



HAL
open science

Production de synthons par des consortia microbiens à partir de paille de blé : approches macrocinétique, enzymatique et métaprotéomique

Adele Lazuka

► To cite this version:

Adele Lazuka. Production de synthons par des consortia microbiens à partir de paille de blé : approches macrocinétique, enzymatique et métaprotéomique. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. INSA de Toulouse, 2018. Français. NNT : 2018ISAT0049 . tel-02905313

HAL Id: tel-02905313

<https://theses.hal.science/tel-02905313>

Submitted on 23 Jul 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par

INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUÉES DE TOULOUSE (INSA de Toulouse)

Présentée et soutenue par

Adèle LAZUKA

Le 28 Septembre 2018

Production de synthons par des consortia microbiens à partir de paille de blé : approches macrocinétique, enzymatique et métabotéomique

École doctorale et discipline ou spécialité

ED SEVAB : Ingénieries microbienne et enzymatique

Unité de recherche

Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

Directrice(s) ou Directeur(s) de Thèse

HERNANDEZ-RAQUET Guillermina, Directrice de recherche, INRA-LISBP, Toulouse, France

O'DONOHUE Michael, Directeur de recherche, INRA-LISBP, Toulouse, France

Jury

CARRERE Hélène, Directrice de recherche, INRA-LBE, Narbonne, France, rapporteur

KURECK Bernard, Directeur de recherche, INRA-FARE, Reims, France, rapporteur

GUILLON Fabienne, Directrice de recherche, INRA-BIA, Nantes, France, examinateur

BERRIN Jean-Guy, Directeur de recherche, INRA-LBCF, Marseille, France, examinateur

Remerciements

« De la diversité naît la richesse... »

Avant toute chose, il advient de mentionner que ce travail n'aurait pu être réalisé sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes.

Je remercie Guillermina et Mike de m'avoir offert la possibilité d'effectuer cette thèse et pour m'avoir encadré pendant toutes ces années...(!) Merci pour les conditions de travail assez exceptionnelles, qui ont permis d'aller plus loin que ce que j'imaginai dans la compréhension des phénomènes.

Merci à Lucas, binôme de thèse, pour les échanges, les coups de main et le soutien de manière général. Notre binôme, quand on y pense ce n'est pas commun (!), aura été notre force pour aborder la complexité du sujet, profitant de cette diversité pour décortiquer résultats, articles et autres observations. Un remerciement spécial pour ton aide lors de mon déménagement !! . Merci aussi à Emeline, presque trinôme de thèse et binôme perso-pro de mon binôme pro (# c'est beau la vie !), je vous souhaite tout le meilleur.

Merci aux stagiaires, Maïder, Cécile, Camille et Gunnar. Ça a été un plaisir de travailler avec chacun de vous. J'espère vous avoir apporté un bon encadrement, en tout cas vous m'avez fait grandir et avez contribué à cette diversité de points de vue et d'expérience qui font que la Recherche en équipe est belle. (# c'est mieux en rigolant !)

Comment ne pas remercier toute l'équipe SYMBIOSE (ce nom que j'adore). Et comment les remercier dignement ? D'abord une spéciale dédicace et un grand merci aux collègues et amis de bureau (Laeti et MP², sans oublier Anil), plein de fous rires, beaucoup de soutien pro mais aussi perso... (#Candy !) Ensuite les techs bien entendu (Chanta, Delphine, Mansour, Evrard et Simon). Sans vous, pas de manips, c'est aussi simple que ça, donc plus qu'un merci je veux vous dire que ce travail est le fruit de votre, tout simplement. Merci à tous les membres de l'équipe, vous m'avez tous apporté bienveillance, joie (#mots fléchés), conseil et soutien (Tata yoyo, Seb (#concert parapluie, #solidia), Xavier, Alexis, Hélène, Ana, Mathieu, Etienne...). Un remerciement spécial à Etienne, qui m'a fait mettre le pied dans la recherche en me prenant en stage avec Laeti, ça a changé ma vie ! Un autre pour Mathieu, membre de nos comités de thèse et soutien permanent, tu gères une bien belle équipe avec beaucoup d'humanité.

Bien entendu je remercie ma famille qui a toujours cru en moi et m'a porté et apporté au quotidien le soutien indéfectible dont j'avais besoin. Merci Maman d'être toujours là pour et avec moi.

Je remercie mes amis Cécé, Jéjé, Juju, Laurent, Erwan, Margaux, Lulu, Deixonne et tous les autres, pour m'avoir écoutée et soutenue même quand j'étais en boucle sur la thèse. Votre amitié est précieuse.

Une petite phrase pour chou, qui a su s'adapter entre Toulouse et Paris, doctorat et travail, et toujours avec amour. Merci pour tout à toi et à tous tes/nos proches.

Arrivant à Paris, je remercie mes collègues actuels pour leur accueil et leur soutien pour cette grande étape qu'est la fin de la thèse (#BIA).

Enfin je remercie tous ceux qui ont contribué à ce travail de loin ou de près, au niveau professionnel (Sophie, Sandrine, Julie, Nourredine, Willy, Mathias...) comme personnel (Marvin, David, Mylène, Carine...).

Si je retiens bien quelque chose de tout cela c'est que de la diversité naît la richesse.

Production scientifique

Publications dans journaux à comité de lecture

Efficient anaerobic transformation of raw wheat straw by a robust cow rumen-derived microbial consortium. Lazuka, A. & Auer, L., Bozonnet, S., Morgavi, D.P., O'Donohue, M., Hernandez-Raquet, G., 2015. *Bioresour. Technol.* 196, 241–249.

CAZyChip: dynamic assessment of exploration of glycoside hydrolases in microbial ecosystems. Abot, A., Arnal, G., Auer, L., Lazuka, A., Labourdette, D., Lamarre, S., Trouilh, L., Laville, E., Lombard, V., Potocki-Veronese, G., Henrissat, B., O'Donohue, M., Hernandez-Raquet, G., Dumon, C., Leberre, V., 2016. *BMC Genomics.* 17:671.

Ecofriendly lignocellulose pretreatment to enhance the carboxylate production of a rumen-derived microbial consortium. Lazuka, A., Roland, C., Barakat, A., Guillon, F., O'Donohue, M., Hernandez-Raquet, G., 2017. *Bioresour. Technol.* 236, 225–233

Uncovering the potential of termite gut microbiome for lignocellulose bioconversion in anaerobic batch bioreactors. Lucas Auer, Adèle Lazuka, David Sillam-Dussès, Edouard Miambi, Michael O'Donohue, Guillermina Hernandez-Raquet, 2017. *Front Microbiol.* 8:2623.

Diversity of metabolically active bacteria associated with lignocellulose degradation by a cow rumen-derived consortium: dynamic responses to substrate pretreatment. Lazuka, A. & Auer, L., O'Donohue, M., and Hernandez-Raquet, G. **In preparation.**

Community dynamics of an efficient lignocellulolytic bacterial consortium derived from termite-gut microbiome. Lazuka, A. & Auer, L., O'Donohue, M., and Hernandez-Raquet, G. **In preparation.**

Dynamic profiling of efficient anaerobic consortia producing carboxylate from raw wheat straw by shotgun metaproteomics. Lazuka, A. & Flajollet, E., Jehmlich N., B. Henrissat, O'Donohue M., Hernandez-Raquet G. **In preparation.**

Conférences

Impact of ecofriendly pretreatments on lignocellulose properties and its digestibility by a hydrolytic microbial consortium. Adèle Lazuka, Lucas Auer, Cécile Roland, Maïder Abadie, Michael O'Donohue, Guillermina Hernandez-Raquet. *Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals (San Diego, CA, USA, Feb 2015)*. Oral presentation

Lignocellulose degradation by microbial consortia from phytophagous insect guts: microbial diversity and enzymatic activities. Maïder Abadie, Adèle Lazuka, Lucas Auer, Michael O'Donohue, Claire Dumas, Guillermina Hernandez-Raquet. *Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals (San Diego, CA, USA, Feb 2015)*. Oral presentation

Metagenomics and metaproteomics of lignocellulose transformation by enriched microbiomes from cow rumen and termite gut. Adèle Lazuka, Lucas Auer, Cécile Roland, Maïder Abadie, Michael O'Donohue, Guillermina Hernandez-Raquet. *Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals (San Diego, CA, USA, Feb 2015)*. Oral presentation

Lignocellulose degradation by enriched microbial consortia from cow rumen and termite gut. Lucas Auer, Adèle Lazuka, Maïder Abadie, Gunnar Oelker, Guillermina Hernandez-Raquet. *Workshop on Control of Natural and Engineered microbial Communities (Cambridge UK, Nov 2014)*. Oral presentation

Lignocellulose bioconversion by engineered mixed cultures from cow rumen and termite gut microbiomes. Adèle Lazuka, Cécile Roland, Lucas Auer, Abdellatif Barakat, Guillermina Hernandez-Raquet. *3rd Symposium on Biotechnology Applied to Lignocellulose (Concepcion, Chile, Oct 2014)*. Oral presentation

Lignocellulose degradation by engineered microbial consortia from rumen and termite gut: Correlating enzymatic profiles and functional microbial diversity. Lucas Auer, Adèle Lazuka, Sandrine Païsse, Michael O'Donohue and Guillermina Hernandez-Raquet. *15th International Symposium on Microbial Ecology (Seoul, South Korea, Aug 2014)*. Oral presentation

Exploring enzymatic behavior in xylo- and phytophagous insect's consortia. What could be learned from Nature ? Claire Dumas, Guillermina Hernandez-Raquet, Lucile Chatellard, Amandine Gales, Adèle Lazuka, Lucas Auer, Hélène Carrère, Jean-Jacques Godon, Michael O'Donohue, Jean-Philippe Steyer. *Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals (Clearwater beach, FL, USA, Mai 2014)*. Oral presentation

Valorisation de la lignocellulose : Analyse fonctionnelle de consortia microbiens enrichis. Lucas Auer, Adèle Lazuka, Maïder Abadie, Michael O'Donohue, Guillermina Hernandez-Raquet. *Génomique Environnementale (Rennes, FR, Nov 2013)*. Poster

Lignocellulose bioconversion by engineered mixed cultures. Païssé S, **Lazuka A**, Auer L, Bozonnet S, O'Donohue M. Hernandez-Raquet G. *Joint Genome Institute Users Meeting (Walnut Creek, CA, USA, March 2013). Poster.*

Collaborations scientifiques

Production de synthons à partir de lignocelluloses par des consortia microbiens (Hi-Solids). BIA-INRA Angers-Nantes, LBE-INRA Narbonne, IATE- INRA Montpellier (2014-2015). *Financement ANR*

Combinaison de traitements bactériens pour fractionner la paille de blé (COMBA). FARE-INRA Reims. (2014-2015). *Financement département CEPIA INRA*

Metaproteomic analysis of hydrolytic samples derived from natural ecosystems. UFZ Leipzig-Germany. (2014-2015). *Expérience internationale dans le cadre du parcours de l'EIR-A. Financement INRA DARESE et Campus France*

Caractérisation de l'activité et de la structure des consortia microbiens lignocellulolytiques issus des systèmes digestifs d'insectes (Insyme). LBE-INRA Narbonne. (2013-2015) *Financement 3BCAR*

Lignocellulose bioconversion by engineered mixed cultures from rumen, (project High-throughput metagenome functional screening (MetaScreen). Equipe de métagénomique-LISBP Toulouse. (2012-2015). *Financement Metaprogramme MetaOmiques des Ecosystèmes Microbiens (MEM) INRA*

Production de synthons par des consortia microbiens à partir de biomasse lignocellulosique (ProBioS). IATE-INRA Montpellier. (2012-2015). *Financement 3BCAR*

Résumé

Alors que la biomasse lignocellulosique constitue le plus grand réservoir de carbone renouvelable sur Terre, sa valorisation reste encore limitée par sa récalcitrance à la dégradation. Bien que la bioconversion de la lignocellulose ait été largement étudiée dans le cadre de la production de biocombustibles (éthanol, biohydrogène ou méthane), d'autres approches comme la plateforme des carboxylates permettent de produire des intermédiaires et composés chimiques d'intérêt industriel. Pourtant dans la Nature, la lignocellulose est prise en charge par des écosystèmes microbiens présents dans les sols ou les systèmes digestifs des animaux qui déploient une large diversité enzymatique pour déconstruire la lignocellulose. Ainsi, dans cette thèse de doctorat, nous avons étudié l'enrichissement de communautés microbiennes naturelles issues d'écosystèmes digestifs animaux sur paille de blé et en conditions d'anaérobiose en bioréacteur contrôlé, en vue de produire des carboxylates.

Via une procédure de culture en bioréacteur batch séquentiel, deux communautés stables ont été obtenues à partir de rumen bovin (nommée RWS) et de microbiote intestinal de termite de l'espèce *Nasutitermes ephratae* (nommée TWS). RWS et TWS dégradait 55% et 45% MV du substrat non prétraité, en produisant 230 mCmol-AGV.L⁻¹ (6,5 g-AGV.L⁻¹) et 180 mCmol-AGV.L⁻¹ (5,8 g-AGV.L⁻¹) en 15 jours, respectivement.

En combinant des approches de suivi dynamique des paramètres macroscopiques et des activités enzymatiques impliquées dans la dégradation du substrat, ainsi que par une étude métabolomique dynamique, nous avons pu révéler des particularités intéressantes entre ces deux communautés microbiennes.

Alors que les membres des phyla Bacteroidetes et Firmicutes étaient majoritaires dans les deux communautés, TWS présentait une diversité bactérienne beaucoup plus faible que RWS. Pourtant TWS semblait être un meilleur pourvoyeur d'enzymes hémicellulolytiques que RWS, ce qui se traduisait par une accélération de la dégradation initiale de la fraction hémicellulosique associée à une augmentation des proportions de Cazymes impliquées dans cette fonction.

RWS est apparue plus orientée vers la transformation à fort rendement du substrat en carboxylates, ainsi que vers la dégradation plus poussée d'une fraction récalcitrante du substrat sans préférence pour l'une ou l'autre des fractions (hémi)cellulolytiques. Ce comportement semblait soutenu par des diversités taxonomique et fonctionnelle importantes. La communauté RWS a donc été soumise à des prétraitements du substrat dans le but d'augmenter ses capacités de production de carboxylates. Des prétraitements par imprégnation à la soude à haute teneur en solide ont finalement permis d'accélérer la dynamique de transformation du substrat en AGV d'un facteur 2, constituant ainsi une approche d'intérêt pour la stimulation du consortium hyper-hydrolytique.

Abstract

Lignocellulose (LC) is the most abundant terrestrial reservoir of renewable carbon on Earth but its valorization is still limited due to its recalcitrance. In the field of bioconversion, the production of ethanol, methane and H₂ from LC has been widely studied, whereas others valorization – as the carboxylate platform- routes enable the production of intermediate building blocks or industrial compounds.

However, in Nature, the recycling of LC is performed by microbial consortia, present in soils and guts of animals, which deploy complex arsenals of enzymes to deconstruct LC.

In this PhD thesis we studied the anaerobic enrichment of natural microbial communities from animal digestive systems, aiming to production of carboxylates from wheat straw as substrate.

Thanks to a sequential batch reactor procedure, we obtained two stable communities from bovine rumen (named RWS) and intestinal microbiote from the termite species *Nasutitermes ephratae* (named TWS).

RWS and TWS transformed 55% and 45% VS unpretreated wheat straw into 230 mCmol-AGV.L⁻¹ (6.5 g-AGV.L⁻¹) and 180 mCmol-AGV.L⁻¹ (5.8 g-AGV.L⁻¹) within 15 days, respectively.

Combing the dynamic measurement of macroscopic parameters (i.e. degradation and production) to the quantification of enzymatic activities involved in LC degradation, as well as to a dynamic metaproteomic approach we revealed some interesting features between these two consortia.

Whereas both microbial communities were mainly composed from bacterial members belonging to phyla Bacteroidetes and Firmicutes, TWS bacterial diversity was very reduced, compared to RWS.

However, TWS surprisingly appeared as a better hemicellulolytic enzymes purveyor than RWS; this last was characterized by an increase of its initial hemicellulose degradation rate, associated to increased proportions of Cazymes involved in this function.

RWS was mainly linked to high-yield substrate transformation into carboxylates, as well as to the degradation of a recalcitrant fraction of wheat straw, displaying no preference for cellulose or hemicellulose fractions. This interesting behavior was probably supported by the high taxonomic and functional diversity observed in RWS.

RWS was thus selected to study the impact of pretreatments on its acidogenic biological potential. Dry chemo-mechanical pretreatments -employing soda as chemical compound- resulted in a 2-fold increase of the transformation rate of substrate into carboxylates, revealing the interest of such high-solids approach to enhance the activity of an hyper-hydrolytic microbial consortia.

Sommaire

Chapitre I : Introduction	1
I.1. Contexte	1
I.2. Objectifs de recherche et organisation du manuscrit	1
Chapitre II : Etat de l'art	3
II.1. Caractéristiques du substrat lignocellulosique	3
II.1.1. Cellulose	3
II.1.2. Hémicellulose	5
II.1.3. Lignine.....	6
II.1.4. Structure tertiaire de la lignocellulose	7
II.1.5. Caractérisation de la lignocellulose	8
II.1.6. Les sources de biomasse lignocellulosique	14
II.2. Valorisation de la biomasse lignocellulosique vers le concept de bioraffinerie.....	16
II.2.1. Prétraitements appliqués à la lignocellulose.....	21
II.2.2. Voies de valorisation de la lignocellulose	33
II.3. Dégradation biologique de la lignocellulose	41
II.3.1. Dégradation microbienne de la lignocellulose dans les écosystèmes naturels	41
II.3.2. Potentialités des consortia microbiens dérivés d'écosystèmes naturels pour la valorisation de la biomasse lignocellulosique	44
II.3.3. Enzymes impliquées dans la dégradation de la lignocellulose.....	57
II.4. Objectifs de l'étude.....	71
Chapitre III : Matériel et méthodes	73
III.1. Substrats lignocellulosiques d'étude	73
III.1.1. Paille de blé	73
III.1.2. Substrat lignocellulosique pré-traité.....	73
III.1.2.2. Prétraitements enzymatiques	74
III.3. Origine des inocula.....	75
III.3.1. Rumen bovin	75
III.3.2. Termites.....	75
III.4. Conditions de fermentation	78
III.4.1. Cultures d'enrichissement	80
III.4.2. Dynamique des communaunautés enrichies	81

III.4.3 Cultures sur des substrats prétraités	82
III.5. Techniques analytiques	83
III.5.1. Caractérisation des substrats	83
III.5.2. Analyse des produits du métabolisme microbien.....	86
III.5.3. Traitement des données macrocinétiques.....	87
III.5.4. Activités enzymatiques	88
III.6. Analyse de diversité microbienne	89
III.6.1. Prélèvement et co-extraction ADN/ARN.....	89
III.6.2. Amplification de la région V3-V4 de l'ADN 16S et séquençage MiSeq Illumina	90
III.7. Analyse de diversité fonctionnelle par métaprotéomique	91
III.7.1. Extraction des protéines et séparation	92
III.7.2. Digestion des protéines et purification.....	93
III.7.3. Chromatographie liquide et spectrométrie de masse tandem.....	93
III.7.4. Analyse des données métaprotéomiques générées.....	94
Chapitre IV : Evaluation du potentiel biologique lignocellulolytique acidogène de l'inoculum rumen	96
VI.1. Introduction du chapitre	96
IV.2. Efficient anaerobic transformation of raw wheat straw by a robust cow rumen-derived microbial consortium.....	98
IV.2.1. Abstract	98
IV.2.2. Introduction.....	99
IV.2.3. Materials and methods	101
IV.2.4. Results and discussion	105
IV.2.5. Conclusions.....	119
IV.2.6. Acknowledgment	119
IV.2.7. Supplementary data.....	120
IV.3. Capacités de dégradation de la lignocellulose d'un consortium microbien ruminal enrichi <i>in vivo</i>	121
IV. 4. Conclusions du chapitre	126
Chapitre V : Prétraitements innovants : caractérisation et impacts sur le potentiel biologique lignocellulolytique acidogène de la communauté RWS dérivée de rumen bovin.. V- 128	
V.1. Introduction du chapitre	128

V.2. Ecofriendly lignocellulose pretreatment to enhance the carboxylate production of a rumen-derived microbial consortium	129
V.2.1. Abstract	129
V.2.2. Introduction	130
V.2.3. Materials and methods.....	132
V.2.4. Results and discussion.....	136
V.2.5. Conclusions	148
V.2.6. Acknowledgment.....	148
V.2.7. Supplementary data	148
V.3. Conclusions du chapitre	149
Chapitre VI : Evaluation du potentiel biologique lignocellulolytique acidogène de microbiotes intestinaux de termite	150
VI.1. Introduction du chapitre	151
VI.2. Uncovering the potential of termite gut microbiome for lignocellulose bioconversion in anaerobic batch bioreactors.....	152
VI.2.1. Abstract	152
VI.2.2 Introduction.....	153
VI.2.3. Materials and methods	156
VI.2.4. Results.....	161
VI.2.5. Discussion	169
VI.2.6. Contribution and acknowledgements.....	175
VI.2.7. Supplementary data.....	176
VI.3. Efficient carboxylate production from wheat straw by a microbial consortium derived from termite <i>Nasutitermes ephratae</i> gut microbiome	180
VI.3.1. Abstract	180
VI.3.2. Introduction.....	181
VI.3.3. Materials and methods	184
VI.3.4. Results and discussion	186
VI.3.5. Conclusions.....	196
VI.3.6. Acknowledgment	196
VI.4. Conclusions du chapitre	197
Chapitre VII : Structuration fonctionnelle de communautés microbiennes dérivées de rumen bovin (RWS) et de microbiote intestinal de termite (TWS).....	198
VII.1. Introduction du chapitre.....	198

VII.2. Shotgun metaproteomic dynamic profiling of efficient anaerobic consortia producing carboxylate from raw wheat straw	199
VII.2.1. Abstract.....	199
VII.2.2. Introduction.....	201
VII.2.3. Materials and methods	203
VII.2.4. Results.....	209
VII.2.5 Conclusions.....	233
VII.2.6 Acknowledgment	234
VII.2.7. Supplementary data	235
VII.3. Conclusions du chapitre.....	237
Chapitre VIII : Discussion générale.....	240
VIII.1 Comment enrichir des populations microbiennes complexes issues d'écosystèmes naturels d'intérêt en vue de leur utilisation comme inocula stables pour la bio-conversion contrôlée de lignocellulose de paille de blé en synthons de type AGV ?	241
VIII.2 Quels sont les comportements dynamiques de telles consortia microbiens en termes de dégradation de lignocellulose, de production de synthons et d'activités enzymatiques et peuvent-ils être mis en lien avec la structuration et la diversité des populations mises en jeu ?	248
VIII.3 Comment prétraiter la paille de blé pour maximiser les rendements et vitesses de production de synthons de type AGV par des consortia hyper-hydrolytiques dérivés d'écosystèmes naturels ? Et quels sont les impacts des prétraitements sur le comportement dynamique des consortia ?	251
VIII.4 Quelle est la structuration dynamique des fonctions (et populations) mises en jeu dans de tels consortia microbiens hyper-hydrolytiques et peut-elle être corrélée à la dynamique de dégradation de lignocellulose, de production de synthons et d'activités enzymatiques observées ?	255
VIII.5. Conclusion et perspectives	259
Chapitre IX : Références bibliographiques	238
Chapitre X : Données supplémentaires et annexes	288
Annexe 1 : Détermination d'activités enzymatiques en milieu complexe.....	288
A1.1. Incubation enzyme - substrat.....	289
A1.2. Dosage de l'activité	292
A1.3. Fractionnement des échantillons	293
Annexe 2. Système de prélèvement	302

Annexe 3. Prétraitements enzymatiques	304
A3.1. Tests de saccharabilité et choix des enzymes étudiées en prétraitement biologique	304
A3.2. Caractérisation de la paille de blé prétraitée enzymatiquement.	305
A3.3. Production de carboxylates par le consortium microbien RWS à partir des pailles de blé prétraitées enzymatiquement	310
A3.4. Conclusions	319

Liste des figures

Chapitre II

Figure II-1 : Représentation schématique de la structure chimique de la cellulose.....	3
Figure II-2 : Liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires de la cellulose,	4
Figure II-3 : Structure chimique du xylane	6
Figure II-4 : Représentation schématique de la structure tertiaire de la lignocellulose, Chatel et al. (2014)	7
Figure II-5 : Différentes techniques de spectroscopie et états quantiques associés	10
Figure II-6 : Spectre de la cellulose en MAS-RMN ¹³ C selon le déplacement chimique.....	11
Figure II-7: Plateformes de molécules d'intérêt dérivées d'holocelluloses de biomasse lignocellulosique par transformations chimique ou biologique, Isikgor et Bercer (2015) (1/3)	17
Figure II-8 : Plateformes de molécules d'intérêt dérivées d'holocelluloses de biomasse lignocellulosique par transformations chimique ou biologique, Isikgor et Bercer (2015) (2/3)	18
Figure II-9 : Plateformes de molécules d'intérêt dérivées d'holocelluloses de biomasse lignocellulosique par transformations chimique ou biologique, Isikgor et Bercer (2015) (3/3)	19
Figure II-10: Degré de réduction et énergie libre de Gibbs pour la conversion biologique du glucose en composés d'intérêt, Holtzapple et al. (2015).....	38
Figure II-11 : Voies métaboliques impliquées dans la dégradation de la matière organique en anaérobie	44
Figure II-12 : Hypothèse de corrélation entre diversité bactérienne et fonctionnelle	45
Figure II-13 : Tractus intestinal du termite supérieur <i>Cubitermes</i> sp. (Kappler et Brune ,1999)	50
Figure II-14 : Tractus intestinal du termite supérieur <i>Nasutitermes corniger</i> (Köhler et al., 2012)	52
Figure II-15 : Système digestif bovin, Millen et al. (2016).....	54
Figure II-16 : Rupture des liaisons O-glycosidiques par les cellulases.....	57
Figure II-17 : Structure du domaine catalytique des endoglucanases et exoglucanases	58
Figure II-18 : Interaction des cellulases libres avec leur substrat insoluble rencontrée chez les microorganismes aérobies Himmel et al. (2010)	60
Figure II-19 : Interaction entre le cellulosome des microorganismes anaérobies et le substrat cellulosique, Himmel et al. (2010)	62

Figure II-20 : Attachement du cellulosome à la surface bactérienne (Himmel et al., 2010) ... 63

Chapitre III

Figure III-1 : Représentation schématique de la dissection des termites 77

Figure III-2: Réacteur Sartorius Biostat A + 78

Figure III-4 : Représentation schématique de la procédure d'enrichissement en SBR..... 80

Chapitre IV

Figure IV-1 : VS degradation and VFA production (a), relative community composition (b) and community clustering (c) through the enrichment procedure. Error bars in VS degradation are standard deviations of two technical replicates. 109

Figure IV-2 : Profile of VS degradation and VFA production (a) and products composition of RWS cultivated on wheat straw (b). Error bars are standard deviations of three biological replicates..... 112

Figure IV-3 :Substrate characterization: residual percentages of cellulose and hemicellulose calculated as percentage from their respective initial concentrations (a) and Lateral Order Index (LOI) and 1512:1375 cm^{-1} area ratio (b). Error bars are standard deviations of three biological replicates..... 114

Figure IV-4 : Enzymatic activity profiles of RWS through wheat straw transformation: Xylanase and CMCase activities(a); β -glucosidase and cellobiohydrolase activities (b) and pellet:supernatant repartition of the enzymatic activities measured (c). Error bars are standard deviations of three biological replicates..... 117

Figure IV-5 : Comparaison des enrichissements *in vivo* et RWS – paramètres macrocinétiques (a) dégradation des matières volatiles (b) production d'AGV (c) production de CO_2 et (d) composition en AGV 122

Figure IV-6 : Comparaison des enrichissements *in vivo* et RWS – cellulose et hémicellulose résiduelles..... 123

Figure IV-7 : Comparaison des enrichissements *in vivo* et RWS – activités enzymatiques (a) xylanase et (b) CMCCase 124

Chapitre V

Figure V-1 : Characterization of the pretreated wheat straw substrates. (A) Lateral order index (LOI). (B) Macroporosity estimated as 1 μm -pore volume. (C) Biochemical composition of wheat straw (Cellulose -C, hemicellulose -H and lignin -L). The types of pretreatment are indicated by the bar colors as in A. (D) Reducing sugars liberated from wheat straw by the saccharification test performed under standard conditions (Cellulase, 20 FPU.L⁻¹, β -glucosidase 81U.mL⁻¹, 72h, 50°C, pH 5). Error bars indicate the standard deviation of the mean of three technical replicates. Different lowercase letters indicate differences within a treatment (one-way ANOVA, P<0.05)..... 139

Figure V-2 : Wheat straw transformation kinetics by RWS incubated with the four pretreated wheat straws. (A) Holocellulose degradation and (C) Holocellulose degradation rate. (B) Specific VFA production and (D) Specific VFA production rate. Experimental points and smoothed curves are presented with error bars corresponding to the standard deviation of the mean of two biological replicates..... 142

Figure V-3 : Kinetics of enzymatic activity and polysaccharide degradation throughout the fermentation of pretreated-wheat straw by a RWS consortium. Xylanase (A) and CMCase (B) activity and cellulose (C) and hemicellulose (D) degradation rates. Experimental points and smoothed curves are presented with error bars corresponding to the standard deviation of two biological replicates..... 146

Figure V-4 : Lateral order index (LOI) profiles during fermentation of pretreated wheat straw by a RWS consortium. Error bars correspond to the standard deviation of 2 biological duplicates..... 147

Chapitre VI

Figure VI-1 : Bioreactor composition (A) at the beginning and at end of incubation of termite gut microbiomes issued from *Nasutitermes ephratae*, *N. lujae*, *Microcerotermes parvus* and *Termes hospes*. Errors are standard deviations of the two biological replicates. Kinetic of volatile fatty acid (VFA) production (B) through the incubation in each reactor (r1 and r2). Sterile wheat straw was inoculated with 500 termite guts from each species and incubated for 20 days..... 162

Figure VI-2 : Xylanase and CMCase enzymatic activities at final the end of the incubation for the termite gut inocula from *Nasutitermes ephratae*, *N. lujae*, *Microcerotermes parvus*, and *Termes hospes*. Supernatants represent extracellular enzymatic activities whereas pellets

correspond to cell-bound activities. Errors bars are standard deviations between technical replicates..... 163

Figure VI-3 : Diversity of the termite-derived microbiome. Phylum level classification of the 16S rRNA genes in the studied termite gut species and in the two replicated reactors inoculated with such guts at the end of the incubation. The category “Others” contains the low abundance phyla Acidobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria, Chlorobi, and Deferribacteres. 165

Figure VI-4 : Weighted-Unifrac diversity distances between the initial termite gut communities from *Nasutitermes ephratae* (NE), *N. lujae* (NL), *Microcerotermes parvus* (MP), and *Termes hospes* (TH). 166

Figure VI-5 : PCoA plot of weighted-Unifrac distances of guts and bioreactor communities issued from *Nasutitermes ephratae* (NE), *N. lujae* (NL), *Microcerotermes parvus* (MP), and *Termes hospes* (TH). Shapes correspond to different samples from guts and bioreactors. Small dots are colored according to their phylum, and correspond to the projection of OTUs in the samples-space, so distance between samples reflects their specificity. 168

Figure VI-6: Characterization of the first cycle of enrichment (C1) of TM on SS and NSS. a) VS degradation, b) VFA production, c) xylanase and d) CMCase activities..... 188

Figure VI-7: Effect of substrate sterility on wheat straw degradation (VS) and carboxylate production (VFA) during the enrichment process of termite derived-microbiome. SS and NSS indicate sterile and non-sterile substrate, respectively. 189

Figure VI-8: Comparing lignocellulose degradation and metabolites production by TWS and C1 SS. a) VS degradation and b) VFA and CO₂ production. 192

Figure VI-9: Comparison of TWS and C1 SS activity on cellulose and hemicellulose fractions of wheat straw. a) cellulose and b) hemicellulose degradation; c) cellulose and..... 193

Chapitre VII

Figure VII-1: Overview of taxonomic and functional structure of RWS and TWS along wheat straw degradation. Sample clustering considering expressed proteins (a). 16S rDNA and proteins affiliation at the phylum level (b). Dynamic COG profiles of proteins expressed by RWS and TWS (c)..... 214

Figure VII-2: Dynamic RWS and TWS COG profiles expressed by phylum. Raw abundances (a) and taxon-specific abundances at the phylum level (b). 216

Figure VII-3: Cazymes abundance (class level) in RWS and TWS along wheat straw degradation 217

Figure VII-4: RWS and TWS cazome profile along wheat straw degradation. Abundance of GH (a) and others Cazy families (b). PCA based on abundance of GH (c) and others Cazy families (d).	227
Figure VII-5: Dynamic RWS and TWS Cazome profiles expressed by phylum. Raw abundances (a) and specific abundances at the phylum level (b).....	231

Chapitre X

Figure A1-1 : Structure chimique du sel de sodium carboxyméthylcellulose (CMC-Na).....	291
Figure A1-2 : pNP-xylopyranoside, groupement Azo et MuF-glucopyranoside (de gauche à droite)	292
Figure A2-1 : Système de prélèvement mis en œuvre.....	303
Figure A3-1 : Test de saccharification de la paille de blé brute (2mm) par 4 cocktails enzymatiques.....	304
Figure A3-2 : Caractérisation des prétraitements enzymatiques (a) holocelluloses RCell (b) holocelluloses RXyn (c et d) activités enzymatiques xylanase et CMCCase (e) sucres réducteurs libérés et (f) LOI.....	306
Figure A3-3 : Dynamique de dégradation a) holocellulose, b) cellulose, et c) hémicellulose au cours des 15 jours d'incubation des substrats prétraités enzymatiquement et non-prétraité avec RWS	311
Figure A3-4 : Dynamique de production en a) AGV et b) CO ₂ au cours des 15 jours d'incubation des substrats prétraités enzymatiquement et non-prétraité avec RWS.....	314
Figure A3-5 : Mesure des activités enzymatiques (a) xylanase, (b) CMCCase, à 35°C, pH 6, après ajout de l'inoculum dans les réacteurs RCell (bleu), RXyn (orange), et sans prétraitement (vert)	317

Liste des tables

Chapitre II

Table II-1: Principales assignations de pics en FTIR, adapté de Monlau et al. (2012).....	12
Table II-2: Composition biochimique de la paille de blé adapté de Lee et al. (2007)	15
Table II-3: Avantages et inconvénients des principaux prétraitements appliqués à la biomasse lignocellulosique – adapté de Menon et Rao (2012) et Kuna et al. (2017).....	22
Table II-4: Effet des prétraitements sur les attributs physicochimiques et la biodégradabilité de substrats lignocellulosiques (1/2)	30
Table II-5: Effet des prétraitements sur les attributs physicochimiques et la biodégradabilité de substrats lignocellulosiques (2/2)	31
Table II-6: Principaux microorganismes cellulolytiques isolés dans des écosystèmes naturels , Himmel et al. (2010)	42
Table II-7 : Utilisation de communautés microbiennes dérivées d'écosystèmes naturels pour la dégradation de biomasse lignocellulosique (1/2)	46
Table II-8 : Utilisation de communautés microbiennes dérivées d'écosystèmes naturels pour la dégradation de biomasse lignocellulosique (2/2)	47
Table II-9 : Principales familles de GH dirigées contre les parois cellulaires des végétaux et retrouvées dans des écosystèmes lignocellulolytiques	69

Chapitre III

Table III-1 : Conditions de prétraitement physico-chimique du substrat lignocellulosique	74
Table III-2 : Prétraitements enzymatiques et conditions.....	75
Table III-3 : Poids relatifs des espèces de termites étudiées.....	77
Table III-4 : Composition du milieu de culture.....	79

Chapitre IV

Table IV-1: Primers and conditions for PCR amplifications	104
Table IV-2: Observed richness (ACE and Chao) and diversity index (Simpson and Shannon) along the enrichment process.	106

Chapitre V

Table V-1: Size and energy consumption of the four types of wheat straw pretreatment.	137
Table V-2: Product concentrations and yields after a 15-day fermentation of the pretreated wheat straw substrates by a RWS microbial consortium.	143

Chapitre VI

Table VI-1: Microbial biomass concentration estimated as 16S rRNA gene copies measured at the beginning and at the end of the incubation.....	161
Table VI-2 : Alpha-diversity indexes of gut inocula and final reactor communities.....	164
Table VI-3 : Relative abundance (%) of the main phyla present in termite gut microbiomes and in the final bioreactor communities (colored lines).....	167

Chapitre VII

Table VII-1: RWS and TWS sample characteristics.....	204
Table VII-2: Diversity of species (OTUs) and proteins detected in RWS and TWS samples.....	210
Table VII-3: Main function associated to Cazyyme families presenting high number of proteins and their respective abundance in RWS and TWS.....	220
Table VII-4 (1/2) : Occurrence of plant cell wall degrading GH enzymes identified in several metagenomics, metatranscriptomics an metaproteomics studies	223

Chapitre VIII

Table VIII-1 : Composition bactérienne de consortia enrichis sur substrat lignocellulosique	247
---	-----

Chapitre X

Table A1-1: : Substrats adaptés au dosage des activités cellulases, Percival Zhang et al. (2006)	297
Table A1-2: Techniques de fractionnement et dosages d'activités enzymatiques en milieu solide-liquide (1/5).....	297
Table A1-3: Techniques de fractionnement et dosages d'activités enzymatiques en milieu solide-liquide (2/5).....	298
Table A1-4: Techniques de fractionnement et dosages d'activités enzymatiques en milieu solide-liquide (3/5).....	299
Table A1-5: Techniques de fractionnement et dosages d'activités enzymatiques en milieu solide-liquide (4/5).....	300
Table A1-6: Techniques de fractionnement et dosages d'activités enzymatiques en milieu solide-liquide (5/5).....	300
Table A3-1 : Production, composition et rendement théorique et expérimentaux en AGV (C2-C5) après 15 jours d'incubation des substrats prétraités enzymatiquement et non prétraité avec RWS.....	315

Chapitre I : **Introduction**

I.1. Contexte

La biomasse lignocellulosique, constituant essentiel des plantes, est le biopolymère le plus abondant sur Terre. La valorisation de la biomasse lignocellulosique constitue un des enjeux du 21ème siècle pour pallier à l'utilisation des ressources pétrolières que ce soit pour la production d'énergie, type carburants, ou de composés pétrochimiques, type plastiques.

Après s'être intéressée à la production de biocarburants à partir des sources de carbone rentrant en concurrence avec la consommation alimentaire, la recherche scientifique s'est tournée vers la transformation des résidus organiques. Ainsi, de nombreuses études se sont penchées sur la production d'éthanol, de dihydrogène et de méthane à partir de biomasse lignocellulosique issue de déchets agricoles.

Le caractère récalcitrant de la biomasse lignocellulosique rend son hydrolyse biologique lente et difficile. Des prétraitements physicochimiques sont alors communément employés pour altérer la structure de la lignocellulose et ainsi accélérer et favoriser son hydrolyse biologique. D'autre part, des traitements enzymatiques (essentiellement d'origine fongique) peuvent aussi être mis en œuvre, catalysant le processus biologique d'hydrolyse et ainsi facilitant les réactions de production de molécules d'intérêt (éthanol, méthane, carboxylates...).

Parallèlement, dans les écosystèmes environnementaux (e.g. sols, rumen bovin, intestin du termite), la dégradation de la lignocellulose est notamment réalisée par des flores microbiennes performantes, dont tous les mécanismes d'action et de structuration ne sont pas encore bien compris. Ces flores microbiennes présentent l'avantage d'exprimer une importante diversité génétique, métabolique et enzymatique. D'autre part, la culture contrôlée de telles populations microbiennes ne nécessite *a priori* ni stérilisation, ni d'oxygénation, ce qui permettrait de réduire considérablement les coûts de mise en œuvre.

Dans ce contexte, ce projet s'est proposé d'étudier la dégradation de la lignocellulose par des populations microbiennes complexes dérivées d'écosystèmes naturels en conditions d'anaérobiose contrôlées. Les écosystèmes testés ont été le rumen bovin et la flore microbienne de l'intestin de termite ; le substrat modèle d'étude étant la paille de blé.

I.2. Objectifs de recherche et organisation du manuscrit

Les objectifs étaient ici multiples. Le premier enjeu était d'obtenir des communautés microbiennes simplifiées stables et enrichies en certaines fonctions spécifiques ; ici celles de dégradation et transformation de la paille de blé en carboxylates, puis de caractériser leur

capacité d'hydrolyse de la lignocellulose tant au niveau macroscopique qu'enzymatique. Des approches de métagénomique ciblée basées sur le séquençage des gènes et transcrits des ARNr 16S (thèse de Lucas Auer) et métaprotéomique (cette thèse) ont aussi été menées pour corrélérer la présence et l'expression de groupes taxonomiques et fonctionnels avec les données macroscopiques.

Au-delà des problématiques de compréhension de structuration microbienne, aux niveaux taxonomique comme fonctionnel, il semblait important que les choix de mise en œuvre prennent en compte des problématiques d'applicabilité industrielle et de rendements.

Pour cela nous avons d'une part, étudié l'impact de l'inoculum sur les différents aspects cités précédemment, mais aussi sur les rendements et productivités d'acides organiques. D'autre part, différents prétraitements ont été appliqués sur la biomasse lignocellulosique de manière à étudier leurs effets sur la structure du substrat et sur les rendements d'hydrolyse. Les prétraitements étudiés ont été mis en œuvre dans des conditions douces, visant à réduire le coût économique et l'impact environnemental de l'étape de prétraitement.

Dans ce cadre, ce mémoire se propose, dans le Chapitre II, d'effectuer un état de l'art reprenant les caractéristiques de la biomasse lignocellulosique ainsi que les procédés actuels de valorisation des lignocelluloses. Pour la valorisation de cette biomasse, l'intérêt de l'utilisation de consortia microbiens ainsi que les enzymes impliquées sont détaillés. Puis, afin de mieux comprendre le fonctionnement des écosystèmes microbiens hydrolytiques, l'apport des techniques récentes de méta-omics est aussi exposé.

Le chapitre suivant (Chapitre III) est consacré aux matériels et méthodes mis en œuvre pour répondre aux problématiques soulevées.

La partie consacrée aux résultats s'organise ensuite en 4 chapitres évaluant le potentiel biologique lignocellulolytique acidogène des inocula (i) rumen et (iii) termite, (ii) l'impact de prétraitements innovants sur le potentiel acidogène de l'inoculum rumen, ainsi que (iv) l'apport de la métaprotéomique à la compréhension de la structuration dynamique taxonomique et fonctionnelle des communautés microbiennes dérivées du rumen bovin et de microbiote intestinal de termite. Dans chacun de ces chapitres, une attention particulière est donnée à la caractérisation dynamique des communautés microbiennes étudiées.

Le chapitre VIII propose une discussion générale qui intègre et analyse de manière critique l'ensemble des données issues de ces travaux.

Une conclusion générale, résumant les principaux apports de nos recherches, suivie des perspectives envisagées à cette étude, clôturent finalement ce manuscrit.

Chapitre II : **Etat de l'art**

II.1. Caractéristiques du substrat lignocellulosique

La lignocellulose peut être décrite comme un assemblage de trois polymères constitutifs, que sont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. On se propose ici de décrire, dans un premier temps chacun de ces polymères, avec un intérêt particulier pour la cellulose. En effet, cette dernière constitue la part la plus importante de la lignocellulose (en masse), elle a été très largement étudiée et son hydrolyse conduit à un des substrats "des plus universels" qu'est le glucose ce qui en fait une molécule pivot pour la bioraffinerie des lignocelluloses.

II.1.1. Cellulose

La cellulose est un homopolymère linéaire de glucose lié en β -1,4 (Figure II-1) dont le motif répété, aussi appelé anhydrocellobiose, peut s'écrire (Glc-1,4-Glc). Ce polymère peut notamment être caractérisé par son degré de polymérisation, ce qui correspond au nombre moyen d'unités monomériques enchainées pour former une chaîne polymérique. Il peut être considéré équivalent à la longueur moyenne des chaînes du polymère, qui est compris entre 100 et 25000 selon les auteurs (Malherbe et Cloete, 2002; Percival Zhang et al., 2006).

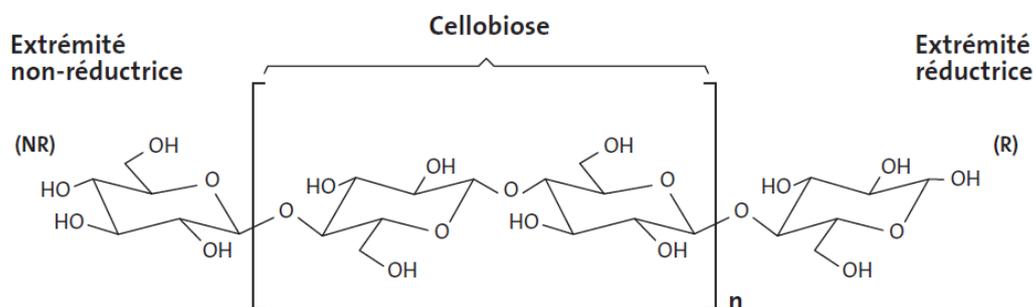


Figure II-1 : Représentation schématique de la structure chimique de la cellulose

De par la liaison β -1,4 le carbone anomérique C_1 est en conformation chaise et les groupements hydroxyles, comme la liaison osidique, sont en position équatoriale par rapport au plan du cycle. Lorsque le carbone anomérique n'est pas engagé dans une liaison glucosidique, ce dernier constitue l'extrémité réductrice de la molécule, car un équilibre s'établit entre les forme hémiacétale et aldéhyde réductrice (Mazza, 2009). *A contrario*, l'extrémité dont le carbone 1 est engagé dans la liaison β -1,4 est dite non-réductrice.

La particularité de la molécule de cellulose est qu’elle forme des structures microcristallines qui lui confèrent son caractère difficilement biodégradable et très peu soluble en solution aqueuse. En effet, les différentes chaînes linéaires de glucose s’assemblent en suivant un alignement (parallèle ou antiparallèle) et sont stabilisées entre elles par la formation de liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires (Figure II-2), conduisant à la formation de feuillets ou fibres, eux-mêmes stabilisés par des forces de van der Waal’s (Percival Zhang et al., 2006).

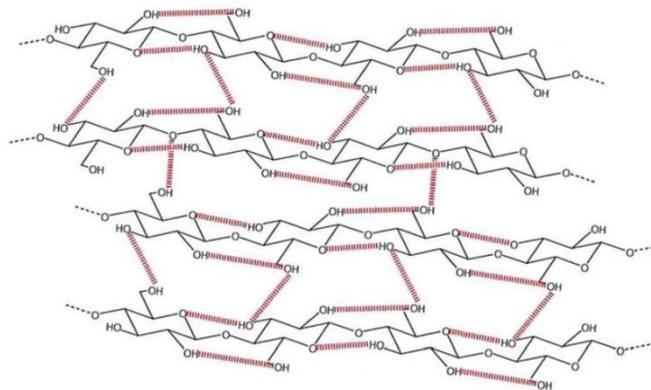


Figure II-2 : Liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires de la cellulose, Desvaux (2001)

Les liaisons covalentes de type hydrogènes intramoléculaires conduisent à la formation de protofibres de cellulose constituées d’environ 30 molécules de cellulose (Lynd et al., 2002). Plusieurs protofibres s’associent entre elles pour former des microfibrilles puis des fibres.

Cela étant, il n’existe pas une cellulose mais plusieurs types de structures cellulosiques qu’il convient de distinguer. Plusieurs paramètres caractéristiques permettent d’appréhender le caractère structural des polymères, tels que le degré de cristallinité, la fraction d’extrémités réductrices (F_{RE}) ou encore la fraction de liaisons β -glucosidiques accessibles (F_a) (Percival Zhang et al., 2006).

Il advient aussi de noter que la cellulose n’est pas nécessairement homogène du point de vue structural et qu’elle présente le plus souvent plusieurs zones de structure différente.

Les régions amorphes de la cellulose se caractérisent par un assemblage non aligné, non ordonné et aléatoire des chaînes polymériques. Elles sont d’une grande importance en ce qui concerne les potentialités de dégradation de la cellulose, car elles sont beaucoup plus accessibles pour les enzymes cellulolytiques. De tels polymères, alternant régions cristallines et amorphes sont qualifiés de celluloses paracristallines et sont caractérisés par leur degré de cristallinité (par spectroscopie infrarouge, par exemple).

Les techniques analytiques, telles que la cristallographie par rayon X et la spectroscopie infrarouge ont permis d’explorer les structures cristallines de la cellulose et de définir plusieurs organisations cristallines polymorphes.

La cellulose I est la forme naturelle et métastable de la cellulose. Encore appelée cellulose native, elle se caractérise par un arrangement parallèle des chaînes glucidiques.

La cellulose II est très peu synthétisée de manière naturelle et peut être obtenue par des traitements chimiques de la cellulose I, tels que la mercerisation (traitement à la soude à forte concentration) ou la régénération (avec des liquides ioniques, par exemple). L’arrangement des chaînes est alors antiparallèle. La transformation de cellulose I en cellulose II est une réaction irréversible, qui nécessite une étape de dissolution de la cellulose, un lavage et une recristallisation (Perez et Mazeau, 2004). Il en résulte une stabilité importante de la cellulose de type II. Dans le cadre des prétraitements chimiques de la lignocellulose ayant pour but de faciliter son hydrolyse, il convient donc de veiller à ne pas se rapprocher des conditions de mercerisation de la cellulose.

En 1984, Atalla et Vanderhart, ont mis en évidence la coexistence de deux types de celluloses suballomorphes constituant la cellulose I. La résonnance magnétique nucléaire du ^{13}C a permis de distinguer les celluloses I_α et I_β . La cellulose I_α présente une chaîne unique de maille triclinique, et est principalement produite par des bactéries et des algues. La cellulose I_β se retrouve chez les végétaux et se caractérise par une structure de deux chaînes parallèles de maille monoclinique (Perez et Mazeau, 2004).

Les formes de cellulose III et IV se décomposent en celluloses III_I , III_II , IV_I et IV_II selon qu’elles soient issues de cellulose I ou II. Elles ne sont donc pas natives et sont obtenues par des traitements thermochimiques à l’ammoniac (cellulose III) ou au glycérol (cellulose IV) (Perez et Mazeau 2004).

II.1.2. Hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des hétéropolymères d’hexoses, de pentoses et d’acide glucuronique. Différents sucres peuvent être présents dans ces polymères, tels que le xylose, le glucose, le mannose, le galactose et l’arabinose.

La composition en différents sucres diffère d’une lignocellulose à l’autre, mais de manière générale le xylane est le constituant majoritaire de l’hémicellulose – au sens large- des plantes annuelles (Lee et al., 2007). Le xylane, polymère de xylose lié en β -1,4 (Figure II-3) est alors le motif répété du polymère avec un degré de polymérisation allant de 100 à 200 (Malherbe et Cloete, 2002).

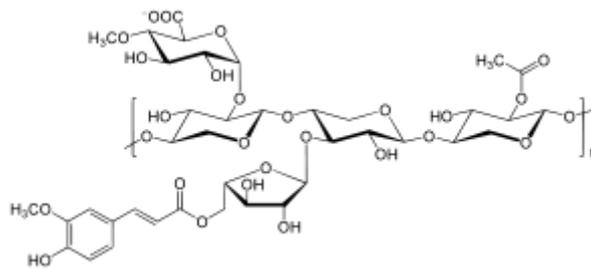


Figure II-3 : Structure chimique du xylane

De par sa structure plus hétérogène, l'hémicellulose -au sens large- va pouvoir être plus facilement solvatée par de petites molécules que la cellulose et sera donc plus facilement soluble. La diversité des sucres composant celle-ci va cependant impliquer une plus importante diversité enzymatique pour sa dégradation complète.

II.1.3. Lignine

La particularité de la lignine est qu'elle constitue un polymère aromatique ne présentant pas de réel motif répété. On retrouve trois sous unités phénylpropanoïdes caractéristiques (ou "monomères") toutes dérivées de la phénylalanine. L'alcool paracoumarylique ou sous unité H (hydroxyphényle), l'alcool coniférylique ou sous unité G (guaiacyle) et l'alcool sinapylique ou sous unité S (syringyle) sont les trois monolignols les plus représentés. Leur proportion dans la biomasse lignocellulosique varie selon l'espèce, l'âge des tissus végétaux et selon l'environnement. D'autres unités moins importantes ont été retrouvées dans de nombreuses espèces végétales. Il n'existe donc pas en propre une lignine mais des lignines (Wertz, 2010).

Ce qu'il semble important de noter est que, par sa structure aléatoire et l'absence de motif répété, la lignine constitue un polymère particulièrement résistant à la dégradation biotique et abiotique.

II.1.4. Structure tertiaire de la lignocellulose

La structure tertiaire de la lignocellulose est déterminée par la composition de chaque polymère et leurs interactions respectives, via l'établissement de liaisons covalentes, ou non. La complexité des macromolécules impliquées rend cette structure difficile à appréhender et à résoudre. De plus, d'autres polymères biologiques, tels que des pectines ou des protéines sont aussi retrouvés dans les biomasses lignocellulosiques et viennent augmenter le niveau de complexité structurelle.

On peut tout de même retenir quelques grands principes : Comme nous l'avons vu, les microfibrilles de celluloses sont stabilisées par des liaisons intra et intermoléculaires, qui sont résistantes à l'hydrolyse. De plus, elles sont entourées par des polymères d'hémicellulose dans le cadre de liaisons covalentes ou hydrogènes. Ensuite, les polymères phénoliques (lignines) sont liés aux hémicelluloses par des liaisons fortes, de type esters (Malherbe et Cloete, 2002). Les hémicelluloses semblent être protégées de l'hydrolyse par leur lien avec la lignine (Figure II-4). Comme ces dernières constituent le principal lien entre lignine et cellulose, la résistance de la cellulose se trouve renforcée dans cette structure, ce qui explique la résistance des parois des cellules végétales (Himmel et al., 2010).

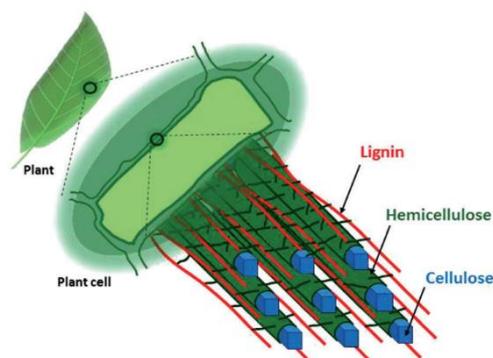


Figure II-4 : Représentation schématique de la structure tertiaire de la lignocellulose, Chatel et al. (2014)

De la complexité de structure et de composition de la biomasse lignocellulosique au sens large résulte le fait qu'il n'existe pas en propre une lignocellulose mais des lignocelluloses qu'il convient de caractériser.

II.1.5. Caractérisation de la lignocellulose

Plusieurs échelles de caractérisation de la lignocellulose peuvent être mises en œuvre. Les techniques physiques vont permettre d’appréhender la structure des polymères alors que les fractionnements biochimiques renseignent sur la composition de la biomasse. Ces méthodes de caractérisation sont nécessaires pour différencier les différents substrats lignocellulosiques et permettent d’orienter les voies de valorisation à envisager. En effet, de nombreuses études se sont intéressées à mettre en relation les propriétés structurelles et/ou la composition de biomasse lignocellulosique avec des tests de biodégradabilité ou de conversion en produits d’intérêt.

II.1.5.1. Composition biochimique

De nombreux protocoles ont été développés pour déterminer la composition biochimique de la biomasse lignocellulosique. La méthode la plus courante et qui offre *a priori* le meilleur compromis entre récupération des différentes fractions et temps de mise en œuvre est la méthode aux détergents neutre et acide de Van Soest (Godin, 2011; Van Soest et Wine, 1967). Elle consiste en une succession d’extractions par voie chimique suivies d’une quantification des fibres insolubles après filtration et séchage.

L’action d’un détergent neutre (Na_2PO_4 , B_4Na , 2-éthoxyéthanol, EDTA, lauryl sulfate et sulfite de sodium) pendant 1h à 100°C permet d’extraire les sucres non structuraux (solubles), les pectines, les tannins solubles à pH neutre, les lipides, les protéines solubles au détergent neutre et certaines cendres. Le rétentat après filtration constitue la fraction Neutral Detergent Fiber (NDF) et contient la cellulose, les hémicelluloses, la lignine, les tanins et protéines insolubles au détergent neutre, ainsi que certaines cendres.

Les hémicelluloses, les tanins et les protéines solubles en milieu acide sont extraits par une solution de tryméthylcétyl-ammonium et d’ H_2SO_4 - 1 N pendant 1h à 100°C. Après filtration, les fibres insolubles au détergent acide (ADF) se composent de cellulose et de lignine, tanins et protéines insolubles en milieu acide, ainsi que de certaines cendres.

La différence entre NDF et ADF (corrigée par la teneur en cendres et en protéines) correspond à la quantité d’hémicelluloses (ainsi que de lignine et tanins solubles en milieu acide).

Enfin, la fraction ADF est traitée à l’ H_2SO_4 72% pendant 3h à 20°C. Après filtration, la perte de masse de la fraction ADF représente la cellulose. Toutes les valeurs doivent être corrigées par la fraction de protéines et celle de cendres.

Cette méthode ne s'applique qu'à des échantillons dont les teneurs respectives en amidon, lipides et protéines sont inférieures à respectivement 10, 10 et 30%.

Cependant, Jung et al. (1999) ont pu montrer que la détermination de la lignine de Klason (insoluble à l'acide sulfurique) était plus fiable que celle de Van Soest. Ainsi Monlau et al. (2012) reprennent le protocole d'Effland (1977), lui-même dérivé du protocole d'hydrolyse à l'acide sulfurique de Seaman et al. (1954), et qui intègre cette notion de lignine de Klason regroupant toutes les molécules non extractibles à l'acide sulfurique. Ce dernier consiste à effectuer deux hydrolyses acides successives de la biomasse, puis à filtrer l'hydrolysate pour récupérer les sucres non hydrolysables et la lignine (additionnée de tout ce qui n'a pas été extrait à l'acide). Après séchage et calcination à 550°C, la lignine de Klason est déterminée par pesée du rétentat et les fractions cellulosique et hémicellulosique par dosage (HPLC par exemple) des monomères libérés. La première étape d'hydrolyse est faite à température ambiante (30°C) et forte concentration d'acide sulfurique (12 M), et permet de générer un relâchement des polymères structuraux. Cette étape est aussi appelée phase de pré-solubilisation. Puis, l'acide est dilué à 2 M et l'hydrolyse des polymères a lieu à 100°C pendant trois heures, constituant la phase de solubilisation.

Plus récemment, de Souza et al. (2013) ont optimisé l'hydrolyse de Seaman selon les paramètres de durée et de température de la phase de pré-solubilisation, et de durée et de concentration en acide sulfurique de la phase de solubilisation. En effet, toute la problématique de l'hydrolyse de Seaman est d'appliquer des conditions suffisamment sévères pour hydrolyser les polymères structuraux tout en limitant la minéralisation des monomères en dioxyde de carbone. Leurs travaux ont montré qu'à partir de 40 mg de matériel lignocellulosique, l'optimum consistait en une pré-solubilisation d'une heure à 30°C et 72% d'H₂SO₄ (m/m), suivie d'une solubilisation d'une heure trente à 100°C et 10% d'H₂SO₄.

Hormis la composition biochimique, les propriétés structurelles d'un substrat lignocellulosique peuvent se révéler nécessaires pour appréhender son hydrolyse.

II.1.5.2. Caractérisation structurale

La principale propriété déterminée par méthode dite physique est le degré de cristallinité de la cellulose (CrI), qui correspond à la part de cellulose cristalline rapportée à la cellulose totale. La biomasse est analysée sous forme solide, broyée ou à l’état de poudre. Plusieurs techniques basées sur des transitions d’énergie et des états quantiques différents (Figure II-5), telles que la diffraction aux rayons X, la RMN ¹³C et la spectroscopie infrarouge sont utilisées mais ne donnent pas les mêmes informations pour un même substrat (Chauve, 2011).

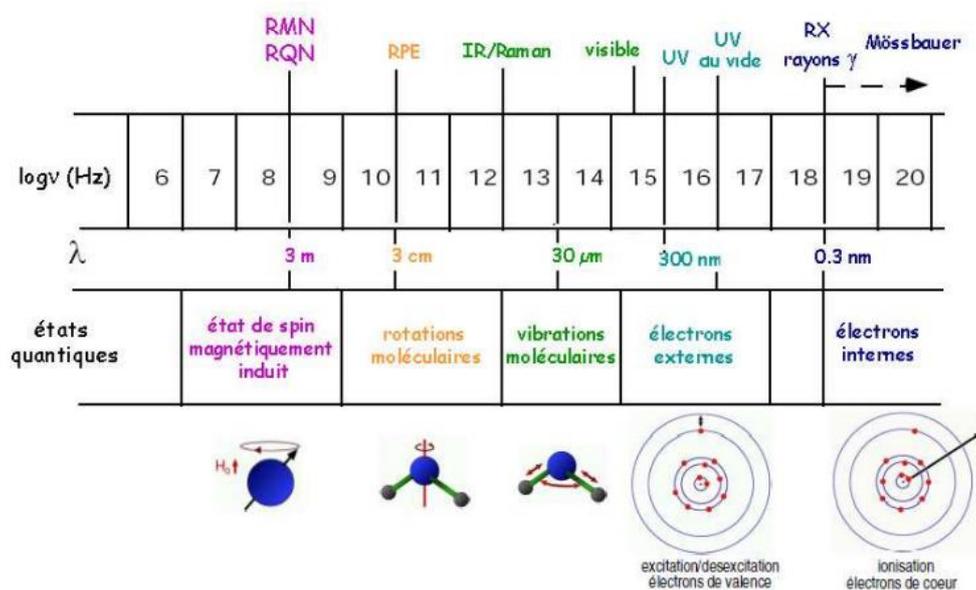


Figure II-5 : Différentes techniques de spectroscopie et états quantiques associés

La diffraction aux rayons X est une technique de cristallographie répandue pour distinguer des formes cristallines de composés de même formule brute. Elle consiste à imposer au composé un rayonnement électromagnétique à haute fréquence, constitué de photons. Cette onde perturbe le nuage électronique des atomes du composé et en retour cela provoque une réémission électromagnétique de même fréquence. Cette technique peut être utilisée à grand angle pour étudier les structures supramoléculaires (Thiebaud, 1995). Le degré de cristallinité est calculé en fonction des intensités de pic pour des angles $\Theta = 11^\circ$ (fraction cristalline) et $\Theta = 9^\circ$ (fraction amorphe) (Terinte et al., 2011).

La RMN ^{13}C sur milieu solide est aussi basée sur un phénomène électromagnétique de relaxation d’énergie par les noyaux atomiques de spin non nul. La technique à angle magique (Magic Angle Spinning, MAS) développée dans les années 60 a permis l’étude des solides en RMN. La Figure II-6 illustre l’existence des pics caractéristiques des zones cristallines et amorphes de la cellulose. La RMN permet aussi d’identifier des changements chimiques des différents polymères de lignocellulose (Brouwer et Regnerus, 2010).

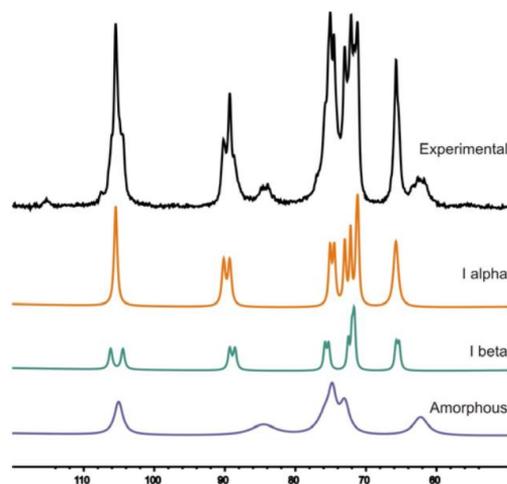


Figure II-6 : Spectre de la cellulose en MAS-RMN ^{13}C selon le déplacement chimique (en ppm), Brouwer and Regnerus, 2010

La spectroscopie infrarouge (IR) est aussi une technique basée sur un phénomène électromagnétique, mais c’est l’absorption du rayonnement infrarouge qui est analysée. Les molécules présentent des fréquences pour lesquelles elles se mettent à vibrer et c’est cette propriété qui est exploitée. Cette technique permet d’identifier des fonctions chimiques et elle présente donc un intérêt particulier dans le cas de la lignocellulose. En plus de permettre de calculer un degré de cristallinité, elle donne aussi accès, comme la RMN, aux modifications chimiques de la biomasse.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permet de balayer une plage de longueur d’onde via un interféromètre de Michelson, qui est un dispositif intégrant un miroir fixe et un miroir mobile. Deux techniques d’analyses se démarquent, la Réflexion Totale Atténuée (ATR) et la transmission. Pour la première, l’échantillon est analysé en surface et pour la seconde, il est traversé par le rayon incident. Pour analyser des changements structurels subit par une biomasse en cours de dégradation ou ayant subi un prétraitement, l’ATR semble donc recommandée.

L’IR est facile de mise en œuvre et la région du moyen infrarouge (comme celle du proche infrarouge) est adaptée à la caractérisation de la biomasse lignocellulosique. Selon les revues de Xu et al. (2013) et de Karimi et al. (2016), de nombreuses études ont établi des modèles visant à prédire la composition de substrats lignocellulosiques par spectroscopie proche infrarouge (ou NIRS - Near Infrared Spectroscopy). D’après Xu et al. (2013) et selon les études de Sills et Gosset (2012) et Gollapali et al. (2002), l’avantage du moyen infrarouge (devant le proche infrarouge) résiderait dans le fait que la technique (couplée à des modèles de régression multivariée) permettrait non seulement de prédire des informations structurelles et compositionnelles d’une biomasse lignocellulosique mais aussi son potentiel de digestibilité par des enzymes. D’autre part, Monlau et al. (2012) ont pu observer des variations cohérentes entre spectre FTIR, composition biochimique et biodégradabilité (évaluée par mesure du potentiel de méthane biologique) en étudiant 7 prétraitements effectués sur la même biomasse. La table II-1 représente les principales assignations des pics caractéristiques de la lignocellulose utilisés dans cette étude.

Table II-1: Principales assignations de pics en FTIR, adapté de Monlau et al. (2012)

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Fraction
1610	Holocellulose
1512	C=C Lignine aromatique
1430	C-H Cellulose cristalline
1375	Holocellulose
1160	C-O-C Holocellulose
898	C-H Cellulose amorphe

Ces mêmes auteurs déterminent le pourcentage de cellulose cristalline via le rapport de l’aire des pics 1430 cm⁻¹/898 cm⁻¹, qui est aussi appelé Lateral Order Index (LOI) et qui a été introduit par O’Connor et al. (1958). Comme la technique FTIR n’est que semi-quantitative, l’utilisation de ratios est primordiale. Le pourcentage de cellulose cristalline peut alors être calculé en impactant le LOI au pourcentage de cellulose, déterminé par voie biochimique.

Cette technique semble particulièrement adaptée à l’analyse de la structure de la lignocellulose, et, est présentée comme efficace pour déterminer les composants majeurs comme mineurs des fibres naturelles (Fan et al., 2012).

Cependant, Karimi et al. (2016) soulèvent de nombreuses questions quant à la reproductibilité des données, la dislocation des bandes parfois observée et l’impact de la variabilité des valeurs absolues obtenues sur la fiabilité des analyses de composition. Néanmoins ces mêmes auteurs n’excluent pas que cette méthode puisse donner de bons résultats en ce qui concerne la mesure relative et qualitative de cristallinité, ainsi que dans un but de comparaison de substrats (et non de détermination absolue de leur composition). En effet, la FTIR moyen infrarouge a été mise en place avec succès sur des matrices lignocellulosiques ayant subi différents prétraitements (Monlau et al., 2012 ; Adapa et al., 2011) et semble permettre d’analyser des changements compositionnels et structurels induits par des prétraitements impactant leur potentiel de valorisation.

Au-delà de l’imagerie, les techniques de mesure de l’accessibilité des enzymes et des microorganismes hydrolytiques aux fibres lignocellulosiques semblent particulièrement intéressantes pour caractériser des substrats ayant subi ou non un prétraitement. En effet, il est communément accepté que la surface accessible ou porosité (aux enzymes) constitue un des paramètres les plus importants, affectant la dégradabilité des substrats lignocellulosiques (Karimi et al., 2016 ; Rollin et al., 2010 ; Heiss-Blanquet et al., 2011).

Alors que la surface externe de particules lignocellulosiques peut être évaluée à partir de la distribution de taille et de forme de ces dernières, la surface interne dépend de la taille des pores et de leur distribution (Karimi et al., 2016). Plusieurs techniques ont été développées ou testées sur des matériaux lignocellulosiques pour évaluer l’aire de surface accessible (totale, c’est-à-dire externe et interne) avec différentes molécules (adsorption d’eau et de diazote, exclusion de soluté, porosimétrie au mercure, coloration de Simon, cryoporométrie) avec l’objectif de déterminer le diamètre de pores moyen de l’échantillon lignocellulosique (Karimi et al., 2016 ; Meng et al., 2013).

La mesure de rétention à l’eau, aussi appelée capacité de gonflement à l’eau est une des techniques les plus simples, rapides et peu onéreuses à mettre en œuvre et présente pourtant de bonnes corrélations avec le potentiel d’hydrolyse enzymatique (Chandra et al., 2009 ; Karimi et al., 2016). Alors que cette méthode de mesure est basée sur la rétention d’eau après centrifugation, des mesures de macroporosité peuvent aussi être effectuées en mesurant l’absorption d’eau à différentes pressions osmotiques. Ainsi, Robertson et Eastwood (1981) ont développé une méthode simple permettant d’explorer différents diamètres de pores en jouant sur la concentration de solutions de polyéthylène glycol (PEG).

La différence de rétention en eau (mesurée par pesée) à différentes pressions osmotiques permet d’estimer le volume de pores de taille connue (supérieurs à 1 μm , par exemple). Des études sur les fibres alimentaires ont pu montrer des corrélations entre cette mesure de macroporosité et la fermentabilité des fibres (Guillon et al., 1998 ; Robertson et al., 2000).

D’autres méthodes de caractérisation, telles que la saccharabilité par des enzymes ou le potentiel de production de méthane, peuvent constituer de bons indicateurs du potentiel de valorisation des substrats lignocellulosiques. Etant donné que ces méthodes induisent la production de molécules d’intérêts, elles seront détaillées dans la section relative à la valorisation de la lignocellulose.

II.1.6. Les sources de biomasse lignocellulosique

La foresterie et l’agriculture constituent les deux sources de carbone végétal renouvelable qui peuvent être distinguées (Chandra et al., 2012). La majorité de l’énergie produite actuellement à partir de biomasse est dérivée de bois et de déchets de bois (64%), principalement par leur combustion. Généralement la biomasse issue du bois, dite ligneuse, se compose majoritairement de cellulose et de lignine, alors que la biomasse dite agricole (culture et résidus de culture, herbe..) contient plus d’hémicellulose, d’extractibles et de cendres (Zhao et al., 2012). Bien que de nombreux travaux se soient intéressés à la valorisation de la biomasse ligneuse, notamment en utilisant des enzymes produites par des champignons lignolytiques (Lee et al., 2008; López et al., 2013) ou des prétraitements physico-chimiques (Kim et al., 2014; Wyman et al., 2009) en vue de la production d’éthanol, de méthane ou de carboxylates, la valorisation des cultures ligneuses, à faible contenu en eau, reste principalement effectuée par combustion pour son fort potentiel calorifique (Demirbaş, 2001). A *contrario*, les résidus agricoles présentent généralement une plus forte teneur en eau, ce qui réduit leur pouvoir calorifique et augmente leur potentiel de conversion biologique. De la même manière, de par leur composition, ces différentes sources de biomasse (forestière et agricole) ne présentent pas les mêmes vitesses globales de dégradation naturelle (Malherbe et Cloete, 2002). Les biomasses fortement lignifiées se dégradent naturellement très lentement alors que les biomasses agricoles sont plus « facilement » biodégradables.

Les quatre principales cultures agricoles cultivées dans le monde sont le maïs, le blé, le riz et la canne à sucre, représentant une production annuelle totale de plus de 5358 millions de tonnes de biomasse sèche (Chandra et al., 2012).

Parmi ces cultures, le riz est principalement cultivé en région asiatique et ses résidus sont donc plus facilement valorisables dans cette partie du monde. Le maïs est majoritairement produit aux Amériques (USA, Amérique du Sud), alors que la production de blé s’effectue dans de nombreuses régions du monde (Chine, Inde, Russie, USA, Australie et France) (Chandra et al., 2012). En Europe, la disponibilité de la paille de blé est estimée à 34 millions de tonnes de masse sèche d’extractibles pour sa valorisation en bioénergie ou biomolécules (Pajual and O’Donohue, 2013). D’autre part, en masse sèche, le ratio rafle (maïs) ou paille (blé) sur grain du maïs est de 1:1 alors que celui du blé est de 1,3-1,4:1 (Lee et al., 2007), ce qui fait du blé une culture agricole plus fortement génératrice de résidus que celle du maïs. La paille de blé semble ainsi être un substrat pertinent pour l’étude de sa valorisation en composés d’intérêt industriel par voie biologique.

Comme déjà évoqué, bien qu’il soit très complexe de décrire la structure précise d’une biomasse lignocellulosique, sa composition moyenne peut être déterminée. Ainsi, cette section décrit de manière plus détaillée la composition de substrat de cette étude, la paille de blé. La Table II-2 représente le fractionnement biochimique moyen de la paille de blé selon une dizaine d’études compilées par Lee et al. (2007).

Table II-2: Composition biochimique de la paille de blé adapté de Lee et al. (2007)

% masse sèche	Moyenne	Ecart-type
Cellulose	37,6	5,7
Glucane structurel*	32,1	4,5
Hémicellulose	28,8	5,7
Xylane	19,5	0,3
Arabinane	2,8	0,6
Galactane	1,1	0,5
Mannane	0,6	0,4
Lignine totale	14,5	6,2
Lignine soluble à l'acide	2,5	-
Lignine insoluble à l'acide	10,9	7,9
Acid detergent lignin (Van Soest)	9,2	1,6
Protéines	3,8	1,9
Cendres	6,4	3,4

* la différence entre la cellulose et le glucane structurel correspond au glucose soluble non structurel.

La fraction la plus importante de la paille de blé est la cellulose, suivie par l'hémicellulose. La somme de ces deux fractions, que nous appellerons holocellulose représente plus de $66\% \pm 11\%$ de la masse sèche de la paille de blé, ce qui en fait un substrat intéressant pour sa valorisation en molécules plateformes dérivées de cellulose et d'hémicellulose. Comme nous avons pu le mentionner précédemment, il n'existe pas en propre une lignocellulose mais une vaste diversité de biomasses lignocellulosiques différenciables par leur composition et leur structure physique et chimique. Aux vues de la variabilité de composition d'échantillons de paille de blé, présentée en Table II-2, il semble qu'il existe aussi une diversité de paille de blé, potentiellement expliquée par l'âge des plantes, leurs conditions et environnement de culture et de stockage. De ce fait une caractérisation plus complète des différentes pailles de blé ne semble que peu pertinente et non généralisable. Néanmoins, ces observations soulèvent que pour une étude scientifique, le recours à un substrat lignocellulosique spécifique (dédié et identique tout au long de l'étude) et sa caractérisation la plus complète possible apparaissent comme indispensables.

II.2. Valorisation de la biomasse lignocellulosique : vers le concept de bioraffinerie

La lignocellulose, constituant majoritaire des parois des végétaux, constitue une source de carbone renouvelable, intéressante à valoriser et qui continue d'attirer l'attention de nombreux travaux de recherche (Anwar et al., 2014 ; Kuna et al., 2017, Kim et Dale, 2004).

Les problématiques actuelles de respect de l'environnement et de palliation à la raréfaction du pétrole font des sources naturelles de carbone des substrats particulièrement attractifs, offrant des possibilités pérennes. En effet, la cellulose est la matière première la plus abondante sur Terre et sa biosynthèse d'origine végétale et marine représente $8,5 \times 10^{10}$ tonnes par années, ce qui équivaut à 4 fois la consommation d'énergie mondiale (Lo et al., 2009).

La valorisation des ressources lignocellulosiques ne rentre pas en concurrence directe avec l'alimentation humaine et offre des possibilités de production de plus de 200 molécules plateforme et produits chimiques à valeur ajoutée (Isikgor et Becer, 2015, Kobayashi et Fukuoka, 2013), tels que biocarburants, bio jet fuels, bioplastiques, biohydrogène, biogaz ou encore bio-intermédiaires et bio-composés pour l'industrie chimique (Figures II-7, II-8 et II-9).

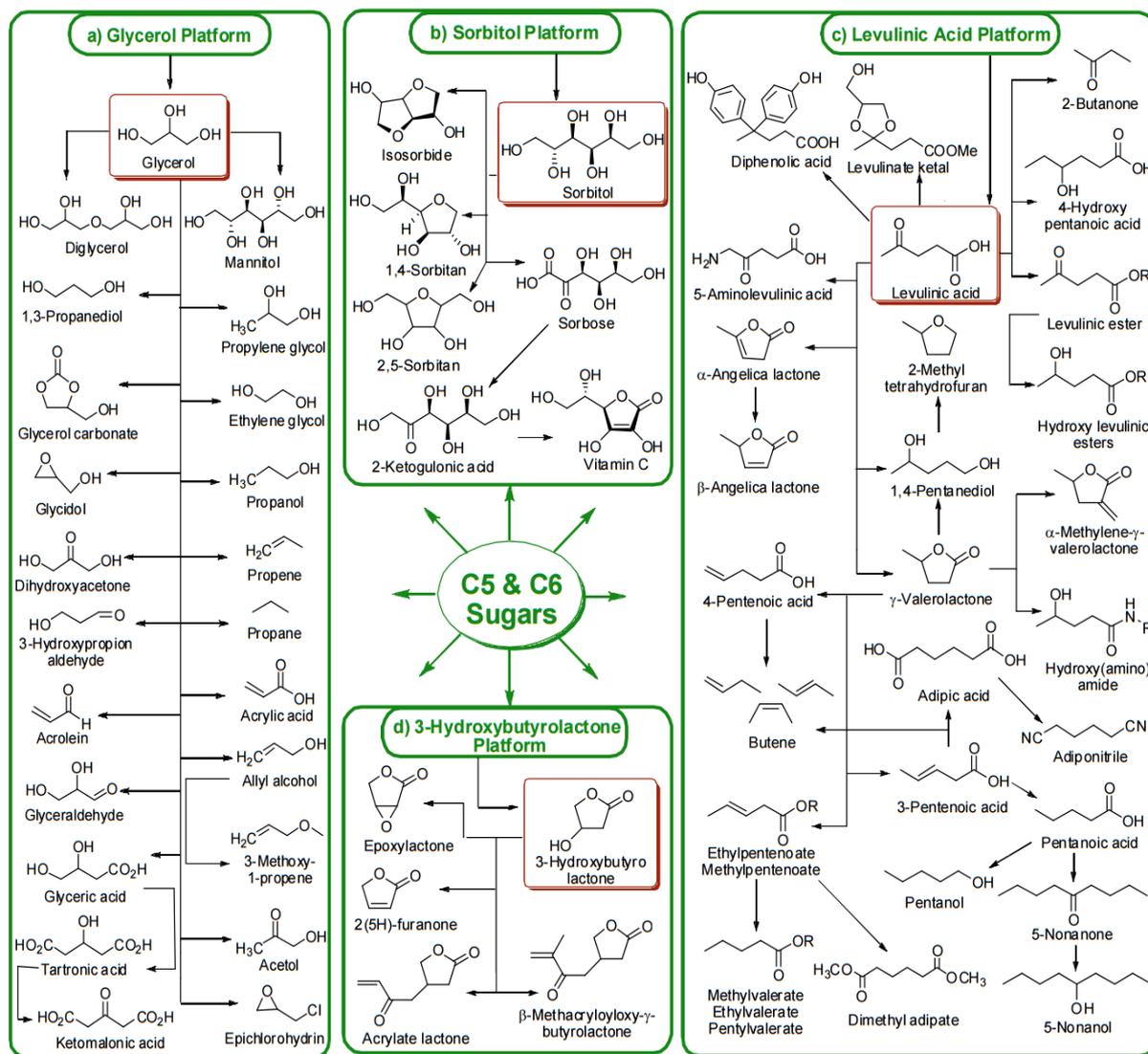


Figure II-7: Plateformes de molécules d'intérêt dérivées d'holocelluloses de biomasse lignocellulosique par transformations chimique ou biologique, Isikgor et Bercer (2015)

(1/3)

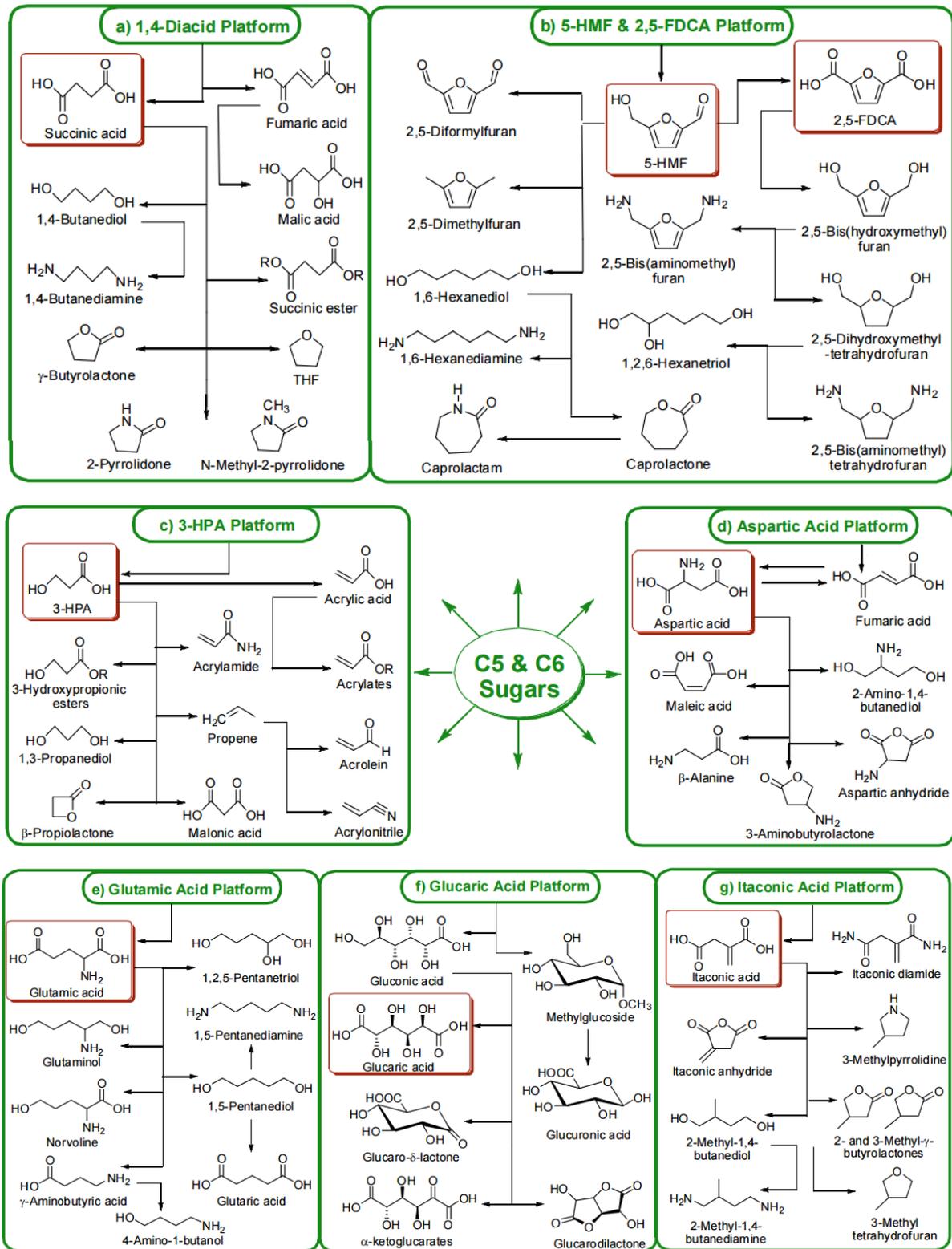


Figure II-8 : Plateformes de molécules d’intérêt dérivées d’holocelluloses de biomasse lignocellulosique par transformations chimique ou biologique, Isikgor et Bercer (2015)

(2/3)

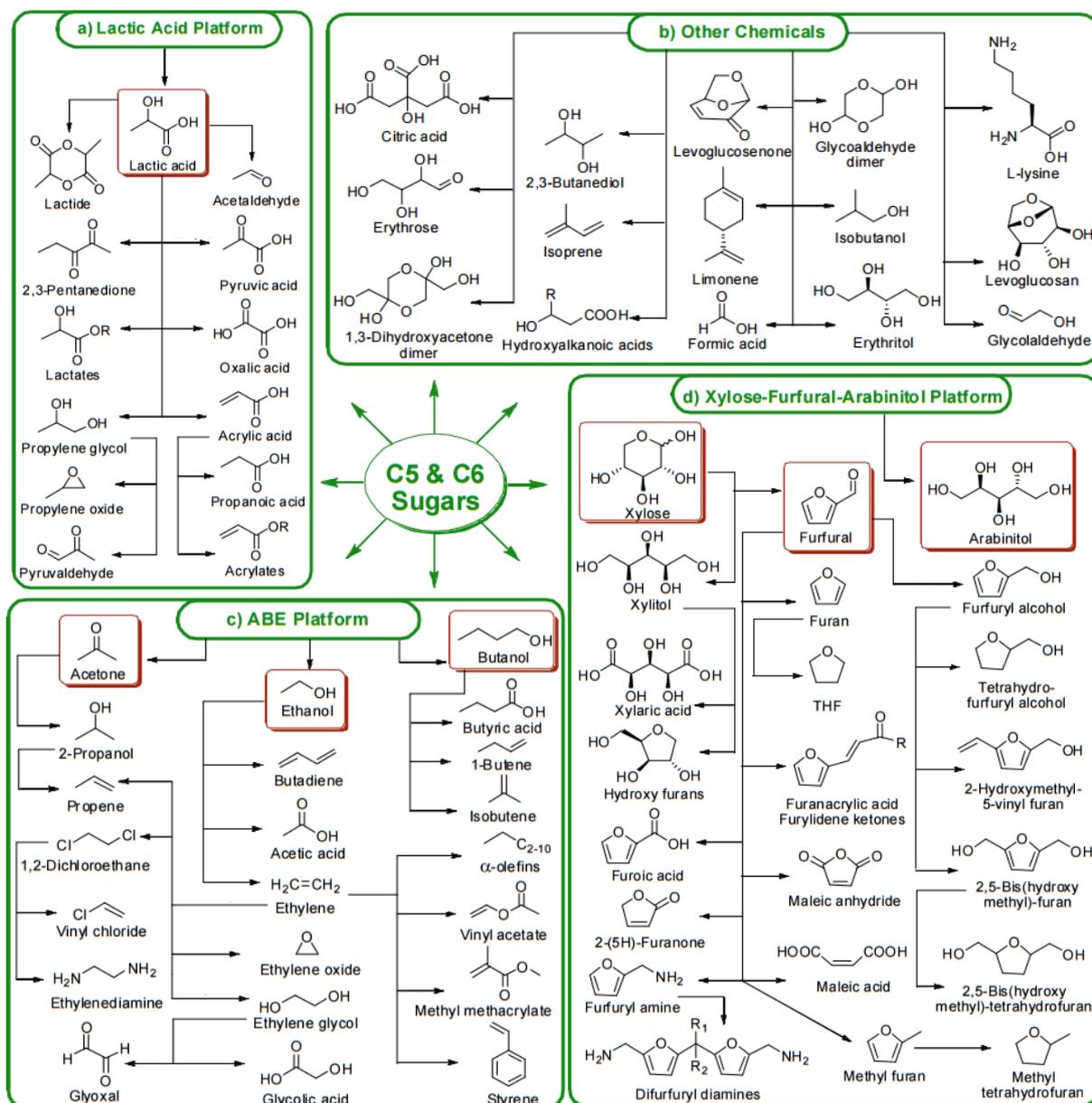


Figure II-9 : Plateformes de molécules d’intérêt dérivées d’holocelluloses de biomasse lignocellulosique par transformations chimique ou biologique, Isikgor et Bercer (2015) (3/3)

De par leur composition chimique, les matériaux lignocellulosiques présentent –en termes élémentaires- plus d’oxygène et moins d’hydrogène et de carbone que les ressources pétrolières. Ainsi, leur valorisation en carburants nécessite des (bio)transformations de déoxygénation alors qu’*a contrario*, pour la production d’autres composés chimiques, cette propriété offre souvent des particularités physiques ou chimiques intéressantes (Isikgor et Becer, 2015).

Indépendamment de la voie de valorisation envisagée (production de biocombustibles ou autres composés chimiques), un des points communs des procédés mettant en œuvre des ressources lignocellulosiques est le besoin absolu de favoriser l’hydrolyse du substrat, aussi appelée dépolymérisation. Comme nous l’avons vu précédemment, la biomasse lignocellulosique est un matériau composite formant une structure chimiquement et structurellement complexe. Cette matrice tridimensionnelle est particulièrement résistante aux attaques chimiques et biologiques (Mosier et al., 2005 ; Himmel et al., 2007 ; Chandra et al., 2012). Pour contrer cette récalcitrance, la plupart des procédés envisagés ont recours à une étape de prétraitement du substrat qui peut être chimique, physique, biologique ou combinée. Une attention particulière sera donnée aux technologies de prétraitement de la biomasse lignocellulosique, mais il est dès lors important de noter que le but de ces méthodes est de favoriser l’hydrolyse tout en limitant les coûts énergétiques et environnementaux.

Alors que l’hydrolyse de la cellulose conduit à la formation de glucose, celle de l’hémicellulose permet de produire un mélange de monosaccharides en C5 (xylose, arabinose) et en C6 (mannose, galactose, rhamnose, glucose). La production de ces sucres fermentescibles constitue ce qu’on appelle la plateforme des sucres et ils sont particulièrement intéressants en termes de valorisation car ils peuvent conduire à la production d’une large diversité de molécules, qui peuvent être regroupées en 15 plateformes de molécules (Figures II-7, II-8 et II-9). Cependant, cette voie de valorisation rencontre (elle aussi) le challenge de parvenir au meilleur rendement de libération de sucres au plus faible coût économique, énergétique et environnemental (Isikgor et Becer, 2015). D’autre part, un des objectifs clé de la plateforme des sucres est la séparation sélective des monosaccharides pour mieux contrôler la fermentation ou la (bio)transformation successive. Dans ce cadre, les approches de déconstruction du substrat ne consistent plus, à proprement parler, à prétraiter la biomasse lignocellulosique, mais plus précisément à mettre en œuvre des techniques spécifiques de l’hydrolyse de chaque fraction. On parle alors de fractionnement de la biomasse lignocellulosique (Wettstein et al., 2012, da Costa Soussa et al., 2009) et, dans ce contexte, les technologies actuelles ont recours à des solvants d’extraction sélectifs.

Pour aller plus loin, dans la partie suivante de l’état de l’art, nous allons détailler dans un premier temps les différents types de prétraitements qu’il est nécessaire d’envisager avant toute (bio)transformation en molécules d’intérêt. Dans un second temps, nous présenterons quelques-unes des molécules plateforme d’intérêt en progressant, de l’utilisation de souche pure à la mise en œuvre de consortia microbiens dérivés d’écosystèmes environnementaux.

II.2.1. Prétraitements appliqués à la lignocellulose

Comme nous l’avons vu, la résistance à l’hydrolyse biologique des biomasses lignocellulosiques est notamment imputable à leur structure complexe. C’est pourquoi de nombreuses recherches scientifiques ont porté, et portent encore, sur les prétraitements applicables à la biomasse lignocellulosique pour modifier cette structure et la rendre plus facilement biodégradable.

Pour la valorisation de biomasse lignocellulosique en molécules plateforme, l’objectif des prétraitements est de modifier les liaisons et la structure supramoléculaire de la matrice cellulose-hémicellulose-lignine notamment via la destruction du lien lignine-hémicellulose, la diminution de la cristallinité et du degré de polymérisation des polymères d’holocellulose et l’augmentation de l’accessibilité des enzymes hydrolytiques aux polymères structuraux. De manière globale, pour être efficace, un prétraitement doit satisfaire à quatre critères : (i) améliorer l’hydrolyse de la lignocellulose en sucres simples, (ii) limiter la dégradation des carbohydrates, (iii) éviter la formation de sous-produits inhibiteurs des attaques enzymatiques ou procédés de fermentations, et (iv) être économiquement avantageux (Anwar et al., 2014 ; Chandra et al., 2012).

Comme présenté dans la table II-3, de nombreux prétraitements sont référencés et peuvent être combinés pour maximiser leur efficacité. Ces prétraitements peuvent être classifiés selon leur caractère : physique, thermique, chimique et biologique (Hendricks et Zeeman, 2009 ; da Costa Soussa et al., 2009). De plus, à ces derniers viennent s’ajouter les plus récentes techniques de fractionnement aux solvants, qui peuvent être regroupées avec les prétraitement chimiques (Kuna et al., 2017).

Malgré la large diversité de prétraitements existants, aucun d’entre eux ne peut être déclaré comme meilleur que les autres, car chacun présente des avantages et des inconvénients (Table II-3). Le choix d’un prétraitement dépend essentiellement de l’objectif à atteindre dans le cadre du procédé global de valorisation envisagé ainsi que de son impact économique et environnemental (Menon et Rao, 2012).

Table II-3: Avantages et inconvénients des principaux prétraitements appliqués à la biomasse lignocellulosique – adapté de Menon et Rao (2012) et Kuna et al. (2017)

		Rendement en sucres	Formation d'inhibiteur	Génération de co-produits	Utilisation de produits "chimiques"	Réutilisation des composés "chimiques"	Coût équipement	Succès à l'échelle pilote	Avantages	Inconvénients
Prétraitements physiques	Irradiation	☹️	-	😊	😊	-	☹️	😊	Réduction de la cristallinité de C*	Forte consommation énergétique
	Mécanique	☹️	-	😊	😊	-	☹️	-	Accélère les cinétiques ultérieures	Forte consommation énergétique
Prétraitements thermiques	Eau chaude	😊	☹️	😊	😐	☹️	-	😊	Rend C* accessible en solubilisant H*	Longues durées - faible solubilisation de L*
	Explosion à la vapeur	😊	☹️	😊	😊	-	☹️	😊	Dégradation de H* - Altération de L*	Destruction incomplète de la matrice L-C-H*
Prétraitements chimiques	Acide	😊	☹️	☹️	☹️	😊	☹️	😊	Dégradation de L* et H* - Augmentation accessibilité de C*	Dangereux, toxique et corrosif
	Basique	😊	😊	☹️	☹️	😊	-	😊	Dégradation de L* - Solubilisation de H* - Gonflement de C*	Longues durées - Perte de sels chimiques
	Oxydatif	😐	😐	😊	☹️	☹️	☹️	-	Dégradation de L* et H* - Gonflement de C*	Peu spécifiques
	Solvants et liquides ioniques	😊	😐	😐	😐	☹️	😊	😐	Hydrolyse L* et H* ou dissolution de C*	Traitement des solvants ou encore en développement
Prétraitements biologiques	Enzymatique	😊	😊	😊	😊	☹️	☹️	😊	Production de sucres fermentescibles	Couteux - Nécessite autres prétraitements en amont
	Microbien	-	😊	😊	😊	😊	😐	😊	Production de molécules plateforme ou à haute valeur ajoutée	Nécessite autres prétraitements en amont

II.2.1.1. Prétraitements physiques

Les prétraitements physiques sont le plus souvent mécaniques et font intervenir la réduction de taille des particules de biomasse lignocellulosique par broyage. Il existe une diversité de broyage que nous ne détaillerons pas ici (broyage humide ou à sec, broyeur à boulets, à couteaux, à hélices, à balles). Le broyage, en réduisant la taille des particules, permet d’augmenter la surface spécifique accessible aux solvants, composés chimiques et enzymes, ainsi que de réduire le degré de polymérisation des constituants du substrat et d’impacter la cristallinité de la biomasse (Palmowski et Müller, 2000; Hendricks et Zeeman, 2009, Barakat et al., 2014). En première approche, le broyage semble donc particulièrement intéressant, d’autant qu’il ne génère pas d’inhibiteurs et ne nécessite pas d’utilisation de produits chimiques. Cependant, les inconvénients majeurs sont qu’à lui seul, ce prétraitement n’augmente pas significativement la conversion des polymères en sucres (da Costa Soussa et al., 2009) et qu’il est couteux en énergie et ainsi non viable économiquement (Sun et Cheng, 2002; Barakat et al., 2014).

Paradoxalement, comme stipulé dans la revue de da Costa Soussa et al. (2009), il apparaît évident que la plupart des autres prétraitements -utilisant des composés chimiques -nécessitent une taille de particule suffisamment faible pour favoriser l’imprégnation et l’action des composés chimiques. Il semble donc que le prétraitement mécanique soit incontournable et que l’enjeu soit ici d’établir des compromis en efficacité de prétraitement et rentabilité énergétique et économique.

Ainsi, le broyage est donc le plus souvent utilisé en combinaison avec d’autres types de prétraitements. De nombreuses études ont cherché à réduire la demande en énergie liée à la réduction de taille des particules de biomasse lignocellulosique (Kumar et al., 2009 ; Miao et al. 2011), aboutissant à des protocoles de broyage appliqués après traitement chimique permettant une réduction de la demande énergétique (Zhu et Pan, 2010).

D’autres prétraitements physiques basés sur des mécanismes d’irradiation avec des rayons gamma, des ondes acoustiques ou encore sur l’extrusion ou la pyrolyse ont été suggérés (Agbor et al., 2011 ; Chatel et al., 2014). Alors que pour Agbor et al. (2011) ces méthodes sont trop couteuses économiquement et environnementalement, de plus récentes études affirment que les procédés de sonication (ultrasons) optimisés nécessitent généralement moins d’énergie (Chatel et al., 2014). Ils permettent ainsi d’atteindre de meilleures performances que les procédés mécaniques conventionnels.

Par exemple, le procédé d’extrusion est particulièrement intéressant car il permet un prétraitement physique en continu, peut être facilement transposable à l’échelle industrielle et apparaît comme flexible et polyvalent. En effet, l’extrusion peut être couplée à un prétraitement chimique et permet de travailler à des hautes teneurs en solide.

II.2.1.2. Prétraitements thermiques

On parle de prétraitement thermique lorsqu’à partir de 150-180°C l’hémicellulose puis la lignine commencent à se solubiliser (Garrote et al., 1999). La solubilisation de l’hémicellulose entraîne la libération d’acides qui vont favoriser l’hydrolyse du polymère ("phénomène d’auto-clivage"). Paradoxalement, la solubilisation de la lignine va permettre de modifier la structure tertiaire de la lignocellulose pour faciliter l’accès aux enzymes cellulolytiques, mais va aussi conduire à la production d’inhibiteurs (phénoliques) toxiques pour les microorganismes (Garrote et al., 1999). Ces composés phénoliques sont de plus susceptibles de former des complexes avec les holocelluloses solubles, impactant directement le rendement d’hydrolyse en sucres fermentescibles (Agbor et al., 2011).

Selon Hendricks et Zeeman (2009), les deux prétraitements thermiques majeurs sont le traitement à la vapeur ou explosion à la vapeur (température supérieure de 160 à 290°C et pression de 0,69 à 5 MPa) et celui à l’eau chaude liquide (Liquid Hot Water, LHW) (température et pression supérieures à 190°C et 5 MPa). Ces deux procédés ont le même objectif et les mêmes inconvénients, cités précédemment. Le temps d’exposition est de l’ordre de quelques minutes, mais peut augmenter si les conditions appliquées sont plus douces. On retiendra que, lorsque le pH est maintenu entre 4 et 7, le prétraitement LHW permet de solubiliser une part plus importante d’hémicellulose et de lignine (en comparaison avec l’explosion à la vapeur), mais que cette quantité se retrouve en concentration plus faible (utilisation de plus grand volume d’eau), ce qui réduit le risque de formation d’inhibiteurs et en conséquence favorise l’hydrolyse enzymatique mais nécessite de plus grandes tailles de réacteurs (Agbor et al., 2011).

II.2.1.3. Prétraitements chimiques

II.2.1.3.1. Prétraitements acides

De manière générale, l'utilisation d'acide va permettre de solubiliser l'hémicellulose et la lignine, de favoriser déstructuration du lien xylane – lignine ainsi que d'augmenter l'accessibilité à la cellulose (da Costa Soussa et al., 2009 ; Agbor et al., 2011). Comme dans le cas des traitements thermiques, cette solubilisation peut entraîner des réactions d'hydrolyse acide formant des composés inhibiteurs de type furfural, 5-hydroxyméthylfurfural, acides et aldéhydes phénoliques, acide levulinique (Hendricks et Zeeman, 2009 ; da Costa Soussa et al., 2009). Les conditions les plus douces sont donc, en général, moins efficaces en termes de déstructuration, mais diminuent la production d'inhibiteurs et ainsi présentent de meilleurs rendements lors d'hydrolyse biologique ultérieure. Néanmoins, on notera que ces inhibiteurs biologiques peuvent aussi être considérés comme des molécules plateforme commercialement intéressantes à produire à partir de la biomasse lignocellulosique (Kumar et al., 2009).

Le traitement acide peut être réalisé dans différentes conditions, acide concentré ou dilué, température haute ou modérée et temps d'exposition faible ou long. L'utilisation d'acide concentré se fait le plus souvent à température ambiante pendant des temps courts, alors que les traitements à l'acide dilué peuvent être réalisés soit à forte température pour des temps courts ou à température modérées sur quelques heures. Différents acides peuvent être employés, avec en premier lieu l'acide phosphorique (Kumar et al., 2009) ainsi que les acides chlorhydrique, sulfurique et nitrique (Agbor et al., 2011).

L'inconvénient de ce type de prétraitement est qu'il nécessite l'utilisation de produits toxiques, dangereux pour l'environnement et corrosifs pour les équipements (Kumar et al., 2009 ; Anwar et al., 2014). D'autre part, pour effectuer une hydrolyse enzymatique par la suite, la biomasse doit être lavée ou neutralisée. Enfin, les traitements qui permettent une dégradation progressive de l'hémicellulose et de la lignine peuvent aussi conduire à une réorientation de la cellulose sous une forme plus cristalline (Gregg et Saddler, 1996).

Enfin, les procédés de prétraitements acides ont démontré leur faisabilité à échelle industrielle sur différentes sources de lignocellulose (Agbor et al., 2011 ; Anwar et al., 2014).

II.2.1.3.2. Prétraitements basiques

Globalement le but des prétraitements basiques est la rupture de la barrière ligneuse ainsi que le gonflement de la cellulose et la solubilisation partielle des hémicelluloses (Anwar et al., 2014). En effet, à pH basique des réactions de saponification (hydrolyse des esters) et de solvataion entraînent le gonflement de la lignocellulose (Hendricks et Zeeman, 2009).

Les prétraitements alcalins sont le plus souvent réalisés à faible température sur des périodes longues. Les composés les plus utilisés pour le prétraitement des biomasses lignocellulosiques agricoles sont la chaux (CaO) et l'hydroxyde de sodium, potassium et d'ammonium (Anwar et al., 2014 ; Hendricks et Zeeman, 2009). Pendant le traitement, des sels insolubles se forment au contact de la biomasse et restent adsorbés sur cette dernière (Hendricks et Zeeman, 2009). Il est alors souvent nécessaire d'effectuer une neutralisation et des lavages après traitement.

D'autre part, comme il a été mentionné, le traitement basique peut modifier la structure de la cellulose en la rendant plus stable après recristallisation, et ce, de manière irréversible (principe de la mercérisation). Des conditions trop fortes peuvent donc avoir un effet négatif sur la biodégradabilité.

En comparaison avec leurs homologues acides, les prétraitements basiques permettraient une plus faible perte de sucres par dégradation chimique, une plus faible production d'inhibiteurs et une plus importante capacité de délignification (Mathew et al., 2011 ; Zhao et al. 2008 ; Menon et Rao, 2012). Bien que plus couteuse que la chaux, la soude est largement utilisée pour son alcalinité relativement forte et sa capacité à déstructurer la barrière ligneuse, augmentant ainsi la porosité de la biomasse et l'accessibilité aux holocelluloses (Karp et al., 2015; Li et al., 2004; Zhao et al., 2008). Cependant, la délignification de la biomasse entraîne un inconvénient important dans le cadre de l'hydrolyse enzymatique. En effet, les enzymes (hémi)cellulolytiques, et notamment les cellulases, peuvent se lier de manière non spécifique à la fraction ligneuse, engendrant une perte d'activité (Berlin et al., 2007). Ce processus est accentué par le prétraitement basique, c'est à dire que la lignine ainsi déstructurée présente plus de sites de liaisons non spécifiques pour les enzymes, entraînant une chute de rendement d'hydrolyse enzymatique.

Toutefois, les prétraitements basiques ont démontré leur efficacité sur différentes biomasses lignocellulosiques agricoles (Anwar et al., 2014) et ont été implémentés avec succès à échelle pilote (Menon et Rao, 2012).

