



HAL
open science

Création d'enzymes multimodulaires à façon dédiées à la dégradation de substrats complexes

Louise Badruna

► To cite this version:

Louise Badruna. Création d'enzymes multimodulaires à façon dédiées à la dégradation de substrats complexes. Biochimie [q-bio.BM]. INSA de Toulouse, 2017. Français. NNT : 2017ISAT0021 . tel-01743784

HAL Id: tel-01743784

<https://theses.hal.science/tel-01743784>

Submitted on 26 Mar 2018

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 :

Louise BADRUNA

le 27 novembre 2017

Titre :

Création d'enzymes multimodulaires à façon dédiées à
la dégradation de substrats complexes

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SEVAB : Ingénieries microbienne et enzymatique

Unité de recherche :

Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (UMR INRA 792 et CNRS 5504)

Directeur/trice(s) de Thèse :

Michael O'DONOHUE - Directeur de recherche - INRA de Toulouse

Cédric MONTANIER - Chargé de recherche - INRA de Toulouse

Jury :

Marie-Christine RALET - Directrice de recherche - INRA de Nantes - Rapportrice

Thierry VERNET - Directeur de recherche - IBS de Grenoble - Rapporteur

Cécile HERVÉ - Chargée de recherche - CNRS de Roscoff - Examinatrice

Didier COMBES - Professeur - INSA de Toulouse - Président du jury

Résumé

Afin de réduire notre empreinte carbone sur l'environnement, il est urgent de développer des procédés industriels utilisant une source de carbone renouvelable comme la biomasse lignocellulosique. Cette biomasse est composée d'un enchevêtrement complexe de cellulose, d'hémicelluloses, de pectines et de lignines. Cette matrice permet aux parois cellulaires végétales de résister aux attaques biologiques et chimiques mais représente un frein au développement d'une bioéconomie responsable. Dans la Nature, des enzymes multimodulaires produites par certains microorganismes peuvent la déconstruire. Toutefois, ces enzymes sont majoritairement étudiées sur des substrats artificiels ou purifiés. Dans cette thèse, nous proposons d'étudier des enzymes multimodulaires sur des substrats broyés puis des coupes de paille de blé brutes. Les enzymes multimodulaires sont préparées à façon en utilisant la propriété d'association covalente des protéines Jo et In. Nous avons ainsi associé la xylanase *NpXyn11A* de *N. patriciarum* avec deux modules non catalytiques : le CBM3a de *C. thermocellum* ou le CBM2b1 *C. fimi* ciblant la cellulose ou les xylanes respectivement. Les propriétés biochimiques de ces protéines chimériques ont été déterminées et comparées aux modules sauvages. L'activité enzymatique des protéines chimériques a ensuite été étudiée sur des substrats artificiels et solubles, jusqu'à des substrats insolubles comme le son et la paille de blé, notamment par immunocytochimie. Ce travail a mis en évidence l'importance de la relation enzymes/ substrats pour une caractérisation *in muro* d'activités enzymatiques et une meilleure compréhension de la déconstruction de la biomasse végétale.

Mots clés : enzyme multimodulaire, immunocytochimie, Jo et In, CBM, xylanase, paille de blé

Abstract

In order to reduce our carbon footprint on the environment, it is more than urgent to develop new industrial process using a renewable carbon source such as lignocellulosic biomass. Plant cell walls consist of a complex network of cellulose, hemicelluloses, pectins and lignins that cross-link with each other mainly *via* non-covalent bonds. It is thus hardly surprising that plant biomass is rather recalcitrant to chemical or biological degradation. In the present era marked by the desire to build a green bioeconomy, this recalcitrance remains a key point. In Nature, the plant-based organic carbon contained within plant cell walls is mainly recycled by the action of cellulolytic microorganisms, producing a large set of multimodular enzymes. However, these enzymes are mainly characterized on artificial or purified substrates. In this thesis, we proposed to study multimodular enzymes on raw substrates such as wheat straw sections. The studied multimodular enzymes were associated thanks to the use of two small proteins Jo and In. Thus, we associated the xylanase *NpXyn11A* from *N. patriciarum* with two non-catalytic modules: CBM3a from *C. thermocellum* or CBM2b1 from *C. fimi* targeting cellulose or xylans respectively. Biochemical properties of these chimeric proteins and wild-type modules have been determined and compared. The enzymatic activity of chimeric proteins has been studied on artificial and soluble substrates and compared to the activity on insoluble substrates, mainly by immunocytochemistry. This work highlighted the importance of the relationship between enzymes and substrates and its key role to better understanding the biomass deconstruction *in muro*.

Key words: multimodular enzyme, immunocytochemistry, Jo and In, CBM, xylanase, wheat straw

Publication

Badruna L., Burlat V., Montanier C. Y., 2017. *CBMs as probes to explore plant cell wall heterogeneity using immunocytochemistry*, in: Protein-Carbohydrate Interactions: Methods and Protocols. pp. 181-197. doi: 10.1007/978-1-4939-6899-2_4

Posters

BADRUNA Louise, MONTANIER Cédric, O'DONOHUE Michael. *Synergic study of hemicellulases associated with carbohydrate-binding modules for the deconstruction of wheat straw cell walls*. Journée de l'école doctorale SEVAB, 5 mars 2015, Toulouse (France).

BADRUNA Louise, VERNET Thierry, DI-GUILMI Anne Marie, BURLAT Vincent, O'DONOHUE Michael, MONTANIER Cédric. *Investing synergism within modular glycoside hydrolases during wheat straw cell wall deconstruction*. 11th Carbohydrate Bioengineering Meeting, 10-13 mai 2015, Espoo, (Finlande).

MONTANIER Cédric, BADRUNA Louise, VERNET Thierry, DI-GUILMI Anne Marie, BURLAT Vincent, DURU Paul, O'DONOHUE Michael, *X-ray computed microtomography as a possible complementary approach to investigate synergism within multimodular glycoside hydrolases. Cellulosomes, cellulases and other carbohydrate modifying enzymes*, août 2015, Andover (Etats-Unis).

BADRUNA Louise, BURLAT Vincent, O'DONOHUE Michael, MONTANIER Cédric. *Study of hemicellulases associated with carbohydrate-binding modules for the deconstruction of wheat straw cell walls*. 12th Carbohydrate Bioengineering Meeting, 23-26 avril 2017, Vienne (Autriche).

Remerciements

Tout d'abord je souhaiterai remercier sincèrement mes deux encadrants de thèse, Cédric Montanier et Michael O'Donohue pour m'avoir choisie, aidée et encouragée durant ces trois années de thèse. Merci Cédric pour toutes ces qualités : rigueur, écoute, disponibilité, patience. Et merci Mike pour ces précieux conseils, notamment dans les moments clés.

En cette fin de thèse je pense également aux deux autres personnes qui m'ont accueillie lors de mon arrivée dans cette équipe, Marjorie Ochs et Régis Fauré. Ce trio formé avec Cédric m'a fait confiance tout au long de mon stage. J'ai tant appris depuis, notamment qu'encadrer un stagiaire pouvait être très compliqué !

Je tenais également à écrire quelques mots pour l'ensemble des collaborateurs de ce projet. Vincent Burlat qui m'a formée et épaulée tout au long des expériences d'immunochimie et sans qui nous n'aurions pas pu avoir de tels résultats. L'équipe Protéines pariétales et Développement du LRSV m'a permis de travailler dans de bonnes conditions (mention spéciale à Edith et Adélaïde). Merci à Alain Jauneau et Aurélie Le Ru de la plateforme Imagerie cellulaire pour leurs conseils, leur investissement et leur soutien tout au long de la thèse.

Je souhaiterai également remercier Guy Lippens pour les manips de RMN. Son aide précieuse a permis de résoudre rapidement le cas des protéines chimériques de CBM2b1. Je pense également à Harry Gilbert et son équipe, notamment Immacolata Venditto et Aurore Labourel. Ces personnes m'ont chaleureusement accueillie pendant quelques jours dans leur laboratoire et m'ont formé à différentes techniques. Ces résultats ont également été obtenus grâce au personnel de la plateforme ICEO (Sophie, Nelly, Gianluca), merci beaucoup pour les formations et votre soutien pour l'utilisation de toutes ces machines. Merci aussi à Jean Jacques Bono et Virginie Gascioli pour leur aide dans l'utilisation du Nanotemper. Pour finir, les collaborateurs de dernière minute, à quelques semaines de finir le manuscrit : merci à Jérémy, Isabelle, Sophie et Gianluca pour ce travail en modélisation et structure 3D de nos protéines.

Merci beaucoup à Yannick pour tes astuces pour la présentation et à Etienne pour tes conseils sur l'oral.

Je voudrais remercier les rapporteurs (Thierry Vernet et Marie-Christine Ralet) pour avoir accepté d'évaluer mon travail, pris du temps pour lire ce manuscrit et surtout m'avoir aiguillée pour améliorer ce travail. Je souhaite également remercier les examinateurs (Cécile Hervé et Didier Combes) pour leur intérêt pour cette thèse et leur participation au jury de thèse. Un grand merci aux membres de mon comité de thèse (Antoine Bouchoux, Anne Marie Di Guilmi, Sophie Duquesne et Alain Jauneau) qui ont su m'encourager, m'aiguiller et me permettre de mener à bien ce projet.

D'autres personnes m'ont permis de tenir ces trois années, des collègues devenus amis comme le quatuor formé avec Marina, Lisa et Jean Christophe. Votre soutien infaillible durant nos soirées ou même après votre départ du labo et l'éloignement, a été précieux. Merci Angie d'avoir toujours le sourire et de m'emmener dans des pays magnifiques grâce à nos soirées photos. Je pense évidemment à nos soirées jeux où les fous rires et les discussions infinies étaient toujours au rendez-vous. La deuxième équipe des soirées jeux a bien pris la relève avec Virginie, Barbara et Marie H. Merci pour

ces moments indispensables ! Ma chère Barbie, tu as été une voisine de paillasse parfaite malgré ma fâcheuse habitude de râler.

Merci aussi à l'ensemble de l'équipe « étiquetage » : Lenaïk, Maher, Nathalie, Marie G., Franck pour leur aide avec ces innombrables gommettes ! Il y a également eu les papotages à rallonge et indispensables avec Nelly et Marie G. à cause (ou grâce) aux quelques mésaventures avec la ionique (merci aussi à Etienne et Florent pour leur aide).

Je souhaite également remercier Alexandra renommée « ma binôme de bureau » pour ses conseils avisés, son aide et son soutien durant ma thèse. Une pensée également pour mes deux voisins de bureau Pablo et Franck qui m'ont supportée. Merci à tous ceux qui rendaient joyeuses les journées au labo (Laure, Manon M., Mounir, Marc, Thibault, Maher, Marie-Laure, Nathalie, Marlène V., Doriane, Marion C., Akli, Clément F., Jérémy, David S., Benjamin, Emna, Sandra, Florence et bien sûr le duo des Pablo) même si je ne peux malheureusement pas écrire un petit mot pour chacun d'entre vous.

Lenaïk et Audrey vous avez été un merveilleux bol d'air frais durant votre stage ! Et merci à Nour pour la dernière manip d'immuno que je n'ai pas pu faire.

Pour finir, je voudrais remercier l'équipe Lignocellulases avec les anciens (Marjorie, Bastien, Pablo, Julien D., Barbara, Olga, Thomas) et les permanents (Régis, Cédric, Mike, Claire, Sophie) qui m'ont accueillie, les personnes qui y ont travaillé depuis et celles laissées à la fin de ma thèse (Franck, Victor, Virginie, Jiao, Haiyang, Nuria). Merci également aux autres membres de l'équipe EAD1, (permanents ou non permanents), si nombreux depuis ces trois années et demie passées dans cette équipe.

Bien sûr je ne pouvais pas clôturer ces remerciements sans penser à ma famille et mes amis à l'extérieur du labo. Je ne suis pas la première ni la dernière doctorante de cette famille mais leur soutien a été sans faille durant ces années d'étude, commencées il y a déjà 8 ans. Laurence, Babeth et Fabienne, vous m'avez particulièrement encouragée durant les différentes étapes de ces études. Mes parents, ma sœur, tout simplement je vous aime. Merci aussi aux amis fidèles : Héléna, Fleur, Elodie et la bande des animateurs de Rib (Emilie, Véro, Pascal, Aude et Pauline).

Sommaire

Résumé	1
Abstract.....	1
Remerciements	5
Liste des figures	15
Liste des tableaux	19
Liste des abréviations	21
Introduction générale	23
Chapitre 1 : Etude bibliographique.....	29
1. La biomasse lignocellulosique.....	30
I. La structure de la paroi.....	30
a) Généralités	30
b) Les parois primaires et secondaires.....	31
II. Composition de la paroi.....	32
2. Composition des <i>Poaceae</i>	35
I. La cellulose.....	36
II. Les hémicelluloses	37
III. Les pectines	39
IV. Les lignines.....	41
V. Les protéines.....	42
VI. Interactions entre les composés de la paroi	42
3. Enzymes impliquées dans la déconstruction de la biomasse lignocellulosique.....	43
I. Les glycosides hydrolases	43
II. Le site actif des glycosides hydrolases	44
III. Les mécanismes d'action.....	46
4. Cellulases.....	48
I. Généralités sur les cellulases	48
II. Structure des cellulases.....	49
5. Xylanases.....	50
I. Généralités sur les xylanases	50
II. Structure des xylanases.....	51
III. Etude des xylanases.....	53
6. Xylosidase	55
I. Généralités sur les xylosidases	55
II. Structure des xylosidases.....	55

7.	Les principales enzymes débranchantes	56
8.	Les carbohydate estérases	58
	I. Féruloyle estérase.....	59
	II. Acétyle xylane estérase	59
9.	Les Carbohydate-Binding Modules	59
	I. Généralités sur les CBMs	59
	II. Structure des CBMs	61
	a) Classement des CBMs	61
	b) Repliement des CBMs	64
	III. Fonctions des CBMs	65
10.	Protéines mises en œuvre dans cette thèse	68
	I. NpXyn11A de <i>Neocallimastix patriciarum</i>	68
	II. Les CEs.....	69
	a) Les enzymes E5UNK, E7 et E8.....	69
	b) Les enzymes <i>Pm13</i> , <i>Pm20</i> et <i>Pm51</i>	70
	III. CBMs	71
	a) Le CBM2b1 de la xylanase 11A de <i>Cellulomonas fimi</i>	71
	b) Le CBM3a de <i>Clostridium thermocellum</i>	74
11.	Les différentes stratégies de dégradation de la lignocellulose.....	77
	I. Enzymes sécrétées	77
	II. Cellulosome	78
	a) Généralités sur les cellulosomes.....	78
	b) Mimer la nature : les protéines Jo et In	80
	III. Synergie et proximité entre enzymes	82
	a) Synergie entre enzymes	82
	(1) Généralités	82
	(2) Synergie entre une xylanase et une CE.....	83
	b) Enzyme multimodulaire	85
	(1) Xylanase multimodulaire	85
	(2) Enzyme multimodulaire avec le CBM3a	86
	(3) Enzyme multimodulaire avec plusieurs CBMs.....	87
	(4) Importance du linker dans une enzyme multimodulaire.....	88

12.	Suivi de l'hydrolyse d'un substrat complexe par immunocytochimie	91
I.	Généralités sur l'immunocytochimie	91
II.	Sonde : anticorps monoclonal ou CBM.....	91
III.	Exemples d'utilisation de CBMs en immunocytochimie	96
IV.	Immunocytochimie et suivi d'hydrolyse d'un substrat complexe.....	98
13.	Problématiques de la thèse	100
Chapitre 2 : Matériels et méthodes		105
1.	Biologie moléculaire	105
I.	Plasmides utilisés	105
a)	Liste des plasmides	105
b)	Système pET	106
II.	Milieux de culture	107
a)	Milieux liquides.....	107
(1)	Lysogeny Broth (LB)	107
(2)	ZYP5052.....	107
(3)	SOB.....	108
b)	Milieu solide	108
III.	Pré-culture	108
IV.	Purification de l'ADN à partir d'une pré-culture	109
V.	Utilisation d'enzymes de restriction.....	109
VI.	Préparation d'un gel d'agarose	109
VII.	Purification sur gel d'agarose des fragments d'ADN.....	110
VIII.	Ligature d'un insert dans un vecteur.....	110
IX.	Amplification des plasmides par PCR.....	110
X.	Recombinaison homologue d'ADN	112
XI.	Préparation de cellules compétentes.....	112
a)	Culture des cellules.....	112
b)	Vérification de la compétence.....	113
XII.	Transformation des cellules compétentes	113
XIII.	Dosage de l'ADN	113
XIV.	Séquençage de l'ADN	114
2.	Expression de protéine recombinante dans <i>Escherichia coli</i>	114
I.	Cas de la production de protéines	114
II.	Antibiotiques.....	115

III.	IPTG.....	115
3.	Purification des protéines	115
I.	Préparation des extraits cellulaires.....	115
II.	Chromatographie d'affinité d'ions métalliques immobilisés (IMAC).....	116
a)	Cas général	116
b)	IMAC par centrifugation.....	117
c)	IMAC pour les échantillons de microthermophorèse	117
III.	Séparation de protéines par chromatographie d'exclusion stérique	118
IV.	Gel d'électrophorèse SDS-PAGE.....	119
V.	Dialyse.....	120
a)	Boudins à dialyse	120
b)	Colonne de dessalage PD10	120
VI.	Mesure de la concentration en enzyme.....	120
a)	Mesure de l'absorbance.....	120
b)	Détermination par gel SDS-PAGE	120
VII.	Concentration de protéines	121
a)	Cas classique.....	121
b)	Cas des CBMs spécifiques de la cellulose.....	121
4.	Substrats d'étude.....	121
I.	Préparations disponibles de cellulose.....	121
II.	Le blé.....	122
a)	Vision globale de la plante	122
b)	La paille de blé.....	123
c)	Le son de blé	124
5.	Biophysique	126
I.	Etude de l'affinité entre un CBM et un sucre	126
II.	Association entre une protéine et un ligand insoluble	129
III.	Microcalorimétrie.....	130
a)	CBM-ligand	130
(1)	Cellulose régénérée	131
(2)	Nanocristaux de cellulose	131
(3)	Arabinoxylanes de blé.....	131

b)	Protéine-protéine	131
IV.	Résonance magnétique nucléaire	131
V.	Microthermophorèse	132
a)	Marquage de la protéine.....	133
b)	Analyse par MST	133
6.	Enzymologie.....	134
I.	Dosage de l'activité enzymatique sur un substrat chromogénique	134
a)	<i>p</i> NP-X ₃	134
b)	<i>p</i> NP-Ace.....	134
II.	Test DNS	135
a)	Préparation du DNS	135
b)	Protocole général	135
c)	Préparation des substrats.....	137
(1)	Xylane de hêtre.....	137
(2)	Son de blé.....	137
(3)	Paille de blé	137
d)	Détermination des paramètres cinétiques	137
e)	Cinétique sur xylane de hêtre.....	137
f)	Cinétique sur son ou paille de blé.....	138
III.	Analyse HPAEC-PAD	138
a)	Protocole général.....	138
b)	Cinétique sur xylane de hêtre	140
c)	Cinétique sur son ou paille de blé.....	140
7.	Immunocytochimie	141
I.	Préparation des échantillons	141
a)	Echantillons inclus en paraffine	141
(1)	Fixation.....	141
(2)	Inclusion dans du Paraplast plus	142
b)	Echantillons inclus dans de la résine.....	142
II.	Coupe des échantillons	143

a)	Echantillons inclus dans de la paraffine	143
(1)	Traitement des lames	143
(2)	Microtome.....	143
(3)	Déparaffinage.....	144
b)	Echantillons inclus dans de la résine.....	144
III.	Digestion enzymatique	144
a)	Echantillons inclus dans de la paraffine	144
b)	Echantillons inclus dans de la résine.....	145
IV.	Marquage des coupes	145
a)	Visualisation des xylanes.....	145
b)	Visualisation de la cellulose.....	146
c)	Coloration au calcofluor	146
8.	Analyse des coupes de paille de blé	147
I.	Microscopie	147
II.	Quantification de l'immunofluorescence	147
9.	Modélisation d'In <i>NpXyn11A</i> -JoCBM3a <i>versus</i> données SAXS.....	148
Chapitre 3 : Validation du système Jo-In.....		153
1.	Introduction	153
2.	Résultats	154
I.	Construction des protéines chimériques	154
a)	Construction des plasmides.....	155
b)	Optimisation des conditions d'expression des protéines	157
II.	Conservation des propriétés physico-chimiques des protéines chimériques	159
a)	Association entre Jo et In	160
b)	Paramètres cinétiques de <i>NpXyn11A</i> en fusion avec Jo ou In	162
c)	Capacité de reconnaissance des CBMs	164
(1)	CBM3a.....	164
(2)	CBM2b1.....	170
3.	Conclusion.....	178
Chapitre 4 : Etude cinétique de l'influence du CBM3a sur l'activité de la xylanase <i>NpXyn11A</i>		183

1.	Introduction	183
2.	Résultats	184
I.	Couplage des modules protéiques et purification des enzymes multimodulaires	184
II.	Activité des enzymes sur substrat soluble	187
III.	Activité des enzymes sur substrat insoluble	192
a)	Activité des enzymes sur son et paille de blé.....	192
b)	Comparaison d'In avec un CBM de type B	199
c)	Présence du CBM3a sous forme libre	200
d)	Diffusion et structure des enzymes multimodulaires.....	201
3.	Conclusion.....	204
Chapitre 5 : Etude de l'activité de <i>NpXyn11A</i> sur des coupes d'entre-nœud de paille de blé		209
1.	Introduction	209
2.	Résultats	212
I.	Influence de l'analyse des images dans le traitement des données	212
II.	Effet de la concentration en <i>NpXyn11A</i> sur la détection des xylandes	217
III.	Influence de la dégradation de la cellulose sur la détection des xylandes	220
IV.	Impact de la modularité de <i>NpXyn11A</i> sur la détection des xylandes.....	223
a)	Effet du module In sur l'activité de <i>NpXyn11A</i> lors de la dégradation des xylandes	223
b)	Effet du CBM3a sur l'activité de <i>NpXyn11A</i> lors de la dégradation des xylandes.	227
3.	Conclusion.....	231
Chapitre 6 : Perspectives.....		235
1.	Etude de la synergie d'action d'enzymes multi-catalytiques.....	236
2.	Influence du domaine catalytique sur la reconnaissance du ligand du CBM	242
3.	Etude immunocytochimique sur des sections entière de paille de blé	243
Conclusion générale		- 249 -
Références bibliographiques.....		- 249 -
Annexe 1 : Séquences nucléotidiques et protéiques des différentes protéines		- 294 -
Annexe 2 : Génotype des cellules compétentes utilisées		- 295 -
Annexe 3 : Choix des paramètres des images immunocytochimiques		- 296 -
I.	Quantification des images	- 296 -
II.	Images proposées dans le manuscrit	- 296 -

Liste des figures

Figure 1 : Vue en coupe transversale d'un entre-nœud de paille de blé.	30
Figure 2 : Microstructure de l'épiderme de la paille de blé.	31
Figure 3 : Complexité de la structure de la paroi des plantes.	33
Figure 4 : Représentation de la composition de la paroi cellulaire des angiospermes et des gymnospermes.	34
Figure 5 : Représentation de la composition de la paroi cellulaire des <i>Poaceae</i>	36
Figure 6 : Représentation schématique des microfibrilles cristallines de la cellulose.	37
Figure 7 : Différents types d'hémicelluloses.	38
Figure 8 : Exemples de structures des xylanes.	39
Figure 9 : Sous-structures des pectines.	40
Figure 10 : Structure des trois principaux composés des lignines.	41
Figure 11 : Exemple de lignine.	41
Figure 12 : Structure tridimensionnelle pour trois GHs ayant chacune une topologie précise.	45
Figure 13 : Schéma des sous-sites d'un site actif d'une GH.	45
Figure 14 : Schéma du mécanisme d'inversion par une β -glucosidase.	47
Figure 15 : Schéma du mécanisme de rétention par une β -glucosidase.	48
Figure 16 : Enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose.	49
Figure 17 : Structures cristallographiques des xylanases.	51
Figure 18 : Structure tridimensionnelle d'une xylanase annotée avec les éléments de ressemblance d'une main droite.	52
Figure 19 : Enzymes impliquées dans la dégradation des xylanes.	57
Figure 20 : Représentation des sites de liaison des trois types de CBMs.	62
Figure 21 : Représentation schématique des trois types de CBMs.	63
Figure 22 : Structure cristallographique de la xylanase <i>NpXyn11A</i>	68
Figure 23 : Organisation des gènes sur les opérons.	71
Figure 24 : Représentation de structures cristallographiques de CBMs.	72
Figure 25 : Représentation du cellulosome de <i>C. thermocellum</i>	79
Figure 26 : Représentation de structures cristallographiques de RrgA.	81
Figure 27 : Comparaison de fluorophores, sondes et éléments de la paroi cellulaire.	96
Figure 28 : Représentation du système pET.	107
Figure 29 : Droite de calibration pour la colonne Superose 10/300 GL.	119
Figure 30 : Représentation d'une paille de blé.	122
Figure 31 : Représentation du grain de blé.	125
Figure 32 : Droite étalon en pNP dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7.	135

Figure 33 : Droite étalon en xylose.....	136
Figure 34 : Courbes étalons du xylose au xylohexaose, entre 0,005 et 0,040 g.L ⁻¹ par HPAEC-PAD.	140
Figure 35 : Représentation des étapes de marquage.	146
Figure 36 : Représentation de la structure cristallographique du complexe JoIn.	154
Figure 37 : Bilan partiel des différentes constructions utilisées dans cette thèse.	155
Figure 38 : Stratégie employée pour la recombinaison homologue.	156
Figure 39 : Gel d'agarose après amplification par PCR.	157
Figure 40 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE des différentes fractions de purification d'InCBM3a obtenues dans les conditions de culture résumées dans le Tableau 36.	158
Figure 41 : Courbes obtenues par microcalorimétrie pour l'association de Jo et In ou de JoDsRed et In.	161
Figure 42 : Courbe de la vitesse réactionnelle en fonction de la concentration en substrat. ...	162
Figure 43 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE des différentes fractions correspondant aux étapes d'association entre CBM3a ou JoCBM3a et de la cellulose.	165
Figure 44 : Courbes obtenues par microcalorimétrie pour l'association entre le CBM3a et de la cellulose.	166
Figure 45 : Courbes représentant l'association entre un CBM et les nanocristaux de cellulose.	169
Figure 46 : Courbe obtenue par microcalorimétrie pour l'association entre le CBM2b1 et l'arabinoxylane de blé.	171
Figure 47 : Spectre RMN obtenu pour le CBM2b1 en l'absence de ligand.	173
Figure 48 : Spectres RMN obtenus pour chacune des protéines en présence de concentrations croissantes en xylohexaose.	174
Figure 49 : Déplacements chimiques observés pour le troisième pic de tryptophane sur les spectres RMN des CBMs en présence de concentrations croissantes en xylohexaose.	175
Figure 50 : Structure cristallographique du CBM2b1 selon deux vues différentes.	177
Figure 51 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE des différentes fractions de purification des enzymes multimodulaires.	185
Figure 52 : Purification de l'enzyme multimodulaire In <i>Np</i> Xyn11A-JoCBM3a.	186
Figure 53 : Purification de l'enzyme multimodulaire In <i>Np</i> Xyn11A-Jo.	187
Figure 54 : Variation des concentrations en xylooligosaccharides au cours de l'hydrolyse du xylane de hêtre par différentes formes de <i>Np</i> Xyn11A.	190
Figure 55 : Cinétique de dégradation de substrats insolubles par différentes protéines.	193
Figure 56 : Variation des concentrations en xylooligosaccharides au cours de l'hydrolyse du son de blé par différentes formes de <i>Np</i> Xyn11A.	196

Figure 57 : Variation des concentrations en xylooligosaccharides au cours de l'hydrolyse de la paille de blé par différentes formes de <i>NpXyn11A</i>	197
Figure 58 : Représentation de la structure cristallographique de <i>CsCBM6-1</i> et d' <i>In</i>	200
Figure 59 : Modélisation de la structure tridimensionnelle d' <i>InNpXyn11A-JoCBM3a</i>	202
Figure 60 : Détails anatomiques d'une section transversale d'entre-nœud de paille de blé....	210
Figure 61 : Détails d'une image observée à partir d'une coupe non traitée d'entre-nœud de paille de blé.	210
Figure 62 : Description des étapes suivies lors de l'analyse d'échantillons d'entre-nœud de paille de blé.	212
Figure 63 : Exemple de zones analysées.....	213
Figure 64 : Description des méthodes d'analyse.	214
Figure 65 : Dégradation de la cellulose d'entre-nœud de paille de blé par le cocktail Cellic® Ctec2.	215
Figure 66 : Quantification de la fluorescence résiduelle de la cellulose d'entre-nœud de paille de blé après dégradation par Cellic® Ctec2.	216
Figure 67 : Dégradation des xylanes d'entre-nœud de paille de blé par des concentrations croissantes de <i>NpXyn11A</i>	218
Figure 68 : Dégradation des xylanes d'entre-nœud de paille de blé par le cocktail Celluclast et <i>NpXyn11A</i> ou par <i>NpXyn11A</i>	221
Figure 69 : Quantification de la fluorescence résiduelle après dégradation des xylanes d'entre-nœud de paille de blé par Celluclast et <i>NpXyn11A</i> ou par <i>NpXyn11A</i>	222
Figure 70 : Dégradation des xylanes d'entre-nœud de paille de blé par <i>NpXyn11A</i> ou par <i>InNpXyn11A</i>	225
Figure 71 : Quantification de la fluorescence résiduelle du sclérenchyme ou du parenchyme après dégradation par <i>NpXyn11A</i> ou par <i>InNpXyn11A</i>	226
Figure 72 : Dégradation des xylanes d'entre-nœud de paille de blé par <i>NpXyn11A</i> , <i>InNpXyn11A</i> ou <i>InNpXyn11A-JoCBM3a</i>	229
Figure 73 : Schéma des axes de recherche de cette thèse.	235
Figure 74 : Cinétique de dégradation du son de blé par <i>NpXyn11A</i> seule ou avec une AXE.	237
Figure 75 : Variation des concentrations en xylooligosaccharides au cours de l'hydrolyse du son de blé par <i>NpXyn11A</i> seule ou avec une AXE.	240
Figure 76 : Cinétique de dégradation de la paille de blé par <i>NpXyn11A</i> seule ou avec une AXE.	241
Figure 77 : Marquage de la cellulose dans des sections de paille de blé issues d'échantillons de 1 cm traités par <i>NpXyn11A</i> , <i>InNpXyn11A</i> ou <i>InNpXyn11A-JoCBM3a</i>	246

Figure 78 : Marquage des xylanes dans des sections de paille de blé issues d'échantillons de 1 cm traités par *NpXyn11A*, *InNpXyn11A* ou *InNpXyn11A-JoCBM3a*.....247

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de compositions de plantes.	33
Tableau 2 : Caractéristiques de la composition de la paroi cellulaire des plantes.	34
Tableau 3 : Composition approximative (% de matière sèche) des parois cellulaires primaires et secondaires des <i>Poaceae</i> et des dicotylédones.	35
Tableau 4 : Exemples d'enzymes impliquées dans la dégradation des différents composants de la biomasse lignocellulosique.	44
Tableau 5 : Classification des enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose.	49
Tableau 6 : Composition de divers xylanes.	53
Tableau 7 : Classement des CBMs.	65
Tableau 8 : Paramètres cinétiques de la xylanase d'intérêt.	69
Tableau 9 : Paramètres optimaux de E5UNK, E7 et E8 sur <i>p</i> NP-acétate.	70
Tableau 10 : Paramètres optimaux de <i>Pm13</i> , <i>Pm20</i> et <i>Pm51</i> sur <i>p</i> NP-acétate.	71
Tableau 11 : Données de la littérature sur l'affinité entre le CBM2b1 et des xylooligosaccharides.	74
Tableau 12 : Données de la littérature sur la caractérisation de l'affinité du CBM3a d'intérêt.	76
Tableau 13 : Données de la littérature sur l'affinité entre un CBM3 et différentes préparations de cellulose.	76
Tableau 14 : Classement des anticorps monoclonaux utilisés principalement comme sonde.	93
Tableau 15 : Classement des CBMs utilisés comme sonde.	95
Tableau 16 : Liste des plasmides utilisés.	105
Tableau 17 : Composition du milieu ZYP5052.	108
Tableau 18 : Séquence des amorces.	111
Tableau 19 : Composition du milieu réactionnel.	111
Tableau 20 : Programme de la PCR.	111
Tableau 21 : Condition d'induction pour chaque type de cellules compétentes.	114
Tableau 22 : Conditions d'éluion de la protéine d'intérêt dans les différentes fractions.	116
Tableau 23 : Etapes de la purification.	117
Tableau 24 : Etapes de la purification.	117
Tableau 25 : Données de la calibration de la colonne Superose 10/300 GL.	118
Tableau 26 : Répartition de la masse dans une paille de blé.	123
Tableau 27 : Composition des différentes parties du blé.	123
Tableau 28 : Composition de la paille de blé.	124
Tableau 29 : Composition du son de blé.	125
Tableau 30 : Conditions pour chaque solution de resuspension du culot.	129

Tableau 31 : Valeurs de la droite étalon en <i>pNP</i>	134
Tableau 32 : Valeurs de la droite étalon en xylose.	136
Tableau 33 : Etapes du gradient des tampons A et B pour la méthode 1.	139
Tableau 34 : Etapes du gradient des tampons A et B pour la méthode 2.	139
Tableau 35 : Etapes du déparaffinage.	144
Tableau 36 : Conditions d'expression des protéines.	158
Tableau 37 : Conditions optimisées pour l'expression des protéines.	159
Tableau 38 : Paramètres thermodynamiques d'In avec Jo ou JoDsRed.	161
Tableau 39 : Paramètres cinétiques des enzymes <i>NpXyn11A</i> , <i>InNpXyn11Aet JoNpXyn11A</i>	162
Tableau 40 : Paramètres thermodynamiques de l'association de CBM3a avec différentes celluloses.	166
Tableau 41 : Détermination des EC_{50} pour CBM3, <i>InCBM3a</i> et <i>JoCBM3a</i> par microthermophorèse.	169
Tableau 42 : Paramètres thermodynamiques du CBM2b1 avec l'arabinoxylane de blé.	171
Tableau 43 : Données de la littérature sur l'affinité entre le CBM2b1 et des xylooligosaccharides.	172
Tableau 44 : Constantes d'association de CBM2b1 et des protéines chimériques pour le xylohexaose déterminées par RMN.	176
Tableau 45 : Bilan de la chromatographie d'exclusion stérique d' <i>InNpXyn11A-JoCBM3a</i> et d' <i>InNpXyn11A-Jo</i>	186
Tableau 46 : Activité spécifique des enzymes sur du <i>pNP-X₃</i>	188
Tableau 47 : Bilan des spécificités de chaque filtre de fluorescence.	210
Tableau 48 : Comparaison des données quantitatives selon le traitement d'image.	216
Tableau 49 : Activité spécifique des enzymes sur du <i>pNP-Ace</i>	237
Tableau 50 : Informations complémentaires sur les protéines d'étude.	- 294 -
Tableau 51 : Explications pour chaque génotype.	- 295 -
Tableau 52 : Exemple de paramètres choisis pour les images.	- 296 -
Tableau 53 : Exemple de paramètres choisis pour les images.	- 296 -
Tableau 54 : Exemple de traitements d'images (Power point) rajoutés.	- 297 -

Liste des abréviations

^1H = proton

^{15}N = azote 15

AA : enzyme ayant une activité auxiliaire

Ac : anticorps

ADN (ou DNA) : acide désoxyribonucléique

AGE : affinity gel electrophoresis

Arg : arginine

AS : activité spécifique

Asn : asparagine

Asp : acide aspartique

AXE : acétyle xylane estérase

BET : bromure d'éthidium

BMCC : bacterial microcrystalline cellulose

bp (ou pb) : paire de base

BSA : bovin serum albumin

CAZy : Carbohydrate-Active enZYmes

CBM : carbohydrate-binding module

CBM2b1 ou CjCBM2b1 : CBM de la xylanase 11A de *Cellulomonas fimi*

CBM3a ou CtCBM3a : CBM de la protéine CipA de *Clostridium thermocellum*

CCM : chromatographie sur couche mince

CE : carbohydate estérase

C. fimi : *Cellulomonas fimi*

CipA : cellulosome-integrating protein A

C. thermocellum : *Clostridium thermocellum*

Da : Dalton

DAPI : di aminido phényle indol

DNS : acide 3,5 dinitrosalicylique

dNTPs : désoxyribonucléotides

DO : densité optique

DP : degré de polymérisation

E : fraction éluée

E. coli : *Escherichia coli*

FAE : ferulic acid esterase ou féruloyle estérase en français

FITC : fluorescein isothiocyanate

GFP : green fluorescent protein

GH : glycoside hydrolase

Gln : glutamine

Glu : acide glutamique

GST : glutathion S-transférase

g.L^{-1} : gramme par litre

His : histidine

HPAEC-PAD : high performance anion exchange coupled with pulsed amperometric detection

HPLC : high performance liquid chromatography

IMAC : immobilized-metal affinity chromatography

IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

ITC : isothermal titration calorimetry
 K_a : constante d'association
 kb : kilo base
 K_d : constante de dissociation
 kDa : kilo Dalton
 L : fraction de lavage
 LB : Lysogeny Broth
 M : molaire (mol.L^{-1})
 MST : microthermophorèse
N. patriciarum : *Neocallimastix patriciarum*
NpXyn11A : xylanase 11A de *Neocallimastix patriciarum*
 NR : fraction non retenue
 PASC : phosphoric acid-swollen cellulose
 PCR : polymerase chain reaction
 PDB : protein data bank
 PIM : protease inhibitor mix
 PL : pectate lyase
pNP : 4-nitrophényle
pNP-Ace : 4-nitrophényle acétate
pNP-X₃ : 4-nitrophényle- β -D-xylotrioside
 qsp : quantité suffisante pour
 RMN : résonance magnétique nucléaire
 rpm : rotation par minute
 SDS-PAGE : sodium dodecylsulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
 Ser : serine
 SN : surnageant
S. pneumoniae : *Streptococcus pneumoniae*
 SSD : solid state depletion
 TB : tampon de purification
 TM : tampon de marquage
T. reesei : *Trichoderma reesei*
 Trp : tryptophane
 Tyr : tyrosine
 UI : unité internationale
 UNK : domaine de fonction inconnue (unknown)
 V : volt
 X_1 : xylose
 X_2 : xylobiose
 X_3 : xylotriose
 X_4 : xylotetraose
 X_5 : xylopentaose
 X_6 : xylohexaose
 WAX : arabinoxylanes de blé
 ΔG : énergie libre de Gibbs
 ΔH : enthalpie
 ΔS : entropie

Introduction générale

Entre 2004 et 2013, les émissions mondiales de CO₂ ont augmenté de 2,5 % chaque année (Friedlingstein et al., 2014). Or, afin de ne pas dépasser 2 °C de réchauffement climatique par rapport à 2009, synonyme de graves conséquences écologiques et sociétales, il est impératif de réduire les émissions de CO₂ d'environ 3,2 % par an dès 2020 (Stocker, 2013). Une des causes de ce réchauffement climatique est l'utilisation massive de carbone fossile largement utilisé depuis le XIX^{ème} siècle pour fournir de l'énergie ou des molécules chimiques et qui ne cesse de s'épuiser. Dans ce contexte d'urgence, il devient primordial de valoriser d'autres sources de carbone et de surcroît, renouvelables. La biomasse végétale peut permettre de relever ce défi. En effet, cette source de carbone est présente en abondance dans de nombreux biotopes sur notre planète et permet de recycler chaque année 120 milliards de tonnes de CO₂ atmosphérique grâce à la photosynthèse.

Cette biomasse lignocellulosique est composée de cellulose, d'hémicelluloses, de pectines, de lignines et de protéines dont la composition précise varie selon l'espèce de plante, le type de tissu et le stade de développement (Knox, 2008; Ordaz-Ortiz et al., 2009). Ces polymères très variés sont enchevêtrés dans une matrice complexe conférant aux parois des cellules végétales une résistance élevée aux attaques biologiques et chimiques (Fontes and Gilbert, 2010). Cette "récalcitrance naturelle" de la biomasse lignocellulosique représente aujourd'hui un verrou majeur pour le développement de procédés viables et économiquement pertinents (Himmel et al., 2007; Saha, 2003).

La plupart des procédés industriels utilisant cette biomasse requièrent une première étape de prétraitement. Cette étape cruciale permet de dissocier les différents polymères. Toutefois, les conditions de mises en œuvre de ces traitements doivent minimiser la perte de co-produits, produire moins de déchets et limiter l'utilisation d'énergie et de produits chimiques (Holtzapfle and Humphrey, 1984).

Dans la Nature, certains microorganismes peuvent déconstruire la biomasse lignocellulosique en produisant un très large spectre d'enzymes. Ces enzymes, majoritairement des glycosides hydrolases (GHs), sont souvent multimodulaires présentant un ou plusieurs modules. Parmi ces modules se trouvent des carbohydrate-binding modules ou CBMs, qui se fixent à leur ligand qui est le substrat de l'enzyme à laquelle il est apparenté ou à proximité. Le rôle principal du CBM est alors d'amener le domaine catalytique en contact

étroit et prolongé avec son substrat. Ces enzymes sont sécrétées en grand nombre dans le milieu par certains microorganismes aérobies ou bien assemblées au sein d'un complexe multienzymatique, le cellulosome, associé à la membrane de microorganismes anaérobies. Dans tous les cas, ces enzymes de par leur complémentarité et leur diversité, fonctionnent en synergie. Mais dans le cas du cellulosome, la proximité spatiale entre les enzymes renforce cette synergie (Fierobe et al., 2002).

La vaste majorité des études portant sur les GHs et les CBMs sont basées sur des substrats artificiels ou des substrats naturels purifiés. Or l'objectif de cette thèse est de mieux comprendre les stratégies mises en œuvre par les microorganismes pour déconstruire la biomasse lignocellulosique. En effet, de nombreuses questions restent en suspens. Par exemple, existe-t-il une corrélation entre des activités enzymatiques réalisées *in vitro* sur des substrats plus ou moins purifiés et une activité réalisées *in muro* sur des coupes de cellules végétales ? Ou bien, comment la complexité de la paroi végétale a un impact sur les activités enzymatiques ? Nous proposons donc dans cette thèse d'aborder l'influence de l'environnement du substrat sur l'activité d'enzymes multimodulaires contenant une xylanase. Pour cela, nous avons utilisé comme substrat un polymère de xylose plus ou moins substitué, le xylane qui est le substrat de la xylanase. Il se présente soit sous une forme purifiée et soluble, soit insoluble et enchâssé dans les parois des cellules végétales de paille ou de son de blé. Dans ce cas, les différences en cellulose et en lignines présentes entre ces deux substrats complexes ont permis d'étudier l'activité de notre enzyme sur du xylane inclus dans un environnement différent.

L'enzyme étudiée dans cette thèse est la xylanase *NpXyn11A* de *Neocallimastix patriciarum*. Cette enzyme hydrolyse le xylane en xylooligosaccharides. Afin d'étudier l'impact d'un environnement complexe sur l'activité de notre enzyme, nous avons développé une approche consistant à produire des enzymes multimodulaires à façon comprenant notre enzyme et un CBM. Les CBMs utilisés dans cette étude sont le CBM3a de *Clostridium thermocellum* reconnaissant la cellulose et le CBM2b1 de *Cellulomonas fimi* reconnaissant le xylane. Les différents domaines catalytiques et non catalytiques ont été associés à façon en utilisant deux protéines Jo et In. Ces deux protéines sont issues de l'adhésine RrgA du pilus de *Streptococcus pneumoniae* et ont la faculté de pouvoir s'associer de manière covalente et spontanée. Les différents domaines d'intérêt sont produits en fusion avec Jo ou In, ce qui nous a permis d'obtenir ensuite nos enzymes multimodulaires.

Cette thèse s'organise en six chapitres. Le premier chapitre est une étude bibliographique approfondie et permet de présenter plus largement la problématique de l'utilisation de la biomasse et le contexte dans lequel se place la thèse. Il décrit les enzymes impliquées dans la déconstruction de la biomasse mais il introduit également certaines approches permettant d'en étudier l'action, comme l'immunocytochimie. Le second chapitre présente classiquement l'ensemble des méthodes utilisées au cours de cette thèse, dont les méthodes de biologie moléculaire, d'enzymologie mais également des méthodes biophysiques ou d'immunocytochimie. Suit alors le premier chapitre de résultats qui permet d'expliquer plus en détails les différentes enzymes de fusion réalisées au cours de cette thèse et de valider notre approche de construction à façon d'enzymes multimodulaires en utilisant les protéines Jo et In. Cette validation consiste à étudier l'impact de nos différentes constructions Jo et In sur les propriétés biochimiques des protéines associées. Le chapitre 4 présente les résultats concernant les activités enzymatiques de nos enzymes multimodulaires sur une gamme de substrats allant du substrat modèle artificiel jusqu'à des broyats de paille de blé. Nous avons étudié et comparé ainsi l'influence de la complexité de nos substrats sur l'activité de nos enzymes multimodulaires. Le chapitre 5 nous a permis d'aller au bout de cette complexité en travaillant directement sur des coupes brutes de pailles de blé et de mettre en lumière l'importance du contexte dans lequel se trouve un substrat pour une activité enzymatique donnée. Enfin, le dernier chapitre fait un point sur des pistes que nous avons commencé à aborder dans cette thèse et qui nous permettent de proposer quelques perspectives.

Chapitre 1
Etude bibliographique

Chapitre 1 : Etude bibliographique

La biomasse lignocellulosique est une source importante de carbone renouvelable pour l'élaboration de nombreux produits biosourcés tels que les carburants ou des produits chimiques (acide lactique, hydrogène, phénols...) (Menon and Rao, 2012). Un éventail assez large de substrats a été identifié comme matière première, par exemple le bois ou les résidus de récolte (canne de maïs, épis de maïs, bagasse de canne à sucre) (Bornscheuer et al., 2014). Cette biomasse végétale doit permettre de réduire drastiquement le recours aux énergies fossiles afin de relever les défis énergétiques et environnementaux auxquels nous devons faire face (sources fossiles non renouvelables et pollution liée à leur utilisation). Par exemple une quantité d'environ 1 500 millions de tonnes d'agro-résidus provenant de la culture de blé, de riz, de maïs ou d'autres céréales serait disponible ("Biocore," n.d.). Les Etats-Unis et le Brésil produisent presque 20 milliards de litres par an d'éthanol à partir de canne à sucre et d'amidon à partir de graines comme le maïs (Yang and Wyman, 2008). Toutefois la composition et la structure de cette lignocellulose rendent son exploitation à l'échelle industrielle encore difficile (Saha, 2003). Les contraintes de l'utilisation à l'échelle industrielle de la biomasse lignocellulosique sont le nombre d'étapes pour séparer les différents polymères (cellulose, hémicelluloses, lignines), le coût ou encore la production de produits inhibiteurs pour les organismes fermentaires. Il est donc difficile d'avoir un procédé adapté pour une biomasse donnée. La première étape indispensable est le prétraitement de la biomasse lignocellulosique afin de faciliter la dégradation du réseau complexe formé par ces polymères. Plusieurs conditions sont importantes pour que le prétraitement soit réussi (Holtzapple and Humphrey, 1984). Celui-ci doit favoriser l'efficacité enzymatique tout en minimisant la perte de sucres. Il est important de diminuer l'utilisation d'énergie, de produits chimiques et le nombre d'équipements. Les étapes suivantes de l'utilisation de la biomasse lignocellulosique sont la production des enzymes (cellulases, hémicellulases), la fermentation des sucres par ces enzymes et la purification des produits (Menon and Rao, 2012).

1. La biomasse lignocellulosique

I. La structure de la paroi

a) Généralités

Différentes zones sont observées sur une coupe : principalement l'épiderme, le sclérenchyme, le parenchyme, les faisceaux conducteurs ou vasculaires regroupant le xylème et le phloème (Figure 1). Le rôle de l'épiderme est de contrôler des échanges gazeux et l'équilibre aqueux (Hansen et al., 2011). Il présente à sa surface des petits trous, les stomates, qui permettent aux cellules végétales de respirer (Figure 2). Le stomate est composé de deux cellules de garde qui régulent la taille du pore et de deux cellules annexes (Taiz and Zeiger, 2002). L'épiderme est une couche très riche en cellulose (Hornsby et al., 1997) qui protège la plante de l'extérieur (Zhang et al., 2003). La morphologie des nœuds est différente de celle des entre-nœuds, des études plus précises ayant montré que la taille de l'épiderme est plus élevée pour les nœuds (145 μm pour les entre-nœuds et 200-230 μm pour les nœuds) (Ghaffar and Fan, 2015). Les parois des cellules du sclérenchyme sont épaisses, lignifiées et résistantes à la dégradation microbienne (Hansen et al., 2011). La majorité de ces cellules sont mortes (Albersheim et al., 2010) du fait de la présence des lignines qui les isolent de l'extérieur et les empêchent de respirer.

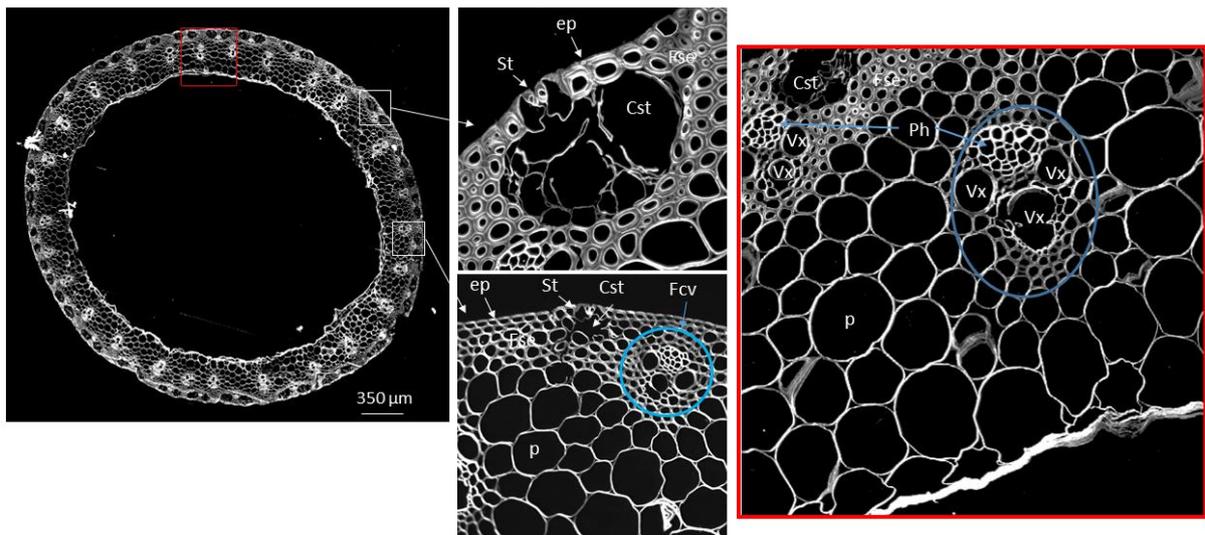


Figure 1 : Vue en coupe transversale d'un entre-nœud de paille de blé.
Cst : chambre sous-stomatique ; ep : épiderme composé d'une assise cellulaire ; Fcv ou cercle bleu : faisceau cribro vasculaire ; Fse : fibres de sclérenchyme sous épidermique ; P : cellules de parenchyme ; Ph : îlot de cellules du phloème ; St : stomate ; Vx : vaisseau xylémien. Réalisation des images et de la légende par le Dr. Alain Jauneau, plateforme d'Imagerie cellulaire.

Les faisceaux vasculaires sont disposés sur deux cercles. Les plus externes sont de petite taille positionnés au sein des fibres du sclérenchyme sous épidermique. Les plus internes sont de plus grande taille et situés au sein du parenchyme. Dans ces faisceaux, on retrouve un îlot de cellules du phloème et les vaisseaux du xylème. Les vaisseaux du phloème font circuler l'eau et les minéraux ainsi que les sucres produits par photosynthèse des feuilles jusqu'aux racines (Taiz and Zeiger, 2002). Le xylème permet de conduire l'eau et les minéraux des racines aux feuilles. La distance entre le centre de deux faisceaux vasculaire pour les entre-noeuds de paille de blé est de 200 μm (Ghaffar and Fan, 2015)

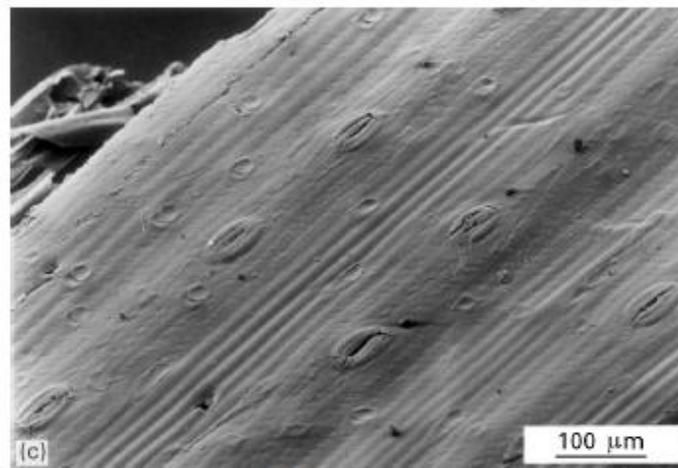


Figure 2 : Microstructure de l'épiderme de la paille de blé.
D'après (Hornsby et al., 1997).

La fonction principale du parenchyme est de renforcer la structure de la tige (Hansen et al., 2011). Les cellules du parenchyme peuvent aussi stocker de l'eau, de l'amidon et de petites molécules (Albersheim et al., 2010). Elles ne sont composées généralement que d'une fine paroi primaire. La lignine a été observée dans une fine couche autour du parenchyme (Hansen et al., 2011) ou dans les parois des cellules du parenchyme (Burlat, 1997). Ces cellules restent vivantes tout au long de la vie de la plante, elles augmentent graduellement en taille jusqu'au centre de la tige où l'épaisseur de la paroi diminue (Ghaffar and Fan, 2015). Le diamètre moyen de ces cellules est de 58 à 142 μm (McKean and Jacobs, 1997).

b) Les parois primaires et secondaires

Les parois cellulaires peuvent être composées de trois couches : la lamelle moyenne, la paroi cellulaire primaire et la paroi cellulaire secondaire. Les parois primaires et secondaires

correspondent à des structures complexes. On y retrouve des polysaccharides variés en nature et abondance selon l'organisme et la différenciation des cellules (Casero and Knox, 1995; Jeffries, 1996; Puls, 1997). Plusieurs études révèlent les lacunes sur la compréhension précise des liaisons entre les divers groupes de polysaccharides présents dans les parois cellulaires et leur organisation spatiale. En effet, il faut prendre en compte de nombreux paramètres comme l'âge, la structure et la fonction des cellules (Knox, 2008; Ordaz-Ortiz et al., 2009).

Les parois cellulaires primaires s'accommodent à l'expansion cellulaire, jouent un rôle dans l'adhésion cellulaire et sont présentes à la surface de toutes les cellules végétales (Knox, 1997; Lee et al., 2011; Popper, 2008). En général, une paroi primaire a une taille de 100 nm d'épaisseur (Albersheim et al., 2010).

La paroi cellulaire secondaire est présente dans certaines cellules, notamment les cellules différenciées ou les cellules du xylème. Elle n'est pas présente dans les cellules du collenchyme et du parenchyme (Popper, 2008). Cette paroi est synthétisée à la fin de la croissance de la cellule (Himmel et al., 2010). L'épaisseur de la paroi secondaire varie de 1 μm (Albersheim et al., 2010) à 10 μm (Ding et al., 2012). Ses caractéristiques structurales et biochimiques sont différentes de celles de la paroi primaire. Par exemple, les parois secondaires sont plus épaisses et résistent à des forces compressives (Hervé et al., 2009; Lee et al., 2011)

II. Composition de la paroi

La biomasse lignocellulosique (Figure 3) est majoritairement composée de cellulose, d'hémicelluloses, de pectines et de lignines (Carpita, 1996; Claassen et al., 1999; Saha, 2003). On retrouve également des protéines (arabinogalactane protéines, protéines riches en proline, protéines riches en glycine ou kinases associées à la paroi) (Showalter, 1993; Talmadge et al., 1973). La composition exacte dépend du type de plante étudié (Tableau 1). Par exemple, la paille de riz et la bagasse de canne à sucre ont une composition similaire en cellulose (respectivement 39 % et 43 %) mais les quantités de lignines et d'hémicelluloses sont différentes. En effet, la paille de riz contient 15 % d'hémicelluloses et 10 % de lignines alors que la bagasse de canne à sucre est composée de 25 % d'hémicelluloses et de 24 % de lignines.

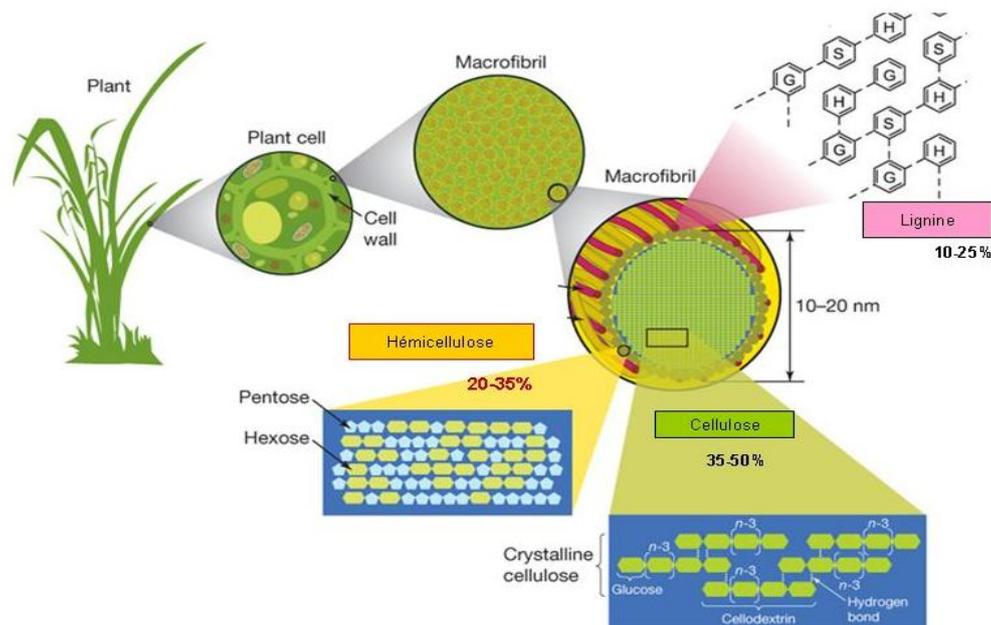


Figure 3 : Complexité de la structure de la paroi des plantes.
A partir de (Rubin, 2008).

Tableau 1 : Exemples de compositions de plantes.
D'après (Merino and Cherry, 2007).

échantillon	variété	% masse		
		cellulose	hémicelluloses	lignines
pin de Monterey	<i>Pinus radiata</i>	41,7	20,5	25,9
peuplier hybride	DN-34	40	22	24
bagasse de canne à sucre	<i>Gramineae saccharum</i> var. 65-7052	43	25	24
tige de maïs	<i>Zea mays</i>	35	22	18
herbes	<i>Alamo</i>	31	24	18
paille de blé	<i>Thunderbird</i>	33	23	17
paille d'orge	<i>Hordeum vulgare</i> sp.	40	19	14
paille de riz	<i>Oryza sativa</i> sp.	39	15	10

Les plantes sont réparties en divers groupes tels que les angiospermes et les gymnospermes. Par exemple, les feuillus sont des angiospermes alors que les conifères sont des gymnospermes. Il existe des différences dans la composition de la paroi cellulaire entre chacun des groupes (Tableau 2, Figure 4). Par exemple, l'hémicellulose majoritaire des gymnospermes est le glucomannane alors qu'il s'agit de glucuronoxylane pour les angiospermes (Jeffries, 1994). Parfois, les arabinoxylanes sont décrits comme les hémicelluloses majoritaires des angiospermes car il y a peu de substitutions avec un résidu acide glucuronique (Harris and Smith, 2006). La lignine observée dans la paroi secondaire est composée majoritairement d'alcool coniférique et d'alcool sinapique pour les angiospermes alors que la lignine des gymnospermes contient surtout de l'alcool coniférique (Campbell and Sederoff, 1996).

Tableau 2 : Caractéristiques de la composition de la paroi cellulaire des plantes.

- : non détecté ; ± : trace ; + : présence en faible concentration ; ++ : présence à une concentration modérée. D'après (Popper, 2008).

	xylanes	mannanes	xyloglucanes	rhamnogalacturonanes II	pectines	β-glucanes à liaisons multiples
gymnospermes	+	±	++	+	+	-
angiospermes	+	±	+ ou ++	+	+	- ou +

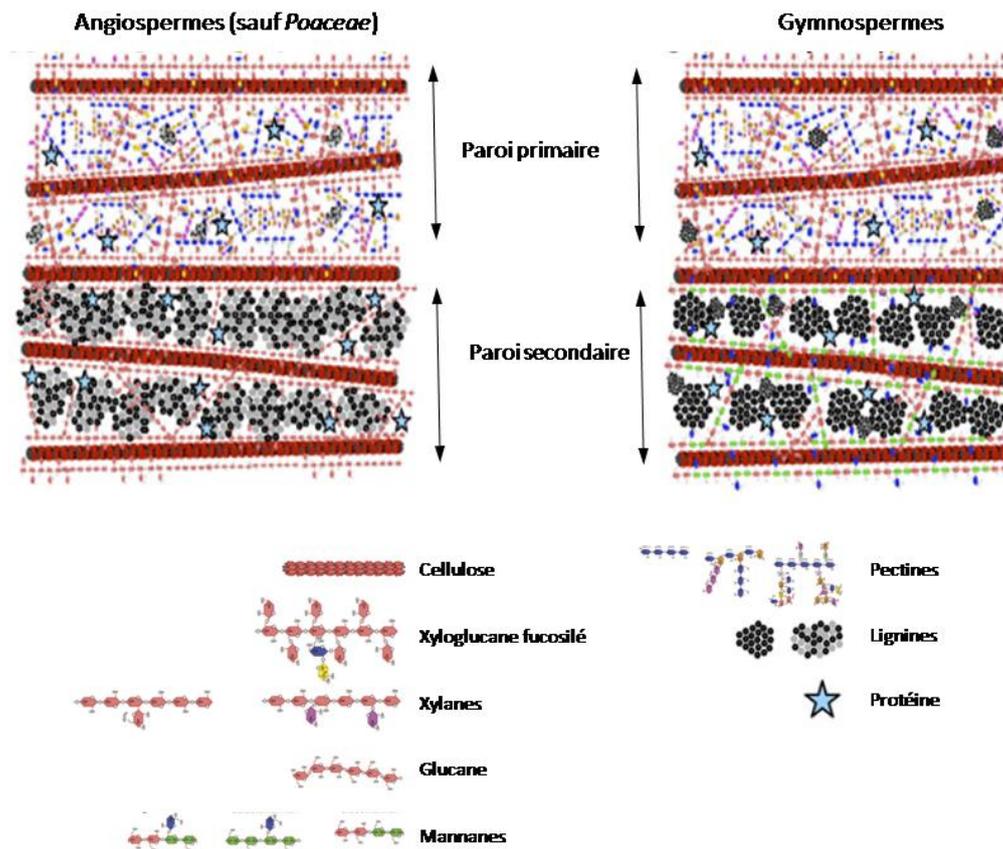


Figure 4 : Représentation de la composition de la paroi cellulaire des angiospermes et des gymnospermes
D'après (Sarkar et al., 2009).

Les angiospermes sont classés en divers groupes. Par exemple, les monocotylédones et les eudicotylédones (ou dicotylédones dans la suite de ce manuscrit) sont des sous-groupes des angiospermes (AGP, 1998). Le nombre de cotylédones dans la graine est respectivement de un ou de deux. Le hêtre, le bouleau et l'épinard sont des dicotylédones alors que le palmier et l'orge sont des monocotylédones. Des différences dans la composition de la paroi végétale ont été observées entre ces deux groupes. Par exemple, l'hémicellulose majoritaire des dicotylédones est le xyloglucane, qui correspond entre 20 et 25 % de la paroi cellulaire

(Hayashi, 1989). A l'inverse, 2 à 5 % de la paroi cellulaire des monocotylédones est composée de xyloglucanes (McNeil et al., 1984).

2. Composition des *Poaceae*

Au sein des monocotylédones, la famille *Poaceae*, du sous-groupe *Poales*, rassemble les graminées dont les céréales telles que le blé, le maïs, l'avoine ou le seigle. La paroi cellulaire de ces espèces végétales a une composition spécifique, différente de celle des autres monocotylédones (Tableau 3, Figure 5) (Carpita and Gibeaut, 1993; Smith and Harris, 1999).

Tableau 3 : Composition approximative (% de matière sèche) des parois cellulaires primaires et secondaires des *Poaceae* et des dicotylédones.

- : non détecté ; ± : trace. D'après (Vogel, 2008).

	paroi primaire		paroi secondaire	
	<i>Poaceae</i>	dicotylédones	<i>Poaceae</i>	dicotylédones
cellulose	20 - 30	15 - 30	35 - 45	45 - 50
xylanes	20 - 40	5	40 - 50	20 - 30
β-glucanes à liaisons multiples	10 - 30	-	±	-
xyloglucanes	1 - 5	20 - 25	±	±
mannanes et glucomannanes	±	5 - 10	±	3 - 5
pectines	5	20 - 35	0,1	0,1
protéines de structure	1	10	±	±
lignines	±	±	20	7 - 10

En effet, deux groupes ont été observés : le premier groupe correspond aux *Poales* et le deuxième groupe est composé des dicotylédones et des monocotylédones qui ne sont pas classés dans les *Poales*. La paroi primaire et la paroi secondaire des *Poales* sont composées majoritairement de glucuronoarabinoxylanes (Carpita and Gibeaut, 1993; Carpita, 1996; Smith and Harris, 1999). La paroi primaire des *Poales* contient peu de pectines contrairement aux autres monocotylédones (Carpita and Gibeaut, 1993; Smith and Harris, 1999). Les β-glucanes à liaisons multiples sont spécifiques des parois primaires des *Poales* (Carpita and Gibeaut, 1993; Carpita, 1996). Par ailleurs, dans la paroi secondaire des *Poaceae* la lignine représente 20 % de la masse sèche contre 7 à 10 % pour la paroi secondaire des dicotylédones (Vogel, 2008).

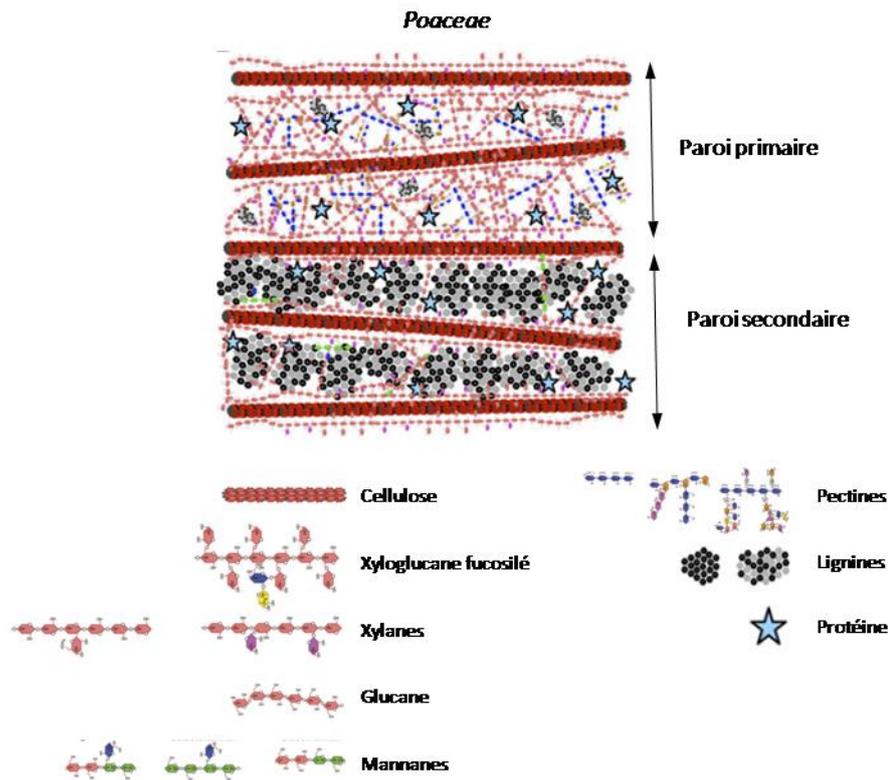


Figure 5 : Représentation de la composition de la paroi cellulaire des *Poaceae* D'après (Sarkar et al., 2009).

I. La cellulose

La cellulose est l'un des composants majeurs des plantes et c'est le polysaccharide le plus abondant sur Terre (Bayer et al., 1998a). La cellulose est un polymère composé d'unités D-glucose (D est le symbole pour l'énantiomère dont le dernier carbone asymétrique porte une fonction alcool, située à droite dans la représentation de Fisher) liées par des liaisons β -(1,4), découvert par Anselme Payen (O'Sullivan, 1997). Le carbone 1 d'un glucose porte une fonction réductrice, il s'agit du carbone anomérique (carbone ayant une position asymétrique et portant le groupe hydroxyle). Les glucoses sont associés par une liaison covalente entre le carbone 1 d'une unité et le carbone 4 d'une autre unité. La liaison est une liaison β car les D-glucoses ont le groupe hydroxyle et le groupe CH_2OH du même côté du cycle.

Ces polymères de D-glucose sont reliés entre-eux de manière parallèle par des liaisons hydrogènes pour former un feuillet. Des liaisons hydrophobes permettent une cohésion entre les différents feuillets. Une microfibrille est ainsi formée. Les microfibrilles sont des structures ayant des tailles latérales variables entre 2 et 20 nanomètres de diamètre (Bayer et

al., 1998a; Ratanakhanokchai et al., 2013). Le poids moléculaire des différentes sources de cellulose commerciale est compris entre 27 000 et 900 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour un degré de polymérisation (DP) compris entre 90 et 10 000 (Chundawat et al., 2011; Immergut et al., 1953). De plus, ces microfibrilles présentent des zones cristallines (régions très ordonnées) et des zones amorphes (régions moins ordonnées). Les microfibrilles cristallines sont des agrégats de chaînes de cellulose. Le nombre de chaînes varie en fonction de l'espèce : par exemple, une dizaine de chaînes de cellulose forme une microfibrille d'oignon (Ha et al., 1998) alors qu'environ 24 chaînes ont été observées dans le bois d'épicéa (Fernandes et al., 2011). Il existe six types de cellulose appelés polymorphes (I, II, III₁, III₁₁, IV₁, IV₁₁). L'interconversion entre ces formes est possible (Kudlicka et al., 1996; O'Sullivan, 1997). Il y aurait deux types de cellulose cristalline nommés I et II (Atalla and VanderHart, 1984) et quatre types de cellulose amorphe (McLean et al., 2002). Chez les plantes supérieures, la cellulose est en majorité sous la forme I β (Atalla and VanderHart, 1984). Chaque microfibrille a plusieurs faces dont la face 110 qui est hydrophobe (Figure 6).

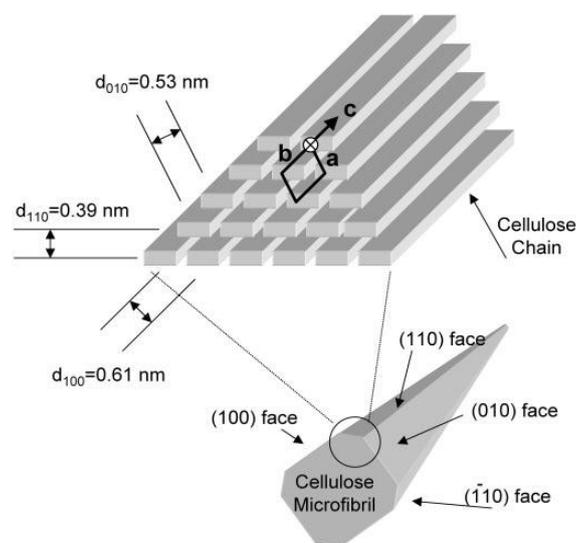


Figure 6 : Représentation schématique des microfibrilles cristallines de la cellulose. D'après (Lehtio et al., 2003).

II. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses correspondent à une classe de polymères beaucoup plus complexes que la cellulose, présentant des substitutions de longueur et de nature variable selon l'origine et la croissance de la biomasse considérée (Timell, 1967). Structurellement, les hémicelluloses sont composées d'une chaîne principale de sucres sous leur forme D-pyranose

(galactose, xylose, mannose) liés les uns aux autres en β -(1,4) (Pérez et al., 2002; Saha, 2003). Les hémicelluloses regroupent les xylanes, les β -glucanes à liaisons multiples, les xyloglucanes et les mannanes (Figure 7).

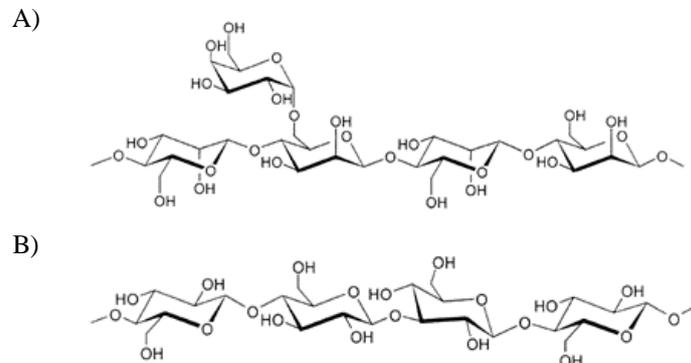


Figure 7 : Différents types d'hémicelluloses.
A) D-galacto-D-mannanes. B) β -D-glucanes à liaisons multiples (Ebringerová, 2006).

Les xylanes sont une famille complexe et très variable de polysaccharides avec une chaîne principale d'environ 150 à 200 unités de D-xylopyranose, éventuellement substituées par des résidus glycosidiques (arabinose, xylose, galactose), des acides glucuroniques ou d'autres groupes (acétyle, féruloyle) (Figure 8) (Biely, 1985a; Gilbert and Hazlewood, 1993; Ratanakhanokchai et al., 2013; Torronen et al., 1994). Par exemple, le résidu de D-xylose peut être substitué par un groupement acétyle (Grohmann et al., 1989) en position 2 ou 3 (Benamrouche et al., 2002). La nature et le degré de substitution varient selon la source. Les glucuronoxylanes correspondent à une chaîne principale composée de D-xyloses qui peuvent être substitués par un résidu α -D-acide glucuronique en position 2 (Sun et al., 1996) ou en position 3 (Aspinall and Mahomed, 1954) ou par son dérivé O-méthylé (Sun et al., 1996). On observe également des arabinoxylanes avec une chaîne principale de D-xyloses qui peuvent être substitués par un résidu α -L-arabinose en position 2 (Wilkie, 1979) et parfois en position 3 (Aspinall and Meek, 1956) ou doublement substitués (en positions 2 et 3) (Wilkie, 1979). Le résidu d'arabinose peut lui-même être substitué par un acide férulique (Mueller-Harvey et al., 1986; Smith and Hartley, 1983). Les arabinoxylanes extraits de céréales ont une taille comprise entre 64 000 et 380 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Ebringerová, 2006). Plus complexes, les glucuronoarabinoxylanes présentent une chaîne principale de D-xyloses, liés en β -(1,4), qui peuvent être substitués en position 3 par un résidu d'arabinose ou en position 2 par un résidu d'acide glucuronique. D'autres substitutions sont observées comme la substitution d'un résidu α -L-arabinose (lui-même substituant un résidu de xylose), en position 5 par un acide férulique

ou un acide *p*-coumarique (Saulnier et al., 2007) ou la substitution d'un résidu de D-xylose par un autre D-xylose en position 3 (Sun et al., 1996).

