzymes clefs de la dégradation de la lignine

LiP/MnP/Versatile peroxidases:

- accepteur d'e⁻ H_2O_2
- 1980's
- Enzymes cristallisées
- Blanchiment (industrie papetière)
- ligninases

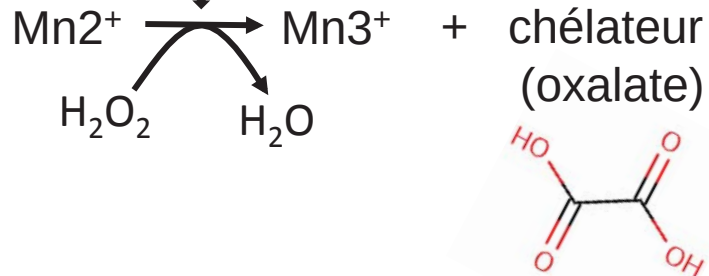


Martinez *et al.* (2005)

- H_2O_2

Lignine-Peroxidase

Mn-Peroxidase



Lignine

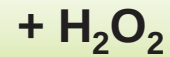
oxydation

clivage $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$

dépolymérisation

Les enzymes clefs de la dégradation de la lignine

les Copper Radical Oxidases:



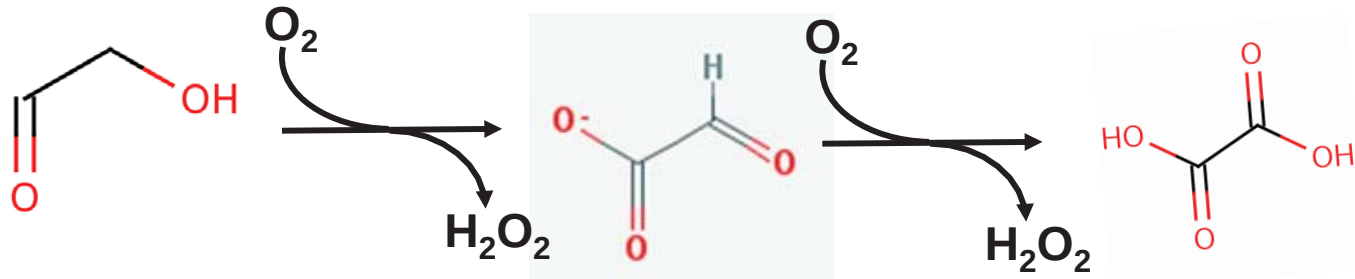
la Glyoxal Oxidase GLX

dégradation
lignine

glycolaldéhyde

glyoxalate

oxalate

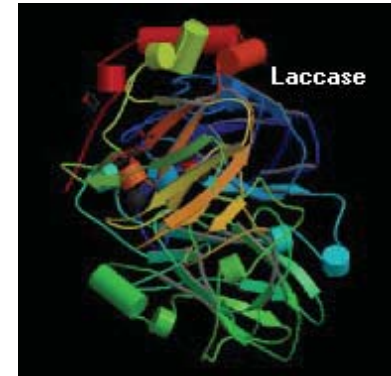


Les enzymes clefs de la dégradation de la lignine

Les laccases:

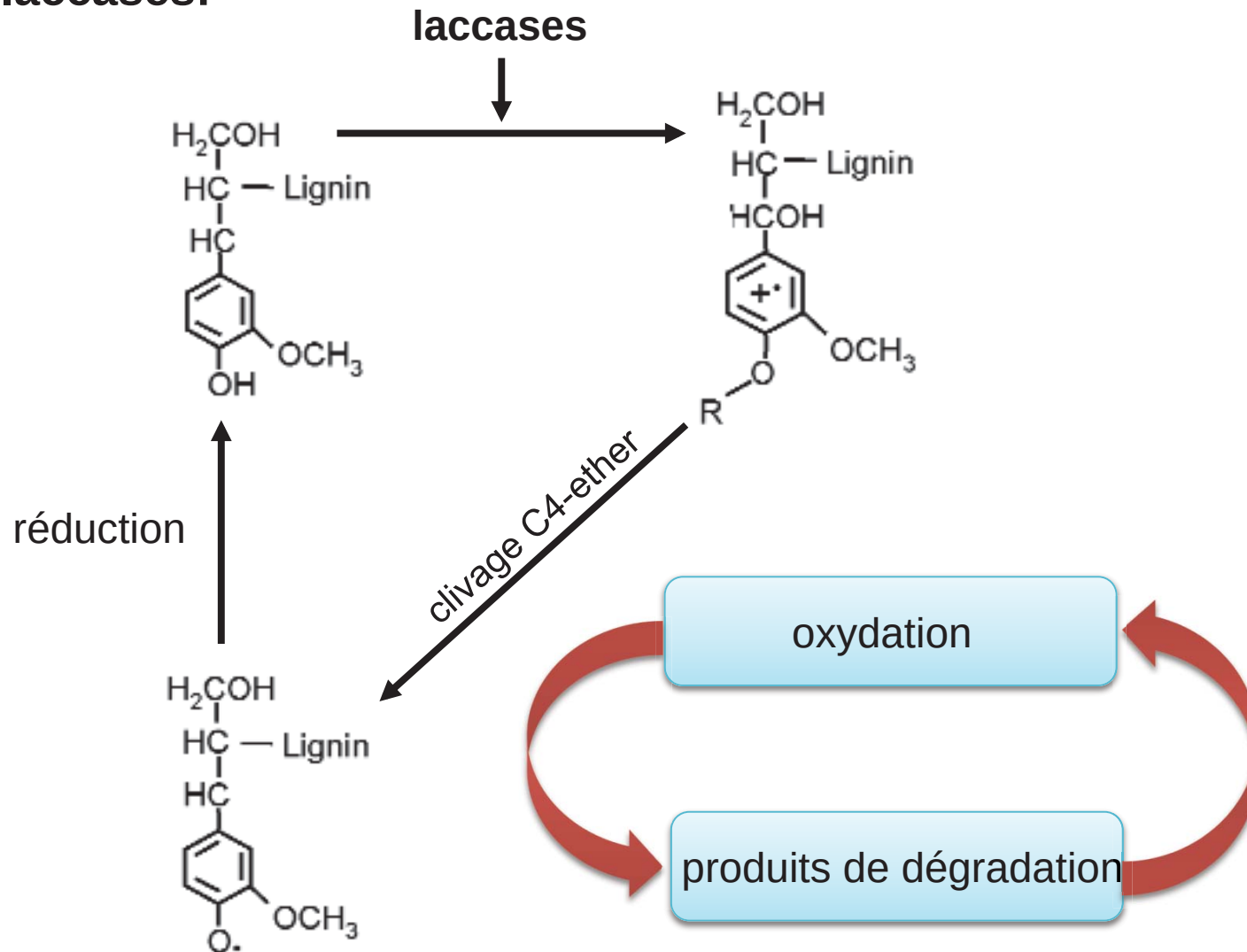
- Phenol oxidases
- Multi Copper Oxidases
- Accepteur d'e⁻ O_2
- Oxidation des phenylpropanoïdes
- Dépolymérisation de la lignine
- Oxydation des quinones

➤ Cycle RedOx

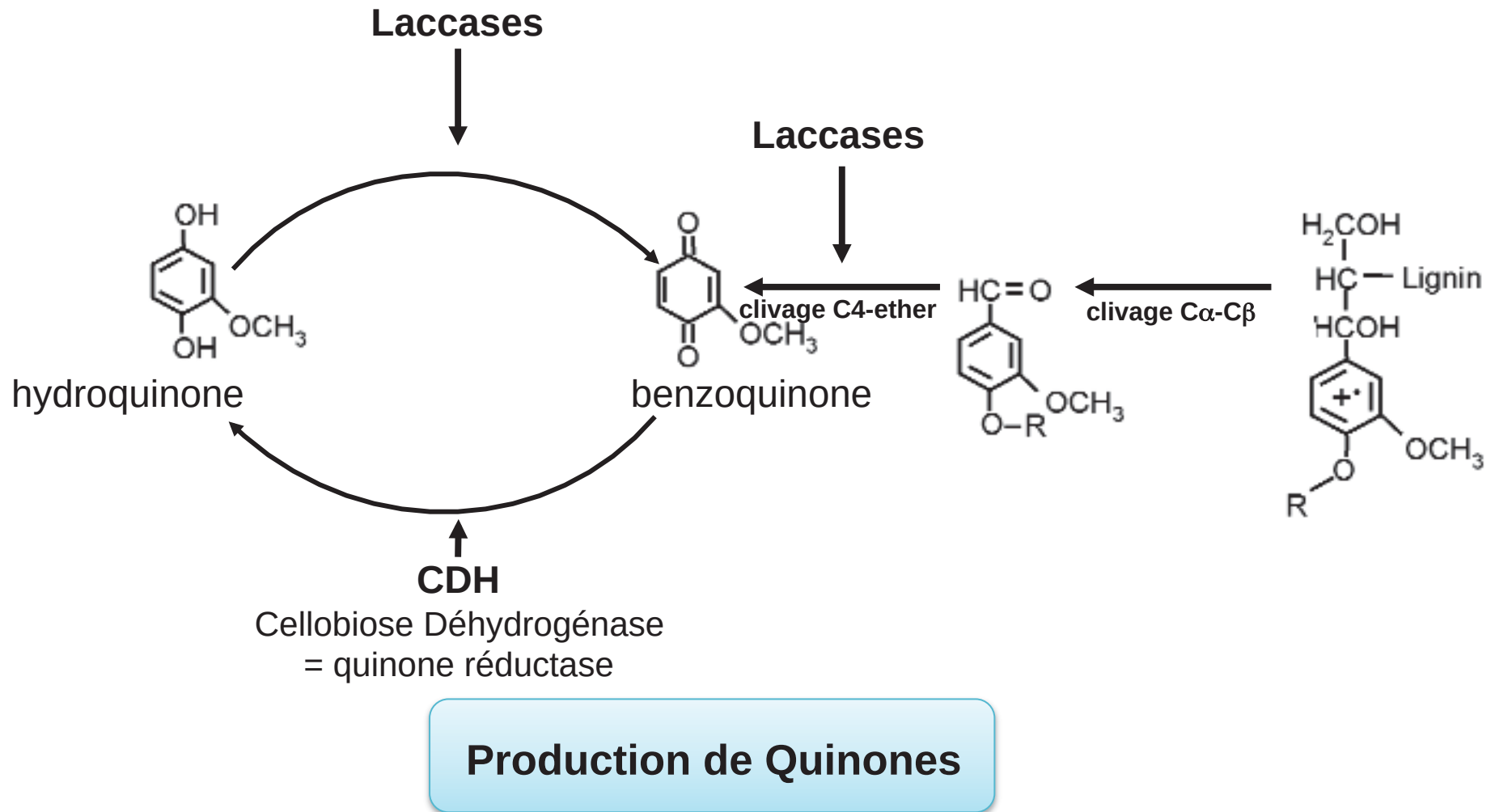


Les enzymes clefs de la dégradation de la lignine

Les laccases:

