



Production par voie microbienne et extraction *in situ* d'acide 3-hydroxypropionique : Apport de la cytométrie en flux dans l'étude de la biocompatibilité du procédé

Grégoire BURGÉ^{1,2}, Claire SAULOU-BÉRIION², Marwen MOUSSA²,
Florent ALLAIS^{1,2}, Violaine ATHES², Henry-Éric SPINNLER²

1 : Chaire Agro-Biotechnologies Industrielles (ABI) - AgroParisTech, 51100 Reims, France

2 : INRA-AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, 78850 Thiverval-Grignon, France

gregoire.burge@agroparistech.fr



Plan de la présentation

- **Contexte et objectifs**

Etude de l'impact des stress générés par le couplage entre production et extraction du 3-HP sur l'état physiologique des bactéries productrices

- **Matériel et méthodes**

- Fonctionnement du contacteur membranaire
- Marqueurs utilisés en cytométrie en flux

- **Résultats**

- Etude du stress subi au cours de la bioconversion du glycérol
- Etude des stress engendrés par le procédé couplé

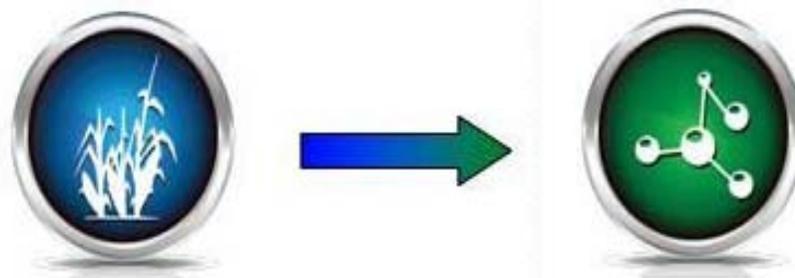
- **Conclusion**

Vers un procédé intégré couplant production et extraction du 3-HP

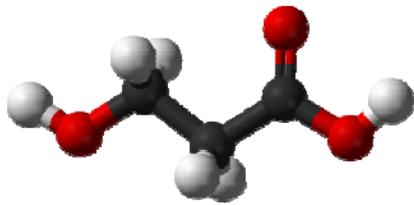


Contexte et objectifs :

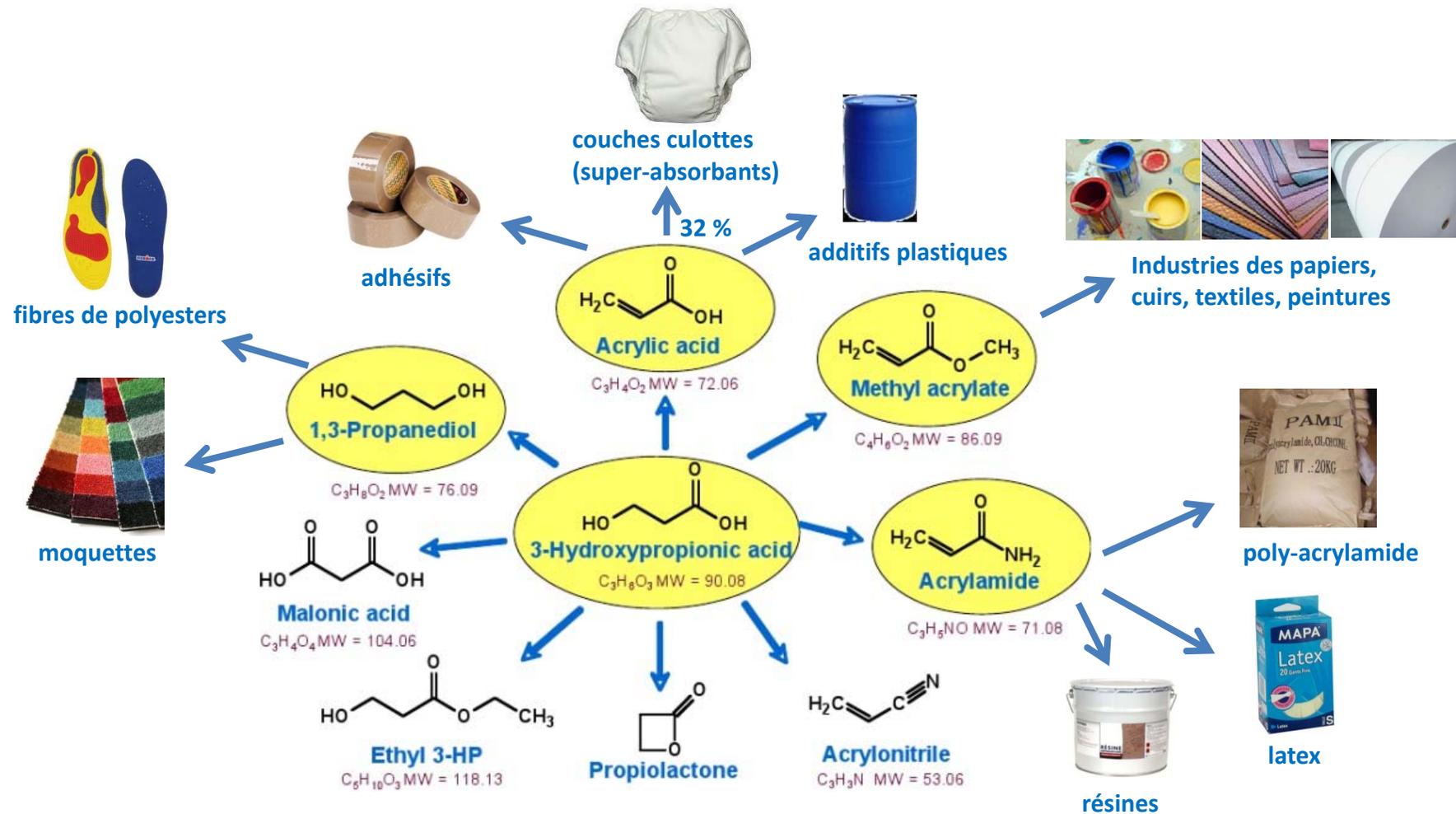
Etude de l'impact des stress générés par le couplage entre production et extraction du 3-HP sur l'état physiologique des bactéries productrices



