

Les automates de phénotypage à haut débit du CIRM

David NAVARRO^{1,2}
Victoria CHUAT³

CORRESPONDANCE
victoria.chuat@inrae.fr

Le Centre International de Ressources Microbiennes (CIRM) est un Groupe-ment d'Intérêt Scientifique (GIS), créé en 2004 par l'INRA, qui a pour vocation la préservation, l'enrichissement et la valorisation de la diversité microbienne présente dans ses collections. Il compte aujourd'hui plus de 22 000 souches de champignons filamenteux, levures et bactéries.

Les collections du CIRM ont la particularité d'être spécialisées, les ressources biologiques hébergées étant liées à des thématiques précises : des Levures d'intérêt biotechnologique, des Bactéries d'intérêt alimentaire, pathogènes des animaux et de l'Homme, associées aux Plantes, et des Champignons Filamenteux d'intérêt agro-industriel. Ces collections sont capables d'offrir plus d'une centaine de souches d'une seule et même espèce. Elles représentent ainsi un vivier très intéressant pour la recherche de fonctionnalités d'intérêts dans les domaines de l'agroalimentaire, de la santé et des biotechnologies.

Pour investiguer les capacités de ses ressources microbiennes, le GIS CIRM s'est doté de deux outils de criblage, l'un au CIRM dédié aux Bactéries d'Intérêt Alimentaire (CIRM-BIA) de Rennes, et l'autre au CIRM dédié aux Champignons Filamenteux (CIRM-CF) à Marseille, chaque plateforme étant optimisée pour la manipulation des ressources biologiques lui étant propres.

1 Biodiversité et Biotechnologie Fongiques, Aix-Marseille Université, INRAE, UMR1163, 13288 Marseille, France.

2 INRAE, Aix-Marseille Université, UMR1163, CIRM-CF, 13288 Marseille, France.

3 STLO, INRAE, Agrocampus Ouest, 35000 Rennes, France.

Une plateforme de criblage à haut débit pour la caractérisation phénotypique des souches bactériennes d'intérêt alimentaire au CIRM-BIA de Rennes

Contexte

Le Centre International de Ressources Microbiennes dédié aux Bactéries d'Intérêt Alimentaire (CIRM-BIA), situé à Rennes, possède une collection de plus de 4 000 souches bactériennes issues de collections rapatriées, de dépôts et de collectes ciblées. Si dans les premières années d'activité du CIRM-BIA, les souches de la collection provenaient principalement d'aliments fermentés laitiers, comme le yaourt et les fromages, la collection s'est fortement enrichie ces dernières années avec des souches provenant de matrice d'origine végétale, comme le moût de raisin, le levain de boulangerie ou encore les légumes fermentés.

Les micro-organismes jouent un rôle crucial dans la fermentation des aliments. En fermentant les sucres naturellement présents dans la matrice, différents composés aromatiques sont produits, impactant le goût final de l'aliment. La texture finale de l'aliment peut également être impactée par la production d'exopolysaccharides, par exemple. Enfin, la diminution de pH ayant lieu pendant la fermentation d'une matrice peut empêcher le développement de micro-organismes indésirables tout comme la production de bactériocines.

Ces fonctionnalités très recherchées sont cependant souche-dépendantes et dépendent pour beaucoup de la matrice à fermenter. En effet, une souche produisant des arômes et une texture intéressante sur une matrice laitière n'aura pas forcément les mêmes caractéristiques sur une matrice végétale. À partir de notre expérience, nous avons réalisé que seulement 10 % des souches criblées pouvaient potentiellement montrer un intérêt dans la recherche d'une fonctionnalité ciblée ; cela soulignait l'immense avantage à mettre en place un outil permettant le criblage d'un grand nombre de souches, pour sélectionner rapidement des souches d'intérêt à étudier plus en détails.

Dans ce but, le CIRM-BIA s'est doté, en 2009, d'un automate de criblage à haut débit HAMILTON. Les projets étant très variables, nous avons souhaité une plateforme modulable pour répondre aux questions de recherche très diverses.

Description de la plateforme

Cette plateforme est dotée de 8 canaux (1) et travaille en plaques 96 puits. Un spectrophotomètre est relié au robot

permettant des suivis de croissance par mesure d'absorbance (2). La plateforme est dotée d'une pompe à vide (3) permettant les extractions d'ADNs en haut débit. Elle possède également des blocs chauffants et agitateurs permettant l'incubation de cultures bactériennes liquides en aérobiose sur la plateforme (4, 4'). Différents supports sont présents pour s'adapter aussi bien aux plaques (5), microplaques PCR (6), tubes hémolyse (7), cryotubes (8), eppendorfs (9) ou encore vials CPG (10). Tous les racks sont mobiles et peuvent être déplacés, enlevés ou ajoutés selon le programme. Cette plateforme ainsi équipée est située dans une enceinte stérile.