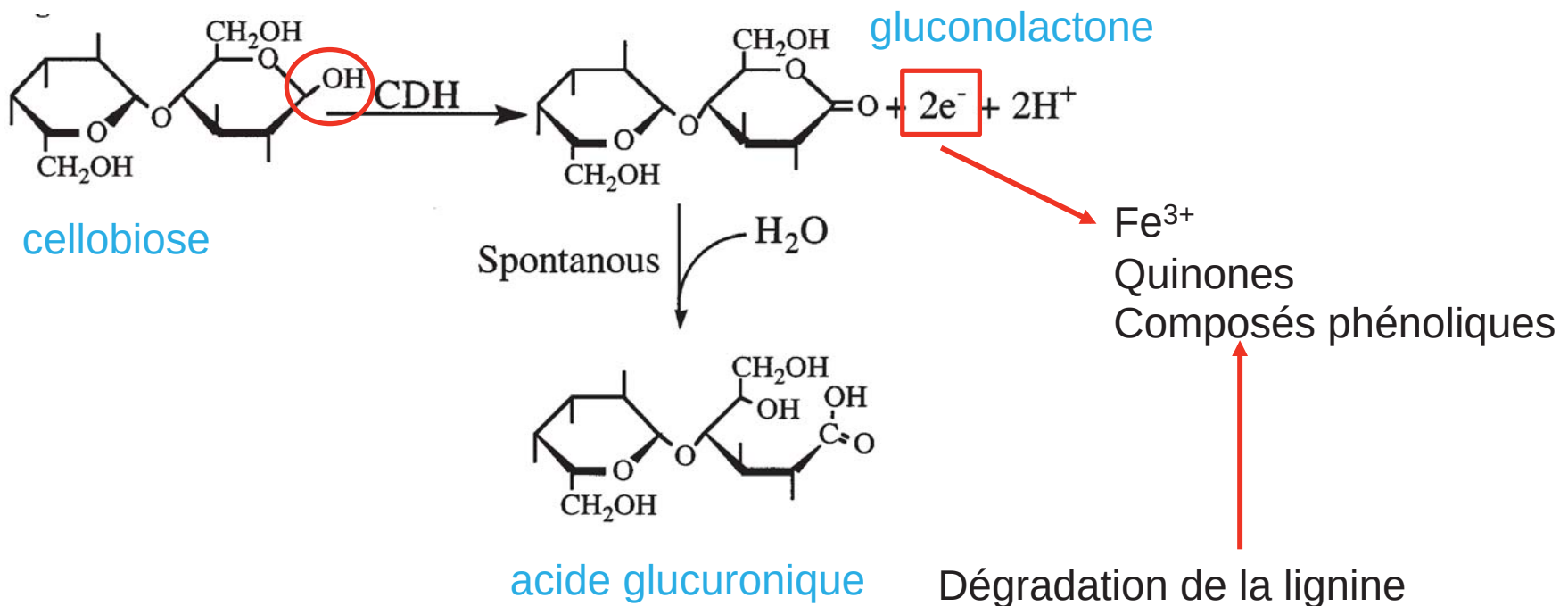


Les enzymes clefs de la dégradation de la lignine



Les enzymes clefs de la dégradation de la lignine

les Cellobiose Dehydrogenases CDH:



dégradation de la cellulose ↔ dégradation de la lignine

D'après Henrikson *et al.* (2000)

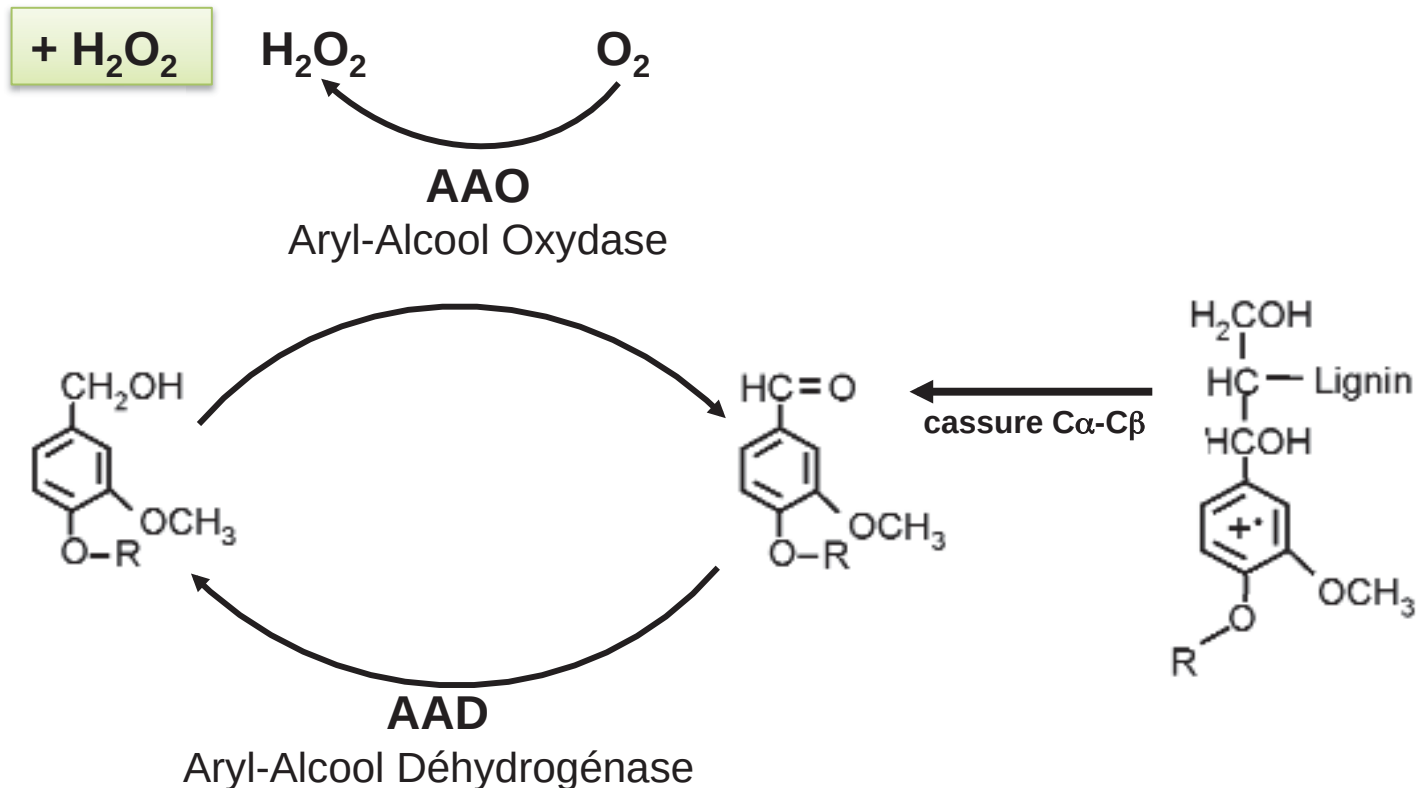
Les enzymes clefs de la dégradation de la lignine

Cellobiose Dehydrogenases CDH:

- GMC oxydoréductase
 - réduisent les quinones uniquement en présence de cellobiose
 - domaine FAD + CBM (non canonique) + Heme
 - **substrats:** di-saccharides (β 1-4) avec glucose ou mannose en position terminale
 - **produits intermédiaires de la dégradation de la cellulose**
 - cellobiose = di-glucose
 - lactose = galactosyl-glucose
 - mannobiose = di-mannose
 - cellodextrines = n-glucoses
 - participent à la dégradation de la lignine:
 - réduction des quinones et des composés phénoliques
 - acides cellobioniques (Mn^{3+})
- $Fe^{2+} \longrightarrow HO\cdot$ (Fenton)

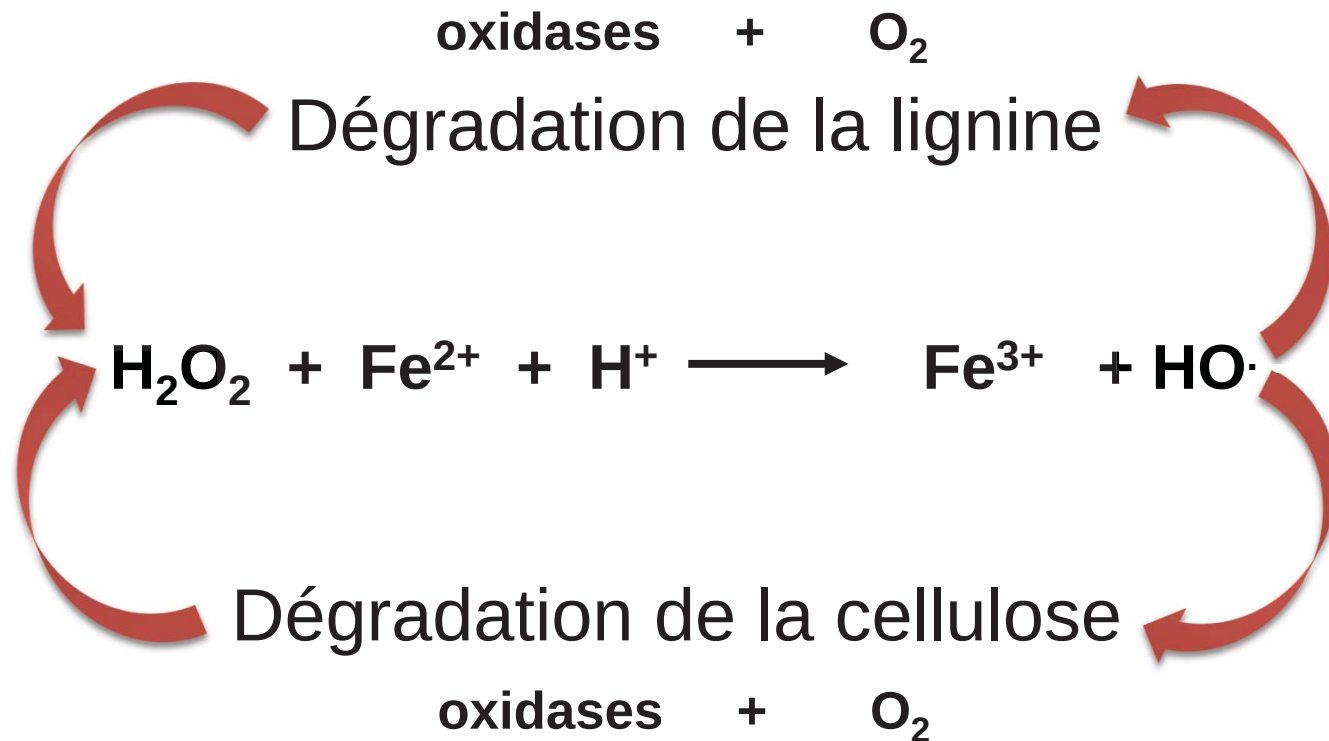
Les enzymes clefs de la dégradation de la lignine

L' Aryl Alcohol oxidase AAO:



Production de H₂O₂ par dégradation de la lignine

Production de $\text{HO}\cdot$ par la réaction de Fenton

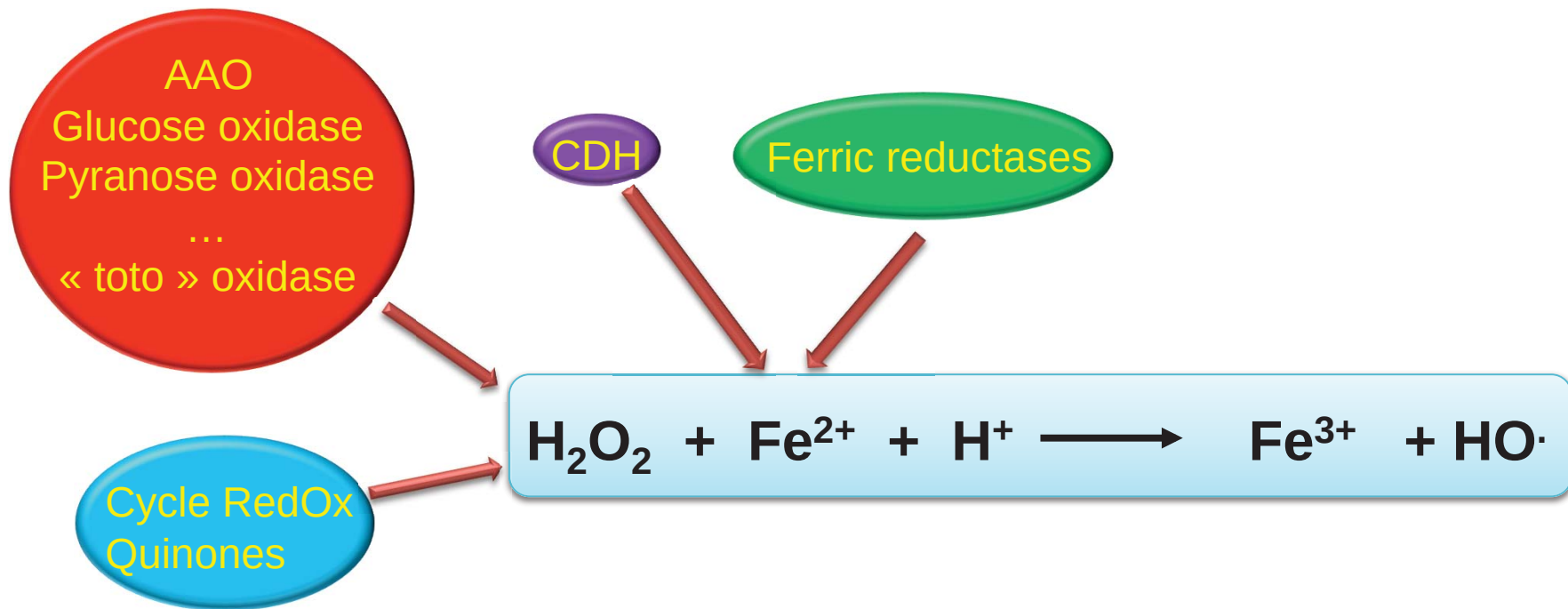


- gonflement de la lignocellulose (en début de dégradation)
- molécules oxydantes de petite taille diffusant dans les tissus
- dégradation de la cellulose sans dépolymérisation de la lignine (pourritures brunes)

La dégradation de la cellulose et de l'hémi-cellulose

Dégradation oxydative de cellulose / hémicellulose

Production de $\text{HO}\cdot$ par la réaction de Fenton



Dépolymérisation aspécifique

cellulose / hémicellulose

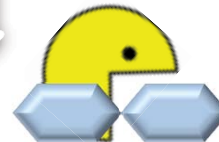
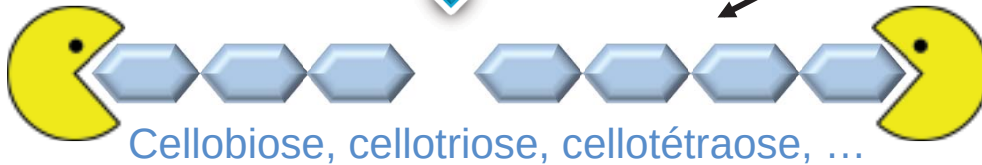
Les Cellulases

endo-cellulases

L'endo- $\beta(1-4)$ glucanase EG

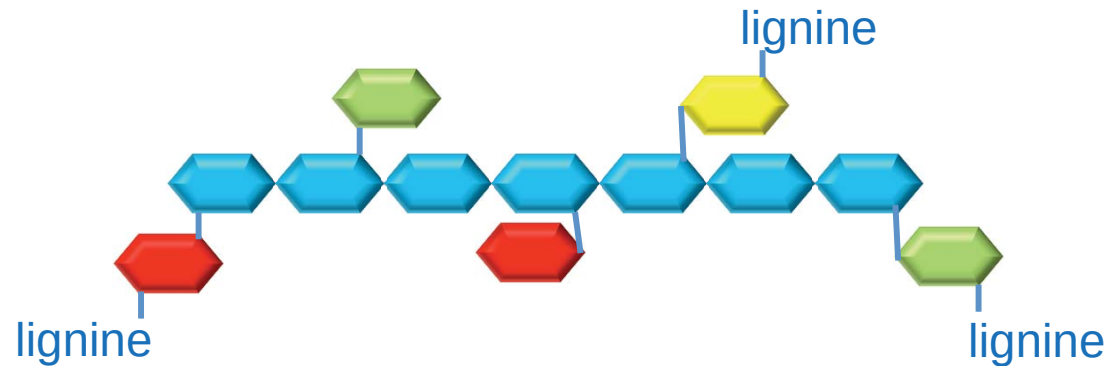


Cellulose Hydrolases CBH



exo-cellulases

Les Hémicellulases



- **Xylan** (bois) = polymère de xylose « branché »
- grande diversité des sucres
- sucres modifiés (acetylés)
- grande diversité de branchements

➤ **spécificité large des cellulases**

endocellulases		→	xylane	
cellobiose hydrolases				
β -glucosidase	→	mannose	xylose	galactose

- **Set exhaustif de glycosides hydrolases GH**

Les CAZymes

Carbohydrates Active Enzymes

Les grandes classes:

Carbohydrates Estérases (CE) (5%)

- clivage des modifications sucres simples polysaccharides
- facilitent l'accès pour les GH

Polysachharides lyases (PL) (2%)

- clivage des liaisons glycosidiques des acides uroniques

Glycosyltransferases (GT) (40%)

- biosynthèse des liaison glucidiques à partir des sucres phospho-activés

Glycosides Hydrolases 114 familles (50%)

- clivage des liaisons glycosidiques

Carbohydrate Binding Module (CBM) 52 familles (5%)

- domaine de fixations aux sucres

Enzyme class	Enzyme code	Substrate	CAZy families
α -L-arabinofuranosidase	ABF	Xyloglucan, xylan, pectin	GH51,54
Endoarabinanase	ABN	Pectin	GH43
Exoarabinanase	ABX	Pectin	GH93
α -L-fucosidase	AFC	Xyloglucan	GH29,95
α -1,4-D-glucosidase	AGD	Starch	GH31
α -1,4-D-galactosidase	AGL	Xyloglucan, xylan, galactomannan	GH27,36
α -Glucuronidase	AGU	Xylan	GH67
α -Amylase	AMY	Starch	GH13
Acetyl xylan esterase	AXE	Xylan	CE1
Arabinoxylan arabinofuranohydrolase	AXH	Xylan	GH62
α -D-xylosidase	AXL	Xyloglucan	GH31
β -1,4-D-glucosidase	BGL	Cellulose	GH1,3
β -1,4-D-xylosidase	BXL	Xylan, pectin	GH3,43
Cellobiohydrolase	CBH	Cellulose	GH6,7
β -1,4-D-endoglucanase	EGL	Cellulose	GH5,7,12,61
Feruloyl esterase	FAE	Xylan, pectin	CE1
β -1,4-Endogalactanase	GAL	Pectin	GH53
Glucoamylase	GLA	Starch	GH15
β -1,6-Endogalactanase	GLN	Pectin	
Galactomannan acetyl esterase	GMAE	Galactomannan	
Endo-inulinase	INU	Inulin	GH32
Exo-inulinase	INX	Inulin	GH32
β -1,4-D-galactosidase	LAC	Xyloglucan, xylan, pectin, galactomannan	GH2,35
β -1,4-D-endomannanase	MAN	Galactomannan	GH5,26
β -1,4-D-mannosidase	MND	Galactomannan	GH2
Pectin acetyl esterase	PAE	Pectin	
Pectin lyase	PEL	Pectin	PL1
Rhamnogalacturonan lyase	RGL	Pectin	PL4,11
Endopolygalacturonase	PGA	Pectin	GH28
Exopolygalacturonase	PGX	Pectin	GH28
Pectate lyase	PLY	Pectin	PL1,3,9
Pectin methyl esterase	PME	Pectin	CE8
Rhamnogalacturonan acetyl esterase	RGAE	Pectin	CE12
Rhamnogalacturonan galacturonohydrolase/exorhamnogalacturonase	RGX	Pectin	GH28
α -rhamnosidase/rhamnogalacturonan rhamnohydrolase	RHA	Pectin	GH78
rhamnogalacturonan hydrolase/endorhamnogalacturonase	RHG	Pectin	GH28
Invertase/fructofuranosidase	SUC	Inulin	GH32
D-4,5-Unsaturated-glucuronyl hydrolase	UGH	Pectin	GH88
unsaturated rhamnogalacturonan hydrolase	URH	Pectin	GH105
β -1,4-Exogalactanase	XFG	Pectin	
Xyloglucan-active β -1,4-D-endoglucanase	XEG	Xyloglucan	GH12,74
Xyloglucan acetylcetase	XGAE	Xyloglucan	
β -1,4-D-endoxylanase	XLN	Xylan	GH10,11
β -1,6-Exogalactanase	XSG	Pectin	
β -1,3-Exogalactanase	XTG	Pectin	

The enzymes are sorted alphabetically on the enzyme code.

Coutinho *et al.*, 2009

The CAZyme database

- Online depuis 1998
- Mise à jour quotidienne manuelle curateurs experts
 - Données biochimiques fiables
 - Structure 3D
 - Analyses fonctionnelles (délétions)
 - 16000 références
- Participent à l'annotation des génomes
 - Pr. B. Henrissat, Pr. P. M. Coutinho
 - Université Aix-Marseille France

www.cazy.org

CAZY - Home - Mozilla Firefox

Fichier Édition Affichage Historique Marque-pages Outils ?

www.cazy.org

Google

Les plus visités Débuter avec Firefox Free Mobile - Bienven... IGM - Accès Messagerie TousPhocéens - Le We... Facebook Webmail Zimbra Free.fr Lechuza : pot de fleurs... Jardinières - Jardinière... Dictionnaire anglais

CAZY - Home

CAZY
CARBOHYDRATE-ACTIVE ENZYMES

HOME ENZYME CLASSES ASSOCIATED MODULES GENOMES

What's new
Definitions and Terminology
Help
Citing CAZY
Enzyme & Glyco Resources
Commercial Providers
Scientific Meetings
About Us
Position(s) available

Welcome to the Carbohydrate-Active enZymes Database

The **CAZY** database describes the families of structurally-related catalytic and carbohydrate-binding modules (or functional domains) of enzymes that degrade, modify, or create glycosidic bonds.

Online since 1998, CAZY is a specialist database dedicated to the display and analysis of genomic, structural and biochemical information on Carbohydrate-Active Enzymes (CAZymes).

CAZY data are accessible either by browsing sequence-based families or by browsing the content of genomes in carbohydrate-active enzymes. New genomes are added regularly shortly after they appear in the daily releases of GenBank. New families are created based on published evidence for the activity of at least one member of the family and all families are regularly updated, both in content and in description.

An original aspect of the CAZY database is its attempt to cover all carbohydrate-active enzymes across organisms and across subfields of glycosciences. Please let us know if some families have escaped our attention, we will be happy to add them !

For a more extensive encyclopedic resource on the particular features of carbohydrate active enzymes, please visit [CAZypedia](#), a web site driven by the scientific community that studies these enzymes.