Le 3-HP : une molécule plateforme d'intérêt



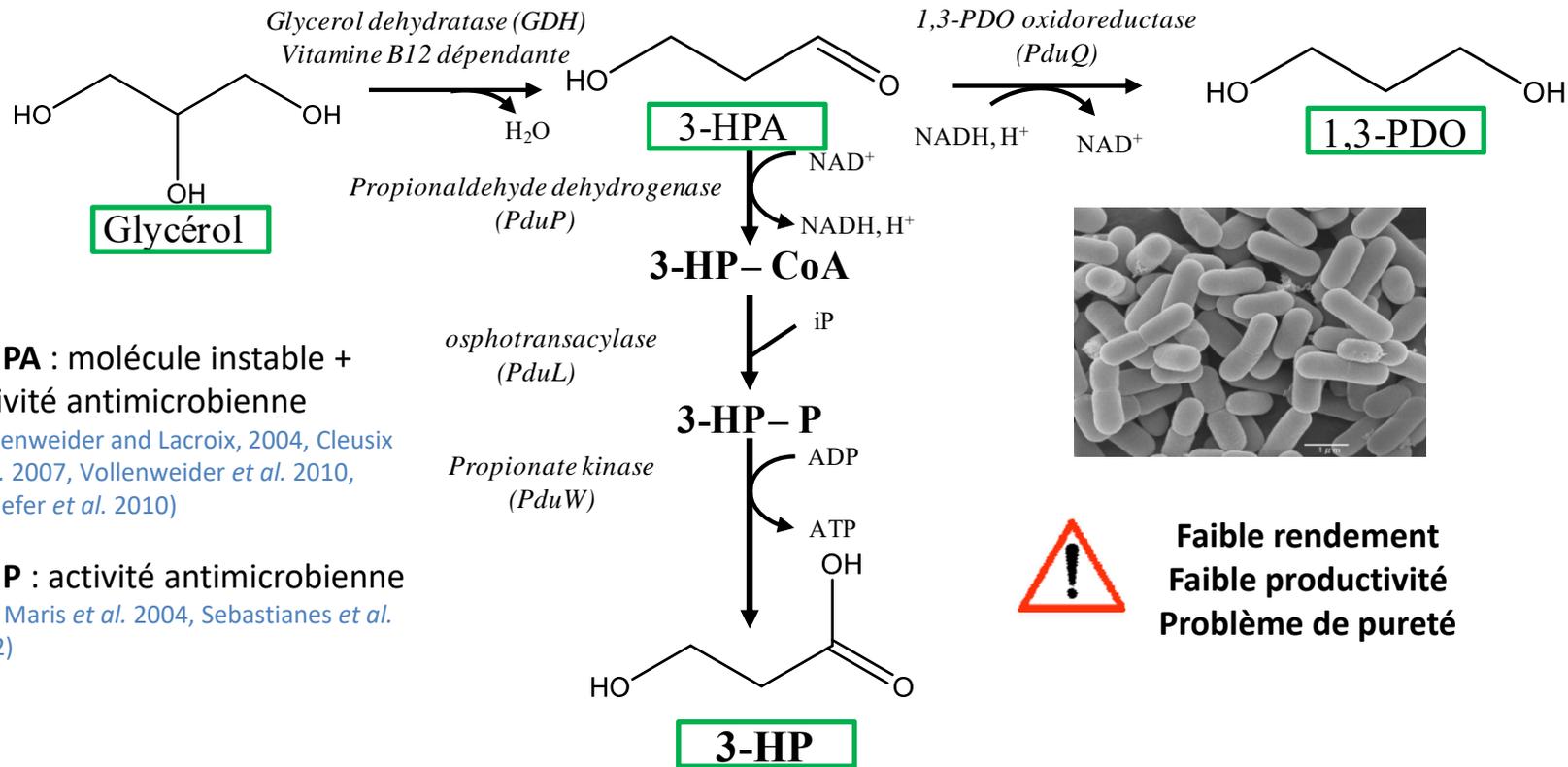
- Formule brute : $C_3H_6O_3$
- Isomère de position de l'acide lactique (2-HP)
- 1 des 10 synthons d'intérêt ciblé par le DOE (Bozell and Petersen, 2010)



Lactobacillus reuteri :

une bactérie naturellement productrice de 3-HP

- Bonne résistance au stress acide pendant la phase de croissance (Kandler *et al.* 1983 , Schleifer and Ludwig 1995)
- Productrice naturelle de 3-HP à partir du glycérol (Talarico *et al.* 1988, Luo *et al.* 2011, Dishisha *et al.* 2014)
- Inhibition liée à la bioconversion non étudiée



3-HPA : molécule instable +
activité antimicrobienne

(Vollenweider and Lacroix, 2004, Cleusix *et al.* 2007, Vollenweider *et al.* 2010, Schaefer *et al.* 2010)



3-HP : activité antimicrobienne
(van Maris *et al.* 2004, Sebastianes *et al.* 2012)



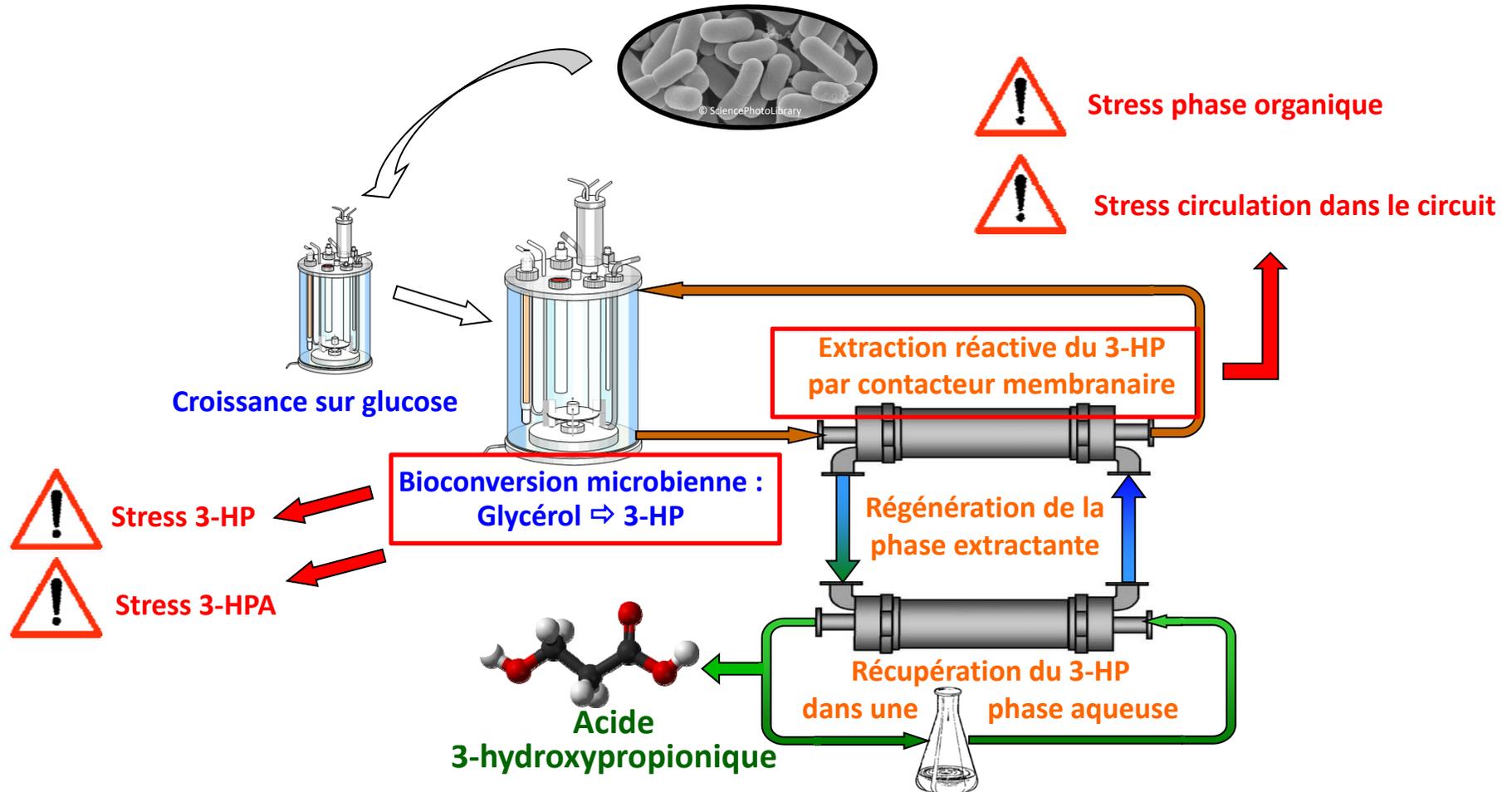
Faible rendement
Faible productivité
Problème de pureté

- Choix d'extraire sélectivement le 3-HP du milieu de bioconversion pour récupérer la molécule d'intérêt et pour diminuer l'inhibition exercée sur *L. reuteri*
- Intégration des étapes de bioconversion et extraction

Schéma général du procédé intégré

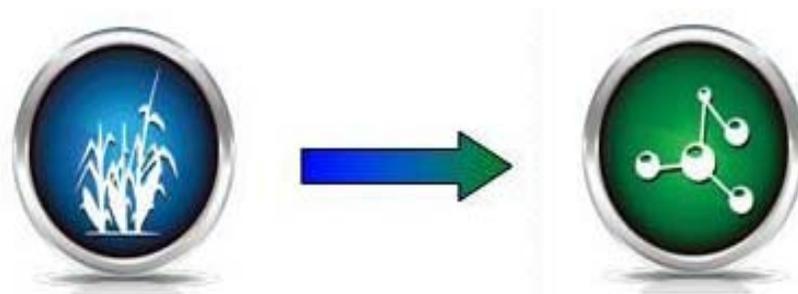
Projet multidisciplinaire : **Génie microbiologique** + **Génie des procédés**