II.2.1.3.3. Autres prétraitements chimiques : oxydatifs, liquides ioniques et solvants

Le plus souvent l’utilisation d’oxydant(s) (peroxyde d’oxygène, acide peracétique) ne permet pas une attaque sélective de la lignine et engendre une perte de carbone par dégradation des holocelluloses (Hendricks et Zeeman, 2009). Au contraire, les procédés organosolv ont recours à des solvants organiques mis en œuvre à forte température (tels que des alcools et autres composés organiques de type éthers, cétones, phénols, acides organiques et diméthyl sulfoxyde). Ces procédés sont considérés comme très sélectifs et permettent de fractionner la biomasse lignocellulosique en hémicellulose en solution aqueuse, en cellulose relativement pure et en résidu enrichi en lignine. Les procédés organosolv aux alcools -de faible point d’ébullition comme au méthanol ou à l’éthanol ou de haut point d’ébullition avec éthylène glycol ou encore glycérol- permettent d’éliminer efficacement la lignine ainsi que de solubiliser les hémicelluloses (Zhao et al. 2009). L’inconvénient de ces procédés est qu’en dépit de leur sélectivité, ils sont dangereux et coûteux car i) ils sont effectués à relativement haute température (100 – 250°C selon le solvant) et ii) le solvant doit être drainé de la biomasse, évaporé et recondensé pour être réutilisé (Menon et Rao, 2012). Néanmoins, ils restent parmi les rares méthodes réellement efficaces sur les biomasses riches en lignine (Agbor et al., 2009). Une nouvelle approche est le recours aux liquides ioniques. Alors que l’objectif des prétraitements oxydatifs et aux solvants est la dissolution des hémicelluloses et lignines pour augmenter l’accessibilité à la cellulose (Hendricks et Zeeman, 2009 ; Agbor et al., 2011), celui des prétraitements à l’aide des liquides ioniques est de dissoudre la cellulose (Agbor et al., 2011). En 2002, Rogers et ses collaborateurs ont ainsi montré que les liquides ioniques aux sels d’imidazonium mis en œuvre à 100-110°C permettaient de solubiliser la cellulose (Swatlovski et al., 2002) en rentrant en compétition avec les liaisons hydrogènes inhérentes à la biomasse lignocellulosique. Par la suite, de nombreuses recherches se sont intéressées aux liquides ioniques, développant des solutions spécifiques à la solubilisation de la lignine (MeSO₄) ainsi que des techniques de séparation des fractions (Wang et al., 2010 ; da Costa Lopes et al., 2013). Bien qu’encore en développement, ces techniques semblent prometteuses et les liquides ioniques sont qualifiés de solvants verts, car a priori moins nocifs pour l’environnement et employés à des températures moins sévères (Menon et Rao, 2012 ; Pu et al., 2007).

II.2.1.4. Prétraitements biologiques

Il existe également des méthodes de prétraitements biologiques qui font appel aux capacités de certains champignons et bactéries à dépolymériser la lignocellulose (Anwar et al., 2014). L’hydrolyse biologique de la fraction (hémi)cellulosique par des enzymes produites à partir du champignon *Trichoderma reesei* a été largement étudiée, aboutissant à la production de cocktails enzymatiques commerciaux, parmi lesquels les préparations Cellic C-Tec (Novozymes) et Accelerase (Genencore) sont les plus couramment utilisées. *T. reesei* possède un large arsenal génétique encodant pour des cellulase et hémicellulases, mais ne présente pas de forte capacité de production de β -glucosidase. Les cocktails commerciaux sont donc souvent supplémentés en β -glucosidase, essentiellement produite par *Aspergillus Niger*.

Par ailleurs, des organismes appartenant principalement au règne des *Fungi* ou *Mycota* produisent aussi des enzymes (lignine peroxydases, laccases, polyphénols oxydases) capables de dégrader la lignine et les polyphénols (Canam et al., 2013) et leur étude constitue un des nouveaux axes d’optimisation des prétraitements biologiques. La délignification de la biomasse par de telles enzymes est efficace et les procédés associés sont considérés comme faiblement consommateurs d’énergie et peu polluants (Chen et al., 2017). Cependant, les inconvénients majeurs de tels prétraitements biologiques restent le coût des enzymes, la lenteur du procédé (plusieurs jours à plusieurs semaines pour attaquer la fraction ligneuse), la nécessité de maîtriser finement les conditions de mise en œuvre (pH et température optimaux des enzymes ou microorganismes) et la perte de carbone potentielle, consommé par les microorganismes producteurs d’enzymes, dans le cas où la production d’enzymes est réalisée directement à partir du substrat à prétraiter (Agbor et al., 2011). Pour ces raisons, ils ne sont actuellement que très peu envisagés à l’échelle industrielle (Agbor et al., 2011; da Costa Sousa et al., 2009). Néanmoins, des recherches sur la production d’enzymes par des microorganismes génétiquement modifiés ou des consortia microbiens ciblant des fractions spécifiques de la lignocellulose, ainsi que sur la possibilité de réutiliser les enzymes, leur permettra certainement d’être plus utilisés dans le futur (Chen et al., 2017 ; Hui et al., 2013 ; Wongwilaiwalin et al., 2010).

II.2.1.5. Combinaisons de prétraitements

Comme nous venons de le voir, chaque type de prétraitement présente des avantages et des inconvénients. Les approches envisagées -pour à la fois exacerber les avantages et limiter les inconvénients- constituent donc en la combinaison de plusieurs prétraitements.

De nombreuses combinaisons de prétraitements physico-chimiques ont été proposées et leur description a fait l’objet d’articles et de revues scientifiques (Hendricks et Zeeman, 2009 ; Agbor et al., 2011). La quasi-totalité des prétraitements, dits chimiques, peuvent en fait être considérés comme (thermo)-physico-chimiques, car la biomasse lignocellulosique est – la plupart du temps- pré-broyée pour faciliter l’imprégnation des composés chimiques, et/ou maintenue à des températures plus ou moins sévères. Néanmoins, certaines combinaisons plus spécifiques ont fait l’objet de nombreux travaux de recherche, telles que l’utilisation d’oxydants à pH basique ou l’explosion à la vapeur avec des composés acide (au CO₂ pour solubiliser les hémicelluloses) ou alcalin (à l’ammoniac pour favoriser le gonflement de la cellulose et la solvataion de la lignine) (Hendricks et Zeeman, 2009) ou encore l’extrusion catalytique qui permet un traitement thermo-physico-chimique en continu.

Par exemple, le procédé AFEX (Ammoniac Fiber Explosion) consiste en une explosion à l’ammoniac liquide, ce qui permet d’opérer à des températures modérées. Ce prétraitement semble permettre de transformer la cellulose de sa forme native (I) à la forme III, d’augmenter la capacité de solvataion de la lignine, de minimiser la production d’inhibiteurs, de ne pas nécessiter de neutralisation, ainsi que de fournir de l’azote pour une croissance microbienne ultérieure (Agbor et al., 2011).

A l’heure actuelle, des prétraitements chimiques en milieu sec ou peu hydratés sont en voie de développement et d’optimisation à travers l’utilisation d’effecteurs chimiques basiques et/ou oxydatifs (Barakat et al., 2014). Les substrats sont traités chimiquement à haute teneur en solide, puis broyés, afin d’augmenter leur surface accessible, de réduire la cristallinité de la cellulose et, par conséquent, de rendre les polymères lignocellulosiques plus accessibles aux microorganismes. En opérant la réduction de taille des particules après traitement chimique, ces prétraitements par voie sèche s’intéressent particulièrement à réduire la consommation énergétique engendrée par le broyage. Le prétraitement de la biomasse par voie sèche permet, de plus, de diminuer la consommation d’eau, la production d’effluents et la taille des réacteurs de prétraitement (Barakat et al., 2013).

Chapitre II – Etat de l'art

Table II-4: Effet des prétraitements sur les attributs physicochimiques et la biodégradabilité de substrats lignocellulosiques (1/2)

Prétraitement	Conditions	Substrat	Impact physico-chimique					Impact biologique - hydrolyse enzymatique ou fermentation					Auteurs		
			MS solubilisées (% m/m)	Récupération (% m/m)			CrI	Conditions biologiques	Dégradation du substrat (% MS m/m)	Glucose Production (mg/gMS) et rendement (% m/m)	AGV produits (g/L)	Ethanol produit (g/L)		Méthane produit (ml/gMV)	
				Cellulose	Hémi cellulose	Lignine									
Alcalin	Broyage 2 mm -Ca(OH) ₂ (0,1g/gMS) - 25°C - 8 semaines	Miscanthus	28%	89%	27%	84%	-	Cocktail enzymatique <i>Aspergillus niger</i>	-	68	-	-	-	Chen at al. (2012)	
		Herbe à éléphants	32%	100%	29%	100%	-	10 FPU/gMS - 50°C - 48h - pH5 - 0,02 gMS/L	-	67	-	-	-		
		Paille de riz	31%	90%	29%	100%	-	-	-	67	-	-	-		
	Broyage 2 mm - NH ₃ ,H ₂ O (0,03g/gMS) - 25°C - 8 semaines	Miscanthus	29%	84%	74%	95%	-	-	-	49	-	-	-		
		Herbe à éléphants	35%	96%	60%	87%	-	-	-	56	-	-	-		
		Paille de riz	34%	89%	66%	99%	-	-	-	42	-	-	-		
	NaOH (0,05g/gMS) - 0,2 kgMS/L - 25°C - 5h - broyage <60µm	Paille de blé	12%	100%	68%	66%	62%	Cocktail enzymatique (+12%) <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	332	-	-	-		Barakat et al. (2014)
			0%	96%	92%	78%	61%	20FPU/gMS - (+11%) 37°C - 72h - pH5 - 0,1 kgMS/L	-	320	-	-	-		
			0%	97%	88%	75%	67%	(+21%)	-	322	-	-	-		
			0%	98%	95%	95%	51%	(-7%)	-	140	-	-	-		
			0%	98%	96%	92%	53%	(-4%)	-	141	-	-	-		
			0%	98%	96%	92%	53%	(-4%)	-	28%	(+20%)	-	-		
NaOH (0,4 M) - 0,05 kgMS/L - 25°C - 24h - neutralisation HCl - broyage 2 mm	Tiges de maïs	34%	95%	49%	32%	-	Consortium cellulolytique MCI-20 gMS/L - 50°C - 15 jrs	50% (+138%) à 6jrs	2,72 (+433%)	0,17 (x1,8)	-	-	Guo et al. (2001)		
		15%	100%	65%	65%	-	-	72% (+188%) à 15jrs	à 3jrs	à 6 jrs	-	-			
NH ₃ ,H ₂ O (1M) - 0,05 kgMS/L - 25°C - 24h - neutralisation HCl - broyage 2 mm	Tiges de tournesol	13%	87%	59%	54%	55% (=)	Boues anaérobies - 5gMS/L - 35°C	37% (+76%) à 6jrs	2,2 (+331%)	0,44 (x6,3)	-	-	Monlau et al. (2012)		
		12,5%	90%	74%	62%	55% (=)	-	55% (+120%) à 15jrs	à 3jrs	à 6 jrs	-	259 (+35%)			
Broyage 2-3 mm - Ca(OH) ₂ (0,04g/gMS) - 55°C - 24h	Tiges de maïs	-	-	-	-	-	Boues anaérobies méthanogènes - 8%MS - 37°C - 35jrs	40% (+110%) à 35jrs	12 (+60%)	160 (+60%)	-	-	Song et al. (2014)		
		-	-	-	-	-	-	58% (+205%) à 35jrs	à 10jrs	à 35jrs	-	-			
		-	-	-	-	-	-	-	14 (+87%)	205 (+105%)	-	-			
		-	-	-	-	-	-	-	48% (+153%) à 35jrs	à 10jrs	à 35jrs	-		-	
Broyage 20-30 mm - NaOH (0,08g/gMS) - 0,3 kgMS/L - 25°C - 7jrs	Tiges de maïs	-	-	-	-	-	-	-	10,5 (+40%)	165 (+65%)	-	-	Song et al. (2014)		
		-	-	-	-	-	-	-	-	à 10jrs	à 35jrs	-		-	

Table II-5: Effet des prétraitements sur les attributs physicochimiques et la biodégradabilité de substrats lignocellulosiques (2/2)

Prétraitement	Conditions	Substrat	Impact physico-chimique					Impact biologique - hydrolyse enzymatique ou fermentation					Auteurs	
			MS solubilisées (% m/m)	Récupération (% m/m)			CrI	Conditions biologiques	Dégradation du substrat (% MS m/m)	Glucose Production (mg/gMS) et rendement (% m/m)	AGV produits (g/L)	Ethanol produit (g/L)		Méthane produit (ml/gMV)
				Cellulose	Hémi cellulose	Lignine								
Acide	H ₂ SO ₄ (1 M) - 0,05 kgMS/L - 25°C - 24h - neutralisationNaOH- broyage 2 mm	Tiges de maïs	11%	100%	55%	93%	- Consortium cellulolytique MC1- 20 gMS/L - 50°C - 15 jrs	30% (+43%) à 6jrs 41% (+64%) à 15jrs	-	1,82 (+257%) à 3jrs	0,17 (x1,8) à 6 jrs	-	- Guo et al. (2001)	
	CH ₃ COOH (1 M) - 0,05 kgMS/L - 25°C - 24h - neutralisationNaOH- broyage 2 mm		7%	100%	66%	95%	-	27% (+29%) à 6jrs 32% (+28%) à 15jrs	-	1,4 (+175%) à 3jrs	0,13 (x1,2) à 6 jrs	-	-	
	Broyage 2-3 mm - HCl (0,04g/gMS) - 170°C - 1h	Tiges de tournesol	36,5%	57%	0%	48%	52% Boues anaérobies - 5gMS/L - 35°C (-5%)	-	-	-	-	-	233 (+21%) Monlau et al. (2012)	
	Broyage 20-30 mm - H ₂ SO ₄ (0,02g/gMS) - 0,3 kgMS/L - 25°C - 7jrs	Tiges de maïs	-	-	-	-	- Boues anaérobies méthanogènes - 8%MS - 37°C - 35jrs	38% (+100%) à 35jrs	-	12,5 (+65%) à 10jrs	-	160 (+60%) à 35jrs	Song et al. (2014)	
Broyage 20-30 mm - HCl (0,02g/gMS) - 0,3 kgMS/L - 25°C - 7jrs		-	-	-	-	-	47% (+147%) à 35jrs	-	13,8 (+84%) à 10jrs	-	175 (+75%) à 35jrs			
Broyage 20-30 mm - CH ₃ COOH (0,02g/gMS) - 0,3 kgMS/L - 25°C - 7jrs		-	-	-	-	-	36% (+89%) à 35jrs	-	8,5 (+13%) à 10jrs	-	140 (+40%) à 35jrs			
Autres prétraitements d'intérêt														
Explosion à la vapeur	0,02kgMS/L - 0,7 Mpa - 165°C - 3 min - broyage 2mm	Tiges de maïs	32%	90%	34%	81%	- Consortium cellulolytique MC1- 20 gMS/L - 50°C - 15 jrs	55% (+162%) à 6jrs 77% (+208%) à 15jrs	-	2,98 (+484%) à 3jrs	0,28 (x3,6) à 6 jrs	-	- Guo et al. (2001)	
Liquide ionique	Broyage 2-3 mm - FeCl ₃ (0,1g/gMS) - 170°C - 1h	Tiges de tournesol	30%	67%	10%	51%	54% Boues anaérobies - 5gMS/L - 35°C (-1%)	-	-	-	-	-	248 (+29%) Monlau et al. (2012)	
Prétraitement oxydatif voie humide	Broyage 20-30 mm - H ₂ O ₂ (0,03g/gMS) - 0,3 kgMS/L - 25°C - 7jrs	Tiges de maïs	-	-	-	-	- Boues anaérobies méthanogènes - 8%MS - 37°C - 35jrs	58% (+200%) à 35jrs	-	14,8 (+97%) à 10jrs	-	268 (+168%) à 35jrs	Song et al. (2014)	
	Broyage 2-3 mm - H ₂ O ₂ (0,04g/gMS) - 55°C - 24h	Tiges de tournesol	14%	89%	64%	55%	54% Boues anaérobies - 5gMS/L - 35°C (-1%)	-	-	-	-	-	256 (+33%) Monlau et al. (2012)	

Les effets des prétraitements sur la structure et la biodégradabilité de la lignocellulose sont très complexes et encore mal compris à certains égards. Comme nous avons pu le voir, de nombreux paramètres rentrent en jeu tels que température, pression, temps d'exposition, type de composé ou encore concentration. Néanmoins, de nombreuses études portent sur la caractérisation physique, biochimique et/ou biologique de la biomasse (prétraitée ou non).

Les tableaux II-4 et II-5 proposent une compilation de travaux comparant les effets de prétraitements sur les caractéristiques biochimiques et/ou le potentiel de valorisation biologique par hydrolyse enzymatique ou fermentation (Chen et al., 2012 ; Barakat et al., 2014 ; Guo et al., 2001 ; Monlau et al., 2012 ; Song et al., 2014). Bien que non exhaustive, cette compilation montre des impacts positifs des différents types de prétraitements thermo-chimio-mécaniques sur l'hydrolyse biologique de plusieurs substrats lignocellulosiques d'origine agricole. De plus, il apparaît aussi que les résultats obtenus peuvent être très différents selon la nature du substrat, les conditions de prétraitements, la caractérisation mise en œuvre (biochimique, potentiel d'hydrolyse enzymatique ou de fermentation) et donc la voie de valorisation envisagée.

Finalement, la nécessité du recours au prétraitement est décrite par le truisme introduit par Wyman et al. (2007) selon lequel « le procédé plus coûteux que le prétraitement est l'absence de prétraitement ». Ainsi, le point clé se situe dans le choix du prétraitement et, comme suggéré précédemment, celui-ci dépend de la voie de valorisation envisagée et de sa capacité ultime à faciliter cette dernière.

II.2.2. Voies de valorisation de la lignocellulose

II.2.2.1. Production de biocarburants et biocombustibles

L’exemple le plus édifiant de production de molécule chimique d’intérêt industriel à partir de biomasse lignocellulosique est sans doute la production de bioéthanol. En effet, le critère de recherche « bioéthanol » révèle plus de 13900 articles sur le moteur de recherche ScienceDirect (Mars 2018). D’autre part, les technologies liées à sa production sont aujourd’hui considérées comme approchant de la maturité (Isikgor et Becer, 2015). Alors que les biocarburants de première génération étaient produits à partir de plantes sucrières ou amylacées, les biocarburants de seconde génération sont dérivés de plantes et résidus de plantes qui ne rentrent pas en concurrence avec l’alimentation humaine.

La plupart des procédés de production de bioéthanol de seconde génération se basent sur un prétraitement thermochimique de la fraction hémicellulosique, suivi d’une hydrolyse enzymatique de la fraction cellulosique. L’hydrolysats obtenu est alors fermenté en éthanol par des souches de levures (recombinantes ou non) appartenant aux genres *Saccharomyces*, *Kluveryomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, ou encore *Zymomonas*. Le procédé se finalise par une étape de séparation de l’éthanol produit par distillation (Olofsson et al., 2008 ; Menon et Rao, 2012).

Quatre configurations de procédés se distinguent, selon la séparation ou non des étapes d’hydrolyse et fermentation : le procédé SHF pour separate hydrolysis and fermentation, la SSF pour simultaneous saccharification and fermentation, la SSCF pour simultaneous saccharification and co-fermentation et les bioprocédés consolidés CBP pour consolidated biomass processing.

Alors qu’en configuration SHF le nombre de réacteurs est le facteur limitant en termes de rentabilité, l’inconvénient des procédés SSF résulte en l’utilisation de levures alcooliques qui ne supportent pas les températures supérieures à 45°C alors que les enzymes utilisées, essentiellement produites par le microorganisme *Trichoderma reesei* (Menon et Rao, 2012), présentent le plus souvent un optimum d’activité vers 50°C (Adney et al., 1991). A partir de biomasse lignocellulosique et à forte teneur en solides (de l’ordre de 25%), il est possible de produire du bioéthanol en configuration SSF à des productivités de 0,6 à 0,9 g.L⁻¹h⁻¹ et des concentrations de 40-60 g.L⁻¹ (Lu et al. 2010 ; Zhang et al., 2010). Les concentrations et productivités atteintes dépendent notamment du substrat, du prétraitement appliqué et de sa

sévérité, de la concentration d’enzymes utilisée, ainsi que du microorganisme fermentaire mis en jeu.

Une variante de la configuration SSF est la SSCF où les hexoses et pentoses sont co-métabolisés. Le microorganisme *Zymomonas mobilis* a, par exemple, montré de bonnes capacités de production d’éthanol sur des boues de papier, permettant d’obtenir 40 g.L⁻¹ d’éthanol, ce qui correspond à un rendement 0,39 g.g⁻¹ de sucres (Mesquita et al., 2010).

Une alternative à ces procédés sont les bioprocédés consolidés qui impliquent de réaliser la production d’enzymes, l’hydrolyse des polymères de lignocellulose et leur fermentation en une seule étape (Lynd et al., 2005) dans le but de faire baisser les coûts d’investissement du procédé (CAPEX). Cela nécessite de trouver des synergies de microorganismes (ou consortia) qui supportent l’ensemble des fonctions recherchées.

Jin et al. (2011) ont comparé l’hydrolyse de canne de maïs prétraitée par explosion à l’ammoniac (AFEX) en configuration CBP et SSCF, par la bactérie *Clostridium phytofermentans* en vue de la production de bioéthanol. Le fonctionnement CBP a permis d’atteindre 87%, 102% et 72% des capacités obtenues en configuration SSCF pour l’hydrolyse du glucane et du xylane, et la production d’éthanol, respectivement.

L’inconvénient majeur à l’utilisation d’enzymes fongiques est leur coût de production dû à la consommation d’oxygène et à la perte de carbone sous forme de CO₂ nécessaires à la croissance des champignons producteurs d’enzymes. Bien que ces coûts soient en forte baisse grâce à l’optimisation des conditions de production des cocktails enzymatiques (MacLellan, 2010), les CBP restent très compétitifs, jusqu’à 4 fois moins coûteux que leur homologues SSF (Lynd et al., 2005; Menon and Rao, 2012).

La biomasse lignocellulosique peut aussi être utilisée pour la production de dihydrogène. Ce gaz est intéressant d’un point de vue énergétique, de par son enthalpie de combustion élevée (141,9 kJ.g⁻¹) (Nima Nasirian, 2012). Il constitue une source d’énergie exempt de carbone, sans impact sur l’effet de serre et dont l’applicabilité technologique comme biocarburant a été validée (Gupta et al., 2010). Plusieurs procédés permettent sa production par voie chimique, comme l’électrolyse de l’eau, la pyrolyse de la biomasse ou le vaporeformage du méthane (Gupta et al., 2010). Le dihydrogène peut aussi être produit à partir de biomasse par fermentation. Cette conversion biologique appelée fermentation obscure (dark fermentation) est réalisée par des bactéries anaérobies de type *Clostridium* et *Enterobacter* par exemples (Kumar et al., 2017). Plusieurs configurations de bioprocédés (hydrolyse et fermentation

simultanée, ou découplée et CBP) sont mises en œuvre, ainsi que le recours au prétraitement de la biomasse. La particularité ici est que dans le cas des CBP, le rendement en H₂ à partir des sucres hydrolysés est limité par la formation d’acides organiques par des bactéries non productrices d’H₂ (Boodhun et al., 2017). Ainsi, plusieurs auteurs comme Lo et al. (2009) ou Chang et al. (2010) proposent un procédé à deux étages (Simultaneous Hydrogen Fermentation - SHF) qui permet d’obtenir des rendements en hydrogène, à partir d’écailles de riz, comparables à ceux obtenus sur sucres simples. Dans le premier étage, l’hydrolyse est réalisée par une souche ou un consortium sélectionné(e) pour ses capacités de dégradation, et dans le second étage une ou plusieurs souches productrices d’H₂ permettent la production à partir des sucres générés dans le premier étage (Chang et al., 2010; Lo et al., 2009).

La production de méthane à partir de différents déchets biologiques et via le processus de méthanisation est en essor mondial car elle présente des avantages économiques et environnementaux (Chandra et al., 2012). En effet, comme nous l’avons signalé, la production de méthane est un processus naturel qui a lieu lors des périodes de stockage des matériaux issus de l’agroforesterie. La captation du potentiel de méthane (gaz à effet de serre) dans des procédés de valorisation de déchets par digestion anaérobie permet donc de i) limiter la production de gaz à effet de serre (Shah et al., 2014), de ii) produire un biogaz compatible avec les unités usuelles de génération d’électricité et de transport (Chandra et al., 2012) et de, iii) stabiliser et valoriser les déchets de ce procédé en fertilisants agricoles (Shah et al., 2014).

La digestion anaérobie ou méthanisation est une transformation de la matière organique en biogaz, faisant intervenir de nombreuses voies métaboliques portées par une forte diversité de microorganismes, bactéries et archées (consortium microbien). Conventionnellement, le processus de méthanisation peut se résumer par l’équation générale $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CO_2 + 3CH_4$. Ce processus résulte de quatre réactions biologiques principales qui constituent un groupe trophique : l’hydrolyse, l’acidogénèse, l’acétogénèse et la méthanogénèse (Chandra et al., 2012 ; Moletta et al., 2002).

Généralement, l’hydrolyse, qui consiste en la dégradation lente et incomplète des polymères structuraux de la biomasse en monomères métabolisables, constitue l’étape limitante du processus. Néanmoins, il est intéressant de noter que le temps de génération des microorganismes hydrolytiques est relativement rapide, de l’ordre de quelques heures (Moletta, 2002).

Les monomères générés sont alors pris en charge par des bactéries acétogènes, anaérobies strictes et anaérobies facultatives (principalement des genres *Clostridium*, *Bacillus*, *Acetobacterium* et *Enterobacter*). Ces bactéries produisent principalement des acides organiques (accompagnés d’alcools, dihydrogène et dioxyde de carbone) par fermentation, au cours de cette étape ainsi nommée acidogénèse (Chandra et al., 2012). L’acidogénèse est le métabolisme le plus rapide de tout le groupe trophique. Les intermédiaires métaboliques de l’acidogénèse (acides organiques et alcools) sont ensuite convertis en acétate, dihydrogène et dioxyde de carbone dans l’étape d’acétogénèse, réalisée par trois groupes de bactéries.

Les bactéries syntrophiques - productrices obligatoires d’hydrogène - se caractérisent par leur dépendance à un autre groupe bactérien responsable de la consommation d’hydrogène : La réaction n’est thermodynamiquement réalisable ($\Delta G_0 > 0$) que si l’hydrogène est instantanément consommé par le second groupe bactérien (Chandra et al., 2012 ; Moletta et al., 2002).

Les bactéries homoacétogènes du groupe 1 réalisent l’oxydation d’intermédiaires carbonés en acétate, alors que les bactéries homoacétogènes du groupe 2 effectuent la réduction du dioxyde de carbone en acétate avec consommation de dihydrogène et participent ainsi à la consommation du dihydrogène, nécessaire aux bactéries syntrophiques.

Parallèlement, les bactéries sulfato-réductrices utilisent les sulfates (et les sulfites) comme accepteur final d’électron et peuvent oxyder partiellement (groupe 1) ou totalement (groupe 2) certains intermédiaires carbonés en acétate et dioxyde de carbone (groupe 1) ou en dioxyde de carbone uniquement (groupe 2).

Enfin, la réaction biologique de méthanogénèse est assurée par des microorganismes anaérobies stricts appartenant au phylum des *Archaea*. On distingue là encore deux groupes. Les *Archaea* méthanogènes hydrogénotrophes produisent du méthane (et de l’eau) à partir de CO_2 et d’ H_2 et participent au maintien d’une faible concentration en dihydrogène. Les *Archaea* méthanogènes acétoclastes convertissent l’acétate en méthane et CO_2 . Ces dernières produisent 70% du méthane produit (Moletta et al., 2002). Elles présentent en général un pH optimal de croissance légèrement alcalin, mais peuvent s’adapter à des pH acides (Ahring and Westermann, 1985). Le genre *Methanosarcina* présente la particularité de pouvoir utiliser à la fois l’acétate, le CO_2 et l’ H_2 . Le temps de génération des *Archaea* méthanogènes est compris entre quelques heures et 7 jours et est supérieur à ceux des bactéries hydrolytiques et acidogènes (Moletta, 2002).

De nombreuses études ont porté sur l’optimisation de la production de biogaz à partir de biomasse lignocellulosique (Antonopoulou and Lyberatos, 2013; Hu and Yu, 2005; Labatut et al., 2011; Nima Nasirian, 2012; Wang et al., 2010). La majorité des recherches est axée sur les

prétraitements de la biomasse et l’origine de l’inoculum. Des rendements supérieurs à 300 L de méthane.kg⁻¹ de matière sèche (MS) ont pu être atteints à partir de pailles agricoles, proches du rendement théorique de 350 L.kg⁻¹ MS (Moletta, 2008; Monlau et al., 2012).

Au-delà des intérêts économiques et environnementaux, le processus de méthanisation est particulièrement intéressant car il met naturellement en œuvre des écosystèmes bactériens syntrophiques (consortia) dont l’association mutualiste supporte la réaction globale. C’est aussi via l’observation de ces réactions qu’ont émergé i) la plateforme des carboxylates et ii) les champs de recherche liés à l’utilisation de consortia microbiens naturels et dérivés des écosystèmes environnementaux.

II.2.2.2. La plateforme des carboxylates et autres plateformes d’intérêt

Comme précédemment évoqué, les bactéries acidogènes impliquées dans le processus de méthanation biologique produisent des acides organiques, aussi appelés acides gras volatils (AGV) avec principalement les acides acétique, propionique et butyrique. L’existence de cette fermentation -aussi appelée fermentation mixte- a conduit Holtzapple et al. (2009) à proposer la terminologie de plateforme des carboxylates, aussi suggérée comme plateforme des AGV par Chang et al. (2010).

La plateforme des carboxylates regroupe les procédés à culture mixte (de microorganismes non nécessairement définis) générant un mélange de carboxylates. Ces composés forment une plateforme dans la mesure où ils constituent des intermédiaires chimiques, notamment pour les carburants plus complexes (Holtzapple et al., 2009).

Les acides organiques produits par la fermentation primaire de culture mixte (acétate, propionate, lactate, butyrate) sont des molécules d’intérêt à part entière lorsqu’ils sont séparés du moût de fermentation, et peuvent aussi servir de substrat pour la production d’autres molécules par fermentation secondaire ou procédés chimiques (Chang et al., 2010).

Devant la complexité et la diversité des molécules pouvant être produites, les considérations de degré d’oxydo-réduction et d’énergie libre de Gibbs sont nécessaires pour évaluer la possibilité des réactions et trouver les leviers de leur réalisation (Figure II-10).

Ainsi, Holtzapple et Granda (2009) ont pu montrer que l’ajout d’hydrogène permettait d’augmenter les rendements de production des trois plateformes (à partir d’une biomasse théorique idéale) de production i) d’éthanol, ii) d’alcanes et iii) de carboxylates.

De manière intéressante, dans la même étude ces auteurs affirment que la plateforme des carboxylates permet d’atteindre les meilleurs rendements.

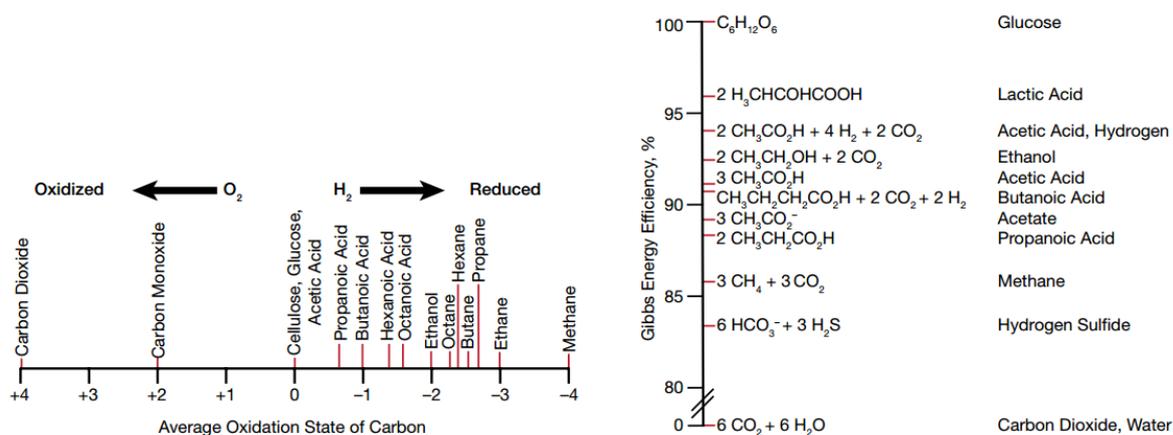


Figure II-10: Degré de réduction et énergie libre de Gibbs pour la conversion biologique du glucose en composés d’intérêt, Holtzapple et al. (2015)

De nombreuses études ont été menées par l’équipe de Holtzapple et ont conduit à des brevets et à l’élaboration d’une filière testée avec succès à l’échelle pilote, intégrant les procédés de prétraitement à la chaux, fermentation, purification, concentration, cétonisation thermique, distillation, hydrogénation et oligomérisation. Cette filière est connue sous le nom de procédés MixAlco™ (Holtzapple et al., 1999 ; Vasquez et Holtzapple., 2013). Datant de 1997, ce procédé permet de produire un mix d’alcools, à partir d’un mix d’acides organiques produits par fermentation mixte de biomasse lignocellulosique prétraitée à la chaux et opérée en configuration CBP. L’intérêt de ce type d’approche est qu’elle ne nécessite pas de conditions de stérilisation, et est *a priori* plus robuste que les techniques mises en œuvre en culture pure. De manière intéressante, le prétraitement à la chaux employé dans le procédé a montré son efficacité sur différents substrats lignocellulosiques, tels que vinasse, paille de blé, rafle de maïs et autres biomasses herbacées, en mesurant l’impact du prétraitement sur la digestibilité par des ruminants (Holtzapple et al., 1999). D’autre part, l’étape de fermentation suit un design bien spécifique constitué de 4 réacteurs à contre-courant (voies solide et liquide à contre-courant) (Thanakoses et al., 2003) qui font écho aux quatre panses intestinales des ruminants bovins.

Alors que ce procédé constitue donc un exemple de biomimétisme et de management des communautés microbiennes, de nombreux aspects sont encore à l’étude, tels que le développement de nouveaux prétraitements innovants (prétraitement choc à la chaux – Darvekar et Holtzaple (2015)), le recours à des inocula extrémophiles (Haynes, 2014, Cope et al., 2014), la possibilité de dégradation de la biomasse algale (Zhao et al., 2016) ou encore l’étude de la structure et de la dynamique des communautés microbiennes impliquées (Hollister et al., 2010).

Comme nous l’avons déjà mentionné, de nombreuses autres molécules peuvent être produites à partir de biomasse lignocellulosique. Les figures II-7, II-8 et II-9 (pages 17-19) illustrent 15 plateformes identifiées et compilées par Isikgor et Becer (2015). Ces figures sont le fruit d’une large revue bibliographique identifiant les travaux de recherche visant à produire des molécules d’intérêt à partir des sucres issus de biomasse lignocellulosique via des transformations biologique ou chimique.

Au-delà des possibilités de valorisation des monomères en C₅ et C₆ en molécules d’intérêt, le concept de bioraffinerie ne se limite pas à la production mais inclus aussi toute la chaîne de production de la biomasse, l’utilisation de toute la matière organique, ainsi que toutes les étapes de transport et de raffinage des matières, et de purification des produits, de manière à rendre la filière globale économiquement viable (Menon et Rao, 2012). A cet égard, la valorisation de la lignine en gaz utilisable directement sur site ou en composés chimiques – particulièrement intéressants pour leur structure aromatique complexe- pourrait constituer un enjeu des bioraffineries et attire l’objet de nombreux sujets de recherches (Ragauskas et al., 2014).

Au travers de cette étude bibliographique non exhaustive sur la valorisation de la biomasse lignocellulosique nous pouvons dégager deux points essentiels : le besoin absolu de prétraitement pour augmenter l’accessibilité aux polymères structuraux de la biomasse lignocellulosique et la tendance croissante en faveur des bioprocédés consolidés, permettant de réaliser hydrolyse et production de molécules d’intérêt dans la même unité opératoire.

Alors que certains bioprocédés consolidés, à l’instar du procédé MixAlcoTM, mettent en œuvre des consortia microbiens et que d’autres processus comme la méthanation biologique s’appuie sur des organisations microbiennes syntrophiques naturelles, nous nous proposons, dans la partie suivante, d’étudier la dégradation biologique de la biomasse lignocellulosique.

Dans cette partie nous progresserons de la description des espèces microbiennes impliquées et retrouvées dans les écosystèmes naturels à la description du système enzymatique lignocellulolytique. Une attention particulière sera donnée aux études mettant en œuvre des consortia microbiens naturels ou dérivés d’écosystèmes environnementaux en vue de dégrader la biomasse lignocellulosique, ainsi qu’aux techniques développées à ce jour pour appréhender la structure et la dynamique des populations microbiennes impliquées.

II.3. Dégradation biologique de la lignocellulose

La dégradation biologique de la biomasse lignocellulosique est effectuée par des enzymes lignocellulolytiques. Ces enzymes produites notamment par des microorganismes peuvent être utilisées en valorisation de biomasse lignocellulosique, comme nous l’avons vu précédemment, pour fournir des substrats monomériques pour d’autres transformations d’intérêt.

Les écosystèmes où de tels microorganismes évoluent ont fait l’objet de nombreuses recherches car ils constituent un réservoir de biocatalyseurs et de mécanismes de dégradation naturels. A ce titre, la cellulose étant le composant majoritaire de la biomasse lignocellulosique, sa dégradation biologique a été largement étudiée (Wilson 2009 ; Himmel et al., 2010 ; Lynd et al., 2002 ; Zhang et al., 2006).

II.3.1. Dégradation microbienne de la (ligno)cellulose dans les écosystèmes naturels

L’hydrolyse biologique de la cellulose est une fonction partagée par peu de microorganismes mais, qui, paradoxalement présentent une forte diversité. Ils peuvent être tant eucaryotes que procaryotes, aérobies ou anaérobies (stricte ou non), thermophiles ou mésophiles. On les retrouve dans de nombreux écosystèmes, tels que le sol, les fonds aquatiques et le tube digestif des ruminants et des insectes (Himmel et al., 2010 ; Table II-6). Les champignons cellulolytiques anaérobies sont principalement ceux retrouvés dans le tractus intestinal des ruminants et appartenant au groupe des *Chytridiomycètes*. Les champignons aérobies sont retrouvés dans les subdivisions *Basidiomycètes*, *Ascomycètes* et *Deuteromycetes* et ont été étudiés pour leur enzymes cellulolytiques et leur capacité à dégrader la lignine. Les bactéries cellulolytiques sont principalement des bactéries Gram + et peuvent être anaérobies (*Clostridium* et *Ruminococcus*) ou aérobies (*Cellulomonas*, *Thermobifida*, *Acidothermus*).

Dans les écosystèmes naturels, la majeure partie de la lignocellulose est dégradée de manière aérobie à la surface des sols, mais les organismes anaérobies jouent un rôle important en contribuant à la réduction de la matière organique en méthane et dioxyde de carbone (Lynd et al., 2002).

Table II-6: Principaux microorganismes cellulolytiques isolés dans des écosystèmes naturels , Himmel et al. (2010)

Bactéries		Champignons	
Espèce	Origine	Espèce	Origine
Aérobies			
Mésophiles			
<i>Bacillus brevis</i>	Intestin du termite	<i>Aspergillus nidulans, A. niger</i>	Bois putréfié
<i>Cellulomonas fimi</i>	Sol	<i>Agaricus bisporus</i>	Compost
<i>Cellvibrio japonicus</i>	Sol	<i>Coprinus truncorum</i>	Sol, compost
<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	Sol, compost	<i>Geotrichum candidum</i>	Sol, compost
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Compost	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Sol, compost
<i>Pseudomonas fluorescens, P. putida</i>	Sol, boues	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Compost
<i>Saccharophagus degradans</i>	Herbe des marais putréfiée	<i>Trichocladium canadense</i>	Sol, compost
<i>Sorangium cellulosum</i>	Sol	<i>Trichoderma reesei</i>	Sol, toile de coton en décomposition
Thermophiles			
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	Source chaude	<i>Chaetomium thermophilum</i>	Sol
<i>Thermobifida fusca</i>	Compost	<i>Corynascus thermophilus</i>	Compost
		<i>Paecilomyces thermophila</i>	Sol, compost
		<i>Thielavia terrestris</i>	Sol
Anaérobies			
Mésophiles			
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	Eaux usées	<i>Neocallimastix patriciarum</i>	Rumen
<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	Eaux usées	<i>Orpinomyces joyonii</i>	Rumen
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	Compost	<i>Orpinomyces PC-2</i>	Rumen
<i>Clostridium cellulovorans</i>	Fermenteur en bois	<i>Piromyces equi</i>	Rumen
<i>Clostridium josui</i>	Compost	<i>Piromyces E2</i>	Feces
<i>Clostridium papyrosolvens</i>	Boues		
<i>Clostridium phytofermentans</i>	Sol		
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Rumen		
<i>Prevotella ruminicola</i>	Rumen		
<i>Ruminococcus albus</i>	Rumen		
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Rumen		
Thermophiles			
<i>Anaerocellum thermophilum</i>	Source chaude		
<i>Caldicellulosiruptor, saccharolyticus</i>	Source chaude		
<i>Clostridium thermocellum</i>	Eaux usées, sol, fumier		
<i>Clostridium stercorarium</i>	Compost		
<i>Thermotoga maritima</i>	Boues marines		
<i>Rhodothermus marinus</i>	Source chaude		

La digestion des composés celluloseux dans les écosystèmes naturels s’effectue via des écosystèmes cellulolytiques régis par des interactions mutualistes. C’est-à-dire qu’il y a une interaction favorable entre les microorganismes fibrolytiques qui dégradent la lignocellulose (et produisent des sucres métabolisables) et les (micro)organismes non fibrolytiques qui consomment les produits de dégradation, limitant les effets d’inhibition par ces produits et tirant la réaction globale vers la dégradation (Lynd et al. 2002).

Hormis quelques exceptions (comme les bactéries du genre *Cellulomonas*), il est intéressant de noter que les bactéries cellulolytiques peuvent être aérobies ou anaérobies mais rarement aérobies/anaérobies facultatives. En effet, l’hydrolyse aérobie et l’hydrolyse anaérobie ne présentent pas du tout les mêmes types de fonctionnement. Alors qu’en aérobie, les enzymes de dégradation sont principalement excrétées dans le milieu, en anaérobiose on retrouve aussi des enzymes complexées sous forme de cellulosomes à la surface des cellules (Himmel et al., 2011). Aussi, en condition d’aérobie, les sucres solubles sont entièrement métabolisés en CO₂ alors qu’en anaérobiose il y a principalement formation d’acides organiques, d’éthanol et de dihydrogène. Une grande part du carbone est orientée vers la production de produits fermentaires au détriment de la croissance microbienne. En prenant comme exemple le cas du glucose, cela conduit au niveau cellulaire à une efficacité énergétique moindre, avec de 2 à 4 moles d’ATP générées par mole de glucose consommée, contre 38 pour le métabolisme aérobie (Malherbe and Cloete, 2002).

Les microorganismes anaérobies sont donc particulièrement intéressants pour la valorisation de la cellulose car, en comparaison avec leurs homologues aérobies, ils limitent la perte de carbone pour la croissance microbienne.

Dans les écosystèmes naturels, les microorganismes cellulolytiques évoluent de manière syntrophique avec des microorganismes non fibrolytiques aussi appelés microorganismes satellites. En condition d’anaérobiose stricte, le métabolisme fermentaire des microorganismes fibrolytiques et satellites conduit à la formation d’acides organiques. Le glucose est métabolisé en glucose-6-P et entre ainsi dans la voie d’Embden-Meyerhoff. Le xylose est lui converti en xylulose-5-P et suit la voie des pentoses phosphates. L’ensemble des bactéries vont produire principalement de l’acétate et du CO₂. Les proportions des autres co-produits vont dépendre de la structure des communautés microbiennes et des voies métaboliques présentes et des conditions abiotiques (Latrille et al., 2013). La Figure II-11 représente les principales voies métaboliques pouvant se réaliser en conditions anaérobies à partir de substrat type C6.

Voie acétate.....	$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COOH + 2 CO_2 + 4 H_2$	$\Delta G'_0 = -215 \text{ KJ.mol}^{-1}$
Voie butyrate.....	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2 CO_2 + 2 H_2$	$\Delta G'_0 = -264 \text{ KJ.mol}^{-1}$
Voie éthanol.....	$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow CH_3CH_2OH + CH_3COOH + 2 CO_2 + 2 H_2$	$\Delta G'_0 = -225 \text{ KJ.mol}^{-1}$
Voie éthanol (sans production d’H ₂).....	$C_3H_{12}O_6 \rightarrow 3 CH_3CH_2OH + 2 CO_2$	$\Delta G'_0 = -235 \text{ KJ.mol}^{-1}$
Homoacétogénèse.....	$2 CO_2 + 4 H_2 \rightarrow CH_3COOH + 2 H_2O$	$\Delta G'_0 = -94 \text{ KJ.mol}^{-1}$
Voie propionate.....	$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2 \rightarrow 2 CH_3CH_2COOH + 2 H_2O$	$\Delta G'_0 = -359 \text{ KJ.mol}^{-1}$
Voie caproate.....	$CH_3CH_2CH_2COOH + CH_3COOH + 2 H_2 \rightarrow CH_3(CH_2)_4COOH + 2 H_2O$	$\Delta G'_0 = -48 \text{ KJ.mol}^{-1}$
Voie caproate.....	$CH_3CH_2CH_2COOH + 2 CO_2 + 6 H_2 \rightarrow CH_3(CH_2)_4COOH + 4 H_2O$	$\Delta G'_0 = -143 \text{ KJ.mol}^{-1}$
Sulfato-réduction.....	$4 H_2 + SO_4^{2-} + 2 H^+ \rightarrow H_2S + 4 H_2O$	$\Delta G'_0 = -152 \text{ KJ.mol}^{-1}$
Méthanisation.....	$4 H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2 H_2O$	$\Delta G'_0 = -136 \text{ KJ.mol}^{-1}$
Voie homolactique.....	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CHOHCOOH$	$\Delta G'_0 = -117 \text{ KJ.mol}^{-1}$
Voie hétérolactique.....	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3CH_2OH + CO_2$	$\Delta G'_0 = -216 \text{ KJ.mol}^{-1}$
Voie homo-acétique.....	$C_3H_{12}O_6 \rightarrow 3 CH_3COOH$	$\Delta G'_0 = -310 \text{ KJ.mol}^{-1}$
Fermentation propionique.....	$1.5 C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O$	$\Delta G'_0 = -311 \text{ KJ.mol}^{-1}$

Figure II-11 : Voies métaboliques impliquées dans la dégradation de la matière organique en anaérobie

Les points critiques du métabolisme anaérobie sont la réoxydation des cofacteurs réduits et l’accumulation d’intermédiaires métaboliques potentiellement inhibiteurs. Des relations de syntrophie viennent s’ajouter à ce système complexe et constituent la fermentation mixte déjà évoquée précédemment et mise en œuvre dans le cadre du procédé MixAlcoTM.

II.3.2. Potentialités des consortia microbiens dérivés d’écosystèmes naturels pour la valorisation de la biomasse lignocellulosique

A l’instar de la digestion anaérobie ou de la plateforme des carboxylates, la culture de consortia microbiens environnementaux ou dérivés d’écosystèmes naturels peut offrir des avantages, intéressants à la fois en termes économiques et hydrolytiques. D’une part, ce type de culture ne nécessite pas de contraintes de stérilisation, ce qui réduit les coûts de fonctionnement du procédé. Aussi, si la culture est menée en conditions d’anaérobiose, un gain énergétique est réalisé sur l’oxygénation et la réduction de la perte de carbone pour la croissance microbienne. Enfin, en ce qui concerne les capacités de dégradation, la Figure II-12 représente l’hypothèse selon laquelle la diversité fonctionnelle nécessaire à une dégradation efficace pourrait être favorisée par une plus large diversité microbienne. La culture de consortia environnementaux dérivés d’écosystèmes naturels (où la dégradation de la lignocellulose a lieu de manière naturelle) serait alors un moyen efficace pour atteindre de hauts rendements de production de synthons.

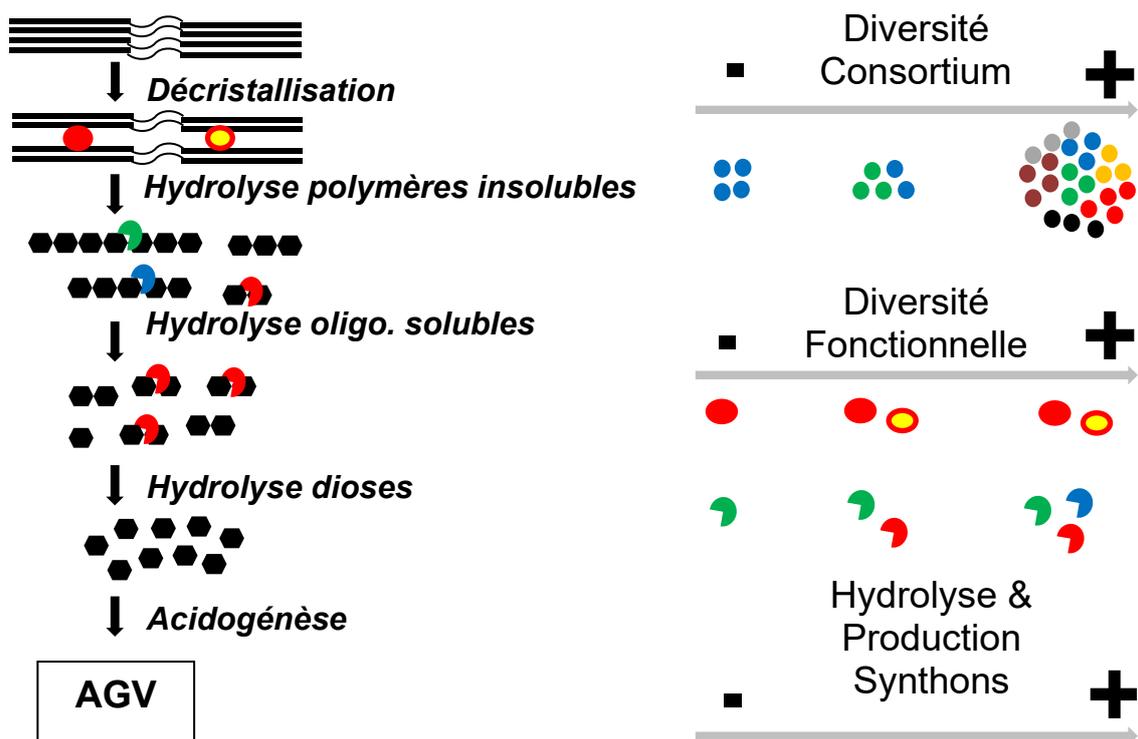


Figure II-12 : Hypothèse de corrélation entre diversité bactérienne et fonctionnelle

En effet, l’utilisation de consortia microbiens soulève de grands intérêts pour leur capacité à dégrader synergiquement la biomasse lignocellulosique, même non prétraitée (Feng et al., 2011). En comparaison avec la culture de microorganismes mixés artificiellement, celle de consortia dérivés d’écosystèmes naturels présente de nombreux avantages, raisonnablement imputables à leur structuration syntrophique, tels qu’une forte versatilité et diversité métabolique ainsi que leur stabilité et robustesse dans de larges gammes de conditions (Kleerebezem and van Loosdrecht, 2007). Cependant, pour exploiter les consortia naturels, il advient de trouver des techniques permettant leur culture en environnement contrôlé. Les techniques d’enrichissement constituent ainsi un outil puissant pour obtenir des consortia microbiens présentant des capacités de dégradation de biomasse lignocellulosique (Cheng et al., 2009). En effet, cette approche a été évaluée avec succès sur différentes sources de biomasse lignocellulosique (prétraitée ou non) et à partir de diverses écosystèmes naturels (Tables II-7 et II-8) tels que le sol (de Lima Brossi et al., 2016 ; Feng et al., 2011; Gao et al., 2014; Jiménez et al., 2014; Zhou et al., 2014), le compost (Guo et al., 2010; Haruta et al., 2002; Lin et al., 2011; Reddy et al., 2011; Wang et al., 2011; Wongwilaiwalin et al., 2010) le contenu ruminal bovin (Chang et al., 2010) ou le contenu intestinal d’insectes (Sheng et al., 2016).

Table II-7 : Utilisation de communautés microbiennes dérivées d’écosystèmes naturels pour la dégradation de biomasse lignocellulosique (1/2)

Substrat	Prétraitement	Consortium	Conditions	Production	Remarques	Auteurs
Rafles de maïs	Broyage à 1 mm	rumen de chèvre	batch et réacteurs semi-continu mésophiles anaérobies	AGV : jusqu'à 6g/L et 11g/L/jr	Production simultanée de méthane	Hu et Yu (2005)
Mélasse et fibre de maïs	Broyage à 2 mm	rumen de mouton	batch et réacteurs semi-continu mésophiles anaérobies	AGV : jusqu'à 100 mmol/l et 115 mmol/L/jr	Production simultanée de méthane	Kivaisi et Eliapendna (1994)
Alpha-cellulose (Sigma)	-	rumen bovin	réacteur batch séquencé anaérobie (ASBR) mésophile	AGV : jusqu'à 5,3 gDCO/L/jr	Production simultanée de méthane	Barnes et Keller (2003)
Rafles de maïs et papier filtre	Broyage à 400 µm	RCSP - enrichi à partir de sol	batch statique mésophile	AGV : < 500 mg/L	Dégradation de 51% des rafles brutes et 81% du papier filtre	Feng et al. (2011)
Paille de riz et rafles de maïs	Soude 1% - 24h	XDC-2 - enrichi à partir de compost	batch statique mésophile	Xylanase 8,4 U/mL CMCCase 0,4 U/mL	Dégradation de 60,3% de la paille de riz	Peng et al. (2009)
Paille de blé	Soude 1,5% - 48h	WSD-5 - enrichi à partir de litière et de sol	batch statique mésophile	Xylanase 15,2 U/mL - CMCCase 4,3 U/mL	Dégradation de 75,6% de la paille de blé	Wang et al. (2011)
Paille de riz et rafles de maïs	Acide peracétique alcalin	Enrichi à partir de compost	batch statique thermophile	Xylanase 1,71 U/mg - CMCCase 0,24 U/mg	Dégradation de 75,3% de la paille de riz et 70,3% des rafles de maïs	Wongwilaiwalin et al. (2010)
Déchets de platane et roseau	Chaux 0,2 g/g - 1h - 121°C	Digesteur anaérobie	batch anaérobie mésophile	AGV : jusqu'à 5,4 g/L	Milieu contrôle produisant 2g-AGV/L	Kim et al. (2013)
Paille d'orge	Broyage 1 mm	Enrichi à partir de rumen bovin	batch statique mésophiles	biogaz : jusqu'à 250 ml/ml - AGV jusqu'à 45 mM	Méthanogènes et fungi	Cheng et al. (2009)
Papier filtre	Broyage en boue	SQD-1.1 enrichi à partir de sol de mangrove	batch statique anaérobie mésophile	Complexe de cellulosomes	Dégradation complète du papier filtre à 2g/L	Gao et al. (2014)
Millet vivace	Soude 1,5% - 24h	SD-Y enrichi à partir de millet vivace	milieu solide (+ millet) mésophile puis batch mésophile	Xylanase 3,75 U - CMCCase 0,21 U	Dégradation de 70% du millet	Yang et al. (2011)
Paille de blé, rafles de maïs et millet	Broyage à 1 mm	Enrichi à partir de sol forestier	batch aérobie mésophile	-	Dégradation max de 43,3 à 47,7% des substrats	de Lima Brossi et al. (2015)
Paille de riz et papier filtre	Broyage à 5 cm	Enrichi à partir de compost	batch statique thermophile	AGV : < 300 mg/L - éthanol jusqu'à 1g/L	Dégradation de 61% de la paille de riz	Haruta et al. (2002)
Rafles de maïs	acides, bases et explosion à la vapeur	Enrichi à partir de compost (Haruta et al., 2002)	batch statique thermophile	AGV : jusqu'à 3 g/L - glucérine : jusqu'à 3,1 g/L	Dégradation de 75% des rafles de maïs	Guo et al. (2011)

Table II-8 : Utilisation de communautés microbiennes dérivées d’écosystèmes naturels pour la dégradation de biomasse lignocellulosique (2/2)

Substrat	Prétraitement	Consortium	Conditions	Production	Remarques	Auteurs
Paille de blé, rafles de maïs et paille de riz	Broyage à 1 mm	XDC-2 (Peng et al., 2009)	batch statique mésophile	AGV : jusqu'à 5,3 g/L (paille de blé) - xylanase : jusqu'à 850 U/mL (rafles de maïs)	Dégradation de 39,6 de la paille de riz, 25,2 de la paille de blé et 17,6 % des rafles de maïs	Hui et al. (2013)
Paille de riz et papier filtre	Soude 1% - 24h	WCS-6 - enrichi à partir de compost	batch statique thermophile	-	Dégradation de 81,3% de la paille de riz	Wang et al. (2011)
Herbe à éléphants et avicel	Broyage en micro-poudre	Enrichi à partir de compost	batch anaérobie thermophile	Acétate : jusqu'à 1,1 g/L	Ethanol: jusqu'à 1,6 g/L	Lin et al. (2011)
Millet vivace	Extraction à l'éthanol 1,5 jrs puis à l'eau 2 jrs	Enrichi à partir de compost	batch aérobie thermophile	Xylanase 55 U/g - CMCase 7,8 U/g	Dégradation de 34% du millet	Reddy et al. (2011)
Rafles de maïs	Extraction à l'éthanol 1,5 jrs puis à l'eau 2 jrs	Enrichi à partir de compost	batch aérobie thermophile	Xylanase 3,5 U/g - CMCase 1,8 U/g	Dégradation de 23% des rafles de maïs	Reddy et al. (2011)
Herbe à éléphants	Broyage à 1 mm	Enrichi à partir de rumen bovin	batch anaérobie mésophile	H ₂ : jusqu'à 50 mL (pour 15 g/L de substrat)	Dégradation de 21,1% de l'herbe à éléphants	Chang et al. (2010)
Paille de riz et papier filtre	Soude 15 g/L - 48h	Enrichi à partir d'intestin de larve de scarabé	batch statique mésophile	-	Dégradation de 83,1% de la paille de riz	Sheng et al. (2016)
Rafles de maïs et fumier porcin	Chaux 100°C - 1h	Rumen bovin + compost + marais	Fermenteur rotatif semi-continu anaérobie contre-courant à 4 étages thermophile	AGV : jusqu'à 24,4 g/L	Dégradation jusqu'à 77% du substrat - Procédé MixAlco™	Thanakoses et al. (2002)
Bagasse prétraitée et fumier de volaille	Imprégnation chaux-air à 50°C - 8 semaines	Microorganismes marins	Fermenteur rotatif semi-continu anaérobie contre-courant à 4 étages thermophile	AGV : jusqu'à 40,2 g/L	Dégradation jusqu'à 60% du substrat - Procédé MixAlco™	Fu et Holtzapfle (2011)
Chute de papier de bureau recyclé	-	Cultures mixtes dérivées de sols	Fermenteur rotatif semi-continu anaérobie contre-courant à 4 étages thermophile	AGV : jusqu'à 16,6 g/L	Dégradation jusqu'à 43% du substrat - Procédé MixAlco™	Forrest et al. (2012)

De manière intéressante, il est possible de remarquer dans les tables II-7 et II-8 que la sélection de consortia a beaucoup été orientée vers la production d’enzymes lignocellulolytiques en conditions statiques ou aérobies, pour le prétraitement biologique de la biomasse lignocellulosique (Guo et al., 2010 ; Wongwilaiwalin et al., 2010, Wang et al., 2011 ; Reddy et al., 2011). Pourtant la plateforme des carboxylates (nécessitant des conditions d’anaérobiose) tend à être reconnue comme plus viable économiquement que les plateformes des combustibles et des sucres (Kim et al., 2013 ; Menon et Rao, 2012). D’autre part, de nombreuses études emploient des substrats simplifiés ou prétraités et ne reflètent donc potentiellement pas uniquement l’activité des consortia microbiens mis en œuvre. Pourtant quelques études ont pu démontrer l’intérêt des consortia sur des substrats bruts ou n’ayant subi qu’une réduction de taille de particules (Feng et al., 2011 ; Cheng et al., 2009).

Alors que nous avons suggéré les intérêts de la plateforme des carboxylates ainsi que ceux des écosystèmes microbiens naturels, nous nous proposons à présent d’étudier deux écosystèmes environnementaux symbiotiques producteurs d’acides organiques, connus et étudiés pour leur flore microbienne et leur potentialité de dégradation de la biomasse lignocellulosique : l’intestin du termite et le rumen bovin.

II.3.2.1. Flore microbienne intestinale des termites

Le termite est un insecte capable de dégrader la matière organique sous toutes ces formes. Les termites sont parmi les insectes les plus abondants sur Terre, dont plus de 2600 espèces différentes ont été décrites (Kambhampati and Eggleton, 2000). Les termites jouent un rôle important dans la dégradation de la matière organique et dans le cycle global du carbone (Eggleton, 2010).

En ~150 millions d’années, les termites ont développé différentes stratégies digestives et systèmes intestinaux symbiotiques pour digérer la lignocellulose (König et al., 2013). Tous les termites ont en commun l’existence d’une symbiose microbienne dans leur intestin, qui contribue à la régulation de l’azote ainsi qu’à la production de produits fermentaires tels qu’acétate, propionate et autres AGV, utilisés comme source d’énergie oxydable pour l’hôte termite (Breznak et Brune, 1994). En retour, le microbiote bénéficie d’un environnement stable et d’une ressource de nutriments.

Comme les termites évoluent dans un environnement pauvre en azote, le comportement symbiotique est essentiel pour eux, car leur flore microbienne leur permet en outre de faciliter la dégradation de la biomasse lignocellulosique, de minéraliser l’azote.

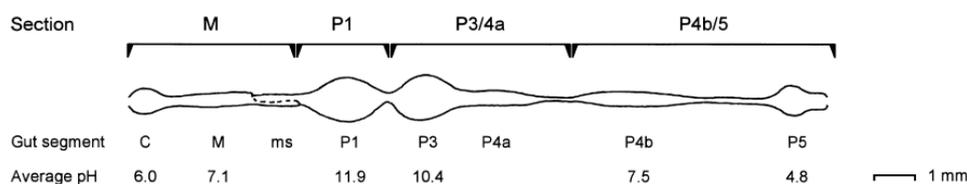
Selon Bignell et Eggleton (2000), les termites peuvent être subdivisés en cinq groupes majeurs en fonction de leur régimes alimentaires, i) mangeurs de sols, ii) mangeurs de l’interface sol/bois (sous-sol ou bois très dégradé) aussi connus sous le nom de mangeurs intermédiaires, iii) mangeurs de bois ou xylophages, iv) mangeurs de litière ou humivores et v) mangeurs d’herbe ou fourrageurs. De plus, d’autres espèces se nourrissent d’autres substrats (comme de lichens, d’algues ou de mousses) et constituent des groupes alimentaires mineurs. Les groupes de régimes alimentaires sont plutôt bien reconnus dans le domaine de l’écologie des termites, mais ne sont pas clairement adaptés à leur définition, car en fonction des conditions écologiques certaines espèces peuvent se nourrir d’autre régime que celui qui leur est reconnu (Donovan et al., 2001).

Les termites sont aussi divisés en sept familles, les Termitidae étant la plus grande, regroupant 75% des termites connus et présentant différents régimes alimentaires (Ni et Tokuda, 2013). Six familles (Mastotermitidae, Kalotermitidae, Termopsidae, Hodotermitidae, Rhinotermitidae and Serritermitidae) abritent des eucaryotes protozoaires flagellés (en plus des archaea et bactéries) dans leur intestin et sont appelés termites inférieurs, alors que les espèces de la famille Termitidae, aussi appelés termites supérieurs, n’accueillent pas d’eucaryotes et ne présentent de symbiose qu’avec des bactéries et des archaea (Lo and Eggleton, 2010).

Les termites inférieurs, représentant 25% de l’ensemble des termites, sont xylophages et ont été largement étudiés en vertu de leur caractère nuisible (Su et Scheffrahn, 2000). Il est largement reconnu que les protozoaires flagellés du microbiote intestinal des termites inférieurs, appartenant aux groupes Oxymonadida, Trichomonadida et Hypermastigida, possèdent des activités cellulolytiques (Cleveland, 1923 ; Nakashima et al., 2002). Il a cependant fallu attendre l’avènement des techniques de biologie moléculaire (qPCR puis séquençage) pour mettre en évidence la présence de cellulases endogènes, c’est-à-dire produites par l’hôte termite lui-même (Watanabe et al., 1998 ; Tokuda et al., 2007). En d’autres termes, cela signifie que les cellulases de l’hôte et de la flore protiste agissent selon un « système dualiste pour la dégradation de la cellulose » (Tokuda et al., 2007).

Les termites supérieurs, qui possèdent une flore exclusivement bactérienne et archaea ainsi qu’un fort niveau de compartimentation, sont regroupés en i) termites champignonnistes, essentiellement xylophages, et ii) non champignonnistes, humivores ou xylophages (Radek, 1999). Les premiers vivent en ectosymbiose avec un champignon supérieur lignolytique (*Termitomyces*). Le champignon prédigère la biomasse pour la rendre plus facilement accessible pour le termite (Yang et al., 2014). L’ingestion du champignon permet probablement d’apporter des activités enzymatiques manquantes chez le termite, bien que la nature et l’importance de cet apport varient d’une espèce à une autre (Radek, 1999).

Les termites humivores représentent 50% des espèces de termites et sont capables de dégrader l’acide humique et l’(hémi)cellulose (Kappler et Brune, 1999). L’importance du pH et de la présence d’oxygène a pu être démontrée sur la désorption de l’acide humique de la matrice minérale, ainsi que sur sa solubilisation (Kappler et Brune, 1999). Dans le segment proctodéale 1 – P1, le pH très alcalin (pH 12) et la présence d’oxygène favorisent la solubilisation et l’auto-oxydation de l’acide humique (soluble à pH basique) (Figure II-13).



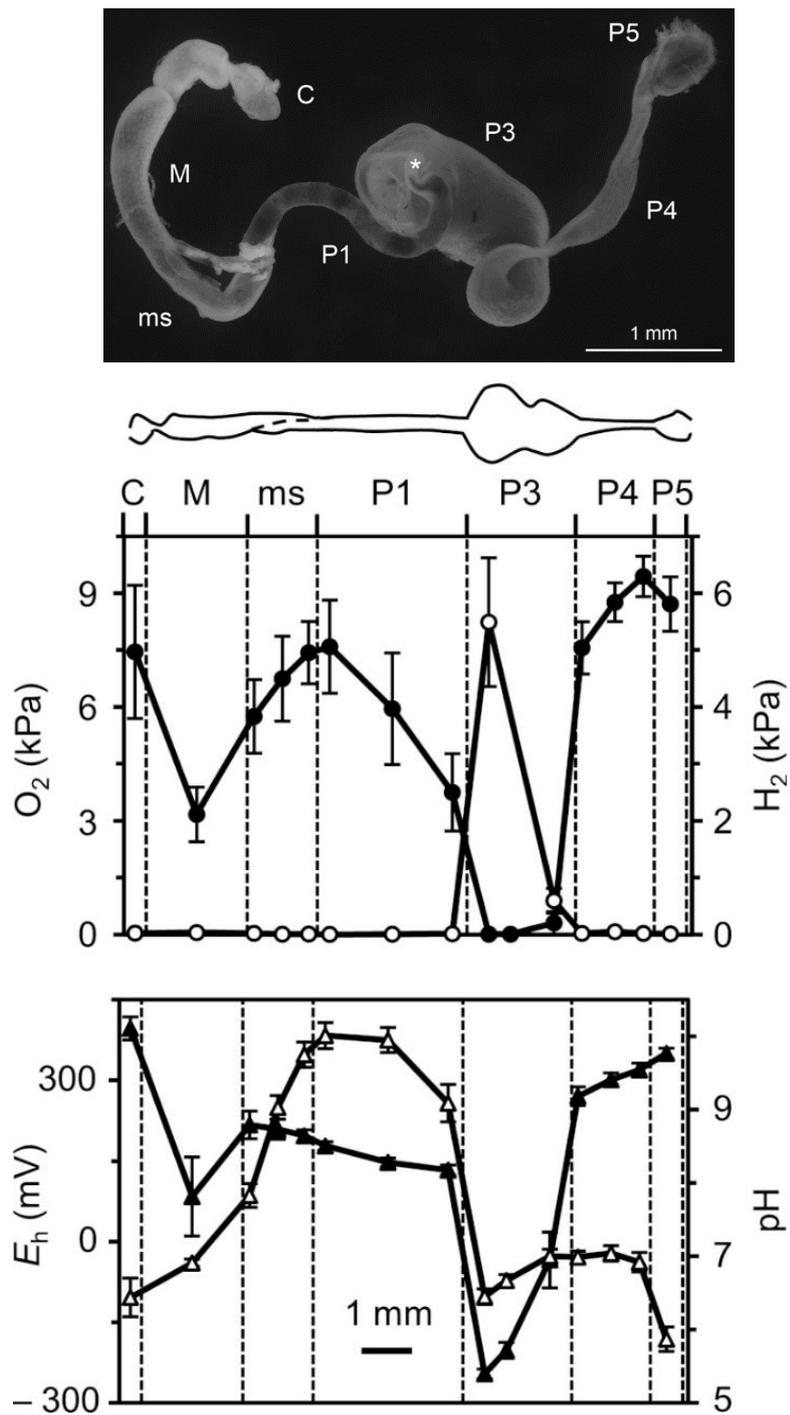
C : Crop (Jabot) ; M :Midgut (Moyen intestin) ; ms : mixed segment (segment mixte) ; Px : Proctodeal segment x (segment proctodéale x)

Figure II-13 : Tractus intestinal du termite supérieur *Cubitermes* sp. (Kappler et Brune, 1999)

Alors que la flore bactérienne intestinale des termites inférieurs est dominée par le phylum *Spirochaetes*, celle des termites supérieurs humivores est dominée par le phylum *Firmicutes* (Bignell et al., 2000 ; Santana et al., 2015 ; Dietrich et al., 2014 ; Grieco et al., 2013). En ce qui concerne les archaea, chez les termites humivores on retrouve à la fois des méthanogènes acétoclastes et des méthanogènes hydrogénotrophes. Il semblerait que les premières se trouvent principalement dans le segment P1 où la pression partielle en hydrogène est la plus faible, alors que les secondes soient dans les autres compartiments (Moletta, 2002).

Nasutitermes est sans doute le genre le plus étonnant de la famille Termitidae, car il regroupe des termites xylophages comme humivores. Le système digestif de l’espèce *Nasutitermes corniger* est très compartimenté et a été décrit par Köhler et al. (2012) (Figure II-14). Les techniques récentes de métagénomique ont permis d’appréhender la structure du microbiote intestinal du termite supérieur xylophage *Nasutitermes corniger*. Il a été montré que le compartiment P3 était la seule zone anoxique (Figure II-14), qu’elle contenait l’essentiel des bactéries du termite et que les phyla les plus représentés y étaient *Spirochaetes* et *Fibrobacteres*. Une forte production d’H₂ a aussi été relevée dans le segment P3 (Köhler et al., 2012). Finalement, le pré-intestin (segment proximal) et l’intestin moyen peuvent être vus comme des réacteurs chimio-enzymatiques de petite taille où les conditions alcalines sévères et les cellulases endogènes contribuent à l’hydrolyse partielle de la cellulose (Tokuda et al., 2012). Dans le plus volumineux post-intestin (segment distal), à pH légèrement acide (pH 6-7), les hémicelluloses et la cellulose résiduelles sont hydrolysées et métabolisées par le microbiote symbiotique (Breznak and Brune, 1994; Brune, 2014).

De manière générale, 90% des bactéries de la flore du termite sont incultivables dans des conditions usuelles, ce qui explique le manque de connaissance et de compréhension de ce biotope (Radek, 1999). Les termites vivent en communauté eusocial organisée en colonies, et dans le cadre des bioraffineries, la caste des ouvriers est particulièrement intéressante, car ses membres nourrissent la colonie et présentent les capacités de digestion les plus abouties (Ni et Tokuda, 2013). Pendant longtemps, la communauté scientifique ne savait pas si le microbiote intestinal des termites supérieurs contribuait à la dégradation de la cellulose, ou si elle était entièrement réalisée par l’hôte. Des études récentes sur *Nasutitermes* sp ont cependant montré que 50% de l’activité cellulase retrouvée dans l’intestin n’était pas associée à la production d’enzyme par l’hôte termite, mais à la flore microbienne de l’intestin distal (P3), lorsque la cellulose cristalline était utilisée comme substrat (Tokuda et Watanabe, 2007).



C : Crop (Jabot) ; M :Midgut (Moyen intestin) ; ms : mixed segment (segment mixte) ; Px : Proctodeal segment x (segment proctodéale x) ; cercles pleins : pO₂ ; cercles vides : pH₂ ; triangles pleins : potentiel rédox et triangle vide : pH

Figure II-14 : Tractus intestinal du termite supérieur *Nasutitermes corniger* (Köhler et al., 2012)

De plus, l’analyse de la flore bactérienne de la poche intestinale P3 a révélé la présence de bactéries cellulolytiques, mais aussi une large diversité de gènes codant pour des enzymes bactériennes fibrolytiques (He et al., 2013 ; Warnecke et al., 2007). De manière intéressante, hormis la présence possible d’enzymes bifonctionnelles xylanase/cellulase, il n’existe à notre connaissance, aucune étude rapportant une activité xylanolytique endogène chez les termites supérieurs, humivores comme xylophages (Ni et Tokuda, 2013). Les analyses métagénomiques sur le microbiote de l’intestin distal (P3) des termites *Nasutitermes* sp. et *Microcerotermes* (xylophage) suggèrent un nombre plus important de gènes d’enzymes hémicellulolytiques que cellulolytiques (Ni et Tokuda, 2013 ; Warnecke et al., 2007 ; Nimchua et al., 2012).

Ces dernières années, différentes approches ont cherché à révéler le potentiel réservoir enzymatique responsable de la forte dégradation de la biomasse lignocellulosique chez les termites. La production d’enzymes recombinantes à partir de gènes issus de termite ou de leur flore symbiotique a été reportée mais son potentiel d’industrialisation reste incertain (Ni et Tokuda, 2013). Au contraire, les approches d’isolement microbien (Dheeran et al., 2012; Gupta et al., 2012; Schultz and Breznak, 1978) et de méta-omiques (Franco Cairo et al., 2011; He et al., 2013; Warnecke et al., 2007) tendent à montrer que les flores microbiennes de termite et plus spécifiquement celles de termites supérieurs non champignonnistes pourraient constituer de bons candidats pour la l’enrichissement de consortia (hémi)cellulolytiques et notamment pour la dégradation des hémicelluloses. Cependant, de manière surprenante, l’écosystème intestinal des insectes phytophages n’a pas reçu suffisamment d’attention dans le cadre des bioraffineries et bioprocédés consolidés (Sheng et al., 2016).

II.3.2.2. Rumen

Le rumen est sans doute l’un des écosystèmes microbiens symbiotiques le plus étudié. En effet, son étude a débuté dans les années 1950 avec Robert Hungate, autrement appelé le père de la microbiologie ruminal (Puniya et al., 2015). Ses travaux ont permis l’établissement de protocoles de culture anaérobie pour le rumen, mais aussi pour d’autres systèmes anaérobies. Le système digestif des ruminants est complexe : l’estomac est divisé en 4 compartiments (Figure II-15), les 3 pré-estomacs que sont le rumen, le bonnet (ou *reticulum*) et le feuillet (ou *omasum*) et, enfin, la caillette (ou *abomasum*), équivalent de l’estomac.

La caillette est le seul compartiment à contenir des glandes gastriques alors que les pré-estomacs sont responsables de 80 à 90% des capacités de dégradation du tube digestif (Moletta, 2002).

Les espèces ruminantes sont des mammifères herbivores représentés par les bovins, les ovins, les caprins (chèvres), les cervidés (cerf, renne, chevreuil et élan notamment) et certains camélidés comme les girafes. Ils sont caractérisés par la rumination qui consiste en la régurgitation des aliments après leur absorption. Les aliments sont alors mâchés une seconde fois, ce qui permet de réduire la taille des particules. La rumination est pour eux un processus vital, favorisant la digestion fermentative -réalisée par la suite par les microorganismes symbiotiques - leur permettant de tirer avantage des composés fibreux, plus efficacement que tous les autres herbivores (Millen et al., 2016 ; Van Soest, 1994).

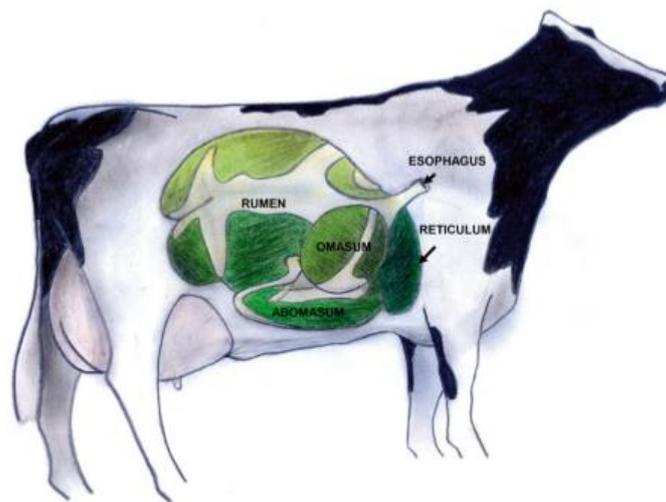


Figure II-15 : Système digestif bovin, Millen et al. (2016)

Le rumen est la première partie pré-stomacale des ruminants. C’est une poche fermentative volumineuse (jusqu’à 200 L chez les bovins), stratifiée en 3 parties. La partie dorsale contient les gaz, la partie centrale, qui représente 14 à 18% de la matière sèche, contient les plus grosses particules, et enfin la partie ventrale, constituant 6 à 9% de la matière sèche, contient les fluides (Millen et al., 2016). Bien qu’il soit triphasique et ouvert sur l’environnement extérieur, c’est un écosystème considéré comme régulé. La température est comprise entre 36 et 41°C selon l’avancée du cycle de digestion. La pression osmotique est équivalente à celle du sang (300 à 400 mosm.L⁻¹) et est régulée par des apports d’eau via le réseau vasculaire ; alors que le pH est l’un des facteurs les plus variables, compris entre 5,5 et 7, sa valeur moyenne et optimale pour la digestion se situe autour de 6-6,5 (Puniya et al., 2015, Moletta, 2002, Millen et al., 2016).

C'est aussi un écosystème riche, essentiellement anaérobie strict, et composé de bactéries (10^{10} à 10^{11} .g⁻¹ de contenu), d'archées (10^5 à 10^{10} .g⁻¹), de champignons (10^2 à 10^5 .g⁻¹) et de protozoaires (10^4 à 10^6 .g⁻¹) (Moleta, 2002 ; Puniya et al., 2015 ; Millen et al., 2016). Dans le rumen, l'écosystème microbien est responsable de la dégradation de 50 à 80% des polymères de sucres et de 40 à 70% de l'azote, ce qui correspond à 45% de la matière organique ingérée (Moleta, 2002 ; Puniya et al., 2015 ; Millen et al., 2016). La mastication joue un rôle essentiel en réduisant la taille des particules mais aussi en favorisant la colonisation de ces dernières par la flore. Certains de ces microorganismes interagissent synergiquement pour la dégradation de la matière organique et la production d'acides organiques assimilables par l'hôte ruminant au niveau de la paroi ruminale. Finalement, selon Millen et al. (2016), la flore ruminale constitue le meilleur et le plus abouti exemple de fermentation digestive microbienne.

Sur plus de 200 espèces bactériennes présentes dans le rumen, il semblerait que la majeure partie des bactéries appartiennent à 4 grands phylotypes : les bactéries Gram positif pauvre en GC (LGCGPB) - Firmicutes), les Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (CFB), les Proteobacteria, et les Spirochetes. Selon la fraction étudiée (fluide, contenu particulaire ruminal et épithélium), le régime alimentaire et les conditions ruminales, les proportions de ces phylotypes changent, mais de manière générale la fraction particulaire est plus diversifiée et plus importante en abondance (Kong et al., 2010, Millen et al., 2016). Certains genres bactériens non cellulolytiques (*Prevotella*) sont présents dans d'importantes proportions et jouent un rôle sur la dégradation, probablement par le biais d'interaction positive entre microorganisme (synergie). Par exemple, une co-culture de *R. flavefaciens* (bactérie cellulolytique) et *S. ruminicola* (non cellulolytique) conduit à une dégradation de cellulose cristalline de 23,6% après 72h d'incubation contre 21,4% et 0,2% pour respectivement *R. flavefaciens* et *S. ruminicola* en monoculture (Sawanon et Kobayashi, 2006). De manière intéressante, chez les bovins de race Holstein, les phyla Firmicutes et Bacteroidetes représenteraient plus de 90% des bactéries ruminales (Jami et Mizrahi, 2012).

Au-delà de la taxonomie, les bactéries ruminales peuvent aussi être classifiées selon leur fonction de digestion. On distingue ainsi des bactéries d'intérêt pour la dégradation de biomasse lignocellulosique, c'est-à-dire cellulolytiques (essentiellement *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flaveciens* et *Ruminococcus albus*) et hémicellulolytiques (*Butyrivibrio fibrosolven*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus flaveciens* et *Ruminococcus albus*), mais aussi des espèces spécifiques de la dégradation des plantes fourragères, c'est à dire pectinolytiques et amidolytiques (Puniya et al., 2015).

Les archées, représentées principalement par les genres *Methanobacterium* et *Methanobrevibacter*, sont des méthanogènes hydrogénotrophes et ne présentent pas d’activité hydrolytique (Janssen et Kirs, 2008). Au contraire, les champignons anaérobies appartenant à l’ordre des Chytridiales et à la famille Neocallimastigaceae produisent des enzymes lignocellulolytiques qui leur permettent, en plus de dégrader les holocelluloses, d’altérer la lignine (Choudhury et al., 2015).

Les protozoaires ruminiaux sont anaérobies, principalement ciliés et participent comme les bactéries à la dégradation des fibres, à la production de carboxylates ainsi qu’au cycle de l’azote dans le rumen. Leur contribution précise n’est pas encore bien définie, mais ils semblent permettre de stabiliser la fermentation digestive microbienne (Millen et al., 2016).

Au cours de la digestion ruminale, la production de méthane est importante (110 millions de tonnes de méthane d’origine animale/an (Moletta, 2002) bien qu’elle ne soit pas favorisée au niveau microbien. En effet, dans cet écosystème il n’y a pas de méthanogénèse acétoclaste mais seulement hydrogénotrophe, on parle alors de fermentation tronquée. L’écosystème trophique aboutit principalement à la formation d’AGV à courte chaîne (acétate, butyrate, propionate), qui constituent la source d’énergie essentielle des ruminants. Lors du transit dans l’intestin grêle, il y a lyse des microorganismes et leur contenu en vitamines et acides aminés migre alors dans le sang. Ce phénomène couvre 100% des besoins en vitamines et plus de 50% des besoins en acides aminés des ruminants (Moletta, 2002). Ainsi, le système digestif bovin, et particulièrement le rumen peut être vu comme un bioréacteur plus ou moins continu, régulé, agité par brassage et permettant la transformation essentiellement bactérienne de matière organique notamment lignocellulosique en carboxylates.

Le rumen bovin a été très étudié pour des raisons agronomiques (efficacité de la digestion, réduction de la production de méthane) (Jouany, 2011), mais l’utilisation d’enzymes ou de bactéries ruminales pourrait aussi offrir de nouvelles possibilités en matière d’additifs alimentaires animaux et de bioraffinerie, bien qu’aucune application commerciale n’ait été recensée à ce jour (Puniya et al., 2015). En effet, le rumen bovin constitue un écosystème de choix pour étudier la dégradation de la lignocellulose. Il a donné lieu à de nombreuses études qui concernent à la fois l’optimisation de la digestion anaérobie (Cheng et al., 2009), de la production d’H₂ (Chang et al., 2010) et la compréhension des enzymes et microorganismes impliqués dans la digestion et la transformation de la biomasse lignocellulosique (Hess et al., 2011; Lee et al., 2007; Jami et Mizrahi, 2012; Singh et al., 2012 ; Brulc et al., 2009).

Après cette description de la structuration d’écosystèmes symbiotiques naturels d’intérêt pour la dégradation de la biomasse lignocellulosique, nous allons nous intéresser plus précisément à la nature des enzymes impliquées dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique ainsi qu’à leur structuration et aux moyens de déterminer leur présence, leur origine microbienne et leur fonction dans de milieux complexes.

II.3.3. Enzymes impliquées dans la dégradation de la lignocellulose

Les (hémi)cellulases sont des glycosides hydrolases (GH) qui catalysent l’hydrolyse des liaisons O-glycosidiques. Elles appartiennent au groupe E.C. 3.2.1.x. Dans un premier temps elles ont été classées en familles selon les données de séquence en acides aminés du domaine catalytique. Plus récemment, les analyses de cristallographie ont permis de créer des classes d’enzymes selon la structure et le repliement de leur domaine catalytique.

L’hydrolyse de la cellulose fait intervenir trois types d’enzymes : i) endoglucanase, ii) exoglucanase et iii) β -glucosidase (Figure II-16). L’hydrolyse de l’hémicellulose repose sur des xylanases classées selon le même modèle, auxquelles s’ajoutent des activités auxiliaires de type estérase, arabinase, etc... Certaines de ces enzymes auxiliaires appartiennent au groupe des glycosyltransférases (GT) (E.C. 2.4.1.x).

En aérobiose et anaérobiose, les enzymes impliquées sont sensiblement les mêmes, du moins d’un point de vue de leur mécanisme général d’action (Himmel et al., 2010).

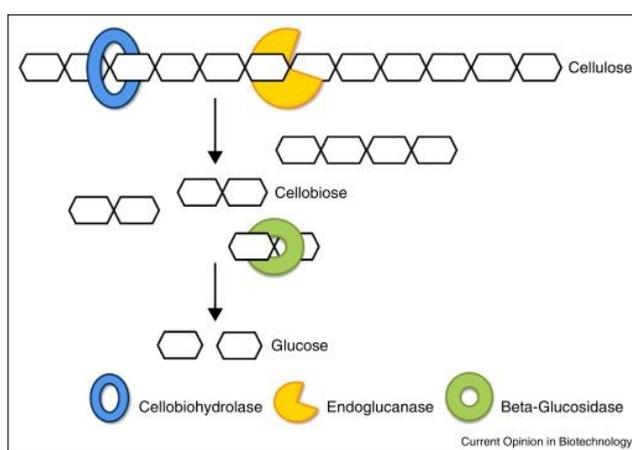
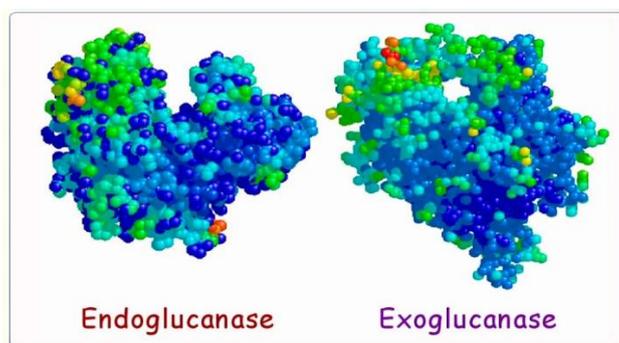


Figure II-16 : Rupture des liaisons O-glycosidiques par les cellulases (Koeck et al. 2014)

Les endoglucanases coupent aléatoirement les liaisons $\beta(1-4)$ des polymères de cellulose, principalement dans les zones amorphes. Elles diminuent ainsi le degré de polymérisation et libèrent des extrémités libres pour les exoglucanases. Elles présentent un site catalytique en forme de crevasse (Figure II-17) qui leur permet un positionnement aléatoire (Teeri, 1997) et la plupart possèdent un site de liaison à la cellulose (carbohydrate ou cellulose binding module -CBM). Elles montrent de bonnes activités sur des substrats solubles ayant un degré de polymérisation supérieur à 3. Elles ne sont pas capables d’hydrolyser le cellobiose et sont inhibées par celui-ci. En effet, il a été montré que chez *T. reesei*, leur activité est réduite de 10 à 50% par 50 mM de cellobiose alors qu’elle ne l’est pas avec 200 mM de glucose (Macarron et al., 1993).

Les exoglucanases, aussi appelées cellobiohydrolases (CBH), attaquent aux extrémités de la cellulose de façon processive et libèrent majoritairement du cellobiose. On distingue deux types d’exoglucanases : CBH I et CBH II qui agissent sur les extrémités réductrices et non réductrices de la cellulose, respectivement. Tout comme les endoglucanases, les exoglucanases ne peuvent pas (ou très rarement) hydrolyser le cellobiose. Elles présentent également un CBD et un domaine catalytique, mais ce dernier est en forme de tunnel (Teeri, 1997) (Figure II-17). Chez *T. reesei*, la structure du domaine catalytique est différente entre CBI et CBII. Le premier comporte 4 boucles (Divne et al., 1994) et le second seulement deux (Rouvinen et al., 1990). Cette structure en tunnel leur confère leur forte processivité et leur différence pourrait expliquer leur spécificité d’action.

Les exoglucanases sont inhibées par le cellobiose et, de manière moins importante, par le glucose. Cependant, contrairement aux endoglucanases, elles présentent de faibles activités sur les substrats solubles de très faible degré de polymérisation ($DP < 6$) (Nidetzky et al., 1994). Cela confirme le mode d’action processif, nécessitant la liaison d’unités de glucose au site actif.



Structure quaternaire des endoglucanases en forme de crevasse et des exoglucanases en forme de tunnel.

Figure II-17 : Structure du domaine catalytique des endoglucanases et exoglucanases

La β -glucosidase hydrolyse le cellobiose en glucose. De ce fait, la β -glucosidase est un régulateur de l’hydrolyse de la lignocellulose, puisqu’elle permet de réduire l’inhibition des endo- et exoglucanases par le cellobiose. Elle est inhibée par son produit, le glucose.

Les enzymes produites par *T. reesei* sont les plus utilisées pour la dégradation de la lignocellulose dans des procédés industriels, mais elles doivent être supplémentées en β -glucosidase. En rajoutant cette dernière, la dégradation de la cellulose augmente de 40% (Berlin et al., 2007).

La dégradation de la lignocellulose par des cocktails enzymatiques a engendré des études sur les synergies entre les enzymes. La dégradation de la cellulose est, en effet, le fruit d’actions coordonnées de plusieurs enzymes. On distingue plusieurs types de synergies, exo-exo, endo-exo, glucanase-glucosidase et cellulases-hémicellulases (Lynd et al., 2002). Les trois dernières sont les plus faciles à saisir. Les hémicellulases déstructurent les hémicelluloses, libérant ainsi de nouveaux polymères de celluloses et facilitant l’action des cellulases. Les glucosidases consomment les produits inhibiteurs des cellulases et les endoglucanase produisent des polymères de plus courte taille augmentant ainsi le nombre d’extrémités réductrices accessibles pour les exoglucanases.

La synergie exo-exo fait référence à l’action combinée de CBH I et CBH II. Elle s’expliquerait par la formation en solution d’un complexe relâché entre les deux enzymes qui permettrait notamment de favoriser l’adhésion de CBH II (Tomme et al., 1990).

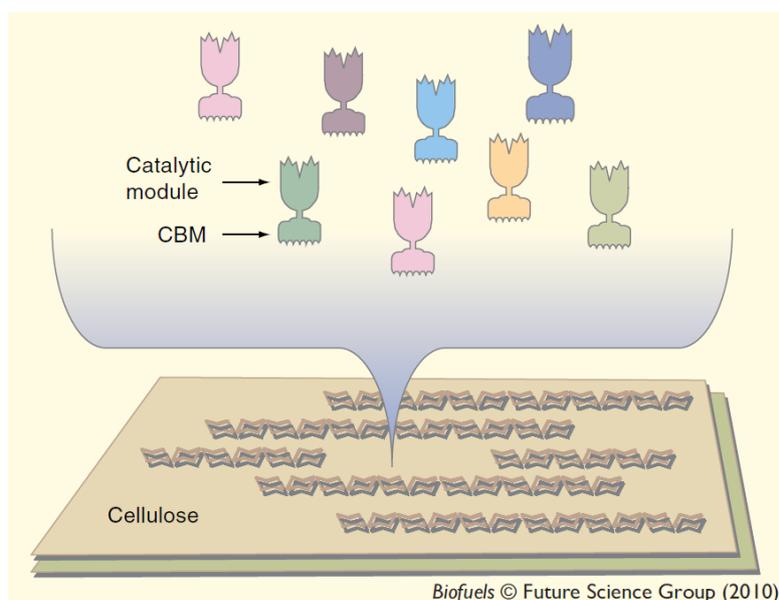
En ce qui concerne les xylanases, les endoxylanases montrent de faibles activités sur les oligopolymères, alors que pour les exoxylanases certaines favorisent l’hydrolyse des polymères courts et d’autre celle des plus longs. L’équivalent de la glucosidase est la xylosidase. Le degré de synergie nécessaire à la dégradation du polymère de xylane est d’autant plus important que sa complexité augmente. Ainsi la présence d’une synergie entre xylanases et enzymes auxiliaires a pu être démontrée (Sørensen et al., 2003).

II.3.3.1. Structuration du système enzymatique lignocellulolytique

Comme nous l’avons déjà abordé, la structuration des enzymes lignocellulolytiques est très différente en conditions aérobie et anaérobie. Alors que les enzymes sont libérées dans le milieu chez les microorganismes aérobies, elles se présentent aussi sous forme de cellulosomes chez les microorganismes anaérobies.

II.3.3.1.1. Structuration enzymatique aérobie

Les microorganismes cellulolytiques aérobies présentent des enzymes sous forme libre, c’est-à-dire qu’elles sont excrétées dans la phase liquide. Elles présentent un module catalytique et un CBM. Le CBM est une structure conservée qui permettrait le rapprochement de l’enzyme avec la chaîne polymérique hydrophobe pour assurer une configuration favorisant l’activité du module catalytique (Himmel et al., 2011). Ce CBM présente une surface plane (Figure II-18) constituée de chaînes latérales aromatiques. Chez les champignons aérobies, le CBM des cellulases est petit et se constitue de 30 à 35 résidus aminoacides alors que chez les bactéries aérobies il atteint 100 à 150 acides aminés (Himmel et al., 2010). Il a d’abord été découvert pour des cellulases (Cellulose Binding Domain sur la Figure II-18), mais en 2011, 15 structures de CBM complexées à leur ligand et appartenant à 10 familles d’enzymes de dégradation de cellulose, hémicellulose et amidon ont été résolues (Boraston et al., 2004).



CBM : Carbohydate ou Cellulose Binding Domain

Figure II-18 : Interaction des cellulases libres avec leur substrat insoluble rencontrée chez les microorganismes aérobies Himmel et al. (2010)

Ces CBM assureraient trois fonctions. Ils permettraient d’augmenter la proximité entre l’enzyme et son substrat, augmentant ainsi la concentration d’enzymes à la surface du polymère insoluble. Ils joueraient un rôle en termes de spécificité de l’enzyme, en ciblant le substrat préférentiel de l’enzyme.

On retrouve d’ailleurs, des CBM qui peuvent se lier avec des substrats différents et d’autres spécifiques. De manière associée, ces enzymes possèdent des sites catalytiques pour plusieurs substrats ou spécifiques à un seul. Enfin, les CBM possèderaient probablement un rôle de perturbation non catalytique de la structure du substrat. Des études ont pu montrer une diminution de l’activité sur des enzymes possédant une mutation correspondant au CBM (Boraston et al., 2004).

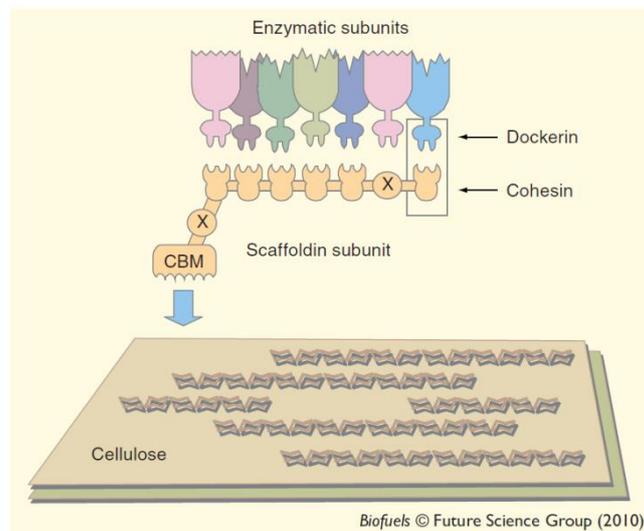
Certains microorganismes aérobies sont capables de dégrader la lignine via une enzyme à 4 atomes de cuivres, la laccase. Cette enzyme est présente majoritairement chez des champignons des genres *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* et *Deuteromycetes*, mais existe aussi chez des bactéries comme *Bacillus subtilis* et des insectes comme le termite (Alcalde, 2007). L’oxydation des polyphénols, aromatiques ou non, est réalisée via la réduction de l’oxygène et est donc spécifique de la dégradation aérobie. Ces enzymes lignolytiques semblent présenter un vif intérêt en termes de prétraitement biologique de la biomasse, bien que leur efficacité dépende de la biomasse lignocellulosique considérée (Moilanen et al., 2011).

II.3.3.1.2. Structuration enzymatique anaérobie

L’hydrolyse anaérobie est très différente du point de vue de la proximité enzyme substrat. Alors qu’en aérobie, une importante quantité d’enzymes peut être synthétisée, car énergétiquement la dégradation de la lignocellulose est très rentable, en anaérobie la stratégie est différente. D’une part, la proximité enzyme substrat est établie par l’organisation d’un complexe enzymatique appelé cellulosome (Figure II-19). Aussi, notamment pour les bactéries du rumen bovin (comme *F. succinogenes*) l’adhésion est renforcée par la présence d’un fin glycocalice glycoprotéiné. Il est supposé que la synthèse de ce glycocalice puisse jouer un rôle dans la réoxydation des cofacteurs réduits. L’organisation en cellulosome et la présence d’un glycocalice apportent des avantages essentiels aux bactéries cellulolytiques anaérobies. Cela leur permet de concentrer leur enzymes à la surface du substrat, elles bénéficient alors d’un accès privilégié aux produits de dégradation et sont protégées des protéases et autres toxiques présents dans le milieu (Lynd et al., 2002).

La sous-unité d’échafaudage (scaffoldin) se compose de plusieurs modules de cohésines qui sont susceptibles d’accueillir différentes enzymes, ainsi que des CBM qui permettent le lien et la reconnaissance du substrat.

La sous-unité catalytique est constituée d’un module d’arrimage (dockerin), permettant d’établir le lien entre cohésines et enzymes (Himmel et al., 2010).

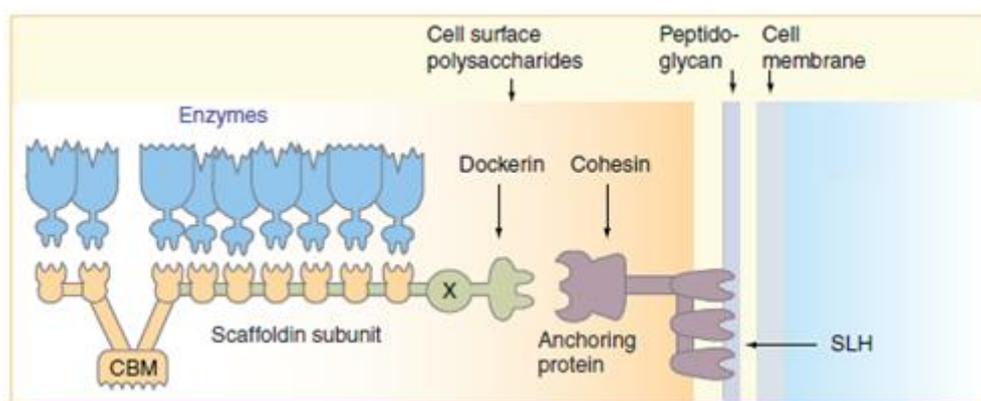


CBM : Carbohydrate Binding Module ou Cellulose Binding Domain ; X : module de liaison ; Scaffoldin subunit : sous-unité d’échafaudage ; Cohesin : module de cohésine ; Dockerin : module d’arrimage ; Enzymatic subunits : sous-unités enzymatiques

Figure II-19 : Interaction entre le cellulosome des microorganismes anaérobies et le substrat cellulosique, Himmel et al. (2010)

Cette structure complexe permet d’apporter et de concentrer au niveau du substrat une importante quantité d’enzymes d’activités complémentaires. On pourrait penser que cette forte concentration enzymatique réduise le niveau de synergie entre enzymes. En effet, il a été établi que le niveau de synergie et de concentration en enzymes étaient inversement corrélés, par génération notamment d’une gêne stérique et conformationnelle. Dans les faits, le cellulosome fait preuve d’une grande flexibilité. Des modules de liaison de la sous-unité d’échafaudage (X sur les Figures II-19 et II-20) permettent d’ajouter de l’espace. Certains types de modules d’arrimage peuvent se présenter sous différentes conformations, permettant de moduler l’orientation du domaine catalytique au sein du cellulosome (Himmel et al., 2010). En désignant un cellulosome composé de xylanases et de cellulases, il a été montré que cette configuration permettait de multiplier l’activité globale d’hydrolyse de paille de blé par ~2,4 (Morais et al., 2010).

Le cellulosome se situe en surface des cellules et participe fortement à la formation du complexe bactérie-substrat-enzyme. Il peut cependant être relargué dans le milieu extracellulaire, ou au contraire être « physiquement » attaché à la surface cellulaire via des protéines d’encrage (Figure II-20). Ces protéines présentent une homologie avec la couche de surface des bactéries (S-Layer) (Himmel et al., 2010).



CBM : Carbohydrate Binding Module ou Cellulose Binding Domain ; X : module de liaison ; Scaffoldin subunit : sous-unité d’échafaudage ; Cohesin : module de cohésine ; Dockerin : module d’arrimage ; Anchoring protein : protéine d’ancrage ; SLH : S-Layer Homology : Homologie avec la couche S

Figure II-20 : Attachement du cellulosome à la surface bactérienne (Himmel et al., 2010)

Au travers de ce bref état des connaissances sur la dégradation enzymatique de la lignocellulose, il apparaît que pour contrer la complexité de la structure et de la composition des biomasses lignocellulosique, les systèmes enzymatiques présentent une complexité et une diversité de mécanismes dépendant des conditions extérieures. A cela il faut ajouter qu’il existe une diversité d’enzymes, différenciées par leur séquence peptidique, supportant *a priori* les mêmes types de fonctions. Face à cette complexité et grâce aux avancées technologiques (cristallographie, séquençage haut débit), les scientifiques ont répertorié et classifié les données connues sur les enzymes lignocellulolytiques sous forme de classification et de base de données, accessibles en ligne.

Ainsi, la classification CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes, initiée par Bernard Henrissat en 1991) a donné lieu à la base de données CAZy -développée en 1999 (Cantarel et al., 2009)– ainsi qu’à la CAZyedia (encyclopédie des CAZymes), constituant la seule ressource actualisée régulièrement et corrélant séquence, structure et mécanisme moléculaire des CAZymes (Lombard et al., 2014).

En 2013, la base de données CAZy présentait des informations relatives à 340 000 séquences protéiques de CAZymes, dont 12700 étaient caractérisées biochimiquement. Parmi ces protéines, la structure tridimensionnelle d’uniquement 1400 CAZymes avait été résolue (Lombard et al., 2014), démontrant que, bien que la connaissance accumulée soit colossale, elle est loin d’être exhaustive. Néanmoins, cette base de données propose une division des CAZymes en classes, familles et sous-familles, basée sur leur domaine fonctionnel, leur séquence protéique et leur phylogénie (Henrissat et Romeu, 1995). Le CAZome d’un microorganisme donné est défini comme l’ensemble des CAZymes codées par le génome de cet organisme. Ce CAZome correspond généralement à 1-5% des séquences codantes prédites (Davies et al., 2005; Lombard et al., 2014). La comparaison des CAZomes entre organismes peut alors mettre en évidence l’adaptation de l’arsenal de CAZymes en réponse à l’environnement.

A l’heure actuelle il existe 6 classes de CAZymes : les glycoside hydrolases (GHs), les carbohydrate binding modules (CBMs), les glycosyltransférases (GTs), les polysaccharides lyases (PLs), les carbohydrates estérases (CEs) et les activités auxiliaires (AAs). Les classes CE, GH et PL sont connues comme “cell wall degrading enzymes (CWDEs) de par leur rôle important dans la dégradation de la biomasse végétale par les microorganismes fongiques et bactériens.

D’après le site internet CAZy (Juillet 2017), les GHs hydrolysent la liaison glycosidique entre deux carbohydrates ou plus, ou entre un carbohydrate et une moitié non sucrée telle qu’un lipide ou une protéine et sont regroupées en 145 familles. Les enzymes de la classe PL, dégradant les glycosaminoglycanes et la pectine, sont regroupées en 27 familles. Les CEs, regroupées en 16 familles, catalysent la dé-O ou dé-N acylation des esters ou des amides et des autres substitués sucrés dans lesquels les sucres jouent le rôle d’alcool ou d’amine. Les CBMs, déjà décrits précédemment, sont des modules des enzymes dégradant les sucres insolubles et regroupés en 81 familles. La classe des AAs est plus récente et rassemble des enzymes rédox qui agissent en conjugaison avec les CAZymes. Elle regroupe 13 familles liées à la dégradation de la lignine. Bien que décrire l’ensemble des CAZymes impliquées dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique soit complexe, les GHs sont connues comme la classe qui contribue majoritairement à l’activité catalytique lignocellulolytique, notamment chez les champignons (Murphy et al., 2011).

De nombreuses enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose sont retrouvées dans les familles GH1, 3, 5, 6, 8, 9, 12, 30, 51, 74, 44, 45, 48, 55, 63, 64 et 116 ; ainsi que dans celle des hémicelluloses, dans les familles GH3, 9, 10, 11, 12, 30, 43, 39, 51, 52, 54, 62, 74 et 116 (Abot et al., 2016 ; Zhu et al., 2016 ; Warnecke et al., 2007 ; Singh et al., 2014 ; Hess et al. 2011).

Depuis une vingtaine d’années, des techniques complexes appelées omiques (omics) permettent d’acquérir des données à toutes les échelles biologiques (gènes, transcrits, protéines, métabolites) et contribuent largement à la création et à l’amélioration de bases de données. Néanmoins, des techniques classiques, plus simples, sont également pertinentes pour évaluer les activités enzymatiques présentes dans un échantillon donné. Les protocoles de dosage des activités enzymatiques consistent à faire réagir en conditions contrôlées l’échantillon (contenant les enzymes à doser) avec un substrat mimant la réaction enzymatique. La transformation du substrat peut alors être suivie en cinétique ou simplement déterminée en un temps donné. Bien que de nombreux substrats soient aujourd’hui disponibles pour caractériser les activités lignocellulolytiques, des substrats plus spécifiques sont toujours en cours de développement. Aussi, des techniques de fractionnement ont été développées pour mieux distinguer les systèmes enzymatiques libres et attachés. Ces aspects ne seront pas détaillés ici mais sont présentés dans l’annexe 1. Contrairement aux omiques, ces techniques ne sont pas en mesure de différencier les enzymes produites par différents microorganismes mais offrent l’avantage de pouvoir appréhender le potentiel lignocellulolytique global d’un échantillon.