Enzyme Classes currently covered

Modules that catalyze the breakdown, biosynthesis or modification of carbohydrates and glycoconjugates:

- [Glycoside Hydrolases \(GHs\)](#) : hydrolysis and/or rearrangement of glycosidic bonds (see [CAZypedia definition](#))
- [GlycosylTransferases \(GTs\)](#) : formation of glycosidic bonds (see [definition](#))
- [Polysaccharide Lyases \(PLs\)](#) : non-hydrolytic cleavage of glycosidic bonds
- [Carbohydrate Esterases \(CEs\)](#) : hydrolysis of carbohydrate esters

Associated Modules currently covered

Carbohydrate-active enzymes often display a modular structure with non-catalytic modules appended to the enzymes above

- [Carbohydrate-Binding Modules \(CBMs\)](#) : adhesion to carbohydrates

Genome analysis by CAZY

Family distribution and/or protein listings of the carbohydrate-active enzymes and associated proteins identified in genomes

- **Genomes** by Kingdom :

Bacteria	1849
Archaea	127
Eukaryota	64
Viruses	139

Last update: 2012-05-31 © Copyright 1998-2012
[AFMB - CNRS - Université d'Aix-Marseille](#)

FR 21:57 04/06/2012

www.cazy.org

CAZy - GH - Mozilla Firefox

Fichier Édition Affichage Historique Marque-pages Outils ?

www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html

Les plus visités Débuter avec Firefox Free Mobile - Bienven... IGM - Accès Messagerie TousPhocéens - Le We... Facebook Webmail Zimbra Free.fr Lechuza : pot de fleurs... Jardinières - Jardinière... Dictionnaire anglais

CAZy - GH

CAZY
CARBOHYDRATE-ACTIVE ENZYMES

HOME ENZYME CLASSES ASSOCIATED MODULES GENOMES

Glycoside Hydrolases GlycosylTransferases Polysaccharide Lyases Carbohydrate Esterases

GH1 Go

Family Go

Glycoside Hydrolase family classification

Introduction

Glycoside hydrolases (EC 3.2.1.-) are a widespread group of enzymes which hydrolyse the glycosidic bond between two or more carbohydrates or between a carbohydrate and a non-carbohydrate moiety. The IUBMB Enzyme nomenclature of glycoside hydrolases is based on their substrate specificity and occasionally on their molecular mechanism; such a classification does not reflect (and was not intended to) the structural features of these enzymes. A classification of glycoside hydrolases in families based on amino acid sequence similarities has been proposed a few years ago. Because there is a direct relationship between sequence and folding similarities, such a classification:

- (i) reflects the structural features of these enzymes better than their sole substrate specificity,
- (ii) helps to reveal the evolutionary relationships between these enzymes,
- (iii) provides a convenient tool to derive mechanistic information [1] [2]
- (iv) illustrates the difficulty of deriving relationships between family membership and substrate specificity

The Carbohydrate-Active Enzymes database (**CAZy**) provides a continuously updated list of the glycoside hydrolase families. Because the fold of proteins is better conserved than their sequences, some of the families can be grouped in '**clans**': (i) when new sequences are found to be related to more than one family, (ii) when the sensitivity of sequence comparison methods is increased or (iii) when structural determinations demonstrate the resemblance between members of different families [3].

The established '**clans**' are given in form of a table below.

Catalytic Mechanism

In most cases, the hydrolysis of the glycosidic bond is catalyzed by two amino acid residues of the enzyme: a general acid (proton donor) and a nucleophile/base [4]. Depending on the spatial position of these catalytic residues, hydrolysis occurs via overall retention or overall inversion of the anomeric configuration. For each family listed in the **CAZy** database, we indicate (when it is known) the stereochemical outcome of the reaction catalyzed as well as the type of amino-acid residues acting as a nucleophile/base and as a proton donor. In some cases, the catalytic nucleophile is not borne by the enzyme, and is replaced by the acetamido group at C-2 of the substrate [5]. A completely unrelated mechanism has been demonstrated recently for two families of glycosidases utilizing NAD⁺ as a cofactor [6] [7].

For a detailed description of the catalytic mechanism (and variations thereof) of glycoside hydrolases, please visit [CAZypedia](#).

Tables for Direct Access

- GH Family Number

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120

[Non-Classified Sequences](#)

- GH Classification Statistics

Modules in present families 122867

Non-Classified modules 1457

- GH Clans of Related Families

FR 21:58 04/06/2012

www.cazy.org

CAZY - Eukaryota - Mozilla Firefox

Fichier Édition Affichage Historique Marque-pages Outils ?

www.cazy.org/6733.html

Les plus visités Débuter avec Firefox Free Mobile - Bienven... IGM - Accès Messagerie TousPhocéens - Le We... Facebook Webmail Zimbra Free.fr Lechuza : pot de fleurs... Jardinières - Jardinière... Dictionnaire anglais

CAZY - Eukaryota

CAZY
CARBOHYDRATE-ACTIVE ENZYMES

HOME ENZYME CLASSES ASSOCIATED MODULES GENOMES

Introduction Archaea Bacteria Eukaryota Viruses

Podospira anserina S mat+

Taxonomy ID : 5145

Lineage: cellular organisms; Eukaryota; Opisthokonta; Fungi; Dikarya; Ascomycota; saccharomyceta; Pezizomycotina; leotiomyceta; sordariomyceta; Sordariomycetes; Sordariomycetidae; Sordariales; Lasiosphaeriaceae; Podospira

Glycoside Hydrolase Family	1	2	3	5	6	7	10	11	12	13	15	16	17	18	20	24	26	27	30	31	35	36	37	38	43	45	47	51	53	55	61	62	63	64	67	71	72	74	75	76	78	79	81
Number of sequences	1	7	11	12	4	6	8	6	2	9	3	12	4	20	1	1	1	2	3	5	1	1	2	1	10	2	9	1	1	7	33	2	1	1	1	3	6	1	1	9	1	3	1

GlycosylTransferase Family	1	2	3	4	5	8	15	17	20	21	22	24	25	31	32	33	34	35	39	41	48	50	55	57	58	59	62	66	69	76	90	NC
Number of sequences	8	16	1	5	2	3	5	1	3	1	4	1	1	5	5	1	2	1	3	1	1	1	1	1	2	1	3	1	3	1	3	2

Polysaccharide Lyase Family	1	3	4
Number of sequences	4	2	1

Carbohydrate Esterase Family	1	3	4	5	8	9	12	15	16	NC
Number of sequences	13	7	5	7	1	1	1	3	1	2

Carbohydrate-Binding Module Family	1	6	18	20	21	24	35	42	43	48	50	52	NC
Number of sequences	30	1	32	3	1	2	2	1	1	3	19	2	1

List Of Proteins

Protein Name	Family	Reference Accession
α -1,3-glucosidase (PaG;Pa_2_60)	GH31	CAP72574.1
α -L-arabinofuranosidase (Pa_0_1370)	GH62	CAP62336.1
α -L-arabinofuranosidase (Pa_5_11670)	GH51	CAP62201.1
endo- β -1,4-mannanase (Pa_5_1950)	CBM35, GH26	CAP61906.1
endo- β -1,4-mannanase (Pa_6_490)	GH5	CAP71606.1
endo- β -1,4-xylanase (Pa_2_13730)	GH11, CBM1	CAP60973.1
Pa5D0098	GT24	CAD60785.1
Pa5G0016	GH18	CAD60603.1
Pa_0_1250	CBM1, GH6	CAP60942.1
Pa_0_270	GH61	CAP61650.1
Pa_0_910	CBM1, CE15	CAP60908.1
Pa_1_1010	GH11	CAP59648.1
Pa_1_11070	GH45	CAP69443.1
Pa_1_12220	GH16	CAP69564.1
Pa_1_12690	GH13, CBM20	CAP69613.1
Pa_1_15210	CE3, CBM1	CAP67628.1
Pa_1_16300	GH61, CBM1	CAP67740.1
Pa_1_20990	GT39	CAP60828.1
Pa_1_21900 (fragment)	GH61	CAP67176.1

http://www.cazy.org/CBM42.html

FR 22:01 04/06/2012

Régulation de l'expression des GH

Les modèles industriels

➤ *Aspergillus niger* *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*)

Génome: 2007

39 Mb

14600 gènes

Génome: 2008

34Mb

9129 gènes

➤ production industrielle d'enzymes

Agroalimentaire

Biocarburants

➤ pectinases, cellulases, xylanases, arabinases, etc.

➤ étude de l'expression des GH

 maîtrise et amélioration des rendements

Le Régulon Xylose chez *Aspergillus niger*

- **XInR** (1994)
- Mutants de réponse au Xylose (dégradation du Xylan)
- **FT 2 doigts de Zn** spécifique des champignons famille **Gal4p**
- Transcriptome (cellulose, Xylan)