Lactobacillus reuteri

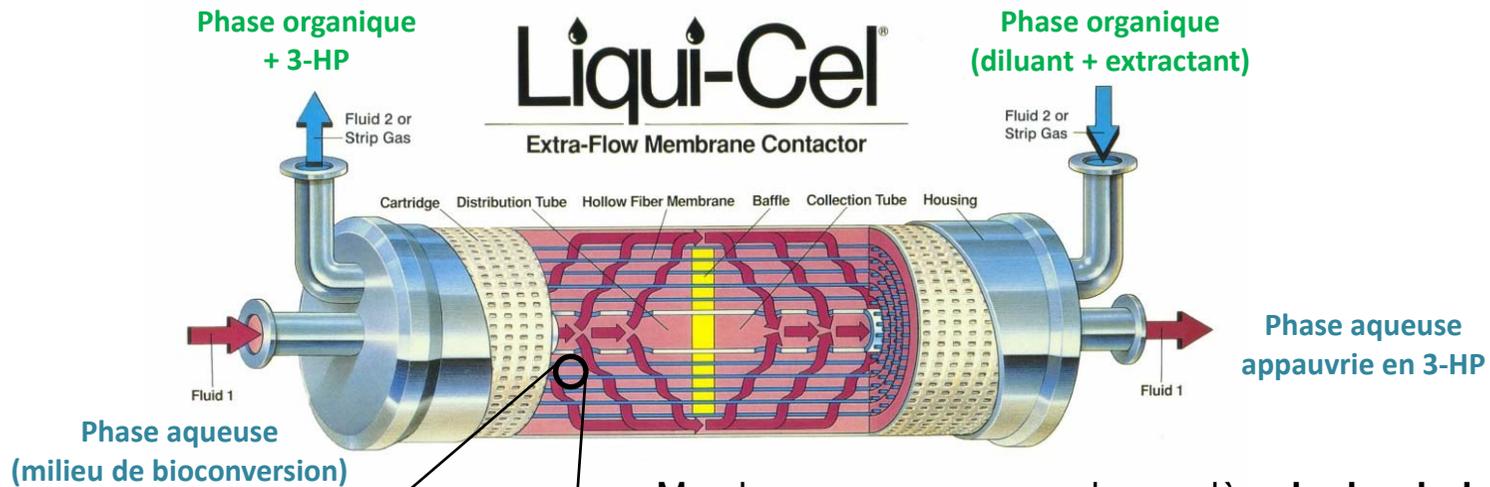


Matériel et Méthodes :

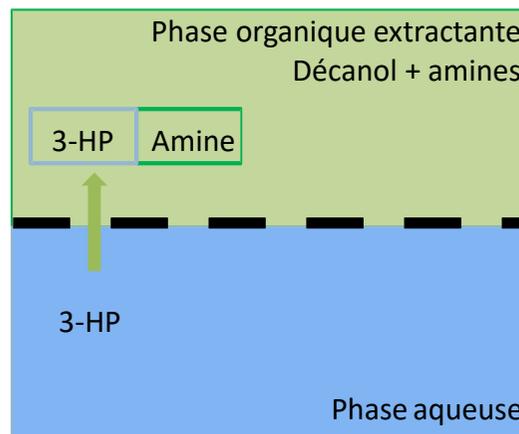
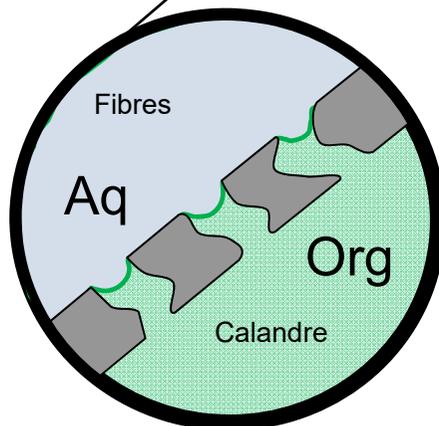
Fonctionnement du contacteur membranaire Marqueurs utilisés en cytométrie en flux



Principe du contacteur membranaire



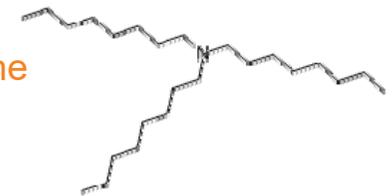
Membrane poreuse en polypropylène hydrophobe



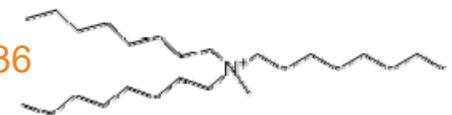
Décanol



Trioctylamine (TOA)

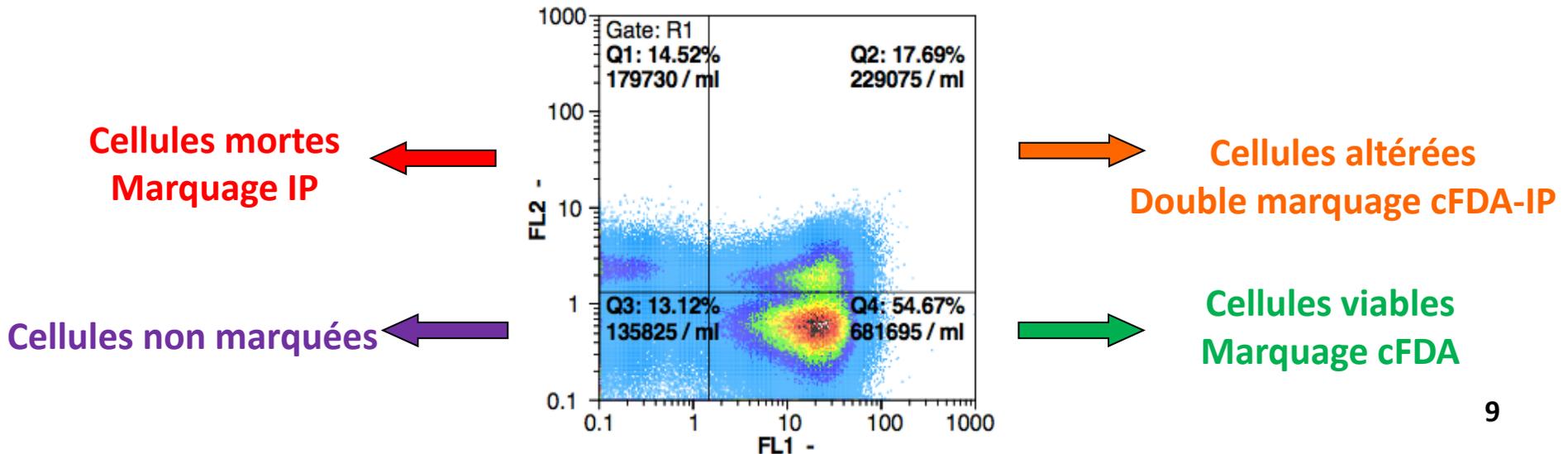
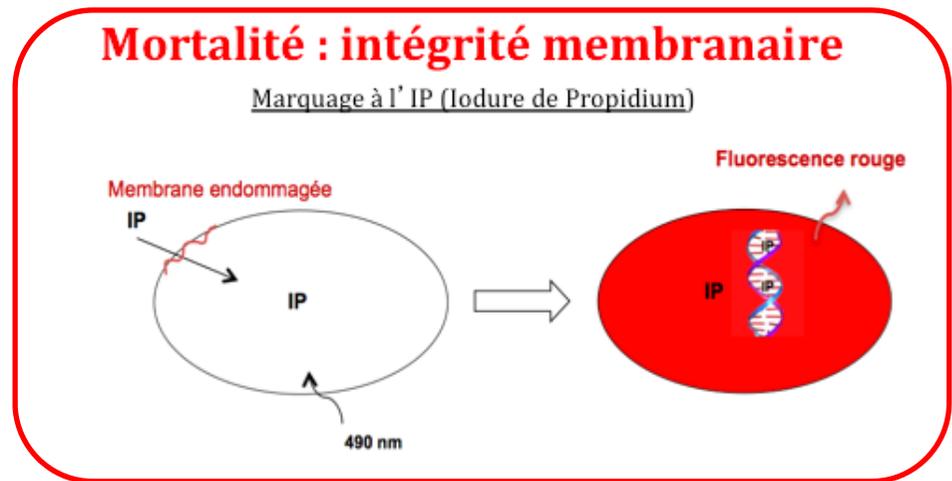
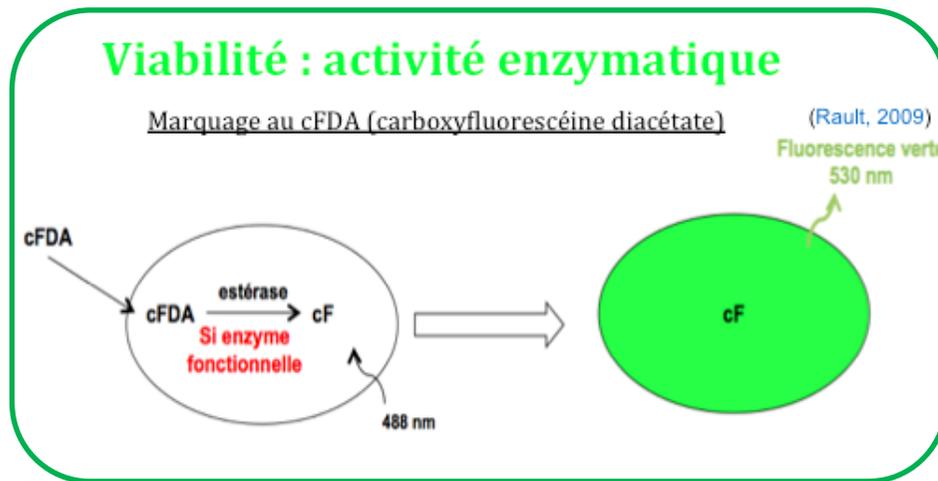