Aussi, nous nous proposons d’aborder, dans la partie suivante, les plus récentes techniques omiques et métaomiques et notamment leur application à des écosystèmes naturels ou des consortia microbiens enrichis présentant une activité de dégradation de la biomasse lignocellulosique.

II.3.3.2 Apport des techniques omiques à l’étude de la dégradation de la biomasse lignocellulosique par des écosystèmes lignocellulolytiques

Depuis une dizaine d’années les techniques omiques, regroupant la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique, ainsi que leur correspondant méta-omiques, sont en essor et permettent d’explorer la structuration taxonomique et fonctionnelle des consortia microbiens.

Ces méthodes étant applicables à de nombreux champs de recherche, nous nous concentrerons ici que sur les études en lien avec la dégradation de la biomasse lignocellulosique.

Parmi la branche des techniques hautes résolutions des méta-omiques, on distingue la métagénomique fonctionnelle (screening fonctionnel d’un métagénome dans un hôte modèle), la métagénomique computationnelle et la métranscriptomique (basées sur les techniques de séquençage à très haute résolution de l’ADN et l’ARN, respectivement), la métaprotéomique (l’identification de l’ensemble des protéines) et la métabolomique (profile de tous les métabolites).

La métaprotéomique, aussi appelée protéomique des communautés (Armengaud et al., 2013) a été définie par Wilmes et Bond (2004) comme « la caractérisation à grande échelle de la totalité des protéines d’un microbiote environnemental à un instant donné ». Elle permet d’appréhender à la fois les unités cataboliques principales (protéines) des populations microbiennes d’environnement variés, contrôlés ou non, ainsi que leur taxonomie. Elle offre donc la possibilité d’établir des liens génotype-phénotype. Néanmoins, selon les techniques utilisées et les environnements analysés (profondeur d’analyse et niveau d’information déjà existant), elle est associée à la métagénomique, pour permettre d’apporter des informations complémentaires pour l’annotation génomique et métagénomique. En visant à la compréhension du lien entre présence de séquences génomiques et fonctions métaboliques au sein des communautés microbiennes, l’association de ces techniques a pour but ultime l’identification et la compréhension holistique des interactions et interdépendances symbiotiques des écosystèmes microbiens.

Plusieurs études de métaprotéomique ont été menées ces 10 dernières années sur des communautés microbiennes mixtes *in situ* ou issues d’environnements contrôlés et d’origines variées tels que les boues activées, les biofilms de drainage des mines acides, les systèmes marins, les eaux de surface, les sols ou encore le microbiote gastro-intestinal humain (Wilmes et al., 2015).

Quelques études se sont aussi penchées plus précisément sur la dégradation de la lignocellulose au travers d’approches méta-omiques (Bize et al., 2015; Brulc et al., 2009; DeAngelis et al., 2010; Hanreich et al., 2013; Hess et al., 2011; Kohrs et al., 2015; Lü et al., 2014; Singh et al., 2014; Warnecke et al., 2007; Wongwilaiwalin et al., 2013; Zhou et al., 2014) et ont permis d’accélérer considérablement la découverte de nouvelles CAZymes CWDEs (Abot et al., 2016).

Avec une approche de métagénomique, Wongwilaiwalin et al. (2013) ont pu mettre en évidence la structuration fonctionnelle et les capacités métaboliques d’un consortium (BGC-1) issu de canne à sucre et enrichi sur paille de riz. Alors qu’au niveau taxonomique la communauté était dominée par des bactéries des phyla Firmicutes (50%) et Bacteroidetes (24%), l’analyse des gènes codant pour des GH putatives ont révélé 26 familles différentes, les plus abondamment représentées appartenant aux familles GH2, 3, 5, 9, 10, 28, 51 et 78.

Brulc et al. (2009) ont réalisé une étude métagénomique de trois échantillons de rumen bovin, mettant en évidence que l’attaque initiale des fibres ingérées était réalisée par des microorganismes dégradant la fraction facilement dégradable de la biomasse lignocellulosique (et pas la plus récalcitrante). De manière intéressante, la comparaison de données obtenues sur les communautés microbiennes de rumen et termite (Singh et al., 2014) suggère que la flore de termite contient plus de protéines impliquées dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique que le rumen (cellulose – CBM6, GH5,9,44 et 74 , hémicelluloses – GH10 et 11) mais moins d’enzymes accessoires (pour la dégradation des plantes fourragères plus facilement fermentescibles), ce qui pourrait s’expliquer par leur régime alimentaire (Wongwilaiwalin et al., 2013 ; Warnecke et al., 2007, Brulc et al., 2009).

En bioréacteurs de digestion anaérobie de paille et de foins et avec une approche de métaprotéomique, Hanreich et al. (2013) ont aussi observé une dominance des phyla Firmicutes et Bacteroidetes et une surprenante abondance de protéines de transport des sucres, mais peu d’enzymes impliquées dans la dégradation des polymères structuraux. Les auteurs suggéraient que les Firmicutes soient principalement impliqués dans la dégradation du substrat malgré le faible nombre d’enzymes identifiées.

En environnement thermophile, D’haeseleer et al. (2013) rapportent l’étude protéogénomique d’un consortium issu de compost et adapté à la dégradation de miscanthus (aussi appelé napier grass ou herbe à éléphant). La majeure partie des GHs étaient impliquées dans la déconstruction de l’hémicellulose (GH10, 51, 74 et 2), ou de l’amidon (GH13 et 31) et peu dans la dégradation de la cellulose (GH1, 3, 5 et 9). De manière surprenante, de nombreuses isomérases de sucres ont été retrouvées, questionnant leur implication potentielle dans la dégradation du substrat.

De la même manière, d’autres études se sont concentrées sur l’étude métagénomique de consortia microbiens issus de composts aérobies ou aérobies facultatifs (Alessi et al., 2017, Zhu et al., 2016 ; Jimenez et al., 2015). Dans ces études les membres des Proteobacteria (Alessi et al., 2017), Bacteroidetes (Jimenez et al., 2015 ; Alessi et al., 2017) et Firmicutes (Zhu et al., 2016) étaient les principaux producteurs de protéines. En étudiant la structuration fonctionnelle de communautés microbiennes sur substrats simplifiés, Zhu et al. (2016) et Jimenez et al. (2015) ont pu suggérer la présence de synergies au sein des communautés cultivées sur substrats complexes. Prises ensemble, ces études ont montré la production de protéines dirigées vers la dégradation de substrats lignocellulosiques appartenant aux familles de GH, GH2, 3, 5, 6, 10, 11, 39, 43, 51, 67, 95.

Finalement, en regroupant de nombreuses études de métagénomique (métagénomique, transcriptomique et protéomique) menées sur des écosystèmes hydrolytiques et considérant les Cazymes (Zhu et al., 2016 ; Marynowska et al., 2017 ; Wongwilaiwalin et al., 2013 ; Warnecke et al., 2007 ; Wang et al., 2016 ; Brulc et al., 2009 ; Hess et al., 2011 ; Suen et al., 2010 ; Singh et al., 2014 ; Zhu et al., 2016 ; Hanreich et al., 2013 ; Lü et al., 2014 ; Jimenez et al., 2015), nous avons identifié 40 familles de GH dirigées vers la dégradation des parois cellulaires des végétaux, pouvant être décrites par leur fonction potentielle admise (Table II-9). Parmi ces familles (classées de gauche à droite par nombre d’occurrence décroissant dans la Table II-9) 16 étaient retrouvées dans au moins la moitié des études (en gras dans la Table II-9).

Table II-9 : Principales familles de GH dirigées contre les parois cellulaires des végétaux et retrouvées dans des écosystèmes lignocellulolytiques

Function principale putative	Familles de GH															
Cellulases	5	9	16	48	44	45	74	6	17	7						
Endohemicellulases	10	26	8	11	28	53	12									
Enzymes débranchantes	78	67	51	62	54											
Enzymes dégradant les oligosaccharides	1	35	42	2	3	39	4	29	43	38	27	94	52	92	32	117
Enzymes dégradant l’amidon	31	13														

Familles classées de gauche à droite par nombre d’occurrence décroissant dans les études méta-omics de Zhu et al., 2016 ; Marynowska et al., 2017 ; Wongwilaiwalin et al., 2013 ; Warnecke et al., 2007 ; Wang et al., 2016 ; Brulc et al., 2009 ; Hess et al., 2011 ; Suen et al., 2010 ; Singh et al., 2014 ; Zhu et al., 2016 ; Hanreich et al., 2013 ; Lü et al., 2014 ; Jimenez et al., 2015. Les familles en gras sont retrouvées dans au moins la moitié des études.

Ces 16 familles apparaissent donc particulièrement intéressantes et pourraient constituer un cœur de GH dirigées contre la lignocellulose. Ce cœur de GH se décrirait de cinq fonctions de dégradation principales ainsi : cellulase (GH5, 9 et 16), endo-hemicellulase (GH10, 26, 8 et 11), enzymes débranchantes (GH78), enzymes dégradant les oligosaccharides (GH1, 35, 42, 2, 3, 39 et 4) et enzymes impliquées dans la dégradation de l’amidon (GH31).

Cependant, il faut bien noter que la plupart de ces études présentent des jeux de données relativement peu conséquents (de quelques dizaines à quelques milliers de CAZymes putatives), contenant des proportions de protéines (ou gènes ou transcrits) non identifiés à ce jour. De plus, la preuve expérimentale de l’activité des enzymes n’a pas toujours été effectuée. Ainsi, ces éléments ne sont probablement pas exhaustifs et pourront être amenés à changer au cours du temps et des efforts de recherche. A titre d’exemple ; à partir de rumen bovin, Hess et al. (2011) ont identifié plus de 27 000 gènes putatifs de CAZymes dont une cinquantaine furent validés expérimentalement.

Avec un angle de vue tout à fait différent, nous voulions aussi citer deux études ayant fourni des résultats surprenants, ouvrant ainsi sur les découvertes potentielles qui peuvent être amenées par les analyses de métaprotéomique. Concernant l’étude de digesteurs anaérobies et en combinant métaprotéomique et marquage isotopique Fū et al. (2013) ont révélé une surprenante activité protéolytique. Dans le même contexte, Heyer et al. (2015) sont parvenus à identifier et proposer une protéine comme marqueur biologique de l’acidification (phénomène néfaste pour la production du méthane), montrant ainsi que le lien entre application industrielle et techniques de méta-omics est possible.

Dans l’ensemble, ces études montrent que les techniques méta-omiques permettent d’acquérir des connaissances jamais égalées concernant la dégradation de la biomasse, alimentant la compréhension de la structuration taxonomique et fonctionnelle des écosystèmes microbiens hydrolytiques. De plus, ces techniques pourraient même aboutir à des applications d’intérêt industriel (biomarqueurs). Néanmoins, le caractère encore relativement récent de ses approches nécessite de prendre des précautions quant à l’exhaustivité des données obtenues, à l’instar de l’étude de Hess et al. (2011) qui a dénombrée beaucoup plus de gènes putatifs de CAZymes que la plupart des autres études contemporaines, notamment grâce à une importante profondeur de séquençage.

II.4. Objectifs de l’étude

Comme nous avons pu le voir au travers de cette revue bibliographique, la dégradation de la biomasse lignocellulosique offre de nombreuses possibilités de valorisations. La problématique commune à ces bioprocédés est double. Elle concerne d’une part, l’augmentation des rendements d’hydrolyse de la biomasse et, d’autre part, la compréhension de la structuration et du management des consortia microbiens.

Alors que certains écosystèmes environnementaux sont connus pour leur capacité naturelle de dégradation, les cocktails enzymatiques commerciaux qui s’en inspirent ne présentent pas les mêmes capacités de dégradation. De plus, leur production par des champignons aérobies, par exemple, est couteuse (oxygène, agitation poussée, stérilisation) devant la mise en culture de flore environnementales anaérobies en conditions non stériles. Cultiver de tels inocula environnementaux pourrait être un bon moyen pour maximiser les rendements d’hydrolyse. Une étude fine des capacités de dégradation, de la diversité microbienne enrichie et des activités enzymatiques permettrait alors d’apporter des connaissances indispensables à la compréhension de ces écosystèmes et de leur activité d’hydrolyse. De plus, comme nous l’avons vu, la plateforme des carboxylates peut permettre de produire des produits chimiques et des biocarburants à partir de biomasse, de manière potentiellement rentable, mais pour cela la compréhension et la maîtrise des phénomènes microbiologiques semblent essentielles.

C’est pourquoi au travers de ce doctorat, nous proposons d’appréhender l’hydrolyse de la lignocellulose de paille de blé en vue de sa fermentation en carboxylate en conditions d’anaérobiose non aseptiques, à partir de différents inocula (rumen bovin et microbiote intestinal de termite). Le niveau de caractérisation de nos systèmes lignocellulolytiques s’étend des aspects macroscopiques (rendements de conversion en bioréacteur) aux activités enzymatiques (activité globale) tout en intégrant des aspects de structuration taxonomique et fonctionnelle des écosystèmes microbiens étudiés.

Pour cela, la première partie du travail a consisté à stabiliser les communautés microbiennes naturelles sur paille de blé comme seule source de carbone, et à les caractériser du point de vue macroscopique, des activités enzymatiques et de la diversité taxonomique (en lien avec d’autres études de notre équipe, présentées notamment dans la thèse de L. Auer, 2016).

D’autre part, les prétraitements semblent essentiels à l’augmentation des rendements, leur impact a été évalué sur la fermentation carboxylique par la communauté microbienne obtenue à partir de rumen bovin. Enfin, des éléments de structuration taxonomique et fonctionnelle ont été obtenus par une approche de métaprotéomique effectuée sur chacune des deux communautés microbiennes hydrolytiques obtenues (rumen et termite).

Le chapitre suivant présente les éléments matériels mis en œuvre pour effectuer ses travaux et répondre aux problématiques soulevées.

Chapitre III : **Materiel et méthodes**

III.1. Substrats lignocellulosiques d'étude

III.1.1. Paille de blé

Toutes les expérimentations de cette étude ont été menées à partir de paille de blé tendre de variété Koréli issue d'une ferme expérimentale de l'INRA située sur la parcelle argilo-limoneuse de l'Étang (Commune de Boissy-le-Repos – 51210 France), semée en 2006 et récoltée en Août 2011. La semence est certifiée traitée par un traitement fongicide, Celest XL© (Composition : Fludioxonil 25g/L ; Mefenoxam 10 g/L), selon un dosage réglementaire établi par le Ministère de l'Agriculture de 0.1L/Q. La paille, coupée au broyeur à couteaux (Retsch SM 100, Germany) et tamisée à 2 mm, a été conditionnée à l'abri de la chaleur et de l'humidité. Cette paille broyée à 2 mm et non prétraitée constitue le substrat d'étude A.

Lorsque cela n'est pas précisé, la paille n'a pas été stérilisée afin de ne pas induire de modifications structurales du substrat dû à la chaleur. Le choix de la paille de blé comme substrat d'étude résulte de sa composition pauvre en lignine (comparativement au bois par exemple), de sa disponibilité en France et de son utilisation dans d'autres projets de recherche.

III.1.2. Substrat lignocellulosique prétraité

III.1.2.1 Prétraitements physico-chimiques

Pour cette étude, trois prétraitements de la paille de blé (B, C, D) ont été réalisés dans les laboratoires de l'INRA de Montpellier, département Agro-polymère et Technologies émergentes (IATE) par l'équipe du Dr. Abdellatif Barakat à partir du substrat A. Les substrats C et D ont été obtenus après un traitement alcalin à la soude à haute teneur en solide. Les pailles B et D ont subi un traitement mécanique de broyage pour réduire la taille des particules à 100 µm. La Table III-1 résume les différentes conditions de prétraitement pour chaque échantillon.

III.1.2.1.1 Traitement chimique à haute teneur en solide

Des cristaux de soude (NaOH) ont été dissouts dans de l'eau distillée. La solution alcaline a été pulvérisée sur la paille de blé avec une quantité d'eau ajustée pour obtenir une concentration massique de soude à 5% (5g de catalyseur pour 100g de paille) et une teneur en eau de 30% (sur matière sèche).

Le traitement chimique à la soude a été réalisé avec un ratio biomasse : liquide de 5 :1 soit, une forte teneur en solide et une concentration de 5 kgMS/L. La température de traitement était de 25°C et le temps de séjour de 5h. La biomasse traitée a ensuite été séchée à 105°C jusqu'à obtention d'un taux d'humidité de 8-10%.

III.1.2.1.2. Traitement mécanique

Les substrats non traité (A) et traité chimiquement (C), à 8-10% d'humidité ont été broyés par broyeur à impact (Hosokawa-alpine, type UPZ, Augsburg, Germany) équipé d'un tamis 0.1 mm, opéré à température ambiante et à la vitesse de 18000 rpm.

Les pailles prétraitées ont été analysées par l'équipe du Dr. Abdellatif Barakat au laboratoire d'Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes (IATE) pour déterminer les énergies requises pour chacun des prétraitements. Les méthodes associées sont détaillées dans le Chapitre V.

Table III-1 : Conditions de prétraitement physico-chimique du substrat lignocellulosique

Echantillon	Prétraitement chimique (PC)	Prétraitement mécanique (PM)
A	-	Broyage 2mm
B	-	Broyage 2mm + broyage 100µm
C	NaOH 5% m, 5 kgMS/L	Broyage 2mm avant PC
D	NaOH 5% m, 5 kgMS/L	Broyage 2mm avant PC + broyage 100µm

MS : Masse sèche de biomasse lignocellulosique

III.1.2.2. Prétraitements enzymatiques

Quatre cocktails enzymatiques (Table III-2) ont été testés comme prétraitements enzymatiques sur le substrat A. Des tests de saccharabilité en fioles ont permis de choisir deux cocktails enzymatiques les plus performants (parmi ceux testés) pour être caractérisés par la suite en fermentation. Ces tests effectués en conditions contrôlées de pH initial et de température, ont été mis en œuvre à une concentration de biomasse lignocellulosique de 10 gMS/L et en présence d'azide de sodium (0,5 g/L).

Table III-2 : Prétraitements enzymatiques et conditions

	Enzymes utilisées	Origine	Concentration	Fournisseur	Conditions
Xyn11	Xylanase bactérienne	<i>Thermobacillus Xylanolyticus</i>	150 U/g	FARE	50°C, pH7.5
Xyl	Xylanase fongique	<i>Thermomyces Lanuginosus</i>	150 U/g	LISBP	50°C, pH7
Cell	Celluclast 1.5L	<i>Trichoderma Reesei</i>	15 FPU/g	Novozymes	50°C, pH5
β-Cell	Celluclast 1.5L + β-glucosidase	-	15 FPU/g de chaque	-	50°C, pH5

III.3. Origine des inocula

Deux inocula ont été testés, le rumen bovin issu de vaches Holstein et la flore intestinale de termites supérieurs.

III.3.1. Rumen bovin

Les vaches laitières non productives de race Holstein dont le rumen a été utilisé dans cette étude ont été élevées selon la norme nationale fixée par la législation sur la protection des animaux (Certificat d'autorisation d'expérimenter sur animaux vivants no. 004495, Ministère de l'Agriculture, France). Les bovins ont été nourris à partir de rations normalisées pour vaches laitières, composées d'ensilage de maïs (64% MS), de foin (6% MS) et de concentré (30% MS). Les animaux étaient nourris *ad libitum* une fois par jour le matin et le prélèvement de rumen a été effectué juste avant la ration sur deux individus équipés d'une canule à rumen (Vaches no 3042 et 3059). Pour l'enrichissement *in vivo*, les deux vaches ont reçu pendant 7 semaines une ration modifiée, constituée de 80% de paille de blé, 12% de concentré et 8% de mélasse de betterrave. Dans les deux cas, le contenu ruminal a été prélevé dans différentes parties du rumen et homogénéisé manuellement. Des sous-échantillons de 30g ont été immédiatement congelés à l'azote liquide avant stockage à -80°C.

III.3.2. Termites

III.3.2.1. Choix des espèces

Afin d'augmenter les chances d'obtenir un consortium stable et actif sur lignocellulose à partir de bactéries intestinales de termites, quatre espèces différentes de termites ont été sélectionnées pour servir d'inoculum à une première expérience de fermentation.

Les critères déterminant le choix des espèces ont été la composition de la flore (désirée à forte dominance bactérienne), le pH (légèrement acide, ou le moins basique possible), le régime alimentaire et la production d'acétate. Les termites inférieurs, dont la flore intestinale est composée d'un mélange d'eucaryotes unicellulaires en symbioses complexes avec l'hôte et des bactéries, ont été écartés, leur flore étant probablement très difficile à stabiliser en réacteur. Dans les termites supérieurs, les termites champignonnistes ont également été écartés, la digestion de la lignocellulose y étant assurée par une symbiose externe avec un champignon. Dans les espèces restantes, et en fonction de la disponibilité des espèces dans les élevages de notre partenaire l'IRD, le choix s'est porté sur *Microcerotermes parvus*, *Nasutitermes ephratae*, *Nasutitermes lujae*, et *Termes hospes*. *Microcerotermes* est un genre contenant une vingtaine d'espèces arboricoles, se nourrissant principalement de bois mort (régime alimentaire de type 2). Le genre *Nasutitermes* contient un très grand nombre d'espèces, la plupart arboricoles. Il est également d'un régime alimentaire de type 2. De manière intéressante, la poche P3 (la plus importante) de son intestin présente un pH légèrement acide, alors qu'elle est très basique chez la plupart des insectes se nourrissant de bois. Enfin, *Termes* est un genre humivore (type 3) se nourrissant de bois décomposé ou de sol à forte teneur organique.

III.3.2.2 Récolte et conditionnement

Les termites collectés provenaient de colonies élevées à l'IRD de Bondy, en chambre contrôlée (27°C et 60% d'humidité relative). Pour chaque réacteur, 500 ouvriers ont été collectés aléatoirement (les soldats et juvéniles ont été écartés). Le jour précédant la dissection, une pièce de bois partiellement décomposé a été déposée dans la termitière, permettant sa récupération le lendemain. Le bois ainsi chargé de termites a été cassé et agité afin de récupérer les insectes dans un bassin contenant du sable et de la laine de cellulose hydratée (pour maintenir des conditions d'humidité compatibles avec celles de la termitière). Le tri entre ouvriers et soldats permettait de replacer les soldats dans la termitière.

Après une anesthésie sur glace de quelques minutes, les intestins ont été disséqués à l'aide de pinces fines stérilisées, l'une pour maintenir le termite et la seconde pour extraire l'intestin au niveau de l'anus (Figure III-1). Seuls les intestins complets approximativement de même taille ont été conservés pour l'étude. La pré-conservation des intestins a été effectuée dans 50 mL de tampon PBS (10 mM) placé sur glace. Tous les 250 intestins collectés, l'ensemble a été congelé à -20°C, puis expédié au laboratoire sur glace carbonique avant d'y être stocké à -80°C.

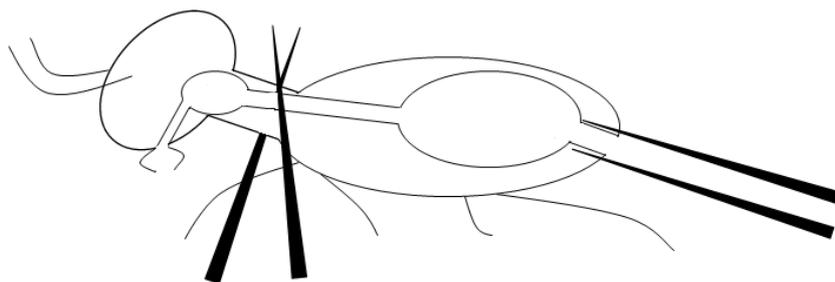


Figure III-1 : Représentation schématique de la dissection des termites

Chaque espèce a été testée en deux réplicats de réacteur, la collecte de termites ayant été réalisée à trois mois d'intervalle. À des fins de séquençage et de quantification du nombre de copies du gène codant pour l'ARNr 16S par intestin, 2x20 intestins supplémentaires ont été collectés. Enfin, des groupes de 10 ouvriers ont été pesés pour estimer la masse de l'inoculum (Table II-3). L'ensemble de ces manipulations ont été réalisées dans le cadre de la thèse de L. Auer.

Table III-3 : Poids relatifs des espèces de termites étudiées

Espèce	Poids humide (mg pour 10 ouvriers)
<i>Microcerotermes parvus</i>	61,7
<i>Nasutitermes ephratae</i>	64,8
<i>Nasutitermes lujae</i>	48,8
<i>Termites hospes</i>	24,2

Afin de favoriser l'établissement des communautés et du fait de la petite taille des inocula, des réacteurs de petit volume (400mL) ont été inoculés avec les intestins de termites. Les réacteurs (Applikon MiniBio 500) ont été utilisés en conditions anaérobies et après stérilisation à l'autoclave. Les échantillons d'intestins ont été centrifugés (7197g, 10 min, 4°C) et la solution saline éliminée. 500 intestins centrifugés ont alors servi à inoculer 400 mL de milieu minéral (MM, composition détaillée ci-dessous) additionnés de 20g.L⁻¹ de paille de blé comme seule source de carbone (substrat A - paille broyée à 2mm de variété Koreli). Afin d'éviter la présence de bactéries endogènes du substrat, la paille a été stérilisée à l'autoclave (120°C, 20 min et 1,2 bars en présence d'eau). Une fois les réacteurs inoculés, les conditions anaérobies ont été obtenues par injection d'un flux d'azote avant fermeture hermétique du réacteur.

La température a été maintenue à 35°C et le pH à 6,15 par ajout d'une solution de soude à 2M NaOH, sous agitation constante à 400 rpm. La surpression due à la production de gaz a été libérée lors des prélèvements gaz. Ces expérimentations en réacteurs ont aussi été menées dans le cadre de la thèse de L. Auer, suivant les recommandations techniques attenantes à ce manuscrit.

III.4. Conditions de fermentation

Les cultures ont été menées en réacteurs batch anaérobies avec comme seule source de carbone le substrat lignocellulosique à la concentration de 20 gMS/L (MS à 8-10% d'humidité). Les réacteurs (BIOSTAT[®] A+, Sartorius, Germany - Figure III-2) présentaient un volume liquide utile de 2,4 L et de 0,6 L de volume de ciel gazeux. Les expérimentations ont été menées dans des conditions mésophiles et légèrement acidophiles, avec une température régulée à 35°C et un pH régulé à 6,15 (\pm 0,05) via l'ajout de soude 1M. Un condenseur permettait d'éviter l'évaporation. L'agitation était assurée par un axe muni d'une turbine de Rushton (RT4, Np 4.3) fixée au tiers du fond du réacteur et la vitesse d'agitation était fixée à 300 rpm de manière à assurer une homogénéisation de la fraction solide.



Figure III-2: Réacteur Sartorius Biostat A +

Les choix des pH et température de travail résultent des conditions retrouvées dans le rumen bovin. La température est légèrement réduite à 35 °C de manière à rendre le procédé moins couteux en énergie et le pH acide permet de minimiser la croissance des archées méthanogènes. Du bromoéthanesulfonate (Sigma Aldrich) était utilisé en tant qu'inhibiteur de méthanogenèse dans des concentrations comprises entre 0,1 et 10 mM. A chaque cultures 1 mM de BES a été ajouté et durant les expériences, si du méthane était détecté dans la phase gazeuse, l'inhibiteur était ajouté jusqu'à la concentration maximale de 10 mM.

Les conditions d'anaérobiose ont été imposées par un balayage à l'azote gazeux du milieu de culture avant inoculation et au début de chaque expérience.

Un compteur gaz à tambour de type Ritter TG 05 permettait de mesurer le volume de gaz produit, le débit minimum de cet appareil étant de 2 mL.h⁻¹.

Le milieu de culture était un milieu minéral (Table III-4) mimant la composition de la salive des ruminants, adapté pour ne pas présenter d'autre source de carbone que la paille. Il est constitué des solutions S1, S2, d'une source d'azote en large excès pour assurer la croissance microbienne, de l'inhibiteur de méthanogenèse, d'une solution de vitamines (V7, Pfennig and Trüper, 1992) et d'une solutions d'oligo-éléments (SL12, adaptée d'Overmann et al., 1992). Ces deux dernières solutions ont été stérilisées par filtration (0,2 µm).

Table III-4 : Composition du milieu de culture

	Solution mère	Milieu
S1 (6,7X)	(g/l)	(g/l)
K ₂ HPO ₄	1,3	0,195
S2 (6,7 X)	(g/l)	(g/l)
KH ₂ PO ₄	3	0,45
NH ₄ Cl	2,46	0,369
NaCl	6	0,9
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,066	0,1599
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,6	0,09
Source d'azote		(g/l)
NH ₄ Cl		5,4
Inhibiteur méthanogenèse		mM
Bromoéthanesulfonate BrCH ₂ CH ₂ SO ₃ Na		0,1 à 10
Solution V7 (4000x)	(mg/l sol. mère)	(mg/l)
Biotine C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	8	0,002
p-aminobenzoate H ₂ NC ₆ H ₄ CO ₂ H	40	0,010
Thiamine C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS · HCl	40	0,010
Pantothénate C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	20	0,005
Pyridoxamine C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂ · 2HCl	200	0,050
VitamineB12 C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	80	0,020
Nicotinate C ₆ H ₅ NO ₂	80	0,020
Solution SL12 (1000x)	(mg/l sol. mère)	(mg/l)
H ₃ BO ₃	300	0,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	1100	1,1
CoCl ₂ .6H ₂ O	190	0,19
MnCl ₂ .4H ₂ O	50	0,05
ZnCl ₂	42	0,042
NiCl ₂ .6H ₂ O	24	0,024
NaMoO ₄ .2H ₂ O	18	0,018
CuCl ₂ .2H ₂ O	2	0,002

Le ratio $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ de 2,3 permettait d'obtenir un milieu avec un pH initial de 6,15. Les ratios C/N et C/P sont respectivement de 7 et 60 et permettent d'éviter toute carence, car ils sont calculés sur la base d'une utilisation de la totalité du carbone exclusivement pour la croissance bactérienne.

Le système de prélèvement utilisé est par ailleurs décrit en Annexe 2.

III.4.1. Cultures d'enrichissement

Pour les deux inocula, rumen ou termite, une première étape d'enrichissement a été effectuée en cultures successives en batch (SBR – sequencing batch reactor) dans les conditions décrites ci-avant. Pour chaque communauté microbienne testée, après décongélation lente à 4°C, un premier réacteur a été inoculé avec soit 2% (m/v) de rumen bovin (à part égale de chaque vache), soit 500 intestins de termite.

Pour la communauté issue de rumen bovin la paille de blé brute non-stérilisée (substrat A) a été utilisée exclusivement, alors que pour le microbiote intestinal de termites deux conditions ont été testées pour la stabilisation de la communauté : soit avec la paille brute non-stérile, soit la même paille stérilisée (substrat A et substrat A stérilisé par autoclave).

Dans tous les cas, pour le rumen ou le microbiote de termites, le premier réacteur a été conduit jusqu'à atteindre une concentration d'AGV stable, fixant ainsi le temps de culture de chaque cycle d'enrichissement. Le cycle d'enrichissement suivant a été inoculé à partir de 10% (v/v) du réacteur précédent. Cette procédure a été poursuivie jusqu'à obtenir une concentration d'AGV finale stable sur au moins 3 cycles successifs. La Figure III-3 représente le principe de la procédure d'enrichissement mise en œuvre.

Une fois la production d'AGV stabilisée, des échantillons de 200 mL de la communauté enrichie ont été congelés à l'azote liquide et stockés à -80°C pour servir d'inoculum pour les expériences suivantes, réalisées en cinétique fine et analysant le comportement dynamique des communautés.

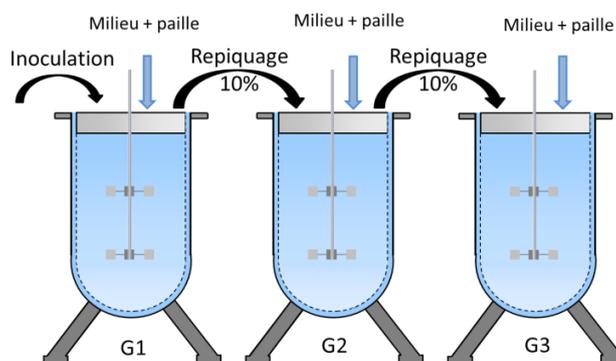


Figure III-3 : Représentation schématique de la procédure d'enrichissement en SBR

Les prélèvements réalisés lors des enrichissements concernaient les paramètres macrocinétiques : production d'AGV et de gaz ainsi que dégradation du substrat en dynamique et le suivi de la diversité microbienne aux points initiaux et finaux de chaque cycle.

Parallèlement à nos travaux d'enrichissement en bioréacteurs, un enrichissement du rumen en communautés capables de dégrader la biomasse lignocellulosique a été effectué *in vivo*, directement dans les vaches utilisées pour le prélèvement de rumen de cette étude (section III.3.1). Pour cela, les rations alimentaires de ces animaux ont été progressivement enrichies en paille de blé. Après trois mois, leur alimentation étant entièrement constituée de paille de blé, un prélèvement ruminal a été effectué dans les mêmes conditions que décrit précédemment et constituait la communauté enrichie *in vivo*. La dynamique de cet enrichissement *in-vivo* sera ensuite comparée à celui de l'enrichissement rumen réalisé en bioréacteur.

III.4.2. Dynamique des communautés enrichies

Afin de caractériser la dynamique de dégradation de la lignocellulose par les communautés rumen et termites enrichies, des cinétiques de fermentation ont été inoculées (10% v/v) à partir des communautés enrichies (après décongélation lente à 4°C) et incubées pendant 15 jours dans les mêmes conditions de culture décrites précédemment. Pour le rumen enrichi *in vivo* des cinétiques de fermentation ont également été réalisées mais l'inoculation a été effectuée à 2% (m/v). Des échantillonnages *a minima* quotidiens de phase liquide-solide et de phase gazeuse ont été réalisés afin de pouvoir effectuer un suivi dynamique des composantes macrocinétiques, enzymatiques et métabolomiques, ainsi que l'analyse de la diversité bactérienne (Thèse de L. Auer) au cours de l'avancement de la réaction.

La caractérisation de la communauté issue de rumen bovin enrichie dans ces travaux a été effectuée en triplicat ; les autres communautés enrichies issues de microbiotes intestinales de termites et de rumen bovin *in vivo* ont été évaluées en duplicat de fermentation.

III.4.3 Cultures sur des substrats prétraités

L'impact de l'utilisation de substrats prétraités a été évalué sur la communauté microbienne enrichie issue de rumen bovin. Deux types de prétraitements ont été mis en œuvre : chimio-mécaniques et enzymatiques.

III.4.3.1 Prétraitements physico-chimiques

Les fermentations sur les substrats prétraités chimio-mécaniquement (B, C et D) ont été effectuées dans les mêmes conditions que pour le substrat brut (A) et en dupliquât de réacteurs. La seule différence se situe dans le pH initial qui a été ramené à 6,15 par ajout de d'acide phosphorique avant inoculation par la communauté microbienne évaluée.

III.4.3.2 Prétraitements enzymatiques

Les prétraitements enzymatiques de la paille ont été réalisés au laboratoire (détaillés précédemment), directement avant leur évaluation en fermentation.

Les deux prétraitements enzymatiques étudiées en fermentation sont ceux traités avec i) une xylanase (Xyn 11) produite par *Thermobacillus Xylanolyticus* fournie par le laboratoire partenaire FARE (Reims – France) et ii) une cellulase commerciale Celluclast 1.5L (Novozymes) à des concentrations respectives de 150U/g et 15 FPU/g. Par la suite, les conditions de pH et température ont été ramenées à celles de la communauté issue de rumen bovin (pH 6.15 et T 35°C) et la communauté microbienne a été inoculée à hauteur de 10% (v/v).

Les réacteurs de fermentation ont alors été menés dans les mêmes conditions que pour les cinétiques évaluant cette communauté sur le substrat A (Section III.4.3.1.) pendant 15 jours.

Un plan d'échantillonnage a été mis en place afin d'atteindre les mêmes volumes (2,2 L) et concentrations en substrat (20 gMS/L) que précédemment mis en œuvre au moment de l'inoculation, tout en permettant l'analyse dynamique des prétraitements enzymatiques avant inoculation.

III.5. Techniques analytiques

Tous les prélèvements ont été effectués *a minima* en tripliquat d'échantillonnage. Sauf précision, ces techniques analytiques ont été mises en œuvre sur l'ensemble des échantillons prélevés au cours des cinétiques fines, permettant l'analyse dynamique du comportement des communautés microbiennes.

III.5.1. Caractérisation des substrats

III.5.1.1. Matières sèches, volatiles et minérales

Les matières sèches (MS), volatiles (MV) et minérales (MM) étaient évaluées sur des prélèvements totaux de 10 mL. Les matières sèches étaient obtenues après séchage à 105°C pendant 48h, et les matières minérales après calcination à 500°C pendant 2h. Les matières volatiles constituaient alors la différence entre ces deux dernières. De plus le milieu minéral étant volatil à 500°C (probablement lié à la charge en NH₄Cl – formation de Cl₂ gazeux), un protocole de double rinçage à l'eau distillée (centrifugation de 10 minutes à 7197 xg) a été mis en place pour déterminer au mieux les solides volatils selon les conditions décrites précédemment.

III.5.1.2. Composition du substrat lignocellulosique

L'hydrolyse acide permettant la détermination de la composition du substrat lignocellulosique était effectué sur des échantillons séchés (et non lavés) de 40 mg selon le protocole décrit par de Souza et al. (2013). Brièvement, ces échantillons étaient hydrolysés dans des tubes en verre en présence d'acide sulfurique concentré (0,5 mL à 10,8 M) pendant 1h à 30°C et sous agitation douce de manière à déstructurer la matrice lignocellulosique. La concentration d'acide sulfurique était ensuite ramenée à 1,5 M par ajout d'eau ultrapure (3,1 mL) et l'hydrolyse poursuivie pendant 1h30 à 100°C. Les monomères ainsi générés étaient collectés dans la fraction liquide par filtration sur fritté en fibre de verre. Le rétentat -constituant la fraction ligneuse- était rincé abondamment à l'eau ultrapure (trois fois le volume) séché pendant 48h à 105°C puis calciné à 500°C (2h) pour détermination de la masse relative de lignine (m/m).

La quantification des sucres monomériques dans l'hydrolysats filtré était effectuée après dilution par trois à l'eau ultrapure (0,5 M H₂SO₄) et par chromatographie liquide haute performance (HPLC) selon le protocole décrit par Monlau et al. (2012). L'équipement mis en œuvre était un système de séparation Dionex Ultimate 3000 équipé d'une colonne d'affinité Aminex HPX 87H (Biorad) et d'un détecteur d'indice de réfraction (Thermo Scientific). Les conditions de chromatographie consistaient en une séparation à 50°C sous un débit de 0,3 mL/min d'acide sulfurique 5 mM. Le traitement quantitatif des données se faisait contre des gammes étalons acidifiées (0,5M H₂SO₄) de D-glucose, D-xylose, L-arabinose, et d'acide D-glucuronique en mélange, comprises entre 0 et 2 g/L de chaque sucre.

III.5.1.3. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier

La structure (et la composition) des substrats a été évaluée par spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier (FTIR) sur des culots de centrifugation (10 minutes à 7197 xg) congelés à -80°C puis lyophilisés.

L'appareillage utilisé était un spectromètre FTIR Nicolet 6700 (Thermofisher) utilisé exclusivement en mode ATR (attenuated total reflexion), équipé d'un détecteur DTGS (sulfate de triglycine). La plage de nombre d'onde étudiée était comprise entre 400 et 4000 cm⁻¹ avec une résolution de 4 cm⁻¹. Chaque échantillon a été analysé au moins 5 fois, chaque analyse produisant un spectre moyen résultant de 32 scans individuels. Entre chaque analyse le solvant de nettoyage était l'éthanol absolu et un background était effectué toutes les 30 minutes. Pour l'analyse des spectres moyens (5 par échantillons), le ratio des pics 1512 :1375 cm⁻¹ été considéré comme reflétant le ratio lignine/holocellulose d'après Monlau et al. (2012). De la même manière les pics 1430 et 898 cm⁻¹ étaient attribués aux quantités respectives de cellulose cristalline et amorphe, et leur ratio représentait le lateral order index (LOI – ratio cellulose cristalline:amorphe) considéré comme une image de la cristallinité du substrat.

III.5.1.4. Taille des particules et énergie de broyage

La consommation d'énergie liée au broyage ainsi que la taille des particules des différents substrats secs initiaux (substrat brut et prétraitements chimio-mécaniques) ont été analysées par le laboratoire partenaire IATE (Montpellier). La taille des particules a été mesurée par granulométrie laser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments) et l'énergie consommée durant le broyage a été analysées par un wattmètre selon le protocole décrit par Barakat et al. (2004).

III.5.1.5. Macroporosité

Les mesures de macroporosité ont été effectuées sur les substrats initiaux (substrat brut et prétraitements chimio-mécaniques) en mesurant leur cinétique d'absorption d'eau à différentes pressions osmotiques (Robertson et Eastwood, 1981). La capacité de rétention en eau a été déterminée par dialyse des échantillons de paille hydratés contre trois solutions de polyéthylène glycol (PEG de masse molaire 10 000) à 10, 75 et 100 g/L induisant des pressions de succion connues (de 0,009, 0,112 et 0,206 MPa respectivement). La quantité d'eau retenue par la matrice fibreuse pour une concentration de PEG peut être reliée au volume de pores de taille spécifique, considérant la pression de succion et la tension de surface selon l'équation $D=4S/\Delta P$ (où D est le diamètre de pore en mm, S la tension de surface de l'eau en N/m et ΔP la pression de succion mise en œuvre (MPa)). Le volume total de pores est estimé à la concentration de 10 g/L de PEG alors que le volume des pores de taille 1 μm au plus correspond à la quantité d'eau retenue par les fibres à concentration de 100 g/L de PEG. Leur différence représente ainsi le volume des pores de taille supérieure à 1 μm , accessible aux bactéries.

Pour chaque échantillon de substrat testé, l'absorption en eau à différentes pressions de succion a été déterminée en triplicat en hydratant l'équivalent de 0,2-0,3 g secs des échantillons sur la nuit à 4°C. Après l'étape d'hydratation sur la nuit, la fraction liquide a été collectée et analysée par un analyseur Skalar (Breda) mesurant les sucres neutres, alors que le matériel fibreux hydraté a été transféré dans des sacs de dialyse (seuil de coupure de 6-8 kDa, diamètre de 32 mm, Visking R dialysis bag, PolyLabo). Les sacs de dialyse ont été fermés hermétiquement, placés dans 100 mL de solution de PEG et agités sur la nuit à 37°C. Le contenu des sacs a été récupéré précautionneusement, pesé avec précision puis séché de manière à déterminer le poids sec et le contenu en eau. Les résultats exprimés en g d'eau par g d'échantillon sec représentent finalement la différence entre le volume total de pore et le volume des pores de taille 1 μm au moins.

III.5.1.6. Saccharabilité des substrats

Les différents substrats étudiés ont été caractérisés par rapport à leur saccharabilité enzymatique (production de sucres sous l'action d'enzymes (hémi)cellulolytiques. Avant fermentation des substrats, des tests de saccharabilité ont été conduits sur les différents prétraitements du substrat A, avec une teneur en solide de 1% (masse/volume m/v) sous agitation et dans des conditions de pH et de température contrôlées.

De l'azoture de sodium a été ajouté à une teneur de 0,5 g/L pour inhiber la croissance bactérienne et ainsi doser les sucres libérés. Des échantillonnages réguliers ont été effectués sur la période d'incubation fixée à 72h. Les sucres réducteurs libérés dans la phase liquide ont été dosés par la méthode au DNS après centrifugation (10 min, 4°C, 7197 g).

III.5.2. Analyse des produits du métabolisme microbien

III.5.2.1. Carboxylates

Le dosage des carboxylates était effectué sur le surnageant (filtré à 0,2 µm) d'échantillons de 10 mL (centrifugation 10 minutes à 7197 xg) par chromatographie phase gazeuse (CPG) selon le protocole de routine du laboratoire, décrit par Cavallé et al. (2003). Rapidement le dosage s'effectuait par la méthode de l'étalon interne (acide éthyl-2-butyrique à 1 g/L dans une solution d'acide orthophosphorique à 5%). L'appareillage utilisé était une CPG de modèle Varian 430 composé d'un injecteur 1177 split/splitless utilisé en mode splitless et d'un four à température programmable équipé d'une colonne CP-Wax 58 (FFAP) CB (Polyéthylèneglycol substitué par l'acide nitrotéréphtalique et chimiquement greffé). Le gaz vecteur utilisé était le diazote (à un débit de 25L/min) et les températures opératoires étaient de 250°C et 275°C pour l'injecteur et le détecteur, respectivement.

Un gradient de température permettait la séparation des carboxylates (C2 à C6) de la manière suivante : rampe de 30°C/min de 90°C jusqu'à 115°C – rampe de 1,5°C/min jusqu'à 130°C - rampe de 70°C/min jusqu'à 230°C, aboutissant aux temps de rétention d'environ 2,6 minutes pour l'acide acétique ; 3,5 pour l'acide propionique ; 4,3 pour l'acide isobutyrique ; 4,7 pour l'acide butyrique ; 5,4 pour l'acide isovalérique ; 6,8 pour l'acide valérique ; 9,6 pour l'acide hexanoïque et 7,9 minutes pour l'étalon interne. La quantification se faisait contre des gammes étalon régulières, comprises entre 0 et 1 g/L de chaque carboxylate.

III.5.2.2. Sucres solubles

Les échantillons liquides obtenus au cours de la fermentation étaient analysés par HPLC pour déterminer leur contenu en sucres monomériques solubles selon la procédure décrite en section III.5.1.2. L'acidification des échantillons était effectuée de la même manière que pour les gammes étalons (H₂SO₄ 0,5 M).

III.5.2.3 Carbone organique total et analyse de la composition du gaz

La présence de potentiels autres produits du métabolisme microbien était vérifiée dans les échantillons gazeux et dans les échantillons liquides prélevés au cours de la fermentation.

La composition en gaz (O₂, CO₂, H₂, CH₄) était analysée sur des échantillons de 10 mL par chromatographie gaz HP 5890 équipée d'un détecteur à conductivité et d'une colonne HAYSEP D avec comme gaz vecteur l'argon et contre des étalons gazeux quotidiens.

Le contenu total en carbone organique dans le liquide était déterminé par un analyseur TOC-V_{CSN} (Shimadzu) selon les recommandations du fournisseur.

III.5.3. Traitement des données macrocinétiques

Le calcul des variables a été réalisé en Cmol.L⁻¹ pour appréhender le devenir du carbone.

Les rendements R_{x/y} en AGV totaux ont été calculés par rapport soit aux sucres disponibles sous forme d'holocelluloses (R_{AGV/S}), soit aux sucres libérés (R_{AGV/S,deg}) ou encore par rapport à la matière sèche disponible (R_{AGV/MS}) ou dégradée (R_{AGV/MS,deg}).

Les compositions en cellulose et hémicellulose étaient calculées par la formule suivante décrite par Monlau et al. (2012) et adaptée de Petersson et al. (2007) :

$$\% \text{ Cellulose} = \% \text{ Glucose} / 1,11$$

$$\% \text{ Hémicellulose} = (\% \text{ Xylose} + \% \text{ Arabinose}) / 1,13$$

Où les pourcentages de sucres sont les concentrations dosées en HPLC rapportés à la masse exacte de paille sèche hydrolysée et impactés de la mesure des matières sèches.

Les facteurs 1,11 et 1,13 correspondent à la prise en compte de la perte d'une molécule d'eau lors de la formation du polymère.

En ce qui concerne le CO₂, pour évaluer la quantité produite en cours de culture, la composition du gaz produit et la fraction dissoute dans la phase liquide ont été prises en compte. La fraction dissoute considérait à la fois le CO₂ dissous et la forme d'hydrogénocarbonate. En effet, à notre pH de travail, régulé à 6,15 +/- 0,05 par ajout de soude 1M, la répartition entre le CO₂d et l'HCO₃⁻ était de 60% et 40% respectivement.

La concentration en CO_{2,dissous} était calculé selon l'équilibre gaz-liquide avec la formule suivante :

$$CO_{2,dissous} \text{ (mol/L)} = K_H \text{ (mol/L/atm)} P_{CO_2} \text{ (atm)}$$

Où K_H = 0,0262 mol/L/atm ; la constante de Henry à pH 6,15 et 35°C

Le volume de CO₂ produit était alors converti en mol en l'approximant à un gaz parfait. Comme la production de CO₂ était perturbée par les prélèvements, la production réelle était reconstruite en cumulant les productions entre chaque prélèvement. Finalement la quantité de CO₂ produite en fin de culture était utilisée pour évaluer la répartition du carbone.

III.5.4. Activités enzymatiques

Des protocoles de dosage des activités enzymatiques endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase et (endo)xylanase ont été mis au point d'après une recherche bibliographique (Annexe 1) et les résultats d'un plan d'expérience qui ne seront pas détaillés dans ce manuscrit. Par la suite les dosages d'activités enzymatiques étaient effectués à partir d'échantillons totaux de 5 mL. Ces échantillons étaient centrifugés (10 minutes à 7197 x g), produisant une fraction liquide (contenant les enzymes extracellulaires) et une fraction solide (enzymes cell-bound). La fraction solide était resuspendue dans 6 mL de tampon acétate (50 mM - pH 6) et soniquée sur glace quatre fois 20 secondes (avec 20s de repos sur glace entre chaque cycle de sonication) avec un sonicateur HD 2070 fixé à une puissance de 60W et équipé d'une sonde MS73 (Bandelin Sonoplus). Cette étape de sonication avait fait l'objet d'une optimisation des conditions de temps et de puissance, permettant de maximiser la libération des enzymes de la matrice lignocellulosique.

Pour chaque échantillon analysé (*a minima* en duplicat), les activités ont été évaluées en duplicat technique sur les fractions liquide et solide soniquée. Les activités xylanase et endoglucanase (CMCase) ont été mesurées en utilisant du xylane de hêtre (1% - Sigma) et de la carboxyméthyl cellulose (CMC) (1% - Sigma) respectivement dissolu dans le tampon acétate (50 mM – pH 6). Ces activités étaient estimées par mesure de la libération de sucres réducteurs après incubation de 200 μ L d'échantillon avec 400 μ L de substrat à 35°C pendant 1h (xylanase) et 3h (CMCase). Les sucres réducteurs générés étaient déterminés par la méthode à l'acide dinitrosalicylic (DNS), ajouté volume à volume, et mesurant l'absorbance des liquides à 570 nm avec un spectrophotomètre UV/Vis (Multiskan Ascent, Thermo Scientific), contre des gammes étalon de xylose et glucose respectivement.

Les activités exoglucanase et β -glucosidase ont été évaluées avec des substrats fluorescents methylumbelliferyl (MUF), MUF cellobioside et MUF glucopyranoside respectivement et la methylbelliferone comme étalon. Les incubations ont été réalisées pendant 2 minutes dans les mêmes conditions que décrites précédemment. Les mesures de fluorescence étaient effectuées avec un spectrophotomètre de fluorescence Cary Eclipse (Agilent Technologies).

Une unité d'activité était définie comme la quantité d'enzymes permettant la libération de 1 μmol de produit (sucres réducteurs ou methylbelliferone) par minute.

Pour toutes les activités et tous les échantillons, ces dosages en milieu complexes étaient réalisés contre (en soustraction des valeurs) des contrôles i) ne contenant pas de substrat (remplacé par le tampon) et ii) ne contenant pas d'échantillon (remplacé par le tampon). De plus la dilution des échantillons était adaptée de manière à transformer environ 4% du substrat pendant la réaction de dosage enzymatique. Deux dilutions ont systématiquement été considérées pour assurer la linéarité de la réaction.

III.6. Analyse de diversité microbienne

III.6.1. Prélèvement et co-extraction ADN/ARN

Les analyses de diversité bactérienne ont été effectuées à partir d'échantillons de 1,5 mL prélevés (au minimum en quintuplicat) sur glace et immédiatement centrifugés (13 000 x g, 5 minutes, 4°C). Le surnageant était alors éliminé et le culot congelé à l'azote liquide et stocké à -80 °C. Après prélèvement, toutes les étapes de l'analyse de diversité microbienne ont été réalisées dans le cadre des travaux de doctorat de L. Auer. Les protocoles employés sont détaillés dans la thèse associée et seront donc résumés dans ce manuscrit.

La lyse cellulaire était effectuée par 2 cycles de 30 secondes de broyage sur billes via un équipement FastPrep (MP Biomedicals) opérant à 4 ms⁻¹. Une coextraction ADN/ARN (kit PowerMicrobiome RNA isolation – MoBio) permettait l'extraction simultanée des ADN et ARN. Cette étape était réalisée selon les prescriptions du fournisseur (MoBio), mais sans réaliser le traitement à la DNase. Les ADN et ARN générés étaient séparés en suivant le protocole fournisseur du kit AllPrep DNA/RNA MiniKit (Qiagen). Les qualités et quantités extraites étaient alors vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose 1% et mesures d'absorbance à 260 et 280nm (Nanodrop 1000, ThermoScientific). Toute trace potentielle d'ADN dans les échantillons d'ARN purifié était éliminée en suivant le protocole fournisseur du kit TURBO DNA-free (Ambion) et la qualité de l'ARN obtenue vérifiée au BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies) et sur puce RNA Pico 6000 Chip. Les ARN étaient finalement rétro-transcrits en suivant le protocole fournisseur du kit MMLV Reverse Transcriptase (Promega) avec des hexamères aléatoires comme amorces.

III.6.2. Amplification de la région V3-V4 de l'ADN 16S et séquençage MiSeq Illumina

La diversité bactérienne et son activité ont été étudiées par séquençage de l'ADNr 16S et de l'ARNr 16S en ciblant les régions hypervariables V3 et V4 et en utilisant un séquenceur Illumina MiSeq à la plateforme de séquençage GenoToul Genomics and Transcriptomics (GeT, Auzeville, France). Le séquençage a été réalisé en pair-end. La région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S a été amplifiée par PCR en deux étapes. La première PCR, en utilisant les amorces bactériennes 343F et 784R, modifiées pour ajouter des adaptateurs de la PCR2, permettait s'amplifier les régions V3-V4 :

343F=5'-CTT-TCC-CTA-CAC-GAC-GCT-CTT-CCG-ATC-TAC-GGR-AGG-CAG-CAG-3'

784R=5'-GGA-GTT-CAG-ACG-TGT-GCT-CTT-CCG-ATC-TTA-CCA-GGG-TAT-CTA-ATC-CT-3'

Une deuxième réaction de PCR a alors été réalisée pour ajouter les adaptateurs de séquençage ainsi qu'un index unique pour chaque échantillon, en utilisant les amorces suivantes :

FP2=5'-AAT-GAT-ACG-GCG-ACC-ACC-GAG-ATC-TAC-ACT-CTT-TCC-CTA-CAC-GAC-3'

RP2=5'-CAA-GCA-GAA-GAC-GGC-ATA-CGA-GAT-index-GTG-ACT-GGA-GTT-CAG-ACG-TGT-3'

Les conditions de PCR sont détaillées dans le manuscrit de L. Auer (2016). A chaque PCR, les produits obtenus étaient purifiés en utilisant des billes magnétiques avant d'être quantifiés par un spectrophotomètre Nanodrop 1000.

La qualité et la mesure de quantité d'un dixième des échantillons choisis aléatoirement ont été vérifiées en utilisant un BioAnalyzer 2100 et un kit High Sensivity DNA Analysis (Agilent). La librairie a été préparée par mélange équimolaire à partir de tous les échantillons à séquencer, et dosée par qPCR (Thèse de L. Auer, 2016).

Le séquençage a ensuite été réalisé à la plateforme de séquençage GenoToul Genomics and Transcriptomics (GeT, Auzeville, France) en chargeant 1 mL de librairie à 7 pM sur une cartouche Illumina MiSeq et un kit de réactifs v2 ou v3 selon les fois. Les données répondant aux filtres de qualité interne au séquenceur ont été vérifiées par la plateforme GeT. Elles ont alors été démultiplexées (deux fichiers de sortie par échantillon) puis les lectures jumelles ('pair-end reads') ont été jointes en une seule, plus longue ('contig') en utilisant le logiciel Flash v1.2.6 (Magoč and Salzberg, 2011) avec un recouvrement minimum de 110 paires de base et un ratio de mismatch (non-appariement) maximum de 0,1.

Le traitement des données a été réalisé principalement à partir de fonctions Mothur (Schloss et al., 2009), ajoutées de scripts développés par L. Auer en Bash et Python. Toutes les procédures s'enchaînaient automatiquement dans un pipeline IPS (écrit en Bash par L. Auer) et permettaient i) le formatage des données (fastq à fasta), ii) le nettoyage des données (suppression des amorces et des séquences mal définies ou de taille incorrecte), iii) la déréplication des données (conservation d'un exemplaire et chaque séquence et de son effectif), iv) l'alignement des séquences contre la base de données LTP115 (curée sur les régions V3-V4), v) la filtration des séquences (non alignées et séquences uniques appelées singletons), vi) le pré-clustering (correction des erreurs de séquençage), vii) la suppression des chimères (Uchime), viii) l'affiliation des séquences contre la base de données taxonomique (fusion LTP et DictBD (microbiote des insectes)),ix) le sous-échantillonnage facultatif des données par tirage aléatoire d'un nombre de séquences normalisé, x) le clustering des séquences en OTU (seuil de 3% de différence), xi) l'affiliation des OTUs à partir de celle des séquences majoritaires le constituant (seuil 90%), xii) le calcul de distance entre OTU.

Toutes ces procédures sont détaillées dans le manuscrit de L. Auer et enfin l'analyse statistique des données était effectuée sur R avec principalement des fonctions des packages Phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013) et mixOmics (Cao et al., 2009).

III.7. Analyse de diversité fonctionnelle par métaprotéomique

L'analyse de diversité fonctionnelle (et taxonomique) par métaprotéomique se déroulait en quatre étapes principales i) d'extraction et séparation des protéines, ii) de digestion en peptides et purification de ces derniers, iii) de séparation et détermination des peptides par chromatographie liquide suivie d'une spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) et iv) de l'analyse des données (base de données peptidique, protéique et spécifique au carbohydrate active enzyme (CAZY) ainsi que traitement et visualisation de l'ensemble des données).

Dans le cadre de ce doctorat ce protocole a été défini en collaboration avec le laboratoire partenaire (UFZ Leipzig - Allemagne) puis transféré en partie au LISBP (Toulouse – France). Après transfert des procédures d'extraction, séparation, digestion et purification en France, les échantillons étaient toutefois analysés à l'UFZ (LC-MS/MS et affiliation contre la base des données peptidiques), puis les données transférées et traitées par nos soins.

III.7.1. Extraction des protéines et séparation

L'extraction des protéines était effectuée en utilisant un tampon phénol comme solvant et selon la procédure dédiée aux échantillons complexes de sédiments détaillée par Lin et al. (2016).

Pour chaque échantillon, 3 réplicats techniques ont été prélevés et stockés à -80°C jusqu'à extraction. Pour l'extraction, 3 mL d'échantillon homogénéisé était resuspendu dans 5 mL de tampon SDS (SDS 1.25%, DTT 20 mM, Tris-HCl 0.1 M pH 6.8) et le mélange était agité doucement pendant 1h à température ambiante. Ensuite, une sonication douce était effectuée sur glace (2x40s avec 1 min. de repos – sonde MS72, puissance de 40W). Une centrifugation (7197 g, 10 min, 4°C) permettait de récupérer le surnageant contenant les protéines, qui était alors mélangé avec 3 mL de solvant phénol (10g phénol dans 1 mL d'eau ultrapure – pH 8.0) et incubé 15 minutes à température ambiante sous agitation douce. Le surnageant était récupéré (centrifugation 7197 x g, 10 min, 4°C) et l'étape précédente répétée. Les protéines contenues dans le surnageant obtenu après double extraction au phénol étaient précipitées sur la nuit à -20°C par ajout de cinq volumes d'acétate d'ammonium 0,1M dissout dans du méthanol.

Après précipitation, les protéines étaient récupérées par centrifugation (7197 x g, 20 min, 4°C) et les culots étaient rincés deux fois au méthanol froid (1 mL) et une fois à l'acétone froid (1mL). Chaque étape de rinçage incluait une agitation par vortex et une élimination du surnageant après centrifugation (12000 x g, 10 min, 4°C). Finalement, les échantillons étaient séchés sous hotte à flux laminaire avant séparation par SDS-PAGE.

Pour la séparation, les culots secs étaient alors dissouts dans 100 µL de tampon de charge Laemmli (2% w/v SDS, 2 mM beta-mercaptoethanol, 4% v/v glycérol, 40 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.01% w/v bromophenol blue) et chauffés 5 minutes à 90°C. Le gel de séparation par SDS-PAGE se répartissait en un gel de collection (environ 1,5 cm – 4% polyacrylamide) et le gel de séparation (12% polyacrylamide). Les échantillons étaient chargés sur le gel (10 µL) ainsi que deux étalons de poids moléculaire connu (Bio-Rad) et l'électrophorèse était effectuée à 20 mA pendant environ 30-40 minutes jusqu'à migration d'environ 1 cm dans le gel de séparation.

Le gel pouvait alors être coloré au bleu de Coomassie (Coomassie brilliant blue G-250 - Merck) et chaque bande (correspondant à un échantillon) découpée en petits cubes (d'environ 1 mm³) et transférée en Eppendorf de 0,5 mL avant digestion à la trypsine.

III.7.2. Digestion des protéines et purification

Pour chaque échantillon la digestion à la trypsine s'effectuait sur gel. Pour cela les petits morceaux de gels étaient décolorés trois fois par ajout de 200 μL de bicarbonate d'ammonium (10 mM) dissout dans un mélange eau/acétonitrile (60/40 v/v), puis finalement lavés par 200 μL d'acétonitrile pendant 5 minutes. Les morceaux de gels lavés étaient alors séchés au Speed-Vac, puis les protéines contenues étaient réduites au dithiothreitol (DTT) (30 minutes d'incubation à température ambiante dans une solution de 60 μL à 10 mM de DTT) et alkylées à l'iodoacetamide (IAA) (30 minutes d'incubation à température ambiante et au noir dans une solution de 60 μL à 100 mM d'IAA).

Par la suite, chaque échantillon était déshydraté à l'acétonitrile (200 μL , 5 minutes, agitation douce) puis lavés au bicarbonate d'ammonium (200 μL à 10 mM, 10 minutes, agitation douce) et enfin une dernière fois déshydraté à l'acétonitrile et séché au Speed-Vac.

La digestion à la trypsine était alors effectuée sur la nuit à 37°C en suivant les recommandations du fournisseur (Promega, Madison, WI, USA), puis les morceaux de gels lavés pour extraire les peptides avec 50 μL de bicarbonate d'ammonium 5 mM pendant 10 minutes à température ambiante. La phase liquide contenant les peptides était collectée et l'extraction des peptides répétée avec 50 μL d'un mélange acétonitrile/eau/acide formique à 85% (50/44/0.06 v/v/v).

Les peptides extraits étaient alors complètement séchés au Speed-Vac (3h) et dessalés au moyen de pointes équipées de résine de séparation des peptides ZipTip- μC18 tips (Millipore, Billerica, MA, USA). Finalement les peptides dessalés étaient récoltés dans une solution d'acétonitrile (80%) et d'acide formique (0,1%), évaporée au Speed-Vac et le lysat peptidique était resuspendu dans une solution d'acide formique à 0,1% pour analyse par LC-MS/MS.

III.7.3. Chromatographie liquide et spectrométrie de masse tandem

Les lysats peptidiques ont été séparés sur un système de chromatographie ultra haute performance (UHPLC - Ultimate 3000, Dionex/Thermo Fisher Scientific, Idstein, Germany).

Un volume de 5 μL d'échantillon a été chargé sur la pré-colonne (μ -precolumn, Acclaim PepMap, 75 μm de diamètre interne, 2 cm, C18, Thermo Scientific) puis séparé et élué de la colonne analytique (PepMap Acclaim C18 LC Column, 25 cm, taille de particule de 3 μm , Thermo Scientific).

Pour la pré-colonne, la phase mobile était constituée d'un mélange à 4% (v/v) d'une solution A à 80% d'acétonitrile et 0,08% d'acide formique, et à 96% d'une solution B à 0,01% d'acide formique, toutes deux préparées en solution d'eau nanopure.

Pour la colonne analytique et l'élution des peptides, un gradient non linéaire d'acétonitrile était effectué à partir des solutions A et B, augmentant la fraction de la phase B de 4 à 55% en 150 minutes.

La spectrométrie de masse (MS) était effectuée sur un appareillage Q Exactive HF MS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) équipé d'une source TriVersa NanoMate (Advion, Ltd., Harlow, UK) et couplée à la UHPLC. La MS était paramétrée en mode HCD (higher energy collision dissociation) à une énergie de collision normalisée de 30%. Les scans (loop couny de 20) étaient mesurés avec une résolution de 120000 dans la gamme de 350-1600 m/z. La cible de quantification des ions était fixée à $3 \cdot 10^6$ au temps d'injection de 80 ms. Pour la fragmentation MS/MS, les ions étaient isolés sur le quadrupole avec une fenêtre de 1,6 Da et mesurés avec une résolution de 15000 dans la gamme de 200-2000 m/z. La durée d'exclusion dynamique était fixée à 30 secondes avec une tolérance de 10 ppm, alors que le contrôle du gain automatique était de $2 \cdot 10^5$ avec un temps d'injection de 120 ms et un ratio de sous-remplissage de 1% (Starke et al., 2017).

III.7.4. Analyse des données métaprotéomiques générées

Les données brutes ont été traitées avec le logiciel Proteome Discoverer (v1.4.1.14; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A partir des spectres acquis en MS/MS, des recherches peptidiques étaient effectués sous Sequest HT contre la base de données Uniprot-TrEMBL (mise à jour le 6 Avril 2016). Les paramètres de recherche fixés étaient i) le clivage à la trypsine avec la permission de jusqu'à deux erreurs, ii) une tolérance de 10 ppm et 0,05 Da sur les ions peptidiques, iii) l'oxydation des résidus méthionine et la carbamylation des résidus lysines et arginines et iv) la carbamidométhylation des résidus cystéines.

De plus, seuls les peptides avec un taux de fausse découverte (false discovery rate -FDR) inférieur à 1% (calculé avec Percolator Käll et al., 2007) et un rang peptidique de 1 ont été considérés. Ces recherches peptidiques aboutissaient à la génération de groupes de protéines (par la suite appelés protéines pour de raison de simplification).

Les données obtenues étaient alors filtrées en conservant uniquement les peptides de « haute confiance » (high peptide confidence sous Proteome Discoverer) ainsi que seulement les protéines différenciables et distinctes.

Par la suite, le pipeline d'accès libre ProPhane® était utilisé pour déterminer la classification taxonomique (basée sur les bases de données NCBI et BlastP) et la prédiction fonctionnelle par catégorisation des clusters de groupes orthologues (Cluster of Orthologous Groups - COG) basée sur RPSBLAST (Schneider et al., 2011). Seules les protéines identifiées étaient conservées et pour chaque réplicat le facteur d'abondance spectrale normalisé (normalized spectral abundance factor - NSAF) était calculé pour compenser le biais quantitatif induit par la différence de taille entre protéines (Paoletti et al., 2006).

Le traitement des triplicats consistait par la suite à ne conserver que les protéines présents dans au moins 2 réplicats sur 3. En d'autres termes, les protéines présentes dans seulement un triplicat étaient considérées comme des faux positifs et supprimées, alors que les autres étaient conservées et considéraient selon la valeur moyenne obtenue.

Les échantillons des duplicats biologiques (réacteurs) étaient alors groupés selon le temps d'incubation (4 temps d'échantillonnage considérés par réacteurs), générant moyenne et écart-type pour chaque protéines.

Pour obtenir plus d'informations sur la structure du metaprotéome, les protéines identifiées ont été soumises à l'assignation des familles de CAZY via le pipeline d'annotation utilisé pour la mise à jour quotidienne de la base de données CAZY comme décrit par Svartström et al. (2017). Le traitement ultime des données générées et leur visualisation ont été effectués sur R, avec notamment les packages ggplot2 (v.2.2.1) et mixOmics (v.6.3.1).

**Chapitre IV : Evaluation du potentiel biologique
lignocellulolytique acidogène de l'inoculum
rumen**

VI.1. Introduction du chapitre

Alors que la biomasse lignocellulosique constitue le plus grand réservoir de carbone renouvelable sur Terre et représente une bonne alternative aux ressources fossiles, sa valorisation reste encore limitée par sa récalcitrance à la dégradation.

Bien que la bioconversion de la lignocellulose ait été largement étudiée dans le cadre de la production de biocombustibles (éthanol, biohydrogène ou méthane), d'autres approches comme la plateforme des carboxylates permettent de produire des intermédiaires et composés chimiques d'intérêt industriel. Dans tous les cas, l'amélioration de la dégradation du substrat lignocellulosique passe par le recours à des prétraitements (chimiques, mécaniques, thermiques...) ayant pour but de diminuer sa récalcitrance.

Pourtant dans la Nature, la lignocellulose est prise en charge par des écosystèmes microbiens présents dans les sols ou les systèmes digestifs des animaux. Ces consortia microbiens naturels déploient une large diversité enzymatique pour déconstruire la lignocellulose. Ainsi, le management de ces consortia en conditions contrôlées constituerait une alternative intéressante pour faire face à la complexité de structure et de composition des substrats lignocellulosiques. La question qui se pose alors est de savoir comment obtenir et maintenir des communautés microbiennes complexes issues d'écosystèmes naturels (ligno)cellulolytiques pour leur utilisation en conditions contrôlées ?

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à la stabilisation d'une communauté microbienne issue de rumen bovin, sélectionnée pour sa capacité naturelle à favoriser la transformation de biomasse lignocellulosique en carboxylates. La première partie de ce chapitre concerne ainsi la description de l'enrichissement de cette communauté en réacteur batch séquentiel (SBR) en conditions d'anaérobiose et avec de la paille de blé non prétraitée comme seule source de carbone.

Parallèlement, la même communauté initiale a été enrichie directement dans l'animal (*in vivo*), c'est-à-dire que l'alimentation bovine a été progressivement modifiée en incluant de la paille de blé jusqu'à que celle-ci constitue la seule source de carbone. Les capacités de cette communauté enrichie « *in vivo* » à dégrader la paille de blé ont été évaluées dans les mêmes conditions que celle obtenue en bioréacteur « *in vitro* » (en environnement contrôlé). Leur comparaison fait l'objet de la seconde partie de ce chapitre.

Dans les deux cas, *in vivo* ou *in vitro*, les capacités des communautés à transformer la biomasse ont été évaluées en suivant les dynamiques de dégradation du substrat non prétraité, de production de carboxylates, ainsi que de production d'enzymes (xylanase et CMC_{ase}) hydrolytiques impliquées dans la dégradation du substrat.

IV.2. Efficient anaerobic transformation of raw wheat straw by a robust cow rumen-derived microbial consortium

This subchapter was published as Lazuka et al. (2015) in *Bioresources Technology*:

“Lazuka, A., Auer, L., Bozonnet, S., Morgavi, D.P., O’Donohue, M., Hernandez-Raquet, G., 2015. Efficient anaerobic transformation of raw wheat straw by a robust cow rumen-derived microbial consortium. *Bioresour. Technol.* 196, 241–249.”

with the main conclusions:

A stable lignocellulolytic rumen-derived consortium was successfully obtained.

The enriched consortium degraded 55.5% lignocellulose, producing mainly carboxylates.

A three-phase behavior was observed for macrokinetic and enzymatic parameters.

IV.2.1. Abstract

A rumen-derived microbial consortium was enriched on raw wheat straw as sole carbon source in a sequential batch-reactor (SBR) process under strict mesophilic anaerobic conditions. After five cycles of enrichment the procedure enabled to select a stable and efficient lignocellulolytic microbial consortium, mainly constituted by members of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla. The enriched community, designed rumen-wheat straw-derived consortium (RWS) efficiently hydrolyzed lignocellulosic biomass, degrading 55.5% w/w of raw wheat straw over 15 days at 35°C and accumulating carboxylates as main products. Cellulolytic and hemicellulolytic activities, mainly detected on the cell bound fraction, were produced in the earlier steps of degradation, their production being correlated with the maximal lignocellulose degradation rates. Overall, these results demonstrate the potential of RWS to convert unpretreated lignocellulosic substrates into useful chemicals.

Keywords: Lignocellulose bioconversion; Anaerobic consortium; Carboxylate production; Xylanase; Cellulase.

IV.2.2. Introduction

Lignocellulose (LC) is the most abundant terrestrial reservoir of renewable carbon on Earth and thus its use as feedstock for industrial processes is considered to be a viable alternative to fossil resources. In the field of bioconversion, the production of ethanol, methane and H₂ from LC has been widely studied (Chang et al., 2010; Yan et al., 2012). Similarly, carboxylates (volatile fatty acids – VFAs) are also an interesting product of LC bioconversion, since these are intermediate building blocks for the production of polyhydroxyalkanoates, which are potentially useful as bioplastics (Kleerebezem and van Loosdrecht, 2007). Nevertheless, whatever the target molecule, much progress remains to be achieved to overcome the recalcitrant nature of LC.

Lignocellulosic biomass is a composite material, with cellulose (30-55%), hemicelluloses (18-37%) and (10-30%) lignin as the main constituents. These macromolecules are organized in a complex, heterogeneous matrix that confers to LC hydrophobicity, strength and resistance to biotic and abiotic attack.

In Nature, the recycling of LC is performed by LC-utilizing microbial consortia, present in soils and guts of animals, which deploy complex arsenals of enzymes including, cellulases, hemicellulases and lignin-degrading enzymes to overcome the complexity of LC. Accordingly, microbial consortia constitute an interesting paradigm for LC bioconversion. In particular, the use of microbial consortia in controlled bioreactors is a promising alternative to the deployment of single microorganisms. In contrast to the latter, microbial consortia do not require sterile operating conditions, display a more diversified enzymatic arsenal, show high metabolic diversity and versatility and generally remain stable and robust in a broad range of conditions (Kleerebezem and van Loosdrecht, 2007). Moreover, microbial consortia are more advantageous than pure strains artificially mixed in the laboratory because they rely on natural symbiotic interactions and coupled metabolisms that provide the basis of their robustness and can prevent undesirable phenomena in bioreactors, such as feedback inhibition. Overall, assuming that the advantages of microbial consortia can be fully harnessed in artificial environments, these constitute an interesting biocatalytic alternative for the industrial bioconversion of LC into useful products.

In previous studies, microbial consortia operating under both aerobic and anaerobic conditions have been successfully enriched on different types of biomass (Gao et al., 2014; Guo et al., 2010; Jiménez et al., 2014; Reddy et al., 2011; Trifonova et al., 2008). The selection of microbial consortia has been mainly directed towards the production of proteins (Guo et al., 2010), or the biological pretreatment of LC and enhance methane production (Yan et al., 2012). Nevertheless, most of these studies used simplified cellulosic substrates (e.g. carboxymethylcellulose, Avicel, filter paper) or physico-chemically pretreated biomass (Eichorst et al., 2014; Yan et al., 2012), thus circumventing some of the difficulties linked to the complex structure of intact LC. Moreover, only a few studies have dealt with the enrichment of stable microbial consortia under strictly anaerobic conditions, thus the diversity and potential of microorganisms involved in LC decomposition in anaerobic environments remains poorly explored (Gao et al., 2014).

In this study, a natural bovine rumen consortium was enriched under strict anaerobic conditions, selecting for carboxylate production. Selection was performed by SBR cultivation, using raw wheat straw as the sole carbon source. Wheat straw was selected as substrate because it is considered one of the main LC feedstocks with about 34 Mt dry matter (DM) of extractible for being available in Europe for biorefinery purpose (Pajual and O'Donohue, 2013). Regarding the enrichment process, it is described herein in terms of biomass degradation, VFA production and also from the standpoint of the dynamic behavior of the microbial community. The major outcome of this study is the enrichment of a stable microbial community that displays good aptitude for the bioconversion of LC biomass into VFAs. Using the enriched consortium, the kinetic of LC deconstruction has been deeply studied, monitoring the physico-chemical composition of the substrate and characterizing the products. A particular effort was made to correlate enzyme deployment in both the liquid and solid fractions with biomass degradation to identify the rate limiting steps LC bioconversion process under strict anaerobic conditions.

IV.2.3. Materials and methods

IV.2.3.1. Lignocellulosic substrate and inoculum

20 kg of straw from the winter wheat variety Koreli was harvested at an experimental farm (INRA, Boissy-le-Repos, France) in August 2011. After harvest, the straw was milled to 2 mm and stored at room temperature (20-25°C).

The non-producing Holstein dairy cows used in this study were reared according to the national standards fixed by the legislation on animal care (Certificate of Authorization to Experiment on Living Animals, no. 004495, Ministry of Agricultures, France). In particular, the cows were fed a standard dairy cow ration composed of corn silage (64% DM), hay (6% DM) and concentrate (30% DM). They were fed *ad libitum* once a day in the morning and sampling was done just before feeding. For sampling, the whole rumen content was collected just before feeding from two individuals fitted with rumen cannula. Rumen contents were taken from various parts of the rumen and manually homogenized. Subsamples (30g) were immediately frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C.

IV.2.3.2. Anaerobic reactor

Bioconversion was carried out in anaerobic SBR (2L BIOSTAT® A+, Sartorius, Germany) using a mineral medium containing wheat straw as the sole carbon source (20g.L⁻¹). The mineral medium (MM) contained, per liter of distilled water: KH₂PO₄, 0.45g, K₂HPO₄, 0.45g; NH₄Cl, 0.4g; NaCl, 0.9g; MgCl₂.6H₂O, 0.15g; CaCl₂.2H₂O, 0.09g. MM was supplemented with 250µL of V7 vitamin solution (Pfennig and Trüper, 1992), and 1mL trace elements solution, containing per liter of distilled water: H₃BO₃, 300 mg; FeSO₄.7H₂O, 1.1 g; CoCl₂.6H₂O, 190 mg; MnCl₂.4H₂O, 50 mg; ZnCl₂, 42 mg; NiCl₂.6H₂O, 24 mg; NaMoO₄.2H₂O, 18 mg; CuCl₂.2H₂O, 2 mg; sterilized by filtration (0.2 µm).

Reactors were operated under mesophilic temperature (35°C) and pH was regulated at 6.15 by the addition of 1M NaOH. Anaerobic conditions were ensured by nitrogen flush at the beginning of the experiment. To avoid methanogenic conditions bromoethansulfonate (BES), a methanogenesis inhibitor, was added at the beginning of experiment (1mM). During the experiment, if methane was detected in the biogas, BES was spiked until a maximum concentration of 10 mM.

To progressively enrich a LC-degrading microbial consortium, a first batch reactor was initiated by inoculating (2% w/v) fresh medium with raw cow rumen (pooled from the two cows, thawed overnight at 4°C). This reactor was operated for 7 days before removing 10% v/v of its content, which was used as inoculum for the subsequent batch reactor. In this manner, SBR cultures were performed until VFA reached a stable concentration. Thereafter, 200mL samples of the enriched consortium RWS were frozen under liquid nitrogen and stored at -80°C. After thawing at 4°C overnight, these frozen samples of the RWS consortium were used as inocula for further experiments. Deeply characterization of LC degradation by the enriched RWS consortium was performed in three biological replicate reactors incubated for fifteen days in the conditions described above. Reactors were carried out at three months intervals; they were inoculated with the same source of inoculum stored at -80°C.

IV.2.3.3. Chemical analyses

Total solids (TS) were measured using 10 mL samples that had first been centrifuged (7197 x g, 10 min), rinsed twice with distilled water and dried 24h at 105°C. The mineral fraction (MF) was estimated by mineralization of the samples at 500°C for 2h, and volatile solids (VS) were estimated from the difference between TS and MF. VS degradation was expressed as weight/weight percentages.

Wheat straw composition was determined using the sulfuric acid hydrolysis method described by de Souza et al. (2013) on 40 mg samples. Quantitative detection of monomeric sugars was achieved using high performance liquid chromatography (HPLC) on a Ultimate 3000 Dionex separation system equipped with a BioRad Aminex HPX 87H affinity column and a refractive index detector (Thermo Scientific) as described by Monlau et al. (2012).

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis was performed on lyophilized samples using an attenuated total reflection (ATR) Nicolet 6700 FT-IR spectrometer (Thermo Fisher) equipped with a deuterated-triglycine sulfate (DTGS) detector. Spectra were recorded in the range 400-4000 cm⁻¹ with a 4 cm⁻¹ resolution. Each sample was recorded 5 times and analyses were performed using average spectra resulting from 32 individual scans. For FT-IR spectral analysis, the peak ratio 1512:1375 cm⁻¹ was considered to be a lignin:holocellulose ratio (Monlau et al., 2012).

The peaks 1430 cm^{-1} and 898 cm^{-1} were attributed to the amounts of crystalline and amorphous cellulose respectively (Monlau et al., 2012) and the ratio of these peaks was considered to be the lateral order index (LOI), which is the ratio of crystalline:amorphous cellulose.

VFA production was determined by gas chromatography (GC), using a Varian 3900 chromatograph as described by (Cavaillé et al., 2013). The total organic carbon (TOC) content of the liquid fraction was measured using a TOC analyzer (TOC-V_{CSN}, Shimadzu Co., Japan). Gas composition was analyzed using a chromatograph HP 5890 equipped with a conductivity detector and a HAYSEP D column.

All the macro-kinetic parameters are expressed as average values obtained in triplicate biological reactors.

IV.2.3.4. Enzyme activity assays

For enzyme activity measurement, triplicate reactor samples (5 mL) were removed at regular intervals. Samples were centrifuged at $7197 \times g$ for 10 min at 4°C thus yielding a supernatant and a solid pellet. It was assumed that the supernatant contains extracellular enzymes, while the pellet is representative of cell-bound enzymes. The latter was suspended in 6 mL of acetate buffer solution (50 mM, pH 6), placed on ice and sonicated four times for 20s each using a sonication device (Bandelin Sonoplus HD 2070, MS73 probe) operating at 60W.

For each reactor and each sampling time, end point enzymatic activities were measured in technical duplicates in both the extracellular and cell-bound fractions. Enzymatic activities were expressed as average values obtained on triplicate reactors.

Xylanase and endoglucanase (CMCase) activities were measured using 1% w/v xylan beechwood (Sigma) and 1% w/v carboxymethyl cellulose (CMC) (Sigma) respectively dissolved in buffer solution. Activities were estimated by measuring the release of reducing sugar equivalents after incubation at 35°C for 1h (xylanase) or 4h (CMCase). Reducing sugars were determined using the dinitrosalicylic acid (DNS) method, measuring absorbance of the sample at 570 nm using a UV/VIS spectrophotometer (Multiskan Ascent, Thermo Scientific). One unit of CMCase or xylanase activity (UA, unit of activity) was defined as the amount of enzyme that produces $1\ \mu\text{mol}$ of reducing sugars per minute. Exoglucanase (cellobiohydrolase) and β -glucosidase activities were assessed using fluorescent methylumbelliferyl (MUF) substrates (MUF cellobioside and MUF glucopyranoside, Sigma) and methylumbelliferone as standard.

Incubation was carried out for 2 minutes in the same conditions as above. Measurements were made with a Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). One unit of exoglucanase or β -glucosidase activity (UA) was defined as the amount of enzyme that produces 1 μ mol of methylumbelliferone per minute.

IV.2.3.5. Analysis of microbial diversity

For bacterial diversity analysis, samples (1.5mL) were removed and immediately centrifuged (13 000 x g, 5 min, 4°C). Subsequently, the supernatant was removed and the solid pellet was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Simultaneous DNA/RNA extraction was performed using the PowerMicrobiome RNA isolation kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Cell lysis was carried out using a FastPrep Instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA; 2 x 30 seconds at 4 ms⁻¹). Subsequently, DNA purification was carried out using the AllPrep DNA/RNA mini kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions.

Microbial diversity was analyzed using MiSeq Illumina sequencing performed by the GenoToul Genomics and Transcriptomics facility (Auzeville, France). A 460 bp fragment corresponding to the highly variable V3-V4 region of 16S rRNA gene was amplified from genomic DNA samples using bacterial universal primers F343 and R784 (Table IV-1). Primer sequences and PCR conditions are detailed in Table IV-1. The resulting PCR products were purified and loaded onto the Illumina MiSeq cartridge according to the manufacturer's instructions. Joined-pair reads (56,000 reads per sample, minimum 30,224) were pre-processed and filtered for chimeras using a Mothur pipeline (Schloss et al., 2009).

Table IV-1: Primers and conditions for PCR amplifications

	F343	5'-CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTACGGRAGGCAGCAG-3'
PCR1	R784	5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT-3'
	cycles	94°C/60s - 30x(94°C/60s - 65°C/60s - 72°C/60s) - 72°C/10min
	FP2	5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACTCTTCCCTACACGAC-3'
PCR2	RP2	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT- index -GTGACTGGAGTTCAGACGTGT-3'
	cycles	94°C/60s - 12x(94°C/60s - 65°C/60s - 72°C/60s) - 72°C/10min

Operational taxonomic units (OTU; 97% similarity) were defined using a random subsample of 15,000 sequences per sample using Mothur default parameters, and OTUs that were less than 10 sequences across all samples were filtered. OTUs were taxonomically classified using Mothur and LTPs115 SSU database. Comparative analysis of samples was performed on a random subsample of 10,000 high quality sequences per sample. These produced saturated rarefaction curves (Supplementary data

S. IV-1) and were sufficient to assess relationships among samples (Caporaso et al., 2011).

Community diversity was estimated using the Simpson and Shannon diversity index. The richness, at 97% similarity, was estimated using Chao and the abundance coverage estimator (ACE). The distance between communities present in different samples was estimated using the Bray-Curtis dissimilarity index and weighted Unifrac distances, calculated using the Phyloseq R package v1.6.1 (McMurdie and Holmes, 2013). These distances were used to ordinate samples with Hclust R function.

The sequencing data generated in this study were deposited in the NCBI Sequence Read Archive and are available under the project number PRJNA284586.

IV.2.4. Results and discussion

IV.2.4.1. Enrichment: macro-kinetic and diversity analyses

In this study, a sequential culture enrichment strategy was deployed to obtain a stable rumen-derived microbial community displaying good LC biomass hydrolysis capability. Likewise, the aim was to reduce the complexity of the initial microbial inoculum and to study the resultant LC-degrading, VFA-producing microbial community.

Gratifyingly, after only 10 SBR subculture cycles a stable consortium (RWS) was obtained that is characterized by its ability to release up to 35% VS, accumulating up to 1.94 ± 0.04 gC VFA.L⁻¹ over a 7-day period when operating at 35°C (Figure IV-1a). Amplicon sequencing of the 16S rDNA gene revealed that important changes in the microbial community had accompanied the acquisition of higher VFA production and LC biomass degradation capability (Figure IV-1b). The majority of these changes occurred in the initial enrichment phase, specifically by the end of the second SBR cycle. These radical changes can almost certainly be attributed to the transition from the natural environment of the rumen to the artificial conditions of the bioreactor and thus mainly correspond to community acclimation.

Table IV-2: Observed richness (ACE and Chao) and diversity index (Simpson and Shannon) along the enrichment process.

SBR cycle	Ti	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Shannon index	4.45	3.71	3.25	3.51	3.47	3.04	3.11	3.16	3.17	3.08	3.38
Simpson index	36.8	21.1	12.6	16.1	14.9	7.7	7.8	8.9	9.8	8.2	11.7
ACE richness	282.9	241.5	203.7	219.7	195.5	191.4	199.0	192.4	195.5	191.7	186.5
Chao richness	287.4	255	205.6	224.7	194.2	191.3	201.3	193	217.8	185.5	187.3

Ti: initial time

Compared to the rumen inoculum, the community richness, estimated by the ACE and Chao methods, decreased strongly from 282.9 and 287.4, respectively, to 241.5 and 255.1 after the first SBR cycle and to 203.7 and 205.6 at the second SBR cycle. Similarly, determination of the Simpson diversity and Shannon index revealed a loss in diversity, which was particularly marked during the two firsts SBR cycles and then stable along the subsequent enrichment cycles (Table IV-2).

Comparison of the Simpson diversity across the whole experiment, from the rumen-derived inoculum to the final SBR cycle (C10), revealed that it had dropped from 36.8 to 11.7. Similarly, the Shannon index decreased from 4.45 to 3.38. Hierarchical Unifrac clustering of the initial community presented in the inoculum and those generated at the end of each SBR cycle revealed that two community groups cluster together (

Figure IV-1c). The first cluster encompasses the communities present during the first four SBR cycles, whereas the second one contains the communities from SBR cycles 5 to 10.

Correlation of these results with the higher degradation of LC biomass and VFA production (described below) suggests that the microbial community evolved towards a structure that better expresses the wheat straw degradation and VFA production functions within the conditions defined by the experiment. Significantly, the communities that grouped in the second cluster are rather similar, reflecting the relative stability of the community's structure after five cycles of SBR enrichment.

Similar rapid stabilization of enriched microbial communities has already been reported by Jiménez et al. (2014) and Trifonova et al. (2008), with stable microbial communities being obtained after six transfers on wheat straw and five transfers on grass fiber respectively. Overall, this rapid stabilization underlines the stringency of the enrichment conditions and suggests that the use of LC biomass as a sole carbon source is a good way to select a LC-degrading microbial community.

The analysis of the community's composition during the successive SBR cycles showed a dominance of OTUs related to the phylum *Bacteroidetes* (44%-70%), followed by *Firmicutes* (17%-46%) and *Proteobacteria* (2%-18%), which constituted more than 85% of the total community (Figure IV-1b).

The relative abundance of the *Bacteroidetes* phylum increased during the first five SBR subcultures (from 44% to 66%); and stabilized between the fifth and the last cycle of enrichment (Figure IV-1b). Within the *Bacteroidetes* phylum, it is noteworthy that the *Bacteroidia* class diminished during the enrichment process to the benefit of an unclassified class, composed of only one OTU. This latter was related to the unclassified *Bacteroidetes* clone P5_J07 (EU381760, 100% identity) that has already been identified in the ruminal microflora (Kong et al., 2010). This OTU increased from a relative abundance of 3% in the inoculum to 28% in the SBR cycles 5-10. A second dominant OTU that was enriched during the SBR subculture process (from 1% to 14%) was closely related to *Bacteroides graminisolvens* strain JCM 15093 (*Bacteroidetes* phylum, 100% identity), a known xylanolytic anaerobic bacterium able to produce acetate, propionate and succinate (Nishiyama et al., 2009). *Prevotella* genus was well represented with several OTUs including *P. ruminicola* and *P. brevis*, known ruminal bacteria able to produce succinate that can be further decarboxylated into propionate (Ramsak et al., 2000); OTUs related to unclassified *Prevotella* species were also present. The *Clostridia* class (*Firmicutes* phylum), highly abundant in the rumen inoculum (43%), decreased after the first cycle of SBR enrichment, but then stabilized at a relative abundance of 20% in subsequent SBR cycles. This class included *Butyrivibrio* species, able to transform xylan and produce butyrate (Krause et al., 2003); *Ruminococcus albus*, a ruminal cellulose degrader and acetate producer (Christopherson et al., 2014); various *Clostridium* species, reported as displaying cellulase and/or hemicellulase activities; *Eubacterium cellulosolvens*, a cellulose degrader known to produce mainly butyrate, succinate and valerate (Prins et al., 1972), as well as numerous unclassified *Clostridiales*.

Therefore, it appears that members of RWS consortium are particularly well-equipped to degrade LC biomass and produce VFA. These observations are consistent with those of previous studies that have identified *Firmicutes* and *Bacteroidetes* as dominant phyla in LC-degrading ecosystems and are known to participate in the hydrolytic and acidogenic steps in carboxylate production systems (Hollister et al., 2011).

Moreover, the enrichment of members of *Bacteroidetes* has been previously observed in experiments where strict anaerobic conditions have been applied (Gao et al., 2014).

During the enrichment process the hydrolytic capability of the microbial community was estimated by measuring the residual VS content and metabolite production. This revealed that biomass degradation almost doubled between the first SBR cycle and the final enrichment step, increasing from 20 to 35% VS (Figure IV-1a).

This increase in biomass degradation was particularly marked during the first four SBR cycles (from 18.5 ± 2.2 % VS to 24.7 ± 4.1 % VS), after which progress was steadier (between 24.7 ± 4.1 % VS and 36.1 ± 2.4 % VS). Similar behavior was observed on VFA accumulation, increasing from 1.23 ± 0.01 to 1.56 ± 0.12 gC.L⁻¹ between the first and sixth cycles (Fig 1a). Significantly, stabilization of the community's LC biomass-degrading function correlates quite well with the evolution of the community's composition, since from the fifth SBR cycle the community grouped together with the final one (Figure IV-1c). This result clearly underlines the benefit of the enrichment procedure and the fact that only ten successive cultures were necessary to procure a functionally- and microbiologically-stable consortium. Moreover, from the fifth to the tenth cycle of enrichment, the LC degradation ability and community composition were stable and reproducible after each cycle of culture, showing the robustness and reproducibility of the selected microbial community.

These observations strongly suggest that the LC biomass degradation function, concomitant to VFA production, is linked to the presence of specific species. In this respect it is useful to recall that during the enrichment process the microbial community became progressively enriched in OTUs related to the *Bacteroidetes* phylum and the *Clostridia* class; some of them known for their capacity to produce VFA (See supplementary data S IV-2).

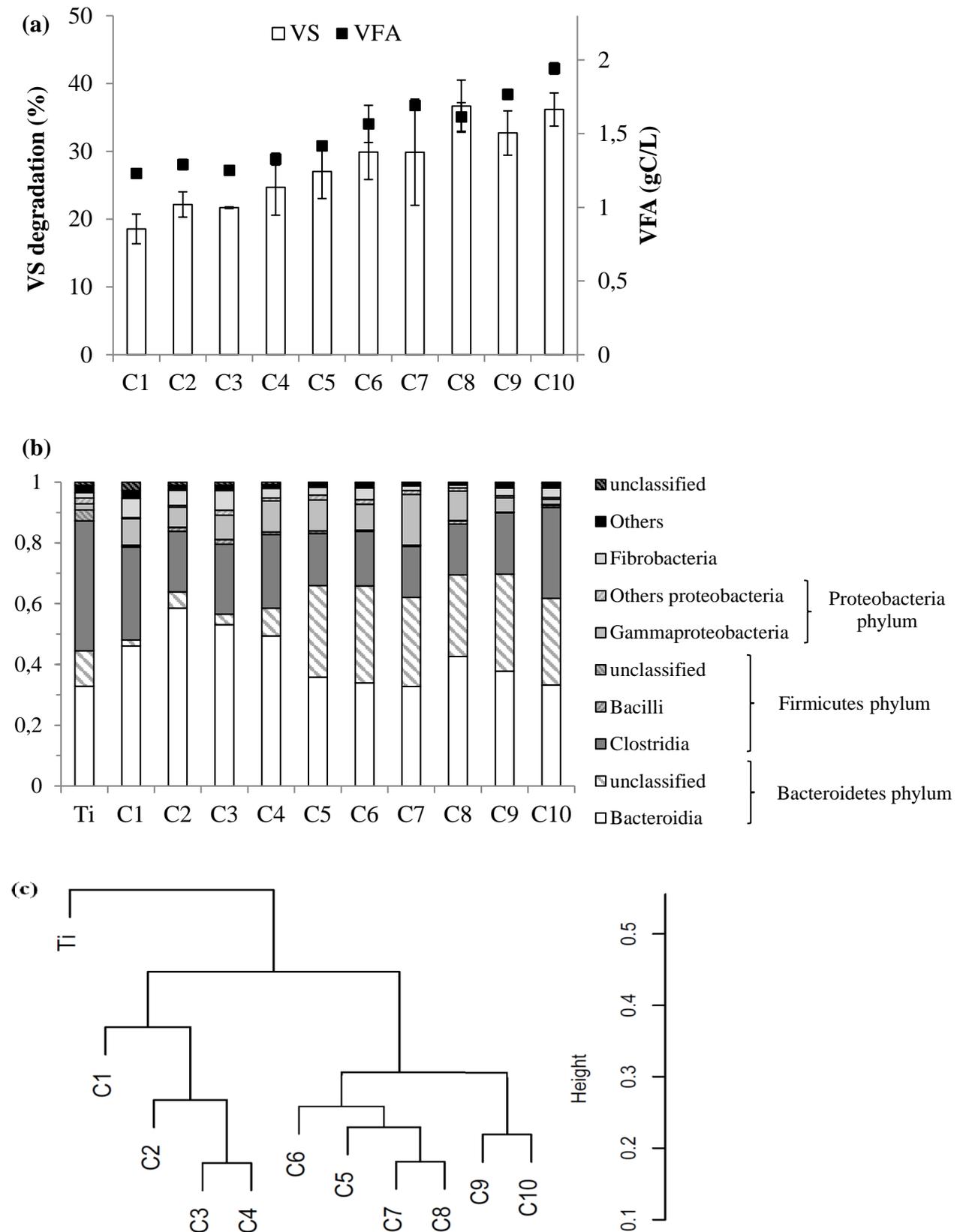


Figure IV-1 : VS degradation and VFA production (a), relative community composition (b) and community clustering (c) thought the enrichment procedure. Error bars in VS degradation are standard deviations of two technical replicates.

Previous studies focused on the production of stable consortia presenting high LC biomass degradation capability, already demonstrated how progressive enrichment of inocula (e.g. compost, soil, and sediment) can be used to procure microbiologically-stable LC biomass-degrading communities, but did not always evidence increases in the potency of the LC biomass-degrading function (Gao et al., 2014; Guo et al., 2010).

However, working with a bovine rumen inoculum (1% v/v), Chang et al. (2010) did obtain results that are consistent with those described here. However, in this latter work a much longer enrichment process (18 cycles) was necessary to obtain a stable community, composed mainly of *Clostridia*. Such community was able to release 27% w/w of hemicellulose and 2% w/w of cellulose after 8 days of cultivation on milled (1 mm) *Napiergrass* (1.5% w/v); whereas in the present study degradation was much higher (35.5% w/w in 7 days) after only 10 cycles of enrichment.

Similarly, the aerobic enrichment of a compost-derived communities on switchgrass and corn stover procured very fast increases in LC biomass-degrading function, with degradation increasing from 8% to 34% (switchgrass) and from 19% to 23% (corn stover) in only 4 cycles (Reddy et al., 2011). Remarkably, in this study it was shown that the main changes occurred between the first and second enrichment cycles, since thereafter both the function and the community structure remained quite stable.

Taken together with results obtained in the present study, it is clear that enrichment can be an efficient method to select for LC biomass-degrading function with strong selection occurring after only a relatively small number of subculture steps. However, the efficiency of the process is almost certainly determined by the biological potential of the initial inoculum, the culture conditions and the specific composition of the biomass.

To the authors' knowledge, this study represents the first work demonstrating anaerobic enrichment of rumen-derived inoculum on raw wheat straw as an efficient tool to increase substrate degradation capability and generate a stable and robust consortium.

IV.2.4.2. Characterization of wheat straw degradation by consortium RWS

IV.2.4.2.1. Wheat straw degradation and VFA production by RWS

The LC degradation kinetics of the enriched microbial consortium RWS, obtained after ten SBR subcultures, was studied in detail using the same culture conditions as those used for enrichment. The inoculation rate was 10% v/v and incubation was pursued over a 15-day period. After 7 days, % VS degradation was 36.8 ± 3.6 (Figure IV-2a), reaching 55.5 ± 2.8 after 15 days. Simultaneously, VFA production reached 2.92 ± 0.45 gC.L⁻¹. It is important to note that, although the reactors were not performed simultaneously and that the same source of inoculum was stored for different periods (as detailed in Materials and Methods), similar LC degradation and VFA production rates were observed in all replicate reactors.

Taken together with the remarkable stability of the consortium observed over SBR cycles 5 to 10, it is clear that RWS is highly robust.

The study of the kinetics of VS release and VFA production revealed a 3-phase dynamic behavior. VS degradation was rather low at the beginning of the experiment and then strongly increased from days 2 to 10. Consistently, before day 2, average VFA productivity was 0.155 ± 0.027 gC-VFA.L⁻¹.day⁻¹, increasing thereafter to 0.224 ± 0.008 gC-VFA.L⁻¹.day⁻¹. However, from day 10 onwards, both VS degradation and VFA productivity declined (0.110 ± 0.100 gC-VFA.L⁻¹.day⁻¹). TOC measurements (data not shown) performed on the supernatants showed that no other metabolites (other than VFA) were present. The VFA molar ratio (expressed as %) for acetic (AA), propionic (PA), butyric (BA) and valeric (VA) acid was $65.6 \pm 3.9\%$, $20.5 \pm 3.4\%$, $10.0 \pm 2.9\%$ and $3.8 \pm 3.1\%$ respectively, with this composition remaining rather constant during the 15-day period (Figure IV-2b). This VFA profile is quite typical for acidogenic systems at neutral and slightly acidic pH (Hu and Yu, 2005). Similarly, the CO₂:VFA ratio also remained constant (0.33 ± 0.04 gC-CO₂/gC-VFA), with CO₂ production representing approximately 25% (gC/gC) of all products.

Using the theoretical stoichiometry of the bioconversion of glucose to C₂-C₄ VFA (AA, PA, BA) in ruminant digestive systems (Eq. IV-1, IV-2 and IV-3), and assuming that valeric acid production results from the condensation of acetyl-CoA and propionyl-CoA with oxidation of reduced cofactors (Eq IV-4), the yields of AA, PA, BA and VA can be calculated as 0.66, 0.82, 0.48 and 0.56 g.g⁻¹ respectively (Hu and Yu, 2005; Nozière et al., 2010).

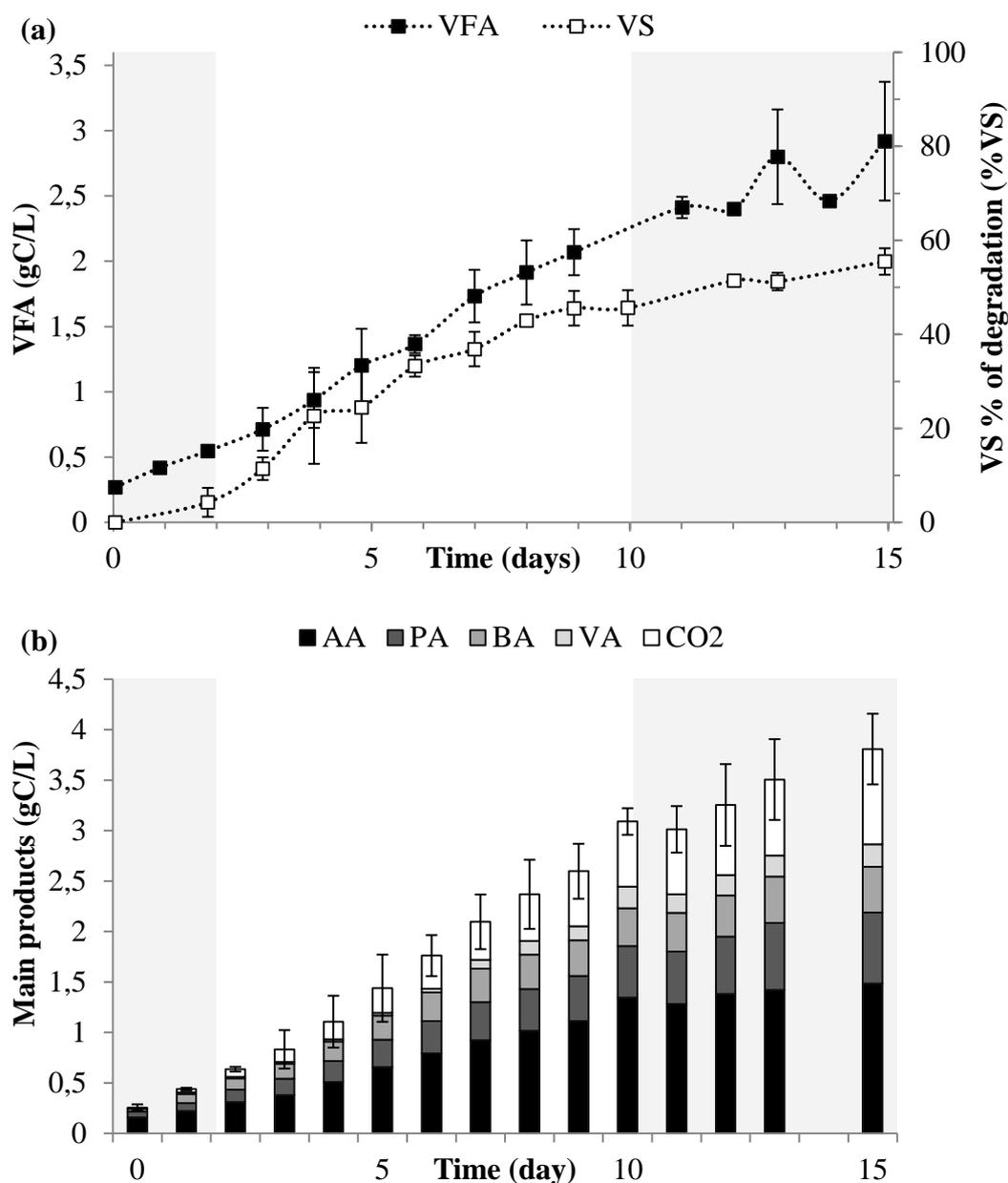


Figure IV-2: Profile of VS degradation and VFA production (a) and products composition of RWS cultivated on wheat straw (b). Error bars are standard deviations of three biological replicates.

Moreover, calculation of the theoretical stoichiometry of VFA production from C₆ degraded sugars based on the wheat straw composition determined in this study reveals a yield of 0.65 g.g⁻¹ (or 0.74 g eq AA.g⁻¹). However, the experimentally-measured VFA yield was 0.49 g.g⁻¹ (or 0.61 g eq AA.g⁻¹), which represents 75% of the theoretical yield. This high VFA yield was achievable because of anaerobic conditions, since unlike aerobic conditions these limit carbon loss in the form of CO₂ and microbial biomass (Feng et al., 2011).

It is noteworthy that the yield of VFA observed in this experiment is quite consistent with that observed in previous studies (0.6 to 0.7 g eq AA.g⁻¹ VS) in which rumen inocula were used to treat corn stover (Datta, 1981; Hu and Yu, 2005).