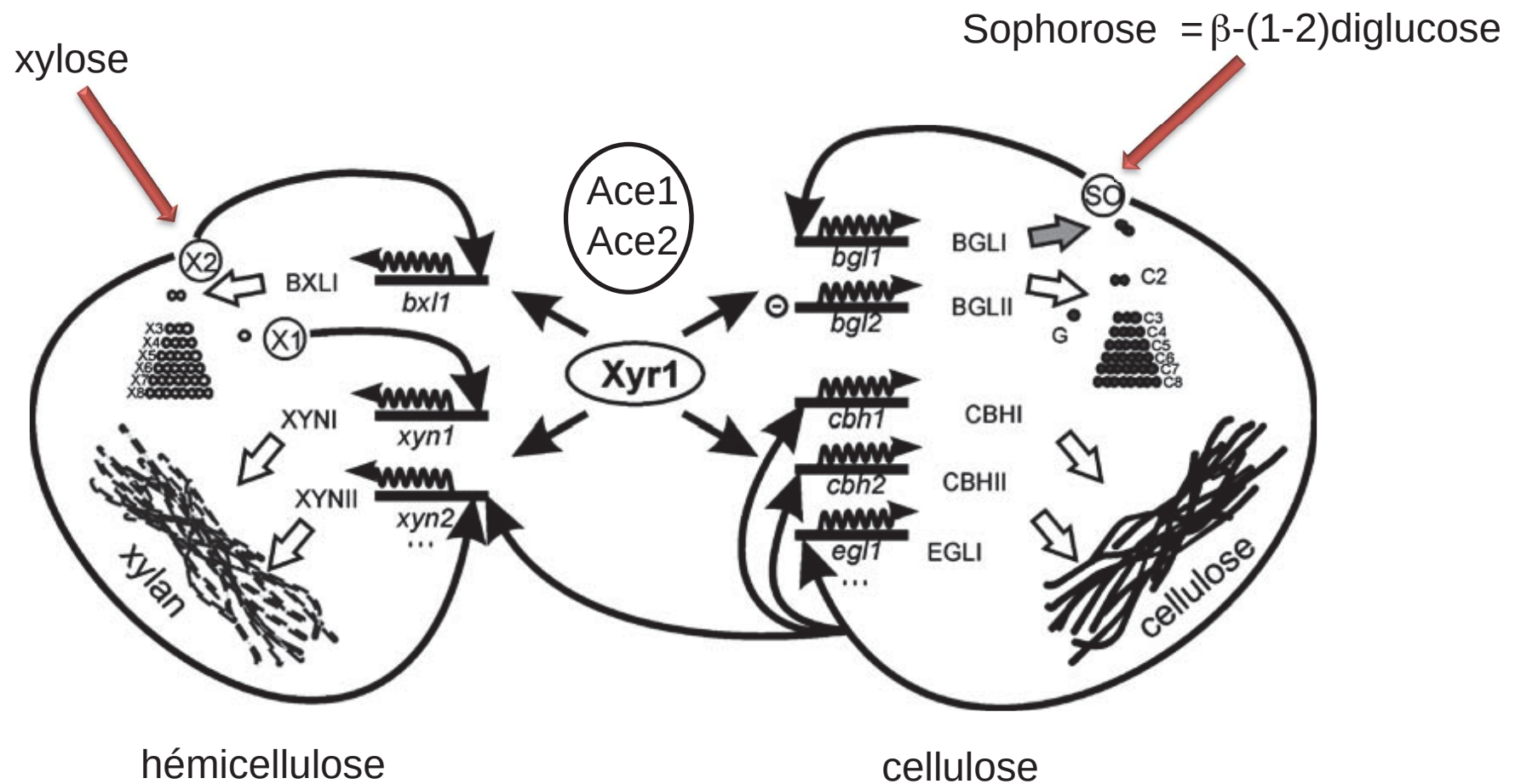
hémicellulases

cellulases

Gene name	Functional annotation	E.C. number	Reference
Enzymes involved in xylan degradation			
<i>XlnC</i>	Endo-1,4- β -xylanase C	3.2.1.4	(Gielkens et al. 1999)
<i>XlnB</i>	Endo-1,4- β -xylanase B	3.2.1.8	(Kinoshita et al. 1995)
<i>XlnD</i>	β -Xylosidase	3.2.1.-	(van Peij et al. 1997)
<i>AxhA</i>	1,4- β -D-Arabinoxylan arabinofuranohydrolase	3.2.1.55	(Gielkens et al. 1999)
<i>AxeA</i>	Acetyl xylan esterase	3.1.1.73	(de Graaff et al. 1992)
<i>aguA</i>	α -Glucuronidase	3.2.1.139	(de Vries et al. 2002)
<i>estA</i>	Esterase A	3.1.1.3	(Boume et al. 2004)
<i>faeA</i>	Ferulic acid esterase A	3.1.1.73	(de Vries and Visser 1999)
	Putative xylosidase		^a
Enzymes involved in cellulose and xyloglucan degradation			
<i>cbhA</i>	1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase A	3.2.1.91	(Gielkens et al. 1999)
<i>cbhB</i>	1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase B	3.2.1.91	(Gielkens et al. 1999)
<i>eglA</i>	Endo-1,4- β -glucanase A	3.2.1.4	(van Peij et al. 1998a)
<i>eglB</i>	Endo-1,4- β -glucanase B	3.2.1.4	(van Peij et al. 1998a)
<i>eglC</i>	Endo-1,4- β -glucanase C (xyloglucanase)	3.1.1.72	(Hasper et al. 2002)
	Putative cellulases		^a
	Putative xyloglucanases		^a
	Enzymes involved in D-xylose metabolism		
<i>xyrA</i>	D-Xylose reductase	1.1.1.200	(Hasper et al. 2000)
<i>talB</i>	TalB trans-aldolase-like	2.2.1.2	^b
	3 Putative sugar transporters		^a
Other systems			
<i>aglB</i>	α -Galactosidase B	3.2.1.22	(de Vries et al. 1999a)
<i>lacA</i>	β -Galactosidase lacA	3.2.1.23	(de Vries et al. 1999a)
	Putative transcription factor		^a

Xylose  gènes de cellulases et d'hémicellulases

XlnR = Xyr1 chez *T. reesei*



Induction différentielle des gènes d'hémicellulases et de cellulases

Composition des génomes et stratégies de dégradation

Pourritures blanches vs. Pourritures brunes



***Phanerochaete chrysosporium*:**

- pourriture blanche
- champignon modèle de la dégradation de la lignocellulose
 - biochimie
 - génomique (2004 et 2006)
 - 32,5 Mb 10048 gènes
- les grandes lois de la dégradation
 - lignine
 - cellulose
 - hémicellulose
- mais
- **Absence de laccases**
- **Rôle mineur de HO[•]**

Pourritures blanches vs. Pourritures brunes

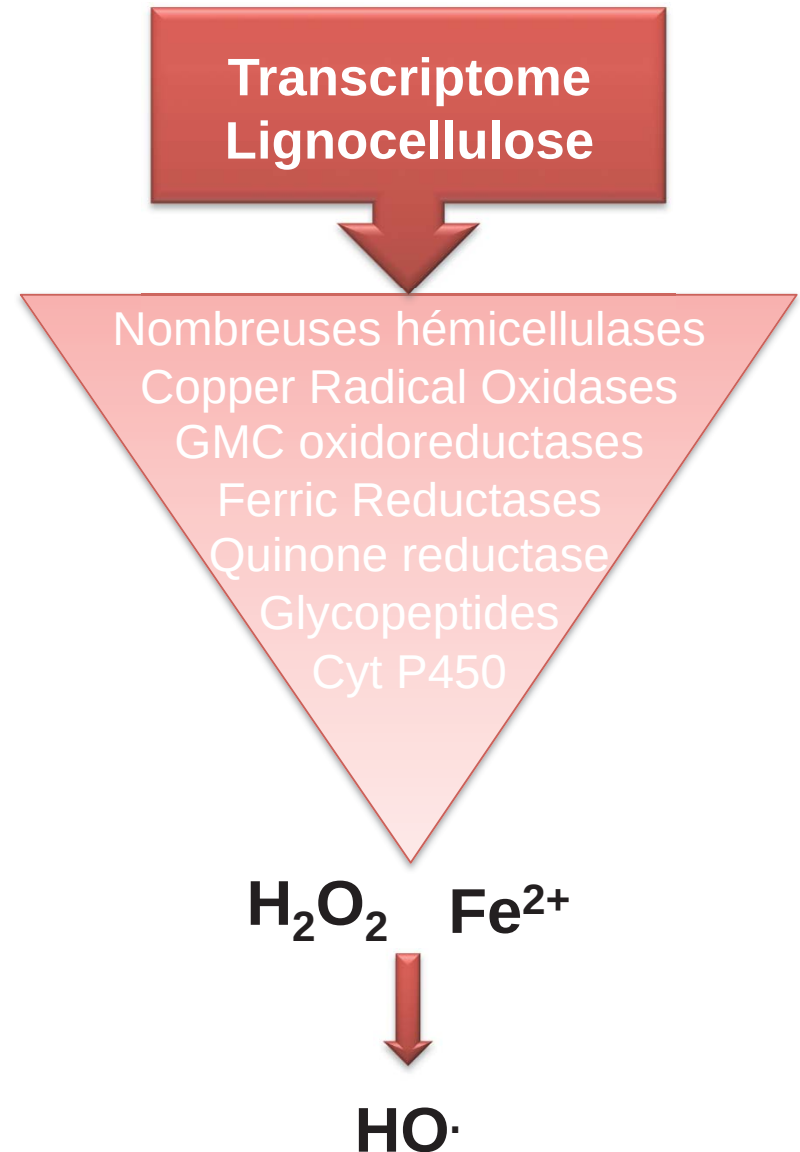
Postia placenta

- pourriture brune

~~Lignine~~



- évolution répétitive à partir des pourritures blanches par perte de gènes
 - cellulose (petites molécules oxydantes diffusibles)
 - génome 2009 91 Mb 17173 gènes
 - absence:
 - LiP/MnP Laccases ? CDH CBH CBM
 - perte de familles GH
 - 1 β -glucanase (endocellulase)
- GH = symbionte des plantes



Pourquoi développer
de nouveaux modèles d'études

Bilan du séquençage de *Trichoderma reesei*

- découvert lors de la 2^{ème} guerre mondiale
- champignon du sol (saprophyte)
- téléomorphe = *Hypocrea jecorina*
- choix DOE et mondial
- capacité de sécrétion (100g L⁻¹)
- production de cellulases
- améliorer l'étape limitante ethanol cellulosique

Bilan du séquençage de *Trichoderma reesei*

- 34 Mb 9129 gènes
- **Dégradeur efficace mais...**

Lineages	Species	GH	Avg. GH	GT	Avg. GT	CB M	Avg. CBM	CE	Avg. CE	PL	Avg. PL
Ascomycetes	Eurotio.	<i>A.nid.</i>	247	265	91	103	36	29	28	19	18
		<i>A.fum.</i>	263		103		55	29		13	
		<i>A.ory.</i>	285		114		30	26		21	
	Sordario.	<i>M.gris.</i>	231	211	94	96	58	47	32	4	8
		<i>N.cra.</i>	171		76		39	21		3	
		<i>T.ree.</i>	200		103		36	16		3	
		<i>F.gra.</i>	243		110		61	42		20	
	Saccharo.	<i>C.alb.</i>	58	47	69	70	4	3	3	0	0
		<i>S.cer.</i>	45		67		12	3		0	
		<i>C.gla.</i>	38		73		12	3		0	
	Archiasco.	<i>S.pom.</i>	46	46	61	61	5	5	5	0	0

P.a 236 89 98 41 7

Le  de CAZymes

Bilan du séquençage de *Trichoderma reesei*

Cellulase type ^a	CBH1 (Cel7A)	CBH2 (Cel6)	EG1 (Cel7B)	EG2 (Cel5)	EG3 (Cel12)	EG4 (Cel61)	EG5 (Cel45)	
Species ^b								Sum
<i>A.nid.</i>	2	2	1	2	1	9	1	18
<i>A.fum.</i>	2	1	2	3	3	7	1	19
<i>A.ory.</i>	2	1	1	2	2	8	0	16
<i>M.gris.</i>	3	2	2	2	3	17	1	30
<i>N.cra.</i>	2	2	3	1	0	14	1	23
<i>T.ree.</i>	1	1	1	2	1	3	1	10
<i>F.gra.</i>	1	0	1	2	2	13	1	20
<i>C.alb.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S.cer.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C.gla.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S.pom.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C.neo.</i>	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>P.chr.</i>	7	1	2	2	1	14	0	27

Le  de Cellulases

Bilan du séquençage de *Trichoderma reesei*

Family ^a Species ^b	GH43	GH10	GH11	GH51	GH74	GH62	GH53	GH54	GH67	GH29	GH26	GH95	Total
<i>A.nid.</i>	15	3	2	2	2	2	1	1	1	0	3	3	35
<i>A.fum.</i>	18	4	3	2	2	2	1	1	1	0	0	2	36
<i>A.ory.</i>	20	4	4	3	0	2	1	1	1	0	1	3	40
<i>M.gris.</i>	19	5	5	3	1	3	1	1	1	4	0	1	44
<i>N.cra.</i>	7	4	2	1	1	0	1	1	1	0	1	0	19
<i>T.ree.</i>	2	1	4	0	1	1	0	2	1	0	0	4	16
<i>F.gra.</i>	16	5	3	2	1	1	1	1	1	1	0	2	34
<i>C.alb.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S.cer.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C.gla.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S.pom.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C.neo.</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>P.chr.</i>	4	6	1	2	4	0	1	0	0	0	0	1	19

Le  d'hémicellulases (0 pectinases !)

- Nécessité d'améliorer *Trichoderma* (cocktail de GH)
- Opportunité de développer des modèles de recherche