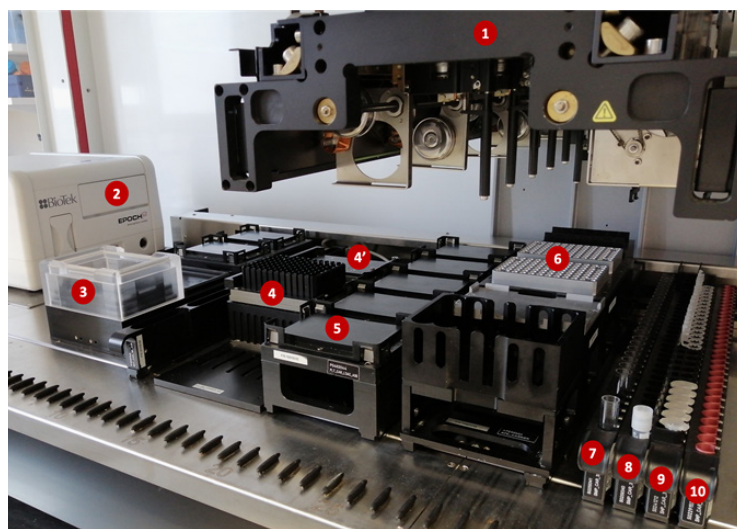


Figure 1. Plateforme de criblage du Centre International de Ressources Microbiennes dédié aux Bactéries d'Intérêt Alimentaires (CIRM-BIA).

Méthodes développées

Si l'outil permet en routine des expérimentations classiques de repiquages de souches, d'extractions d'ADN en plaques 96 puits ou encore de congélation de souches, il est aussi modulable pour permettre le criblage de fonctionnalités recherchées.

Ainsi, de nombreux suivis de croissance ont pu être réalisés, en conditions de cultures optimales ou au contraire en conditions fixées, bas pH, présence de sels, permettant ainsi de cribler les souches sur des critères bien définis.

Ces dernières années, l'outil est très utilisé pour cribler les souches de la collection sur leur capacité à dégrader des sucres d'intérêt dans des milieux synthétiques, des matrices laitières ou encore des matrices végétales. Aujourd'hui ce sont environ 1 000 souches de la collection du CIRM-BIA qui ont déjà pu être testées.

Une plateforme de phénotypage à haut-débit, dédiée à l'exploration fonctionnelle de la biodiversité fongique, au CIRM-CF de Marseille

Contexte

Les champignons filamenteux, principaux micro-organismes impliqués dans la dégradation de la matière organique végétale, sont une source majeure d'enzymes et de molécules d'intérêt biologique dans les domaines de l'agro-alimentaire (arômes, antioxydants, agent de fermentation), de la santé (antiviraux, antimicrobiens, anti-inflammatoires) ou encore des biotechnologies blanches (bioremédiation, biocarburant...). Malgré ce fort potentiel de valorisation, peu d'outils permettent d'explorer la diversité enzymatique et métabolique offerte par les champignons filamenteux, dont la biodiversité est estimée, aujourd'hui, à plus de 5 millions d'espèces. En effet, contrairement à d'autres micro-organismes (bactéries, levures), le développement de méthodes automatisées, adaptées aux champignons filamenteux, et notamment des basidiomycètes, est rendu difficile par des contraintes spécifiques

(cultures hétérogènes, sporulation, pigmentation et viscosité des sécrétomes). C'est dans ce contexte que le CIRM-CF et l'UMR 1163 BBF ont développé, depuis plus de 15 ans, une plateforme de phénotypage à haut-débit, dédiée à l'exploration fonctionnelle de la biodiversité fongique.

Équipements mis en place

Pour répondre aux défis posés par la miniaturisation de culture de champignons filamenteux et par la grande diversité des différents types de champignons filamenteux, nous avons fait le choix d'une plateforme robotisée évolutive, permettant de s'adapter à chaque problématique rencontrée. Aujourd'hui, la plateforme réunit plusieurs équipements autour d'un automate de pipetage TECAN Freedom Evo 200 (Figure 2).

Selon les applications, la plateforme peut utiliser des cônes stériles ou des aiguilles téflonisées pour les pipetages (Figure 2, n°3). Deux manipulateurs de microplaques permettent de déplacer les microplaques aux emplacements requis. Enfin, un ordinateur contrôle l'ensemble de ces équipements.