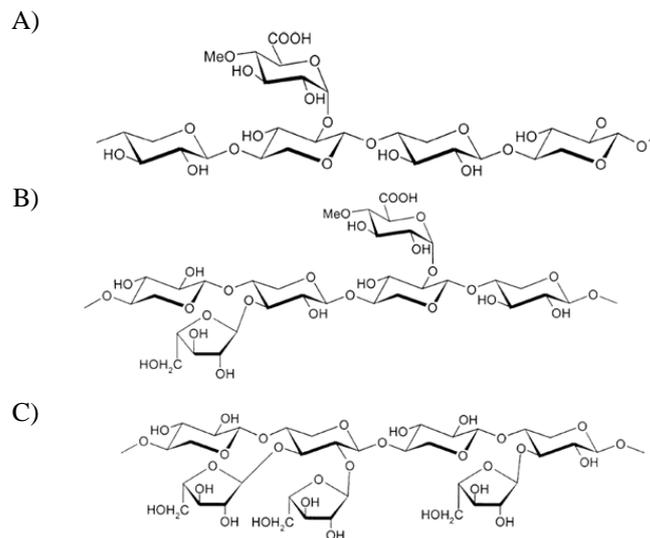


Figure 8 : Exemples de structures des xylanes.

A) 4-O-méthyle-D-glucurono-D-xylane. B) (L-arabino)-4-O-méthyle-D-glucurono-D-xylane. C) L-arabino-D-xylane (Ebringerová, 2006).

Les β-glucanes à liaisons multiples sont également des hémicelluloses présentes dans la paroi. Il s'agit de D-glucoses liés en β-(1,3) et β-(1,4) non substitués.

D'autre part, les xyloglucanes sont composés d'une chaîne principale de β-(1,4)-D-glucoses qui peuvent être substitués en position 6 par un résidu de D-xylose. Des substitutions moins fréquentes ont été observées comme un β-D-galactose ou un α-L-arabinose en position 2 du résidu de xylose (Ebringerová, 2006). Par ailleurs, un résidu de galactose peut être acétylé en position 2 (Hayashi, 1989).

Pour finir, les mannanes sont constitués d'une chaîne principale de β-(1,4)-D-mannoses. Le carbone 2, 3 ou 6 d'un D-mannose peut être acétylé (Manna and McAnalley, 1993). Un résidu de D-mannose peut également être substitué en position 6 par un galactose, donnant alors un galactomannane (Reid, 1985). Un glucommane correspond à une chaîne principale composée de mannoses et de glucoses liés en β-(1,4) avec parfois une substitution par un résidu de galactose en α-(1,6) (Reid, 1985).

III. Les pectines

Les pectines sont des polysaccharides caractérisés par une grande quantité d'acides galacturoniques. Elles sont composées de 17 monosaccharides différents liés par 20 types de

liaisons (Figure 9) (Ridley et al., 2001). L'homogalacturonane, le rhamnogalacturonane de type I et de type II sont des domaines structuraux des pectines. La sous-structure la plus simple, l'homogalacturonane, est constituée d'acides galacturoniques liés en α -(1,4), qui peuvent être estérifiés par un méthyle en position 6 ou un acétyle en positions 3 ou 4 (Ishii, 1997; O'Neill et al., 1990).

Le rhamnogalacturonane de type I correspond à un dissaccharide répété, formé de L-rhamnose et d'acide galacturonique. La liaison entre l'unité de rhamnose et celle d'acide galacturonique est une liaison α -(1,4) alors que celle entre l'unité d'acide galacturonique et l'unité de rhamnose suivante est α -(1,2) (McNeil et al., 1984). Un sucre peut substituer un résidu de rhamnose en positions 3 ou 4. Par ailleurs, un acétyle peut être lié à un résidu d'acide galacturonique en positions 2 ou 3 (Ishii, 1997; Komalavilas and Mort, 1989). Le rhamnogalacturonane de type II est composé d'une chaîne principale d'homogalacturonane et de quatre chaînes latérales très conservées (Darvill et al., 1978; O'Neill et al., 2004).

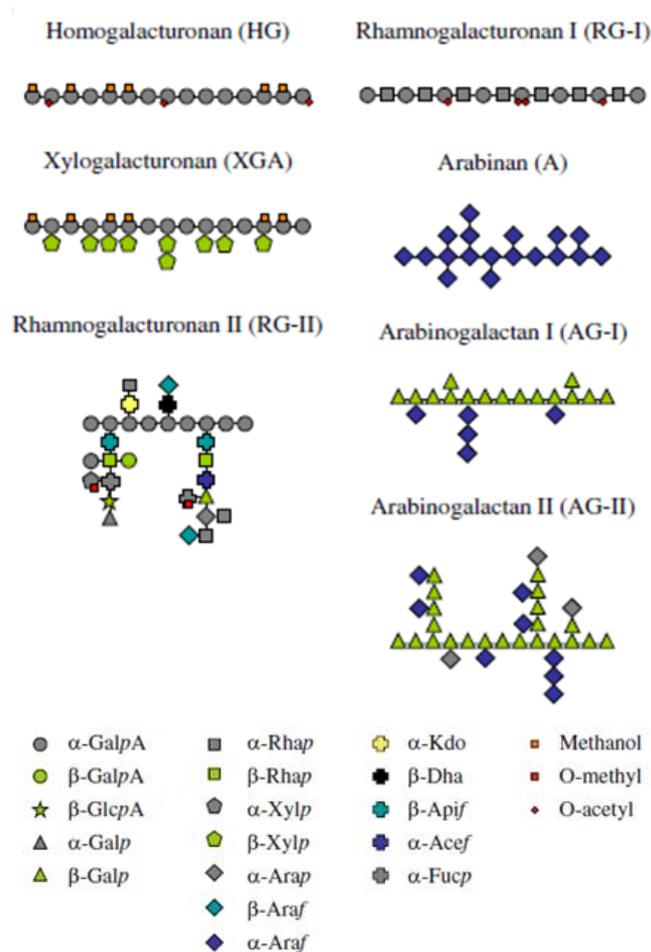


Figure 9 : Sous-structures des pectines.
D'après (Bonnin et al., 2014).

Les sous-structures sont liées de manière covalente entre-elles pour former le complexe macromoléculaire nommé pectine (Bonnin et al., 2014). Divers modèles ont été proposés pour la structure des pectines (Jarvis, 1984; Vincken et al., 2003; Voragen et al., 2009). Les pectines sont impliquées dans différentes propriétés de la paroi cellulaire comme la flexibilité de la paroi cellulaire (Ralet et al., 2008) ou la force de traction (Ryden et al., 2003).

IV. Les lignines

Les lignines sont un des constituants non saccharidiques majeurs de la biomasse lignocellulosique (Carpita, 1996; Claassen et al., 1999; Saha, 2003). Elles forment un réseau complexe à partir d'unités de phényle propane. Les trois monomères qui la constituent sont l'alcool *p*-coumarique, l'alcool coniférique et l'alcool sinapique (Figure 10).

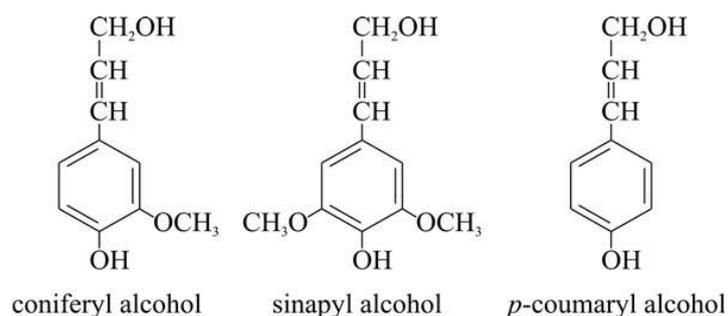


Figure 10 : Structure des trois principaux composés des lignines. Les composés sont l'alcool coniférique, l'alcool sinapique et l'alcool *p*-coumarique.

Les lignines peuvent avoir une masse molaire comprise entre 300 et 850 g.mol⁻¹ (Zeikus et al., 1982) (Figure 11). Elles confèrent à la paroi plusieurs propriétés : rigidité, imperméabilité, résistance à un stress oxydatif ou à une attaque microbienne (Pérez et al., 2002; Ratanakhanokchai et al., 2013).

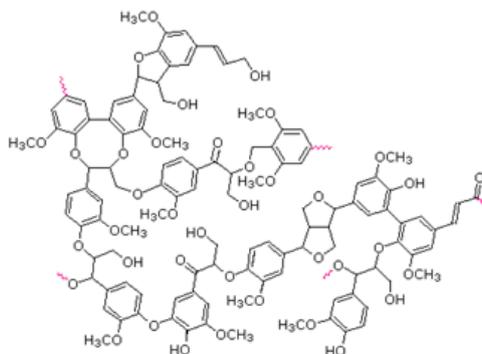


Figure 11 : Exemple de lignine.

V. Les protéines

De nombreuses protéines sont également retrouvées dans la paroi des cellules végétales (Showalter, 1993). Il s'agit des arabinogalactane protéines, des protéines riches en proline, des protéines riches en glycine ou des kinases associées à la paroi. Les arabinogalactane protéines sont présentes à la surface de la cellule (Showalter, 2001). Le rôle de ces protéines n'est pas totalement compris, ces protéines pourraient être impliquées dans la différenciation cellulaire (Basile and Basile, 1993), dans la croissance (Serpe and Nothnagel, 1994), dans la mort cellulaire (Langan and Nothnagel, 1997) ou dans le signalment (Schultz et al., 1998). Par ailleurs, les protéines riches en proline peuvent être associées à la paroi (García-Gómez et al., 2000) et s'associer entre-elles ce qui consolide la paroi cellulaire (Bradley et al., 1992). Les protéines riches en glycine seraient quant à elles, des régulateurs de la structure de la paroi (Park et al., 2001). Les kinases associées à la paroi sont impliquées dans l'élongation des cellules, la morphogenèse (Lally et al., 2001) ainsi que dans la protection de la plante contre les pathogènes (He et al., 1998).

VI. Interactions entre les composés de la paroi

Les fibrilles de cellulose sont attachées entre-elles par les hémicelluloses et les pectines. Une partie des hémicelluloses, notamment les xylanes et arabinoxylanes, est liée voire entrelacée aux microfibrilles de la cellulose par des liaisons hydrogènes (Bornscheuer et al., 2014; McNeil et al., 1984; Shallom-Shezifi and Shoham, 2003). Les xyloglucanes sont également décrits comme interagissant avec la cellulose (Carpita, 1983). De plus, les substitutions par des acides glucuroniques dans les glucuronoarabinoxylanes contribuent à la stabilisation de la liaison entre les hémicelluloses et la cellulose (Pereira et al., 2017). Les hémicelluloses pourraient protéger des zones de la cellulose et ainsi limiter l'accessibilité aux enzymes comme le font les lignines (Bornscheuer et al., 2014). En effet, les fibrilles de cellulose sont protégées d'une hydrolyse enzymatique par les lignines (Brodeur et al., 2011). Les lignines entourent la cellulose et peuvent former des liaisons covalentes avec des hémicelluloses (Pérez et al., 2002; Ratanakhanokchai et al., 2013). La paroi est alors considérée comme une barrière physique pour les pathogènes. De plus, des interactions entre les pectines, plus précisément les arabinanes et galactanes, et la cellulose ont été mises en évidence (Zykwinska et al., 2007, 2005).

Des liaisons entre chaînes de xylanes impliquent des acides féruliques liés à un résidu d'arabinose lui-même substituant un xylose (Ishii, 1991). Des interactions entre xylanes et lignines créent un réseau. Par exemple, un acide *p*-coumarique peut être lié à un résidu arabinose (lui-même substituant la chaîne principale d'un xylane) par une liaison ester (Fang et al., 1999; Kuhad et al., 1997). Un acide férulique peut également être impliqué dans l'interaction entre des arabinoglucuronoxylanes et la lignine grâce à une liaison ether (Scalbert et al., 1986, 1985).

3. Enzymes impliquées dans la déconstruction de la biomasse lignocellulosique

Les polysaccharides pariétaux sont imbriqués les uns aux autres par un grand nombre d'interactions inter- et intra-moléculaires. Ces interactions constituent une véritable barrière à l'action des enzymes (Lee et al., 2011). Reflétant la diversité des polysaccharides qui constituent le substrat, les microorganismes qui dégradent la paroi cellulaire végétale expriment un large répertoire d'enzymes de dégradation qui inclut les glycosides hydrolases (GHs), les polysaccharides lyases (PLs), les monooxygénases lysant les polysaccharides (LPMO) et les carbohydate estérases (CEs) (Gilbert, 2010). Ces enzymes sont produites par des bactéries, des champignons (Belancic et al., 1995; Elegir et al., 1994; Gilbert et al., 1988; Matte and Forsberg, 1992; Yang et al., 1989) ou des plantes (Cleemput et al., 1997). Les GHs, les PLs, CEs, les enzymes ayant une activité auxiliaire (AAs) et les carbohydate-binding modules (CBMs) sont répertoriées dans la base de données CAZy (Lombard et al., 2014). Les enzymes classées dans les PLs clivent la liaison glycosidique de polysaccharides contenant un acide uronique (Lombard et al., 2014; Yip and Withers, 2006). Les AAs sont des enzymes redox comme par exemple les monooxygénases hydrolysant les polysaccharides. Dans ce chapitre, nous allons nous focaliser sur les enzymes utilisées dans la thèse.

1. Les glycosides hydrolases

Les glycosides hydrolases sont des glycosidases et transglycosidases qui clivent les liaisons glycosidiques entre deux sucres et/ ou qui synthétisent des liaisons glycosidiques. Ces enzymes sont organisées actuellement en 145 familles différentes sur la base de similarités de séquences ((Lombard et al., 2014) mis à jour le 29/06/17). Les GHs sont les enzymes clés du

métabolisme glucidique et sont retrouvées dans les trois règnes principaux (archaeobactéries, eubactéries, eucaryotes). La nomenclature IUB (International Union of Biochemistry) des enzymes est basée sur le type de réaction que l'enzyme catalyse et sur sa spécificité de substrat. Pour les GHs (EC 3.2.1.x), les trois premiers chiffres désignent des enzymes hydrolysant des liaisons O-glycosyles alors que le dernier chiffre indique le substrat et reflète parfois le mécanisme moléculaire. Les enzymes impliquées dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique sont répertoriées dans le Tableau 4. Pour information, les enzymes endo clivent leur substrat au hasard et à l'intérieur de la chaîne polysaccharidique alors que les exo-enzymes clivent à partir d'une des extrémités de la chaîne.

Tableau 4 : Exemples d'enzymes impliquées dans la dégradation des différents composants de la biomasse lignocellulosique.
D'après (Van Dyk and Pletschke, 2012).

substrat dégradé	enzymes
cellulose	cellobiohydrolase, endoglucanase, β -glucosidase
hémicelluloses	endo-xylanase, β -xylosidase, endo-mannanase, β -mannosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -glucuronidase, α -galactosidase
pectines	polygalacturonase

II. Le site actif des glycosides hydrolases

La configuration du site actif d'une GH peut être décrite par deux critères : sa topologie générale et ses sous-sites. La topologie générale des sites actifs correspond à trois classes quels que soient la famille de GHs et le mécanisme d'action. Les trois topologies sont la forme poche (ou cratère), la forme canyon et la forme tunnel (ou fente) (Figure 12) (Davies and Henrissat, 1995). La topologie a une influence sur la reconnaissance d'un substrat puis sa fixation et par conséquent sur l'activité de l'enzyme. Les enzymes, comme les β -glucosidases, ayant une topologie de type poche reconnaissent une extrémité non-réductrice du substrat. La forme canyon est présente dans les enzymes de type endo comme les xylanases, qui hydrolysent ainsi les longues chaînes polysaccharidiques à partir de leur centre. La topologie qualifiée de tunnel est observée dans des cellobiohydrolases, elle provient de l'évolution de la topologie canyon lorsque la boucle couvre le site catalytique.

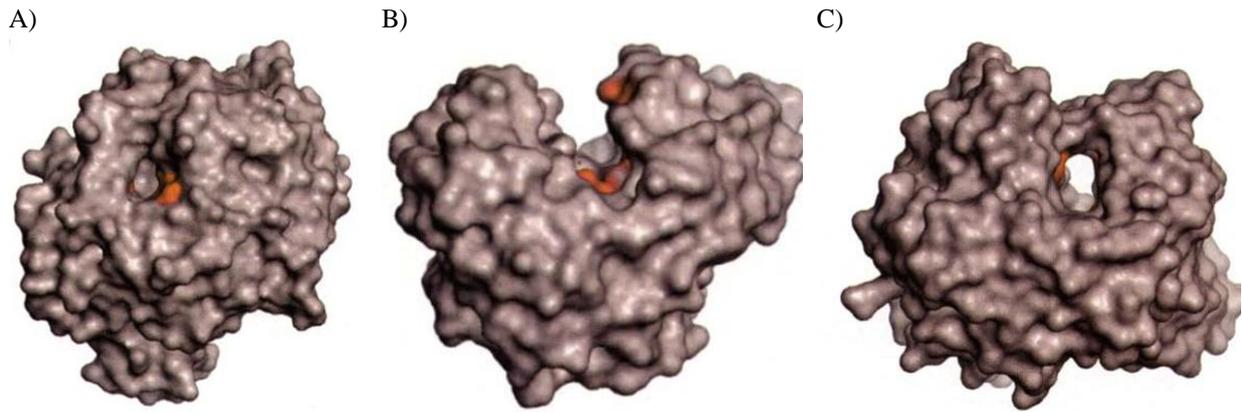


Figure 12 : Structure tridimensionnelle pour trois GHs ayant chacune une topologie précise.
 A) Topologie de type poche (ou cratère), exemple de la glucoamylase de *Aspergillus awamori*. B) Topologie de type canyon, exemple de l'endoglucanase E2 de *Thermonospora fusca*. C) Topologie de type tunnel (ou fente), exemple de la cellobiohydrolase II de *Trichoderma reesei*. (Davies and Henrissat, 1995)

Le site actif est composé de sous-sites de liaison au substrat. Ils permettent le positionnement du substrat afin de couper la bonne liaison glycosidique ou de modifier des résidus. La nomenclature utilisée pour ces sous-sites a été proposée par l'équipe de Gideon Davies afin de pouvoir comparer plusieurs complexes d'une même enzyme avec des substrats variables ainsi que des enzymes ayant un nombre différent de sous-sites. Le substrat (appelé aussi donneur) est représenté avec l'extrémité non réductrice à gauche. Les sous-sites sont numérotés à partir du point d'hydrolyse : en négatif vers l'extrémité non réductrice du substrat et en positif vers l'extrémité réductrice du substrat (Figure 13). Ainsi, la coupure de la liaison a lieu entre les positions -1 et +1 (Davies et al., 1997). Les sous-sites négatifs sont aussi nommés sous-sites donneurs (ou glycones) car ils interagissent avec le donneur en sucre (glycosidique). Les sous-sites positifs sont appelés sous-sites accepteurs (ou aglycones) car ils interagissent avec l'accepteur (molécule comprenant un groupement OH). Celui-ci n'est pas glycosidique dans le cas de l'hydrolyse.

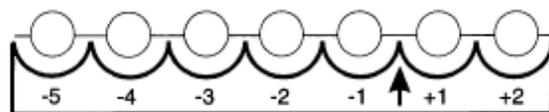


Figure 13 : Schéma des sous-sites d'un site actif d'une GH.
 Les ronds correspondent aux unités glycosidiques du substrat. La flèche correspond au site de coupure (Davies et al., 1997)

Les modèles de topologie et des sous-sites du site de liaison présentent des limites car ils ne représentent pas l'ensemble des GHs. Par exemple, l'arabinofuranosidase de *Thermobacillus xylanilyticus* a quatre sous-sites nommés -1, +1, +2 et +2' (Paës et al., 2008). D'autre part, la structure tridimensionnelle de cette enzyme correspond à un canyon avec une poche profonde au niveau du sous-site -1.

Lors de la catalyse, les résidus formant les divers sous-sites jouent un rôle important. En effet, ils interagissent avec le substrat *via* des interactions hydrogènes, hydrophobes ou électrostatiques dites de Van der Waals. Les interactions les plus fréquentes proviennent de liaisons hydrogènes ou d'effets électrostatiques (π -stacking ou interactions d'empilement en français) entre les cycles des chaînes latérales des acides aminés aromatiques et les cycles des sucres (Quioco, 1989). Les résidus catalytiques sont en général un aspartate et un glutamate même si parfois d'autres résidus sont impliqués comme une tyrosine (Davies and Henrissat, 1995; Sinnott, 1990).

III. Les mécanismes d'action

Le mécanisme catalytique des GHs est de type acide/base présentant deux alternatives possibles conduisant soit à une inversion de la configuration du carbone anomérique, soit à la rétention nette de sa configuration (Sinnott, 1990). La différence entre les mécanismes provient de la variation des distances entre les deux résidus catalytiques, ou diade catalytique (deux résidus présents dans le site catalytique d'une enzyme et indispensables pour son activité). Dans les deux cas, les étapes de transition sont de type ion oxocarbonium.

Dans le cas de l'inversion de conformation, la poche catalytique est large, présentant un espace entre les deux résidus catalytiques de 9 à 10,5 Å afin que la molécule d'eau et le substrat puissent entrer en même temps dans le site actif (Davies and Henrissat, 1995; McCarter and Withers, 1994; Rye and Withers, 2000) (Figure 14). Le mécanisme d'inversion correspond à deux réactions concomitantes. Le résidu catalytique acide protone l'atome d'oxygène de la liaison glycosydique, entraînant la rupture de celle-ci. Le résidu catalytique basique active une molécule d'eau qui va alors jouer le rôle du nucléophile et attaquer le carbone anomérique. La substitution permet d'obtenir un produit ayant une stéréochimie inverse de celle du substrat (Davies and Henrissat, 1995; McCarter and Withers, 1994).

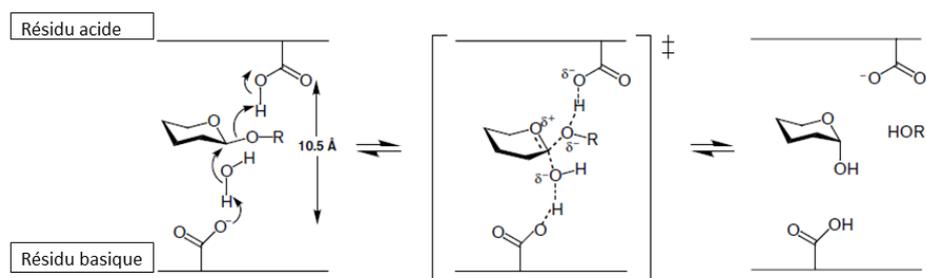


Figure 14 : Schéma du mécanisme d'inversion par une β -glucosidase. D'après (Rye and Withers, 2000).

Dans le cas de la rétention de configuration, la poche catalytique des enzymes est étroite avec une distance entre les deux résidus catalytiques de 4,5 à 5,5 Å (Davies and Henrissat, 1995; McCarter and Withers, 1994). Le mécanisme de rétention se fait en deux étapes successives. La première est nommée glycosylation de l'enzyme. Il s'agit d'une protonation de l'oxygène de la liaison glycosidique par le résidu catalytique acide/base qui joue ici le rôle d'acide. En parallèle, le résidu catalytique nucléophile attaque le carbone anomérique. Un intermédiaire covalent glycosyle-enzyme est alors formé et l'aglycone est libéré. Lors de cette première étape, il y a une inversion de la configuration du carbone anomérique entre le substrat et l'intermédiaire covalent glycosyle-enzyme. La deuxième étape est une déglycosylation de l'enzyme. Le résidu acide/base a un rôle de base en prenant un proton à la molécule d'eau. Cette molécule déprotonée hydrolyse la liaison de l'intermédiaire glycosyle-enzyme. Le nucléophile attaque alors le carbone anomérique. Lorsque l'accepteur n'est pas une molécule d'eau mais une molécule possédant une fonction alcool ($R'-OH$), comme un sucre, la réaction se poursuit en transglycosylation, entraînant la synthèse d'une liaison glycosidique. Dans les deux cas le produit a la même stéréochimie que le substrat (Figure 15).

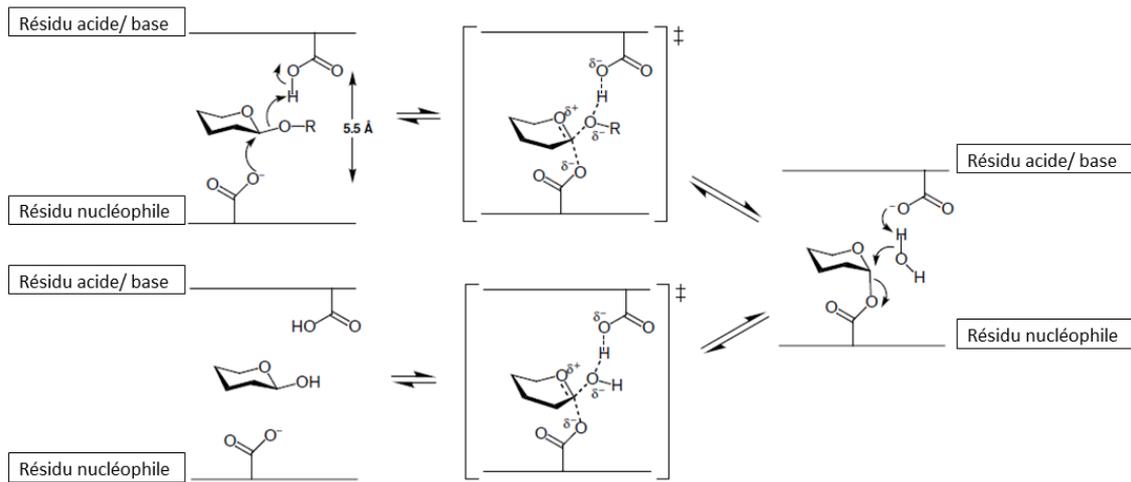


Figure 15 : Schéma du mécanisme de rétention par une β -glucosidase. D'après (Rye and Withers, 2000).

4. Cellulases

I. Généralités sur les cellulases

Trois classes d'enzymes interviennent dans l'hydrolyse complète de la cellulose. Les endo- β -(1,4)-glucanases hydrolysent la cellulose dans des zones amorphes et libèrent des glucooligosaccharides dont du cellobiose. Les exo- β -(1,4)-glucanases vont hydrolyser les zones cristallines. Enfin, les β -glucosidases clivent le cellobiose produit par les glucanases en unités simples de glucose (Figure 16). Ces types d'enzymes hydrolysent la cellulose de manière synergique en créant de nouveaux sites accessibles aux autres enzymes et en évitant l'accumulation des inhibiteurs (Beldman et al., 1988; Johnson et al., 1982; Woodward et al., 1988). En effet, la β -glucosidase ne peut pas agir sur la cellulose directement, néanmoins elle est importante car le cellobiose est un inhibiteur compétitif des cellulases et la β -glucosidase réduit cette inhibition en hydrolysant le cellobiose en glucose (Sternberg et al., 1977). Par ailleurs, les cellulases libèrent le matériel amorphe autour des fibrilles cristallines en premier puis dégradent ensuite les fibrilles pour découvrir du matériel amorphe adjacent (Ganner et al 2012).

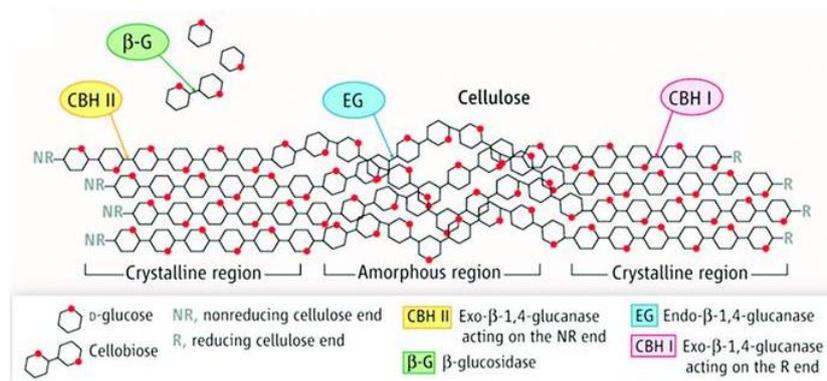


Figure 16 : Enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose.
D'après (Duttaa and Wu, 2014).

II. Structure des cellulases

Une endo- β -(1,4)-glucanase (ou endocellulase, EC 3.2.1.4) hydrolyse les liaisons glycosidiques entre deux résidus D-glucoses en interne de la cellulose (Lombard et al., 2014) (Tableau 5). Certaines endocellulases sont processives, c'est-à-dire qu'elles vont hydrolyser de manière successive les sucres tout le long de leur substrat. Ces enzymes peuvent avoir un mécanisme de rétention de la configuration du carbone anomérique ou un mécanisme d'inversion. Les deux structures majoritairement décrites pour ces enzymes présentent un repliement en tonneau (β/α)₈ ou en (α/α)₆. Le tonneau (β/α)₈ est une structure courante, elle correspond à une alternance de feuillets β formant un tonneau et d'hélices α telles que les hélices entourent le tonneau. Leur site actif est ouvert puisqu'elles sont capables de se lier à l'intérieur de longues molécules de cellulose (Juy et al., 1992). Les deux acides aminés catalytiques sont deux acides glutamiques ou deux acides aspartiques ou un acide aspartique et un acide glutamique (Lombard et al., 2014).

Tableau 5 : Classification des enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose.
D'après (Lombard et al., 2014) mis à jour le 24/06/17).

type d'enzyme	familles de GHs
endoglucanase	GH5, GH6, GH8, GH9, GH12, GH44, GH45, GH51, GH74, GH124
cellobiohydrolase	GH6, GH7, GH9, GH48 et GH74
β -glucosidase	GH1, GH3, GH9, GH17, GH30, GH116

D'autre part, une cellobiohydrolase (aussi appelée exo- β -(1,4)-glucanase ou CBH, EC 3.2.1.91) libère du cellobiose à partir des extrémités non réductrices ou des extrémités réductrices du polymère de cellulose selon la spécificité de l'enzyme (Lyman et al., 1995)

(Tableau 5). Ces enzymes suivent un mécanisme de rétention de la configuration du carbone anomérique, excepté les cellobiohydrolases GH7. Les CBHs ont un repliement en $(\alpha/\alpha)_6$ ou en « β -jelly roll » (ou gâteau roulé en français) ou en hélice β à 7 pales. Le β -jelly roll, également répandu, correspond à des paires de feuillettes β associées de manière antiparallèle par des liaisons hydrogènes. Les acides aminés catalytiques sont un acide aspartique et/ ou un acide glutamique (Lombard et al., 2014).

Par ailleurs, une β -glucosidase (EC 3.2.1.21) hydrolyse des glucooligosaccharides solubles en libérant un glucose (Bornscheuer et al., 2014) (Tableau 5). Ces enzymes ont un mécanisme de rétention (sauf pour celles classées dans la famille GH9). Les deux structures majoritairement retrouvées sont un repliement en tonneau $(\beta/\alpha)_8$ ou en $(\alpha/\alpha)_6$. On retrouve un acide glutamique ou un acide aspartique pour les acides aminés catalytiques (Lombard et al., 2014). Les cellobiohydrolases et les β -glucosidases qui sont des exocellulases ont leur site actif dans un tunnel, en accord avec leur activité processive, où elles clivent séquentiellement les résidus de cellobiose provenant d'une molécule de cellulose (Rouvinen et al., 1990).

5. Xylanases

1. Généralités sur les xylanases

Les endo- β -(1,4)-D-xylanases (EC 3.2.1.8) ou plus simplement xylanases sont des enzymes qui hydrolysent des liaisons β -(1,4) entre deux résidus D-xylopyranosyles de la chaîne principale des xylanes. Leur produit d'hydrolyse est majoritairement un xylooligosaccharide à très courte chaîne comme le xylotriose, le xylobiose et le xylose (Beaugrand et al., 2004; Biely et al., 1997; Ratanakhanokchai et al., 2013; Torronen et al., 1994). Ces enzymes ont un domaine catalytique, souvent lié à un ou plusieurs autre(s) domaine(s) nommé(s) domaine(s) non catalytique(s). Par exemple, dans les xylanases caractérisées de la famille GH11, 80 % des séquences contiennent un seul domaine catalytique alors que 10 % ont un domaine catalytique et un CBM de la famille 1 et 0,7 % des séquences ont deux domaines catalytiques GH11 ("Family: Glyco_hydro-11 (PF00457)," 2017).

II. Structure des xylanases

Les xylanases répertoriées dans la base de données CAZy sont présentes majoritairement dans les familles GH10 et GH11 mais sont également présentes dans les familles GH5, GH8, GH30, GH43, GH51, GH98 et GH141 (mis à jour le 06/10/17, (Lombard et al., 2014)). Chaque famille a une structure spécifique (Henrissat and Davies, 1997). Les xylanases des familles GH10 et GH11 vont être davantage décrites.

La famille GH10 est composée d'enzymes présentant un poids moléculaire supérieur à 30 kDa, un point isoélectrique acide et un repliement structural du type tonneau (β/α)₈ (Figure 17A) (Biely et al., 1997). Le site de liaison au substrat de cette famille est une fente moins profonde que pour le site de liaison des xylanases de la famille GH11. Ces enzymes ont tendance à former des oligosaccharides de faible DP (Jeffries, 1996).

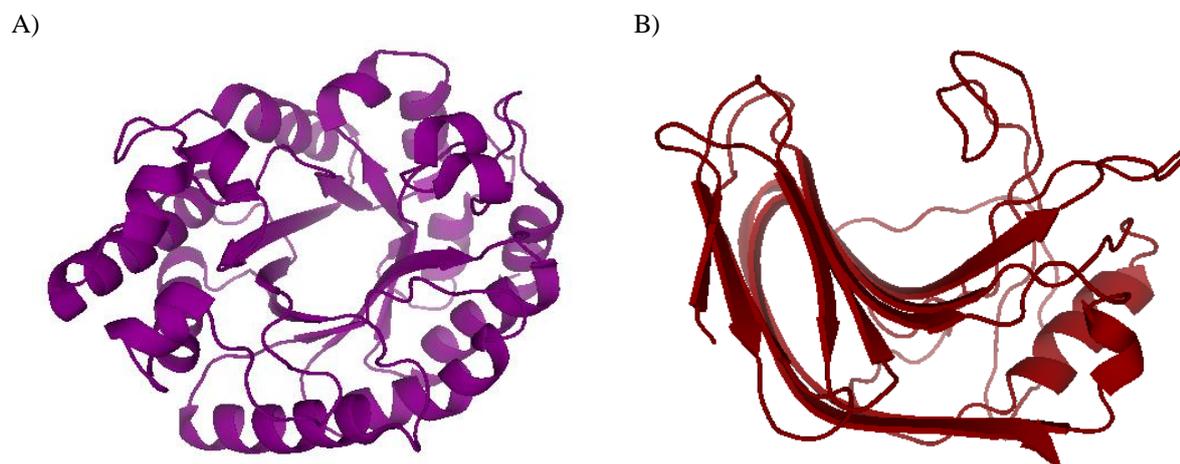


Figure 17 : Structures cristallographiques des xylanases.

A) Enzymes de la famille GH10 (xylanase de *Thermoascus aurantiacus* (Vardakou et al., 2005), code PDB 2BNJ). B) Enzymes de la famille GH11 (xylanase de *T. reesei* (Vardakou et al., 2008), code PDB 2C1F).

Les enzymes présentes dans la famille 11 sont plus petites (inférieures à 30 kDa), avec un point isoélectrique basique et une structure tridimensionnelle présentant un repliement de type β -jelly roll avec de nombreux feuillettes. La famille GH11 est exclusivement composée de xylanases. Cette famille est davantage décrite car une xylanase de cette famille est utilisée dans cette thèse. La structure tridimensionnelle est comparable à une main droite partiellement fermée (Figure 17B) (Torrönen et al., 1994; Wakarchuk et al., 1994). Cette architecture correspond à deux feuillettes β antiparallèles nommés A et B qui forment les doigts (Figure 18). La partie torsadée du feuillet β B et l'hélice α correspondent à la paume. On remarque aussi la présence d'un pouce mobile au-dessus du site catalytique et complétant ce

dernier au cours de l'hydrolyse (Muilu et al., 1998; Sapag et al., 2002; Torronen et al., 1994). Le mouvement du pouce modifie la topologie du site actif et par conséquent l'activité enzymatique (Muilu et al., 1998). Lors de la phase initiale du mécanisme de la réaction proposé, la boucle du pouce serait dans une configuration ouverte (Cortés et al., 2005; Paës et al., 2012b, 2007; Pollet et al., 2009). Après l'entrée du substrat dans la fente, celle-ci serait fermée par le pouce, favorisant des interactions optimales pour le positionnement du substrat dans le site actif. Après hydrolyse, le pouce reviendrait dans sa configuration initiale, ouvrant alors le site catalytique et permettant l'expulsion du produit.

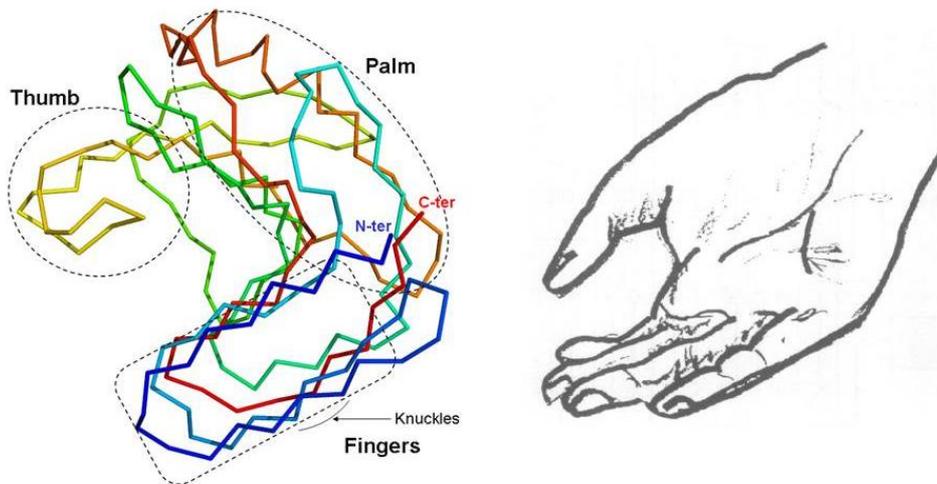


Figure 18 : Structure tridimensionnelle d'une xylanase annotée avec les éléments de ressemblance d'une main droite. D'après (Song et al., 2012; Torronen et al., 1994).

Les GH11 ont un domaine catalytique contenant des feuillettes β plissés, formant un creux de deux couches entourant le site catalytique (Jeffries, 1996). Ces enzymes hydrolysent plus facilement des xylandes débranchés avec au moins trois résidus de xylose non substitués consécutifs (Biely et al., 1997).

Les différences entre les activités catalytiques des xylanases des familles 10 et 11 peuvent être attribuées aux différences des structures tridimensionnelles. Les xylanases des familles GH10 et GH11 présentent un mécanisme catalytique conservant la configuration du carbone anomérique. L'acide aminé catalytique ayant le rôle de nucléophile et le résidu catalytique ayant le rôle d'acide/base sont des acides glutamiques (Withers, 2015). La majorité des enzymes classées dans la famille GH11 possède sept sous-sites (Bray and Clarke, 1992; Dodd and Cann, 2009; Vršanská et al., 1982). Les résidus catalytiques présents dans la

fente des enzymes de la famille GH11 accommodent une chaîne de cinq à sept résidus de xylopyranosyle.

III. Etude des xylanases

Différents substrats sont classiquement utilisés pour caractériser les xylanases. Il s'agit de substrats solubles (xylooligosaccharides, substrats chromogéniques ou xylanes purifiés) ou de substrats complexes, plus proches du substrat retrouvé dans la Nature. Les xylooligosaccharides sont les premiers substrats choisis pour étudier ce type d'enzyme (Biely et al., 1981). D'autres substrats existent comme des substrats non naturels, appelés substrats chromogéniques tels que des xylooligosaccharides liés avec le groupe partant *p*NP (4-nitrophényle). Ils permettent une détection facile de l'activité d'une xylanase (Matte and Forsberg, 1992). Des substrats purifiés tels que les xylanes de mélèze, de glumes d'avoine (Yang et al., 1989), de bouleau (Elegir et al., 1994; Irwin et al., 1994), de hêtre (Zverlov et al., 1996) ou encore de seigle (Pell et al., 2004) sont également utilisés. La composition précise a été référencée pour les xylanes cités dans la suite de ce manuscrit (Tableau 6). L'acide glucuronique a également été dosé pour le xylane de hêtre, correspondant à 13 % de ce substrat (Megazyme, n.d.).

Tableau 6 : Composition de divers xylanes.
X : information non donnée.

	xylose	arabinose	glucose	autres sucres	référence
xylane de glumes d'avoine	84	9	7	1	(Hespell and Cotta, 1995)
	81,3	9,3	9,3	X	(Fan et al., 2009a)
	93	6	X	X	(McCartney et al., 2005)
arabinoxylane de blé	63,9	34	X	2,1	(Fan et al., 2009a)
xylane de bouleau	98	X	4	X	(Hespell and Cotta, 1995)
xylane de hêtre	97	X	X	X	(Hespell and Cotta, 1995)
	81,3	X	X	5,7	(Megazyme, n.d.)

Des études ont été menées sur des xylanes peu substitués tels que les xylanes de glumes d'avoine ou de bouleau (environ 9 % d'arabinose pour le xylane de glumes d'avoine) (Czjzek et al., 2001; Fan et al., 2009a; Hespell and Cotta, 1995). Cependant, d'autres équipes ont travaillé avec des xylanes très substitués comme les arabinoxylanes extraits du blé (34 % d'arabinose) ou le xylane de seigle (Czjzek et al., 2001; Fan et al., 2009a)..

Par exemple, une équipe a étudié la dégradation d'arabinoxylanes de farine de blé (purifiés et vendus par Megazyme, la farine de blé pouvant provenir de l'endosperme seul ou de

l'ensemble du grain de blé) par une xylanase. Cette xylanase a été purifiée à partir de farine de blé (*Triticum aestivum*). L'analyse par HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange coupled with Pulsed Amperometric Detection) des produits relargués a permis de montrer que 0,05 mg.L⁻¹ d'arabinose et 0,09 mg.L⁻¹ de xylose ont été produits par l'enzyme en 24 heures (Cleemput et al., 1997). Un autre projet était basé sur la comparaison de deux xylanases, une de la famille GH10 (Connerton et al., 1999) et l'autre de la famille GH11 (G. W. Harris et al., 1997) sur des arabinoxylanes solubles ou insolubles extraits du son de blé (Beaugrand et al., 2004). L'analyse des sucres relargués (xylose et arabinose) a été réalisée par HPAEC-PAD. Après une heure de réaction, la xylanase GH10 a libéré environ 14 % de ces sucres alors que l'enzyme de la famille GH11 est plus efficace car elle en a clivé 46 %. Ces études montrent la possibilité de détecter l'activité d'une xylanase même lorsque les xylanes sont substitués.

En parallèle, des projets existent sur l'activité d'une xylanase sur des substrats complexes c'est-à-dire qui ne contiennent pas seulement la cible de l'enzyme (soit un polymère de xylose). Par exemple, une étude a permis de quantifier l'hydrolyse du son de blé (broyé et hydraté) par une xylanase initialement produite par *Thermobacillus xylanilyticus* (G. W. Harris et al., 1997) et qui appartient à la famille GH11 (Lequart et al., 1999). La quantité de sucres détectés après hydrolyse a été déterminée par HPAEC-PAD. La quantité de xylose et d'arabinose est égale à 69 % et 20 % respectivement (Lequart et al., 1999). Le son de blé a également été utilisé sous forme désamidonnée, hydrolysé par la même xylanase (Benamrouche et al., 2002). De plus, certains groupes ont étudié l'activité d'une xylanase sur de la paille de blé broyée puis hydratée avant hydrolyse. Par exemple, une équipe a quantifié par HPAEC-PAD les sucres obtenus après l'utilisation de la xylanase de *Thermobacillus xylanilyticus* (G. W. Harris et al., 1997) et qui appartient à la famille GH11 (Lequart et al., 1999). Environ 65 % des produits détectés sont du xylose et 13 % sont de l'arabinose (Benamrouche et al., 2002). En parallèle, une étude a été publiée dans laquelle la paille de blé prétraitée hydrothermiquement a été hydrolysée par la xylanase XYL de *Thermoascus aurantiacus* (GH10) (Zhang et al., 2011a). Après 24 heures de réaction, le degré d'hydrolyse des xylanes, c'est-à-dire la somme des produits quantifiés après hydrolyse, a atteint une valeur de 9,8 %. Le produit majoritaire obtenu après hydrolyse est le xylobiose (7,2 % de la paille de blé). D'autres produits ont été relargués, tels que 1,6 % de xylose et 1 % de xytotriose mais la quantité de xylo-tetraose était trop faible pour être quantifiée. La paille de blé prétraitée hydrothermiquement a également été utilisée pour comparer la xylanase de *Thermoascus*

aurantiacus (*TaXyn*) de la famille GH10 et la xylanase produite par *Nonomuraea flexuosa* (*NfXyn*) de la famille GH11 (Zhang et al., 2011b). L'hydrolyse de cette paille a été réalisée pour chacune de ces enzymes pendant 48 heures et analysée par détection des sucres réducteurs par la méthode DNS (acide 3,5 dinitrosalicylique) puis par HPAEC-PAD. Les deux enzymes produisent des quantités équivalentes en glucose ($0,04 \text{ g.L}^{-1}$). De plus, *TaXyn* produit $0,04 \text{ g.L}^{-1}$ de xylose alors que *NfXyn* en produit $0,01 \text{ g.L}^{-1}$. La quantité de xylobiose est également supérieure pour *TaXyn* que pour *NfXyn*, égale à $0,10 \text{ g.L}^{-1}$ et $0,06 \text{ g.L}^{-1}$ respectivement. Ces études montrent qu'il est possible de travailler sur un substrat complexe notamment s'il est broyé ou prétraité mais la plupart des études sont réalisées sur des xylanes extraits de la biomasse lignocellulosique.

6. Xylosidase

I. Généralités sur les xylosidases

Les enzymes β -(1,4)-xylosidases (EC 3.2.1.37), aussi appelées β -xylosidases, libèrent des monomères de xylose à partir de l'extrémité non réductrice des xylo-oligosaccharides (Lee and Zeikus, 1993). Les xylosidases sont retrouvées dans les familles GH1, GH3, GH30, GH31, GH39, GH43, GH51, GH52, GH54, GH116 and GH120 (mis à jour le 31/01/17, (Lombard et al., 2014)). La majorité des xylosidases est classée dans la famille GH43, c'est pourquoi cette famille va être plus particulièrement décrite.

II. Structure des xylosidases

Deux domaines sont retrouvés dans les β -xylosidases de la famille GH43 : un domaine en hélice β au niveau N-terminal et un domaine en sandwich β au niveau C-terminal (Brunzelle et al., 2008; Br ux et al., 2006; Nurizzo et al., 2002). Le repliement en hélice est constitué de cinq pales (composées de quatre brins β antiparallèles avec une topologie en W) distribuées de manière égale autour d'un cercle. Le sandwich β est composé de deux feuillets de cinq brins β antiparallèles (Br ux et al., 2006) ce qui signifie que les feuillets sont tête bêche. La structure complète est plissée avec les chaînes latérales alternativement au-dessus et au-dessous. Ce sandwich β va fermer une partie du site actif pour former une poche (Brunzelle et al., 2008).

Les résidus catalytiques sont situés dans un site actif peu profond au centre du domaine en hélice β qui est proche d'un résidu phénylalanine (inclu dans le domaine sandwich). Les xylosidases ont au moins deux sous-sites pour lier deux xyloses et trois résidus catalytiques : un acide aspartique (résidu basique), un acide glutamique (résidu acide) et un résidu dont le rôle est moins connu (Lombard et al., 2014; Van Doorslaer et al., 1985). Le résidu basique est situé entre deux prolines conservées, dont la position permet d'activer une molécule d'eau favorisant l'attaque du carbone anomérique et entraînant ainsi une inversion de la configuration de ce carbone. Le résidu catalytique acide pourra alors protoner l'aglycon partant (Brüx et al., 2006). Le troisième résidu serait responsable de la modulation du pKa du résidu catalytique acide. En effet, il permettrait de garder le résidu acide protonné afin qu'il agisse en tant qu'acide pour la réaction (Brüx et al., 2006; Nurizzo et al., 2002). Un autre rôle attribué à ce résidu est l'orientation de l'acide catalytique par rapport au substrat (Brüx et al., 2006; Nurizzo et al., 2002). De plus, ce troisième résidu catalytique a un rôle crucial dans la liaison du substrat *via* le O₂ du glycon ce qui permet la stabilisation de l'état de transition. Ces propriétés expliquent la conservation de ce résidu dans les GHs ayant un domaine hélice β à cinq pales (Brüx et al., 2006). Les GH43 suivent un mécanisme d'inversion de la configuration du carbone anomérique (Braun et al., 1993; Kersters-Hilderson et al., 1976). Toutefois, la plupart des β -xylosidases suivent un mécanisme de rétention.

7. Les principales enzymes débranchantes

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1. 2. II, les xylanes ont des compositions variables d'une espèce à l'autre avec des substitutions nombreuses et variées. En conséquence, l'hydrolyse complète de ce substrat nécessite une grande variété d'enzymes agissant coopérativement ce qui signifie que la liaison d'un premier ligand sur son site augmente l'affinité d'un autre ligand sur un autre site. Les xylanases et les β -xylosidases agissent sur la chaîne principale (Biely, 1985a; Dekker, 1983). Afin que les xylanases aient accès à la totalité de la chaîne principale, d'autres classes d'enzymes vont intervenir pour débrancher les substitutions, notamment les α -D-glucuronidases (E.C. 3.2.1.139), α -L-arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55), acétyl xylane estérases (E.C. 3.1.1.72) et féruloyle estérases (E.C. 3.1.1.73) (Biely, 1985b; Subramaniyan et al., 2002) (Figure 19). Des monomères sont obtenus tels que des acides glucuroniques, des arabinofuranoses et des résidus acétyles. Des féruloyle estérases pourront ensuite cliver les liaisons acide férulique-

arabinofuranose et les β -D-xylosidases hydrolyseront les xylooligosaccharides à l'extrémité non réductrice produisant des résidus de xylose (Bachmann and Mccarthy, 1991; Bartolomé et al., 1997; Saha, 2003; Shallom-Shezifi et al., 2005).

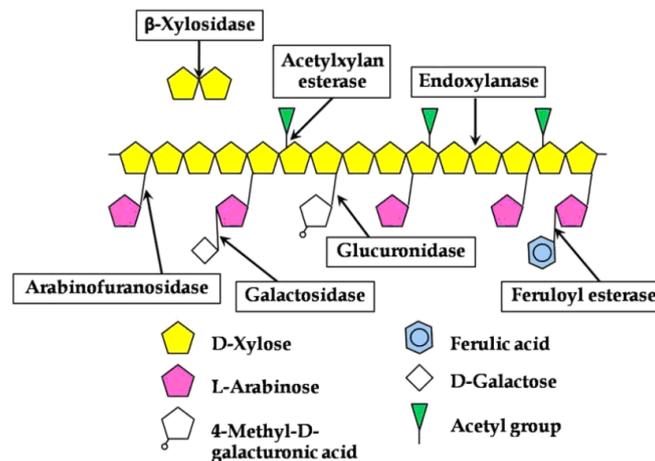


Figure 19 : Enzymes impliquées dans la dégradation des xylanes. D'après (Ratanakhanokchai et al., 2013).

Les α -L-arabinofuranosidases sont des enzymes qui catalysent spécifiquement l'hydrolyse des résidus α -L-(1,2)-, α -L-(1,3)- et α -L-(1,5)-arabinofuranosyles à l'extrémité non réductrice dans les oligosaccharides et les polysaccharides hémicellulosiques (Saha, 2000). Ces enzymes sont spécifiques d'une liaison 1,2, 1,3 ou 1,5 ou peuvent préférer des doubles substitutions 1,2 et 1,3. Les α -L-arabinofuranosidases sont classées dans la base de données CAZy dans les familles 2, 3, 43, 51, 54, 62, 127, 137 et 142 des GHs ((Lombard et al., 2014) mis à jour le 13/06/2017). Il existe plusieurs structures possibles pour les α -L-arabinofuranosidases comme la structure en tonneau $(\beta/\alpha)_8$ ou $(\alpha/\alpha)_6$ ou encore une hélice β à cinq pales. Le mécanisme d'action est en majorité un mécanisme de rétention de la configuration du carbone anomérique. Selon la spécificité de substrat, les α -L-arabinofuranosidases ont été classées en trois groupes : les enzymes de type A sont actives sur les arabinooligosaccharides et les *p*NP-glycosides synthétiques, les enzymes de type B catalysent l'hydrolyse des arabinooligosaccharides, des *p*NP-glycosides et des polymères branchés alors que les enzymes de type C sont seulement actives sur les liaisons entre un arabinose et un xylose dans les arabinoxylanes et inactives sur les *p*NP-glycosides.

Les α -D-glucuronidases clivent un acide uronique, substitution d'une hémicellulose (Gilbert, 2010) (par exemple un α -D-acide glucuronique substitue un xylose en position 2 ou 3 dans un glucuronoxylane (Aspinall and Mahomed, 1954; Sun et al., 1996)). Ces enzymes sont

classées dans la base de données CAZy dans les familles GH4, GH67 et GH115 ((Lombard et al., 2014) mis à jour le 05/10/17). Les enzymes de la famille GH4 ont un mécanisme de rétention de la configuration du carbone anomérique alors que les autres suivent un mécanisme d'inversion de sa configuration. A l'heure actuelle, il n'y a pas de consensus sur la structure tridimensionnelle de ces enzymes et les acides aminés impliqués dans la réaction. Un acide aspartique ou un acide glutamique ont le rôle d'acides aminés catalytiques pour une partie des α -D-glucuronidases.

D'autres enzymes peuvent agir sur des substitutions des hémicelluloses comme les α -galactosidases (EC 3.2.1.22) (de Vries and Visser, 2001). Ces enzymes clivent les D-galactoses. Elles sont classées dans les GH4, GH10, GH27, GH31, GH36, GH57, GH95 et GH97. Ces enzymes suivent un mécanisme de rétention de la configuration du carbone anomérique (sauf pour celles classées dans les GHs 95 et 97). La structure tridimensionnelle retrouvée en majorité est un tonneau (β/α)₈. Les acides aminés catalytiques correspondent à un acide glutamique et/ ou un acide aspartique et/ ou une asparagine (Lombard et al., 2014) mis à jour le 27/06/17).

Les féruloyle estérases et les acétyle xylane estérases, regroupées sous le terme de carbohydrate estérases suppriment certains esters sur des polysaccharides et facilitent l'action des GHs sur des polysaccharides. Ces enzymes, qui ne sont pas des GHs, sont davantage décrites dans la partie 8 ci-dessous car elles seront utilisées dans cette thèse.

8. Les carbohydrate estérases

Les hémicelluloses sont en partie substituées par des acides acétiques ou des phénols estérifiés ce qui rend leur dégradation difficile (Pan et al., 2006). Les CEs (EC 3.1.1.1) sont des enzymes qui catalysent la dé-O ou dé-N-acylation de saccharides substitués (Lombard et al., 2014). Ces enzymes sont produites par des bactéries ou des champignons (Williamson et al., 1998). Il existe actuellement 16 familles de CEs selon la base de données CAZy (mis à jour le 15/09/2017, (Lombard et al., 2014)). Ces enzymes ont été identifiées dans des arsenaux d'enzymes microbiennes (de Vries et al., 1997; Guais et al., 2008). Les CEs sont divisées en plusieurs groupes, la majorité des enzymes étant des acétyle xylane estérases (EC 3.1.1.72) et des féruloyle estérases (EC 3.1.1.73).

I. Féruloyle estérase

Les féruloyle estérase (FAEs) (EC 3.1.1.73) hydrolysent les liaisons esters entre les substitutions arabinose et acide férulique. Ces enzymes permettent un accès facilité à la chaîne principale du polysaccharide pour d'autres enzymes lignocellulolytiques (de Vries and Visser, 2001). Les FAEs sont toutes classées dans la famille CE1, avec un repliement en sandwich ($\alpha/\beta/\alpha$) (Lombard et al., 2014). Ces enzymes ont une triade catalytique (soit trois résidus catalytiques) importante pour l'hydrolyse, contenant une sérine, une histidine et un acide aspartique (parfois remplacé par un acide glutamique) (Prates et al., 2001).

II. Acétyle xylane estérase

Les acétyle xylane estérases (AXEs) (EC 3.1.1.72) hydrolysent spécifiquement les liaisons esters des groupes acétyles en position 2 et/ ou 3 des résidus de xylose des xylanes (Dupont et al., 1996). Elles sont retrouvées dans les familles CE1, CE2, CE3, CE4, CE5, CE6, CE7, CE12 et CE16. Ces enzymes ont en majorité une structure en sandwich en ($\alpha/\beta/\alpha$) même si une partie des AXEs forment un tonneau (β/α)₇ (Lombard et al., 2014). Dans la majorité de ces estérases, la triade catalytique est composée d'une sérine, d'une histidine et d'un acide aspartique. Parfois, un glutamate a le rôle de l'acide aspartique. Certaines enzymes catalysent une déacétylation par seulement deux résidus catalytiques qui sont une sérine et une histidine (Biely, 2012). Les AXEs suivent un des deux mécanismes possibles (une rétention de la configuration du carbone anomérique ou une inversion de sa configuration) comme les GHs.

9. Les Carbohydre-Binding Modules

I. Généralités sur les CBMs

En général, les hydrolases microbiennes qui dégradent la paroi cellulaire végétale sont des protéines modulaires dans lesquelles le module catalytique est associé à un ou plusieurs domaine(s) non catalytique(s). Il peut s'agir d'un Carbohydre-Binding Module (CBM) (Black et al., 1997; Irwin et al., 1994; Millward-Sadler et al., 1995), d'un domaine dockérine (impliqué dans un cellulosome, expliqué dans le chapitre 1. 11. II) (Hayashi et al., 1997), d'un domaine thermostabilisant (Lee et al., 1993; Winterhalter et al., 1995) ou d'un domaine de

fonction encore inconnue. Les domaines non catalytiques peuvent se replier et fonctionner indépendamment du domaine catalytique (Black et al., 1996; Millward-Sadler et al., 1994)

En général les CBMs sont annexés à une GH qui dégrade des polysaccharides de la paroi végétale de plantes (Sun et al., 1998), la cellulose cristalline (Knowles et al., 1987) ou des substrats complexes (Black et al., 1996). Ils peuvent être associés à une cellulase (Gilkes et al., 1988), une xylanase (Kellett et al., 1990), une acétyl xylane estérase (Margolles-Clark et al., 1996), une arabinofuranosidase (Kellett et al., 1990), une β -glucosidase (Lymar et al., 1995) ou encore une pectate lyase (Brown et al., 2001; Mckie et al., 2001). Les CBMs sont également retrouvés dans d'autres composés comme dans un cytochrome (Yoshida et al., 2005) ou isolés c'est-à-dire sans domaine catalytique (Barral et al., 2005; Vaaje-Kolstad et al., 2005). Ces protéines repliées de manière autonome et fonctionnelle ont dans un premier temps été nommées CBDs (Cellulose Binding Domain). En effet, les premiers exemples sont des petits polypeptides stables ayant une activité de liaison à la cellulose cristalline et initialement associés à une cellulase (Gilkes et al., 1988; Ong et al., 1989; Tomme et al., 1988; Van Tilbeurgh et al., 1986). L'appellation CBD a ensuite été remplacée par CBM car il existe également des modules ayant une spécificité pour bien d'autres sucres que la cellulose. En effet, il existe des CBMs reconnaissant spécifiquement la cellulose cristalline, la cellulose non cristalline, la chitine (il s'agit d'un polymère de N-acétyl glucosamine liée en β -(1,4) dont l'unité ressemble au glucose), les β -glucanes à liaisons multiples, les β -(1,3)-glucanes, des mannanes, des glucomannanes (avec ou sans substitutions) ou encore de l'amidon (Abou Hachem et al., 2000; Bolam et al., 2001; Boraston et al., 2003, 2001; Ferreira et al., 1990; Freelove et al., 2001; Simpson et al., 2000).

Les CBMs ont été classés dans des familles selon la similarité de leur séquence en acides aminés (Coutinho et al., 1992). Certains CBMs peuvent reconnaître deux substrats, par exemple la cellulose cristalline et la cellulose amorphe mais avec des affinités différentes (Ong et al., 1993). La diversité des CBMs reflète l'hétérogénéité dans la structure de la cellulose et des hémicelluloses (Tomme et al., 1996). Par exemple, les xylanases ne sont pas seulement associées à des CBMs spécifiques des xylanes, il existe des associations avec des CBMs ciblant la cellulose (Creagh et al., 1996; Fukuda et al., 2010). Ceci pourrait permettre de diriger les xylanases vers les régions difficilement accessibles des xylanes. Cependant, la majorité des analyses de l'importance fonctionnelle du CBM correspond à l'exploration de leur rôle *in vitro* contre des substrats purifiés ou des composites simples où l'intégrité de la

paroi cellulaire a été perturbée (Black et al., 1996; Bolam et al., 2001, 1998). La région de connection entre le module catalytique et le CBM, appelée linker, n'a pas une séquence strictement conservée mais des séries de résidus de sérine, thréonine, proline et glycine sont retrouvées (Abuja et al., 1988; Langsford et al., 1987; Tomme et al., 1988).

De nombreux CBMs sont des métalloprotéines ; dans la plupart des cas, ces ions métalliques seraient structurels. La présence de cations influence les propriétés du CBMs en augmentant son affinité avec le substrat (Reinikainen et al., 1995). En effet, pour certains CBMs la reconnaissance du ligand semble calcium-dépendante (Bolam et al., 2004; Jamal-Talabani et al., 2004; Tormo et al., 1996).

II. Structure des CBMs

Actuellement 81 familles de CBMs sont recensées (mis à jour le 15/09/2017, (Lombard et al., 2014)). Les CBMs sont aussi regroupés selon leur type (A, B ou C) d'après des études structurales et biochimiques (Boraston et al., 2004).

a) Classement des CBMs

Les CBMs de type A sont capables de se lier préférentiellement à la cellulose très cristalline et insoluble et/ ou à la chitine. Dans une étude de McLean et collaborateurs, plusieurs CBMs de type A ont la même affinité sur de la cellulose amorphe (PASC ou phosphoric acid-swollen cellulose) et de la cellulose cristalline (BMCC ou bacterial microcrystalline cellulose) tel que le CBM2a de la xylanase 10A de *Cellulomonas fimi* (*C. fimi*) (McLean et al., 2002). Il a également été démontré que le CBM3a provenant de la protéine scaffold CipA du cellulosome de *Clostridium thermocellum* (*C.thermocellum*) reconnaissait du xyloglucane (en solution ou dans une paroi cellulaire végétale) en plus de la cellulose cristalline, l'affinité pour le xyloglucane étant entre cinquante et cent fois plus faible que l'affinité pour la cellulose cristalline. Cependant, ce CBM ne se lie pas aux oligosaccharides dérivés du xyloglucane. Ceci suggère que la protéine identifie une conformation du xyloglucane qui est absente dans les oligosaccharides (Hernandez-Gomez et al., 2015).

La résolution de la structure pour une trentaine de CBMs de type A révèle une surface plane constituée de résidus aromatiques très fortement conservés (tryptophane, tyrosine) ayant des interactions hydrophobes de stacking par complémentarité avec les surfaces planes et non

polaires de cristaux de cellulose ou de chitine (Figure 20A) (Bray et al., 1996; Din et al., 1994b; Nagy et al., 1998). En effet, les acides aminés aromatiques de ces CBMs forment des interactions (notamment des interactions de van der Waals) avec les cycles de pyranose exposés. Ceux-ci se situent au niveau de la surface 110 hydrophobe des microfibrilles cristallines de cellulose (Mattinen et al., 1997; Reinikainen et al., 1995, 1992; Tormo et al., 1996). Ceci a notamment été mis en évidence pour le CBM1 de la cellobiohydrolase Cel7A produite par *T. reesei* et le CBM3a de CipA de *C. thermocellum* (Lehtio et al., 2003). Ces CBMs sont qualifiés de CBMs plans (Figure 21) (Gilbert et al., 2013). Certaines équipes ont pu mettre en évidence l'importance des tryptophanes dans la reconnaissance du ligand en étudiant des CBMs mutés. Ainsi, Poole et ses confrères ont montré que les tryptophanes 12, 34, et 38 du CBM de la xylanase A de *Pseudomonas fluorescens*, de la sous-espèce *cellulosa*, jouent un rôle essentiel dans la liaison avec la cellulose (Poole et al., 1993). Hernandez-Gomez et collaborateurs ont muté en alanine les résidus impliqués dans la surface hydrophobe du CBM3a (comportant les résidus Asp56, His57, Tyr67, Arg112 et Trp118). Ceci a anéanti la reconnaissance des deux ligands (la cellulose cristalline et le xyloglucane), ce qui indique que le même site de liaison reconnaît les deux polysaccharides. De plus, les mutants de la protéine avec seulement un des cinq résidus muté gardent tous la reconnaissance de la cellulose (Hernandez-Gomez et al., 2015). Par ailleurs, il est possible que les chaînes latérales des xyloses dans le xyloglucane, qui ont des interactions avec la surface des CBMs de type A, contribuent à la liaison avec le ligand. En effet, la reconnaissance des chaînes latérales pourrait expliquer pourquoi les β -glucanes à liaisons multiples ne se lient pas aux CBMs de type A (Hernandez-Gomez et al., 2015).

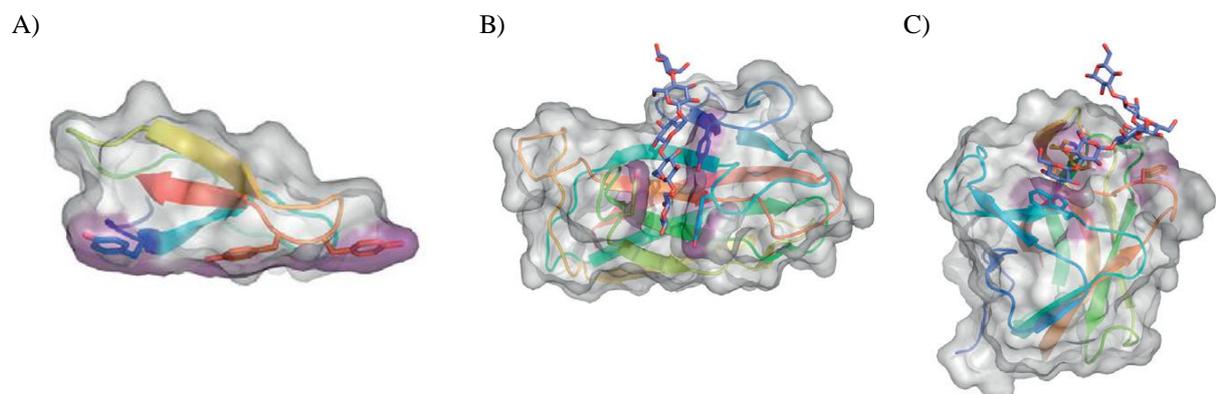


Figure 20 : Représentation des sites de liaison des trois types de CBMs.
 A) Le CBM de type A : structure RMN du CBM1 de *T. reesei* (code PDB 1CBH). B) Le CBM de type B : structure cristallographique du CBM4 de *C. fimi* en complexe avec du cellopentaose (code PDB 1GU3). C) Le CBM de type C : structure cristallographique du CBM6 de *Bacillus halodurans* en complexe avec du laminarihexaose (code PDB 1W9W). Les chaînes latérales des acides aminés des CBMs impliquées dans la reconnaissance du substrat sont en bâtons. Les ligands sont en bâtons bleus. D'après (Gilbert et al., 2013).

Les CBMs de type B peuvent se lier à des substrats très variés comme des oligosaccharides solubles ou insolubles dérivés des hémicelluloses ou à de la cellulose amorphe (Tomme et al., 1996). Ces CBMs présentent en général une masse moléculaire plus importante que ceux de type A. Ils se lient aux régions internes des glucanes et sont capables d'accueillir les unités de sucre des oligosaccharides dans une poche allongée dans laquelle se trouvent plusieurs sous-sites (Figure 20B). En général, les CBMs accueillent une chaîne individuelle de glucanes contenant au maximum trois sucres (Boraston et al., 2004). Ces CBMs sont alors qualifiés d'endo-CBMs (Figure 21) (Gilbert et al., 2013). La capacité de liaison de ce type de CBM est déterminée par le DP du ligand glucidique. Par exemple, l'affinité sera importante pour des hexasaccharides alors que les interactions avec des oligosaccharides de DP inférieur ou égal à 3 sont négligeables (Boraston et al., 2004). En général, les constantes d'association de ces CBMs pour leur ligand sont d'environ $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Boraston, 2005). La présence de ces endo-CBMs favorise l'activité des GHs contre les polysaccharides insolubles (Hall et al., 1995; Tomme et al., 1988) ou contre les substrats branchés (Cuskin et al., 2012).

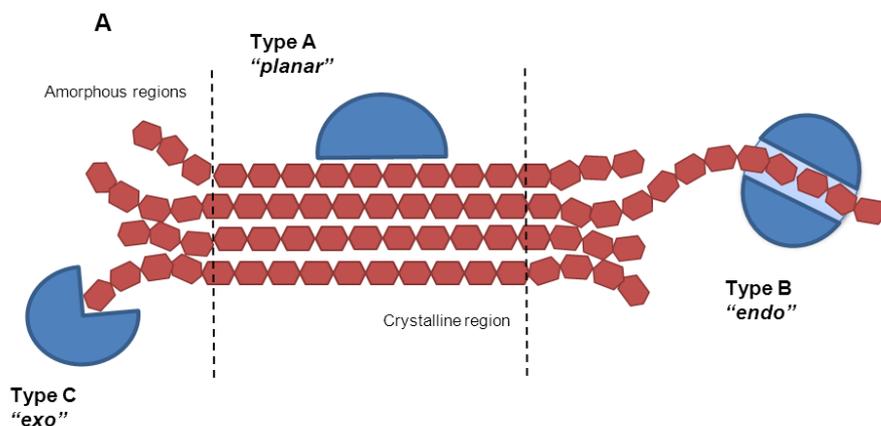


Figure 21 : Représentation schématique des trois types de CBMs.
D'après (van Bueren, 2013).

Pour finir, les CBMs de type C reconnaissent des petits saccharides ou les sucres terminaux des polysaccharides complexes et se lient donc à une seule unité de sucre (Figure 20C). Ces CBMs sont appelés exo-CBMs (Figure 21) (Gilbert et al., 2013). Ils permettent une augmentation considérable de l'activité des glucosidases agissant en exo même si le glucane est soluble et facilement accessible à l'attaque enzymatique (Cuskin et al., 2012). Ces CBMs ont des propriétés semblables aux lectines pour une liaison optimale aux mono-, di- ou tri-

saccharides. Ainsi, le réseau de liaisons hydrogènes entre protéine et ligand est plus important pour les CBMs de type C que pour ceux de type B (Boraston et al., 2004). Pour ces exo-CBMs qui ciblent les produits de dégradation générés par les pectates lyases ou les xylanases, il a été proposé qu'ils orientent les enzymes vers les régions de la paroi cellulaire végétale qui ont déjà subi une dégradation et qui sont donc accessibles pour une attaque enzymatique (Montanier et al., 2009).

Même si l'orientation et le positionnement des résidus aromatiques des sites de liaison des CBMs sont les premiers éléments clés de la spécificité et de l'affinité de ces protéines, d'autres interactions (dont les liaisons hydrogènes directes) ont un rôle significatif dans la reconnaissance du ligand par le CBM. Les glucides sont des molécules bipolaires qui ont une grande capacité à former des liaisons hydrogènes avec des résidus polaires des sites de liaison des protéines (Boraston et al., 2004). L'importance des liaisons hydrogènes directes dans l'interaction CBM-sucres cibles varie selon le type de CBM. Pour les CBMs de type A, les liaisons hydrogènes joueraient un rôle mineur dans la reconnaissance du ligand. Pour les CBMs de types B et C, une perte d'affinité avec le ligand pourrait être la conséquence de la perte d'une liaison hydrogène ou de changements structurels dans les sites de liaison au ligand (Kormos et al., 2000; Xie et al., 2001b).

b) Repliement des CBMs

Les CBMs varient largement dans leurs spécificités de ligand mais des repliements communs ont été observés dans les protéines avec différentes spécificités et appartenant à différents groupes taxonomiques (Tableau 7) (Czjzek et al., 2001; Sunna et al., 2001). Les CBMs ont été classés selon leur repliement dans sept familles (Boraston et al., 2004) avec comme repliement le plus fréquent, le sandwich β . Ce repliement correspond à deux feuillets β dont chacun a entre trois et six brins β antiparallèles (Boraston et al., 2004). Le site de liaison au ligand est localisé au niveau de la surface concave due à un des feuillets β . Ce site a une topographie qui facilite le ciblage des régions internes des chaînes de glycanes (Boraston et al., 2002b; Najmudin et al., 2006; Simpson et al., 1999). Le site de liaison au ligand peut sinon se trouver dans les boucles qui connectent les deux feuillets (Czjzek et al., 2001). Ce site de liaison peut cibler la fin (Montanier et al., 2011) où les régions internes des chaînes de glycane (Czjzek et al., 2001).

D'autre part, les CBMs peuvent contenir un trèfle β , formé de trois unités de trèfle. Chacune des unités contient quatre feuillets β . Ainsi douze feuillets β forment six épingles à cheveux. Trois épingles à cheveux constituent un tonneau à six brins et les trois autres épingles composent un bouchon triangulaire (Murzin et al., 1992). Il existe également un repliement nommé repliement Hevein. Il correspond à une majorité de bobine et de deux petits feuillets β et d'une petite région d'hélice (Boraston et al., 2004). La famille de repliement 7 incorpore certains aspects du repliement Hevein en fusionnant ce type de repliement avec un petit feuillet β ce qui explique la création d'une famille de repliement différente (Boraston et al., 2004). Pour finir, le repliement OB est constitué de cinq brins β formant un feuillet β fermé par une hélice α (Murzin, 1993).

Par exemple, les CBM3a et CBM2b1 qui ont une conformation en β -jelly roll (sous famille du repliement en sandwich β), sont fréquemment utilisés pour leur grande spécificité de reconnaissance (respectivement la cellulose et les xyloxygénases). C'est pourquoi ils ont été choisis pour cette thèse.

Tableau 7 : Classement des CBMs.
Mis à jour le 20/09/17, d'après (Boraston et al., 2004; Guillén et al., 2010; Lombard et al., 2014).

famille de repliement	repliement	famille de CBM
1	sandwich β	2, 3, 4, 6, 9, 11, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 41, 44, 47, 48, 51, 70
2	trèfle β	13, 42
3	nœud de cystéine	1
4	repliement unique	5, 12
5	repliement OB (oligonucléotide/oligosaccharide binding)	10
6	repliement Hevein	18
7	repliement unique, contient un repliement ressemblant au Hevein	14

III. Fonctions des CBMs

La fonction première des CBMs est de se fixer sur son ligand et ainsi de favoriser un contact intime et prolongé entre le module catalytique et son substrat présent dans la paroi végétale (Ferreira et al., 1993; Fontes et al., 1995; Tomme et al., 1988). En général, la spécificité de ligand pour les CBMs bactériens reflète la nature des substrats hydrolysés par les modules catalytiques (Black et al., 1995; Van Tilbeurgh et al., 1986). Le deuxième rôle des CBMs est une fonction de ciblage. En conséquence, la concentration de l'enzyme annexée

à un CBM est augmentée à proximité du substrat (Bolam et al., 1998; Boraston et al., 2004; Hall et al., 1995; Hervé et al., 2010). Le troisième rôle est un effet d'avidité sur le substrat (Boraston et al., 2002a). Ceci se caractérise par une liaison du CBM à son ligand en parallèle de l'affinité entre le module catalytique et son substrat. En conséquence, l'affinité de l'enzyme va accroître l'efficacité de l'enzyme (Gilbert et al., 2013).

Certains CBMs pourraient avoir des fonctions additionnelles, comme la stabilisation de l'enzyme en augmentant sa thermostabilité (Fontes et al., 1995; Winterhalter et al., 1995; Zverlov et al., 1996). Par exemple, le CBM de la xylanase de *Streptomyces sp S27* et le linker correspondant stabilisent la xylanase (Li et al., 2009).