Using the same equations, the theoretical CO₂ yield is 0.35 g.g⁻¹, while that measured in the present experiments was 0.26 ± 0.03 g.g⁻¹ biomass-derived sugars. The discrepancy between the theoretical and experimentally-measured yields is probably the result of the utilization of a part of the carbon for microbial growth and maintenance, but could also result from CO₂ consumption via homoacetogenic reactions. However, although increased quantity of DNA clearly indicated that microbial growth did occur during the experiment (data not shown), it was not possible to estimate quantitative microbial growth using standard methods, because of interference from the solid wheat straw fraction.

IV.2.4.2.2. Effect of RWS activity on the physicochemical composition of wheat straw

The residual LC biomass was characterized using biochemical (hydrolysis and HPLC) and physical (FT-IR) methods. The monitoring of cellulose and hemicellulose content, performed at several points during the experiment, revealed that these plant polysaccharides were simultaneously degraded, with their hydrolysis following the same kinetic profile and displaying similar residual percentages (Figure IV-3a). This behavior was also similar to the VS degradation kinetics, displaying a high degradation between days 2 and 10, and a relative stability beyond day 10. Thus, the RWS consortium did not preferentially degrade one or the other of these fractions. At the end of the 15-day incubation, more than 60% w/w of holocellulose was degraded. In contrast, the determination of lignin content revealed that this macromolecule was not degraded (data not shown).

Monitoring wheat straw degradation by RWS using FT-IR analysis revealed an increase in both the ratio of the 1512:1375 cm⁻¹ peaks (representing the lignin:holocellulose ratio) and the LOI, representing the ratio of crystalline:amorphous cellulose (Figure IV-3b).

Although these measurements are associated with quite large standard deviations, the time-dependent profile nevertheless correlates well with the 3-phase dynamic behavior of VS loss (Figure IV-2a) and the evolution of the two ratios is opposite to that of the residual holocellulose measurements (Figure IV-3a). Therefore, accounting for the fact that lignin was not degraded, the increase of 1512:1375 cm^{-1} ratio is consistent with a decrease of the holocellulose. Moreover, the increase of the LOI ratio indicates that the RWS consortium preferentially degraded the amorphous cellulose fraction, leaving a residual cellulose fraction enriched in crystalline cellulose.

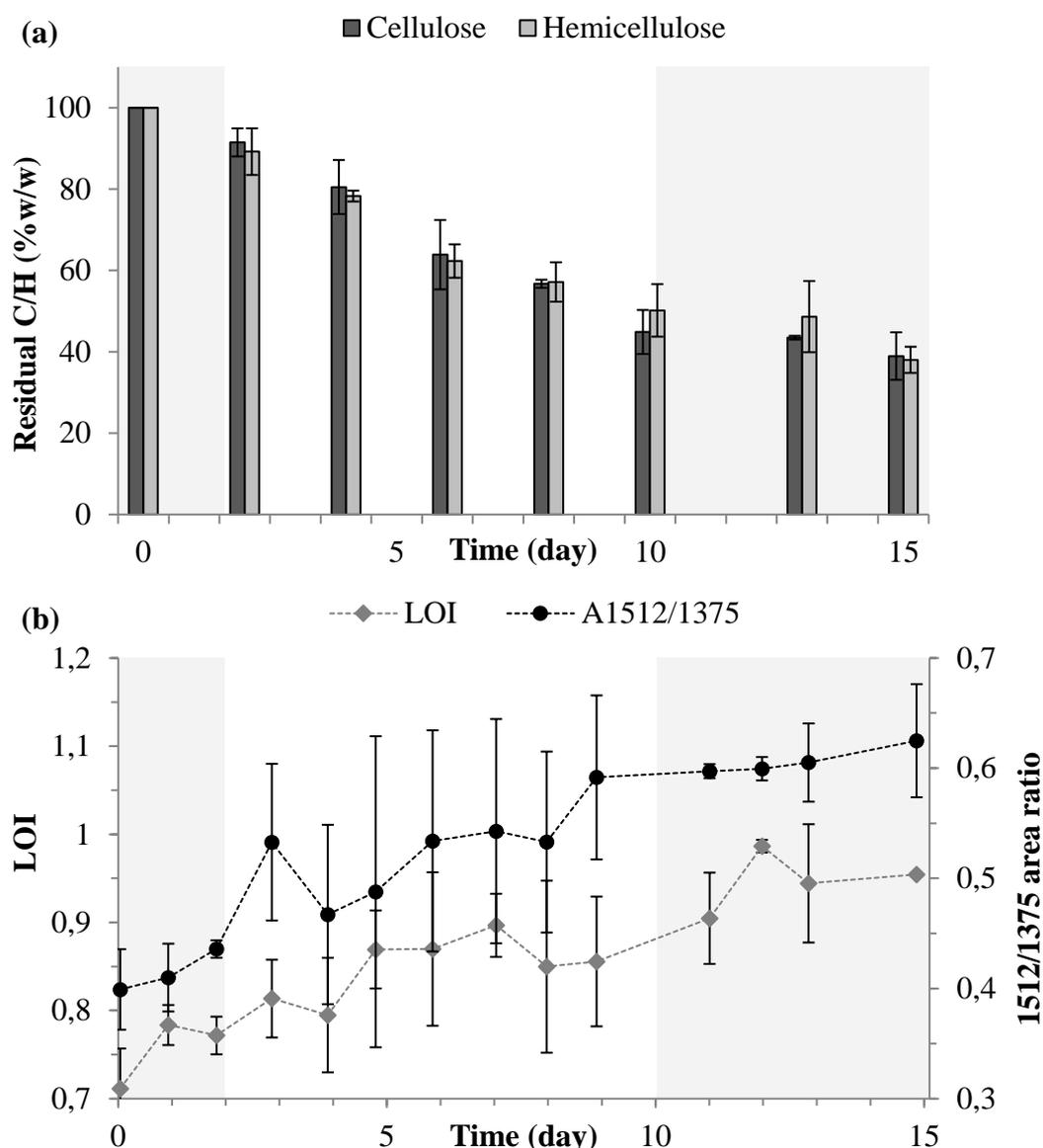


Figure IV-3 :Substrate characterization: residual percentages of cellulose and hemicellulose calculated as percentage from their respective initial concentrations (a) and Lateral Order Index (LOI) and 1512:1375 cm^{-1} area ratio (b). Error bars are standard deviations of three biological replicates.

So far, only a few studies involving the use of enriched microbial consortia have provided detailed insight into how the LC biomass is degraded during the process. Using a compost-derived consortium (XCD-2) enriched on alkali-pretreated lignocellulosic substrates, Guo et al. (2010) showed that LC biomass degradation mainly involved the destruction of the hemicellulosic fraction (up to 89% w/w), with cellulose degradation being only about 12% w/w. This is in sharp contrast to the present study, but the fact that a rumen-derived consortium and untreated raw LC biomass were used may well have orientated the microbial enrichment process, leading to a more efficient functional community. Indeed, alkaline treatment leads to saponification of ester bonds that link hemicellulose to lignin and decorating side-chain groups (e.g. acetyl and feruloyl moieties) to the main xylan chain. The overall effect is to increase the solubility and accessibility of hemicellulose and thus provide a prime target for microbial attack (Hendriks and Zeeman, 2009).

The finding that RWS preferentially degrades the amorphous fraction of cellulose is logical, since it is known that the crystalline fraction is quite resistant to the action of microbial enzymes (Lynd et al., 2002).

The absence of lignin degradation is consistent with the fact that anaerobic bacteria are not widely associated with lignin degradation, this function being much more frequently associated with aerobic fungi, which produce oxidative enzymes such as peroxidases and laccases (Ten Have and Teunissen, 2001). Moreover, studies on bacterial consortia incubated on unpretreated LC substrate (switchgrass) under aerobic conditions, where lignin modification by peroxidase and lacasse oxidation-reactions likely occurs, showed that the physicochemical composition of lignin remain unchanged in the residual biomass after two weeks of incubation (Eichorst et al., 2014). It is clear that native lignin in raw biomass is resistant to bacterial attack.

Nevertheless, despite the fact that lignin was not degraded by RWS, the consortium was able to efficiently degrade holocellulose, demonstrating that lignin modification is not a prerequisite feature of biomass deconstruction by microbial consortia under the applied experimental conditions.

The ability of RWS to concomitantly degrade hemicellulose and cellulose fractions of raw LC substrate to produce VFA is a clear advantage that may have led to the higher LC degradation observed in the present study.

IV.2.4.2.3. Enzymatic activity profiles along wheat straw degradation by RWS

The enzyme activity (xylanase and CMCase) profiles expressed by RWS during the 15-day experiment displayed an initial lag phase that covered the first 2 days (Figure IV-4a). Afterwards, from day 2 to 7 xylanase and CMCase activities increased 4 and 2.5 fold respectively, reaching maximum levels of $0.81 \pm 0.11 \text{ UA.mL}^{-1}$ and $0.04 \pm 0.01 \text{ UA.mL}^{-1}$. Towards the latter part of the experiment CMCase and xylanase activities stabilized.

In sharp contrast, exoglucanase and β -glucosidase activities decreased throughout the 15-day period, even if there was a slight increase in exoglucanase activity between days 5 and 6 (Figure IV-4b). Taken together, these results imply that an endocellulase-like activity (i.e. CMCase) played a more important role in LC biomass degradation by RWS than an exocellulase activity. This is consistent with the fact that amorphous cellulose was the main target for RWS, since it is known that endocellulases mainly act on amorphous regions, whereas exocellulases preferentially act on crystalline cellulose (Lynd et al., 2002).

The localization of the different enzyme activities that were produced by RWS during the experiment revealed that the different enzyme activities were mainly localized in the insoluble pellet fraction (Figure IV-4c). This might imply that different members of the RWS community produced cell-bound enzymes that are perhaps part of cellulosome-like complexes described by Lamed et al. (1983) and observed by Gao et al. (2014). Indeed, several *Clostridia* members known for having a cellulosome complex, such as *R. albus*, were detected in RWS (Christopherson et al., 2014). Nevertheless, the fact that both microbial biomass and wheat straw were present in the pellet fraction, it is impossible to completely affirm that all of the enzymes were actually cell-bound. This is because some free, extracellular enzymes could have remained associated with the solid biomass perhaps forming enzyme-substrate complexes involving high affinity carbohydrate binding domains (Himmel et al., 2010).

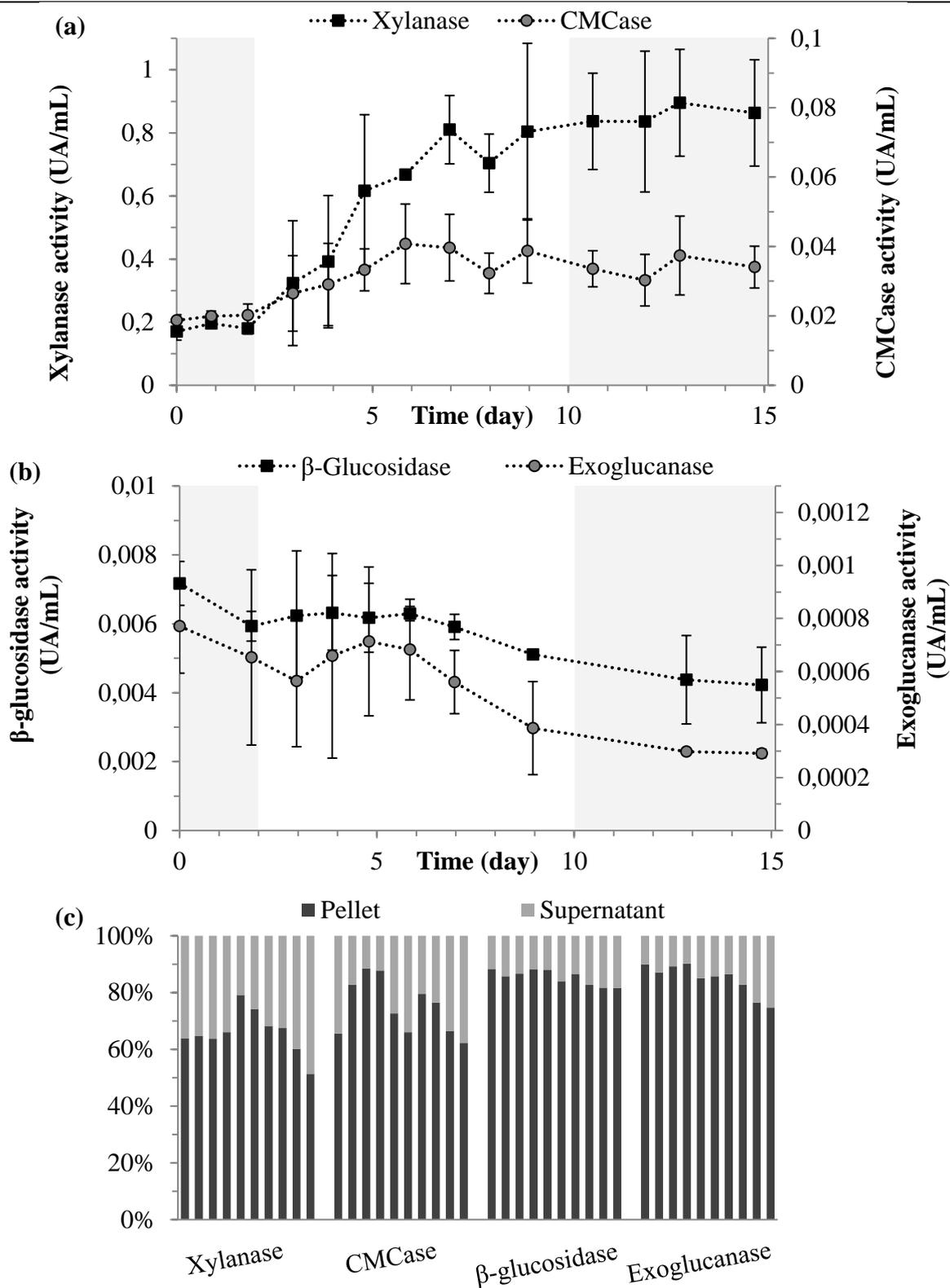


Figure IV-4 : Enzymatic activity profiles of RWS trough wheat straw transformation: Xylanase and CMCase activities(a); beta-glucosidase and cellobiohydrolase activities (b) and pellet:supernatant repartition of the enzymatic activities measured (c). Error bars are standard deviations of three biological replicates.

The integration of the different parameters (VS release, substrate characterization, VFA production, enzyme activities) that describe the degradation of wheat straw by RWS provides an overview of the whole experiment. An initial phase that covers the first two days was characterized by stable, low-level enzyme activity and VFA production and very little biomass degradation. During this phase VFA production was no doubt sustained by the degradation of readily-accessible biomass that could be easily dealt by only small amounts of enzyme. A second phase characterized by high enzyme activities, VFA production and biomass degradation was the result of the use of amorphous cellulose and hemicellulose, with this phase coming to end when the ability of the enzymes to furnish metabolizable sugars from the recalcitrant and more crystalline structure of the remaining substrate became overwhelmingly rate-limiting. Thereafter, despite maintenance of enzyme levels, substrate hydrolysis is low, a fact reflected by lowered VS degradation and VFA production. Overall, the present results clearly highlight the fact that enzyme hydrolysis and the increase of wheat straw recalcitrance throughout the experiment were the rate-limiting steps regulating of the wheat straw to VFA bioconversion process.

Among the studies of microbial consortia acting on LC biomass, only a few have so far simultaneously studied the dynamics of enzyme production and substrate modification, and even when enzyme activities have been studied, the cell-bound fraction has often been neglected (Hui et al., 2013). In the case of the xylanolytic consortium XDC-2, preferential degradation of the hemicellulose fraction was correlated with strong extracellular xylanase activity, with only a minor fraction of enzyme activity being cell-bound (Guo et al., 2010). However, it should be recalled that this experiment was subject to micro-aerobic conditions, unlike the conditions that prevailed in the present study. In a previous study performed under strict anaerobic conditions, cellulosome-like systems were detected and associated with single *Clostridium*-related isolates arising from the consortium SQD-1.1 (Gao et al., 2014). In this respect it is noteworthy that the consortium RWS was also characterized by numerous OTUs belonging to *Clostridia*, a class that is well-known for its cellulosomes.

In view of the performance of RWS, it is obvious that further investigation of the enzyme array produced by RWS could be highly profitable route of investigation. Also, studies of RWS at metatranscriptomic and metaproteomic level are required to ultimately confirm the microorganisms and enzymes acting along wheat straw degradation.

IV.2.5. Conclusions

This work reveals original insight into the dynamics and function of a microbial community acting on raw LC biomass and operating in non-sterile, strictly anaerobic conditions. The RWS enriched consortium transformed 55.5% w/w of the lignocellulose into VFA as main products. RWS is mainly constituted by members of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* phyla and produced the key cellulolytic and hemicellulolytic enzymes, mainly of cell-bound type, to simultaneously degrade cellulose and hemicellulose fractions of raw biomass. The holistic analysis of substrate structure and composition, VFA and enzymes production underlines the potency of non-sterile microbial enrichment for the development of high-performance biomass-degrading consortia.

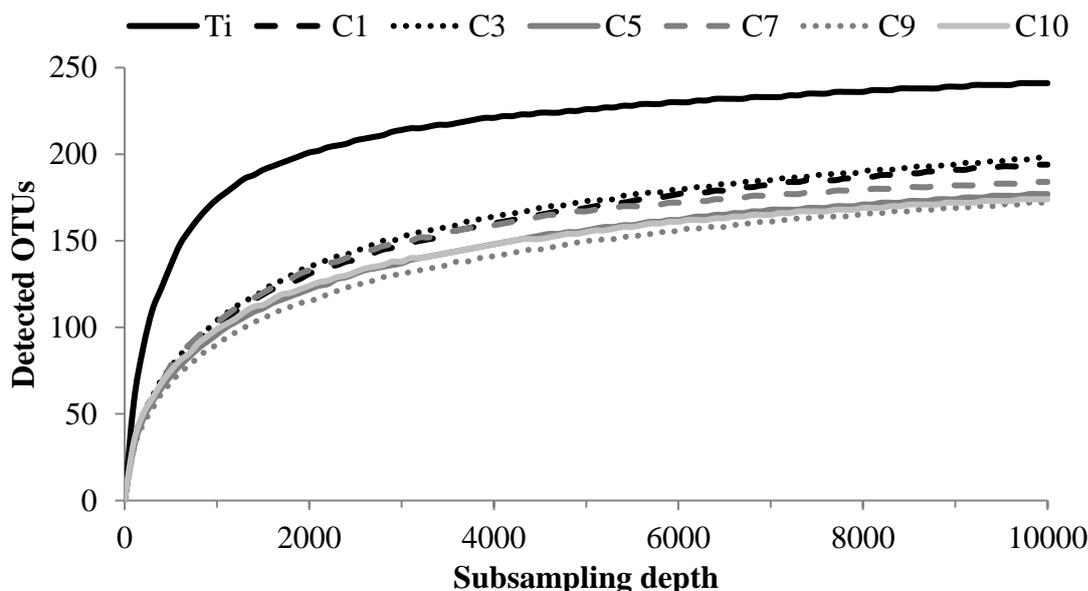
IV.2.6. Acknowledgment

This research was supported by the French National Agency for Energy and Environment (ADEME), the Carnot Institute 3BCAR and the INRA Metascreen project. The authors thank the ICEO facility dedicated to enzyme screening and discovery, and part of the Integrated Screening Platform of Toulouse (PICT, IBiSA) for providing access to the Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer equipment. The authors also thank the Genomics and Transcriptomics (GET) INRA platform for their help with sequencing. M. Abadie, M. Bounouba and E. Mangelle are acknowledged for their assistance with experiments and technical support.

IV.2.7. Supplementary data

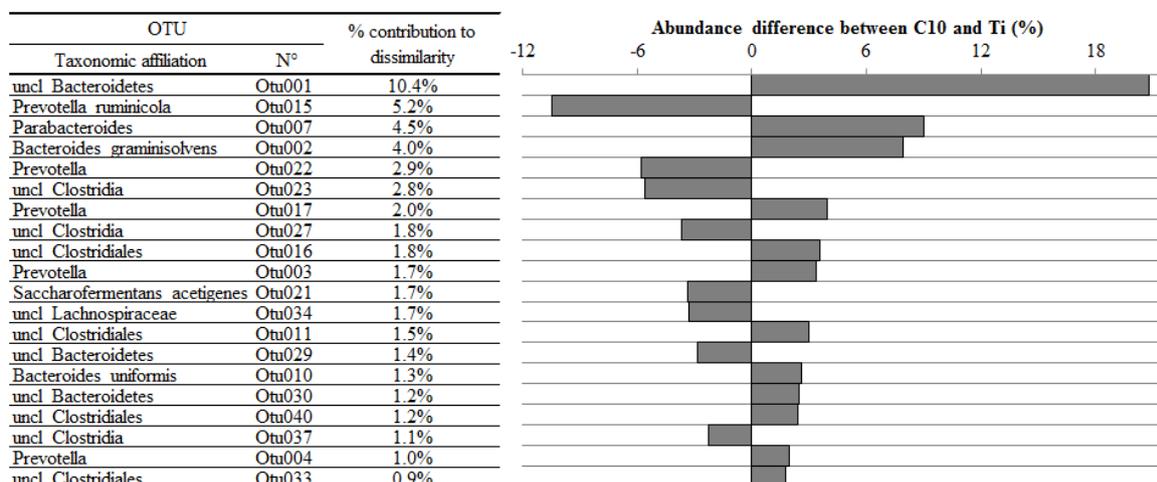
S. IV-1 : Rarefaction curves from sequencing data along the enrichment.

Rarefaction curves were generated with the Mothur subroutine described in materials and methods. Numbers of detected OTU reached a plateau, indicating sequencing and subsampling depth are sufficient to describe the samples communities.



S IV-2: OTU contribution to Bray-Curtis dissimilarity between initial and final points of enrichment.

Contribution to Bray-Curtis dissimilarity was calculated using Simper analysis in R package vegan v2.2.1. OTUs were ordered by decreasing contribution and the only 20 first OTUs are presented. Their relative abundance variation between Ti and C10 shows if their contribution is due to their enrichment or loss.



IV.3. Capacités de dégradation de la lignocellulose d'un consortium microbien ruminal enrichi *in vivo*

En parallèle à l'enrichissement ingénieré en SBR anaérobie RWS, les individus bovins dont le rumen a été étudié précédemment ont reçu pendant 7 semaines une ration modifiée enrichie en paille de blé, constituée de 80% de paille de blé, 12% de concentré et 8% de mélasse de betterrave.

L'hypothèse de travail étant que ce changement d'alimentation induirait des modifications de la flore microbienne symbiotique de leur rumen, des prélèvements ruminiaux ont été effectués en fin d'enrichissement *in vivo* de manière à évaluer ces modifications.

Des échantillons de rumen enrichis *in vivo* ont été incubés sur paille de blé non prétraitée dans les mêmes conditions que celles mises en œuvre pour l'enrichissement en bioréacteur anaérobie RWS (enrichissement *in vitro*). Cette partie du travail présente la comparaison des composantes macrocinétiques et des profils enzymatiques des deux systèmes après enrichissement (*in vivo* et *in vitro* RWS), avec la dégradation du substrat et l'évolution de sa composition, les produits et les profils des activités enzymatiques xylanase et CMC₅.

En 15 jours, la communauté enrichie *in vivo* permettait la dégradation de 50.7 ± 5.8 % MV (m/m) du substrat lignocellulosique, contre 55.5 ± 2.8 % MV pour RWS (Figure IV-5a). Il semble très intéressant que ces communautés expriment le même niveau d'activité de dégradation alors qu'elles ont été enrichies de manière différente.

En effet, après 7 jours d'incubation, les capacités de dégradation de la communauté *in vivo* atteignaient 38.5 ± 2.1 % contre 36.9 ± 3.7 % pour RWS et 18.5 ± 2.2 % pour la communauté initiale non enrichie. Ce résultat suggère que les conditions d'enrichissement permettent de doubler la dégradation anaérobie du substrat d'étude non prétraité, et ce indépendamment de l'approche mise en œuvre.

En ce qui concerne les productions d'AGV et de CO₂ (Figure IV-5b, 5c et 5d), les productions à 15 jours ainsi que le profil des AGV étaient aussi très proches pour les deux communautés enrichies. Les communautés *in vivo* et RWS produisaient respectivement 183.7 ± 11.6 et 226.5 ± 21.1 mCmol d'AGV/L, dont respectivement de 55.1 et 57.1 % (g/g) d'acide acétique, 18.2 et 22.3 % d'acide propionique, 22.4 et 12.8 % d'acide butyrique et 25 et 5.8 % d'acide valérique ; ainsi que 68.3 et 78.7 mCmol de CO₂/L.

Bien que les niveaux de production en AGV finaux soient très proches, les dynamiques de dégradation et de production montrent de légères différences. Ainsi, la Figure IV-5 montre qu'entre les jours 3 et 6, les vitesses de production d'AGV et de dégradation du substrat étaient supérieures pour la communauté enrichie *in vivo* devant celles obtenues avec RWS. Cette légère différence, ainsi que le profil d'AGV en faveur du butyrate obtenu pour la communauté *in vivo* nécessiteraient des études plus poussées de diversité microbiennes pour en comprendre la cause, mais pourraient néanmoins constituer des pistes de réflexion pour en guider l'analyse.

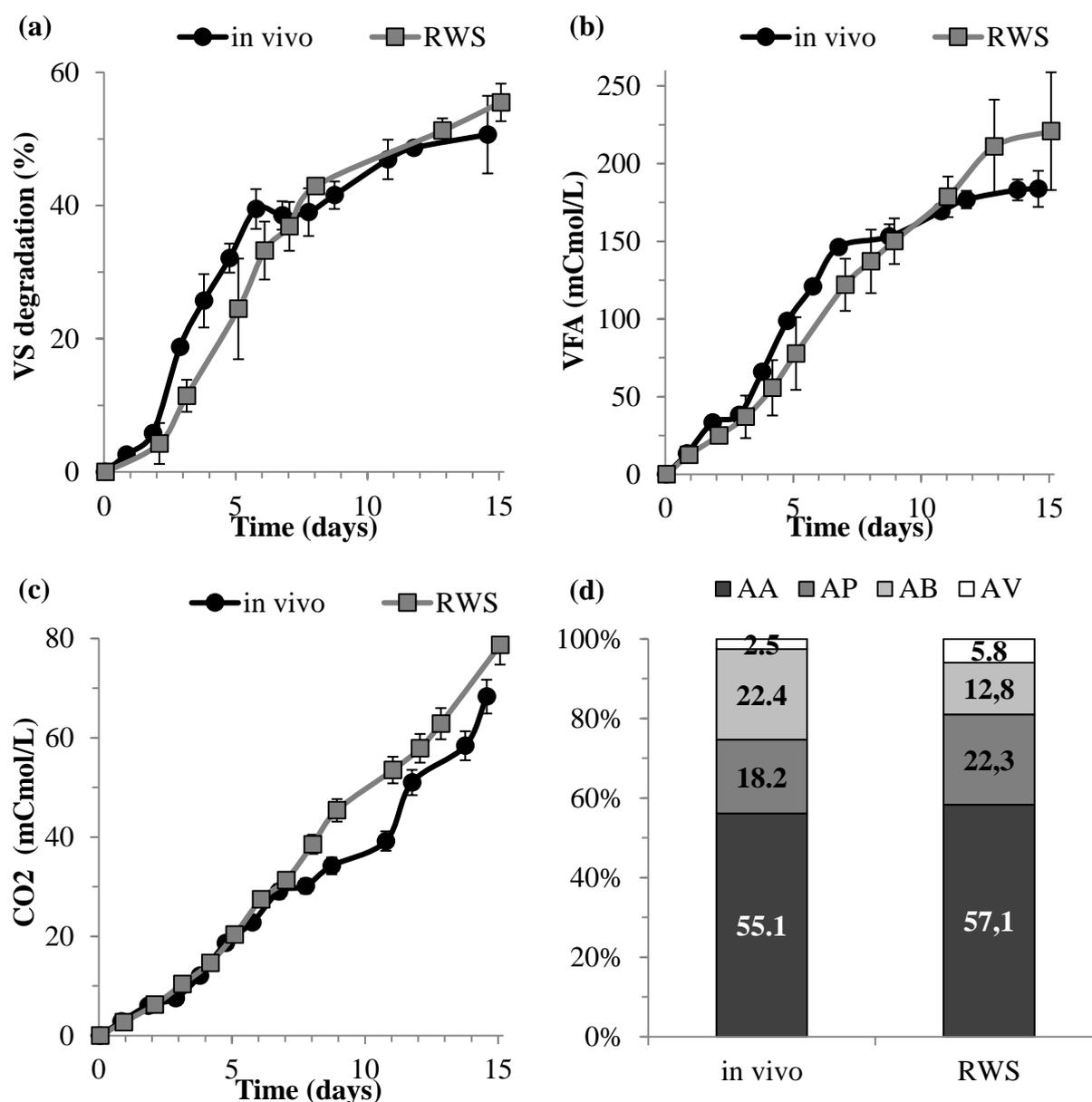


Figure IV-5 : Comparaison des enrichissements *in vivo* et RWS – paramètres macrocinétiques (a) dégradation des matières volatiles (b) production d'AGV (c) production de CO₂ et (d) composition en AGV

La détermination de la composition biochimique en cellulose et hémicellulose au cours des cinétiques montrait une dégradation simultanée de ces deux fractions pour les deux communautés enrichies (Figure IV-6).

Malgré le faible nombre de points mesurés pour la cinétique de dégradation du consortium microbien enrichi *in vivo*, il semblerait que la dégradation des holocelluloses était plus rapide en début de cinétique pour cette communauté que pour RWS. En effet, au jour 3 les pourcentages de cellulose et d'hémicellulose résiduelles étaient respectivement de 71.8 ± 7.0 et 69.3 ± 1.2 % (m/m) pour l'enrichissement *in vivo* contre 84.7 ± 1.6 et 81.7 ± 3.5 % (m/m) pour RWS. Aux vues des écarts-type sur l'ensemble des mesures, il advient de ne pas surinterpréter ce résultat, bien qu'il soit en cohérence avec les observations précédentes concernant les vitesses de dégradation des matières volatiles et de production d'AGV.

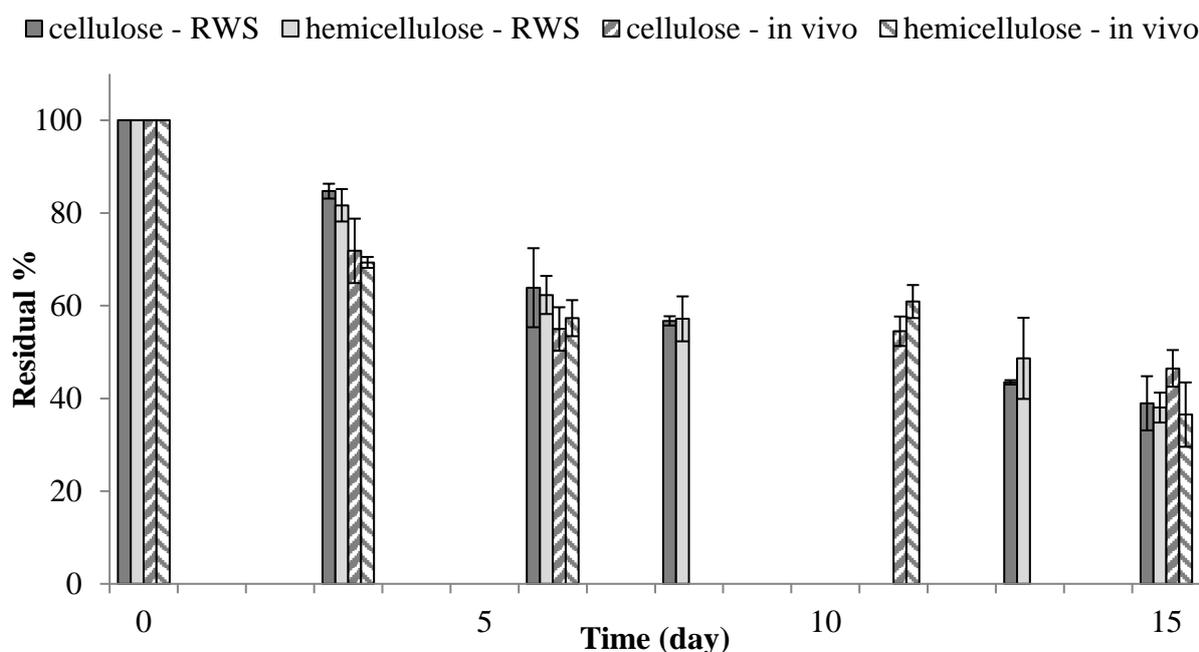


Figure IV-6 : Comparaison des enrichissements *in vivo* et RWS – cellulose et hémicellulose résiduelles

Les profils d'activités enzymatiques xylanase et CMCCase ont été mesurés pour les deux communautés enrichies (Figure IV-7). Alors que les niveaux d'activité CMCCase étaient nettement supérieurs pendant les 2 premiers jours de la cinétique *in vivo* devant ceux observés pour RWS, avec par exemple $0,036 \pm 0,001$ contre $0,020 \pm 0,003$ UA-CMCCase/mL au jour 2 ; ceux de l'activité xylanase étaient similaires, avec $0,214 \pm 0,014$ et $0,180 \pm 0,017$ UA-xylanase/mL pour les enrichissements *in vivo* et RWS, respectivement.

Entre les jours 2 à 7, l'activité CMCase augmentait de manière importante pour RWS, atteignant son niveau maximum de $0,041 \pm 0,011$ UA/mL et se stabilisant à cette valeur jusqu'à la fin de la cinétique. Parallèlement, au cours de la cinétique *in vivo* cette activité restait stable autour de la valeur moyenne de $0,035 \pm 0,003$ UA/mL. L'activité xylanase exprimée par RWS augmentait aussi drastiquement sur cette période, pour atteindre $0,812 \pm 0,112$ UA/mL au jour 7, représentant une augmentation de l'activité basale d'un facteur 4. Dans le cas de la communauté enrichie *in vivo*, l'augmentation de l'activité xylanase était plus importante et atteignait un facteur 6 au jour 5, manifesté par une activité maximale de $1,234 \pm 0,093$ UA/mL. De manière intéressante, entre les jours 3 à 7, l'activité xylanase était nettement supérieure pour la communauté *in vivo* que RWS, puis diminuait pour atteindre un niveau similaire (Figure IV-7). Considérant les observations faites en termes de dégradation du substrat ainsi que de production de carboxylates, ces résultats suggéraient donc que la communauté *in vivo* présente des capacités particulièrement intéressantes en début de cinétique (jours 3 à 7), légèrement supérieures à celles observées chez RWS. De plus, les informations apportées par les mesures d'activités enzymatiques, notamment xylanase, venaient largement soutenir l'interprétation des variations macrocinétiques du comportement des communautés. Néanmoins, des analyses de diversité microbienne restent nécessaires pour mieux comprendre les conséquences de l'approche d'enrichissement mise en œuvre sur la composition des communautés microbiennes.

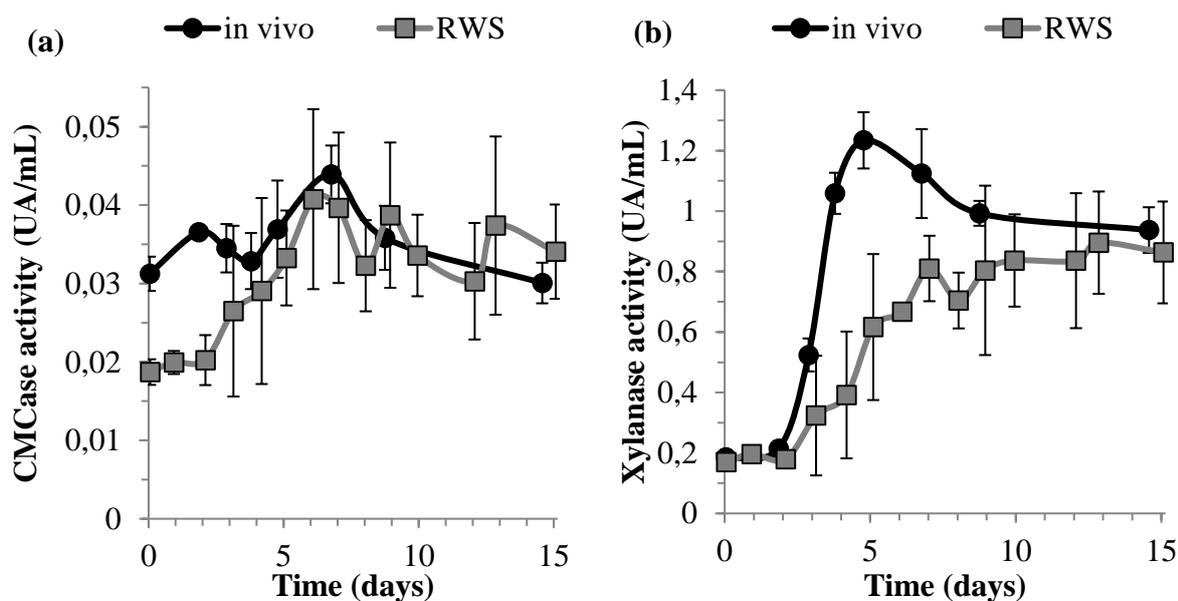


Figure IV-7 : Comparaison des enrichissements *in vivo* et RWS – activités enzymatiques (a) xylanase et (b) CMCase

Finalement, bien que les deux communautés enrichies *in vivo* ou *in vitro* (bioréacteur) présentaient des dynamiques légèrement différentes et à l'avantage du consortium microbien enrichi *in vitro*, il est important de souligner que les capacités finales de transformation de la paille de blé en carboxylates, ainsi que les niveaux finaux d'activités CMC_{Case} et xylanase étaient très proches. Ceci suggère que, indépendamment du mode d'enrichissement du consortium microbien, la fraction résiduelle de paille de blé en fin d'incubation présente un caractère réfractaire à la dégradation microbienne par ces écosystèmes lignocellulolytiques dérivés de rumen bovin.

D'autre part, il est intéressant de remarquer que les niveaux d'activités (notamment xylanolytique) de la communauté *in vivo* étaient supérieurs à ceux de RWS lorsque la durée d'incubation n'excédait pas 7 jours. Cependant, cette activité xylanolytique ne s'est pas traduite en une dégradation finale accrue de la fraction hémicellulose de la paille de blé. Ceci est en accord avec le caractère de plus en plus récalcitrant de la paille de blé au cours de l'avancement de la réaction. Des analyses supplémentaires aux niveaux métagénomique et métaproteomique permettraient de mieux comprendre les différences observées entre ces deux enrichissements *in vivo* et *in vitro*.

Il est intéressant de remarquer que cette durée de 7 jours est précisément celle établie pour chaque cycle d'enrichissement ayant abouti à la communauté RWS, suite à l'observation de la stabilisation de la production d'AGV. Il semble donc pertinent de questionner l'impact du passage en réacteur contrôlé sur le comportement du consortium microbien *in vivo*. En effet les résultats obtenus, bien qu'affichant la communauté obtenue *in vivo* comme un meilleur pourvoyeur d'enzymes xylanolytiques que RWS, ne permettent pas de conclure sur la stabilité et la robustesse des capacités de cette communauté. Seuls des repiquages successifs, couplés aux analyses précédemment effectuées ainsi qu'à une analyse de diversité microbienne permettraient d'investiguer ses capacités effectives pour une transformation de la paille de blé non prétraitée en carboxylates de manière prévisible. Cependant, aux vues des capacités de la communauté *in vivo*, son enrichissement en bioréacteur pourrait aussi aboutir à des performances encore supérieures.

IV. 4. Conclusions du chapitre

La première partie de ce travail de thèse concernait l'enrichissement d'une communauté bactérienne issue de rumen bovin de deux manières, en environnement contrôlé anaérobie et directement dans l'écosystème naturel.

Pour l'étude en conditions contrôlées, l'inoculum initial ; provenant de deux vaches laitières non productives, à part égale ; a été incubé en conditions anaérobie avec 20 g/L de paille de blé non prétraitée comme seule source de carbone. La procédure d'enrichissement SBR a été mise en place pendant 10 cycles de 7 jours chacun, permettant l'obtention d'une communauté bactérienne stable en termes de diversité et de comportement macrocinétique. Le suivi dynamique de la diversité bactérienne et des composantes macrocinétiques a révélé une augmentation des capacités de dégradation de la lignocellulose au cours de l'enrichissement, concomitante à un changement de communauté bactérienne.

Les premiers cycles d'enrichissement montraient de fortes modifications, avec notamment une perte de diversité imputable à l'adaptation de la communauté initiale aux conditions de culture. De manière intéressante, après 5 cycles de culture, l'évolution des capacités de dégradation ainsi que celle de la communauté bactérienne se sont stabilisées, suggérant que la procédure permettait de sélectionner les microorganismes capables de dégrader efficacement le substrat et de les maintenir pendant plusieurs cycles. La communauté stable ainsi enrichie et nommée RWS se composait principalement de microorganismes issus des phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes*, connus pour être impliqués dans la dégradation de la lignocellulose.

Des cinétiques plus fines ont été réalisées en triplicat avec la communauté enrichie comme inoculum, de manière à caractériser en dynamique l'évolution de la composition et de la structure du substrat ; les produits et leur composition ; ainsi que les activités enzymatiques majeures et leur localisation. Après enrichissement RWS transformait 55,5% (m/m) du substrat non traité en AGV comme produit principal et ce, en 15 jours d'incubation à 35°C. Les fractions celluloses et hémicellulosiques étaient dégradées simultanément, alors que la fraction amorphe de la cellulose était préférentiellement attaquée devant la fraction cristalline.

Les activités enzymatiques dosées (xylanase, CMC_{Case}, exoglucanase et β -glucanase) ont révélé que la majeure part de l'activité se trouvait dans la fraction liée aux cellules et au substrat, et non dans la fraction extracellulaire, suggérant la présence de complexes enzymatiques accrochés aux membranes bactériennes de type cellulosomes.

La présence d'espèces de type *Clostridium* dans la communauté microbienne enrichie, connus pour leur cellulosome, venait soutenir cette hypothèse. Ainsi, ces résultats montrent l'importance de la fraction solide dans le dosage des activités enzymatiques en conditions anaérobies.

Parallèlement, un enrichissement a été effectué directement dans l'écosystème ruminal (*in vivo*) à partir des mêmes animaux. L'alimentation des animaux a été progressivement modifiée en augmentant la proportion de paille de blé, jusqu'à atteindre 100% de paille de blé. La capacité à dégrader la paille de blé par la communauté microbienne enrichie *in vivo* a été évaluée dans les mêmes conditions que pour la communauté enrichie *in vitro* en SBR. La communauté *in vivo* a montré des résultats similaires à RWS considérant la transformation de la paille de blé non prétraité en carboxylates en 15 jours d'incubation.

La comparaison dynamique de ces deux communautés microbiennes suggère cependant que la communauté enrichie *in vivo* pourrait présenter des capacités supérieures à celle obtenue en bioréacteur, pendant la phase initiale d'incubation. Cependant, sa stabilité n'ayant pas été démontrée et sa structuration microbienne non étudiée (à ce jour), nous ne pouvons pas clairement affirmer ni discuter son avantage devant RWS.

En conclusion, l'inoculum rumen présente un fort potentiel biologique lignocellulolytique acidogène. Notamment, la communauté RWS est stable et présente des capacités hyperhydrolytiques de transformation de paille de blé non prétraitée en carboxylates. De plus, sa mise en œuvre ne nécessite pas de conditions de stérilisation. Il semblait dès lors particulièrement intéressant d'étudier cette communauté stable sur des substrats prétraités, dans le but de favoriser la transformation de paille de blé en carboxylates et ainsi d'évaluer leur impact sur le potentiel biologique lignocellulolytique acidogène de RWS.

**Chapitre V : Prétraitements innovants :
caractérisation et impacts sur le potentiel
biologique lignocellulolytique acidogène de la
communauté RWS dérivée de rumen bovin**

V.1. Introduction du chapitre

Nous avons montré précédemment qu'il est possible d'enrichir une communauté microbienne hyper-hydrolytique stable en bioréacteur contrôlé à partir de l'écosystème microbien naturel du rumen bovin. Il paraît maintenant intéressant d'évaluer cette communauté RWS sur des substrats prétraités dans le but d'augmenter les performances de bioconversion.

En effet, la capacité biologique (ligno)cellulolytique acidogène de cette communauté étant de haute performance sur paille de blé non prétraitée, elle pourrait être encore améliorée par des prétraitements appliqués au substrat.

Pour évaluer l'apport de prétraitements sur les capacités de RWS, nous avons mis en œuvre deux approches innovantes, d'une part, des prétraitements chimio-mécaniques à forte teneur en solide (voie sèche) par imprégnation à la soude et, d'autre part, des prétraitements enzymatiques (voie liquide) notamment via l'utilisation d'un cocktail enzymatique produit par *Thermobacillus xylanilyticus*. La première approche fait l'objet de ce chapitre, alors que la seconde a été placée en Annexe 3 pour simplifier ce manuscrit.

Dans les deux cas, l'impact des prétraitements a été évalué de deux manières, en caractérisant les substrats en termes de structure et de composition, puis en fermentation par la communauté RWS.

L'impact des prétraitements sur les capacités de la communauté RWS a été évalué en suivant les dynamiques de dégradation du substrat, de production de carboxylates ainsi que de production d'enzymes hydrolytiques (xylanase et CMCCase) impliquées dans la dégradation du substrat.

V.2. Ecofriendly lignocellulose pretreatment to enhance the carboxylate production of a rumen-derived microbial consortium

This subchapter was published as Lazuka et al. (2017) in *Bioresources Technology*:

“Lazuka, A., Roland, C., Barakat, A., Guillon, F., O’Donohue, M., Hernandez-Raquet, G., 2017. Ecofriendly lignocellulose pretreatment to enhance the carboxylate production of a rumen-derived microbial consortium. *Bioresour. Technol.* 236, 225–233.”

with the main conclusions:

Dry chemo-mechanical pretreatments impact biomass crystallinity and macroporosity.

Dry chemo-mechanical pretreatment increased the carboxylate production rate by RWS.

Dry chemo-mechanical pretreated biomass enhances the microbial xylanase activity.

Initial biomass macroporosity correlated with the biological acidogenic potential.

V.2.1. Abstract

Innovative dry chemo- and chemo-mechanical pretreatments form an interesting approach for modifying the native physico-chemical composition of lignocellulose facilitating its microbial conversion to carboxylates. Here, the impact of four dry-pretreatment conditions on the microbial transformation of wheat straw was assessed: milling to 2 mm and 100 μm , and NaOH chemical impregnation at high substrate concentrations combined with milling at 2 mm and 100 μm . Pretreatment effect was assessed in the light of substrate structure and composition, its impact on the acidogenic potential and the major enzyme activities of a rumen-derived microbial consortium RWS. Chemo-mechanical pretreatment strongly modified the substrate macroporosity. The highest carboxylate production rate was reached after dry chemo-mechanical treatment with NaOH at 100 μm . A positive impact of the dry chemo-mechanical treatment on xylanase activity was observed also. These results underline that increasing substrate macroporosity by dry chemo-mechanical pretreatment had a positive impact on the microbial acidogenic potential.

Keywords: Lignocellulose bioconversion; Anaerobic microbial consortium; Carboxylate production; Enzymes; Dry chemo-mechanical pretreatment.

V.2.2. Introduction

For over three decades intense R&D activity has focused on the development of industrial processes to convert lignocellulosic (LC) biomass into fuels, energy and value added chemicals, using various combinations of mechanical, chemical and bioconversion technologies (Kim and Dale, 2004).

Among the manufacturing routes that have been investigated, the carboxylate platform is rather attractive (Agler et al., 2011). Operating under non-sterilized, non-aerated conditions, the carboxylate platform exploits the robustness and large enzymatic potential of mixed microbial communities for the transformation of LC biomass into carboxylates (Agler et al., 2011).

In this platform, microbial communities hydrolyze the LC biomass producing soluble oligomeric and monomeric compounds that are further transformed into short chain carboxylates (or volatile fatty acids – VFA) by acidogenic and acetogenic microorganisms. In this respect, the carboxylate platform is related to the biogas platform, a two-stage anaerobic digestion system that produces carboxylates as intermediates that are then broken down by methanogenic archaea into methane. However, in the carboxylate platform, the products are considered to be building blocks for the production of added value chemicals and materials (e.g. polyhydroxyalcanoate bioplastics), and liquid biofuels (Agler et al, 2011; Torella et al, 2013), rather than intermediates for low value renewable energy (i.e. bio-H₂, and bio-CH₄), which is inevitably in direct competition with low-priced fossil resources, such as shale gas.

Despite its attractive features, the carboxylate platform is nonetheless limited by the ability to extract fermentable components from LC biomass, which constitutes a highly recalcitrant raw material. Indeed, LC biomass is a composite material composed mainly of cellulose, hemicellulose and lignin. Together, these polymers and other minor components, form a chemically- and structurally-complex, three dimensional matrix that is particularly resistant to both abiotic and biotic aggression. The structural and protective role played by LC-based structures in plants prevents their destruction by microorganisms and their enzymes (Mosier et al., 2005). To overcome LC biomass recalcitrance, various types of strategies involving a pretreatment step have been investigated (Alvira et al., 2010; Hendriks and Zeeman, 2009). In this case, chemical and/or physical processes are first used to increase the accessible surface area and porosity of LC biomass, thus rendering it more amenable to the subsequent action of biocatalytic agents (Hendriks and Zeeman, 2009; Mosier et al., 2005).

Despite the development of numerous pretreatments, cost effectiveness still has to be achieved, notably by reducing non-specific effects and energy expenditure and maximizing beneficial effects for the subsequent biocatalytic processes.

The effect of different pretreatments on LC biomass has been extensively studied (Alvira et al., 2010; Hendriks & Zeeman, 2009; Mosier et al., 2005), revealing that each type of pretreatment is characterized by advantages and disadvantages. For example, chemical treatments often generate fermentation inhibitors while mechanical methods are usually associated with high energy expenditure (Barakat et al., 2013; Jönsson et al., 2013). However, the absolute need for pretreatment is cleverly illustrated by the truism “the only process more expensive than pretreatment is no pretreatment” (Wyman, 2007).

Among the vast array of LC biomass pretreatments that have been tested, alkaline pretreatment using sodium hydroxide is one of the most effective and attractive methods. It presents a high capacity for delignification, disrupts the biomass structure and increases porosity, thus making cellulose and hemicellulose more accessible, but with low sugar degradation (Kaar and Holtzapfle, 2000; Mathew et al., 2011; Zhao et al., 2008). Some form of particle size reduction using mechanical methods also usually forms part of pretreatment technologies (Hendriks and Zeeman, 2009), because it is required to increase biomass surface area and can improve depolymerization and reduces residual waste (Barakat et al., 2014; Palmowski and Müller, 2000).

Recently, innovative procedures so-called ‘dry chemical’ (DC) and ‘dry chemo-mechanical’ (DCM) pretreatments have been developed to reduce energy consumption (Miao et al., 2011, Barakat et al., 2013). DC pretreatment consists of moderate chemical treatment using alkali impregnation of LC biomass at high solids loadings, while dry-chemo-mechanical pretreatment describes a process in which dry chemical pretreatment is performed simultaneously with or before mechanical particle size reduction (Barakat et al., 2014). Advantageously, these pretreatments reduce the use of chemicals and energy demand, enhance polysaccharide saccharification when using enzyme cocktails (Barakat et al., 2014) and, thanks to high solids loadings, permit process intensification and reactor downsizing.

To investigate whether DC and DCM pretreatments can be beneficial for the carboxylate platform, we have investigated the use of these technologies in combination with anaerobic conversion of wheat straw using a lignocellulolytic cow rumen-derived microbial consortium (RWS).

The effect of the pretreatments on the subsequent microbial activity has been investigated, monitoring the kinetics of LC biomass conversion, carboxylate production and the dynamics of key enzymatic activities. Our findings reveal that DC pretreatment increased the initial VFA production rate and that this increase was most pronounced when DCM pretreatment was employed. This increase was accompanied by an increase in early phase xylanase activity, but CMCase activity was unchanged. Finally, our results indicate a correlation between lignocellulose macroporosity and its degradability by a hydrolytic microbial consortium.

V.2.3. Materials and methods

V.2.3.1. Wheat straw

A 20 kg batch of wheat straw (Koreli variety grown on an INRA-owned experimental farm, Boissy-le-Repos, France) was harvested (in August 2011), milled to 2 mm using a knife mill (Retsch SM 100, Germany) and stored at room temperature (20-25°C) until use as the for all the experiments, hereafter referred to as 2 mm wheat straw (biomass A).

V.2.3.2. Dry chemical pretreatment

Sodium hydroxide (NaOH) was dissolved in distilled water (5g in 20 mL). Wheat straw at 2 mm (100g) was impregnated during 5h at ambient conditions (25 °C) with this alkaline solution using a pulverizing system (5 g of NaOH per 100 g of wheat straw) according to the procedure described previously (Barakat et al., 20014). The chemically treated wheat straw-2mm was dried at 105 °C (12h) resulting in a final moisture content of 8-10% (w/w) and designated biomass C.

V.2.3.3. Mechanical treatment

Biomass A and C were comminuted using an impact mill operating at ambient temperature and 18,000 rpm (Hosokawa-alpine, type UPZ, Augsburg, Germany). Fine particulate fractions were collected using a 100 µm mesh (the material was milled until it passed through the grid) and designated as biomass B and D, respectively.

V.2.3.4. Substrate characterization

V.2.3.4.1. Substrate composition

For compositional analysis wheat straw (40 mg) was submitted to the sulfuric acid hydrolysis method described by de Souza et al. (2013), analyzing monosaccharides (glucose, xylose and arabinose) by high-performance liquid chromatography (HPLC) using an Ultimate 3000 Dionex separation system equipped with a BioRad Aminex HPX 87H affinity column and a refractive index detector (Thermo Scientific). The protocol used for HPLC analysis was that described elsewhere (Monlau et al., 2012).

Lyophilized wheat straw samples were also analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis using an attenuated total reflection (ATR) Nicolet 6700 FT-IR spectrometer (Thermo Fisher), equipped with a deuterated-triglycine- sulfate (DTGS) detector, following the procedure described by Lazuka et al. (2015). For FT-IR spectral analysis, the peak ratio 1512:1375 cm⁻¹ was considered representative of the lignin:holocellulose ratio, while peaks at 1430 cm⁻¹ and 898 cm⁻¹ were attributed to crystalline and amorphous cellulose respectively (Monlau et al., 2012), and the ratio of these peaks was considered to be the lateral order index (LOI), which represents the ratio of crystalline:amorphous cellulose.

V.2.3.4.2. Determination of particle size and energy consumption

Particle size was analyzed by laser granulometry using a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Orsay, France). The energy consumed during milling was determined in triplicates using a watt meter following a previously described procedure (Barakat el al., 2014).

V.2.3.4.3. Determination of macroporosity by suction pressure

Macroporosity of the four treated wheat straw samples (A-D) was determined by measuring the water-absorption kinetics at different osmotic pressures (Robertson and Eastwood, 1981). The water retention capacity (macroporosity profile) was obtained by dialysis of hydrated wheat straw samples using three solutions of polyethylene glycol (PEG) (MW 10,000) at 10, 75 and 100 g.L⁻¹ inducing a known suction pressure (0.009, 0.112 and 0.206 MPa, respectively).

The water retained by the fiber matrix was related to pore size through suction pressure and surface tension according to equation V-1:

$$D=4S/\Delta P \text{ (Eq. V-1)}$$

where D (mm) is the pore diameter, S the solute (water) surface tension, ΔP the suction pressure (MPa) used to measure the ratio water held:pore volume.

Water absorption at different suction pressures (used to explore different pore diameters) was determined by presoaking wheat straw samples overnight at 4°C, and transferring the equivalent of 0.2–0.3 g dry wheat straw as hydrated fibers into dialysis bags (6-8 kDa cutoff, 32 mm diameter, Visking R dialysis bag, PolyLabo, Strasbourg, France). The dialysis bags were then sealed and placed in a 100 mL PEG solution and shaken overnight at 37°C (100 cycles.min⁻¹). The content of the dialysis bags was weighed accurately then dried overnight (100°C) to determine dry weight and water content. Each wheat straw sample at each PEG concentration was tested in triplicate. Results (g water g⁻¹ dry sample) represented the difference between the total pore volume (estimated at 10 g/L PEG) and the volume of at most 1 µm-diameter pores (estimated at 100 g/L PEG), which constitute the pore volume with diameter >1µm likely to be accessible to bacteria. After presoaking, the liquid fraction was collected and the neutral sugar content was evaluated using a Skalar autoanalyzer (Skalar, Breda, Netherlands), employing the sulfuric orcinol method (Tollier and Robin, 1979).

V.2.3.4.4. Saccharification with commercial enzymes

Saccharification of the four treated wheat straw samples, A to D, was evaluated using a commercial enzymatic mixture (Celluclast 1.5L Novozymes). Dry wheat straw (1 %, w/w) was incubated for 72h at 50°C with 20 FPU.g⁻¹ dw cellulase supplemented with 81 U.mL⁻¹ β-glucosidase (Novozyme 188) in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 0.5 g.L⁻¹ sodium azide. Following centrifugation (7197 g, 10 min at 4°C), the reducing sugar content in the supernatant was quantified using the di-nitro-salicylic acid method (DNS).

V.2.3.5. Lignocellulose bioconversion by RWS in anaerobic reactors

Microbial bioconversion of LC substrate by a cow-rumen derived consortium (RWS) that displays a good ability to degrade wheat straw was carried out in anaerobic batch reactors (2L BIOSTAT® A+, Sartorius, Germany). Bioreactors containing wheat straw samples (A to D) as the sole carbon source (20g.L⁻¹) suspended in mineral medium (Lazuka et al., 2015).

The bioreactors were operated under agitation (300 rpm) at a mesophilic temperature (35°C) and pH (6.15), which was adjusted by the appropriate addition of H₃PO₄ at the beginning of the experiment (before inoculation) and thereafter regulated by the automated addition of 1 M NaOH, according to the protocol established by Lazuka et al., (2015). Each microbial bioconversion reactor was performed in biological duplicates over a 15-day period. Wheat straw removal, residual substrate compositional analysis, total organic carbon (TOC), VFA production and enzymatic activities were monitored throughout the incubation period.

V.2.3.6. Chemical analyses

To quantify total solids (TS) 10 mL samples were removed, centrifuged (7197 x g, 10 min, 4°C), rinsed twice with distilled water and dried 24h at 105°C. For the mineral fraction (MF), mineralization was performed at 500°C for 2h, and volatile solids (VS) were estimated from the difference between TS and MF. VS degradation was expressed as weight/weight percentages.

The composition of the residual substrate in the reactor was characterized as described above for substrate characterization (section 2.4.1).

VFA production was monitored using a Varian 3900 gas chromatograph as described by Cavaillé et al. (2013). The total organic carbon (TOC) content of the liquid fraction was measured using a TOC analyzer (TOC-VCSN, Shimadzu Co., Japan). Gas composition was analyzed using an HP 5890 gas chromatograph equipped with a conductivity detector and a HAYSEP D column. All chemical measurements were done in technical duplicates.

All the macro-kinetic parameters are expressed as average values obtained from duplicate biological reactors (biological duplicates). Smoothed data and derivatives were obtained after polynomial regression on the raw data (inside error bars). The statistical significance of differences between the types of pretreatment was evaluated by one-way ANOVA (P<0.05) for characterization parameters (LOI, macroporosity, saccharification, composition).

V.2.3.7. Enzyme activity assays

To measure enzyme activity, triplicate samples (5 mL) were withdrawn at regular intervals and centrifuged (7197 x g, 10 min, 4°C) yielding a supernatant and a sonicated solid pellet fraction as described by Lazuka et al. (2015). These two fractions were considered to be representative of extracellular (supernatant), and sum of intracellular and cell-bound (sonicated pellet) localizations respectively. For each reactor and each sampling time, end-point enzymatic activities were measured in technical duplicates in both the extracellular and the intracellular and cell-bound fractions. All enzymatic activities were expressed as averages of the two values obtained from the duplicate reactors.

Xylanase and endoglucanase (CMCase) activity were measured using 1% w/v xylan beechwood (Sigma) and 1% w/v carboxymethyl cellulose (CMC) (Sigma) respectively according to the previously described protocol (Lazuka et al., 2015). One unit of CMCase or 1 unit of xylanase activity (UA, unit of activity) was defined as the amount of enzyme that produces 1 µmol of reducing sugars per minute.

V.2.4. Results and discussion

The impact of dry pretreatment on the kinetics of wheat straw degradation and carboxylate production by a microbial consortium RWS was assessed using four different pretreated wheat straws. Samples A and C were milled to 2 mm, B and D to 100 µm, and C and D were submitted to 5% (w/w) NaOH impregnation at high LC solids. These conditions facilitated the assessment of a possible synergy between dry milling and chemical pretreatment. Moreover, it is important to underline that D was first chemically pretreated and then milled, because this sequence is expected to reduce the energy demand associated with milling and increase biomass component extractability (Barakat et al., 2014).

V.2.4.1. Characterization of the pretreated straws

The energy consumption associated with the production of A was 223.3 kJ.kg⁻¹, while the production of B required 2.8 times more energy (Table1). The energy demand associated with the production of C was the same as that for A, which is logical since chemical impregnation was carried out after milling.

However, energy consumption associated with the production of D (100 μm) was almost half that required to produce B, which clearly demonstrates that prior chemical pretreatment was beneficial. It is likely that during NaOH impregnation, the lignocellulosic matrix is weakened and disintegrated into finer components, thus increasing overall energetic efficiency (Kaar and Holtzapfle, 2000; Mathew et al., 2011; Zhao et al., 2008; Barakat et al., 2014).

Table V-1: Size and energy consumption of the four types of wheat straw pretreatment.

Pretreatment	Size (μm), D50	Energy (kJ.kg^{-1})
A 2 mm	-	223.34
B 100 μm	115.87 \pm 3.24	635.23
C 2 mm – NaOH	-	223.34
D 100 μm – NaOH	91.54 \pm 2.24	327.45

In order to identify the biomass features that affect microbial bioconversion, samples A to D were characterized with regard to four parameters: (i) the LOI which gives insight into substrate crystallinity; (ii) the $>1 \mu\text{m}$ -pore volume or macroporosity, considered as the volume accessible to bacteria (Guillon et al., 1998); (iii) biochemical composition in terms of cellulose, hemicellulose and lignin (C, H, L) and (iv) the enzymatic saccharification under standard conditions. Figure 1A shows that particle size had no significant impact on wheat straw crystallinity (LOI), irrespective of the substrate pretreatment. However, chemical pretreatment decreased LOI from 0.766 ± 0.079 (mean of A and B substrates, without chemical pretreatment) to 0.572 ± 0.05 (mean of C and D substrates, with chemical pretreatment), irrespective of particle size. Regarding the impact of NaOH pretreatment on cellulose crystallinity, previous studies have provided contradictory results. For instance, when applying DCM, soda pretreatment to wheat straw at a particle size below 60 μm , Barakat et al. (2014) obtained an 11% increase in crystallinity. This result was attributed to the solubilization of amorphous polymers and not to an actual increase in crystallinity. In fact, several parameters can impact cellulose crystallinity, notably the severity of a given treatment. Bali et al. (2015) showed that the cellulose crystallinity of alkali-pretreated *Populus* varied as function of severity. The authors showed that shorter pretreatments (lower severity) reduced cellulose crystallinity, probably through the actual disruption of the cellulose crystalline structure. However, in the same study, it was reported that crystallinity increased when the pretreatment was prolonged, this observation being attributed to the solubilization of the amorphous cellulose component.

The results obtained in the present study are consistent with the hypothesis that NaOH pretreatment causes the cellulose to swell and decreases cellulose crystallinity, as described by Agbor et al. (2011), suggesting that the severity of the applied treatment did not induce any rise in crystallinity.

The comparison of the macroporosity of samples A to D (Fig. 1B) revealed a negative correlation between macroporosity with fine milling (100 μm) in the absence of chemical pretreatment. For sample B, macroporosity was $1.5 \pm 0.3 \text{ g.g}^{-1}$, which is lower than that measured for A, $2.9 \pm 0.4 \text{ g.g}^{-1}$. On the other hand, soda pretreatment had a positive effect on macroporosity, reaching $4.4 \pm 0.9 \text{ g.g}^{-1}$ and $4.6 \pm 0.6 \text{ g.g}^{-1}$ for samples C and D, respectively. These results suggest that milling to 100 μm (B) actually reduced accessibility to bacteria, whereas chemical pretreatment (i.e. samples C and D) increased it. In early studies on resistant starch dietary fiber, a correlation between macroporosity (generally in the range 1 and 10 g.g^{-1}) and substrate fermentability was described (Guillon et al., 1998; Robertson et al., 2000). Consistently, in the present study, macroporosity was shown to be correlated to the quantity of fermentable sugars formed by pretreatment, with samples C and D displaying the highest amounts of soluble neutral sugars ($1.705 \pm 0.003 \text{ mg.L}^{-1}$ and $2.394 \pm 0.003 \text{ mg.L}^{-1}$, respectively), while non-chemically treated substrates displayed lower levels ($0.948 \pm 0.004 \text{ mg.L}^{-1}$ and $0.682 \pm 0.003 \text{ mg.L}^{-1}$ for substrates A and B, respectively).

The biochemical analysis of the four wheat straw samples revealed no significant compositional changes after pretreatment, with the average composition being (in % w/w) $43.6 \pm 3.4 \%$ cellulose, $23.2 \pm 1.4 \%$ hemicellulose and $19.7 \pm 1.7 \%$ lignin (Fig. 1C), values that are similar to those measured in the raw substrate.

This compositional stability can be explained by the fact that no extraction was performed, meaning that solubilized components remained in the sample, and also indicates that very little biomass loss occurred, consistent with the findings of Barakat et al. (2014). Carbon loss is often associated with alkaline pretreatments and occurs in the form of carbon dioxide release associated with peeling reactions. This phenomenon is highly correlated with the pretreatment severity factor and substrate recalcitrance (Hendriks and Zeeman, 2009; Karp et al., 2015). Therefore, the results obtained on the biochemical composition of LC before and after pretreatment indicate that the pretreatments used in this study are relatively mild, ensuring good mass conservation.

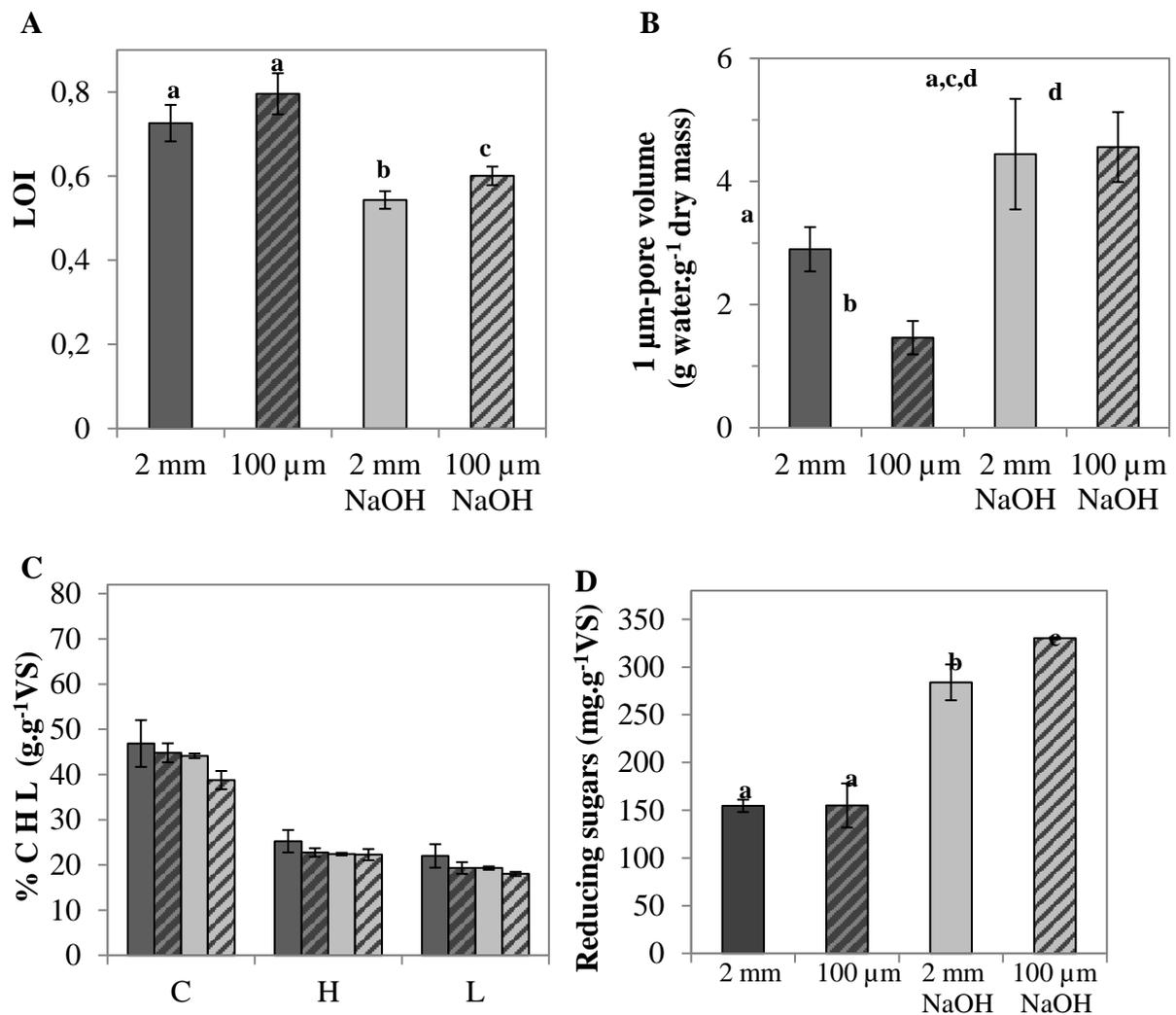


Figure V-1 : Characterization of the pretreated wheat straw substrates. (A) Lateral order index (LOI). (B) Macroporosity estimated as 1 µm-pore volume. (C) Biochemical composition of wheat straw (Cellulose -C, hemicellulose -H and lignin -L). The types of pretreatment are indicated by the bar colors as in A. (D) Reducing sugars liberated from wheat straw by the saccharification test performed under standard conditions (Cellulase, 20 FPU.L⁻¹, β-glucosidase 81U.mL⁻¹, 72h, 50°C, pH 5). Error bars indicate the standard deviation of the mean of three technical replicates. Different lowercase letters indicate differences within a treatment (one-way ANOVA, P<0.05).

Enzymatic saccharification of the four pretreated materials (Fig. 1D) did not reveal any clear correlations between particle size and substrate accessibility to enzyme hydrolysis. However, soda treatment clearly enhanced the enzymatic release of reducing sugars, since on the dry chemo-mechanical pretreatment (D) the release of soluble reducing sugars was 2-fold higher when compared to A and B (no soda treatment) and approximately 1.2-fold higher than that obtained with C, consistent with previous findings (Barakat et al. 2014).

In conclusion, assuming that cellulose crystallinity, the aptitude towards enzymatic saccharification and macroporosity are reliable indicators of pretreated substrate accessibility for microbial bioconversion, it appears reasonable to suggest that samples C and D should be readily amenable to bioconversion by suitable microbial consortia. In this regard, considering samples A and B, which had not been submitted to soda treatment, the only clear difference concerned their macroporosity (lower for B). This makes prediction more difficult, but suggests that B (100 μm particle size) might be less amenable to microbial bioconversion.

V.2.4.2. Fermentation of the pretreated wheat straw by the microbial consortium RWS

V.2.4.2.1. Wheat straw degradation and VFA production by RWS

Wheat straw A to D were anaerobically fermented by the RWS consortium. The biochemical analysis of residual wheat straw revealed that only the holocellulose fraction was degraded, irrespective of the pretreatment applied, meaning that the lignin concentration was unchanged throughout the experiment (average lignin concentration of $4.35 \pm 0.55 \text{ g.L}^{-1}$ for all reactors and sampling times, representing $21.7 \pm 2.75 \%$ w/w of the initial substrates; data not show). Therefore, subsequently wheat straw degradation was expressed more simply as the percentage of holocellulose-related carbon (in moles) removal (expressed as percentage of the initial holocellulose-related carbon content, % iCmolHolo).

In this respect, the results obtained for holocellulose removal (% iCmolHolo) on samples A, C and D at the end of the experiment were similar with removal values of 64.2 ± 1.0 , 68.8 ± 3.4 and $58.2 \pm 5.4 \%$, respectively (Fig. 2A). As predicted by the macroporosity analysis, despite the larger surface area available in B, this sample was less apt for bioconversion by the RWS consortium ($37.0 \pm 1.1 \%$ of holocellulose removed at the end of the experiment).

Likewise, measurement of specific VFA production (expressed as moles of carbon of VFA produced per mole of carbon of the initial holocellulose, $\text{CmolVFA.iCmol-1Holo}$) revealed a similar trend. Maximal VFA production levels (approximately $0.45 \text{ CmolVFA.iCmol-1Holo}$) were obtained with A, C and D at the end of the incubation, whereas significantly lower VFA production was recorded for B ($0.31 \pm 0.02 \text{ CmolVFA.iCmol-1Holo}$) (Fig. 2B).

Accordingly, the holocellulose degradation and VFA production rates (Fig. 2C and D) displayed similar trend for each substrate but the maximal value and time needed to reach such maximum value varied importantly in function of the pretreatment applied. Comparing these specific rates for the different pretreated substrates, it is noteworthy that the highest rates for holocellulose degradation and VFA production were obtained after DCM pretreatment (sample D), DC pretreatment being the next best option (sample C). Indeed, with these samples, holocellulose degradation reached a maximum at an earlier stage in the experiment (i.e. 12 and 14.6 % iCmol-1Holo.day-1 after 3.5 and 2.8 days for C and D, respectively) whereas maximum degradation rate was lower and occurred later for A and even more for B (i.e. 7.6 and 4% iCmol-1Holo.day-1 after 4.8 and 5.2 days for A and B, respectively).

Likewise, the highest VFA production rates were also measured for C and D (0.066 and $0.094 \text{ CmolVFA.iCmol-1Holo.day-1}$, respectively), with maximum production being reached after 2.5 days. In contrast, with samples A and B, VFA production peaked after 5 days, with rates reaching only 0.045 and $0.028 \text{ CmolVFA.iCmol-1Holo.day-1}$, respectively.

Overall, these results underline the beneficial effect of the soda treatment, particularly when it was coupled to mechanical milling to $100\mu\text{m}$.

Compared to the fermentation of 2mm wheat straw (sample A), the VFA, CO_2 and H_2 yields increased when chemically-pretreated substrates were used (Table 2). The highest yields were systematically obtained after DCM pretreatment (sample D), while the fermentation of samples B and C procured intermediate values.

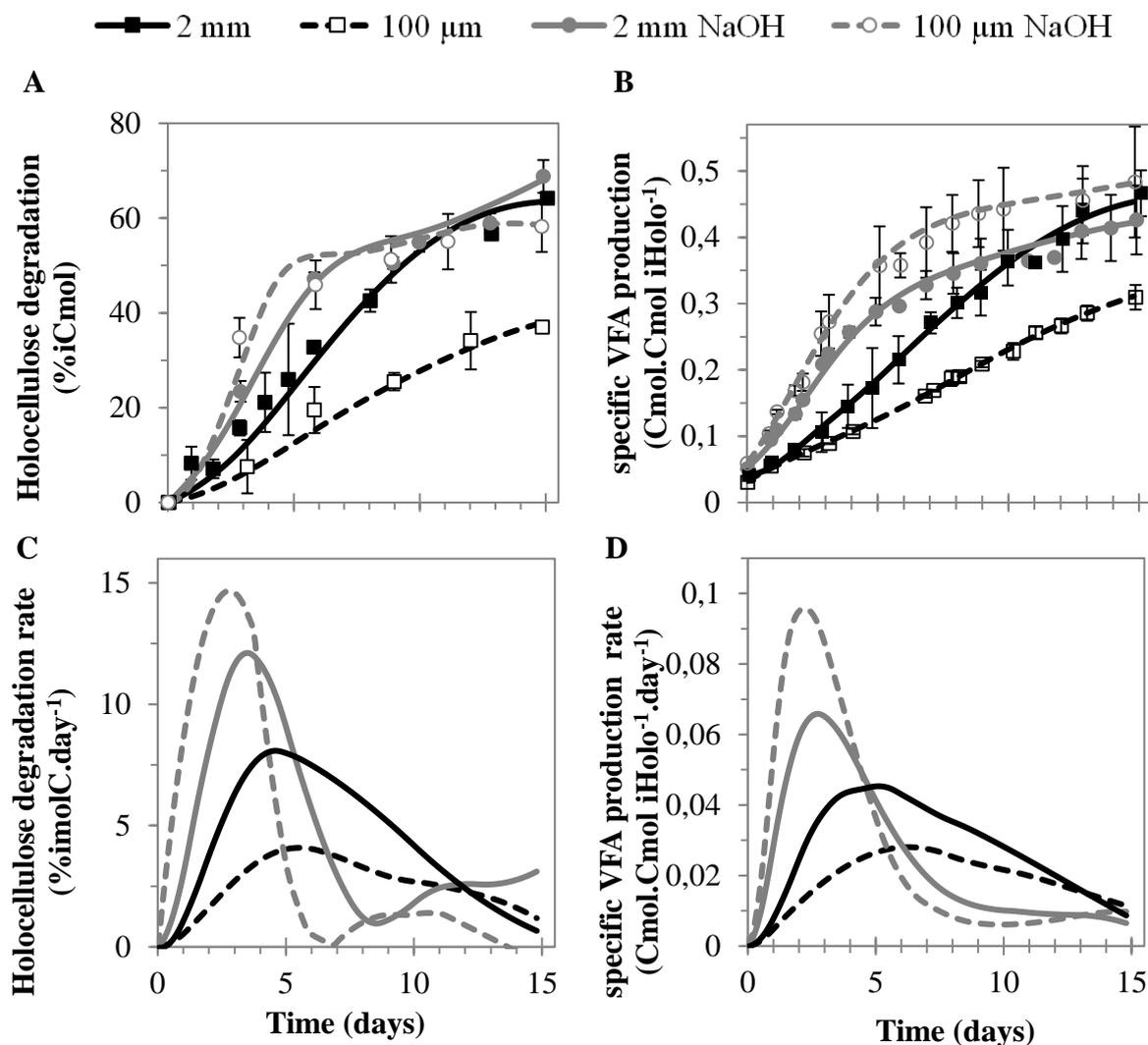


Figure V-2 : Wheat straw transformation kinetics by RWS incubated with the four pretreated wheat straws. (A) Holocellulose degradation and (C) Holocellulose degradation rate. (B) Specific VFA production and (D) Specific VFA production rate. Experimental points and smoothed curves are presented with error bars corresponding to the standard deviation of the mean of two biological replicates.

The composition of the carboxylates produced at the end of the experiment (Table 2), was for all samples mostly acetic, propionic and butyric acids, with minor quantities of valeric and hexanoic acids. Quantification of TOC level in the supernatant corresponded to the VFA concentration (data not shown) indicated that no other metabolites were produced.

The main difference was observed for chemically-treated samples C and D. The fermentation of these substrates procured a higher amount of butyric acid, which was associated with a lower level of acetic acid.

It is known that members of the Clostridia genus are able to ferment hexoses into acetate, and xylose into butyrate and dihydrogen (Jaros et al., 2013; Liu and Yang, 2006; Raganati et al., 2014). Furthermore, it is known that alkaline pretreatment efficiently removes hemicellulose from LC biomass (Hendriks and Zeeman, 2009). Since Clostridia is one of the main microbial groups found in RWS (Lazuka et al., 2015), it is possible that a metabolic shift from acetate (from glucose) to butyrate (from xylose) pathway in this microbial group induced a higher proportion of butyrate in soda treatment conditions. Nevertheless, to confirm such a hypothesis, further characterization of the microbial community's composition during incubation time will be needed.

Table V-2: Product concentrations and yields after a 15-day fermentation of the pretreated wheat straw substrates by a RWS microbial consortium.

	(A) 2 mm	(B) 100 µm	(C) 2 mm NaOH	(D) 100 µm NaOH
VFA yield * (g eq AA.g ⁻¹)	0.61 ± 0.07	0.77 ± 0.03	0.70 ± 0.07	0.83 ± 0.14
CO ₂ yield * (g CO ₂ .g ⁻¹)	0.26 ± 0.03	0.47 ± 0.02	0.41 ± 0.07	0.58 ± 0.15
H ₂ yield * (mg H ₂ .g ⁻¹)	0.55 ± 0.19	1.52 ± 0.20	2.70 ± 0.47	3.25 ± 0.31
Time at maximum VFA prod. rate (days)	5.2	6.0	2.9	2.2
Max VFA prod. rate (mCmol.L ⁻¹ .day ⁻¹)	25.6 ± 1.0	13.4 ± 0.14	35.6 ± 6.0	43.4 ± 4.1
VFA concentration at max VFA prod. rate (mCmol.L ⁻¹)	109.0 ± 20.8	72.2 ± 7.4	100.1 ± 4.2	94.2 ± 4.4
Final VFA prod. (mCmol.L ⁻¹)	226.5 ± 21.1	149.0 ± 3.5	228.3 ± 22.1	217.1 ± 20.9
% AA (%Cmol)	65.6 ± 3.9	50.8 ± 2.6	38.6 ± 3.6	34.3 ± 1.2
% PA (%Cmol)	20.5 ± 3.4	24.7 ± 0.4	24.0 ± 7.6	22.3 ± 6.1
% BA (%Cmol)	10.0 ± 2.9	17.8 ± 2.3	28.0 ± 2.1	33.1 ± 6.5
% VA (%Cmol)	3.8 ± 3.1	4.9 ± 0.3	5.5 ± 0.2	6.0 ± 0.6

* Metabolic yield, against consumed substrate

Regarding particle size, it is often assumed that size reduction facilitates substrate accessibility to enzymes and microorganisms. However, herein we show that extremely fine milling (i.e. to 100µm) has an adverse effect on biodegradation and VFA production.

This result could be attributed to the liberation of inhibitory compounds or to an increase in recalcitrance due to pretreatment severity. However, as discussed above, LOI results revealed that crystallinity did not increase. Moreover, it is unlikely that mechanical milling would generate inhibitors of the type associated with chemical pretreatments (Kumar et al., 2009). In contrast, measurements showed that milling decreased macroporosity level, a phenomenon that was no doubt responsible for the lowered fiber degradation and thus fermentability of sample B.

Previous studies comparing the degradability of lignocellulosic substrates showed a positive effect of pretreatment on the degradation performance of different microbial consortia. For instance, Wongwilaiwalin et al. (2013) reported an increase in the degradation of alkali-pretreated rice straw, sugarcane bagasse and corn stover by two selected thermophilic consortia BGC-1 and CRC-1 (50°C). Compared to the raw substrate, Guo et al., (2011) also reported a 3.3-fold increase in the degradation of NaOH-pretreated rice straw by the MC1 thermophilic consortium (50°C) and the production of 2.72 g.L⁻¹ organic acids after 3 days. Similarly, Zhao et al. (2014) reported 75% degradation of alkali-pretreated rice straw by the BMC-9 consortium, which accumulated a maximum of 3.3 mg VFA.L⁻¹ after 12 days incubation at 60°C. Although it is difficult to compare the bioconversion efficiency reported in studies applying different pretreatment protocols (different NaOH concentration, solids loadings, incubation period) and culture conditions (inocula, culture media, incubation temperature), it is clear that alkali-pretreatment enhances the accessibility of lignocellulose towards bacteria. In this respect, the results reported herein are consistent with previous data, although VFA production levels were much higher, probably because of the selected inoculum as well as the strict anaerobic conditions that were applied (static or anoxic conditions were used in previous studies). Indeed, strict anaerobic conditions prevent microbial VFA consumption.

V.2.4.2.2. Major enzyme profiles and residual LC biomass structure and composition along degradation by RWS

Xylanase and CMCase activities were measured regularly over the 15-day incubation period (Figure 3). For xylanase activity, two distinct profiles can be distinguished. Fermentation of the dry milled samples, A and B, procured maximum activities of 0.61 ± 0.14 UA.mL⁻¹ and 0.81 ± 0.11 UA.mL⁻¹, respectively, after 5 and 7 days of incubation. Thereafter, the activities remained stable.

In contrast, the dry milled, chemically-pretreated samples, C and D, procured maximum enzyme activities after just 3 days of incubation, with the two activities attaining approximately 1.2 UA.mL⁻¹. Thereafter, the activities decreased slightly (Figure 3A). Correlating this data with the dynamics of hemicellulose degradation (Supplementary data and Figure 3C) revealed that the highest hemicellulose degradation rates (Figure 3C) coincided with increasing xylanase activity. For chemically-treated samples, measurements performed at day 1 revealed that xylanase levels were quite low, although hemicellulose degradation had already started, suggesting that the chemical pretreatment had already degraded the xylans, producing xylo-oligosaccharides. This observation is consistent with the release of free sugars observed after 24h presoaking during macroporosity measurements.

Comparing xylanase activity profiles and hemicellulose degradation with those of CMCase and cellulose degradation revealed quite different trends (Figure 3B and 3D). CMCase activity remained low (approximately 0.05UA.mL⁻¹) in all of the experiments, irrespective of pretreatment. Moreover, no reliable correlations between CMCase activity and cellulose degradation rates were evidenced, CMCase activity did appear to reach maximum levels earlier (around day 4) in the case of samples C and D, compared to A and B (peaking after day 5). Correspondingly, cellulose degradation rates were also reached earlier (around day 3) for samples C and D (12.7 and 16.0 %mCmol.day⁻¹ respectively), whereas maximum rates in the case of A and B (7.5 and 5 %mCmol.day⁻¹ respectively) were achieved latter (about 5 days). Taken together, our results indicate that hemicellulose and cellulose were degraded simultaneously. However, in the case of the chemically-pretreated samples the hemicellulose was probably solubilized and partially degraded, meaning that xylose was more readily available at early stage for bioconversion

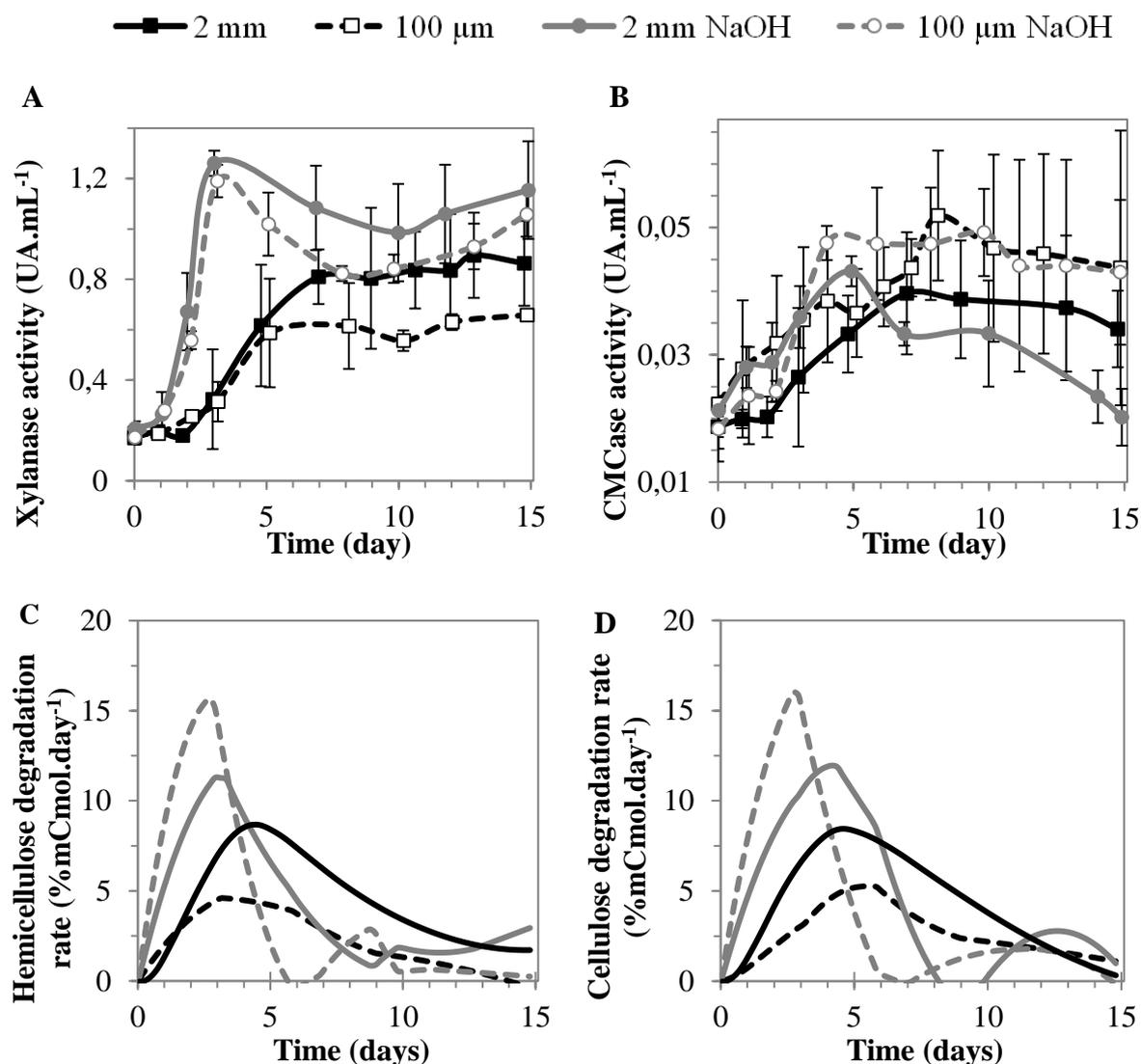


Figure V-3 : Kinetics of enzymatic activity and polysaccharide degradation throughout the fermentation of pretreated-wheat straw by a RWS consortium. Xylanase (A) and CMCCase (B) activity and cellulose (C) and hemicellulose (D) degradation rates. Experimental points and smoothed curves are presented with error bars corresponding to the standard deviation of two biological replicates.

To understand whether the different CMCCase activity profiles reflect differential attack of the amorphous and crystalline fractions of cellulose, the evolution of crystallinity was investigated throughout the bioconversion of the four wheat straw samples. Figure 4 shows that crystallinity (LOI) evolved differently for each substrate.

Since LOI is the ratio of crystalline versus amorphous cellulose, increases in LOI correlate with increased degradation of amorphous cellulose relative to the crystalline fraction. The microbial bioconversion of sample A was characterized by increasing LOI (from 0.73 ± 0.04 to 0.98 ± 0.11), whereas bioconversion sample B produced an opposite trend (decreased LOI, Fig. 4). However, in the chemically-pretreated samples (C and D) LOI remained mostly unchanged, suggesting that amorphous cellulose was preferentially degraded during substrate A fermentation, while the attack of the crystalline fraction of substrate B appeared to be facilitated by milling pretreatment. It is known that endocellulases mainly act on amorphous cellulose regions, while exocellulases act on crystalline regions (Lynd et al., 2002). Hence, simply measuring CMC_{case} did not provide a complete view of cellulose degradation during RWS-mediated bioconversion. Nevertheless, our results indicate that RWS did possess a full cellulose arsenal, allowing it to degrade both amorphous and crystalline cellulose. Caution should nonetheless apply, because determining LOI using FT-IR only procures surface-related information, thus it is unclear whether FT-IR provides information on intra-fiber crystallinity. Further analyses at the metaproteomics will no doubt be needed to demonstrate whether RWS can adapt its enzymatic pool to a substrate structure.

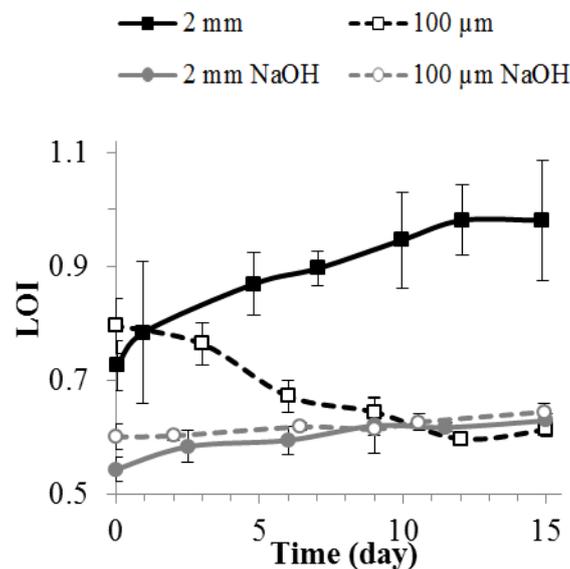


Figure V-4 : Lateral order index (LOI) profiles during fermentation of pretreated wheat straw by a RWS consortium. Error bars correspond to the standard deviation of 2 biological duplicates.

V.2.5. Conclusions

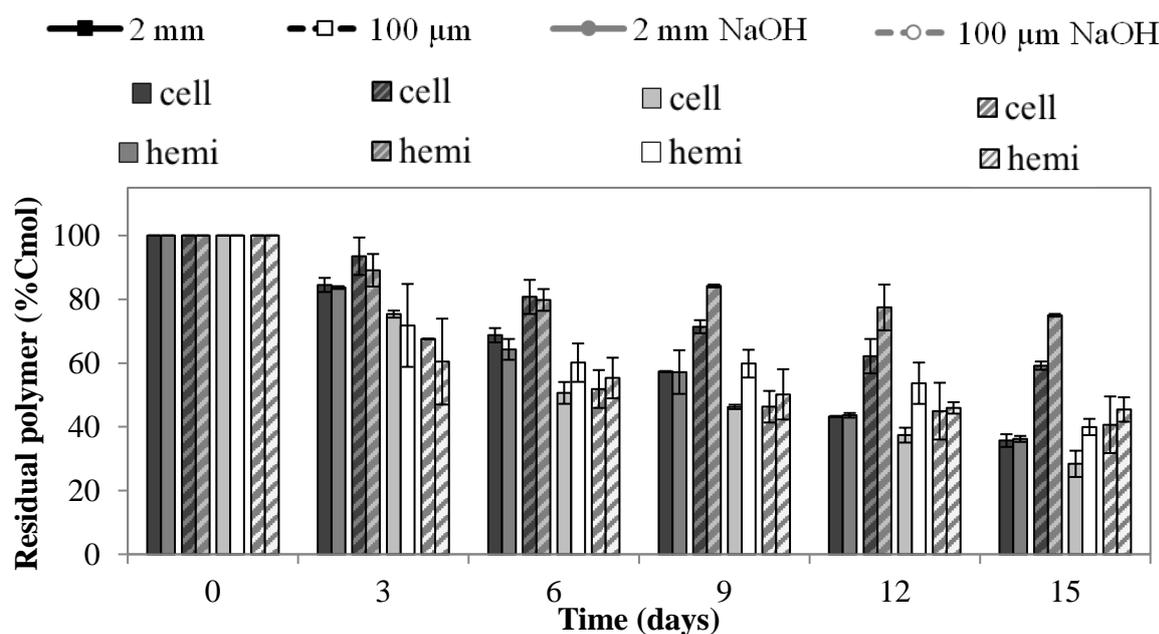
Dry milling combined with NaOH pretreatment enhanced wheat straw enzymatic hydrolysis and bioconversion using a microbial consortium RWS, leading to increased xylanase activity and VFA production rate. Compared to raw wheat straw, the optimal pretreatment was dry milling to 100 μm , combined to alkaline impregnation, which procured a greater than two-fold increase in VFA production rate. Acetic, propionic and butyric acids were the main VFA produced by RWS, irrespective of the pretreatment method. An increase in butyric acid production was observed with chemically-pretreated substrates. Macroporosity appeared as the parameter that best predicts the biological acidogenic potential of RWS.

V.2.6. Acknowledgment

This research was supported by the French National Agency for Energy and the Environment (ADEME), the CEPIA department of INRA and the PROBIOS project funded by the Carnot Institute 3BCAR. We would like to acknowledge M. Abadie's important contribution in enzymatic analysis. M. Bounouba and E. Mangelle are also thanked for their technical support.

V.2.7. Supplementary data

S V-1: Residual cellulose and hemicellulose fractions throughout the wheat straw degradation by a RWS microbial consortium.



V.3. Conclusions du chapitre

Alors que le recours aux prétraitements est quasiment incontournable dans les procédés actuels de valorisation de substrats lignocellulosiques, la communauté RWS a été soumise à deux types de prétraitements innovants, avec des approches chimio-mécanique et enzymatique, respectivement.

Concernant les prétraitements chimio-mécaniques, l'imprégnation à la soude par voie sèche a été évaluée sur deux tailles de broyage du substrat paille de blé (2 mm et 100 μ m). La caractérisation de ces prétraitements a montré que l'imprégnation voie sèche à la soude permettait d'augmenter l'accessibilité à 1 μ m ainsi que de réduire la cristallinité de la fraction cellulosique, mais sans impact sur la composition des substrats. Pour les deux prétraitements enzymatiques voie liquide étudiés (cocktail cellulolytique commercial et cocktail hémicellulolytique produit par *Thermobacillus xylanilyticus*) la caractérisation a montré une attaque des fractions (hémi)cellulolytique ainsi qu'une diminution de la cristallinité du substrat.

Les prétraitements chimio-mécaniques permettaient d'accélérer l'activité du consortium RWS, tant au niveau de la dégradation du substrat, de la production de carboxylates que de la production d'enzymes d'activités xylanase. Les vitesses maximales (dégradation et production) étaient ainsi avancées au jour 2-3 (contre 5 sur substrat brut) tout comme le pic d'activité xylanase qui était de plus augmenté d'un facteur 1,5. De plus les rendements de production de carboxylates étaient augmentés à des valeurs supérieures à 0,7 g eq. AA/g (d'holocellulose consommée) consécutifs à une production favorisée d'acide butyrique (contre à 0,61 g eq. AA/g pour le substrat brut).

En plus d'accélérer aussi l'activité et le rendement de production de carboxylates du consortium RWS, les substrats prétraités enzymatiquement permettaient aussi de repousser la transformation en carboxylates de fractions considérées jusque-là comme récalcitrantes pour RWS, atteignant 65 % de dégradation de la matière volatile et 8,7 g-AGV/L produits en 15 jours. De plus, pour les deux types de prétraitements étudiés, l'analyse de la structure du substrat montrait une attaque simultanée des fractions cristalline et amorphe de la cellulose qui n'avait jusque-là pas été observée avec RWS (attaque préférentielle de la fraction amorphe sur le substrat brut) et dévoilait ainsi une nouvelle capacité de RWS sur substrat préalablement prétraité.

Enfin, bien qu'il apparaisse que les prétraitements étudiés soient pertinents pour une application industrielle de production de carboxylates à partir de paille de blé par RWS, des études technico-économiques restent nécessaires pour affirmer leur rentabilité.

**Chapitre VI : Evaluation du potentiel biologique
lignocellulolytique acidogène de microbiotes
intestinaux de termites**

VI.1. Introduction du chapitre

Alors que nous avons vu qu'il est possible d'enrichir une communauté microbienne hyperhydrolytique stable en bioréacteur contrôlé à partir de rumen bovin et avec la paille de blé comme seule source de carbone, nous nous sommes ici intéressés à l'évaluation d'une nouvelle source d'inoculum, le microbiote intestinal de termite.

En effet, les insectes, et notamment les termites, atteignent des taux de dégradation de la biomasse particulièrement intéressants, jusqu'à 74-99% pour la cellulose et 65-87% pour l'hémicellulose. Ils sont également capables de digérer des substrats très lignifiés et présentent des microbiotes intestinaux très différents des écosystèmes digestifs de mammifères ou des écosystèmes du sol. Les termites supérieurs présentent un microbiote principalement bactérien qui pourrait ainsi constituer une bonne source d'inoculum pour la production de carboxylates à partir de paille de blé.

Quatre espèces de termites supérieurs ont été sélectionnées et collectées en partenariat avec l'IRD de Bondy (France). Le microbiote intestinal de chaque espèce de termite a subi un cycle de culture en conditions aseptiques, permettant de sélectionner l'espèce dont le microbiote était le plus efficace pour la dégradation du substrat en carboxylates dans les conditions évaluées (Expérimentations réalisées par L. Auer). Le microbiote de l'espèce sélectionnée a par la suite été soumis à la procédure d'enrichissement en SBR dans les mêmes conditions que celles employées pour le rumen bovin.

Ce chapitre décrit donc dans un premier temps le comparatif des microbiotes des quatre espèces de termite étudiées, avec une attention particulière pour l'évolution des communautés microbiennes. Puis dans un second temps la procédure d'enrichissement du microbiote de l'espèce sélectionnée est détaillée.

Dans les deux cas, les capacités des communautés ont été évaluées en suivant les dynamiques de dégradation du substrat non prétraité, de production de carboxylates ainsi que de production d'enzymes (xylanase et CMC_{ase}) impliquées dans la dégradation du substrat.

VI.2. Uncovering the potential of termite gut microbiome for lignocellulose bioconversion in anaerobic batch bioreactors

This subchapter was published as Auer et al. (2017) in *Frontiers Microbiology* as:

“Auer, L., Lazuka, A., Sillam-Dussès, D., Miambi, E., O’Donohue, M., Hernandez-Raquet, G., 2017. Uncovering the Potential of Termite Gut Microbiome for Lignocellulose Bioconversion in Anaerobic Batch Bioreactors. *Front. Microbiol.* 8 :2623.”

VI.2.1. Abstract

Termites are xylophages, being able to digest a wide variety of lignocellulosic biomass including wood with high lignin content. This ability to feed on recalcitrant plant material is the result of complex symbiotic relationships, which involve termite-specific gut microbiomes. Therefore, these represent a potential source of microorganisms for the bioconversion of lignocellulose in bioprocesses targeting the production of carboxylates. In this study, gut microbiomes of four termite species were studied for their capacity to degrade wheat straw and produce carboxylates in controlled bioreactors. All of the gut microbiomes successfully degraded lignocellulose and up to 45% w/w of wheat straw degradation was observed, with the *Nasutitermes ephratae* gut-microbiome displaying the highest levels of wheat straw degradation, carboxylate production and enzymatic activity. Comparing the 16S rRNA gene diversity of the initial gut inocula to the bacterial communities in lignocellulose degradation bioreactors revealed important changes in community diversity. In particular, taxa such as Spirochaetes and Fibrobacteres that were highly abundant in the initial gut inocula were replaced by Firmicutes and Proteobacteria at the end of incubation in wheat straw bioreactors. Overall, this study demonstrates that termite-gut microbiomes constitute a reservoir of lignocellulose-degrading bacteria that can be harnessed in artificial conditions for biomass conversion processes that lead to the production of useful molecules.

Keywords: Termite, gut-microbiome, lignocellulose bioconversion, carboxylate production, microbial diversity.

VI.2.2 Introduction

With more than 200 billion tons of non-food lignocellulosic biomass produced yearly, lignocellulose represents the most abundant source of renewable carbon on Earth (Chandel and Singh, 2011). For this reason, the bioconversion of lignocellulose into biofuels or industrial chemicals is receiving much attention, because this is one route towards creating a fossil carbon-free economy.

Lignocellulose is a composite material, composed of cellulose microfibrils, hemicellulose, lignin and a variety of other minor components (Lynd et al., 2002). Each of these polymers displays intrinsic complexity and together they form a highly recalcitrant material. In natural ecosystems, the degradation of lignocellulose involves chemical processes and a large arsenal of enzymes, including cellulases, hemicellulases and lignin-degrading enzymes (Cragg et al., 2015). To develop industrial lignocellulose bioconversion processes, it is necessary to overcome the recalcitrant nature of lignocellulosic biomass, while limiting cost as much as possible. So far, this trade-off has not been satisfied and current processes are not cost competitive at industrial scale.

The degradation and recycling of lignocellulose in natural ecosystems is performed by various organisms, including bacteria, fungi and animals (Cragg et al., 2015). Therefore, the in-depth study of these deconstruction strategies is a useful way to identify and understand biomass bioconversion processes.

Most plant biomass degradation occurs in the soil, where it is partially mineralized, producing CO₂ and humic substances (Deacon, 2005). The principal players in soil-based biomass degradation are aerobic fungi and bacteria that produce extracellular biomass-degrading enzymes (Fierer et al., 2009; Burns et al., 2013). Owing to the tremendous ability of filamentous fungi to secrete large quantities of biomass-hydrolyzing enzymes, fungi are currently the main sources of industrial hydrolytic enzymes used for biorefinery purposes (Kubicek and Kubicek, 2016).

Regarding animals, many herbivores and omnivores are actually devoid of endogenous lignocellulolytic enzymes and rely upon microbial symbionts to supply the requisite enzymatic arsenal (Smant et al., 1998). One of the best examples of this symbiosis is that of ruminant animals where bacteria, archaea, protozoa and anaerobic fungi act in concert to degrade lignocellulose and ultimately produce short chain carboxylates (volatile fatty acids, VFA) and methane (Hobson, 1998).

Since VFA and methane are commercially valuable molecules the harnessing of rumen fermentation for biotechnological processes has already been assessed using, for example, a rumen inoculum to enhance methane production in bioreactors using various lignocellulosic feedstocks (Yue et al., 2007).

Wood-eating termites figure among the animals that are best equipped for the digestion of lignocellulosic material. Although the feeding regimes of different termite species vary, some species are able to digest crystalline cellulose and overcome the lignin barrier (Breznak and Brune, 1994). Moreover, compared to ruminants, termites are able to degrade wood more efficiently, since they remove 74-99% cellulose and 65-87% hemicellulose from wood samples (Brune, 2014). For this reason, it is thus unsurprising that termites are considered as promising sources of plant cell wall-degrading microorganisms and enzymes.

It has long been acknowledged that termites belong to the order Isoptera, but more recent work suggests that they are related to cockroaches and are thus members of the Blattodea order (Inward et al. 2007; Lo et al., 2007). Termites have been classified into two major groups, lower (families Archotermopsidae, Mastro-, Stolo-, Kalo-, Hodo-, Stylo-, Rhino- and Serri-termitidae) and higher (family Termitidae) termites (Inward et al., 2007). The members of these groups display different lignocellulose digestion strategies. Lower termites rely on complex symbiotic interactions with eukaryotic flagellates and bacteria (Ni and Tokuda, 2013), whereas higher termites rely on an external symbiotic interaction with fungal species of Basidiomycetes (e.g. termites from the subfamily Macrotermitinae) and/or harbor a mutualistic hindgut microbiome exclusively constituted by prokaryotes (Brune, 2014; Slaytor, 1992; Tokuda and Watanabe, 2007). Additionally, several lower and higher termite species appear to produce endogenous cellulases, notably in the buccal cavity (Lo et al., 2010; Watanabe et al., 1998). Unlike rumen and cellulolytic soil bacterial communities, which are dominated by Firmicutes and Bacteroidetes, the particle-associated bacteria in wood-feeding termite guts are mainly constituted by Spirochaetes and Fibrobacteres (Mikaelyan et al., 2014). This marked difference probably reflecting distinct degradation mechanisms and bioconversion pathways.