Aliquat 336



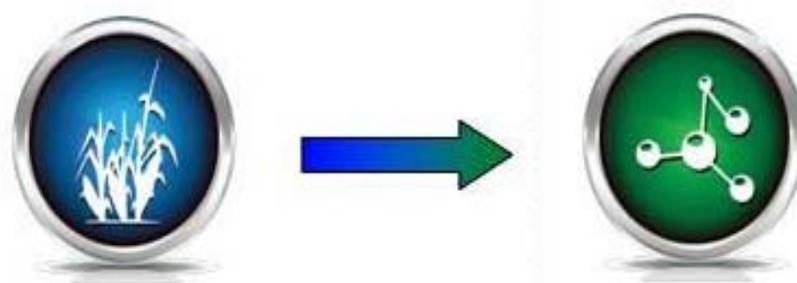
Marqueurs utilisés en cytométrie en flux

→ Cytométrie en flux = méthode d'intérêt pour caractériser une éventuelle inhibition des enzymes de la voie de biosynthèse du 3-HP au cours de la bioconversion du glycérol et de l'extraction *in situ* de la molécule d'intérêt



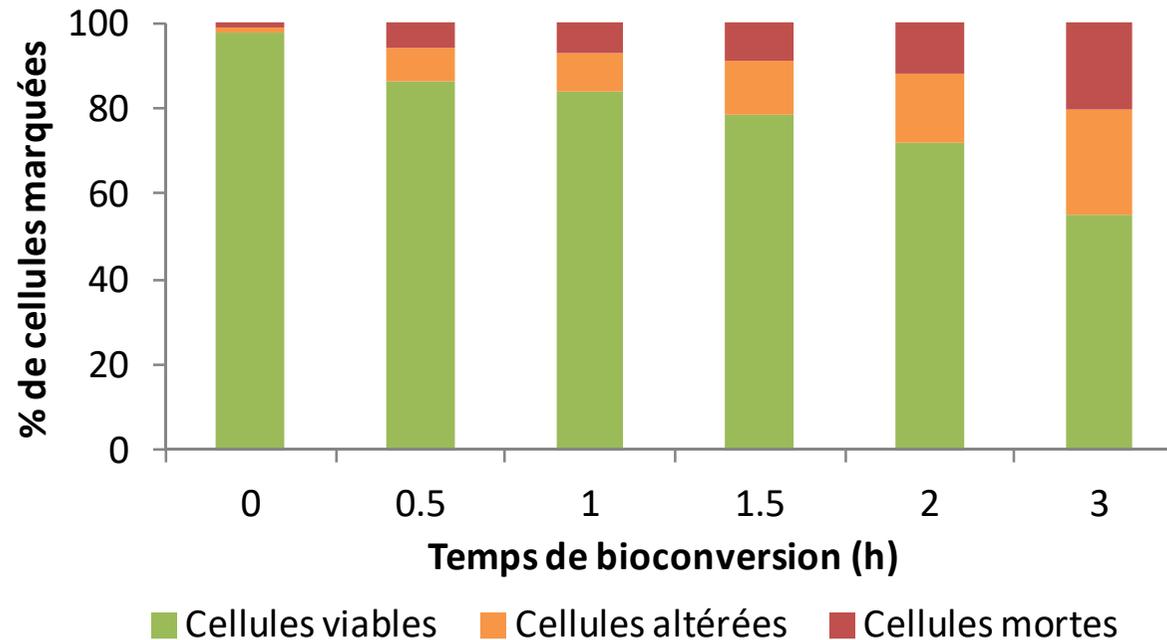


Etude du stress subi au cours de la bioconversion du glycérol



Impact de la bioconversion du glycérol sur l'état physiologique de *L. reuteri*

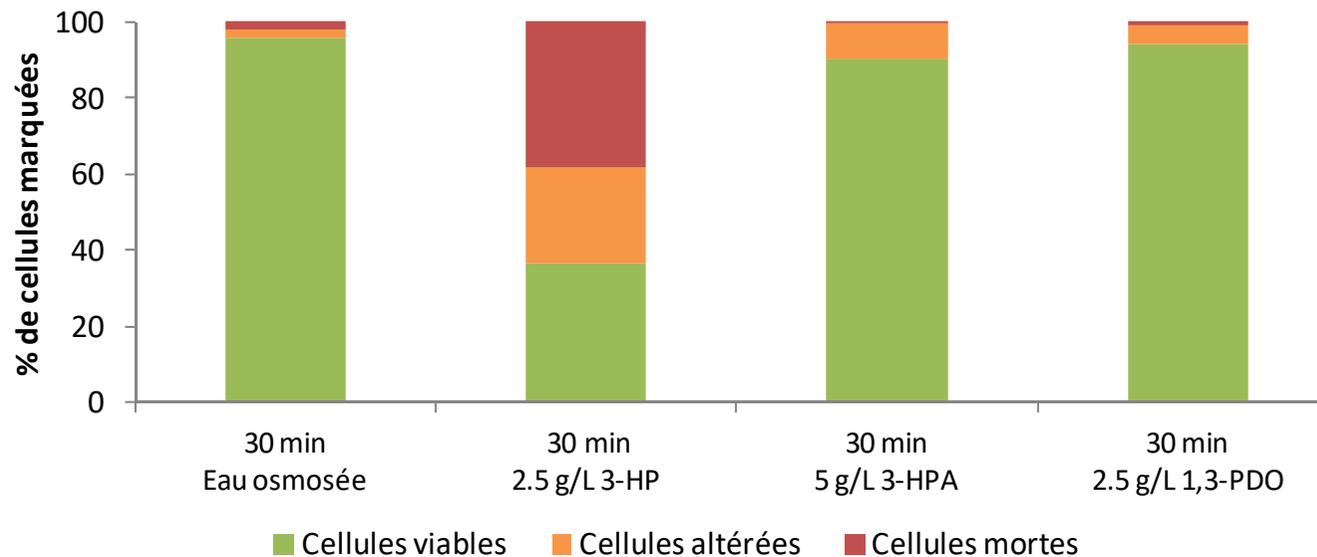
- Etude de l'impact de la bioconversion du glycérol sur l'état physiologique de *L. reuteri* à pH 6