En parallèle, le CBM46 de l'enzyme *BICel5B* de *Bacillus licheniformis* a été décrit comme ayant une complémentarité avec le domaine catalytique pour fermer le site catalytique (Liberato et al., 2016; Venditto et al., 2015). En effet, cette enzyme est composée de trois domaines dont le CBM46 et la cellulase. Le domaine catalytique seul n'a pas d'activité, l'interaction CBM46-cellulase est indispensable pour la fermeture du site catalytique.

Une autre fonction relevée est la possibilité de perturber l'interface entre le substrat et les autres polysaccharides dans la paroi afin d'isoler des chaînes simples de cellulose dans le site actif du module catalytique (Din et al., 1994a; Gill et al., 1999; Irwin et al., 1998; Southall et al., 1999; Tomme et al., 1996). Une enzyme située à côté d'un CBM, qui possède des fonctions de déstructuration pourrait avoir une hydrolyse facilitée des substrats récalcitrants, ce qui confère un avantage sur les autres enzymes (Guillén et al., 2010). Ceci a été mis en évidence avec le CBM de la famille 2a placé en position N-terminale de l'endoglucanase produite par *C. fimi*. Ce CBM semble favoriser la perturbation non catalytique de la structure cristalline de la cellulose. L'accès des enzymes puis leur activité sont donc augmentés, ce qui améliore la capacité de dégradation de module catalytique (Din et al., 1994a, 1991). Un autre exemple est celui du CBM33 (non lié à une enzyme dans la Nature) produit par *Serratia marcescens* qui augmente la capacité des chitinases à dégrader des formes très cristallines de chitine (Vaaje-Kolstad et al., 2005). Cependant, la perturbation du substrat n'a été observée que pour quelques CBMs et ne peut donc pas être généralisée à tous les CBMs (Din et al., 1994a; Southall et al., 1999).

Il est probable que dans un contexte de parois cellulaires intactes, la possession d'un CBM dirigé contre la cellulose confèrerait un avantage sélectif pour de nombreuses enzymes

dégradant des polysaccharides. Cet avantage peut permettre à l'enzyme de rester dans un contact intime avec les matériaux de la paroi cellulaire. Dans ce mécanisme, l'enzyme est liée à la paroi cellulaire par son CBM spécifique de la cellulose alors que le module catalytique est capable d'accéder à son substrat cible qui peut être en association avec les microfibrilles de cellulose. Ainsi le CBM augmente fortement la concentration de l'enzyme dans le voisinage du substrat amenant à l'augmentation observée de l'hydrolyse du polysaccharide. Les CBMs en diminuant les vitesses de diffusion, pourraient limiter l'accessibilité des enzymes, particulièrement quand tous les substrats disponibles ont été hydrolysés dans le voisinage du CBM lié. Cependant, les CBMs dirigés contre la cellulose cristalline sont capables de diffuser sur la surface des microfibrilles de cellulose (Jervis et al., 1997) ce qui permet à l'enzyme d'accéder aux molécules substrats rapidement dans la paroi.

Il a également été démontré que les CBMs peuvent être impliqués dans la régulation de l'expression de gènes codant pour des enzymes cellulosomales. La présence de polysaccharides extracellulaires est détectée par une protéine liée à un facteur RsgI-anti σ^I situé à l'intérieur de *C. thermocellum*. Le facteur anti σ^I relargue le facteur σ^I qui interagira avec l'ARN polymérase. Cette polymérase débutera alors la transcription des gènes codant pour les enzymes cellulosomales qui pourront agir sur le substrat reconnu (Kahel-Raifer et al., 2010). Ce modèle a été appuyé par des études de microcalorimétrie (Isothermal Titration Calorimetry ou ITC en anglais) entre plusieurs facteurs σ^I et les domaines RsgI-anti σ^I correspondants (Nataf et al., 2010). Les résultats montrent une interaction spécifique entre ces deux composés. Par ailleurs, après une étude des structures tridimensionnelles il a été confirmé qu'une partie des protéines impliquées lors de la première étape dans la reconnaissance du substrat sont des CBMs de la famille 3 (Yaniv et al., 2014).

Les CBMs ont un impact sur la dégradation de la paroi de cellules végétales mais ils peuvent également influencer d'autres systèmes biologiques. Ainsi, certaines bactéries pathogènes utilisent des enzymes ayant un CBM comme un facteur de virulence (Boraston et al., 2006; van Bueren et al., 2007). Par exemple, la bactérie *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) est responsable de la pneumonie. Elle utilise des facteurs de virulences et certains gènes codant pour des GHs putatives semblent participer à cette virulence (Hava and Camilli, 2002). L'équipe de Boraston (Boraston et al., 2006) a étudié les trois CBMs d'une GH98 potentiellement impliquée dans le système de virulence de *S. pneumoniae*. Ces CBMs

provenaient de pullulanases de *S. pneumoniae* ou de *Streptococcus pyogenes*. Ils ont des oligosaccharides fucosylés comme ligands. Par la suite, ils ont réalisé une étude structure-fonction sur des CBMs dont le ligand est le glycogène (van Bueren et al., 2007). La conclusion de ce travail est l'identification de la cible des facteurs de virulence, qui correspondrait aux glycogènes intracellulaires pulmonaires.

10. Protéines mises en œuvre dans cette thèse

I. *NpXyn11A de Neocallimastix patriciarum*

La xylanase *NpXyn11A* du champignon anaérobie *Neocallimastix patriciarum* (Gilbert et al., 1992) fait partie de la famille GH11 (Lombard et al., 2014). *NpXyn11A* est produite extracellulairement (Gilbert et al., 1992) mais certaines évidences permettent de supposer qu'elle fait partie d'un cellulosome (Paës et al., 2012a). La structure tridimensionnelle de l'enzyme seule a été résolue et présente le domaine β -jelly roll commun aux enzymes de la famille GH11 (Figure 22) (Vardakou et al., 2008).

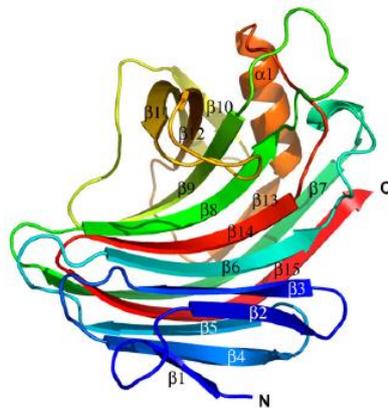


Figure 22 : Structure cristallographique de la xylanase *NpXyn11A*. D'après (Vardakou et al., 2008), code PDB 2C1F.

Les deux résidus catalytiques sont les acides glutamiques Glu113 (nucléophile) et Glu201 (acide/base), ils sont situés au centre de la poche catalytique. La distance entre les deux résidus catalytiques est d'environ 6 Å, comme décrit pour les enzymes ayant un mécanisme catalytique de rétention de configuration du carbone anomérique (Vardakou et al., 2008).

La xylanase a été caractérisée sur des xylooligosaccharides, des substrats chromogéniques et du xylane de glumes d'avoine. Le pH optimal de *NpXyn11A* sur le xylane

de glumes d'avoine semblerait être de 7,5. Cependant, les paramètres cinétiques sur les différents substrats ont été réalisés à pH 6 ou à pH 7,2 (Tableau 8). L'enzyme est 10 fois plus active sur du xylohexaose que sur du xylopentaose mettant en évidence son grand nombre de sous-sites, au moins 6. Cette xylanase peut cliver du xylotriose en relarguant du xylose et du xylobiose. Lorsque l'enzyme dégrade du xylotetraose, elle produit du xylose, du xylobiose et du xylotriose dont le rapport est 1 : 2 : 1. Les sous-sites -3 et +3 ont donc la même affinité pour le xylose. A partir de xylopentaose la xylanase libère un mélange de xylobiose et de xylotriose. Depuis du xylohexaose, cette enzyme produit surtout du xylotriose mais elle peut également produire du xylobiose et du xylotetraose en faibles quantités. Ceci a permis de mettre en évidence l'importance des sous-sites -3 et +3, appuyée par l'hydrolyse des deux substrats chromogéniques et de la structure de l'enzyme. En effet, l'enzyme est plus active d'un facteur 30 sur *pNP-X₃* comparé à son activité sur du *pNP-X₂*.

Tableau 8 : Paramètres cinétiques de la xylanase d'intérêt.
pNP-X₂ : 4-nitrophényle-β-D-xylobioside ; *pNP-X₃* :4-nitrophényle-β-D-xylotrioside (Vardakou et al., 2008).

unité	k_{cat}	K_M		k_{cat}/K_M	
	min ⁻¹	mM	mg.mL ⁻¹	mM ⁻¹ min ⁻¹	mL.mg ⁻¹ min ⁻¹
xylotriose	X	X	X	X	2,5
xylotetraose	X	X	X	X	1,4.10 ²
xylopentaose	X	X	X	X	1,7.10 ⁴
xylohexaose	X	X	X	X	2,0.10 ⁵
<i>pNP-X₂</i>	1,1.10 ¹	1,5.10 ¹	X	0,74	X
<i>pNP-X₃</i>	4,8.10 ¹	2,1	X	2,3.10 ¹	X
xylane de glumes d'avoine	3,5.10 ⁵	X	4,2	X	8,4.10 ⁴

II. Les CEs

Six carbohydate estérases ont été utilisées dans cette thèse et sont issues de travaux menés précédemment dans notre groupe dont les résultats ne sont pas encore publiés. Il s'agit d'acétyl xylane estérases nommées E5UNK, E7, E8, *Pm13*, *Pm20* et *Pm51*.

a) Les enzymes E5UNK, E7 et E8

Dans le but de découvrir de nouvelles enzymes pour la dégradation de la biomasse lignocellulosique, une banque métagenomique du ver de terre de Madagascar *Ponthoscolex corethrurus* a été réalisée après avoir été élevé sur paille de blé (ANR BAMBI, Dr. Michael O'Donohue). La métagenomique fonctionnelle permet à partir d'un échantillon naturel d'explorer la diversité des activités présentes dans cet échantillon sans passer par la culture

des microorganismes présents. Le criblage fonctionnel, sur substrats chromogéniques, de la banque métagénomique de ce ver a permis d'identifier de nombreux clones actifs sur divers substrats représentatifs de la biomasse lignocellulosique allant du *p*NP-arabinose à l'AZCL-cellulose (AZCL pour Azurine-crosslinked). L'annotation fonctionnelle des fragments d'ADN découverts a permis d'obtenir de potentielles nouvelles carbohydate estérases.

Dans le projet MASCOT (financé par 3BCar, Dr. Claire Dumon, résultats non publiés), une vingtaine de carbohydate estérases hypothétiques ont été clonées et exprimées. Les enzymes ainsi obtenues ont été caractérisées et leur activité sur un sirop de pentose a été évaluée. Les enzymes E5UNK, E7 et E8 ont été sélectionnées pour leur activité de déacétylation d'un sirop de pentose, obtenu après traitement Organosolv de la paille de blé (société CIMV). Ces enzymes font partie de la famille CE4 (CAZy). Le Dr. Pablo Alvira a caractérisé ces enzymes sur *p*NP-acétate (Tableau 9). L'enzyme E5UNK est composée de deux domaines, un domaine catalytique (E5) et un domaine de fonction inconnue (UNK) alors que E7 et E8 ont seulement un domaine catalytique.

Tableau 9 : Paramètres optimaux de E5UNK, E7 et E8 sur *p*NP-acétate. Résultats non publiés du Dr. Pablo Alvira. UNK : domaine de fonction inconnue.

enzyme	température optimale (°C)	pH optimal
E5UNK	55-60	6,5
E7	60	7,5
E8	60	6

b) Les enzymes *Pm13*, *Pm20* et *Pm51*

L'étude de Bastien et collaborateurs est basée sur deux banques métagénomiques obtenues à partir du termite *Pseudacanthotermes militaris*. La banque réalisée à partir du système digestif entier des termites (16 000 clones) a été criblée à haut débit sur milieu solide avec différents substrats chromogéniques (Bastien et al., 2013). Ceci a permis de détecter des clones métagénomiques exprimant des activités de modification des hémicelluloses et des glucanes. Les enzymes *Pm13*, *Pm20*, et *Pm51* ont été mises en évidence lors d'un projet sur l'hydrolyse de paille de blé pré-traitée par explosion à la vapeur (FUTUROL, Drs. Grégory Arnal et Claire Dumon), permettant une hydrolyse partielle et une solubilisation des hémicelluloses (Jorgensen et al., 2007). L'enzyme multimodulaire *Pm48* correspond à une enzyme de la famille GH3, un CBM de la famille 48 et une carbohydate estérase (Figure 23). L'enzyme *Pm51* est une forme tronquée du gène codant pour *Pm48*. Les enzymes *Pm13* et

Pm20 ne contiennent qu'un module catalytique. Les trois enzymes d'intérêt (*Pm13*, *Pm20* et *Pm51*) appartiennent à la famille CE1 et elles ont été caractérisées par le Dr. Pablo Alvira (Tableau 10).

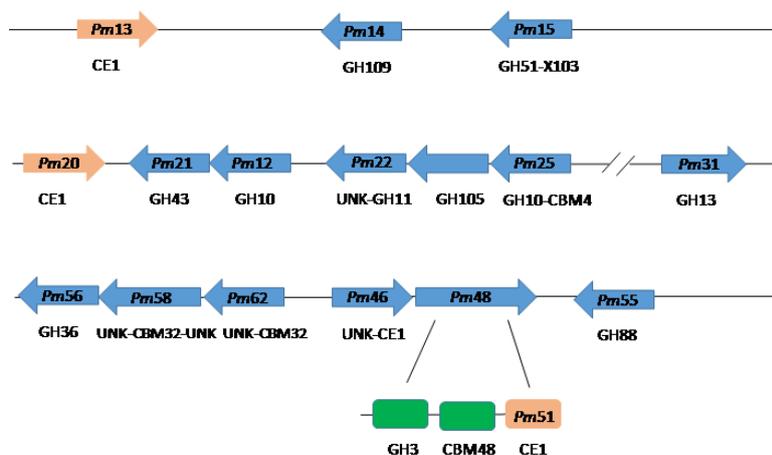


Figure 23 : Organisation des gènes sur les opérons.
X103 : module de fonction non déterminée, probablement un CBM (Arnal, 2014).

Tableau 10 : Paramètres optimaux de *Pm13*, *Pm20* et *Pm51* sur *pNP*-acétate. Résultats non publiés du Dr. Pablo Alvira.

enzyme	température optimale (°C)	pH optimal
<i>Pm13</i>	55	7
<i>Pm20</i>	> 65	6,5
<i>Pm51</i>	25	7

III. CBMs

a) Le CBM2b1 de la xylanase 11A de *Cellulomonas fimi*

De manière générale, les CBMs de la famille 2 sont composés d'environ 100 acides aminés. La quarantaine de membres de cette famille est divisée en deux sous-familles (2a et 2b) (Tomme et al., 1998). Les CBM2a se lient à la cellulose cristalline (Gilkes et al., 1992) et font partie des CBMs de type A alors que les CBM2b se lient aux xylanes (Figure 24) (Black et al., 1995; Dupont et al., 1998; Tomme et al., 1998) et font partie des CBMs de type B. Les CBM2a ont deux domaines de liaison à la chitine et une boucle de huit résidus avec un tryptophane conservé (Simpson et al., 2000; Tomme et al., 1998). Cette boucle est peut-être la cause de la différence des affinités entre CBM2a et 2b (Dupont et al., 1998). Une autre explication des différences de spécificité de ligand entre CBMs de la famille 2 serait l'orientation des deux ou trois résidus de tryptophane qui sont exposés. En effet, pour les modules de la famille 2a, ils sont plans ce qui leur permet d'interagir avec les chaînes planes

retrouvées dans la cellulose. A l'inverse, les CBM2 de la sous-famille b ont les résidus perpendiculaires qui vont alors interagir avec l'hélice des chaînes de xylanes (Simpson et al., 2000). Cette orientation des tryptophanes serait liée à un résidu clé, en position 262 dans le CBM2b1 de la xylanase 11A de *C. fimi*. Ce résidu est une glycine ou une alanine dans les CBM2a et une arginine dans les CBM2b. Le résidu arginine étant plus gros que celui de glycine, il empêcherait les cycles du tryptophane le plus proche de se positionner sous forme plane et les forcerait à faire une rotation de 90° (Simpson et al., 2000)

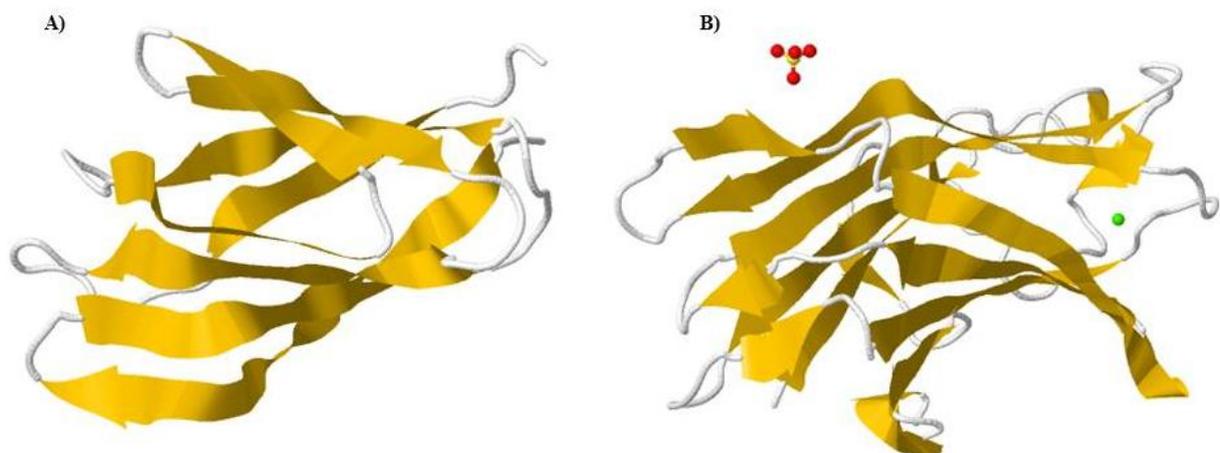


Figure 24 : Représentation de structures cristallographiques de CBMs.
 A) Le mutant R262G du CBM2b1 de la xylanase 11A produite par *C. fimi* (code PDB 1E5B). B) Le CBM3a de la protéine scaffold CipA produite par *C. thermocellum* (code PDB 4B9F).

La xylanase 11A produite par *C. fimi* CfXyn11A a été mise en lumière lors d'une étude sur les xylanases produites par cette bactérie (Clarke et al., 1991). Elle provient d'une enzyme multimodulaire composée du module catalytique (xylanase), d'un CBM interne classé CBM2b1, d'une carbohydre estérase CE4 et d'un deuxième CBM, localisé en position C-terminale et nommé CBM2b2 (Millward-Sadler et al., 1994). L'enzyme multimodulaire a une affinité pour la cellulose (Millward-Sadler et al., 1994) et le xylane de glumes d'avoine (Black et al., 1995) alors que le domaine catalytique n'a pas d'affinité pour ces deux types de polymères. Le domaine CBM2b1 a une affinité pour les xylanes (Black et al., 1995) mais pas pour la cellulose (Millward-Sadler et al., 1994) alors que le domaine CBM2b2 a une affinité pour les xylanes et pour la cellulose (Black et al., 1995). La structure cristallographique du CBM2b1 représente la première structure d'un CBM spécifique des xylanes (code PDB 1XBD).

L'étude de Bolam a permis de déterminer l'importance du CBM2b2, de résoudre sa structure tridimensionnelle par RMN (résonance magnétique nucléaire) et de comparer ses propriétés biochimiques avec celles du CBM2b1 (Bolam et al., 2001). Ainsi, il a été démontré que ces deux modules sont très proches à la fois au niveau de leur structure mais aussi de leurs caractéristiques biochimiques. Ils ont une affinité pour les xylandes tels que les arabinoxylanes de blé ou les xylandes de glumes d'avoine qui sont des xylandes moins substitués. Ils agissent en synergie pour se lier à la cellulose et aux xylandes (solubles et insolubles). Ceci signifie que leur activité combinée est plus grande que la somme des activités individuelles. Dans l'objectif de travailler sur un substrat complexe il est donc judicieux d'utiliser un seul de ces CBMs qui ciblera uniquement les xylandes, préférentiellement les xylandes insolubles.

Les deux résidus de tryptophane exposés à la surface (Trp259 et Trp291) contrôlent la liaison aux xylandes (Simpson et al., 2000). Ces résidus sont conservés dans les CBMs de la famille 2 où ils sont impliqués dans la liaison avec la cellulose et les oligosaccharides courts (Nagy et al., 1998; Simpson et al., 1999; Xu et al., 1995). Leur orientation est essentielle pour la détermination de la spécificité de liaison avec un ligand et les mécanismes de reconnaissance et de liaison avec la cible sont identiques pour les deux CBMs (Bolam et al., 2001). Les CBMs de *CfXyn11A* ont probablement évolué pour permettre à l'enzyme de mieux se fixer aux xylandes dans les cellules de paroi végétale, la liaison à la cellulose serait juste un effet secondaire (Bolam et al., 2001).

La spécificité du CBM2b1 a dans un premier temps été étudiée de manière qualitative en utilisant des gels d'affinité. Ce CBM a été fusionné avec une glutathione-S-transférase (GST) pour son étude. Il montre de l'affinité pour les β -glucanes d'orge, les xylandes issus de blé, de seigle ou de glumes d'avoine. Il ne reconnaît pas la cellulose, sous forme soluble ou insoluble, ni les pectines (Simpson et al., 1999). D'autres publications ont mis en évidence l'association du CBM2b1 avec d'autres polymères (Tableau 11). Ce CBM sera étudié dans cette thèse.

Tableau 11 : Données de la littérature sur l'affinité entre le CBM2b1 et des xylooligosaccharides. XGA : xylane de glumes d'avoine ; SSD : solid state depletion ; M : microcalorimétrie. D'après (Bolam et al., 2001; Simpson et al., 1999; Xie et al., 2001a).

	Simpson et al 1999		Bolam et al 2001		Xie et al 2001	
	K_a (M^{-1})	méthode	K_a (M^{-1})	méthode	K_a (M^{-1})	méthode
XGA insoluble	X	X	$4,7.10^4$	SSD	X	X
XGA soluble	$2,43.10^3$	M	$5,9.10^3$	M	$6,42.10^3$	M
β -glucane d'orge	$1,17.10^2$	M	X	X	X	X
xylotriase	$4,50.10^1$	M	X	X	X	X
xylotetraose	$8,40.10^2$	M	X	X	X	X
xylopentaose	$2,43.10^3$	M	X	X	X	X
xylohexaose	$3,45.10^3$	RMN	$3,4.10^3$	RMN	X	X
	$5,26.10^3$	M				

Ce CBM a une forte affinité pour le xylane de glumes d'avoine insoluble avec une constante d'affinité de $4,7.10^4 M^{-1}$ (Bolam et al., 2001). L'affinité pour les autres polymères testés (xylane soluble de glumes d'avoine, xylopentaose ou xylohexaose) est légèrement inférieure, de l'ordre de $10^3 M^{-1}$ (Bolam et al., 2001; Simpson et al., 1999; Xie et al., 2001a). La liaison légèrement plus faible pour les données de Simpson avec du xylane de glumes d'avoine comparée au xylohexaose peut être expliquée par la nature hétérogène de ces xylanes (Simpson et al., 1999).

Le CBM2b1 a des affinités plus faibles pour des xylooligosaccharides plus petits comme du xylohexaose ou du xylotriase ainsi que pour du glucane d'orge (Simpson et al., 1999). Ainsi, la protéine se lie de plus en plus fortement à des oligomères de xylose jusqu'au xylohexaose. Simpson et ses collègues ont suggéré que le site de liaison accommode au maximum six unités de xylose. L'étude de la liaison entre le xylohexaose et le CBM2b1 par RMN a permis de confirmer que les résidus affectés par la liaison avec ce ligand sont sur la même face du CBM. Ils sont proches des deux résidus de tryptophane exposés au solvant, le Trp259 et le Trp291 qui font partie du site de liaison aux xylanes.

b) Le CBM3a de *Clostridium thermocellum*

Les CBMs de la famille 3 ont une séquence primaire comprenant entre 130 à 170 acides aminés. On retrouve deux sous-familles (3a et 3b) dont certains membres peuvent reconnaître la chitine (Tomme et al., 1998). Les CBM3 sont généralement classés comme des modules de type A et ont une très forte affinité pour la cellulose cristalline (Gilad et al., 2003).

La première structure de CBM3 à avoir été élucidée est celle provenant de la protéine charpente CipA (cellulosome-integrating protein A) du cellulosome de *C. thermocellum* (Tormo et al., 1996) (Figure 24B). Ce cellulosome est un complexe multienzymatique décrit pour la première fois par l'équipe d'Edward Bayer (Bayer et al., 1983; Lamed et al., 1983a; Pohlschroder et al., 1994) (Chapitre 1. 11. II). Ce CBM3 permet de favoriser l'interaction entre le complexe enzymatique et la cellulose en cours de dégradation. La structure cristallographique de *CtCBM3a* présente une forme caractéristique de sandwich à neuf feuillets β antiparallèles. L'un des feuillets possède une topologie plane reflétant celle de la cellulose cristalline. Les chaînes latérales de trois résidus aromatiques se superposent aux anneaux de glucose de la chaîne cellulosique. De plus, plusieurs acides aminés polaires situés sur la surface liante sont susceptibles de créer des liaisons polaires avec les groupes hydroxyles (Charnock et al., 2002).

Dix résidus de *CtCBM3a* participent à la liaison avec la cellulose dont cinq résidus à la surface (Trp118, Arg112, Asp56, His57, Tyr67) et les cinq autres résidus comme résidus d'ancrage (Asn16, Gln110, Ser12, Asn10, Ser113) (Tormo et al., 1996). Les résidus d'ancrage pourraient établir des liaisons hydrogènes avec des chaînes de cellulose. Il a notamment été montré que les résidus His57 et Tyr67 peuvent former des liaisons hydrogènes fortes avec les unités de glucose de la cellulose et stabiliser la conformation de liaison.

Le CBM3a a largement été étudié. La recherche de la spécificité de ce CBM (Hernandez-Gomez et al., 2015; Poole et al., 1992), de sa structure (Lamed et al., 1994; Yaniv et al., 2013), une étude structure-fonction (Lehtio et al., 2003) et la dégradation de substrats lors de l'association entre une cellulase et ce CBM (Carrard et al., 2000) ont été réalisées.

Peu d'informations existent sur l'affinité du CBM3a avec des polymères (Tableau 12). L'étude de Poole met en évidence la liaison entre le CBM3a et de la cellulose (Avicel ou PASC) mais ceci n'est pas quantifié (Poole et al., 1992). En effet, l'équipe utilise la méthode d'association qualitative entre une protéine et un ligand (nommée « pull down assay » en anglais). Le principe est de mettre la protéine et le ligand en contact durant environ une heure puis de laver le ligand. La protéine peut être éluée avec du β -mercaptoéthanol par exemple. Après dépôt des fractions sur un gel SDS-PAGE il est possible de déterminer si la protéine s'est liée au ligand. Seule l'étude de Hernandez-Gomez a déterminé l'affinité entre le CBM3a et un polymère. Cependant, il ne s'agit pas du ligand principal du CBM3a qui est la cellulose cristalline. A ma connaissance, aucune donnée qualitative n'a été publiée sur l'affinité entre le

CBM3a et la cellulose même si d'après l'étude d'Hernandez-Gomez, l'affinité du CBM3a pour la cellulose cristalline est entre 50 et 100 fois plus importante que celle pour les xyloglucanes (Hernandez-Gomez et al., 2015). Ceci correspondrait à une constante d'affinité du CBM3a pour la cellulose cristalline entre $4,75 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ à $9,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. En général, les constantes d'association entre un CBM de type A (dont fait partie le CBM3a) et la cellulose cristalline sont de l'ordre de 10^6 M^{-1} (Gilkes et al., 1992).

Tableau 12 : Données de la littérature sur la caractérisation de l'affinité du CBM3a d'intérêt. AGE : gel d'affinité ; M : microcalorimétrie.

	CBM3a de CipA du cellulosome de <i>C. thermocellum</i>	
	(Poole et al., 1992)	(Hernandez-Gomez et al., 2015)
méthode	AGE	M
Avicel	affinité	X
PASC	affinité	X
xyloglucanes	X	$K_a = 9,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$

Afin de compléter ces données, les affinités entre plusieurs CBMs de la famille 3 avec la cellulose sous différentes formes ont été publiées (Tableau 13). D'après le travail de Tomme et ses confrères (Tomme et al., 1998) le K_a du CBM3 pour la BMCC est compris entre $1,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (pour le CBM de CbpA de *C. cellulovorans*) et $2,9 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (pour le CBM de la protéine charpente CipC de *C. thermocellum*). L'équipe de McLean a également travaillé sur un CBM3 dont le K_a pour la BMCC était de 10^6 M^{-1} (McLean et al., 2002). La méthode utilisée par Tomme et ses collègues (Tomme et al., 1998) correspond à la méthode solid state depletion (Chapitre 2. 5. I). L'équipe de McLean a déterminé la constante d'affinité à partir d'une méthode légèrement différente, la solid state depletion basée sur la fluorescence (McLean et al., 2002).

Tableau 13 : Données de la littérature sur l'affinité entre un CBM3 et différentes préparations de cellulose.

BMCC : bacterial microcrystalline cellulose ; PASC : phosphoric acid-swollen cellulose ; SSD: solid state depletion ; SSDF : solid state depletion basé sur la fluorescence ; CbpA : protéine charpente du cellulosome de *Clostridium cellulovorans*.

CBM testé	CBM3 de CipC du cellulosome de <i>C. thermocellum</i>	CBM3 de CbpA du cellulosome de <i>Clostridium cellulovorans</i>		
	(Tomme et al., 1998)	(Tomme et al., 1998)	(Goldstein et al., 1993)	(McLean et al., 2002)
$K_a (\text{M}^{-1})$				
méthode	SSD	SSD	SSD	SSDF
BMCC	$2,9 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^6$	X	$1 \cdot 10^6$
PASC	$6,7 \cdot 10^7$	X	X	$1,1 \cdot 10^6$
Avicel	$7,7 \cdot 10^6$	X	$1,7 \cdot 10^6$	X

Les valeurs observées pour la PASC sont comprises entre 10^6 M^{-1} (McLean et al., 2002) et $6,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Tomme et al., 1998), l'ordre de grandeur est le même que pour la BMCC. La liaison entre l'Avicel et un CBM de la famille 3 est également caractérisée par une constante d'affinité de l'ordre de 10^6 M^{-1} (Goldstein et al., 1993; Tomme et al., 1998).

11. Les différentes stratégies de dégradation de la lignocellulose

La diversité et la complexité de la lignocellulose au niveau chimique et structurel contribuent de manière significative à sa récalcitrance aux attaques chimiques ou biologiques (Fontes and Gilbert, 2010; Himmel et al., 2007). Bien que les polysaccharides soient une source de carbone pour de nombreux microorganismes, les plantes ont évolué pour résister aux attaques microbiennes et enzymatiques, en termes de tissus, compartimentation et stratégie de reproduction (Sarkar et al., 2009). En conséquence, de nombreuses enzymes sont nécessaires pour déconstruire la biomasse végétale. Les microorganismes suivent une des deux stratégies pour dégrader la biomasse lignocellulosique, en produisant des enzymes sous forme libre ou sous forme liée, dans un cellulosome.

I. Enzymes sécrétées

Les microorganismes aérobies comme les champignons *Trichoderma* et *Aspergillus* sécrètent une grande quantité de cellulases ou d'hémicellulases libres. Ces enzymes, en très grand nombre, dégradent complètement les polymères en monosaccharides ou disaccharides qui peuvent être utilisés par les microorganismes environnants (de Vries and Visser, 2001). En effet, ces organismes ne sont pas capables de transporter du matériel insoluble comme la cellulose à travers la membrane cellulaire. Ils doivent donc commencer la dégradation dans le milieu extracellulaire. Les sucres solubles produits par la digestion d'une cellulase sont transportés dans la cellule et métabolisés (Wilson and Irwin, 1999).

D'autres microorganismes aérobies comme les bactéries *Bacilli* et *Cellvibrio* sécrètent des enzymes. Le nombre d'enzymes est plus modéré, ces enzymes vont agir sur la chaîne principale des polymères et produire des oligosaccharides. Comme l'hydrolyse des polysaccharides a lieu à l'extérieur de la cellule, les microorganismes doivent s'assurer qu'au moins une partie des sucres solubles obtenus soit disponible pour eux (Shallom and Shoham

2003). Ces sucres seront alors utilisés par des exo-enzymes et enzymes de débranchement dans la membrane ou dans le milieu intracellulaire (Shulami et al., 1999). Cette stratégie évite aux bactéries de produire dans le milieu extracellulaire des produits finis qui seraient disponibles pour d'autres bactéries (Biely 1985, Shulami et al 1999).

II. Cellulosome

a) Généralités sur les cellulosomes

La deuxième stratégie consiste à produire un complexe multienzymatique composé de plusieurs enzymes et ancré à la surface du microorganisme. Il s'agit du cellulosome (Lamed et al., 1983b). Cette stratégie a été développée par des bactéries anaérobies comme celles du genre *Clostridia* ou par des champignons (Fanutti et al., 1995). Le modèle type du cellulosome est celui décrit pour *C. thermocellum* (Bayer et al., 1998a; Zverlov et al., 2005). En effet, il s'agit du premier cellulosome découvert par Bayer et ses collègues (Bayer et al., 1998a, 1983; Lamed et al., 1983a; Pohlschroder et al., 1994). Le cellulosome se définit par trois éléments majeurs qui sont une protéine de structure (scaffold, CipA) portant des modules cohésines, un CBM3 et des enzymes catalytiques présentant un module dockérine (Bayer et al., 1994) (Figure 25). Les cellulosomes présentent de nombreuses enzymes hémicellulolytiques et cellulolytiques (Morag et al., 1990; Tamaru and Doi, 2001). Le module dockérine va permettre à ces enzymes de se fixer sur la protéine CipA *via* des interactions calcium-dépendant avec les cohésines (Yaron et al., 1995). L'ensemble des enzymes est alors associé à la membrane de la bactérie (Bayer et al., 1985) par une dockérine en interaction avec une cohésine, elle-même liée à une protéine d'ancrage à la membrane (Bayer et al., 2004). La protéine scaffold porte le CBM qui permet de fixer le cellulosome sur la cellulose cristalline (Tomme et al 1995b, Morag et al 1995). En général il s'agit d'un CBM de la famille 3 qui est spécifique de la cellulose et va permettre de cibler la paroi des cellules végétales (Fontes and Gilbert, 2010).

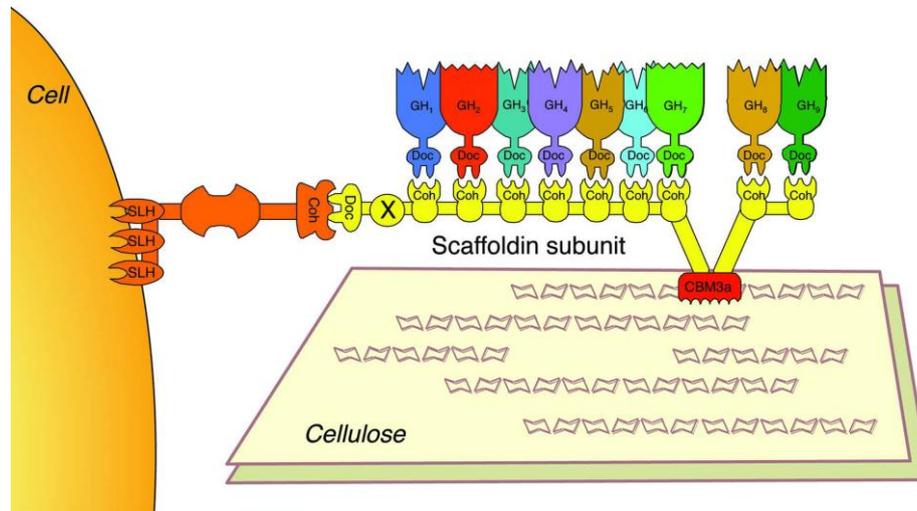


Figure 25 : Représentation du cellulosome de *C. thermocellum*.

GH : glycoside hydrolase ; doc : dockérine ; coh : cohésine ; SLH : S-layer homology module (Yaniv et al., 2014).

L'interaction entre cohésine et dockérine est très spécifique d'une espèce (Pagès et al., 1997). Ainsi, une cohésine d'une espèce n'interagira pas avec une dockérine d'une autre espèce. L'affinité entre une cohésine et une dockérine, produites par *C. thermocellum*, a une valeur importante, d'environ 10^9 M^{-1} (Schaeffer et al., 2002). En théorie, plus de 70 protéines contenant une dockérine peuvent être assemblées dans le cellulosome de *C. thermocellum* (Schwarz et al., 2004). Les cellulosomes pourraient donc contenir des enzymes différentes comme des cellulases, des hémicellulases et des pectinases (Bayer et al., 1998b; Morag et al., 1990). Par exemple, l'étude d'Hayashi est un des premiers rapports sur la présence d'une xylanase dans les composants majeurs du cellulosome de *C. thermocellum* (Hayashi et al 1997). Une féruloyle estérase a aussi été retrouvée dans ce cellulosome (Blum et al., 2000).

La proximité spatiale des enzymes semble être à l'origine de leur synergie d'action. La pression sélective de l'environnement anaérobie a pu entraîner la formation de cellulosomes. Ainsi, des travaux de l'équipe de Bayer ont mis en lumière que les effets de proximité et de ciblage des CBMs pouvaient avoir lieu simultanément dans les minicellulosomes artificiels (Fierobe et al., 2002). Une cohésine est produite avec un CBM et en parallèle une dockérine est liée à un module catalytique. Le couple cohésine-dockérine permet ainsi d'associer le module catalytique et le CBM. Des constructions plus complexes ont été réalisées avec plusieurs cohésines d'espèces différentes, liées entre-elles, permettant alors d'associer spécifiquement plusieurs modules catalytiques. La proximité étroite entre les enzymes est importante car les activités de certaines enzymes facilitent les activités des autres enzymes

présentes en favorisant l'accès aux sections appropriées du substrat complexe et insoluble. Ceci a été démontré par plusieurs études de Morais sur un cellulosome créé avec différentes enzymes (Morais et al., 2010a, 2010b). L'activité peut être améliorée d'un facteur 2,4 si ces enzymes sont associées entre-elles dans un cellulosome (Morais et al., 2010a). La synergie est davantage expliquée dans le chapitre 1. 11. *III. a.* A l'opposé une autre étude de ce groupe montre que la proximité entre deux cellulases qui dans la Nature sont sous forme libre, n'est pas toujours à l'origine d'une activité plus importante, il s'agit plutôt du ciblage du CBM (Vazana et al., 2010).

b) Mimer la nature : les protéines Jo et In

La bactérie pathogène *Streptococcus pneumoniae* est responsable de maladies humaines comme la méningite, l'otite ou la pneumonie ("Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the advisory committee on immunization practices," 1997). La surface de la bactérie comprend la paroi cellulaire et une capsule (Bruyn et al., 1992). Celle-ci est entièrement composée de polysaccharides. Les anticorps humains vont cibler ces polysaccharides pour protéger l'Homme de l'infection (Bogaert et al., 2004). Cependant, ces polysaccharides servent de facteur de virulence et protègent les cellules de toute attaque. Une structure fibrillaire appelée pilus est présente à la surface de la bactérie et se compose de plusieurs sous-unités dont l'adhésine RrgA (Nelson et al., 2007). L'adhésine RrgA se divise en quatre domaines (Figure 26A) (Vernet and Di Guilmi, 2012), dont les deux domaines comprenant les résidus 144 à 218 et les résidus 593 à 722 peuvent s'accocier de manière spontanée en créant une liaison isopeptidique intramoléculaire (Izoré et al., 2010). Ces domaines sont respectivement nommés Jo et In, la liaison se faisant entre la lysine 191 de Jo et l'asparagine 695 d'In pour former le complexe JoIn (Figure 26B). Les domaines Jo et In forment un sandwich β fermé par cette liaison isopeptidique (Bonnet et al., 2017). Celle-ci est dépendante de l'acide aspartique 600 (Izoré et al., 2010). Les liaisons intramoléculaires isopeptidiques sont principalement formées entre les chaînes latérales d'une lysine et d'une asparagine bien que des liaisons entre une lysine et un acide aspartique existent aussi (Hagan et al., 2010; Pointon et al., 2010). La liaison intramoléculaire isopeptidique est autocatalytique. De plus, il n'est pas nécessaire d'avoir un environnement spécifique oxydo-réducteur. Ces caractéristiques intéressantes ont été exploitées avec le développement de tags peptidiques (Zakeri and Howarth, 2010).

Les deux fragments Jo et In de RrgA peuvent être exprimés et purifiés indépendamment. L'association irréversible entre Jo et In est extrêmement spécifique, stable dans le temps et indépendante de la présence ou non de détergents (Vernet and Di Guilmi, 2012). Ces protéines peuvent s'associer *in vivo* et *in vitro* même en étant isolées de la protéine parentale (Bonnet et al., 2017). La formation de la liaison intramoléculaire isopeptidique entraîne la formation d'un groupement NH₃ qui est libéré dans le milieu, entraînant une perte de 17 Da de la masse moléculaire entre la somme des masses molaires de Jo et In et la masse molaire réelle du complexe JoIn (Izoré et al., 2010).

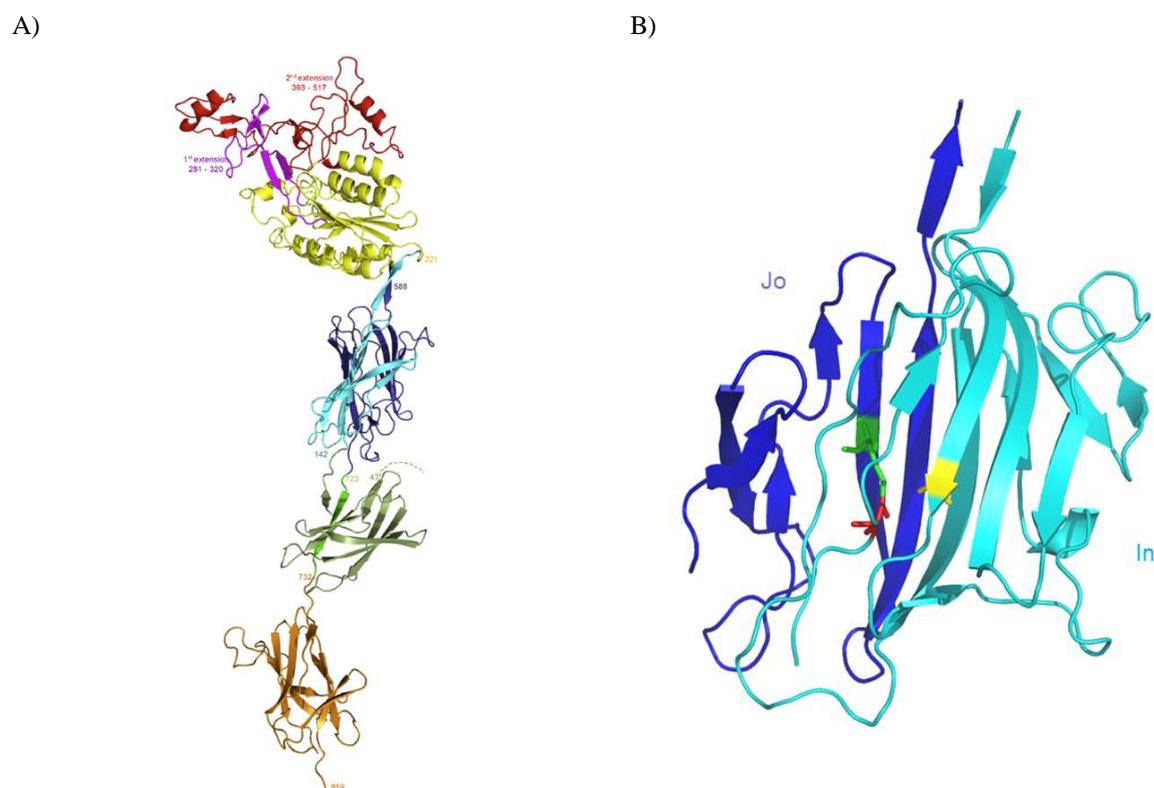


Figure 26 : Représentation de structures cristallographiques de RrgA.
 A) L'adhésine RrgA, sous-domaine du pilus produit par *S. pneumoniae* (code PDB 2WW8) (Izoré et al., 2010).
 B) Le complexe JoIn (code PDB 5MKC) (Bonnet et al., 2017). Résidu en vert : lysine 191 de Jo ; résidu en jaune : acide aspartique d'In ; résidu en rouge : asparagine 695 d'In.

Les protéines His-Jo et His-In ont pu être produites et purifiées séparément avant le début de ma thèse (Bonnet et al., 2017). Le complexe JoIn a pu être reconstitué à partir de ces protéines purifiées. Il est détecté après 5 minutes d'incubation avec environ 60 % du complexe reconstitué après une heure. Ces informations montrent que les sous-domaines Jo et In gardent leur capacité à former un complexe stable même lorsqu'ils sont séparés de la protéine parentale RrgA et avec l'ajout de tags histidines. La réaction est efficace à pH 8 et à

pH 7 car 100 % du complexe est obtenu après une heure. La formation du complexe est légèrement réduite à pH 6 avec 90 % du complexe observé et inefficace à pH 5 avec seulement 18 % du complexe observé (Bonnet et al., 2017). Dans ce projet, Bonnet et ses collègues ont réalisé une étude biochimique et structurale du complexe et ont validé différentes applications biotechnologiques. Par exemple, il est possible d'utiliser ces protéines pour détecter et localiser des protéines exposées à la surface de cellules. Par ailleurs, la structure cristallographique du complexe HisJo-In a été résolue à 2,04 Å (code PDB 5MKC) (Bonnet et al., 2017). L'utilisation de ces protéines pour diverses applications biotechnologiques, a été nommée Bio Molecular Welding.

Les protéines Jo et In présentent divers avantages. Leur taille et leur forme sont très proches des domaines cohésine et dockérine présents naturellement dans les cellulosomes. En effet Jo contient 93 acides aminés et In en a 147 alors qu'en moyenne une dockérine a 70 résidus (Bayer et al., 1998b) et une cohésine en contient 150 (Fontes and Gilbert, 2010). L'association cohésine-dockérine est calcium-dépendante alors que le complexe JoIn n'est pas altéré par les conditions d'utilisation. Par ailleurs, la proximité entre domaines sera présente. Le système Bio Molecular Welding permet par exemple une étude facilitée de la diversité naturelle (le nombre de constructions plasmidiques à créer par biologie moléculaire sera moindre comparé à une approche classique, de même que le nombre de protéines à exprimer et à purifier). Nous utiliserons ce système afin de construire des enzymes chimériques associables à façon. Ainsi, nous pourrons former des enzymes multimodulaires contenant un domaine catalytique et un CBM ou avec deux domaines catalytiques.

III. Synergie et proximité entre enzymes

a) Synergie entre enzymes

(1) Généralités

Le phénomène de synergie correspond à une coopération lors d'une attaque par plusieurs enzymes du même substrat, chacune agissant sur un site différent. Lorsqu'il y a synergie entre deux enzymes l'activité combinée est plus grande que la somme des activités individuelles (Moraïs et al., 2010a). Des effets synergiques ont été montrés entre des cellulases provenant de différents systèmes, entre différents types d'enzymes provenant de différentes familles et entre des enzymes ayant des modes d'action différents (c'est-à-dire des exoglucanases et endoglucanases) (Caspi et al., 2009; Fierobe et al., 2005; Irwin et al., 1993;

Mingardon et al., 2007; Walker et al., 1993). Par exemple, un effet synergique a été observé entre une xylanase et une acétyl xylane estérase (Puls et al., 1991). La synergie peut être observée entre enzymes libres ou associées dans un cellulosome.

L'équipe de Xu a travaillé sur des minicellulosomes afin de favoriser des synergies (Xu et al., 2013). Dans la majorité des précédents travaux sur les minicellulosomes, les enzymes utilisées contenaient un seul module catalytique (Caspi et al., 2009; Cho et al., 2004; Fierobe et al., 2001; Mingardon et al., 2005) alors que dans cette étude, une des enzymes est multifonctionnelle (Xu et al., 2013). Cette enzyme multifonctionnelle contient un CBM3a et deux endoglucanases provenant de *C. thermocellum*. Le minicellulosome contenant l'enzyme multifonctionnelle et une exoglucanase de *C. thermocellum* a besoin de 25 heures pour dégrader 50 % de la cellulose alors que 34 heures sont nécessaires lorsque la protéine multifonctionnelle et l'exoglucanase sont indépendantes.

En conclusion, trois types de synergie existent. La synergie intramoléculaire correspond à une synergie entre protéines situées au sein d'une enzyme multimodulaire (Fan, Werkman, & Yuan, 2009; Fan, Wagfschal, et al., 2009; Riedel & Bronnenmeier, 1998) (explications dans le chapitre 1. 11. III. b). En parallèle, la synergie endo/exo correspond à une synergie intermoléculaire entre deux protéines indépendantes. Pour finir, la synergie liée à la proximité, au niveau d'un minicellulosome, est également possible (Fierobe et al., 2002, 2001).

(2) Synergie entre une xylanase et une CE

Les groupements acétyles dans les matériels lignocellulosiques sont connus pour restreindre l'action des xylanases (Selig et al., 2009). En effet, l'action des CEs élimine certaines estérifications qui gênent l'accès à la chaîne principale de xylose, substrat des xylanases (Biely et al., 1986). La synergie entre des estérases et des xylanases a été décrite (Biely et al., 1986). Des études ont ainsi démontré que les FAEs agissaient en synergie avec des xylanases (Bartolomé et al., 1997; Faulds and Williamson, 1995) ou que l'action d'AXEs pouvait augmenter l'activité de xylanases (Dupont et al., 1996), notamment sur de la tige de maïs (Selig et al., 2008). La synergie entre une xylanase et une AXE est davantage développée car ces deux catégories d'enzymes sont utilisées dans cette thèse.

Par exemple, l'action de l'AXE nommée Axe6 et de la xylanase Xyn10E de *Fibrobacter succinogenes* sur du xylane acétylé de bouleau a été étudiée (Kam et al., 2005). Lorsque le substrat est prétraité avec la Xyn10E, la quantité d'acides acétiques relargués après action de

l'Axe6 est plus importante qu'en absence de prétraitement. En parallèle, lorsque le substrat est prétraité avec l'Axe6, la quantité de sucres réducteurs par action de Xyn10E est supérieure à celle produite après action de la xylanase mais sans prétraitement. Ces deux enzymes sont alors qualifiées de synergiques. En parallèle, l'action synergique entre la xylanase Xyn11 de *Volvariella volvacea* et l'acétyl xylane estérase AXEI de *V. volvacea* a été étudiée en comparant les actions séquentielles des enzymes individuelles et les actions simultanées des enzymes par rapport aux activités des enzymes seules sur du son de blé désamidonné (Zheng et al., 2013). Le plus haut degré de synergie est égal à 1,42, il a été obtenu après action de l'AXEI en premier puis action de Xyn11 lors d'une deuxième étape. A l'inverse, aucune synergie n'a été obtenue quand la xylanase a été utilisée en premier, suivie de l'AXEI (après inactivation de la xylanase). Par ailleurs, le degré de synergie s'accroît lors de l'augmentation de la quantité d'AXEI utilisée. Ces résultats confirment la nécessité d'enlever les groupes O-acétylés des résidus de xylose avant d'hydrolyser le son de blé par les xylanases.

D'autres projets ont montré qu'une xylanase et qu'une AXE, utilisées en même temps, pouvaient agir en synergie. Ainsi, Cybinski et collaborateurs ont travaillé avec la xylanase *NpXyn11A* et l'AXE *BnaA* de *N. patriciarium* sur du xylane acétylé de bouleau (Cybinski et al., 1999). La concentration de sucres réducteurs en présence des deux enzymes est supérieure à celle après action de *NpXyn11A* seule. Il y a donc synergie entre les deux enzymes. Une autre étude est basée sur la xylanase *XYL* de *Thermoascus aurantiacus* et de l'AXE de *T. reesei* lors de l'hydrolyse de paille de blé prétraitée hydrothermiquement (Zhang et al., 2011a). Le degré d'hydrolyse du xylane de la paille de blé prétraitée est de 11,3 % en présence des deux enzymes utilisées simultanément alors que pour la *XYL* seule le degré d'hydrolyse est égal à 9,8 %. Les résultats montrent que l'AXE pourrait enlever les groupements acétyles des xylanes dans le substrat et relarguer des fragments de xylanes, créant ainsi de nouveaux sites pour l'action de la *XYL* (Zhang et al., 2011a).

En conclusion, le clivage des groupements acétyles par voie chimique ou enzymatique augmente la disponibilité et le nombre de sites pour l'hydrolyse par la xylanase (Grohmann et al., 1989; Poutanen et al., 1990; Selig et al., 2009) et de plus petits xylooligosaccharides sont formés (Zhang et al., 2011a). Dans l'étude de Zhang et al 2011a, l'addition de l'AXE favorise la solubilisation du xylane jusqu'à un seuil, ce qui indique que l'AXE a clivé certains groupements acétyles des xylanes et a augmenté l'accessibilité du xylane pour la xylanase. Ainsi, le xylane de la paille de blé est davantage dégradé si le nombre d'acétylations diminue

(Grohmann et al., 1989), une relation linéaire a même été observée entre le relargage des groupements acétyles et celui de xylose dans l'hydrolyse de différents substrats de tiges de maïs avec une xylanase (XynA d'*Aspergillus niger*) et une AXE (Axe1 de *T. reesei*) (Selig et al., 2009).

b) Enzyme multimodulaire

Les enzymes multimodulaires peuvent présenter un ou plusieurs modules catalytiques et/ ou un plusieurs domaines non catalytiques comme un CBM. Des études ont mis en évidence la présence de nombreuses GHs microbiennes multimodulaires ciblant la paroi cellulaire et qui contiennent un ou plusieurs CBMs.

(1) Xylanase multimodulaire

Nous avons choisi de travailler avec une xylanase (Chapitre 1. 10. I) c'est pourquoi cette sous-partie traite plus particulièrement des enzymes multimodulaires contenant un module catalytique xylanase et un CBM. La présence d'un CBM pourrait augmenter la dégradation d'un substrat, selon la nature et les propriétés du module catalytique et du CBM. Par exemple, l'équipe de Moraïs a permis de comparer des enzymes sur des xylandes purifiés (de glumes d'avoine, de hêtre ou de bouleau) (Moraïs et al., 2010b). L'enzyme multimodulaire est composée du module catalytique de la xylanase Xyn11A de *Thermobifida fusca* et d'un CBM de la famille 2, spécifique des xylandes et de la cellulose. Ces deux modules ou seulement le module catalytique sont liés à une dockérine (car l'objectif de cette recherche est de créer des cellulosomes artificiels). La construction avec le CBM est celle qui a une activité spécifique (AS) la plus élevée sur les trois substrats. Par exemple sur le xylane de hêtre, l'AS pour la construction « xylanase + dockérine » est égale à 345 katal.mol⁻¹ alors qu'en présence du CBM c'est-à-dire pour la construction « xylanase + CBM + dockérine », l'AS est égale à 445 katal.mol⁻¹. Le CBM a donc un rôle important sur ces substrats purifiés. Les deux constructions de la xylanase sont ensuite testées avec une autre xylanase produite par *T. fusca* nommée Xyn10B sur de la paille de blé hachée. Lorsque la construction avec le module catalytique de Xyn11A et le module dockérine est mélangée à Xyn10B, l'AS est inférieure à celle du mélange de Xyn10B avec la construction « xylanase Xyn11A + CBM + dockérine ». Dans ce deuxième cas, le CBM permet d'augmenter l'action de l'enzyme.

D'autres études ont été réalisées avec une xylanase et un ou plusieurs CBMs mais en étudiant seulement l'affinité avec le ligand. On peut citer l'étude d'une xylanase (xylanase A de *Clostridium stercorarium*) naturellement associée à deux CBMs, pouvant reconnaître la cellulose ou le xylane de glumes d'avoine (Sun et al., 1998). L'adsorption a été mesurée pour les différentes constructions sur de la cellulose (ASC). La protéine entière s'adsorbe à 90 % alors que la construction sans le CBM initialement en position N-terminale (XynAΔC) ne s'adsorbe qu'à 6 %. Le CBM est donc indispensable pour reconnaître ce ligand. Lorsque le test est réalisé avec un autre ligand, le xylane de glumes d'avoine, la conclusion est identique. En effet, la construction sauvage s'adsorbe à 85 % alors que XynAΔC s'adsorbe à 7 %. Ces études ont montré l'importance de l'ajout d'un CBM pour dégrader différents substrats ou augmenter la reconnaissance de ligands (xylane ou paille de blé hachée). Cependant, à ma connaissance une seule étude a utilisé un substrat complexe tel que la paille de blé, sous forme hachée (Morais et al., 2010b).

(2) Enzyme multimodulaire avec le CBM3a

Nous avons choisi de travailler avec le CBM3a de la protéine CipA de *C. thermocellum* (Tormo et al., 1996) car ce CBM3a reconnaît fortement la cellulose. Ainsi, l'association entre l'endoglucanase de *Alicyclobacillus acidocaldrius* et plusieurs CBMs dont le CBM3a de la protéine CipA de *C. thermocellum* a été réalisée (Telke et al., 2012). L'AS de chaque construction a été déterminée sur différents substrats solubles contenant de la cellulose et des substrats insolubles cellulosiques comme l'Avicel et le papier filtre. La présence du CBM3a a fait augmenter l'AS d'un facteur 12,5 pour l'Avicel et d'un facteur 10 pour le papier filtre par rapport à l'endoglucanase seule. La liaison avec l'Avicel est le deuxième paramètre déterminé. Seulement 5 % de l'enzyme sauvage sont liés au ligand alors que 50 % de l'endoglucanase associée au CBM3a sont fixés sur ce ligand.

Ces données peuvent être nuancées car il a été montré à plusieurs reprises que l'ajout d'un CBM ne favorise pas toujours l'action du module catalytique. Ainsi, la xylanase D de *C. fimi* a été étudiée. Il s'agit d'une enzyme multimodulaire avec un CBM en interne qui reconnaît les xyloxyloses alors que le deuxième CBM, placé en C-terminal est spécifique de la cellulose (Black et al., 1995). L'AS pour la protéine sauvage, pour le domaine catalytique seul ou pour le domaine catalytique associé au CBM interne a été déterminée sur du xylane soluble de glumes d'avoine. L'AS est la plus importante pour le domaine catalytique seul (693 unités/mg d'enzyme) puis pour l'enzyme entière (678 unités/mg d'enzyme) et pour le domaine

associé au CBM (652 unités/mg d'enzyme). La présence du CBM n'améliore pas l'activité sur ce substrat. Une autre étude a montré que la présence du CBM entraînait une diminution de l'activité de la xylanase. En effet, Inoue et ses collègues ont travaillé avec la xylanase de *Talaromyces cellulolyticus* (GH10) qui est une enzyme multimodulaire avec le domaine catalytique et un CBM de la famille 1 (dont le ligand hypothétique est de la cellulose) (Inoue et al., 2015). L'activité sur de l'arabinoxylane de blé a été déterminée pour l'enzyme entière (21,9 U.nmol⁻¹) et pour le domaine catalytique seul (35,5 U.nmol⁻¹). Ainsi, l'activité est plus faible lorsque le module catalytique est associé à ce CBM.

A partir des données actuelles, il semble difficile de prédire si l'association entre le CBM3a et un domaine catalytique est intéressante pour augmenter l'activité catalytique.

(3) Enzyme multimodulaire avec plusieurs CBMs

Les CBMs présents dans une enzyme multimodulaire peuvent être des membres de différentes familles qui ciblent des ligands variés (Araki et al., 2004; Hogg et al., 2003).

Parmi les premiers CBMs en tandem découverts, il y a ceux associés à la xylanase 11A de *C. fimi* (Bolam et al., 2001). Ces deux CBMs étaient de la famille 2b. Plusieurs CBMs peuvent agir en synergie pour lier leur ligand cible. L'équipe de Linder (Linder et al., 1996) a montré une coopération dans une protéine artificielle contenant deux CBM1 liés de manière covalente. Cette protéine artificielle a une affinité pour la cellulose insoluble augmentée de 6 à 10 fois par rapport aux modules seuls. Le modèle proposé est que la liaison entre un CBM1 et le polysaccharide insoluble augmente l'affinité du deuxième module pour le ligand grâce à un effet de proximité. Ceci accroît l'affinité générale de la protéine. Ce modèle est aussi possible dans le cas de polysaccharides solubles. Un autre exemple de synergie entre CBMs de même famille provient de l'étude de Freelove et ses collaborateurs sur deux CBMs de famille 29 avec une affinité augmentée de 4 à 45 fois par rapport à un seul des CBMs (Freelove et al., 2001). Les informations obtenues par ces équipes suggèrent que les GHs associées à plusieurs CBMs ont une affinité plus importante pour les polysaccharides insolubles grâce aux interactions coopératives de ces modules (Bolam et al., 2001; Freelove et al., 2001; Linder et al., 1996). Ceci n'est pourtant pas un cas général (Abou Hachem et al., 2000; Gill et al., 1999; Hervé et al., 2010; Tomme et al., 1996). En conséquence, à chaque association entre une GH et plusieurs CBMs, l'enzyme multimodulaire doit être caractérisée.

Une autre raison possible à la présence de plusieurs CBMs est de diversifier les polysaccharides qui vont interagir avec l'enzyme et donc de dégrader différentes cibles de la paroi cellulaire (Blake et al., 2006). En effet, la présence de CBMs avec des spécificités différentes peut emmener l'enzyme vers plusieurs ligands potentiels. Pour rappel, la xylanase Xyn11A de *C. fimi* a un CBM interne (CBM2b1) et un CBM en C-terminal (CBM2b2). La xylanase entière se lie à la cellulose insoluble et aux xylandes insolubles alors que la forme sans le CBM2b2 peut interagir avec les xylandes mais n'a pas d'affinité pour la cellulose (Black et al., 1995). Le CBM2b1 interne interagit avec les xylandes mais n'a pas d'affinité significative pour la cellulose (Black et al., 1995; Simpson et al., 2000). La nature du polysaccharide ne serait pas le seul facteur important, il faudrait également prendre en compte l'environnement dans lequel il se trouve (la nature et les substitutions des polysaccharides par exemple) (Bolam et al., 2004; Hogg et al., 2003; Zhang et al., 2014).

(4) Importance du linker dans une enzyme multimodulaire

Un linker est souvent présent entre un domaine catalytique et un domaine non catalytique comme un CBM ou un module dockérine. Ce linker est riche en glycine et parfois en proline dans les chitinases de plante (Raikhel et al., 1993), riche en proline, thréonine et sérine dans les cellulases fongiques (Abuja et al., 1988; Tomme et al., 1988) ou dans les cellulases bactériennes (Langsford et al., 1987; Warren et al., 1986). Après l'étude de plusieurs banques de linkers, il apparaît que les résidus de thréonine, de glutamine et de proline sont les résidus majoritaires (Argos, 1990; George and Heringa, 2003). Cependant, les deux études ont mis en évidence d'autres résidus qui sont variables. La sérine, la glycine, l'alanine, l'acide aspartique, la lysine et l'asparagine sont des résidus importants d'après la première étude (Argos, 1990) alors que la deuxième étude a souligné l'intérêt des résidus de phénylalanine, d'arginine et d'acide glutamique (George and Heringa, 2003). Ceci fait ressortir la complexité des linkers.

Le consensus général pour les linkers est une taille moyenne de 65 résidus (Argos, 1990). Par ailleurs, il s'agit de connecteurs flexibles entre des domaines qui permettent le repliement indépendant des domaines et leur fonctionnement (Gilbert et al., 1990). De plus, leur haut degré de glycosylation leur permet d'accroître leur stabilité à la protéolyse et ainsi de limiter fortement le clivage entre les modules fusionnés (Shen et al., 1991; Srisodsuk et al., 1993). La présence de glycosylation limite également la flexibilité des régions des linkers riches en proline et thréonine (Poon et al., 2007). Par ailleurs, les linkers décrits dans cette étude se lient

dynamiquement et de manière non spécifique avec la surface de cellulose et participent ainsi à l'action du CBM. L'ensemble des résultats suggère que les linkers dans de nombreuses enzymes de dégradation de la lignocellulose sont susceptibles d'être optimisés dans leur longueur et leur séquence pour jouer un rôle plus direct dans l'interaction avec les parois cellulaires végétales (Payne et al., 2013; Sammond et al., 2012). Il a également été décrit qu'un linker hyperglycosylé pourrait avoir un rôle positif dans la sécrétion, en augmentant le rendement de production (Levasseur et al., 2005).

La comparaison de séquences de linkers pour des cellulases et des xylanases a permis de mettre en évidence des points communs. Il y a parfois des petites séquences d'acides aminés répétées riches en proline, en sérine ou en thréonine (Gilkes et al., 1991). Un taux important d'aspartate ou de glutamate est parfois relevé. Certaines caractéristiques sont conservées dans une famille de GH donnée comme la longueur du linker, la position des glycosylations et le contenu en acides aminés. Ces caractéristiques sont différentes dans au moins deux familles de GHs, les GH6 et les GH7 avec par exemple, 42 résidus en moyenne pour un linker associé à une GH6 contre 30 résidus pour une GH7 (Sammond et al., 2012).

La suppression d'un linker peut, dans certains cas, diminuer l'activité de l'enzyme associée. Par exemple, l'étude de Black et de ses confrères sur la xylanase A des sous-espèces *cellulosa* de *Pseudomonas fluorescens* associée dans la Nature à un CBM spécifique de la cellulose par un linker montre que lorsque le linker est enlevé de la xylanase, l'activité de l'enzyme sur du xylane de glumes d'avoine (Black et al., 1996) ou sur un substrat complexe composé de cellulose et d'hémicelluloses est diminuée (Black et al., 1997). Dans le cas de l'endoglucanase A produite par *C. fimi* sans linker entre cette enzyme et le CBM spécifique de la cellulose, l'activité sur la cellulose (sous forme soluble ou cristalline) est inférieure à l'enzyme sauvage (Shen et al., 1991). Par exemple, sur de l'Avicel l'activité de l'enzyme sauvage et celle de l'enzyme sans linker est égale à 25,3 millikatal.mol⁻¹ et 15,03 millikatal.mol⁻¹ respectivement.

Cependant, cela ne peut pas être généralisé car certaines enzymes ont la même activité en présence ou en l'absence du linker. Ainsi, une étude a porté sur la xylanase A (XYLA) des sous espèces *cellulosa* de *Pseudomonas fluorescens*. L'activité catalytique de l'enzyme sur du xylane soluble et sur du xylane insoluble n'est pas altérée par l'absence du linker (Ferreira et al., 1990). Un autre exemple provient de l'arabinofuranosidase et du CBM (reconnaissant la cellulose) produits par *Pseudomonas fluorescens* des sous-espèces *cellulosa*. L'enzyme a la

même activité sur de l'arabinoxylane soluble lorsque la protéine a un linker ou n'en a pas (Black et al., 1997).

Etonnamment, pour certaines enzymes, l'influence du linker sur l'activité catalytique dépend du substrat étudié. Ceci est illustré par le linker d'une cellobiohydrolase de *T. reesei*. L'absence du linker n'a pas altéré l'activité pour la cellulose soluble mais l'activité est réduite sur les substrats cristallins (Srisodsuk et al., 1993). Dans le cas d'une diminution de l'activité de l'enzyme, il semblerait que cela ne reflète pas un repliement incorrect de l'enzyme mais serait probablement une conséquence d'une gêne stérique à cause de la forte proximité entre le domaine catalytique et le CBM (Black et al., 1997).

L'étude de Payne porte sur les cellobiohydrolases *TrCel6A* et *TrCel7A* de *T. reesei* qui ont chacune un CBM spécifique de la cellulose. Ces travaux démontrent que l'affinité d'un CBM est plus grande lorsqu'il est associé à un linker (Payne et al., 2013). Ceci a également été conclu pour une protéine artificielle contenant la GST, un CBM spécifique de la cellulose et un linker entre ces deux modules. La suppression du linker a entraîné la perte de la liaison avec la cellulose (Quentin et al., 2002).

D'autres propriétés sont modifiées par le linker comme l'adsorption de la cellobiohydrolase I de *T. reesei* sur la cellulose qui est diminuée en l'absence du linker (Srisodsuk et al., 1993). En parallèle, Shen et son équipe ont enlevé le linker de l'endoglucanase A de *C. fimi* ce qui a influencé les propriétés d'élution, a diminué la résistance à une protéase et a entraîné un changement d'orientation des deux domaines (l'endoglucanase et le CBM spécifique de la cellulose) (Shen et al., 1991).

De plus, un groupe a étudié l'influence de la longueur du linker sur l'activité d'une endoglucanase (*Cel5A* produite par *Thermobifida fusca*) (Caspi et al., 2009). Sur CMC (carboxyméthylcellulose, cellulose soluble), la construction avec le linker le plus long (22 résidus) est la plus active alors que sur PASC (cellulose amorphe insoluble) la construction avec 9 résidus est moins efficace que la construction avec un linker de 22 résidus ou la construction sans linker. En parallèle, une équipe a cherché la longueur optimale du linker associé à une enzyme (Robinson and Sauer, 1998). Selon l'objectif de l'étude, la longueur optimale est différente. Ainsi, le repliement de l'enzyme est meilleur si le linker contient 13 résidus alors que la stabilité de l'enzyme est améliorée lorsque la longueur du linker est égale à 19 résidus. Cependant, la stabilité est diminuée s'il y a au moins 11 résidus (Robinson and Sauer, 1998).

12. Suivi de l'hydrolyse d'un substrat complexe par immunocytochimie

I. Généralités sur l'immunocytochimie

Un grand nombre de marquages colorimétriques permettant de visualiser les différents constituants de la paroi végétale sont disponibles, comme le marquage des β -glucanes par du carmin (Mondolot et al., 2001) ou du calcofluor (Calcofluor white) (Sauter et al., 1993) ou le marquage de la cellulose avec du Pontamine (Pontamine fast Scarlet 4B) (Hoch et al., 2005). Il est également possible d'utiliser du bleu de Toluidine (Toluidine blue O) qui va bloquer l'autofluorescence afin d'améliorer l'observation des autres marquages (Knox, 2012). Des sondes moléculaires comme les anticorps monoclonaux (Knox et al., 1989) et les CBMs (McCartney et al., 2004) spécifiques des composés des parois végétales sont utilisés pour étudier la composition en polysaccharides dans leur environnement, pour mieux comprendre l'architecture des parois cellulaires et la régulation du développement de ces structures. Les premières études sur l'immunolocalisation d'antigènes de paroi cellulaire végétale concernaient la paroi du pollen (Knox et al., 1970) et les polysaccharides d'algues (Vreeland, 1970).

II. Sonde : anticorps monoclonal ou CBM

Un large panel d'anticorps monoclonaux (Tableau 14) et de CBMs (Tableau 15) recombinants a déjà été développé (www.biosupplies.com.au, www.carbosource.net, www.plantprobes.net). Les anticorps monoclonaux sont utilisés comme sondes car ils sont spécifiques d'un polymère connu. A l'origine, les anticorps ont été utilisés pour les tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay en anglais) pour la détection d'un épitope précis. L'anticorps primaire va se lier à son ligand si celui-ci est présent dans le matériel d'étude. La spécificité d'un anticorps secondaire pour l'anticorps primaire permet de détecter l'anticorps primaire et donc l'épitope de celui-ci. L'anticorps secondaire peut être lié à une molécule fluorescente comme le FITC (fluorescein isothiocyanate) (Casero and Knox, 1995) ou à une enzyme comme la phosphatase alcaline (Moller et al., 2008). Dans ce cas de figure, le substrat de l'enzyme sera ajouté et après réaction enzymatique, le produit sera détecté. Ces sondes moléculaires sont des outils puissants dans l'étude des rôles biologiques des glucanes

mais leur production est compliquée (coût, temps...). Parmi tous les anticorps, les anticorps LM10 et LM11 sont très utilisés. Le LM10 se fixe sur les β -(1,4) xylanes non substitués, retrouvés sur les régions internes des renflements de la paroi cellulaire alors que le LM11 se lie aux β -(1,4) xylanes non substitués mais également aux arabinoxylanes substitués. Ces molécules sont par exemple situées aux jonctions (régions externes) entre cellules du collenchyme de tabac (Hervé et al., 2009).