Driven by technological goals, interest in termites has increased in recent years, extending investigations beyond the entomological community. Many studies have focused on the identification and characterization of enzymatic arsenals from different termite species (König et al., 2013), with some using advanced metagenomics to explore termite gut microbiomes from higher termites that feed on plant biomass at different stages of decomposition (Warnecke et al., 2007; Bastien et al. 2013; Rossmassler et al., 2015; Scharf, 2015).

However, fewer studies have actually focused on harnessing termite gut microbiomes, using them as inocula for biotechnological applications (Hamdi et al., 1992), despite their natural ability to produce industrially relevant carboxylates (Agler et al., 2011).

The carboxylate platform is an interesting alternative to the more common biomass to ethanol route and could be useful to diversify lignocellulose biorefining (Agler et al., 2011; Holtzapple et al., 1999). In the carboxylate platform, anaerobic mixed bacterial communities growing under non-sterile conditions are used to produce acetic, propionic and butyric acid, all of which are interesting platform chemicals for further biological or chemical transformations (Agler et al., 2011; Kleerebezem and van Loosdrecht, 2007).

Nevertheless, to develop a feasible carboxylate platform technology, it is first necessary to stabilize a suitable lignocellulose-degrading microbial community in artificial bioreactor conditions. Numerous attempts to achieve this have used lignocellulolytic communities from soil (DeAngelis et al., 2012; Feng et al., 2011), compost (Guo et al., 2010; Reddy et al., 2013), marine sediments (Hollister et al., 2011), or extreme environments (Cope et al., 2014). However, so far the lignocellulose conversion yields obtained have been insufficient to envisage commercial viability. Moreover, the fundamental knowledge concerning the microbiological processes that underpin carboxylate production on lignocellulosic biomass remains insufficient to make further progress.

Therefore, to extend the knowledge base, the present study assessed the use of gut microbiomes from higher termites for the production of carboxylates in controlled bioreactors. Gut microbiomes from four termite species were evaluated for their ability to produce carboxylates from wheat straw in controlled bioreactors, monitoring substrate composition, products, enzymatic activities and microbial community dynamics using 16S rRNA gene sequencing.

VI.2.3. Materials and methods

VI.2.3.1. Lignocellulose substrate and termite gut inocula.

Wheat straw from the winter wheat variety Koreli was collected at an experimental farm (INRA, Boissy-le-Repos, France) in August 2011. After harvesting, the straw was milled to 2 mm and stored at room temperature (20-25°C).

Four different species of higher termites (Termitidae family) *Microcerotermes parvus*, *Termes hospes*, *Nasutitermes ephratae* and one undescribed species closely related to *Nasutitermes lujae* (herein after *N. lujae*) were selected as inocula for this study. The major selection criteria were based on the fact that higher termites harbor a predominantly bacterial gut microbiome and that the intestinal pH in each species is slightly acidic or near to neutrality (Köhler et al., 2012). *M. parvus*, *N. ephratae* and *N. lujae* are wood-feeding termites while *T. hospes* is a soil-feeding species (Eggleton et al., 1995). Other selection criteria were prior knowledge on their lignocellulose degradation ability, acetate production, and the availability of the species at the Institut de Recherche pour le Développement (IRD, Bondy, France). Termite colonies were maintained in a temperature-controlled room (27°C, 90% relative humidity) at IRD. One thousand worker termites per species were randomly collected from their nest in two campaigns separated by a period of three months (i.e. sample size n=500 guts per species per sampling campaign). Following cold anesthesia of termites, whole guts were removed by dissection on ice with sterile scissors and forceps. Once removed, the guts were immediately suspended in a physiological saline solution (PBS-buffer) and maintained on ice (Santana et al., 2015). Once completed, gut samples (containing 500 guts each) were frozen at -20°C, transported to LISBP on dry ice and stored at -80°C. Due to the low number of termite-gut available, for DNA extraction, a small fraction of guts (20 guts) per species were collected separately (in duplicate) and stored as previously described. Similar low numbers of insect-guts have been used in previous studies (Scully et al., 2013; Marynowska et al., 2017). Finally, samples composed of 10 guts per species were weighed to estimate the biomass contained within a typical inoculum.

VI.2.3.2. Anaerobic bioreactors

To assess the lignocellulose degradation capacity of the different gut microbiomes, two replicate anaerobic bioreactors (Applikon MiniBio 500) were conducted for each termite species. Following centrifugation (7,197 x g, 10 min, 4°C) and elimination of the saline media, termite-gut homogenates (500 guts) were used to inoculate 400 mL of mineral media (MM), containing per liter of distilled water: KH₂PO₄, 0.45 g; K₂HPO₄, 0.45 g; NH₄Cl, 0.4 g; NaCl, 0.9 g; MgCl₂.6H₂O, 0.15 g; CaCl₂.2H₂O, 0.09 g, supplemented with 250 µL of V7 vitamin solution (Pfenning and Trüper, 1992) and 1 mL of sterilized (0.2 µm filtration) trace elements solution (containing per liter of distilled water: H₃BO₃, 300 mg; FeSO₄.7H₂O, 1.1 g; CoCl₂.6H₂O, 190 mg; MnCl₂.4H₂O, 50 mg; ZnCl₂, 42 mg; NiCl₂.6H₂O, 24 mg; NaMoO₄.2H₂O, 18 mg; CuCl₂.2H₂O, 2 mg).

Milled wheat straw (2 mm) was sterilized by autoclaving (120°C, 20 min and 1.2 bars) and added to the medium (20 g.L⁻¹) as the sole carbon source. Stirred bioreactors (400 rpm) were operated under strict anaerobic conditions, flushing the reactor with nitrogen after inoculation. The absence of dissolved oxygen was continuously monitored with a polarographic dissolved oxygen probe (AppliSens). The temperature was set to 35°C and pH was maintained at 6.15 by adding a 2M NaOH solution. During the incubation, methane was monitored and, if necessary, inhibited by addition a solution of 2-bromoethanesulfonate (BES), a methanogenesis inhibitor, until a maximum concentration of 10 mM. A non-inoculated control bioreactor was operated under identical conditions. Samples were collected from all bioreactors every two days during the 20 days of incubation to characterize VFA and gas production. Samples from the initial and final times of incubation were used to determine LC degradation, enzymatic activities and microbial diversity.

VI.2.3.3. Chemical analysis

Gas production was measured by monitoring pressure changes and gas composition was analyzed using a gas chromatograph (GC) HP 5890 equipped with a conductivity detector and a HAYSEP D column (molecular sieve of 5 Å). Argon was used as the carrier gas at a flow rate of 100 mL.min⁻¹. Injector, oven, and detector temperatures were 100, 60, and 140°C, respectively. Volatile Fatty Acids (VFA) contained in the liquid phase of samples were analyzed using a Varian 3900 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and CP-Wax 58 (FFAP) CB column (length: 25 m, inside diameter: 0.53 mm).

Wheat straw concentration was determined at the beginning and at the end of the 20-days incubation by measuring the total (TS) and volatile (VS) solids. TS were determined using 10 mL samples that were first centrifuged (7,197 x g, 10 min), rinsed twice with distilled water and dried for 24h at 105°C. The mineral fraction (MF) was estimated by mineralization of the samples at 500°C for 2h, and VS were determined by subtracting MF from TS. Wheat straw degradation was reported as percentage of LC (% , w/w) related to the initial LC mass.

VI.2.3.4. Enzyme activity assay

Enzyme activity measurements were performed as previously described by Lazuka et al. (Lazuka et al., 2015). Briefly, triplicate bioreactor samples (5 mL) were removed at the end of the experiment (after 20 days) and centrifuged at 7,197 x g for 10 min at 4°C.

Enzyme activity detected within the supernatant was designated as “extracellular enzymes”, while enzyme associated with the pellet was designated “cell-bound enzymes”. Xylanase and endoglucanase (CMCase) activities were measured using 1% w/v xylan beechwood (Sigma) and 1% w/v carboxymethyl cellulose (CMC purchased from Sigma, France), respectively. Activities were estimated by the DNS method. One unit of xylanase or CMCase activity (UA, unit of activity) was defined as the amount of enzyme that produces 1 µmol of reducing sugars per minute in the measurement conditions. These measurements were only possible for the second replicate bioreactors.

VI.2.3.5. 16S rRNA gene copy number and diversity analysis

16S rRNA gene copy number and bacterial diversity were analyzed on the initial termite gut samples and at the end of the bioreactor experiments. Samples (1.5 mL) were collected and centrifuged at 13,000 x g, for 5 min at 4°C. After removing the supernatant, the pellet was snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Total DNA/RNA was extracted from these samples using a PowerMicrobiome RNA Isolation kit (MoBio Laboratories Inc. Carlsbad) following the manufacturer’s instructions but omitting the final DNase steps. Cell lysis was carried out using a Fast Prep (MP Biomedicals) (2 x 30 s at 4 ms⁻¹). DNA was purified using an AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer’s instructions. DNA integrity and purity were checked using agarose gel (1%) electrophoresis. DNA concentration was measured using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific), measuring absorbance at 260 and 280 nm.

16S rRNA copy number was determined by qPCR using a Realplex Mastercycler (Eppendorf, Montesson, France). For each sample, assays were carried out in triplicate using 96-well realtime PCR plates (Eppendorf). The qPCR was performed in 25 μ L containing 12.5 μ L Master Mix (Invitrogen, Eugen, USA), using primers BAC3388 and BAC805R (250 nM of each primer), the TaqMan probe BAC516F (100 nM) and DNA template ranging from 10 ng to 100 ng as previously described (Yu et al., 2005). Real-time PCR thermocycling was conducted at 95°C for 20 s during 1 cycle, then at 95°C for 15 s during 40 cycles and finally at 60°C for 1 min. A negative control without DNA template was subjected to the same procedure in order to monitor contamination. A standard curve was generated for each assay using 10-fold dilutions of pEX-A plasmid (Eurofins MWG Operon) containing the target gene sequence. Three different dilutions of each sample were amplified and the initial concentrations were calculated from reactions displaying satisfactory PCR amplification.

Microbial diversity was analyzed using MiSeq Illumina sequencing, performed at the GenoToul Genomics and Transcriptomics facility (GeT, Auzeville, France). The V3-V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene was amplified from genomic DNA samples using the bacterial primers 343F (5'-CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TAC GGR AGG CAG CAG-3') and 784R (5'-GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTA CCA GGG TAT CTA ATC CT-3') modified to add adaptors during the second PCR amplification. The first PCR amplification was performed in 50 μ l reactions containing 1X PCR buffer, 2.5 U MTP Taq DNA Polymerase (Sigma), 0.2 mM of each dNTP, 0.5 mM of each primer and 2 ng of extracted DNA. After 30 amplification cycles (94°C, 1 min; 65°C, 1 min; 70°C, 1 min), amplicons were purified using magnetic beads and quantified using a NanoDrop 1000 spectrophotometer. A second PCR amplification was performed at the GeT platform to add sequencing adapters and a unique index for each sample (details in Supplementary data). The PCR products were purified using magnetic beads and their quality was ascertained using a High Sensivity DNA Analysis Kit (Agilent) and a BioAnalyzer 2100. DNA concentration was measured using a NanoDrop 1000 spectrophotometer. An equimolar pool was then prepared and loaded on a MiSeq Illumina cartridge, using reagent kit v3 which enabled paired 300-bp reads. Sequencing data were demultiplexed at the GeT platform and pair-ends reads were joined with Flash v1.2.6 (Magoc and Salzberg, 2011), using an overlap (>110 bp) displaying a maximum ratio of 0.1 mismatches, which generated high quality full-length reads of the V3 and V4 regions.

All fastq files were then merged into a unique fasta file, and processed using the software package Mothur v1.33.1 following the standard procedures (Schloss et al., 2009; Auer et al., 2017). Briefly, sequences presenting a primer mismatch or displaying unexpected length (>380 or <460 bp) were removed. To reduce the computational costs, sequences were de-replicated and unique sequences were aligned with the SILVA database (Yilmaz et al., 2014). Only the sequences that aligned with the expected V3-V4 region were further analyzed. Sequences that presented less than 5 differences with a more abundant one were considered as sequencing errors and were merged together. Chimeras were detected and removed using Uchime (Edgar et al., 2011) set to self-reference and default parameters for each of the sample groups. Sequences were then clustered at 3 % distance which approximately corresponds to the species level (Stackebrandt and Goebel, 1994).

Taxonomic affiliations were obtained using the Wang method and a fusion of LTP v115 (Yarza et al., 2008) and DictDB (Mikaelan et al., 2015b) databases. According with Bokulich et al., (2013), in order to avoid false and/or contaminant OTUs, rare OTUs containing less than 20 sequences across all samples (representing less than 0.005% of total sequences) were removed, considering this value as a detection threshold. All OTUs validating this criterium were thus considered as true OTUs. All samples were normalized by random subsampling to a level which enable to cover the community diversity (herein 15,000 sequences per sample; see Supplementary data 1). Abundance tables with affiliation and rarefaction curves were generated using Mothur (Schloss et al., 2009). Major OTUs are frequently defined as those displaying abundances >1%; such value, based on low resolution PCR-dependent technologies is sometimes controversial (Casamayor et al., 2000; Poretsky et al., 2014). Herein, in order to take account of the eventual variability between termite-gut replicates, OTU abundance was set at >2% to define abundant OTUs.

Abundance tables, taxonomy files and phylogenetic trees were manually imported into R (v3.0.3) package Phyloseq v1.6.1 (McMurdie and Holmes, 2013). Weighted-Unifrac distances were calculated using Phyloseq and clustered using Hclust. PCoA plots were generated using Phyloseq using the `vegan:metaMDS` function. ClustalOWS alignment and calculation of neighbor-joining or average distance trees were performed using Jalview v2.8.2 (Waterhouse et al., 2009).

Sequence data were deposited in the sequence read archive (SRA) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under accession number SRP119642.

VI.2.4. Results

VI.2.4.1. Reactor performance: wheat straw degradation and carboxylate production

The ability of gut microbiomes from four different species of higher termites (*Nasutitermes ephratae*, *N. lujae*, *Termes hospes* and *Microcerotermes parvus*) to degrade wheat straw as sole carbon source was assessed in controlled bioreactors, performing duplicates for each termite species (named r1 and r2). The quantity of DNA in each inoculum (500 guts) was estimated to be about 150 µg, implying that each inoculum contained a similar number of 16S rRNA gene copies ($\sim 1.5 \times 10^{12}$). However, regarding *Termes hospes* these values were lower (67.9 ± 0.7 µg and $1.7 \pm 0.7 \times 10^{11}$ 16S rRNA copies; Table VI-1).

Table VI-1: Microbial biomass concentration estimated as 16S rRNA gene copies measured at the beginning and at the end of the incubation.

Species	16S rRNA gene copies/µL			
	initial		final	
	r1	r2	r1	r2
<i>M. parvus</i>	$5.0 \pm 0.6 \text{ E}+06$	$4.3 \pm 0.3 \text{ E}+06$	$5.4 \pm 0.8 \text{ E}+06$	$1.4 \pm 0.3 \text{ E}+07$
<i>N. ephratae</i>	$3.9 \pm 0.2 \text{ E}+06$	$3.7 \pm 0.6 \text{ E}+06$	$8.6 \pm 1.2 \text{ E}+06$	$2.3 \pm 0.5 \text{ E}+07$
<i>N. lujae</i>	$2.8 \pm 0.4 \text{ E}+06$	$3.9 \pm 0.9 \text{ E}+06$	$1.65 \pm 0.08 \text{ E}+07$	$1.7 \pm 0.2 \text{ E}+07$
<i>T. hospes</i>	$4.3 \pm 0.7 \text{ E}+05$	$1.4 \pm 0.3 \text{ E}+06$	$1.0 \pm 0.4 \text{ E}+07$	$7.8 \pm 0.5 \text{ E}+06$

Values are detailed for each inoculum and biological replicates.

After 20 days of incubation in anaerobic batch bioreactors, wheat straw degradation varied from 26 to 49% w/w for the different termite gut inocula (Figure VI-1 A). Highest wheat straw degradation ($45.2 \pm 5\%$) was achieved by the *N. ephratae* inoculum, followed by those of *N. lujae*, *T. hospes* and *M. parvus*, with mean degradation values of 37.1 ± 4.3 , 30 ± 5 and $31 \pm 3.7\%$, respectively (Figure VI-1 A).

The main products of lignocellulose bioconversion were carboxylates (VFA, Figure VI-1 B) and CO₂ (data not shown), irrespective of the inoculum used. Small amounts of methane were detected in some of the bioreactors, but in this case its production was immediately inhibited by the addition of BES. During the initial phase of the culture, small amounts of H₂ production were also detected, but this ceased at later stages (data not shown). VFA accumulation varied from 2.2 to 5.8 g.L⁻¹ for the different termite gut inocula, with the *N. ephratae* gut microbiome yielding the highest concentration (Figure VI-1 B).

For all the termite species tested, VFA was mainly composed of acetate (>85%), associated with smaller amounts of propionate and butyrate, the only exception being the bioreactor inoculated with *M. parvus* gut microbiome (20% propionate production). It is also noteworthy that VFA production by *N. lujae* and *M. parvus* gut inocula displayed high variability between replicates (Figure VI-1 B) and VFA production kinetics varied between the different inocula. However, despite these differences, VFA production reached a maximum value in all bioreactors after 20 days of incubation.

Importantly, the amounts of VFA produced in the different bioreactors correlated with measured lignocellulose degradation and were consistent with theoretical lignocellulose conversion yields (Lazuka et al., 2015). Logically, being devoid of inoculum the control bioreactor did not produce VFA or gas over the whole incubation period and the amount of lignocellulosic biomass remained unchanged (data not shown).

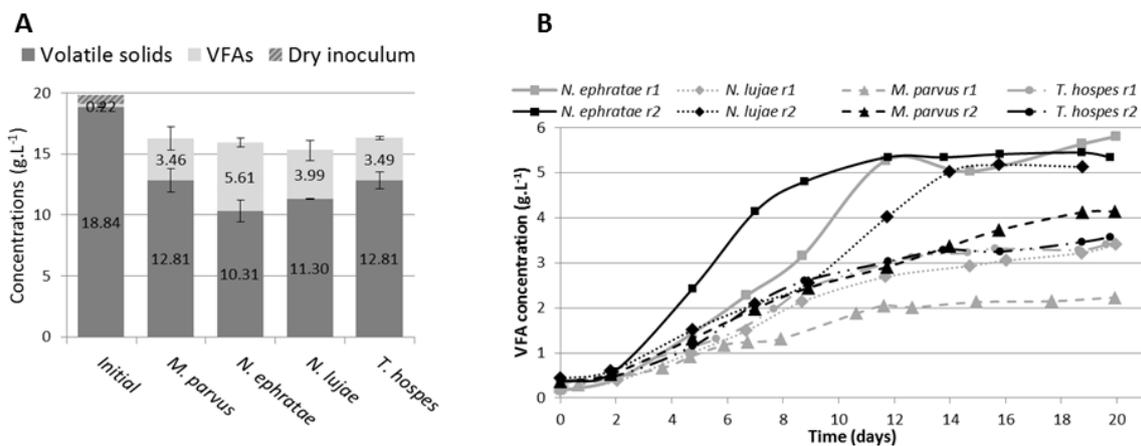


Figure VI-1 : Bioreactor composition (A) at the beginning and at end of incubation of termite gut microbiomes issued from *Nasutitermes ephratae*, *N. lujae*, *Microcerotermes parvus* and *Termes hospes*. Errors are standard deviations of the two biological replicates. Kinetic of volatile fatty acid (VFA) production (B) through the incubation in each reactor (r1 and r2). Sterile wheat straw was inoculated with 500 termite guts from each species and incubated for 20 days.

Monitoring various enzymatic activities on r2 duplicates at the end of the incubation (Figure VI-2) revealed free- and cell-bound xylanase and cellulase activities. However, exoglucanase and β -glucosidase activities were not detected.

While bioreactors inoculated with termite guts of *N. ephratae*, *M. parvus* and *N. lujae* displayed significant xylanase activity ($>1.500 \text{ UA.mL}^{-1}$), the one containing the *T. hospes* inoculum displayed lower xylanase activity (600 UA.mL^{-1}).

Regarding CMCCase activity, a similar profile was observed in all bioreactors, but the measured activity was generally lower than xylanase activity (i.e. $62\text{-}71 \text{ UA.mL}^{-1}$ CMCCase activity for *N. ephratae*, *M. parvus* and *N. lujae* gut inocula and 40 UA.mL^{-1} for *T. hospes* inoculum).

Finally, it was noted that for all termite gut inocula, more than 60% of the xylanase and cellulase activities were cell-bound.

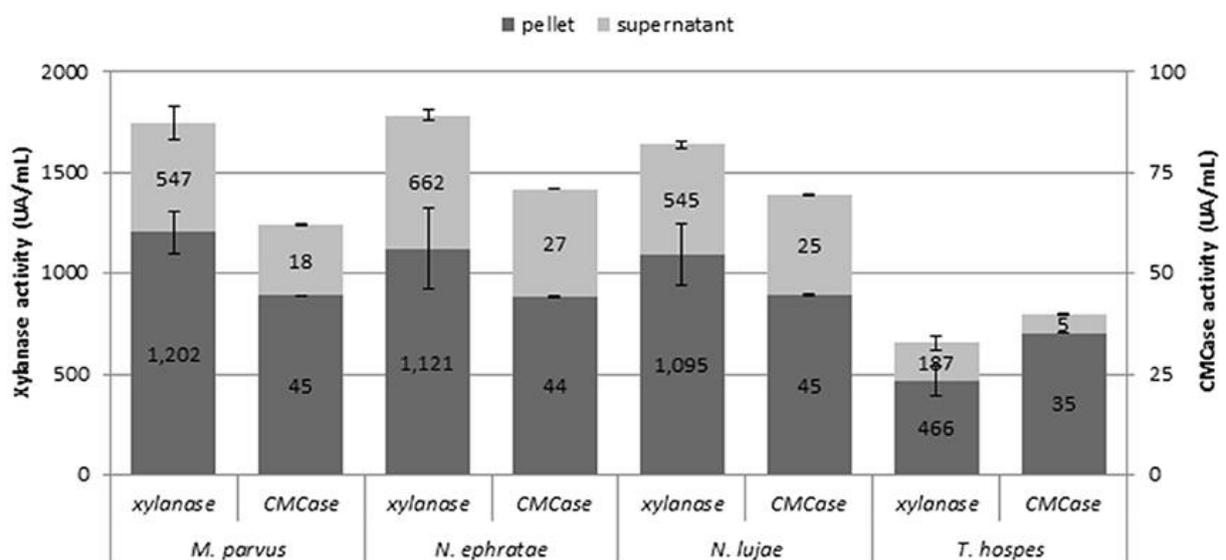


Figure VI-2 : Xylanase and CMCCase enzymatic activities at final the end of the incubation for the termite gut inocula from *Nasutitermes ephratae*, *N. lujae*, *Microcerotermes parvus*, and *Termes hospes*. Supernatants represent extracellular enzymatic activities whereas pellets correspond to cell-bound activities. Errors bars are standard deviations between technical replicates.

VI.2.4.2. Diversity analysis of the termite-gut inocula and lignocellulose degradation bioreactors

The microbial diversity of the original termite gut microbiome and that of the communities developed in the bioreactors was assessed by sequencing the V3-V4 16S rRNA gene region of genomic DNA samples.

A total of 870,449 pair-end reads were successfully assembled into sequences of about 450 bp length, with an average of 54,400 reads per sample. After filtering and chimera removal, more than 20,000 high quality sequences per sample remained for further analysis. Sequence clustering yielded a total of 8,794 bacterial operational taxonomic units (OTUs) at 97% sequence similarity threshold. Rare OTUs were filtered generating 671 final OTUs.

Rarefaction curves, based on normalization by subsampling at 15,000 sequences per sample, showed that all samples (except *N. lujae* r1) were close to saturation (Figure VI-S1, Supplementary data), indicating that all communities were sufficiently sampled to estimate bacterial diversity and richness.

VI.2.4.3. Termite gut microbiome composition

The average number of OTUs observed was 150, 181, 192 and 292 for the gut microbiomes of *T. hospes*, *N. ephratae*, *N. lujae*, and *M. parvus*, respectively (Table VI-2). Considering Shannon’s and Simpson’s reciprocal index, *T. hospes* displayed the highest diversity, while the other termite gut microbiomes displayed similar levels of diversity.

Table VI-2 : Alpha-diversity indexes of gut inocula and final reactor communities.

Species	<i>M. parvus</i>				<i>N. ephratae</i>				<i>N. lujae</i>				<i>T. hospes</i>			
	gut1	gut2	r1	r2	gut1	gut2	r1	r2	gut1	gut2	r1	r2	gut1	gut2	r1	r2
ObsOTUs	154	147	63	52	194	169	67	58	196	186	116	44	304	281	61	63
Shannon	3.40	3.31	2.48	1.79	3.43	3.46	2.49	2.10	3.36	3.41	2.20	2.01	4.96	4.94	2.22	2.54
Simpson	12.3	10.1	7.7	3.9	13.2	12.9	7.0	5.4	13.0	12.9	4.9	5.8	64.4	65.7	5.6	7.63

Abundant OTUs were defined herein as those displaying a minimum 2% abundance (min. 300 sequences) in at least one sample. From the 34 abundant OTUs detected across all gut samples, only one was common to three termite species *N. lujae*, *N. ephratae* and *M. parvus*. One OTU was common to *M. parvus* and *T. hospes*, while nine OTUs were common to the two *Nasutitermes* gut microbiomes (Supplementary data, Table VI-S1). Therefore, the majority of abundant OTUs were specific to a given host, and the shared OTUs were mainly associated with the two closely related *Nasutitermes* species.

This observation was also true for OTUs displaying low abundances (< 2 %; defined as minor OTUs). Indeed, only 8 minor OTUs were common to the four termite species.

Regarding the relative abundances of species, the gut microbiome from *M. parvus* and the two species of *Nasutitermes* were dominated by Spirochaetes (> 55%), followed by Fibrobacteres (except for *N. lujae*) and the candidate phylum Termite group 3 (TG3; Figure VI-3). A completely different profile was observed for the *T. hospes* sample, which was dominated by Firmicutes (46%), Spirochaetes (21%), Bacteroidetes (13%) and Proteobacteria (12%).

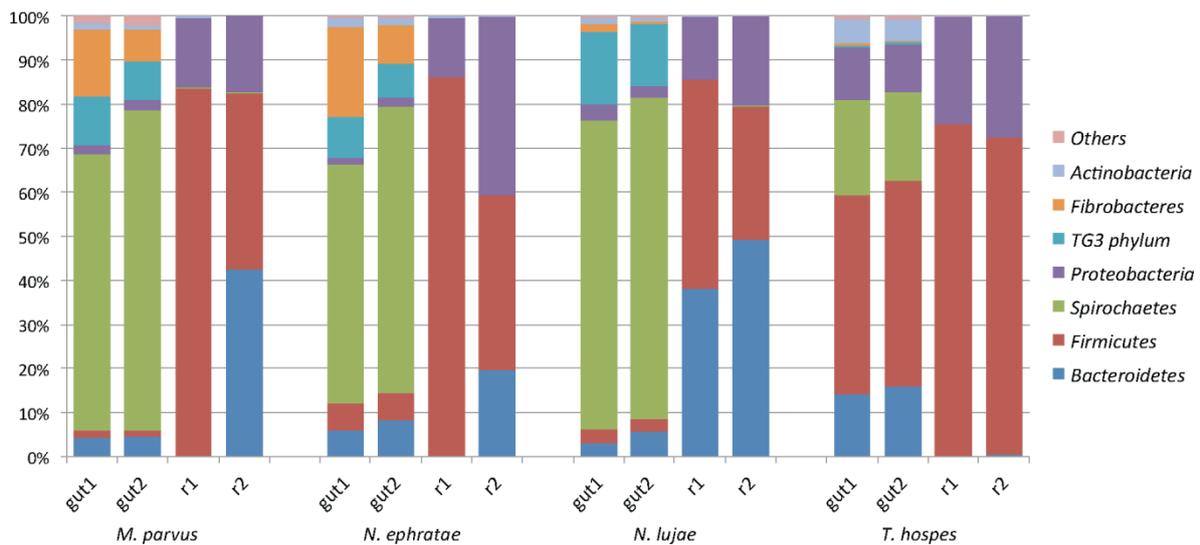


Figure VI-3 : Diversity of the termite-derived microbiome. Phylum level classification of the 16S rRNA genes in the studied termite gut species and in the two replicated reactors inoculated with such guts at the end of the incubation. The category “Others” contains the low abundance phyla Acidobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria, Chlorobi, and Deferribacteres.

Overall, these results are consistent with previous descriptions of termite gut bacterial communities (Brune, 2014; Hongoh et al., 2006; Mikaelyan et al., 2017; Thongaram et al., 2005).

Weighted Unifrac distances of OTUs (Figure VI-4 A) showed that the two *Nasutitermes* gut microbiomes were closely related, while the *M. parvus* gut microbiome was closer to those of *Nasutitermes* than the gut microbial community of *T. hospes*.

Based on cytochrome oxidase subunit II gene (Legendre et al., 2008), the genus *Termes* is phylogenetically closer to *Nasutitermes* than *Microcerotermes* (VI-S2 Supplementary data). Nevertheless, the *Termes* gut microbiome was clearly different to that of *Nasutitermes* gut, being the only termite species displaying abundant OTUs belonging to Firmicutes and Proteobacteria.

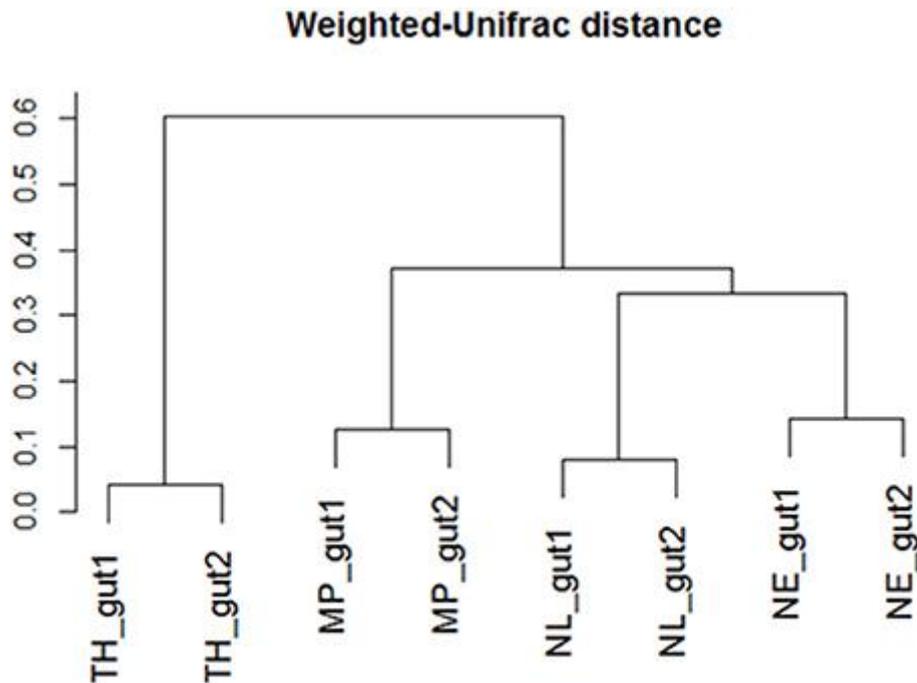


Figure VI-4 : Weighted-Unifrac diversity distances between the initial termite gut communities from *Nasutitermes ephratae* (NE), *N. lujae* (NL), *Microcerotermes parvus* (MP), and *Termes hospes* (TH).

VI.2.4.4. Diversity changes after incubation in lignocellulose bioreactors

Determination of observed richness (Table VI-2) using a 97% similarity threshold revealed that this was decreased by a factor of 2 (147-304 OTUs being reduced to 67 OTUs) over the 20-day incubation period. Moreover, for each of the termite-gut inocula, the Shannon and Simpson reciprocal diversity indices were higher than 3 and 10 respectively, whereas these values were lower than 2.6 and 7.7 for the communities sampled in the bioreactor after incubation. Taken together, these data reveal that growth of the termite gut bacterial communities in artificial bioreactor conditions using wheat straw as the sole carbon source systematically decreased microbial diversity.

A majority of sequences (64%) obtained at the end of the incubation period belonged to 59 OTUs that were common to all the samples. However, 273 OTUs representing 10% of sequences were sample-specific. The phylogenetic profiles of the bacterial communities present in the bioreactor at the end of the incubation were dominated by Firmicutes (particularly of the Clostridia class) and contained lower levels of Proteobacteria- and Bacteroidetes-related OTUs (Figure VI-3).

Moreover, unlike the original gut microbiome, the abundant OTUs present at the end of the experiment were the same for all samples, irrespective of the profile of the original inoculum (Table VI-3). PCoA analysis based on weighted-Unifrac distances confirmed that the final communities were significantly different compared to the initial gut microbiome (Figure VI-5). It is noteworthy that replicates of the gut microbiome of a given termite species clustered together, whereas replicates of the bioreactor communities were more distant, with the exception of those derived from *T. hospes*.

Regarding the microbial communities present in the bioreactors, these can be separated into two subgroups, according to differences at the phylum level. The first group was dominated by Firmicutes (over 70%) and characterized by the absence of Bacteroidetes, while the second group was mainly composed of Bacteroidetes (20 to 50%) and Firmicutes (30 to 47%).

Table VI-3 : Relative abundance (%) of the main phyla present in termite gut microbiomes and in the final bioreactor communities (colored lines).

Species	<i>M. parvus</i>				<i>N. ephratae</i>				<i>N. lujae</i>				<i>T. hospes</i>			
	gut1	gut2	r1	r2	gut1	gut2	r1	r2	gut1	gut2	r1	r2	gut1	gut2	r1	r2
Bacteroidetes	4.4	4.6	0.04	42.7	5.9	8.2	0.3	19.7	3.0	5.7	38.2	49.2	14.1	16.0	0.1	0.5
<i>Dysgonomonas</i> Otu002	-	-	-	98.4	-	-	22.2	-	0.7	2.6	99.3	53.4	2.6	-	-	-
<i>Dysgonomonas</i> Otu015	-	-	-	0.02	-	-	-	-	-	-	-	46.1	-	-	-	-
<i>Bacteroides</i> Otu018	-	0.1	-	-	-	-	-	93.8	-	-	-	-	-	-	-	-
Firmicutes	1.5	1.4	83.6	40.0	6.2	6.3	85.8	39.6	3.2	2.9	47.4	30.4	45.3	46.8	75.4	72.0
<i>Clostridium termitidis</i> Otu001	-	-	27.2	60.9	-	-	33.1	34.8	0.2	-	5.8	50.6	0.1	-	17.6	10.7
uncl <i>Lachnospiraceae</i> Otu003	0.4	0.9	8.2	-	0.3	0.7	14.9	2.6	0.6	2.3	44.3	-	0.7	-	45.2	32.9
uncl <i>Lachnospiraceae</i> Otu004	0.9	-	9.2	30.4	-	0.6	21.1	34.5	0.2	-	9.7	37.5	0.1	-	11.2	27.7
<i>Acetanaerobacterium</i> Otu014	-	-	26.8	-	-	-	1.0	-	0.8	-	-	-	-	-	0.3	0.02
<i>Ruminococcaceae</i> Gut_cluster Otu019	-	-	0.1	-	-	-	0.2	-	0.4	-	14.0	-	0.2	-	12.8	0.1
<i>Ruminococcaceae</i> Gut_cluster_7 Otu023	-	-	3.4	-	0.1	-	8.5	-	-	-	3.5	-	0.03	-	-	-
<i>Ruminococcaceae</i> Gut_cluster Otu024	-	-	1.6	1.1	-	-	2.2	7.3	-	-	5.9	0.5	0.04	-	0.4	2.2
<i>Sedimentibacter</i> Otu027	-	-	1.4	0.1	-	-	4.0	2.8	-	-	0.0	-	-	-	3.6	3.0
uncl <i>Clostridia</i> Otu034	-	-	9.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lachnospiraceae</i> Incertae_Sedis Otu037	-	-	-	-	-	-	-	10.8	-	-	0.03	-	-	-	1.8	2.1
uncl <i>Clostridia</i> Otu042	-	-	3.0	-	-	-	4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
uncl <i>Lachnospiraceae</i> Otu043	-	-	4.0	0.7	-	-	1.4	0.7	0.2	-	0.2	0.8	-	-	0.03	0.7
<i>Ruminococcaceae</i> Gut_cluster Otu053	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.7	-	0.04	-	0.4	3.0
Proteobacteria	1.9	2.3	15.8	17.3	1.6	2.2	13.5	40.5	3.5	2.7	14.2	20.4	11.9	10.8	24.4	27.5
uncl <i>Enterobacteriaceae</i> Otu005	-	-	0.1	38.2	0.4	1.2	21.7	81.2	0.2	0.5	43.1	55.6	0.4	0.7	8.0	14.2
<i>Pseudomonas_2</i> Otu010	-	-	0.6	32.1	0.4	-	4.8	2.5	0.4	-	21.5	16.5	0.2	-	63.5	33.3
uncl <i>Enterobacteriaceae</i> Otu012	-	-	0.0	12.9	-	-	3.7	1.0	-	-	26.2	22.1	0.2	-	1.4	47.3
<i>Stenotrophomonas</i> Otu028	-	-	44.7	0.3	-	-	24.5	-	-	-	1.0	-	-	-	-	-
uncl <i>Rhodocyclales</i> Otu029	-	-	10.1	-	0.4	-	25.0	-	0.2	-	6.4	-	0.2	-	15.9	-
<i>Escherichia-Shigella</i> Otu031	0.7	5.6	37.1	-	0.9	1.2	17.6	0.1	0.6	8.6	0.1	-	0.3	-	0.2	0.5
<i>Acinetobacter</i> Otu040	-	-	-	2.9	-	-	-	12.9	-	-	-	0.03	-	-	-	2.0

For each phylum, OTU composition is detailed as relative abundance (%).

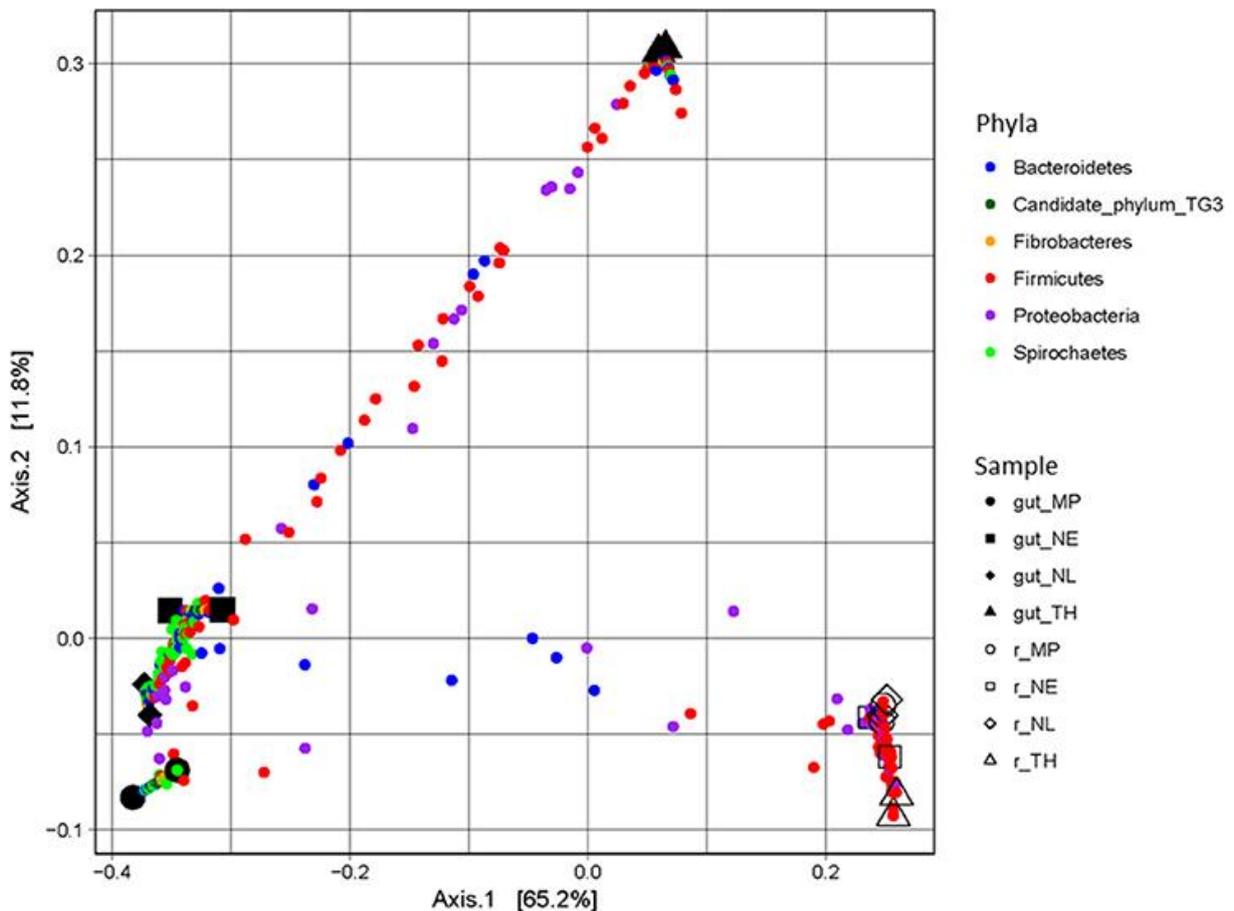


Figure VI-5 : PCoA plot of weighted-Unifrac distances of guts and bioreactor communities issued from *Nasutitermes ephratae* (NE), *N. lujae* (NL), *Microcerotermes parvus* (MP), and *Termes hospes* (TH). Shapes correspond to different samples from guts and bioreactors. Small dots are colored according to their phylum, and correspond to the projection of OTUs in the samples-space, so distance between samples reflects their specificity.

The phylogenetic distribution of 16S rRNA phylotypes was strikingly different in the bioreactors compared to those in the gut inocula. Notably, sequences related to Spirochaetes, Fibrobacteres and TG3, had almost disappeared at the end of the fermentation period (Figure 3), whereas sequences related to Bacteroidetes were highly abundant in bioreactors inoculated with gut microbiome from *N. lujae*, as well as in one of the bioreactors inoculated with *M. parvus* and *N. ephratae* gut microbiome.

This phylum was represented by two OTUs belonging to the genera *Dysgonomas* and *Bacteroides*.

Furthermore, within the bioreactor derived communities, Proteobacteria-related OTUs belonging to the gamma-Proteobacteria class were identified, with some members being related to the *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Acinetobacter* genera and another to an unclassified genus. Regarding the Firmicutes-related OTUs, these were composed of the class Clostridia, mainly related to Lachnospiraceae and Ruminococcaceae orders. *Clostridium termitidis* was found at high frequency in all reactor samples, representing on average 16% of the sequences, whereas sequences assigned to this species represented less than 0.02% of reads in the gut inocula.

The reactor-mediated enrichment of Firmicutes, Proteobacteria and Bacteroidetes occurred at the expense of the three dominant phyla observed in the termite guts. Bacteria that were able to grow in the conditions prevailing in the bioreactors represented less than 5% in the initial gut community, and in some cases they represented less than 0.01% (Table 3).

VI.2.5. Discussion

The goal of this study was to determine the ability of termite gut microflora to grow in controlled bioreactor conditions, using raw wheat straw as the sole carbon source to produce carboxylates. Accordingly, our results demonstrate that gut microbiome from *Nasutitermes ephratae*, *N. lujae*, *Microcerotermes parvus* and *Termes hospes* were all able to degrade wheat straw and produce the targeted products. The highest level of wheat straw conversion was obtained in bioreactors inoculated with the *N. ephratae* gut microbiome, which was accompanied by high xylanase and cellulase activities.

Importantly, the extent of wheat straw degradation brought about by the termite gut microbiome was high compared to similar experiments performed using larger amounts of cow rumen inoculum (Lazuka et al., 2015). This is particularly true in the case of the *Nasutitermes lujae* gut inoculum ($40 \pm 0.5\%$ wheat straw degradation), even if carboxylate production was variable in replicate bioreactors. Regarding this variability, it is important to note that the different termite individuals were collected from their nests over a 3-month interval (Material and Methods section) and, in the specific case of *T. hospes*, the inoculum size of the two replicate experiments was different, with a two-fold difference in the number of 16S rRNA gene copies (Table VI-1).

Nevertheless, variable carboxylate production was also observed for the *M. parvus*-related inocula, despite a similar 16S rRNA gene copy count (i.e. a 15% difference) and in both cases a rather consistent bacterial community composition was observed. Therefore, it appears that other factors, such as the specific physiological state of the gut microbiome at the time of the gut's withdrawal, could be responsible for experimental variability.

In an attempt to relate wheat straw degradation to enzyme activity, cellulase and xylanase activities were monitored. Significantly, the majority of these activities were cell-bound, which might be considered counter intuitive, since the enzymes must be acting on large insoluble polymers. However, the term cell-bound covers all cell-associated enzyme activities, including those present in the cytoplasm, in the periplasmic space (Gram negative species) and those bound to the outer cell wall (e.g. enzymes associated with cellulosomes). In this respect, it is noteworthy that the bacterial communities in the bioreactors contained Clostridia, a class that contains cellulosome-producing members (He et al., 2013). Furthermore, while the reactor communities derived from the guts of *N. ephratae*, *N. lujae* and *M. parvus* all produced similar levels of cell-bound cellulase and xylanase activities, those from *N. ephratae* and *N. lujae* displayed the highest extracellular enzyme activities, and in particular more CMCase activity, which might explain why these communities also produced the highest level of wheat straw degradation. In contrast, bioreactors inoculated with gut microbiome from *T. hospes* displayed the lowest xylanase and cellulase activities. This observation is consistent with the observed low wheat straw degradation. In a previous study involving the use of switchgrass and corn stover as carbon sources for the growth of a compost inoculum, the production of 58 UA xylanase and 8 UA cellulase was correlated with approximately 34 % w/w switchgrass degradation, while 23% corn stover degradation was achieved in the presence of less than 4 UA xylanase and 1 UA cellulase (Reddy et al., 2013).

Enzyme-mediated biomass deconstruction is a complex process involving whole arsenals of enzymes representing different families, substrate specificities and chemical mechanisms. Moreover, it involves intricate enzyme interplay and significant synergistic effects (Kumar et al., 2008; Wei et al., 2009). Therefore, it is to be expected that wheat straw degradation varies according to the exact enzyme mixture present in the bioreactor. Accordingly, further identification and characterization of the enzymes present in the different reactors should provide insight into the relationship between the composition of the enzyme arsenals produced by the different termite gut-derived inocula and their wheat straw-degrading capabilities.

A second aim of this study was to characterize the different components of the termite gut microbial communities and identify those that are involved in wheat straw degradation in the bioreactor experiments. The analysis of sequencing data showed that termite-gut microbial diversity decreased after incubation on wheat straw bioreactors irrespective of the termite species origin of guts used as inocula. In this study, bioreactors were operated in batch mode which implies that bacteria displaying the highest growth rates under defined conditions are selected. Thus, diversity decrease reflects the selection of more adapted species, growing faster on the lignocellulosic substrate under the experimental conditions applied in bioreactors. This in turn would result in the selection of the most efficient lignocellulolytic microorganisms. These observations are consistent with previous studies reporting a decline of diversity in microbial communities enriched on lignocellulosic substrates, decline that was particularly strong at the initial steps of the enrichment process (Reddy et al., 2011; Lazuka et al., 2015). Additionally, among the termite species studied, *M. parvus*, *N. ephratae* and *N. lujae* gut microbiome were dominated by members belonging to Spirochaetes and abundant in the Fibrobacteres phylum, though this was not the case for *T. hospes*, which was rich in Firmicutes-related OTUs. In the light of termite phylogenetic relationships, established by comparing the genes encoding cytochrome oxidase subunit II, this is surprising because *Nasutitermes* genus is more closely related to the *Termes* genus than to *Microcerotermes* (Supplementary Information, S2). However, it is notable that *T. hospes* is the only humus feeding species in this study, the three others being wood-feeders. Therefore, these results appear to confirm that termite gut microbiomes are mainly shaped by the host's diet, consistent with previous results (Mikaelyan et al., 2015a). Additionally, it is noteworthy that our data describing the *T. hospes* gut microbial community were similar to those reported for *T. comis* (Thongaram et al., 2005), indicating that the bacterial profiles are robust within the *Termes* genus. Similarly, the gut microbiome phylogenetic profiles of the wood-feeders *N. ephratae* and *M. parvus* closely resembled that of the *N. takasagoensis* microbiome (Hongoh et al., 2006), once again supporting the idea that gut microbiome profiles are shaped by feeding regimes. The weighted-Unifrac distance of the gut microbial communities from *M. parvus*, *N. lujae* and *N. ephratae* (all three being wood-feeders) were highly similar (Figure 4). This signifies that these termite gut communities share numerous OTUs, but their relative abundances might vary between these species.

Indeed, the weighted-Unifrac distance observed between *N. ephratae* and *N. lujae* gut communities results from differences in abundance of Fibrobacteres compared to the two other termite gut communities. The presence of TG3-related OTUs in all termite guts confirmed that this hypothetically new phylum is widespread and dominant in termite gut communities. TG3-related OTUs were surprisingly well grouped by host (Supplementary Information S3), supporting the hypothesis of coevolution and host-adaptation processes proposed by Hongoh et al. (2005). It has been reported that TG3 members associate with fibers in the termite hindgut, leading to the postulate that these are lignocellulolytic bacteria (Mikaelyan et al., 2014). The two other major taxa observed in the termite gut samples were Spirochaetes and Fibrobacteres, which are not well characterized. Nevertheless, they have previously been described in ruminants as cellulose degraders (Kobayashi et al., 2008) and in higher termites as fiber-associated lignocellulose degraders (Mikaelyan et al., 2014; Warnecke et al., 2007). *Spirochaetaceae* have been shown to play a vital role in termites (Eutick et al., 1978), producing acetate from H₂ and CO₂ (Brauman et al., 1992), an interesting metabolic route for carboxylate production. Nevertheless, despite the high initial abundance of Spirochaetes and Fibrobacteres, neither of these phyla were maintained in the bioreactors, being absent at the end of the 20-day incubation period.

After incubation on wheat straw, comparison of microbial diversity between the initial and final states (based on Shannon's and Simpson's reciprocal indices) revealed that diversity was strongly decreased. For all termite gut inocula, the conditions prevailing in the bioreactors led to the selection of OTUs mainly related to Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria. This was particularly noticeable in the bioreactors inoculated with the *N. lujae* gut microbiome, which generated very reproducible community profiles, mainly composed of these three phyla. Regarding Proteobacteria, members of this phylum included *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* and *Rhodocyclales*. These groups are not known for their ability to degrade lignocellulose, but they are reputed to ferment carbohydrates derived from lignocellulose degradation (Imhoff, 2005). Moreover, it is noteworthy that *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* normally display aerobic metabolism. Their presence in the bioreactors is thus surprising since experiments were conducted under strict anaerobic conditions and dissolved oxygen was never detected in the liquid phase (data not shown).

Nevertheless, their relative abundance in the bioreactors was low, with maximal abundances of 3.6% *Stenotrophomonas* and 2.7% *Acinetobacter* in bioreactors inoculated with guts from *M. parvus* and *N. ephratae*, respectively.

Higher abundance values were observed for *Pseudomonas* (12.3% in bioreactors inoculated with *T. hospes* guts), but facultative anaerobic metabolism has been reported for *Pseudomonas*, particularly, in relation to aromatics and lignoaromatics metabolism (Liang et al., 2014; Taylor, 1983). In this respect, it is notable that strict anaerobes such as *Clostridium*, *Bacteroides* or *Acetanaerobacterium* were also observed in the bioreactor communities. This apparent anomaly remains to be explained. In all the bioreactors, OTUs belonging to *Clostridia* (Firmicutes), particularly *Clostridium termitidis* OTU₁, but also OTUs related to *Lachnospiraceae* (OTU_{3, 4, 37, 43}) and *Ruminococcaceae* (OTU_{19, 23, 24, 53}) were strongly enriched. *C. termitidis* was present in all bioreactors at an average of 16% of total reads. This species, previously identified in the *N. lujae* gut (Hethener et al., 1992), is reputedly a cellulose degrader able to use various sugars, including xylose as a source of carbon. So far, the role played by *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae* in lignocellulose degradation has only been studied in mammals (Biddle et al., 2013), although previous studies have revealed their presence in termite environments, mainly in association with fungus-growing or humus and soil feeder termites (Mikaelyan et al., 2015a). Additionally, it has been shown that members of *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae* are characterized by a greater number of plant cell wall-degrading glycoside hydrolase (GH) genes than those of the Clostridiaceae family. This is remarkable, because many species belonging to the Clostridiaceae family are lignocellulolytic, being characterized by the fact that they bear cellulosomes and their genomes encode large numbers of xylanases (He et al., 2013). Nevertheless, our observations suggest that the members of the Firmicutes phylum, which were enriched in all bioreactors, are the main source of wheat straw degradation in the experimental conditions employed in this study. OTUs related to Bacteroidetes were also enriched in some of the reactors, particularly *Dysgonomonas* (OTU_{2, 15}) and *Bacteroides* (OTU₁₈). Members of the *Dysgonomonas* genus are known for their lignocellulolytic potential (Sun et al., 2015) and have been identified as putative cellulose degraders in termite gut (Yang et al., 2014). Species in this genus are also able to degrade cellobiose and glucose (Hofstad et al., 2000). *Bacteroides* species are commonly found in mammalian digestive tracts and have been described as xylanolytic (Tomomi Nishiyama, 2009).

The final composition of the bacterial communities growing on wheat straw in the bioreactors was clearly distinct when compared to the parental termite gut communities (Figure 5). Diversity analysis showed that OTUs present in termite guts were mainly host-specific. However, in the bioreactor experiments a certain convergence of OTUs was observed. This is no doubt caused by the identical conditions prevailing in the different bioreactors. Moreover, the community structure in the bioreactors more closely resembled lignocellulolytic communities present in rumen or soil than those in termite guts (He et al., 2013). While it is difficult to ascribe these changes to one particular factor, unsatisfied pH, nutrient and/or O₂ requirements, altered host specific signaling and inter- taxa dependency relationships might explain the loss of certain phyla during our experiments.

It is difficult to compare the biomass-degrading potency of the termite gut microbiomes studied herein with those described in other studies, because the latter are often enriched microbial communities from compost, forest soils, or mangrove sediments grown on different substrates that were prepared in different ways (Feng et al., 2011; Reddy et al., 2011; Yan et al., 2012). For example, Feng et al. (2011) reported that a woodland soil inoculum growing at 40°C achieved 51% degradation of corn stover powder (mesh 40 or 375 µm) and 44% degradation of steam-exploded corn. In another study, a cow manure inoculum growing on alkali-pretreated rice straw in an anaerobic digester yielded 49% degradation of the substrate after 7-day incubation (Yan et al., 2012). However, to our knowledge, no previous investigations have focused on lignocellulose degradation by termite gut communities growing in bioreactor conditions. Nevertheless, it is possible to simply observe that wheat straw degradation levels in this study, particularly those obtained with the *Nasutitermes* gut microbiome (up to 45% w/w) are comparable with those mentioned above. Moreover, it is noteworthy that this level of degradation was achieved using a relatively intact substrate (simply milled to 2 mm and autoclaved) and in the absence of prior enrichment of microbial community. This suggests that it might be possible to achieve higher degradation levels using a pretreated substrate (Yan et al., 2012; Lazuka et al., 2017) or an enrichment strategy (Reddy et al., 2012; Lazuka et al., 2015). In the conditions applied here, a slightly acid pH was chosen in order to inhibit methanogenesis and favor carboxylate accumulation. However, the pH conditions prevailing in termite guts is variable and can reach very high pH values in the hindgut (P3) region, which harbors a dense microbial community and is the place where most lignocellulose degradation occurs.

This is the case for some soil-feeding higher termites, such as those from the genus *Cubitermes* (Brune and Köhl, 1996), but it is untrue for termites belonging to the *Nasutitermes* genus. Their hindguts are characterized by neutral or even slightly acidic pH values (Köhler et al., 2012), close to the pH prevailing in the bioreactors used in this study. Indeed, this observation provides a possible explanation as to why the *Nasutitermes* microbiome performed best in our experimental conditions.

In conclusion, this study demonstrated that termite gut microflora can be grown in bioreactors, using lignocellulose as the sole carbon source to produce carboxylates. Further studies should focus on deeper characterization of the enriched microbial communities and identification of the key microbial and enzymatic drivers for lignocellulose bioconversion. Moreover, it will be worthwhile to investigate how modified experimental conditions can be used to further optimize the bioconversion process in order to maximize carboxylate production.

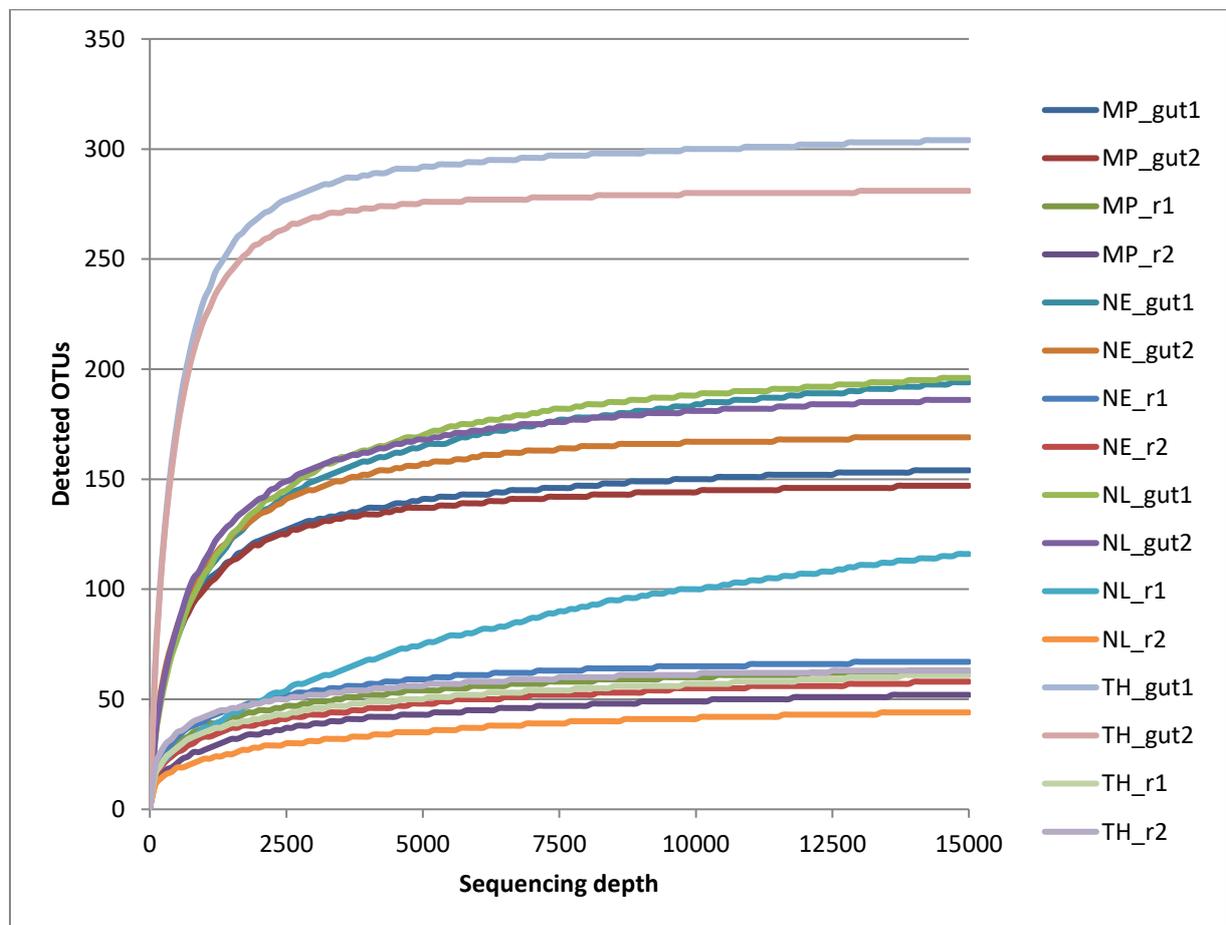
VI.2.6. Contribution and acknowledgements

LA, PhD student on this project, performed all bioreactor experiments and data interpretation. He carried out the molecular diversity analysis and drafted the manuscript. AL, PhD student in this project performed the metabolite and enzymatic activity assays; she also trained LA in the use of bioreactors. DSD contributed to termite rearing, selection and dissection. He trained LA for the termite dissection performed in this study. EM contributed to termite selection for this project. DSD and EM critically revised the manuscript. MO and GHR participate on experimental design and project conception; they critically revised the manuscript, providing important intellectual contributions. GHR is the main supervisor and MO is co-supervisor of LA and AL. As the project coordinator, GHR designed the study, and contributed at all stages. All the authors read and approved the final manuscript. This research was supported by the French National Institute for Agricultural Research (INRA) and the Region Languedoc-Roussillon Midi-Pyrénées grant 31000553. It was also supported by the Carnot Institute 3BCAR – Insyme project. The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest. The authors thank the Genomics and Transcriptomics (GeT) platform for their help with sequencing. We would like to acknowledge M. Abadie's important contribution in enzymatic analysis and G. Oekler for his help with termite-gut bioreactors. M. Bounouba and E. Mangelle are also thanked for their technical support. Toulouse White Biotechnology (TWB) is thanked for their technical support for bioreactor use.

VI.2.7. Supplementary data

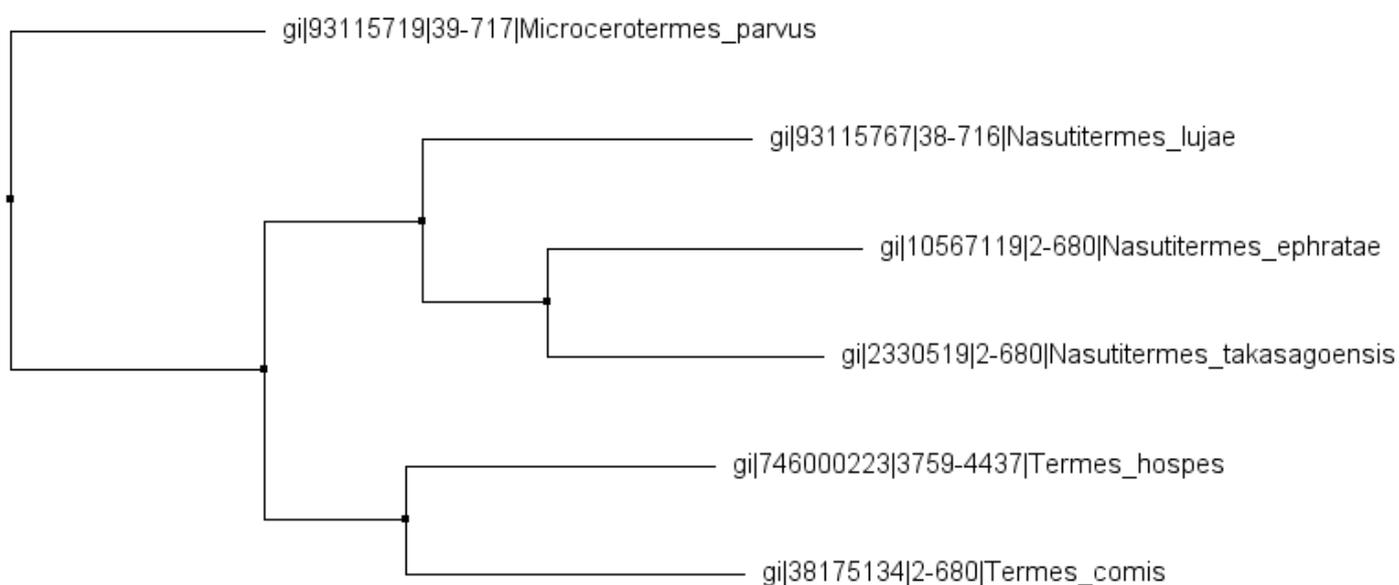
S.VI-1: Rarefaction curves of the sequenced points.

Rarefaction curves were generated with the Mothur subroutine rarefaction.single on the randomly subsampled 15 k final sequences. For all the samples but *N. lujae* r2, the number of detected OTUs reached a plateau corresponding to its observed richness, indicating that sequencing depth is sufficient to describe the community (*M. parvus*=MP, *N. ephratae*=NE, *N. lujae*=NL, *T. hospes*=TH).



S.VI-2: Phylogenetic tree of representative termite species.

Sequences corresponding to the cytochrome oxidase subunit II gene were collected from NCBI. They were aligned using Clustal Omega and used to build a neighbor-joining tree between the four termite species of this study and two species, *Termes comis* and *Nasutitermes takasagoensis*, whose microbiome were described in other studies and were very close to respectively our *T. hospes* and *N. ephratae*.



S.VI-3: Phylogenetic position of the TG3 OTUs

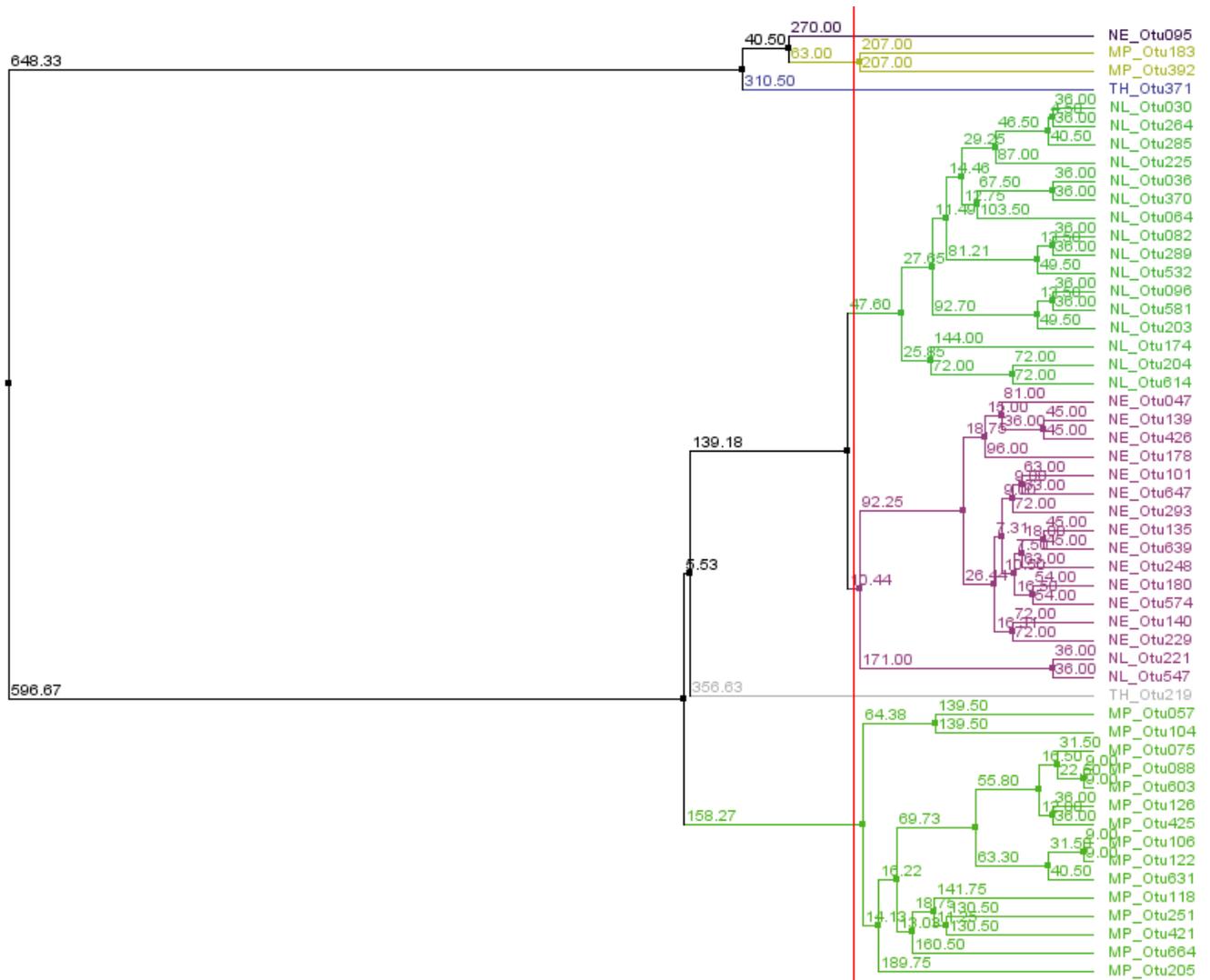


Table VI-S1: Relative abundance (%) of main phyla present in termite gut microbiomes. For each phylum, major OTU composition ($\geq 2\%$ in at least one sample) is detailed.

	<i>M. parvus</i>		<i>N. ephratae</i>		<i>N. lujae</i>		<i>T. hospes</i>	
	gut1	gut2	gut1	gut2	gut1	gut2	gut1	gut2
Bacteroidetes	4.4	4.6	5.9	8.2	3.0	5.7	14.1	16.0
<i>Dysgonomonas</i> Otu002	-	-	-	-	0.7	2.6	2.6	-
Firmicutes	1.5	1.4	6.2	6.3	3.2	2.9	45.3	46.8
uncl Lachnospiraceae Otu003	0.4	0.9	0.3	0.7	0.6	2.3	0.7	-
<i>Lactococcus</i> Otu020	-	-	-	-	-	-	15.2	14.5
Ruminococcaceae insect cluster Otu026	-	-	-	-	-	-	12.3	11.7
uncl Ruminococcaceae Otu045	-	-	-	-	-	-	6.1	6.0
uncl Ruminococcaceae Otu046	-	-	-	-	-	-	5.6	5.6
Uncultured_24 Ruminococcaceae Otu048	2.2	1.4	0.1	-	-	-	4.6	6.2
<i>Turicibacter sanguinis</i> Otu051	-	-	-	-	-	-	5.2	4.4
Proteobacteria	1.9	2.3	1.6	2.2	3.5	2.7	11.9	10.8
<i>Escherichia-Shigella</i> Otu031	0.7	5.6	0.9	1.2	0.6	8.6	0.3	-
uncl Myxococcales Otu041	-	-	-	-	-	-	27.4	26.7
Fibrobacteres	15.2	7.4	20.3	8.8	1.7	0.7	0.5	0.4
<i>Fibrobacteres</i> termite subcluster Ib Otu017	-	-	66.1	59.9	-	-	-	-
<i>Fibrobacteres</i> termite subcluster Ia Otu032	34.3	34.5	-	-	-	-	-	-
<i>Fibrobacteres</i> termite subcluster Ia Otu033	34.3	34.5	-	-	-	-	-	-
<i>Fibrobacteres</i> termite cluster_I Otu049	-	-	15.7	20.6	-	-	-	-
<i>Fibrobacteres</i> termite subcluster Ib Otu052	-	-	14.6	15.0	-	-	-	-
<i>Fibrobacteres</i> termite subcluster_Ia Otu070	14.1	13.3	-	-	-	-	-	-
Spirochaetes	62.8	72.7	54.2	65.0	70.2	72.9	21.6	20.0
<i>Treponema_I</i> Otu006	-	-	35.3	33.1	9.5	8.4	-	-
<i>Treponema_I</i> Otu007	-	-	9.5	11.4	26.7	26.6	-	-
<i>Treponema_I</i> Otu008	33.6	34.8	-	-	-	-	-	-
<i>Treponema_I</i> Otu009	-	-	12.9	14.0	20.6	19.3	-	-
<i>Treponema_I</i> Otu011	-	-	13.9	10.8	8.6	7.3	-	-
<i>Treponema_I</i> Otu013	19.9	16.1	-	-	-	-	-	-
<i>Treponema_I</i> Otu016	16.4	16.3	-	-	-	-	-	-
<i>Treponema_Ia</i> Otu021	-	-	2.7	3.7	5.9	8.9	0.03	-
<i>Treponema_Ia</i> Otu022	-	-	10.1	12.0	-	-	-	-
<i>Treponema_I</i> Otu025	-	-	1.9	1.3	7.5	5.8	0.03	-
uncl <i>Treponema_I</i> Otu035	-	-	0.05	-	4.9	5.6	-	-
uncl <i>Treponema_I</i> Otu038	0.2	0.4	0.1	-	4.2	4.9	-	-
<i>Treponema_Ia</i> Otu039	4.6	4.9	-	-	-	-	-	-
<i>Treponema_Ia</i> Otu044	3.5	5.0	-	-	-	-	-	-
<i>Treponema_Ic</i> Otu050	-	-	-	-	3.3	3.5	-	-
uncl <i>Treponema_I</i> Otu059	-	-	-	-	-	-	9.6	7.7
<i>Treponema_Ic</i> Otu062	-	-	2.7	3.2	-	-	-	-
TG3	11.2	8.7	9.3	7.7	16.6	14.0	0.5	0.5
TG3 subcluster IIIa Otu030	-	-	0.4	-	29.6	29.8	-	-
TG3 termite cluster III Otu036	-	-	0.1	-	26.2	20.4	-	-
TG3 subcluster IIIa Otu047	-	-	30.5	30.0	-	-	-	-
Others	2.9	2.9	2.6	1.9	1.7	1.1	6.2	5.5

VI.3. Efficient carboxylate production from wheat straw by a microbial consortium derived from termite *Nasutitermes ephratae* gut microbiome

This subchapter is in preparation for publication as:

“Lazuka, A., O’Donohue, M., Hernandez-Raquet, G., 2017. Efficient carboxylate production from wheat straw by a microbial consortium derived from termite *Nasutitermes ephratae* gut microbiome.”

with the main conclusions:

A stable lignocellulolytic termite-derived consortium was successfully obtained on sterile wheat straw.

The enriched consortium degraded 45.5% lignocellulose, producing mainly carboxylates.

A strong xylanase activity correlated with lignocellulose degradation.

VI.3.1. Abstract

With about 2,600 different described species, termites are among the most abundant insects on earth and play an important role in the decomposition of plant material. Although their digestive microbiome is recognized as a potential reservoir of microorganisms producing lignocellulolytic-enzymes, the potential to enrich microbial consortia derived from termite-gut useful for the carboxylate platform or for enzyme production has not been assessed. In the present study, two termite-gut derived microbial consortia were obtained from *Nasutitermes ephratae* by sequential batch culture on raw wheat straw. In order to assess the impact of microorganisms naturally present in the raw substrate on the enrichment and maintenance of termite-gut microbiome, the enrichment process was carried out using both sterile and non-sterile wheat straw. The community enriched on sterile straw displayed higher lignocellulose degradation capacity; it displayed a high xylanase activity and an initial preference for hemicellulose degradation. This study demonstrates that it is possible to enrich and maintain a microbial consortium derived from termite-gut microbiome in controlled bioreactors, producing useful enzyme activities and carboxylates from lignocellulosic biomass.

Keywords: Lignocellulose bioconversion; anaerobic microbial consortium; termite gut microbiome; carboxylate production; xylanase; cellulase.

VI.3.2. Introduction

Lignocellulose (LC) is the major component of plant cell walls and the most abundant biomass on earth which make of LC the promising renewable carbon resource to produce energy and commodity chemicals. A survey of symbiotic lignocellulose digestion strategies in nature reveals digestive systems of herbivores, including termites, as interesting research target (Godon et al., 2013; Brune, 2014). To digest biomass, herbivores benefit on efficient microbial symbiosis which have been selected by millennial evolutionary processes (Brune, 2014). The symbiotic lignocellulolytic microorganisms present in such digestive ecosystems represent thus a tremendous potential for biorefinery applications. Selecting microbial communities from these environments, which naturally produce volatile fatty acids (VFA) as end-products instead of converting them into methane, represents an opportunity to improve the carboxylate platform. Furthermore, these microorganisms could offer a wide range of natural glycosyl hydrolases to be explored (Warnecke et al., 2007, Franco Cairo et al., 2011, He et al., 2013). With around 2,600 different described species, termites are among the most abundant insects on earth (Kambhampati and Eggleton, 2000). They play an important role in the decomposition of plant material and global carbon recycling (Eggleton, 2010). During the last ~150 million years, termites have developed various symbiotic strategies to digest lignocellulosic material, including highly lignified hardwood (König et al., 2013). All termite species have in common that they borne in their guts symbiotic microbes that contribute to nitrogen regulation and deliver fermentative products from biomass such as acetate, propionate and other VFA as a carbon and energy source for their host (Godon et al., 2013; Brune, 2014). In return, the symbiotic microbiome benefits from a stable environment and supply of nutrients (Breznak and Brune, 1994).

According to Bignell and Eggleton (2000), termites are subdivided into five major groups regarding their feeding habits, i) soil-feeders, ii) soil/wood interface-feeders (soil under or highly decayed wood), iii) wood-feeders, iv) litter-foragers and v) grass-feeders. Other minor feeding-groups use substrates such as lichens, algae, mosses or tree bark fungi. Moreover, some species are able to use different substrates than their usual feed, depending on ecological conditions (Donovan et al. 2001). Although the relationship between feeding habits and taxonomy is unclear, termite feeding groups are generally well recognized in termite ecology.

Termites have been classified divided into nine families with Termitidae being the largest one, regrouping almost 75% of all known termite species (Ni and Tokuda, 2013; Inward et al. 2007). Eight termite families (Mastotermitidae, Archotermitidae, Stolotermitidae, Kalotermitidae, Stylotermitidae, Hodotermitidae, Rhinotermitidae and Serritermitidae) house eukaryotic flagellates, bacteria and archaea in their hindgut and are referred to as lower termites, while the family Termitidae, referred to as higher termites, only borne bacterial and archaeal symbionts (Inward et al., 2007; Lo and Eggleton, 2011). Termites live in eusocial community and for a biorefinery purpose, the workers caste is of interest because they are responsible of feeding the colony and carry-out the most sophisticated digesting abilities. In higher termites such as the wood-feeding subfamily Nasutermitinae, which are non-fungus growing species, the digestive track can be described as a “dual cellulose digestion system” consisting of three major compartments - the fore-, mid- and hindgut (Nakashima et al., 2002). The fore- and midgut can be seen as relatively small enzymatic bioreactors where highly alkaline conditions and host-endogenous cellulases contribute to partially hydrolyse cellulose (Tokuda et al., 2012). In the following voluminous hindgut, with a rather neutral or slightly acidic environment (pH 6-7), hemicellulose and remaining cellulose are metabolized by the symbiotic microbiome (Breznak and Brune, 1994; Brune, 2014). For a long time, it was not certain if the symbionts contributed to cellulose digestion or if it was entirely done by the host itself. Though, recent investigations on *Nasutitermes* spp. showed that up to 50 % of total cellulase activity in the hindgut was not produced by the termite host but by the microbial gut content (Tokuda et al., 2007). It is at the hindgut paunch where lignocellulolytic bacteria, harbouring a rich diversity of carbohydrate active enzymes, degrade plant fibre (Warnecke *et al.*, 2007, He *et al.*, 2013). Therefore, such microbiome may offer interesting potential for lignocellulose transformation for biorefinery purposes.

To reveal the biomass degradation potential of termite gut microbiome and to identify the microbial species and enzymes involved in such process, previous studies have applied culture dependent approaches, enabling the isolation of cellulolytic and hemicellulolytic bacteria belonging to different taxa including *Bacteroides* and *Enterobacteriaceae* (Schultz and Breznak, 1978; Gupta *et al.*, 2011; Dheeran *et al.*, 2012; Azizi-Shotorkhoft et al., 2016). More recently, culture-independent omic methodologies applied to the study of termite microbiome identified a broad range of genes coding for carbohydrate active enzymes (Warnecke *et al.*, 2007, Franco Cairo *et al.*, 2011, He *et al.*, 2013).

The production of recombinant enzymes derived from termite and its microbiome has also been reported but their potential for industrial application is still subject of research (Ni and Tokuda, 2013).

In the biorefinery context, microbial consortia are of great interest for their ability to utilize raw lignocellulosic biomass synergistically to produce methane, hydrogen or carboxylates (Kleerebezem and van Loosdrecht, 2007). Efficient microbial consortia displaying desired bioconversion features could be obtained by enrichment culture technique, instead to artificially mixing known microorganisms (Haruta et al., 2002; Cheng et al., 2009). By such enrichment approach, several studies reported the selection of efficient cellulolytic microbial consortia using different sources of inoculum, including microorganisms from soils (Feng *et al.*, 2011, Gao *et al.*, 2014, Zhou *et al.*, 2014, Jimenez *et al.*, 2014, de Lima Brossi *et al.*, 2015), compost (Haruta *et al.*, 2002, Guo *et al.*, 2010, Wongwilaiwalin *et al.*, 2010, Lin *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2011, Reddy *et al.*, 2011) and cow rumen content (Chang *et al.*, 2010, Lazuka *et al.*, 2015). In contrast, although termite display interesting lignocellulolytic properties, the potential of enriching lignocellulolytic microbial consortia from termite-gut microbiomes has not been assessed so far.

The aim of this study was to assess *Nasutitermes ephratae* gut microbiome as a source of inoculum to enrich a lignocellulolytic consortium able to hydrolyse wheat straw to produce VFA. The microbiome of this species has previously shown its capacity to efficiently degrade wheat straw in bioreactors (Auer et al., 2017). Here, we assessed the potential to enrich and maintain such termite-gut microbiome and to enhance its lignocellulolytic capacity by sequencing batch reactor (SBR) culture under anaerobic conditions. To assess the impact of the endogenous microflora of raw substrate into the selection and maintenance of a termite gut-derived lignocellulolytic consortium, the enrichment processes was realized on sterile (SS) and non-sterile (NSS) wheat straw as sole carbon sources. The results obtained after SBR enrichment with both substrates, showed that the sterile-straw enabled a better maintenance of the consortium with a higher lignocellulolytic activity compared to the non-sterile condition. The consortium enriched on sterile substrate showed preferential hemicellulose degradation at early incubation times, accompanied by an increased xylanase activity.

VI.3.3. Materials and methods

VI.3.3.1. Lignocellulosic substrate and inoculum

20 kg of wheat straw from the winter wheat variety Koreli were harvested and milled to 2 mm as described by Lazuka et al. (2015). This raw substrate is referred to as raw no-sterile straw (NSS). One kg of this milled straw was autoclaved under dry conditions (120°C, 20 min, 1.1 bar) and is thereafter referred to as sterile straw (SS).

The initial termite-gut inoculum (500 dissected guts) from *Nasutitermes ephratae* was provided by the IRD (Institute for Research and Development, Bondy, France). It was used to inoculate a first anaerobic bioreactor containing water-autoclaved wheat straw (120°C, 15 min, 1.1 bar) as sole carbon source, as described by Auer et al. (2016). At the end of the incubation period (20 days), the culture obtained from *N. ephratae* gut microbiome was snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. This stored inoculum is thereafter referred to as termite-derived microbiome (TM).

VI.3.3.2. Enrichment of termite-derived microbiome in anaerobic bioreactors

Microbial cultures were carried out in anaerobic bioreactors (2L BIOSTAT® A+, Sartorius, Germany) using a mineral medium (MM) and wheat straw as the sole carbon source (20g.L⁻¹) according to the conditions detailed by Lazuka et al. (2015). Briefly, MM contained per liter of distilled water: KH₂PO₄, 0.45g, K₂HPO₄, 0.45g; NH₄Cl, 0.4g; NaCl, 0.9g; MgCl₂.6H₂O, 0.15g; CaCl₂.2H₂O, 0.09g. MM was supplemented with 250µL of V7 vitamin solution (Pfennig and Trüper, 1992), and 1mL trace elements solution, containing per liter of distilled water: H₃BO₃, 300 mg; FeSO₄.7H₂O, 1.1 g; CoCl₂.6H₂O, 190 mg; MnCl₂.4H₂O, 50 mg; ZnCl₂, 42 mg; NiCl₂.6H₂O, 24 mg; NaMoO₄.2H₂O, 18 mg; CuCl₂.2H₂O, 2 mg; sterilized by filtration (0.2 µm). Reactors were run at constant temperature (35°C) and pH (6.15); this last was controlled by alkali addition (1M NaOH).

To progressively enrich LC-degrading microbial consortia, two parallel batch bioreactors were inoculated (10% v/v) with *N. ephratae* TM (thawed overnight at 4°C) and fed with SS or NSS as sole carbon source. These two reactors, representing the first enrichment cycle (SS C1 and NSS C1), were operated until VFA reached a stable concentration.

Thereafter, the next cycles of enrichment were incubated for 11 days for both SS and NSS substrates. To produce duplicate experiments on both substrate, after this first cycle of enrichment, two parallel bioreactors were inoculated (10% v/v) with the culture obtained from C1 cycle with the respective substrate (two reactors SS C2 and two reactors NSS C2). The following cycles were inoculated with 10% v/v of the previous cycle obtained with the respective substrate (duplicate enrichment for both SS and NSS). In this manner, SBR cultures were performed until VFA reached a stable concentration. After five cycles of enrichment, samples (200mL) of the final termite-enriched consortia obtained on sterile and non-sterile straw were snap-frozen under liquid nitrogen and stored at -80°C.

To characterize the dynamic of LC degradation by the best performing enrichment (presently corresponding to that obtained on sterile straw), samples of this consortium were thawed overnight at 4°C and used as inocula for further experiments. Deeply characterization of LC degradation by this consortium was performed in biological duplicate bioreactors incubated for eleven days in similar conditions as described above. In order to assess the impact of enrichment on LC degradation, the kinetic behavior of this enrichment was compared to that observed on the first SBR cycle (SS C1).

VI.3.3.3. Chemical analyses

Total solids (TS) were measured on 10 mL samples that had first been centrifuged (7,197 x g, 10 min), rinsed twice with distilled water and dried 24 h at 105°C. The mineral fraction (MF) was estimated by mineralization of the samples at 500°C for 2 h, and volatile solids (VS) were estimated from the difference between TS and MF. VS degradation was expressed as weight/weight (w/w) percentages.

Wheat straw composition (40 mg) was determined using the protocol described by Lazuka et al. (2015), based on the sulfuric acid hydrolysis method described by de Souza et al. (2013). Monomeric sugar concentration was determined by HPLC analysis following the conditions described by Monlau et al. (2012) on a Ultimate 3000 Dionex separation system equipped with a BioRad Aminex HPX 87H affinity column and a refractive index detector (Thermo Scientific).

VFA production was determined by gas chromatography (GC), using a Varian 3900 chromatograph as described by Cavallé et al. (2013). The total organic carbon (TOC) content of the liquid fraction was measured using a TOC analyzer (TOC-V_{CSN}, Shimadzu).

Gas composition was analyzed using a chromatograph HP 5890 equipped with a conductivity detector and a HAYSEP D column.

All the macro-kinetic parameters are expressed as average values obtained in duplicate biological reactors, except for the first enrichment cycle where average values were obtained from technical duplicate samples.

VI.3.3.4. Enzyme activity assays

For enzyme activity measurement, samples (5 mL) were withdrawn at regular intervals from the bioreactors. Samples were separate in a supernatant and a solid pellet, following the procedures described previously (Lazuka et al., 2015). It was assumed that the supernatant contains extracellular enzymes, while the sonicated pellet represents cell-bound enzymes. For each bioreactor and each sampling time, end-point enzymatic activities were measured in technical duplicates in both the extracellular and cell-bound fractions. Enzymatic activities were expressed as average values obtained on duplicate bioreactors.

Xylanase and endoglucanase (CMCase) activities were measured using 1% w/v xylan beechwood (Sigma) and 1% w/v carboxymethyl cellulose (CMC) (Sigma) in the conditions described in Lazuka et al. (2015). One unit of CMCase or xylanase activity (UA, unit of activity) was defined as the amount of enzyme that produces 1 μmol of reducing sugars per minute.

VI.3.4. Results and discussion

VI.3.4.1. Enrichment of termite-derived microbiome on sterile and non-sterile wheat straw

To enhance the hydrolytic capacity of the termite-derived microbiome (TM) of *Nasutitermes ephratae*, it was submitted to SBR enrichment on both sterile (SS) and non-sterile (NSS) raw wheat straw. SBR enrichment method has been previously used to successfully select the more efficient lignocellulose degrading microorganisms (Cheng et al., 2009; Feng et al., 2011; Lazuka et al., 2015). As TM was produced initially on sterile substrate, in order to assess the impact of non-sterile substrate on its lignocellulose degradation activity, the first cycle of enrichment (C1) in both SS and NSS wheat straw was kinetically characterized analyzing the substrate degradation, carboxylate production and major enzyme activities (Figure VI-6).

An important difference between sterile and non-sterile substrate was the behavior during the early phase of incubation. Indeed, after 3 days of incubation, a significantly higher substrate degradation was observed on C1 SS ($25.8 \pm 3.7\%$ VS) than in C1 NSS ($14.1 \pm 3.4\%$ VS) (Figure VI-6a).

During the same period, a concomitant higher VFA production was observed on SS (95.2 ± 1.9 mCmol VFA.L⁻¹) compared to NSS (68.2 ± 8.5 mCmol VFA.L⁻¹) (Figure V-1b). At the end of incubation, wheat straw degradation (VS) was still higher for SS than NSS whereas VFA production was similar for both substrates (1a-b). As no other metabolites than VFA were detected in the fermentation broth (TOC measurements, data not shown), this difference can reasonably be explained by the significantly higher CO₂ production observed on sterile substrate compared to the non-sterile wheat straw (55.8 ± 2.8 and 75.3 ± 3.8 mCmol CO₂.L⁻¹ for C1 NSS and C1 SS, respectively; Figure VI-6b).

The two major lignocellulolytic enzyme activities, xylanase and CMCcase, displayed different profiles according to the substrate tested (Figures 6c and VI-6d). Interestingly, in sterile substrate, xylanase activity peaked at days 4, achieving 2.3 ± 0.21 UA.mL⁻¹, while for NSS xylanase activity peaked later, on days 5 with a maximal value 30% lower than that observed on SS (1.6 ± 0.05 UA.mL⁻¹). After the peaking, xylanase activity decreased in both substrates but the drop was more sharply on NSS, down to 0.90 ± 0.05 UA.mL⁻¹ while the activity stayed about 2.0 ± 0.11 UA.mL⁻¹ on SS.

Similarly, the maximum CMCcase activity was higher and occurred earlier for SS (0.06 ± 0.003 UA.mL⁻¹, day 3) compared to NSS (0.05 ± 0.005 UA.mL⁻¹, day 6). In contrast to xylanase profiles, CMCcase activities in both substrates kept levels around their respective maximal values until the end of incubation.

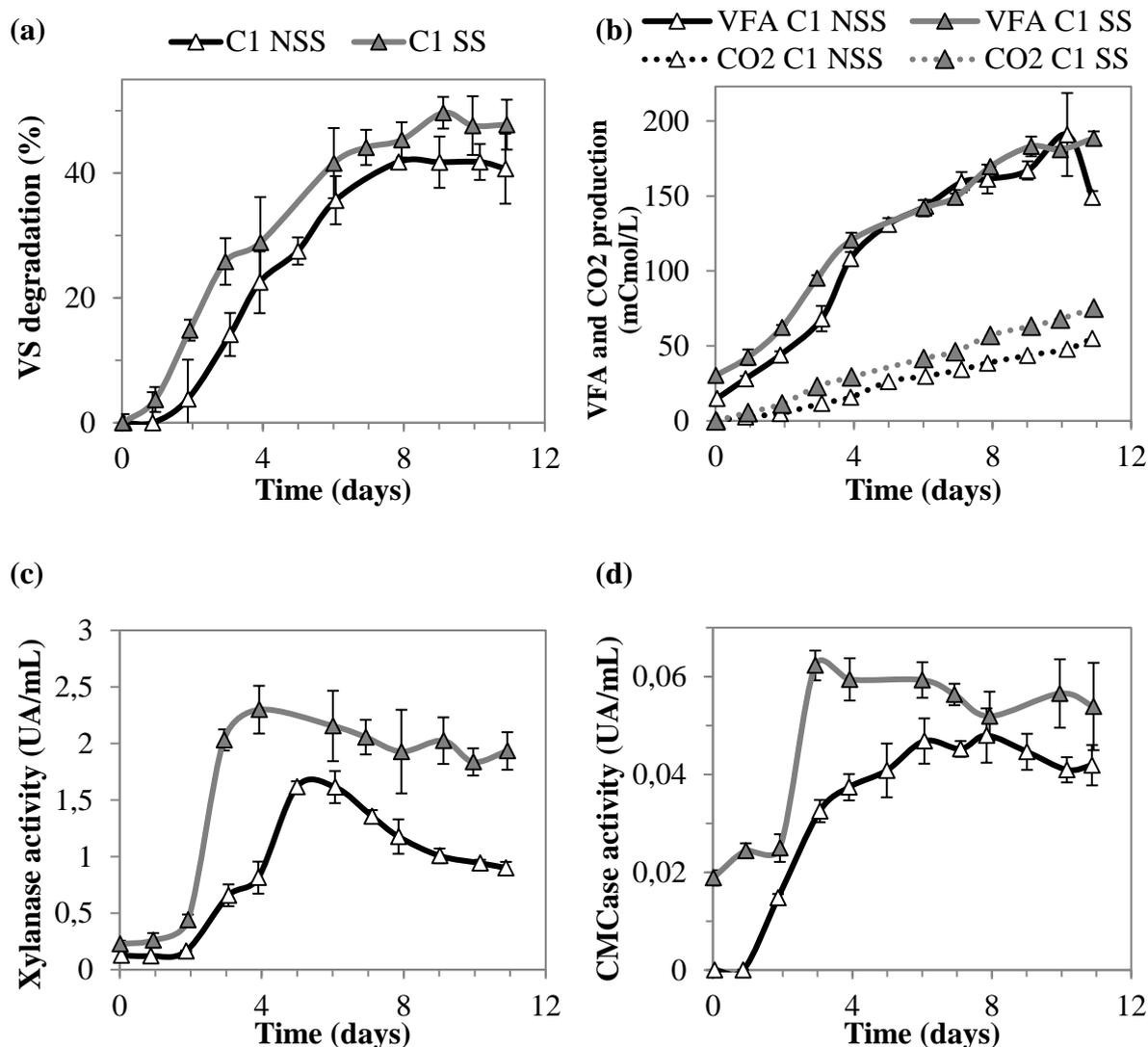


Figure VI-6: Characterization of the first cycle of enrichment (C1) of TM on SS and NSS. a) VS degradation, b) VFA production, c) xylanase and d) CMCCase activities.

The first cycle of TM enrichment on raw wheat straw displayed thus a high lignocellulose degradation capacity of $40.7 \pm 4.0\%$ and $47.4 \pm 5.0\%$ of VS for NSS and SS, respectively. The VFA production followed a similar trend with about $2.3 \text{ g C-VFA.L}^{-1}$ for both substrates. These degradation capacities revealed a real LC degradation potential of termite-derived microbiome which could be enhanced by enrichment process.

Throughout the enrichment process, however, it appeared that when it was carrier-out on NSS, a decline of the initial TM lignocellulolytic capacity was observed from the first cycle of enrichment (Figure 7).

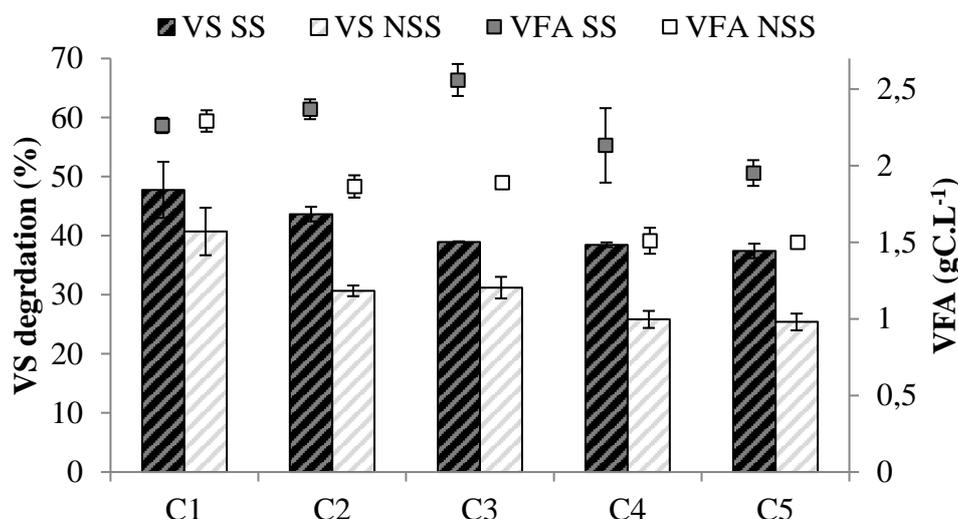


Figure VI-7: Effect of substrate sterility on wheat straw degradation (VS) and carboxylate production (VFA) during the enrichment process of termite derived-microbiome. SS and NSS indicate sterile and non-sterile substrate, respectively.

Indeed, in the subsequent cycles of enrichment on non-sterile wheat straw, although a reasonable good lignocellulose degradation capacity was observed in the first cycle, it drastically dropped to 30.7 ± 0.9 % (w/w) after the second SBR cycle (Figure VI-7, C2). Concomitantly, VFA production decreased by 20%, dropping to $1.86 \text{ gC-VFA.L}^{-1}$. At the end of SBR enrichment process on NSS, VS degradation and VFA production displayed a loss of a third of their respective initial values.

A different behavior was observed when TM was enriched on sterile wheat straw. From the first cycle of enrichment, lignocellulose degradation on SS was slightly higher to than observed in NSS (Figure VI-7). After five cycles of enrichment on SS, 38 % VS degradation and about 2 gC.L^{-1} of VFA production were observed, representing higher values than on NSS. Thus, although a slight decrease on TM performances was observed during SBR enrichment on SS, a stable behavior was kept during the last three cycles, maintaining a high level of lignocellulolytic activity. Indeed, the final termite-enriched consortium obtained on sterile wheat straw (hereafter called TWS) presented 80% of the initial LC degradation activity and 86% of the initial VFA production level measured on TM.

In SBR enrichment process, bacterial selection is based on microbial growth capacity, selecting those microorganisms able to grow faster under defined conditions, and here, using wheat straw as sole carbon source.

It is possible that with NSS, the endogenous wheat straw microflora exerted a strongest pressure on termite-derived microbiome preventing its establishment in the bioreactors. The loss of degradation capacities observed along SBR enrichment on NSS could result from the low xylanase activity observed in the first SBR cycle as well as on modifications occurred in the microbial community diversity, as suggested by Reddy et al. (2011) and Lazuka et al. (2015). These authors reported strong changes in microbial diversity in the first steps of the enrichment process. It could be hypothesized that during the first SBR cycle on NSS, wheat straw endogenous bacteria could have consumed easily metabolizable substrates, potentially provided by TM inoculum or released from the initial substrate, leading to the selection of wheat straw endogenous bacteria at the expenses of ligno(hemi)cellulolytic microorganisms present in TM. It resulted on a lower TM growth and thus on a loss of its degradation capacity in the following enrichment cycles. Additional data on the microbial diversity could be very useful to validate such hypothesis.

Taken together, these results suggest that avoiding competition with substrate endogenous microflora, by using sterile wheat straw, enabled to stabilize a TWS consortium displaying good lignocellulose degradation and VFA production performances.

In a previous study on a cellulose degrading community H-C derived from soil, Feng et al., (2011) reported that the sterilization of the lignocellulosic substrate had little effect on lignocellulose degradation rate (corn stover powder, 40 mesh=375 μ m). The authors observed a degradation of 52.8% and 50.8% with, respectively, autoclaved and non-autoclaved corn stover. Compared to our study, these contrasting results could be explained by the fact that, in Feng's study, the enrichment procedure was performed only on sterile substrate (autoclaved filter paper); the activity of the enriched H-C community on non-sterile corn stover was only tested at the end of the enrichment processes. Otherwise, the LC degradation and VFA production observed on the final TWS consortium were similar and sometimes higher than those reported in previous studies using non-sterile raw lignocellulosic substrates. For example, using a rumen fluid inoculum, Chang *et al.* (2010) observed 11% degradation of raw napiergrass. Another study reported degradation levels of 47.7, 43.8 and 43.3% on, respectively, switchgrass, corn stover and wheat straw using a soil inoculum incubated under aerobic conditions but with no VFA production (De Lima Brossi et al., 2015). Using an inoculum enriched from soil incubated at 40°C under static conditions (not strict- anaerobic), Feng et al., (2011) reported 51% degradation of raw corn powder (40 mesh).

However, such degradation was accompanied by a low VFA production, probably due to the non-strict anaerobic conditions applied. With XDC-2 microbial consortium enriched from compost, Hui *et al.*, (2013) measured 39.6% degradation of rice straw, 25.2% of wheat straw and 17.6 % of corn stalk. More recently, Sheng *et al.* (2016) enriched a microbial consortium derived from *Halotrichia parallela* (dark black chafer) that degraded in 3 days about 83 % of NaOH-pretreated rice straw but metabolite production was not assessed. It is thus difficult to compare LC degradation performances and VFA production between different studies due to the different experimental conditions applied (type and size of substrate, substrate pretreatment, aerobic/anaerobic conditions, incubation temperature). Moreover, most of the previous studies were designed for enzyme production and the carboxylate production was frequently not determined. Nevertheless, the high LC degradation and VFA production levels observed in our study strongly support the interest in exploring insect microbiota enrichment procedure for lignocellulose bioconversion purposes.

To the author's knowledge, this is the first study generating a stable community derived from termite *Nasutitermes ephratae* gut microbiome presenting high degradation capacities of raw wheat straw under strict anaerobic conditions, favorable for carboxylate production. This enriched and stabilized community derived from termite microbiome (TWS) was further submitted to a deeply kinetic-characterization.

VI.3.4.2. Characterization of wheat straw termite-enriched microbiome TWS

The kinetic behaviour of TWS was investigated considering substrate degradation, carboxylate production, and major enzyme activities. To assess the benefit of the enrichment process, TWS data was compared to that obtained during the first cycle of enrichment on sterile straw (C1 SS; Figure VI-8). The stabilized community TWS achieved 41.8 ± 2.9 % VS degradation and a production of 179.3 ± 3.1 mCmol VFA.L⁻¹ in 11 incubation days; the corresponding values measured in C1 SS were slightly higher, with 47.8 ± 4.7 % VS degradation and a VFA production of 188.6 ± 4.5 mCmol VFA.L⁻¹ (Figure VI-8a and VI-8b). The main difference between C1 SS and TWS was the dynamic during the first days of incubation, when the enriched consortium TWS displayed higher lignocellulose degradation and VFA production rates compared to C1 SS. Indeed, substrate degradation at day 2 represented 14.8 ± 1.8 % VS degradation for C1 SS while TWS already achieved 30.4 ± 3.7 % VS.

Similarly, TWS displayed a higher VFA production during the first days of incubation compared to C1 SS (158.0 ± 1.5 mCmol VFA.L⁻¹ vs 120.6 ± 3.2 mCmol VFA.L⁻¹ on day four, respectively).

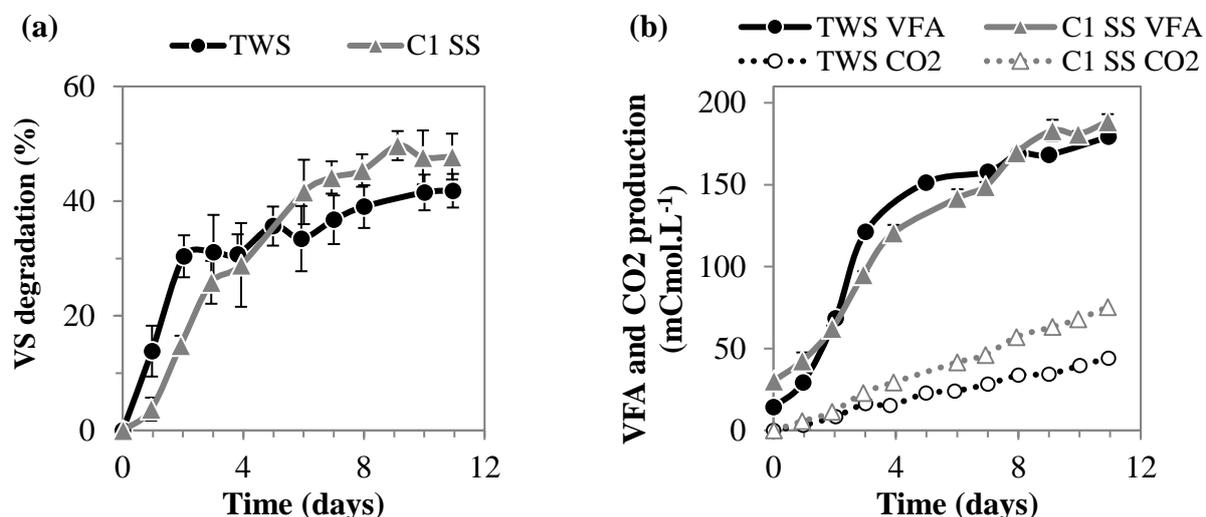


Figure VI-8: Comparing lignocellulose degradation and metabolites production by TWS and C1 SS. a) VS degradation and b) VFA and CO₂ production.

TWS displayed also a higher capacity to remove hemicellulose compared to C1 SS while cellulose degradation was similar for both C1 SS and TWS communities (Figure VI-9).

Indeed, TWS displayed at day 2, the double hemicellulose degradation (43.0 ± 4.7 %) compared to C1 SS (24.9 ± 3.9 %) (Figure VI-9b). TWS displayed thus a maximal hemicellulose degradation rate of about 29.6 % Cmol.L⁻¹.day⁻¹ on day 1 whereas in C1 SS it reached about half of this value in two days (17.0 % Cmol.L⁻¹.day⁻¹) (Figure VI-9d). In other terms, after the enrichment process TWS hemicellulose degradation was faster and occurred sooner. Concerning cellulose degradation, although C1 SS and TWS displayed a similar global trend, some slight differences were observed during the early phase of incubation. A higher cellulose degradation rate was measured for TWS (10.6 % Cmol.L⁻¹.day⁻¹) than for C1 SS (8.3 % Cmol.L⁻¹.day⁻¹), both occurring on day 3 (Figure VI-9c).