- Etat physiologique affecté au cours du temps de bioconversion
- Trois molécules potentiellement inhibitrices dans le milieu de bioconversion (3-HP, 3-HPA et 1,3-PDO) + impact potentiel de la baisse de pH due à la production de l'acide
- Difficile de discerner les effets

Impact des métabolites de la voie sur l'état physiologique de *L. reuteri*

- Etude de l'impact des différents métabolites de la voie de bioconversion du glycérol sur l'état physiologique de *L. reuteri*
- Concentrations choisies en fonction de la concentration maximale attendue en milieu réel



Après 30 min de contact :

→ Pas d'impact du 1,3-PDO ni du 3-HPA

→ Impact négatif du 3-HP

→ Dans le cas de l'inhibition provoquée par le 3-HP, nécessité de découpler l'effet pH et l'effet molécule

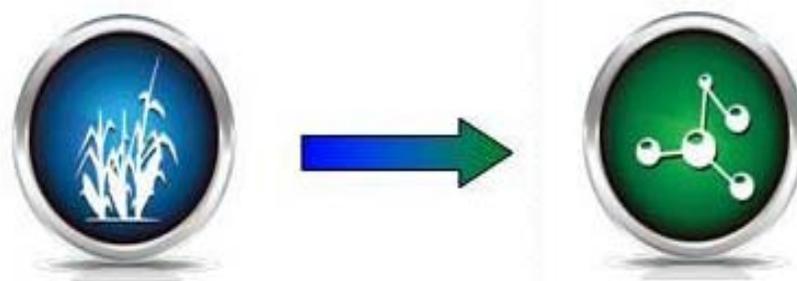
Après 3 h de contact (résultats non montrés):

→ Pas d'impact du 1,3-PDO

→ Impact du 3-HPA équivalent à celui du 3-HP après 30 min de contact

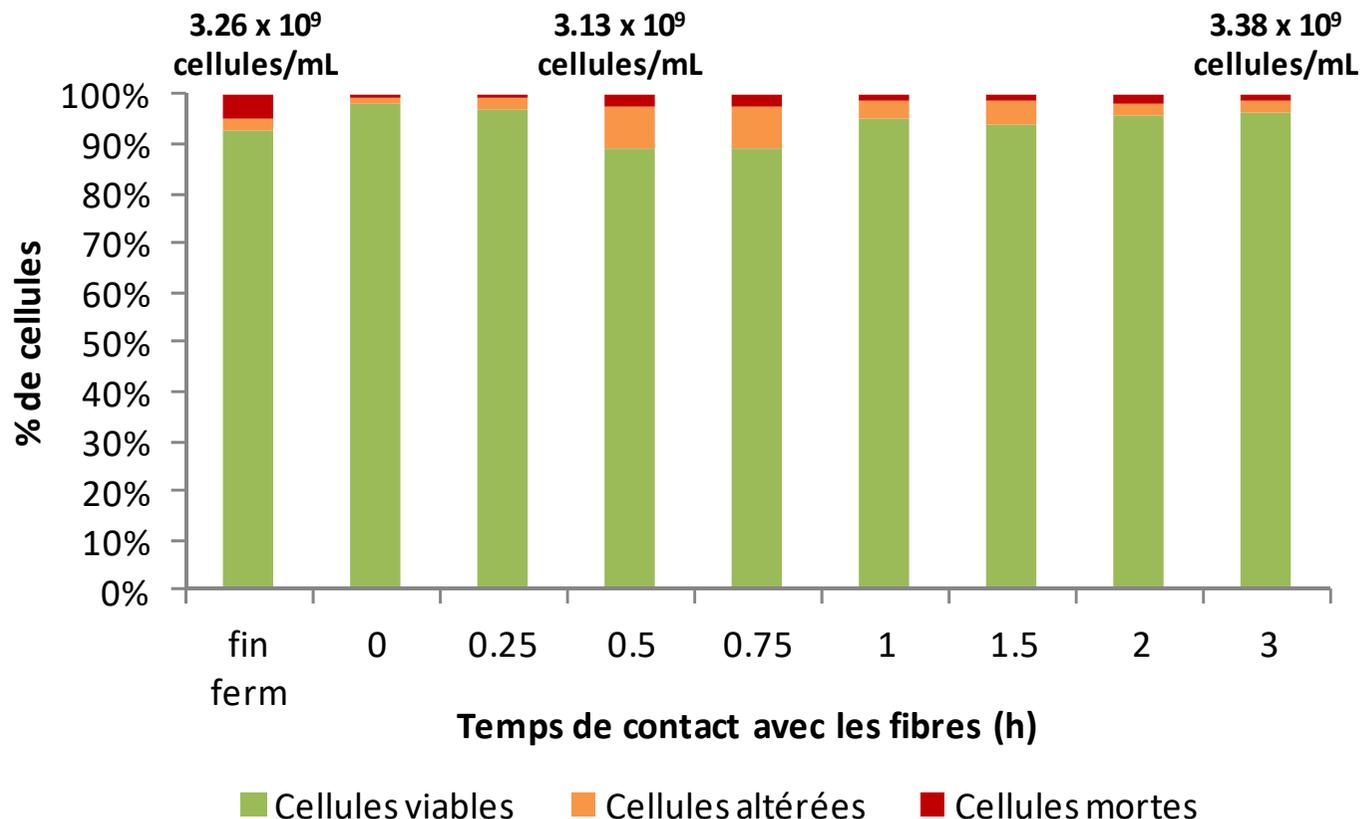


Etude des stress engendrés par le procédé couplé



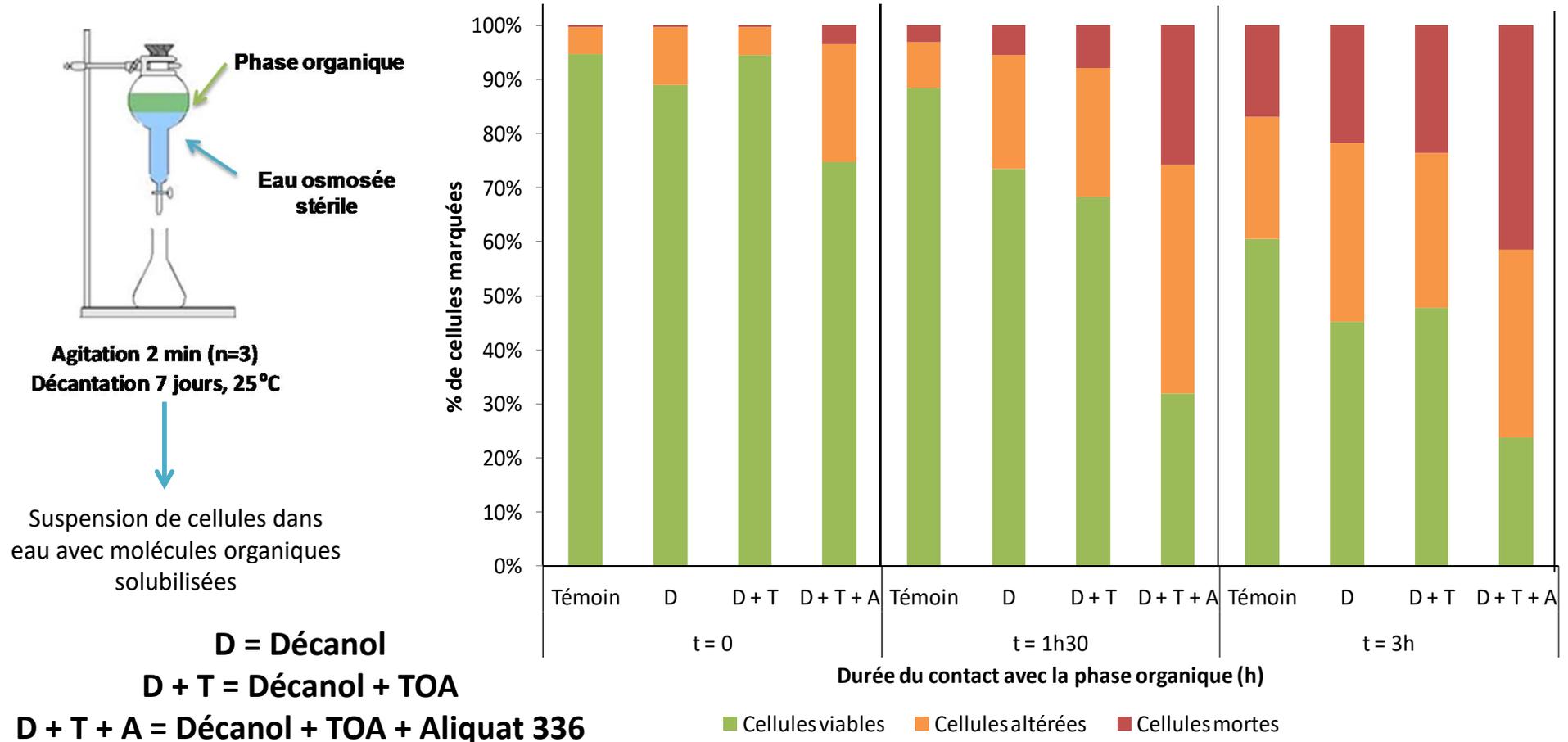
Impact de la circulation des cellules sur l'état physiologique de *L. reuteri*