Neurospora crassa

Podospora anserina

Etude de la dégradation de la biomasse chez le champignon modèle *N. crassa*

- modèle de génétique classique et moléculaire

- communauté bien structurée

- **génom** 2003

40 Mb 10 000 gènes

- collection de souches délétées pour chaque gène prédit

- **Transcriptomique**

Micro-arrays RNA-Seq

- **Protéomique**

Spectrométrie de masse

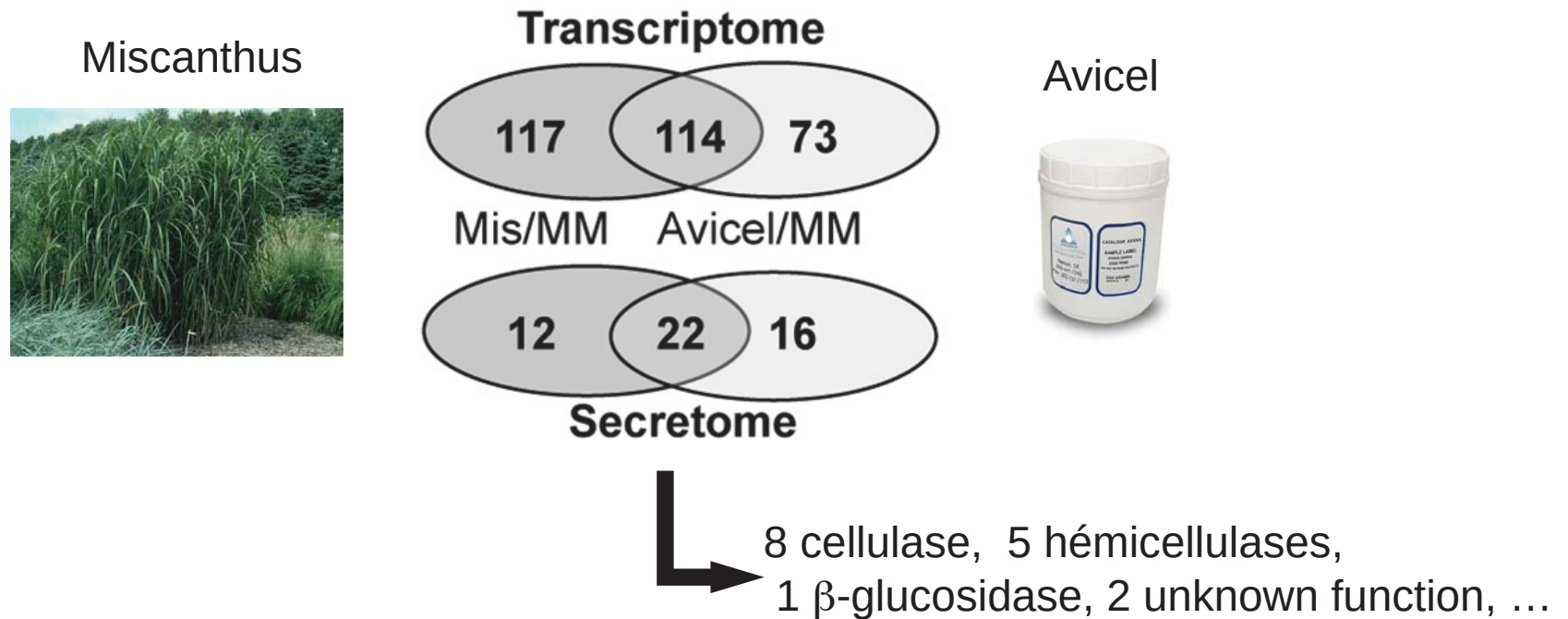
- intérêt récent pour la dégradation de la biomasse (2009)

Isolé sur des tiges de canne à sucre brûlées

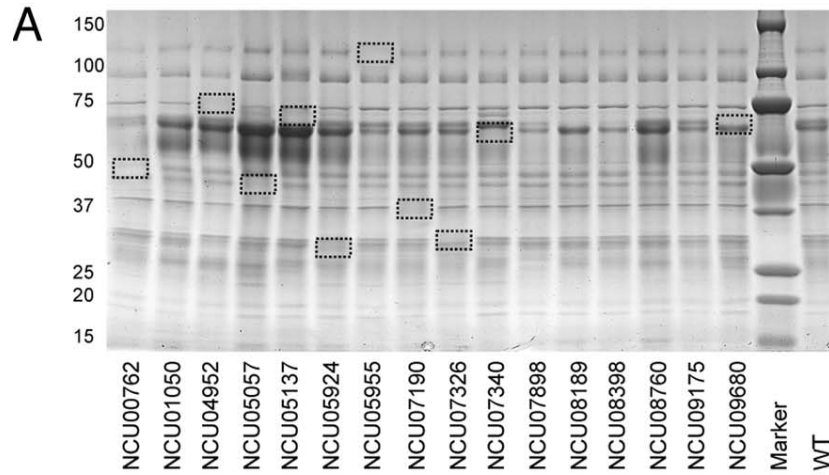
Canne à sucre / Miscanthus

Génomique fonctionnelle chez *Neurospora crassa*

Tian *et al.*, PNAS 2009

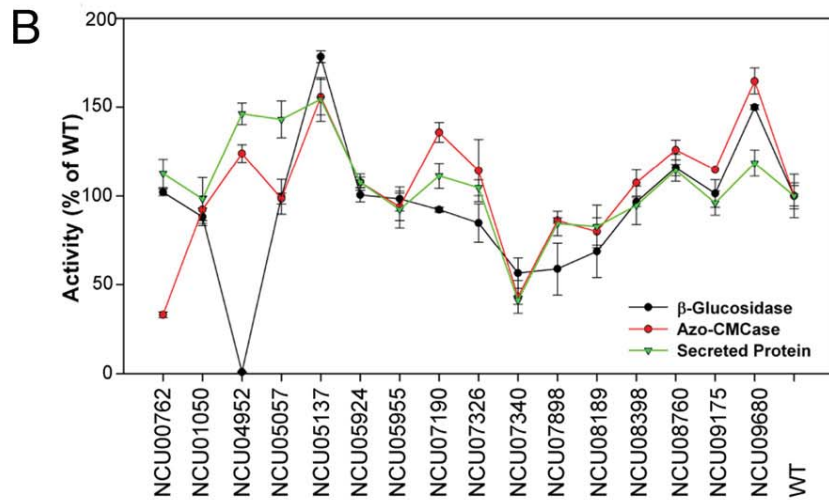


- collection de souches invalidées Δ NCU00000
- analyse fonctionnelle des gènes candidats (16)



Etude fonctionnelle

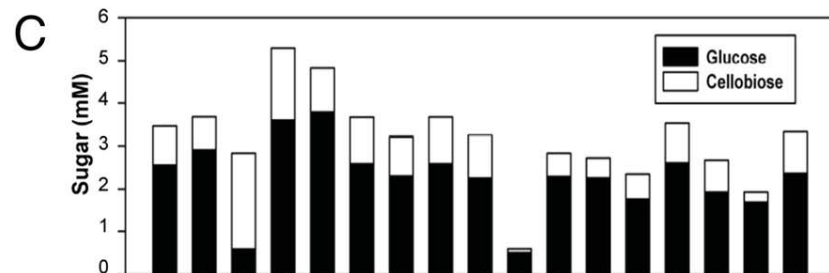
← Δ protéine



Δ NCU04952 [Avicel]

~~Activité β -glucosidase~~

→ β -glucosidase majeur



Δ NCU04952

Cellobiose → Glucose

Tian *et al.*, PNAS 2009

Identification de Clr-1 et Clr-2 chez *N. crassa*

- Crible de la collection de souches invalidées Δ NCU00000 ➔ [Avicel-]
- Facteurs de transcriptions

~~XlnR~~

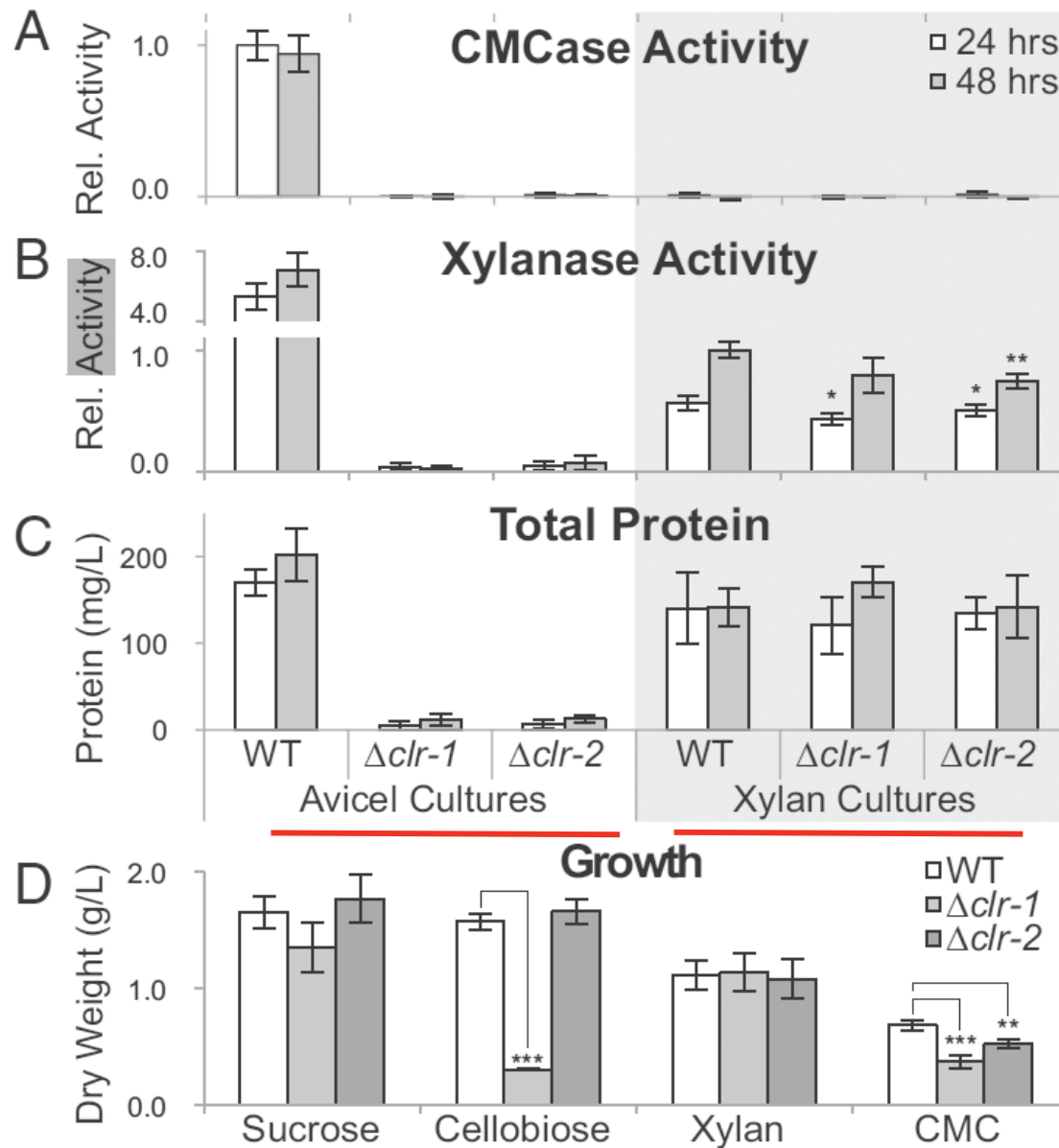
➔	<i>Cre-1</i>	Carbon Catabolite Repression
➔	<i>Clr-1</i>	Cellulose degradation Regulator-1
	<i>Clr-2</i>	Cellulose degradation Regulator-1