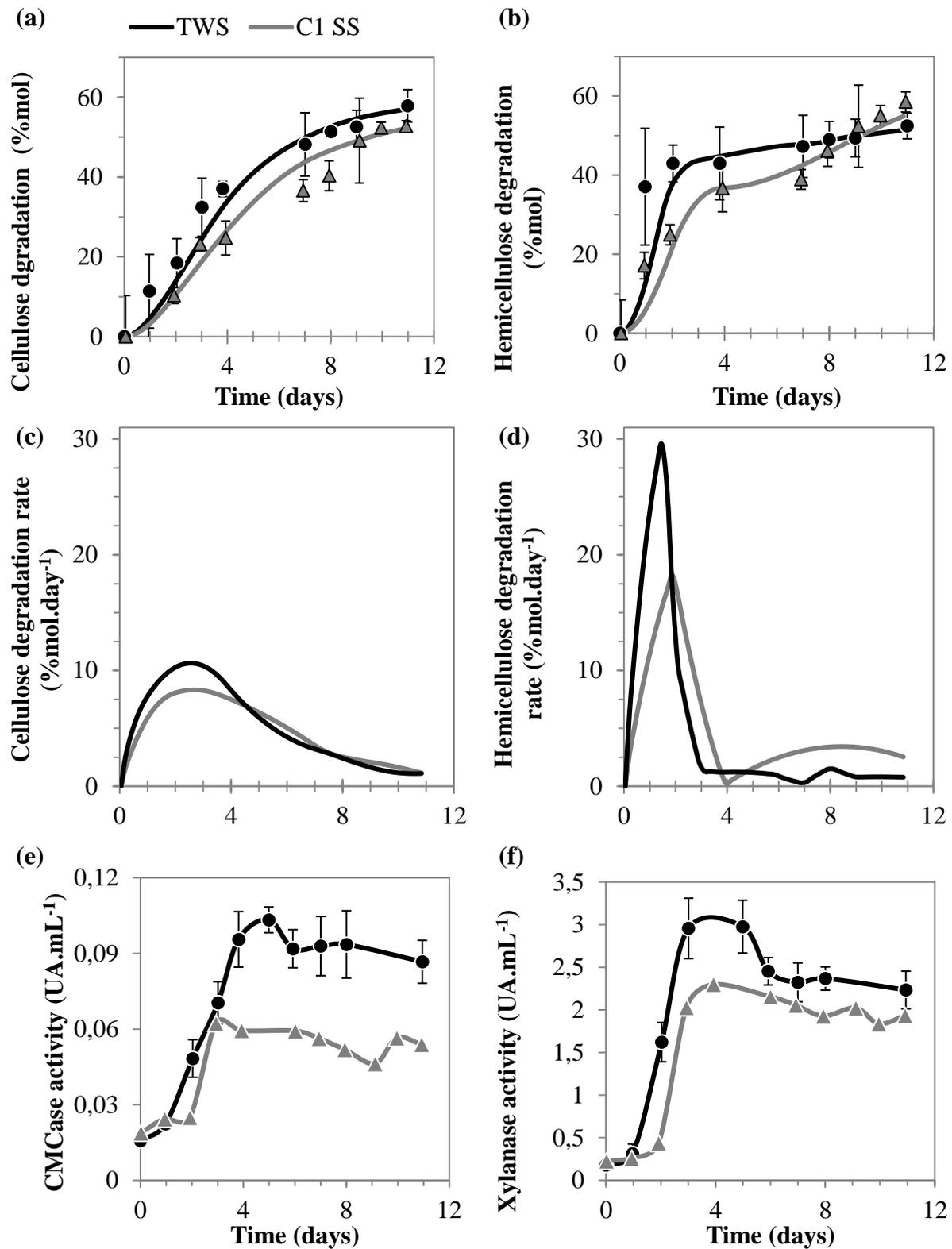


Figure VI-9: Comparison of TWS and C1 SS activity on cellulose and hemicellulose fractions of wheat straw. a) cellulose and b) hemicellulose degradation; c) cellulose and d) hemicellulose degradation rate, and e) CMCase and f) xylanase activities.

Compared to hemicellulose, cellulose degradation on day 2 reached 10.3 ± 2.0 % (% Cmol) for C1 SS and 18.4 ± 6.1 % for TWS which represent 80% increase on the activity (Figure VI-9a and VI-9b). From these results, it appeared that cellulose and hemicellulose were not concomitantly degraded by both communities. At the beginning of the incubation, before or after the enrichment, hemicellulose was preferentially hydrolyzed than cellulose, but the hemicellulose degradation rate dropped rapidly after day 4, while the cellulose degradation rate decreased progressively until day 10 (Figure VI-9a to VI-9d). This observation is even more pronounced and amplified for TWS community compared to C1 SS.

The profile of major enzyme activities can be compared to cellulose and hemicellulose degradation kinetics (Figure VI-9e and VI-9f). CMCcase (endoglucanase activity) and xylanase profiles presented a similar three-phase shape constituted by a short lag phase, followed by a sharp increase to the peak of activity and finally, a slow decrease of activity. The maximal values achieved for CMCcase activity were of 0.063 ± 0.003 UA.mL⁻¹ on day 3 for C1 SS and 0.103 ± 0.005 UA.mL⁻¹ on day 5 for TWS. Xylanase activity presented maximal values of 2.291 ± 0.211 UA.mL⁻¹ on day 4 for C1 SS while TWS reached earlier (day 3) a higher level of activity (2.956 ± 0.355 UA.mL⁻¹). Surprisingly, the increase on CMCcase activity was not correlated with a higher cellulose degradation rate. Indeed, although cellulose degradation peaked concomitantly to an increase in CMCcase activity for both C1 SS and TWS kinetics, the higher CMCcase activity observed on TWS after enrichment was not correlated to a higher cellulose degradation rate. Nonetheless, it reflects the enhanced ability of TWS to produce CMC active enzymes. In contrast, the high initial hemicellulose degradation rates observed in both C1 SS and TWS communities were concomitant to an increase in xylanase activity. Moreover, in TWS a higher initial hemicellulose degradation rate was accompanied by a higher xylanase activity. That suggests that a higher hemicellulose degradation rate was linked to an increase on enzyme production. Such increase in hemicellulose degradation performances observed in TWS appeared to be one of the main benefits of the enrichment process on the termite-derived microbiome.

It's worth mentioning that dry sterilization could have acted as a thermal pretreatment impacting lignocellulose structure and degradability, particularly in its hemicellulose fraction. Fengel and Weneger (1984) suggested that LC thermal reactivity depends on its composition; as wheat straw has low-lignin content, it might be sensitively modified by sterilization.

Furthermore, it is known that thermal treatments above 150°C mostly solubilize hemicellulose and weaken lignin (Garrote et al., 1999; Hendriks and Zeeman, 2009). In this study, sterilization was carried out at a lower temperature (121°C), but it cannot be excluded that it could favor the preferential hemicellulose degradation at the early incubation time. Nevertheless, it is clear that such stronger hemicellulose degradation was enhanced by the enrichment process of which favored the xylanase activity. Similar preferential hemicellulose degradation and its correlation with an increase of xylanase activity were reported by Guo et al. (2009) on an enriched consortium XDC-2 originated from Chinese soil. It removed 77.1% of the hemicellulose fraction of rice straw (3 days) whereas the corresponding cellulose degradation was only of 11.2%. Hemicellulose removal by XDC-2 was concomitant to an increase in xylanase activity during the first six incubation days, reaching 8.454 U.mL⁻¹. In contrast, cellulose degradation continued to progress slowly, reaching a maximal value of 36.7% removal after 12 days despite the low CMCase activity (below 0.5 UA.mL⁻¹) measured throughout the experiment. Despite TWS degraded hemicellulose to a minor extent compared to XDC-2 consortium (52.4% vs 77.1%, respectively), TWS has the advantage of degrading also the cellulose fraction which it is the main polysaccharide in biomass. Interestingly, TWS removed 57.9% of the initial cellulose weight while CMCase activity was about a fifth of the maximum activity measured in XDC-2. This consortium XDC-2 was also tested on raw wheat straw by Hui *et al.* (2013); the authors reported 25.2% removal which is much lower than the activity displayed by TWS consortium. From an industrial point of view, another advantage of TWS is that it was enriched anaerobically. So, other than TWS produces enzymes active on both cellulose and hemicellulose fractions of wheat straw, TWS produce VFAs and it not need any aeration.

In previous studies realized by our group, a high lignocellulose degradation and VFA production were reported for rumen-derived microbial consortium RWS, which was enriched anaerobically on non-sterile raw wheat straw (Lazuka *et al.*, 2015; Lazuka *et al.*, 2017). RWS produced the highest xylanase (1.2 UA.mL⁻¹) and CMCase (0.05 UA.mL⁻¹) activities when NaOH pretreated straw was used as substrate. However, such levels were lower to than observed here with TWS using unpretreated wheat straw (with respective maximal values of 2.9 UA.mL⁻¹ and 0.05 UA. mL⁻¹). Consistently, the TWS displayed a higher hemicellulose degradation rate (29.6 % per day) than RWS (14.6% per day). These results strongly suggest that TWS is a better purveyor of xylanase and, to a lesser extent, CMC degrading enzymes compared to RWS.

The knowledge about the hindgut microbiome of higher termites is still relatively limited. However, recent metagenomic studies suggest that *Nasutitermes* spp. microbiome harbour more microbial hemicellulases than cellulases (Warnecke et al., 2007). Genes encoding lignolytic enzymes have not been identified on termite gut bacteria (Ni and Tokoda, 2013). This information obtained from metagenomics data are in agreement with the enzymatic activities observed in our bioreactors which suggest that the main lignocellulolytic potential of termite microbiome was expressed in the conditions imposed in our bioreactors. Nevertheless, further characterisation by metaproteomic approaches could be very helpful in determining the main protein players in TWS consortium derived from *Nasutitermes ephratae*.

VI.3.5. Conclusions

Although it was not feasible to enrich *Nasutitermes ephratae* termite-gut microbiome in anaerobic SBR bioreactor using raw non-sterile substrate, we successfully enriched and stabilized a lignocellulolytic community TWS on sterile wheat straw. This microbial consortium efficiently degraded 42% of raw lignocellulosic substrate within 12 incubation days and presented an initial preference for hemicellulose. Wheat straw was mainly converted into VFA. Along enrichment, xylanase and, to lesser extent, CMCase activities were increased, depicting TWS as an interesting reservoir of lignocellulolytic enzymes.

VI.3.6. Acknowledgment

This research was supported by the French National Agency for Energy and Environment (ADEME), the Carnot Institute 3BCAR and the INRA Metascreen project.

M. Abadie, M. Bounouba and E. Mangelles are acknowledged for their assistance with experiments and technical support.

VI.4. Conclusions du chapitre

Parmi les quatre espèces de termites supérieurs testées en un cycle de fermentation de paille de blé en conditions d'anaérobiose aseptique, les trois ayant un régime alimentaire à base de bois affichaient des capacités de dégradation intéressantes. Au niveau microbien, ces trois espèces présentaient un profil bactérien initial dominé par des Spirochaetes, Fibrobacteres, et TG3, qui disparaissaient quasiment complètement en 15 jours de culture pour être remplacés par des communautés dominées par des Firmicutes et Proteobacteria, parfois associées à des Bacteroidetes.

Parmi les quatre espèces de termites supérieurs testés *Nasutitermes ephratae* présentait les meilleures capacités de dégradation du substrat, atteignant 45% en 15 jours et a donc été évalué par la procédure d'enrichissement en SBR en conditions non aseptiques.

Le maintien des capacités de cette communauté n'a pas été possible sur le substrat brut. Par contre la procédure de SBR sur substrat stérilisé a permis de stabiliser la communauté à une transformation de 42% du substrat en carboxylates en 12 jours. Cette valeur de dégradation, bien que plus faible que celle observé chez RWS (55%) est néanmoins intéressante quand elle est comparée à l'activité d'autres consortia microbiens enrichis agissant sur des substrats non-prétraités.

Cette communauté nommée TWS a été caractérisée en dynamique avant et après la procédure de stabilisation, révélant la dégradation rapide des deux fractions (hémi)cellulosique du substrat. Cependant, une dégradation initiale préférentielle de la fraction hémicellulosique a été observée, cette dernière étant favorisée au cours de la procédure, et supérieure à celle de RWS.

De plus, les activités enzymatiques (notamment xylanase) étaient augmentées au cours de l'enrichissement, à des valeurs nettement supérieures à celles atteintes par RWS, faisant de TWS un meilleur pourvoyeur d'enzymes que RWS.

Chapitre VII : Structuration fonctionnelle de communautés microbiennes dérivées de rumen bovin (RWS) et de microbiote intestinal de termite (TWS)

VII.1. Introduction du chapitre

La structuration fonctionnelle des deux communautés microbiennes hyper-hydrolytiques RWS (dérivée de rumen bovin) et TWS (dérivée du microbiote intestinal de termite) a été évaluée par une approche de métaprotéomique dynamique, c'est à dire au cours de la transformation du substrat en carboxylates.

Cette approche a été réalisée en partenariat avec l'UFZ de Leipzig (Centre de Recherche Environnementale Helmholtz, Leipzig, Allemagne) et plus particulièrement avec l'équipe de métaprotéomique environnementale et de biologie des microbiomes de Nico Jehmlich, intégrée au département de biologie moléculaire des système dirigé par le Prof. Dr. Martin von Bergen. Pour caractériser la dynamique fonctionnelle des deux communautés RWS et TWS au cours de l'avancement de la dégradation du substrat, quatre temps de cinétiques ont été sélectionnés. Ces échantillons ont été traités en triplicat technique pour chacun des consortia évalués. De plus, deux réplicats biologiques de fermentation de paille de blé ont été considérés pour chaque communauté microbienne, résultant en un total de 48 échantillons analysés.

De manière générale la procédure mise en place consistait en i) l'extraction des protéines des échantillons et leur séparation sur gel, ii) leur digestion en peptides et leur purification, iii) la détermination de ces derniers par LC-MS/MS, iv) l'identification des protéines contre la base de données Uniprot-TrEMBL, v) leur analyse quantitative fonctionnelle et taxonomique contre la base de données COG (via Prophane), vi) l'annotation des modules Cazy et, finalement, vii) le traitement et l'analyse critique des données générées.

Bien qu'une large partie du travail présenté dans ce chapitre ait été effectuée dans le cadre de ce doctorat, l'analyse des données a été améliorée dans le cadre du doctorat de E. Flajollet, incluant notamment une automatisation des processus de traitement des données générées plus robuste ainsi que l'actualisation de l'annotation des modules Cazymes en partenariat avec le laboratoire d'Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB, Marseille, France).

Ce dernier chapitre de résultats apporte des éléments de compréhension de la structuration fonctionnelle et taxonomique des communautés RWS et TWS considérant l'ensemble des protéines exprimées ainsi que, plus spécifiquement, les enzymes ciblant les fractions (hémi)cellulosiques du substrat.

VII.2. Shotgun metaproteomic dynamic profiling of efficient anaerobic consortia producing carboxylates from raw wheat straw

This chapter is in preparation for publication as

“Lazuka A., Flajollet E., Jehmlich N., B. Henrissat, O’Donohue M., Hernandez-Raquet G., Dynamic profiling of efficient anaerobic consortia producing carboxylate from raw wheat straw by shotgun metaproteomics.”

VII.2.1. Abstract

Studies have shown how microbial consortia derived from natural environments, selectively enriched on lignocellulose deconstructing functions, can improve biomass degradation to produce synthons useful for industrial applications. However, the biological mechanisms behind lignocellulose transformation by microbial consortia such as microbial symbiosis and enzyme complementarity are not fully understood. Currently, meta-omics technologies and particularly metaproteomics enable studying complex microbial ecosystems providing useful knowledge on the taxonomic and functional diversity associated with lignocellulose bioconversion.

Here, we applied metaproteomics to dynamically characterize two robust lignocellulolytic microbial consortia derived from cow rumen (RWS) and termite-gut (TWS) microbiomes. Such consortia display a high capacity to transform raw wheat straw into carboxylates.

More than 8,600 proteins were identified from the two microbial consortia studied. The majority of the identified proteins were affiliated to two phyla, Bacteroidetes and, Firmicutes, irrespective the origin of microbial consortia used as inocula. The majority of proteins were related to translation, ribosomal structure and biogenesis, carbohydrate transport and metabolism and, energy production and conversion. Our data indicate that the expression of carbohydrate active enzymes (CAZymes) was dominated by members of the Bacteroidetes phyla but specific CAZymes were exclusively expressed by Firmicutes.

A focus on glycosyl hydrolases (GHs) enabled to identify GH16, 17, 3, 48, 5 and 9 as well as GH10, 11, 26, 28, 43, 51, 67 and 8 as the main enzyme families associated to cellulose and hemicellulose degradation in such consortia, respectively.

The results obtained suggest a dynamic behavior considering GH families involved in biomass degradation in accordance with enzymatic activities and biochemical characterization. Especially, our results suggest that high rate of hemicellulose transformation along TWS incubation, which was correlated to an increase in xylanase activity, was probably supported by the expression of hemicellulose targeting enzymes from families GH10, 11, 26, 28, 43, 51, 68 and 8 and CBM6,36 and 13.

Moreover, GH families 10 and 11, displaying similar functions, were mainly produced by bacteria belonging to Bacteroidetes and Firmicutes, respectively. This feature supports the hypothesis of enzymatic complementarity between these two taxonomic phyla, which could be a prerequisite for efficient LC degradation.

Keywords: Lignocellulose bioconversion; anaerobic consortium; carboxylate production; xylanase; cellulase; metaproteomics

VII.2.2. Introduction

Lignocellulose (LC) is the major component of plant cell wall (PCW), and is thus considered as the prime renewable feedstock to produce biofuels and commodity chemicals by microbial fermentation. Such route for LC valorization may contribute to overcome the fossil energy dependency and the development of bio-economy. In nature, the complex biological process to break down PCW required a large diversity of enzymes which is rarely produced by a single microbial species (Singh et al., 2014). Thus, the recycling of LC in natural ecosystems is mostly realized by complex microbial communities that have evolved to select the more efficient enzyme mixtures. Such symbiotic strategy is exploited in the digestive tract of herbivores and xylophagous animals that feed on plants. These animals digest plant material by virtue of complex microbial communities found in their digestive system, living in symbiosis with the host, providing nutrients in the form of short chain fatty acids (or carboxylates) and microbial proteins. The lignocellulolytic properties displayed by symbiotic digestive ecosystems have motivated researches to enrich such microbial ecosystems under controlled conditions in order to exploit them for lignocellulose degradation. Although several studies have shown the potential of such enriched microbial-consortia derived from digestive systems to transform biomass, little information exists on the dynamics of functional microorganisms and proteins involved in LC bioconversion processes for carboxylate production. These microorganisms could offer a wide range of natural carbohydrate-active enzymes (CAZymes) and glycoside hydrolases (GHs) to be explored, with potentially improved synergistic/complementary activities (Rubin, 2008).

CAZYmes gather all the known protein motifs of enzymes that degrade, modify or create glycosidic bonds and thus including plant cell wall degrading enzymes (Ospina-Giraldo et al., 2010). CAZYmes have been classified into 6 classes (namely, GHs, glycosyl transferases – GTs, carbohydrate esterases – CE, polysaccharide lyases – PL and auxiliary activities – AA) and their appended non-catalytic carbohydrate-binding modules (CBM). GHs are a widespread group of modular enzymes that hydrolyse or rearrange glycosidic linkage between two or more carbohydrates or between a carbohydrate and a non-carbohydrate moiety. Based on the CAZY database (accessed in July 2017), GH family include glycosidases and transglycosidases and constitute 145 protein families that are responsible for the hydrolysis and/or transglycosylation of glycosidic bonds (Henrissat, 1991, Cantarel et al., 2008).

GTs are responsible for the biosynthesis of glycosidic bonds from phospho-activated sugar donors (Coutinho et al., 1999, Cantarel et al., 2008) and form 105 families. CEs remove ester-based modifications present in mono-, oligo- and polysaccharides and thereby facilitate the action of GHs on complex polysaccharides (Cantarel et al., 2008). CE family forms 16 families. PLs cleave the glycosidic bonds of uronic acid-containing polysaccharides by a β -elimination mechanism and form 27 families. The recently created AA class groups together the families of lytic polysaccharide mono-oxygenases (LPMO) and redox enzymes involved in lignin breakdown (Levasseur et al., 2013) and forms 13 families. CBM are protein fragments (or domains) that have no enzymatic activity per se but are known to potentiate the activity of many enzyme activities by targeting and promoting a prolonged interaction with the substrate (Cantarel et al., 2008). Currently, CBM class has been divided in 81 families.

Regarding the complex taxonomic and functional diversity of microbial communities, and the extremely limited number of cultivable microorganisms (Amann et al., 1995), meta-omics are required to explore the functional community structure, aiming in discovering microbial symbiosis and enzymatic synergism features.

Metagenomics have provided genetic information on the metabolic and hydrolytic potential of natural and derived-digestive microbial communities (Hess et al., 2011; Pope et al., 2012; Brulc et al., 2009; Toyoda et al., 2009; Warnecke et al., 2007, Singh et al., 2014). However, the genetic identification of enzyme-coding genes do not inform about the effective translation into proteins, neither about the effective role of these genes regarding the community functioning. Thus, the mechanisms behind lignocellulose degradation in microbial consortia derived from digestive tracts are currently not fully understood (Brulc et al., 2009; Toyoda et al., 2009). Metaproteomics is defined as the large-scale characterization of the entire protein component of microbial communities at a given time (Wilmes and Bond, 2004). This approach offers the possibility to explore microbial communities at the protein level, considering the expression of their genomic potential and linking proteins to specific microorganisms. Metaproteomics may also help in filling gaps of knowledge between genomic annotation and functional characterization (Rosnow et al., 2016). Furthermore, this promising technique provides both taxonomic and functional information that may reveal microbial symbiotic cooperation, potentially responsible for the high efficiency for PCW degradation observed in digestive-derived microbial consortia.

In previous studies (Lazuka et al., 2015; Auer et al., 2017), we reported the construction of two bacterial consortia, the first derived from cow rumen (RWS) and the second, from the gut microbiome of *Nasutitermes ephratae* (TWS). RWS and TWS were enriched by sequential batch reactor process using raw (RWS) and sterile (TWS) wheat straw as sole carbon source, generating stable and robust lignocellulolytic consortia. These consortia have shown their high lignocellulolytic activity and high capacity to produce carboxylates from raw (unpretreated) wheat straw. The kinetic characteristics of these consortia were established based on lignocellulose degradation, major enzyme activities and carboxylate production. In the current study, we expanded our previous work by focusing on meta-barcoding profiling (based on sequencing data of the 16S rRNA gene) and metaproteomic analysis of these two lignocellulolytic microbial consortia enriched on wheat straw. Shotgun metaproteomic analysis was applied to different sampling times throughout wheat straw degradation by RWS and TWS in anaerobic batch bioreactors. Our aim was to correlate metaproteomic information with taxonomic diversity assessed by 16S rRNA gene meta-barcoding, enzymatic activities measured throughout LC degradation and, the overall biomass transformation profiles displayed by RWS and TWS.

In this work, insights in enzyme activities, proteins and diversity will be discussed, providing better understanding of LC deconstruction by microbial consortia, uncovering the functional role of the major microbial players and revealing interesting complementary enzymatic features.

VII.2.3. Materials and methods

VII.2.3.1. Anaerobic reactor, lignocellulosic substrate and inoculum

The lignocellulolytic microbial communities derived from cow rumen (RWS) and termite-gut (TWS) enriched in anaerobic batch reactors (2L BIOSTAT® A+, Sartorius, Germany) were used as inoculum for lignocellulose degradation experiments. Bioreactors were carried out using a mineral medium containing wheat straw (variety Koreli, milled to 2 mm) as the sole carbon source (20g.L⁻¹). The experimental conditions were described by Lazuka et al. (2015, 2018).

The kinetic behavior of these consortia has earlier been described in detail (Lazuka et al., 2015; 2018).

To explore the temporal dynamics of microorganisms and expressed proteins in RWS and TWS consortia along lignocellulose deconstruction, 16S rRNA meta-barcoding and metaproteomics analysis were performed on four time-points of each biological replicate bioreactor. The criteria for time point selection were based on lignocellulose degradation level and enzyme activity profiles (Table VII-1). T1 points represented the initial time and describe a phase of low enzyme activities and early LC degradation, T2 and T3 points corresponded to the beginning and end of the maximal enzyme activity and LC degradation rates. Finally, T4 points displayed a final phase, characterized by wheat straw degradation rate as well as enzyme activities stabilization.

Table VII-1: RWS and TWS sample characteristics

	%Deg (%DM)	Xylanase (mUA/L)	CMCase (mUA/L)
RWS C1* T1	7.6 ± 7.1	174.6 ± 22.8	20.4 ± 1.6
RWS C2* T1	10.1 ± 3.2	158.4 ± 17.3	16.2 ± 1.6
RWS C1 T2	14.2 ± 0.5	543.0 ± 18.1	37.9 ± 2.7
RWS C2 T2	20.5 ± 5.4	369.8 ± 19.1	29.4 ± 1.7
RWS C1 T3	33.2 ± 3.1	852.3 ± 48.3	40.2 ± 1.7
RWS C2 T3	36.6 ± 1.2	865.4 ± 17.9	50.5 ± 0.6
RWS C1 T4	40.7 ± 1.5	879.6 ± 40.9	36.2 ± 6.5
RWS C2 T4	45.6 ± 3.8	937.5 ± 58.0	38.3 ± 4.5
TWS C1 T1	11.3 ± 4.5	297.9 ± 167.4	27.5 ± 1.4
TWS C2 T1	16.3 ± 4.4	327.9 ± 56.7	17.2 ± 3.3
TWS C1 T2	30.7 ± 3.5	2561.4 ± 292.3	95.6 ± 11.0
TWS C2 T2	31.1 ± 6.5	2955.7 ± 355.0	70.4 ± 8.4
TWS C1 T3	34.6 ± 3.3	2467.8 ± 251.2	103.9 ± 7.4
TWS C2 T3	38.9 ± 5.2	2177.5 ± 204.3	82.0 ± 16.1
TWS C1 T4	46.2 ± 3.1	2070.5 ± 187.6	92.3 ± 8.9
TWS C2 T4	45.0 ± 3.1	1477.8 ± 129.5	60.2 ± 3.4

*C1 and C2 correspond to different biological replicate bioreactors.

VII.2.3.2. Enzyme activity assays

For enzyme activity measurement, triplicate reactor samples (5 mL) were removed at regular intervals and separate in two fractions, a supernatant and a sonicated solid pellet (separation and sonication were described in Lazuka et al., 2015).

It was assumed that the supernatant contains extracellular enzymes, while the sonicated pellet is representative of cell-bound enzymes. For each reactor and each sampling time, end point enzymatic activities were measured in technical duplicates in both the extracellular and cell-bound fractions. Enzymatic activities were expressed as average values obtained on triplicate reactors.

Xylanase and endoglucanase (CMCase) activities were measured using 1% w/v xylan beechwood (Sigma) and 1% w/v carboxymethyl cellulose (CMC) (Sigma) in the conditions already described in Lazuka et al. (2015). One unit of CMCase or xylanase activity (UA, unit of activity) was defined as the amount of enzyme that produces 1 μmol of reducing sugars per minute.

VII.2.3.3. Analysis of microbial diversity

Bacterial diversity analysis was performed on 1.5mL samples on the pellet fraction (13,000 x g, 5 min, 4°C) after simultaneous DNA/RNA extraction followed by DNA purification as described in Lazuka et al. (2015).

16S rRNA microbial diversity was analyzed by MiSeq Illumina sequencing, performed by the GenoToul Genomics and Transcriptomics facility (Auzerville, France) using the conditions and primers already described in Auer et al. (2018). Joined-pair reads (56,000 reads per sample, minimum 30,224) were pre-processed and filtered for chimeras using a Mothur pipeline (Schloss et al., 2009). Operational taxonomic units (OTU; 97% similarity) were defined using a random subsample of 15,000 sequences per sample using Mothur default parameters, and OTUs that were less than 10 sequences across all samples were filtered. OTUs were taxonomically classified using Mothur and LTPs115 SSU database. Comparative analysis of samples was performed on a random subsample of 10,000 high quality sequences per sample.

VII.2.3.4. Metaproteomics analysis

VII.2.3.4.1 Protein extraction and purification

Protein extraction was carried out using phenol buffer as solvent and following the adapted procedure dedicated to extraction of complex sediment samples (Lin et al., 2016).

For each biological replicate sample, 3 technical replicates were collected from the bioreactors and stored at -80°C. For protein extraction, 3 mL of homogeneous frozen sample were suspended in 5 mL of SDS buffer (SDS 1.25%, DTT 20 mM, Tris-HCl 0.1 M pH 6.8).

The mixture was then placed in a rotary shaker (140 rpm, 1 h, 20°C). After soft ultra-sonication on ice (2 x 40 sec with 1 min break – MS 72 probe, power 40 %) and centrifugation (7,197 g, 10 min, 4°C), the supernatant was mixed with liquid phenol (10 g phenol in 1 mL water) and shaken (100 rpm, 15 min, 20°C). Afterwards, the aqueous/organic phases were separated by centrifugation (7,197 g, 10 min, 4°C) and the previous step was repeated. After centrifugation, the proteins in the organic phase were precipitated overnight with fivefold volume of 0.1 M ammonium acetate dissolved in methanol at -20°C. The samples were then centrifuged (7,197 g, 20 min, 4°C) and protein pellets were successively washed in 1 mL ice-cold methanol and twice with 1 ml ice-cold acetone, each washing step including vortex and subsequent centrifugation (12,000 g, 10 min, 4°C). Finally, samples were dried in a laminar flow hood, before sample preparation for SDS-PAGE separation.

To separate the extracted proteins, dried pellets were dissolved in 100 µL buffer (2% w/v SDS, 2 mM beta-mercaptoethanol, 4% v/v glycerol, 40 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.01% w/v bromophenol blue), heated at 90°C for 5 min. Then 10 µL of this mixture were loaded on SDS-PAGE (4% stacking gel, 12% separating gel) with molecular weight standards (Bio-rad). Electrophoresis was performed at 20 mA until migration of 1 cm into the gel (approximately 30-40 min). Afterwards, the PAGE gel was stained with Coomassie brilliant blue G-250 (Merck) before each lane was cut into small squares (~ 1mm²) and transferred into 0.5 mL Eppendorf tubes.

VII.2.3.4.2 Protein digestion and purification

For each sample, the pool of gel pieces was destained three times in 200 µL of 10 mM ammonium bicarbonate in water/acetonitrile (60/40 v/v) solution, following by last washing with 200 µL of acetonitrile and incubating at room temperature for 5 min under shaking at 600 rpm. The pools were dried using a Speed-Vac centrifuge for 5 min, and the protein lysates were reduced (60 µL of 10 mM dithiothreitol (DTT) solution at 600 rpm for 30 min at room temperature) and alkylated (60 µL of 100 mM iodoacetamide (IAA) solution, incubation under agitation at 600 rpm for 30 minutes at room temperature in the dark). After that, each sample was washed first with 200 µL of acetonitrile solution (5 min, room temperature, 600 rpm), then with 10 mM ammonium bicarbonate (10 min, room temperature, 600 rpm) and finally washed with 200 µL of acetonitrile (5 min, room temperature, 600 rpm). After dehydration with acetonitrile washing the gel pieces were then dried using a Speed-Vac.

Trypsin proteolysis (Promega, Madison, WI, USA) was performed on the dried gel pieces, overnight at 37°C. The gel pieces were then washed with 50µL of 5 mM ammonium bicarbonate (10 min, room temperature, 800 rpm). The liquid phase (with peptides) of each sample was collected in a new 0.5 mL Eppendorf tube. Gel pieces were washed again with 50 µL of acetonitrile/water/formic acid 85% (50/44/0.06 v/v/v) and the liquid phase was collected. Extracted peptides were completely dried using a Speed-Vac (180 min). Finally, the extracted protein lysates obtained from the proteolytic cleavage were desalted using ZipTip-µC18 tips (Millipore, Billerica, MA, USA) with 80 % acetonitrile/0.1 % formic acid. The peptide lysates were then dried using a Speed-Vac and reconstituted in 0.1 % formic acid before being analyzed by LC-MS.

VII.2.3.4.3. Liquid chromatography mass spectrometry analysis

The peptide lysates were separated on a UHPLC system (Ultimate 3000, Dionex/Thermo Fisher Scientific, Idstein, Germany). In total, 5 µL samples were first loaded for 5 min on the precolumn (µ-precursor, Acclaim PepMap, 75 µm inner diameter, 2 cm, C18, Thermo Scientific) at 4% mobile phase B (80% acetonitrile in nanopure water with 0.08% formic acid), 96% mobile phase A (nanopure water with 0.1% formic acid), then eluted from the analytical column (PepMap Acclaim C18 LC Column, 25 cm, 3 µm particle size, Thermo Scientific) over a 150 min non-linear gradient of mobile phase B (4-55% B).

Mass spectrometry was performed on a Q Exactive HF MS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with a TriVersa NanoMate (Advion, Ltd., Harlow, UK) source in LC chip coupling mode. The MS was set on loop count of 20 using for MS/MS scans with higher energy collision dissociation (HCD) at normalized collision energy of 30%. MS scans were measured at a resolution of 120,000 in the scan range of 350-1,600 m/z. MS ion count target was set to 3×10⁶ at an injection time of 80 ms. Ions for MS/MS scans were isolated in the quadrupole with an isolation window of 1.6 Da and were measured with a resolution of 15,000 in the scan range of 200-2,000 m/z. The dynamic exclusion duration was set to 30 s with a 10 ppm tolerance. Automatic gain control target was set to 2×10⁵ with an injection time of 120 ms using the underfill ratio of 1% (Starke et al., 2017).

VII.2.3.4.4 Data analysis

Raw MS/MS data obtained were processed for database searches with Proteome Discoverer software (v1.4.1.14; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). MS/MS spectra acquired were searched with Sequest HT against the Uniprot-TrEMBL database (available release of April, 6th 2016) and with the following parameters: enzyme specificity was selected as trypsin with up to two missed cleavages allowed, using 10 ppm peptide ion tolerance and 0.05 Da MS/MS tolerances. Oxidation at methionines and carbamylation at lysines and arginines were selected as the variable modifications and carbamidomethylation at cysteines as the static modification. Only peptides with a false discovery rate (FDR) below 1% calculated by Percolator (Käll et al., 2007), and a peptide rank of one were considered as identified.

Each dataset (RWS and TWS separately) was filtered according to high peptide confidence and only the differentiable and distinct protein groups (for simplicity, protein groups are thereafter referred to as proteins) were kept for the following analysis. The open-access ProPhane® pipeline was used to find both taxonomic classification, based on NCBI and BlastP, and functional prediction of Cluster of Orthologous Groups (COG) categorization based on RPSBLAST (Schneider et al., 2011). Only identified protein groups were kept for further analysis. For each replicate, the normalized spectral abundance factor (NSAF) was considered to compensate protein length bias (Paoletti et al., 2006). Proteins were then filtered by keeping only those present in at least two of the three time-point replicates. In other terms, proteins present in only one of the three replicates were considered as false positive and suppressed, while remaining proteins were expressed as mean values. Duplicate biological reactors were then pooled according to time-point samples to produce average and standard deviation values for each protein, resulting in eight functional profiles describing the four time-points for both consortia. To gather more information about the composition and function of the metaproteome, identified proteins were assigned to CAZyme families using the annotation pipeline used for the day-to-day updates of the CAZy database as described previously (Svartström et al., 2017). The ultimate data processing was conducted under R, where heatmaps and barplots were constructed using the ggplot2 package (v.2.2.1) and principal component analyses were performed using mixOmics package (v.6.3.1).

VII.2.4. Results

VII.2.4.1. Overview of taxonomic and functional profiles of RWS and TWS throughout wheat straw degradation

VII.2.4.1.1 Taxonomic and functional diversity along wheat straw degradation by RWS and TWS

For the two inocula, four sampling times from two biological duplicate bioreactors were analysed using 16S rRNA gene meta-barcoding and metaproteomics approach. 16S rRNA gene sequencing of RWS and TWS samples generated more than 1,000,000 high quality sequences presenting the expected length. Rarefying samples to 10,000 sequences (each) enable to cover most of the microbial diversity as estimated by rarefaction curves (Supp data S VII-1). Regarding protein data, the number of proteins found in each bioreactor (Table VII-2) were similar, irrespective of the consortium or the time point considered (from 2,887 to 3,642), suggesting a similar coverage for all samples.

Diversity index and richness were calculated for 16S rRNA gene sequencing, revealing high taxonomic diversity in both consortia (Table VII-2). Nonetheless, regarding taxonomic diversity TWS was more simplified than RWS, displaying lower richness, Simpson and Shannon indexes (until 122 and 163 OTUs, averaged Simpson of 0.60 and 0.82 and Shannon of 1.8 and 2.6 for TWS and RWS, respectively). The richness of functional diversity (considering all proteins) was closer between the two consortia and achieved very high values of about 3,000 proteins per sampling time while Simpson and Shannon indexes approaching values of 1 and 7.5, respectively. This observation obviously results from the fact that in metaproteomics data describe a very large and diverse set of proteins (at both taxonomic and functional levels) from microorganisms present in the community.

Table VII-2: Diversity of species (OTUs) and proteins detected in RWS and TWS samples

	Taxonomic diversity			Functional diversity				
	16S rRNA gene sequencing			metaproteomics data				
	Richness (OTUs)	Simpson index	Shannon index	Richness (from 8653 proteins)		Simpson index	Shannon index	
RWS C1 T1	149	0.878	2.91	2433	3279	5586	0.999	7.24
RWS C2 T1	151	0.807	2.60	2087			0.999	7.17
RWS C1 T2	156	0.819	2.56	2713	3642	5586	0.998	7.35
RWS C2 T2	162	0.806	2.62	2213			0.998	7.19
RWS C1 T3	163	0.765	2.29	2409	3107	5586	0.999	7.18
RWS C2 T3	160	0.844	2.66	1849			0.999	7.08
RWS C1 T4	157	0.828	2.66	2074	3056	5586	0.999	7.07
RWS C2 T4	157	0.830	2.70	2152			0.999	7.21
TWS C1 T1	96	0.649	1.96	2513	3433	4993	0.999	7.32
TWS C2 T1	91	0.660	1.88	2952			0.999	7.47
TWS C1 T2	91	0.523	1.44	2544	3103	4993	0.999	7.28
TWS C2 T2	91	0.675	1.75	2570			0.999	7.32
TWS C1 T3	117	0.520	1.62	2408	3014	4993	0.999	7.24
TWS C2 T3	111	0.624	1.79	2356			0.999	7.25
TWS C1 T4	116	0.513	1.63	2207	2887	4993	0.999	7.17
TWS C2 T4	122	0.663	1.99	2282			0.999	7.21

The two consortia also present similar number of expressed proteins (5,586 and 4,993 for RWS and TWS, respectively), having in common only 22% (1,925) of the total proteins detected in the dataset (8,653), while about 35% (3,068) and 42% (3,571) of proteins were specific to the termite-derived (TWS) and rumen-derived (RWS) consortium, respectively. Regarding the proteins shared between the different time points, the four samples of RWS shared 28% proteins (1,570) while 35% (1,762) of proteins were common to the different samples of TWS (Supp data S VII-2). This observation suggests higher difference between the protein make-up of the two consortia than within their temporal profiles, which is consistent with the drastically different enzyme activities (especially for xylanase) observed for each consortium (Table VII-1).

The number of proteins observed in this study is relatively high compared to previous studies focused on lignocellulolytic microbial communities. For instance, in the supernatant of a corn stover-adapted microbial consortium EMSD5, Zhu et al. (2016) detected 255 identified proteins while Alessi et al. (2017) identified 723 and 1,624 proteins during the degradation of, respectively, wheat and rice straw (triplicate biological samples) by microbial communities originating from compost. Similarly, Aylward et al. (2012) identified a low number of proteins (653) in leaf-cutter ant fungus gardens material. A larger number of proteins (4,148) was detected by D'haeseleer et al. (2013) in a thermophilic compost-derived consortium adapted to deconstruct switchgrass (JP-9), using a sample fractionation method (supernatant, suspended and attached proteins). In this last study, 55% of the identified proteins (2,293) were common to the different fractions (55% - 2,293 proteins). From a pure culture of *P. radiata* fungus grown on spruce wood, Kuuskeri et al. (2016) revealed 1,356 identified proteins. In the previous study, similar amounts of identified proteins were found according to five time-points of cultivation (1,009-1,151) and many of the total proteins (61% - 823) were common to the time-points studied.

VII.2.4.1.2. Functional and taxonomic structure of RWS and TWS microbial communities along wheat straw degradation

Clustering all proteins detected in RWS and TWS, based on Euclidean distances and ward.D2 algorithm, separated first, the two consortia and then, the four sampling points (Figure VII-1a). It confirms that the distance between the two consortia was higher than between the different time points of each consortium. Moreover, the different sampling times clustered according to LC degradation progression for each consortium. Indeed, RWS T3 and T4, displaying high LC degradation (>30% VS) and enzymatic activities (>800 mUA/mL xylanase and >40 mUA/mL CMCase) were closer to each other than to T1 and T2, which showed lower LC degradation and enzymatic activity levels. A similar behavior was observed for TWS, where T2, T3 and T4 clustered together but not with T1. This last sampling time displaying the lower LC degradation and enzymatic activity levels compared to the other three time-points (Table VII-1). Thus, the two consortia as well as their corresponding temporal samples revealed differences in their protein distribution according to LC degradation and enzyme activity levels.

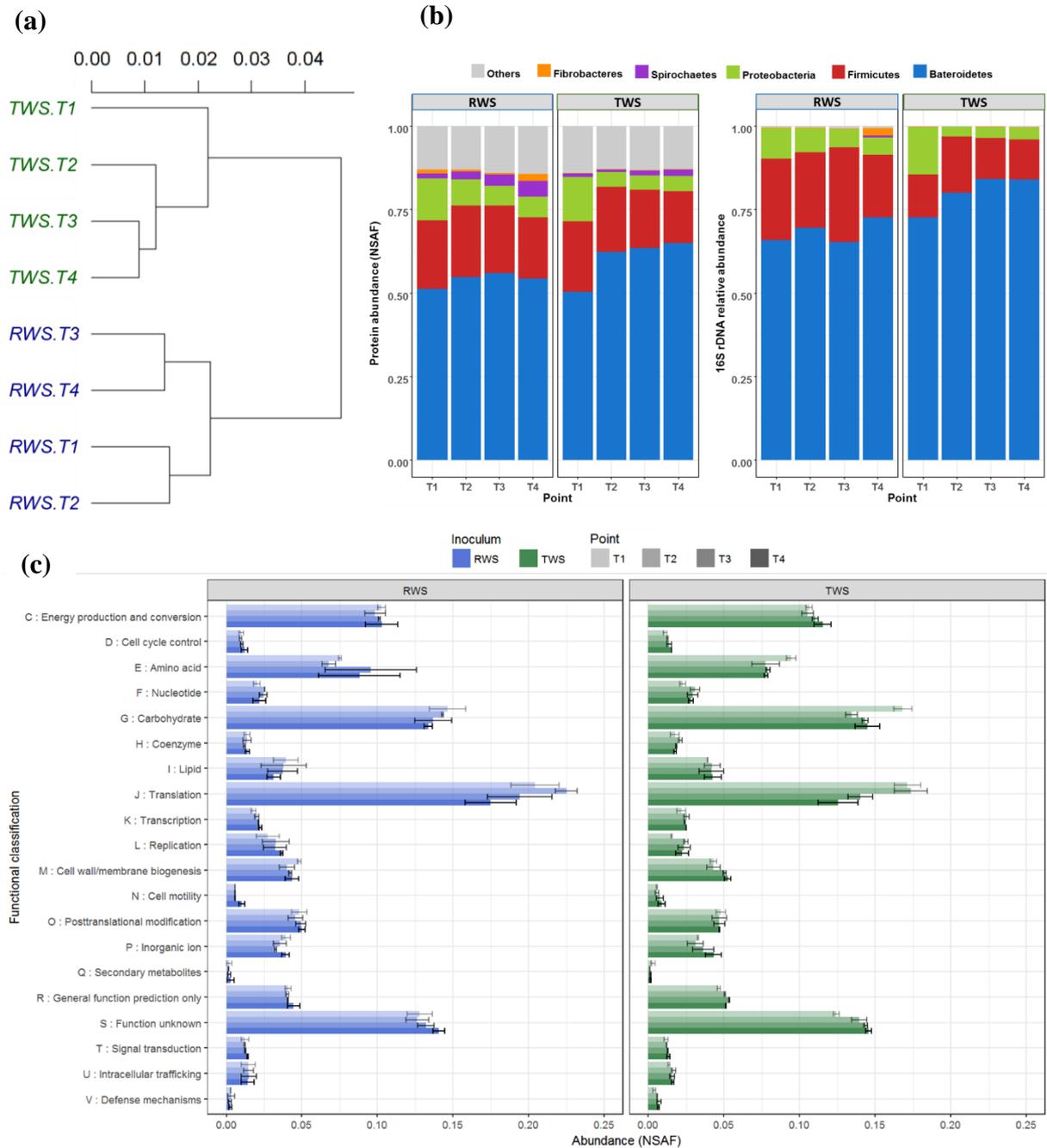
To better characterize these consortia and their temporal dynamics, functional prediction of cluster of orthologous groups (COG) based on RPSBLAST was performed using Prophané ® pipeline. COG repartition of all detected proteins revealed similar profiles irrespective of the consortia and time-points (Figure VII-1c). Despite 16.7 – 19.7 % of proteins corresponded to unknown or poorly characterized functions, the main COG functions were related to “metabolism” (42.4 – 48.3 %), “information storage and processing” (17.3 – 27.7 %) and “cellular processes and signaling” (13.1 – 16.9 %). Three sub-COG functions J, G and C, related to “translation, ribosomal structure and biogenesis” (12.5-22.5%), “carbohydrate transport and metabolism” (13.3-16.8%) and “energy production and conversion” (9.8-11.5%) were highly observed; their sum representing 38.6-46.7% of the identified proteins. Similar COG distributions have previously been reported in metaproteomic studies on cellulose-degrading (office paper) sludge (Lü et al., 2014) and for a compost-derived community degrading wheat straw (Alessi et al., 2017). The first authors reported 17.9% of proteins as having a poor COG classification while in both studies, proteins related to “metabolism” were highly represented (58.9 and 48%, respectively) followed by “cellular processes and signaling” (15.4 and 30%, respectively). The main difference with our work was on proteins related to “information storage and processing” COG, representing only 8.1% and about 15% in Lü et al., and Alessi et al. studies, respectively.

Regarding COG J, which represents protein synthesis function, it revealed a decrease for final sampling time for both consortia, as it dropped from 20.4 ± 1.6 to 17.5 ± 1.7 % for RWS and from 17.1 ± 0.8 to 12.5 ± 1.3 % for TWS T1 and T4 time-points. This result might suggest that the whole protein biosynthesis machinery of both consortia was consistently reduced when xylanase and CMCase activities as well as substrate degradation reached a plateau. However, more detailed information on the particular levels of protein expression could be needed to confirm this hypothesis.

Taxonomic information deduced from metaproteomics data showed a similar microbial composition at the phylum level to that observed by 16S rRNA gene sequencing (Figure VII-1b) for both microbial consortia and time points. Irrespective the taxonomic annotation basis (protein or 16S rRNA gene) all samples displayed Bacteroidetes, Firmicutes and to a lesser extent Proteobacteria as the most abundant phyla. Compared to 16S rRNA gene-based diversity profiles, protein-based taxonomic annotation presented a higher proportion of unclassified or heterogeneous proteins (12.8-14.2%) which can be explained by the structure of protein database.

Indeed, in community proteomics, taxonomy refers to the protein nearest common ancestor and, as some proteins or motifs are ubiquitous and highly conserved between taxa, their taxonomic affiliation cannot be deduced with accuracy. However, taxonomical protein-based profiles were similar to 16S rRNA gene-based profiles and notably Bacteroidetes (50.4–65.1%) phylum was always present in larger proportion than Firmicutes (15.4–21.4 %). Interestingly, both taxonomic annotations revealed a high content (more than 30% irrespective the inoculum and time point) of one particular species, *Bacteroidetes graminisolvens* which has previously been identified as a xylanolytic anaerobe (Nishiyama et al., 2009). The predominance of Bacteroidetes and Firmicutes is in agreement with previous studies on herbivore microbiota as well as lignocellulolytic microbial consortia (Pope et al., 2012; Singh et al., 2014; Jami et al., 2012; Wongwilaiwalin et al., 2012).

For instance, Pope et al. (2012) detected 61% of Bacteroidetes and 27% of Firmicutes in reindeer rumen using 16S rRNA gene amplicon pyrosequencing. Similar results have also been reported for cow rumen in a survey exploring bacterial community changes between 16 lactating cows (Jami et al., 2012). The authors suggest that, despite noticeable differences between individual cows, there is a core microbiome in the bovine rumen constituted by 32 genera predominantly related to Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria phyla. Comparing the metagenomes of buffalo rumen, cow rumen and termite gut microbiota Singh et al. (2014) came to the same conclusion, showing that Bacteroidetes (30-60%), Firmicutes (20-40%) and Proteobacteria (8-10%) were the predominant phyla. Considering the metagenome of the consortium BGC-1, derived from sugarcane bagasse able to degrade rice straw under facultative anoxic conditions, Wongwilaiwalin et al. (2012) reported Bacteroidetes and Firmicutes as the main phyla.



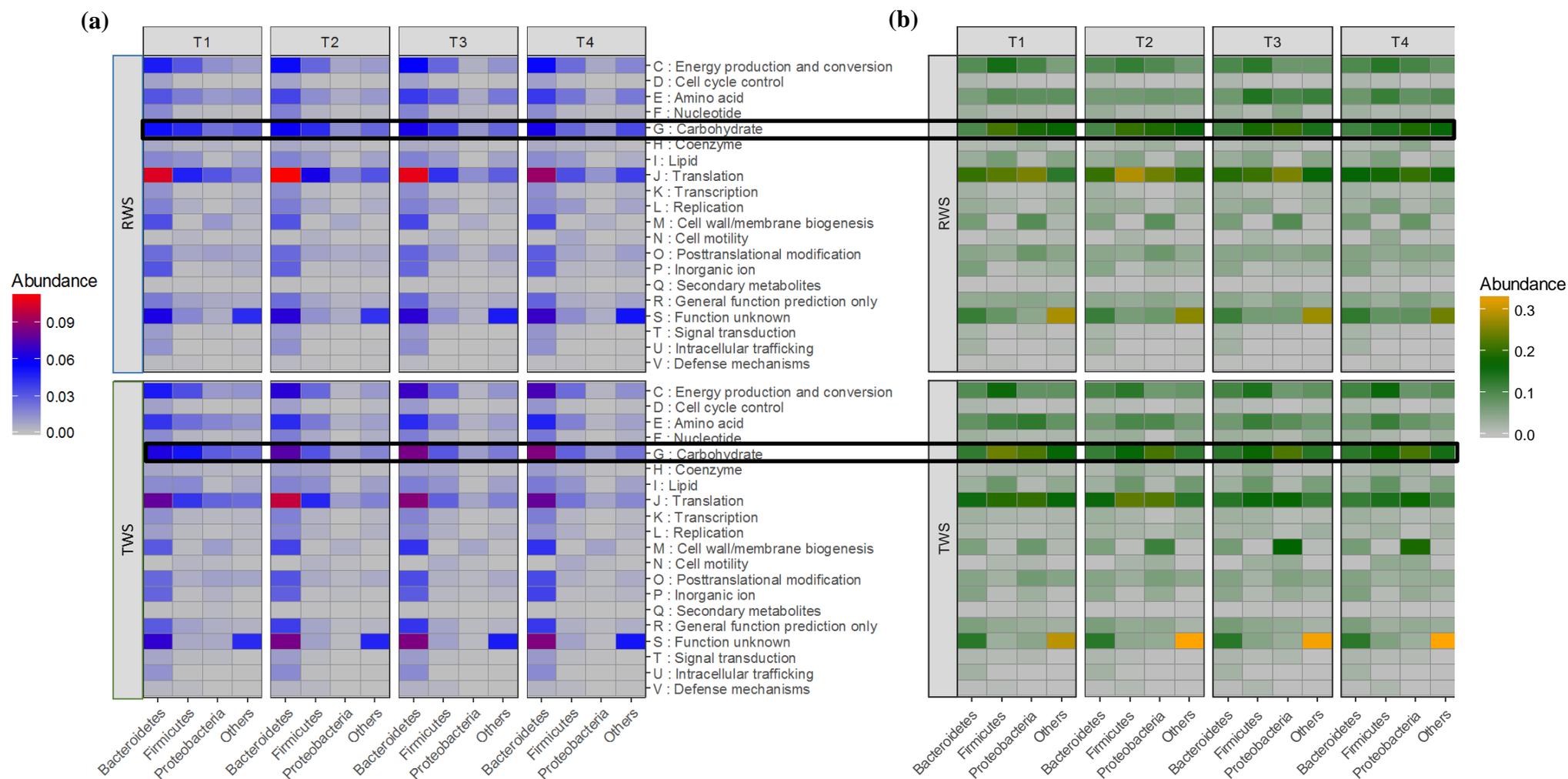
*Others group consists of low amount of *Actinobacteres*, *Tenericutes* and unclassified or heterogeneous sequences.

Figure VII-1: Overview of taxonomic and functional structure of RWS and TWS along wheat straw degradation. Sample clustering considering expressed proteins (a). 16S rDNA and proteins affiliation at the phylum level (b). Dynamic COG profiles of proteins expressed by RWS and TWS (c).

VII.2.4.1.3. Functional profiles expressed by each major taxonomic contributor

In order to identify the specific roles of each phylum, we determined the abundance profile of COG functions classified at the phylum level, for each consortium and time point (Figure VII-2a). For both RWS and TWS consortia, the heatmaps show a large representation of Bacteroidetes phylum contributing the most to the COG functions J, G and C, respectively related to “translation, ribosomal structure and biogenesis”, “carbohydrate transport and metabolism” and “energy production and conversion” as well as unknown COG functions. Firmicutes phylum presented similar COG profile but seemed to play a secondary role as it contributed in a lesser extent to the overall protein profile. From these results, it appears that irrespective the consortium and time point considered, the two main phyla expressed proteins having the same three main COG functions; but with higher expression level for Bacteroidetes than for Firmicutes. Indeed, as it was previously shown, Bacteroidetes phylum was highly represented considering both 16S rRNA or metaproteomics data; that explains its high contribution to global COG repartition at the phylum level.

To identify the main GOG function expressed by each phylum, the COG expression levels were normalized for each phylum (Fig VII-2b). Interestingly, the phylum-specific GOG profile showed that Firmicutes and Proteobacteria phyla highly expressed the COG function G, linked to carbohydrate transport and metabolism. Indeed, their specific levels of expression achieved 14.1-24.1% and 18.3-22.0%, respectively, representing higher levels than for Bacteroidetes phylum (10.1 – 13.1%). Although Bacteroidetes expressed a relatively high proportion of proteins with unknown function, taking in account only the known functions, the specific COG proportions calculated for each phylum (data not shown) also resulted in a phylum-specific prevalence of COG G in Firmicutes and Proteobacteria over Bacteroidetes phylum. Moreover, the same behavior was observed for the protein biosynthesis-related COG J, meaning that whatever the time-point and consortia, a higher phylum-specific proportion of proteins related to COG J was observed for Firmicutes and Proteobacteria than for Bacteroidetes. This result suggests that although protein expression of Firmicutes and Proteobacteria phyla was not as high as for Bacteroidetes, they should have an important role regarding carbohydrate- and protein biosynthesis-related functions as they concentrate their metabolism towards such functions.



“Others” group consists of low amount of *Actinobacteres*, *Tenericutes* and unclassified or heterogeneous sequences.

Figure VII-2: Dynamic RWS and TWS COG profiles expressed by phylum. Raw abundances (a) and taxon-specific abundances at the phylum level (b).

VII.2.4.2. RWS and TWS Cazome structure along wheat straw degradation

VII.2.4.2.1. Comparing RWS and TWS Cazome at the class-level

To differentiate the hydrolytic capacities of RWS and TWS consortia, CAZYme modules annotation was performed on the metaproteomics dataset based on the CAZY database (accessed in 2017). Among the total 8,653 proteins detected, 376 contained at least one CAZYme module, their abundance representing 3.1 to 3.4% and 4.2 to 4.7% of the protein profile for RWS and TWS, respectively (Figure VII-3).

In total, 455 CAZY modules were found as some proteins were multimodular CAZymes. For example, 61 proteins contained at least two CAZY modules. Considering that 1-3% of the proteins encoded by a typical genome correspond to CAZymes (Cantarel et al., 2008), this proportion of CAZymes is relatively high. Although protein expression cannot be directly linked to enzyme activity, the high proportion of CAZymes observed in our dataset may indicate a link with the high wheat straw degradation efficiency observed in RWS and TWS.

Every enzyme classes (auxiliary activities – AA , carboxyl esterases - CE, glycoside hydrolases - GH, glycosyltransferases – GT, polysaccharide lyase – PL) as well as some domains and modules (carbohydrate binding modules – CBM , cohesion domain – COH, dockerin module – DOC, S-layer homology domain - SLH) were detected in both consortia, but with a larger proportion of GH.

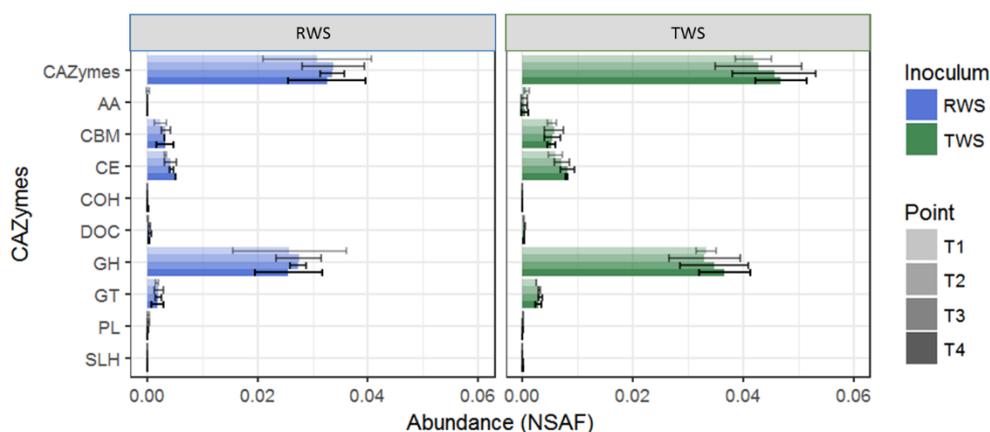


Figure VII-3: Cazymes abundance (class level) in RWS and TWS along wheat straw degradation

AA class was poorly expressed in both communities (<0.1% of identified proteins - Figure VII-3). This AA class was recently added to the CAZYmes classification to regroup enzymes involved in lignin degradation, including LPMO and lignolytic enzymes (Levasseur et al., 2013). The low level of AA class enzymes observed in RWS and TWS is in agreement with the absence of lignin degradation observed in these anaerobic consortia (Lazuka et al., 2015, Lazuka et al., 2018). However, shotgun proteomics constitutes a non-exhaustive image of the expressed proteins and only a precise physical and biochemical assessment of changes occurring in lignin structure and composition along wheat straw degradation by the consortia could ultimately confirm this hypothesis.

Whereas PL class, linked to uronic acid cleavage, was very under-represented in both RWS and TWS consortia (<0.1%) ; proteins from GT class, that were mainly assigned as glucan phosphorylases represented 0.2 and 0.3% of identified proteins for RWS and TWS, respectively (Figure VII-3). In accordance with Blackman et al. (2014) CE class was essentially composed of proteins targeting hemicellulose. This last depicted 0.5 and 0.8% proteins in RWS and TWS datasets, respectively (Figure VII- 3).

Proteins presenting CBM module accounted for respectively 0.3 and 0.5% of RWS and TWS metaproteomes (Figure VII- 3). According to CAZYPedia, the predominant role described for CBM modules is carbohydrate binding and targeting. It has been shown that this type of module synergistically enhances the activity of the adjacent catalytic domain on insoluble substrates (Gilbert et al., 2013, Herve et al., 2010, Abbott et al., 2009). In the present dataset, CBM were mainly associated to enzymes from families GH43 and GH9.

GH was the most abundant CAZY class, reaching 2.7 and 3.5% of RWS and TWS metaproteome, respectively. From these results it appears that besides TWS presented higher overall CAZYmes proportion in comparison with RWS, each class targeting (hemi)cellulose (CE, GT, CBM and GH) also displayed a higher expression in TWS, suggesting that it could be a better enzyme purveyor than RWS in the context of biomass valorization.

VII.2.4.2.2. Linking Cazome diversity to LC degradation functional activities

It's worth mentioning that each of the CAZY classes, notably GH, was diverse and depicted different families that could be associated to several enzymatic functions. Indeed, considering the number of Cazy families in the dataset, richness was relatively high for each class (Table VII-3). In comparison with the whole CAZY database (March 2018) 11/105 GT families were retrieved, as well as 9/16 CE, 18/83 CBM and 47/152 GH families. Moreover, because CAZY classification is based on protein structure, inside a family, several catalytic activities may coexist. From 2006 onward, subfamilies have been created for several families to overcome this unspecificity (Lombard et al., 2014). For instance, the α -amylase family GH13 and the hemicellulose-targeting family GH43 were divided into 35 and 37 subfamilies, respectively, which enable a better description of their substrate specificity (Stam et al., 2006, Mewis et al., 2016).

Regarding our dataset, we manually checked if the proteins composing the richest Cazy families (i.e. those presenting the highest number of proteins) present in both RWS and TWS consortia could be associated to a sole function, according to COG description obtained from the Prophan output (Table VII-3).

The richest GT families (GT4, 5 and 35) were well defined as proteins related to monosaccharide transfer, whereas the richest CE families 1, 6 and 11 were mainly linked to enterochelin esterases and thus potentially involved in iron transport. For the richest CBM families, contrasting results were observed. CBM6 was mainly defined as beta-xylosidase according to COG description, what can be explained by the assignation of these proteins as multimodular enzymes by the CAZY database, in association with GH43. CBM4 related proteins were poorly described according to COG description, only 2/8 proteins corresponded to glucan-binding domains. According to CAZY annotation, these proteins are multimodular, associated to GH9. The latter being essentially described as cellulases in CAZYpedia, we could reasonably assume they act in that respect. Note that in spite of continuous databases growing up and update, through these examples we emphasized the complexity of information retrieved in such dataset and the particular importance of double-checking against both databases and literature.

Table VII-3: Main function associated to Cazyme families presenting high number of proteins and their respective abundance in RWS and TWS

CAZY class	Protein number	Family number	Main families	Protein number	Abundance in RWS	Abundance in TWS	Main function according to COG description (protein number)
GT	41	11	GT35	19	0.10%	0.09%	glucan phosphorylase (15)
			GT4	5	0.02%	0.04%	glycosyl transferase (5)
			GT5	5	0.03%	0.10%	glycogen synthase (5)
CE	33	9	CE1	14	0.25%	0.56%	enterochelin esterase (11)
			CE6	5	0.03%	0.05%	enterochelin esterase (2)
			CE11	4	0.12%	0.14%	acetylglucosamine deacetylase (4)
CBM	61	18	CBM6	11	0.06%	0.11%	beta-xylosidase (7)
			CBM4	8	0.05%	0.09%	glucan-binding domain (2)
GH	299	47	GH43	38	0.36%	0.58%	beta-xylosidase (35)
			GH3	31	0.29%	0.35%	beta-glucosidase (26)
			GH13	22	0.17%	0.14%	multiple glycosidases (14)
			GH2	18	0.11%	0.10%	beta-galactosidase/beta-glucuronidase (11)
			GH51	17	0.31%	0.57%	alpha-L-arabinofuranosidase (15)
			GH94	15	0.05%	0.07%	cellobiose phosphorylase (12)

This was even more pronounced for GH class, which was constituted of 299 proteins and 316 modules and depicted 47 families. Proteins annotated as GH displayed a large diversity, but 48% of them were represented by GH43, GH3, GH13, GH2, GH51 and GH94 families, grouping 38, 31, 22, 18, 17 and 15 proteins, respectively (Table VII-3).

In our dataset, GH43-related proteins were mainly described as beta-xylosidase enzymes (35/38 proteins). According to Mewis et al. (2016), the main activities reported for GH43-enzymes are β -D-xylosidase (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), endo- α -L-arabinase (EC 3.2.1.99), and 1,3- β -galactosidase (EC 3.2.1.145), making this family as a pool of debranching enzymes contributing to the degradation of hemicellulose, particularly arabinoxylans, and pectin. Recently, this family was divided into 37 sub-families based on phylogenetic distances (Mewis et al., 2016) and GH43-proteins recorded in this study belonged to a large range of these subfamilies (subf. 1, 10, 11, 12, 16, 18, 19, 2, 29, 31, 35 and 7). Interestingly more than 20% of GH43-containing proteins retrieved in our dataset were modular enzymes associated to a CBM6 module, whereas in the CAZy database only 6.0% of all GH43 domain-containing proteins harbor a CBM6 module. These modular enzymes belonged to subfamilies 2, 29 and 16, which is in accordance with co-occurrence pattern reported by Mewis et al. (2016).

In this respect, for GH43, double-checking reinforces the observation obtained, but help also in highlighting the specificities of our results (i.e. enrichment in GH43-CBM6 modular enzymes) specifically defining the functions harbored in a family.

From the 22 proteins annotated as GH13 (also known as α -amylase family), 14 were classified as glycosidases, of which only 6 were specifically defined as 1,4- α -glucan branching enzymes. Nonetheless, 17 proteins belonged to different GH13-subfamilies, known to present specific activities as 1,4- α -glucan branching enzymes (subf. 8 and 9), pullulanases (subf. 14), α -amylases (subf. 19 and 28), cyclomaltodextrinases (subf. 20), glucan- and oligo 1,6- α -glucosidases (subf. 31) (Stam et al., 2006).

Moreover, ten modular enzymes were found in the subfamilies 28, 19, 8 and 9, that were in association with CBM from families 25, 26 and 48, which are known as starch binding modules (Machovic et al., 2005, Machovic & Janecek, 2008). Interestingly, taken together these enzymes should describe the whole starch degradation into glucose. However, even if such enzymes were already described in other LC-degrading communities (Zhu et al., 2016; Jimenez et al., 2015; D'haeseleer et al., 2013) the precise role of these starch-degrading proteins in wheat straw degradation by RWS and TWS remains to be clarified.

In accordance with Macdonald et al. (2015) and Hidaka et al. (2004), proteins annotated as GH3 and GH94 were exclusively non-modular enzymes, related to beta-glucosidase and cellobiose phosphorylase activities, respectively (Table VII-3); while GH2 and GH51 were mostly non-modular enzymes depicting beta-galactosidase/beta-glucuronidase and alpha-L-arabinofuranosidase activities (Table 3) as previously described (Kelil et al., 2007; Henrissat and Bairoch, 1996; Pitson et al., 1996; and Shallom et al., 2002).

The overall description of the richest CAZymes families and modules suggest that these family proteins can reasonably be grouped together to describe potential functional activities. Indeed, all the protein-richest families and modules (except GH13, which was less specific) were associated to one main potential function, which in addition, has consistently already been reported in previous studies.

Facing the complexity of describing each 47 GH family detected in this study in terms of both characterized activities and occurrence in omics studies, a comparison was performed with several meta-omics data collected in the literature (genomics, metatranscriptomics and metaproteomics). For this, we considered the accepted main activities and focused only on GH families associated to PCW degradation, generalizing GH families to their main functional activities. Table VII-4 summarizes the comparison of 20 metagenomes from diverse microbial sources, 4 metaproteomes of microbial consortia derived from compost, anaerobic digestors, soils, cow rumen and termite guts, and one metatranscriptomic study performed on termite digestive system. The 26 considered datasets (including the present study) were ordinated according to the number of GH families found, whereas GH families were split in five main functional groups and ordinated by decreasing co-occurrence into each functional group.

The first observation that can be made from this comparison is the increasing number of GH targeting the plant cell wall discovered in omics studies along time. This observation may obviously be linked to the increase of CAZy database size and number of families (Lombart et al., 2013) as well as to analytical chemistry and bioinformatic improvements in omics studies.

Chapitre VII - Structuration fonctionnelle de communautés microbiennes dérivées de rumen bovin (RWS) et de microbiote intestinal de termites (TWS)

Main function	retrieved	GH family	MG 1	MT 1	MP 1	MG 2	MG 3	MT 2	MG 4	MG 5	MG 6	MG 7	MG 8	MG 9	MP 2	MG 10	MG 11	MG 12	MG 13	MP 3	MP 4	MG 14	MG 15	MG 16	MG 17	MG 18	MG 19	MG 20	
Cellulase		GH5	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x	X	x	x	x	x	x										x
		GH9	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x	X	x	x	x				x								x
		GH16	x	x	x	x	x	x				x	x		x	x	x					x					x	x	
		GH48	x	x	x					X					x	x				x		x							
		GH44		x		x	x	x	X		x											x							
		GH45		x			x	x				x	x		X														
		GH74		x			x	x																					
		GH6								X				x															
		GH17				x	x																						
	GH7																												
Endohemicellulase		GH10	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x	X	x	x	x				x	x	x		x	x		x	
		GH26	x	x	x	x	x		X	x	x	x	x	X	x	x	x	x						x	x	x	x	x	
		GH8	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x					x	x				x			x		
		GH11	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x		X	x	X					x								
		GH28	x	x	x	x	x	x	X	x	x			X															
		GH53	x	x		x	x	x	X	x																			
		GH12	x						X					x								x		x					
Debranching enzyme		GH78	x	x		x	x		X	x	x	x	x	X		x	x	x				x	x	x	x		x		
		GH67	x	x	x	x	x	x	X		x	x		X	x							x							
		GH51	x	x	x	x	x	x	X	x					x					x		x							
		GH62				x			X				x																
		GH54									x																		

MG, MT and MP refer to metagenome, metranscriptome and metaproteome data collected in : MG1 (Zhu et al., 2016) MT1 (Marynowska et al., 2017 – four termites) MP1 (this study – in bold) MG2 (Wongwilaiwalin et al., 2013) MG3 (Warnecke et al., 2007) MT2 (Marynowska et al., 2017 – *N. ephratae* metatranscriptome) MG4 (Wang et al., 2016) MG5 (Brulc et al., 2009) MG6 (Hess et al., 2011) MG7 (Suen et al., 2010 – whale fall) MG8 (Suen et al., 2010 – Minnesota soil) MG9 (Singh et al., 2014) MP2 (Zhu et al., 2016) MG10 (Suen et al., 2010 – cow rumen) MG11 (Suen et al., 2010 – human gut Kurokawa study) MG12 (Suen et al., 2010 – human gut Gill study) MG13 (Hanreich et al., 2013) MP3 (Lü et al., 2014) MP4 (Jimenez et al., 2015) MG14 (Suen et al., 2010 – chicken cecum) MG15 (Suen et al., 2010 – fish) MG16 (Suen et al., 2010 – mouse obese) MG17 (Suen et al., 2010 – sludge USA) MG18 (Suen et al., 2010 – leaf-cutter ant fungus garden) MG19 (Suen et al., 2010 – mouse lean) MG20 (Suen et al., 2010 – sludge Australia). GH families in bold are the ones present in at least half of the considered datasets.

Table VII-4 (1/2) : Occurrence of plant cell wall degrading GH enzymes identified in several metagenomics, metatranscriptomics and metaproteomics studies

Main function	retrieved	GH family	MG 1	MT 1	MP 1	MG 2	MG 3	MT 2	MG 4	MG 5	MG 6	MG 7	MG 8	MG 9	MP 2	MG 10	MG 11	MG 12	MG 13	MP 3	MP 4	MG 14	MG 15	MG 16	MG 17	MG 18	MG 19	MG 20	
Oligosaccharide degrading enzyme		GH1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x				x	x	x		x		x	
		GH35	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X		x	x	x				x	x			x			
		GH42	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X		x	x	x				x	x			x			
		GH2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X	x		x	x	x	x			x						
		GH3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		X	x					x	x	x							
		GH39	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x											
		GH4	x	x	x				x				x	x			x	x	x			x		x	x	x		x	
		GH29	x	x	x	x	x	x	x	x	x				X						x								
		GH43	x	x	x	x	x	x	x	x						x					x		x						
		GH38	x	x	x	x	x	x	x	x	x				X														
		GH27	x	x	x								x				x	x	x										
		GH94	x	x	x				x												x	x							
		GH52				x	x			x			x	x															
		GH92	x	x	x																x								
		GH32	x		x																								
	GH117	x		x																									
Strach degrading enzyme		GH31	x	x	x			x				x	x		x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	
		GH13	x	x	x			x							x					x	x	x							

MG, MT and MP refer to metagenome, metranscriptome and metaproteome data collected in : MG1 (Zhu et al., 2016) MT1 (Marynowska et al., 2017 – four termites) MP1 (this study – in bold) MG2 (Wongwilaiwalin et al., 2013) MG3 (Warnecke et al., 2007) MT2 (Marynowska et al., 2017 – *N. ephratae* metatranscriptome) MG4 (Wang et al., 2016) MG5 (Brulc et al., 2009) MG6 (Hess et al., 2011) MG7 (Suen et al., 2010 – whale fall) MG8 (Suen et al., 2010 – Minnesota soil) MG9 (Singh et al., 2014) MP2 (Zhu et al., 2016) MG10 (Suen et al., 2010 – cow rumen) MG11 (Suen et al., 2010 – human gut Kurokawa study) MG12 (Suen et al., 2010 – human gut Gill study) MG13 (Hanreich et al., 2013) MP3 (Lü et al., 2014) MP4 (Jimenez et al., 2015) MG14 (Suen et al., 2010 – chicken cecum) MG15 (Suen et al., 2010 – fish) MG16 (Suen et al., 2010 – mouse obese) MG17 (Suen et al., 2010 – sludge USA) MG18 (Suen et al., 2010 – leaf-cutter ant fungus garden) MG19 (Suen et al., 2010 – mouse lean) MG20 (Suen et al., 2010 – sludge Australia). GH families in bold are the ones present in at least half of the considered datasets

Table VII-4 (2/2): Occurrence of plant cell wall degrading GH enzymes identified in several metagenomics, metatranscriptomics an metaproteomics studies

It's noteworthy that data were directly collected from published research papers, thus CAZy annotations were not performed simultaneously and cannot be used to ultimately compare data deepness. Nonetheless, the metaproteome obtained in this study depicted a surprising wide range of GH families targeting plant cell wall (with 28 GH families found in our dataset over the 40 retained in the literature comparison in Table VII-4). More importantly, most of these families were shared between RWS and TWS, as only 3 were specific to RWS (GH38, 17 and 117) and one to TWS (GH35), all four presenting very low abundance (<0.003%).

Moreover, 16 GH families were found in at least half of the considered datasets, thus being of particular interest. This potential core of GH families directed toward PCW degradation was distributed in the five defined degradation functions as follow: GH5, 9 and 16 in cellulase; GH10, 26, 8 and 11 in endo-hemicellulase; G78 in debranching enzyme; GH1, 35, 42, 2, 3, 39 and 4 in oligosaccharide degrading enzyme and GH31 in starch degrading enzyme function. Except from GH39 and 78, all of these hypothetical core GH families were detected in the present study in both RWS and TWS consortia.

VII.2.4.2.3. RWS and TWS cazome profile along wheat degradation

Besides CAZymes description in terms of presence/absence and number of expressed proteins, NSAF enabled considering CAZymes proportions and thus in depth and dynamic comparison between our samples. As previously discussed, most of the functionally richest CAZymes families present in the whole dataset were associated to one highly-shared potential activity and thus the proteins inside each of these families can reasonably be grouped to describe our samples. As a result, Figures VII-4a and VII-4b represent the distribution of CAZymes families and modules found in RWS and TWS throughout wheat straw degradation.

Concerning GH distribution among samples GH43, 51, 10, 3, 97, 67 and 11 were the highest expressed GH families, for both consortia (Figure VII-4a). GH43 and GH3 have been described as oligosaccharide degrading enzymes, directed toward xylobiose and cellobiose, respectively. This result is in accordance with previous studies reporting high abundance of GH3 in metagenomes (Hess et al., 2011, Singh et al., 2014; Warnecke et al., 2007 and, Wongwilaiwalin et al., 2013). Singh et al. suggested that high proportion of oligosaccharide degrading enzymes could result in high VFA production.

Abundance of all oligosaccharide degrading enzymes (GH1, 35, 42, 2, 3, 4, 29, 43, 38, 27, 94, 92, 32 and 117) accounted for more than 30% in total GH abundance for both consortia. This high expression in association with high VFA production rate (Table VII-1) strongly supports Singh et al. hypothesis.

Whereas both consortia presented similar levels of GH3, TWS depicted higher GH43 abundance than RWS, which is in accordance with Burnum et al. (2011) metaproteomics findings on higher termite *Nasutitermes corniger* hindgut.

GH51 and GH67, related to alpha-L-arabinofuranosidase and alpha-glucuronidase activities, can be regrouped as debranching enzymes. The abundance of both families was higher for TWS than RWS. Surprisingly, these GH families have not been reported in previous termite-gut metaproteomics studies (Franco Cairo et al., 2011; Burnum et al., 2011; Warnecke et al., 2007). Nevertheless, these GH families were reported in recent studies on enriched communities from compost. Zhu et al. (2016) and Alessi et al. (2017) reported the detection of GH51 while Jimenez et al. (2015) detected both GH51 and GH67. As suggested by Alessi et al. (2017), high level of CAZyme detection in lignocellulose-enriched communities could be linked to the selection in the community of microbial species (and their proteins) related to lignocellulose bioconversion which could not be detected in metaproteomic analysis of natural, non-enriched communities.

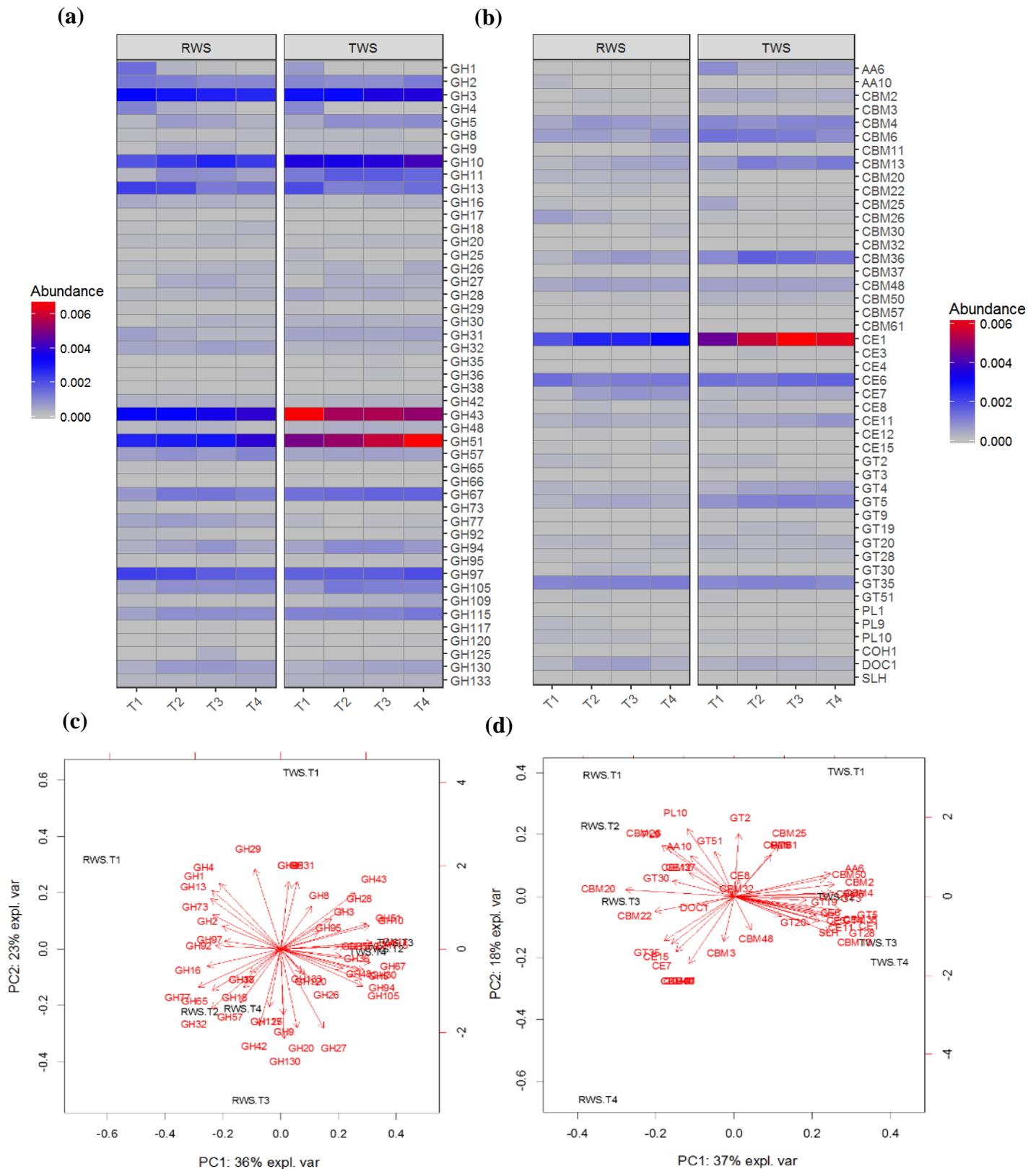


Figure VII-4: RWS and TWS cazome profile along wheat straw degradation. Abundance of GH (a) and others Cazy families (b). PCA based on abundance of GH (c) and others Cazy families (d).

GH10 and GH11 families are considered as displaying endo- β -1,4-xylanase activities. These GH families were more abundant in TWS than RWS, particularly in sampling times T2 and T3 (Figure VII-4a). As it can be seen in Table VII-1, these samples corresponded to high xylanase activities for both consortia, suggesting that xylanase activity observed in these consortia could be linked with these GH families. These GH families were also reported in numerous metaproteomics studies of different microbial origins (Zhu et al., 2016, Franco Cairo et al., 2011, Alessi et al., 2017, Burnum et al., 2011, Warnecke et al., 2007, Jimenez et al., 2015, Speda et al., 2017). Interestingly, these families were among the most multi-modular proteins detected in this study, with four and two multimodular proteins from families GH10 and 11, respectively. Enzymatic complexes of particular interest were CBM22|GH10|DOC1|GH43_16|CBM6, GH11|CBM22|GH10|DOC1|CE4, GH11|CBM22|DOC1|GH16, CBM22|GH10|CBM37 and GH10|CBM13|CBM2, all directed toward hemicellulose degradation.

GH97 was highly abundant in both consortia and sampling times. However, its activity has been poorly described, excepting as glycogen debranching enzyme and an alpha-mannosidase activity; but no direct link with lignocellulose degradation has been reported. Other GH families directed toward carbohydrate polymers linked in alpha, such as GH31 and GH13 were detected in this study as well as in several others (Zhu et al., 2016, Franco Cairo et al., 2011, Burnum et al., 2011, Warnecke et al., 2007, Jimenez et al., 2015) and can be potentially linked to microbial glycogen management.

From the analysis of these highly abundant GH families, it's worth mentioning that many of them were directed toward hemicellulose degradation and in addition more abundant in TWS consortium, compare to RWS. Interestingly, as described in our previous work (Lazuka et al., 2018), TWS achieved higher initial hemicellulose degradation and xylanase activity level than RWS (Table VII-1). Cellulose degradation was also important in both consortia, without any preference for the hemicellulosic or cellulosic fraction in RWS (Lazuka et al., 2015). GH-affiliated proteins linked to cellulose degradation were detected in GH families 5, 9, 16, 48 and 17, depicting both exo- and endo-glucanase mechanisms and represented 3.0 to 5.6 % in total GH-affiliated proteins. This ratio was equal to 3.0 % in T1 time-point for both consortia and increased to 5.0 and 5.8% in T2 time-point for RWS and TWS respectively, in accordance with CMCase activity increase (Table VII-1).

Endoxylanase activity, likely represented by the abundance of GH families 10, 26, 8, 11 and 28, was lower in RWS (10.1 % in total GH-affiliated proteins) than TWS (14.8 % in total GH-affiliated proteins) T1 time-point and achieved 14.2 and 16.1% in T2 time-point for RWS and TWS, respectively. The global higher proportion of GH families involved in xylan degradation observed for TWS compare to RWS is thus in accordance with xylanase activity measurements (Table VII-1) and degradation rate observed in our previous studies. However, high diversity and abundance of potential hemicellulose targeting enzymes (endoxylanase + debranching enzymes + beta-xylosidase) should not be overinterpreted in terms of effective hemicellulose degradation. Indeed, due to its more complex and diverse biochemical structure (compared to cellulose), hemicellulose degradation requires a broader range of enzymes. Nonetheless taking together, GH families observed in both RWS and TWS metaproteomes strongly support degradation of both wheat straw (hemi)cellulose fractions actually measured in RWS and TWS (Lazuka et al. 2015; Lazuka et al. 2018). Moreover, as already mentioned, the low levels of lignin-targeting enzymes (AA class, Figure VII-4b) were also in accordance with applied conditions (anaerobic environment) and biochemical observation (Lazuka et al. 2015, Lazuka et al., 2018).

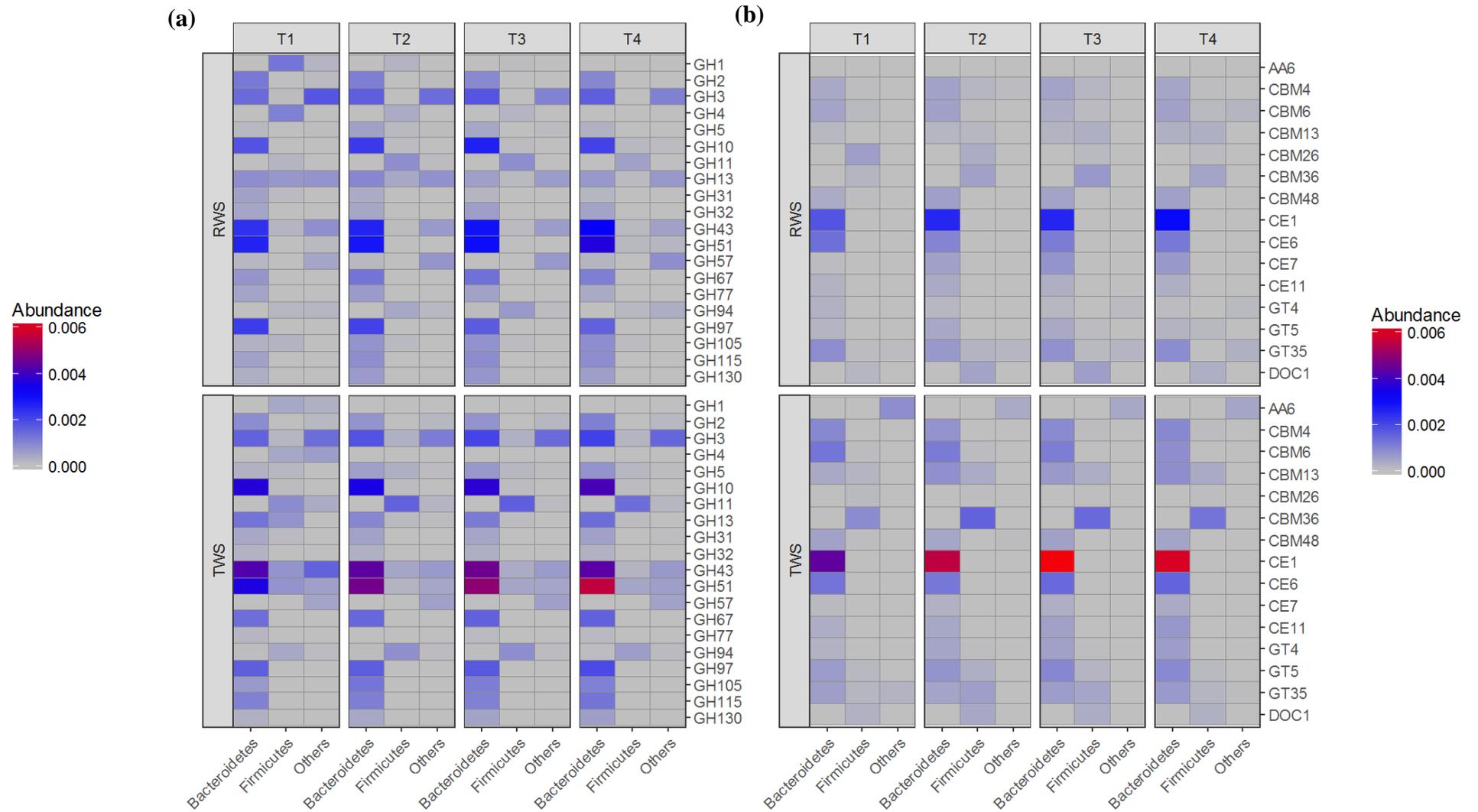
Considering others CAZymes classes and modules detected, CBM 36, 6, 4 and 13, CE 1 and 6, and GT 35 and 5 were particularly highly abundant (Figure VII-4b). As already described in previous section, CBM 6 and 4 were mainly found in association with GH43 and GH9, targeting hemicellulose and cellulose, respectively. CBM 36 was specifically detected with GH11, targeting hemicellulose, whereas CBM13 was common to GH families 10 and 43, also attacking hemicellulose. As mentioned in previous section, CE1 and 6 mainly appeared in COG P involved in inorganic ion transport and metabolism and more precisely described as enterochelin esterases, thus presenting no direct implication in wheat straw degradation. GT35 and 5 were defined as glucan phosphorylases and glycogen synthase and thus potentially linked to microbial glycogen management (or starch degradation) such as also suggested before for GH97, 13 and 31. From these CAZymes modules and classes (other than GH), all except CBM36 were already detected in other meta-omics studies in relation with biomass degradation: CBM6 in direct termite metaproteome studies of Franco Cairo et al. (2011) and Burnum et al. (2011); CBM4 and CE1 in the work of Zhu et al. (2016) and CBM13, CE6, GT35 and GT5 in cow rumen and termite microbiome metagenomic studies (Singh et al., 2014).

PCA analyses performed on GHs and other CAZymes families enabled to identify the proteins specific to each inoculum which explain the main RWS and TWS differences (Figure VII-4c and VII-4d). PCA based on the abundance of GH families (Figure VII-4c) separated RWS and TWS and presented a dynamic behavior between T1 and T2-T3-T4 time-points, for both consortia. Whereas the initial TWS sampling point (T1) was associated to GH 31 and 25, T2-T3 and T4 were grouped according to GH11, 115 and 109. Similarly, for RWS, GH1, 4, 13 and 73 separated the initial point, while T2 and T4 appeared linked to GH32, 57 and 18 and T3 to GH42 and 130. This result confirms the prevalence of GH11 in TWS sampling time T2 to T4. Moreover, GH10, 11, 26, 28, 43, 51, 68 and 8 (linked to hemicellulose degradation) all appeared on the right side of the PCA plot together with TWS points, showing that these families differentiate the two consortia, being mainly present in TWS. Concerning cellulose degradation, GH3, 5 and 48 were projected on the right-side of the PCA plot with TWS point, whereas GH17, 48 and 9 appeared left-sided and closed to RWS sampling points.

Interestingly, PCA based on other modules and classes (Figure VII-4d) also separated the two consortia and displayed an even more pronounced dynamic behavior, distinguishing time-points for both consortia. These differences were mainly driven by CBM abundances. For TWS, time points were separated according to the abundance of CBM25 and 61 for T1, CBM4 and 6 and GT3 for T2, and CBM13, CE11 and GT28 for T3 and T4, whereas for RWS differentiation was explained by CBM26, PL10 and PL9 for T1 and T2, CBM20 and 22 for T3 and CBM47, 30 and 11 for T4. Moreover, CBM36, 6 and 13 (all associated to enzymes attacking hemicellulose) were preferentially found in TWS, as their eigen vectors were right-sided in PCA plot, together with TWS sampling point. In comparison with RWS, these results showed that TWS was more enriched in enzymes involved in the degradation of hemicellulose, while different GH families linked to cellulose degradation were enriched in both consortia.

VII.2.4.2.4. Cazome profile expressed by major taxons

Considering both the taxonomic proteins affiliation at the phylum level and CAZymes annotations, (minimal abundance of 0.5 ‰), metaproteomics data revealed Bacteroidetes phylum as the main CAZyme purveyor in both consortia, followed by Firmicutes (Figure VII-5).



“Others” group consists of low amount of *Actinobacteres*, *Tenericutes* and unclassified or heterogeneous sequences.

Figure VII-5: Dynamic RWS and TWS Cazome profiles expressed by phylum. Raw abundances (a) and specific abundances at the phylum level (b).

In previous studies exploring lignocellulolytic communities, these two phyla were frequently detected as dominant but its relative abundance hierarchy varied. For instance, Alessi et al. (2017) reported CAZymes proteins as belonging to Proteobacteria and Firmicutes phylum, whereas Firmicutes and Bacteroidetes phyla were the main source of CAZymes in the studies of, respectively, Zhu et al. (2016) and Jimenez et al. (2015). These differences may be explained by the consortium origin (compost or soil in the previous studies) or by the enrichment conditions applied. Indeed, in these works and in contrast to the present study, oxygen was available at the beginning of the incubation which may have impacted the microbial selection. Otherwise, our results are in accordance with the metagenomics study of Singh et al. (2014), which reported Bacteroidetes followed by Firmicutes as the main CAZyme purveyors in buffalo rumen microbiome.

Interestingly, some CAZyme families and modules were found as specific to one taxonomic group. GH32, 67, 77, 97, 115, and 130, CBM4, 6 and 48 as well as CE1, 6, 7 and 11 were specifically affiliated to Bacteroidetes, whereas DOC1, CBM26 and 36 were specifically affiliated to Firmicutes phylum in both consortia. More precisely, in our dataset DOC1 modules were exclusively found in Ruminococcaceae family, strongly supporting the presence of cellulosome-like complexes, multi-enzyme assemblies described by Lamed et al. (1983). Indeed this family is known to harbor such type of cellulosomal feature (Christopherson et al., 2004). Otherwise, note that although poorly described, Bacteroidetes-specific GH115 and 130 expressions increased as incubation time (and thus degradation) progressed for both consortia (Figure VII-5).

Comparing only GH presence/absence in Bacteroidetes and Firmicutes in both consortia, that is to say excluding others phyla, some other features can be observed. GH1, 11 and 4 were absent in Bacteroidetes phylum, whereas GH2, 57 and 97 were absent in Firmicutes organisms. More importantly, for the enzymes of particular interest for biomass degradation displaying an abundance superior to 0.05‰ (GH5, 10, 11, 3, 43, 51 and 67) all of them, except GH11, were related to members from Bacteroidetes phylum.

Taking together these results revealed an interesting feature of endoxylanase expression, as GH10 proteins were mainly affiliated to Bacteroidetes phylum, whereas GH11 proteins were mainly associated to Firmicutes being absent in Bacteroidetes. Moreover, CBM36, specific of Firmicutes phylum was exclusively found in association with GH11, supporting the GH11 prevalence in Firmicutes phylum. These observations suggest the cooperation of enzymes from different taxonomic origins as a potential key factor to achieve efficient hemicellulose hydrolysis and thus potential synergisms between microorganisms producing plant cell wall degrading enzymes in complex ecosystems.

Although some precautions have to be taken because metaproteomics only inform on the presence/abundance of proteins in an ecosystem, but do not consider their effective activity, it's worth mentioning that the results obtained here constitute a good indication of bacterial symbiosis in PCW degradation. Nevertheless, additional information on the specific protein activity on different substrates could be helpful to precise the specific role of each taxon and proteins detected in this study.

Thanks to the metaproteomic approach used in this study, several interesting features have been observed, indicating large arrays of PWC degrading enzymes being shared between two consortia of different origin, microbial symbiosis directed toward wheat straw degradation, as well as some dynamics of potential (hemi)cellulosic enzymes in accordance with enzymatic activities and biochemical measurements.

VII.2.5 Conclusions

Dynamic metaproteomics characterization of the two hyper-lignocellulolytic microbial consortia derived from cow rumen (RWS) and termite-gut (TWS) microbiomes has shown that the majority of the identified proteins were affiliated to two phyla, Bacteroidetes and Firmicutes, irrespective microbial consortia origin or sampling-point considered.

These two phyla expressed relatively high proportion of proteins linked to carbohydrate transport and metabolism and more importantly, of carbohydrate active enzymes (CAZYmes) in both consortia.

Whereas a large array of PWC degrading enzymes were shared between the two consortia, Cazyyme profile varied among consortia and with wheat straw degradation progression. Especially, high rate of hemicellulose degradation and high xylanase activity along TWS incubation were concomitant to the increased expression of hemicellulose targeting enzymes from families GH10, 11, 26, 28, 43, 51, 68 and 8 and CBM6,36 and 13.

Moreover, even if Cazyyme expression was dominated by members of the Bacteroidetes phyla, specific CAZymes were also exclusively expressed by Firmicutes, suggesting enzymatic synergies between these two taxonomic phyla as a prerequisite for efficient LC degradation. Particularly, GH families 10 and 11, displaying similar functions (endo-xylanase), were mainly produced by bacteria belonging to Bacteroidetes and Firmicutes, respectively.

Finally, the GH families GH16, 17, 3, 48, 5 and 9 as well as GH10, 11, 26, 28, 43, 51, 67 and 8, respectively associated to cellulose and hemicellulose degradation, constitute the core Cazyyme of RWS and TWS anaerobic hyper-hydrolytic consortia targeting PWC.

VII.2.6 Acknowledgment

This research was supported by the French National Agency for Energy and Environment (ADEME), the Carnot Institute 3BCAR and the CEPIA department of INRA.

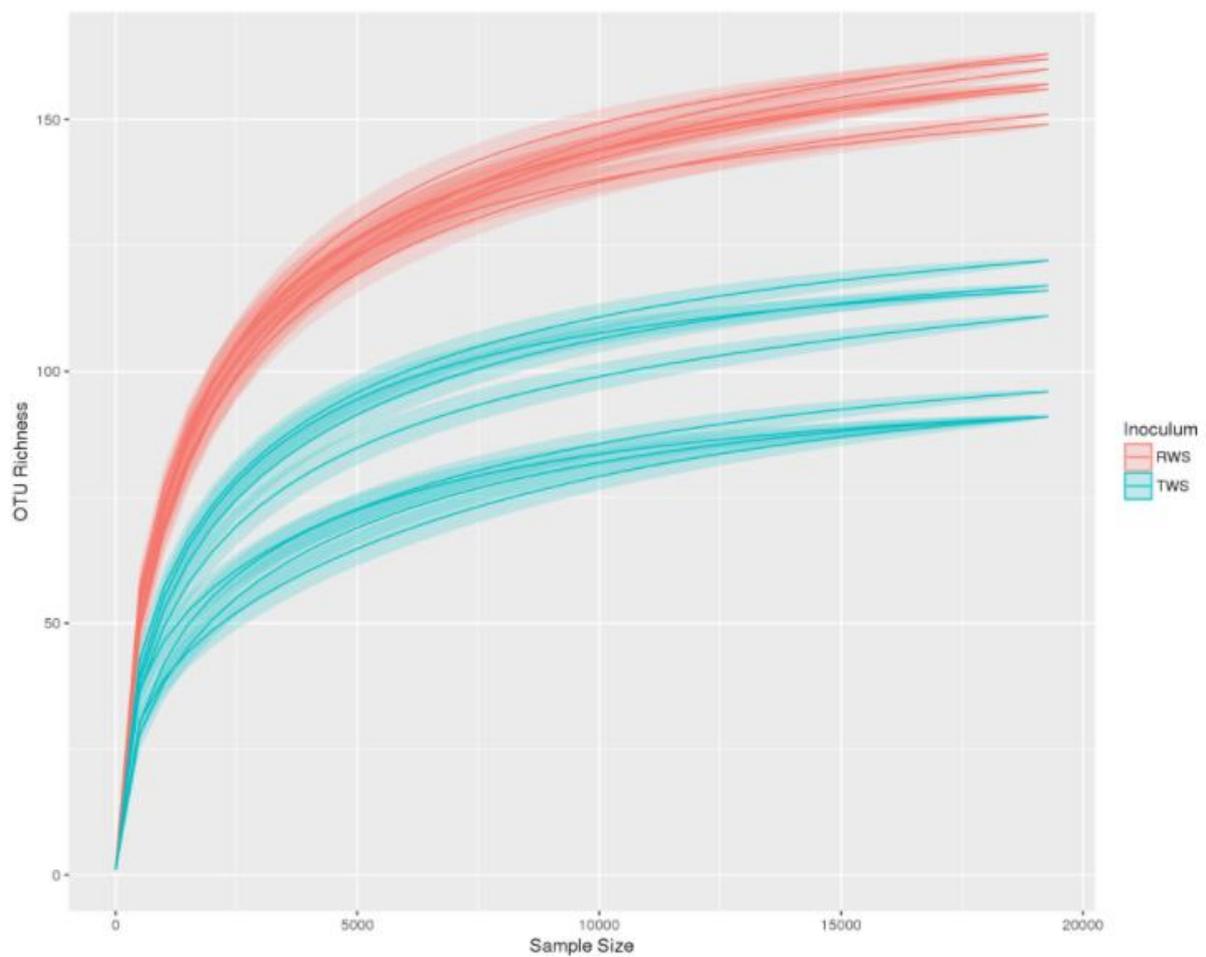
G. Oekler, M. Bounouba and E. Mangelle are acknowledged for their assistance with fermentation experiments and technical support.

The authors thank the Genomics and Transcriptomics (GeT) platform for their help with sequencing. We would like to acknowledge M. Abadie's important contribution in enzymatic analysis and protein extraction, as well as K. Eismann, S. Haange and V. Lünsmann for their help with metaproteomics protocols and data analysis.

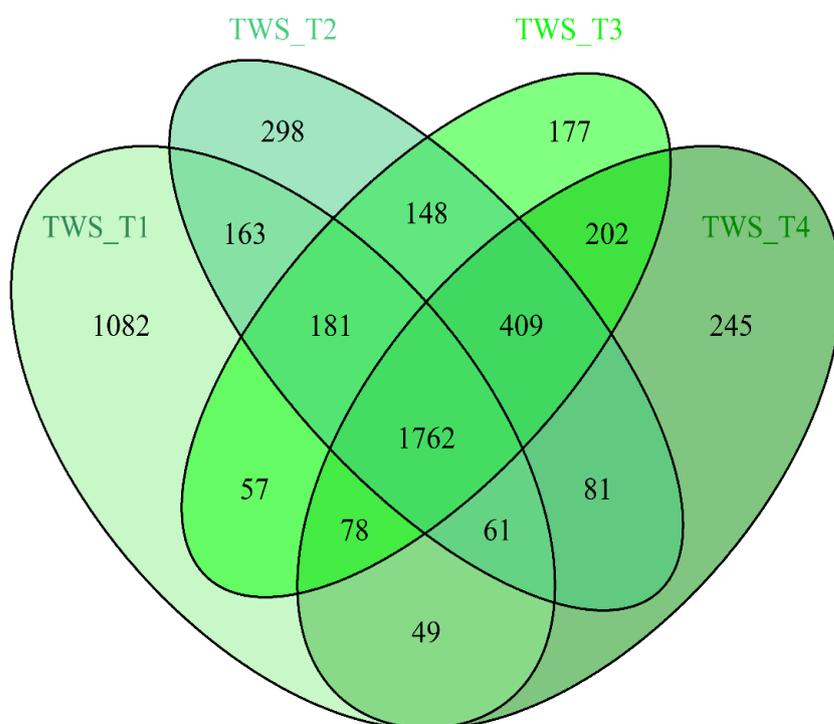
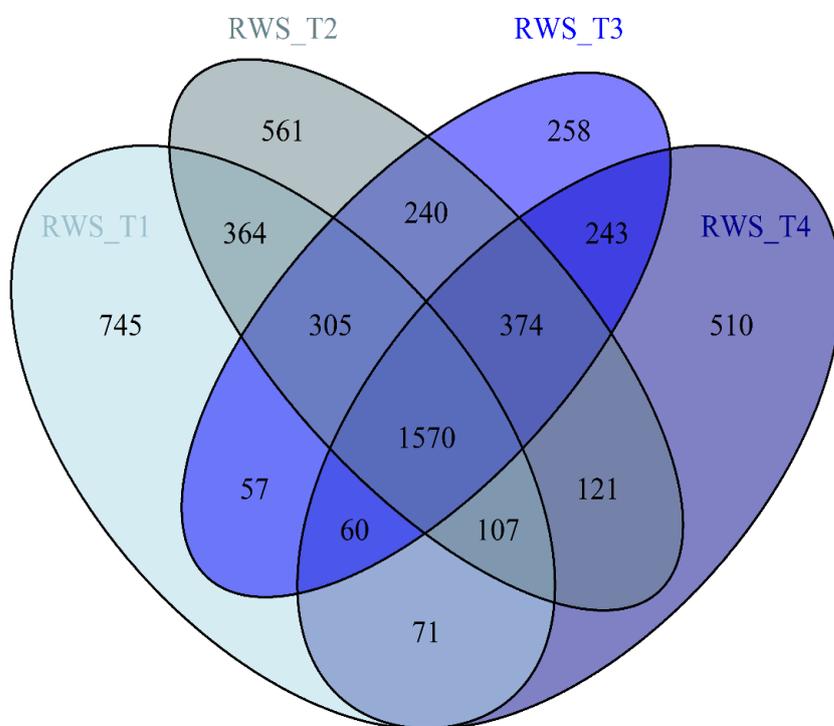
VII.2.7. Supplementary data

S VII-1: Rarefaction curves of the 16S rDNA data.

Numbers of detected OTU reached a plateau, indicating sequencing and subsampling depth are sufficient to describe the samples communities.



S VII-2: Venn diagram obtained on the metaproteomics data



VII.3. Conclusions du chapitre

L'analyse dynamique des communautés microbiennes hyper-hydrolytiques RWS et TWS par l'approche de métaprotéomique a révélé des éléments d'intérêt pour la compréhension de la structuration taxonomique et fonctionnelle de tels consortia transformant la paille de blé en carboxylates en conditions d'anaérobiose.