- Circulation de 500 mL d'eau + cellules dans le circuit du contacteur et circulation de 500 mL d'eau sans cellules dans la calandre
- Débits et pressions identiques aux conditions opératoires habituelles



- ➔ Pas de baisse significative de la viabilité cellulaire lors du passage dans le circuit
- ➔ Pas d'impact visible de la circulation dans le circuit sur l'état physiologique de *L. reuteri*

Impact de la phase organique sur l'état physiologique de *L. reuteri*



- Témoin altéré au cours du temps

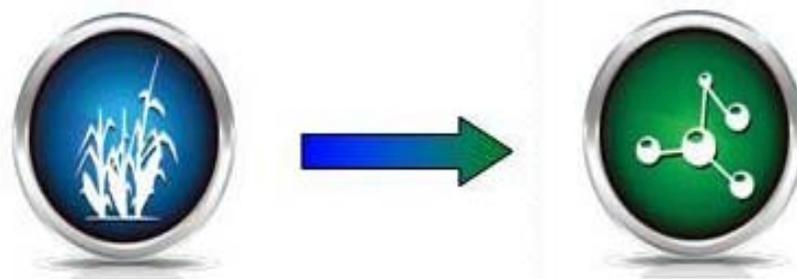
➔ Peu d'impact du décanol seul ou du mélange décanol / TOA par rapport au témoin

➔ Impact beaucoup plus marqué de l'Aliquat 336 sur l'état physiologique de *L. reuteri*

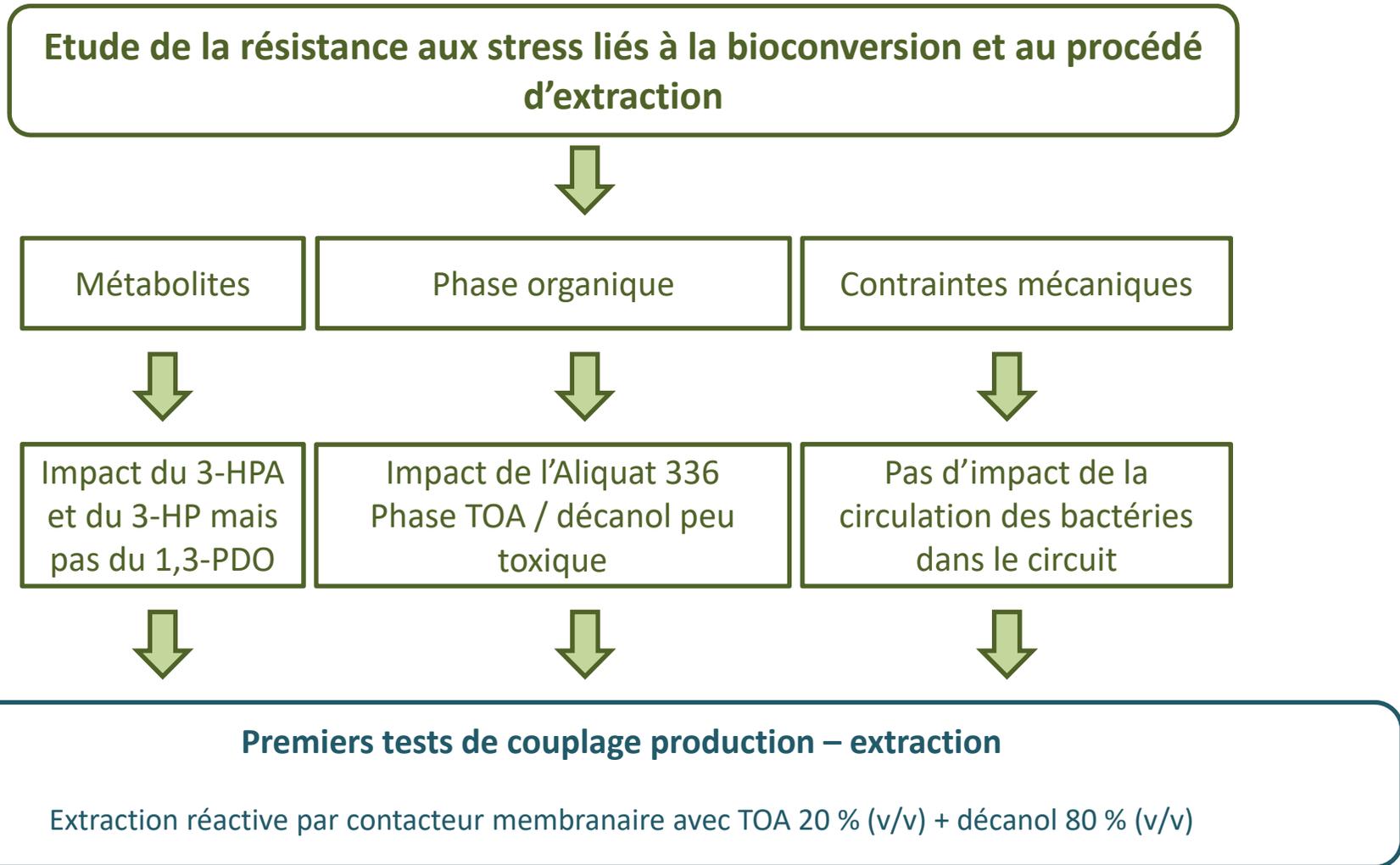


Conclusion et perspectives :

Vers un procédé intégré couplant production et extraction du 3-HP



Vers un procédé intégré couplant production et extraction du 3-HP



→ **Cytométrie en flux = technique d'intérêt pour la caractérisation et la compréhension des phénomènes d'inhibition observés lors de la mise en œuvre du procédé couplé**



Poster : Session microbiologie industrielle

Production par voie microbienne et extraction *in situ* d'acide 3-hydroxypropionique : Vers un procédé intégré couplant procédés upstream et downstream

Grégoire BURGÉ^{1,2}, Claire SAULOU-BÉRION², Marwen MOUSSA²,
Florent ALLAIS^{1,2}, Violaine ATHES², Henry-Éric SPINNLER²

1 : Chaire Agro-Biotechnologies Industrielles (ABI) - AgroParisTech, 51100 Reims, France

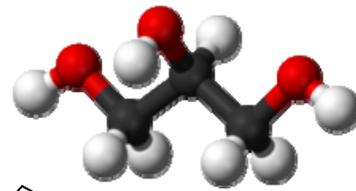
2 : INRA-AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, 78850 Thiverval-Grignon, France

gregoire.burge@agroparistech.fr

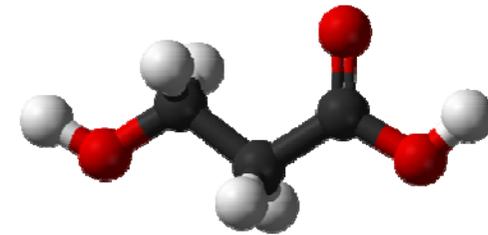
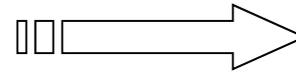




Merci de votre attention !