Tableau 14 : Classement des anticorps monoclonaux utilisés principalement comme sonde.

nom	spécificité	caractérisation de l'anticorps
1C7	pectine en présence de calcium	(Liners et al., 1989)
2F4	pectine en présence de calcium	(Liners et al., 1989)
4A12	glycoprotéine riche en hydroproline	(Moller et al., 2008)
4B11	glycoprotéine riche en hydroproline	(Moller et al., 2008)
4B12	glycoprotéine riche en hydroproline	(Moller et al., 2008)
7F7	pectine en présence de calcium	(Liners et al., 1989)
8H11	glycoprotéine riche en hydroproline	(Moller et al., 2008)
10E10	glycoprotéine riche en hydroproline	(Moller et al., 2008)
BS 400-2	β -(1,3)-glucane	(Meikle et al., 1991)
BS 400-3	β -(1,3)-(1,4)-glucane	(Meikle et al., 1994)
BS 400-4	β -(1,4)-mannane/ galactomannane	(Pettolino et al., 2001)
CCRC-M1	xyloglucane fucosylé	(Puhlmann et al., 1994)
CCRC-M2	rhamnogalacturonane I	CarboSource
CCRC-M7	rhamnogalacturonane I	CarboSource
CCRC-M14	rhamnogalacturonane I	CarboSource
CCRC-M16	rhamnogalacturonane I	CarboSource
CCRC-M34	homogalacturonane	(Pattathil et al., 2010)
CCRC-M38	homogalacturonane	CarboSource
CCRC-M39	xyloglucane	CarboSource
CCRC-M58	xyloglucane	CarboSource
CCRC-M87	xyloglucane	CarboSource
CCRC-M89	xyloglucane	CarboSource
JIM1	rhamnogalacturonane I	(Pattathil et al., 2010)
JIM4	arabinogalactane glucane protéine	(Knox et al., 1989)
JIM5	homogalacturonane court avec partiellement des méthyles estérifiés	(Vandenbosch et al., 1989; Willats et al., 1999b)
JIM6	β -(1,3)-glucane	(Pedersen et al., 2012)
JIM7	homogalacturonane partiellement méthyle estérifié	(Willats et al., 2000)
	ligand avec 35-90 % d'estérification	(Knox et al., 1990)
JIM8	galactose lié à un arabinose, un rhamnose ou un acide glucuronique méthylé	(Knox et al., 1991; Pennell et al., 1991)
JIM11	rhamnogalacturonane I	(Pattathil et al., 2010; Smallwood et al., 1994)
JIM12	rhamnogalacturonane I et arabinane linéaire ou branché	Pattathil et al., 2010; Smallwood et al., 1994)
JIM13	arabinogalactane glucane protéine	(Knox et al., 1991)
JIM14	glucoronyle (1,2)- α -(1,4)- β -D-xylotriase	(Knox et al., 1991; Pedersen et al., 2012)
JIM15	arabinogalactane glucane protéine	(Knox et al., 1991)
JIM16	rhamnogalacturonane I	(Knox et al., 1991; Pattathil et al., 2010)
JIM19	rhamnogalacturonane I et arabinane linéaire ou branché	(Knox et al., 1995; Pattathil et al., 2010)
JIM20	rhamnogalacturonane I	(Smallwood et al., 1994)
JIM93	rhamnogalacturonane I	(Pattathil et al., 2010)
JIM94	rhamnogalacturonane I	(Pattathil et al., 2010)

JIM131	rhamnogalacturonane I	(Pattathil et al., 2010)
JIM132	rhamnogalacturonane I	(Pattathil et al., 2010)
LM1	extensine	(Smallwood et al., 1995)
LM2	arabinogalactane glucane protéine	(Smallwood et al., 1996; Yates et al., 1996)
LM5	β -(1,4)-galactane	(Jones et al., 1997)
LM6	α -(1,5)-L-arabinane	(Willats et al., 1998)
LM7	homogalacturonane des pectines	(Willats et al., 2001)
	homogalacturonane partiellement méthyle estérifié	(Clausen et al., 2003)
LM8	xylogalacturonane	(Willats et al., 2004)
LM9	galactane avec des féruloyle liés en β -(1,4)	(Clausen et al., 2004)
LM10	β -(1,4)-xylane peu ou pas substitué	(McCartney et al., 2005)
LM11	xylane	(McCartney et al., 2005)
LM12	résidu féruloyle attaché à un sucre	(Pedersen et al., 2012)
LM13	α -(1,5)-L-arabinane	(Moller et al., 2008)
LM14	glucoronyle (1,2)- α -(1,4)- β -D-xylotriose	(Moller et al., 2008; Pedersen et al., 2012)
LM15	xyloglucane fucosylé ou non fucosylé	(Marcus et al., 2008)
LM16	résidu galactosylé ou l'extrémité d'un galactane d'un rhamnogalacturonane I	(Verhertbruggen et al., 2009b)
LM17	α -(1,5)-L-arabinane	(Verhertbruggen et al., 2009b)
LM18	homogalacturonane	(Verhertbruggen et al., 2009a)
LM19	homogalacturonane	(Verhertbruggen et al., 2009a)
LM20	homogalacturonane	(Verhertbruggen et al., 2009a)
LM21	mannane	(Ordaz-Ortiz et al., 2009)
LM22	mannane	(Marcus et al., 2010)
LM23	xylane non acétylé	(Pedersen et al., 2012)
LM24	xyloglucane avec des substitutions galactosyles	(Pedersen et al., 2012)
LM25	xyloglucane avec des substitutions galactosyles	(Pedersen et al., 2012)
LM27	glucuronoarabinoxylane	(Cornuault et al., 2015)
LM28	xylane contenant du glucuronyle	(Cornuault et al., 2015)
MAC204	rhamnogalacturonane I	(Pattathil et al., 2010; Vandenbosch et al., 1989)
MAC207	rhamnogalacturonane I et arabinane linéaire ou branché	(Pattathil et al., 2010; Pennell et al., 1989)
MAC236	glycoprotéine	(Vandenbosch et al., 1989)
MAC265	glycoprotéine	(Vandenbosch et al., 1989)
PAM1	homogalacturonane non estérifié	(Willats et al., 1999a)

Tableau 15 : Classement des CBMs utilisés comme sonde.

nom	spécificité	découverte du CBM	utilisation du CBM en immunocytochimie
CBM1	cellulose cristalline	(Hildén et al., 2003)	(Hildén et al., 2003)
CBM2a	cellulose cristalline	(McCartney et al., 2004)	(McCartney et al., 2004)
CBM2b1-2	xylane	(Bolam et al., 2001)	(McCartney et al., 2006)
CBM3a	cellulose cristalline	(Tormo et al., 1996)	(Blake et al., 2006; Ding et al., 2006)
CBM4-2	xylane	(Abou Hachem et al., 2000)	(McCartney et al., 2006)
CBM6	xylane	(Boraston et al., 2002a)	(McCartney et al., 2004)
CBM9-2	cellulose	(Boraston et al., 2001)	(Blake et al., 2006)
CBM10	cellulose cristalline	(Gill et al., 1999)	(Blake et al., 2006)
CBM15	xylane	(Szabó et al., 2001)	(McCartney et al., 2006)
CBM17	cellulose amorphe	(Boraston et al., 2000)	(Blake et al., 2006)
CBM22	β -(1,4)-xylane	(Charnock et al., 2000)	(McCartney et al., 2006)
CBM27	mannane	(Filonova et al., 2007)	(Filonova et al., 2007)
CBM28	cellulose amorphe	(Boraston et al., 2002b)	(Blake et al., 2006)
CBM29-1-2	glucomannane	(Freelove et al., 2001)	(McCartney et al., 2004)
CBM29-2	glucomannane	(Freelove et al., 2001)	(McCartney et al., 2004)
CBM35	mannane	(Bolam et al., 2004)	(McCartney et al., 2006)

Une autre possibilité consiste à utiliser des CBMs à la place des anticorps primaires (McCartney et al., 2004). Les CBMs avec un tag histidine peuvent être détectés par des anticorps anti-histidine (produits par des souris). Des anticorps anti-anticorps de souris (couplés au FITC) permettent de détecter les CBMs. Cette méthode est avantageuse par rapport au couplage direct du CBM avec le tag fluorescent qui pouvait inactiver la protéine (McCartney et al., 2004). Le couplage direct a été testé pour la première fois par Din (Din et al., 1991) puis repris par plusieurs équipes (Hildén et al., 2003; McCartney et al., 2004).

Les CBMs présentent quelques avantages par rapport aux anticorps : leur taille, leur spécificité et leur capacité à reconnaître un sucre dans son environnement. Lorsque la structure et la séquence du CBM sont connues, des études de mutagenèse permettraient d'obtenir des CBMs avec de nouvelles spécificités. La plupart des CBMs utilisés comme sondes pour les polymères de la paroi cellulaire sont d'origine microbienne bien qu'il existe des CBMs dans les enzymes de plantes, intéressants à caractériser selon leur liaison avec des parois cellulaires (Urbanowicz et al., 2007).

Les différences de liaison des sondes mettent en évidence l'hétérogénéité des parois cellulaires, la nature complémentaire de tous les types de sondes et elles confirment l'intérêt d'un recoupement de CBMs et d'anticorps pour la visualisation de polysaccharides et des procédés enzymatiques de dégradation (Hervé et al., 2009).

III. Exemples d'utilisation de CBMs en immunocytochimie

Les CBMs utilisés comme sondes moléculaires permettent d'avoir de nouvelles informations, souvent plus précises sur la composition du substrat étudié. En effet, un anticorps a une taille d'environ 10 nm alors qu'un CBM est plus petit (1 à 2 nm) ce qui permet au CBM d'accéder à des épitopes non accessibles pour un anticorps (Figure 27).

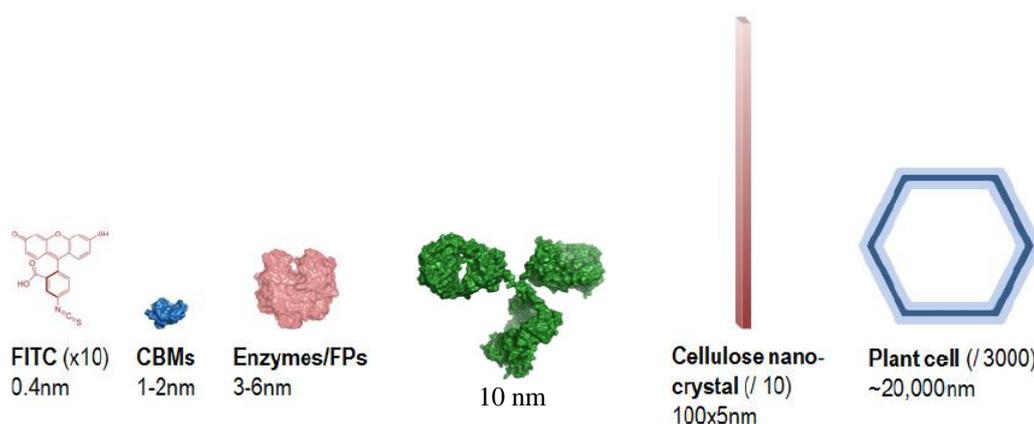


Figure 27 : Comparaison de fluorophores, sondes et éléments de la paroi cellulaire. Les éléments ne sont pas à l'échelle à cause de leur taille réelle. FP : protéine fluorescente. D'après (L. J. Harris et al., 1997; Paës, 2014).

Différentes études montrent l'abondance des xylanes dans les parois secondaires des dicotylédones (Ebringerová and Heinze, 2000; McCartney et al., 2005). Par exemple pour le tabac, les parois secondaires des cellules associées avec des tissus vasculaires ont de nombreux xylanes relativement non substitués (Hervé et al., 2009). Dans cette étude, les xylanes ont été détectés dans les parois cellulaires comme l'épiderme mais pas dans le parenchyme (Hervé et al., 2009). Par ailleurs, les mannanes sont abondants dans les parois secondaires (Auxtová et al., 1995) ; ils apparaissent avoir des rôles structurels (Handford et al., 2003). Les mannanes sont retrouvés chez *Physcomitrella* (il s'agit d'une espèce de mousse) dans les jonctions intracellulaires mais aussi dans les parois cellulaires les plus fines (Zhang et al., 2014). Ces informations, associées à celles de l'étude d'Hervé et collaborateurs indiquent que les polysaccharides retrouvés dans les espaces intercellulaires où la cellulose est susceptible d'être absente, peuvent être à l'abri des enzymes et pourraient être récalcitrants à une attaque biologique (Hervé et al., 2010; Zhang et al., 2014).

Il est également possible de détecter la présence de polysaccharides dans des substrats complexes avant et après dégradation par une enzyme. Cette réaction enzymatique fait

disparaître le ligand du CBM ou au contraire permet la détection d'un ligand caché préalablement par le substrat de l'enzyme. Par exemple, les épitopes xyloglucane (Marcus et al., 2008), xylane (Hervé et al., 2009) et mannane (Marcus et al., 2010) peuvent être masqués dans les parois cellulaires primaires par la présence d'homogalacturonanes pectiques. Ainsi, l'environnement des xylanes dans les parois primaire et secondaire influence leur disponibilité pour la reconnaissance par des protéines (Hervé et al., 2009). Par ailleurs, la dégradation de l'épitope peut être mesurée selon la concentration en enzyme. Ceci a été réalisé par l'équipe de Zhang concernant la dégradation par des mannanases sur des sections de tiges de tabac *via* l'anticorps fluorescent LM21 dirigé contre les mannanes. Il y a une corrélation directe entre la concentration en enzyme GH5 utilisée et la dégradation des xylanes du tabac. A l'inverse, il existe une concentration seuil en GH26 pour laquelle tout ajout n'entraînera pas de dégradation supplémentaire des mannanes du tabac. Le même type d'expérience réalisé sur *Physcomitrella* a mis en évidence une proportion de mannanes résistants à l'attaque des deux enzymes (Zhang et al., 2014).

Un autre cas d'étude correspond à une comparaison de ligands détectés par différentes sondes (CBMs et/ ou anticorps). L'environnement précis du polymère reconnu va influencer sur sa possible détection. En effet, différents travaux ont mis en évidence la distinction entre des sondes qui reconnaissaient le même polymère en solution mais permettaient de détecter des polymères différents sur un substrat plus complexe comme des parois intactes de cellules (Blake et al., 2006; Hervé et al., 2010, 2009; McCartney et al., 2006; Zhang et al., 2014). Le contexte dans lequel les polysaccharides sont dans les parois cellulaires influence considérablement la spécificité des enzymes de dégradation. Ceci permet d'expliquer leur structure complexe composée de plusieurs modules (Zhang et al., 2014). En effet, ceci reflète probablement le rôle central joué par les CBMs annexés aux hydrolases bactériennes de paroi cellulaire, dans les procédés de dégradation (Hervé et al., 2009; Ordaz-Ortiz et al., 2009). Cette variation de reconnaissance du ligand *in muro* montre l'interaction des polysaccharides cibles avec d'autres composants de la paroi cellulaire. Ainsi, il existerait des microenvironnements dans les parois cellulaires, susceptibles d'influencer l'accès des protéines ou enzymes à des cibles spécifiques. De plus, lorsque ni l'anticorps ni le CBM fluorescent (molécule plus petite qu'un anticorps, Figure 27) dirigés contre le mannane ne se lient spécifiquement il ne s'agit pas toujours d'un problème d'accessibilité au ligand. Le polymère peut être masqué ou absent (Marcus et al., 2010). La capacité des

homogalacturonanes pectiques à bloquer l'accès des sondes et des enzymes a des conséquences sur la compréhension de la déconstruction des parois cellulaires et de la biologie de ces parois (Hervé et al., 2010).

La détection d'un polymère dans un substrat complexe par un CBM peut aussi comporter des difficultés. Dans certains cas, un anticorps peut reconnaître son épitope alors que le CBM (ayant le même épitope) ne permettra pas de le détecter. Par exemple, dans une étude d'Hervé, les xylanes présents dans les parois secondaires de la tige de tabac sont détectés par l'anticorps LM11 après l'action d'une xylanase alors que le CBM15 (présent dans la xylanase *CjXyn10C* de *Cellvibrio japonicus*) ne détecte pas son épitope. Il apparaît que la liaison CBM-épitope est plus sensible que la liaison anticorps-épitope. Si les CBMs reconnaissent seulement des xylanes exposés, ils ne se lient pas avec des xylanes plus enchevêtrés dans les composants de la paroi cellulaire. Ceci expliquerait la différence de détection entre l'anticorps et le CBM après action enzymatique (Hervé et al., 2009)

IV. Immunocytochimie et suivi d'hydrolyse d'un substrat complexe

Différentes études utilisant l'immunocytochimie ont été réalisées, notamment dans le groupe de Knox. Le tabac est un substrat largement étudié (Hervé et al., 2009; Marcus et al., 2008; McCartney et al., 2005) ainsi que le pois (Blake et al., 2008; McCartney et al., 2000). On retrouve des études sur *Arabidopsis thaliana* (Blake et al., 2008; Handford et al., 2003; Orfila et al., 2005), une plante utilisée comme modèle ou sur la tomate (Ordaz-Ortiz et al., 2009; Orfila and Knox, 2000) et le maïs (McCartney et al., 2004).

Par exemple, l'activité catalytique de plusieurs enzymes ayant le même substrat peut être comparée dans deux conditions : avec un substrat soluble et avec un substrat complexe. L'équipe de Gilbert a étudié la dégradation des cellules de tabac par deux mannanases, une GH5 et une GH26. Les résultats sont surprenants car dans le cas des mannanes solubles la GH26 est l'enzyme la plus active. Au contraire, la GH5 est la plus active sur les mannanes intégrés à une paroi cellulaire (Zhang et al., 2014). Ceci avait déjà été observé pour les xylanases des familles GH10 et GH11. Les enzymes classées dans la famille GH11 dégradent davantage les xylanes solubles alors que celles de la famille GH10 sont plus actives sur des xylanes incorporés dans une paroi (Hervé et al., 2010, 2009; Pell et al., 2004; Vardakou et al., 2008). Ceci corrèle avec la topologie des sites de liaison au substrat des GH10 et GH11. Dans

les enzymes de la famille GH11, la fente de liaison est étroite et profonde et peut ainsi adapter des chaînes de xylanes simples. Dans les enzymes de la famille GH10, les xylanes en interaction avec d'autres polymères de la paroi cellulaire accèdent au site plus large. Par conséquent, il est probable que les GH10 n'aient pas besoin d'un CBM pour hydrolyser les xylanes qui sont en association avec d'autres composés de la paroi cellulaire alors que les GH11 bénéficieront de la fonction de ciblage de ces modules pour déconstruire certaines structures (Hervé et al., 2010, 2009).

Notre substrat d'étude, la paille de blé a été déjà étudiée dans d'autres contextes (Burlat et al., 1997). Le substrat le plus proche déjà étudié par immunocytochimie est le grain de blé (McCartney et al., 2005; Philippe et al., 2006). Une partie de ces projets a pour but de mieux connaître les sondes (anticorps monoclonal ou CBM) (Blake et al., 2008; McCartney et al., 2004) ou de les comparer entre-elles (McCartney et al., 2006). En dégradant le substrat complexe par une mannanase (Ordaz-Ortiz et al., 2009), une pectate lyase (Blake et al., 2008) ou une estérase (Marcus et al., 2010) certains épitopes apparaissent alors qu'ils étaient masqués par la matrice très dense de la paroi cellulaire ou au contraire, les épitopes peuvent disparaître lorsqu'ils sont dégradés par l'enzyme.

Une autre partie des travaux d'immunocytochimie porte sur l'étude de la dégradation du substrat par des enzymes multimodulaires directement sur des coupes afin de choisir le CBM favorisant l'hydrolyse. Pour cela, une enzyme est associée à différents CBMs (Hervé et al., 2010). Il a été montré que la meilleure association entre un CBM et une enzyme est dépendante des propriétés de ces deux modules. Par exemple, la pectate lyase Pel10A produite par *Cellvibrio japonicus* est plus efficace avec le CBM2a (ciblant la cellulose cristalline) sur le tabac parmi un panel de CBMs testés (ciblant la cellulose cristalline ou les xylanes). A l'inverse, il est plus intéressant d'associer le CBM2b1-2 reconnaissant les xylanes avec l'arabinofuranosidase (Araf51A produite par *Cellvibrio japonicus*) (Hervé et al., 2010). Un travail similaire a été réalisé par l'équipe de Gilbert (Zhang et al., 2014) qui a montré qu'il est nécessaire de prendre en compte le substrat complexe dans le choix du CBM à associer à une enzyme. En effet, la mannanase *CjMan5A* produite par *Cellvibrio japonicus* liée à un CBM ciblant la cellulose cristalline (le CBM3a utilisé dans ces travaux) dégradera davantage le tabac alors qu'il est avantageux d'ajouter un CBM spécifique des mannanes (le CBM27 de

la mannanase Man5A de *Thermotoga maritima*) avec la même mannanase pour digérer des coupes de *Physcomitrella*.

Ainsi, il a été mis en évidence que les liaisons entre un CBM et sa cible sont différentes entre un polysaccharide partiellement purifié et un polysaccharide inclu dans les parois intactes de cellules. Ceci a également été observé pour des modules catalytiques et leur substrat. Cela est lié à l'environnement des polysaccharides dans les parois primaire et secondaire qui influence leur disponibilité pour la reconnaissance par des protéines. Les cibles peuvent aussi être masquées par d'autres polysaccharides et donc ne pas être reconnues par la sonde ou l'enzyme. Ceci met en évidence l'importance de travailler sur un substrat complexe, d'utiliser plusieurs sondes et de digérer le substrat avec des enzymes.

Par ailleurs, l'interprétation de résultats immunocytochimiques est complexe. Une sonde peut indiquer la présence d'une classe de polymères mais ceux-ci sont très complexes et peuvent avoir des motifs de branchement nombreux et variés. L'absence de liaison de la sonde pourrait indiquer un polymère altéré structurellement ou un épitope masqué par d'autres polymères de la paroi comme alternatives à l'absence d'une classe de polymères (Marcus et al., 2008).

13. Problématiques de la thèse

Comme décrit ci-dessus, les microorganismes déconstruisent la paroi végétale à l'aide de nombreuses enzymes et selon plusieurs stratégies (enzymes libres ou associées dans un cellulosome). Cette déconstruction peut également être favorisée si les enzymes sont multimodulaires, avec la présence ou non d'un CBM. Malgré l'étude des différentes stratégies présentes dans la Nature, de nombreuses questions restent en suspens. Comment sont choisies les enzymes présentes dans un cellulosome ? L'ordre des enzymes au sein du cellulosome est-il important ? Cet ordre est-il aléatoire ou dirigé par la bactérie ? La distance entre enzymes influence-t-elle la dégradation ? En quoi la composition ou la structure de la paroi impacte l'organisation du cellulosome ? Les enzymes cellulosomales sont-elles aussi flexibles que lorsqu'elles sont libres ? Et dans le cas d'enzymes sécrétées, est-ce qu'elles pourraient se lier entre-elles pour se concentrer au niveau du substrat afin de le dégrader ? Le comportement des enzymes en présence d'un substrat simple est-il le même qu'en présence d'un substrat complexe ? Cette thèse ne vise pas à répondre à toutes ces questions mais l'objectif est de

comprendre comment les microorganismes dégradent la biomasse lignocellulosique dans la Nature.

Ce travail se base sur une alternative à l'étude de protéines multimodulaires, *via* le système Bio Molecular Welding, en associant à façon différents domaines. La première hypothèse est que l'ajout de Jo ou In à une extrémité d'un domaine catalytique ou un CBM n'altèrera pas les propriétés biochimiques du domaine. La deuxième hypothèse est que la complexité du substrat, lorsque celui-ci ne contient pas seulement la cible de l'enzyme (soit un polymère de xylose dans le cas de l'étude d'une xylanase), influence l'activité enzymatique. La troisième hypothèse est l'importance du contexte dans lequel se trouve la cible de l'enzyme c'est-à-dire si le substrat est utilisé sous forme broyé ou coupé ou entier. Ce contexte pourrait entraîner une modification de l'activité enzymatique.

Ainsi, grâce aux protéines Jo et In il sera possible d'associer à façon différents domaines (catalytiques et non catalytiques) en mimant le rôle des protéines cohésine et dockérine dans un cellulosome. Avant de poursuivre nos études, il est important de vérifier les propriétés biochimiques de chaque construction afin de valider cette approche (Chapitre 3). L'activité d'une enzyme multimodulaire composée d'un module catalytique xylanase et d'un CBM, a été comparée sur différents substrats par rapport à l'activité du module catalytique seul (Chapitre 4). En effet, existe-t-il une corrélation entre des activités enzymatiques réalisées *in vitro* sur des substrats plus ou moins purifiés ? Le comportement d'une enzyme multimodulaire sur des substrats purifiés est-il le même ? Pour cela, différents substrats sont disponibles, du substrat purifié au substrat complexe afin d'augmenter au fur et à mesure la complexité. Deux substrats complexes ont été choisis, le son et la paille de blé.

L'originalité de ce travail de thèse repose également sur une analyse de l'activité enzymatique réalisée *in muro* sur des coupes de paille de blé par immunocytochimie. L'objectif est de savoir s'il existe une corrélation entre des activités enzymatiques réalisées *in vitro* sur des substrats plus ou moins purifiés et une activité réalisée *in muro* sur des coupes (Chapitre 5). Plusieurs pistes de travail seront également entreprises dans cette thèse. Par exemple, j'ai initié un travail sur les six acétyl xylane estérases précédemment décrites afin d'étudier leur impact sur l'activité de la xylanase sur des substrats complexes (Chapitre 6).

Chapitre 2

Matériels et méthodes

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

L'eau utilisée pour préparer les tampons ou diluer les échantillons est de l'eau déminéralisée (Veolia Elga ELECT50, EL50E2611015) sauf quand cela est précisé. L'eau milliQ est produite par le Flex PF2L260088 (Elga, Veolia). Les milieux de culture et les tampons sont autoclavés avec l'autoclave Sanoclav Adolf Wolf, 20 minutes à 121 °C. La majorité des produits chimiques sont fournis par Sigma Aldrich, cela sera spécifié pour les produits venant d'un autre fournisseur.

1. Biologie moléculaire

I. Plasmides utilisés

a) Liste des plasmides

Les différents plasmides utilisés sont dans le Tableau 16. Les informations sur les séquences plasmidiques et protéiques des protéines utilisées sont dans l'annexe 1. Le plasmide pUC17 est un plasmide qui a été commandé, il contient un gène d'intérêt ainsi que des sites de restriction à ses extrémités.

Tableau 16 : Liste des plasmides utilisés.
Amp : ampicilline ; Cm : chloramphénicol ; Kan : kanamycine ; ^R : résistance.

plasmide	taille (bp)	phénotype/ génotype	référence
pACYCDuet	4008	Tag H, Cm ^R , T7, <i>lacI</i>	Novagen
pADG16		Tag H, Kan ^R , T7, <i>lacI</i>	Equipe de T. Vernet et A. M. Di Guilmi (Equipe Pneumocoque, Institut de Biologie Structurale)
pDEST17	6354	Tag H, Amp ^R , T7	Invitrogen
pETDuet	5420	Tag H, Amp ^R , T7, <i>lacI</i>	Novagen
pET16b	5711	Tag H, Amp ^R , T7, <i>lacI</i>	Novagen
pET22b	5493	Tag H, Amp ^R , T7, <i>lacI</i>	Novagen
pET28a	5369	Tag H, Kan ^R , T7, <i>lacI</i>	Novagen
pUC57	2710	Kan ^R ou Amp ^R , <i>lacZ</i>	Genewiz

b) Système pET

Le génome d'*E. coli* contient le gène DE3 (Figure 28). Celui-ci correspond à un gène codant pour le promoteur lacUV5, le site Lac O et le gène codant pour l'ARN polymérase T7. Le promoteur lacUV5 est inactif si le répresseur Lac se situe au niveau du site Lac O. Un autre gène présent dans le génome de la bactérie est Lac I. Lorsqu'il y a transcription puis traduction de ce gène on obtient le répresseur Lac. En présence de lactose ou d'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) le répresseur est dissocié. Au contraire, le promoteur lacUV5 est actif et permet la transcription du gène T7 s'il est induit par la ARN polymérase T7 produite en faibles quantités et de manière constitutive par *E. coli*.

Le même système est retrouvé sur le plasmide recombinant pET avec un gène codant pour le promoteur T7, le site Lac O, un gène codant pour la protéine d'intérêt et le gène Lac I. L'ARN polymérase T7 permet d'activer le promoteur T7 qui permet la transcription du gène d'intérêt seulement si le répresseur Lac I est dissocié.

Par ailleurs, le plasmide pLyS ou pLysE contient le gène codant pour le lysosyme T7. L'ARN polymérase T7 est inhibée si le lysosyme T7 est exprimé. Il est donc nécessaire de produire une grande quantité de l'ARN polymérase T7 pour sur-exprimer la protéine d'intérêt ce qui correspond à mettre dans le milieu réactionnel une grande quantité de lactose ou d'IPTG.

Les plasmides utilisés sont tous compatibles avec le système pET et les cellules compétentes sont des cellules qui portent l'opéron DE3. Du lactose est présent dans le milieu autoinductible ou de l'IPTG est ajouté lors de la production de protéines (Chapitre 2. 1. II. et 2. 2. I).

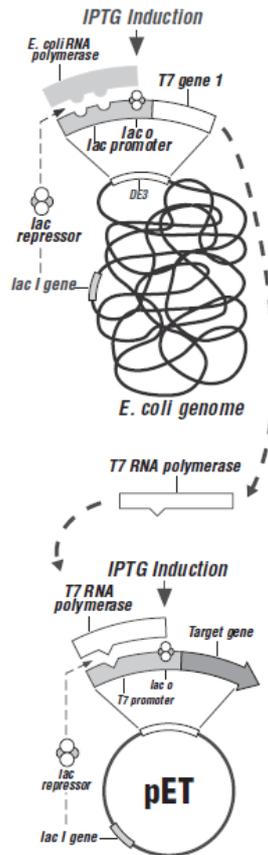


Figure 28 : Représentation du système pET.
D'après (Novagen, 2003).

II. Milieux de culture

a) Milieux liquides

(1) Lysogeny Broth (LB)

Le milieu LB est composé de 10 g.L⁻¹ de tryptone (Biokar diagnostics), 5 g.L⁻¹ d'extrait de levures (Biokar diagnostics), 10 g.L⁻¹ de NaCl. Le milieu est autoclavé avant utilisation.

(2) ZYP5052

Les solutions stocks du milieu ZYP5052 sont préparées comme suit puis autoclavées. La solution ZY est composée de 10,8 g.L⁻¹ de tryptone et de 5,4 g.L⁻¹ d'extrait de levure. Le tampon 20 x NPS correspond à 0,5 M de (NH₄)₂SO₄ (Acros organics), 1 M de KH₂PO₄ (VWR chemicals) et 1 M de Na₂HPO₄ (VWR chemicals). La solution 50 x 5052 contient 0,25 % poids/ volume de glycérol, 0,025 % de glucose (VWR chemicals) et 0,1 % de α-lactose. La

solution de MgSO_4 (magnésium sulfate heptahydrate) est préparée à 1 M. Les volumes respectifs de chaque solution sont répertoriés dans le Tableau 17. Le glucose et le glycérol seront utilisés en premier comme source de carbone pour la croissance des cellules puis le lactose, également source de carbone, permettra d'induire l'expression des protéines.

Tableau 17 : Composition du milieu ZYP5052.

	volume nécessaire pour une culture de 800 mL
ZY	742,4 mL
1 M MgSO_4	800 μL
50 x 5052	16 mL
20 x NPS	40 mL
antibiotique selon le plasmide utilisé : kanamycine (50 g.L^{-1}), ampicilline (50 g.L^{-1}) ou chloramphénicol (34 g.L^{-1})	800 μL

(3) SOB

Le milieu SOB est composé de trois solutions. La première, nommée SOB stock, correspond à 20 g.L^{-1} de tryptone, 5 g.L^{-1} d'extrait de levure, 0,584 g.L^{-1} de NaCl et 0,186 g.L^{-1} de KCl (chlorure de potassium, Panreac). Cette solution est autoclavée. En parallèle, une solution de MgSO_4 à 1 M est préparée. Une troisième solution contenant 1 M de MgCl_2 (VWR Chemicals) à 1 M est préparée. Chaque solution est autoclavée séparément. Pour la préparation de 1 L du milieu SOB, un volume de 10 mL de la solution de MgCl_2 , un volume de 10 mL de la solution de MgSO_4 et un volume de 980 mL de la solution SOB stock sont mélangés.

b) Milieu solide

Le milieu LB agar est composé de 10 g.L^{-1} , de tryptone, 5 g.L^{-1} d'extrait de levures, 10 g.L^{-1} de NaCl et 15 g.L^{-1} d'agar (Biokar diagnostics). Le milieu est autoclavé avant utilisation.

III. Pré-culture

Une pré-culture de 8 mL de milieu LB estensemencée à partir d'une colonie de cellules compétentes transformées avec l'ADN d'intérêt. La pré-culture est incubée à 37 °C sur la nuit, sous une agitation de 120 rpm (Infors HT multitron).

IV. Purification de l'ADN à partir d'une pré-culture

Une miniprep est réalisée selon le protocole décrit dans le kit Qiagen spin miniprep. Ce kit permet de réaliser trois étapes qui sont la préparation et le lavage du lysat bactérien, l'adsorption de l'ADN sur la membrane de silice, le lavage puis l'éluion de l'ADN plasmidique avec 50 µL de tampon EB (tampon Tris HCl à pH 8,5). L'échantillon est ensuite stocké à - 20 °C.

V. Utilisation d'enzymes de restriction

Une quantité de 1 µg du plasmide contenant le gène d'intérêt est digéré par 0,5 µL de chacune des deux enzymes de restriction. Ce fragment d'ADN sera ensuite nommé insert. Une quantité de 3 µg du plasmide qui permettra de stocker le gène d'intérêt est digéré avec 1 µL de ces deux enzymes de restriction. Un volume de 5 µL du tampon CutSmart (New England Biolabs) ainsi que de l'eau milliQ qsp (quantité suffisante pour) 50 µL sont ajoutés. L'ADN est incubé à 37 °C pendant 2 heures sans agitation (thermocycleur Eppendorf 2 mL). Une quantité de 1 µg du plasmide contenant le gène d'intérêt est digéré par 0,5 µL d'une des deux enzymes de restriction pour servir de contrôle négatif, dans les mêmes conditions que ci-dessus.

VI. Préparation d'un gel d'agarose

Le tampon de charge pour gel d'agarose est composé de 50 % de glycérol, de 50 % d'eau et de quelques grains de méthylorange. Il est filtré à 0,45 µm. Un volume de 1 µL de l'échantillon correspondant à 40 ng est mélangé avec 4 µL du tampon de charge et de l'eau milliQ qsp 8 µL. Ceci est déposé sur un gel d'agarose 0,7 % dans du tampon Tris Acétate EDTA. Le marqueur de poids moléculaire (1 kb DNA Ladder, New England Biolabs) est déposé en parallèle. Après migration par électrophorèse des échantillons pendant 30 minutes à 100 V, le gel est plongé 20 minutes dans un bain contenant 1 % de bromure d'éthidium. La présence des brins d'ADN est révélée en lumière UV (Gel Doc™ EZ imager, BioRad) et la taille du fragment d'ADN est vérifiée avec le logiciel Image Lab par comparaison avec le marqueur de poids moléculaire.

VII. Purification sur gel d'agarose des fragments d'ADN

Un volume de 50 μ L de solution contenant l'insert est mélangé avec 5 μ L du tampon de charge 10X (Invitrogen) et déposé sur un gel d'agarose 0,6 % dans 15 mL du tampon Tris Acétate EDTA et contenant 5 μ L de SyBRSafe (Invitrogen). Les échantillons sont séparés par électrophorèse pendant 40 minutes sous une tension de 100 V. La présence des fragments d'ADN est révélée en lumière UV et la taille des fragments est comparée à celle des marqueurs de poids moléculaire (1 kb DNA Ladder, New England Biolabs). La bande d'intérêt est excisée en utilisant une lame de scalpel.

Les fragments d'ADN sont purifiés en utilisant le kit d'extraction GENelute Gel (Sigma Aldrich). Le gel est solubilisé puis la solution est déposée sur une colonne afin que l'ADN s'y lie. La colonne qui est ensuite lavée puis l'ADN est élué dans 50 μ L de la solution d'éluion et stocké à - 20 °C.

VIII. Ligature d'un insert dans un vecteur

Le vecteur linéarisé et l'insert doublement digérés par des enzymes de restriction adéquates sont ligaturés à l'aide du kit Mighty mix (Clontech). Le protocole du Mighty mix est suivi pour cette étape avec une quantité de vecteur égale à 50 ng et un ratio vecteur : insert de 1 : 3 pour un volume de 10 μ L. Un volume de 10 μ L de Mighty mix est ajouté. Cette solution contient l'enzyme T4 DNA ligase qui va permettre la ligature de l'insert dans le vecteur et un tampon optimal pour l'activité de cette enzyme. Ceci est incubé 30 minutes à 10 °C.

Une quantité de 50 ng de vecteur seul est préparée dans 10 μ L et ajouté à 10 μ L de Mighty mix. Le mélange est incubé 30 minutes à 10 °C. Il sert de contrôle négatif.

IX. Amplification des plasmides par PCR

La réaction en chaîne par polymérase ou PCR (polymerase chain reaction en anglais) permet d'amplifier une séquence d'ADN (renommée matrice). La matrice est définie par deux amorces (amorce sens et amorce anti-sens, Tableau 18) à ses extrémités et l'amplification est réalisée par la polymérase nommée Phusion High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs).

Tableau 18 : Séquence des amorces.

	amorce	séquence et Tm
plasmide du vecteur pETDuet_JoCBM3a	sens	cggatcctggctgtggtgatgatggtgatg Tm = 60,6 °C
	anti-sens	gagctcggcggcgggggc Tm = 68°C
gène In du vecteur pACYCDuet_In	sens	ccgcccggagctcatcacgaatcttaggaatcg Tm = 65,2 °C
	anti-sens	cacagccaggatccgactgaaaagaaatcaattgagaatg Tm = 60,5°C

Les quantités de chaque composant du milieu réactionnel sont dans le Tableau 19. Plusieurs cycles permettent d'amplifier de manière exponentielle la quantité d'ADN (Tableau 20) dans un thermocycleur pour PCR (T100 thermalcycler, Biorad ou MJ mini personal thermal cycler, Biorad). Lors de chaque cycle, l'étape de dénaturation de l'ADN permet de séparer les deux brins de la matrice. L'étape d'hybridation correspond à la reconnaissance de la matrice par les amorces sens et anti-sens par complémentarité de leur séquence. L'étape d'élongation permet à la polymérase d'ajouter des oligonucléotides à la suite des amorces par complémentarité avec la matrice. Le Tm de chaque amorce est donné par le fournisseur (Eurogentec) mais il a également été vérifié avec le logiciel NEBuilder Assembly Tool (New England Biolabs).

Tableau 19 : Composition du milieu réactionnel.

composant	concentration ou volume
plasmide (vecteur ou insert)	5 ng.µL ⁻¹
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	0,5 µL
amorce sens	5 mM
amorce anti-sens	5 mM
dNTPs	100 mM
eau milliQ	qsp 50 µL

Tableau 20 : Programme de la PCR.

nombre de cycles	étape	température	temps
1	dénaturation initiale	98 °C	30 secondes
30	dénaturation	95°C	10 secondes
	hybridation	Tm la plus faible des deux amorces	20 secondes
	élongation	72 °C	20 secondes / kb du plasmide
1	élongation finale	72 °C	10 minutes

X. Recombinaison homologue d'ADN

L'utilisation du kit In-Fusion HD Cloning (Clontech) permet à partir de deux séquences d'ADN d'obtenir un nouveau plasmide en favorisant la recombinaison homologue entre deux petites séquences d'ADN similaires avec l'enzyme In-Fusion. Plusieurs protocoles sont proposés par le kit In-Fusion HD Cloning selon l'état de pureté des ADNs amplifiés.

Un volume de 5 µL de la solution obtenue par PCR pour le fragment d'ADN non pur est mélangé à 2 µL de Cloning enhancer (contient l'enzyme de restriction DpnI qui clive les méthyles présents sur le brin parental). Ce mélange est incubé à 37 °C pendant 15 minutes puis à 80 °C pendant 15 minutes dans un thermocycleur pour PCR. Le milieu réactionnel pour la recombinaison homologue est composé de 2 µL du mix 5X In-Fusion HD enzyme premix (contient l'enzyme et le tampon optimal pour son activité), d'une quantité de 50 à 200 ng de vecteur, de 1 à 2 µL de l'ADN traité avec le Cloning enhancer et d'eau milliQ qsp 10 µL. Le mélange est alors incubé à 50 °C pendant 15 minutes. Le même protocole est suivi pour l'insert contrôle et le vecteur pUC19 contrôle fournis par le kit avec respectivement 2 µL et 1 µL. Ceci correspond au contrôle positif. Le même protocole est suivi avec uniquement 1 µL du vecteur pUC19 contrôle fourni par le kit pour le contrôle négatif.

XI. Préparation de cellules compétentes

a) Culture des cellules

Le stock des cellules est conservé à - 80 °C. Il est utilisé pour ensemercer une pré-culture de 5 mL dans un milieu LB. Un volume de 50 mL de milieu SOB (Chapitre 2. 1. II. a) est inoculé avec la pré-culture. Ceci est agité entre 18 et 26 °C entre 150 et 250 rpm. Un prélèvement d'environ 1 mL de la culture est réalisé régulièrement afin de suivre la croissance bactérienne à une densité optique (DO) de 600 nm jusqu'à une valeur entre 0,4 et 0,5. La culture est mise dans la glace pendant 10 minutes puis centrifugée pendant 10 minutes à 4 °C et entre 1 600 et 2 500 xg.

La suite du protocole doit être réalisée dans la glace et dans un environnement stérile. Le surnageant peut être jeté et le culot est resuspendu dans 5 mL de tampon de lavage 1X. Cette solution est composée de 2,5 mL de tampon de dilution 2X et de 2,5 mL de tampon de lavage 2X (fournis dans le kit Mix&Go de Zymo research). La solution est à nouveau centrifugée et le culot est resuspendu dans 5 mL du tampon de compétence 1X. Cette solution est composée de 2,5 mL de tampon de dilution 2X et de 2,5 mL de tampon de compétence 2X (fourni dans

le kit, cette solution permet de rendre les cellules compétentes par action chimique). Des aliquots de 50 µL des cellules compétentes sont préparés et conservés à - 80 °C.

b) Vérification de la compétence

La compétence est vérifiée en transformant un aliquot de cellules avec un plasmide ne contenant pas d'insert (protocole dans le chapitre 2. 1. *XII*). Le plasmide pET28a peut être utilisé sauf pour les cellules ayant déjà la résistance à la kanamycine. Une transformation des cellules avec de l'eau milliQ stérile à la place du plasmide est réalisée comme contrôle négatif. Un volume de 100 µL de chaque transformation est étalé sur trois boîtes à une dilution différente (non dilué, 1/10 ou 1/100). Les colonies sont comptées et permettent de calculer la compétence selon cette équation :

$$\text{Compétence (UFC.}\mu\text{g d'ADN}^{-1}\text{.mL}^{-1}) = \frac{10^6 \times \text{nombre de colonies}}{\text{quantité de plasmide} \times \text{volume étalé}}$$

L'UFC correspond à l'unité formant colonie c'est-à-dire le nombre de colonies isolées. L'unité de la quantité de plasmide est le ng alors que celle du volume étalé est le µL. En moyenne, les cellules ont une compétence d'environ 10^5 UFC.µg d'ADN⁻¹.mL⁻¹.

XII. Transformation des cellules compétentes

Un volume de 50 µL de cellules compétentes d'*E. coli* ont été transformée avec 1 µL d'ADN et incubées pendant 10 minutes dans la glace. Un volume de 200 µL de milieu LB est ajouté et les cellules sont ensuite incubées une heure à 37 °C sous agitation à 200 rpm. Après incubation, les cellules sont étalées sur une boîte de milieu LB agar contenant l'antibiotique adéquat. Les boîtes sont incubées à 37 °C sur la nuit.

XIII. Dosage de l'ADN

Un volume de 1,2 µL d'un échantillon d'ADN plasmidique est dosé à une longueur d'onde de 260 nm en utilisant un nanodrop ND10 spectrophotometer. Le blanc est réalisé avec le tampon EB (kit Qiagen spin miniprep).

XIV. Séquençage de l'ADN

Les échantillons sont séquencés (GATC) pour vérifier la présence du gène d'intérêt dans le vecteur choisi. L'amorce pour le séquençage est l'amorce nommée Duet Down (séquence GATTATGCGGCCGTGTACAA) ou l'amorce nommée pETUpstream (séquence ATGCGTCCGGCGTAGA).

2. Expression de protéine recombinante dans *Escherichia coli*

Les différentes souches utilisées sont dans l'annexe 2.

I. Cas de la production de protéines

Une pré-culture de 8 mL est utilisée pour ensemercer à 1 %, un volume de 800 mL de milieu LB ou de milieu ZYP5052 (Chapitre 2. 1. II. a).

Dans le cas du milieu LB, un prélèvement d'environ 1 mL de la culture est réalisé régulièrement afin de suivre la croissance bactérienne à une DO de 600 nm. Lorsque celle-ci atteint une valeur comprise entre 0,4 et 0,6, l'expression de notre protéine d'intérêt est induite par ajout d'IPTG à une concentration finale variable en fonction de la souche d'expression utilisée (Tableau 21). L'induction peut durer 4 heures à 37 °C, 4 heures à 16 °C ou 25 heures à 16 °C selon les conditions optimales de production, propres à chaque protéine

Tableau 21 : Condition d'induction pour chaque type de cellules compétentes.

cellules compétentes d' <i>E. coli</i>	concentration en IPTG
BL21 (DE3)	1 mM
JM109 (DE3)	400 µM
Tuner (DE3)	200 µM
C41 (DE3)	100 µM

Pour les protéines produites avec le milieu ZYP5052, il n'est pas nécessaire de suivre la DO car ce milieu est autoinductible. La présence de glucose et de glycérol permet une augmentation de la biomasse. Les cellules utilisent ensuite le lactose comme source de carbone et celui-ci induira l'expression des protéines d'intérêt. La culture dure 25 heures à 23 °C ou 4 heures à 37 °C puis 20 heures à 16 °C.

Les cultures sont stoppées par une centrifugation de 10 minutes à 4 424 xg à 10 °C (5 000 rpm) dans une centrifugeuse Avanti J-26 (Beckman Coulter). Les culots cellulaires sont

repris dans 15 mL de TB (composition du TB dans le chapitre 2. 3. II) supplémenté avec 1 % de cocktail d'antiprotéase PIM 100X (composition du PIM dans le chapitre 2. 3. II). Les cellules resuspendues sont alors conservées à - 20 °C jusqu'à la purification.

II. Antibiotiques

Une quantité de 1 g de kanamycine (Euromedex) ou d'ampicilline est pesée sur une balance de précision. Un volume de 15 mL d'eau milliQ est ajouté puis la solution est agitée. Le volume d'eau est ajusté à 20 mL pour que la concentration finale soit de 50 mg.L⁻¹. La suite du protocole est réalisée sous environnement stérile. La solution est filtrée à 0,22 µm (Minisart syringe filter) puis la solution est aliquotée à 1 mL dans des Eppendorfs de 1,5 mL et stockée à - 20 °C.

Une quantité de 340 mg de chloramphénicol (Euromedex) est pesée puis est dissoute dans 10 mL d'éthanol 100 % pour obtenir une concentration de 34 g.L⁻¹. Cette étape doit être réalisée sous une hotte chimique. La suite du protocole est réalisée sous environnement stérile. La solution est filtrée à 0,22 µm puis aliquotée à 1 mL dans des Eppendorfs de 1,5 mL et stockée à - 20 °C.

III. IPTG

Une quantité de 5 g d'IPTG (Euromedex) est pesée sur une balance de précision. Un volume de 15 mL d'eau milliQ est ajouté puis la solution est agitée. Le volume d'eau est ajusté à 21 mL pour que la concentration finale soit de 1 M. La suite du protocole est réalisée sous environnement stérile. La solution est filtrée à 0,22 µm puis aliquotée à 1 mL dans des Eppendorfs de 1,5 mL et stockée à - 20 °C.

3. Purification des protéines

I. Préparation des extraits cellulaires

Les cellules sont décongelées rapidement à 37 °C, sous agitation constante. Elles sont ensuite cassées par sonication à une amplitude de 30 à 40 % : première étape de sonication durant une minute, une pause pendant une minute et enfin une deuxième étape de

sonication de 30 secondes (Bioblocks scientific vibracells ou Fisher Scientific™ Model 505 Sonic Dismembrator). La solution est centrifugée pendant 30 minutes à 48 384 xg à 10 °C dans une centrifugeuse Avanti J-25 (Beckman Coulter). La fraction soluble contient la protéine d'intérêt.

II. Chromatographie d'affinité d'ions métalliques immobilisés (IMAC)

a) Cas général

La résine de cobalt crée des interactions spécifiques avec les histidines. Ainsi, les protéines d'intérêt ayant le tag histidine se fixent à la colonne. L'imidazole a une structure proche d'une partie du tag histidine, il va donc entrer en compétition dans la fixation sur la résine ce qui permettra l'élution de notre protéine.

Typiquement, 1,5 mL de résine Cobalt (Talon metal affinity resin, Clontech) est versé dans une colonne frittée de 20 mL (Clontech). La résine est lavée avec 5 mL d'eau puis équilibrée avec le tampon de purification (TB, 20 mL). La fraction soluble contenant notre protéine (avec le tag histidine) est déposée sur la résine. La fraction non retenue (NR) est collectée. Les lavages et l'élution de notre protéine sont réalisés avec le TB contenant une concentration croissante d'imidazole (Tableau 22). Le NaCl présente limite les interactions non spécifiques entre la résine et les protéines sans tag histidine.

Le tampon de purification (TB) est composé de 50 mM tampon phosphate de sodium, 300 mM NaCl et est ajusté à pH 7. Le tampon phosphate de sodium est préparé à partir des deux solutions mères à 0,5 M, du phosphate de sodium monobasique dihydrate (NaH₂PO₄, VWR Chemicals) et du phosphate de sodium dibasique (Na₂HPO₄). Le cocktail d'antiprotéase PIM 100X est composé de 0,2 g.L⁻¹ d'aprotinine, de 0,05 g.L⁻¹ de leupeptine, de 0,1 g.L⁻¹ de pepstatine A, de 1,57 g.L⁻¹ de benzamidine hydrochloride, de 1,9 g.L⁻¹ métabisulfite de sodium et d'éthanol 25 % (dans de l'eau).

Tableau 22 : Conditions d'élution de la protéine d'intérêt dans les différentes fractions.

	lavages 1, 2 et 3	élution 1	élution 2	élutions 3 et 4	élution 5
abréviation	L1, L2, L3	E1	E2	E3, E4	E5
concentration en imidazole (mM)	0	5	20	150	500
volume (mL)	6	6	6	2	2

b) IMAC par centrifugation

Cette IMAC est miniaturisée dans un Eppendorf de 1,5 mL avec des étapes de centrifugation. Un volume de 100 µL de résine Cobalt est déposé dans un Eppendorf puis centrifugé une minute à 16 000 xg. Le surnageant est jeté. Les étapes suivantes sont dans le Tableau 23. La solution protéique est ajoutée lors de l'étape 3 et mélangée à la résine puis incubée 10 minutes dans la glace. La durée de centrifugation est de 2 minutes à partir de l'étape 4.

Tableau 23 : Etapes de la purification.

X : donnée non utile dans cette étape ; NR : non retenu ; L1, L2, L3 : lavage 1, 2, 3 respectivement ; E1, E2, E3 : élution 1, 2, 3 respectivement.

étape	1	2	3	4, 5, 6	7, 8	9
nom du tampon	eau	TB	solution protéique	TB	TB	TB
concentration en imidazole (mM)	X	X	X	X	150	500
volume de tampon (µL)	200	600	X	200	200	200
surnageant après centrifugation	jeté	jeté	NR	L1, L2, L3	E1, E2	E3

c) IMAC pour les échantillons de microthermophorèse

Ce protocole a été adapté du protocole classique d'une IMAC par le Dr. Cédric Montanier (Wu et al., 2017). Une colonne plus petite (Vivascience vs MC01 MC12) remplace la colonne frittée. Un volume de 100 µL de résine Cobalt est déposé dans la colonne puis celle-ci est centrifugée une minute à 1 500 xg. Les étapes suivantes sont dans le Tableau 24. Le tampon de marquage (TM) est composé du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7. La solution protéique est ajoutée lors de l'étape 5 et mélangée à la résine puis incubée à température ambiante pendant 15 minutes à l'abri de la lumière. La résine est resuspendue avec 100 µL de TM.

Tableau 24 : Etapes de la purification.

X : donnée non utile dans cette étape ; NR : non retenu ; L1, L2 : lavage 1, 2 respectivement ; E1, E2, E3 : élution 1, 2, 3 respectivement.

étape	1	2, 3, 4	5	6, 7	8	9
nom du tampon	eau milliQ	TM	solution protéique	TM	TM	TM
concentration en imidazole (mM)	X	X	X	X	200	1000
volume de tampon (µL)	500	400	X	400	200	200
surnageant après centrifugation	jeté	jeté	NR	L1, L2	E1, E2	E3

III. Séparation de protéines par chromatographie d'exclusion stérique

Une colonne Superose 10/300 GL (volume de colonne ou V_c : 24 mL, GE Healthcare) est utilisée sur un Äkta Purifier (GE Healthcare) situé à la plateforme d'Ingénierie Combinatoire et Criblage à haut débit (ICEO, Drs. Sophie Bozonnet et Gianluca Cioci). L'ensemble des tampons a été préalablement dégazé. La colonne est stockée dans de l'éthanol 20 % (Sigma Aldrich ou VWR chemicals). La colonne est rincée avec de l'eau à $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Elle est ensuite équilibrée dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 et 150 mM de NaCl à $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Une boucle d'injection de 500 μL est utilisée pour déposer la fraction protéique à purifier au sommet de la colonne. Des fractions de 1 mL sont collectées en sortie de la colonne (Fraction Collector F920, GE Healthcare) en utilisant un débit de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Les fractions d'intérêt sont analysées par électrophorèse SDS-PAGE. La colonne est lavée à l'eau puis stockée dans de l'éthanol 20 % à $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

La colonne a été calibrée en utilisant un kit de calibration (Gel filtration calibration kit for high molecular weight, GE Healthcare). Le mélange contient de la ferritine, de l'ovalbumine et de la ribonucléase A. Pour compléter les données, de l'aldolase a également été injectée. Pour chaque protéine, le volume d'élution (V_e) a été déterminé (Tableau 25). Le volume mort (V_m) théorique de la colonne est de 8 mL. Le volume total de la colonne (V_c) est nécessaire pour déterminer le coefficient K_{av} est déterminé pour chaque protéine selon l'équation :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_m}{V_c - V_m}$$

La masse molaire de chaque protéine étant connue, le log de cette valeur a pu être calculé.

Tableau 25 : Données de la calibration de la colonne Superose 10/300 GL.

	concentration en protéine ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	volume d'élution (mL)	K_{av}	masse molaire (Da)	Log de la masse molaire
ferritine	0,3	7,52	-0,03	440000	5,643
aldolase	4	11,193	0,1995	158000	5,199
ovalbumine	4	12,78	0,2987	44000	4,643
ribonucléase A	3	14,927	0,4329	13700	4,137

La droite de calibration est dans la Figure 29 avec l'équation correspondante. Cette équation sera appliquée aux protéines d'étude afin de déterminer la masse molaire expérimentale. Le nombre d'unités de protéines n sera calculé selon l'équation :

$$n = \frac{\text{masse molaire expérimentale}}{\text{masse molaire théorique}}$$

Si le n est proche de 1, la protéine est sous forme d'un monomère alors que si le n est égal à 2 la protéine est sous forme de dimère.

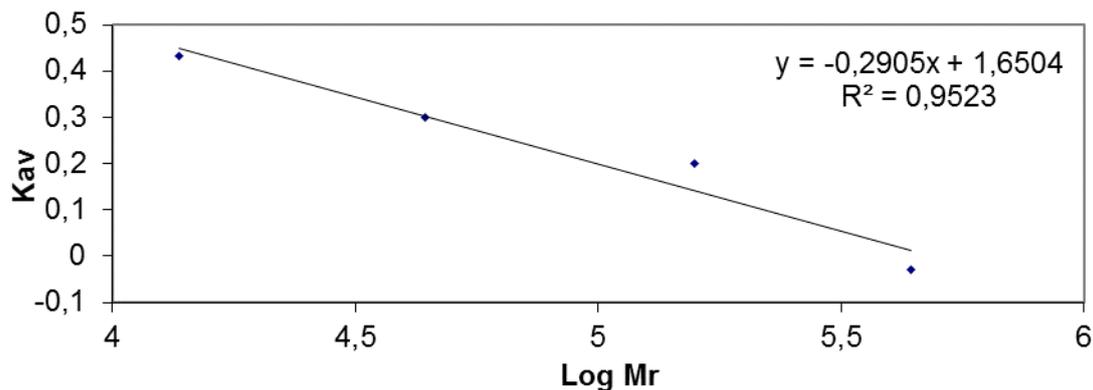


Figure 29 : Droite de calibration pour la colonne Superose 10/300 GL.

IV. Gel d'électrophorèse SDS-PAGE

Un échantillon de chaque fraction de la purification est préparé afin d'être analysé sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE, gel pré-coulé Any kD mini-Protean TGX Gel stain free, BioRad, 200 V, 30 minutes). Les échantillons sont éventuellement dilués (1 μ L de l'échantillon et 8 μ L d'eau) avant ajout du tampon de charge (3 μ L de la solution stock, elle-même composée de 450 μ L de Laemmli sample buffer 4X et de 50 μ L de 2 β -mercaptoéthanol) pour gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Après une rapide centrifugation, les échantillons sont incubés 5 minutes à 95 °C. La totalité du volume est déposée sur gel et 5 μ L des marqueurs de poids moléculaire sont également déposés (Biorad Precision plus protein unstained standart, BioRad). Un composé présent dans le gel se lie aux tryptophanes de la protéine par une liaison covalente augmentant alors la fluorescence de ce résidu aromatique lors de la révélation du gel (Stain free detection, BioRad). En cas d'absence de tryptophane dans la protéine d'intérêt le gel est révélé par une coloration au bleu de Coomassie (PageBlue Protein Staininf Solution, Fermentas). La taille théorique de chaque protéine est connue grâce au logiciel Protparam tool (ExPASy) à partir de la séquence en acides aminés.

V. Dialyse

a) Boudins à dialyse

Le boudin de dialyse (seuil de coupure de 14 kDa) est hydraté dans 100 mL d'eau à 95 °C pendant 5 min. La dialyse est réalisée à 4 °C pendant 1 heure contre 100 volumes d'échantillon dans 50 mM de tampon phosphate de sodium pH 7, sous agitation magnétique. Le tampon est renouvelé pour une deuxième étape de dialyse, dans les mêmes conditions, sur la nuit. En fin de dialyse, la solution protéique est supplémentée avec 1 % de cocktail d'antiprotéase PIM 100X.

b) Colonne de dessalage PD10

La colonne de dessalage PD10 (GE Healthcare) est mise en œuvre selon les préconisations du fabricant. La résine est équilibrée avec 25 mL de tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7. Un volume de 2,5 mL d'échantillon est déposé en haut de la colonne et est élué par 3,5 mL de tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7. La solution protéique est alors supplémentée avec 1 % de cocktail d'antiprotéase PIM 100X.

VI. Mesure de la concentration en enzyme

a) Mesure de l'absorbance

Une mesure de l'absorbance à 280 nm réalisée sur un spectrophotomètre (Cary 100 Bio Varian) permet de déterminer la concentration en enzymes grâce à l'équation de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

A est l'absorbance, ε est le coefficient d'extinction molaire théorique de la protéine ($M^{-1}.cm^{-1}$), l est la longueur de la cuve (cm) et c est la concentration massique ($g.L^{-1}$).

Il est alors possible de déterminer la concentration molaire de la protéine (M) à partir de la concentration massique et de la masse molaire de la protéine (ProtParam, Expasy),

b) Détermination par gel SDS-PAGE

L'analyse est réalisée avec le logiciel Image-Lab. Chaque bande détectée de l'échantillon standard (déposé à 20, 10, 5, 2,5 et à 1,25 μ M) est associée à la concentration

correspondante pour établir une courbe étalon. La méthode linéaire est choisie et appliquée aux fractions de l'IMAC. La courbe étalon permet de définir la concentration en protéine.

VII. Concentration de protéines

a) Cas classique

Les protéines sont concentrées par centrifugation à l'aide d'une cellule de concentration Amicon Ultra (Dutscher) en suivant les préconisations du fabricant. Le seuil de coupure de la membrane utilisée est au moins deux fois inférieur à la taille de la protéine à concentrer.

b) Cas des CBMs spécifiques de la cellulose

CBM3a (ou JoCBM3a) est concentré par centrifugation à l'aide d'une cellule Vivaspin (Sartorius) dont la membrane est composée de polyéthersulfone. Le seuil de coupure de la membrane utilisée est au moins deux fois inférieur à la taille de la protéine à concentrer. Le protocole préconisé par le fournisseur est suivi.

4. Substrats d'étude

I. Préparations disponibles de cellulose

L'Avicel est une préparation hétérogène de cellulose. Elle est obtenue à partir d'une hydrolyse acide partielle de fibres de bois suivie d'un séchage par pulvérisation de la solution obtenue (Marshall and Sixsmith, 1974). Il s'agit de cellulose cristalline (Lee et al., 1982). Ce polymère contient des pores intraparticules de 1 à 10 nm et une distance entre particules de 1 à 100 µm (Marshall and Sixsmith, 1974).

La BMCC (bacterial microcrystalline cellulose) et la PASC (phosphoric acid swollen cellulose) sont de la cellulose insoluble mais la BMCC contient de la cellulose cristalline alors que la PASC est composé de cellulose amorphe. Le degré de cristallinité de la BMCC est de 76 % (Henrissat et al., 1985).

II. Le blé

a) Vision globale de la plante

Parmi les matières premières renouvelables on peut citer la paille de blé qui est relativement abondante. Elle n'est utilisée en alimentation animale que pour les ruminants. Environ 60 % de la production mondiale pourrait être dirigée vers des voies énergétiques (Kim and Dale, 2004). Elle est par exemple utilisée pour la préparation de fibres (Avella et al., 1993) ou de nanocristaux de cellulose (Helbert et al., 1996) qui seront inclus dans du plastique pour créer des matériaux biodégradables.

La paille de blé constitue la structure résiduelle de la plante après la récolte des grains de blé. A l'échelle macroscopique, la paille est composée de la tige (entre-nœuds et nœuds), des feuilles et de l'épi (bale et rachis) (Figure 30 et Tableau 26). Les entre-nœuds sont séparés par des nœuds qui sont les points d'attache des feuilles à la tige (Hornsby et al., 1997). Les entre-nœuds sont formés de cercles concentriques laissant un vide (ou chaume) au centre (Hornsby et al., 1997). La longueur des entre-nœuds augmente du sol jusqu'en haut de la plante (Ghaffar and Fan, 2015). La morphologie peut varier selon différents paramètres en fonction de l'échantillon étudié (variété et méthode de récolte) (McKean and Jacobs, 1997).

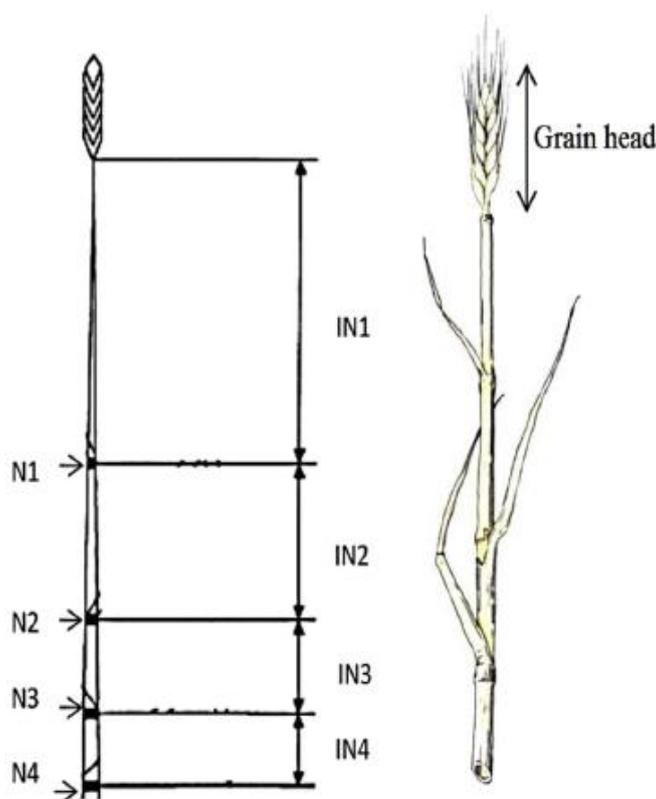


Figure 30 : Représentation d'une paille de blé.
N : nœud ; IN : entre-noeud (Ghaffar and Fan, 2015).

Tableau 26 : Répartition de la masse dans une paille de blé.
D'après (Motte et al., 2014).

éléments	composition massique (%)
entre-noeud	57 ± 10
nœud	10 ± 2
feuille	18 ± 3
bale	9 ± 4
rachis	6 ± 2

b) La paille de blé

Nous avons travaillé avec de la paille de blé comme substrat. Les différentes parties de la paille de blé (Chapitre 2. 4. II. a) ont un rôle spécifique pour la plante et des différences dans leur composition biochimique (Ghaffar and Fan, 2015; Harper and Lynch, 1981; Motte et al., 2014) (Tableau 27). La composition de la paroi cellulaire varie selon la partie de la tige de blé considérée. La quantité de xylose et par conséquent de xylane est similaire dans les différentes fractions (nœuds, entre-nœuds, feuilles...) (Harper and Lynch, 1981). Les arabinoxylanes dans les nœuds sont très substitués (ratio arabinose/ xylane égal à 17) ce qui suggère que dans cette partie de la plante la dégradation enzymatique des arabinoxylanes n'est pas facile. A l'inverse, l'attaque des entre-nœuds ou du rachis serait plus facile grâce aux faibles taux de substitution (ratios arabinose/ xylane de 7 et 9 respectivement) (Motte et al., 2014). Par ailleurs, les lignines sont retrouvées en majorité dans les entre-nœuds et les racines (Bertrand et al., 2006). La cellulose retrouvée dans les différentes parties de la paille de blé a une cristallinité similaire, avec par exemple 44,4 % dans l'épiderme et 44,3 % dans le parenchyme (Liu et al., 2005).

Nous travaillerons plus particulièrement sur les entre-nœuds qui contiennent davantage de cellulose que les feuilles ou les nœuds (Harper and Lynch, 1981). La cellulose est le polymère majoritaire présent dans les entre-nœuds (Bertrand et al., 2006).

Tableau 27 : Composition des différentes parties du blé.
L'index de cristallinité correspond au pourcentage par rapport au total de cellulose (Motte et al., 2014).

%	entre-noeud	feuille	noeud	bale	rachis
hémicelluloses	31 ± 1	34 ± 1	34 ± 1	43 ± 1	39 ± 1
cellulose	50 ± 1	41 ± 1	42 ± 2	40 ± 2	44 ± 2
lignines	10 ± 3	6 ± 1	8 ± 2	6 ± 1	7 ± 2
glucose	32 ± 0	25 ± 1	26 ± 1	29 ± 0	28 ± 1
xylose	17 ± 0	17 ± 1	17 ± 0	18 ± 1	21 ± 1
arabinose	1 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	2 ± 0
arabinose/ xylose	7 ± 0	13 ± 0	17 ± 0	14 ± 0	9 ± 0
cristallinité	49 ± 1	51 ± 1	52 ± 4	45 ± 2	47 ± 2

La composition précise de la paille de blé varie selon les études (Tableau 28). Ceci peut provenir de l'espèce, de l'âge de la plante ou de la méthode d'analyse. On retrouve les trois principaux polymères que sont la cellulose, les hémicelluloses et les lignines. Plus précisément, les hémicelluloses les plus abondantes dans la paille de blé sont les arabinoxyanes et les xylanes (Lawther et al., 1995; Sun and Tomkinson, 2002). Par exemple, il a été décrit qu'environ 1,1 résidus de xylose sur 10 sont substitués par un arabinose (Aspinall and Meek, 1956) ou 1 résidu de xylose sur 13 (Sun et al., 1996) selon la source. Ces valeurs sont cependant plus faibles que le ratio arabinoxyane/ xylane, égal à 0,17 qui a été déterminé dans une étude plus récente (Motte et al., 2014).

La paille de blé (espèce *Apache*) utilisée dans ce projet provient du Sud de la France et a été fournie en 2007 par ARD (Pomacle, France) (Song et al., 2010). Elle est composée de 44,51 % de cellulose, 26,16 % de xylose, 2,37 % d'arabinose, 0,44 % de galactose et a un rapport arabinose/ xylose de 0,09 (Song et al., 2014).

Tableau 28 : Composition de la paille de blé.
La composition de la paille de blé est donnée en pourcentage de masse. X : information non donnée dans cette référence.

références	cellulose	hémicelluloses			lignines
		totaux	xylanes	arabinanes	
(Lawther et al., 1995)	37,19 - 38,55	30,28 - 35,01	X	X	14
(Klinke et al., 2002)	35 - 40	20 - 30	X	X	8 - 15
(Kristensen et al., 2008)	39,8	X	24,5	2,8	22,6
(Motte et al., 2014)	40 - 50	31 - 43	X	X	6 - 10
(Sun et al., 2004)	35 - 40	30 - 38	X	X	14 - 17
(Merino and Cherry, 2007)	33	23	X	X	17

c) Le son de blé

Le son de blé est le deuxième substrat utilisé dans cette étude. La graine de blé est séparée en trois parties correspondantes au son de blé, à l'endosperme et au germe. Le son correspond à l'enveloppe de l'endosperme (Figure 31).

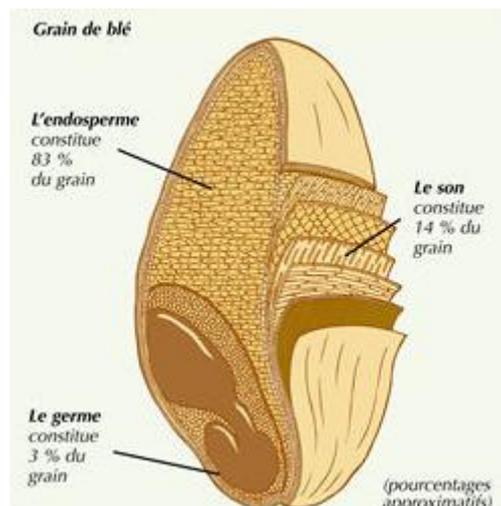


Figure 31 : Représentation du grain de blé.

Le son de blé est composé de 7,2 % de cellulose, de 19,4 % de glucuronoarabinoxylanes et de 3 % de lignines (Brillouet and Mercier, 1981). En fonction des traitements réalisés sur le son de blé, différentes études ont révélé des compositions variables (Tableau 29). Toutefois, nous retrouvons dans le son des résidus de glucose, de galactose, de xylose et d'arabinose. Les arabinoxylanes sont les hémicelluloses les plus abondantes dans le son de blé (Brillouet et al., 1982) jusqu'à 30 % de la masse totale du son (Ebringerová, 2006). Des traces de mannose (Brillouet and Mercier, 1981), d'acide glucuronique ou d'acide galacturonique (Benamrouche et al., 2002) ont également été détectées. Par ailleurs, la taille des xylanes et la quantité d'arabinoses vont varier selon les parties de la graine (Ordaz-Ortiz et al., 2005).

Tableau 29 : Composition du son de blé.
La composition est donnée en pourcentage de masse.

	glucose	galactose	xylose	arabinose	prétraitement
(Brillouet and Mercier, 1981)	22,1	1,2	12,3	7,3	absent
(Brillouet et al., 1982)	2,5	3,5	41	48	extraction des hémicelluloses
(Shiiba et al., 1993)	2,4-17,3	X	42,4 – 50,4	28,7 – 45,5	extraction des arabinoxylanes
(Lequart et al., 1999)	42,5 ± 0,8	2,7 ± 0,2	15,4 ± 1,3	3,1 ± 0,2	substrat autoclavé et hydraté
(Benamrouche et al., 2002)	29,1 ± 0,89	2,1 ± 0,53	43,7 ± 0,21	23,7 ± 0,44	amidon enlevé
(Rémond et al., 2008)	9,9	0,09	54,3	35,7	amidon enlevé

Le son de blé utilisé dans ce projet provient de ARD (Pomacle, France) et est désamidonné (Bouraoui et al., 2016). Il est composé de 47,21 % de xylose, 27,04 %

d'arabinose, 23,33 % de galactose 1,79 % de glucose et 0,64 % de mannose. Le ratio arabinose/ xylose est égal à 0,57. D'après la composition chimique, la différence majeure entre la paille et le son de blé est le contenu en lignines (environ 3 % pour le son de blé, 6 à 23 % pour la paille de blé). La deuxième différence est le rapport arabinose/ xylose. En effet, ce rapport est de 0,2 (Brillouet and Mercier, 1981) à 0,6 (Izydorczyk and Biliaderis, 1995) dans le son de blé alors que pour la paille de blé le rapport est compris entre 0,08 et 0,1 (Aspinall and Meek, 1956; Sun et al., 1996). Il y a donc davantage de substitutions dans le son de blé. De plus, la paille de blé est majoritairement composée de cellulose alors que le son de blé contient surtout des arabinoxylanes.

5. Biophysique

1. Etude de l'affinité entre un CBM et un sucre

Plusieurs techniques existent pour quantifier l'affinité entre un CBM et son ligand. Il est possible d'utiliser des gels d'affinité (Tomme et al., 2000), de la RMN (Johnson et al., 1996; Tomme et al., 1996), de mesurer l'absorbance (Tomme et al., 2000) ou la fluorescence du CBM, d'utiliser la microcalorimétrie (Breslauer et al., 1992) ou encore la thermophorèse (Baaske et al., 2010) pour des ligands solubles. Dans le cas d'un ligand insoluble, la seule méthode possible est la « solid state depletion » (Gilkes et al., 1992). Chacune de ces approches est expliquée ci-dessous.

Des gels d'affinité sont préparés en incorporant un polysaccharide soluble dans une matrice de polyacrylamide. La migration du CBM va être retardée si ce CBM a une affinité pour le polysaccharide par rapport à un gel de polyacrylamide sans polysaccharide. Le retard de la migration sera proportionnel à la quantité de ligand. Cette méthode permet de cribler rapidement et à moindre coût les ligands possibles pour un CBM mais également de quantifier cette interaction (Abbott and Boraston, 2012). Le premier CBM étudié avec cette technique est le CBM4-1 de la cellulase 9B produite par *C. fimi* (Tomme et al., 2000). Une large gamme de polysaccharides peut ainsi être testée (Abou Hachem et al., 2000).

Les premières études entre un CBM et un ligand par RMN datent de 1996 (Johnson et al., 1996; Tomme et al., 1996). La méthode est basée sur l'importance des résidus

aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine) du site de reconnaissance du CBM pour l'interaction avec le ligand. Les déplacements chimiques de ces acides aminés aromatiques clés sont mesurés pour des concentrations croissantes en ligand (Johnson et al., 1996). Un spectre du proton (^1H) à une dimension est obtenu pour chaque concentration en ligand. Il est également possible de travailler avec le spectre de l'azote 15 (^{15}N) si les protéines ont été marquées lors de leur expression (Johnson et al., 1996). Le ligand peut être un oligosaccharide comme du cellohexaose (Johnson et al., 1996) ou un xylooligosaccharide (Simpson et al., 1999). Il est également possible de travailler avec des polymères tels que la cellulose (Bray et al., 1996; Din et al., 1994b; Nagy et al., 1998) ou des xylanes (Simpson et al., 2000).

Les premiers travaux ont permis de quantifier l'affinité entre le CBM nommé CBD_{N1} de la β -(1,4)-glucanase CenC de *C. fimi* avec du cellotetraose, du cellopentaose et du cellohexaose grâce au signal de la tyrosine Tyr19 du CBD_{N1} (Johnson et al., 1996; Tomme et al., 1996). Un autre exemple est celui du CBM2b1 de la xylanase de *C. fimi* dont l'affinité avec du cellohexaose ou du xylohexaose a été étudiée. Le système HSQC (heteronuclear single quantum coherence) permet d'associer un carbone protoné aux hydrogènes qu'il porte. Les spectres ^1H - ^{15}N HSQC (en deux dimensions), ciblant le Trp259 et le Trp291 du CBM ont permis de quantifier l'affinité (Bolam et al., 2001; Simpson et al., 1999).

La reconnaissance d'un ligand par un CBM implique souvent la chaîne latérale d'un acide aminé aromatique comme un tryptophane ou une tyrosine, présent dans le site de liaison du CBM (Bray et al., 1996; Din et al., 1994b; Nagy et al., 1998). Les propriétés spectroscopiques de ces chaînes latérales sont sensibles à leur microenvironnement. Lorsqu'elles interagissent avec des sucres, ces chaînes latérales sont protégées du solvant ce qui entraîne de petites perturbations dans leur profil spectroscopique. Ces changements dans les propriétés spectroscopiques sont facilement mesurés pour la liaison entre un CBM et un polysaccharide soluble (Abbott and Boraston, 2012). Le spectre d'absorbance peut donc être réalisé toutes les 0,5 secondes et avec une longueur d'onde entre 250 et 300 nm (Boraston et al., 2000).

Une variante de cette méthode est basée sur la fluorescence intrinsèque des résidus aromatiques du CBM si ces résidus sont impliqués dans l'interaction du CBM avec le ligand. Le spectre d'absorbance est réalisé pour chacune des concentrations en ligand entre 300 et 400 nm (F). En parallèle la fluorescence d'une solution contenant seulement le CBM est dosée afin de tenir compte du bruit de fond causé notamment par les protéines et le tampon

(F_0). La courbe de la fluorescence relative (F/F_0) en fonction de la concentration en ligand permet de définir la constante d'association (Abbott and Boraston, 2012).

La méthode « solid state depletion » permet de déterminer les interactions entre un CBM et des polysaccharides insolubles. L'adsorption d'un CBM est observée après une incubation en présence du ligand puis en mesurant l'absorbance à 280 nm (Gilkes et al., 1992). La détermination de l'adsorption peut également être réalisée par gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Des réactions sont réalisées avec la même concentration en ligand et des concentrations en CBM variables. De plus, des échantillons de concentration croissante en CBM sont préparés mais sans le ligand afin de retirer l'adsorption des protéines sur le tube ou leur précipitation (Abbott and Boraston, 2012).

Il existe également une variante de cette méthode, renommée ici solid state depletion basée sur la fluorescence. Il s'agit d'incuber différentes concentrations de CBM en présence d'une concentration fixe en ligand. La mesure de la quantité de CBM libre après incubation est déterminée par fluorescence dans ce cas alors que pour la méthode classique, l'absorbance à 280 nm est mesurée (McLean et al., 2002).

La microcalorimétrie mesure l'augmentation (réaction exothermique) ou la diminution (réaction endothermique) de la température dans une solution régulée lors de l'ajout du ligand (Freire et al., 1990). En effet, l'instrument fournit de l'énergie pour revenir à la température de travail. Cette méthode est l'une des plus anciennes, datant des années 1760 (Breslauer et al., 1992). Ceci permet de déterminer l'énergie libre de Gibbs (ΔG), l'enthalpie (ΔH), l'entropie (ΔS) et la stœchiométrie (n) de l'interaction. Cette technique est utilisée depuis les années 1980 pour caractériser des protéines (Spokane and Gill, 1981). Le CBM de la glucanase Cenc de *C. fimi* a ainsi été testé avec différents cellooligosaccharides et des glucanes (Tomme et al., 1996). En parallèle, l'affinité entre le CBM de l'endoglucanase Cex de *C. fimi* et de la cellulose cristalline a été déterminée (Creagh et al., 1996).