En effet, en cohérence avec ce qui avait été observé en métagénomique ciblée sur le gène de l'ARNr 16S (Thèse de L. Auer), la majeure part des protéines exprimées par ces deux consortia étaient affiliées au phyla Bacteroidetes et Firmicutes. De plus, ces derniers étaient largement impliqués dans l'expression de protéines liées au métabolisme et au transport des sucres, soutenant fortement l'hypothèse qu'ils étaient bien impliqués dans la dégradation du substrat.

Pour approfondir cela, l'ensemble des protéines identifiées ont été soumises à annotation sur la base de données CAZY. De manière intéressante, de fortes proportions de Cazymes ont été retrouvées dans les deux communautés, indépendamment de l'avancement de la dégradation du substrat. Ces Cazymes étaient elles aussi principalement affiliées au phyla Bacteroidetes et Firmicutes, appuyant encore plus fortement l'hypothèse selon laquelle ils participeraient activement à la dégradation.

Parmi ces Cazymes, il a été possible d'identifier un cœur de familles de GH, retrouvées dans les deux consortia, ainsi que dans de nombreuses autres études de méta-omiques caractérisant des écosystèmes lignocellulolytiques. Nous proposons ainsi que les enzymes appartenant aux familles GH16, 17, 3, 48, 5 et 9 ainsi que GH10, 11, 26, 28, 43, 51, 67 et 8 soient respectivement impliquées dans la dégradation des fractions cellulosique et hémicellulosique dans de tels consortia.

L'identification de familles de GH largement majoritaires dans chacun des phyla les plus abondants (Bacteroidetes et Firmicutes), nous permet aussi de suggérer l'existence de synergies entre ces groupes taxonomiques. Plus particulièrement, les familles GH10 et 11, qui sont supposées induire toutes deux l'activité endoxylanase, étaient affiliées majoritairement au Bacteroidetes et Firmicutes, respectivement. Cela suggère que les synergies seraient aussi valables au sein d'une même activité.

Alors que le consortium TWS présentait une forte dégradation initiale de la fraction hémicellulosique associée à une forte activité xylanase, il était aussi caractérisé par une augmentation de la proportion des familles de Cazymes ciblant la fraction hémicellulosique GH10, 11, 26, 28, 43, 51, 68 et 8, et CBM6,36 et 13. Ce résultat nous permet de poser l'hypothèse que ces enzymes soient liées à l'activité xylanase mesurée ainsi qu'à la dégradation de la fraction hémicellulose effectivement observée. Cela vient aussi largement soutenir le fait que TWS soit un meilleur pourvoyeur d'enzymes de type endoxylanase que RWS.

L'approche de métaprotéomique utilisée dans cette étude est une technique puissante qui apparait cohérente avec les observations macroscopiques et enzymatiques. Elle permet ainsi de suggérer des modalités enzymatiques et taxonomiques potentiellement caractéristiques des écosystèmes microbiens hyper-hydrolytiques anaérobies.

Chapitre VIII : **Discussion générale**

La problématique principale de ce travail de doctorat étant l'étude de la bioconversion de la lignocellulose de la paille de blé en carboxylates par des populations microbiennes complexes dérivées d'écosystèmes naturels en conditions contrôlées, deux paramètres majeurs ont été évalués :

L'origine de l'écosystème de départ a pu être étudié au travers des résultats obtenus dans les chapitres IV et VI qui décrivent le potentiel naturel des écosystèmes étudiés ainsi que les possibilités d'amélioration de ce potentiel au travers d'un processus d'enrichissement en culture contrôlée.

L'impact des caractéristiques structurales et biochimiques sur la dégradation du substrat modifié par prétraitement fait l'objet du chapitre V.

Au-delà de ces aspects appliqués et dirigés vers la production de synthons à partir de paille de blé comme substrat modèle, la majeure partie des expérimentations réalisées ont fait l'objet d'une caractérisation dynamique, apportant une meilleure compréhension des mécanismes microbiologiques et biochimiques mis en œuvre dans les écosystèmes étudiés.

En regard des travaux de thèse de doctorat de Lucas Auer (effectués sur les échantillons générés dans le cadre des expérimentations décrites dans cette étude), des éléments d'écologie microbienne sont aussi apportés et discutés tout au long de ce manuscrit.

Alors que les considérations de structuration et d'évolution des écosystèmes microbiens étudiés ici ont été largement détaillées par L. Auer au niveau taxonomique, ce travail propose un nouvel éclairage en intégrant la structuration fonctionnelle des écosystèmes étudiés, via une approche de métaprotéomique, détaillée dans le chapitre VII.

Cette étude a adressé quatre questions majeures :

1) Comment enrichir des populations microbiennes complexes issues d'écosystèmes naturels d'intérêt en vue de leur utilisation comme inocula stables pour la bioconversion contrôlée de paille de blé en synthons de type AGV ?

2) Quels sont les comportements dynamiques de telles consortia microbiens en termes de dégradation de lignocellulose, de production de synthons et d'activités enzymatiques ? Peuvent-ils être mis en lien avec la diversité des populations mises en jeu ?

3) Comment prétraiter le substrat paille de blé pour maximiser les rendements et vitesses de production de synthons (AGV) de tels consortia hyper-hydrolytiques dérivés d'écosystèmes naturels ? Quels sont les impacts des prétraitements sur le comportement dynamique des consortia ?

4) Quelle est la structuration dynamique des fonctions (et populations) mises en jeu dans de tels consortia microbiens hyper-hydrolytiques ? Peut-elle être corrélée à la dynamique de dégradation de lignocellulose, de production de synthons et d'activités enzymatiques observées ?

L'ensemble des résultats obtenus permet d'apporter des éléments de réponse et de discuter ces questions centrales pour favoriser la transformation microbienne de la lignocellulose de la paille de blé en synthons par des populations dérivées d'écosystèmes naturels, et d'aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans de tels écosystèmes biologiques.

VIII.1 Comment enrichir des populations microbiennes complexes issues d'écosystèmes naturels d'intérêt en vue de leur utilisation comme inocula stables pour la bioconversion de paille de blé en synthons de type AGV ?

La culture de populations microbiennes issues d'écosystèmes naturels en environnement artificiel contrôlé induit nécessairement des modifications environnementales pour ces dernières, pouvant se traduire par une instabilité des populations et une adaptation de la diversité microbienne. Dans cette étude, deux types d'écosystèmes naturels ont été étudiés : le rumen bovin et le microbiote intestinal de termite. Pour les deux, l'impact du transfert de ces communautés microbiennes lignocellulolytiques naturelles en bioréacteurs a été évaluée par le suivi de paramètres reflétant leur activité macroscopique, tels que la dégradation du substrat paille de blé (broyée à 2 mm) et la production d'AGV, ainsi que par l'analyse de la diversité microbienne par séquençage ciblant le gène codant pour les ARNr 16S.

Plusieurs configurations de bioréacteurs (continu, fedbatch, batch, etc...) peuvent être envisagées pour étudier la culture de communautés microbiennes lignocellulolytiques issues d'écosystèmes naturels ou environnementaux. Dans tous les cas, l'évolution des populations microbiennes en environnement contrôlé implique des notions de sélection microbienne qui résultent des conditions opératoires appliquées. Ici, le mode batch séquentiel en condition d'anaérobiose légèrement acide (pH 6,15) et avec le substrat lignocellulosique non prétraité (paille de blé broyée à 2 mm) comme seule source de carbone a été retenu pour procéder à l'adaptation des populations microbiennes lignocellulolytiques.

En effet, alors qu'Holtzapple et Granda (2009) ont affirmé que la plateforme des carboxylates était celle qui permettait d'atteindre les meilleurs rendements de conversion de lignocellulose, résultat confirmé par plusieurs auteurs (Kim et al., 2013 ; Menon et Rao, 2012), nous nous sommes orientés vers cette voie. Dans ce cadre, et comme présenté dans les Tables II-7 et II-8 (pages 46-47) de nombreuses études visant à obtenir des communautés microbiennes hydrolytiques ont été menées en bioréacteurs de type batch séquentiel.

De plus, d'après certains travaux sur les microorganismes ruminiaux, le pH légèrement acide et supérieur à 6 permettrait de favoriser l'adhésion des bactéries au substrat, la vitesse d'hydrolyse et la production de carboxylates (Mourino et al., 2001). Enfin, le recours à un pH légèrement acide avait pour objectif de limiter la croissance des archaea méthanogènes pour défavoriser la production de méthane devant celle de carboxylates.

Ainsi, l'enrichissement de la fonction lignocellulolytique d'une communauté bactérienne issue de rumen bovin est présenté dans le Chapitre IV. L'inoculum initial, provenant de deux vaches laitières non productives, a été incubé en conditions d'anaérobiose avec 20 g.L⁻¹ de paille de blé non prétraitée comme seule source de carbone. La procédure de SBR a été mise en place pendant 10 cycles de 7 jours d'incubation chacun, permettant l'obtention d'une communauté bactérienne stable en termes de comportement macrocinétique.

Le suivi dynamique de ces composantes macrocinétiques au cours de la procédure a révélé une augmentation des capacités de dégradation de la lignocellulose, passant de moins de 20% à 35% MS, associée à une augmentation de la production d'AGV, de 1,2 à 1,6 g/L. De manière intéressante ces observations macroscopiques étaient concomitantes à un changement de communauté bactérienne. Les premiers cycles d'enrichissement montraient de fortes modifications, avec notamment une perte de diversité, imputable à l'adaptation de la communauté initiale aux conditions de culture. Après 5 cycles de culture, l'évolution des capacités de dégradation ainsi que celle de la communauté bactérienne s'étaient stabilisées, suggérant que la procédure permettait de sélectionner les microorganismes capables de dégrader efficacement le substrat et de les maintenir pendant plusieurs cycles. La communauté stable ainsi enrichie nommée RWS se composait principalement de microorganismes issus des phyla Bacteroidetes et Firmicutes, connus pour être impliqués dans la dégradation de la lignocellulose.

La stabilisation rapide de communautés microbiennes par la procédure SBR avait déjà été observée par plusieurs études après 6, 5 ou même 4 transferts, respectivement (Jiménez et al., 2014 ; Trifonova et al., 2008 et Reddy et al., 2011). Cependant, dans de nombreux cas cette observation n'était pas corrélée à une augmentation des capacités de dégradation (Gao et al., 2014, Guo et al., 2010). Les travaux de Reddy et al. (2011) et Brossi et al. (2015) sont pourtant totalement en accord avec ceux obtenus dans le cadre de cette thèse de doctorat. Ces derniers ont en effet enrichi des communautés microbiennes issues de i) compost et ii) sol avec des rafles de maïs, du millet vivace, ou de la paille de blé comme source de carbone.

Dans tous les cas, ils observèrent une augmentation des capacités de dégradation concomitante à une sélection microbienne. Ces études étant dirigées vers la production d'enzymes et réalisées en conditions d'aérobiose, ils n'ont cependant pas observé l'augmentation de production de carboxylates qui constitue un avantage majeur de notre étude en termes d'application industrielle potentielle de la communauté RWS.

Finalement, ces résultats nous permettent de montrer qu'au-delà de permettre la stabilisation de la communauté microbienne, la procédure de SBR (dans les conditions appliquées) constitue aussi une technique efficace pour l'enrichissement en microorganismes hyper-hydrolytiques, permettant ainsi d'augmenter les capacités de dégradation du substrat et de production de carboxylate par rapport à la communauté initiale. A notre connaissance cette étude représentait le premier travail montrant l'enrichissement en SBR d'une communauté microbienne dérivée de rumen bovin avec de la paille de blé non prétraitée comme seule source de carbone.

Après enrichissement et conservation par congélation, RWS transformait 55.5% MV du substrat non prétraité en AGV comme produit principal, en 15 jours à 35°C. Des cinétiques fines ont été réalisées de manière à caractériser en dynamique l'évolution de la composition et de la structure du substrat ; les produits et leur composition ; ainsi que les activités enzymatiques majeures et leur localisation ; ces aspects étant discutés dans la partie suivante.

Parallèlement, un enrichissement a été effectué *in vivo* à partir des mêmes individus bovins. L'alimentation des animaux a été progressivement modifiée en augmentant la proportion de paille de blé, jusqu'à atteindre 100% de paille. Des échantillons de rumen ont été prélevés et constituaient la communauté microbienne enrichie *in vivo*. A partir de ces échantillons, un bioréacteur anaérobie a pu être incubé dans les mêmes conditions que pour la communauté RWS, enrichie en bioréacteur (*in vitro*). En 15 jours, la communauté enrichie *in vivo* permettait la dégradation de 50.7 ± 5.8 % (m/m) du substrat lignocellulosique non prétraité, contre 55.5 ± 2.8 % pour l'enrichissement *in vitro* RWS. Il paraît très intéressant que ces communautés expriment le même niveau global d'activité de dégradation alors qu'elles ont été obtenues de manière différente. Plus précisément, à 7 jours, les capacités de dégradation de la communauté *in vivo* atteignaient 38.5 ± 2.1 % contre 36.9 ± 3.7 % pour RWS et 18.5 ± 2.2 % pour la communauté initiale non enrichie. Ce résultat suggèrent que les conditions d'enrichissement permettraient de doubler la dégradation anaérobie du substrat d'étude non prétraité, et ce indépendamment de l'approche mise en œuvre. De la même manière, les productions à 15 jours ainsi que le profil des AGV étaient très proches pour les deux communautés enrichies.

Les communautés *in vivo* et *in vitro* RWS produisaient respectivement 183.7 ± 11.6 et 226.5 ± 21.1 mCmol d'AGV.L⁻¹, dont respectivement de 55.1 et 57.1 % (g.g⁻¹) d'acide acétique, 18.2 et 22.3 % d'acide propionique, 22.4 et 12.8 % d'acide butyrique et 25 et 5.8 % d'acide valérique ; ainsi que 68.3 et 78.7 mCmol de CO₂.L⁻¹. Bien que l'analyse de la composition de la communauté microbienne *in vivo* ne soit pas présentée ici, ces résultats soutiennent largement la procédure d'enrichissement employée dans ce travail comme adaptée à la communauté initiale issue de rumen bovin. Des informations sur la composition microbienne des deux consortia serait nécessaire pour comparer la diversité des communautés sélectionnées dans les deux conditions.

En plus de ce travail sur l'enrichissement d'une communauté microbienne issue de rumen bovin, plusieurs microbiotes intestinaux de termite ont été évalués dans le cadre de ce doctorat, faisant l'objet du chapitre VI de ce manuscrit.

Quatre espèces de termites supérieurs *Nasutitermes ephratae*, *N. lujae*, *Microcerotermes parvus* et *Termes hospes*, ont été sélectionnées pour leur potentiel de dégradation de lignocellulose. Leur microbiote intestinal a été utilisé comme inoculum pour la transformation de paille de blé en carboxylates dans les mêmes conditions opératoires que pour le rumen bovin (thèse de L. Auer). Compte-tenu des faibles quantités d'inocula recueillies (en comparaison avec le rumen bovin), ces premiers cycles ont été toutefois effectués avec la paille de blé autoclavée comme unique source de carbone et dans des réacteurs de plus faible volume (0,4 L contre 2 L pour les essais rumen).

Les résultats obtenus ont permis de distinguer le microbiote intestinal de l'espèce *Nasutitermes ephratae*, affichant une dégradation du substrat de $45.2 \pm 5\%$ MV dès le premier cycle de 15 jours de culture. En comparaison, les autres microbiotes ne dépassaient pas 38% de dégradation sur la même période, alors que la communauté microbienne issue de rumen bovin avait permis la transformation de moins de 20% du substrat en 7 jours au cours du premier cycle.

De plus, l'inoculum issu de *Nasutitermes ephratae* transformait efficacement le substrat en carboxylates, affichant une concentration finale de 180 mCmol-AGV.L⁻¹ (équivalent à 5,8 g-AGV.L⁻¹).

Ce microbiote, nommé TM, semblait donc très prometteur et constituait un bon candidat pour son enrichissement par la procédure de SBR, visant l'obtention d'une communauté hyper-hydrolytique. De plus, la composition initiale des communautés microbiennes n'avait pas été maintenue, basculant vers une dominance très forte des Firmicutes.

Avec les quatre espèces de termites testées, les proportions de Spirochaetes, Fibrobacteres et TG3, initialement dominants dans le microbiote intestinal des termites, avaient drastiquement diminué au profit de microorganismes appartenant au phylum Firmicutes (notamment *Clostridium termitidis*, *Lachnospiraceae* et assimilés *Ruminococcaceae*) et de Proteobacteria (*Enterobacteriaceae* pour la plupart), parfois accompagnés par des Bacteroidetes (*Dysgonomonas*). Par ailleurs, la diversité bactérienne finale s'était révélée très peu répétable entre reliquats biologiques, donc encore potentiellement assez éloignée de son état stable.

L'enrichissement en bioréacteur de l'inoculum le plus prometteur, nommé TM, a donc été mené dans les mêmes conditions que pour la communauté microbienne issue de rumen bovin, c'est-à-dire sur paille de blé non stérilisée. Ces conditions opératoires n'ont pas permis d'observer une augmentation des capacités de dégradation. Au contraire ces dernières diminuaient au cours de la procédure de SBR, passant de $40,7 \pm 4,0\%$ MV pour le premier cycle à $30,7 \pm 0,9\%$ MV pour le second. Finalement après 5 cycles de 11 jours, bien que 30 % de l'activité de dégradation initiale ait été perdue, résultant en une dégradation de 25% MV du substrat et une production de carboxylates à hauteur de $125 \text{ mCmol-AGV.L}^{-1}$, les deux derniers cycles semblaient relativement stables du point de vue de l'activité macroscopique.

Par la suite, l'utilisation de paille stérilisée pendant la procédure de stabilisation a donc été évaluée avec l'objectif d'atteindre de meilleures performances macroscopiques. Dans ces conditions TM présentait de meilleures capacités de dégradation du substrat qu'auparavant, dès le premier cycle, avec $47,4 \pm 5,0\%$ MV abattu et converti en $190 \text{ mCmol-AGV.L}^{-1}$ en 11 jours. De plus après 2 cycles, malgré une faible chute, l'activité macroscopique s'était stabilisée à 38% de dégradation et 165 mCmol.L^{-1} d'AGV produits et ce pendant 3 cycles successifs de 11 jours. La communauté stable ainsi générée, nommée TWS a –tout comme la communauté RWS- été conservée par congélation et étudiée de manière plus fine en dynamique.

Après conservation, TWS transformait $42,0 \pm 4,0\%$ MV du substrat en 11 jours d'incubation, produisant $180 \text{ mCmol-AGV.L}^{-1}$. Comme RWS, cette communauté microbienne stabilisée TWS se composait essentiellement de microorganismes appartenant au phylum Bacteroidetes et Firmicutes. TWS présentait de fortes similarités avec RWS, avec cependant une diversité active beaucoup plus faible (3 OTUs comptant pour 90% des ARNr 16S au moment du pic de dégradation – thèse de L. Auer).

Ainsi, l'obtention de communautés proches à partir d'inocula d'origine et de composition microbienne initiale très différentes permet de questionner l'impact des conditions d'enrichissement sur la sélection finale.

Alors que plusieurs auteurs ont observé la prévalence de l'effet substrat sur l'effet inoculum en présence d'oxygène, en étudiant l'enrichissement soit d'un inoculum sur plusieurs substrats (Brossi et al., 2015), soit de plusieurs inocula sur le même substrat (Wongwilaiwalin et al., 2013), nos observations suggèrent aussi que la nature du substrat serait un paramètre clé et prépondérant devant l'origine de l'inoculum, orientant la sélection microbienne en conditions d'anaérobiose. Par ailleurs, l'oxygénation semble aussi constituer un paramètre déterminant de la sélection microbienne, l'orientant vers les phyla Proteobacteria et Bacteroidetes, alors que l'anaérobiose semble favoriser principalement les Firmicutes puis les Bacteroidetes (Table VIII-1).

En plus d'orienter la sélection microbienne, ces conditions ont un impact assez net sur les produits générés. De manière générale, les études menées en aérobiose visent à favoriser la dégradation de la lignocellulose et la production d'enzymes, alors que celles menées en anaérobiose sont orientées vers la transformation du substrat en produits de type carboxylates ou biogaz (Tables II-7 et II-8, pages 46-47). Dans ce cadre, nos deux communautés stables RWS et TWS permettaient d'atteindre des capacités de production de carboxylates largement supérieures à la plupart des autres études référencées sur substrat lignocellulosique non prétraité en batch à un étage (Table II-7 et II-8) et, de plus, RWS présentait un rendement proche du rendement théorique de production de carboxylates (Chapitres IV). Ainsi, la procédure de SBR en conditions d'anaérobiose sur paille de blé comme seule source de carbone nous apparaît comme un moyen efficace pour enrichir des populations microbiennes complexes issues d'écosystèmes naturels d'intérêt en vue de leur utilisation comme inocula stables pour la biotransformation contrôlée de lignocellulose de paille de blé en synthons de type AGV.

Table VIII-1 : Composition bactérienne de consortia enrichis sur substrat lignocellulosique

Origine	Conditions	Substrat	Phyla majoritaires	Références
Sol	Aérobiose mésophile	Paille de blé	Proteobacteria et Bacteroidetes	Jimenez et al. (2014)
Sol	Anaérobiose mésophile	Millet vivace	Firmicutes, Bacteroides et Proteobacteria	DeAngelis et al. (2012)
Sol	Aérobiose mésophile	Paille de blé	Proteobacteria et Bacteroidetes	Brossi et al. (2015)
Sol	Aérobiose mésophile	Rafle de maïs	Actinobacteria, Proteobacteria et Bacteroidetes	Brossi et al. (2015)
Sol	Aérobiose mésophile	Millet vivace	Proteobacteria, Bacteroidetes et Firmicutes	Brossi et al. (2015)
Sol	Statique mésophile	Papier filtre	Firmicutes et Proteobacteria	Feng et al. (2011)
Compost	Aérobiose thermophile	Millet vivace	Firmicutes et Bacteroidetes	Gladden et al. (2011)
Compost	Statique mésophile	Paille de riz	Firmicutes, Bacteroidetes et Proteobacteria	Peng et al. (2010)
Compost	Aérobiose thermophile	Paille de riz	Firmicutes et Proteobacteria	Haruta et al. (2002)
Compost	Aérobiose thermophile	Millet vivace et rafle de maïs	Actinobacteria, Proteobacteria et Firmicutes	Reddy et al. (2011)
Compost	Statique mésophile	Rafle de maïs	Proteobacteria, Firmicutes et Bacteroidetes	Lv et al. (2008)
Digestat industriel	Anaérobiose mésophile	Paille et foin	Firmicutes et Bacteroidetes	Hanreich et al. (2013)
Bagasse	Statique thermophile	Paille de riz	Firmicutes	Wongwilaiwalin et al. (2013)
Boues activées	Statique thermophile	Paille de riz	Firmicutes, Bacteroidetes et Proteobacteria	Wongwilaiwalin et al. (2013)
Rumen bovin	Statique thermophile	Paille de riz	Firmicutes	Wongwilaiwalin et al. (2013)
Rumen caprin	Anaérobiose mésophile	Paille de blé	Bacteroidetes et Firmicutes	Ozbayram et al. (2017)
Rumen bovin	Anaérobiose mésophile	Paille de blé	Bacteroidetes et Firmicutes	Ozbayram et al. (2017)
Rumen bovin	Anaérobiose mésophile	Paille de blé	Bacteroidetes et Firmicutes	Cette étude
Microbiote intestinal de termites	Anaérobiose mésophile	Paille de blé	Bacteroidetes et Firmicutes	Cette étude

Il advient de mentionner que la configuration en bioréacteur continu aurait aussi pu être envisagée pour effectuer les sélections microbiennes. Cependant, devant le caractère solide du substrat, une telle configuration ne peut être mise en place facilement à l'échelle laboratoire (substrat non « pompable ») et nécessite donc une montée en échelle qui induit d'autres problématiques (notamment en termes d'homogénéité). Néanmoins, il serait intéressant de tester les communautés stabilisées générées dans ces travaux en réacteurs continus de taille pilote pour évaluer leur applicabilité industrielle.

VIII.2 Quels sont les comportements dynamiques de tels consortia microbiens en termes de dégradation de lignocellulose, de production de synthons et d'activités enzymatiques ? Peuvent-ils être mis en lien avec la diversité des populations mises en jeu ?

Les communautés enrichies RWS et TWS ont été caractérisées plus finement afin de connaître l'évolution dynamique de la composition et de la structure du substrat, des produits et de leur composition, ainsi que des activités enzymatiques majeures et de leur localisation.

Après enrichissement, RWS et TWS transformaient respectivement 55.5% et 42.0% (m/m) du substrat en 2,9 et 2,1 gC-AGV.L⁻¹ comme produit principal et ce, en 15 et 11 jours d'incubation à 35°C. Les comportements dynamiques de ces deux communautés étaient différents, avec une activité plus forte et mise en place plus rapidement pour TWS contre une transformation finale plus forte pour RWS. En effet, les vitesses maximales de dégradation de substrat et de production de carboxylates intervenaient deux fois plus tôt pour TWS devant RWS (respectivement aux jours 2-3 et 5). En d'autres termes, la transformation au jour 3 était deux fois plus élevée avec la communauté microbienne TWS, en comparaison à RWS. De plus, alors que pour RWS les fractions cellulosique et hémicellulosique étaient dégradées simultanément, TWS présentait une préférence initiale pour l'hémicellulose. Les activités enzymatiques xylanase et CMCase étaient aussi largement augmentées pour TWS (devant RWS), atteignant des valeurs maximales plus de deux fois supérieures et intervenant deux fois plus tôt.

Parallèlement, les analyses de diversité microbienne (réalisées dans le cadre du doctorat de L. Auer) ont montré que TWS était plus simplifié que RWS. De plus, dans les deux cas la phase de forte dégradation était caractérisée par la présence de seulement quelques OTUs actifs très majoritaires.

Alors que nous avons proposé un modèle de dégradation de la paille de blé (et de production d'AGVs) en trois phases pour la communauté RWS (Chapitre IV), ces éléments nous ont amené à considérer la compétition microbienne dans ce dernier.

En effet alors que la première phase (pour RWS) était caractérisée par une latence au niveau macroscopique (faibles activités), elle était aussi définie par une réduction de la diversité active, suggérant la spéciation (ou la sélection) de la communauté microbienne vers la transformation du substrat. La seconde phase de forte et rapide activité macroscopique était ainsi caractérisée par une diversité réduite. Puis, la dernière phase correspondant à la transformation plus lente d'une part récalcitrante du substrat, voyait la diversité ré-augmenter vers le niveau initial.

Parallèlement, TWS affichait une diversité initiale réduite mais ne présentait pas (ou une très courte) de phase de latence. La phase de dégradation active de TWS était aussi caractérisée par une sélection marquée de la diversité (vers des microorganismes du genre *Bacteroides*). Cependant, à la différence de RWS, après la phase de forte dégradation (réduite aux 4 premiers jours), la communauté semblait relativement stable et surtout peu diversifiée, ce qui se traduisait par un fort ralentissement des vitesses de transformation, se stabilisant à des niveaux plus faibles que RWS.

Il apparaît donc que le modèle dynamique de transformation du substrat soit très largement impacté par la diversité microbienne initiale de la communauté considérée. Les résultats suggèrent de surcroît des avantages et inconvénients aux deux communautés. Alors que la communauté plus riche et diversifiée, RWS, permet d'atteindre des capacités finales supérieures, la mise en place de la communauté active semble nécessiter une phase d'adaptation de plusieurs jours. Au contraire, TWS, avec sa faible diversité fortement active, ne nécessite pas cette phase de mise en place mais ne permet pas d'atteindre des capacités aussi importantes de transformation.

Il semblerait que la communauté TWS puisse être principalement structurée de microorganismes de stratégie à tendance *r*, c'est-à-dire présentant d'importants taux de croissance et d'activité en environnement « riche » (i.e. fraction du substrat plus facilement accessible). Pour RWS, la communauté semble mixte, répartie entre microorganismes de stratégie à tendance *r* et *K*, la stratégie *K* se caractérisant par des taux de croissance plus faible mais des affinités pour les substrats plus importantes et donc orientée vers la mobilisation de substrats difficilement accessibles. Il advient toutefois de replacer ces définitions dans le contexte de la dégradation anaérobie de la lignocellulose où la labilité du substrat est faible et les taux de croissance relativement bas.

Néanmoins, ce modèle d'écologie microbienne (MacArthur et Wilson, 1967) est en accord avec i) les fortes activités enzymatiques observées pour TWS, dénotant une orientation vers une forte et rapide colonisation de l'environnement et ii) les forts rendements de production de carboxylates observés pour RWS caractérisant une stratégie d'efficacité accrue.

Il reste important de préciser que la sélection et la caractérisation de TWS a été effectuée sur le substrat stérilisé, la stérilisation pouvant avoir eu un impact (prétraitement thermique) sur le substrat et, par conséquent, sur la structuration dynamique de la communauté microbienne comme sur ses capacités de dégradation. D'autre part, la caractérisation dynamique des activités enzymatiques au cours de la procédure de stabilisation de la communauté TWS sur substrat stérilisé, a montré une augmentation des activités maximales ainsi que des vitesses maximales de dégradation d'(hémi)cellulose au cours de l'enrichissement. Pourtant les observations de fortes activités enzymatiques comme de sélection microbienne (faible diversité) étaient aussi valables au cours des essais d'enrichissement de la communauté sur substrat brut (Chapitre VI et thèse de L. Auer, 2016). Cependant, ces observations étaient accrues dans le cas du substrat stérilisé, en comparaison avec le substrat brut. Et d'autre part, dans les deux cas, le premier cycle avait été effectué sur substrat stérilisé. Tous ces éléments nous permettent de suggérer que -comme pour l'enrichissement de la communauté RWS- les conditions de culture du premier cycle d'enrichissement en bioréacteur ont un fort impact sur la structuration de la communauté microbienne, et ainsi sur ses capacités d'hydrolyse du substrat comme sur son comportement dynamique. Il est donc possible que l'utilisation de substrat stérilisé en premier cycle d'enrichissement ait conditionné le comportement dynamique de TWS.

Finalement, l'ensemble de ces observations nous permettent de suggérer que TWS est un consortium microbien particulièrement intéressant pour sa forte et rapide capacité de production d'enzymes. De plus, la caractérisation dynamique effectuée au cours de la procédure d'enrichissement de cette communauté microbienne nous ont permis d'observer un phénomène d'enrichissement en activités enzymatiques (xylanase et CMCase) corrélé à une accélération et à une précocité de la dégradation du substrat par cette dernière (Chapitre VI). Bien que l'augmentation de la transformation du substrat en carboxylate en cours d'enrichissement n'ait pas été observée avec TWS, la procédure a permis de stabiliser l'activité d'une communauté présentant une diversité réduite et un intéressant potentiel de production d'enzymes hémicellulolytiques en conditions d'anaérobiose.

La communauté RWS semble elle plus orientée vers la transformation à fort rendement du substrat en carboxylates, ainsi que vers la dégradation plus poussée d'une fraction récalcitrante du substrat, soutenue par une diversité microbienne plus importante et plastique.

D'un point de vue plus appliqué, ces deux communautés microbiennes restent donc attractives, avec des spécifications dans des objectifs différents, la production d'enzymes pour TWS et le rendement de dégradation de paille de blé et de production de carboxylates pour RWS. C'est donc cette dernière, RWS, qui a été retenue pour étudier l'impact de prétraitements du substrat dans le but de maximiser les rendements et les vitesses macroscopiques de dégradation de la paille de blé et de production de carboxylates.

VIII.3 Comment prétraiter la paille de blé pour maximiser les rendements et vitesses de production de synthons par des consortia hyper-hydrolytiques dérivés d'écosystèmes naturels ? Quels sont les impacts des prétraitements sur le comportement dynamique des consortia ?

Alors que le recours aux prétraitements est quasiment incontournable dans les procédés actuels de valorisation de substrats lignocellulosiques, la communauté RWS a été soumise à deux types de prétraitements faisant l'objet du chapitre V et de l'Annexe 3, avec des approches chimio-mécanique et enzymatique, respectivement.

Concernant les prétraitements chimio-mécaniques, l'imprégnation à la soude (voie sèche) a été évaluée sur deux tailles de broyage du substrat paille de blé. L'imprégnation a été mise en œuvre par le laboratoire partenaire (IATE – Montpellier, France) sur le substrat broyé à 2 mm, puis une partie de ce substrat a été broyé à 100 μm . Parallèlement, une partie du substrat non prétraité a aussi été broyé à 100 μm , démontrant que l'énergie nécessaire au broyage était impactée positivement par le prétraitement évalué. La caractérisation de ces prétraitements a montré que ceux soumis à l'imprégnation voie sèche à la soude présentaient une plus grande accessibilité à 1 μm ainsi qu'une plus faible cristallinité de la fraction cellulosique, mais sans impact sur la composition des substrats. Pour les prétraitements enzymatiques, un cocktail cellulolytique commercial (Novozymes) ainsi qu'un cocktail hémicellulolytique Xyn 11 produit par *Thermobacillus xylanilyticus* (et fournit par le laboratoire partenaire FARE – Reims, France) ont été évalués dans leurs conditions optimales de pH et de température.

La caractérisation de ces prétraitements enzymatiques en voie liquide a montré une attaque des fractions (hémi)cellulolytique ainsi qu'une diminution de la cristallinité du substrat dans les deux cas, avec toutefois une action plus prononcée pour le cocktail Xyn11.

Les incubations de la communauté RWS sur ces différents substrats prétraités ont affiché des résultats très intéressants, démontrant que les prétraitements chimio-mécaniques (imprégnation à la soude et broyage à 2 mm ou 100 μ m) permettaient d'accélérer l'activité du consortium RWS, tant au niveau de la dégradation du substrat, de la production de carboxylate que de la production d'enzymes d'activités xylanase. De manière surprenante, seul le broyage à 100 μ m présentait un effet négatif, imputable à une potentielle augmentation de température, non maîtrisée lors du broyage, qui ne sera que peu discuté ici. Pour les autres cas, les vitesses maximales (dégradation et production) étaient ainsi avancées au jour 2-3 (contre 5 sur substrat brut) tout comme le pic d'activité xylanase dont l'intensité était, de plus, augmentée d'un facteur 1,5. Les rendements de production de carboxylates étaient augmentés à des valeurs supérieures à 0,7 g eq. AA.g⁻¹ consécutives à une production favorisée d'acide butyrique (contre à 0,61 g eq. AA. g⁻¹ pour le substrat brut). Enfin, l'analyse de la structure et de la composition du substrat montrait une attaque simultanée des fractions (hémi)cellulolytiques, attendue avec RWS, mais surtout une attaque simultanée des fractions cristalline et amorphe de la cellulose qui n'avait jusque-là pas été observée avec cette communauté microbienne (attaque préférentielle de la fraction amorphe sur le substrat brut).

Concernant les prétraitements enzymatiques, en plus d'accélérer l'activité de production de carboxylates du consortium RWS, ils permettaient de repousser la transformation en synthons à des fractions du substrat considérées jusque-là comme récalcitrantes pour RWS. Ces derniers ont ainsi permis d'atteindre 65 % de dégradation de la matière volatile et 8,7 g-AGV/L produits en 15 jours. Cependant, les carboxylates produits initialement semblaient essentiellement résulter de la dégradation enzymatique (et non de la dégradation effective du substrat par RWS), il était donc difficile de savoir si RWS était initialement stimulé par les prétraitements enzymatiques. Néanmoins, la biotransformation tardive des fractions récalcitrantes pouvait raisonnablement être imputée à la communauté RWS, car elle se caractérisait par une augmentation des activités enzymatiques sans nouvel ajout de cocktail enzymatique.

Alors que les prétraitements chimio-mécaniques voie sèche étudiés semblent particulièrement intéressants pour une application industrielle de production de carboxylates à partir de paille de blé, des études technico-économiques restent nécessaires pour affirmer leur rentabilité.

Il reste que, dans le cadre de cette étude, ces prétraitements ont présenté de meilleurs (plus robustes) résultats pour maximiser les rendements et vitesses de production de synthons de type AGV par RWS, devant les prétraitements enzymatiques voie liquide.

D'autre part, parmi ces prétraitements, seuls ceux effectués chimio-mécaniquement ont été étudiés du point de vue de la diversité microbienne (à ce jour). Les résultats d'analyses de diversité bactérienne sur ces derniers ont révélé que les différentes espèces composant la communauté RWS n'étaient pas affectées de la même manière par les prétraitements chimio-mécaniques (Thèse de L. Auer, 2016). Alors que de nombreuses espèces bactériennes actives semblaient négativement impactées, d'autres voyaient leur activité favorisée avec l'avancement de la dégradation (*Bacteroides* et *Clostridia*), soutenant largement leur implication dans la dégradation effective de la lignocellulose.

De plus, il a pu être démontré que de la diversité microbienne était plus impactée par la phase de dégradation considérée (et donc par l'évolution du substrat au cours de sa dégradation) que par la nature initiale du substrat (Thèse de L. Auer, 2016). Cela suggérait ainsi que le modèle de structuration écologique mixte de la communauté RWS (stratégie r puis K) restait valable sur substrats prétraités, bien que cela ne se soit pas traduit par une forte activité des microorganismes de stratégie K (pas de dégradation retardée de la fraction récalcitrante) dans le cas des prétraitements par imprégnation à la soude. Aussi, puisque les prétraitements enzymatiques ont permis une dégradation tardive d'une fraction de biomasse lignocellulosique considérée comme récalcitrante pour RWS, il resterait très intéressant d'évaluer la diversité microbienne mise en jeu lors de l'incubation de RWS sur ces substrats prétraités enzymatiquement. Notamment, l'identification des microorganismes majoritaires dans la phase de dégradation tardive associée à de fortes productions d'enzymes (hémi)cellulolytiques permettrait d'affiner notre hypothèse de structuration écologique faisant intervenir des microorganismes à stratégie r puis K.

Par ailleurs, pour les quatre types de substrats étudiés en analyse de diversité microbienne (prétraitements chimio-mécaniques), un comportement cyclique a été observé, suggérant que la communauté revenait à son état actif initial en fin de culture. Ce comportement inédit (à notre connaissance) démontrait que la communauté RWS était stable indépendamment du substrat qui lui était soumis (une fois).

Néanmoins, il serait pertinent d'analyser la diversité microbienne après une seconde incubation de RWS avec les substrats prétraités. Ceci nous permettrait de conclure si le comportement cyclique pourrait être conservé ou si seule la diversité active soumise à un substrat « simplifié » serait maintenue.

Dans ce cadre, quelques études ont récemment cherché à comprendre comment la source de l'inoculum ou les conditions d'enrichissement impactent le rendement, l'efficacité et la structuration microbienne des consortia microbiens. Plusieurs études ont suggéré la prévalence de l'effet substrat sur l'effet inoculum. Après enrichissement de plusieurs communautés microbiennes d'origine différente sur le même substrat, Cortes-Tolalpa et al., (2016) ont observé des capacités similaires entre les consortia obtenus. A l'inverse, à partir d'une même communauté, Brossi et al., (2015) ont mis en évidence les différences de structuration de plusieurs enrichissements effectués sur des sources de biomasse différentes. De la même manière, en appliquant des modifications de substrat à des communautés stables, Gladden et al. (2012) et Jimenez et al., (2015) ont montré l'importance de la nature du substrat sur la diversité microbienne.

En 2016, Wong et al. ont finalement démontré l'importance de l'effet substrat sur l'effet inoculum (dans les conditions étudiées) en enrichissant deux communautés d'origine différente sur différentes biomasses lignocellulosiques dérivées de bois. Encore plus récemment, Carlos et al. (2018) ont observé un shift dans la structuration taxonomique et fonctionnelle de plusieurs communautés microbiennes (dérivées d'écosystèmes microbiens différents et enrichie chacune sur deux sources lignocellulosiques différentes), lorsque ces communautés étaient soumises à une sous-culture sur des substrats simplifiés (xylane et lignine). Ceci renforce encore l'idée selon laquelle la structuration des communautés microbiennes serait très largement impactée par la nature du substrat.

Finalement, ces éléments nous permettent de suggérer plusieurs hypothèses pouvant expliquer le retour inédit de la communauté RWS à sa structuration taxonomique initiale, après incubation avec les substrats prétraités chimio-mécaniquement.

D'une part, les modifications en termes de composition des substrats ont pu être suffisamment subtiles pour permettre la conservation de la diversité finale tout en permettant l'accélération des dynamiques de RWS. En effet, à notre connaissance seul Eichorst et al. (2014) ont entrepris d'étudier l'impact du prétraitement du substrat sur l'enrichissement d'une communauté microbienne.

Bien que ces auteurs ont montré que la structuration taxonomique microbienne était spécifiquement impactée par les prétraitements, les OTUs communs entre communautés étaient aussi les plus abondants dans chacun des consortia, montrant bien que l'impact des prétraitements sur la diversité microbienne majoritaire était limité. Dans notre cas, les prétraitements particulièrement doux ont pu participer au comportement taxonomique cyclique de RWS.

D'autre part, les conditions d'anaérobiose employées dans cette étude pourraient aussi expliquer nos résultats. En effet, les études montrant des changements de structuration taxonomique en un cycle de culture sur substrat différent ont largement été réalisées en conditions statiques ou d'aérobiose, où la croissance des microorganismes (et potentiellement les phénomènes de compétition) est communément plus rapide. Cependant, comme déjà évoqué, la pérennité du comportement inédit de RWS n'a pas été évaluée et ne nous permet pas d'affirmer que sa robustesse taxonomique serait conservée sur plusieurs cycles.

Au-delà de la structuration taxonomique, les différentes études mentionnées précédemment se sont aussi intéressées à caractériser la structuration fonctionnelle des communautés hydrolytiques et l'impact du substrat sur cette dernière. Dans le cadre de ce travail nous avons aussi initié l'exploration de la structuration dynamique de la diversité fonctionnelle de RWS en réponse aux substrats prétraités chimio-mécaniquement, par une approche métaproteomique. Ceci n'a pas fait l'objet de ce manuscrit, mais l'analyse de ces expériences (actuellement en cours dans le cadre du doctorat de E. Flajollet) pourrait potentiellement apporter un nouvel éclairage concernant la robustesse fonctionnelle et taxonomique de RWS après fermentation sur substrats prétraités.

VIII.4 Quelle est la structuration dynamique des fonctions (et populations) mises en jeu dans de tels consortia microbiens hyper-hydrolytiques ? Peut-elle être corrélée à la dynamique de dégradation de lignocellulose, de production de synthons et d'activités enzymatiques observées ?

La structuration fonctionnelle des consortia microbiens hyper-hydrolytiques RWS et TWS a été évaluée au cours de la dégradation de la lignocellulose par une approche de métaprotéomique (Chapitre VII).

Les principaux résultats obtenus ont révélé que les membres des phyla Bacteroidetes et Firmicutes étaient majoritaires, considérant l'expression des protéines. Des résultats similaires avaient aussi été observés en considérant l'ADNr et l'ARNr 16S (Thèse de L. Auer). De plus, ces phyla étaient prédominants en ce qui concerne, à la fois l'expression des protéines liées au métabolisme et au transport des sucres (COG G), et celle des Cazymes. L'ensemble de ces résultats appuie ainsi fortement l'hypothèse selon laquelle ils participeraient activement à la dégradation de la paille de blé.

De plus, parmi les Cazymes détectées et, en comparant nos résultats avec ceux de nombreuses études, nous avons proposé un cœur de familles de GH potentiellement impliquées dans la dégradation des fractions cellulosique et hémicellulosique de la biomasse. Selon ces investigations, les familles GH16, 17, 3, 48, 5 et 9 pourraient participer activement à la dégradation de la cellulose et les familles GH10, 11, 26, 28, 43, 51, 67 et 8 à celle de la fraction hémicellulosique dans les écosystèmes microbiens hydrolytiques.

Aussi, l'identification de familles de GH largement majoritaires dans chacun des phyla les plus abondants (Bacteroidetes et Firmicutes), nous a permis de suggérer l'existence de synergies entre ces groupes taxonomiques. Plus particulièrement, les familles GH10 et 11 étaient affiliées majoritairement aux Bacteroidetes et Firmicutes, respectivement, alors qu'elles sont supposées induire toutes deux l'activité endoxylanase. Cela suggère donc que les synergies seraient aussi valables au sein d'une même activité.

Une approche à envisager pour valider expérimentalement ces hypothèses, pourrait être d'étudier le métaprotéome de nos communautés microbiennes hyper-hydrolytiques en réponse à différents substrats. En effet, cela a été effectué par plusieurs auteurs sur des consortia microbiens issus de compost (Zhu et al. 2016 ; Jimenez et al., 2015), leur permettant d'avancer des preuves de synergie enzymatique. Ce type d'approche a montré son efficacité sur des communautés microbiennes obtenues en présence (initiale) d'oxygène et perturbée avec des substrats simplifiés, mais n'a jamais été entrepris sur des écosystèmes bactériens opérant en conditions d'anaérobiose et appliqués à la plateforme des carboxylates. Ainsi, il serait intéressant d'analyser la réponse métaprotéomique (et taxonomique) dynamique de nos communautés à des perturbations de substrats. Dans ce cadre, l'utilisation de substrats simplifiés (très différents de celui utilisé pour enrichir les communautés) est supposée offrir plus de chances d'observer des variations importantes.

Cependant, les substrats prétraités dans le cadre de ce doctorat (chimio-mécaniquement) seraient aussi particulièrement intéressants car leur dynamique de dégradation par RWS est très différente de celle observée sur substrat brut et permet une accélération de la transformation du substrat en carboxylates. Cela pourrait donc aussi permettre d'observer les potentielles structurations fonctionnelles induisant une rapide réponse macroscopique des communautés. Les échantillons nécessaires à ces analyses ont été prélevés et leur traitement est actuellement en cours (dans le cadre du doctorat de E. Flajollet).

Pour le consortium TWS, nous avons observé une corrélation entre i) une forte dégradation initiale de la fraction hémicellulose associée à une forte activité xylanase et ii) une augmentation de la proportion de Cazymes affiliées à des familles ciblant la fraction hémicellulose (GH10, 11, 26, 28, 43, 51, 68 et 8, et CBM6,36 et 13). Ceci suggère que ces protéines détectées pourraient bien être liées à l'activité xylanase ainsi qu'à la dégradation de la fraction hémicellulose effectivement mesurées dans les bioréacteurs.

Pour pouvoir démontrer la relation entre les enzymes détectées par métaprotéomique et les activités mesurées dans les bioréacteurs, il serait pertinent d'isoler puis de cultiver chacune des espèces microbiennes affiliées aux familles de GH d'intérêt, puis de produire et isoler leur enzymes (hémi)cellulolytiques (sur substrats synthétiques ou réels), et enfin de les caractériser enzymatiquement (activité, séquence peptidique, cristallographie). Il advient ici de noter que devant la faible proportion de microorganismes cultivables, les approches de métagénomique fonctionnelle pourraient aussi permettre d'identifier les gènes d'intérêt puis de produire de telles enzymes à partir de microorganismes modèles. Cependant, afin de montrer les synergies entre espèces microbiennes, il serait aussi particulièrement intéressant de construire des consortia synthétiques à partir de tels isolats pour évaluer l'effet de co-culture sur les activités enzymatiques. Bien que très consommatrice en temps et en ressources, ce type d'approche a montré son efficacité sur de nombreux sujets d'étude. Dans le contexte qui nous intéresse ici, la mise en œuvre de telles approches sur *Clostridium thermocellum* ou encore *Ruminococcus albus* a notamment abouti à des découvertes d'intérêt sur la structuration des complexes enzymatiques (de type cellulosomes) retrouvés chez les Ruminococcaceae (Lamed et al. 1983 ; Bayer et Lamed, 1986 ; Ohara et al., 2000). Dans notre étude, des domaines DOC1 ont, par exemple, été identifiés dans notre jeu de données par la base de données CAZY. Ces domaines étaient exclusivement associés à la famille taxonomique Ruminococcaceae, qui a été très largement étudiée par les approches dites classiques.

Associé à nos précédentes observations (montrant que les activités enzymatiques principales étaient retrouvées dans la fraction cell-bound des échantillons), ce résultat nous a permis de suggérer très fortement la présence de complexes enzymatiques de type cellulosome dans nos communautés hyper-hydrolytiques. Ainsi, grâce aux apports des approches dites classiques et à l'intégration des données obtenues dans des bases de données, de nombreuses informations peuvent de nos jours être retrouvées, faisant des approches de méta-omiques des outils très puissants. L'isolement des espèces microbiennes d'intérêt constituant RWS et TWS, et leur étude selon les approches proposées précédemment, permettraient donc à la fois de confronter nos hypothèses, d'améliorer notre connaissance sur la structuration taxonomique et fonctionnelle des consortia hyper-hydrolytiques, et de capitaliser l'information pour rendre les futures études méta-omiques encore plus puissantes.

Enfin, cette approche métabolomique soutient très largement le fait que TWS apparaisse comme un meilleur pourvoyeur d'enzymes endoxylanase que RWS. Ce consortium a été obtenu sur un substrat stérilisé (Chapitre VI), ce qui peut être vu comme un prétraitement thermique. Ainsi, bien que la source d'inoculum soit différente, il apparaît possible que la plus forte capacité de production d'enzymes hémicellulolytiques de TWS et sa plus faible capacité de dégradation globale soit la résultante de l'effet substrat devant l'effet inoculum. Nos résultats suggèrent donc que ce prétraitement relativement doux ait engendré une diminution de sa diversité taxonomique sans impacter négativement sa diversité fonctionnelle avec, au contraire, une stimulation de l'expression des enzymes hémicellulolytiques.

La communauté RWS semble elle plus orientée vers la transformation à fort rendement du substrat en carboxylates, ainsi que vers la dégradation plus poussée d'une fraction récalcitrante du substrat sans préférence pour l'une ou l'autre des fractions (hémi)cellulolytiques. Ce comportement serait soutenu par des diversités taxonomique et fonctionnelle importantes.

VIII.5. Conclusion et perspectives

Considérant l'ensemble de cette étude, nous avons pu montrer que les écosystèmes digestifs étudiés constituent de bonnes sources d'inocula pour la plateforme des carboxylates.

De plus, l'intégration de l'ensemble des données obtenues nous permet de proposer un modèle de dégradation commun à nos communautés enrichies sur paille de blé comme seule source de carbone et en conditions d'anaérobiose. Ce modèle de dégradation décrirait trois phases, intégrant des considérations macroscopiques, enzymatiques et d'écologie microbienne.

1) Fermentation de la fraction facilement biodégradable du substrat

En début de fermentation, le substrat est faiblement solubilisé en métabolites facilement assimilables. Ces derniers sont très rapidement pris en charge par des microorganismes de stratégie à tendance r (basés sur la croissance plus que sur l'affinité pour le substrat) qui produisent en retour de faibles quantités d'AGV. Ces microorganismes amorcent aussi une surprenante large gamme de protéines dirigées vers de la dégradation de la (ligno)cellulose ne se traduisant pas par une augmentation des activités enzymatiques. Pendant cette phase la diversité de la communauté microbienne est faiblement impactée.

2) Dégradation enzymatique « active » du substrat

La dégradation « active » anaérobie du substrat est effectuée par une fraction réduite de la diversité initiale composée de membres appartenant aux phyla Bacteroidetes et Firmicutes. La dégradation des deux fractions (hémi)cellulosiques est corrélée à une augmentation de la production de carboxylates et des activités enzymatiques xylanase et CMCCase ainsi qu'à une augmentation des proportions des familles de protéines classifiées GH5, 9, 16, 48 et 17 pour la fraction cellulosique et des familles GH10, 26, 8, 11 et 28 pour la fraction hémicellulosique.

3) Attaque de la fraction récalcitrante du substrat

Après la phase de dégradation « active », le substrat devient plus récalcitrant ce qui se manifeste par une chute de la vitesse de transformation du substrat en carboxylates. Pendant cette étape, les activités enzymatiques et les proportions de protéines dirigées contre les parois des végétaux sont maintenues et la diversité microbienne augmente, sans pour autant se traduire par une importante dégradation du substrat. Il semblerait que l'attaque de la fraction récalcitrante dépende de la richesse de la communauté initiale. Si cette dernière est relativement élevée, des microorganismes potentiellement de stratégie K pourraient alors avoir la capacité d'attaquer le substrat récalcitrant.

Plusieurs perspectives à ce travail seraient intéressantes à étudier pour compléter le modèle de dégradation proposé.

i) Dans un contexte plus industriel, il serait pertinent d'évaluer l'efficacité de ces communautés lors d'un changement d'échelle pour vérifier leur applicabilité (scale-up). De la même manière, leur utilisation en bioréacteur continu ainsi que leur robustesse devant des changements de conditions (variation du substrat -seul ou en mélange-, de pH, température, présence d'oxygène, haute teneur en solide...) devraient être étudiées pour permettre le développement d'un procédé industriel. De nouveaux paramètres seraient probablement ainsi identifiés comme clés pour la transformation de la lignocellulose en carboxylates par nos communautés. Il advient aussi ici de mentionner que d'autres communautés microbiennes pourraient être obtenues et évaluées par l'ensemble des procédures étudiées ici, sur d'autres substrats (source, nature, prétraitements..) ou à partir d'autres inocula. Ces dernières permettraient d'évaluer la robustesse de l'approche d'enrichissement mise en œuvre au niveau de l'efficacité de la transformation de substrat lignocellulosique en carboxylates.

ii) Dans un contexte plus fondamental, les perspectives précédentes (scale-up, perturbations, autres communautés microbiennes...) fourniraient aussi de nombreuses informations potentielles sur la compréhension de la structuration taxonomique et fonctionnelle des communautés, si elles étaient suivies de manière la plus complète possible et en dynamique. De plus, comme nous l'avons mentionné au cours de la discussion générale, appliquer l'approche métaprotéomique à l'ensemble des expérimentations réalisées dans ce travail permettrait probablement d'apporter de nouvelles informations de compréhension des écosystèmes microbiens. Cette approche pourrait aussi être enrichie par un fractionnement des échantillons (distinguant les enzymes libres et adhérentes au substrat pour mieux évaluer la structuration spatiales des enzymes), une étude approfondie des protéines membranaires ou encore des études de métagénomique, métatranscriptomique ou de métabolomique. L'ensemble de ces approches permettraient très probablement d'apporter des éléments nouveaux au modèle proposé ici. Pour aller plus loin dans l'établissement du lien entre structuration fonctionnelle et activités macroscopiques et enzymatiques observées, il serait particulièrement intéressant d'identifier les principaux gènes responsables des activités (hémi) cellulolytiques par des approches de screening métagénomique ou de gene fishing. Le clonage de tels gènes dans des microorganismes modèles pourrait permettre en outre une production d'enzymes maîtrisée et leur étude fine en termes de structure et fonction (synergies, inhibition...). Le modèle pourrait ainsi être détaillé au niveau des mécanismes enzymatiques.

De plus la combinaison de telles approches pourrait aussi permettre de découvrir de nouvelles enzymes et mécanismes, et ainsi de réduire les fractions « unknown » ou « undetermined » retrouvées dans les études omiques appliquées à des écosystèmes microbiens naturels ou environnementaux.

iii) Enfin, il serait intéressant de comparer les informations retrouvées en métaprotéomique avec des outils de prédiction fonctionnelle (tels que Picrust ou Tax4Fun) de manière à potentiellement faire évoluer ces derniers vers une meilleure capacité de prédiction. Cette dernière perspective, liée à des considérations de capitalisation de l'information, s'étendrait (bien entendu) à l'ensemble des perspectives précédentes.

Chapitre IX : **Références bibliographiques**

Abot A., Arnal G., Auer L., Lazuka A., Labourdette D., Lamarre S., Trouilh L., Laville E., Lombard V., Potocki-Veronese G., 2016. CAZyChip: dynamic assessment of exploration of glycoside hydrolases in microbial ecosystems. *BMC Genomics*, BioMed Central, 2016, 17 (1), pp.1-12.

Abbott, D.W., Eirín-López, J.M., Boraston, A.B., 2008. Insight into ligand diversity and novel biological roles for family 32 carbohydrate-binding modules. *Mol. Biol. Evol.* 25, 155–167.

Adapa, P.K., Schonau, L.G., Canam, T., Dumonceaux, T., 2011. Quantitative analysis of lignocellulosic components of non-treated and steam exploded barley, canola, oat and wheat straw using Fourier transform infrared spectroscopy. *Faculty Research & Creative Activity*. 107.

Adney, B., Baker, J., 2008. Measurement of cellulase activities (Technical Report No. NREL/TP-510-42628), Laboratory Analytical Procedure. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.

Adney, W.S., Rivard, C.J., Shiang, M., Himmel, M.E., 1991. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass and wastes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 30, 165–183.

Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B., 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.* 29, 675–685.

Aglar, M.T., Wrenn, B.A., Zinder, S.H., Angenent, L.T., 2011. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. *Trends Biotechnol.* 29, 70–78.

Ahring, B.K., Westermann, P., 1985. Methanogenesis from acetate: Physiology of a thermophilic, acetate-utilizing methanogenic bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 28, 15–19.

Alcalde, M., 2007. Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications, in: Polaina, J., MacCabe, A.P. (Eds.), *Industrial Enzymes*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 461–476.

Alessi, A.M., Bird, S.M., Bennett, J.P., Oates, N.C., Li, Y., Dowle, A.A., Polikarpov, I., Young, J.P.W., McQueen-Mason, S.J., Bruce, N.C., 2017. Revealing the insoluble metasecretome of lignocellulose-degrading microbial communities. *Sci. Rep.* 7, 2356.

Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.*, Special Issue on Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Perspectives 101, 4851–4861.

Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.

Anthon, G.E., Barrett, D.M., 2002. Determination of reducing sugars with 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone. *Anal. Biochem.* 305, 287–289.

Antonopoulou, G., Lyberatos, G., 2013. Effect of Pretreatment of Sweet Sorghum Biomass on Methane Generation. *Waste Biomass Valorization* 4 :583-591.

Anwar Z., Gulfranz M., Irshad M., 2014. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7(2):163-173.

Armengaud, J., Hartmann, E.M., Bland, C., 2013. Proteogenomics for environmental microbiology. *Proteomics* 13, 2731–2742.

Atalla, R.H., Vanderhart, D.L., 1984. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science* 223, 283–285.

Auer L., 2016. Vers la maîtrise des communautés microbiennes lignocellulolytiques : impact de la source d'inoculum et du prétraitement du substrat sur le fonctionnement des communautés. INP Toulouse.

Auer, L., Lazuka, A., Sillam-Dussès, D., Miambi, E., O'Donohue, M., Hernandez-Raquet, G., 2017. Uncovering the Potential of Termite Gut Microbiome for Lignocellulose Bioconversion in Anaerobic Batch Bioreactors. *Front. Microbiol.* 8.

Auer, L., Mariadassou, M., O'Donohue, M., Klopp, C., Hernandez-Raquet, G., 2017. Analysis of large 16S rRNA Illumina datasets: impact of singleton read filtering on microbial community description. *Mol. Ecol. Resour.* 17, e122–e132.

Aylward, F.O., Burnum, K.E., Scott, J.J., Suen, G., Tringe, S.G., Adams, S.M., Barry, K.W., Nicora, C.D., Piehowski, P.D., Purvine, S.O., Starrett, G.J., Goodwin, L.A., Smith, R.D., Lipton, M.S., Currie, C.R., 2012. Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. *ISME J.* 6, 1688–1701.

Azizi-Shotorkhoft A., Mohammadabadia T., Motamedib H., Chajia M., Fazaeli H., 2016. Isolation and identification of termite gut symbiotic bacteria with lignocellulose-degrading potential, and their effects on the nutritive value for ruminants of some by-products. *Animal Feed Science and Technology* 221, 234–242.

Bali, G., Meng, X., Deneff, J.I., Sun, Q., Ragauskas, A.J., 2015. The effect of alkaline pretreatment methods on cellulose structure and accessibility. *Chem. Sus. Chem.* 8, 275–279.

Barakat, A., Chuetor, S., Monlau, F., Solhy, A., Rouau, X., 2014. Eco-friendly dry chemo-mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: Impact on energy and yield of the enzymatic hydrolysis. *Appl. Energy* 113, 97–105.

Barakat, A., de Vries, H., Rouau, X., 2013. Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: a review. *Bioresour. Technol.* 134, 362–373.

Barnes SP., Keller J., 2003. Cellulosic waste degradation by rumen-enhanced anaerobic digestion. *Water Sci Technol.* 2003;48(4):155-62.

Bastien, G., Arnal, G., Bozonnet, S., Laguerre, S., Ferreira, F., Fauré, R., Henrissat B., Lefèvre F., Robe P., Bouchez O., Noirot C., Dumon C., O'Donohue M., 2013. Mining for hemicellulases in the fungus-growing termite *Pseudacanthotermes militaris* using functional metagenomics. *Biotechnol. Biofuels* 6:78.

Bensah, E.C., Mensah, M., 2013. Chemical Pretreatment Methods for the Production of Cellulosic Ethanol: Technologies and Innovations. *Int. J. Chem. Eng.* 2013, e719607.

Berlin, A., Maximenko, V., Gilkes, N., Saddler, J., 2007. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 287–296.

Biddle, A., Stewart, L., Blanchard, J., Leschine, S., 2013. Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in diverse gut communities. *Diversity* 5, 627–640.

Bignell, D.E., Eggleton, P., 2000. Termites in ecosystems, in: Abe, T., Bignell, D.E., Higashi, M. (Eds.), *Termites: Evolution, sociality, symbioses, ecology*. Springer Netherlands, pp. 363–387.

Bize, A., Cardona, L., Quémener, E.D.-L., Battimelli, A., Badalato, N., Bureau, C., Madigou, C., Chevret, D., Guillot, A., Monnet, V., Godon, J.-J., Bouchez, T., 2015. Shotgun metaproteomic profiling of biomimetic anaerobic digestion processes treating sewage sludge. *Proteomics*.

Blackman, L.M., Cullerne, D.P., Hardham, A.R., 2014. Bioinformatic characterisation of genes encoding cell wall degrading enzymes in the *Phytophthora parasitica* genome. *BMC Genomics* 15.

Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., et al., 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 57–59.

Boodhun BSF, Mudhoo A, Kumar G, Kim SH, Lin CY, 2017. Research perspectives on constraints, prospects and opportunities in biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol.42, No.45, 27471-27481.

Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J., 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* 382, 769–781.

Brauman, A., Kane, M. D., Labat, M., Breznak, J. A., 1992. Genesis of acetate and methane by gut bacteria of nutritionally diverse termites. *Science* 257, 1384–1387.

Brethauer, S., Studer, M.H., 2014. Consolidated bioprocessing of lignocellulose by a microbial consortium. *Energy Environ. Sci.* 7, 1446.

Breznak, J.A., Brune, A., 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 453–487.

Brouwer, D., Regnerus, C., 2010. High-resolution proton NMR for NMR crystallography of cellulose (Annual report). Redeemer University College, Ancaster, Ontario.

Brulc, J.M., Antonopoulos, D.A., Berg Miller, M.E., Wilson, M.K., Yannarell, A.C., Dinsdale, E.A., Edwards, R.E., Frank, E.D., Emerson, J.B., Wacklin, P., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Nelson, K.E., White, B.A., 2009. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1948–1953.

Brune, A., 2010. Methanogenesis in the Digestive Tracts of Insects, in: Timmis, K.N. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 707–728.

Brune, A., 2014. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 168–180.

Brune, A., Köhl, M., 1996. pH profiles of the extremely alkaline hindguts of soil-feeding termites (Isoptera: Termitidae) determined with microelectrodes. *J. Insect Physiol.* 42, 1121–1127.

Burns, R. G., DeForest, J. L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R. L., Stromberger, M. E., Wallenstein, M. D., et al., 2013. Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. *Soil Biol. Biochem.* 58, 216–234.

Burnum, K.E., Callister, S.J., Nicora, C.D., Purvine, S.O., Hugenholtz, P., Warnecke, F., Scheffrahn, R.H., Smith, R.D., Lipton, M.S., 2011. Proteome insights into the symbiotic relationship between a captive colony of *Nasutitermes corniger* and its hindgut microbiome. *ISME J.* 5, 161–164.

Canam T., Town J., Iroba K., Tabil L., Dumonceaux T., 2013. Pretreatment of lignocellulosic biomass using microorganisms: approaches, advantages, and limitations. InTech (2013).

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B., 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37, D233–D238.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4516–4522.

Carlos C., Fan H., Currie C.R., 2018. Substrate Shift Reveals Roles for Members of Bacterial Consortia in Degradation of Plant Cell Wall Polymers. *Front Microbiol.* 2018; 9: 364.

Casamayor, E. O., Schäfer, H., Ba-eras, L., Pedrós-Alió, C., Muyzer, G., 2000. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 499–508.

Cavaillé, L., Grousseau, E., Pocquet, M., Lepeuple, A.S., Uribelarrea, J.L., Hernandez Raquet, G., Paul, E., 2013. Polyhydroxybutyrate production by direct use of waste activated sludge in phosphorus-limited fed-batch culture. *Bioresour. Technol.* 149, 301–309.

Chandel, A. K., Singh, O. V., 2011. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of biofuel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1289–1303.

Chandra R., Takeuchi H., Hasegawa T., 2012. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16:1462-1476.

Chandra RP., Ewanick SM., Chung PA., Au-Yeung K., Del Rio L., Mabee W., Saddler JN., 2009. Comparison of methods to assess the enzyme accessibility and hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnol Lett.* 31(8):1217-22.

Chandra, R., Takeuchi, H., Hasegawa, T., 2012. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16, 1462–1476.

Chang, J.J., Lin, J.J., Ho, C.Y., Chin, W.C., Huang, C.-C., 2010. Establishment of rumen mimic bacterial consortia: A functional union for bio-hydrogen production from cellulosic bioresource. *Int. J. Hydrog. Energy* 35, 13399–13406.

Chatel, G., De Oliveira Vigier, K., Jérôme F., *ChemSusChem*, 2014, 7, 2774–2787

Chauve, M., 2011. Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique des substrats cellulose. IFP Energies nouvelles, Grenoble.

Chauve, M., Mathis, H., Huc, D., Casanave, D., Monot, F., Ferreira, N.L., 2010. Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases. *Biotechnol. Biofuels* 3, 3.

Chen HZ., Lui ZH., 2017. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass from low to high solids loading. *Engineering in Life Sciences* 17(5):489-499.

Chen, Y., Wen, Y., Zhou, J., Xu, C., Zhou, Q., 2012. Effects of pH on the hydrolysis of lignocellulosic wastes and volatile fatty acids accumulation: The contribution of biotic and abiotic factors. *Bioresour. Technol.* 110, 321–329.

Cheng, Y.F., Edwards, J.E., Allison, G.G., Zhu, W.Y., Theodorou, M.K., 2009. Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture. *Bioresour. Technol.* 100, 4821–4828.

Choudhury P. K., Salem AZM., Jena R., Kumar S., Singh R., Puniya AK., 2015. Rumen Microbiology: An Overview. In A.K. Puniya et al. (eds.), *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer India 2015. 3-16.

Christopherson MR., Dawson JA., Stevenson DM., Cunningham AC., Bramhacharya S., Weimer PJ., Kendzierski C., Suen G., 2014. Unique aspects of fiber degradation by the ruminal ethanologen *Ruminococcus albus* 7 revealed by physiological and transcriptomic analysis. *BMC Genomics* 201415:1066.

Christopherson, M.R., Dawson, J.A., Stevenson, D.M., Cunningham, A.C., Bramhacharya, S., Weimer, P.J., Kendzierski, C., Suen, G., 2014. Unique aspects of fiber degradation by the ruminal ethanologen *Ruminococcus albus* 7 revealed by physiological and transcriptomic analysis. *BMC Genomics* 15, 1066.

Cleveland LR., 1923. Symbiosis between Termites and Their Intestinal Protozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1923 Dec;9(12):424-8.

Cope, J. L., Hammett, A. J. M., Kolomiets, E. A., Forrest, A. K., Golub, K. W., Hollister, E. B., et al., 2014. Evaluating the performance of carboxylate platform fermentations across diverse inocula originating as sediments from extreme environments. *Bioresour. Technol.* 155, 388–394.

Cortes-Totalpa L., Jiménez DJ., de Lima Brossi MJ., Salles JF., van Elsas JD., 2016. Different inocula produce distinctive microbial consortia with similar lignocellulose degradation capacity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016 Sep;100(17):7713-25.

Coutinho PM, Henrissat B. Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In: Gilbert HJ, Davies G, Henrissat H, Svensson B, editors. *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1999. pp. 3–12.

Cragg, S. M., Beckham, G. T., Bruce, N. C., Bugg, T. D., Distel, D. L., Dupree, P., et al., 2015. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 29, 108–119.

Criquet, S., 2002. Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllous forest litter. *J. Microbiol. Methods* 50, 165–173.

D'haeseleer, P., Gladden, J.M., Allgaier, M., Chain, P.S.G., Tringe, S.G., Malfatti, S.A., Aldrich, J.T., Nicora, C.D., Robinson, E.W., Paša-Tolić, L., Hugenholtz, P., Simmons, B.A., Singer, S.W., 2013. Proteogenomic analysis of a thermophilic bacterial consortium adapted to deconstruct switchgrass. *PloS One* 8, e68465.

da Costa Lopes AM., João KG., Morais ARC., Bogel-Łukasik E., Bogel-Łukasik R., 2013. Ionic liquids as a tool for lignocellulosic biomass fractionation. *Sustainable Chemical Processes* 2013 1:3.

da Costa Sousa L., Chundawat SP., Balan V., Dale BE., 2009. 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Curr Opin Biotechnol.* 20(3):339-47.

Darvekar P., Holtzaple MT., 2016. Assessment of Shock Pretreatment of Corn Stover Using the Carboxylate Platform. *Appl Biochem Biotechnol.* 2016 Mar;178(6):1081-94.

Datta, R., 1981. Acidogenic fermentation of corn stover. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 61–77.

Davies, G.J., Gloster, T.M., Henrissat, B., 2005. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol., Catalysis and regulation/Proteins* 15, 637–645.

de Lima Brossi, M.J., Jiménez, D.J., Cortes-Tolalpa, L., van Elsas, J.D., 2016. Soil-derived microbial consortia enriched with different plant biomass reveal distinct players acting in lignocellulose degradation. *Microb. Ecol.* 71, 616–627.

de Souza, A.C., Rietkerk, T., Selin, C.G.M., Lankhorst, P.P., 2013. A robust and universal NMR method for the compositional analysis of polysaccharides. *Carbohydr Polym* 95, 657–663.

Deacon, J., 2005. *Fungal Biology.* Oxford: Blackwell Publishing.

DeAngelis, K. M., Fortney, J. L., Borglin, S., Silver, W. L., Simmons, B. A., Hazen, T. C., 2012. Anaerobic decomposition of switchgrass by tropical soil-derived feedstock-adapted consortia. *MBio* 3, 249–211.

DeAngelis, K.M., Gladden, J.M., Allgaier, M., D’haeseleer, P., Fortney, J.L., Reddy, A., Hugenholtz, P., Singer, S.W., Gheynst, J.S.V., Silver, W.L., Simmons, B.A., Hazen, T.C., 2010. Strategies for Enhancing the Effectiveness of Metagenomic-based Enzyme Discovery in Lignocellulolytic Microbial Communities. *BioEnergy Res.* 3, 146–158.

Deevong, P., Hattori, S., Yamada, A., Trakulnaleamsai, S., Ohkuma, M., Noparatnaraporn, N., Kudo, T., 2004. Isolation and Detection of Methanogens from the Gut of Higher Termites. *Microbes Environ.* 19, 221–226.

Demirbaş, A., 2001. Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. *Energy Convers. Manag.* 42, 1357–1378.

Desvaux, M., 2001. La fermentation de la cellulose par *Clostridium cellulolyticum* : métabolisme modèle d’un clostridium cellulolytique mésophile. Université Henri Poincaré, Nancy 1.

Dheeran, P., Nandhagopal, N., Kumar, S., Jaiswal, Y.K., Adhikari, D.K., 2012. A novel thermostable xylanase of *Paenibacillus macerans* IIPSP3 isolated from the termite gut. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 851–860.

Didderen, I., Destain, J., Thonart, P., 2008. Le bioéthanol de seconde génération: La production d’éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. Presses Agronomiques de Gembloux.

Dietrich C., Köhler T., Brune A., 2014. The Cockroach Origin of the Termite Gut Microbiota: Patterns in Bacterial Community Structure Reflect Major Evolutionary Events. *Appl. Environ. Microbiol.* April 2014 vol. 80 no. 7 2261-2269.

Divne, C., Ståhlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J.K., Teeri, T.T., Jones, T.A., 1994. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science* 265, 524–528.

Donovan, S.E., Eggleton, P., Bignell, D.E., 2001. Gut content analysis and a new feeding group classification of termites. *Ecol. Entomol.* 26, 356–366.

Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200.

Effland, M.J., 1977. Modified procedure to determine insoluble lignin in wood and pulp. *J. Korea Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.* 60:10.

Eggeman, T., Elander, R.T., 2005. Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 96, 2019–2025.

Eggleton, P., 2010. An Introduction to Termites: Biology, Taxonomy and Functional Morphology, in: Bignell, D.E., Roisin, Y., Lo, N. (Eds.), *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Springer Netherlands, pp. 1–26.

Eggleton, P., Bignell, D. E., Sands, W. A., Waite, B., Wood, T. G., Lawton, J. H., 1995. The species richness of termites (Isoptera) under differing levels of forest disturbance in the Mbalmayo forest reserve, southern Cameroon. *J. Trop. Ecol.* 11, 85–98.

Eichorst, S.A., Joshua, C., Sathitsuksanoh, N., Singh, S., Simmons, B.A., Singer, S.W., 2014. Substrate-Specific Development of Thermophilic Bacterial Consortia Using Chemically Pretreated Switchgrass. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.02795–14.

Emtiazi, G., Nahvi, I., 2000. Multi-enzyme production by *Cellulomonas* sp. grown on wheat straw. *Biomass Bioenergy* 19, 31–37.

Eutick, M. L., Veivers, P., O'Brien, R. W., Slaytor, M., 1978. Dependence of the higher termite, *Nasutitermes exitiosus* and the lower termite, *Coptotermes lacteus* on their gut flora. *J. Insect Physiol.* 24, 363–368.

Evans R., Alessi AM., Bird S., McQueen-Mason SJ., Bruce NC., Brockhurst MA., 2017. Defining the functional traits that drive bacterial decomposer community productivity. *ISME J.* 2017 Jul;11(7):1680-1687.

Fan, M., Dai D., Huang, B., 2012. Fourier transform infrared spectroscopy for natural fibres. Salih Mohammed Salih (Ed.), *Fourier Transform – Materials Analysis*, InTech (2012).

Feng, Y., Yu, Y., Wang, X., Qu, Y., Li, D., He, W., Kim, B.H., 2011. Degradation of raw corn stover powder (RCSP) by an enriched microbial consortium and its community structure. *Bioresour. Technol.* 102, 742–747.

Fengel, D. and Wegener G., 1984. Wood—chemistry, ultrastructure, reactions, *J. Polym.Sci. Polym. Lett. Ed.* 23, 601–602.

Fierer, N., Grandy, A. S., Six, J., Paul, E. A., 2009. Searching for unifying principles in soil ecology. *Soil Biol. Biochem.* 41, 2249–2256.

Forrest AK., Hollister EB., Gentry TJ., Wilkinson HH., Holtzapple MT., 2012. Comparison of mixed-acid fermentations inoculated with six different mixed cultures. *Bioresour Technol.* 2012 Aug;118:343-9.

Franco Cairo, J.P.L., Leonardo, F.C., Alvarez, T.M., Ribeiro, D.A., Büchli, F., Costa Leonardo, A.M., Carazzolle, M.F., Costa, F.F., Paes Leme, A.F., Pereira, G.A., Squina, F.M., 2011. Functional characterization and target discovery of glycoside hydrolases from the digestome of the lower termite *Coptotermes gestroi*. *Biotechnol. Biofuels* 4, 50.

Gao, Z.-M., Xu, X., Ruan, L.-W., 2014. Enrichment and characterization of an anaerobic cellulolytic microbial consortium SQD-1.1 from mangrove soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 465–474.

Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J.C., 1999. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Als Roh- Werkst.* 57, 191–202.

Gilbert, H.J., Knox, J.P., Boraston, A.B., 2013. Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 669–677.

Gladden JM., Allgaier M., Miller CS., Hazen TC., VanderGheynst JS., Hugenholtz P., Simmons BA., Singer SW., 2011. Glycoside Hydrolase Activities of Thermophilic Bacterial Consortia Adapted to Switchgrass. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Aug; 77(16): 5804–5812.

Godin, B., 2011. Revue bibliographique sur les méthodes d'analyse des polysaccharides structuraux des biomasses lignocellulosiques. *Biotechnol. Agron. Société Environ.* 15, 165–182.

Godon, J.J., Arcemishère, L., Escudé R., Harmand, J., Miambi, E., Steyer, J.P. 2013. Overview of the oldest existing set of substrate-optimized anaerobic processes: digestive tracts. *Bioenerg. Res.* 6, 1063–1081.

Gollapalli LE., Dale BE., Rivers DM., 2002. Predicting digestibility of ammonia fiber explosion (AFEX)-treated rice straw. *Appl Biochem Biotechnol.* 98:23–35.

Gregg, D., Saddler, J.N., 1996. A Techno-Economic Assessment of the Pretreatment and Fractionation Steps of a Biomass-to-Ethanol Process, in: Wyman, C.E., Davison, B.H. (Eds.), *Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 711–727.

Grieco, M.A.B., Cavalcante, J.J.V., Cardoso, A.M., Vieira, R.P., Machado, E.A., Clementino, M.M., Medeiros, M.N., Albano, R.M., Garcia, E.S., Souza, W. de, Constantino, R., Martins, O.B., 2013. Microbial Community Diversity in the Gut of the South American Termite *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae). *Microb. Ecol.* 65, 197–204.

Guillon, F., Auffret, A., Robertson, J.A., Thibault, J.-F., Barry, J.-L., 1998. Relationships between physical characteristics of sugar-beet fibre and its fermentability by human faecal flora. *Carbohydr. Polym.* 37, 185–197.

Guo, P., Mochizuki, K., Cheng, W., Zhou, M., Gao, H., Zheng, D., Wang, X., Cui, Z., 2011. Effects of different pretreatment strategies on corn stalk acidogenic fermentation using a microbial consortium. *Bioresour. Technol.* 102, 7526–7531.

Guo, P., Zhu, W., Wang, H., Lü, Y., Wang, X., Zheng, D., Cui, Z., 2010. Functional characteristics and diversity of a novel lignocelluloses degrading composite microbial system with high xylanase activity. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 254–264.

Gupta RB., Demirbas A., 2010. *Gasoline, diesel, and ethanol biofuels from grasses and plants*. Cambridge University Press (2010).

Gupta, P., Samant, K., Sahu, A., 2012. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *Int. J. Microbiol.* 2012, e578925.

Gusakov, A.V., Kondratyeva, E.G., Sinitsyn, A.P., 2011. Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. *Int. J. Anal. Chem.* 2011, 283658.

Hamdi, M., Brauman, A., Garcia, J. L. (1992). Effect of an anaerobic bacterial consortium isolated from termites on the degradation of olive-mill waste-water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 408–410.

Hanreich, A., Schimpf, U., Zakrzewski, M., Schlüter, A., Benndorf, D., Heyer, R., Rapp, E., Pühler, A., Reichl, U., Klocke, M., 2013. Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 330–338.

Haruta, S., Cui, Z., Huang, Z., Li, M., Ishii, M., Igarashi, Y., 2002. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 529–534.

Hattori, S., Kamagata, Y., Hanada, S., Shoun, H., 2000. *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 Pt 4, 1601–1609.

Haynes, Abria R (2014). Characterization of Extremophilic Bacteria for Potential in the Biofuel and Bioprocess Industries. Doctoral dissertation, Texas A & M University.

He, S., Ivanova, N., Kirton, E., Allgaier, M., Bergin, C., Scheffrahn, R.H., Kyrpides, N.C., Warnecke, F., Tringe, S.G., Hugenholtz, P., 2013. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analysis of hindgut paunch microbiota in wood- and dung-feeding higher termites. *PLOS ONE* 8, e61126.

Heiss-Blanquet S., Zheng D., Lopes Ferreira N., Lapierre C., Baumberg S., 2011. Effect of pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw on cell wall composition, hydrophobicity and cellulase adsorption. *Bioresour Technol.* 2011 May;102(10):5938-46.

Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10–18.

Henrissat B, Romeu A. Families, superfamilies and subfamilies of glycosyl hydrolases. *Biochem J.* 1995;311(Pt 1):350–1.

Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280, 309–316.

Henrissat, B., Bairoch, A., 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316 (Pt 2), 695–696.

Hervé, C., Rogowski, A., Blake, A.W., Marcus, S.E., Gilbert, H.J., Knox, J.P., 2010. Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15293–15298.

Hess, M., Sczyrba, A., Egan, R., Kim, T.-W., Chokhawala, H., Schroth, G., Luo, S., Clark, D.S., Chen, F., Zhang, T., Mackie, R.I., Pennacchio, L.A., Tringe, S.G., Visel, A., Woyke, T., Wang, Z., Rubin, E.M., 2011. Metagenomic Discovery of Biomass-Degrading Genes and Genomes from Cow Rumen. *Science* 331, 463–467.

Hethener, P., Brauman, A., Garcia, J.-L. (1992). *Clostridium termitidis* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the gut of the wood-feeding termite, *Nasutitermes lujae*. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 52–58.

Heyer R., Kohrs F., Reichl U., Benndorf D., 2015. Metaproteomics of complex microbial communities in biogas plants. *Microb Biotechnol.* 2015 Sep; 8(5): 749–763.

Hidaka, M., Honda, Y., Kitaoka, M., Nirasawa, S., Hayashi, K., Wakagi, T., Shoun, H., Fushinobu, S., 2004. Chitobiose phosphorylase from *Vibrio proteolyticus*, a member of glycosyl transferase family 36, has a clan GH-L-like (alpha/alpha)(6) barrel fold. *Struct. Lond. Engl.* 12, 937–947.

Himmel, M.E., Ding, S.-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D., 2007. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* 315, 804–807.

Himmel, M.E., Xu, Q., Luo, Y., Ding, S.-Y., Lamed, R., Bayer, E.A., 2010. Microbial enzyme systems for biomass conversion: emerging paradigms. *Biofuels* 1, 323–341.

Hobson, P. N., 1998. *The Rumen Microbial Ecosystem*. New York, NY: Elsevier Science Publisher Ltd.

Hofstad, T., Olsen, I., Eribe, E. R., Falsen, E., Collins, M. D., Lawson, P. A. (2000). *Dysgonomonas* gen. nov. to accommodate *Dysgonomonas gadei* sp. nov., an organism isolated from a human gall bladder, and *Dysgonomonas capnocytophagoides* (formerly CDC group DF-3). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 2189–2195.

Hoh, Y., Yeoh, H., Tan, T., 1992. Properties of Beta-Glucosidase Purified from *Aspergillus-Niger* Mutants Usdb-0827 and Usdb-0828. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 590–593.

Hollister, E. B., Hammett, A. M., Holtzapple, M. T., Gentry, T. J., Wilkinson, H. H., 2011. Microbial community composition and dynamics in a semi-industrial-scale facility operating under the MixAlco™ bioconversion platform. *J. Appl. Microbiol.* 110, 587–596.

Hollister, E.B., Forrest, A.K., Wilkinson, H.H., Ebbole, D.J., Malfatti, S.A., Tringe, S.G., Holtzapple, M.T., Gentry, T.J., 2010. Structure and dynamics of the microbial communities underlying the carboxylate platform for biofuel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 389–399.

Hollister, E.B., Hammett, A.M., Holtzapple, M.T., Gentry, T.J., Wilkinson, H.H., 2011. Microbial community composition and dynamics in a semi-industrial-scale facility operating under the MixAlco™ bioconversion platform. *J. Appl. Microbiol.* 110, 587–596.

Holtzapple MT, Lonkar SK, Granda CB. 2015. Producing biofuels via the carboxylate platform. *Chem Eng Prog* 111:52–57.

Holtzapple MT., Davison RR., Ross MK., Aldrett-Lee S., Nagwani M., Lee CM., Lee C., Adelson S., Kaar W., Gaskin D., Shirage H., Chang NS., Chang VS., Loescher ME., 1999. Biomass conversion to mixed alcohol fuels using the MixAlco process. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 79(1–3):609–631.

Holtzapple MT., Granda CB., 2009. Carboxylate platform: the MixAlco process part 1: comparison of three biomass conversion platforms. *Appl Biochem Biotechnol.* 2009 May;156(1-3):95-106.

Holtzapple, M. T., Davison, R. R., Ross, M. K., Albrett-Lee, S., Nagwani, M., Lee, C. M., et al., 1999. Biomass conversion to mixed alcohol fuels using the MixAlco process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 79, 609–631.

Holtzapple, M., Cognata, M., Shu, Y., Hendrickson, C., 1990. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 36, 275–287.

Hongoh, Y., Deevong, P., Hattori, S., Inoue, T., Noda, S., Noparatnaraporn, N., et al., 2006. Phylogenetic diversity, localization, and cell morphologies of members of the candidate phylum TG3 and a subphylum in the

phylum Fibrobacteres, recently discovered bacterial groups dominant in termite guts. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6780–6788.

Hongoh, Y., Deevong, P., Inoue, T., Moriya, S., Trakulnaleamsai, S., Ohkuma, M., et al., 2005. Intra- and interspecific comparisons of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite host. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6590–6599.

Hu, J., Arantes, V., Saddler, J.N., 2011. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnol. Biofuels* 4, 36.

Hu, Z.-H., Yu, H.-Q., 2005. Application of rumen microorganisms for enhanced anaerobic fermentation of corn stover. *Process Biochemistry* 40, 2371–2377.

Hui, W., Jiajia, L., Yucai, L., Peng, G., Xiaofen, W., Kazuhiro, M., Zongjun, C., 2013. Bioconversion of un-pretreated lignocellulosic materials by a microbial consortium XDC-2. *Bioresour. Technol.* 136, 481–487.

Imhoff, J. F., 2005. “Enterobacteriales,” in *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, eds D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, G. M. Garrity, D. R. Boone, P. D. Vos, M. Goodfellow, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer (Boston, MA: Springer), 587–850.

Inward, D., Beccaloni, G., Eggleton, P., 2007. Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biol. Lett.* 3, 331–335.

Isikgor FH., Becer CR., 2015. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.*, 2015,6, 4497-4559 .

Jami, E., Mizrahi, I., 2012. Similarity of the ruminal bacteria across individual lactating cows. *Anaerobe* 18, 338–343.

JanssenPH., Kirs M., 2008. Structure of the Archaeal Community of the Rumen. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Jun; 74(12): 3619–3625.

Jaros, A.M., Rova, U., Berglund, K.A., 2013. Acetate adaptation of clostridia tyrobutyricum for improved fermentation production of butyrate. *SpringerPlus* 2.

Jiang, J., Zhang, Y., Li, K., Wang, Q., Gong, C., Li, M., 2013. Volatile fatty acids production from food waste: Effects of pH, temperature, and organic loading rate. *Bioresour. Technol.* 143, 525–530.

Jiménez, D.J., Dini-Andreote, F., Elsas, J.D. van, 2014. Metataxonomic profiling and prediction of functional behaviour of wheat straw degrading microbial consortia. *Biotechnology for Biofuels* 7, 92.

Jiménez, D.J., Maruthamuthu, M., van Elsas, J.D., 2015. Metasecretome analysis of a lignocellulolytic microbial consortium grown on wheat straw, xylan and xylose. *Biotechnol. Biofuels* 8, 199.

Jin, M., Balan, V., Gunawan, C., Dale, B.E., 2011. Consolidated bioprocessing (CBP) performance of *Clostridium phytofermentans* on AFEX-treated corn stover for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1290–1297.

Johjima, T., Taprab, Y., Noparatnaraporn, N., Kudo, T., Ohkuma, M., 2006. Large-scale identification of transcripts expressed in a symbiotic fungus (*Termitomyces*) during plant biomass degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 195–203.

Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.-O., 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels* 6, 16.

Jørgensen, H., Kristensen, J.B., Felby, C., 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 1, 119–134.

Jouany JP., 2011. Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Prod. Anim.*, 7 (3), 207-225.

Jung H-J. G., Varel V.H., WeimerIP.J., Ralph J., 1999. Accuracy of klason lignin and acid detergent lignin methods as assessed by bomb calorimetry. *J. Agric. Food Chem.* 47, 5, 2005-2008.

Kaar, W.E., Holtzapple, M.T., 2000. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. *Biomass Bioenergy* 18, 189–199.

Käll, L., Canterbury, J.D., Weston, J., Noble, W.S., MacCoss, M.J., 2007. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat. Methods* 4, 923–925.

Kambhampati, S., Eggleton, P., 2000. Taxonomy and Phylogeny of Termites, in: Abe, T., Bignell, D.E., Higashi, M. (Eds.), *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Springer Netherlands, pp. 1–23.

Kappler A., Brune A., 1999. Influence of gut alkalinity and oxygen status on mobilization and size-class distribution of humic acids in the hindgut of soil-feeding termites. *Appl. Soil Ecol.* 13, 219–229.

Karimi, K., Taherzadeh M. J., 2016. A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. *Bioresource Technology* 203:348-356

Karp, E.M., Resch, M.G., Donohoe, B.S., Ciesielski, P.N., O'Brien, M.H., Nill, J.E., Mittal, A., Bidy, M.J., Beckham, G.T., 2015. Alkaline pretreatment of switchgrass. *ACS Sustain. Chem. Eng.*

Kato, S., Haruta, S., Cui, Z.J., Ishii, M., Igarashi, Y., 2008. Network relationships of bacteria in a stable mixed culture. *Microb. Ecol.* 56, 403–411.

Kelil, A., Wang, S., Brzezinski, R., Fleury, A., 2007. CLUSS: Clustering of protein sequences based on a new similarity measure. *BMC Bioinformatics* 8, 286.

Kim, N.-J., Park, G.W., Kang, J., Kim, Y.-C., Chang, H.N., 2013. Volatile fatty acid production from lignocellulosic biomass by lime pretreatment and its applications to industrial biotechnology. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 18, 1163–1168.

Kim, S., Dale, B.E., 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 26, 361–375.

Kivaisi, A.K., Eliapenda, S., 1994. Pretreatment of bagasse and coconut fibres for enhanced anaerobic degradation by rumen microorganisms. *Renew. Energ.* 5, 791-795.

Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C., 2007. Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology / Environmental biotechnology* 18, 207–212.

Kobayashi, Y., Shinkai, T., Koike, S., 2008. Ecological and physiological characterization shows that *Fibrobacter succinogenes* is important in rumen fiber digestion — Review. *Folia Microbiol.* 53, 195–200.

Kobayashia H., Fukuoka A., 2013. Synthesis and utilisation of sugar compounds derived from lignocellulosic biomass. *Green Chem.*, 2013,15, 1740-1763.

Koeck DE., Pechtl A., Zverlov VV., Schwarz WH., 2014. Genomics of cellulolytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology.* 29:171-183.

Köhler, T., Dietrich, C., Scheffrahn, R.H., Brune, A., 2012. High-resolution analysis of gut environment and bacterial microbiota reveals functional compartmentation of the gut in wood-feeding higher termites (*Nasutitermes* spp.). *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4691–4701.

Kohrs, F., Wolter, S., Benndorf, D., Heyer, R., Hoffmann, M., Rapp, E., Bremges, A., Sczyrba, A., Schlüter, A., Reichl, U., 2015. Fractionation of biogas plant sludge material improves metaproteomic characterization to investigate metabolic activity of microbial communities. *Proteomics.* 2015 Oct;15(20):3585-9.

Kong, Y., Teather, R., Forster, R., 2010. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 612–622.

König, H., Li, L., Fröhlich, J., 2013. The cellulolytic system of the termite gut. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7943–7962.

Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T., McSweeney, C.S., 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 663–693.

Kubicek, C. P., Kubicek, E. M., 2016. Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 35, 51–57.

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P., 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 3713–3729.

Kumar, R., Singh, S., Singh, O. V., 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 377–391.

Kuna, E., Behling, R., Valange, S., Chatel, G., Colmenares JC., 2017. Sonocatalysis: A Potential Sustainable Pathway for the Valorization of Lignocellulosic Biomass and Derivatives. *Topics in Current Chemistry (Z)* 375:41.

Kuuskeri, J., Häkkinen, M., Laine, P., Smolander, O.-P., Tamene, F., Miettinen, S., Nousiainen, P., Kemell, M., Auvinen, P., Lundell, T., 2016. Time-scale dynamics of proteome and transcriptome of the white-rot fungus *Phlebia radiata*: growth on spruce wood and decay effect on lignocellulose. *Biotechnol. Biofuels* 9.

L. P. Ramos, M.M.N., 1993. Effect of enzymatic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulosic residues. *Enzyme Microb. Technol.* 821–831.

Labatut, R.A., Angenent, L.T., Scott, N.R., 2011. Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. *Bioresour. Technol.* 102, 2255–2264.

Lamed R., Naimark J., Morgenstern E., Bayer EA., 1987. Specialized cell surface structures in cellulolytic bacteria. *J Bacteriol.* 1987 Aug; 169(8): 3792–3800.

Lamed, R., Setter, E., Kenig, R., Bayer, E.A., 1983. Cellulosome: A Discrete Cell Surface Organelle of *Clostridium Thermocellum* Which Exhibits Separate Antigenic, Cellulose-Binding and Various Cellulolytic Activities. *Biotechnol Bioeng Symp U. S.* 13.

Latrille, É., Trably, É., Larroche, C., 2013. Production de biohydrogène : voie fermentaire sombre. *Tech. Ing. Bioprocédés Dans Domaines Lénergie Environ. base documentaire : TIB161DUO.*

Lazuka, A., Auer, L., Bozonnet, S., Morgavi, D.P., O'Donohue, M., Hernandez-Raquet, G., 2015. Efficient anaerobic transformation of raw wheat straw by a robust cow rumen-derived microbial consortium. *Bioresour. Technol.* 196, 241–249.

Lazuka, A., Roland, C., Barakat, A., Guillon, F., O'Donohue, M., Hernandez-Raquet, G., 2017. Ecofriendly lignocellulose pretreatment to enhance the carboxylate production of a rumen-derived microbial consortium. *Bioresour. Technol.* 236, 225–233.

Leadbetter, J.R., Breznak, J.A., 1996. Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3620–3631.

Lee, D., Owens, V.N., Jeranyama, P., 2007. Composition of herbaceous biomass feedstocks (No. SGINC1-07).

Lee, J.-W., Kim, H.-Y., Koo, B.-W., Choi, D.-H., Kwon, M., Choi, I.-G., 2008. Enzymatic saccharification of biologically pretreated *Pinus densiflora* using enzymes from brown rot fungi. *J. Biosci. Bioeng.* 106, 162–167.

Lee, S.S., Kim, C.-H., Ha, J.K., Moon, Y.H., Choi, N.J., Cheng, K.-J., 2002. Distribution and activities of hydrolytic enzymes in the rumen compartments of Hereford bulls fed alfalfa based diet. *Asian-Aust J Anim Sci* 15, 1725–1731.

Legendre, F., Whiting, M. F., Bordereau, C., Canello, E. M., Evans, T. A., Grandcolas, P., 2008. The phylogeny of termites (Dictyoptera: Isoptera) based on mitochondrial and nuclear markers: implications for the evolution of the worker and pseudergate castes, and foraging behaviors. *Mol. Phylogenet. Evol.* 48, 615–627.

Lequart, C., Ruel, K., Lapierre, C., Pollet, B., Kurek, B., 2000. Abiotic and enzymatic degradation of wheat straw cell wall: a biochemical and ultrastructural investigation. *J. Biotechnol.* 80, 249–259.

Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2013. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol. Biofuels* 6, 41.

Li, Y., Ruan, R., Chen, P.L., Liu, Z., Pan, X., Lin, X., Liu, Y., Mok, C.K., Yang, T., 2004. Enzymatic hydrolysis of corn stover pretreated by combined dilute alkaline treatment and homogenization. *Trans. ASAE* 47, 821–825.

Liang, L., Song, X., Kong, J., Shen, C., Huang, T., Hu, Z., 2014. Anaerobic biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a facultative anaerobe *Pseudomonas* sp. JP1. *Biodegradation* 25, 825–833.

Lin, C.W., Wu, C.-H., Tran, D.T., Shih, M.-C., Li, W.-H., Wu, C.F., 2011. Mixed culture fermentation from lignocellulosic materials using thermophilic lignocellulose-degrading anaerobes. *Process Biochem.* 46, 489–493.

Lin, Y.-W., Tuan, N.N., Huang, S.-L., 2016. Metaproteomic analysis of the microbial community present in a thermophilic swine manure digester to allow functional characterization: A case study. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 115, 64–73.

Liu, C., Wyman, C.E., 2003. The Effect of Flow Rate of Compressed Hot Water on Xylan, Lignin, and Total Mass Removal from Corn Stover. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 5409–5416.

Liu, J., Wang, W., Yang, H., Wang, X., Gao, L., Cui, Z., 2006. Process of rice straw degradation and dynamic trend of pH by the microbial community MC1. *J. Environ. Sci. China* 18, 1142–1146.

Liu, X., Yang, S.-T., 2006. Kinetics of butyric acid fermentation of glucose and xylose by *Clostridium tyrobutyricum* wild type and mutant. *Process Biochem.* 41, 801–808.

Lo, N., Eggleton, P., 2010. Termite phylogenetics and co-cladogenesis with symbionts, in: Bignell, D.E., Roisin, Y., Lo, N. (Eds.), *Biology of termites: A modern synthesis*. Springer Netherlands, pp. 27–50.

Lo, N., Engel, M. S., Cameron, S., Nalepa, C. A., Tokuda, G., Grimaldi, D., et al. (2007). Save isoptera: a comment on Inward et al. *Biol. Lett.* 3, 562–563.

Lo, N., Tokuda, G., Watanabe, H. (2010). Evolution and function of endogenous termite cellulases, in *Biology of Termites: A Modern Synthesis*, eds D. E. Bignell, Y. Roisin, and N. Lo (Dordrecht: Springer), 51–67.

Lo, Y.-C., Saratale, G.D., Chen, W.-M., Bai, M.-D., Chang, J.-S., 2009. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme Microb. Technol.* 44, 417–425.

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42, D490-495.

López, M.J., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López-González, J.A., Verstichel, S., Debeer, L., Wierinck, I., Moreno, J., 2013. Biodelignification of agricultural and forest wastes: Effect on anaerobic digestion. *Biomass Bioenergy* 58, 343–349.

Louime, C., Abazinge, M., Johnson, E., 2006. Location, formation and biosynthetic regulation of cellulases in the gliding bacteria *Cytophaga hutchinsonii*. *Int. J. Molécul. Sci.* 7, 1–11.

Lü, F., Bize, A., Guillot, A., Monnet, V., Madigou, C., Chapleur, O., Mazéas, L., He, P., Bouchez, T., 2014. Metaproteomics of cellulose methanisation under thermophilic conditions reveals a surprisingly high proteolytic activity. *ISME J.* 8, 88–102.

Lu, Y., Wang, Y., Xu, G., Chu, J., Zhuang, Y., Zhang, S., 2010. Influence of High Solid Concentration on Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Steam-Exploded Corn Stover Biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 360–369.

Lv Z., Yang J., Wang E., Yuan H., 2008. Characterization of extracellular and substrate-bound cellulases from a mesophilic sugarcane bagasse-degrading microbial community. *Process Biochemistry.* 43(12):1467-1472.

Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506–577.

Lynd, L.R., Zyl, W.H. van, McBride, J.E., Laser, M., 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 577–583.

Macarron, R., Acebal, C., Castillon, M.P., Dominguez, J.M., de la Mata, I., Pettersson, G., Tomme, P., Claeysens, M., 1993. Mode of action of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. *Biochem. J.* 289, 867–873.

MacArthur, R. H. and E. O. Wilson (1967, reprinted 2001). *The Theory of Island Biogeography*. XV+203 pp. Princeton University Press.

Macdonald, S.S., Blaukopf, M., Withers, S.G., 2015. N-acetylglucosaminidases from CAZy family GH3 are really glycoside phosphorylases, thereby explaining their use of histidine as an acid/base catalyst in place of glutamic acid., *J. Biol. Chem.* 290, 4887, 4887–4895.

Machovič, M., Janeček, Š., 2008. Domain evolution in the GH13 pullulanase subfamily with focus on the carbohydrate-binding module family 48. *Biologia (Bratisl.)* 63, 1057–1068

Machovic, M., Svensson, B., MacGregor, E.A., Janecek, S., 2005. A new clan of CBM families based on bioinformatics of starch-binding domains from families CBM20 and CBM21. *FEBS J.* 272, 5497–5513.

MacLellan, J., 2010. Innovative Strategies to Enhance Enzymatic Hydrolysis: A Review. *MMG 445 Basic Biotechnol. EJournal* 6.

Magoč, T., Salzberg, S. L., 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27, 2957–2963.

Malherbe, S., Cloete, T.E., 2002. Lignocellulose biodegradation : Fundamentals and applications. *Environ. Sci. Biotechnol.* 1, 105–114.

Marynowska, M., Goux, X., Sillam-Dussès, D., Rouland-Lefèvre, C., Roisin, Y., Delfosse, P., Calusinska, M., 2017. Optimization of a metatranscriptomic approach to study the lignocellulolytic potential of the higher termite gut microbiome. *BMC Genomics* 18, 681.

Mathew, A.K., Chaney, K., Crook, M., Humphries, A.C., 2011. Alkaline pre-treatment of oilseed rape straw for bioethanol production: evaluation of glucose yield and pre-treatment energy consumption. *Bioresour. Technol.* 102, 6547–6553.

Mazza, M., 2009. Modification chimique de la cellulose en milieu liquide ionique et CO₂ supercritique. Institut Nationale Polytechnique de Toulouse, Toulouse.

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8, e61217.

Meng X., Foston M., Leisen J., DeMartini J., Wyman CE., Ragauskas AJ., 2013. Determination of porosity of lignocellulosic biomass before and after pretreatment by using Simons' stain and NMR techniques. *Bioresour Technol.* 2013 Sep;144:467-76.

Menon, V., Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* 38, 522–550.

Mesquita, S. da S., Ferreira, V., Faber, M. de O., Jr, N.P., 2010. Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring the B-glucosidase gene. *Electron. J. Biotechnol.* 13, 1–7.

Mewis, K., Lenfant, N., Lombard, V., Henrissat, B., 2016. Dividing the Large Glycoside Hydrolase Family 43 into Subfamilies: a Motivation for Detailed Enzyme Characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1686–1692.

Miao, Z., Grift, T.E., Hansen, A.C., Ting, K.C., 2011. Energy requirement for comminution of biomass in relation to particle physical properties. *Ind. Crops Prod.* 33, 504–513.

Mikaelyan, A., Dietrich, C., Köhler, T., Poulsen, M., Sillam-Dussès, D., Brune, A., 2015. Diet is the primary determinant of bacterial community structure in the guts of higher termites. *Mol. Ecol.* 24, 5284–5295.

Mikaelyan, A., Köhler, T., Lampert, N., Rohland, J., Boga, H., Meuser, K., et al., 2015. Classifying the bacterial gut microbiota of termites and cockroaches: A curated phylogenetic reference database (DictDb). *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 472–482.

Mikaelyan, A., Meuser, K., Brune, A., 2017. Microenvironmental heterogeneity of gut compartments drives bacterial community structure in wood- and humus-feeding higher termites. *FEMS Microbial Ecol.* 93:fiw210.

Mikaelyan, A., Strassert, J. F. H., Tokuda, G., Brune, A., 2014. The fibre-associated cellulolytic bacterial community in the hindgut of wood-feeding higher termites (*Nasutitermes* spp.). *Environ. Microbiol.* 16, 2711–2722.

Millen D., De Beni Arrigoni M., Lauritano P., Rodrigo D. (Eds.), 2016. *Rumenology*. Springer International Publishing. XVI, 314.

Moilanen, U., Kellock, M., Galkin, S., Viikari, L., 2011. The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.* 49, 492–498.

Moletta, R., 2002. *La méthanisation de la matière organique - Aspects généraux*. La méthanisation, Tec & Doc. ed. Lavoisier.

Monlau, F., Barakat, A., Steyer, J.P., Carrere, H., 2012. Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. *Bioresour. Technol.* 120, 241–247.

Moraïs, S., Barak, Y., Caspi, J., Hadar, Y., Lamed, R., Shoham, Y., Wilson, D.B., Bayer, E.A., 2010. Cellulase-Xylanase Synergy in Designer Cellulosomes for Enhanced Degradation of a Complex Cellulosic Substrate. *mBio* 1.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 673–686.

Mourino F., Akkarawongsa R., Weimer P. J., 2011. Initial pH as a Determinant of Cellulose Digestion Rate by Mixed Ruminant Microorganisms In Vitro. *J. Dairy Sci.* 84:848–859.

Murphy, C., Powlowski, J., Wu, M., Butler, G., Tsang, A., 2011. Curation of characterized glycoside hydrolases of Fungal origin. Database J. Biol. Databases Curation 2011.

Nakashima, K., Watanabe, H., Saitoh, H., Tokuda, G., Azuma, J.I., 2002. Dual cellulose digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus shiraki*. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 777–784.

Ni, J., Tokuda, G., 2013. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. Biotechnol. Adv. 31, 838–850.

Nidetzky, B., Zachariae, W., Gercken, G., Hayn, M., Steiner, W., 1994. Hydrolysis of cellooligosaccharides by *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: Experimental data and kinetic modeling. Enzyme Microb. Technol. 16, 43–52.

Nima Nasirian, 2012. Biological hydrogen production from acid-pretreated straw by simultaneous saccharification and fermentation. Afr. J. Agric. RESEARCH 7.

Nimchua T., Thongaram T., Uengwetwanit T., Pongpattanakitsote S., Eurwilaichitr L., 2012. Metagenomic analysis of novel lignocellulose-degrading enzymes from higher termite guts inhabiting microbes. J Microbiol Biotechnol. 2012 Apr;22(4):462-9.

Nishiyama, T., Ueki, A., Kaku, N., Watanabe, K., Ueki, K., 2009. *Bacteroides graminisolvens* sp. nov., a xylanolytic anaerobe isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. Int J Syst Evol Microbiol 59, 1901–1907.

Nozière, P., Ortigues-Marty, I., Loncke, C., Sauvant, D., 2010. Carbohydrate quantitative digestion and absorption in ruminants: from feed starch and fibre to nutrients available for tissues. Animal 4, 1057–1074.