Glycérol



**Acide 3-hydroxypropionique
(3-HP)**



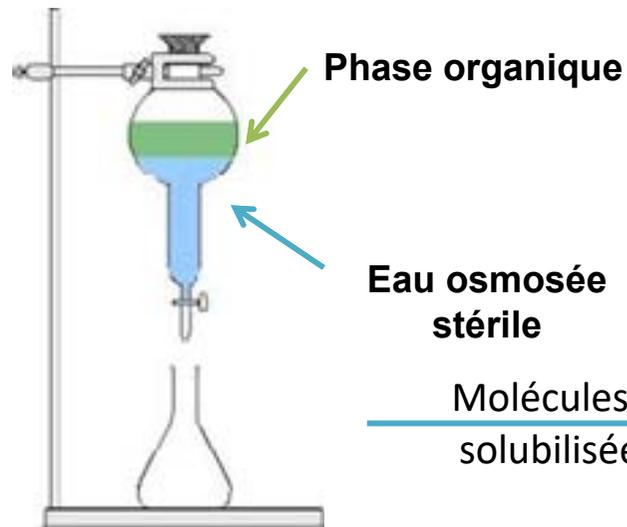
Impact de la phase organique

Conditions opératoires :

- **Témoin** : Eau osmosée stérile
- **Décanol** 100 % (v/v)
- **Décanol** 80 % (v/v) + **TOA** 20 % (v/v)
- **Décanol** 80 % (v/v) + **TOA** 18 % (v/v) + **Aliquat 336** 2 % (v/v)

Solubilités à 25°C :

- **Décanol** : 37 mg/L
- **TOA** : 0.05 mg/L
- **Aliquat 336** : 1200 mg/L



Eau osmosée
stérile

Mise en contact avec cellules lavées
 $2,4 \cdot 10^9$ cellules/mL

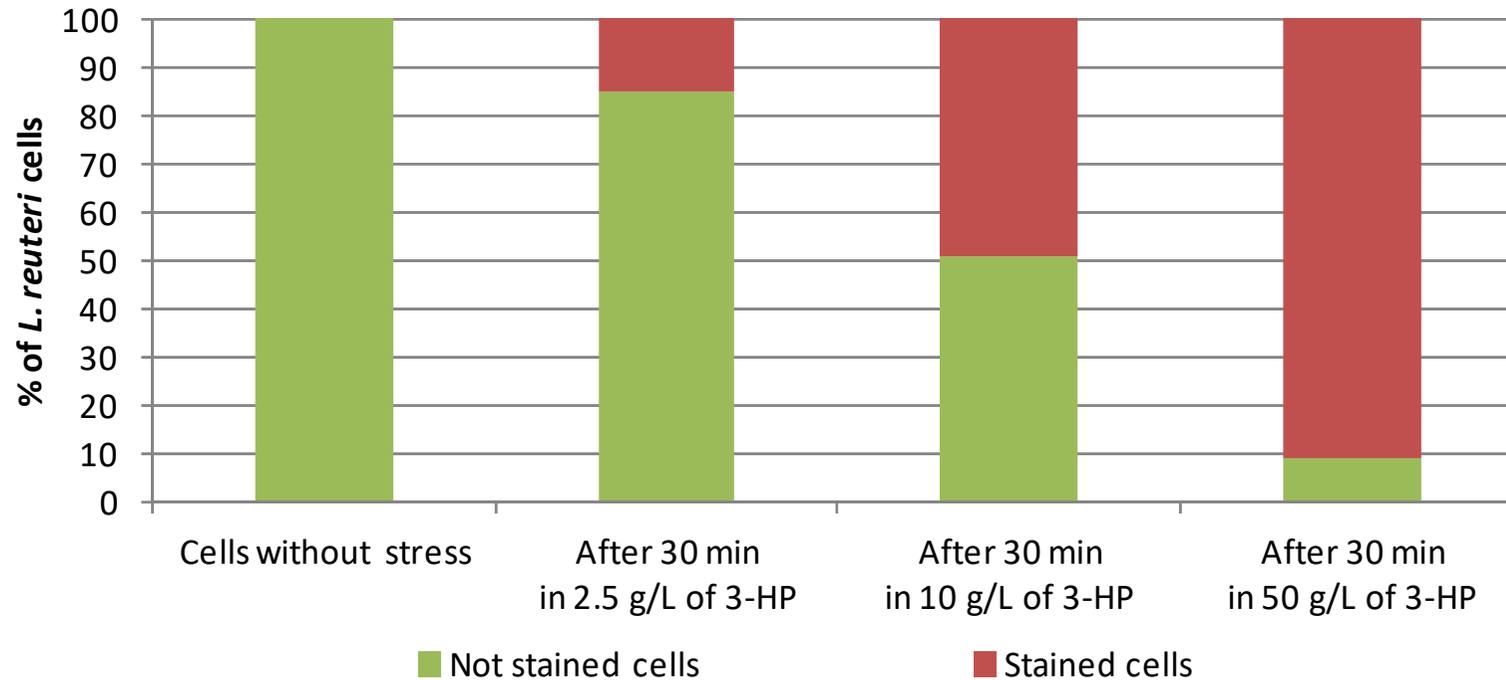
Molécules organiques
solubilisées dans eau

Evolution de l'état
physiologique au cours
du temps
(cytométrie en flux)

Agitation 2 min (n=3)
Décantation 7 jours, 25°C

Témoin : Cellules + eau osmosée stérile

Impact [3-HP] sur stress oxydatif



- Impact du 3-HP sur l'état de stress oxydatif de *L. reuteri*
- Marqueur utilisé = DHE
- 3-HP génère des ROS sous forme de radical superoxyde O_2^-

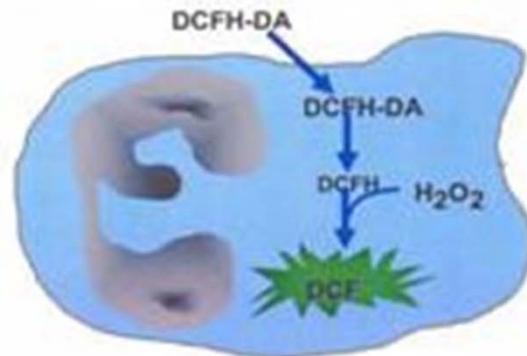
Cytométrie en flux (CMF)

Stress oxydatif

- Les fluorochromes utilisés sont dit « fibrinogènes » car ils acquièrent leur propriétés de fluorescence après un ou plusieurs clivages enzymatiques, dépendant de leur activité oxydatives
- ➔ Dichlorodihydrofluorescéine diacétate (**DCFH-DA**)
- ➔ Dihydrorhodamine (**DHR 123**)
- ➔ Hydroéthidine (**HE**)

Cleusix *et al.* 2007 : Tests d'inhibition avec H_2O_2 sur *L. reuteri* DSM 20016 et SD2112

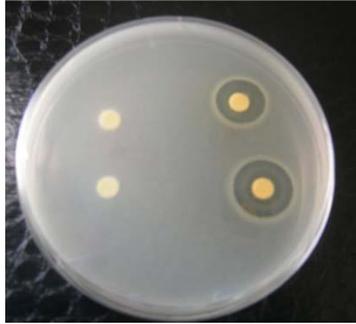
Etude du stress oxydant:



Probes for Oxidation States

Probe	Oxidant	Excitation	Emission
• DCFH-DA	(H_2O_2)	488	525
• HE	(O_2^-)	488	590
• DHR 123	(H_2O_2)	488	525