FT 2 doigts de Zn famille XlnR/Xyr1 Gal4p

ClrA *CLrB* *A. nidulans* ➔ Rôle similaire

➔ Rôle conservé chez les pezizomycètes

Identification de Clr-1 et Clr-2 chez *N. crassa*



~~Activité cellulase~~

Activité hémicellulase

~~cellulose~~ xylan

Sécrétion de protéines

~~cellulose~~ xylan

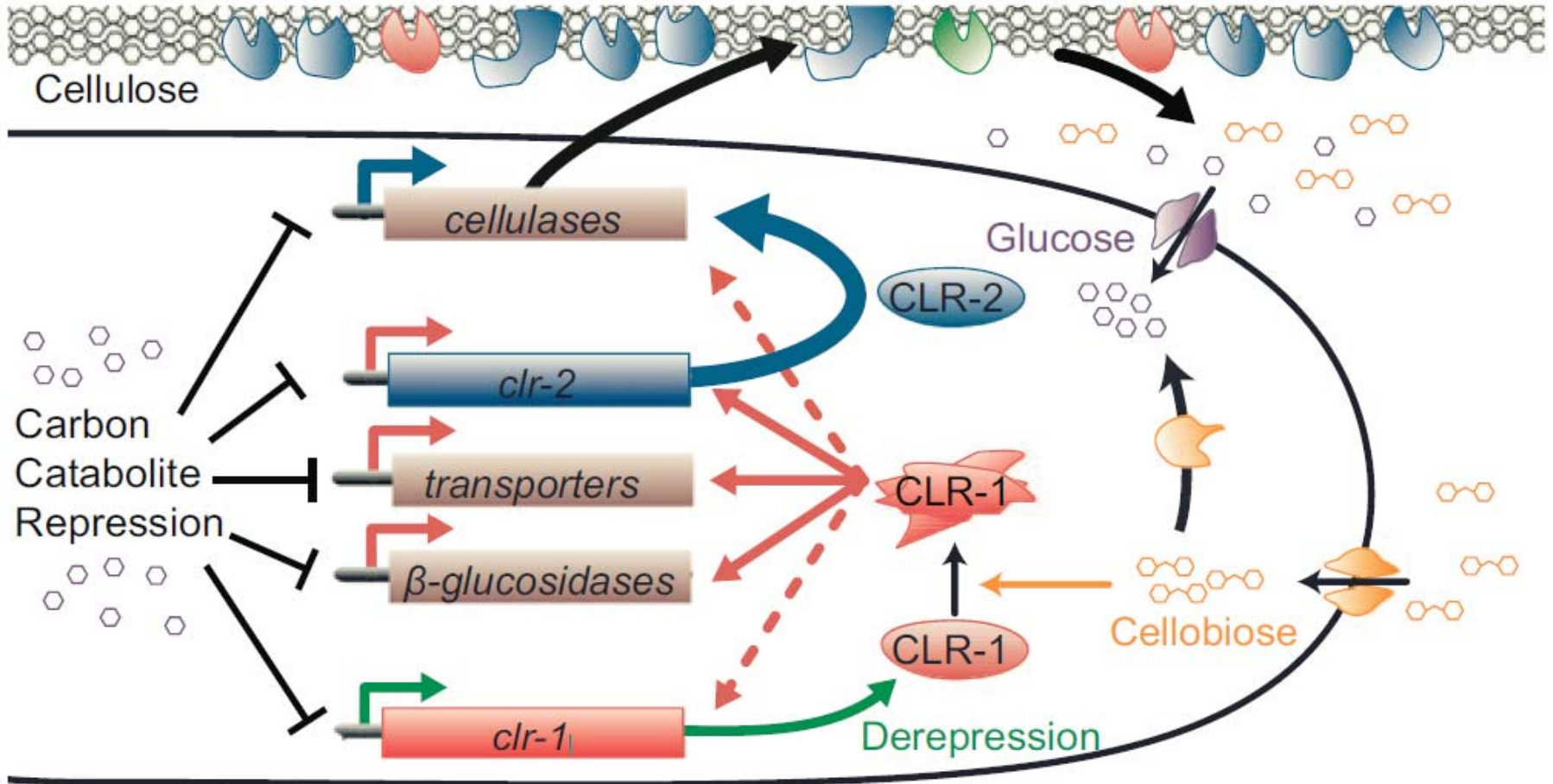
~~$\Delta Clr-1$ cellobiose~~

Coradetti *et al.*, PNAS 2012

Le régulon « Avicel »

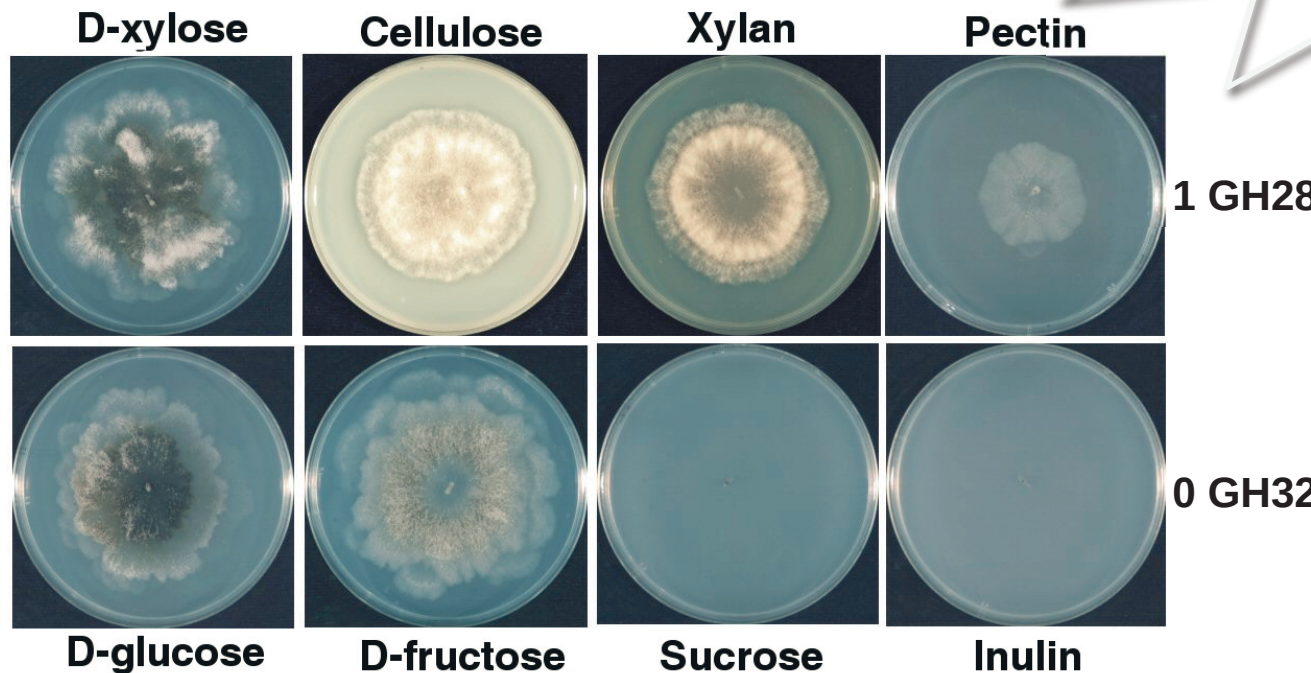
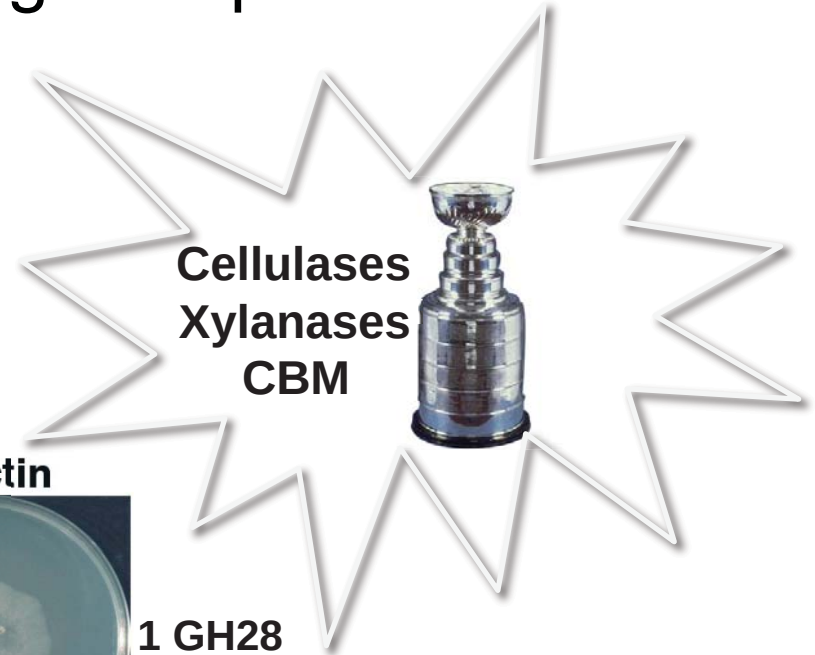
- RNA-Seq sucrose → Avicel (0,5 1 2 4h)
- Sauvage et $\Delta Clr-1$ et $\Delta Clr-2$
- 2 phases d'induction:
 - > Levée de la répression catabolique carbonnée
 - > Induction « cellulose spécifique » régulon avicel **212 gènes**
- **170 contrôlés par Clr-1 et/ou Clr-2**
 - 11/19 hémicellulases
 - 17/21 cellulases
 - 22 CAZymes
 - 13 transporteurs membranaires (dont cellobiose)
 - ...
 - 31 protéines sécrétées fonction inconnue

Régulation de l'expression des gènes par la cellulose chez *N. crassa*



Dégradation de la biomasse végétale par *P. anserina*

- Sordariomycète
- Coprophile (excréments d'herbivores)
- ~~Sucres simples~~ **ligno-cellulose**
- Génome: 35Mb 10545 gènes

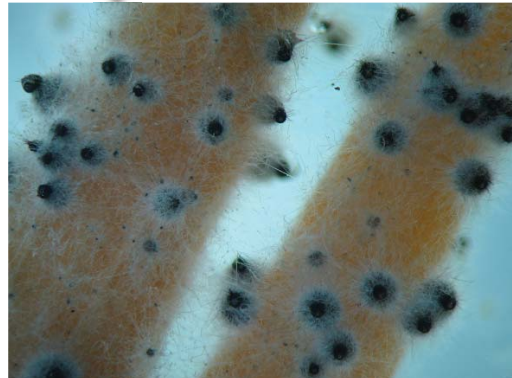
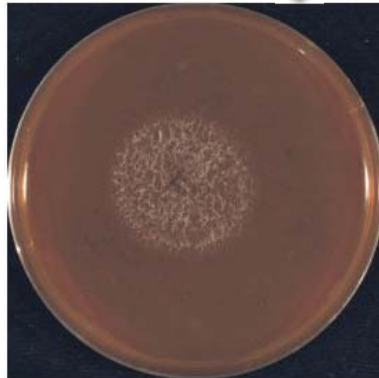


Composition en GH ↔ biotope

Dégradation de la lignine chez un ascomycète ?

	<i>P. anserina</i>	<i>N. crassa</i>	<i>M. grisea</i>	<i>A. nidulans</i>
GMC oxidoreductases	29	6	23	23
CDH	2	2	2	1
Pyranose oxidase	1	0	0	1
Copper Radical Oxidase	1	1	1	0
Quinone Reductase	1	1	1	1
Laccases	10	9	10	7
LiP/MnP	1	0	2	0

lignine



cure dent

Espagne *et al.*, 2008

Podospora anserina Hemicellulases Potentiate the *Trichoderma reesei* Secretome for Saccharification of Lignocellulosic Biomass[▽]

Marie Couturier,^{1,2} Mireille Haon,¹ Pedro M. Coutinho,² Bernard Henrissat,²
Laurence Lesage-Meessen,¹ and Jean-Guy Berrin^{1*}

INRA, UMR 1163, Universités de Provence et de la Méditerranée, Laboratoire de Biotechnologie des Champignons Filamenteux, ESIL, 163 Avenue de Luminy, F-13288 Marseille, France,¹ and Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, UMR 6098, CNRS et Universités d'Aix-Marseille I et II, 163 Avenue de Luminy, F-13288 Marseille, France²