La thermophorèse a été utilisée pour la première fois en 1856 d'après Jerabek-Willemsen et collaborateurs (Jerabek-Willemsen et al., 2014). La miniaturisation de cette technique a été mise en place par l'entreprise Nanotemper (Wienken et al., 2010). La thermophorèse permet de mesurer le mouvement de molécules lors d'un gradient de température. Celui-ci dépend de différentes propriétés comme la taille des molécules, leur

charge, leur conformation et la couche d'hydratation (Jerabek-Willemsen et al., 2014). Selon les molécules étudiées, la source de fluorescence peut être intrinsèque (la chaîne latérale d'un tryptophane) ou peut provenir du marqueur attaché à la molécule d'intérêt comme du AlexaFluor ou de la molécule en elle-même s'il s'agit d'une molécule fluorescente comme la GFP (Wienken et al., 2010). Des solutions avec des concentrations en ligand et une concentration fixe en protéine fluorescente sont préparées pour mesurer à chaque fois la fluorescence lors du gradient de température (Jerabek-Willemsen et al., 2014). Des interactions entre des oligonucléotides (Baaske et al., 2010; Wienken et al., 2011), entre ADN et protéine (Doetsch et al., 2013; Schubert et al., 2012), entre protéines (Arbel et al., 2012; Lin et al., 2012; Wilson et al., 2012) ou entre une protéine et une petite molécule (Seidel et al., 2012; Wienken et al., 2010) peuvent être analysées par thermophorèse. Le premier travail concernant l'affinité entre un CBM et un sucre provient de notre équipe (Wu et al., 2017). Il est ainsi possible de déterminer une constante d'affinité ou un EC_{50} selon le modèle de Hill.

II. Association entre une protéine et un ligand insoluble

Ce protocole a été adapté en association avec le Dr. Aurore Labourel, (post-doctorante à Newcastle University, Royaume-Uni lors de mon séjour dans cette équipe) à partir d'un protocole déjà utilisé dans l'équipe de Harry Gilbert (Institute for Cell and Molecular Biosciences, Newcastle, Grande Bretagne) et nommé pull down assay (Crouch et al., 2016). Une solution stock d'Avicel pH 101 (Fluka) est préparée à 10 % poids/ volume. La réaction d'association du CBM et de la cellulose se fait dans un volume réactionnel de 200 μ L. Chaque protéine est utilisée à une concentration finale de 0,4 $g.L^{-1}$. Du tampon phosphate de sodium pH 7 et à 18,5 mM ainsi que l'Avicel pH 101 à 5 % et de l'eau milliQ sont ajoutés pour compléter le milieu réactionnel. Celui-ci est incubé une heure dans de la glace et agité manuellement toutes les 10 minutes. L'échantillon est centrifugé 2 min à 16 000 xg. Le surnageant est renommé fraction non retenue (NR) et son volume est noté X. Les différentes étapes de resuspension du culot avant une nouvelle centrifugation sont dans le Tableau 30.

Tableau 30 : Conditions pour chaque solution de resuspension du culot.
Na P : phosphate de sodium

tampon de resuspension	20 mM pH 7 de Na P	20 mM pH 7 de Na P	SDS
volume de resuspension	500 μ L	X μ L	X μ L
nom du surnageant	lavage 1	lavage 2	élution
abréviation du surnageant	L1	L2	E

La solution de SDS est composée de 1,25 mL de SDS 20 % (Euromedex), 5 mL de tampon Tris 0,25 M pH 6,8 (PanReac Applichem), 2,5 mL de β -mercaptoéthanol (Biorad) et 2,5 mL de glycérol 50 %. Après la resuspension dans la solution SDS, une étape de chauffage à 95 °C pendant 10 min est réalisée puis la solution est centrifugée et le surnageant est prélevé. Cette dernière étape permet de dissocier le CBM et la cellulose.

En parallèle un contrôle est mis en place. Le milieu réactionnel a un volume de 200 μ L. Il contient la protéine à 0,4 g.L⁻¹, le tampon phosphate de sodium pH 7 à 18,5 mM et de l'eau milliQ. Cet échantillon est ensuite nommé contrôle (C).

Les échantillons NR, L2 et C sont préparés pour être déposés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE (chapitre 2. 3. IV). L'échantillon E est également dilué pour être déposé sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE sans l'étape de chauffage à 95 °C.

III. Microcalorimétrie

a) CBM-ligand

L'ITC (Isothermal Titration Calorimetric) ou microcalorimétrie a été réalisée à l'aide d'un MicroCal VP-ITC (Malverne). Le ligand est dilué dans le tampon de dialyse du CBM puis filtré. Le CBM et le ligand sont préchauffés à 25 °C. La solution protéique (1,4431 mL) à 50 - 300 μ M est mise dans la cellule du microcalorimètre. Un total de 28 injections de 10 μ L du ligand sont automatiquement ajoutées dans la cellule à une fréquence d'une injection toutes les 300 secondes. La chaleur émise (liaison exothermique) ou absorbée (liaison endothermique) est mesurée pour chaque ajout en ligand. La courbe de la variation de la puissance électrique nécessaire pour maintenir la cellule à 25 °C en fonction du temps est tracée. Un contrôle est réalisé avec du tampon à la place du CBM.

Des tests préliminaires (variation de la concentration en CBM et en ligand) ont permis de définir les meilleures conditions expérimentales. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Microcal ORIGIN, version 7.0 (Microcal Software) selon une régression non linéaire et un modèle d'un seul site de liaison (n qui est le nombre de sites est fixé à 1). Les valeurs obtenues pour le contrôle sont soustraites aux valeurs correspondantes à l'interaction CBM-ligand. Les données obtenues sont la constante d'association K_a (M⁻¹) et l'enthalpie de liaison ΔH (J.mol⁻¹). Les autres paramètres thermodynamiques sont calculés à partir de l'équation standard de la thermodynamique :

$$-R.T.\ln K_a = \Delta G = \Delta H - T.\Delta S.$$

R est la constante des gaz parfaits ($1,99 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$), T est la température en Kelvin ($273,15 \text{ K}$), ΔG est l'énergie libre de Gibbs (J.mol^{-1}) et ΔS est l'entropie de liaison ($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$).

(1) Cellulose régénérée

La cellulose régénérée a été préparée par le Dr. Immacolata Venditto (post-doctorante à Newcastle University, Royaume-Uni) à 10 g.L^{-1} (Boraston, 2005). La cellulose est utilisée à 3 g.L^{-1} final.

(2) Nanocristaux de cellulose

Les nanocristaux de cellulose ont été préparés à 2 % poids/ poids par Laurent Heux (CERMAV, Grenoble) selon (Fumagalli et al., 2013), à partir de pâte de feuillus. Les nanocristaux de cellulose ont été dilués à 1 % après dialyse dans du tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7 à température ambiante, sur la nuit.

(3) Arabinoxylanes de blé

L'arabinoxylane de blé a été préparé à 1 % poids/ volume (Wheat arabinoxylans, medium viscosity, Megazyme).

b) Protéine-protéine

La méthode suivie est la même que dans le chapitre 2. 5. III. a). Pour le test Jo-In, Jo est dilué à $420 \mu\text{M}$ alors qu'In est à $56 \mu\text{M}$. Le contrôle correspond à un test tampon – Jo. Dans le cas du test JoDsRed-In, JoDsRed est utilisé à $379 \mu\text{M}$ et In à $56 \mu\text{M}$. Le contrôle n'a pas pu être réalisé.

IV. Résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (ou RMN) permet d'obtenir un spectre du proton (^1H) pour une protéine. Certains résidus aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine) du CBM sont impliqués directement dans la reconnaissance du ligand. Dans notre cas, trois résidus tryptophane sont concernés.

La protéine est préalablement purifiée et diluée à 185 μM . La protéine est ensuite diluée à 176 μM dans de l'oxyde de deutérium (D_2O) /TMSP (acide 3-(triméthylsilyl) 3,3,3,3 - tétradeutéro-propionique) à 5 %. L'oxyde de deutérium est une molécule d'eau dont les hydrogènes sont remplacés par du deutérium, deutérium également présent dans le TMSP. Le solvant utilisé ne perturbera pas la résonance lors de la mesure du spectre RMN. Le xylohexaose (1,4 β -D-xylohexaose ou X₆, Megazyme) a été préparé à différentes concentrations puis lyophilisé. La solution protéique est utilisée pour solubiliser la plus faible concentration en ligand. La solution contenant la protéine et le ligand est ensuite déposée dans un tube RMN. Le spectromètre Bruker Avance 800 MHz permet d'obtenir un spectre RMN ^1H pour chaque protéine en augmentant progressivement la concentration en xylohexaose (50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1 000, 2 000 μM).

A partir de chaque spectre RMN et du logiciel TopSpin 3.5pI4, le déplacement chimique pour chaque protéine et pour chaque concentration en ligand est déterminé. Auparavant, la valeur du signal du méthyle de la référence (le TMSP) est mise à zéro. Ceci sert comme étalon interne qui doit être insensible à l'ajout du ligand. La variation du déplacement chimique est calculée entre la valeur du déplacement chimique à une concentration en ligand donnée et la valeur du déplacement chimique en absence de ligand. Il est alors possible de tracer une courbe de la variation du déplacement chimique (ppm) en fonction de la concentration en ligand. Le logiciel SigmaPlot est utilisé, avec un modèle à un seul site de liaison, pour déterminer la constante de dissociation (K_d) pour chaque protéine.

V. *Microthermophorèse*

La thermophorèse est utilisée pour mesurer le mouvement de molécules lors de l'application d'un gradient de température. Elle a été miniaturisée et renommée microthermophorèse (microscale thermophoresis ou MST en anglais). La source de fluorescence utilisée provient d'un marqueur attaché à la protéine d'étude. Plusieurs solutions sont analysées en parallèle, contenant chacune la même concentration en protéine et une concentration croissante en ligand.

a) Marquage de la protéine

La concentration de la protéine est ajustée à 20 μM avec du tampon de marquage (tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7) pour un volume final de 150 μL . Un volume de 30 μL de 100 % de DMSO (diméthylsulfoxyde) et le marqueur de fluorescence lyophilisé (dye NT647, Nanotemper) sont mélangés. Un volume de 15 μL de cette solution est dilué dans 85 μL du tampon de marquage. Un volume de 100 μL de la protéine diluée est ajoutée et ceci est incubé pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le reste du marqueur de fluorescence peut être conservé à - 20 °C.

b) Analyse par MST

Ces expériences ont été réalisées au sein de la Fédération de recherche agrobiosciences interactions et biodiversité avec l'aide de Jean-Jacques Bono et de Virginie Gascioli. Un volume de 20 μL des nanocristaux de cellulose à 2 % est déposé dans un des tubes PCR fourni dans le kit premium capillaries (Nanotemper). Une quantité de 15 tubes (notés de 1 à 15) est préparée avec 10 μL de tampon de dilution. Un volume de 10 μL de ligand est prélevé dans le tube correspondant, il est versé dans le tube 1 et mélangé au tampon de dilution avec la pipette. Un nouveau prélèvement de 10 μL avec le même cône est réalisé et déposé dans le tube 2. La méthodologie est la même jusqu'au dernier tube. Le volume de 10 μL prélevé dans le dernier tube est jeté. Un volume de 10 μL de la protéine marquée (préalablement diluée si nécessaire pour atteindre 0,6 μM de concentration finale) est ajouté dans les 16 tubes et mélangé. Les concentrations finales de de nanocristaux de cellulose sont comprises entre 312,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et 0,3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Le temps d'incubation dans les tubes est noté. Une solution d'acide pluronique est préparée en amont à 0,5 % (poids/ volume) dans de l'eau puis filtrée à 0,22 μm .

Le capillaire est tenu à une extrémité puis mis dans le tube PCR contenant la solution après quelques secondes, le liquide rentre dans le capillaire par capillarité. Le capillaire est déposé sur le support de l'appareil Monolith NT115 (Nanotemper) puis fixé avec le bloc magnétique. Selon le même protocole les autres capillaires sont remplis pour que chaque capillaire contienne une concentration différente en ligand. Il faut alors ajouter le deuxième bloc magnétique. Le logiciel MO Affinity (Nanotemper) mesure la fluorescence tout au long de l'acquisition pour les 15 capillaires et à 25 °C. L'analyse choisie est celle de l'équation de Hill pour déterminer une valeur d' EC_{50} .

6. Enzymologie

I. Dosage de l'activité enzymatique sur un substrat chromogénique

a) *p*NP- X_3

Un volume de 50 μ L d'enzyme purifiée (diluée dans le mix de dilution) est mélangé à 450 μ L de mix d'activité préalablement chauffé à 37 °C dans des cuvettes en quartz de 500 μ L. Le mix de dilution est composé du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 et de BSA à 1 g.L⁻¹. Le mix d'activité est composé du mix de dilution et de 4-nitrophényle- β -D-xylotrioside (*p*NP- X_3) à une concentration finale de 5 mM. La cinétique de libération du 4-nitrophényle (*p*NP) est suivie par spectrophotométrie à 401 nm (Cary 100 Bio Varian). L'activité de l'enzyme est exprimée en UI.mL⁻¹ (UI (unité internationale) = μ mol de *p*NP.min⁻¹), ceci correspond à la pente de l'absorbance en fonction du temps pour l'échantillon (DO.min⁻¹) sur la pente de l'absorbance en fonction de la concentration pour la gamme étalon (DO.g⁻¹.L⁻¹ ou DO.M⁻¹).

b) *p*NP-Ace

Un volume de 20 μ L d'enzyme est mélangé à 180 μ L de solution contenant 2 mM de *p*Np-Ace, 1 g.L⁻¹ de BSA et du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7. La cinétique de libération du *p*NP est suivie par spectrophotométrie à 37 °C pendant 10 minutes et à 405 nm (EON). L'activité de l'enzyme est exprimée en UI.mL⁻¹.

Un exemple de la droite étalon en *p*NP est présenté ci-dessous. Pour chaque concentration en *p*NP entre 0 et 250 μ M, l'absorbance a été mesurée (Tableau 31).

Tableau 31 : Valeurs de la droite étalon en *p*NP.

concentration en <i>p</i> NP (μ M)	0	25	50	100	125	150	200	250
DO à 405 nm	0,045	0,191	0,364	0,676	0,919	1,084	1,36	1,853

La courbe de l'absorbance en fonction de la concentration molaire en *p*NP est alors tracée (Figure 32). Elle a une équation de type $y = ax+b$. Les coefficients a et b de la droite

étalon sont alors déterminés. Ces données sont spécifiques des conditions expérimentales (tampon, pH, spectrophotomètre).

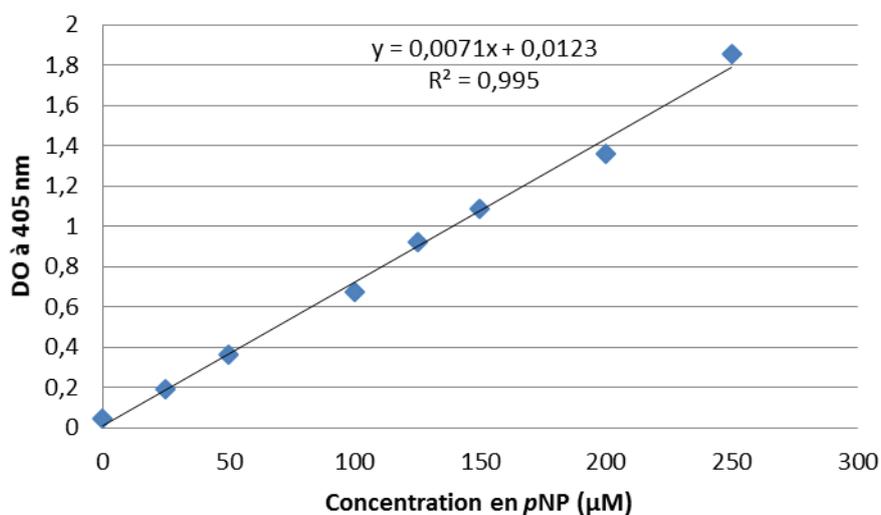


Figure 32 : Droite étalon en pNP dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7.

II. Test DNS

a) Préparation du DNS

La solution d'acide dinitrosalicylique (DNS) contient 10 g.L⁻¹ d'acide dinitrosalicylique (Acros organics), 16 g.L⁻¹ d'hydroxide de sodium (NaOH, GPR Rectapur) et 300 g.L⁻¹ tartrate et potassium de sodium (VWR chemicals).

b) Protocole général

Le DNS permet de doser les sucres réducteurs d'une solution. C'est une solution très basique (pH > 12) dans lequel nos enzymes sont inactivées. Le milieu réactionnel est composé d'enzyme, de substrat et de BSA à 1 g.L⁻¹. La réaction a lieu à 37 °C sous une agitation de 1 400 rpm (ThermoMixer[®] avec un thermoblock de 2 mL, Eppendorf). Un volume de 100 µL d'échantillon est mélangé à 100 µL de DNS puis chauffé 10 minutes à 95 °C. Un volume de 1 mL d'eau est ajouté puis 300 µL de cette solution sont déposés dans une microplaque de 96 puits et l'absorbance de chaque puits est mesurée à 540 nm (Sunrise, Tecan). Un contrôle est réalisé en parallèle avec du tampon à la place de l'enzyme. Une

gamme étalon de xylose est également réalisée avec des concentrations en sucre allant de 0 à 2 g.L⁻¹.

Les valeurs correspondantes de l'échantillon traité avec du tampon sont retranchées aux valeurs correspondantes à l'activité d'une enzyme. Il est possible de tracer les courbes de la libération d'extrémités réductrices en fonction du temps

Un exemple de la droite étalon en xylose est présenté ci-dessous. Pour chaque concentration en xylose entre 0 et 2 g.L⁻¹, l'absorbance a été mesurée (Tableau 32).

Tableau 32 : Valeurs de la droite étalon en xylose.

concentration en xylose (g.L ⁻¹)	0	0,1	0,2	0,4	0,5	2
concentration en xylose (mM)	0	0,666	1,332	2,664	3,330	13,322
DO à 540 nm	0,0480	0,079	0,136	0,23	0,313	1,046

La courbe de l'absorbance en fonction de la concentration molaire en xylose est alors tracée (Figure 33). Elle a une équation de type $y = ax+b$. Les coefficients a et b de la droite étalon sont alors déterminés.

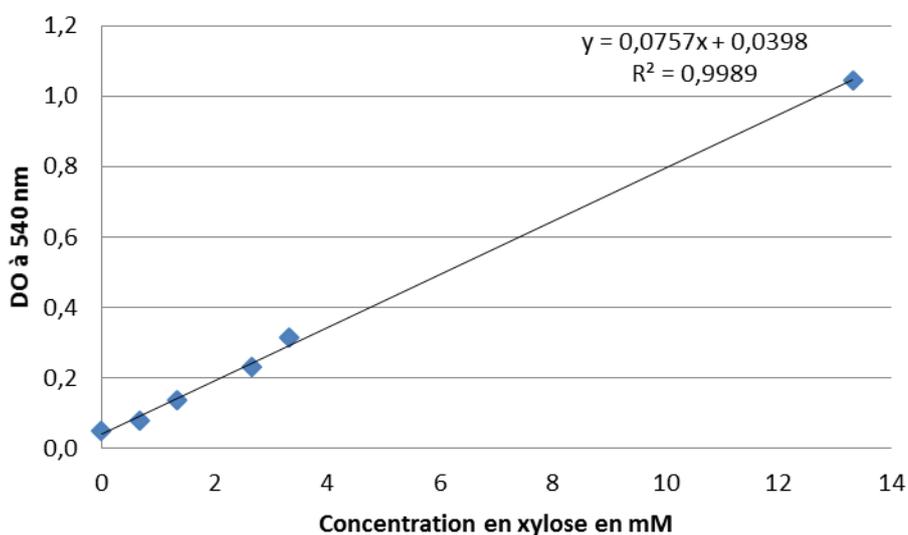


Figure 33 : Droite étalon en xylose.

c) Préparation des substrats

(1) Xylane de hêtre

Le xylane de hêtre est préparé à 4 % (poids/ volume) pour obtenir une solution stock. Le protocole est celui préconisé par Megazyme. La solution est ensuite autoclavée.

(2) Son de blé

Le son de blé broyé à 0,5 mm provient de ARD (Pomacle, France) et est désamidonné (Bouraoui et al., 2016). Une quantité de 5 g de son de blé est lavée dans 2 litres d'eau pendant une heure à 4 °C. La solution est filtrée avec un filtre de 0,45 µm puis le son de blé est séché dans une étuve à 50 °C pendant trois jours. Le son de blé est ensuite autoclavé à sec.

(3) Paille de blé

La paille de blé (variété *Apache*) a été récoltée en 2007 par ARD (Pomacle, France) (Song et al., 2010). La paille a été broyée en poudre (0,5 mm) avec un broyeur à couteaux. Une quantité de 10 g de paille de blé est lavée dans 2 litres d'eau pendant une heure à 4 °C. La solution est filtrée avec un filtre de 0,45 µm puis la paille de blé est séchée dans une étuve à 50 °C pendant trois jours. La paille de de blé est ensuite autoclavée à sec.

d) Détermination des paramètres cinétiques

Des concentrations variables de xylane de hêtre sont incubées dans du tampon Tris HCl à 50 mM pH 7,5, en présence de de BSA à 1 g.L⁻¹. La suite du protocole est dans le chapitre 2. 6. II. b).

Les vitesses exprimées en mM de xylose par minute sont notées pour chaque concentration en xylane et le logiciel SigmaPlot est utilisé pour déterminer les paramètres cinétiques de la réaction avec un modèle à un seul site de liaison.

e) Cinétique sur xylane de hêtre

Le milieu réactionnel comporte 600 µL de xylane de hêtre à partir de la solution stock (soit 1,2 % de substrat), 1 g.L⁻¹ de BSA, 200 µL de chaque protéine préalablement diluée à

$1,54 \cdot 10^{-5}$ M dans le mix de dilution (la concentration finale sera donc de $1,54 \cdot 10^{-6}$ M), du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 6 et de l'eau qsp 2 mL. Le mix de dilution est composé de tampon phosphate de sodium 50 mM pH 6 et de 1 g.L^{-1} de BSA. La suite du protocole est dans le chapitre 2. 6. II. b). Les prélèvements sont réalisés à 20 min, 40 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h. La gamme étalon de xylose est réalisée avec des concentrations en sucre allant de 0 à 8 g.L^{-1} .

f) Cinétique sur son ou paille de blé

Le milieu réactionnel est composé de 2 % de substrat préparé comme dans le chapitre 2. 6. II. c) préalablement hydraté pendant 13 heures, de 1 g.L^{-1} de BSA, de 200 μL de chaque protéine préalablement diluée à $1,54 \cdot 10^{-5}$ M, de tampon phosphate de sodium 50 mM pH 6 et d'eau qsp 2 mL. La suite du protocole est dans le chapitre 2. 6. II. b).

Dans le cas du son de blé et en absence d'acétyl xylane estérase, les prélèvements sont réalisés à 30 min, 1h30, 3 h, 6 h et 24 h. Dans le cas du son de blé et en présence d'acétyl xylane estérase, les prélèvements sont réalisés à 13 min, 30 min, 1 h, 2 h et 3 h. Dans le cas de la paille de blé et en absence d'acétyl xylane estérase, les prélèvements sont réalisés à 20 min, 40 min, 1h30, 3h30, 6 h et 24 h. Dans le cas de la paille de blé et en présence d'acétyl xylane estérase, les prélèvements sont réalisés à 30 min, 1h30, 3h30, 6 h et 23h30.

III. Analyse HPAEC-PAD

a) Protocole général

Un volume de 120 à 150 μL d'échantillon est prélevé et la réaction est arrêtée par une incubation de 5 min à 95 °C dans un bain sec. Les échantillons peuvent être conservés à - 20 °C. Après décongélation, ils sont centrifugés à 16 000 xg pendant 5 min. Le surnageant est alors filtré à 0,22 μm (Minisart RC 4) et dilué en fonction des conditions réactionnelles. Des aliquots de 100 à 200 μL sont pipetés dans des vials avec insert en verre et scellés (Supelco). Une gamme étalon des différents xylooligosaccharides (xylose, xylobiose, xylotriose, xylo-tetraose, xylo-pentaose, xylo-hexaose) (Megazyme) est préparée. Chaque produit est pesé et mélangé pour obtenir une solution à 1 g.L^{-1} qui peut être conservée à - 20 °C. Cette solution est ensuite diluée à $0,4 \text{ g.L}^{-1}$. Ce stock permet alors de préparer différentes concentrations (0,04, 0,02, 0,015, 0,01 et $0,005 \text{ g.L}^{-1}$) dans des vials avec insert.

Une colonne CarboPac PA1 (Dionex) est utilisée avec une précolonne adaptée. La chromatographie échangeuse d'ions est réalisée à l'aide d'une Dionex ICS-3000 (ThermoFischer) située à la plateforme ICEO (Dr. Sophie Bozonnet et Nelly Monties). Le tampon A est une solution d'hydroxyde de sodium 100 mM. Le tampon B est une solution à 1 M d'acétate de sodium et 100 mM d'hydroxyde de sodium. Ces deux tampons sont préalablement dégazés. Un volume de 20 µL de chaque échantillon est injecté avec un débit de 1 mL.min⁻¹. Le programme est dans le Tableau 33 et Tableau 34. La deuxième méthode a été mise en place afin de mieux nettoyer la colonne après le passage des échantillons et ne pas l'encrasser mais cela ne change pas les temps de rétention des xylooligosaccharides d'intérêt. La détection est réalisée par une cellule ampérométrique et électrode AgCl.

Tableau 33 : Etapes du gradient des tampons A et B pour la méthode 1.

étapes	1	2	3	4	5	6
temps (min)	0 à 5	5 à 25	25 à 25,01	25,01 à 35	35 à 35,01	35,01 à 45
tampon A (%)	100	100 à 88	88 à 50	50	50 à 100	100
tampon B (%)	0	0 à 12	12 à 50	50	50 à 0	0

Tableau 34 : Etapes du gradient des tampons A et B pour la méthode 2.

étapes	1	2	3	4	5	6
temps (min)	0 à 5	5 à 25	25 à 29	29 à 35	35 à 36	36 à 48
tampon A (%)	100	100 à 88	88 à 10	10	10 à 100	100
tampon B (%)	0	0 à 12	12 à 90	90	90 à 0	0

Chaque pic des étalons est intégré puis une courbe étalon est calculée pour chaque xylooligosaccharide. Les gammes étalons étant injectées tous les 10 échantillons environ, cela est répété de nombreuses fois. Un exemple des droites étalons (du xylose au xylohexaose) est présenté ci-dessous (Figure 34).

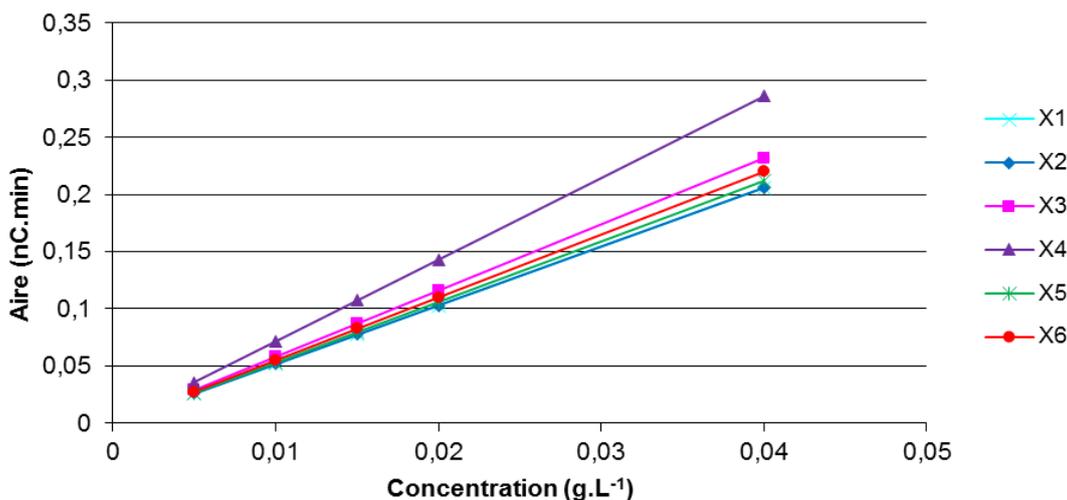


Figure 34 : Courbes étalons du xylose au xylohexaose, entre 0,005 et 0,040 g.L⁻¹ par HPAEC-PAD. X₁ : xylose ; X₂ : xylobiose ; X₃ : xylotriose ; X₄ : xylo tétraose, X₅ : xylopentaose ; X₆ : xylohexaose.

Les pics correspondant à un des xylooligosaccharides dont le temps de rétention est connu, sont également intégrés pour les échantillons des cinétiques. La concentration massique de chaque xylooligosaccharide est déterminée grâce au logiciel Chromoléon après avoir associé une des gammes étalon à un échantillon donné. La concentration molaire est calculée à partir de la concentration massique et de la masse molaire de chaque xylooligosaccharide. Les valeurs correspondantes de l'échantillon traité avec du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 6 (contrôle négatif) sont alors retranchées. Il est possible de tracer les courbes de la concentration pour chaque xylooligosaccharides en fonction du temps.

b) Cinétique sur xylane de hêtre

Le milieu réactionnel et les temps de prélèvement sont les mêmes que dans le chapitre 2. 6. II. e). La suite du protocole est dans le chapitre 2. 6. III. a).

c) Cinétique sur son ou paille de blé

Le milieu réactionnel est le même que dans le chapitre 2. 6. II. f). La suite du protocole est dans le chapitre 2. 6. III. a). Dans le cas du son de blé les prélèvements sont réalisés à 30 minutes, 1h30, 3h30, 6 h et 24 h. Dans le cas de la paille de blé les prélèvements sont réalisés à 20 minutes, 40 minutes, 1h30, 3h30, 6 h et 24 h. InNpXyn11A-Jo a été utilisée à $1,29 \cdot 10^{-4}$ mole.L⁻¹.

7. Immunocytochimie

I. Préparation des échantillons

a) Echantillons inclus en paraffine

(1) Fixation

La paille de blé (*Shango*) a été récoltée lorsque la plante a atteint la maturité puis séparée en parties (racines, nœuds et entre-nœuds) (Bertrand et al., 2006). Les entre-nœuds ont été lavés avec une solution de métaphosphate de sodium pendant 14 heures, rincés deux fois dans de l'eau déionisée et séchés à 35 °C pendant une semaine.

L'ensemble du travail réalisé en immunocytochimie est une collaboration avec le Pr. Vincent Burlat (LRSV, Université Paul Sabatier, Auzeville-Tolosane). Les échantillons (entre-nœuds de paille de blé) ont été immergés dans 20 - 30 mL de FAA ou de AA. La solution FAA est composée de 10 % de formaline (37 % de formaldéhyde), 50 % d'alcool éthylique, 5 % d'acide acétique; 35 % d'eau traitée au DEPC (pyrocarbonate d'éthyle). Le tampon AA correspond à 50 % d'alcool d'éthyle; 5 % d'acide acétique, 45 % d'eau traitée au DEPC. L'infiltration fixative a été réalisée en 5 cycles d'infiltration sous vide (1 min puis libération de vide dans une chambre à vide). Les échantillons infiltrés ont été incubés pendant 8 ou 16 heures à 4 °C dans du FAA et rincées 4 fois dans 50 % d'éthanol dans de l'eau DEPC pendant 10 minutes. A cette étape, les échantillons peuvent être traités directement ou peuvent être stockés en toute sécurité pendant des mois à 4 °C dans 50 % d'éthanol. Le protocole d'infiltration a été adapté à partir de (Burlat et al., 2004) avec une déshydratation progressive dans des gradients en série d'eau DEPC/ éthanol absolu/ tert-butanol avec les proportions suivantes 50/40/10 ; 30/50/20; 15/50/35; 0/45/55; 0/25/75, pendant une heure chacun et à température ambiante, suivie par une nuit d'incubation dans le tert-butanol pur. Le lendemain, la solution de tert-butanol est renouvelée pour une heure, puis la moitié de tert-butanol est remplacée par du Paraplast Plus fondu et ceci est incubé dans un four à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est enlevé avec précaution et remplacé par du tert-butanol/ Paraplast plus 50/50 de pré-mélange et incubé une nuit à 60 °C. Le lendemain et pour les 2-3 jours suivants, le Paraplast Plus pur et fondu est changé une fois ou deux fois par jour. Le capuchon doit être retiré au cours de toutes ces incubations afin de permettre l'évaporation du tert-butanol restant. A ce stade, il est possible de réaliser directement l'incorporation des tissus ou de stocker les

tubes avec des bouchons à 4 °C. Dans ce dernier cas, les tubes doivent être mis en incubation pendant un jour à 60 °C avant d'accéder aux échantillons.

(2) *Inclusion dans du Paraplast plus*

Les échantillons ont été disposés dans du Paraplast plus liquide dans des moules métalliques (38 mm x 25 mm x 12 mm, Tissue-Tek 4133; Delta Microscopies, Mauressac, France). Une plaque chauffante (64 cm x 20 cm, Labscientific XH-2001; Delta Microscopies, Mauressac, France) a été réglée à 62 °C. D'un côté, des moules métalliques de base ont été remplis de Paraplast Plus fondu et de l'autre côté, des boîtes de Pétri ont été remplies avec quatre échantillons dans du Paraplast Plus fondu (les tubes ont été versés directement dans les boîtes de Pétri). Une spatule et des pinces métalliques ont été utilisées pour disposer les siliques dans les moules. Les moules d'enrobage remplis ont été recouverts par un embout d'encastrement blanc et l'ensemble du système a été légèrement déplacé sur une plaque métallique congelée pour fixer la position des échantillons. La solidification du Paraplast Plus et la fixation de l'embout en plastique avec le moule métallique ont été obtenues au bout d'environ 15 min à température ambiante suivies d'un stockage à 4 °C pendant au moins une heure. Les échantillons peuvent ensuite être séparés du moule de base pour la microtomie directe ou pour un stockage à 4 °C pendant des années. Pour adoucir les échantillons relativement durs avant le sectionnement, les blocs de paraffine ont été immergés 24 à 48 heures dans 10 % d'acide acétique/ éthanol à 90 % à 4 °C.

b) Echantillons inclus dans de la résine

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr. Alain Jauneau (plateforme d'Imagerie cellulaire) et le Pr. Vincent Burlat. Les entre-nœuds de paille de blé (Bertrand et al., 2006) sont déshydratés par des bains successifs d'éthanol à 20, 40, 60, 70, 80, 90 % dans de l'eau pendant au minimum une heure entre chaque bain puis 100 % d'éthanol (2 fois 24 heures). Ils sont ensuite infiltrés avec de la résine (LRWhite) : 2 volumes d'éthanol/ 1 volume de LRW, 1/1 et 1/2 (environ 12 heures à température ambiante) puis 2 fois avec de la résine pure (24 heures). Les échantillons sont mis en gélule remplie de LRW et mis à 65 °C pour la polymérisation de la résine.

II. Coupe des échantillons

a) Echantillons inclus dans de la paraffine

(1) Traitement des lames

Les lames de microscopie Starfrost ont été soigneusement disposées dans un rack de coloration en polypropylène. Le rack a été plongé pendant 5 minutes dans 200 mL d'une solution fraîche à 2 % (v/v) de 3-aminopropyltriéthoxysilane dans de l'acétone. Le rack a été mis à sécher pendant 15 minutes et ensuite lavé séquentiellement dans trois cuves contenant chacune 200 mL d'eau traitée au DEPC. Ceci est mis à sécher pendant une nuit à 37 °C et peut être stocké pendant des mois à la température ambiante.

(2) Microtome

Méthode 1

Les lames ont été annotées puis disposées sur une plaque chauffante à 38 °C et soigneusement recouvertes de 2 à 3 mL d'eau déminéralisée préalablement dégazée pendant au moins une heure dans une chambre à vide. Des coupes en série (10 à 16 µm d'épaisseur) de blocs de paraffine ont été coupées avec un microtome rotatif (Seit 1872 Jung AG Microtome avec Tissue-Tek A35). Les sections ont été soigneusement séparées et mises individuellement dans la même orientation et la même position sur chacune des lames. Ce positionnement minutieux des sections est important pour faciliter l'analyse comparative finale des résultats sur exactement les mêmes tissus, avec les différents traitements/ marquages. Finalement quatre coupes ont été positionnées sur une lame. L'excès d'eau a été soigneusement retiré avec une pipette et les lames ont été mises à sécher pendant la nuit à 35 °C sur la plaque chauffante pour que les sections adhèrent.

Méthode 2

Les lames ont été annotées puis disposées sur une plaque chauffante à 38 °C. Des coupes en série (10 à 16 µm d'épaisseur) de blocs de paraffine ont été coupées avec le microtome rotatif. Les sections ont été soigneusement séparées puis déposées dans un bain. Après 2 minutes, une lame a été immergée dans l'eau à un angle de 45° et chaque section a été maintenue pendant que la lame était sortie de l'eau, la section correctement positionnée dessus grâce à l'aide d'une spatule. Chaque section est mise individuellement dans la même orientation et la même position sur chacune des lames. Ce positionnement minutieux des

sections est important pour faciliter l'analyse comparative finale des résultats sur exactement les mêmes tissus, avec les différents traitements/ marquages. Finalement quatre sections ont été positionnées sur une lame. Les lames ont été mises à sécher pendant la nuit à 38 °C sur la plaque chauffante pour que les sections adhèrent.

(3) *Déparaffinage*

Les lames sont plongées dans plusieurs bains (environ 200 mL) pour être déparaffinées (Tableau 35). Les lames sont ensuite posées sur une la plaque chauffante (40 °C) pour être séchées.

Tableau 35 : Etapes du déparaffinage.

lavage	1, 2	3	4	5	6	7	8
tampon	xylène	100 % d'éthanol	95 % d'éthanol	75 % d'éthanol	50 % d'éthanol	eau	eau
temps (min)	10	10	5	5	5	5	5

b) Echantillons inclus dans de la résine

Chaque entre-nœud a été divisé en deux et coupé à partir du milieu de l'entre-nœud. Les coupes de 1 µm d'épaisseur ont été réalisées au couteau diamant avec un ultramicrotome (UltraCut E Leica-Reichert). Elles ont été déposées sur lames de verre et séchées à 50 °C.

III. Digestion enzymatique

a) Echantillons inclus dans de la paraffine

Un volume de 200 µL de la solution enzymatique est déposé sur la lame. Les coupes sont digérées par l'action d'un cocktail enzymatique commercial (Novozymes) seul ou après ajout de l'enzyme *NpXyn11A* à une concentration finale de 0,295 mg.L⁻¹ ou par l'action d'une enzyme seule purifiée. Les cocktails commerciaux sont utilisés à 2 FPU/ lame (filter paper unit). Un contrôle est mis en œuvre en parallèle, avec du tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 5 dans le cas des cocktails commerciaux ou pH 7 dans le cas des xylanases seules. Ceci est fermé avec un microincubateur grâce à l'ajout de 10 à 20 µL d'agarose 1 % afin d'éviter l'évaporation de la solution. L'incubation est alors réalisée dans des conditions optimales pour chaque enzyme (37, 40 ou 50°C, pendant 30 minutes ou 1 heure). Les coupes sont ensuite lavées deux fois dans du TTBS₅₀₀ pendant 5 minutes. Le tampon TTBS₅₀₀ est

composé de 0,01 M Tris à pH 7,5, de 2 mM CaCl₂ (calcium chloride, Pan Reac) et de Triton 100X 0,3 % poids/ volume.

b) Echantillons inclus dans de la résine

Les entre-noeuds de paille sont hydratés pendant 14h30 à température ambiante avec 15 mL de tampon 12 mM citrate de sodium, 50 mM phosphate de sodium pH 6, sans agitation pour dissocier l'effet de gonflement de la paille et la dégradation de celle-ci. Chaque bout de paille est déposé sur un papier absorbant pour enlever le tampon résiduel. Il est ensuite mis dans un tube Eppendorf de 2 mL. Le milieu réactionnel est composé de 2 bouts de paille de blé (soit environ 20 mg) et de 1 mL de l'enzyme préalablement diluée dans le tampon 12 mM citrate de sodium, 50 mM phosphate de sodium pH 6. La concentration finale en protéine est de $7,6 \cdot 10^{-6}$ M sauf pour InNpXyn11A-JoCBM3a ($2,65 \cdot 10^{-6}$ M). La dégradation dure 24 heures à 37 °C avec une agitation de 400 rpm puis 800 rpm après quelques heures dans un thermomixeur (ThermoMixer[®] avec un thermoblock de 2 mL, Eppendorf). A la fin de la réaction, il faut déposer chaque bout de paille sur un papier absorbant pour enlever le tampon résiduel avant de mettre les échantillons dans une solution à 2,5 % de glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7 (1 mL pour 2 bouts de paille) pour la précipitation des protéines et la fixation des composants du substrat. Les échantillons peuvent être conservés à 4 °C pendant 24 heures au maximum.

IV. Marquage des coupes

a) Visualisation des xylanes

Les coupes de paille de blé sont bloquées avec du tampon TTBS₅₀₀ et 5 % poids/ volume de lait écrémé Regilait non gras en poudre (TTBS_{milk}). Le marquage est réalisé avec le FITC (fluorescein isothiocyanate). Un anticorps monoclonal primaire, le LM11 dilué à 1/5 (Plant probes) pour un volume final de 100 µL, est mis en contact avec la coupe pendant 1 - 2 heures à température ambiante. Un volume de 100 µL de l'anticorps secondaire, l'anti-rat IgG-FITC dilué à 1/100, est incubé pendant 1 - 2 heures à température ambiante. L'anticorps LM11 se lie aux xylanes non substitués ou relativement peu substitués alors que l'anticorps secondaire reconnaîtra spécifiquement l'anticorps primaire. Les anticorps sont dilués dans du TTBS_{milk} afin de bloquer les sites non spécifiques sur les coupes. Entre chaque incubation

avec un anticorps, il est important de réaliser des lavages dans 200 mL de TTBS₅₀₀ pour éviter des liaisons non spécifiques, en général 3 à 6 lavages de 5 minutes suffisent. Les lames sont rincées à l'eau et séchées. Le milieu de montage est le Prolong Antifade (Thermo Fisher Scientific) ou le milieu Vectashield (Eurobio). Quelle que soit la méthode de marquage choisie, des contrôles seront effectués (sans l'anticorps contenant le FITC ou sans dégradation enzymatique). En parallèle du marquage au FITC, des informations peuvent être obtenues avec l'autofluorescence de la lignine avec le filtre DAPI.

b) Visualisation de la cellulose

Le CBM3a associé à un tag histidine est utilisé entre 3 et 30 mg.L⁻¹, pendant 1 à 2 heures et à température ambiante. Un anticorps primaire anti-tag histidine dilué à 1/100, incubé à température ambiante pendant une heure (GenScript) est alors utilisé, suivi d'un anticorps secondaire anti-souris IgG-FITC, incubé à température ambiante pendant une heure. Le CBM3a permet de détecter la cellulose (ou les xyloglucanes). Les anticorps sont dilués dans du TTBS_{milk} afin de bloquer les sites non spécifiques sur les coupes. Les lavages, le milieu de montage et les contrôles sont les mêmes que dans le chapitre 2. 7. IV. a).

Les différentes possibilités de marquage sont représentées dans la Figure 35.

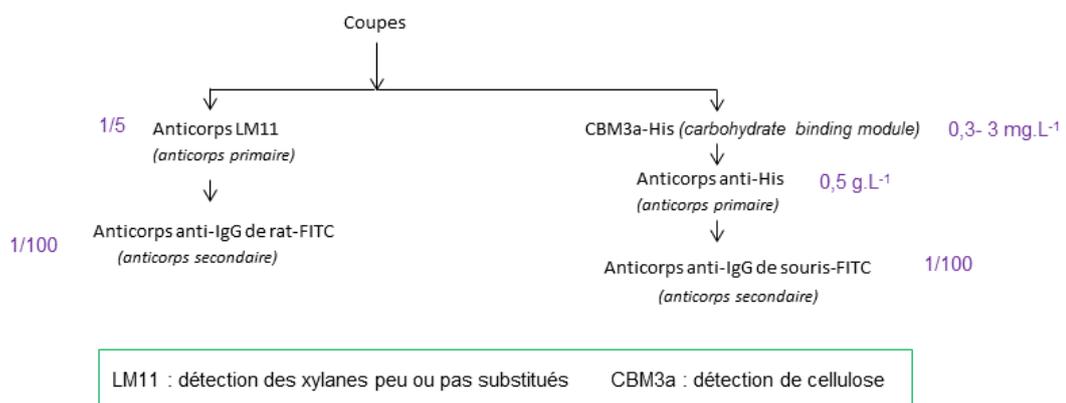


Figure 35 : Représentation des étapes de marquage.

c) Coloration au calcofluor

Les coupes sont traitées au calcofluor 0,1 % en solution aqueuse (2 minutes sur une plaque chauffante à 30 - 40 °C) puis rincées à l'eau. Le calcofluor permet un marquage de la cellulose et une visualisation de l'organisation tissulaire et cellulaire.

8. Analyse des coupes de paille de blé

I. Microscopie

L'ensemble des coupes est scanné au Nanozoomer (scanner de lames, Hamamatsu) à la plateforme Imagerie Cellulaire (Auzeville-Tolosane). Les paramètres pour le FITC (excitation entre 473 et 491 nm, miroir dichroïque à 405/488/561/637 nm, émission entre 510 et 540 nm), le TRITC (tetramethylrhodamine isocyanate) (excitation entre 563 et 569 nm, miroir dichroïque à 405/488/561/637 nm, émission entre 607 et 636 nm) et le DAPI (excitation entre 381 et 393 nm, miroir dichroïque à 405/488/561/637 nm, émission entre 420 et 460 nm) sont choisis en testant le contrôle et le bruit de fond.

Les observations peuvent également être faites avec le microscope confocal (Leica SP2 AOBS, Leica) avec la raie 405 nm d'une diode laser. La fluorescence émise par le calcofluor est collectée entre 415 et 500 nm. Les observations ont été faites avec un objectif 10X à sec (O.N. de 0,3) pour les vues d'ensemble (champ imagé de 1,5 x 1,5 mm) et un 40X immersion huile (O.N. de 1,25) pour les vues à plus fort grossissement. Les vues d'ensemble sont toutes acquises avec les mêmes paramètres d'acquisition. Les vues d'ensemble des échantillons sont des mosaïques obtenues à partir des images réalisées au 10X. Les images à plus fort grossissement sont des projections maximales de stack en z d'images confocales x, y acquises au 40X.

II. Quantification de l'immunofluorescence

La molécule FITC sera en vert et la lignine sera observée grâce au canal DAPI, en bleu. Plusieurs analyses peuvent être faites sur les images obtenues. Une comparaison des images (contrôle du marquage avec les anticorps primaire et secondaire ; bruit de fond avec seulement l'anticorps secondaire ; test avec le traitement enzymatique ainsi que les anticorps primaire et secondaire) peut être réalisée avec le logiciel NDP.view2 (Hamamatsu) en appliquant les mêmes paramètres aux images ce qui donne des informations qualitatives sur la dégradation des coupes.

La quantification de la fluorescence verte après marquage a été réalisée pour plusieurs zones (n) soit de la même coupe, soit de plusieurs coupes de la même lame. Deux régions ont été quantifiées. La première correspond au parenchyme et à la matrice interne. La deuxième est composée du sclérenchyme et de l'épiderme bien que pour faciliter la quantification les

chambres stomatales qui sont des espaces vides sont aussi comprises dans cette région. Le nombre n dépend de l'état des coupes car chaque zone quantifiée est strictement similaire sur les trois images (digestion enzymatique, contrôle et bruit de fond) excluant les zones déchirées de certaines coupes. Des zones ont été définies, identiques sur les trois images et représentatives de la coupe en général puis annotées. Les paramètres de NDP.view2 ont été choisis pour diminuer l'immunofluorescence sur l'image du bruit de fond mais sans observer une image totalement noire et appliqués aux trois images. L'image de chaque zone définie a été exportée et ouverte avec ImageJ. Les trois canaux ont été séparés (Split channel) et seulement l'image correspondante au canal vert a été utilisée pour la suite. Un seuil (Treshold, triangle) a été choisi pour refléter au mieux l'image et l'image a été quantifiée (Measure).

Les mesures de l'immunofluorescence des images ont été traitées sur Excel. Pour la méthode 1, la valeur de l'immunofluorescence du contrôle a été fixée à 100 % pour une zone donnée. Le pourcentage de fluorescence résiduelle a été calculé pour les deux autres images (digestion enzymatique et bruit de fond) de la même zone par rapport au contrôle, à partir des valeurs de l'immunofluorescence desdites images.

Pour la méthode 2, la valeur de l'immunofluorescence du bruit de fond a été soustraite aux valeurs des deux autres images (digestion enzymatique et contrôle) de la même zone. La valeur obtenue pour le contrôle a été fixée à 100 % et le pourcentage de fluorescence résiduelle a été calculé pour l'image de la digestion enzymatique. Pour une expérience donnée, la moyenne des fluorescences résiduelles pour des zones représentant un élément anatomique tel que le parenchyme ou le sclérenchyme a été calculée. L'écart-type a également été déterminé selon la fonction ECARTYPE.STANDARD dont la formule est :

$$\sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

x est la moyenne et n la taille de l'échantillon.

9. Modélisation d'InNpXyn11A-JoCBM3a *versus* données SAXS

Ceci a été réalisé par les Drs. Gianluca Cioci et Jérémy Esque. Dans un premier temps, 10 modèles du complexe InNpXyn11A-Jo ont été construits en utilisant le logiciel Modeller 9.17 (Webb and Sali, 2014), à partir de multiples structures de références, c'est-à-dire 5MKC pour Jo-In (Bonnet et al., 2017), 2C1F pour la xylanase (Vardakou et al., 2008), 3WLA (résidus 301 à 306) (Yang et al., 2014) pour les 6 avant derniers résidus de l'extrémité C-

terminale de la xylanase. Le meilleur modèle, c'est-à-dire avec le score DOPE (Shen and Sali, 2006) le plus bas, a été choisi pour modéliser l'assemblage In*Np*Xyn11A-Jo dans le complexe entier contenant la fusion avec JoCBM3a. Dix modèles du complexe entier ont été ainsi générés à partir du modèle précédent In*Np*Xyn11A-Jo et de la structure cristallographique du CBM3a (code PDB 4B9F) (données non publiées, Yaniv et al 2012), mais aussi des résidus 124 à 128 de 5AWH (Miyoshi et al., 2016) et 518 à 521 de 3SPA (Ringel et al., 2011) pour modéliser une partie du linker reliant Jo à CBM3a. Pour tous ces modèles, tous les résidus issus des structures cristallographiques de références ont été fixés (non mobiles) à l'exception des linkers (entre In et *Np*Xyn11A et entre *Np*Xyn11A et JoCBM3a) et les extrémités N- et C-terminales. Le meilleur modèle généré par Modeller a ensuite été utilisé comme structure de départ pour l'affinage contre les données SAXS à l'aide du logiciel MultiFOXS (Schneidman-Duhovny et al., 2016). Le meilleur modèle calculé montre un X = 2,8.

Chapitre 3

Validation du système Jo-In

Chapitre 3 : Validation du système Jo-In

1. Introduction

Cette thèse concerne la construction d'enzymes multimodulaires réalisées à l'aide des protéines Jo et In qui se lient de manière covalente. Pour rappel, Jo et In sont des protéines provenant de l'adhésine RrgA du pilus de *S. pneumoniae* (Figure 36) (Izoré et al., 2010). Elles ont la capacité de s'associer spontanément *via* une liaison isopeptidique intramoléculaire entre la lysine 191 de Jo et l'asparagine 695 d'In afin de former le complexe JoIn. Cette propriété est conservée lorsque les protéines sont produites indépendamment et purifiées (Vernet and Di Guilmi, 2012). Le résidu d'acide aspartique en position 600 est également impliqué dans la formation de la liaison intramoléculaire isopeptidique (Izoré et al., 2010). Thierry Vernet et Anne Marie Di Guilmi (IBS, Grenoble) nous ont fourni les plasmides codant pour Jo et In. Ces protéines font l'objet d'un brevet (Vernet and Di Guilmi, 2012) et nous remercions ici Thierry Vernet et Anne Marie Di Guilmi de nous avoir donné la permission d'utiliser ce système.

Cette innovation nous a permis de construire des plasmides contenant les gènes codant pour les protéines chimériques en fusion avec Jo ou In. Pour cela, nous avons utilisé les gènes codant pour Jo ou In et un gène codant pour la xylanase *NpXyn11A* ou un CBM (CBM3a ou CBM2b1) (Figure 37). Le linker riche en glycine présent entre les modules In ou Jo et les CBMs provient de la xylanase 11A de *C. fimi* (Millward-Sadler et al., 1994). Il a été ajouté pour introduire de la flexibilité entre les modules lors de la création des enzymes multimodulaires. Pour les différentes protéines chimériques utilisées dans cette thèse, l'impact de l'ajout de Jo ou In sur leur activité biologique a été évaluée afin de valider notre approche.

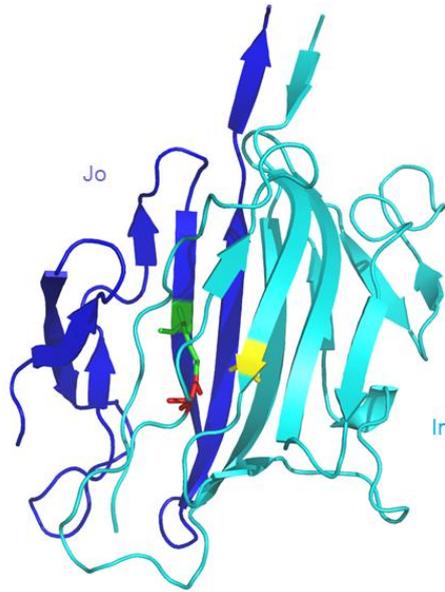


Figure 36 : Représentation de la structure cristallographique du complexe JoIn.
Résidu en vert : lysine 191 de Jo ; résidu en jaune : acide aspartique 600 d'In ; résidu en rouge : asparagine 695 d'In. Code PDB 5MKC (Bonnet et al., 2017).

2. Résultats

I. Construction des protéines chimériques

Durant ce travail de thèse, plusieurs protéines recombinantes ont été produites (Figure 37). Ces protéines ont été exprimées soit sous leur forme native, soit en fusion avec Jo ou In. Les plasmides codant pour le CBM3a de *C. thermocellum* et pour le CBM2b1-CBM2b2 de *C. fimi* ont été gracieusement donnés par Harry Gilbert (Newcastle University, Angleterre). Les protéines fluorescentes DsRed et *sfGFP* proviennent respectivement de chez Clontech et de l'équipe de Thierry Vernet. La protéine *sfGFP* (pour super folder) est un variant de la protéine GFP qui peut se replier correctement après avoir été sécrété (Dammeyer and Tinnefeld, 2012).

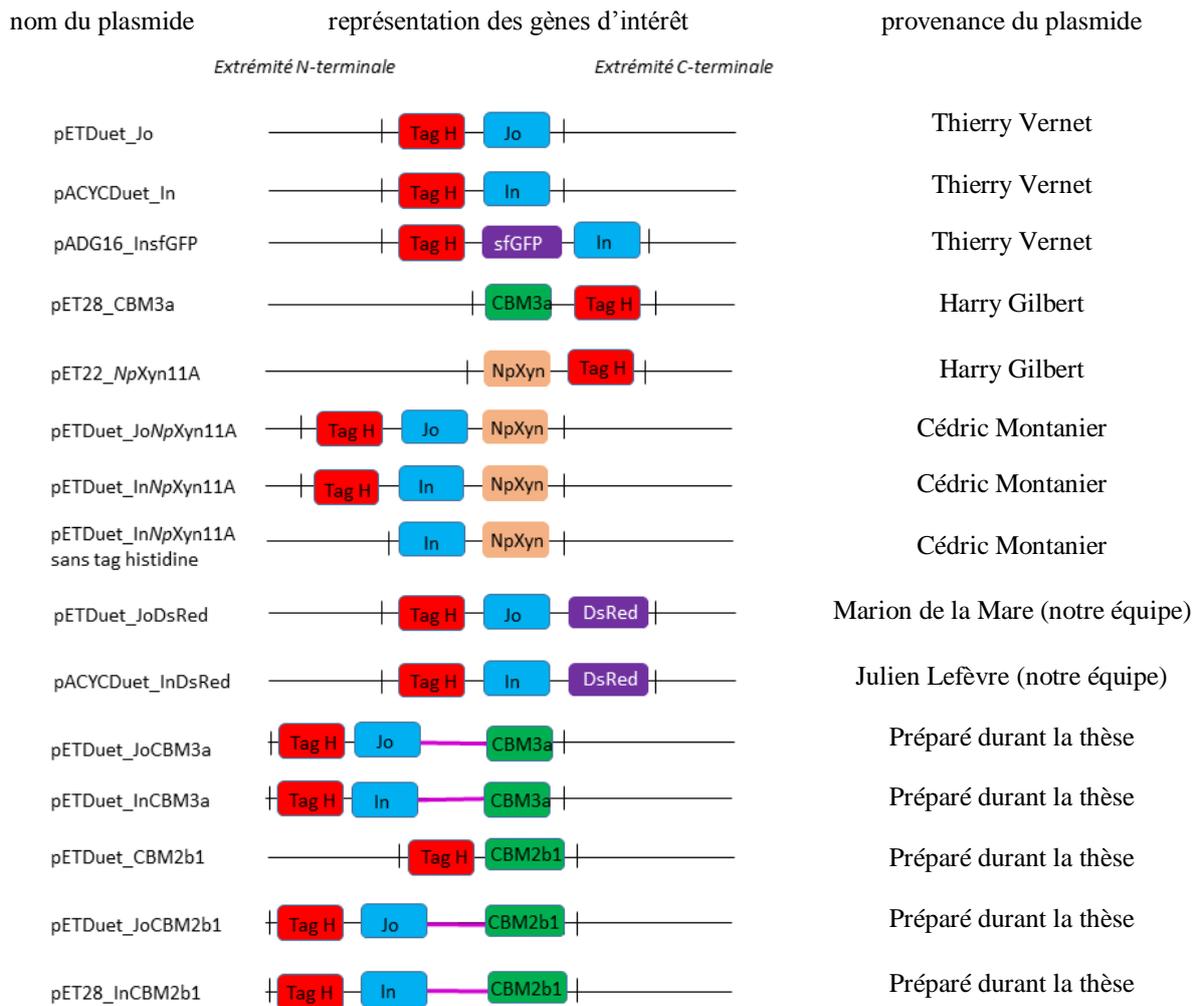


Figure 37 : Bilan partiel des différentes constructions utilisées dans cette thèse. En orange : gène codant pour *NpXyn11A* ; en vert : gène codant pour un CBM ; en violet : gène codant pour une protéine fluorescente ; en rouge : tag ou étiquette histidine ; en bleu : gène codant pour In ou Jo ; en rose : linker ; en noir : le plasmide. Les barrettes verticales symbolisent les extrémités N- et C-terminales des différentes constructions.

a) Construction des plasmides

Deux méthodologies ont été suivies pour la construction des nouveaux plasmides, pETDuet_JoCBM3a, pETDuet_InCBM3a, pETDuet_CBM2b1 et pETDuet_JoCBM2b1. La première méthode concerne la construction des plasmides codant pour les protéines CBM2b1, JoCBM3a ou JoCBM2b1. Le plasmide pUC57 contenant le gène synthétique (GenScript) a été doublement digéré par BamHI et Sall afin d'obtenir nos inserts, de même que pETDuet_Jo pour obtenir le vecteur linéarisé. Les tailles des différents fragments d'ADN ont été vérifiées sur gel d'agarose puis les fragments d'ADN ont été purifiés. Après ligation des inserts dans le vecteur, les produits de ligation ont servi à transformer des cellules OneShot Top10. Des

préparations plasmidiques ont été réalisées à partir de colonies isolées, leur pureté a été vérifiée sur gel d'agarose et les constructions confirmées par séquençage (Chapitre 2. 1).

La deuxième méthode concerne les plasmides codant pour les protéines InCBM3a et InCBM2b1, suivant une approche de clonage par recombinaison homologue. Ici, les plasmides pETDuet_JoCBM3a ou pETDuet_JoCBM2b1 ont servi de vecteur pour introduire à la place du gène codant pour Jo, l'insert codant pour In et provenant du plasmide pACYCDuet_In (Figure 38). Tous les fragments d'ADN ont été amplifiés par PCR et leur taille a été vérifiée sur gel d'agarose. Malgré un grand nombre de conditions expérimentales, il n'a pas été possible d'amplifier la partie du vecteur codant pour CBM2b1 (Figure 39). Le gène InCBM2b1 a alors été directement synthétisé dans le vecteur d'expression pET28 (GenScript). Après recombinaison homologue, une extraction plasmidique de pETDuet_InCBM3a a été évaluée sur gel d'agarose et la construction confirmée par séquençage (Chapitre 2. 1).

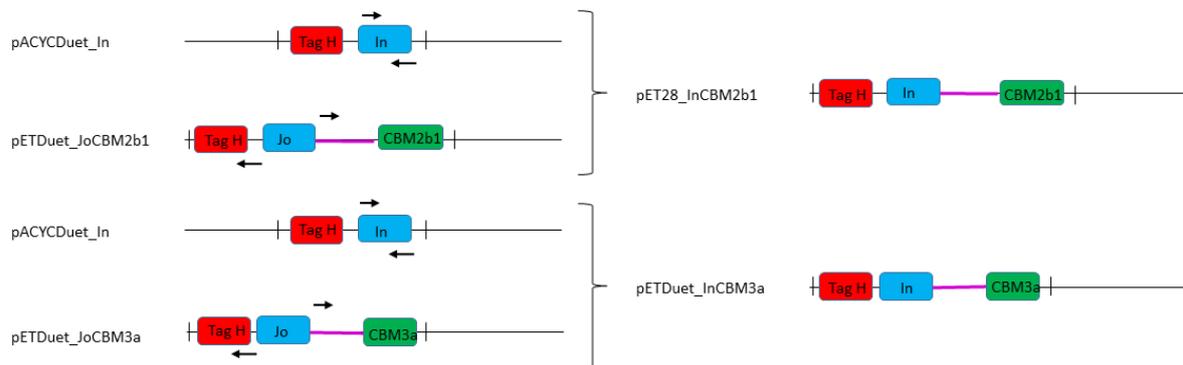


Figure 38 : Stratégie employée pour la recombinaison homologue.

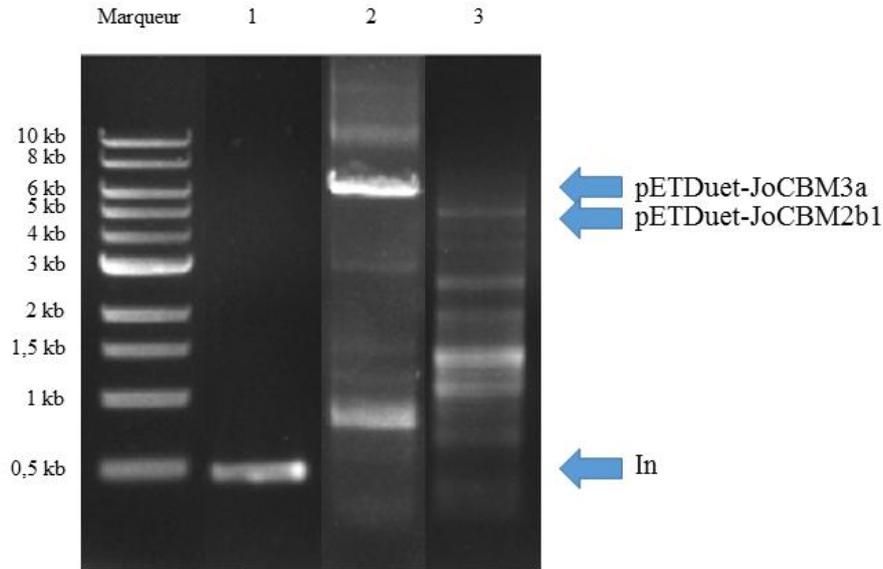


Figure 39 : Gel d'agarose après amplification par PCR.
 1 : le produit d'amplification de l'insert codant pour In ; 2 : le produit d'amplification du vecteur codant pour CBM3a ; 3 : le produit d'amplification du vecteur codant pour CBM2b1. Les flèches indiquent les tailles de chaque fragment d'ADN (429 bp, 5 927 bp et 5 729 bp respectivement).

b) Optimisation des conditions d'expression des protéines

Les conditions d'expression des protéines ont été établies avant cette thèse, à l'exception des protéines CBM2b1, InCBM2b1, JoCBM2b1, InCBM3a et JoNpXyn11A. Pour ces protéines, plusieurs conditions d'expression ont été mises en œuvre afin d'obtenir une quantité de protéine suffisante pour leur étude. L'expression des protéines a été réalisée comme décrit dans le chapitre matériels et méthodes (Chapitre 2. 2) à l'exception du volume de culture qui était de 50 mL (Tableau 36). Le protocole suivi pour la purification par IMAC sur une résine cobalt est celui détaillé dans le chapitre matériels et méthodes (Chapitre 2. 3), à l'exception de l'élution de la protéine qui est réalisée en une seule étape avec 500 mM d'imidazole. La présence et le niveau d'expression des protéines d'intérêt sont évalués par gel d'électrophorèse SDS-PAGE.

Tableau 36 : Conditions d'expression des protéines.

^a : croissance des cellules réalisée à 37 °C pendant 4 heures ; ^b : croissance des cellules réalisée à 37 °C jusqu'à une densité optique entre 0,4 et 0,6 à 600 nm ; X : condition non réalisée.

souche d' <i>E. coli</i>	milieu et condition de culture				
	ZYP5052		LB ^b		
	23 °C, 25 h	16 °C, 20 h ^a	37 °C, 4 h	16 °C, 4 h	16 °C, 25 h
C41 (DE3)	X	X	A	B	C
Tuner (DE3)	X	X	D	E	F
JM109 (DE3)	X	X	G	H	I
BL21 (DE3)	M	N	J	K	L

A titre d'exemple, l'expression de la protéine InCBM3a réalisée dans la souche d'*E. coli* BL21 (DE3), en utilisant le milieu de culture autoinductible ZYP5052 à 23 °C pendant 25 heures (condition M, Figure 40) ce qui correspond à la condition permettant d'obtenir une grande quantité de protéines solubles et facile à mettre en œuvre.

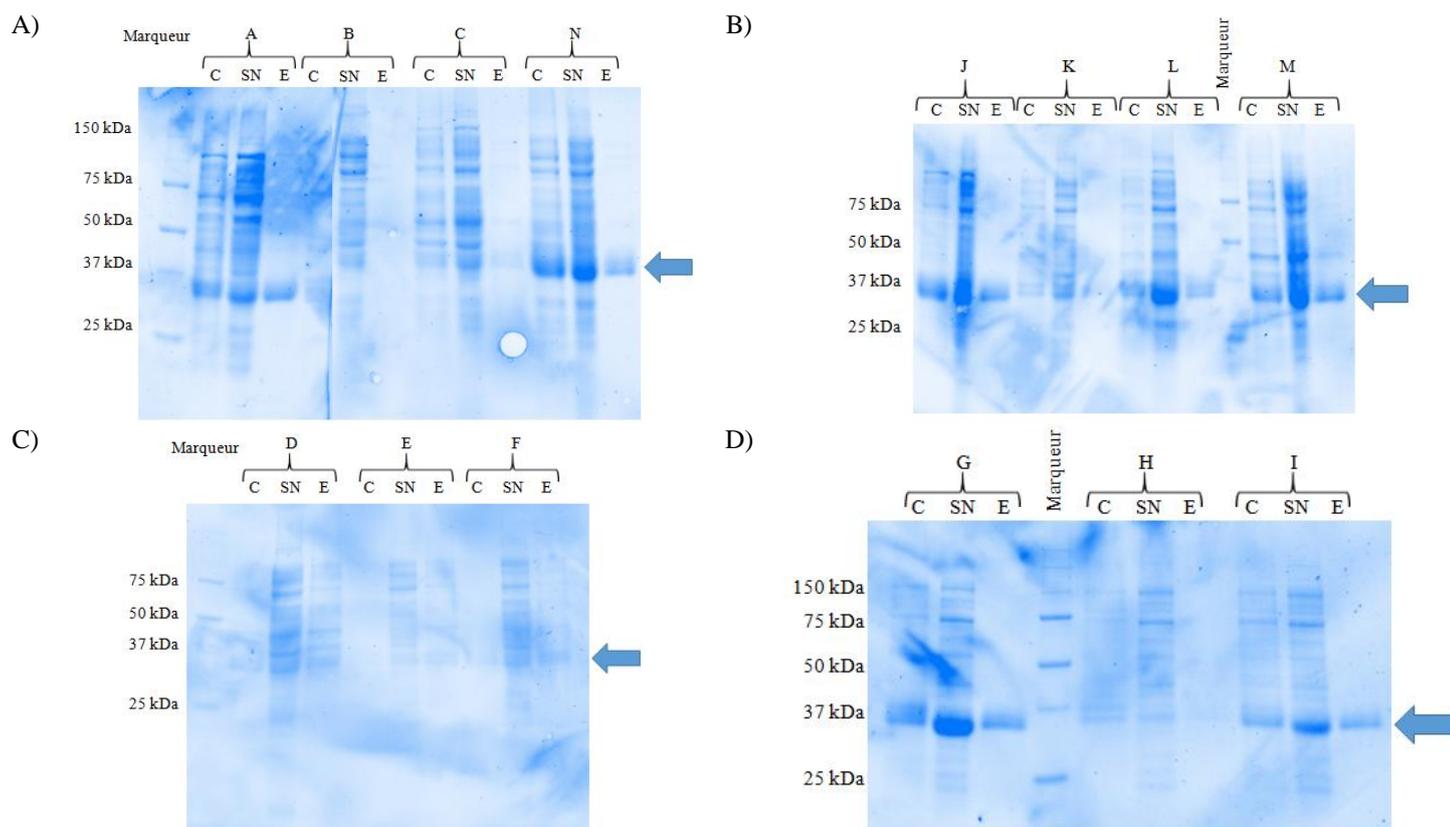


Figure 40 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE des différentes fractions de purification d'InCBM3a obtenues dans les conditions de culture résumées dans le Tableau 36.

C : culot après sonication et centrifugation ; SN : surnageant après sonication et centrifugation ; E : fraction éluée avec 500 mM d'imidazole pour les différentes conditions de culture mises en œuvre : A) conditions A, B, C et N ; B) conditions J, K, L, M ; C) conditions D, E, F ; D) conditions G, H, I. Les flèches indiquent la bande correspondante à InCBM3a dont la masse molaire est de 35 kDa.

Les protéines ont été exprimées et la quantité de protéines obtenue durant ma thèse, entre 0,40 et 10,34 g.L⁻¹, a été suffisante pour leur étude (Tableau 37). La quantité de la protéine InNpXyn11A sans le tag histidine n'a pas pu être déterminée car elle n'a pas été purifiée.

Par ailleurs, un tryptophane a été introduit à l'extrémité N-terminale de Jo ou d'In afin de pouvoir détecter ces protéines sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE par le système Stain Free (Chapitre 2. 3. IV). Les propriétés biochimiques de Jo et d'In n'ont pas été altérées par cet ajout et par convention les termes Jo et In seront employés pour les protéines contenant un tryptophane.

Tableau 37 : Conditions optimisées pour l'expression des protéines.

^a : quantité moyenne de protéine, pour à 1 L de culture ; ^b : une seule production réalisée ; ND : non déterminé, protéine non purifiée en l'absence du tag histidine.

protéine	souche d' <i>E. coli</i>	milieu et conditions de culture	quantité de protéine après purification (mg) ^a
CBM3a	BL21 (DE3)	milieu LB, induction à 37 °C, 4 h	57,26
JoCBM3a	BL21 (DE3)	milieu LB, induction à 37 °C, 4 h	26,51
CBM2b1	Tuner (DE3)	milieu LB, induction à 16 °C, 20 h	31,85
JoCBM2b1	BL21 (DE3)	milieu ZYP5052 23 °C 25 h	21,38
InCBM3a	BL21 (DE3)	milieu ZYP5052 23 °C 25 h	51,83
InCBM2b1	BL21 (DE3)	milieu LB, induction à 16 °C, 20 h	71,23 ^b
NpXyn11A	BL21 (DE3)	milieu LB, induction à 37 °C, 4 h	77,76
InNpXyn11A	BL21 (DE3)	milieu ZYP5052 37 °C 4 h puis 16 °C, 20 h	37,28
InNpXyn11A sans tag histidine	BL21 (DE3)	milieu ZYP5052 37 °C 4 h puis 16 °C, 20 h	ND
JoNpXyn11A	Tuner (DE3)	milieu LB, 37 °C, 4 h	44,76 ^b
Jo	BL21 (DE3)	milieu LB, induction à 37 °C, 4 h	12,61
In	BL21 (DE3)	milieu LB, induction à 37 °C, 4 h	1,99 ^b
In _s fGFP	BL21 (DE3)	milieu LB, induction à 16 °C, 20 h	8,65
InDsred	BL21 (DE3)	milieu LB, induction à 16 °C, 20 h	1,90 ^b
JoDsRed	BL21 (DE3)	milieu LB, induction à 16 °C, 20 h	15,50

II. Conservation des propriétés physico-chimiques des protéines chimériques

Pour utiliser à façon nos différentes constructions, il était tout d'abord important de vérifier que l'ajout d'un module Jo ou In à nos différentes protéines n'altérerait pas la capacité de Jo et In à former le complexe JoIn et dans un second temps que les propriétés biochimiques des protéines fusionnées à Jo et In étaient conservées.

a) Association entre Jo et In

L'association irréversible de Jo et In ou des protéines chimériques contenant Jo ou In a été vérifiée de façon préliminaire en utilisant une méthode qualitative simple. Le mélange a été réalisé en utilisant des concentrations équimolaires en protéines purifiées. Les échantillons ont été incubés 1 heure à 4 °C ou à 21 °C, puis une fraction a été déposée sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. La présence d'une bande correspondant à la formation du complexe a permis de constater que toutes les protéines pouvaient s'associer de manière covalente, à l'exception de JoGFP (données non publiées de l'équipe Pneumocoque, Institut de biologie structurale, Grenoble) bien que cela ne soit pas totalement compris à l'heure actuelle.

Dans un second temps, afin de quantifier finement ces propriétés biochimiques, des expériences de microcalorimétrie ont été réalisées lors de mon séjour dans l'équipe dirigée par H. Gilbert (Newcastle University, Angleterre). Selon le protocole décrit dans le chapitre matériels et méthodes (Chapitre 2. 5. III. b), l'association entre Jo et In (Figure 41A) ou entre JoDsRed et In (Figure 41B) a été étudiée. L'utilisation de JoDsRed a été privilégiée lorsqu'il s'agissait de Jo conjugué aux différents modules, car c'était la seule protéine disponible sous une forme assez concentrée. Ces résultats, ainsi que tous ceux obtenus par microcalorimétrie, ont été réalisés en collaboration avec le Dr. Immacolata Venditto, post-doctorante dans l'équipe de H. Gilbert.

A partir de ces expériences de microcalorimétrie, différents paramètres ont été déterminés tels que la constante d'association (K_a), l'énergie libre de Gibbs (ΔG), l'enthalpie (ΔH), l'entropie (ΔS) et le coefficient de stoechiométrie (n) (Tableau 38). La microcalorimétrie permet de mesurer l'augmentation ou la diminution de la température dans une solution comprenant In lors de l'ajout de Jo ou de JoDsRed. Cependant le modèle utilisé traduit les échanges thermiques pour une liaison réversible (c'est-à-dire un équilibre entre des protéines associées et des protéines dissociées) en une constante d'association or Jo et In s'associent *via* une liaison isopeptidique irréversible. Malgré l'utilisation d'un modèle non adapté au phénomène étudié, les données obtenues permettent la comparaison de l'association entre Jo et In et celle entre JoDsRed et In.