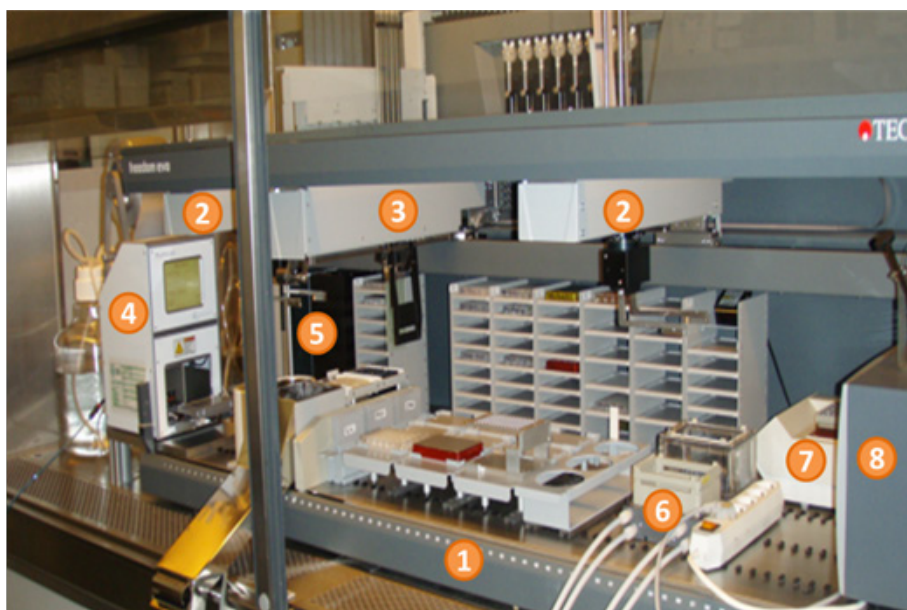


Figure 2. Plateforme de criblage du Centre International de Ressources Microbiennes dédié aux Champignons Filamenteux (CIRM-CF).

- 1) Automate de pipetage TECAN Freedom Evo 200 ;
- 2) Manipulateurs de microplaques ;
- 3) Cônes stériles ou aiguilles téflonisées pour pipetage ;
- 4) Scelleuse de microplaque (VELOCITY11) ;
- 5) Incubateur avec agitation pour microplaque (de 25 à 55 °C) ;
- 6) Unité de filtration de microplaque (TECAN T-Vacs) ;
- 7) Bloc chauffant statique pour microplaque (jusqu'à 100 °C) (EPPENDORF, Thermomixer) ;
- 8) Spectrofluorimètre, avec agitation et incubation (TECAN Infinite 200).

Autour de la plateforme robotisée, d'autres équipements viennent compléter les possibilités :

- Des incubateurs Minitron et Microtron (INFORS) destinés aux cultures moyen-débit (plaques 16 puits) et haut-débit (plaques 24 et 96 puits).
- Une chaîne de chromatographie liquide ultra-haute performance (UHPLC) couplée à un spectromètre de masse (quadropole simple).



Figure 3. Photos des incubateurs Minitron et Microtron ainsi que de la chaîne de chromatographie liquide ultra-haute performance (UHPLC) couplée à un spectromètre de masse.

Méthodes développées

La plateforme est ouverte à nos partenaires académiques et industriels, ainsi qu'à l'enseignement. Elle a permis le développement de méthodes variées :

- Isolement de lignées monocaryotiques à partir de souches basidiomycètes.
- Criblage et sélection de clones recombinants pour la production d'enzymes en système hétérologue.
- Criblage et sélection de souches pour la production de métabolites ou d'enzymes d'intérêt.
- Phénotypage haut-débit de secrétomes fongiques pour la saccharification de biomasses lignocellulosiques.
- Sélection de souches performantes pour la fermentation en milieu solide.
- Purification haut-débit de protéines recombinantes (His-tag). ■