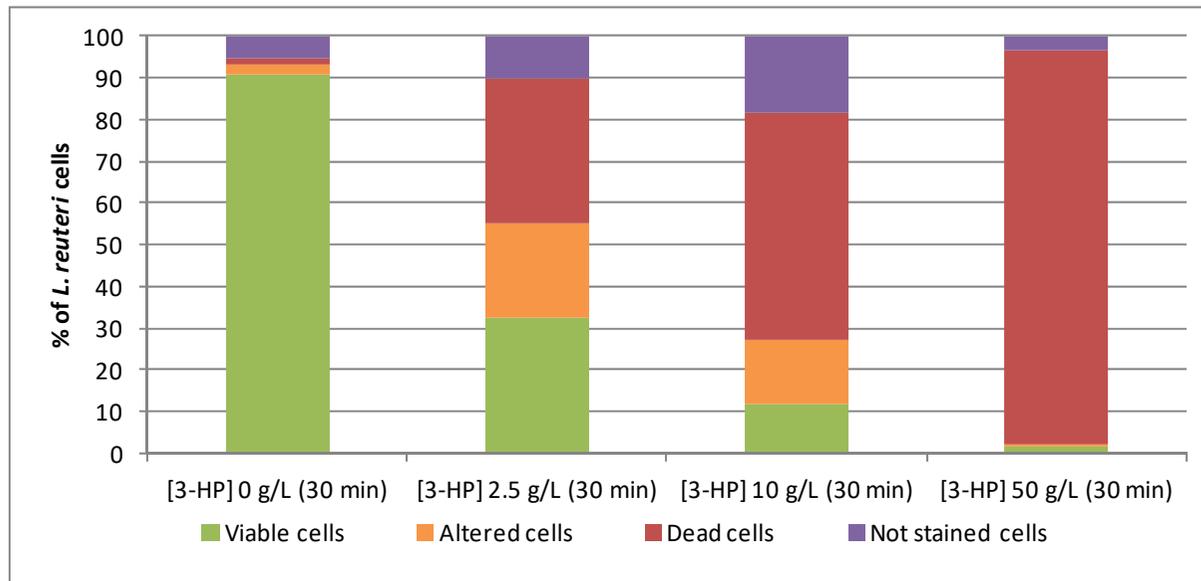
Toxicité du 3-HP



Les CMI ont été déterminées, **64 µg/mL** pour chacun des deux micro-organismes

Sur le côté droit des boîtes : activité du 3-HP (50 mg/disque) contre *S. aureus* (a) and *S. typhi* (b).

Sur le côté gauche : activité antimicrobienne nulle du 3-HP éthyl-ester (50 mg/disque), produit de la réaction d'estérification de Fischer-Speier (Sebastianes et al., 2012).



Toxicité du 3-HPA

Organisme	Souche	CMI (mM)	CMB (mM)
<i>Escherichia coli</i>	DSM 5698	7,5 - 15	15 - 30
<i>Bacteroides vulgatus</i>	DSM 1447	< 1,9	1,9 - 3,8
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	DSM 2079	1,9 - 3,8	1,9 - 3,8
<i>Bacteroides fragilis</i>	LMG 10263	3,8 - 7,5	3,8 - 7,5
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	LMG 11043	1,9 - 3,8	7,5 - 15
<i>Bifidobacterium longum</i>	DSM 20219	1,9 - 3,8	3,8 - 7,5
<i>Bifidobacterium longum infantis</i>	DSM 20088	1,9 - 3,8	1,9 - 3,8
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 20083	3,8 - 7,5	n.d
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSM 20456	3,8 - 7,5	7,5 - 15
<i>Bifidobacterium breve</i>	DSM 20213	7,5 - 15	7,5 - 15
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	15 - 40	15 - 40
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334	15 - 40	40 - 80
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ETH-Z	15 - 40	15 - 40
<i>Lactobacillus salivarius</i>	ETH-Z	15 - 40	40 - 80
<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSM 20016	30 - 50	60 - 120
<i>Lactobacillus reuteri</i>	ATCC 55730	30 - 50	60 - 120
<i>Eubacterium biforme</i>	DSM 3989	1,9 - 3,8	3,8 - 7,5
<i>Eubacterium eligens</i>	DSM 3376	1,9 - 3,8	1,9 - 3,8
<i>Colinsella aerofaciens</i>	DSM 3979	3,8 - 7,5	7,5 - 15
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 20477	3,8 - 7,5	30 - 50
<i>Streptococcus salivarius</i>	DSM 20560	3,8 - 7,5	15 - 30
<i>Clostridium difficile</i>	ETH-Z	< 1,9	3,8 - 7,5
<i>Clostridium clostridioforme</i>	DSM 933	15 - 30	15 - 30
<i>Ruminococcus productus</i>	DSM 2950	7,5 - 15	3,8 - 7,5
<i>Listeria innacua</i>	HPB 13	7,5 - 15	7,5 - 15
<i>Listeria ivanovii</i>	HPB 28	3,8 - 7,5	7,5 - 15

- Interaction entre la fonction aldéhyde du 3-HPA et les groupements thiols des protéines

- l'exposition de bactéries *E. coli* au 3-HPA conduit à une augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines contenant des groupements thiols et des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif

- l'addition exogène d'un groupement thiol diminuerait, voire supprimerait l'effet antimicrobien observé

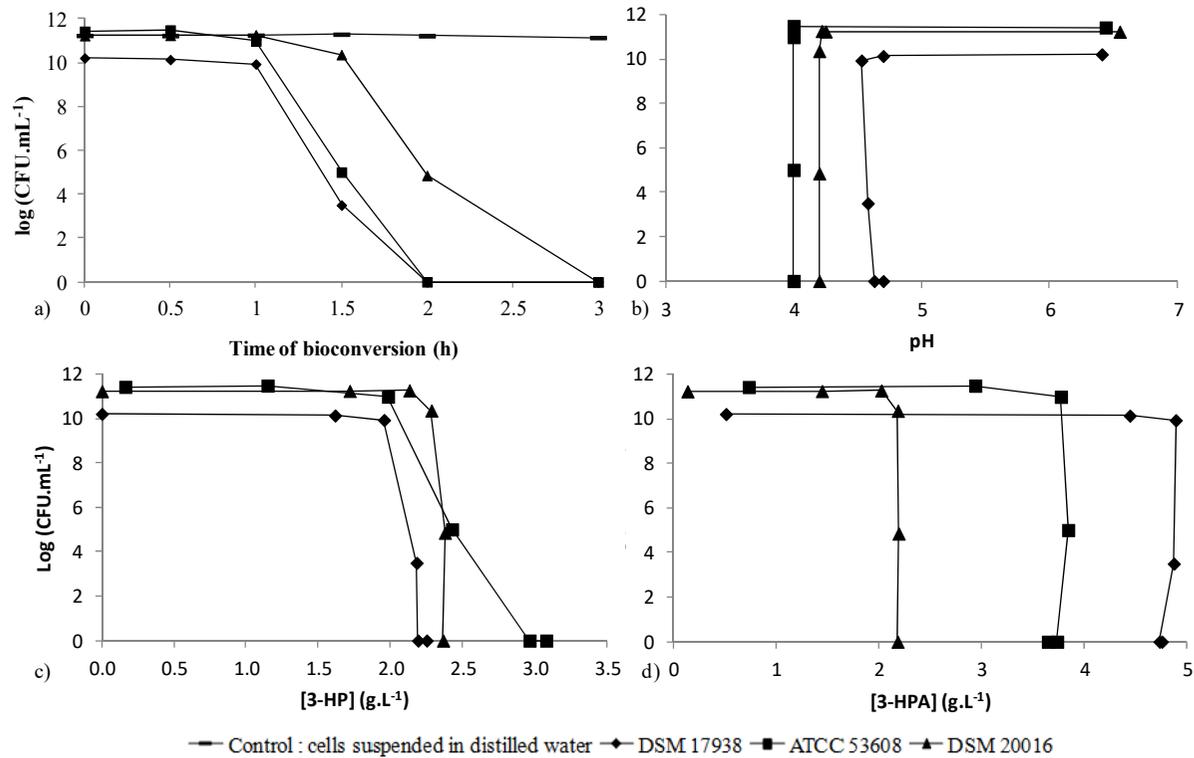
- permet d'éliminer l'hypothèse d'une toxicité due à l'acroléine

(Schaefer *et al.*, 2010)

Activité antimicrobienne du 3-HPA contre différents types de bactéries (Cleusix *et al.*, 2007)



Stress subis pendant la bioconversion



- ➔ Impacts cumulés de 3 stress lors de la bioconversion : pH, 3-HP et 3-HPA
- ➔ Difficile de dissocier les trois impacts