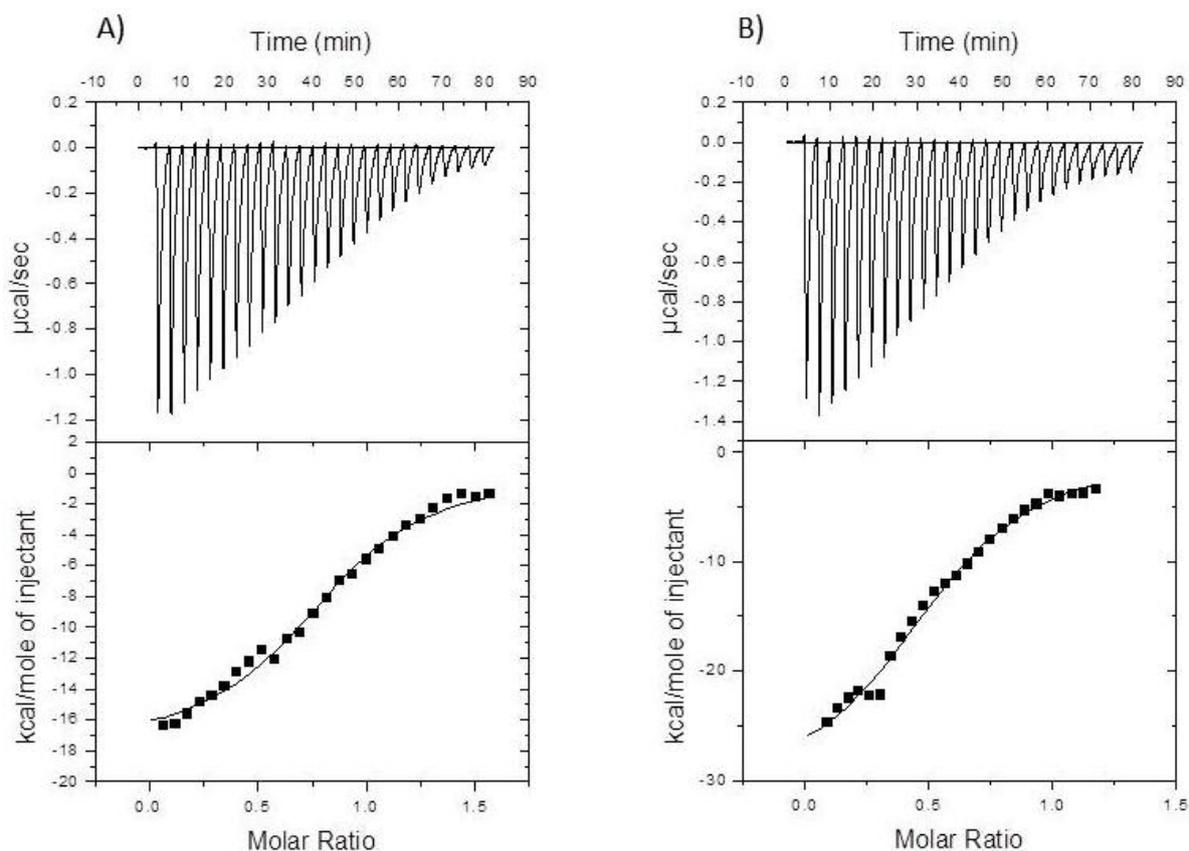


Figure 41 : Courbes obtenues par microcalorimétrie pour l'association de Jo et In ou de JoDsRed et In. A) Association entre Jo et In (Jo à 420 μM , In à 56 μM dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7). B) Association entre JoDsRed et In (JoDsRed à 379 μM , In à 56 μM dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7).

Tableau 38 : Paramètres thermodynamiques d'In avec Jo ou JoDsRed.

protéine 1	protéine 2	K_a (M^{-1})	ΔG (J.mol^{-1})	ΔH (kJ.mole^{-1})	ΔS ($\text{kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)	n
In	Jo	$2,24 \cdot 10^5$	$- 3,06 \cdot 10^4$	$- 1,77 \cdot 10^4$	$- 3,49 \cdot 10^1$	0,84
In	JoDsRed	$1,69 \cdot 10^5$	$- 2,99 \cdot 10^4$	$- 3,14 \cdot 10^4$	$- 8,12 \cdot 10^1$	0,57

La constante d'association entre Jo et In est de $2,24 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, cette valeur étant proche de celle déterminée pour JoDsRed et In ($1,69 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) (Tableau 38). La présence de la protéine DsRed associée à Jo n'empêche pas la formation de la liaison entre les protéines Jo et In. Les autres paramètres déterminés par microcalorimétrie sont du même ordre de grandeur pour les deux associations. La fusion entre une protéine (DsRed ici) et Jo n'altère donc pas la propriété de Jo à s'associer avec In. Les protéines Jo et In seront donc utilisées pour l'assemblage de modules pour former des enzymes multimodulaires.

b) Paramètres cinétiques de *NpXyn11A* en fusion avec Jo ou In

Afin de mesurer l'impact de l'ajout des protéines Jo et In à la xylanase *NpXyn11A*, les paramètres cinétiques des différentes protéines de fusion ont été déterminés sur du xylane de hêtre (Chapitre 2. 6. II. d). Les représentations de Michaelis-Menten sont présentées en Figure 42 et les paramètres cinétiques qui en découlent sont résumés dans le Tableau 39.

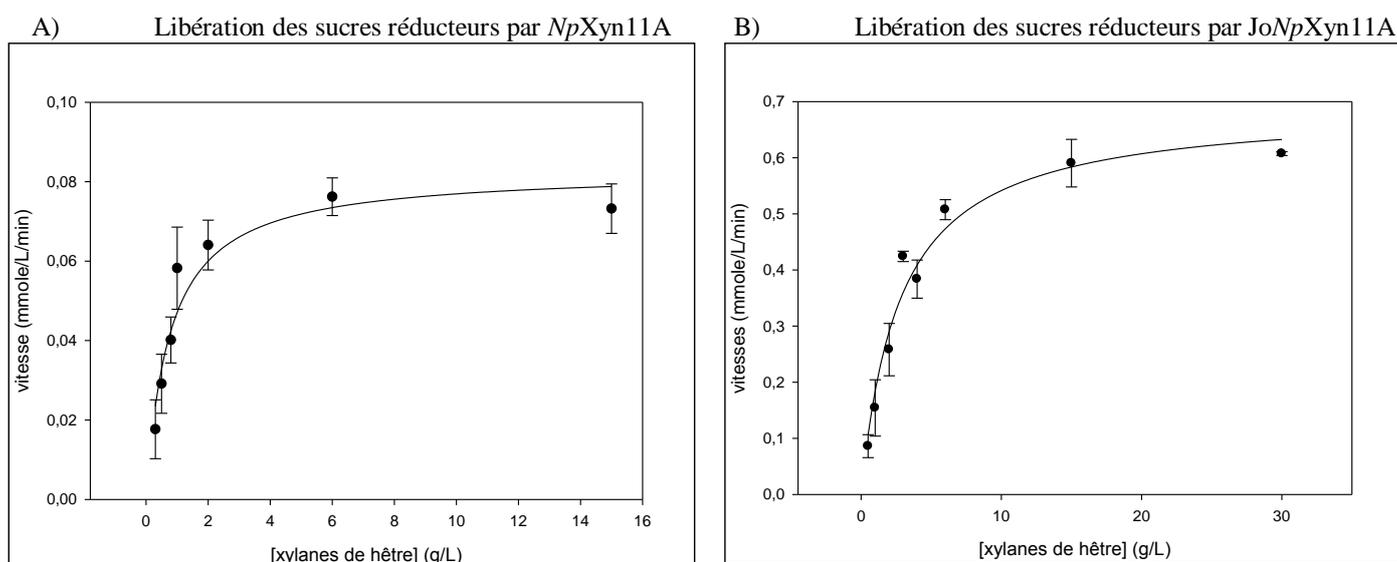


Figure 42 : Courbe de la vitesse réactionnelle en fonction de la concentration en substrat. A) *NpXyn11A* ; B) *JoNpXyn11A*. La concentration en *NpXyn11A* est de $3,4 \cdot 10^{-9}$ M, celle de *JoNpXyn11A* est de $2,7 \cdot 10^{-8}$ M. Le tampon est du Tris HCl 50 mM pH 7,5. Expériences réalisées en triplicat, à 37 °C.

Tableau 39 : Paramètres cinétiques des enzymes *NpXyn11A*, *InNpXyn11A* et *JoNpXyn11A*.

^a : pour cette étude le paramètre K_M est uniquement une valeur apparente ; ^b : données déterminées par le Dr. Cédric Montanier.

substrat	<i>NpXyn11A</i>		<i>InNpXyn11A</i> ^b	<i>JoNpXyn11A</i>
	cette thèse	littérature (Vardakou et al., 2008)		
$K_{M\text{app}}$ (g·L ⁻¹) ^a	xylane de hêtre $0,75 \pm 0,14$	xylane de glumes d'avoine 4,2	xylane de hêtre	
k_{cat} (min ⁻¹)	$2,40 \cdot 10^4 \pm 1,51 \cdot 10^3$	$35,0 \cdot 10^4$	$1,1 \pm 0,07$	$2,76 \pm 0,51$
$k_{\text{cat}}/K_{M\text{app}}$ (L·min ⁻¹ ·g ⁻¹)	$3,25 \cdot 10^4 \pm 5,22 \cdot 10^3$	$8,40 \cdot 10^4$	$3,36 \cdot 10^4 \pm 3,62 \cdot 10^3$	$14,5 \cdot 10^4 \pm 1,05 \cdot 10^5$
	$3,0 \cdot 10^4 \pm 1,22 \cdot 10^3$		$5,06 \cdot 10^4 \pm 3,58 \cdot 10^4$	

La valeur de K_M définie dans le Tableau 39 est une valeur apparente, d'une part parce que la molarité du substrat est inconnue (concentration massique utilisée) et d'autre part parce que le substrat évolue au cours du temps, ce qui peut induire un certain nombre de phénomènes, y compris de l'inhibition. Cette précision est donc importante, car la compréhension de la signification de la valeur de $K_{M\text{app}}$ n'est pas évidente.

En comparant les paramètres cinétiques de *NpXyn11A* sur le xylane de hêtre et sur le xylane de glumes d'avoine, on constate que la valeur du $K_{M\text{ app}}$ est plus faible sur le premier substrat. Cette différence de valeur du $K_{M\text{ app}}$ peut sans doute être corrélée à la nature des substitutions de ce polymère. En effet, le xylane purifié à partir d'avoine présente des substitutions arabinose alors que les substitutions présentes dans le xylane de hêtre sont des acides glucuroniques (Fan et al., 2009a; McCartney et al., 2005; Megazyme, n.d.). Le nombre de substitutions et/ ou leur encombrement stérique pourrait limiter l'activité de l'enzyme. En effet, dans les GH11 le sous-site -3 pourrait accommoder un xylose substitué en position 2 ou 3 (par exemple par un acide 4-O-méthyle-glucuronique) et le sous-site -2 serait capable d'accueillir un xylose substitué en position 3 par un arabinose (Kolenová et al., 2006; Vardakou et al., 2008). Il a également été décrit que le sous-site +2 pouvait contenir un xylose substitué en position 2 ou 3 par un arabinose ou un sucre plus complexe tel qu'un acide glucuronique ou un acide 4-O-méthyle-glucuronique.

La différence entre les paramètres cinétiques pourrait également provenir de la présence d'un peptide signal (absent dans cette thèse) pour la production dans la fraction périplasmidique et la présence d'un tag histidine en position C-terminale (absent dans l'étude de Vardakou) (Vardakou et al., 2008). Afin de confirmer ces hypothèses, il aurait été nécessaire de travailler exactement dans les mêmes conditions que dans l'étude de Vardakou et collaborateurs. Malheureusement, cette possibilité est exclue du fait de la disparition de toutes les sources commerciales de xylane de glumes d'avoine.

L'affinité de l'enzyme sauvage pour le xylane de hêtre a été quantifiée avec un $K_{M\text{ app}}$ de $0,75\text{ g.L}^{-1}$ qui est supérieur à la valeur déterminée pour *InNpXyn11A* égale à $1,1\text{ g.L}^{-1}$ ou à celle de *JoNpXyn11A* qui est de $2,76\text{ g.L}^{-1}$. Cette différence entre l'enzyme sauvage et les enzymes chimériques est acceptée. Le k_{cat} a également été calculé pour les trois enzymes, la constante catalytique de *JoNpXyn11A* est de $1,45\ 10^5\text{ min}^{-1}$ largement supérieure aux valeurs d'environ $3\ 10^4\text{ min}^{-1}$ pour les autres enzymes. Ces variations pourraient provenir de modifications de la manière dont l'enzyme reconnaît le substrat ou dont celui-ci accède au site catalytique. Le facteur $k_{\text{cat}}/K_{M\text{ app}}$ atteint $3,25\ 10^4$, $3,0\ 10^4$ et $5,06\ 10^4\text{ L.min}^{-1}\text{g}^{-1}$ pour *NpXyn11A*, *InNpXyn11A* et *JoNpXyn11A* respectivement. L'activité intrinsèque de l'enzyme est donc du même ordre de grandeur pour les trois enzymes, signifiant que l'ajout de la protéine In ou de la protéine Jo n'influence pas significativement l'activité catalytique de la xylanase bien que les paramètres de *JoNpXyn11A* pourraient être affinés en répétant ces

expériences. Les protéines chimériques pourront donc être utilisées dans ce projet et l'influence d'In sur le module catalytique sera plus particulièrement évaluée dans les prochains chapitres sur des substrats complexes.

c) Capacité de reconnaissance des CBMs

La quantification de l'affinité entre un CBM ou ses protéines chimériques et un ligand a été déterminée par différentes techniques. Malheureusement à cause de diverses raisons comme un problème de production (protéines insolubles ou en très faible quantité), de précipitation ou de protéolyse, toutes les protéines n'ont pas pu être étudiées avec l'ensemble des techniques mises en œuvre.

(1) CBM3a

Association entre le CBM3a et un ligand insoluble

La capacité de CBM3a, de JoCBM3a et d'InCBM3a de s'associer à de la cellulose a d'abord été comparée de manière rapide et qualitative en utilisant la technique d'association entre une protéine et un ligand insoluble décrite dans les matériels et méthode (Chapitre 2. 5. II). La Figure 43 présente le gel d'électrophorèse SDS-PAGE correspondant aux différentes étapes de l'association réalisée avec de la cellulose (Avicel).

L'analyse du profil SDS-PAGE révèle que les protéines CBM3a et JoCBM3a se sont associées spécifiquement avec la cellulose (fractions E, Figure 43) bien qu'une partie des protéines JoCBM3a est restée en solution (fraction NR). Une expérience analogue a été réalisée avec InCBM3a et a démontré que cette protéine chimérique conserve sa capacité de reconnaître la cellulose. Concernant la fraction NR, sans doute une petite partie d'InCBM3a et de JoCBM3a n'est pas repliée correctement et ne peut donc pas reconnaître le substrat. Il existe également un équilibre entre les protéines associées à leur ligand et celles dissociées. Ces deux hypothèses pourraient expliquer la présence des protéines dans les fractions NR et L2 et sont en accord avec l'observation, pour quelques lots de CBM3a au cours de cette thèse, d'une plus grande proportion du CBM dans la fraction non liée à l'Avicel. Il est également possible que le ligand soit saturé à une telle concentration en protéine. Cette expérience pourrait être améliorée en travaillant avec chaque protéine à la même concentration molaire et en essayant de diminuer la concentration en protéine. La quantification de l'affinité entre ces CBMs et la cellulose pourrait confirmer ces données.

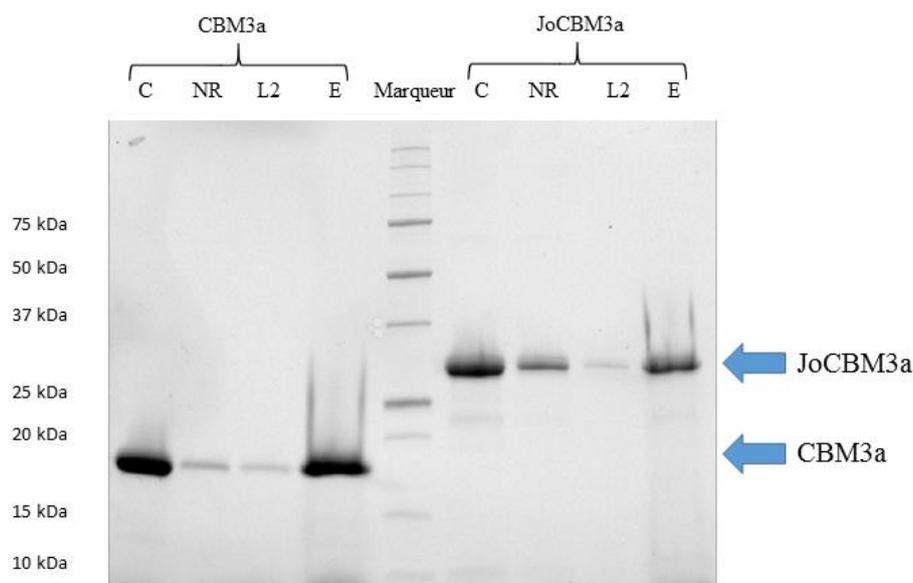


Figure 43 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE des différentes fractions correspondant aux étapes d'association entre CBM3a ou JoCBM3a et de la cellulose.

C : échantillon contrôle en absence d'Avicel ; NR : fraction non retenue après incubation en présence d'Avicel ; L2 : second lavage réalisé en présence d'Avicel ; E : fraction correspondant aux CBMs élués de l'Avicel par ajout de 2,5 % de SDS et de 25 % (volume/ volume) de β -mercaptoéthanol, 10 minutes à 95 °C. Les CBMs sont initialement à 0,4 g.L⁻¹ dans du tampon phosphate de sodium 18,5 mM pH 7. Les flèches indiquent la bande correspondant à JoCBM3a et CBM3a dont la masse molaire est de 29 kDa et 19 kDa respectivement.

Des expériences de « solid state depletion » ont été réalisées mais les valeurs obtenues n'ont pas été répétables malgré de nombreuses tentatives d'optimisation de la technique (variation de la concentration en ligand, de la concentration en CBM et tubes Eppendorfs spécifiques). La quantification de l'affinité entre les CBMs et la cellulose insoluble n'étant pas possible, elle a été réalisée avec une suspension colloïdale de cellulose.

Association du CBM3a et d'une suspension colloïdale

Pour vérifier que l'ajout de Jo ou d'In au CBM3a n'impacte pas la reconnaissance du ligand nous avons quantifié par microcalorimétrie l'affinité du CBM3a pour la cellulose (Chapitre 2. 5. III. a). La cellulose soluble a la même composition que la cellulose insoluble, c'est-à-dire des unités de glucose liées en β -(1,4) (O'Sullivan, 1997). La cellulose régénérée (soluble) et les nanocristaux de cellulose (suspension colloïdale) ont été choisis comme ligands (Figure 44, Tableau 40). La cellulose régénérée est déjà utilisée pour l'étude de CBMs en microcalorimétrie notamment dans le laboratoire qui m'a accueilli pour réaliser ces expériences, le laboratoire de H. Gilbert (Newcastle University, Royaume-Uni) (Hernandez-Gomez et al., 2015; Venditto et al., 2016, 2015).

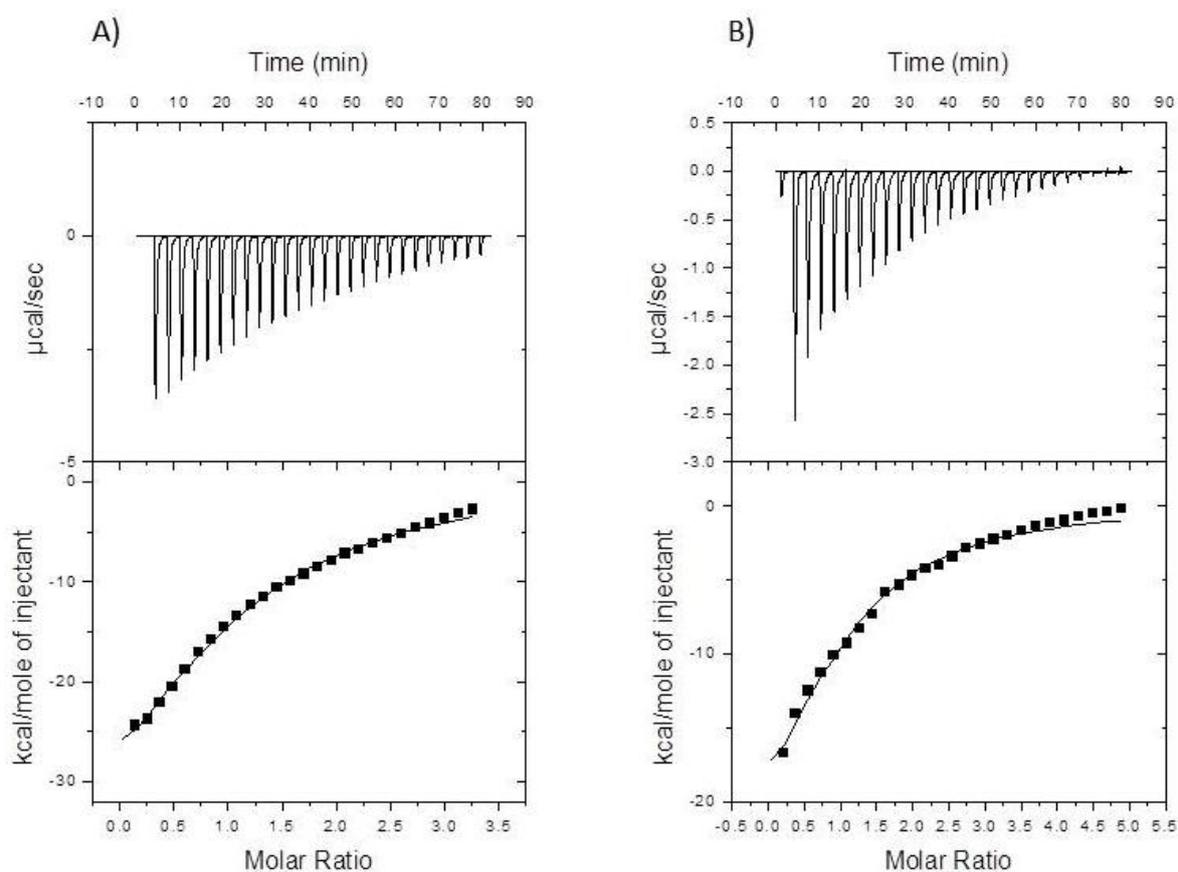


Figure 44 : Courbes obtenues par microcalorimétrie pour l'association entre le CBM3a et de la cellulose.

A) Cellulose régénérée. B) Nanocristaux de cellulose. Le CBM3a est dilué à 260 μM dans du tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7.

Tableau 40 : Paramètres thermodynamiques de l'association de CBM3a avec différentes celluloses.

ligand	K_a (M^{-1})	ΔG ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$)	ΔH ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	ΔS ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)	n
cellulose régénérée	$3,71 \cdot 10^4$	$-2,62 \cdot 10^4$	$-4,73 \cdot 10^4$	$-1,38 \cdot 10^2$	1,09
nanocristaux de cellulose	$6,37 \cdot 10^4$	$-2,75 \cdot 10^4$	$-3,09 \cdot 10^4$	$-8,18 \cdot 10^1$	1

Pour le CBM3a, les mesures de microcalorimétrie ont révélé que la constante décrivant son association avec la cellulose régénérée est égale à $3,71 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Tableau 40). Or, dans l'étude de Hernandez-Gomez, la valeur de cette même constante a été estimée entre $4,75 \cdot 10^5$ et $9,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Hernandez-Gomez et al., 2015), inférieure donc à nos résultats. Pour expliquer cette différence, il est possible que les conditions expérimentales utilisées par Hernandez-Gomez et collaborateurs soient différentes de celles que nous avons utilisées. Or, les conditions utilisées dans l'étude citée ne sont pas connues.

La constante d'association du CBM3a avec la cellulose régénérée est égale à $3,71 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ qui est du même ordre de grandeur que celle définie pour les nanocristaux de cellulose

dont la valeur est de $6,37 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Tableau 40). Les autres paramètres déterminés par microcalorimétrie sont également similaires pour les deux types de cellulose. Les nanocristaux de cellulose ont deux avantages : ils sont une suspension colloïdale et ils miment la surface de la cellulose, grâce notamment à leur taille similaire (Elazzouzi-hafraoui et al., 2008; Lehtio et al., 2003). La valeur négative de l'énergie libre de Gibbs (ΔG) déterminée par microcalorimétrie, signifie que la liaison CBM3a-substrat est spontanée, une observation qui concorde avec plusieurs études précédentes portant sur les interactions CBM-ligand (Bolam et al., 2001; Boraston et al., 2001; Najmudin et al., 2006). Concernant la stœchiométrie de cette association, la valeur déterminée est proche de 1 qui a été calculée par un modèle mathématique par le logiciel MicroCal Origin, ce qui indique la présence d'un seul site de liaison pour le ligand par mole de CBM.

En conclusion, les nanocristaux de celluloses pourront être utilisés comme ligand pour quantifier l'affinité de CBM3a, InCBM3a et JoCBM3a avec la cellulose. Les protéines chimériques n'étaient pas disponibles lors de mon séjour à Newcastle. Par ailleurs, la microcalorimétrie nécessite une forte concentration en protéine c'est pourquoi une nouvelle méthode a été utilisée pour valider (ou invalider) l'utilisation de ces protéines chimériques.

Toujours dans l'optique de quantifier les interactions entre les différentes protéines CBM3a et les nanocristaux de cellulose, une technologie plus récente et jamais utilisée pour quantifier des interactions CBM/ sucre a été mise en œuvre. Il s'agit de la microthermophorèse décrite dans le chapitre 2. 5. I. Les protéines CBM3a, JoCBM3a et InCBM3a ont été marquées à l'aide d'une sonde fluorescente, purifiées et ensuite quantifiées à partir d'un gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Chapitre 2. 3 et 2. 5. V). Les mesures ont été réalisées en suivant le protocole décrit au chapitre 2. 5. V. La concentration molaire des nanocristaux de cellulose étant inconnue, la microcalorimétrie a permis de calculer un EC_{50} qui correspond à la concentration en CBM à laquelle 50 % des protéines sont associées avec le ligand (Zillner et al., 2012). Les avantages de la microthermophorèse sont le faible volume (quelques microlitres) et la faible concentration (de l'ordre du nanomolaire) en protéine, alors que les méthodes précédemment utilisées dont la microcalorimétrie nécessitent une forte concentration en CBM et/ ou en ligand de l'ordre du g.L^{-1} (Jerabek-Willemsen et al., 2011). Les données obtenues par microthermophorèse sont d'autant plus fiables que Seidel et collaborateurs ont montré que les constantes de dissociation de plusieurs couples protéine-

molécule déterminées par une variante de la microthermophorèse (en étudiant la fluorescence intrinsèque des protéines *via* les acides aminés aromatiques) sont similaires aux valeurs de la littérature pour ces mêmes couples (Seidel et al., 2012).

Le comportement de la protéine dépend de sa taille, de sa charge de surface et de son hydratation, trois paramètres pris en compte en microthermophorèse. En conséquence, la valeur de l' EC_{50} pour chaque protéine dépendra de son environnement, ce qui est confirmé par les données obtenues pour le CBM3a (Figure 45 et Tableau 41). Dans le tampon commercial, l' EC_{50} est de $2,43 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ alors que dans le tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 et 0,05 % d'acide pluronique l' EC_{50} est égal à $5,85 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$. L'impact de l'environnement est probablement la cause de l'absence de consensus dans les expériences réalisées pour l'étude des deux protéines chimériques. Ainsi, chacune des protéines chimériques sera comparée à la protéine sauvage dans une condition donnée.

L'association de JoCBM3a aux nanocristaux de cellulose a été caractérisée par une valeur d' EC_{50} de $3,04 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$. Or, dans le cas du CBM3a, cette valeur est de $2,43 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$. La comparaison de ces deux valeurs permet d'affirmer que l'ajout de Jo n'influence pas de manière significative les propriétés biochimiques du CBM3a. L'expérience avec InCBM3a a révélé une valeur d' EC_{50} de $5,48 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$. Le CBM3a a été caractérisé dans les mêmes conditions avec une valeur d' EC_{50} de $5,85 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$, soit plus élevée d'un facteur 10. L'ajout d'In augmente l'affinité du CBM pour la cellulose et ne sera pas utilisée pour le reste de ce projet.

Selon le responsable de l'appareil Nanotemper sur lequel sont réalisées les expériences de microthermophorèse (Dr. Jean Jacques Bono) le marqueur de fluorescence choisi perturberait la stabilité des protéines associées lorsque celles-ci portent un tag histidine. Il est possible qu'InCBM3a soit plus stable que CBM3a. Malgré la présence d'agents tensio-actifs, tel que l'acide pluronique, pour neutraliser la déstabilisation du CBM3a par le marqueur de fluorescence, l'affinité entre le CBM3a et la cellulose serait affectée. Une autre hypothèse est basée sur des études qui ont montré que la présence d'un linker pouvait réduire ou proscrire la reconnaissance du CBM (Payne et al., 2013; Quentin et al., 2002). Dans ce travail, le linker présent entre In et CBM3a augmenterait l'affinité entre le CBM et le ligand. Or ce linker est également présent dans JoCBM3a (Figure 37). Si le linker était en cause, la protéine

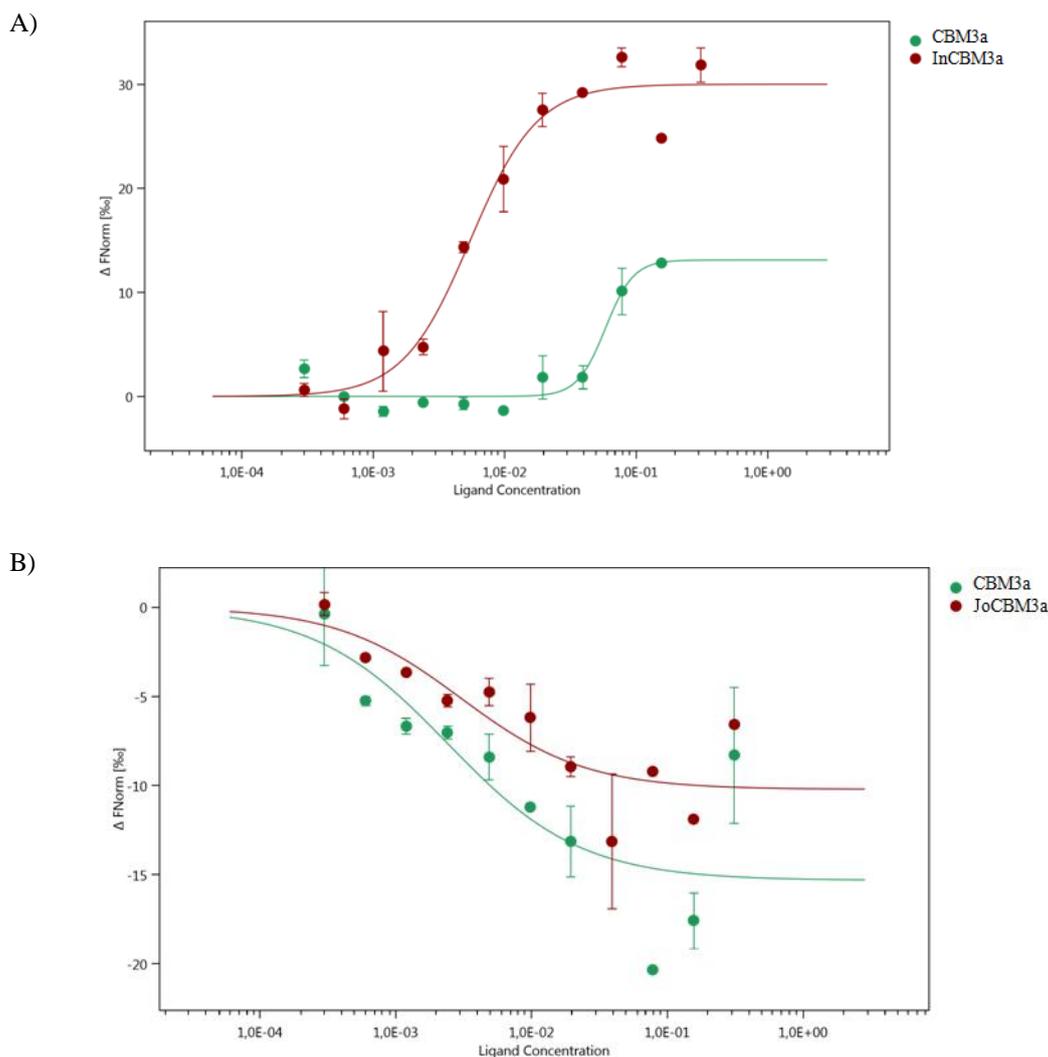


Figure 45 : Courbes représentant l'association entre un CBM et les nanocristaux de cellulose. A) CBM3a et InCBM3a, dilués à 0,6 μ M dans du tampon 50 mM Tris HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,05 % Tween 20. B) CBM3a et JoCBM3a, dilués à 0,6 μ M dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 + 0,05 % d'acide pluronique. Expériences réalisées en duplicat.

Tableau 41 : Détermination des EC₅₀ pour CBM3, InCBM3a et JoCBM3a par microthermophorèse. Les valeurs ont été obtenues à partir de deux expériences pour chaque condition. Na P : phosphate de sodium ; tampon commercial : 50 mM Tris HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,05 % Tween 20.

ligand	tampon	InCBM3a	CBM3a	JoCBM3a
nanocristaux de cellulose	tampon commercial		$2,43 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$	$3,04 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$
	Na P 50 mM pH 7 + 0,05 % d'acide pluronique	$5,48 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$	$5,85 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$	

JoCBM3a aurait également gagné de l'affinité pour les nanocristaux de cellulose comparé à CBM3a ce qui n'a pas été observé.

La saturation à une forte concentration en ligand aurait permis d'augmenter la fiabilité de l' EC_{50} mais n'a pas pu être atteinte à cause de la présence d'un deuxième événement. Il pourrait s'agir d'une agrégation des CBMs à cause d'une interaction entre le tag histidine et le marqueur fluorescent. Une solution possible aurait été de cliver le tag histidine par digestion avec de la thrombine (un site de clivage est présent entre le tag histidine et le gène codant pour CBM3a ou Jo ou In) ou d'utiliser un nouveau kit de marquage, spécifique du tag histidine (Nanotemper) pour limiter cette interaction. Pour information, il n'est pas possible de comparer une constante d'association à un EC_{50} bien que l'association entre un CBM et un ligand soit étudiée car les phénomènes quantifiés sont différents.

L'affinité des CBMs pour la cellulose n'a pas été quantifiée en présence de la cellulose soluble. Par conséquent, elle a été quantifiée à l'aide d'une suspension colloïdale, sous forme de nanocristaux de cellulose et de la technique de microthermophorèse. Cette technique a permis de révéler que l'affinité de la protéine chimérique, InCBM3a, pour les nanocristaux de cellulose est 10 % supérieure à celle du CBM3a.

(2) CBM2b1

La capacité de CBM2b1 à s'associer à du xylane a dans un premier temps été déterminée par microcalorimétrie comme décrit dans les matériels et méthodes (Chapitre 2. 5. III). Les expériences ont été réalisées dans l'équipe de H. Gilbert (Figure 46 et Tableau 42). Pour le CBM2b1, les mesures de microcalorimétrie ont révélé que la constante décrivant son association avec l'arabinoxylane de blé est égale à $7,77 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Cette valeur est du même ordre de grandeur que les constantes d'association déterminées pour des liaisons CBMs de type B (comme le CBM2b1) - ligand (cellulose amorphe ou oligosaccharide) qui sont de l'ordre de 10^4 M^{-1} (Tomme et al., 1996). Les travaux de l'équipe de H. Gilbert ou en collaboration avec cette équipe ont déterminé les constantes d'affinité entre le CBM2b1 et divers ligands (Tableau 43). Or la valeur déterminée dans cette thèse est supérieure à l'ensemble des données de la littérature à l'exception de la constante d'association entre le CBM2b1 et le xylane de glumes d'avoine (obtenue par solid state depletion). La méthode choisie et/ ou la nature différente du ligand pourrait expliquer ces observations.

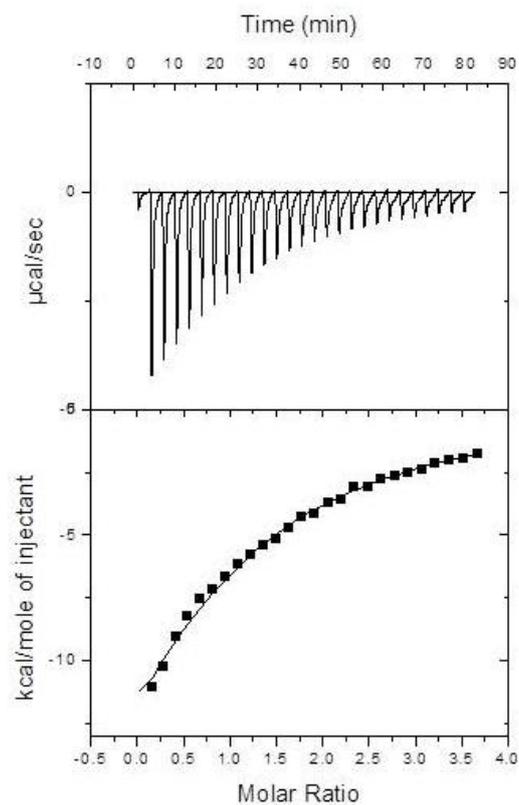


Figure 46 : Courbe obtenue par microcalorimétrie pour l'association entre le CBM2b1 et l'arabinoxylane de blé.

Le CBM2b1 est dilué à 80 µM dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7.

Tableau 42 : Paramètres thermodynamiques du CBM2b1 avec l'arabinoxylane de blé.

K_a (M^{-1})	ΔG ($J.mol^{-1}$)	ΔH ($kJ.mol^{-1}$)	ΔS ($kJ.mol^{-1}.K^{-1}$)	n
$7,77 \cdot 10^3$	$- 2,23 \cdot 10^4$	$- 3,01 \cdot 10^4$	$- 8,33 \cdot 10^1$	0,96

En effet, le xylane de glumes d'avoine contient très peu de substitutions, c'est-à-dire 6 à 9 % d'arabinose et 7 à 9,3 % de glucose comparé à l'arabinoxylane de blé qui contient 34 % d'arabinose (Fan et al., 2009a; Hespell and Cotta, 1995; McCartney et al., 2005). La saturation du signal n'a pas pu être atteinte dans cette expérience c'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser une nouvelle technique pour quantifier l'affinité entre CBM2b1, InCBM2b1 ou JoCBM2b1 et le ligand.

Tableau 43 : Données de la littérature sur l'affinité entre le CBM2b1 et des xylooligosaccharides.
 XGA : xylane de glumes d'avoine ; SSD : solid state depletion ; ITC : Isothermal titration calorimetry. D'après (Bolam et al., 2001; Simpson et al., 1999; Xie et al., 2001a).

	Simpson et al 1999		Bolam et al 2001		Xie et al 2001	
	K_a (M^{-1})	méthode	K_a (M^{-1})	méthode	K_a (M^{-1})	méthode
XGA insoluble	X	X	$4,7.10^4$	SSD	X	X
XGA soluble	$2,43.10^3$	ITC	$5,9.10^3$	ITC	$6,42.10^3$	ITC
β -glucane d'orge	$1,17.10^2$	ITC	X	X	X	X
xylotriase	$4,50.10^1$	ITC	X	X	X	X
xylotetraose	$8,40.10^2$	ITC	X	X	X	X
xylopentaose	$2,43.10^3$	ITC	X	X	X	X
xylohexaose	$3,45.10^3$	RMN	$3,4.10^3$	RMN	X	X
	$5,26.10^3$	ITC				

La deuxième méthode mise en œuvre pour quantifier l'affinité entre le CBM2b1 ou les protéines chimériques et leur ligand fait appel à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Ceci a été réalisé avec CBM2b1 ou JoCBM2b1 et divers ligands, mais la charge électrique globale de CBM2b1 a entraîné une migration inversée (vers l'extérieur des puits, sans rentrer dans les gels). Cette caractéristique de CBM2b1 peut s'expliquer par le point isoélectrique théorique (pI) de cette protéine, égal à 7,01. Ce pH est proche du pH du tampon de migration (8,3) et du tampon de charge (6,8). Or le pI de la protéine ne doit pas être proche de ces valeurs (Horejsi and Ticha, 1986) sinon la protéine n'entre pas dans le gel et ne migre pas (Dias et al., 2004). Cette explication est en accord avec le comportement de la protéine JoCBM2b1 qui a un pI de 5,93 et qui migrait correctement sur gel natif. L'association du CBM2b1 à une GST lors de son étude par gels d'affinité a pu résoudre ce problème de pI (Simpson et al., 1999).

Par ailleurs, notre système d'électrophorèse ne permet pas d'inverser la charge des électrodes. Ainsi, cette méthode incompatible en l'état avec nos protéines n'a pas pu être mise en œuvre.

Suite à ces différentes expériences, une nouvelle technique a été utilisée, l'objectif étant toujours de quantifier l'affinité entre les CBMs et leur ligand pour vérifier les propriétés biochimiques des protéines chimériques. De la RMN a été mise en place en collaboration avec le Dr. Guy Lippens (LISBP) (Chapitre 2. 6. IV). Les protéines CBM2b1, InCBM2b1, JoCBM2b1 ont alors été étudiées en présence de xylohexaose.

En général dans les CBM2, trois résidus de tryptophane sont conservés (Trp259, Trp275, Trp291) mais dans le cas du CBM2b1 seuls les résidus Trp259 et Trp291 sont exposés au solvant (Simpson et al., 1999). La variation du déplacement chimique des chaînes latérales

des tryptophanes lors de l'ajout croissant de ligand permettra de définir la constante d'association pour chaque protéine.

Le spectre RMN de référence pour le CBM2b1 a permis de définir les différents signaux de cette protéine dont les trois pics d'intérêt, qui sont situés sur la gauche du spectre (Figure 47). Cette zone a été agrandie pour l'ensemble des spectres des trois protéines et ces spectres ont été utilisés pour mesurer le déplacement chimique par rapport à la valeur de référence (protéine sans ligand) en fonction de la concentration en ligand (Figure 48 et Figure 49). Les constantes de dissociation et celles d'association ont alors été calculées (Tableau 44).

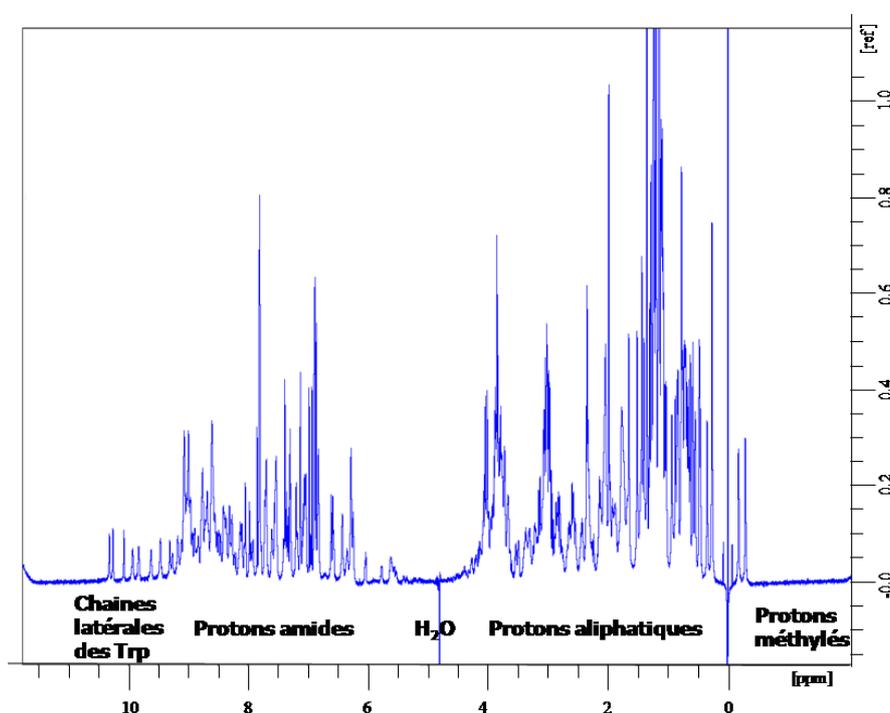


Figure 47 : Spectre RMN obtenu pour le CBM2b1 en l'absence de ligand. Le spectre correspond à l'intensité en fonction du déplacement chimique en ppm.

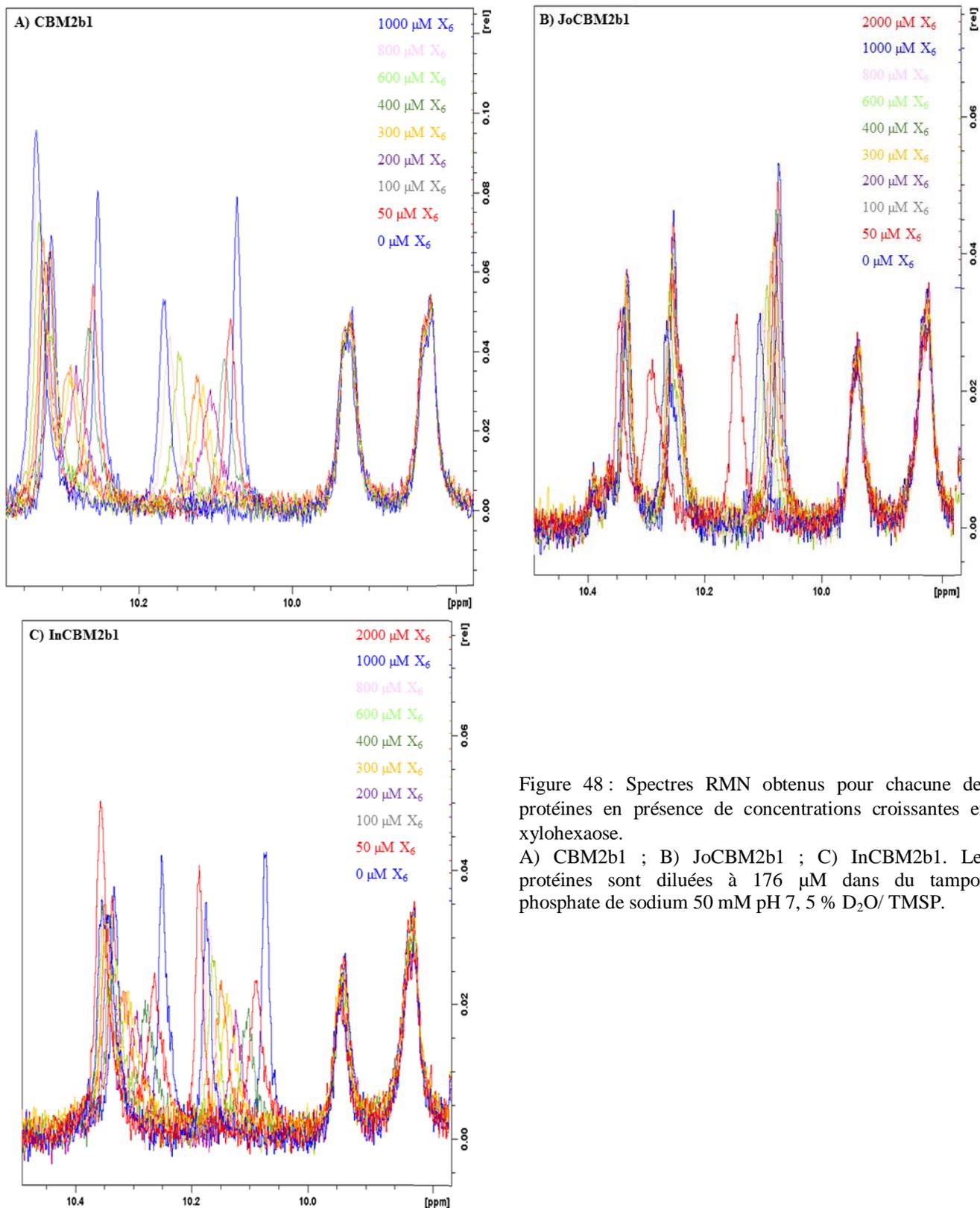


Figure 48 : Spectres RMN obtenus pour chacune des protéines en présence de concentrations croissantes en xylohexaose.

A) CBM2b1 ; B) JoCBM2b1 ; C) InCBM2b1. Les protéines sont diluées à 176 μM dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7, 5 % D_2O / TMSF.

La constante d'association du CBM2b1 pour le xylohexaose déterminée par RMN est de $1,08 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Elle est inférieure à la constante d'association du même CBM avec l'arabinoxylane de blé, égale à $7,77 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ (déterminée par microcalorimétrie). Le xylohexaose n'est composé que de résidus de xylose alors que l'arabinoxylane de blé contient 34 % de substitutions en arabinose (Fan et al., 2009a). La constante d'association étant plus importante pour l'arabinoxylane de blé, les substitutions arabinose pourraient être éloignées les unes des autres, n'intervenant pas dans l'association entre le CBM2b1 et son ligand. D'autre part, la différence entre les constantes d'association pourrait être la conséquence d'un changement de méthode.

Par ailleurs, la valeur déterminée par RMN est plus faible que les valeurs déterminées avec le même ligand et la même technique qui sont de $3,45 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ et de $3,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ dans de précédents travaux (Tableau 43) (Bolam et al., 2001; Simpson et al., 1999). Ceci pourrait provenir de la préparation du CBM et/ ou celle du ligand. Par exemple le CBM2b1 de l'étude de Simpson et collaborateurs n'a pas de tag histidine (Simpson et al., 1999).

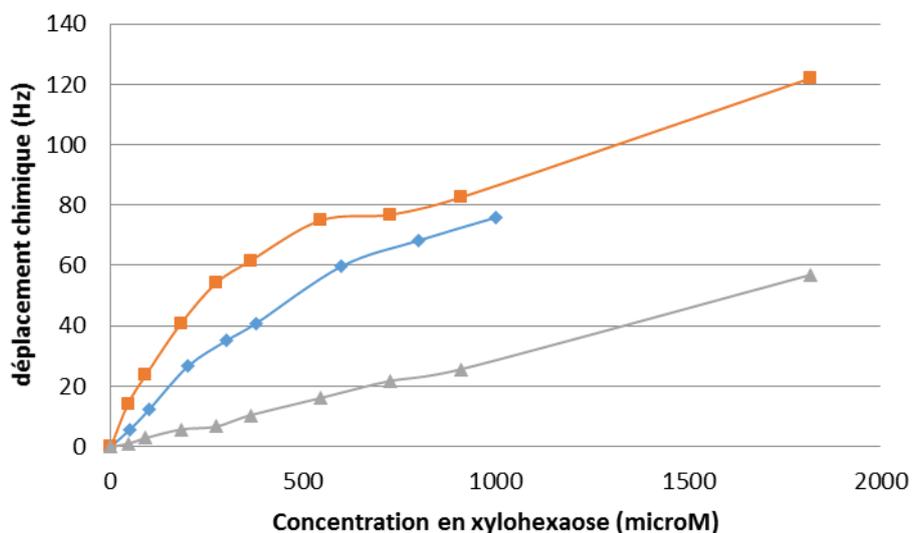


Figure 49 : Déplacements chimiques observés pour le troisième pic de tryptophane sur les spectres RMN des CBMs en présence de concentrations croissantes en xylohexaose.
En carré orange : InCBM2b1 ; en losange bleu : CBM2b1 ; en triangle gris : JoCBM2b1.

Tableau 44 : Constantes d'association de CBM2b1 et des protéines chimériques pour le xylohexaose déterminées par RMN.

La valeur du déplacement chimique (Dc) est celle observée en absence de ligand. K_a : constante d'association.

	pic 1		pic 2		pic 3		K_a (M^{-1})	
	Dc (ppm)	K_a (M^{-1})	Dc (ppm)	K_a (M^{-1})	Dc (ppm)	K_a (M^{-1})	moyenne	écart type
CBM2b1	10,315	$1,18 \cdot 10^3$	10,256	X	10,075	$9,80 \cdot 10^2$	$1,08 \cdot 10^3$	$1,43 \cdot 10^2$
InCBM2b1	10,333	$4,44 \cdot 10^3$	10,251	$2,81 \cdot 10^3$	10,072	$1,91 \cdot 10^3$	$3,05 \cdot 10^3$	$1,29 \cdot 10^3$
JoCBM2b1	10,332	$1,43 \cdot 10^{-3}$	10,254	$6,58 \cdot 10^{-4}$	10,073	$2,61 \cdot 10^{-4}$	$7,82 \cdot 10^{-4}$	$5,93 \cdot 10^{-4}$

L'association d'InCBM2b1 au xylohexaose a été quantifiée par une valeur de K_a de $3,05 \cdot 10^{-3} M^{-1}$ (Tableau 44). L'affinité de CBM2b1 pour le xylohexaose a été caractérisée dans les mêmes conditions, avec une valeur de K_a égale à $1,08 \cdot 10^3 M^{-1}$. La comparaison de ces deux valeurs permet de conclure que l'ajout d'In n'influence pas l'affinité entre le CBM et son ligand. Or dans le cas de JoCBM2b1, la valeur du K_a est égale à $7,82 \cdot 10^{-4} M^{-1}$ bien que d'après l'allure des spectres RMN pour cette protéine, la saturation n'a pas été atteinte (Figure 48). La comparaison des valeurs du K_a pour CBM2b1 et JoCBM2b1 permet d'affirmer que l'ajout de Jo diminue l'affinité du CBM pour le xylohexaose. La protéine JoCBM2b1 ne sera donc pas utilisée pour le reste de cette thèse.

Les constantes de dissociation ont été déterminées en utilisant le modèle avec un seul site de liaison du logiciel SigmaPlot. Cependant, ce modèle n'est valable que pour une courbe. Les constantes de dissociation ont été utilisées pour calculer les constantes d'association. Les valeurs des constantes d'association sont des valeurs approximatives notamment pour JoCBM2b1, où une droite est observée (Figure 49). Des spectres RMN avec la protéine JoCBM2b1 et des concentrations en xylohexaose supérieures à 200 μM auraient donné une constante d'association plus fiable.

L'origine de la différence entre les valeurs de K_a du CBM2b1 et du JoCBM2b1 n'est pas connue, mais pourrait provenir d'un encombrement stérique lié à la présence de Jo, d'interactions hydrophobes entre Jo et le ligand ou de la place de Jo par rapport au CBM2b1. Pour explorer davantage cette différence, nous aurions pu construire une protéine chimérique CBM2b1Jo ou JoCBM2b1 munie d'un linker plus petit ou plus grand susceptible de modifier la position spatiale de Jo. Cependant, cela n'a pas été réalisé dans cette étude par manque de temps. De plus, il est possible d'étudier la structure cristallographique de CBM2b1 dont les deux tryptophanes utilisés pour déterminer la constante d'association pour cette protéine sont Trp259 et Trp291 (Simpson et al., 1999) (en rouge sur la Figure 50). Ils correspondent aux pics

nommés pic 1 et pic 3 sur les spectres RMN (Figure 48, Tableau 44) car ils sont exposés au solvant et font partie des résidus du site de liaison de la protéine. Le pic appelé pic 2 est aussi détecté en RMN, il correspond au Trp275 or n'étant pas exposé au solvant (en magenta sur la Figure 50) l'interaction avec le ligand est faible ou absente. Ceci se retrouve lors de la détermination de la constante d'association à partir des déplacements chimiques du pic de Trp275 pour CBM2b1, qui donne une valeur très faible, égale à $2,46 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ et qui n'a pas été utilisée pour calculer la moyenne.

Au contraire, les données du Trp275 ont pu être utilisées pour les protéines chimériques InCBM2b1 et JoCBM2b1 pour affiner la valeur de la constante d'association (Tableau 44). Jo ou In et le linker ont été ajoutés à l'extrémité N-terminale du CBM2b1 or celle-ci est à proximité de la boucle contenant le Trp275 (Figure 50). Pour les protéines chimériques, la position de la boucle pourrait avoir changé par rapport à sa position dans la protéine sauvage, réorientant le tryptophane, le rendant accessible au solvant et pouvant interagir avec le ligand.

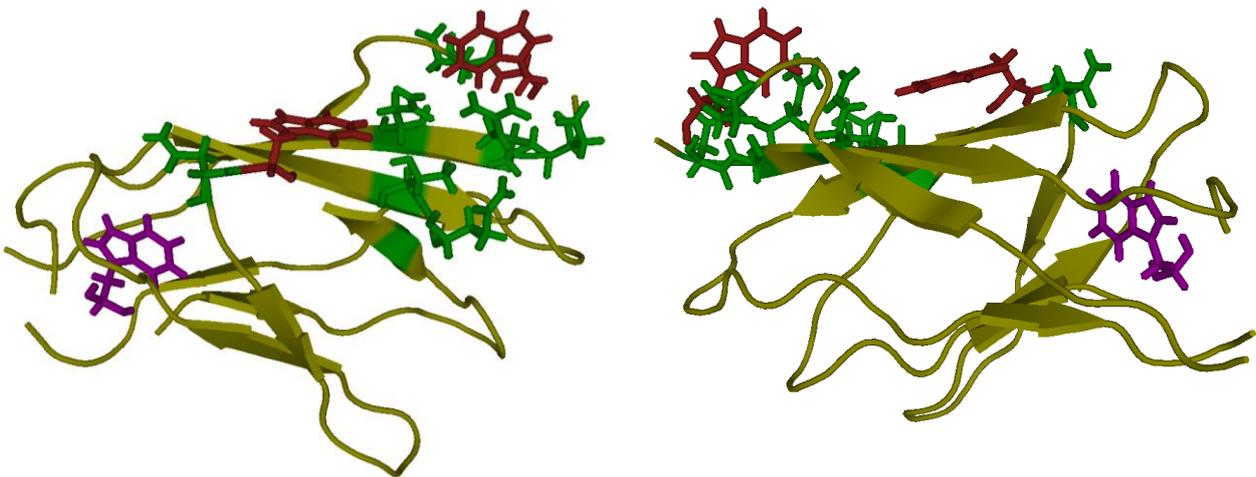


Figure 50 : Structure cristallographique du CBM2b1 selon deux vues différentes.
 Résidus en rouge : Trp259 et Trp291 ; résidu en magenta : Trp275 ; résidus en vert : autres résidus impliqués dans la liaison avec le ligand, Glu257, Asp261, Arg262, Asn264, Gln288, Asn292 et Thr316. Code PDB 1XBD (Simpson et al., 1999).

Par ailleurs, l'ajout de Jo influence l'affinité CBM2b1-ligand, mais n'influence pas celle entre le CBM3a et les nanocristaux de cellulose ni l'activité de la xylanase sur du xylane de hêtre. Le linker ajouté dans les protéines chimériques avec le CBM3a ou le CBM2b1 est le même, il semblerait que la nature de ce linker ne soit pas en cause dans la perte de l'affinité entre JoCBM2b1 et le xylohexaose. Cependant, il a été démontré que selon l'objectif (stabilité ou repliement d'une protéine) la longueur optimale du linker pouvait être différente (Robinson and Sauer, 1998). Dans notre cas, il aurait été intéressant de diminuer ou de

rallonger le linker ou même de changer sa séquence. Il aurait également été possible de refaire de la RMN pour définir si la présence de Jo et/ ou celle du linker dans la protéine JoCBM2b1 entraîne une diminution de l'affinité pour d'autres ligands du CBM2b1 comme l'arabinoxylane de blé.

3. Conclusion

Ce chapitre porte sur la vérification des propriétés biochimiques des différentes protéines (sauvages ou chimériques) afin de valider le système Jo-In. Les paramètres cinétiques des trois xylanases *NpXyn11A*, *InNpXyn11A* et *JoNpXyn11A* pour le xylane de hêtre étant du même ordre de grandeur, ces enzymes seront utilisées dans la suite de ce travail pour construire des enzymes multimodulaires contenant la xylanase et un CBM. Après la mise en œuvre de plusieurs techniques, les paramètres biochimiques de CBM3a, InCBM3a et JoCBM3a ont été déterminés. Les valeurs d' EC_{50} de CBM3a et d'InCBM3a pour les nanocristaux de cellulose sont de $5,85 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ et $5,48 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ respectivement. InCBM3a a donc une affinité supérieure pour les nanocristaux de cellulose par rapport à celle du CBM3a, c'est pourquoi cette protéine ne sera pas utilisée dans la suite de ce projet. En parallèle, des études en RMN de CBM2b1 et de ses protéines chimériques ont permis de déterminer une constante d'association de $1,08 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ pour CBM2b1, $3,05 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ pour InCBM2b1 et $7,82 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ pour JoCBM2b1. La protéine InCBM2b1 pourra donc être utilisée mais nous avons rejeté la protéine JoCBM2b1 car l'ajout de Jo a diminué l'affinité du CBM2b1 pour le xylohexaose. Un nombre important de protéines pourra donc être le sujet d'étude sous forme de protéines libres ou associées *via* Jo et In sur différents substrats. Le système Jo-In est ainsi validé.

Plusieurs pistes ont été énoncées pour comprendre davantage l'impact de l'ajout de Jo ou In ainsi que du linker à un CBM. Par exemple, l'augmentation ou la diminution de l'affinité pour le ligand pourrait provenir de la position du linker et de Jo ou In à l'extrémité N-terminale du CBM. De nouvelles constructions avec le linker et Jo ou In en position C-terminale pourraient apporter des informations complémentaires. Une autre hypothèse serait l'importance du linker dont la séquence pourrait être modifiée dans de futurs assemblages. En effet, la taille du linker peut être augmentée ou au contraire diminuée voire le linker éliminé en associant directement le CBM et Jo ou In. Une autre possibilité serait de modifier la

séquence du linker pour influencer sur la structure tridimensionnelle de JoCBM2b1 ou d'InCBM3a.

Jo et In sont des protéines qui ne sont pas connues pour être des enzymes ou des CBMs. Une vérification facilement réalisable serait de tester ces protéines seules dans les mêmes conditions que les protéines chimériques. Le contrôle négatif correspondant serait l'association JoIn. De plus, des mutants d'In et Jo sont disponibles dont un mutant inactif de Jo. Celui-ci pourrait être lié au CBM2b1 et être étudié en RMN. Ces données pourraient être complétées en étudiant les mêmes caractéristiques mais sur d'autres substrats ou ligands, notamment des substrats/ ligands plus complexes (paille de blé broyée pour les xylanases et arabinoxylane de blé pour les CBM2b1). L'ajout de Jo ou In aurait peut-être un impact différent.

Ces travaux montrent l'importance de vérifier les propriétés biochimiques pour chacune des constructions. Après avoir validé une partie des constructions, il est possible d'associer la xylanase sous forme d'In*Np*Xyn11A au CBM3a grâce à JoCBM3a. L'enzyme multimodulaire In*Np*Xyn11A-JoCBM3a ainsi formée pourra être étudiée sur différents substrats et être comparée aux protéines sous forme libre. Ceci fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 4

Etude cinétique de l'influence du CBM3a sur
l'activité de la xylanase *NpXyn11A*

Chapitre 4 : Etude cinétique de l'influence du CBM3a sur l'activité de la xylanase *NpXyn11A*

1. Introduction

Ce chapitre porte sur l'étude de l'enzyme multimodulaire In*NpXyn11A*-JoCBM3a (c'est-à-dire la xylanase de *N. patriciarum* associée au CBM3a de *C. thermocellum* via le système Jo et In décrit dans le chapitre 3). L'activité enzymatique de cette enzyme y est comparée avec celle de la *NpXyn11A* ainsi que des variants de celles-ci (c'est-à-dire In*NpXyn11A* et In*NpXyn11A*-Jo). Pour cette étude, nous avons employé différents substrats, du plus petit, c'est-à-dire le pseudo-tétramère, *pNP-X₃* (4-nitrophényle-β-D-xylotrioside), au substrat polymérique tel que le xylane de hêtre et à des substrats complexes tels que le son et la paille de blé. A travers ces études, nous avons cherché à mettre en évidence l'impact de la présence du CBM3a sur l'action de la xylanase en travaillant sur la modularité de l'enzyme. D'autre part, nous avons pris en compte la complexité du substrat. En effet, les divers substrats contiennent la cible de l'enzyme (un polymère de xyloses) seule, substituée ou en présence de cellulose, d'autres types d'hémicelluloses et de lignines.

Le xylane de hêtre est un polymère de xyloses faiblement substitué par des acides 4-O-méthyle-glucuroniques et largement utilisé pour la caractérisation biochimique de xylanases. Pour rappel, la paille de blé est composée de 44,51 % de cellulose, 26,16 % de xylose, 2,37 % d'arabinose, 0,44 % de galactose (Song et al., 2014). Les xylanes et les arabinoxylanes représentent la majorité des hémicelluloses (Lawther et al., 1995; Sun and Tomkinson, 2002). Le son de blé est l'enveloppe du grain, composée de 47,21 % de xylose, 27,04 % d'arabinose, 23,33 % de galactose 1,79 % de glucose et 0,64 % de mannose (Bouraoui et al., 2016). Parmi les hémicelluloses les plus abondantes on trouve également les arabinoxylanes (Brillouet et al., 1982). Le choix du son et de la paille de blé nous a permis de disposer de deux substrats complexes à forte teneur en arabinoxylanes mais dont la complexité est très différente, notamment à cause de la teneur en lignines.

Dans la littérature, les études réalisées avec des enzymes multimodulaires peuvent avoir pour objectif d'obtenir soit des informations sur le domaine non catalytique (ligand, rôle) (Charnock et al., 2000; Hoffmam et al., 2016; Sun et al., 1998), soit d'étudier les cellulosomes, notamment la proximité entre domaines, en créant des minicellulosomes

artificiels (Moraïs et al., 2010b; Setter-Lamed et al., 2017). Dans cette thèse, le but est d'étudier l'influence du CBM sur l'activité de la xylanase en fonction de la complexité du substrat. Par exemple, dans une échelle macroscopique, Paës et collaborateurs ont montré que la mobilité et la diffusion des protéines pouvaient être influencées par la quantité de xyloxyanes, celle de cellulose ou encore la taille de la protéine dans des gels composés d'arabinoxylanes féruloylés et de nanocristaux de cellulose, (Paës and Chabbert, 2012; Paës et al., 2013). Cette équipe a également travaillé avec un mutant de la xylanase de *Thermobacillus xylanilyticus* XYL11-INAC inactif mais ayant la même affinité pour le substrat que l'enzyme sauvage. Sur du grain de blé, la diffusion de cette enzyme est moins rapide que celle de l'enzyme sauvage, montrant que le réseau de la paroi cellulaire limitait physiquement le passage de l'enzyme (Beaugrand et al., 2005).

2. Résultats

1. Couplage des modules protéiques et purification des enzymes multimodulaires

Les différentes protéines InNpXyn11A, Jo et JoCBM3a ont été exprimées et purifiées comme décrit dans le chapitre précédent (Chapitre 3. 2. I). Une version d'InNpXyn11A a été exprimée sans le tag histidine. L'extrait cellulaire contenant l'enzyme non taguée a été utilisé en léger excès, mélangé à des fractions pures de Jo ou de JoCBM3a portant un tag histidine. Les quantités relatives de chaque protéine ont été évaluées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. L'enzyme multimodulaire résultante de l'association de Jo et In a alors été purifiée par IMAC selon le protocole décrit (Chapitre 2. 3. II. a et 2. 3. II. b selon le volume réactionnel) puis par chromatographie d'exclusion stérique (Chapitre 2. 3. III). Toutefois il est à noter que la formation de ces complexes peut être réalisée à partir d'extraits cellulaires non purifiés.

La Figure 51 illustre la formation des enzymes multimodulaires InNpXyn11A-JoCBM3a et InNpXyn11A-Jo. Dans les deux cas l'enzyme multimodulaire a pu être obtenue. Toutefois, malgré une estimation des quantités relatives de chaque protéine et un léger excès d'InNpXyn11A sans tag histidine, nous avons constaté qu'une fraction de la protéine Jo en fusion avec le tag histidine ne se complexait pas à In. Il est possible que dans ce cas (Figure 51), la surexpression de Jo dans *E. coli* entraîne un défaut dans le repliement tridimensionnel de la protéine empêchant une association entre Jo et In. Des études structurales par RMN

conduites par les Drs. Cédric Montanier et Guy Lippens tendent à montrer une grande flexibilité structurale de la protéine Jo (données non publiées). Dans le cas de la protéine chimérique JoCBM3a, la présence du CBM pourrait stabiliser Jo et favoriser la formation du complexe.

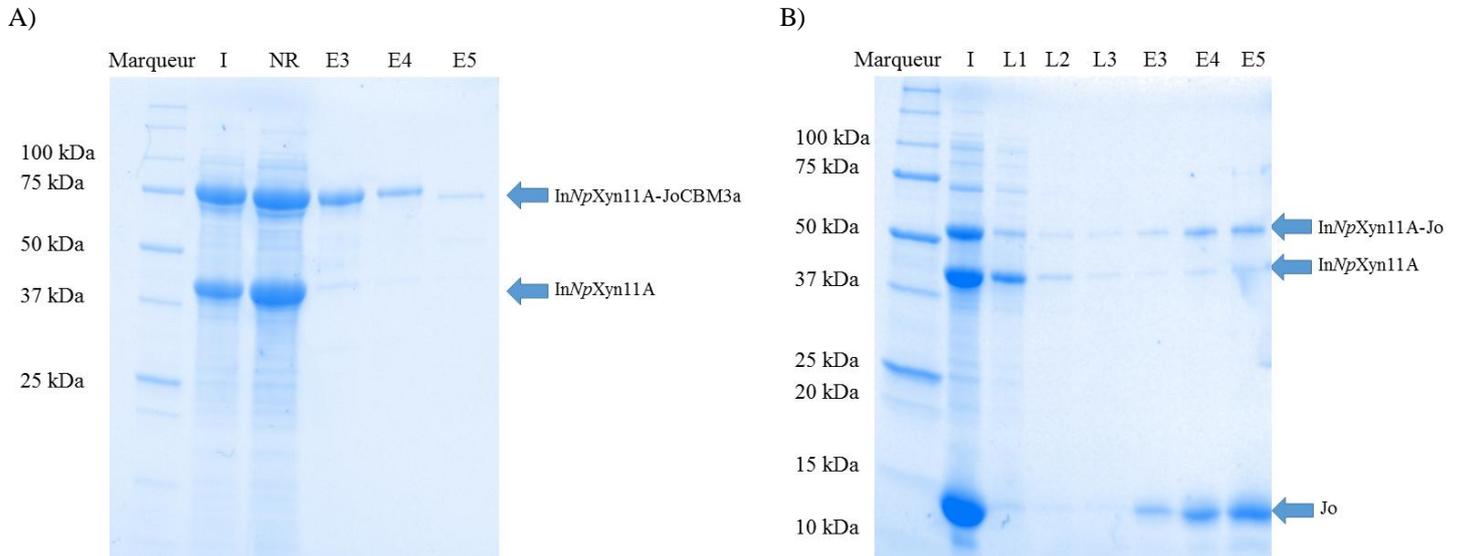


Figure 51 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE des différentes fractions de purification des enzymes multimodulaires.

A) Enzyme multimodulaire InNpXyn11A-JoCBM3a. I : mélange initial d'InNpXyn11A et de JoCBM3a ; NR : fraction non retenue ; E3 et E4 : éluions à 150 mM d'imidazole ; E5 : élution à 500 mM d'imidazole. Les flèches indiquent la bande correspondant à InNpXyn11A-JoCBM3a et InNpXyn11A dont la masse molaire est de 70 kDa et 41 kDa respectivement. B) Enzyme multimodulaire InNpXyn11A-Jo. I : mélange initial d'InNpXyn11A et de Jo ; L1, L2, L3 : fractions de lavage ; E3 et E4 : éluions à 150 mM d'imidazole ; E5 : élution à 500 mM d'imidazole. Les flèches indiquent la bande correspondant à InNpXyn11A-Jo, InNpXyn11A et Jo dont la masse molaire est de 52 kDa, 41 kDa et 11 kDa respectivement.

Les enzymes multimodulaires InNpXyn11A-JoCBM3a et InNpXyn11A-Jo n'étant pas pures à l'issue de cette première étape, une seconde étape de purification par chromatographie d'exclusion stérique (Chapitre 2. 3. III) a été réalisée (Figure 52, Figure 53, Tableau 45). La protéine CBM3a interagissant avec le dextrane, le polymère composé d'unités α -D-glucosyle qui compose la résine des colonnes Superdex (matrice agarose et dextrane), une résine Superose (matrice agarose réticulé) sans dextrane a été utilisée pour faciliter la purification.

Les enzymes multimodulaires pures ont été obtenues sous forme de monomère (Figure 52A et Figure 53A). Néanmoins, la présence de traces d'InNpXyn11A sur les gels d'électrophorèse SDS-PAGE (Figure 51, Figure 52B et Figure 53B) proviendrait de sa capacité à former des dimères. Cependant, les coefficients stœchiométriques obtenus d'après la calibration de la colonne de purification (Tableau 45) montrent que les enzymes multimodulaires InNpXyn11A-JoCBM3a et InNpXyn11A-Jo ont été obtenues majoritairement sous leur forme monomérique.

Les fractions 20 et 22 déposées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE correspondent à des protéines ou à des résidus de protéines dont la taille est inférieure à 10 kDa. Or la résolution du gel d'électrophorèse SDS-PAGE n'est pas compatible avec l'étude de telles protéines, trop petites. Ces protéines ont d'ailleurs été éluées au-delà du volume de la colonne (24 mL) (Figure 52B).

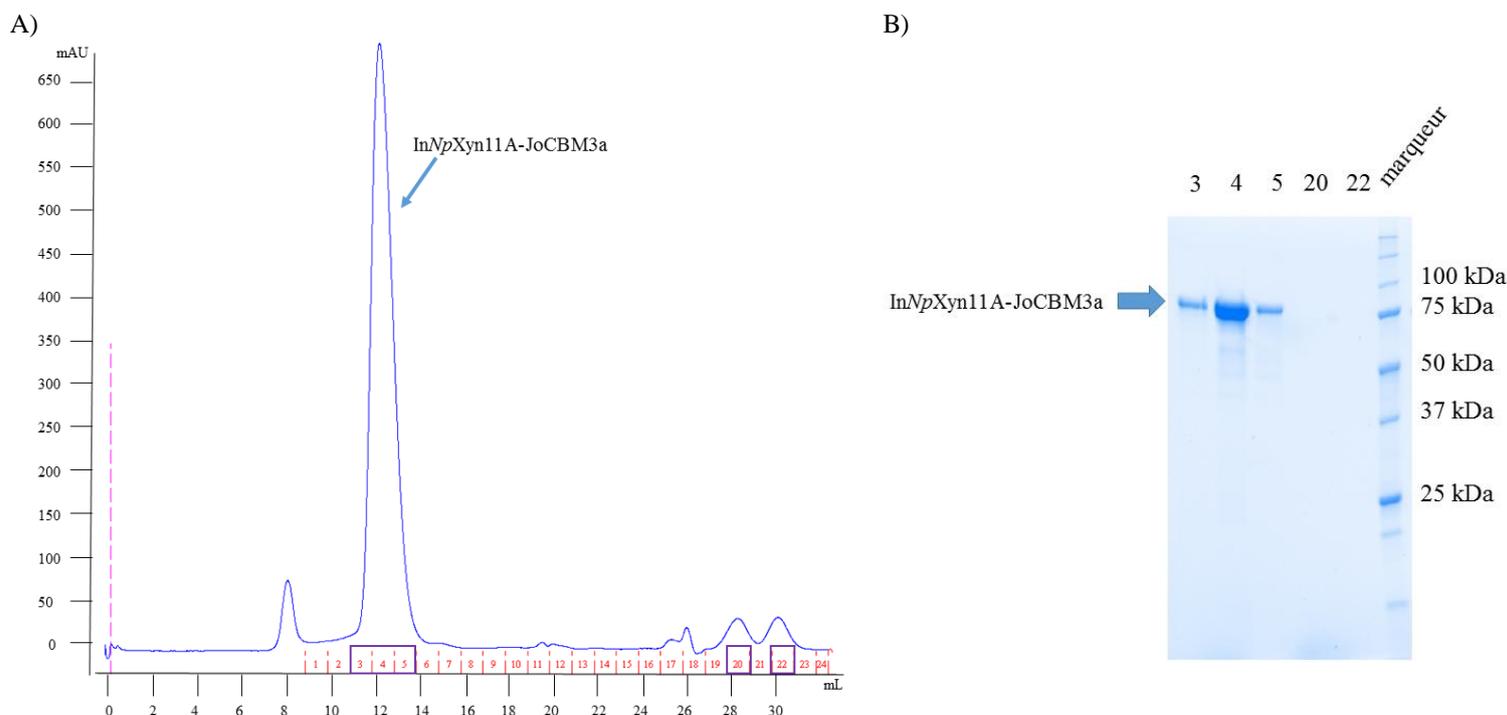


Figure 52 : Purification de l'enzyme multimodulaire InNpXyn11A-JoCBM3a.