Expression hétérologue de 5 hémicellulases de *P. anserina*

PaMan5A  + 28% libération de sucre totale

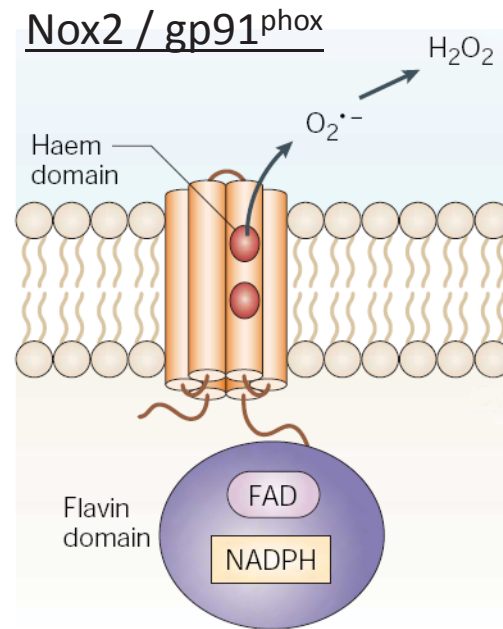
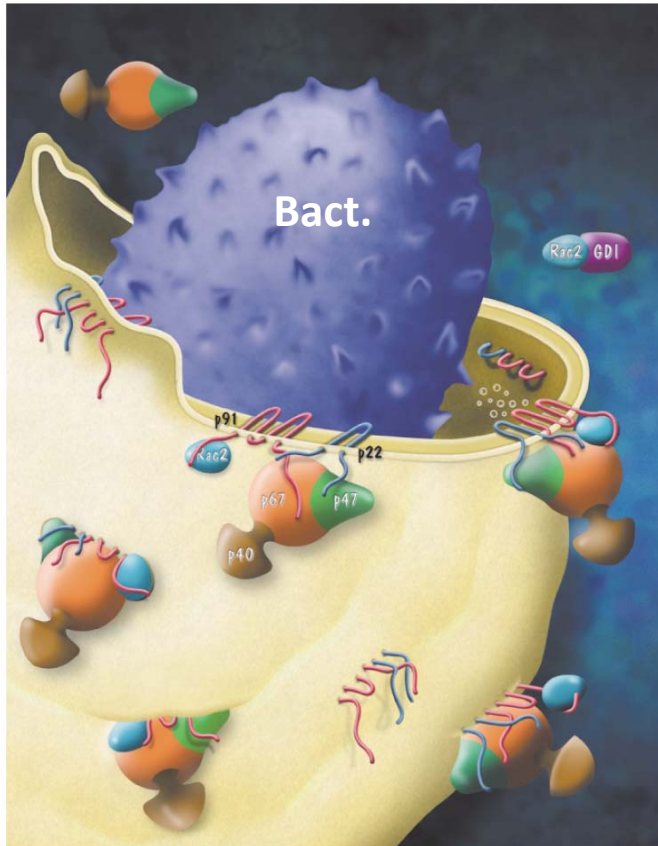
Appressorium-like
chez les saprophytes

Mutants affectés dans l'utilisation de la cellulose chez *P. anserina*

	fertilité		Activité cellulolytique	« Traversée » de la cellophane
	dextrine	Cellulose cellophane		
WT	+++	+++	++	+++
Nox1	-	+	+++	+
Nox2	+++	+	+	-

ROS ↔ Cellulose ↔ Fertilité

NADPH Oxidases (Nox) et production de ROS



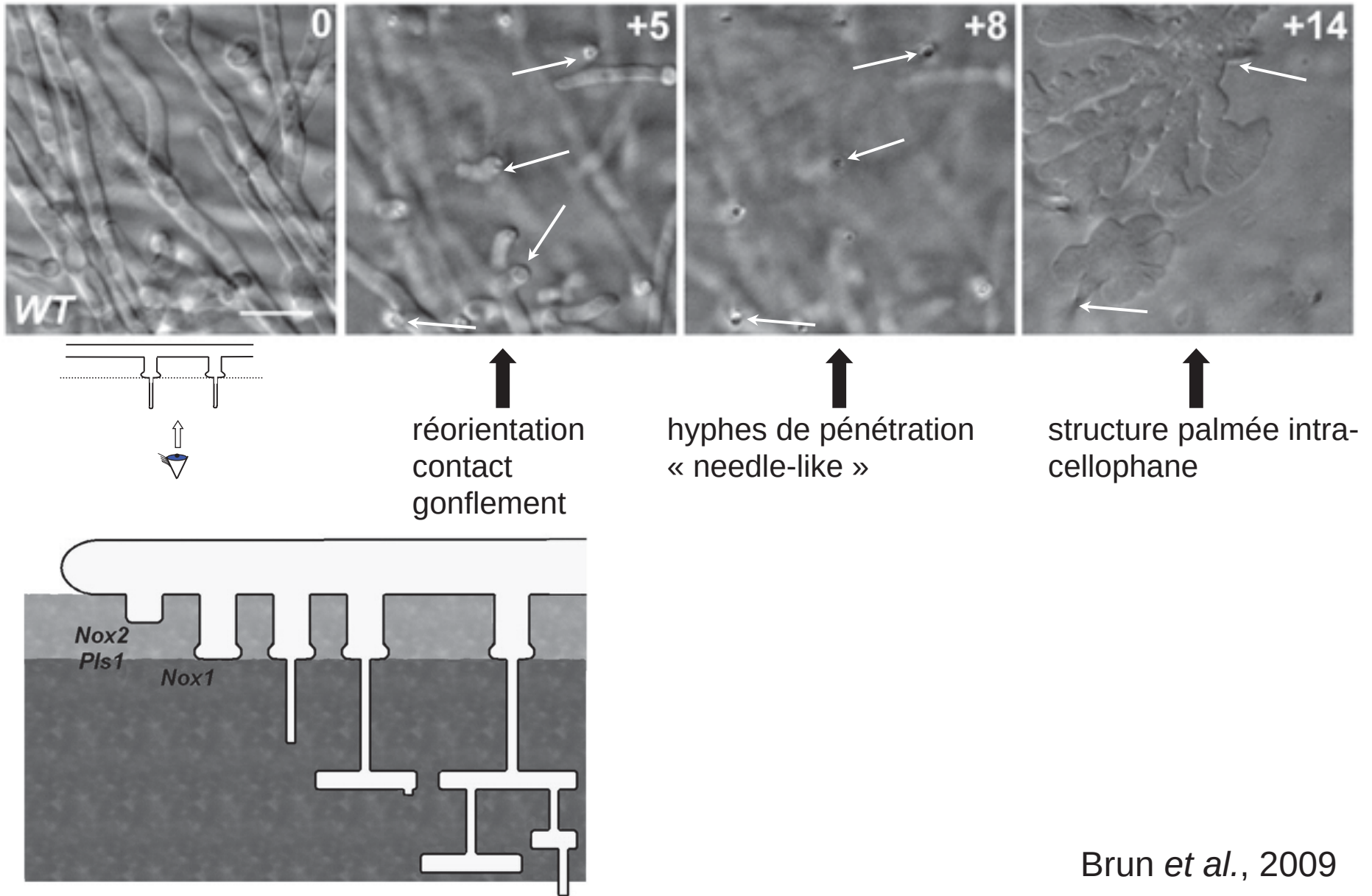
Lambeth *et al.*, 2004

Nox1

Nox2

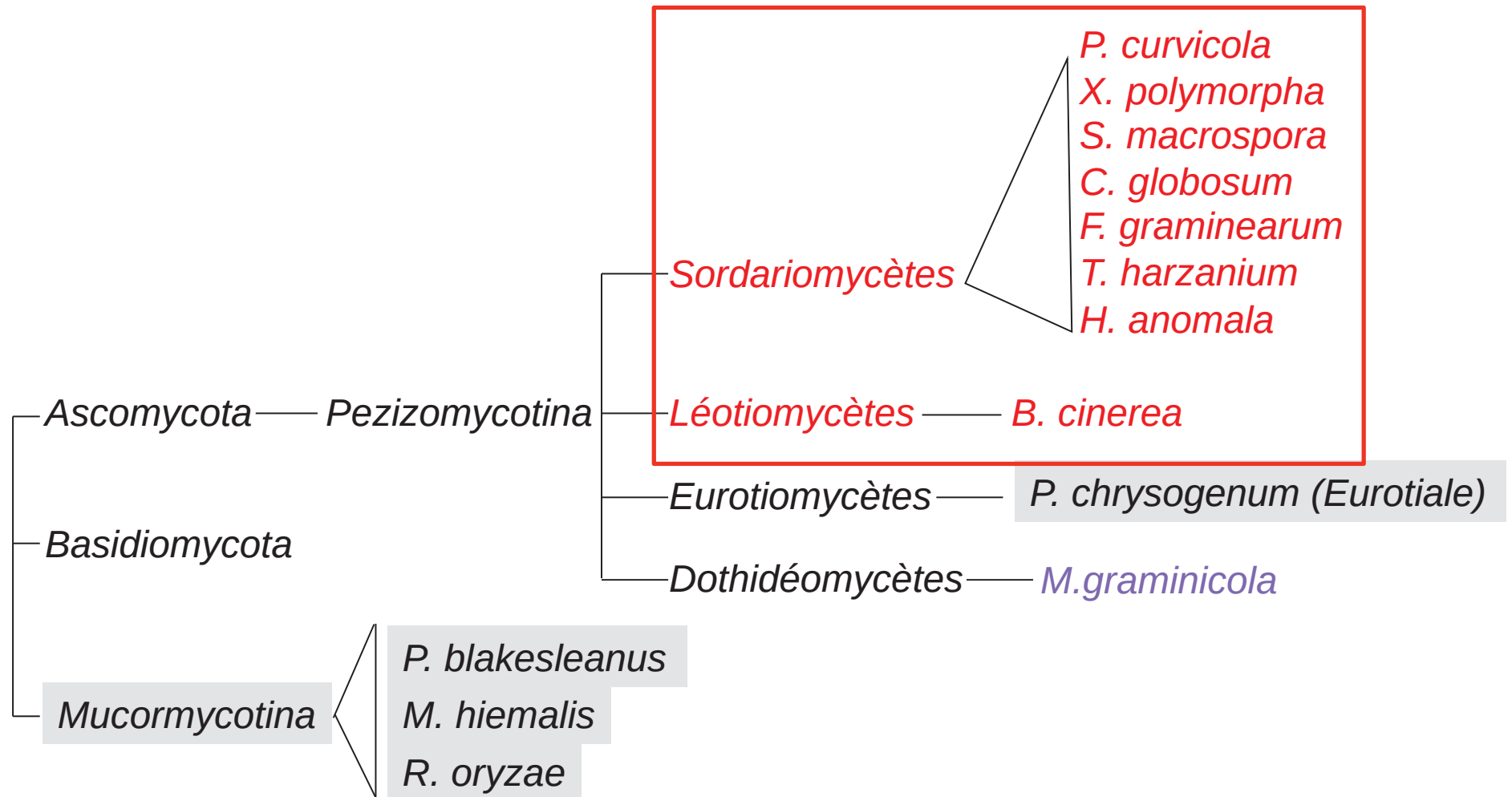
Nox3

Appressorium-like chez *Podospora anserina*



Brun *et al.*, 2009

appressorium-like chez les saprophytes



Nox2 + Pls1 = appressorium-like → Pénétration

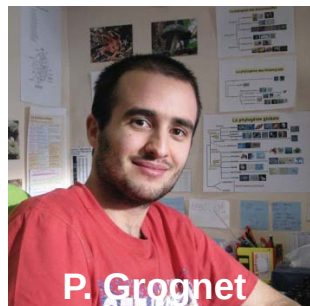
Conclusion

La dégradation de la biomasse

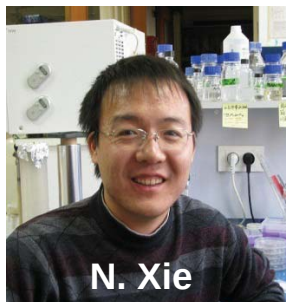
- domaine secondaire  Recherche stratégique
- augmentation des sources de financement
- choix porté sur *Trichoderma reesei*
- développement de modèles parallèles
- puissance du modèle Neurospora
- continuer à investiguer la biodiversité
- comprendre dans sa globalité la physiologie
- les saprophytes développent des structures type appressorium



P. Silar



P. Grognet



N. Xie



A. Dilmaghani



H. Lalucque



I. Lacaze



F. Malagnac



S. Brun



F. Delaître



S. François



F. Leclerc



G. Ruprich-Robert



NamSom



**Equipe
Génétique et
Epigénétique des
Champignons**