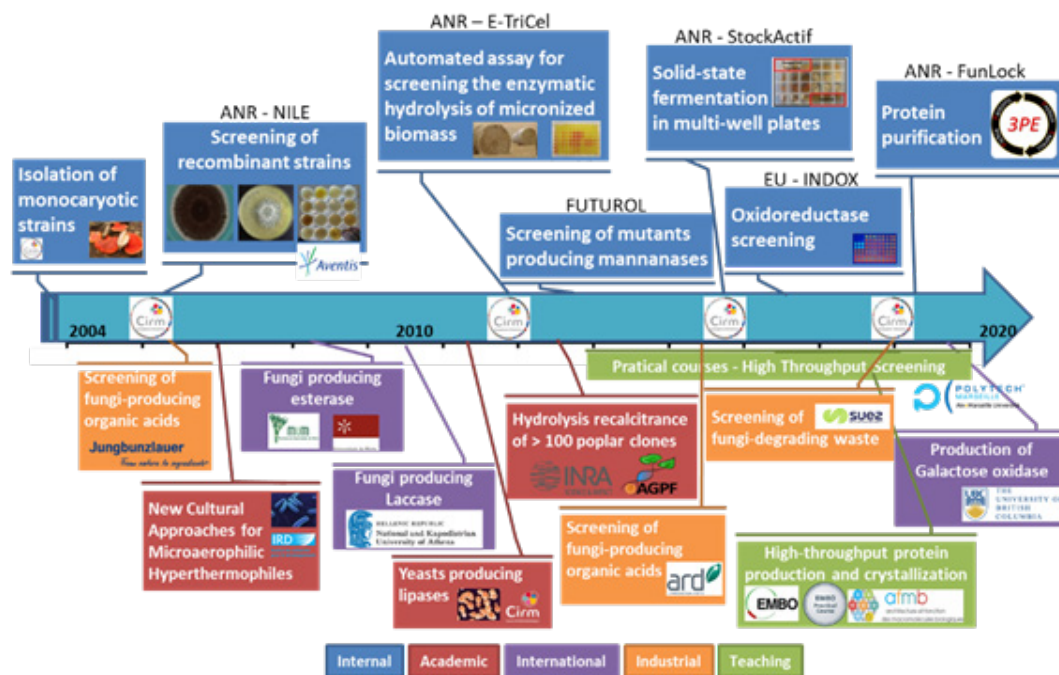


Figure 4. Chronologie des méthodes de criblages développées et des partenariats associés.

Références

- Couturier M., Navarro D., Favel A., Haon M., Lechat C., Lesage-Meessen L., Chevret D., Lombard V., Henrissat B. and Berrin JG. 2016. *Fungal secretomics of ascomycete fungi for biotechnological applications*. Mycosphere. Doi 10.5943/mycosphere/si/3b/6.
- Haon M., Grisel S., Navarro D., Gruet A., Berrin JG. and Bignon C. 2015. *Recombinant protein production facility for fungal biomass-degrading enzymes using the yeast Pichia pastoris*. Frontiers in Microbiology, 23; 6:1002.
- Zhou S., Raouche S., Grisel S., Navarro D., Sigoillot JC. and Herpoël-Gimbert I. 2015. *Solid-state fermentation in multi-well plates to assess pretreatment efficiency of rot fungi on lignocellulose biomass*. Microbial Biotechnology, 8(6):940-9.
- Liaud N., Giniés C., Navarro D., Fabre N., Crapart S., Gimbert I., Levasseur A., Raouche S. and Sigoillot JC. 2014. *Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi*. Fungal Biology and Biotechnology, 1:1.
- Liaud N., Navarro D., Vidal N., Sigoillot JC and Raouche S. 2014. *High throughput automated colorimetric method for the screening of lactic acid producing microorganisms*. MethodsX, 1:e254-e257.
- Berrin JG, Navarro D., Couturier M., Olivé C., Grisel S., Haon M., Taussac S., Lechat C., Courtecuisse R., Favel A., Coutinho P-M. and Lesage-Meessen L. 2012. *Exploring the Natural Fungal Biodiversity of Tropical and Temperate Forests toward Improvement of Biomass Conversion*. Applied and Environmental Microbiology Aug 2012, 78 (18) 6483-6490; DOI: 10.1128/AEM.01651-12.
- Couturier M., Navarro D., Olive C., Chevret D., Haon M., Favel A., Lesage Meessen L., Henrissat B., Coutinho P. M. and Berrin J-G. 2011. *Post-genomic analyses of fungal lignocellulosic biomass degradation reveal the unexpected potential of the plant pathogen Ustilago maydis*. BMC Genomics 2012, 13:57/1471-2164.
- Uzarraga R., Auria R., Davidson S., Navarro D., and Combet-Blanc Y. 2010. *New Cultural Approaches for Microaerophilic Hyperthermophiles*. Current Microbiology, Volume 62, Number 2, 346-350.
- Navarro D, Couturier M, da Silva GG, Berrin JG, Rouau X, Asther M, Bignon C. 2010. *Automated assay for screening the enzymatic release of reducing sugars from micronized biomass*. Microbial Cell Factories. 2010 Jul 16;9:58.
- Alberto F., Navarro D., De Vries RP., Asther M. and Record E. 2009. *Technical advance in fungal biotechnology: development of miniaturized culture method and an automated high-throughput screening*. Letters in Applied Microbiology, 49, no2, pp. 278-282.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.