A) Chromatogramme d'exclusion stérique. InNpXyn11A-JoCBM3a est élué à 12,09 mL. B) Gel d'électrophorèse SDS-PAGE des différentes fractions collectées. Le numéro des fractions correspond aux fractions du chromatogramme. La flèche indique la bande correspondante à InNpXyn11A-JoCBM3a dont la masse molaire est de 70 kDa.

Tableau 45 : Bilan de la chromatographie d'exclusion stérique d'InNpXyn11A-JoCBM3a et d'InNpXyn11A-Jo.

Le ratio masse molaire expérimentale sur masse molaire théorique correspond au coefficient de stœchiométrie ; tag H : tag histidine.

protéine éluée	masse molaire théorique (kDa)	volume d'élué (mL)	masse molaire expérimentale (kDa)	stœchiométrie
InNpXyn11A sans tagH-JoCBM3a	70	12,09	63	0,9
InNpXyn11A sans tagH-Jo	51	12,77	45	0,9

Nous avons obtenu nos enzymes multimodulaires InNpXyn11A-JoCBM3a et InNpXyn11A-Jo pures, nous permettant de les caractériser sur les substrats solubles puis sur les substrats insolubles. Les enzymes NpXyn11A et InNpXyn11A ont également été

exprimées et purifiées. Les quantités obtenues sont compatibles avec leur étude (Chapitre 3. 2.

I. b).

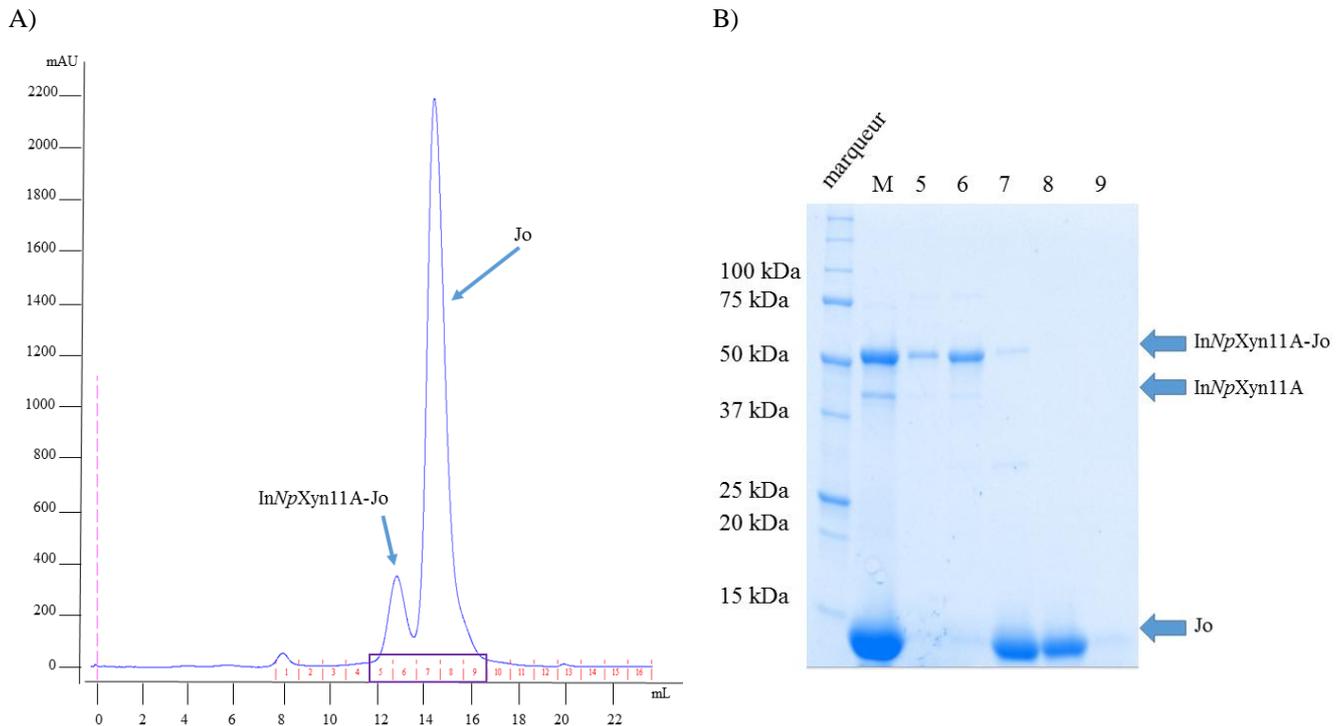


Figure 53 : Purification de l'enzyme multimodulaire InNpXyn11A-Jo.

A) Chromatogramme d'exclusion stérique. InNpXyn11A-Jo est élué à 12,77 mL. B) Gel d'électrophorèse SDS-PAGE des différentes fractions collectées. M : mélange des fractions E4 + E5 après purification IMAC (Figure 51). Le numéro des autres fractions est le même que lors de la chromatographie d'exclusion stérique. Les flèches indiquent la bande correspondante à InNpXyn11A-Jo, InNpXyn11A et Jo dont la masse molaire est de 52 kDa, 41 kDa et 11 kDa respectivement.

II. Activité des enzymes sur substrat soluble

Dans un premier temps, les activités des différentes enzymes (*NpXyn11A*, *InNpXyn11A*, *InNpXyn11A-Jo* et *InNpXyn11A-JoCBM3a*) ont été mesurées et comparées en utilisant des substrats solubles. L'objectif est d'étudier l'impact du CBM3a sur l'activité de la xylanase, les autres enzymes, (*InNpXyn11A* et *InNpXyn11A-Jo*) sont des contrôles. Le premier substrat est du *pNP-X₃*, un substrat chromogénique dont l'utilisation a déjà été décrite pour la *NpXyn11A* (Vardakou et al., 2008). La libération du groupement chromogénique 4-nitrophényle au cours de l'hydrolyse est suivie par spectrophotométrie à 401 nm (Chapitre 2. 6. I. a). Les valeurs des activités spécifiques pour les différentes enzymes sont données dans le Tableau 46 : à partir de l'activité spécifique déterminée pour chaque lot protéique, une moyenne a été calculée pour chaque enzyme.

Tableau 46 : Activité spécifique des enzymes sur du *pNP-X₃*.
 AS : activité spécifique ; $\text{UI}\cdot\text{mg}^{-1}$: libération d'une μmole de *pNP* par minute.

enzyme	AS sur <i>pNP-X₃</i> ($\text{UI}\cdot\text{mg}^{-1}$)	nombre de lots protéiques
<i>NpXyn11A</i>	$5,04 \pm 2,20$	4
<i>InNpXyn11A</i>	$3,09 \pm 0,80$	8
<i>InNpXyn11A-JoCBM3a</i>	$1,94 \pm 0,34$	4
<i>InNpXyn11A-Jo</i>	1,69	1

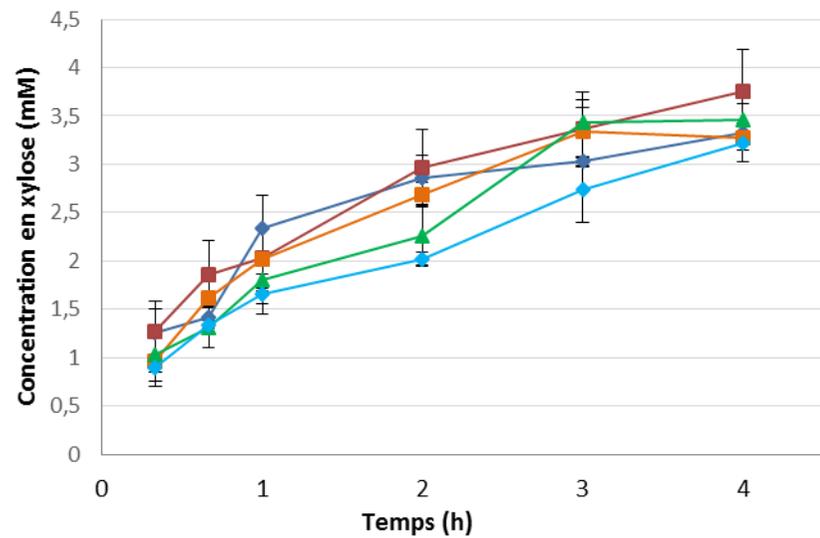
L'activité spécifique de l'enzyme sauvage est de $5,04 \pm 2,20 \text{ UI}\cdot\text{mg}^{-1}$ sur le *pNP-X₃* et celle d'*InNpXyn11A* est égale à $3,09 \pm 0,80 \text{ UI}\cdot\text{mg}^{-1}$. Les activités spécifiques sont similaires en prenant en compte les écarts types. Par conséquent, la présence du module In n'altère pas l'activité du domaine catalytique sur ce substrat. Ce résultat concorde bien avec les résultats décrits dans le chapitre précédent (Chapitre 3. 2. II. b). Par ailleurs, l'activité spécifique de l'enzyme multimodulaire *InNpXyn11A-Jo* est de $1,69 \text{ UI}\cdot\text{mg}^{-1}$. Même si l'activité d'*InNpXyn11A-Jo* n'a pas été mesurée en réplicat, il semblerait que cette activité soit significativement plus faible que celle d'*InNpXyn11A*. Dans ce cas, il est possible que la formation du complexe JoIn du côté N-terminal du module catalytique entraîne une proximité trop proche entre le domaine catalytique et JoIn, gênant ainsi l'accessibilité du substrat. Il est également possible que JoIn entraîne un encombrement stérique modifiant le mouvement du pouce du domaine catalytique de la xylanase et diminuant d'autant son activité spécifique (Chapitre 1. 5. II). De plus, l'activité spécifique d'*InNpXyn11A-JoCBM3a* est égale à $1,94 \pm 0,34 \text{ UI}\cdot\text{mg}^{-1}$, cette valeur est similaire à celle d'*InNpXyn11A-Jo*. Cette activité spécifique est également proche de celle de l'enzyme *InNpXyn11A*. La présence du CBM3a ne modifie donc pas l'activité spécifique.

Des variations lors de la détermination de la concentration en enzyme, de la préparation du milieu réactionnel (lot de tampon et de substrat différents) ou de la durée entre la purification de la protéine et la détermination de son activité peuvent expliquer pour chaque enzyme les écarts-types observés à partir de lots protéiques différents (Tableau 46).

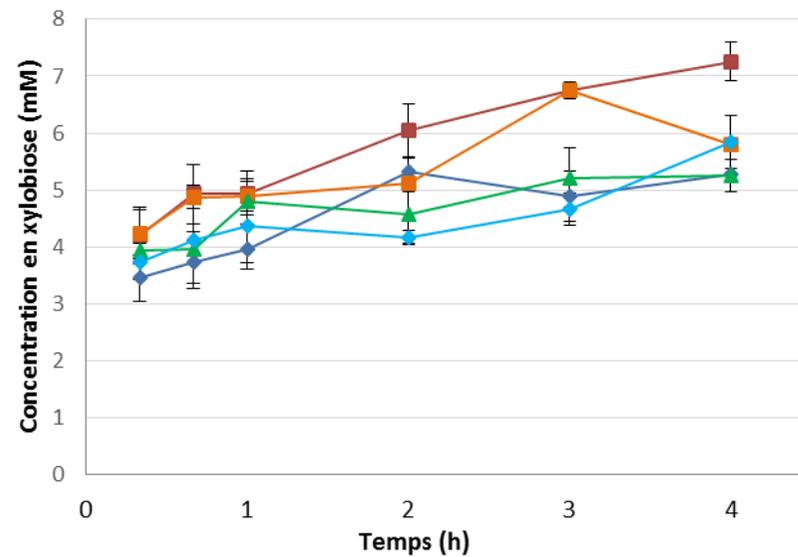
Le second substrat soluble utilisé est le xylane de hêtre. L'hydrolyse de ce polymère de xylose a été suivie par HPAEC-PAD (Chapitre 2. 6. III). Cette approche nous a permis de déterminer au cours du temps la variation des concentrations en xylooligosaccharides, du xylose au xylohexaose (Figure 54).

Pour toutes les conditions enzymatiques testées, la concentration en xylose et xylobiose augmente au cours de la réaction, entre 0,75 et 4 mM et entre 3 et 7,5 mM respectivement.

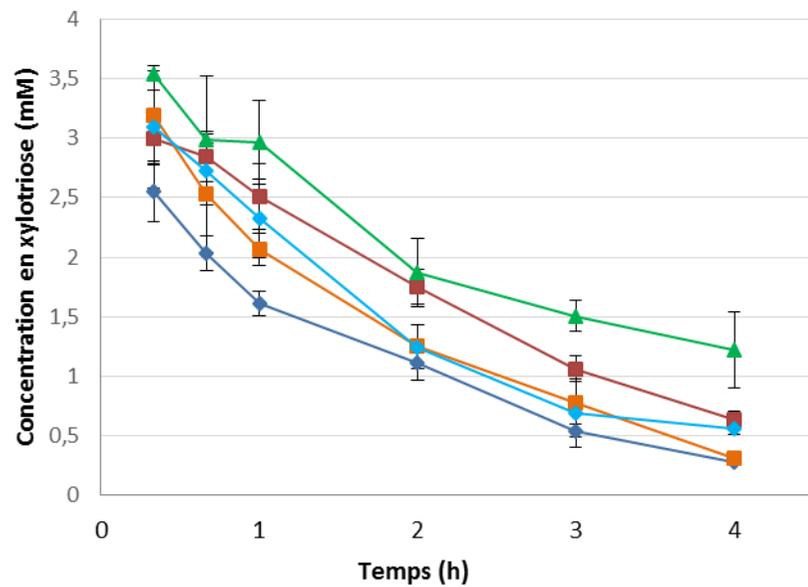
A)



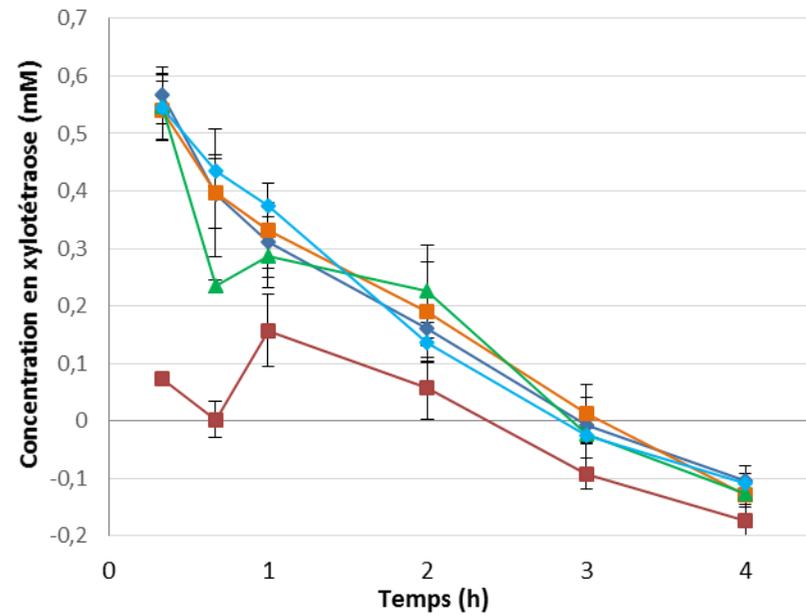
B)



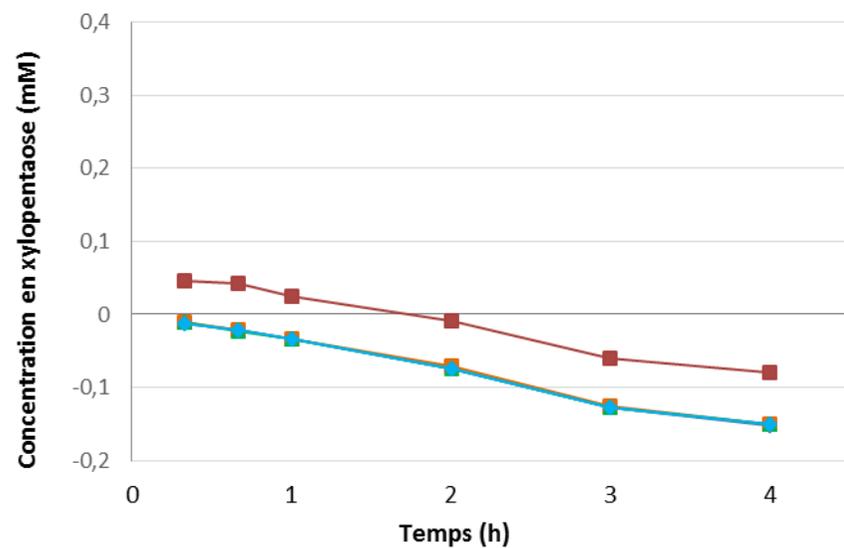
C)



D)



E)



F)

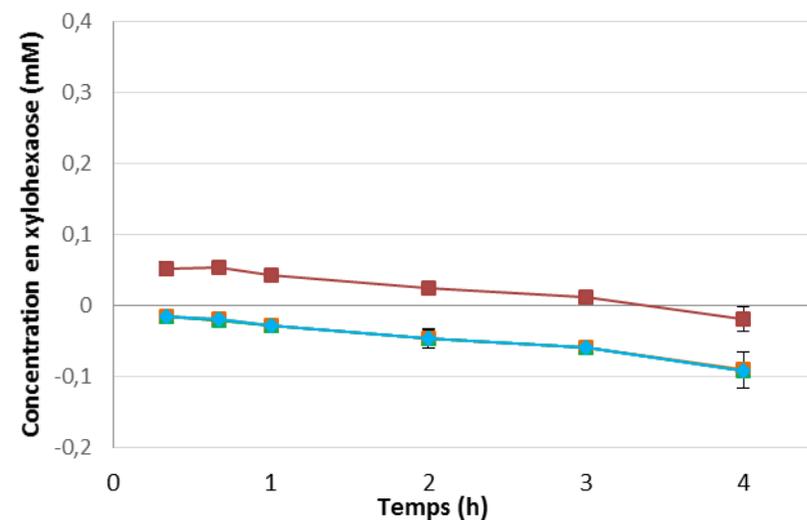


Figure 54 : Variation des concentrations en xylooligosaccharides au cours de l'hydrolyse du xylane de hêtre par différentes formes de *NpXyn11A*. Quantification de A) xylose ; B) xylobiose ; C) xylotriose ; D) xylo tétraose ; E) xylopentaose ; F) xylohexaose. En carré rouge : *NpXyn11A* ; en losange bleu foncé : *InNpXyn11A* ; en carré orange : *InNpXyn11A* + CBM3a ; en losange bleu clair : *InNpXyn11A*-JoCBM3a ; en triangle vert clair : *InNpXyn11A*-Jo. Expériences réalisées en triplicat.

Au contraire, celle en xylotriase diminue entre 3,5 et 0,25 mM. Les concentrations en xylo tétraose, xylopentaose et xylohexaose sont inférieures à 1 mM. Il est également possible que les enzymes aient produit des xylooligosaccharides présentant un degré de polymérisation supérieur à 6 et/ ou des substitutions, mais ces xylooligosaccharides ne sont pas quantifiés dans cette analyse. Dans un premier temps, les enzymes ont dégradé le xylane en produisant divers xylooligosaccharides plus ou moins substitués. L'absence de xylopentaose et de xylohexaose dès 20 minutes de réaction signifie que la réaction est très avancée (Figure 54E et Figure 54F). En effet, dans un deuxième temps les enzymes ont clivé le xylo tétraose, le xylopentaose et le xylohexaose en libérant majoritairement du xylotriase. La concentration en xylotriase diminue entre 20 minutes et 4 heures (Figure 54C) ce qui correspond à la troisième phase, où les enzymes hydrolysent le xylotriase en produisant du xylose et du xylobiose (Figure 54A et Figure 54B) car les autres substrats potentiels (xylooligosaccharides de DP supérieur à 3) sont en faibles quantités ou absents du milieu réactionnel. Ceci est en accord avec la caractérisation biochimique de la xylanase (Vardakou et al., 2008).

L'enzyme In*NpXyn11A* produit 5 mM de xylobiose et 0,5 mM de xylotriase après 3 heures de réaction (Figure 54B et Figure 54C). Ces valeurs sont inférieures à celles de l'enzyme sauvage, pour laquelle 6,8 mM de xylobiose et 1 mM de xylotriase ont été quantifiées. De plus, les profils de xylose sont similaires pour les deux enzymes (Figure 54A). La présence d'In semble limiter l'activité enzymatique sur ce substrat qui est plus long que le *pNP-X₃* et pour lequel la diffusion du substrat jusqu'au site catalytique est moins rapide. Cependant, il faudrait confirmer ou infirmer cette tendance par de nouvelles expériences, avec des écarts-types plus petits.

En parallèle, l'enzyme multimodulaire In*NpXyn11A-Jo* produit 2 mM de xylose et 4,5 mM de xylobiose après 2 heures de réaction soit des valeurs inférieures à celles de *NpXyn11A*, égales à 3 mM et 6 mM respectivement (Figure 54A et Figure 54B). En parallèle, en présence d'In*NpXyn11A-Jo* 1,5 mM de xylotriase est quantifié après 3 heures de réaction, une valeur supérieure à celle de l'enzyme sauvage, égale à 1 mM (Figure 54C). L'enzyme In*NpXyn11A-Jo* produit donc moins de xylose et xylobiose que *NpXyn11A* et en parallèle elle accumule plus de xylotriase et de xylo tétraose. In*NpXyn11A-Jo* est donc moins active. Ainsi, pour un temps donné de l'expérience, la réaction est moins avancée. Ceci est en accord avec les expériences réalisées avec du *pNP-X₃* car son activité spécifique est plus faible que celle de

l'enzyme sauvage (Tableau 46). La présence de Jo influencerait donc la capacité de l'enzyme à hydrolyser des xylooligosaccharides.

La même tendance est observée pour In*NpXyn11A*-JoCBM3a qui produit après 2 heures de réaction 2 mM de xylose et 4 mM de xylobiose (Figure 54A et Figure 54B). L'activité de cette enzyme est également inférieure à celle de *NpXyn11A*. La concentration en xylotriase est plus faible dans le cas de l'enzyme multimodulaire, avec par exemple 0,75 mM après 3 heures de réaction contre 1 mM pour l'enzyme sauvage. La présence du CBM3a ne favorise pas la dégradation du xylane de hêtre ce qui était attendu car le ligand du CBM, la cellulose, n'est pas présent dans ce substrat.

En conclusion, In*NpXyn11A*-JoCBM3a est légèrement moins active que *NpXyn11A* sur les deux substrats solubles.

III. Activité des enzymes sur substrat insoluble

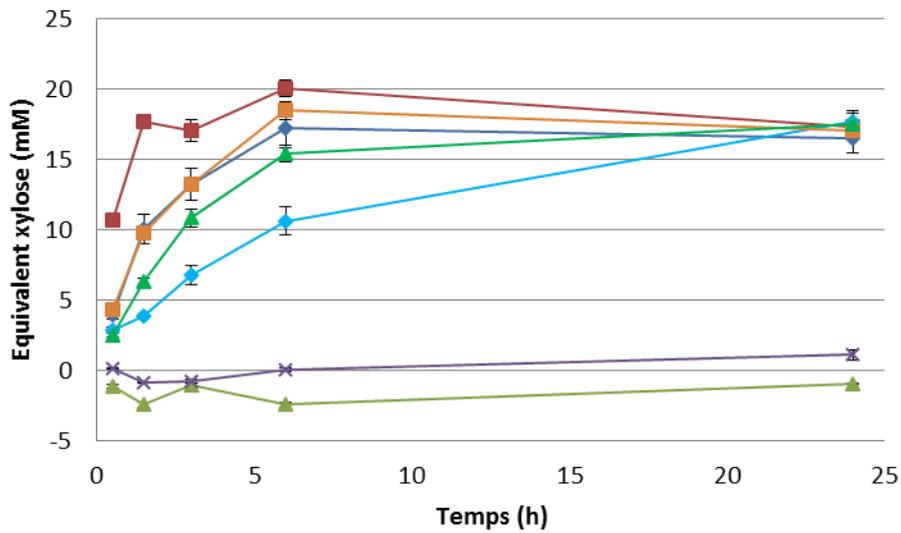
Dans un second temps, l'activité des enzymes *NpXyn11A*, In*NpXyn11A*, In*NpXyn11A*-JoCBM3a et In*NpXyn11A*-Jo a été mesurée et comparée sur des substrats insolubles. Les cinétiques réalisées sur ces substrats ont été menées sur 24 heures afin de prendre en compte la complexité du substrat.

a) Activité des enzymes sur son et paille de blé

L'hydrolyse des xylanes présents dans le son et la paille de blé a d'abord été suivie par la mesure des sucres réducteurs par DNS provenant de l'hydrolyse des xylanes et des arabinoxylanes (Chapitre 2. 6. II). Cette approche classiquement utilisée pour la caractérisation des GHs apporte une vision globale de la réaction enzymatique, ne faisant apparaître que les « événements » de coupure au cours de l'hydrolyse.

La Figure 55A et la Figure 55B présentent le suivi des activités enzymatiques sur le son de blé et sur la paille de blé respectivement par DNS, pour les enzymes libres *NpXyn11A* et In*NpXyn11A* ainsi que pour les enzymes multimodulaires In*NpXyn11A*-Jo et In*NpXyn11A*-JoCBM3a.

A)



B)

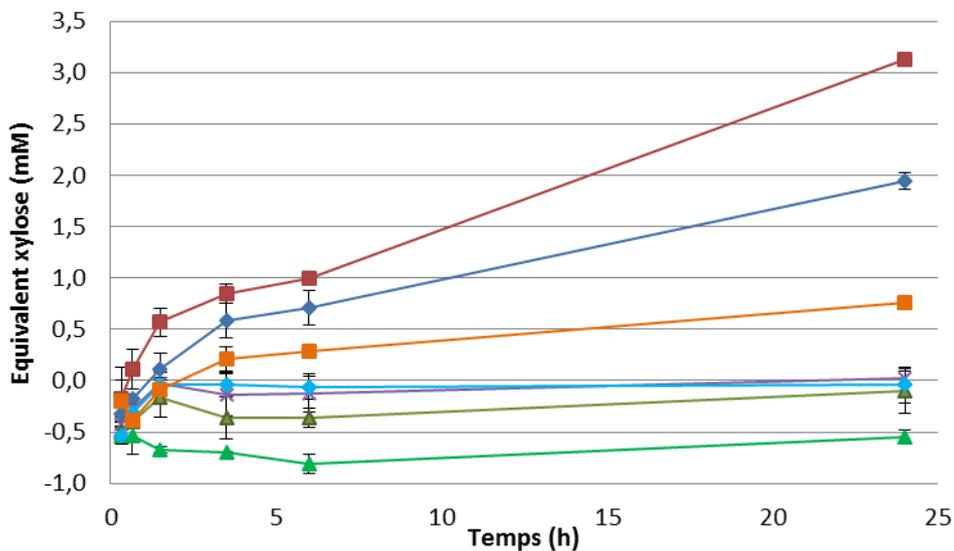


Figure 55 : Cinétique de dégradation de substrats insolubles par différentes protéines.

A) Dégradation du son de blé. B) Dégradation de la paille de blé. Expériences réalisées en triplicat. En carré rouge : *NpXyn11A* ; en losange bleu foncé : *InNpXyn11A* ; en carré orange : *InNpXyn11A* + *CBM3a* ; en losange bleu clair : *InNpXyn11A*-*JoCBM3a* ; en triangle vert clair : *InNpXyn11A*-*Jo* ; en triangle vert foncé : *CBM3a* ; en croix violette : *JoCBM3a*

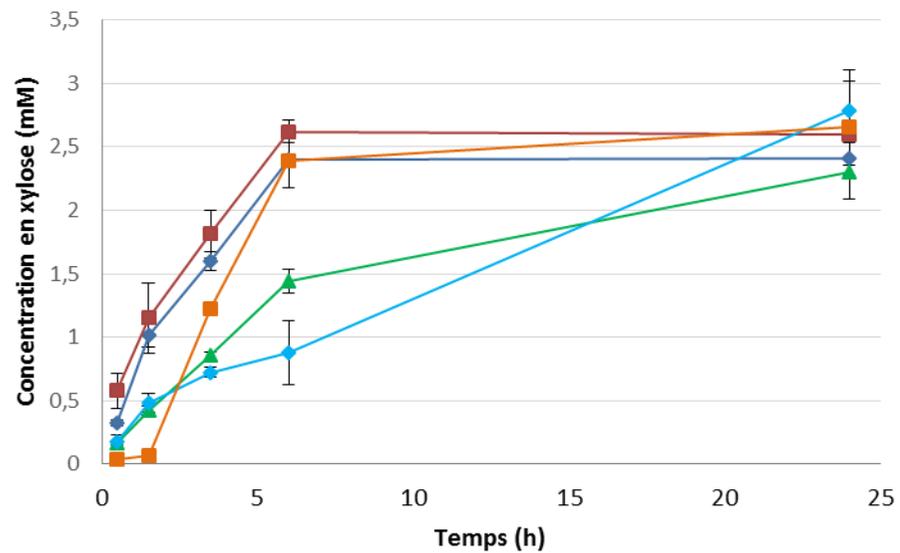
L'enzyme sauvage est la plus active sur les deux substrats, libérant 17,7 mM d'équivalent xylose après 1h30 de réaction à partir de son de blé et 3 mM d'équivalent xylose au bout de 24 heures pour la paille de blé. *InNpXyn11A* est la deuxième enzyme la plus active. En effet, elle produit 9,8 mM d'équivalent xylose à partir du son de blé et 2 mM d'équivalent xylose avec la paille de blé pour les mêmes temps. Le *CBM3a* ne libère pas d'équivalent xylose, ce qui est cohérent avec l'absence de site actif dans cette protéine qui n'a pas d'activité enzymatique.

L'activité des enzymes multimodulaires est différente selon le substrat d'étude. Ainsi, sur le son de blé les deux enzymes sont actives, mais leur capacité d'hydrolyse est plus faible comparée à celle de l'enzyme sauvage. Plus précisément, In*NpXyn11A*-Jo est plus rapide qu'In*NpXyn11A*-JoCBM3a avec 6,3 mM et 3,8 mM d'équivalent xylose produit après 1h30 de réaction respectivement. Il semblerait que les vitesses d'apparition en équivalent xylose soient liées à la taille de l'enzyme. Sur le son de blé, l'ensemble des enzymes produit environ 17 mM d'équivalent en xylose après 24 heures de réaction mais l'hydrolyse est d'autant plus ralentie que la taille de l'enzyme augmente. Ainsi, la taille de l'enzyme limiterait sa diffusion au cours de la réaction d'hydrolyse. En effet, l'activité des enzymes multimodulaires n'est pas détectée sur de la paille de blé.

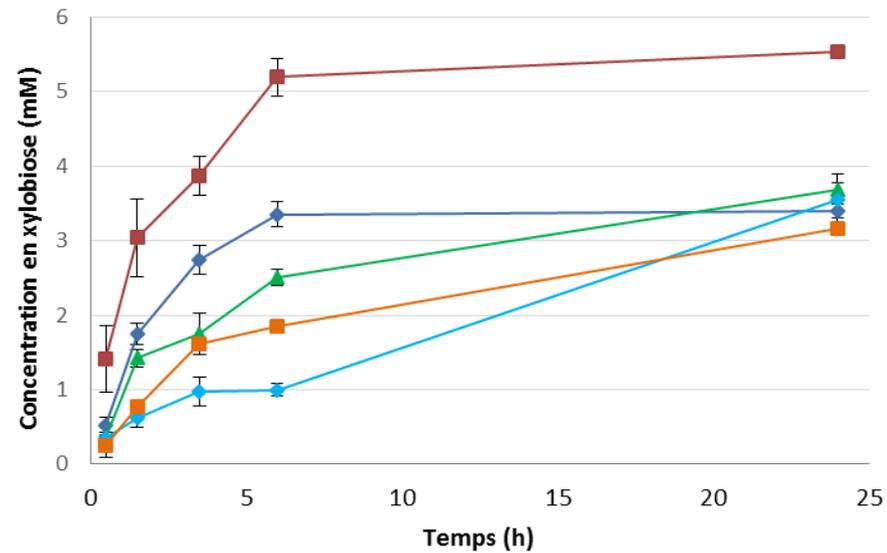
Afin de mieux rendre compte de la nature des produits libérés par les différentes enzymes, les échantillons analysés par DNS l'ont été par HPAEC-PAD (Chapitre 2. 6. III). Contrairement à l'analyse par DNS qui ne reflète que le nombre d'évènement d'hydrolyse, cette approche nous a permis de déterminer au cours du temps la variation des concentrations en xylooligosaccharides, du xylose au xylohexaose (Figure 56 et Figure 57). Le xylotétraose, le xylopentaose et le xylohexaose ne sont pas dans la Figure 57 car les valeurs sont inférieures au seuil de la gamme étalon de chacun de ces produits. La présence de fragments a pu boucher le cône de la pipette utilisée pour réaliser des prélèvements lors des cinétiques expliquant les écarts-types plus importants que pour des substrats solubles.

Lors de la dégradation du son de blé, les enzymes produisent des xylooligosaccharides dont le xylopentaose et le xylohexaose dans un premier temps. A partir de 6 heures d'incubation les xylooligosaccharides de DP supérieur à 3 sont dégradés produisant du xylose et du xylobiose en accord avec la caractérisation biochimique de cette enzyme (Vardakou et al., 2008). A l'inverse, pour la paille de blé la production du xylotétraose, du xylopentaose et du xylohexaose n'a pas été mise en évidence. Seulement du xylose, du xylobiose et du xylotriose ont été détectés. De plus, l'hydrolyse du xylobiose et du xylotriose a été observée dès 30 minutes de réaction. Or, il a été démontré que la *NpXyn11A* accommode très rarement le xylobiose pour produire du xylose (Figure 57A et Figure 57B), ce qui indique que dans notre étude aucun autre substrat n'a été disponible en concentration suffisante. En conséquence, l'enzyme a été contrainte d'utiliser le xylobiose comme substrat. Ce résultat est exceptionnel car jusqu'ici ce phénomène n'a pas été décrit pour la *NpXyn11A*. Cependant, dans l'étude de Vardakou et collaborateurs (Vardakou et al., 2008) seuls des substrats purifiés et solubles ont

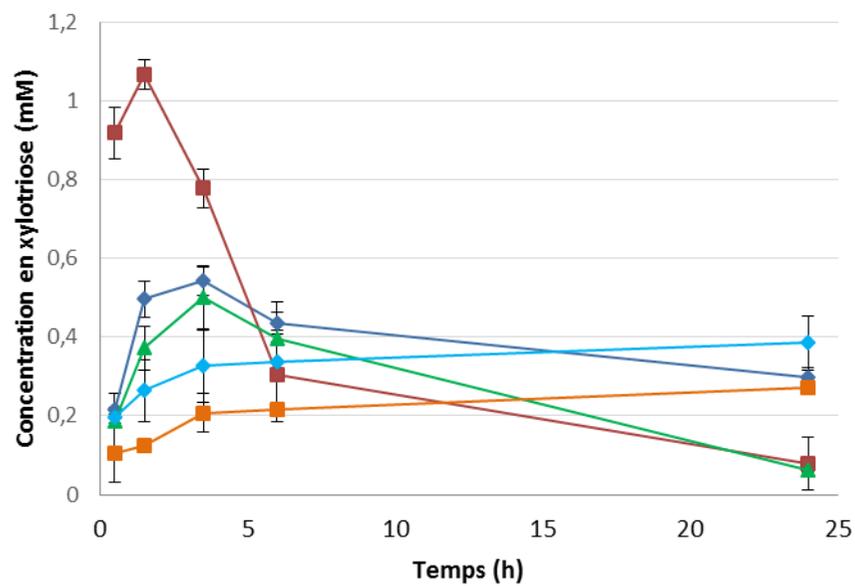
A)



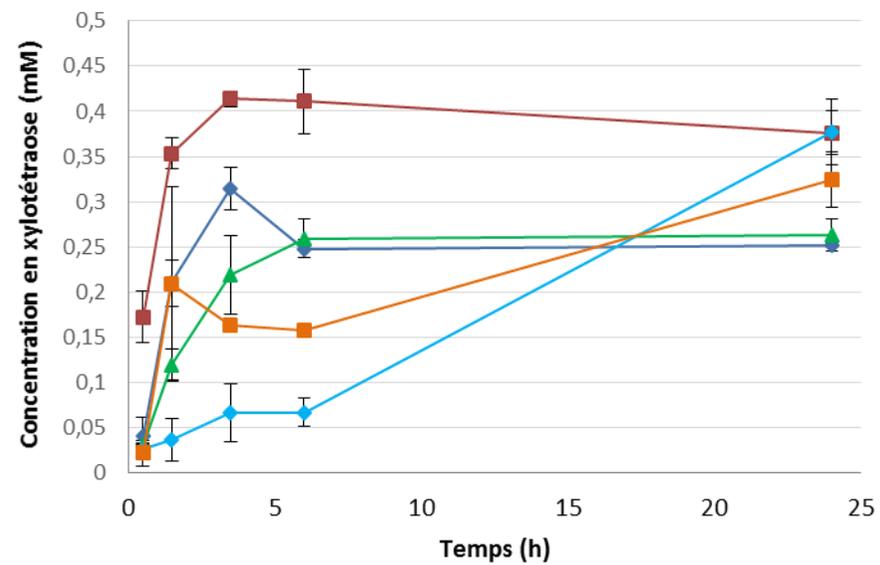
B)



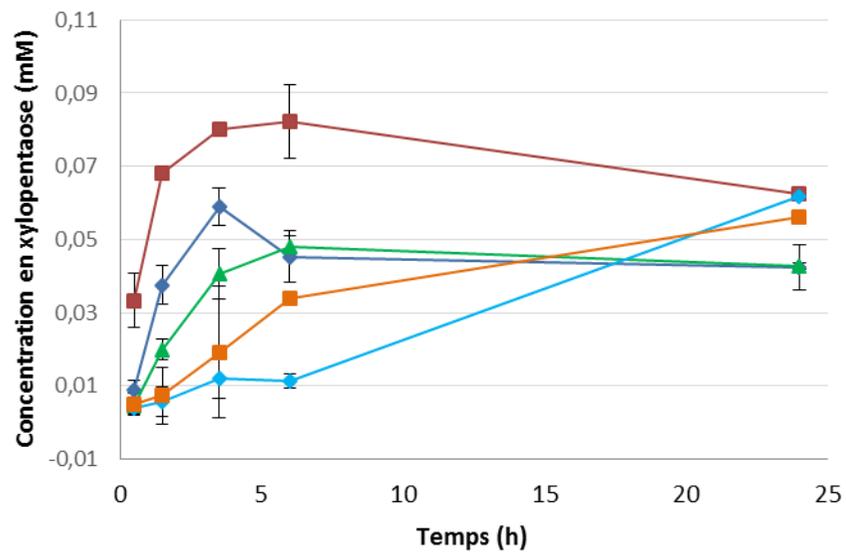
C)



D)



E)



F)

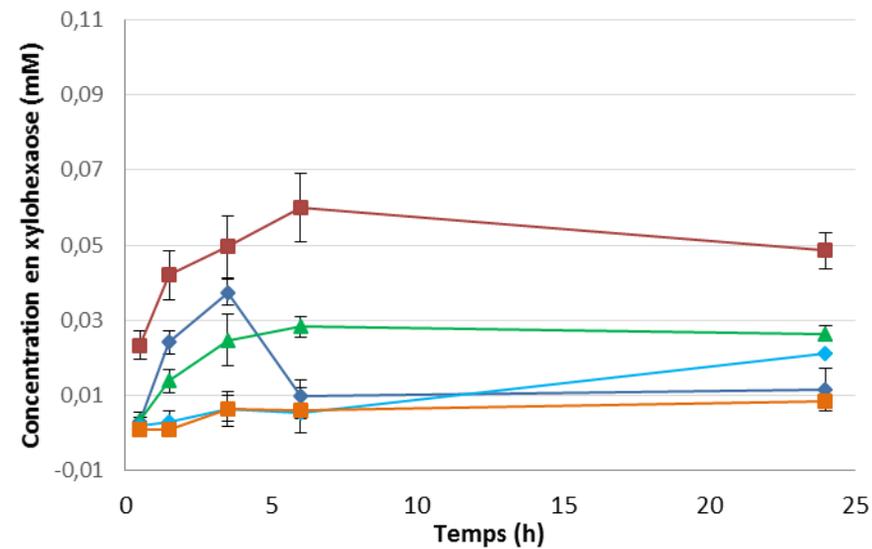
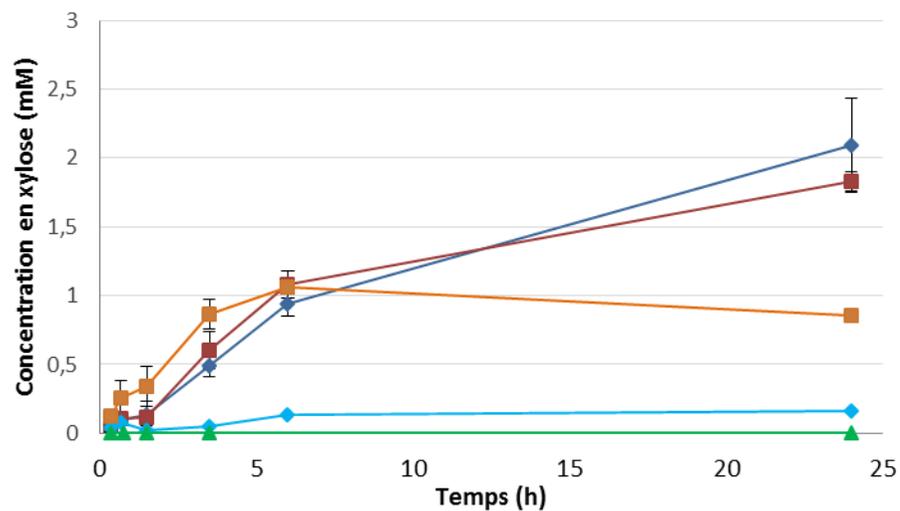
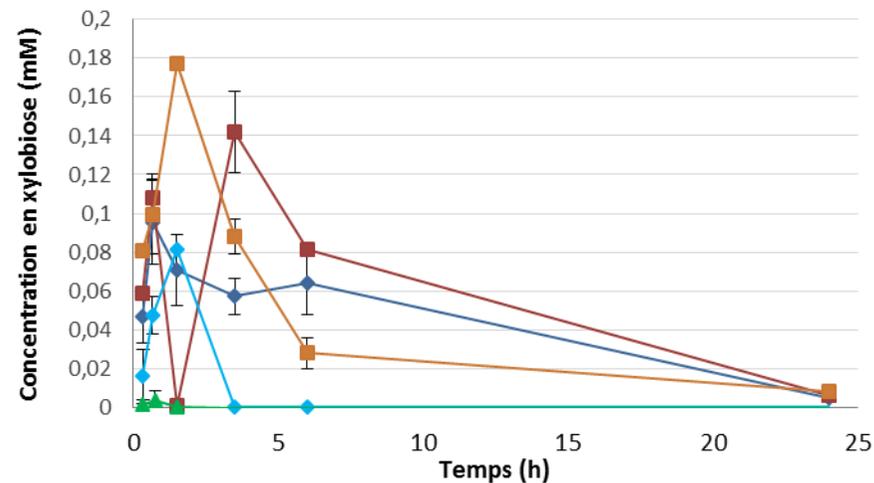


Figure 56 : Variation des concentrations en xylooligosaccharides au cours de l'hydrolyse du son de blé par différentes formes de *NpXyn11A*. Quantification de A) xylose ; B) xylobiose ; C) xylotriose ; D) xylotétraose ; E) xylopentose ; F) xylohexaose. En carré rouge : *NpXyn11A* ; en losange bleu foncé : *InNpXyn11A* ; en carré orange : *InNpXyn11A* + CBM3a ; en losange bleu clair : *InNpXyn11A*-JoCBM3a ; en triangle vert clair : *InNpXyn11A*-Jo. Expériences réalisées en triplicat.

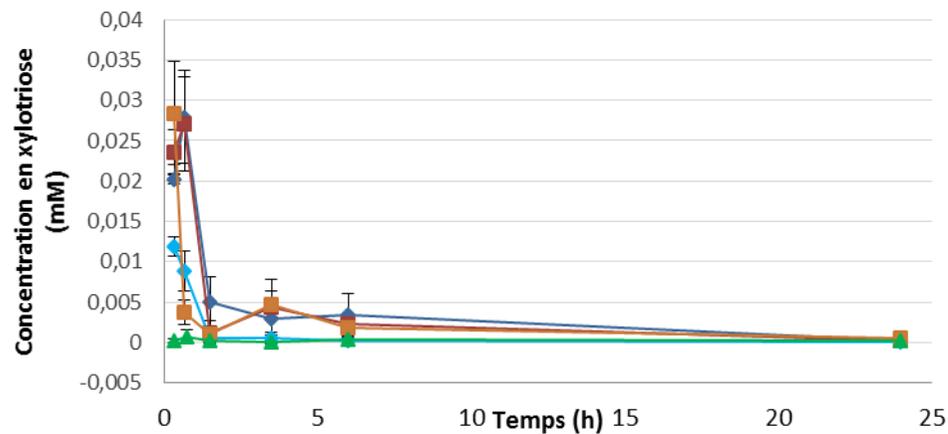
A)



B)



C)



D)

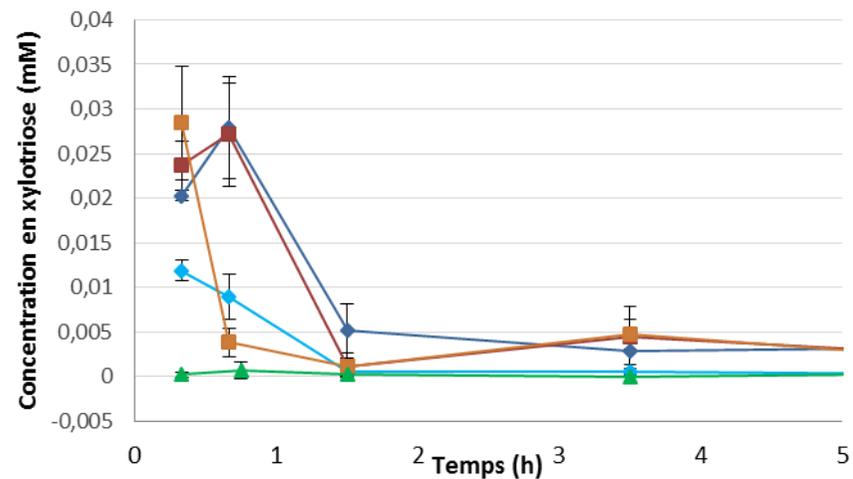


Figure 57 : Variation des concentrations en xylooligosaccharides au cours de l'hydrolyse de la paille de blé par différentes formes de *NpXyn11A*. Quantification de A) xylose ; B) xylobiose ; C) xylotriose ; D) zoom de la figure 57 entre 0 et 5 heures de réaction. En carré rouge : *NpXyn11A* ; en losange bleu foncé : *InNpXyn11A* ; en carré orange : *InNpXyn11A* + *CBM3a* ; en losange bleu clair : *InNpXyn11A*-*JoCBM3a* ; en triangle vert clair : *InNpXyn11A*-*Jo*. Expériences réalisées en triplicat.

été employés et les temps d'hydrolyse et donc d'observation étaient beaucoup faibles (20 minutes).

A partir du son et de la paille de blé, l'enzyme sauvage produit en 30 minutes d'incubation plus de xylooligosaccharides. Par exemple, à partir du son de blé 5,5 mM de xylobiose sont produits en 24 heures et à partir de la paille de blé 1,8 mM de xylose ont été quantifiés après 24 heures de réaction (Figure 56C et Figure 57A). D'après la quantification des xylooligosaccharides, *InNpXyn11A* a la même activité que l'enzyme sauvage sur paille de blé mais son activité est plus faible sur le son de blé, toujours comparé à l'enzyme sauvage avec 0,5 mM de xylotriose relargués à 1h30 (Figure 56C). Sur les deux substrats l'ajout de CBM3a à *InNpXyn11A* (sous forme libre) semble gêner l'activité de la xylanase. En effet, seulement 0,21 mM de xylotriose a été quantifié après 3h30 en pour *InNpXyn11A* + CBM3a sur le son de blé alors que dans les mêmes conditions *InNpXyn11A* en produit 0,54 mM (Figure 56C). En parallèle, *InNpXyn11A* + CBM3a libère 0,86 mM de xylose à partir de la paille de blé contre 2,09 mM quand l'enzyme *InNpXyn11A* est seule après 24 heures de réaction (Figure 57A).

Les enzymes multimodulaires sont capables de produire les divers xylooligosaccharides à partir du son de blé mais leur activité n'est que faiblement détectée sur la paille de blé. Un nouveau lot d'*InNpXyn11A*-Jo a été utilisé pour refaire les expériences de dégradation à partir de la paille de blé, donnant les mêmes résultats. Sur le son de blé, *InNpXyn11A*-Jo produit 0,4 mM de xylotriose après 1h30 alors qu'*InNpXyn11A*-JoCBM3a n'en produit que 0,3 mM (Figure 56C). La paille de blé est plus lignifiée que le son de blé, avec 6 - 23 % et 3 % de lignine respectivement (Brillouet and Mercier, 1981; Kristensen et al., 2008; Motte et al., 2014).

La quantité d'extrémités réductrices en équivalent xylose observée à la fin de la réaction est largement supérieure par DNS qu'avec l'analyse HPAEC-PAD pour les deux substrats. Par exemple, sur le son de blé l'enzyme sauvage libère 17 mM d'équivalent xylose par DNS et 8,3 mM de xylooligosaccharides par HPAEC-PAD. En effet, le DNS surestime l'activité de la xylanase (McCleary and McGeough, 2015). Par exemple, la nature du xylane peut avoir un effet sur la couleur obtenue en présence du DNS. Par ailleurs, les extrémités réductrices détectées par le DNS sont situées sur des xylooligosaccharides de DP entre 1 et 6 (détectés par HPAEC-PAD) mais également des xylooligosaccharides de DP supérieur à 6

(non quantifiés par HPAEC-PAD). La présence d'extrémités réductrices dans une chaîne de xylose sans libération d'un xylooligosaccharide pourrait également être envisagée ainsi que la libération de xylooligosaccharides substitués par un arabinose. Ces deux espèces ne seraient pas quantifiées par HPAEC-PAD. Il serait intéressant d'analyser les polymères de DP supérieur à 6 par spectrométrie de masse pour confirmer cette hypothèse, en collaboration avec des équipes compétentes pour ce type d'expérience.

b) Comparaison d'In avec un CBM de type B

L'enzyme sauvage est plus active qu'In*NpXyn11A* (Figure 55, Figure 56 et Figure 57) malgré la vérification des paramètres cinétiques sur le xylane de blé dans le chapitre précédent (Chapitre 3. 2. II. b). En regardant plus en détails la structure cristallographique d'In, cette dernière présente plusieurs similarités avec des CBMs de type B. Ces similarités sont la topologie présentant un canyon et la nature des résidus pouvant interagir avec le xylane. Comme décrit dans le chapitre 1 (Chapitre 1. 9. II. a), les CBMs de type B présentent un canyon pouvant accommoder les chaînes principales de polymère de sucres. Ce canyon est également décoré de résidus interagissant soit avec le cycle des sucres (Trp ou Tyr), soit avec des groupements hydroxyles de ces sucres (Asp, Val, Glu). Dans le cas du CBM2b1 de *C. fimi*, les résidus impliqués dans la reconnaissance du xylane sont le Glu257, le Trp259, l'Asp261, l'Arg262, l'Asn264, la Gln288, le Trp291, l'Asn292 et la Thr316 (Simpson et al., 1999). Dans le cas du CBM6-1 d'une xylanase putative de *Clostridium stercorarium*, la protéine a été co-cristallisée en présence de xylo-tetraose (Van Bueren and Boraston, 2004). Ce CBM fait 15,2 kDa, une taille comparable à celle d'In (16 kDa). Il présente également un canyon dont la largeur est de 8,3 Å et la longueur de 33 Å (valeurs déterminées en utilisant le logiciel de visualisation de structure cristallographique Pymol, DeLano Scientific LCC, v0.99). Les résidus impliqués dans la reconnaissance du xylooligosaccharide sont entre autres la Gly41, la Tyr42, l'Ile52, la Tyr51, l'Asn108, le Glu79, la Val134 et le Trp107 (Figure 58A). In présente également un canyon linéaire le long de la protéine. Ce canyon fait 7,8 Å de large et 35 Å de long (Figure 58B). Il n'y a pas de résidus tryptophane dans cette protéine mais un certain nombre de résidus décore l'intérieur de ce canyon comme l'Ile593, l'Ile598, l'Asp600, l'Ile661, la Val663, la Val674, la Tyr678, la Val680, la Thr694, l'Asn695, la Thr698, la Phe713 ou bien l'Ile718. Ces résidus et la topologie du canyon pourraient former des interactions avec le xylane (ou potentiellement un autre ligand) et diminuer l'activité

spécifique du domaine catalytique auquel il est fusionné. Cependant, la structure d'In sur laquelle se base cette hypothèse provient de la structure cristallographique du complexe JoIn et non du domaine In seul. Il est alors possible que cette conformation ne soit pas entièrement conservée en solution.

Pour confirmer cette hypothèse, il serait judicieux de quantifier l'interaction entre In et divers ligands selon une des méthodes présentées précédemment (Chapitre 2. 5. D). Les diverses études sur les CBMs de type B ont montré que ces CBMs avaient divers ligands tels que la cellulose amorphe ou les xylanes (Black et al., 1995; Tomme et al., 1996).

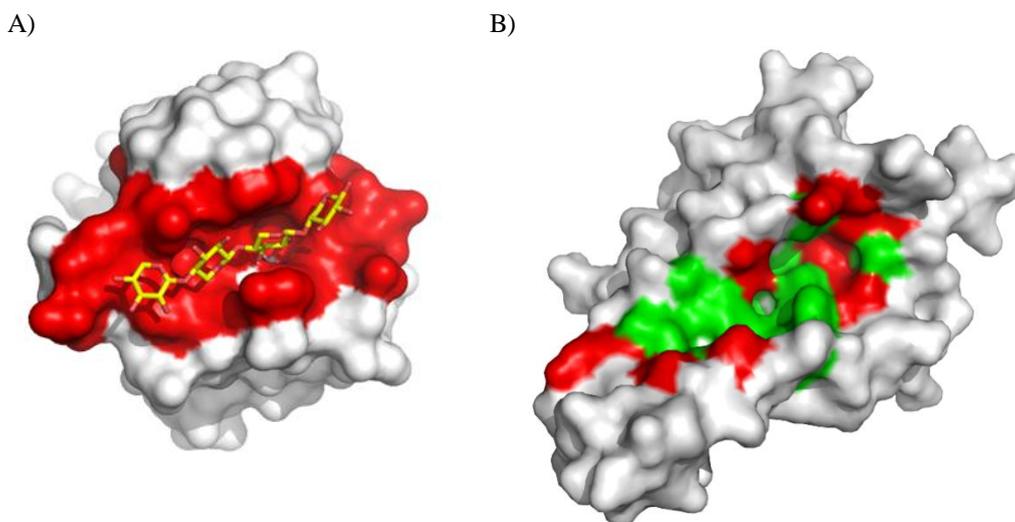


Figure 58 : Représentation de la structure cristallographique de CsCBM6-1 et d'In.

A) Représentation du canyon de CsCBM6-1 en présence de xylo-tétraose (code PDB 1UY4 (Van Bueren and Boraston, 2004)). B) Représentation de la face interne en contact avec Jo (code PDB 5MKC, (Bonnet et al., 2017)). En rouge : les résidus du canyon ; en vert : les résidus d'In potentiellement impliqués dans la reconnaissance du sucre.

c) Présence du CBM3a sous forme libre

InNpXyn11A + CBM3a peut être comparé à l'enzyme seule qui est plus active (Figure 55, Figure 56 et Figure 57). Dans le cas de la dégradation des substrats par InNpXyn11A + CBM3a, la présence du CBM3a semble gêner l'activité de la xylanase car les produits relargués sont moins importants. Dans la structure de la paroi végétale (Chapitre 1. 2. VI) les xylanes et la cellulose sont étroitement liés (Bornscheuer et al., 2014; Shallom-Shezifi and Shoham, 2003). Il se pourrait alors que le CBM3a associé à la cellulose encombre davantage l'accès aux xylanes pour l'enzyme expliquant cette diminution de l'activité.

d) Diffusion et structure des enzymes multimodulaires

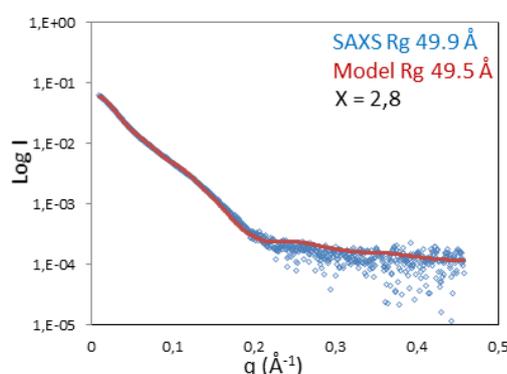
La faible activité des enzymes multimodulaires sur les substrats insolubles comparée aux enzymes libres *NpXyn11A* et *InNpXyn11A* pourrait s'expliquer par une diminution de la vitesse de diffusion de l'enzyme lorsque sa taille augmente. En effet, les tailles des enzymes sont de 26 kDa pour l'enzyme sauvage, 42 kDa pour *InNpXyn11A*, 51 kDa pour *InNpXyn11A-Jo* et 70 kDa pour *InNpXyn11A-JoCBM3a*. L'enzyme multimodulaire *InNpXyn11A-Jo* est moins active que l'enzyme sauvage ou *InNpXyn11A* sur les deux substrats (Figure 55, Figure 56 et Figure 57). La formation de *JoIn* pourrait gêner l'accès au site catalytique ou le mouvement du pouce de la xylanase. Or le pouce a un rôle central dans l'activité catalytique de l'enzyme (Torrönen et al., 1994). La mobilité de ce pouce a également été mise en lumière, confirmant que son mouvement d'ouverture et de fermeture modifiait la topologie du site actif et donc son activité (Muilu et al., 1998). Les rôles de ce pouce seraient de tenir le substrat dans le site catalytique et de participer à l'expulsion du produit (Paës et al., 2007).

Dans le cas de la protéine *InNpXyn11A-JoCBM3a*, le *CBM3a* pourrait se coller sur la cellulose présente dans le son ou la paille de blé et ainsi limiter la diffusion de l'enzyme et par conséquent son activité. Il a été montré que certains CBMs ou certaines enzymes contenant un domaine catalytique et un CBM reconnaissant la cellulose pouvaient se déplacer le long de la cellulose mais cela n'a pas été réalisé pour le *CBM3a* (Igarashi et al., 2011; Jervis et al., 1997; Liu et al., 2009).

Une autre hypothèse pourrait expliquer la faible activité d'*InNpXyn11A-JoCBM3a* sur le son et la paille de blé. La fusion du *CBM3a* avec *Jo* pourrait écarter *Jo* du site catalytique. Lors d'un projet parallèle à cette thèse, la résolution de l'enveloppe SAXS de la protéine *InNpXyn11A-JoCBM3a* a été obtenue sur une ligne du synchrotron SOLEIL (données non publiées). Une modélisation d'*InNpXyn11A-JoCBM3a* à l'aide de données SAXS et d'approches computationnelles a été réalisée par les Drs. Gianluca Cioci et Jérémy Esque à partir des structures cristallographiques du complexe *JoIn* (code PDB 5MKC), de *NpXyn11A* (code PDB 2C1F) et de *CBM3a* (code PDB 4B9F) (Chapitre 2. 9). Cette enveloppe est une moyenne des conformations possibles de l'enzyme en solution. Elle présente une forme allongée dans laquelle il a été possible d'inclure les différents modules composant cette enzyme : le domaine catalytique, les domaines *Jo* et *In* associés et le domaine *CBM*. Cette conformation a été validée par l'utilisation de plusieurs modèles de la structure de l'enzyme

multimodulaire en s'appuyant sur les données SAXS expérimentales. La courbe SAXS du logarithme de l'intensité (I) en fonction du vecteur de diffusion (q) a été comparée à la courbe de chacun des modèles. Le modèle présentant le plus petit facteur X (différence non significative entre le modèle proposé et la courbe SAXS) a alors été choisi (Figure 59A). Ceci est appuyé par les valeurs du paramètre R_g qui sont proches et dont la valeur est égale à 49,9 Å pour la courbe SAXS et à 49,5 Å pour le modèle choisi. D'après l'alignement entre le modèle d'*InNpXyn11A-JoCBM3a* et l'enveloppe SAXS, il semblerait que la présence d'*In-JoCBM3a* ne gêne pas l'accès au site catalytique de l'enzyme (Figure 59B). Malheureusement en l'absence des données SAXS d'*InNpXyn11A-Jo* le même travail n'a pas pu être réalisé sur cette enzyme.

A)



B)

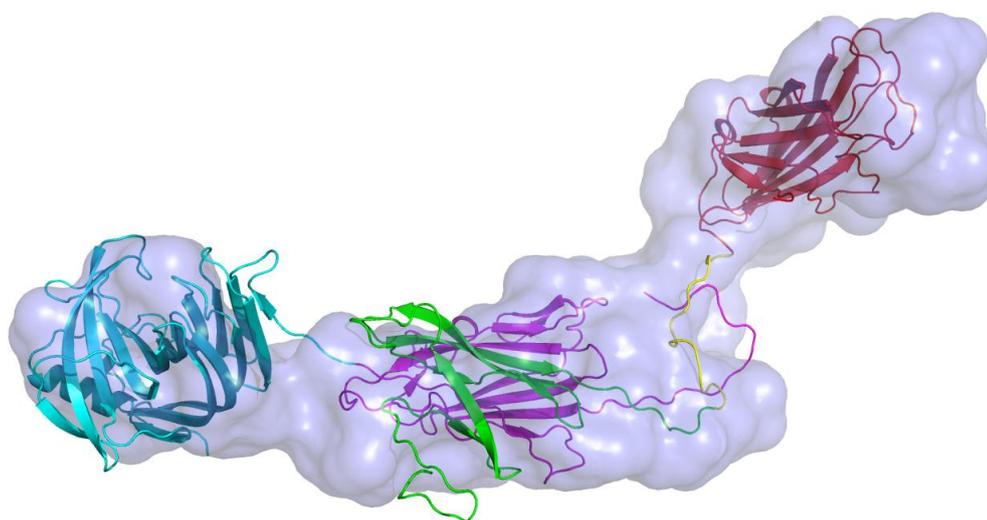


Figure 59 : Modélisation de la structure tridimensionnelle d'*InNpXyn11A-JoCBM3a*

A) Comparaison des courbes obtenues pour les données SAXS (bleu) et pour le modèle choisi de la structure tridimensionnelle (rouge). B) Comparaison entre le modèle de la structure tridimensionnelle d'*InNpXyn11A-JoCBM3a* et son enveloppe SAXS. Éléments structuraux en violet : In ; éléments structuraux en bleu foncé : linker ; éléments structuraux en cyan : *NpXyn11A* ; éléments structuraux en rouge : *CBM3a* ; éléments structuraux en vert : *Jo* ; éléments structuraux en orange : tag histidine ou résidus entre In et *NpXyn11A*. Les structures sont en cartoon.

La production d'une plus grande quantité de produits à partir de son de blé comparé à celle depuis la paille de blé (Figure 55, Figure 56 et Figure 57) pourrait provenir de la quantité plus importante d'hémicelluloses d'un facteur 1,8 dans le son de blé (Bouraoui et al., 2016; Song et al., 2014). De plus, les xylandes présents dans le son de blé seraient plus disponibles en raison d'une plus faible quantité de lignines dans ce substrat, facilitant l'activité des enzymes. L'environnement des xylandes influencerait alors la capacité de chaque enzyme à hydrolyser son substrat. Ainsi, sur le son de blé l'enzyme InNpXyn11A-Jo est plus active qu'InNpXyn11A-JoCBM3a.

L'utilisation de ces enzymes pour hydrolyser un substrat insoluble naturel comme le son ou la paille de blé donne des résultats très différents de leur étude sur des substrats artificiels ou purifiés. Le CBM3a a été choisi pour favoriser la dégradation des xylandes par le module catalytique dans InNpXyn11A-JoCBM3a lorsque ceux-ci sont liés à la cellulose. Or la diffusion dans le substrat est limitée par le réseau formé des divers polymères. Ceci a en effet été mis en évidence lors de l'étude d'une xylanase mutée (XYL11 de *Thermobacillus xylanilyticus*) sans activité catalytique et dont la progression dans le réseau du grain de blé est moins rapide que celle de l'enzyme sauvage (Beaugrand et al., 2005). Une étude physique des différents substrats serait alors nécessaire pour mieux comprendre ces substrats.

La nature du CBM associé à la xylanase pourrait également avoir un rôle dans la capacité du module catalytique à hydrolyser le xylane. Il serait intéressant de comparer ces données à l'association de la xylanase à d'autres CBMs, spécifiques des xylandes par exemple. Il a été envisagé d'associer la xylanase avec le CBM2b1 de *C. fimi*, spécifique du xylane, afin de diriger peut-être plus facilement le module catalytique vers les xylandes. Pour cela, les protéines JoNpXyn11A et InCBM2b1 ont été produites et validées (Chapitre 3. 2. II) mais n'ont pas pu être associées par manque de temps. Ces résultats peuvent également provenir de l'orientation du CBM qui pourrait influencer la liaison au ligand ou l'activité enzymatique du module catalytique associé à ce CBM (Walker et al., 2015).

D'autres solutions existent telle que l'association du module catalytique et du CBM3a de manière plus classique, avec un linker. L'absence de linker peut également être envisagée mais les deux modules pourraient perdre leur activité respective. Il a aussi été montré que la longueur du linker, sa composition et sa conformation peuvent avoir un impact sur l'activité enzymatique (Sammond et al., 2012; von Ossowski et al., 2005). Il serait également possible de travailler avec un linker positionné en C-terminal du CBM.

Comme observé dans cette partie, l'hydrolyse de la paille de blé broyée est possible mais lente, ce substrat sera utilisé dans le chapitre suivant pour observer précisément sur des coupes de paille de blé comment l'enzyme agit. En effet, le contexte d'accessibilité dans le cas de substrats broyés serait différent car l'ensemble des polymères seront disponibles sur la surface de la coupe.

3. Conclusion

L'étude des différentes constructions de la xylanase (*NpXyn11A*, *InNpXyn11A*, *InNpXyn11A-Jo* et *InNpXyn11A-JoCBM3a*) montre des conclusions variables selon le substrat d'étude. La première étape a été de produire les différentes protéines, de les associer et de les purifier pour pouvoir hydrolyser les différents substrats avec les enzymes multimodulaires.

Nous cherchions ici à savoir si la complexité du substrat avait un impact sur l'activité catalytique. Les enzymes *NpXyn11A* et *InNpXyn11A* ont des activités similaires sur *pNP-X₃*. Sur xylane de hêtre, l'enzyme sauvage est plus active avec 7 mM de xylobiose produit après 4 heures de réaction contre 5 mM pour *InNpXyn11A*. Ceci est également observé sur les substrats insolubles. *In* semble donc avoir un impact sur l'activité. Par exemple, sur le son de blé, l'enzyme sauvage produit 0,8 mM de xylotriose après 1h30 alors qu'*InNpXyn11A* n'en produit que 0,5 mM. Une des hypothèses proposées est la présence d'interactions entre *In* et le xylane, comparable aux interactions des CBMs de type B avec le xylane mais une étude de la structure d'*InNpXyn11A* et de son affinité avec le xylane ou d'autres ligands permettrait de confirmer ces données.

Les enzymes multimodulaires sont moins actives que les enzymes libres sur les substrats solubles et cela est accentué lors de leur étude sur le son et la paille de blé. Par exemple, sur la paille de blé leur activité n'est pas quantifiable. Ces enzymes diffuseraient plus lentement à cause de leur taille, *InNpXyn11A-JoCBM3a* ayant une masse molaire de 2,7 fois plus importante que l'enzyme sauvage. La formation de *JoIn* dans l'enzyme *InNpXyn11A-Jo* pourrait également réduire la mobilité du pouce du module catalytique et par conséquent diminuer son activité. En présence du *CBM3a* (dans *InNpXyn11A-JoCBM3a*) *Jo* serait écarté du site catalytique. La complexité du substrat et la modularité de l'enzyme ont donc un impact significatif sur l'activité enzymatique.

Pour compléter ces données, la paille de blé sera utilisée directement sous forme de coupes de paille de blé (qui se rapprochent davantage de l'état naturel de la paille) dans le chapitre suivant. En effet, le contexte dans lequel se trouve la cible de l'enzyme (substrat broyé ou entier, sous forme de coupes) pourrait avoir une influence sur l'activité catalytique.

Chapitre 5

Etude de l'activité de *NpXyn11A* sur des coupes
d'entre-nœud de paille de blé

Chapitre 5 : Etude de l'activité de *NpXyn11A* sur des coupes d'entre-nœud de paille de blé

1. Introduction

Dans le chapitre précédent, l'activité de *NpXyn11A* a été étudiée selon la complexité du substrat contenant les xylanes. L'enzyme *InNpXyn11A* a une activité similaire à celle de l'enzyme sauvage sur le substrat chromogénique mais son activité est plus faible sur les substrats insolubles. Les enzymes multimodulaires produisent moins de xylooligosaccharides que *NpXyn11A* ou *InNpXyn11A* sur les substrats solubles et également sur les substrats insolubles. Comme cela a été décrit dans le chapitre 1. 1. I. a), la composition de la paroi végétale en polysaccharides peut varier d'un groupe de cellules à un autre au sein d'un même échantillon. C'est cette variation du ratio entre cellulose, hémicelluloses et lignines que nous explorons ici, en étudiant la géolocalisation de l'activité de la xylanase *NpXyn11A* sous sa forme libre ou multimodulaire sur des coupes sériées de paille de blé. Il s'agit d'un substrat complexe, le plus proche possible du substrat naturel et n'ayant subi aucun prétraitement pouvant influencer la structure ou la composition des parois végétales. Pour cela, des entre-nœuds de paille de blé uniquement rincés dans une solution de métrasulfate de sodium puis dans de l'eau déionisée (Bertrand et al., 2006) ont été utilisés. La préparation de nos échantillons ne prend pas en compte l'altération naturelle du substrat due aux conditions météorologiques ou à l'action des insectes. Nous avons choisi les entre-nœuds car ils représentent 57 % en masse de la paille de blé (Motte et al., 2014).

Pour rappel, la Figure 60 présente les différents éléments anatomiques d'un entre-nœud de paille de blé. Les régions d'intérêt pour la suite de cette étude sont le parenchyme, le sclérenchyme, l'épiderme et les faisceaux vasculaires. Comme expliqué dans le chapitre 1. 12, deux types de sondes peuvent être utilisées en immunocytochimie : un anticorps monoclonal ou un CBM. Le choix de la sonde permettra de marquer spécifiquement un polymère par immunocytochimie (xylanes ou cellulose) (Tableau 47). Ainsi, sur la Figure 61A l'immunofluorescence verte (nommée fluorescence par la suite) provenant de la molécule FITC couplée à l'anticorps secondaire permet la détection des xylanes ou de la cellulose. L'utilisation du filtre DAPI permet d'observer la lignine en bleu grâce à l'autofluorescence des composés phénoliques qui la compose et permet de vérifier que la perte de signal de la

fluorescence FITC ne correspond pas à une perte de matière (Figure 61B). Lorsque les deux canaux ou filtres sont superposés, l'image obtenue est alors nommée « fusion » (Figure 61C).

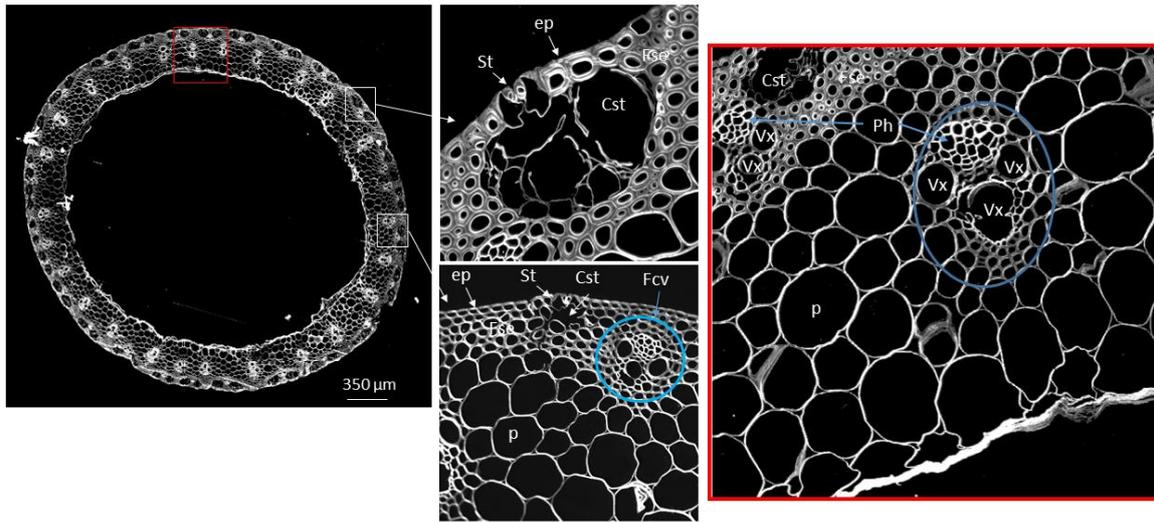


Figure 60 : Détails anatomiques d'une section transversale d'entre-nœud de paille de blé. Cst : chambre sous-stomatique ; ep : épiderme composé d'une assise cellulaire ; Fcv ou cercle bleu : faisceau cribro vasculaire ; Fse : fibres de sclérenchyme sous épidermique ; P : cellules de parenchyme ; Ph : îlot de cellules du phloème ; St : stomate ; Vx : vaisseau xylémien. Réalisation des images et de la légende par le Dr. Alain Jauneau, plateforme d'Imagerie cellulaire.

Tableau 47 : Bilan des spécificités de chaque filtre de fluorescence.
Ac : anticorps ; DAPI : di aminido phényle indol ; FITC : isothiocyanate de fluorescéine.

filtre	couleur	longueur d'onde (nm)		marquage		épitope
		excitation	émission			
DAPI	bleu	381 - 393	420 - 460	autofluorescence		lignine
FITC	vert	473 - 491	510 - 540	CBM3a	Ac anti-tag histidine	cellulose
				X	LM11	xylanes
				Ac secondaire couplé au FITC		Ac primaire

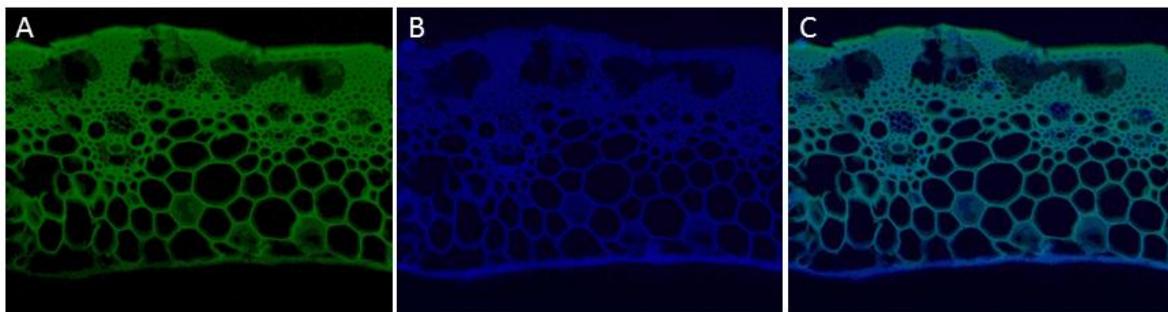


Figure 61 : Détails d'une image observée à partir d'une coupe non traitée d'entre-nœud de paille de blé. A) filtre FITC. B) filtre DAPI. C) fusion.