Ohara H., Karita S., Kimura T., Sakka K., Ohmiya K., 2000. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) from *Ruminococcus albus*. Biosci Biotechnol Biochem. 2000 Feb;64(2):254-60.

Olofsson K., Rudolf A., Lidén G., 2008. Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biotechnol. 2008 Mar 20;134(1-2):112-20.

Ospina-Giraldo, M.D., Griffith, J.G., Laird, E.W., Mingora, C., 2010. The CAZyome of *Phytophthora* spp.: A comprehensive analysis of the gene complement coding for carbohydrate-active enzymes in species of the genus *Phytophthora*. BMC Genomics 11, 525.

Overmann, J., Fischer, U., Pfennig, N., 1992. A new purple sulfur bacterium from saline littoral sediments, *Thiorhodovibrio winogradskyi* gen. nov. and sp. nov. Arch. Microbiol. 157, 329–335.

Ozbayram EG., Kleinstuber S., Nikolausz M., Ince B., Ince O., 2017. Enrichment of lignocellulose-degrading microbial communities from natural and engineered methanogenic environments. Appl Microbiol Biotechnol. 2018 Jan;102(2):1035-1043.

Pajual T., O'Donohue, M.J., 2013. Building Tomorrow's Biorefineries. Annexe D1.1. Biocore Report. Availability of lignocellulosic biomass types of interest in the study regions.pdf.

Palmowski, L.M., Müller, J.A., 2000. Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res. 41, 155–162.

Paoletti, A.C., Parmely, T.J., Tomomori-Sato, C., Sato, S., Zhu, D., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Florens, L., Washburn, M.P., 2006. Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian Mediator complexes using normalized spectral abundance factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 18928–18933.

Park JI., Steen EJ., Burd H., Evans SS., Redding-Johnson AM., Bath T., Benke PI., D'haeseleer P., Sun N., Sale KL., Keasling JD., Lee TS., Petzold CJ., Mukhopadhyay A., Singer SW., Simmons BA., Gladden JM., 2012. A Thermophilic Ionic Liquid-Tolerant Cellulase Cocktail for the Production of Cellulosic Biofuels. *PLoS ONE* 7(5): e37010.

Percival Zhang, Y.-H., Himmel, M.E., Mielenz, J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 24, 452–481.

Perez, S., Mazeau, K., 2004. Conformations, structures and morphologies of celluloses, in: *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*. Dekker, pp. 41–68.

Petersson, A., Thomsen, M.H., Hauggaard-Nielsen, H., Thomsen, A.-B., 2007. Potential bioethanol and biogas production using lignocellulosic biomass from winter rye, oilseed rape and faba bean. *Biomass Bioenergy* 31, 812–819.

Pfennig, N., Trüper, H.G., 1992. The Family Chromatiaceae, in: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer New York, pp. 3200–3221.

Pitson, S.M., Voragen, A.G., Beldman, G., 1996. Stereochemical course of hydrolysis catalyzed by arabinofuranosyl hydrolases. *FEBS Lett.* 398, 7–11.

Pope, P.B., Mackenzie, A.K., Gregor, I., Smith, W., Sundset, M.A., McHardy, A.C., Morrison, M., Eijsink, V.G.H., 2012. Metagenomics of the Svalbard Reindeer Rumen Microbiome Reveals Abundance of Polysaccharide Utilization Loci. *PLoS ONE* 7, e38571.

Poretsky, R., Rodriguez, R. L. M., Luo, C., Tsementzi, D., Konstantinidis, K. T. (2014). Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS ONE* 9:e93827.

Prins, R.A., Vugt, F. van, Hungate, R.E., Vorstenbosch, C.J.A.H.V. van, 1972. A comparison of strains of *Eubacterium cellulosolvens* from the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek* 38, 153–161.

Pu Y., Jiang N., Ragauskas AJ., 2007. Ionic Liquid as a Green Solvent for Lignin. *Journal of Wood Chem and Tehno.* 27(1):23-33.

Puniya AK., Salem AZM., Kumar S., Dagar SS., Griffith GW., Puniya M., Ravella SR., Kumar N., Dhewa T., Kumar R., 2015. Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant productivity: A review. *Journal of Integrative Agriculture.* 14(3):550-560.

Radek, R., 1999. Flagellates, bacteria, and fungi associated with termites : diversity and function in nutrition - a review. *Ecotropica* 5, 183–196.

Raganati, F., Procentese, A., Olivieri, G., Russo, M.E., Salatino, P., Marzocchella, A., 2014. MFA of *clostridium acetobutylicum* pathway: The role of glucose and xylose on the acid formation/uptake. *Chem. Eng. Trans.* 38, 337–342.

- Ramsak, A., Peterka, M., Tajima, K., Martin, J.C., Wood, J., Johnston, M.E.A., Aminov, R.I., Avgustin, G., 2000. Unravelling the genetic diversity of ruminal bacteria belonging to the CFB phylum. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33, 69–79.
- Ransom-Jones, E., Jones, D.L., McCarthy, A.J., McDonald, J.E., 2012. The Fibrobacteres: an important phylum of cellulose-degrading bacteria. *Microb. Ecol.* 63, 267–281.
- Reddy, A. P., Allgaier, M., Singer, S. W., Hazen, T. C., Simmons, B. A., Hugenholtz, P., et al., 2011. Bioenergy feedstock-specific enrichment of microbial populations during high-solids thermophilic deconstruction. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 2088–2098.
- Reddy, A. P., Simmons, C. W., Claypool, J., Jabusch, L., Burd, H., Hadi, M. Z., et al., 2012. Thermophilic enrichment of microbial communities in the presence of the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1362–1370.
- Reddy, A. P., Simmons, C. W., D'haeseleer, P., Khudyakov, J., Burd, H., Hadi, M., et al., 2013. Discovery of microorganisms and enzymes involved in high-solids decomposition of rice straw using metagenomic analyses. *PLoS ONE* 8:e77985.
- Reddy, A., Allgaier, M., Singer, S., Hazen, T., Simmons, B., Hugenholtz, P., VanderGheynst, J., 2011. Bioenergy feedstock-specific enrichment of microbial populations during high solids thermophilic deconstruction. *Biotechnol Bioeng.* 108, 2088-98.
- Robertson, J.A., de Monredon, F.D., Dysseleer, P., Guillon, F., Amado, R., Thibault, J.-F., 2000. Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a european collaborative study. *LWT - Food Sci. Technol.* 33, 72–79.
- Robertson, J.A., Eastwood, M.A., 1981. A method to measure the water-holding properties of dietary fibre using suction pressure. *Br. J. Nutr.* 46, 247–255.
- Rollin JA., Zhu Z., Sathitsuksanoh N., Zhang YH., 2011. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. *Biotechnol Bioeng.* 108(1):22-30.
- Rosnow, J.J., Anderson, L.N., Nair, R.N., Baker, E.S., Wright, A.T., 2017. Profiling microbial lignocellulose degradation and utilization by emergent omics technologies. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 626–640.
- Rossmassler, K., Dietrich, C., Thompson, C., Mikaelyan, A., Nonoh, J. O., Scheffrahn, R. H., et al., 2015. Metagenomic analysis of the microbiota in the highly compartmented hindguts of six wood- or soil-feeding higher termites. *Microbiome* 3, 56.
- Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J.K., Jones, T.A., 1990. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* 249, 380–386.
- Rubin, E.M., 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454, 841–845.
- Santana, R. H., Catão, E. C., Lopes, F. A., Constantino, R., Barreto, C. C., Krüger, R. H., 2015. The gut microbiota of workers of the litter-feeding termite *Syntermes wheeleri* (Termitidae: Syntermitinae): Archaeal, bacterial, and fungal communities. *Microb. Ecol.* 70, 545–556.
-

- Sawanon, S., Kobayashi, Y., 2006. Synergistic fibrolysis in the rumen by cellulolytic *Ruminococcus flavefaciens* and non-cellulolytic *Selenomonas ruminantium*: Evidence in defined cultures. *Anim. Sci. J.* 77, 208–214.
- Scharf, M. E., 2015. Omic research in termites: an overview and a roadmap. *Front. Genet.* 6:76.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-Source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75, 7537–7541.
- Schneider, T., Schmid, E., de Castro, J.V., Cardinale, M., Eberl, L., Grube, M., Berg, G., Riedel, K., 2011. Structure and function of the symbiosis partners of the lung lichen (*Lobaria pulmonaria* L. Hoffm.) analyzed by metaproteomics. *Proteomics* 11, 2752–2756.
- Schultz, J.E., Breznak, J.A., 1978. Heterotrophic bacteria present in hindguts of wood-eating termites *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 930–936.
- Scully, E. D., Geib, S. M., Hoover, K., Tien, M., Tringe, S. G., Barry, K. W., et al., 2013. Metagenomic profiling reveals lignocellulose degrading system in a microbial community associated with a wood-feeding beetle. *PLoS ONE* 8:e73827.
- Seaman J., Moore W., Mitchell R., Millet M., 1954. Techniques for determination of wood constituents by quantitative paper chromatography. *Tappi J* 37:336-343.
- Shah FA., Mahmood Q., Shah MM., Pervez A., Asad SA., 2014. Microbial Ecology of Anaerobic Digesters: The Key Players of Anaerobiosis. *ScientificWorldJournal.* 2014; 2014: 183752.
- Shallom, D., Belakhov, V., Solomon, D., Gilead-Gropper, S., Baasov, T., Shoham, G., Shoham, Y., 2002. The identification of the acid–base catalyst of α -arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase. *FEBS Lett.* 514, 163–167.
- Sheng, P., Huang, J., Zhang, Z., Wang, D., Tian, X., Ding, J., 2016. Construction and characterization of a cellulolytic consortium enriched from the hindgut of *Holotrichia parallela* larvae. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1646.
- Sills DL., Gossett JM., 2012. Using FTIR to predict saccharification from enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated biomasses. *Biotechnol Bioeng.* 109(2):353-63.
- Singh, K.M., Reddy, B., Patel, D., Patel, A.K., Parmar, N., Patel, A., Patel, J.B., Joshi, C.G., 2014. High potential source for biomass degradation enzyme discovery and environmental aspects revealed through metagenomics of indian buffalo rumen. *BioMed Res. Int.* 2014, 2014, e267189.
- Slaytor, M., 1992. Cellulose digestion in termites and cockroaches: what role do symbionts play? *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.* 103, 775–784.
- Smant, G., Stokkermans, J. P., Yan, Y., de Boer, J. M., Baum, T. J., Wang, X., et al., 1998. Endogenous cellulases in animals: isolation of beta-1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 4906–4911.
-

Song Z., Yang G., Liu X., Yan Z., Yuan Y., Liao Y., 2014. Comparison of Seven Chemical Pretreatments of Corn Straw for Improving Methane Yield by Anaerobic Digestion. *PLOS ONE* 9(6): e101617.

Sørensen, H.R., Meyer, A.S., Pedersen, S., 2003. Enzymatic hydrolysis of water-soluble wheat arabinoxylan. 1. Synergy between alpha-L-arabinofuranosidases, endo-1,4-beta-xylanases, and beta-xylosidase activities. *Biotechnol. Bioeng.* 81, 726–731.

Soundar, S., Chandra, T.S., 1987. Cellulose degradation by a mixed bacterial culture. *J. Ind. Microbiol.* 2, 257–265.

Speda, J., Jonsson, B.-H., Carlsson, U., Karlsson, M., 2017. Metaproteomics-guided selection of targeted enzymes for bioprospecting of mixed microbial communities. *Biotechnol. Biofuels* 10.

Stackebrandt, E., Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. System. Bacteriol.* 44, 846–849.

Stam, M.R., Danchin, E.G.J., Rancurel, C., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2006. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of alpha-amylase-related proteins. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* 19, 555–562.

Starke R, Müller M, Gaspar M, Marz M, Küsel K, Totsche KU, von Bergen M, Jehmlich N, 2017. Candidate Brocadiales dominates C, N and S cycling in anoxic groundwater of a pristine limestone-fracture aquifer. *J Proteomics* 152: 153–160.

Su NY., Scheffrahn RH., 2000. Termites as pests of buildings. T. Abe et al. (eds.) *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology.* 437-453.

Suen, G., Scott, J.J., Aylward, F.O., Adams, S.M., Tringe, S.G., Pinto-Tomás, A.A., Foster, C.E., Pauly, M., Weimer, P.J., Barry, K.W., Goodwin, L.A., Bouffard, P., Li, L., Osterberger, J., Harkins, T.T., Slater, S.C., Donohue, T.J., Currie, C.R., 2010. An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. *PLoS Genet.* 6, e1001129.

Sun, X., Yang, Y., Zhang, N., Shen, Y., Ni, J., 2015. Draft genome sequence of *Dysgonomonas macrotermis* strain JCM 19375T, isolated from the gut of a termite. *Genome Announc.* 3, e00963–e00915.

Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11.

Svartström, O., Alneberg, J., Terrapon, N., Lombard, V., de Bruijn, I., Malmsten, J., Dalin, A.-M., El Muller, E., Shah, P., Wilmes, P., Henrissat, B., Aspeborg, H., Andersson, A.F., 2017. Ninety-nine de novo assembled genomes from the moose (*Alces alces*) rumen microbiome provide new insights into microbial plant biomass degradation. *ISME J.* 11, 2538–2551.

Swatloski RP., Spear SK., Holbrey JD., Rogers RD., 2002. Dissolution of cellulose with ionic liquids. *J Am Chem Soc.* 124(18):4974-5.

Taylor, B. F., 1983. Aerobic and anaerobic catabolism of vanillic acid and some other methoxy-aromatic compounds by *Pseudomonas* sp. strain PN-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1286–1292.

Teeri, T.T., 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* 15, 160–167.

Ten Have, R., Teunissen, P.J., 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chem. Rev.* 101, 3397–3413.

Terinte, N., Ibbett, R., Schuster, K.C., 2011. Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by X-ray diffraction (waxd): comparison between measurement techniques. *Lenzing. Berichte* 89, 118–131.

Thanakoses P., Mostafa NA., Holtzaple MT., 2003. Conversion of sugarcane bagasse to carboxylic acids using a mixed culture of mesophilic microorganisms. *Appl Biochem Biotechnol.* 2003 Spring;105 -108:523-46.

Thiebaud, S., 1995. Valorisation chimique de composés lignocellulosiques : obtention de nouveaux matériaux. Institut Nationale Polytechnique de Toulouse, Toulouse.

Thongaram, T., Hongoh, Y., Kosono, S., Ohkuma, M., Trakulnaleamsai, S., Noparatnaraporn, N., Kudo, T., 2005. Comparison of bacterial communities in the alkaline gut segment among various species of higher termites. *Extremophiles* 9, 229–238.

Tokuda, G., Watanabe, H., 2007. Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. *Biol. Lett.* 3, 336–339.

Tokuda, G., Watanabe, H., Hojo, M., Fujita, A., Makiya, H., Miyagi, M., Arakawa, G., Arioka, M., 2012. Cellulolytic environment in the midgut of the wood-feeding higher termite *Nasutitermes takasagoensis*. *J. Insect Physiol.* 58, 147–154.

Tokuda, G., Watanabe, H., Lo, N., 2007. Does correlation of cellulase gene expression and cellulolytic activity in the gut of termite suggest synergistic collaboration of cellulases? *Gene* 401, 131–134.

Tollier, M.T., Robin, J.P., 1979. Adaptation de la méthode à l'orcino sulfurique au dosage automatique des oses neutres et totaux. *Ann. Technol. Agric.* 28, 1-15

Tomme, P., Heriban, V., Claeyssens, M., 1990. Adsorption of two cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei* to Avicel: evidence for “exo-exo” synergism and possible “loose complex” formation. *Biotechnol. Lett.* 12, 525–530.

Torella, J.P., Ford, T.J., Kim, S.N., Chen, A.M., Way, J.C., Silver, P.A. 2013. Tailored fatty acid synthesis via dynamic control of fatty acid elongation. *PNAS*, 110:11290-5.

Touzel JP., O'Donohue M., Debeire P., Samain E., Breton C., 2000. *Thermobacillus xylanilyticus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000 Jan;50 Pt 1:315-20.

Toyoda, A., Iio, W., Mitsumori, M., Minato, H., 2009. Isolation and Identification of Cellulose-Binding Proteins from Sheep Rumen Contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1667–1673.

Trifonova, R., Postma, J., Ketelaars, J.J.M.H., Elsas, J.D. van, 2008. Thermally Treated Grass Fibers as Colonizable Substrate for Beneficial Bacterial Inoculum. *Microb Ecol* 56, 561–571.

Van Soest, P.J., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant.* Cornell University Press, 1994 - 476.

Van Soest, P.J., Wine, J.R., 1967. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents 5.

Vasquez ST., Holtzapple MT., 2013. Biomass Conversion to Hydrocarbon Fuels Using the MixAlco™ Process. Oil & Gas Science and Technology. IFP Energies Nouvelles.

Wang J., Zheng Y., Zhang S., 2010. The application of ionic liquids in dissolution and separation of lignocellulose. InTech (2010).

Wang, C., Dong, D., Wang, H., Müller, K., Qin, Y., Wang, H., Wu, W., 2016. Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost: new insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition. Biotechnol. Biofuels 9.

Wang, H., Vuorela, M., Keränen, A.-L., Lehtinen, T.M., Lensu, A., Lehtomäki, A., Rintala, J., 2010. Development of microbial populations in the anaerobic hydrolysis of grass silage for methane production. FEMS Microbiol. Ecol. 72, 496–506.

Wang, W., Yan, L., Cui, Z., Gao, Y., Wang, Y., Jing, R., 2011. Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. Bioresour. Technol. 102, 9321–9324.

Warnecke, F., Luginbühl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T.H., Stege, J.T., Cayouette, M., McHardy, A.C., Djordjevic, G., Aboushadi, N., Sorek, R., Tringe, S.G., Podar, M., Martin, H.G., Kunin, V., Dalevi, D., Madejska, J., Kirton, E., Platt, D., Szeto, E., Salamov, A., Barry, K., Mikhailova, N., Kyrpides, N.C., Matson, E.G., Ottesen, E.A., Zhang, X., Hernández, M., Murillo, C., Acosta, L.G., Rigoutsos, I., Tamayo, G., Green, B.D., Chang, C., Rubin, E.M., Mathur, E.J., Robertson, D.E., Hugenholtz, P., Leadbetter, J.R., 2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. Nature 450, 560–565.

Watanabe, H., Noda, H., Tokuda, G., Lo, N., 1998. A cellulase gene of termite origin. Nature 394, 330–331.

Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., Barton, G. J., 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. Bioinformatics 25, 1189–1191.

Wei, H., Xu, Q., Taylor, L. E., Baker, J. O., Tucker, M. P., Ding, S. Y., 2009. Natural paradigms of plant cell wall degradation. Curr. Opin. Biotechnol. 20, 330–338.

Wertz, J., 2010. La lignine. Document ValBiom, Gembloux AgroBio Tech.

Wettstein SG., Alonso DM., I Gürbüz E., Dumesic JA., 2012. A roadmap for conversion of lignocellulosic biomass to chemicals and fuels. Current Opinion in Chemical Engineering 2012, 1:218–224.

Wilmes, P., Bond, P.L., 2004. The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. Environ. Microbiol. 6, 911–920.

Wilmes, P., Heintz-Buschart, A., Bond, P.L., 2015. A decade of metaproteomics: Where we stand and what the future holds. Proteomics.

Wilson, D.B., 2009. Cellulases and biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.*, Energy biotechnology / Environmental biotechnology 20, 295–299.

Wong M.T., Wang W., Lacourt M., Couturier M., Edwards E.A., Master E.R., 2016. Substrate-Driven Convergence of the Microbial Community in Lignocellulose-Amended Enrichments of Gut Microflora from the Canadian Beaver (*Castor canadensis*) and North American Moose (*Alces americanus*). *Front Microbiol.* 2016; 7: 961.

Wongwilaiwalin, S., Laothanachareon, T., Mhuantong, W., Tangphatsornruang, S., Eurwilaichitr, L., Igarashi, Y., Champreda, V., 2013. Comparative metagenomic analysis of microcosm structures and lignocellulolytic enzyme systems of symbiotic biomass-degrading consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8941–8954.

Wongwilaiwalin, S., Rattanachomsri, U., Laothanachareon, T., Eurwilaichitr, L., Igarashi, Y., Champreda, V., 2010. Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. *Enzyme Microb. Technol.* 47, 283–290.

Wyman C.E., 2007. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends Biotechnol.*, 25 (2007), pp. 153-157.

Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R., Lee, Y.Y., Mitchinson, C., Saddler, J.N., 2009. Comparative sugar recovery and fermentation data following pretreatment of poplar wood by leading technologies. *Biotechnol. Prog.* 25, 333–339.

Xu F., Yu J., Tesso T., Dowell F., Wang D., 2013. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. *Applied energy* 104:801-809.

Yan, L., Gao, Y., Wang, Y., Liu, Q., Sun, Z., Fu, B., Wen, X., Cui, Z., Wang, W., 2012. Diversity of a mesophilic lignocellulolytic microbial consortium which is useful for enhancement of biogas production. *Bioresour. Technol.* 111, 49–54.

Yang, B., Wyman, C.E., 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 2, 26–40.

Yang, H., Wu, H., Wang, X., Cui, Z., Li, Y., 2011. Selection and characteristics of a switchgrass-colonizing microbial community to produce extracellular cellulases and xylanases. *Bioresource Technology* 102, 3546–3550.

Yang, Y. J., Zhang, N., Ji, S. Q., Lan, X., Zhang, K., Shen, Y. L., 2014. *Dysgonomonas macrotermis* sp. nov., isolated from the hindgut of a fungus-growing termite. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 2956–2961.

Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., 2008. The all-species living tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 241–250.

Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., 2014. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* 42(Database issue), D643–D648.

Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S., 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 670–679.

Yue, Z.-B., Yu, H. Q., Harada, H., Li, Y.-Y., 2007. Optimization of anaerobic acidogenesis of an aquatic plant, *Canna indica* L., by rumen cultures. *Water Res.* 41, 2361–2370.

Yue, Z.-B., Yu, H.-Q., Hu, Z.-H., Harada, H., Li, Y.-Y., 2008. Surfactant-enhanced anaerobic acidogenesis of *Canna indica* L. by rumen cultures. *Bioresour. Technol.* 99, 3418–3423.

Zhang YHPJ., Himmel ME., Mielenz JR., 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances.* 24:452-481.

Zhang, J., Chu, D., Huang, J., Yu, Z., Dai, G., Bao, J., 2010. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 105, 718–728.

Zhao, H., Yu, H., Yuan, X., Piao, R., Li, H., Wang, X., Cui, Z., 2014. Degradation of lignocelluloses in rice straw by BMC-9, a composite microbial system. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 585–724.

Zhao, M., Wang, Y., Zhang, C., Li, S., Huang, Z., Ruan, W., 2014. Synergistic and Pretreatment Effect on Anaerobic Co-Digestion from Rice Straw and Municipal Sewage Sludge. *BioResources* 9, 5871–5882.

Zhao, X., Zhang, L., Liu, D., 2012. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 6, 465–482.

Zhao, Y., Wang, Y., Zhu, J.Y., Ragauskas, A., Deng, Y., 2008. Enhanced enzymatic hydrolysis of spruce by alkaline pretreatment at low temperature. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 1320–1328.

Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., Xu, J.-R., 2013. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics* 14, 274.

Zhou X., Kovaleva ES., Wu-Scharf D., Campbell JH., Buchman GW., Boucias DG., Scharf ME., 2010. Production and characterization of a recombinant beta-1,4-endoglucanase (glycohydrolase family 9) from the termite *Reticulitermes flavipes*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2010 Jul;74(3):147-62.

Zhou, X., Smith, J.A., Oi, F.M., Koehler, P.G., Bennett, G.W., Scharf, M.E., 2007. Correlation of cellulase gene expression and cellulolytic activity throughout the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Gene* 395, 29–39.

Zhou, Y., Pope, P.B., Li, S., Wen, B., Tan, F., Cheng, S., Chen, J., Yang, J., Liu, F., Lei, X., Su, Q., Zhou, C., Zhao, J., Dong, X., Jin, T., Zhou, X., Yang, S., Zhang, G., Yang, H., Wang, J., Yang, R., Eijsink, V.G.H., Wang, J., 2014. Omics-based interpretation of synergism in a soil-derived cellulose-degrading microbial community. *Sci. Rep.* 4, 5288.

Zhu, J.Y., Pan, X.J., 2010. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. *Bioresour. Technol.* 101, 4992–5002.

Zhu, N., Yang, J., Ji, L., Liu, J., Yang, Y., Yuan, H., 2016. Metagenomic and metaproteomic analyses of a corn stover-adapted microbial consortium EMSD5 reveal its taxonomic and enzymatic basis for degrading lignocellulose. *Biotechnol. Biofuels* 9.

Chapitre X : **Données supplémentaires et annexes**

Annexe 1 : Détermination d'activités enzymatiques en milieu complexe

Les activités enzymatiques cellulases, hémicellulases et auxiliaires sont les moteurs de l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique. Au-delà de l'analyse du comportement macrocinétique de dégradation, il paraît donc primordial de mesurer l'activité des différentes enzymes impliquées pour être à même de comprendre les phénomènes mis en jeu. Cela pourrait par exemple permettre de comprendre à quel stade l'hydrolyse est limitée ou favorisée (hydrolyse du/des polymères, accumulation d'inhibiteurs...), dans quelle phase réactionnelle se situe chaque type d'enzyme et ce en dynamique. Aussi, la comparaison entre activité enzymatique et structure du substrat en dynamique pourrait apporter des éléments de compréhension sur l'accès des enzymes au substrat.

Alors que le dosage d'activité enzymatique est commun en milieu simple, son application à des milieux diphasiques nécessite quelques précautions supplémentaires que nous allons aborder dans cette partie.

Un protocole de dosage d'activité enzymatique se déroule en trois étapes que sont, la préparation de l'extrait enzymatique, l'incubation enzyme-substrat et le dosage des produits de réaction enzymatique.

Le point clé d'un dosage enzymatique est de bien comprendre ce que l'on mesure. Selon la théorie Michaélie, deux paramètres permettent de décrire une cinétique enzymatique simple (en l'absence d'inhibition). La vitesse initiale maximale, ou $V_{0,max}$ et la constante de Michaelis, ou K_m qui correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale est divisée par deux.

En termes d'activité, on s'intéresse à la mesure de $V_{0,max}$ qui correspond à la vitesse de dégradation d'un substrat (ou de production du produit) dans des conditions de substrat non limitantes. Deux mises en œuvre sont alors possibles. D'une part, la cinétique enzymatique peut être déterminée et la vitesse initiale maximale correspondra alors à la pente de la partie linéaire de cette dernière. La variable sera alors le temps d'incubation et donc le pas de mesure. D'autre part, la réaction enzymatique peut être mise en place dans des conditions telles que le substrat reste en quantité non limitante tout au long de la réaction. Le temps d'incubation est alors fixe, et c'est la quantité d'enzyme qui doit être adaptée à la mesure de la vitesse initiale maximale. Selon le NREL (National Renewable Energy Laboratory) (Adney and Baker, 2008), la mesure de l'activité enzymatique est correcte selon cette seconde méthode dès lors que l'on se situe à

4% de conversion du substrat. En fait c'est cette valeur fixe, bien qu'arbitraire, qui permet de comparer des échantillons enzymatiques, représentés par la dilution à appliquer pour atteindre le pourcentage de conversion de 4% du substrat. C'est cette stratégie qui est la plus souvent mise en œuvre lorsqu'on souhaite déterminer des activités enzymatiques, les cinétiques elles sont plus souvent utilisées pour caractériser des enzymes plus finement (paramètres cinétiques, paramètres d'inhibition par exemple)

L'activité s'exprime en unité d'activité (UA) par unité de volume de milieu. Une UA correspond à la conversion d'une μ mole de substrat en une minute, ou encore à la génération d'une μ mole de produit par minute. Il peut aussi être intéressant de l'exprimer en UA/mg de protéines. La concentration en protéines est alors déterminée par les méthodes de Lowry ou Bradford.

A1.1. Incubation enzyme - substrat

Lors de l'étape d'incubation plusieurs paramètres sont contrôlés, comme la température, le pH, le temps d'incubation et le type de substrat. Il est important de toujours comparer des activités obtenues dans les mêmes conditions (notamment de pH et de température) car ces paramètres peuvent fortement influencer l'efficacité enzymatique.

Devant l'abondance des substrats disponibles, nous n'allons pas décrire l'ensemble de ces derniers mais uniquement les principes fondamentaux des réactions mises en jeu pour chaque catégorie de substrat. L'enjeu de ces substrats est d'être spécifique d'une activité ou d'un ensemble d'activités. Il est important de comprendre les réactions mises en jeu pour analyser les résultats.

La **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** présente la plupart des substrats disponibles pour l'évaluation des activités cellulases avec les techniques de détection des sucres produits et les enzymes associés. On retrouve des substrats solubles ou insolubles, portant des groupes fluorescents ou colorés, des substrats naturels ou chimiquement modifiés.

Table A1-1: Substrats adaptés au dosage des activités cellulases, Percival Zhang et al. (2006)

Substrate	Detection ^a	Enzymes
Soluble		
Short chain (low DP)		
Cellodextrins	RS, HPLC, TLC	Endo, Exo, BG
Radio-labeled cellodextrins	TLC plus liquid scintillation	Endo, Exo, BG
Cellodextrin derivatives		
β -methylumbelliferyl-oligosaccharides	Fluorophore liberation, TLC	Endo, Exo, BG
<i>p</i> -nitrophenol-oligosaccharides	Chromophore liberation, TLC	Endo, Exo, BG
Long chain cellulose derivatives		
Carboxymethyl cellulose (CMC), hydroxymethyl cellulose (HEC)	RS, viscosity	Endo
Dyed CMC	Dye liberation	Endo
Insoluble		
Crystalline cellulose		
Cotton, microcrystalline cellulose (Avicel)	RS, TSS, HPLC	Total, Endo, Exo
Valonia cellulose, bacterial cellulose	RS, TSS, HPLC	Total, Endo, Exo
Amorphous cellulose		
PASC, alkali- swollen cellulose RAC	RS, TSS, HPLC, TLC	Total, Endo, Exo
Dyed cellulose	Dye liberation	Total, Endo
Fuorescent cellulose	Fluorophore liberation	Total
Chromogenic and fluorephoric derivatives		
Trinitrophenyl-carboxymethylcellulose (TNP-CMC)	Chromophore liberation	Endo
Fluram-cellulose	Fluorophore liberation	Endo, Total
Practical cellulose-containing substrates		
α -cellulose, pretreated lignocellulosic biomass	HPLC, RS	Total

^aRS, reducing sugars; TSS, total soluble sugars

Par exemple la carboxyméthylcellulose (CMC) est une cellulose modifiée chimiquement pour la rendre soluble. Elle peut se présenter sous la forme de sels de sodium (Figure A1-11) mais possède pour autant un degré de polymérisation pouvant aller de 100 à 2000 (Percival Zhang et al., 2006). Puisqu'elle affiche un très faible ratio F_{RE}/F_a (entre 5.10^{-4} et 1.10^{-2}), on l'utilise pour déterminer l'activité endoglucanase. Pour rappel, F_{RE}/F_a représente le ratio entre le nombre d'extrémités réductrices et le nombre de liaisons glucosidiques accessibles aux cellulases.

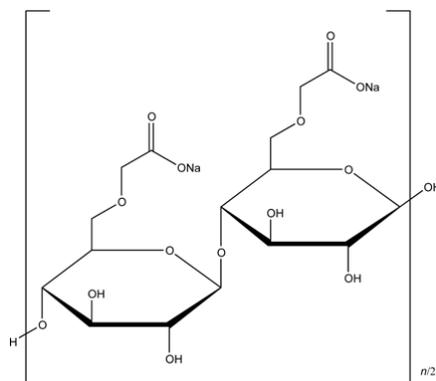


Figure A1-1 : Structure chimique du sel de sodium carboxyméthylcellulose (CMC-Na)

Au contraire l'Avicel est une cellulose microcristalline insoluble qui possède un F_{RE}/F_a élevé, compris entre 0,3 et 1,1, bien supérieur à celui du coton ou du papier (Percival Zhang et al., 2006). Elle est donc principalement utilisée pour évaluer l'activité exocellulase, bien que cela reste controversé. En effet si son taux de cristallinité et son ratio F_{RE}/F_a favorisent l'action des exoglucanases, ils n'empêchent pas celle des endoglucanases, ce qui vient fausser la mesure. Aussi la présence de β -glucosidase dans le mix enzymatique peut transformer (au moins en partie) le produit (cellobiose) en glucose.

Pour pallier à ce type de problèmes, il existe des substrats synthétiques spécifiques qui miment la réaction d'hydrolyse d'enzymes spécifiques. Ce sont des substrats portant des groupements ayant des propriétés de dosage intéressantes, colorimétriques ou fluorescentes. La fixation d'un monomère de glucose (ou xylose) sur de tels groupements en β ,1-4 va ainsi être représentatif d'une molécule de cellobiose, et la libération de ce groupement sera directement lié à l'activité glucosidase (ou xylosidase). Pour les activités exo, ce groupement est fixé à des oligomères de très faibles DP (cellobiose, cellotriose) du côté réducteur ou non réducteur (différenciation CB I et CB II). De par la gêne stérique engendrée par le groupement, la réaction d'hydrolyse ne peut avoir lieu qu'à un seul site de coupure. L'activité glucosidase (ou xylosidase) peut avoir lieu mais entraîne la production de glucose (ou xylose) qui ne sera pris en compte lors du dosage du groupement chromogénique (ou fluorescent).

Ces groupements sont par exemple, le pNP (para-nitrophénol) qui présente un maximum d'adsorbance à 400 nm, le muF (méthylumbelliféryl) qui présente un pic de fluorescence à 455 nm lorsqu'il est excité à 355 nm ou encore Azo qui présente un maximum d'absorbance à 590 nm (Figure 2).

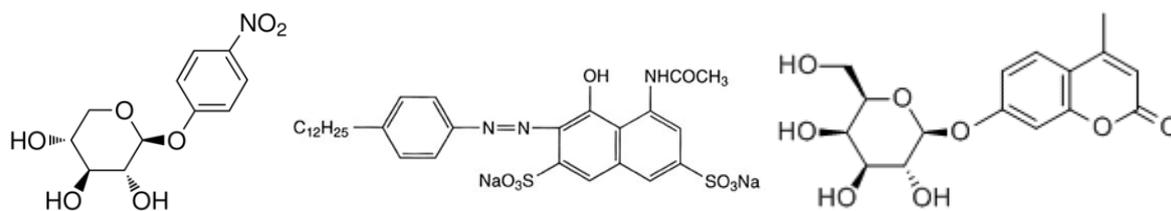


Figure A1-2 : pNP-xylopyranoside, groupement Azo et MuF-glucofuranoside (de gauche à droite)

D'autres substrats peuvent être utilisés pour mesurer des activités plus globales, comme le papier filtre (Filter Paper FP) ou des celluloses traitées pour être plus amorphes (PACS : Phosphoric acid swollen cellulose).

A1.2. Dosage de l'activité

La réaction enzymatique aboutit soit à la formation de sucres réducteurs soit à la libération des groupements caractéristiques. Dans le second cas, les techniques de dosage sont associées aux propriétés des groupements. Dans le premier, un dosage des sucres réducteurs est mis en œuvre. Avec d'autres types de substrats, la mesure de l'activité peut aussi être liée à la mesure de la viscosité du milieu, cette dernière diminuant avec la dégradation.

Plusieurs méthodes de dosage des sucres réducteurs existent, avec la plus connue au DNS (Acide Dinitrosalicylique) ou méthode de Miller, celle de Nelson Somogyi et celle au MBTH (3-méthyl-2-benzothiazolinonehydrazone). La quantification des sucres par HPLC peut aussi être envisagée.

Le DNS met en œuvre une réaction oxydoréduction à chaud en milieu alcalin (pH 14) entre l'acide 3,5-dinitrosalicylique (oxydant) et les sucres réducteurs. Il y a alors formation d'acide 3-amino-5-nitrosalicylique qui présente un maximum d'absorbance à 540 nm. La gamme de sensibilité de ce dosage est comprise entre 20 et 2500 μg de sucres réducteurs par échantillon. Le développement de la coloration nécessite une étape à très forte température (de 90 à 100°C) qui peut entraîner un phénomène de β -dépolymérisation éliminative des extrémités non réductrices ainsi qu'une hydrolyse de la cellobiose, ce qui est susceptible de conduire à une surestimation des sucres réducteurs (Gusakov et al., 2011).

D'autres méthodes de dosage des sucres réducteurs plus sensibles sont basées sur la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^+ par les extrémités réductrices en milieu alcalin (réaction de Biuret). Le dosage de Nelson Somogyi est environ 10 fois plus sensible que le DNS et le dosage à l'acide bincinchoninique (BCA) 100 fois. Ceci dit ces techniques sont à la base utilisées pour le dosage des protéines et présente donc des interactions avec ces dernières. Gusakov *et al.* (2011) ont comparé les techniques au DNS et NS sur des activités CMCCase et xylanase (en milieu non

complexe). Il en ressort que les valeurs déterminées au DNS sont de 40 à 50% supérieures pour la CMCase, et peut être jusqu'à 13 fois plus importante pour des activités xylanases. La comparaison entre des activités déterminées avec des protocoles différents doit donc être faite avec précaution.

Le dosage MBTH est connu pour la détermination des aldéhydes, un aldéhyde se combinant avec deux molécules de MBTH en deux étapes. A pH neutre, l'aldéhyde se condense avec la MTBH pour former un adducte, puis en condition acide et oxydante l'adducte réagit avec une seconde molécule de MTBH pour former un complexe coloré présentant un maximum d'adsorption à 620 nm. Ce dosage affiche une gamme de sensibilité comprise entre 0,5 et 50 µg de sucres réducteurs par échantillon et ne présenterait pas d'interférence avec les protéines (Anthon and Barrett, 2002).

A1.3. Fractionnement des échantillons

Dans le contexte du projet de thèse, comme nous l'avons vu les enzymes des microorganismes anaérobies s'organisent en cellulosome. Il paraît alors intéressant d'effectuer un fractionnement des échantillons pour déterminer les activités enzymatiques extracellulaires et celles liées aux membranes. Plusieurs études se sont orientées vers ce type de fractionnement avec différentes techniques de mise en œuvre.

Pour plusieurs auteurs, le fractionnement peut être réalisé par sonication. Cette technique permet de détacher les microorganismes de leur substrat solide et dans une certaine mesure de lyser les cellules. Ainsi, une première centrifugation permet de récupérer le surnageant comme fraction extracellulaire. Puis le culot est lavé, resuspendu et soniqué. Le surnageant constitue alors la fraction intracellulaire et le culot la fraction cell-bound (Chen et al., 2012; Lee et al., 2002; Lo et al., 2009).

Lee *et al.* (2000) ont pu par exemple réaliser un fractionnement complet des activités endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase, xylanase, acétyl estérase et β -xylosidase sur du rumen bovin. Ils étudient la distribution et l'activité des enzymes hydrolytiques contenues dans le rumen de vaches ayant subies un régime contenant uniquement de la luzerne. Quatre fractions enzymatiques ont été réalisées.

WRE (Whole Rumen Enzymes) Contenu complet du rumen, contenant à la fois les parties solide et liquide, homogénéisées, puis récupération du surnageant après centrifugation. Homogénéisation effectuée en mixant 5 minutes à 4°C et centrifugation de 15 minutes à 10000 x g et à 4°C.

RFE (Rumen Fluids Enzymes) Contenu liquide du rumen, surnageant après centrifugation, sans homogénéisation.

FAE (Feed Associated Enzymes) Enzymes associées aux particules solides, récupération manuelle des particules solides, lavage, resuspension dans un volume équivalent de tampon, homogénéisés et centrifugés pour récupérer le surnageant.

CBE (Cell Bound Enzymes) Après la récupération manuelle des particules, centrifugation pour récupérer le culot microbien, resuspension dans tampon, sonication et centrifugation pour récupérer le surnageant.

Pour former les fractions RFE, FAE et CBE, l'échantillon est filtré au travers de 4 couches d'étamine, puis incubé 60 minutes à 39°C de manière à laisser décanter les microorganismes et laisser remonter les particules solides. Les particules remontées en surface sont alors collectées et rassemblées avec celles retenues sur l'étamine. Le mélange de ces particules est alors brièvement lavé dans du tampon phosphate préchauffé à 39°C (5 minutes) pour enlever les enzymes non adhérentes. Puis une centrifugation à 1000 g et 4°C pendant 10 minutes permet de récupérer les particules dans le culot. Ce culot est finalement resuspendu et mixé dans du tampon phosphate de sodium (pH 6,8). Le dernier surnageant fournit la fraction FAE. La fraction RFE est issue de la partie liquide ayant traversée les couches d'étamine. Une centrifugation permet d'éliminer le culot microbien et le surnageant constitue alors la fraction RFE. Ce dernier culot est resuspendu dans du tampon phosphate et soumis à une ultrasonication en condition anaérobie pendant 2 minutes à puissance maximale avec 3 secondes d'intervalles entre chaque pulse. L'ultrasonicateur utilisé est Vibra Cell™ de Sonics et Materials Inc. L'échantillon soniqué est alors centrifugé 15 minutes à 10000 x g et le surnageant constitue la fraction CBE.

Pour stopper les incubations enzymes substrats, chaque échantillon a été placé 10 minutes dans de l'eau bouillante. Les dosages des sucres réducteurs formés sont réalisés par la méthode de Nelson-Somogyi.

Au final, les activités endo-, exoglucanase, xylanase et pectinase sont principalement retrouvées dans la fraction cell-bound, alors que les activités glucosidase, acétyl estérase et arabinofuranosidase sont retrouvées principalement dans la fraction liquide.

D'autres techniques de fractionnement ont été testées par différents auteurs.

Emtiazi et Nahvi (2000) étudient la production d'enzymes cellulolytiques par *Cellulomonas sp.*, cultivé sur paille de blé en condition microaérobie. Ils testent les optima pH et température des CMCase, Cellobiase, FTPase, xylanase, α -amylase et manganèse peroxydase. D'autre part, les activités extracellulaires et cell-bound sont analysées. Le pH

optimum pour les activités CMCase, FTPase et xylanase est de 6, alors que celui de la cellobiase est de 5. La température optimum d'incubation est de 50°C pour les activités CMCase, cellobiase et xylanase, et de 45°C pour l'activité FTPase.

Les activités extracellulaires sont dosées sur le surnageant de centrifugation (10 minutes à 10000 rpm) et celles cell-bound sont dosées après deux lavages du culot avec une solution tampon phosphate à 0,1 M, resuspension dans le tampon et relargage enzymatique par ajout de Tween 80 ou sonication à froid (pour prévenir l'inactivation thermique des enzymes). Sont considérées comme cell-bound, toutes les enzymes dosées après l'étape de relargage. La technique la plus efficace pour la libération d'enzyme cell-bound est, dans ce cas, la sonication. Ceci dit, il semble intéressant de noter que l'ajout de Tween permet de recueillir plus d'endo et d'exoglucanases après deux qu'après 24h d'incubation (Emtiazi and Nahvi, 2000).

(Criquet, 2002) étudie les activités enzymatiques présentes dans des échantillons frais de litières de chênes verts. Deux méthodes de dosages d'activités cellulolytiques sont mises en œuvre, une méthode directe, sur les échantillons totaux et une passant par une extraction.

La méthode directe est effectuée sur un échantillon total de 1g de litière et consiste en l'incubation de ce dernier avec de la CMC à 2% et 0,5 mL de Toluène dans 30 mL de tampon acétate-sodium pH 6 pendant 24h à 50°C. Une centrifugation de 20 minutes à 12000 x g puis une filtration à 1,2 µm permettent de récupérer le surnageant contenant les sucres réducteurs produits.

La méthode extractive consiste à mettre la litière sous agitation à température ambiante dans du CaCl₂ à 0,2M contenant 0,05% de Tween 80 et environ 30 g/L de PVPP (polyvinylpyrrolidone, un composé ayant une forte affinité pour les tannins). Le surnageant est alors dialysé contre un tampon Bis-Tris à 2 mM pH 6. Suite à une incubation enzyme-substrat d'une heure à 50°C, le dosage des sucres réducteurs est réalisé de la même manière que décrite précédemment.

Il ressort de la comparaison de ces deux techniques d'extraction enzymatique, que la méthode directe renvoie toujours des activités plus faibles que la méthode extractive (jusqu'à 94% moins). Cela peut s'expliquer par un contact enzyme-substrat solide-liquide qui ne favorise pas la réaction catalytique, contrairement à la méthode extractive qui permet une réaction liquide-liquide (Criquet, 2002).

(Louime et al., 2006) étudient la localisation des enzymes cellulolytiques chez la bactérie aérobie *Cytophaga hutchinsonii* en culture sur substrat glucose, cellobiose, cellulose, xylane et amidon. Ils mettent en évidence que les cellulases y sont principalement extracellulaires, bien que 30% de l'activité cellulolytique soit attribuée à des enzymes cell-bound.

Leur technique d'échantillonnage consiste à centrifuger le moût de fermentation, le surnageant constituant alors l'extrait extracellulaire et le culot subissant un choc osmotique. A chaque fraction est ajoutée un inhibiteur de protéase, PMSF. Le culot choqué est alors traité à la presse de French, de manière à en extraire le fluide cytoplasmique. Ce fluide est alors centrifugé, le surnageant constituant alors la fraction intracellulaire et le culot la fraction cell-bound (Louime et al., 2006).

Au travers de ces quelques exemples, on remarque la multiplicité des techniques de fractionnement des extraits enzymatiques en milieu complexe. Cela rend la comparaison entre les manipulations difficile entre elles. Les tables A1-2 à A1-6 se proposent de résumer les principales techniques de fractionnement rencontrées dans la littérature avec les activités optimales mesurées et les rendements atteints en termes d'hydrolyse de biomasse lignocellulosique. La multiplicité des techniques s'accompagne d'une multiplicité d'unités d'expression d'activité et de conditions de mesure.

Table A1-2: Techniques de fractionnement et dosages d'activités enzymatiques en milieu solide-liquide (1/5)

Source de l'échantillon (Consortium-substrat de culture-réacteur-rendement)	Conditions de dosage (Enzyme- substrat- pH-température- temps (min)- méthode de dosage)	Mesure et fractionnement				Unité
		T*	RF*	PB*	CB*	
Lee et al. (2002) Rumen-"luzerne"-bovin nourri avec un régime 100% luzerne- ∅	Endoglucanase ; CMC ; 6.8 ; 39°C ; 60 min ; Nelson Somogyi (NS)	1183.6	362.7	424	596.3	UA
		720.2	206.7	379	761.9	UA/mg prot
	Exoglucanase ; Avicel ; 6.8 ; 39°C ; 120 min ; NS	38.6	18.2	16.6	8	UA
		22.5	10.4	14.6	10.2	UA/mg prot
	β-glucosidase ; pNP-Glc ; 6.8 ; 50°C ; 30 min ; pNP	27.7	17	12.1	6.8	UA
		16.9	9.7	10.8	8.7	UA/mg prot
	Xylanase ; Oat spelt xylan ; 6.8 ; 39°C ; 60 min ; NS	1751.3	528.6	765.8	1572.6	UA
		1068.6	300.2	682.9	1995.5	UA/mg prot
	β-xylanase ; pNP-xyl ; 6.8 ; 50°C ; 30 min ; pNP	55.2	37.5	22.9	22.5	UA
		33.7	21.5	20.4	28.6	UA/mg prot

*T: Total = surnageant ; RF: Rumen Fluide = Surnageant du perméat ; PB: Particules bound = enzymes désorbées du rétentat ; CB: Cell Bound = Surnageant après sonication du culot microbien du perméat

Table A1-3: Techniques de fractionnement et dosages d'activités enzymatiques en milieu solide-liquide (2/5)

Source de l'échantillon (Consortium-substrat de culture-réacteur-rendement)	Conditions de dosage (Enzyme- substrat- pH-température- temps (min)- méthode de dosage)	Mesure et fractionnement		
Desvaux et al., 2000		Surnageant	Culot	Unité
<i>Clostridium cellulolyticum</i> ATCC 35319 ; cellulose ; batch anoxic ; 85%	Avicellase ; avicel ; 7.2 ; 34°C ; Ø ; DNS	3 à 4 . 10 ⁻²	1 à 2,5 . 10 ⁻²	UA/mL
Wongwilaiwalin et al. (2010)		S*	CB*	Unité
Composte de bagasse ; Filter Paper (FP) ; batch aérobie statique 50°C 7 jours ; 54,7% FP en 7 jrs et 75% holocellulose de paille de riz	CMCase ; CMC ; 5 ; 50°C ; 60 min ; DNS	0 à 0,25	2 à 2,5 . 10 ⁻²	UA/mg
	Xylanase ; xylan birchwood ; 5 ; 50°C ; 60 min ; DNS	0,5 à 1,7	2 à 2,5 . 10 ⁻²	
	β-glucosidase ; β-glucane ; 5 ; 50°C ; 60 min ; DNS	1	2 à 15 . 10 ⁻²	
*Centri x 7500 g S et CB= enzymes désorbée dans 2% triéthylamine 30 min				
Chen et al. 2012		S* (pH6)	S* (pH7)	Unité
Boues secondaires de la STEP de Shanghai ; litière ; batch hermétique d'un mois ; 30%	CBH ; α-cellulose ; 6 ou 7 ; 20°C ; 24h ; colorimétrie	0.125	0.132	mol de sucre/g de litière
	Endoglucanase ; CMC ; 6 ou 7 ; 60°C ; 30 min ; DNS	0.127	0.119	
	β-glucosidase ; pNP-glc ; 6 ou 7 ; Ø ; Ø ; pNP	0.154	0.158	
	FPU ; whatman N°1 ; 6 ou 7 ; 50°C ; 1h ; colorimétrie	1.906	2.629	
	Xylanase ; xylan birchwood ; 6 ou 7 ; 50°C ; 5 min ; Ø	0.943	0.799	
*Surnageant + surnageant après sonication 20 min				

Table A1-4: Techniques de fractionnement et dosages d'activités enzymatiques en milieu solide-liquide (3/5)

Source de l'échantillon (Consortium-substrat de culture-réacteur-rendement)	Conditions de dosage (Enzyme- substrat- pH- température- temps (min)-méthode de dosage)	Mesure et fractionnement			Unité
		EC*	IC*	CB*	
Sol de champ de riz ; xylan ; batch anaérobie 35°C enrichi sur CMC ; Ø	Endoglucanase ; CMC ; 5 ; 40°C ; 30 min ; DNS	50	600	75	µmol/mn/mg prot.
	Exoglucanase ; avicel ; 5 ; 40°C ; 2h ; DNS	0	100	20	
	β-glucosidase ; cellobiose ; 5 ; 40°C ; 1h ; HPLC	20	0	220	
	Xylanase ; xylan ; 5 ; 50°C ; 10 min ; DNS	200	700	80	
Sol de champ de riz ; paille de riz ; batch anaérobie 35°C enrichi sur CMC ; Ø	Endoglucanase ; CMC ; 5 ; 40°C ; 30 min ; DNS	200	200	20	
	Exoglucanase ; avicel ; 5 ; 40°C ; 2h ; DNS	50	10	10	
	β-glucosidase ; cellobiose ; 5 ; 40°C ; 1h ; HPLC	0	0	0	
	Xylanase ; xylan ; 5 ; 50°C ; 10 min ; DNS	220	900	90	
Sol de champ de riz ; écale de riz ; batch anaérobie 35°C enrichi sur CMC ; Ø	Endoglucanase ; CMC ; 5 ; 40°C ; 30 min ; DNS	220	1000	50	
	Exoglucanase ; avicel ; 5 ; 40°C ; 2h ; DNS	50	0	30	
	β-glucosidase ; cellobiose ; 5 ; 40°C ; 1h ; HPLC	0	100	0	
	Xylanase ; xylan ; 5 ; 50°C ; 10 min ; DNS	1050	850	180	

*EC: extracellulaire = surnageant (5000 x g, 20 min) ; IC: intracellulaire = surnageant après sonication du culot à 70% ; CB: Cell bound = culot après sonication du culot

Table A1-5: Techniques de fractionnement et dosages d'activités enzymatiques en milieu solide-liquide (4/5)

Source de l'échantillon (Consortium-substrat de culture-réacteur-rendement)	Conditions de dosage (Enzyme- substrat- pH- température- temps (min)-méthode de dosage)	Mesure et fractionnement					Unité
		Extracellulaire*					
Wang et al. (2011)							
consortium enrichi à partir de litière et sol ; paille de blé prétraitée NaOH 1,5% (m/v) 48h temp. amb ; enrichissement milieu solide - dégradation batch (liquide) statique à 30°C ; 75.6%	Cellulase ; whatman ; 6.24 ; 55°C ; Ø ; DNS	1.3					U/mL
	Endoglucanase ; CMC ; 6.24 ; 55°C ; Ø ; DNS	4.35					
	Exoglucanase ; avicel ; 5.91 ; 55°C ; Ø ; DNS	0.6					
	β-glucosidase ; salicyline ; 5.91 ; 55°C ; Ø ; DNS	0.43					
	Xylanase ; xylan d'avoine ; 6.24 ; 55°C ; Ø ; DNS	15.16					
*Dilution de 2g de milieu solide dans 15 mL d'H ₂ O centri 6000xg 10 min							
Louime et al.(2006)		T*	S*	P*	I*	M*	Unité
<i>Cytophaga hutchinsonii</i> ; glucose ; batch aérobie ; Ø	CMCase ; CMC ; 7.4 ; 30°C ; 12h ; DNS	0.17	0.34	0.04	0.12	0.09	UA/min/mL
		15.45	24.29	3.08	7.06	8.18	UA/mg prot.
<i>Cytophaga hutchinsonii</i> ; cellobiose ; batch aérobie ; Ø		0.21	0.41	0.1	0.23	0.12	UA/min/mL
		7	15.19	4	12.11	10	UA/mg prot.
<i>Cytophaga hutchinsonii</i> ; cellulose ; batch aérobie ; Ø		0.72	1.53	0.21	0.37	0.32	UA/min/mL
		12.86	61.2	16.15	30.83	24.62	UA/mg prot.
<i>Cytophaga hutchinsonii</i> ; xylan ; batch aérobie ; Ø		0.26	0.52	0.09	0.23	0.18	UA/min/mL
		7.65	14.05	3.46	10	10.59	UA/mg prot.
<i>Cytophaga hutchinsonii</i> ; amidon ; batch aérobie ; Ø		0.19	0.37	0.12	0.35	0.23	UA/min/mL
		7.04	19.47	3.87	14	6.39	UA/mg prot.
*Centrifugation (Surnageant) - Choc osmotique du culot (Périplasme) - Presse de French (Intracellulaire et membranaire)							
Criquet et al. (2002)		Total*					Unité
Litière de chêne	CMCase ; CMC ; 6 ; 50°C ; 1h ; NS	0.07					UA/g MS
*Extraction au CaCl ₂ sous agitation avec Tween 80 et PVPP							

Table A1-6: Techniques de fractionnement et dosages d'activités enzymatiques en milieu solide-liquide (5/5)

Source de l'échantillon (Consortium- substrat de culture-réacteur-rendement)	Conditions de dosage (Enzyme- substrat- pH- température- temps (min)-méthode de dosage)	Mesure et fractionnement		Unité
Wongwilaiwalin et al. (2013)				
Bagasse de canne à sucre ; PCS + FP + 1% paille de blé prétraitée NaOH ; batch anoxique ; 72.4%	Xylanase ; xylan ; 5 ; 50°C ; 1h ; sucres réducteurs	Surnageant		UA/mg
	CMCase ; CMC ; 5 ; 50°C ; 1h ; sucres réducteurs	1.02		
	β -glucanase ; β -glucane ; 5 ; 50°C ; 1h ; sucres réducteurs	1.31		
		4.8		
Emtiazi et al. (2000)				
<i>Cellulomonas sp.</i> ; paille de blé ; batch microaérobie 28°C ; Ø	Fpase ; FP ; 6 ; 45°C ; 1h ; DNS	Surnageant		UA/mL
	CMCase ; CMC ; 6 ; 50°C ; 15 min ; DNS	3		
	Xylanase ; xylan ; 6 ; 50°C ; 15 min ; DNS	3		
		2		
Guo et al. (2010)				
XDC-2 consortium issus de compost de sols amendés en déchets animaux et agricoles ; paille de riz traitée NaOH 1% (m/m) 25h 30°C ; batch statique sombre 30°C ; 60.3%	CMCase ; CMC ; 6 ; 40°C ; 30 min ; DNS	S*	C*	U/mL
	xylanase ; xylan oat splet ; 6 ; 40°C ; 30 min ; DNS	0.3	0.1	
		8.8	0.1	
*Surnageant - lyse du culot au lysozyme 1% 30 min				
Hui et al. (2013)				
XDC-2 ; paille de blé ; batch statique sombre 35°C ; 25.2%		Surnageant		U/mL
		415		
	XDC-2 ; tige de maïs ; batch statique sombre 35°C ; 39.7%	xylanase ; xylan oat spelt ; 6 ; 40°C ; 30 min ; DNS		
		490		
XDC-2 ; paille de riz ; batch statique sombre 35°C ; 25.2%		335		

Annexe 2. Système de prélèvement

Lors de toutes les expérimentations, des prélèvements du moût de fermentation ont été effectués au moyen d'un système de prélèvement permettant de conserver les conditions d'anaérobiose au sein du réacteur et d'assurer l'homogénéité et la représentativité du prélèvement.

Une canule (A – Figure A1-2) plongeant jusqu'au tiers inférieur du réacteur et de diamètre interne de 1.1 cm assurait la représentativité du prélèvement de la fraction totale (solide + liquide).

Chaque prélèvement débutait par un prélèvement gaz de 20 mL via une seringue suppléant d'une vanne 3 voies et s'effectuait au niveau de la sortie du condenseur au niveau de la vanne 3 voies gaz (B - Figure A1-2). Cette dernière était positionnée de sorte à couper la connexion entre le ciel gazeux et le compteur gaz (Ritter). La dépression occasionnée était aussitôt compensée par la mise en place d'une poche à gaz remplie à l'azote gazeux (C - Figure A1-2). La voie gaz restait connectée à la poche à gaz et fermée sur le Ritter pendant toute la durée du prélèvement.

Pour la voie liquide, une seringue de prélèvement (D - Figure A1-2) surplombant un système de canules permettait d'aspirer de de refouler le mout de fermentation en maintenant les conditions anaérobies. Avant tout prélèvement de la voie liquide, une première procédure permettait de refouler le contenu de la canule (n'étant pas soumis aux conditions d'agitation) dans le mout (procédure de rinçage de la canule). Le contenu de la canule était alors aspiré jusqu'à atteindre le haut de la canule surplombante (E - Figure A1-2), la vanne 3 voie liquide (F - Figure A1-2) était alors positionnée de sorte à sceller le réacteur. La seringue de prélèvement pleine de biogaz était vidée, puis remplie à l'azote gazeux. La vanne liquide pouvait alors être réouverte sur le réacteur de manière à injecter ce gaz inerte pour repousser le liquide dans le réacteur.

Pour effectuer un prélèvement du moût de fermentation, la canule surplombante était graduée en volume. Chaque prélèvement s'effectuait entre la graduation voulue et le raccord sous-jacent (G - Figure A1-2), en aspirant jusqu'à la valeur voulue. Plusieurs cycles aspiration-refoulement étaient nécessaires pour assurer un prélèvement homogène, la paille décantant en quelques dizaines de secondes. Aussitôt le moût était maintenu dans la canule surplombante en fixant une pince de prélèvement (H - Figure A1-2) au niveau du raccord G. Enfin une seconde pince était positionnée au niveau du raccord surplombant la canule plongeante (I - Figure A1-2) de manière à sceller le réacteur. La canule surplombante pouvait alors être détachée du système de

prélèvement au niveau du raccord G (Encadré voie liquide - Figure A1-2) et déposé dans le contenant approprié.

La procédure de rinçage de la canule devait alors être répétée de manière à supprimer le gaz à l'intérieur de la canule surplombante, contaminé par l'air. D'autre part il est important de noter que la paille décantant assez rapidement, cette procédure de rinçage permettait d'homogénéiser le contenu de la canule.

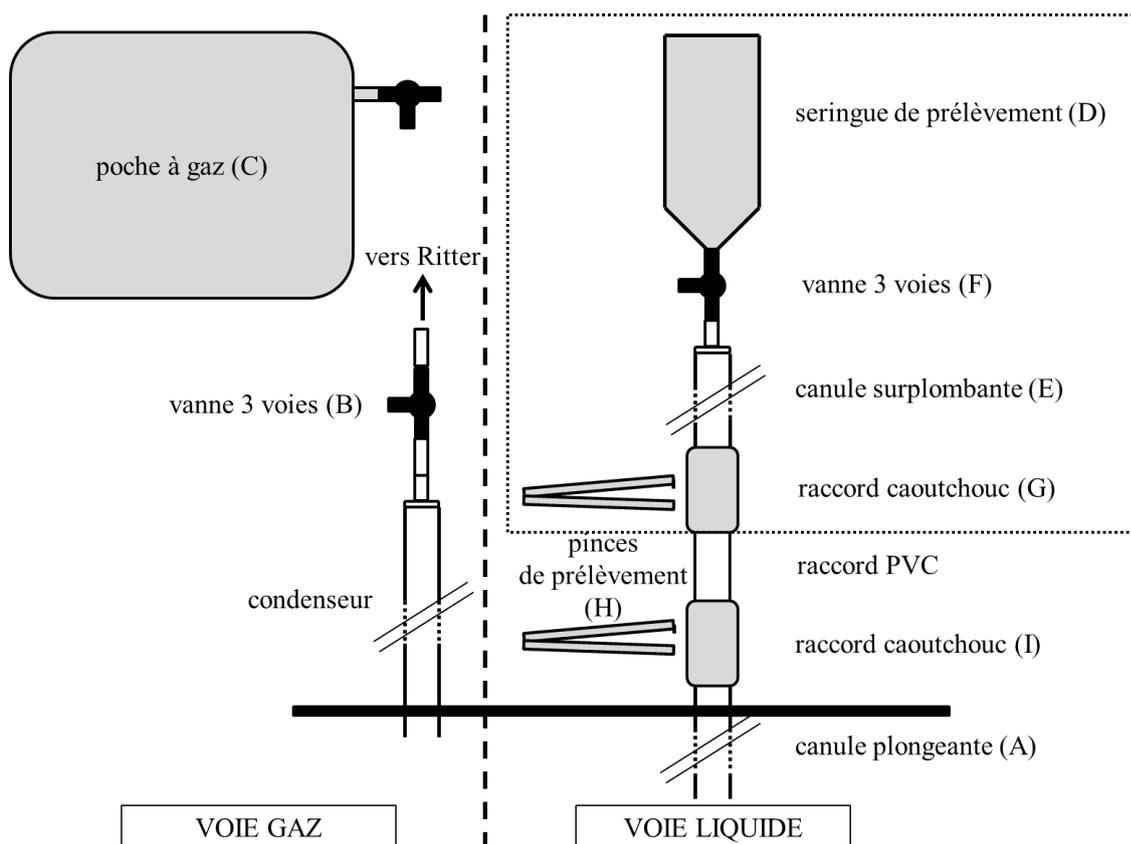


Figure A2-1 : Système de prélèvement mis en œuvre

Une fois l'ensemble des prélèvements effectué sur la phase-solide, un second prélèvement gaz permettait de mesurer les quantités de produits gazeux perdus dans la poche à gaz lors du prélèvement. Enfin la vanne 3 voies de la voie gaz était remise en position assurant la connexion entre le ciel gazeux et le compteur gaz.

Annexe 3. Prétraitements enzymatiques

L'objectif de cette section est d'évaluer l'impact de prétraitements enzymatiques sur le potentiel acidogène du consortium RWS. Cette partie du travail de thèse a fait l'objet d'un stage de master 2 réalisé par Camille Saudemont.

A3.1. Tests de saccharabilité et choix des enzymes étudiées en prétraitement biologique

Afin de choisir les enzymes à utiliser pour le prétraitement de la paille de blé, des tests de saccharabilité ont été menés sur 4 cocktails enzymatiques en conditions optimales : Celluclast 1.5L de Novozymes (15 U.gMS^{-1} – 50°C – $\text{pH } 5$), Celluclast et β -glucosidase (15 U.gMS^{-1} de chaque – 50°C – $\text{pH } 5$), Xyl (xylanase commerciale produite à partir de *Thermomyces lanuginosus* - 150 U.gMS^{-1} , 50°C , $\text{pH } 7$), Xyn11 (xylanase produite à partir de *Thermobacillus xylanilyticus* - 150 U.gMS^{-1} , 50°C , $\text{pH } 7.5$). La saccharabilité a été évaluée par mesure des sucres réducteurs produits.

Pour les quatre cocktails évalués en saccharabilité de paille de blé brute, il apparaît qu'une faible proportion de sucres réducteurs avait été libérée (jusqu'à $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ – Figure A3-1).

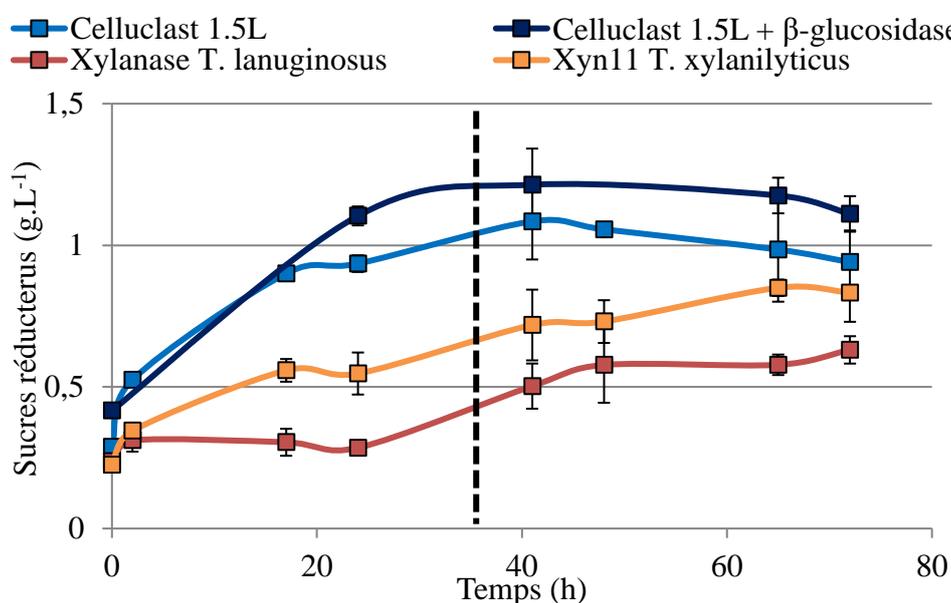


Figure A3-1 : Test de saccharification de la paille de blé brute (2mm) par 4 cocktails enzymatiques

Dans le cas des cocktails cellulolytiques, la libération de sucres réducteurs avoisinait 1 g.L^{-1} en 24h, alors que celle-ci n'atteignait qu'environ la moitié pour les enzymes xylanolytiques. Les cocktails cellulolytiques testés semblaient donc plus rapides et efficaces pour solubiliser la paille de blé. La supplémentation en β -glucosidase au cocktail cellulolytique Celluclast entraînait une légère augmentation de la quantité de sucres réducteurs libérés, avec un gain maximum de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ (17%) sur les 72h de test. Alors que la β -glucosidase est l'enzyme responsable de l'hydrolyse du cellobiose (une extrémité réductrice) en deux glucoses (deux extrémités réductrices), cette faible augmentation suggère un faible intérêt de la supplémentation avec cette enzyme dans les conditions mises en œuvre.

Concernant les cocktails xylanolytiques Xyl et Xyn11, les enzymes produites par *T. xylanolyticus* (Xyn11) permettaient une plus importante libération de sucres réducteurs tout au long du test, avec jusqu'à $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ (80%) de gain par rapport au cocktail Xyl.

De manière générale, la dynamique était plus rapide avec les cocktails cellulolytiques que xylanolytiques, un plateau étant atteint pour les 1^{er} en 42h, alors que pour les xylanase la concentration en sucres réducteurs augmentait graduellement jusqu'à 72h.

Afin d'évaluer l'impact de deux prétraitements enzymatiques présentant des origines et des dynamiques différentes, et sur la base des résultats obtenus, nous avons sélectionné les cocktails enzymatiques Celluclast et Xyn11 pour les essais de prétraitements enzymatiques et fermentations acidogènes par le consortium RWS. La durée des prétraitements enzymatiques a été fixée à 48h pour assurer l'essentiel du potentiel d'hydrolyse enzymatique tout en limitant le temps d'incubation.

A3.2. Caractérisation de la paille de blé prétraitée enzymatiquement.

Les prétraitements enzymatiques de la paille brute ont été réalisés en réacteurs batch au pH et température optimale des cocktails sélectionnés. Par la suite, le réacteur du prétraitement Celluclast est dénommé Rcell et celui traité avec Xyn11 est désigné RXyn. La caractérisation de la paille de blé obtenue par ces prétraitements a été effectuée en suivant la composition en holocelluloses, le LOI par FTIR, les activités enzymatiques xylanase et CMC_{Case} ainsi que la libération de sucres réducteurs (Figure A3-2).

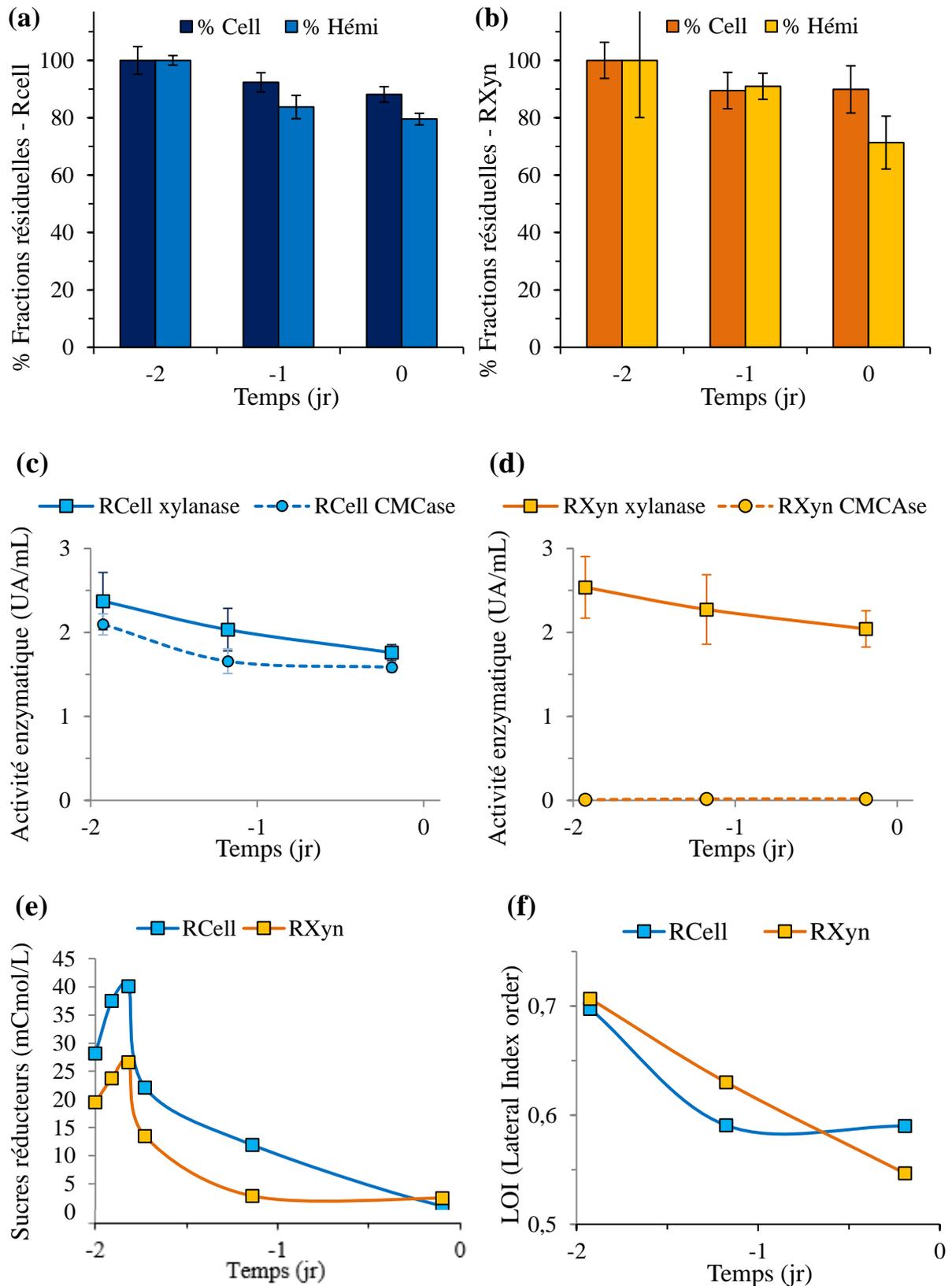


Figure A3-2 : Caractérisation des prétraitements enzymatiques (a) holocelluloses RCell (b) holocelluloses RXyn (c et d) activités enzymatiques xylanase et CMCase (e) sucres réducteurs libérés et (f) LOI

Pour les deux prétraitements, les fractions cellulose et hémicellulose étaient dégradées en présence d'enzymes (Figures A3-2a et A3-2b), avec $11,9 \pm 2,7$ % et $20,5 \pm 2,0$ %, contre $10,2 \pm 8,2$ % et $28,7 \pm 9,2$ % mCmol.i mCmol⁻¹ de dégradation de cellulose et d'hémicellulose au jour 0 (après 48h de traitement enzymatique, le temps 0 correspondant au moment de l'ajout d'inoculum) pour les prétraitements RCell et RXyn, respectivement. Comme cela était attendu, la dégradation des hémicelluloses était supérieure avec le cocktail xylanolytique en comparaison au cocktail Celluclast, alors que de manière surprenante la dégradation de la cellulose était similaire dans les deux cas.

La majorité de la dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose au cours du prétraitement RCell semblait s'effectuer au cours des premières 24h (jour -1). Le prétraitement RXyn présentait une dynamique différente avec une dégradation simultanée des deux fractions le premier jour, suivi d'un arrêt de l'hydrolyse de la cellulose et d'une importante dégradation de l'hémicellulose le deuxième jour ($19,6 \pm 9,2$ % entre les jours -1 et 0).

Concernant l'évolution des propriétés structurales appréhendées par FTIR-ATR, on observait une réduction du LOI (correspondant à la cristallinité) pour les deux prétraitements enzymatiques (Figure A3-2f). De manière cohérente, la valeur initiale observée de $0,70 \pm 0,01$ (jour -2) était identique pour les deux conditions de traitement enzymatique et équivalente à celle mesurée sur paille non prétraitée ($0,73 \pm 0,04$ – Figure V-4, page 147). Alors que pour le prétraitement enzymatique RXyn, la cristallinité chutait de manière continue pendant les 2 jours de suivi jusqu'à 0,55 ; elle atteignait 0,50 dès le premier jour de traitement au cocktail Celluclast (Rcell – jour -1) puis se stabilisait à cette valeur jusqu'à la fin des 48h d'incubation (jour 0). Le LOI représentant le ratio de fraction de cellulose cristalline :amorphe, ces diminutions pouvaient être interprétées comme une attaque préférentielle de la fraction cristalline au cours des prétraitements. De manière intéressante, en comparaison avec les prétraitements chimiques présentés ci-avant, les valeurs de LOI atteintes (notamment pour RXyn) étaient très proches de celles atteintes pour les pailles prétraitées chimio-mécaniquement à la soude (Figures V-4 -page 147- et A3-2f).

Les activités enzymatiques xylanase et CMCCase ont été mesurées aux pH (5 pour Rcell et 7,5 pour RXyn) et température (50°C) des prétraitements, pour rendre compte des activités effectives dans les réacteurs. L'activité xylanase atteignait des valeurs importantes dans les deux réacteurs au cours des 2 jours de prétraitements avant inoculation. Dans les deux cas, on observait une légère chute au cours du prétraitement enzymatique jusqu'à 5h avant l'inoculation par RWS, de $2,37 \pm 0,34$ à $1,76 \pm 0,09$ UA.mL⁻¹ et de $2,53 \pm 0,37$ à $2,04 \pm 0,77$ UA.mL⁻¹ pour RCell et RXyn, respectivement (Figures A3-2c et A3-2d). Alors que la mesure d'une activité xylanase élevée au cours du prétraitement RXyn était attendue, l'activité observée dans le cas de RCell était surprenante. Concernant l'activité CMCCase, les valeurs obtenues pour les deux prétraitements enzymatiques étaient contrastées. Alors que le prétraitement RCell affichait des valeurs comprises entre $2,00 \pm 0,13$ UA.mL⁻¹ au jour -2 et $1,58 \pm 0,06$ UA.mL⁻¹ 5h avant l'inoculation, le prétraitement RXyn présentait une activité beaucoup plus faible, avec une moyenne de $0,02 \pm 0,01$ UA.mL⁻¹. Globalement, les activités variaient peu pendant la durée des prétraitements et diminuaient brusquement au moment de l'inoculation (jour 0) où les conditions de pH et de températures étaient ramenées à celles de RWS (pH=6.10 et T= 35°C). Les enzymes ne se trouvaient alors plus dans leurs conditions optimales mais ne semblaient cependant pas inactivées totalement, les activités n'étant diminuées que de moitié (Figures A3-2c et A3-2d).

Pour les deux prétraitements, une accumulation en sucres réducteurs a été observée dans les 6 premières heures, suivi d'une décroissance progressive de ces derniers (Figure A3-2e). Etant donné que les prétraitements n'avaient pas été réalisés en présence de biocide, ce résultat suggérait la consommation des sucres solubles par les microorganismes endogènes au substrat. Cependant, alors que les sucres réducteurs reflètent le nombre d'extrémités réductrices et non la quantité de carbone libérée, des dosages du carbone organique total (COT), des AGV et des sucres simple (par HPLC) ont été effectués pour caractériser plus précisément l'impact des prétraitements enzymatiques sur la solubilisation du substrat. Ces derniers révélaient une quantité de carbone organique totale équivalente pour les 2 conditions, égale à 140 ± 20 mCmol.L⁻¹. Ce carbone organique se répartissait en 30% d'AGV, moins d'un pourcent de sucres monomériques et environ 70% de sucres solubles polymériques dans le cas du prétraitement RXyn, contre 10% d'AGV, 10% de sucres réducteurs et 80% de sucres solubles polymériques pour la condition RCell.

A partir de ces résultats, il apparaît que les prétraitements RCell et RXyn aient permis de solubiliser approximativement les mêmes quantités de carbone, ce carbone ayant été plus largement converti en AGV pour RXyn et en sucres monomériques pour RCell.

Pour le prétraitement au cocktail Celluclast - RCell, l'ensemble de cette caractérisation montrait une stabilisation de la dégradation des holocelluloses après un jour de traitement, corrélée à une stabilisation de la cristallinité du substrat et une accumulation de sucres monomériques à hauteur de 14 mCmol.L^{-1} (2,3 mM). Les phénomènes d'inhibition des enzymes cellulolytiques étant connus pour intervenir à des concentrations en glucose comprises entre 1,8 et 6,5 mM. (Hoh et al., 1992 ; Chauve et al., 2010 ; Holtzapfle et al., 1990), il semblait hautement probable que l'activité du cocktail cellulolytique ait été inhibée après 24h de prétraitement comme cela avait aussi été observé pendant les tests de saccharabilité en présence de biocide.

Parallèlement, pour le prétraitement au cocktail enzymatique Xyn11 – RXyn, une dégradation préférentielle de la fraction hémicellulose a été observée en corrélation avec une attaque progressive de la cellulose cristalline et une production d'AGV de 45 mCmol.L^{-1} .

Les différences majeures entre les deux prétraitements étaient donc l'attaque plus poussée de la fraction hémicellulose pour RXyn, ainsi que la production plus importante d'AGV observée dans cette même condition. La composition différente du carbone solubilisé par ces deux cocktails enzymatiques pourrait être expliquée par les conditions de pH différentes mises en œuvre (pH 5 pour RCell et pH 7,5 pour RXyn). En effet, les conditions de pH acides sont connues pour limiter le métabolisme des microorganismes acétogènes et donc la production d'AGV par ces derniers (Jiang et al., 2013, Mourino et al., 2001). Au contraire, ce type de microorganismes présentent un optimum de pH compris entre 6 et 7,5 et la plupart des microorganismes hydrolytiques ne peuvent pas croître à des pH inférieurs à 6 (Chen et al., 2012 ; Mourino et al., 2001 ; Russel et Wilson, 1996). Il apparaissait donc fortement probable que le pH acide de 5 ait engendré l'inhibition de la production d'AGV par la biomasse microbienne endogène au substrat lors du prétraitement RCell.

A3.3. Production de carboxylates par le consortium microbien RWS à partir des pailles de blé prétraitées enzymatiquement

Après les 48h de prétraitement enzymatique, les conditions de pH et de température ont été ramenées à celles mises en œuvre pour l'enrichissement de RWS (pH 6,10 et 35°C) et la communauté microbienne enrichie RWS a été inoculée à hauteur de 10% v/v.

A3.3.1. Impacts sur le potentiel biologique (ligno)cellulolytique acidogène de RWS

Après 15 jours de fermentation par RWS des taux de dégradation des matières volatiles de $64,9 \pm 7,8$ et $69,0 \pm 2,5$ %MV, ainsi que des productions d'AGV de $8,7 \pm 0,2$ g-AGV.L⁻¹ ou $326 \pm 9,5$ mCmol-AGV.L⁻¹ et $8,8 \pm 0,2$ g-AGV.L⁻¹ ou $328 \pm 7,8$ mCmol-AGV.L⁻¹, ont été atteints pour les prétraitements RCell et RXyn, respectivement. Ces capacités de transformation étaient nettement supérieures à celles observées en l'absence de prétraitement ($55 \pm 2,8$ % de dégradation des matières volatiles pour $6,5 \pm 0,9$ g-AGV.L⁻¹ ou $226,5 \pm 21,1$ mCmol-AGV.L⁻¹).

Les profils de dégradation de l'holocellulose, de la cellulose et de l'hémicellulose ont été évalués au cours de l'incubation du consortium RWS sur les différents substrats (en % mCmol/mCmol d'holocellulose initiale), ainsi que les vitesses de dégradation correspondantes (en % mCmoles.mCmolHolo initiale⁻¹.jr⁻¹). Avant inoculation par RWS, l'holocellulose était dégradée à hauteur de 26% et 16% pour les prétraitements RXyn et RCell, respectivement, et la vitesse de dégradation était quasiment double dans le cas du prétraitement RXyn en comparaison à RCell (Figure A3-3a). Après l'inoculation, des phases de latence ont été observées pendant 5 et 3 jours pour les prétraitements RXyn et RCell, respectivement. En comparaison, pour le substrat non prétraité la dégradation par RWS débutait après 2 jours. Globalement, la dégradation de l'holocellulose des pailles prétraitées était très nettement supérieure à celle observée avec la biomasse non prétraitée (Figure A3-3a). A partir de 12 jours d'inoculation par RWS, la fraction définie comme récalcitrante sur le substrat non prétraité était attaquée dans le cas des prétraitements enzymatiques ; c'est-à-dire que les niveaux de dégradation observés en prétraitement enzymatique devenaient supérieurs à ceux obtenus sur le substrat brut. Les vitesses maximales de dégradation d'holocellulose après inoculation étaient cependant équivalentes à celles observées sur paille brute, soit de l'ordre de 8 %mCmol.jr⁻¹.

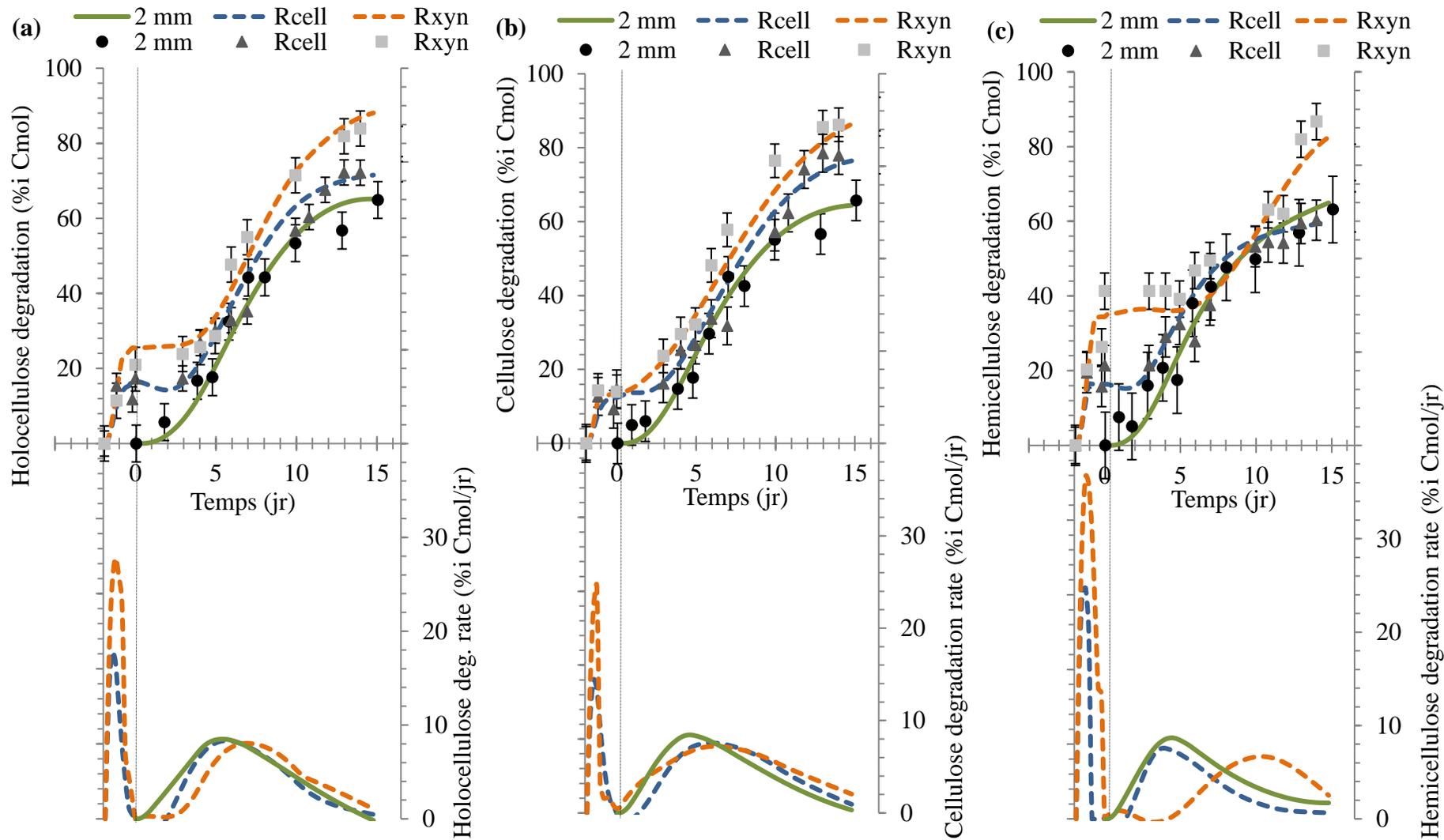


Figure A3-3 : Dynamique de dégradation a) holocellulose, b) cellulose, et c) hémicellulose au cours des 15 jours d’incubation des substrats prétraités enzymatiquement et non-prétraité avec RWS

La cellulose était attaquée dans les mêmes proportions pour les deux prétraitements enzymatiques, alors que la dégradation de l'hémicellulose était nettement plus importante dans le cas du prétraitement RXyn (Figure A3-3b et A3-3c). Les vitesses de dégradations maximales de cellulose et d'hémicellulose étaient pour autant équivalentes dans les trois conditions. Cependant alors que ces vitesses maximales étaient atteintes entre les jours 4 et 6 pour la cellulose, la vitesse maximale de dégradation de l'hémicellulose intervenait au jour 11 et était retardée de 7 jours pour le prétraitement RXyn, en comparaison les deux autres conditions (RCell et substrat non prétraité). Alors qu'aucune dégradation de la lignine par RWS n'avait été observée sur substrat brute ou prétraité chimiquement, il n'était pas possible de conclure sur la dégradation de cette dernière lors des prétraitements enzymatiques tant la variabilité des mesures était importante. D'autre part comme nous l'avons déjà abordé, les analyses dynamiques des substrats par FTIR et notamment la détermination du LOI permet de rendre compte de la cristallinité de la cellulose du substrat au cours de la dégradation par RWS. Alors que pour le témoin sur paille brute, le LOI augmentait de 0,73 à 0,98 au cours de l'incubation avec RWS, il diminuait très légèrement pour les prétraitements enzymatiques passant de 0,59 à 0,52 et de 0,55 à 0,51 pour RCell et RXyn respectivement. Globalement, ce résultat suggère l'attaque simultanée des deux fractions cristalline et amorphe de la cellulose au cours de la fermentation des substrats prétraités par RWS. Ceci avait aussi été observé pour les prétraitements chimiques et confirmait la capacité de RWS à dégrader les deux fractions cellulosiques du substrat lorsque ce dernier a été préalablement prétraité.

La conversion des substrats en AGV et CO₂ a été suivie au cours des 15 jours d'incubation avec RWS et rapportée à la quantité initiale d'holocellulose disponible. Les résultats de production ainsi que les vitesses correspondantes sont exprimés en Cmoles.Cmoles d'holocellulose initiale⁻¹.(jr⁻¹). La production spécifique d'AGV après 15 jours d'incubation avec RWS était multipliée par un facteur 1.5 pour les prétraitements enzymatiques par rapport au substrat brut, atteignant 0,70 Cmol.Cmol iHolo⁻¹ contre 0,45 Cmol.Cmol iHolo⁻¹ pour la référence non prétraitée (Figure A3-4a). Les vitesses maximales de production d'AGV après inoculation par RWS n'étaient pas atteintes simultanément selon que le substrat ait subi un prétraitement enzymatique ou non. Alors que la vitesse spécifique maximale de production d'AGV était observée après seulement 3 jours d'incubation pour les deux prétraitements enzymatiques, elle intervenait au jour 5 pour la paille brute (Figure A3-4a). De plus la vitesse spécifique maximale de production d'AGV était nettement supérieure après les prétraitements enzymatiques notamment cellulolytique, avec 0,12 Cmol.Cmol iHolo⁻¹.jr⁻¹ pour le prétraitement RCell contre 0.07 Cmol.Cmol iHolo⁻¹.jr⁻¹ pour le prétraitement RXyn et 0.045 pour la paille non prétraitée.

Concernant la production de CO₂ (Figure A3-4b), à 15 jours d'incubation, le prétraitement RCell atteignait un niveau de 0,12 Cmol.Cmol iHolo⁻¹, équivalent à celui observée sur paille brute ; alors que dans le cas du prétraitement RXyn la production finale n'était que de 0,08 Cmol.Cmol iHolo⁻¹. D'autre part la production de CO₂ était nettement favorisée durant les premiers jours d'incubation de RWS avec le substrat prétraité par le cocktail cellulolytique RCell. En comparaison avec la référence sur paille brute, elle atteignait 0,02 Cmol.Cmol iHolo⁻¹.jr⁻¹ au jour 3 contre 0,012 Cmol.Cmol iHolo⁻¹.jr⁻¹ aux jours 5-7. A contrario la vitesse de production de CO₂ était diminuée et retardée pour RXyn, avec un maximum de 0,008 Cmol.Cmol iHolo⁻¹.jr⁻¹ aux jours 10-12. Lors des fermentations de RWS sur les différents substrats prétraités ou non, l'analyse de la phase gaz au cours du temps a révélé la présence de dihydrogène. Alors que la production cumulée de dihydrogène en 15 jours s'élevait à 20 mmol.L⁻¹ pour le substrat non prétraité, celle-ci était très largement réduite pour les deux prétraitements enzymatiques, atteignant 7 et 3 mmol.L⁻¹ pour RXyn et RCell, respectivement.

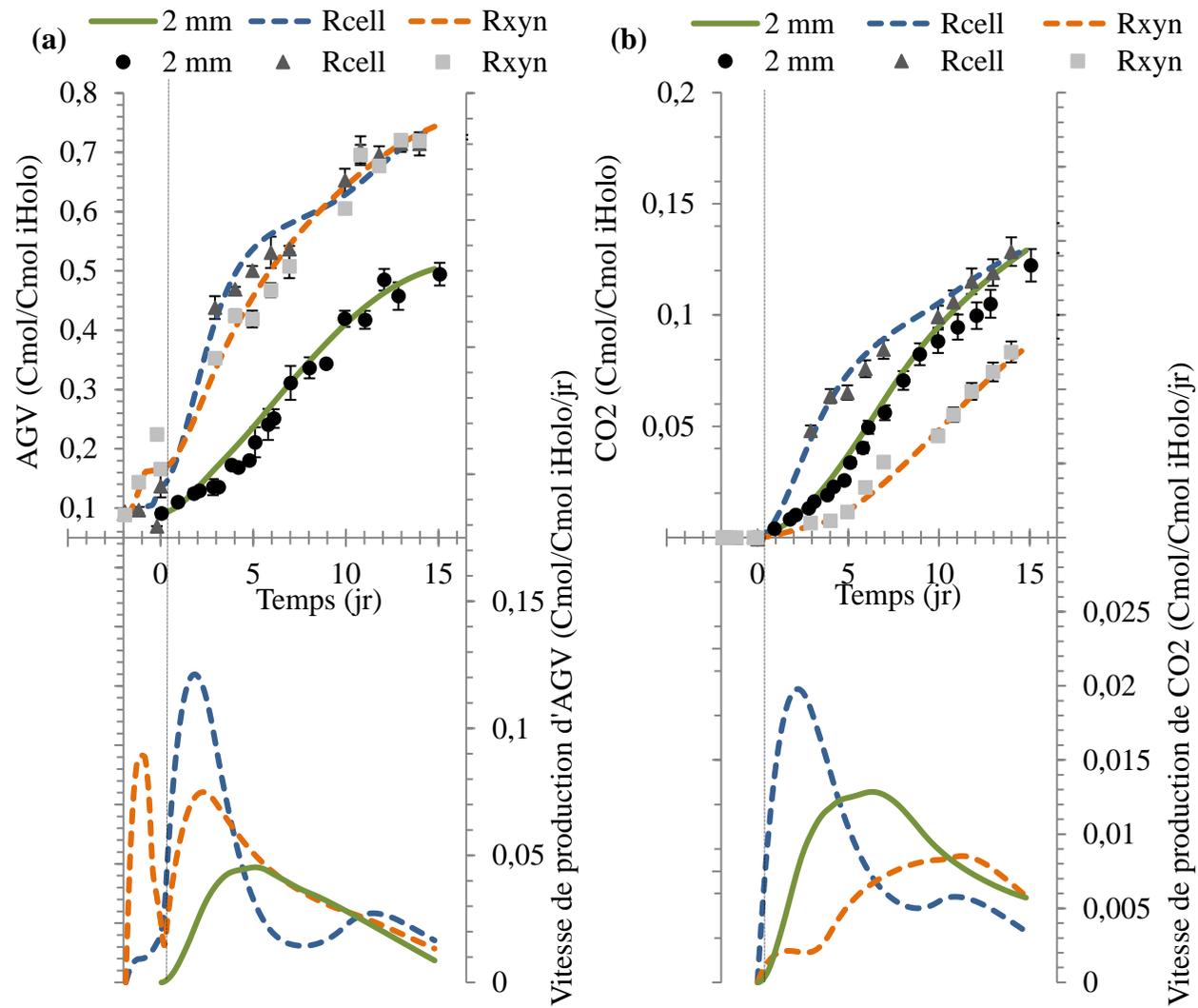


Figure A3-4 : Dynamique de production en a) AGV et b) CO2 au cours des 15 jours d'incubation des substrats prétraités enzymatiquement et non-prétraité avec RWS

La composition en AGV (C2-C5) était aussi impactée par les prétraitements enzymatiques. Par rapport à la référence non prétraitée, la proportion d'acides impairs (propionique et valérique/AGV totaux) était diminuée de 4 et 3% pour RCell et de 7 et 3% m/m pour RXyn; alors que celle d'acide butyrique était augmentée de 9 et 7% m/m dans RCell et RXyn, respectivement, par rapport à la référence non prétraitée. La fraction massique d'acide acétique était elle diminuée de 2% pour le prétraitement RCell et augmentée de 3% pour RXyn, en comparaisons avec la référence (Table A3-1). A partir de ces proportions massiques, les rendements théoriques de production d'AGV ont été calculés selon les équations IV-1 à IV-4 (page 113) et comparés aux rendements expérimentaux déterminés par rapport à la quantité d'holocellulose dégradée.

Table A3-1 : Production, composition et rendement théorique et expérimentaux en AGV (C2-C5) après 15 jours d'incubation des substrats prétraités enzymatiquement et non prétraité avec RWS

	Paille brute 2 mm	Prétraitement enzymatique RCell	Prétraitement enzymatique RXyn
AA (mCmol/L)	136.98±5.55	160.93±5.13	168.03±1.9
AP (mCmol/L)	53.7±1.09	63.48±1.61	59.12±0.35
AB (mCmol/L)	27.78±1.18	85.66±1.85	77.03±1.00
AV (mCmol/L)	36.86±0.58	8.81±0.2	10.16±0.13
AA (%m/m-AGV)	57	55	60
AP (%m/m-AGV)	22	18	15
AB (%m/m-AGV)	13	22	20
AV (%m/m-AGV)	6	3	3
R AGV th (g/gHolo)	0,65	0,63	0,64
R AGV exp (g/gHolo)	0,49	0,61	0,56
R CO ₂ exp (g/gHolo)	0,26	0,20	0,13

Les rendements de production d'AGV par RWS étaient augmentés pour les deux prétraitements enzymatiques, atteignant 0,61 et 0,56 g-AGV.gHolo⁻¹ soit 97% et 87% des rendements théoriques, pour RCell et RXyn respectivement ; contre 0,49 g-AGV.gHolo⁻¹ (75% du rendement théorique) pour la paille non prétraitée. Parallèlement, les rendements de production de CO₂ étaient diminués de 23 et 50% pour RCell et RXyn respectivement, en comparaison avec la paille non prétraitée, ce que constituait un réel avantage en limitant la perte de carbone sous forme gazeuse.

Finalement, les prétraitements enzymatiques étudiés présentaient de nets avantages pour la transformation du substrat en carboxylates par RWS, favorisant à la fois la dégradation de la paille de blé et les hauteurs, vitesses et rendements de production de synthons.

A3.3.2. Impact sur le profil des activités enzymatiques xylanase et CMCCase

Les activités enzymatiques CMCCase et xylanase ont été analysées au cours des 15 jours d'incubation des différents substrats avec RWS. Puisqu'à l'ajout de la communauté RWS les conditions ont été ramenées au pH 6,1 et la température de 35°C, les activités enzymatiques présentées dans cette partie (Figure A3-5) ont été mesurées dans ces conditions de pH et température, contrairement à la phase de prétraitement où ces dernières avaient été analysées dans les conditions optimales des cocktails enzymatiques.

Pour les trois conditions et les deux activités enzymatiques évaluées, on observait une phase de latence lors des premiers jours d'incubation avec RWS. Alors que l'activité xylanase basale était de $0,18 \pm 0,02$ UA.mL⁻¹ pour le témoin sur paille brute, elle atteignait $0,67 \pm 0,02$ et $0,99 \pm 0,08$ UA.mL⁻¹ pour RCell et RXyn, respectivement.

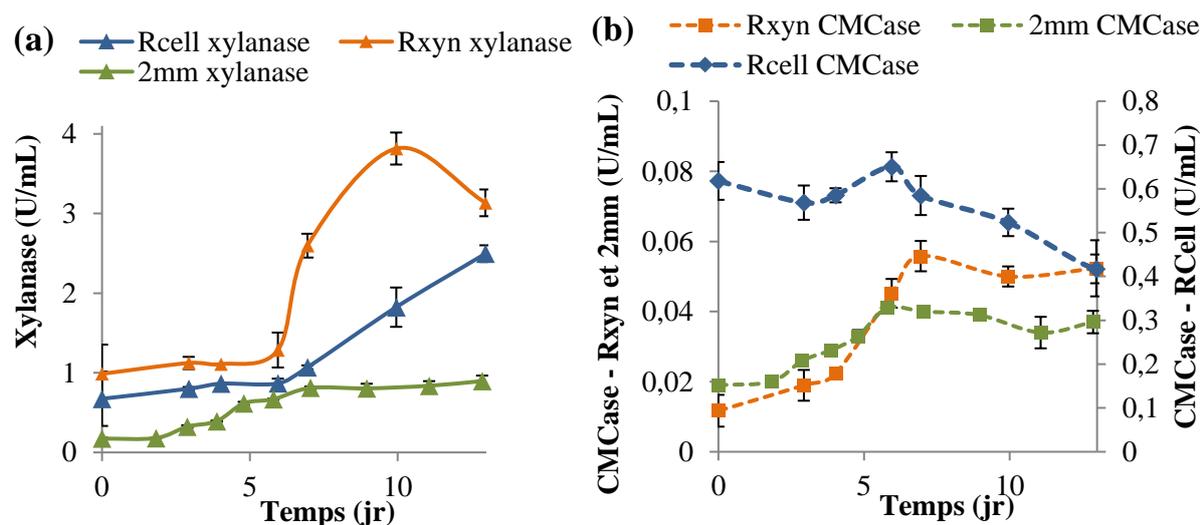


Figure A3-5 : Mesure des activités enzymatiques (a) xylanase, (b) CMCCase, à 35°C, pH 6, après ajout de l'inoculum dans les réacteurs RCell (bleu), RXyn (orange), et sans prétraitement (vert)

L'activité CMCCase basale était elle similaire pour le témoin sur paille brute et le prétraitement enzymatique RXyn ($0,02 \pm 0,01 \text{ UA.mL}^{-1}$ sur paille brute et $0,01 \pm 0,01 \text{ UA.mL}^{-1}$ pour RXyn), mais atteignait $0,62 \pm 0,04 \text{ UA.mL}^{-1}$ pour RCell. Ainsi, les activités enzymatiques dans les substrats prétraités étaient nettement supérieures à celles observées sur le témoin paille brute.

Au cours de l'incubation de RWS sur paille brute, les activités xylanase et CMCCase augmentaient progressivement des jours 2 à 7 pour atteindre les valeurs maximales de $0,81 \pm 0,11 \text{ UA-xylanase.mL}^{-1}$ et $0,04 \pm 0,01 \text{ UA-CMCCase.mL}^{-1}$. Par la suite, ces activités se stabilisaient. Pour la paille prétraitée RCell, l'activité xylanase augmentait tout au long de l'incubation avec RWS, d'abord lentement des jours 3 à 6 puis drastiquement à partir du jour 7 jusqu'à atteindre $2,50 \pm 0,15 \text{ UA.mL}^{-1}$ en fin de cinétique (Figure A3-5a). L'activité CMCCase chutait légèrement jusqu'au jour 10 (à $0,52 \pm 0,03 \text{ UA.mL}^{-1}$) puis diminuait fortement en fin de cinétique à la valeur de $0,47 \pm 0,03 \text{ UA.mL}^{-1}$ (Figure A3-5b).

Concernant le prétraitement RXyn, l'activité xylanase augmentait d'abord légèrement des jours 3 à 6 (jusqu'à $1,28 \pm 0,09$) puis drastiquement à partir du jour 7 pour atteindre un maximum de $3,81 \pm 0,17 \text{ UA.mL}^{-1}$ au jour 10. En fin de cinétique cette dernière retombait à a valeur de $3,13 \pm 0,13 \text{ UA.mL}^{-1}$ (Figure A3-5a). Le profil de l'activité CMCCase observé pour RXyn était similaire à celui décrit pour le témoin sans prétraitement, c'est-à-dire présentant une phase d'augmentation importante suivie d'une stabilisation (Figure A3-5b).

La valeur maximale atteinte était cependant légèrement supérieure et retardée d'un jour (avec $0,55 \pm 0,03 \text{ UA.mL}^{-1}$ au jour 7).

L'ensemble de ces observations suggèrent une production d'enzymes par le consortium RWS en incubation avec les substrats prétraités. En effet, les activités présentées étant des activités totales, c'est-à-dire représentant la somme des activités mesurées dans les surnageants et les fractions cell-bound, leur augmentation en cours d'incubation ne semblait pouvoir résulter que d'une production par RWS et non de la désorption des enzymes vers le surnageant au cours de la dégradation du substrat. De plus, les activités qui augmentaient en cours d'incubation (xylanase pour les deux prétraitements enzymatiques et CMCCase pour RXyn seulement) étaient préférentiellement contenues dans la fraction liée aux cellules et au substrat, phénomène déjà observé lors de l'incubation de RWS sur substrat non prétraité et prétraité chimiquement. De manière intéressante la diminution de l'activité CMCCase au cours de l'incubation RCell était, au contraire, associée avec la mesure préférentielle de cette activité dans le surnageant, suggérant l'instabilité du cocktail cellulolytique au cours de l'incubation.

A3.4. Conclusions

L'intégration de l'ensemble des résultats observés au cours de l'incubation de RWS sur les pailles prétraitées permettait de proposer un modèle de transformation des substrats en carboxylates en trois phases.

La première phase d'environ trois jours est caractérisée par une très faible hydrolyse du substrat corrélée à des niveaux basaux d'activités enzymatiques et une forte production d'AGV résultant probablement de la solubilisation des polysaccharides engendrée lors de la phase de prétraitement.

Par la suite, jusqu'au jour 7, la seconde phase consiste en une légère augmentation des activités enzymatiques à des niveaux proches de ceux obtenus sur prétraitements chimiques, associée à une hydrolyse du substrat et une production d'AGV comparables à celles observées sur paille brute. Il est toutefois à noter que dans cette phase la cellulose était préférentiellement hydrolysée devant la fraction hémicellulolytique pour RXyn, et que l'activité CMCase n'est pas augmentée pour RCell.

Enfin, à partir du jour 7 la dernière phase serait caractérisée par une augmentation drastique de l'activité xylanase induisant l'attaque de la fraction définie comme récalcitrante sur paille brute et sa conversion en AGV à des niveaux nettement supérieurs à ceux atteints tant sur le témoin paille brute que sur les substrats prétraités chimiquement.

Alors que les prétraitements chimio-mécaniques présentés dans ces travaux permettaient d'accélérer la dynamique d'hydrolyse du substrat et sa conversion en AGV par le consortium RWS, les prétraitements enzymatiques étudiés ici sembleraient de surcroit repousser la définition d'une fraction définie auparavant comme récalcitrante.