Classiquement, les études de digestion enzymatique et d'immunocytochimie sont conduites sur des coupes de cellules végétales fixées dans une résine acrylique avant découpe (McCartney et al., 2000; Orfila and Knox, 2000). La très grande majorité de ces travaux provient de l'équipe de J. Paul Knox ou d'une collaboration avec cette équipe. Cependant, d'autres groupes travaillent également dans ce contexte (Ding et al., 2012; Hansen et al., 2013; Thygesen et al., 2011). Des analyses en microscopie de force atomique menées par le Dr. Cédric Montanier sur des coupes de pailles de blé préparées dans une résine acrylique ont montré que cette résine pénètre profondément au cœur des parois végétales (données non publiées). Cette observation pose la question de l'accessibilité des enzymes, des anticorps et des CBMs sur la totalité de l'échantillon traité. Il est ainsi possible que seule la surface des coupes ne soit exposée aux protéines. Cette fixation irréversible entraîne donc une limitation des zones d'action des enzymes. Dans cette thèse, nous avons choisi de travailler avec de la paraffine et en absence de formaldéhyde (agent de réticulation classiquement utilisé dans la préparation de tissus végétaux) pour limiter au maximum une modification des tissus lors de la préparation des coupes. Cette approche réversible permet de retirer la cire avant toute expérimentation. Ceci permet de potentiellement rendre accessible toute l'épaisseur des coupes. Toutefois, cette méthodologie ne rigidifie pas suffisamment les échantillons et nous a contraints à réaliser des coupes épaisses (10 à 16 μm contre 1 μm d'épaisseur en résine acrylique), entraînant une perte de la résolution des images microscopiques. Le deuxième avantage de l'inclusion du substrat avec de la paraffine est de pouvoir travailler à un plus haut débit.

A notre connaissance, aucune autre équipe n'a mené d'études d'immunocytochimie sur des coupes de paille de blé réalisées à partir d'entre-nœuds inclus dans de la paraffine. Les images peuvent être analysées selon différentes méthodes, deux d'entre-elles seront comparées ici (Figure 62). Lors d'études de substrats inclus en résine, l'effet d'un prétraitement sur l'activité d'une enzyme ou la comparaison d'enzymes multimodulaires sont étudiés (Chapitre 1. 12. IV). Nous analyserons dans ce chapitre, l'effet de la concentration en *NpXyn11A*, de l'ajout d'un cocktail enzymatique ciblant la cellulose ou de la modularité de *NpXyn11A* sur la détection des xylanases dans le cas d'un substrat inclus en paraffine (Figure 62).

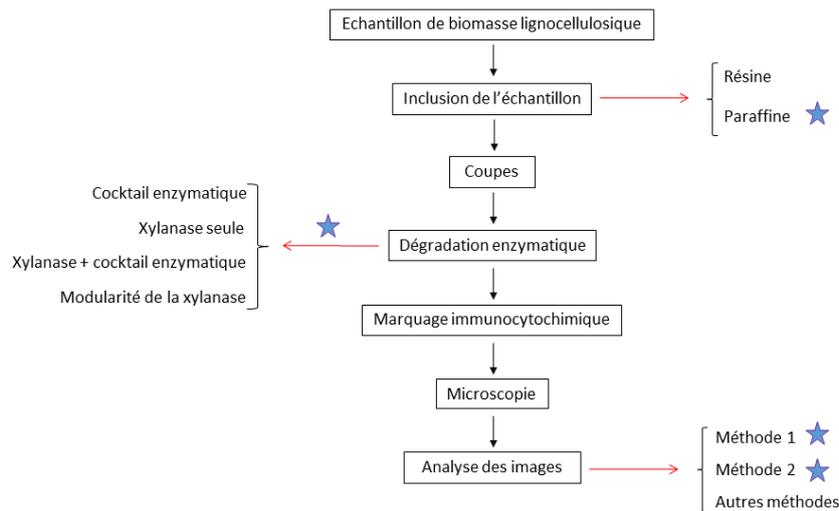


Figure 62 : Description des étapes suivies lors de l'analyse d'échantillons d'entre-nœud de paille de blé. Un échantillon de biomasse lignocellulosique est inclus, coupé puis dégradé par une ou plusieurs enzymes. Les images sont obtenues après un marquage immunocytochimique suivi de l'étape de microscopie. Chaque étoile correspond aux questions soulevées dans ce chapitre.

2. Résultats

1. Influence de l'analyse des images dans le traitement des données

Le traitement des images et leur analyse sont primordiaux pour éviter toute surinterprétation des résultats. De plus, l'utilisation de sondes fluorescentes dans un environnement présentant un niveau de fluorescence intrinsèque important comme la paroi végétale est délicate. Afin de quantifier au plus juste les niveaux de fluorescence émis par nos anticorps secondaires fluorescents, une première série d'expériences a consisté à utiliser le cocktail enzymatique commercial Cellic[®] Ctec2 (Novozymes) sur des entre-nœuds de paille de blé. D'après le fabricant, ce cocktail cible la cellulose mais sa composition précise n'est pas connue. Il contient des néanmoins des cellulases particulièrement efficaces, de nombreuses β -glucosidases et une hémicellulase (Novozymes, n.d.). Le suivi de la dégradation de la cellulose dans la paille de blé a été réalisé en utilisant le CBM3a de *C. thermocellum* comme sonde (Chapitre 2. 7). Ce CBM largement utilisé en immunocytochimie (Blake et al., 2006; Ding et al., 2006) reconnaît la cellulose amorphe, la cellulose cristalline et les xyloglucanes. L'affinité pour la cellulose cristalline est entre 50 et 100 fois plus importante que celle pour les xyloglucanes (Hernandez-Gomez et al., 2015; Poole et al., 1992). Ce CBM est exprimé en fusion avec un tag histidine détecté par un anticorps primaire, lui-même révélé par un anticorps secondaire couplé au FITC. La fluorescence résiduelle a

alors été quantifiée (Chapitre 2. 8). L'ensemble des expériences d'immunocytochimie ont été réalisées en collaboration avec le Pr. Vincent Burlat (LRSV, Université Paul Sabatier, Auzeville-Tolosane).

En réalité, pour chaque traitement enzymatique, trois types de conditions ont été réalisées. La première lame a été traitée avec l'enzyme puis marquée (Figure 63A). La deuxième lame n'a pas été traitée avec l'enzyme mais a été marquée (Figure 63B). La troisième lame n'a pas été traitée avec l'enzyme mais a été marquée, à l'exception de l'étape avec l'anticorps primaire (Figure 63C).

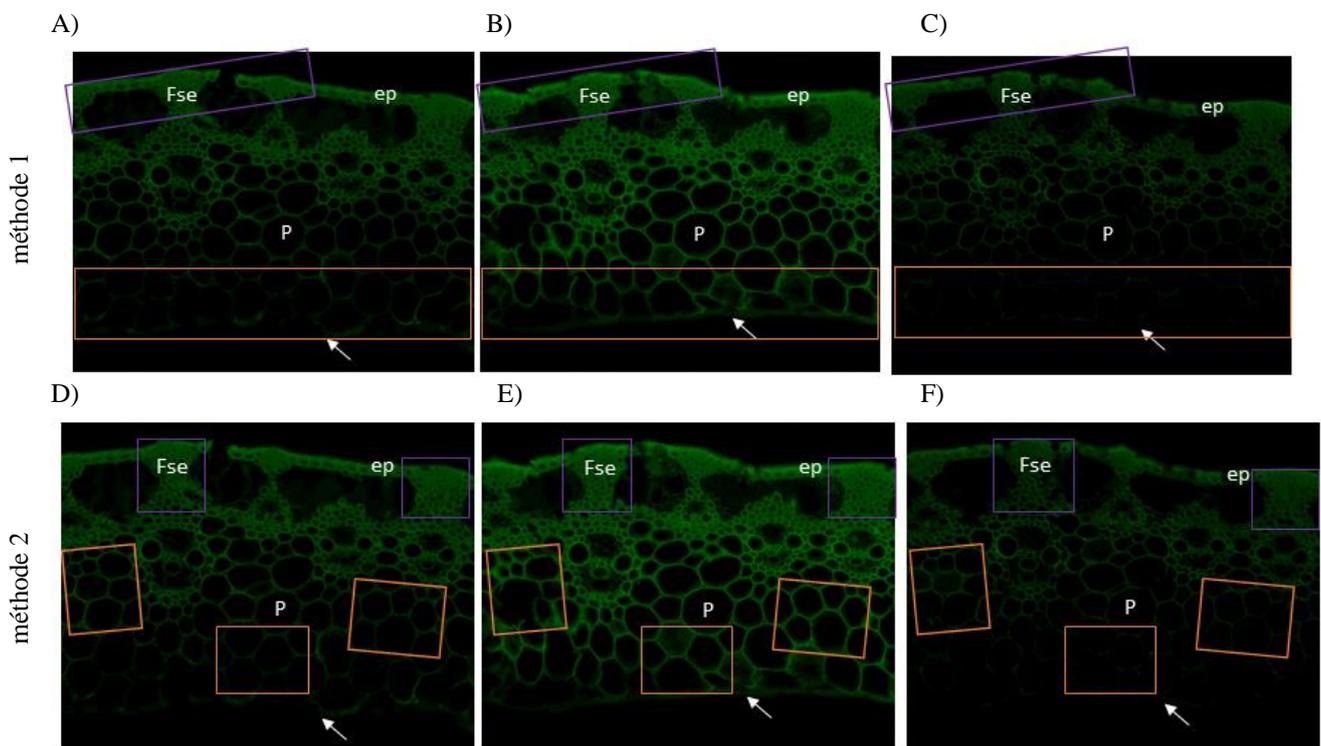


Figure 63 : Exemple de zones analysées.

A et D : traitement enzymatique suivi d'un marquage. B et E : marquage seul. C et F : marquage sans anticorps primaire. ep : épiderme composé d'une assise cellulaire ; Fse : fibres de sclérenchyme sous épidermique ; P : cellules de parenchyme ; flèche : matrice interne. Rectangle orange : parenchyme (n = 1 pour la méthode 1 et n = 3 pour la méthode 2) ; rectangle violet : sclérenchyme (le nombre de zones, n = 1 pour la méthode 1 et n = 2 pour la méthode 2).

La fluorescence de ces coupes peut être comparée car il s'agit de coupes sériées. La fluorescence a été quantifiée dans deux régions, le parenchyme et la matrice interne ainsi que le sclérenchyme et l'épiderme, dénominations simplifiées par la suite en utilisant les termes parenchyme ou sclérenchyme (sauf quand cela sera précisé). La fluorescence du phloème ou du xylème aurait été plus compliquée à quantifier car la résolution des images à l'aide du logiciel NDP. view 2 ne permet pas d'agrandir suffisamment ces images pour observer

uniquement ces zones. Deux méthodes de quantification ont été mises en œuvre à partir des mêmes images. Les différences entre ces méthodes sont le nombre de zones quantifiées (Figure 63), la surface de ces zones et la méthode de calcul appliquée (Figure 64).

Dans les deux méthodes, la fluorescence résiduelle est ramenée à un pourcentage par rapport à celle du contrôle mais dans la méthode 2, la valeur de la fluorescence du bruit de fond est soustraite avant que les valeurs ne soient ramenées à un pourcentage.

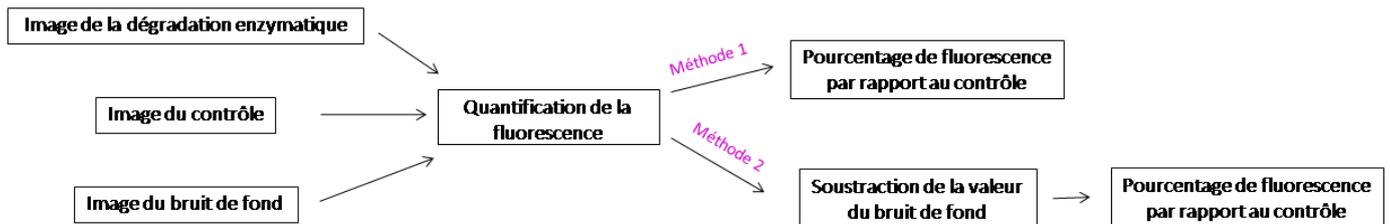


Figure 64 : Description des méthodes d'analyse.

Après acquisition des trois images (dégradation enzymatique, contrôle et bruit de fond) la fluorescence a été quantifiée sur chacune d'entre-elles. Dans la méthode 1, le pourcentage de fluorescence a été calculé. Pour la méthode 2, la valeur de la fluorescence du bruit de fond a été soustraite aux valeurs de la fluorescence des autres images (dégradation enzymatique et contrôle) avant de calculer le pourcentage de fluorescence par rapport au contrôle).

La cellulose présente dans le sclérenchyme et les cellules du parenchyme a été partiellement digérée, probablement par les cellulases et β -glucosidases présentes dans le cocktail Cellic[®] Ctec2 (Figure 65A et Figure 65B). Les images du contrôle et du bruit de fond (Figure 65B et Figure 65C) permettent de confirmer la spécificité de l'anticorps secondaire pour l'anticorps primaire et valident la méthodologie mise en œuvre. Le bruit de fond a été obtenu en utilisant seulement l'anticorps secondaire lors du marquage. Il aurait été plus judicieux d'utiliser l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire. En effet, dans ce cas la seule différence entre le contrôle (marquage avec le CBM3a, l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire) et le bruit de fond aurait été la présence ou l'absence du CBM3a.

Avec la méthode 1, la fluorescence résiduelle du sclérenchyme est égale à 3,6 % alors qu'en utilisant la méthode 2, elle est de 30,8 % (Figure 66, Tableau 48). Dans la méthode 2, la fluorescence résiduelle du bruit de fond est toujours égale à 0, elle n'a donc pas été présentée dans les graphes. Concernant le parenchyme les résultats sont de 70,3 % et 4,9 % pour les méthodes 1 et 2 respectivement. Avec la méthode 2, il semblerait que la dégradation soit plus importante dans le parenchyme alors qu'avec la méthode 1 la région la plus dégradée était le sclérenchyme. Cette comparaison montre que la méthodologie d'analyse peut donner des résultats inversés à partir des mêmes images.

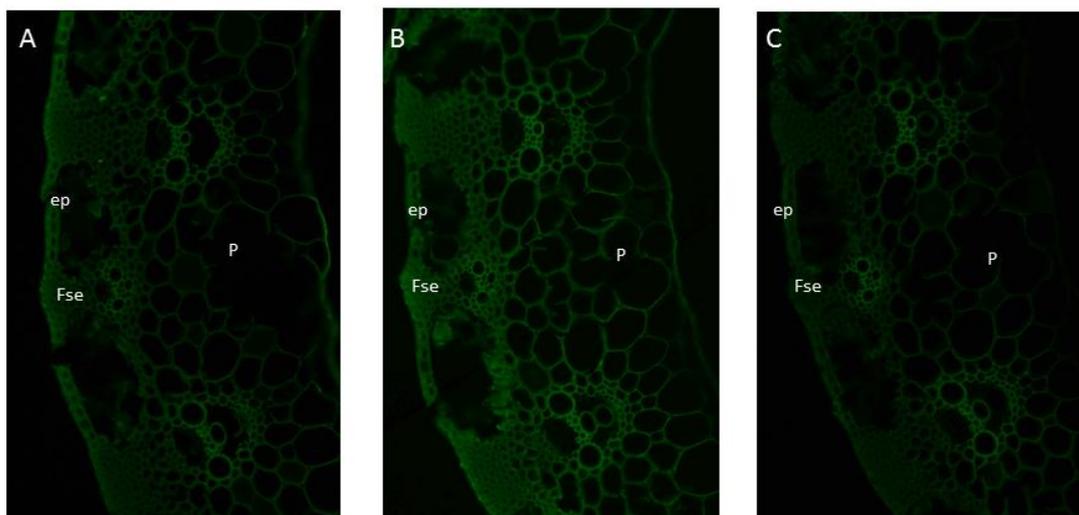


Figure 65 : Dégradation de la cellulose d'entre-nœud de paille de blé par le cocktail Cellic[®] Ctec2. A : digestion par Cellic[®] Ctec2 (Novozymes) à 2 FPU/ lame (filter paper unit) suivie du marquage (CBM3a + Ac anti-tag histidine + Ac anti souris-FITC). B : contrôle avec le marquage (CBM3a + Ac anti-tag histidine + Ac anti souris-FITC). C : bruit de fond avec seulement l'Ac anti-souris FITC pour le marquage. Contrôle et bruit de fond : tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 5 ; digestion une heure à 50 °C (Badrana et al., 2017). ep : épiderme composé d'une assise cellulaire ; Fse : fibres de sclérenchyme sous épidermique ; P : cellules de parenchyme.

Les zones quantifiées dans la méthode 1 contiennent un groupe de cellules et des zones vides, cette analyse prend donc en compte des zones vides. Dans la méthode 2, les zones quantifiées sont centrées sur un groupe de cellules et elles sont plus nombreuses afin de représenter au mieux les observations. La méthode 2 est donc plus précise et plus fiable. De plus, pour environ le même nombre de cellules du parenchyme la surface est divisée par 5 entre la méthode 1 et la méthode 2. Pour le sclérenchyme on retrouve un facteur 10. La méthode 1 surreprésente donc les zones vides. La méthode 2 a donc été choisie et appliquée à l'ensemble des expériences présentées dans cette thèse. Pour information, les écarts-types de l'ordre de 10 à 20 % sont acceptables en immunocytochimie car ils représentent la diversité morphologique et chimique du substrat qui est très hétérogène.

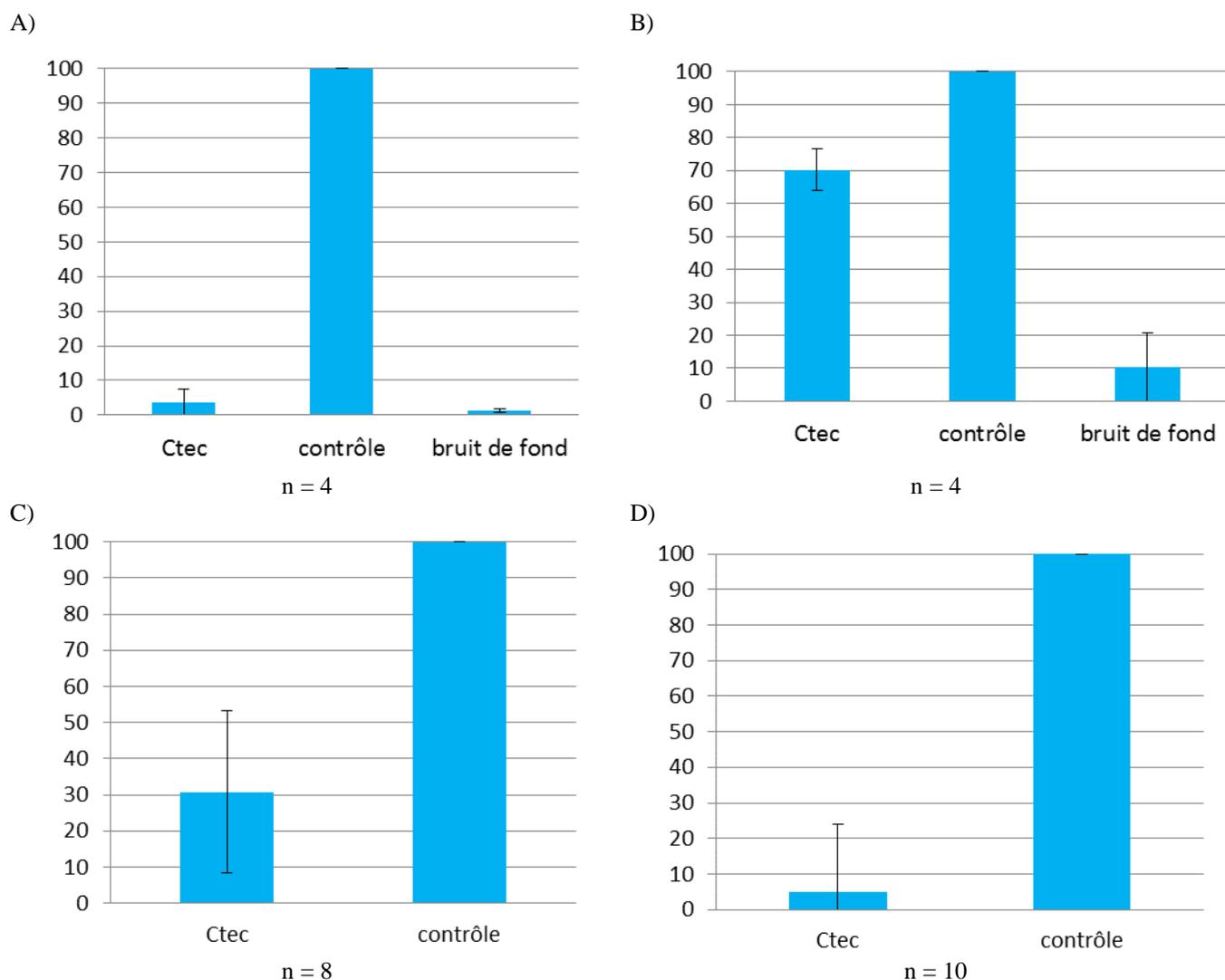


Figure 66 : Quantification de la fluorescence résiduelle de la cellulose d’entre-nœud de paille de blé après dégradation par Cellic® Ctec2.

A) Pourcentage de fluorescence résiduelle au niveau du sclérenchyme pour la méthode 1. B) Pourcentage de fluorescence résiduelle au niveau du parenchyme pour la méthode 1 (Badruna et al., 2017). C) Pourcentage de fluorescence résiduelle au niveau du sclérenchyme pour la méthode 2. D) Pourcentage de fluorescence résiduelle au niveau du parenchyme pour la méthode 2. Barres d’erreur correspondant à l’écart-type standard (Excel).

Tableau 48 : Comparaison des données quantitatives selon le traitement d’image.
n : nombre de zones quantifiées. Pour le parenchyme et le sclérenchyme la surface des zones quantifiées varie au sein d’une méthode, les surfaces moyennes sont données dans le tableau ci-dessus ainsi que le nombre de cellules correspondantes.

		méthode 1	méthode 2
sclérenchyme	fluorescence résiduelle (%)	3,6	30,8
	n	4	8
	nombre de cellules	150 - 200	70 - 100
	surface (µm ²)	70 10 ³ - 170 10 ³	20 10 ³ - 30 10 ³
parenchyme	fluorescence résiduelle (%)	70,3	4,9
	n	2	10
	nombre de cellules	20 - 30	4 - 20
	surface (µm ²)	100 10 ³ - 200 10 ³	20 10 ³ - 30 10 ³

II. Effet de la concentration en *NpXyn11A* sur la détection des xylanes

Afin de définir la concentration en xylanase permettant d'atteindre le taux de fluorescence résiduel le plus bas, les coupes d'entre-nœuds de paille de blé ont été digérées par *NpXyn11A* à différentes concentrations (Chapitres 2. 7 et 2. 8). L'anticorps LM11 a été utilisé pour marquer les xylanes peu ou pas substitués dont les arabinoxylanes, l'épitope du LM11 sera donc désigné par le terme général « xylanes ».

La présence de *NpXyn11A* entraîne une diminution significative de la fluorescence FITC par rapport au contrôle (Figure 67A à Figure 67E). De plus, il est possible d'observer des différences en fonction de la concentration en enzyme utilisée. Plus précisément, entre 0,2 et 2 g.L⁻¹, l'augmentation de la concentration en enzyme entraîne une diminution de la quantité de xylanes détectés. En effet, la fluorescence résiduelle est de 34 % et de 16 % respectivement pour le sclérenchyme (Figure 67G). Concernant le parenchyme, la fluorescence résiduelle est égale à 47 % et 22 % après dégradation par la xylanase à 0,2 et 2 g.L⁻¹ respectivement (Figure 67H). Les deux concentrations les plus élevées en enzyme qui ont été testées, soit 3 et 4 g.L⁻¹, ne permettent pas de diminuer la quantité de xylanes détectés. Ainsi, la fluorescence résiduelle pour le sclérenchyme est égale à 19 % et 36 % respectivement et pour le parenchyme à 37 % et 54 % respectivement. Il n'y a donc pas de proportionnalité entre concentration croissante en enzyme et pourcentage de fluorescence résiduelle c'est-à-dire quantité de xylanes dégradés. Ceci nous indique qu'à partir d'une certaine concentration, l'ajout supplémentaire d'enzyme ne permet pas de libérer plus de produit. Ceci est observé à partir de 2 g.L⁻¹. Il est possible qu'une trop grande quantité de molécules induise un encombrement stérique sur le substrat, inhibant l'action de l'enzyme. Il est également possible que *NpXyn11A* soit adsorbée par les polymères présents dans les parois végétales, diminuant alors le nombre d'enzymes en activité. En effet, il a été montré que les xylanases peuvent s'adsorber sur les xylanes ou sur les lignines (Zilliox and Debeire, 1998). Il est également possible que tous les xylanes accessibles soient déjà dégradés. Ceci est en accord avec l'étude de Zhang et collaborateurs qui ont montré qu'il existait une concentration seuil de la mannanase *CjMan26A* de *Cellvibrio japonicus* pour la dégradation des mannanes de *Physcomitrella patens* (une variété de mousse) (Zhang et al., 2014). Les mannanes non digérés ont été qualifiés de récalcitrants. En parallèle, dans l'étude d'Hervé et collaborateurs, malgré une augmentation de la concentration en *NpXyn11A* ou de la xylanase *CjXyl10B* de *Cellvibrio japonicus* de 10 à 100 µg.mL⁻¹, la quantité de xylanes détectés reste inchangée

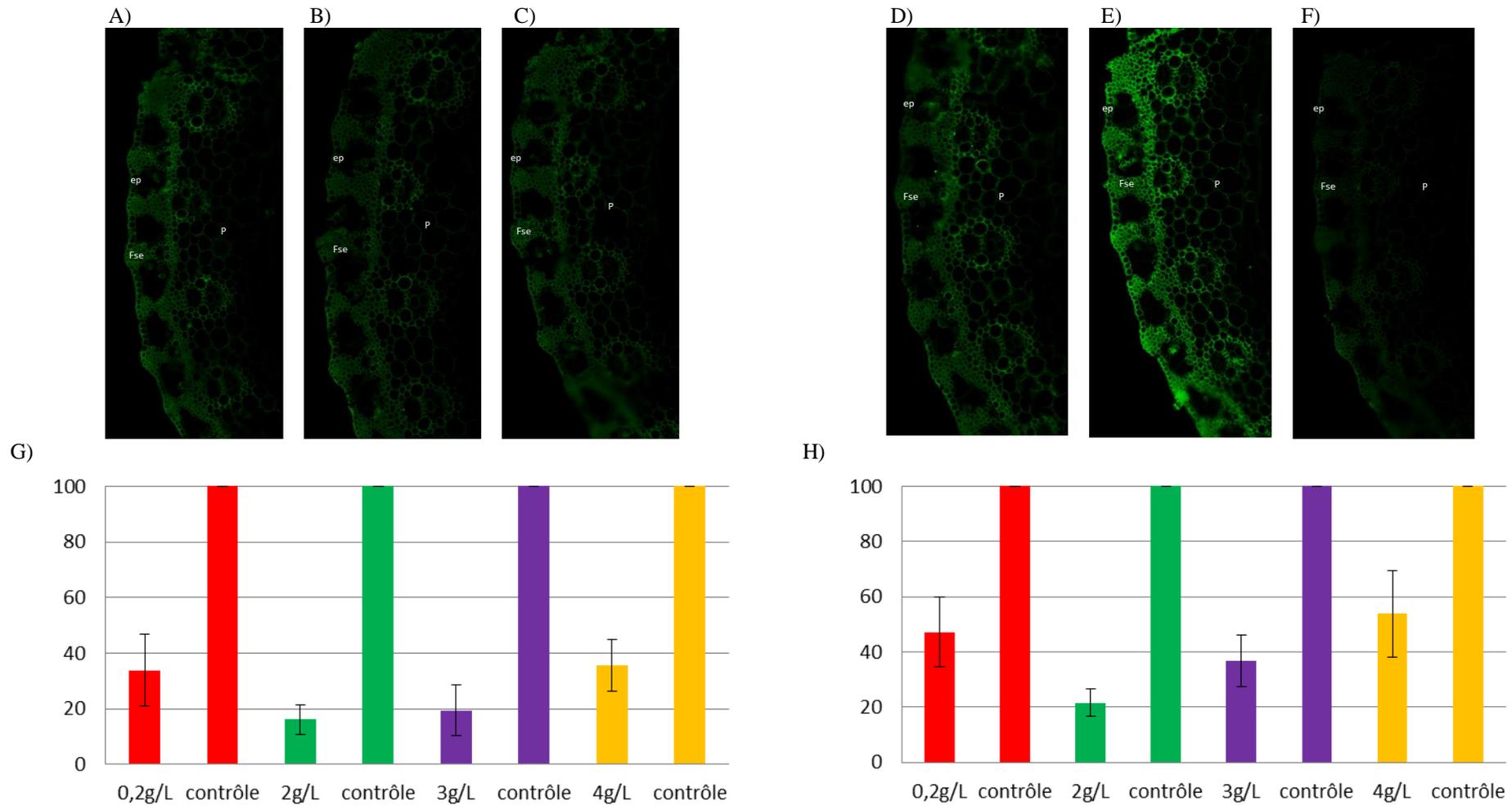


Figure 67 : Dégradation des xylanes d'entre-nœud de paille de blé par des concentrations croissantes de *NpXyn11A*. A), B), C) et D) digestion par *NpXyn11A* à 0,2, 2, 3 ou 4 g.L⁻¹ respectivement suivie du marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC). E) contrôle avec le marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC). F) bruit de fond avec seulement l'Ac anti-rat FITC pour le marquage. G) Pourcentage de fluorescence résiduelle au niveau du sclérenchyme. H) Pourcentage de fluorescence résiduelle au niveau du parenchyme. Pour le sclérenchyme n = 12 et pour le parenchyme n = 8 pour 0,2 g.L⁻¹ et n = 9 pour 2, 3 et 4 g.L⁻¹. ep : épiderme composé d'une assise cellulaire ; Fse : fibres de sclérenchyme sous épidermique ; P : cellules de parenchyme. Contrôle et bruit de fond : tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 7 ; digestion une heure à 37 °C. Barres d'erreur correspondant à l'écart-type standard (Excel).

(Hervé et al., 2009). Les xylanes toujours détectés dans notre cas seraient donc des xylanes récalcitrants à l'activité de *NpXyn11A*. Par ailleurs, le travail d'Hervé a suggéré que les anticorps comme le LM11 pouvaient détecter les xylanes exposés et ceux enfouis dans la matrice alors que seulement les xylanes accessibles pouvaient être dégradés par une xylanase. La configuration des xylanes récalcitrants pourrait ne pas être reconnue par *NpXyn11A* et/ ou la durée de dégradation serait trop courte, en accord avec plusieurs études sur de la paille de blé broyée dont la digestion a duré 24 heures (Song et al., 2012; Zhang et al., 2011a) voire 48 heures (Zhang et al., 2011b). Dans notre cas l'incubation en présence d'enzyme a duré une heure, dans l'étude de Zhang et dans celle d'Hervé elle était respectivement de 30 minutes et d'une nuit (Hervé et al., 2009; Zhang et al., 2014).

Dans la suite de notre étude, nous souhaitons mettre en œuvre l'enzyme multimodulaire *InNpXyn11A-JoCBM3a*. Afin d'être en mesure de quantifier proprement une variation de la fluorescence résiduelle, nous souhaitons que cette fluorescence soit inférieure à la fluorescence du contrôle et relativement élevée afin de pouvoir quantifier l'impact de l'ajout d'autres modules (CBM dans ce cas) qui favoriseraient la dégradation des coupes. Une concentration en *NpXyn11A* de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ répond à ces critères et c'est cette concentration qui a été utilisée pour la suite des expériences (Chapitre 5. 2. III). Dans ces conditions, le ratio de la quantité molaire d'enzyme par rapport à la quantité de substrat est plus élevé d'un facteur $6,2 \cdot 10^5$ par rapport aux expériences réalisées sur la paille de blé broyée (Chapitre 4. 2. III). En augmentant la concentration en enzyme d'un facteur 10 sur les coupes, la quantité de xylanes dégradés augmente. Le choix de la concentration en enzyme de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ reflète la complexité du substrat. En effet, il a été montré que le broyage de la paille de blé et par conséquent la diminution de la taille des particules favorisait la dégradation enzymatique (Da Silva et al., 2010; Silva et al., 2012). Sur les coupes de paille de blé, il est donc nécessaire d'utiliser une concentration largement supérieure à la concentration utilisée dans le cas de broyats, probablement à cause des effets d'adsorption mentionnés ci-dessus. Un travail complémentaire avec des concentrations en enzyme inférieures à $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ pourrait être réalisé mais pour rappel, notre objectif n'est pas d'optimiser la dégradation mais d'étudier cette dégradation.

III. Influence de la dégradation de la cellulose sur la détection des xylanes

La disponibilité des xylanes dans des coupes d'entre-nœuds de paille de blé a été étudiée lors de la dégradation par *NpXyn11A* mélangée au cocktail enzymatique Celluclast (Novozymes). Ce cocktail commercial ciblant majoritairement la cellulose contient des enzymes non caractérisées présentant des activités β -xylosidases (Sørensen et al., 2007, 2003), cellulases (Novozymes, 2009), β -glucosidases (Garcia-Aparicio et al., 2007) et xylanases (Massiot et al., 1989; Sørensen et al., 2003). Après digestion enzymatique, la présence des xylanes a été marquée par l'anticorps LM11, révélé par un anticorps secondaire couplé au FITC et la fluorescence résiduelle a été quantifiée comme décrit précédemment (Chapitres 2. 7 et 2. 8). Ces données sont comparées à la dégradation des xylanes par *NpXyn11A* seule, utilisée à $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ présenté dans la Figure 67 (Chapitre 5. 2. II).

Dans les deux conditions enzymatiques, les xylanes ont été partiellement digérés à des stades plus ou moins avancés en comparaison avec les contrôles (Figure 68A, Figure 68B, Figure 68D et Figure 68E). Dans le cas du sclérenchyme, la fluorescence résiduelle est de 48 % lors de la dégradation par Celluclast + *NpXyn11A* et de 34 % pour *NpXyn11A* seule (Figure 69A). La fluorescence résiduelle pour le parenchyme est de 39 % pour Celluclast + *NpXyn11A* contre 47 % pour la xylanase seule (Figure 69B). Bien que les écarts-types se recouvrent, il semblerait que les valeurs moyennes soient différentes signifiant que la quantité de xylanes détectée ne soit pas la même dans les deux cas. La dégradation des xylanes serait alors différente en présence ou en absence de traitement enzymatique par Celluclast. Une analyse statistique pourrait confirmer cette conclusion. La dégradation des polymères présents dans les coupes par les différentes enzymes du cocktail Celluclast (notamment la cellulose par les cellulases) aurait pu faciliter l'accès aux xylanes pour les xylanases. L'augmentation de l'accessibilité d'un épitope après un prétraitement avec une pectate lyase a notamment été décrite dans le cas de la cellulose amorphe du céleri détectée par le CBM17 (Blake et al., 2006), des xyloglucanes du tabac détectés par le LM15 (Marcus et al., 2008) ou des xylanes du tabac détectés par le CBM15 (Hervé et al., 2009). La quantité plus faible de xylanes détectés pour le parenchyme lorsque Celluclast est ajouté à *NpXyn11A* pourrait alors provenir de l'activité des enzymes de ce cocktail.

A l'opposé, le sclérenchyme seul est riche en lignines (Hansen et al., 2011). Or celles-ci

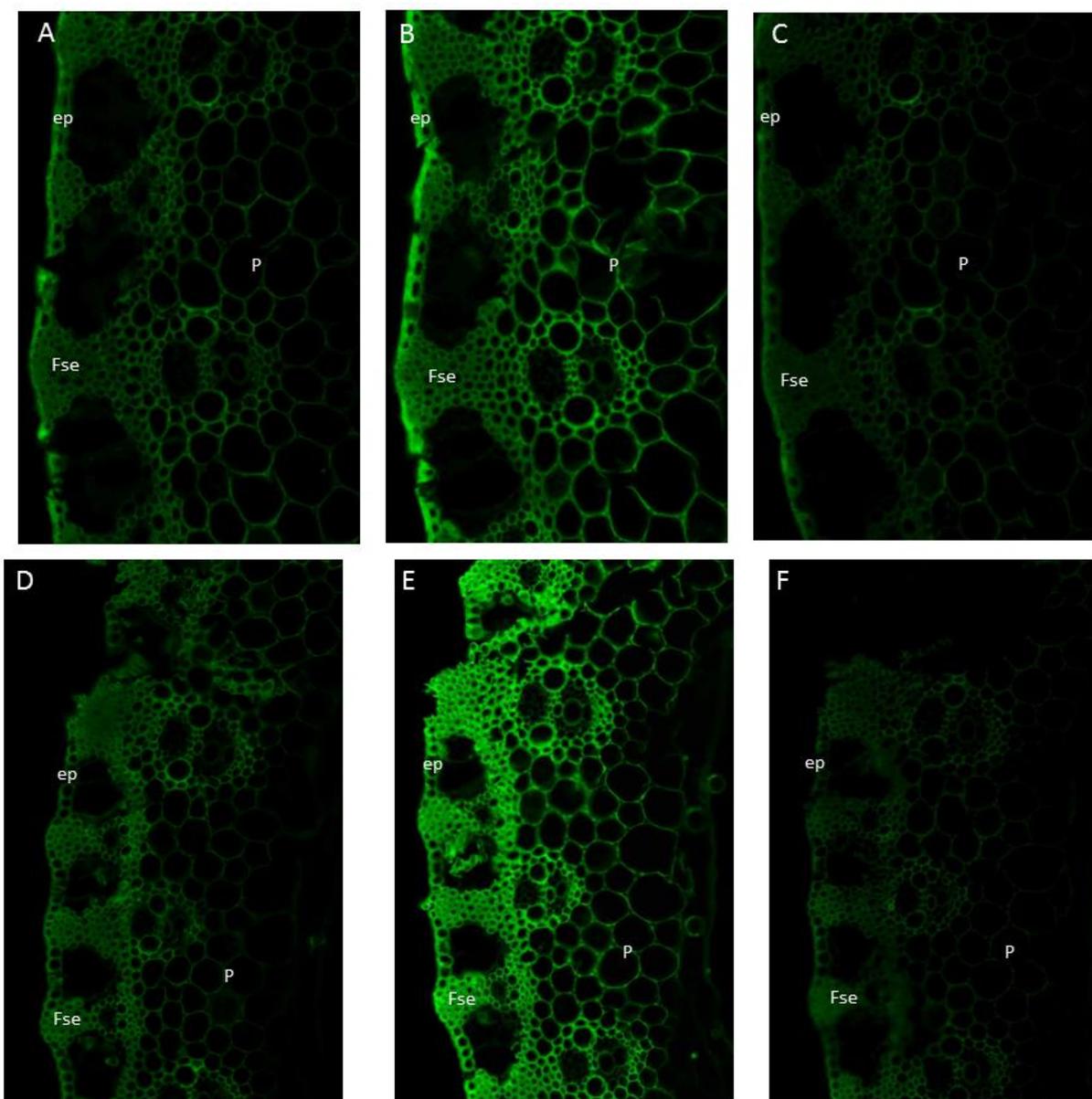


Figure 68 : Dégradation des xylanes d'entre-nœud de paille de blé par le cocktail Celluclast et *NpXyn11A* ou par *NpXyn11A*.

A : digestion par Celluclast (Novozymes) à 2 FPU/lame + *NpXyn11A* à 0,3 mg.L⁻¹ suivie du marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC). B : contrôle avec le marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC), l'incubation a été réalisée avec tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 5 à la place de l'enzyme. C : bruit de fond avec seulement l'Ac anti-rat FITC pour le marquage, l'incubation a été réalisée avec tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 5 à la place de l'enzyme. D : digestion par *NpXyn11A* à 200 mg.L⁻¹ suivie du marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC). E : contrôle avec le marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC), l'incubation a été réalisée avec tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 7 à la place de l'enzyme. F : bruit de fond avec seulement l'Ac anti-rat FITC pour le marquage, l'incubation a été réalisée avec tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 7 à la place de l'enzyme. Digestion une heure à 40 °C (A, B, C) ou à 37 °C (D, E, F). ep : épiderme composé d'une assise cellulaire ; Fse : fibres de sclérenchyme sous épidermique ; P : cellules de parenchyme.

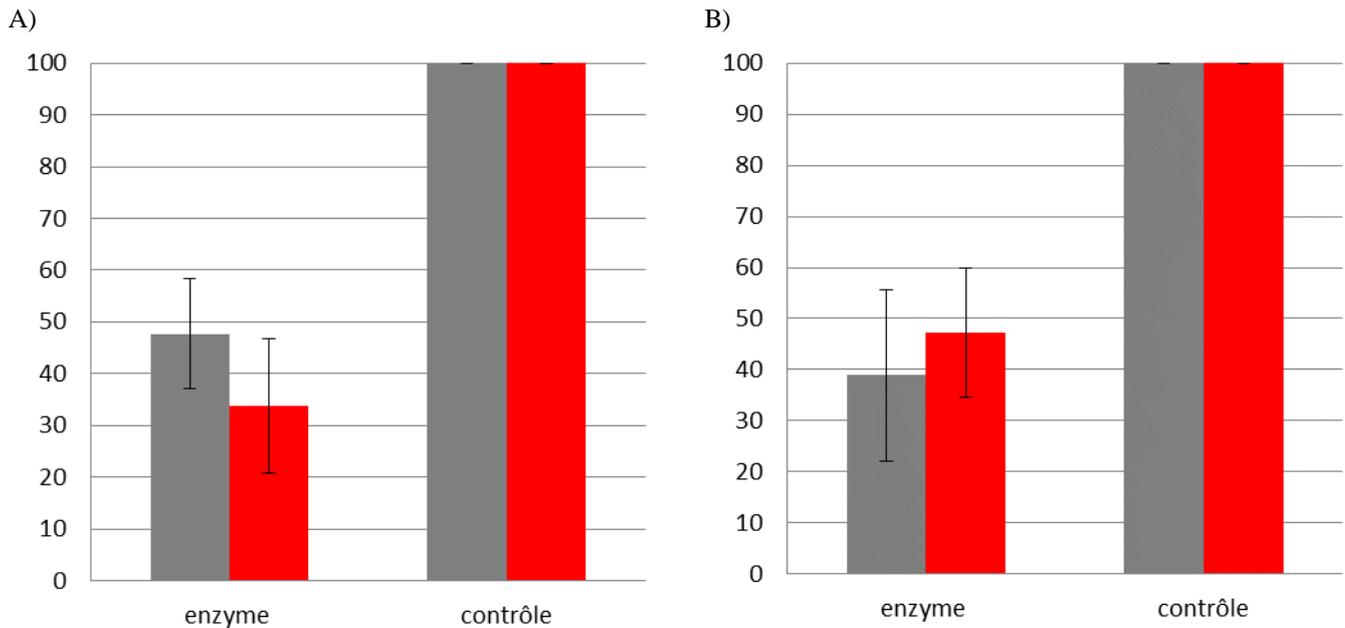


Figure 69 : Quantification de la fluorescence résiduelle après dégradation des xylnes d'entre-nœud de paille de blé par Celluclast et *NpXyn11A* ou par *NpXyn11A*. A) Pourcentage de fluorescence résiduelle au niveau du sclérenchyme. B) Pourcentage de fluorescence résiduelle au niveau du parenchyme. En gris : Celluclast + *NpXyn11A* ; en rouge : *NpXyn11A*. Barres d'erreur correspondant à l'écart-type standard (Excel). n = 7 pour le sclérenchyme et n = 6 pour le parenchyme lors de la dégradation par Celluclast et *NpXyn11A* ; n = 12 pour le sclérenchyme et n = 8 pour le parenchyme lors de la dégradation par *NpXyn11A*.

peuvent former des liaisons covalentes avec des hémicelluloses (Pérez et al., 2002; Ratanakhanokchai et al., 2013). Cependant, aucune activité de dégradation des lignines comme une activité laccase n'a été décrite pour le cocktail Celluclast. Les xylnes liés aux lignines seraient alors peu accessibles aux xylanases dans les deux conditions enzymatiques car l'ajout du cocktail ne favoriserait pas l'accès aux xylnes. Par ailleurs, l'épiderme seul est riche en cellulose (Hornsby et al., 1997). Or la cellulose et les xylnes sont étroitement liés. En effet, les arabinoxylnes et les microfibrilles de cellulose sont associés par des liaisons hydrogènes (Bornscheuer et al., 2014; Shallom-Shezifi and Shoham, 2003) et ces interactions sont stabilisées par les résidus acide glucuronique (Pereira et al., 2017). Trois hypothèses permettraient d'expliquer pourquoi, en présence de Celluclast, la dégradation des xylnes du sclérenchyme semble légèrement inférieure. Les cellulases auraient dégradé la cellulose mais les xylanases (*NpXyn11A* et les xylanases de Celluclast) ne seraient pas assez actives et/ ou nombreuses pour dégrader les xylnes nouvellement accessibles. En effet, la concentration en *NpXyn11A* est égale à $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ lorsqu'elle est mélangée au cocktail Celluclast contre 200 mg.L^{-1} en absence du cocktail enzymatique. La deuxième hypothèse est que *NpXyn11A* aurait accès aux xylnes même en présence de cellulose or l'augmentation du nombre d'enzymes

augmenterait l'encombrement stérique ou la quantité d'enzyme adsorbées sur les coupes limitant l'accès des xylanases jusqu'aux xylanes. En effet, dans cette étape nous n'avons pas ajouté de BSA ni de caséines. De plus, l'adsorption d'enzymes a été décrite pour des enzymes qui ne sont pas des xylanases. Il a été mis en évidence que des cellulases pouvaient s'adsorber sur de la cellulose (Lee et al., 1982), sur les lignines (Palonen et al., 2004) et sur de la paille de blé, notamment la cellulase Cel7A (cellobiohydrolase I) présente dans Celluclast (Rodrigues et al., 2015). Malheureusement il n'est pas possible de savoir quelle est la quantité d'enzymes libres et celle d'enzymes adsorbées. Pour obtenir des informations complémentaires, il aurait été intéressant de travailler avec le cocktail seul, le cocktail auquel *NpXyn11A* aurait été ajouté et comparer les résultats avec ceux de la xylanase seule et à la même concentration. Ces expériences ont été réalisées mais les coupes se sont décollées, empêchant toute analyse de la dégradation et mettant en évidence l'étape délicate de la fixation des coupes sur la lame. La troisième hypothèse est plus surprenante car elle se base sur la possibilité d'activités protéases dans le cocktail Celluclast (Massiot et al., 1989). Les enzymes pourraient donc être dégradées au cours de la réaction lorsque le cocktail Celluclast est utilisé, diminuant alors la quantité d'enzymes actives.

Afin de répondre sur l'influence de la dégradation de la cellulose sur la détection des xylanes, il serait plus simple d'utiliser un cocktail enzymatique pour dégrader la cellulose dont la composition et la concentration en enzyme seraient connues.

En conclusion, dans nos conditions le contexte dans lequel les xylanes se trouvent et notamment la quantité de cellulose semble influencer l'activité de *NpXyn11A* mais des études complémentaires sont nécessaires pour le confirmer.

IV. Impact de la modularité de *NpXyn11A* sur la détection des xylanes

a) Effet du module In sur l'activité de *NpXyn11A* lors de la dégradation des xylanes

Dans le chapitre 4. 2. *III*, nous avons mis en évidence que le module In modifiait l'activité du module catalytique en fusion, sur les substrats complexes. Dans ce chapitre, les activités des enzymes *NpXyn11A* et *InNpXyn11A* ont également été comparées mais sur des coupes d'entre-nœud de paille de blé (Chapitres 2. 7 et 2. 8).

Les xylanes de l'épiderme, du sclérenchyme et des cellules du parenchyme ont été partiellement dégradés par l'activité de chacune des deux enzymes, utilisées à la même concentration molaire (Figure 70A, Figure 70B, Figure 70D et Figure 70E). L'enzyme In*NpXyn11A* digère davantage que l'enzyme sauvage les xylanes présents dans le parenchyme car la fluorescence résiduelle est de 2 % et 48 % respectivement (Figure 71B). De plus, In*NpXyn11A* a dégradé la quasi-totalité des xylanes détectables, le niveau de fluorescence étant proche du niveau du bruit de fond. Cela permet de montrer que bien que l'enzyme sauvage ne puisse pas dégrader tous les xylanes, ces xylanes sont dégradables notamment par In*NpXyn11A*. La dégradation complète d'un substrat par une enzyme a déjà été mise en évidence sur des coupes de tabac où les mannanes ont été digérés par la mannanase *CjMan5A* de *Cellvibrio japonicus* (Zhang et al., 2014). La dégradation de *NpXyn11A* paraît inférieure à celle d'In*NpXyn11A* pour le sclérenchyme malgré le recouvrement des écarts-types, la fluorescence résiduelle est égale à 28 % et 10 % respectivement (Figure 71A).

Le sclérenchyme seul est riche en lignines (Hansen et al., 2011), qui seraient liées aux xylanes (Pérez et al., 2002; Ratanakhanokchai et al., 2013). La cellulose, très présente dans l'épiderme, serait également liée aux xylanes et à la lignine (Hornsby et al., 1997; McNeil et al., 1984; Ratanakhanokchai et al., 2013). L'interaction putative entre In dans In*NpXyn11A* et les xylanes (ou un autre ligand) serait limitée par la présence de ces interactions entre les composés de la paroi permettant d'expliquer la faible différence entre l'activité de cette enzyme et celle de l'enzyme sauvage. Une autre piste pour expliquer ces résultats est l'adsorption de l'enzyme sauvage de manière non spécifique sur le substrat et l'absence ou la faible adsorption pour In*NpXyn11A*. Des différences entre enzymes ont déjà été observées (Jorgensen et al., 2007). Ainsi 30 % de la cellulase Cel7B de *T. reesei* incubée pendant une heure sur de la paille de blé non traitée était adsorbée sur le substrat de manière non spécifique alors que les autres cellulases (les cellobiohydrolases Cel7A et Cel6A de *T. reesei*) n'étaient pas adsorbées (Heiss-Blanquet et al., 2011).

L'enzyme In*NpXyn11A* dégrade davantage de xylanes du parenchyme que *NpXyn11A*. Une différence entre ces enzymes avait déjà été observée lors des expériences réalisées sur les broyats. La dégradation de coupes d'entre-noeuds de paille de blé par les enzymes *NpXyn11A* et In*NpXyn11A* a été répétée, avec de nouveaux lots enzymatiques, confirmant cette conclusion (Chapitre 5. 2. IV. b). Ces observations sont donc inversées avec celles réalisées

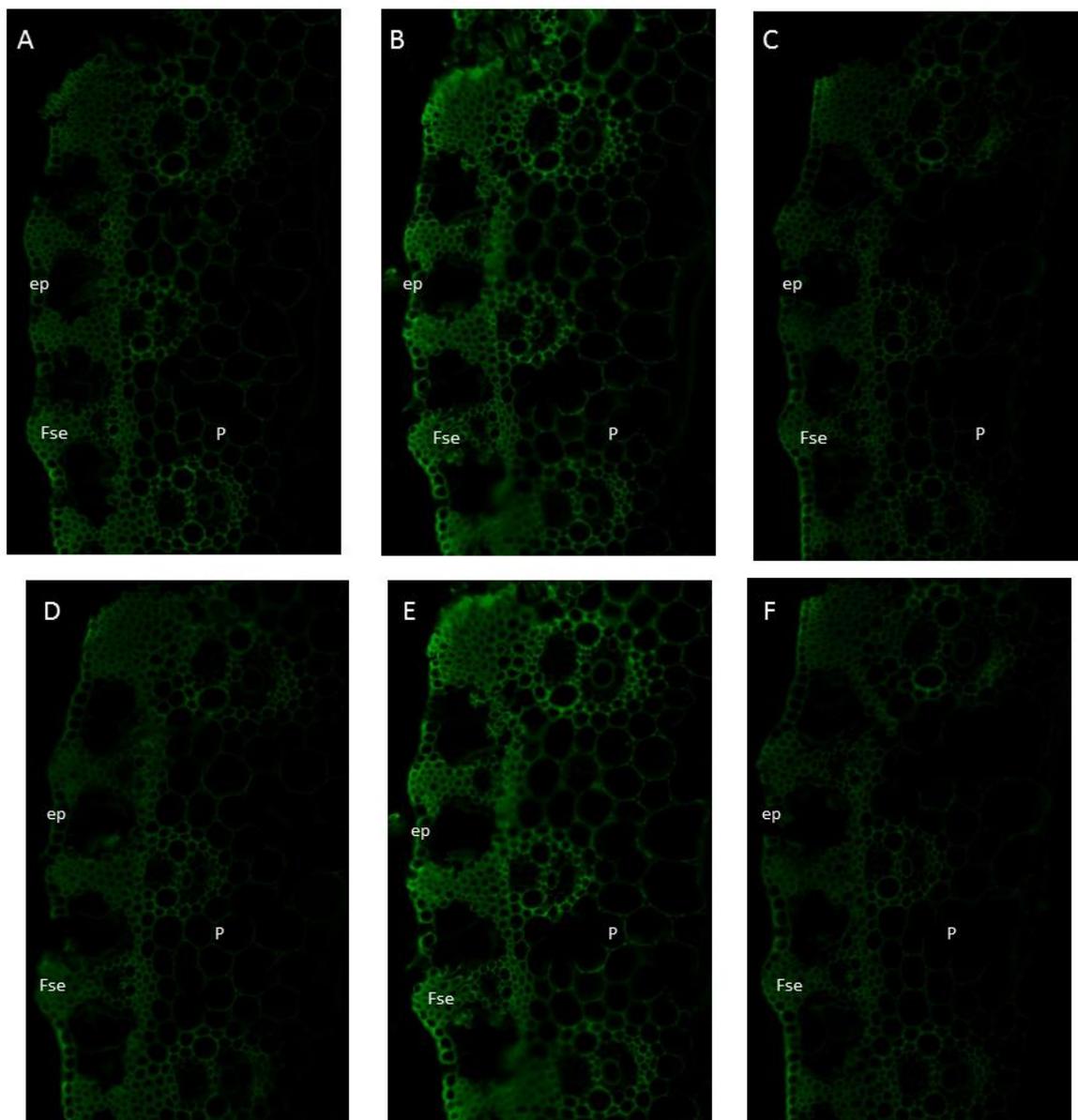


Figure 70 : Dégradation des xylanes d'entre-nœud de paille de blé par *NpXyn11A* ou par *InNpXyn11A*. A : digestion par *NpXyn11A* à $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ suivie du marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC). B et E : contrôle avec le marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC). C et F : bruit de fond avec seulement l'Ac anti-rat FITC pour le marquage. D : digestion par *InNpXyn11A* à $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ suivie du marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC). Contrôle et bruit de fond : tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 7 ; digestion 30 minutes à $37 \text{ }^\circ\text{C}$. ep : épiderme composé d'une assise cellulaire ; Fse : fibres de sclérenchyme sous épidermique ; P : cellules de parenchyme.

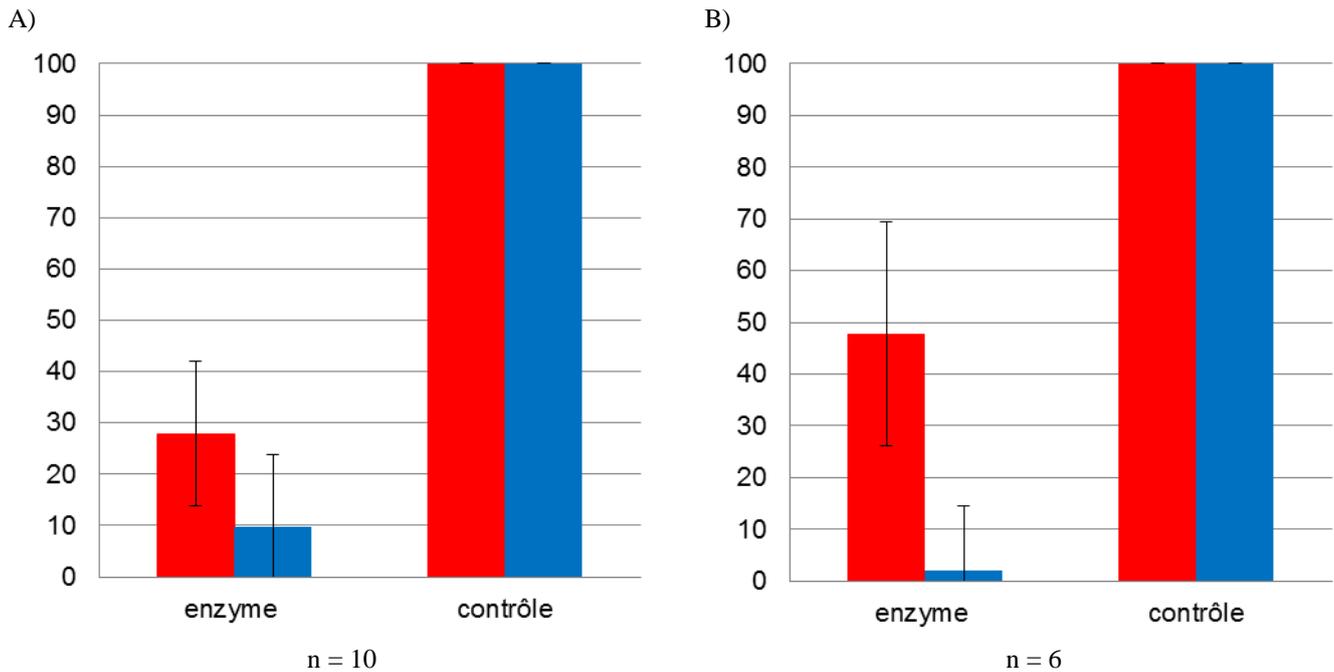


Figure 71 : Quantification de la fluorescence résiduelle du sclérenchyme ou du parenchyme après dégradation par *NpXyn11A* ou par *InNpXyn11A*.

A) Pourcentage de fluorescence résiduelle au niveau du sclérenchyme. B) Pourcentage de fluorescence résiduelle au niveau du parenchyme. En rouge : *NpXyn11A* ; en bleu : *InNpXyn11A*. Barres d'erreur correspondant à l'écart-type standard (Excel).

sur la paille de blé broyée avec détection par DNS (Chapitre 4. 2. III). Pour information, les lots enzymatiques étaient différents de ceux utilisés dans les expériences du chapitre 4.

L'hypothèse majeure de ces conclusions est l'absence d'enzyme lors des étapes de marquage. En effet, si les enzymes restaient associées à leur substrat après les divers lavages, elles masqueraient les xylanes. L'anticorps LM11 ne pourrait alors pas interagir avec les xylanes et par conséquent la fluorescence détectée serait inférieure à celle du contrôle. Afin de valider cette hypothèse, plusieurs expériences pourraient être mises en œuvre. L'absence d'enzyme pourrait être vérifiée en marquant, après les lavages, l'enzyme. Le marquage serait composé de l'anticorps anti-tag histidine suivi de l'anticorps secondaire couplé au FITC. Il est également possible de rajouter une étape après le traitement enzymatique (avec *NpXyn11A* ou *InNpXyn11A*), en dégradant toutes les protéines présentes avec une protéase puis de poursuivre le protocole classique, en réalisant les étapes de marquage. Un mutant d'*InNpXyn11A* inactif pourrait aussi être utilisé comme contrôle pour l'étape de traitement enzymatique. La composition des coupes avant et après traitement enzymatique avec la xylanase pourrait également confirmer nos conclusions.

Si notre hypothèse est correcte, nos données montrent l'importance de facteurs présents dans les coupes et absents sur des broyats et qu'il faudrait prendre en compte lors de l'étude d'enzymes sur des substrats insolubles. En effet, le contexte dans lequel se trouve la cible de l'enzyme est différent lorsque le substrat est sous forme broyée ou sous forme de coupes. Par exemple, l'organisation des cellules ayant des compositions et rôles différents est conservée sur les coupes mais ce n'est pas le cas dans la paille de blé broyée. Dans le chapitre précédent, nous avons proposé que les résidus présents dans le canyon d'In puissent interagir avec un ligand tel qu'une chaîne de xylose, comparable à une interaction CBM-ligand pour expliquer les différences observées entre *NpXyn11A* ou *InNpXyn11A* (Chapitre 4. 2. *III*). Pour confirmer cette hypothèse, le module In pourrait être utilisé seul et détecté par l'anticorps anti-tag histidine alors que l'association JoIn permettrait d'avoir un contrôle négatif. De plus, il serait intéressant de comparer l'activité de ciblage d'*InNpXyn11A* bien qu'involontairement induite par la fusion entre In et le module catalytique, avec les enzymes multimodulaires *InNpXyn11A-JoCBM3a* et *JoNpXyn11A-InCBM2b1* ayant un CBM spécifique de la cellulose ou des xylanes respectivement. *InNpXyn11A-JoCBM3a* a été utilisée pour dégrader les xylanes des coupes (Chapitre 5. 2. *IV*. b).

En conclusion, la fusion entre In et le module catalytique influence l'activité enzymatique sur les coupes d'entre-nœuds de paille de blé. Cependant, l'enzyme sauvage dégrade majoritairement les xylanes du sclérenchyme alors qu'*InNpXyn11A* hydrolyse davantage les xylanes du parenchyme. Le contexte dans lequel se trouvent les xylanes a donc également un impact sur l'activité enzymatique.

b) Effet du CBM3a sur l'activité de *NpXyn11A* lors de la dégradation des xylanes

D'après les conclusions d'une étude d'Hervé et collaborateurs, l'activité d'une enzyme multimodulaire contenant une xylanase et un CBM devrait hydrolyser davantage les xylanes si le CBM est spécifique de la cellulose, car ce module dirigerait plus facilement la xylanase vers des xylanes peu accessibles (Hervé et al., 2009). L'étude suivante de cette équipe montre que l'activité d'une xylanase GH10 et d'une de la famille GH11 en fusion avec un CBM (*CBM2b1-2* dont le ligand est du xylane ou *CBM3a* ciblant la cellulose) permet d'augmenter la dégradation par rapport au module catalytique seul (Hervé et al., 2010). Cependant, les conclusions de la première étude sont nuancées car pour chacune des xylanases les enzymes

multimodulaires contenant l'un ou l'autre des CBMs donnent des résultats similaires. Ce travail met en évidence l'intérêt d'ajouter un CBM à une xylanase pour dégrader les xylandes mais pour cela, il est nécessaire que le CBM puisse détecter son ligand au sein de la coupe. Dans cette thèse, nous avons construit l'enzyme multimodulaire *InNpXyn11A-JoCBM3a* à partir de l'expression séparée des deux modules (module catalytique et CBM) en fusion avec Jo ou In puis en associant les modules et en purifiant l'enzyme multimodulaire (Chapitre 4. 2. I). L'activité de l'enzyme multimodulaire *InNpXyn11A-JoCBM3a* sur les coupes d'entre-nœuds de paille de blé a été comparée à l'activité de chaque enzyme libre lors du marquage des xylandes (Chapitres 2. 7 et 2. 8). Pour rappel, la cellulose présente dans les coupes est détectable par le CBM3a (Chapitre 5. 2. I). La quantification n'a pas pu être réalisée dans cette expérience car les coupes correspondantes au bruit de fond n'étaient pas exploitables, une approche visuelle sera alors développée.

Les xylandes présents dans les coupes ont été partiellement digérés par les trois enzymes (*NpXyn11A*, *InNpXyn11A* et *InNpXyn11A-JoCBM3a*) (Figure 72A, Figure 72D et Figure 72G). Les xylandes détectés dans les faisceaux vasculaires, le sclérenchyme ou le parenchyme ont été davantage clivés par l'enzyme *InNpXyn11A* puis par l'enzyme multimodulaire comparé à l'enzyme sauvage (Figure 72C, Figure 72F et Figure 72I). L'hydrolyse des xylandes présents dans les faisceaux vasculaires a également été observée lors de la dégradation des coupes par Cellic® Ctec2 ou par Celluclast + *NpXyn11A* (images fusion non montrées). Les faisceaux vasculaires après dégradation par Celluclast + *NpXyn11A* sont semblables à ceux observés pour l'hydrolyse d'*InNpXyn11A-JoCBM3a* alors que le clivage des xylandes par Cellic® Ctec2 est similaire à celui d'*InNpXyn11A*. Des données complémentaires sur les enzymes présentes dans ces cocktails permettraient probablement d'expliquer ces observations. En effet, ils contiennent tous les deux des cellulases, β -glucosidases et des hémicellulases (Garcia-Aparicio et al., 2007; Massiot et al., 1989; Novozymes, 2009, n.d.; Sørensen et al., 2007, 2003). L'enzyme sauvage dégrade moins les xylandes comparé à l'enzyme *InNpXyn11A*, en accord avec la comparaison de ces deux enzymes (Chapitre 5. 2. IV. a). Comme mentionné précédemment, les xylandes interagissent avec la cellulose de la paroi cellulaire. Les différences entre l'enzyme multimodulaire et *NpXyn11A* pourraient s'expliquer par la présence du CBM3a qui favoriserait donc la proximité entre le module catalytique et les xylandes présents dans la coupe et/ ou influencerait

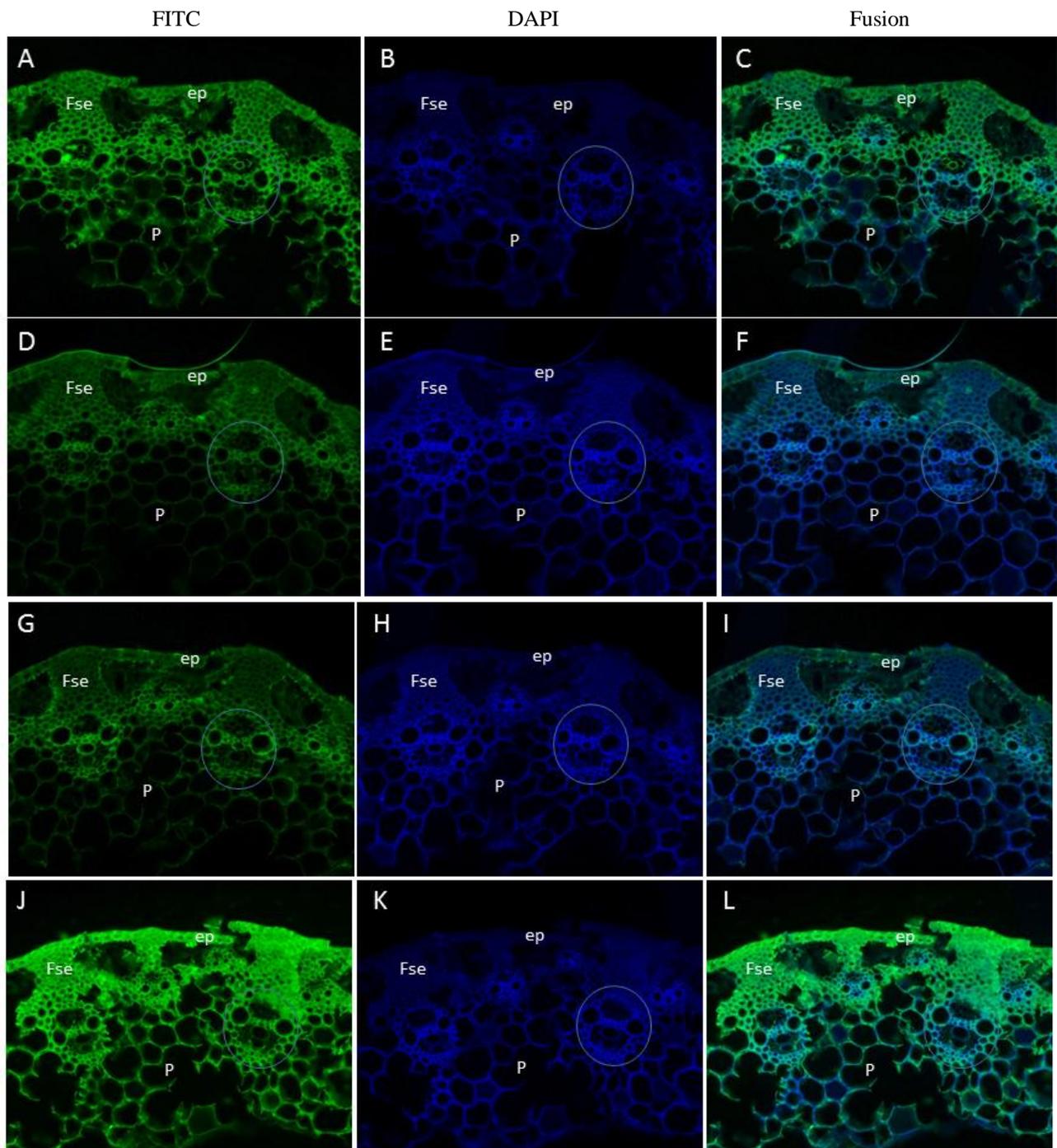


Figure 72 : Dégradation des xylanes d'entre-nœud de paille de blé par *NpXyn11A*, *InNpXyn11A* ou *InNpXyn11A-JoCBM3a*.

A, B, C : digestion par *NpXyn11A* à 0,41 UI sur *pNP-X₃* suivie du marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC). D, E et F : digestion par *InNpXyn11A* à 0,41 UI sur *pNP-X₃* suivie du marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC). G, H et I : digestion par *InNpXyn11A-JoCBM3a* à 0,41 UI sur *pNP-X₃* suivie du marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC). J, K et L : contrôle avec le marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC), l'incubation a été réalisée avec tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 7 à la place de l'enzyme. Digestion 30 minutes à 37 °C. FITC : détection des xylanes ; DAPI : autofluorescence de la lignine. ep : épiderme composé d'une assise cellulaire ; Fse : fibres de sclérenchyme sous épidermique ; P : cellules de parenchyme ; cercle bleu : faisceau cribro vasculaire.

la région où l'enzyme hydrolyse les xylanes. En contrepartie, la taille de l'enzyme multimodulaire est de 70 kDa, elle est supérieure à celle d'InNpXyn11A qui a une taille de 41 kDa. Sa taille pourrait diminuer sa vitesse de diffusion. L'interaction putative entre les résidus du canyon d'In et le xylane (ou un autre ligand) serait absente dans le cas de l'enzyme multimodulaire car Jo et In étant associés, le canyon est couvert par Jo et n'est plus accessible au substrat.

Pour rappel, l'activité de l'enzyme multimodulaire était plus faible sur de la paille de blé broyée et était inférieure à celles de NpXyn11A et d'InNpXyn11A (Chapitre 4. 2. III). La différence avec les coupes d'entre-nœuds de paille de blé pourrait provenir du contexte dans lequel se trouve la cible de l'enzyme c'est-à-dire les xylanes. En effet, comme observé précédemment, la composition du sclérenchyme et celle du parenchyme, notamment la quantité de cellulose, influent sur l'activité enzymatique (Chapitre 5. 2. III et 5. 2. IV a). Par exemple, les mannanases CjMan5A et CjMan26A de *Cellvibrio japonicus* dégradent davantage les mannanes de coupes de tabac si les modules catalytiques sont associés au CBM3a comparé à la fusion du module catalytique avec le CBM27 ciblant des mannanes (Zhang et al., 2014). Cependant ces résultats dépendent de l'environnement des mannanes car sur des coupes de *Physcomitrella patens* la spécificité du CBM est moins importante. Les différences observées entre la paille de blé sous forme de coupes ou broyée peuvent également provenir des échantillons étudiés. La paille de blé sous forme broyée (Song et al., 2010) a une origine différente de celle dont les entre-nœuds ont été extraits pour les expériences d'immunocytochimie (Bertrand et al., 2006), la variété étant respectivement *Apache* et *Shango*. Par ailleurs pour la paille de blé broyée, les différentes parties morphologiques (nœuds, entre-nœuds...) n'ont pas été séparées or chacune de ces parties a une composition spécifique en cellulose, hémicelluloses et lignines (Chapitre 2. 4. II. b). Il aurait donc été intéressant de broyer les entre-nœuds utilisés pour l'immunocytochimie et de réaliser des expériences enzymologiques avec ce substrat pour comparer exactement le même substrat sous deux formes.

L'ensemble des expériences d'immunocytochimie que nous avons menées au cours de cette thèse ont également permis de mettre en évidence de nombreux paramètres clés. Par exemple, la digestion enzymatique ne doit pas être trop importante sinon les coupes trop fragilisées se décollent de la lame. Le milieu de montage qui permet de fixer la lamelle sur la lame après les étapes de marquage, grâce à une réaction chimique, pourrait interagir avec les

anticorps fixés sur les coupes de manière non spécifique. Il serait donc préférable d'utiliser toujours le même milieu de montage. D'autre part, un protocole légèrement modifié pourrait être utilisé, en remplaçant les lamelles par l'utilisation d'un crayon hydrophobe (Hervé et al., 2011) ce qui limiterait une altération de la structure (discussion avec le Dr. Cécile Hervé). De plus, il est connu que la fluorescence d'un anticorps est plus importante à haute température, probablement à cause d'un problème de stabilité du fluorochrome. Si la température du laboratoire n'est pas régulée, la température ambiante peut varier d'environ 10 °C entre l'hiver et l'été. Il est donc nécessaire de refaire les contrôles à chaque nouvelle expérience.

3. Conclusion

Nous avons mis en place les conditions d'observation de la dégradation d'un substrat complexe, l'entre-nœud de paille de blé inclus dans de la paraffine puis coupé et dégradé par un cocktail enzymatique ou une enzyme seule purifiée. La méthodologie de quantification de la fluorescence résiduelle a un impact sur les données obtenues. Après dégradation par le cocktail enzymatique Cellic[®] Ctec2, la méthode d'analyse 1 a donné 3,6 % de fluorescence résiduelle pour le sclérenchyme alors qu'avec la méthode 2 la valeur obtenue est 30,8 %. Un nombre plus grand de zones quantifiées dans la méthode 2, plus précise et plus fiable ont permis de valider cette méthode.

L'augmentation de la concentration en enzyme n'a pas permis de diminuer la quantité de xylanes détectés. Ainsi la concentration de *NpXyn11A*, permettant de dégrader le maximum de xylanes semble être 2 g.L⁻¹. La fluorescence résiduelle est alors de 22 % pour le parenchyme et de 16 % pour le sclérenchyme. Ceci pourrait s'expliquer par un encombrement stérique en présence d'une trop forte concentration en enzyme. D'autre part, les xylanes difficilement accessibles pourraient être détectés par l'anticorps LM11 mais non accessibles aux enzymes. Dans une troisième partie, nous avons comparé l'action de *NpXyn11A* seule ou avec le cocktail commercial Celluclast. Il semblerait que le contexte dans lequel se trouvent les xylanes et notamment la quantité de cellulose a un impact sur l'activité de *NpXyn11A*. Pour confirmer ces conclusions, de nouvelles études devront être réalisées.

Pour finir, nous avons montré que la modularité est un paramètre influençant la dégradation des xylanes dans les coupes d'entre-nœuds de paille de blé. In *NpXyn11A* dégrade davantage les xylanes que l'enzyme sauvage pour le parenchyme. La fluorescence

résiduelle est de 2 % et de 48 % respectivement. Comme proposé dans le chapitre précédent (Chapitre 4. 2. *III*) In pourrait interagir avec une chaîne de xylane (ou un autre ligand), comparable à un CBM de type B. L'utilisation de l'enzyme multimodulaire permet d'augmenter l'hydrolyse des xylanes comparé à l'enzyme sauvage grâce au CBM3a qui emmènerait l'enzyme vers des zones non accessibles. Cependant, l'enzyme multimodulaire dégrade moins de xylanes que l'enzyme chimérique InNpXyn11A probablement à cause de la taille de l'enzyme qui limiterait la diffusion de l'enzyme. Ceci devra être confirmé en validant l'hypothèse majeure de ce travail, proposant une absence d'enzymes lors des étapes de marquages et qui ne masquent pas les xylanes.

Plusieurs pistes de travail peuvent être proposées comme des analyses complémentaires sur le substrat en lui-même ou sur les sucres retrouvés dans la solution enzymatique après hydrolyse. La qualité des images pourrait être améliorée en utilisant de la microscopie confocale qui permettrait d'observer plus précisément les différentes régions d'une coupe. Le chapitre suivant propose plusieurs perspectives suite à ce travail, appuyées par des travaux préliminaires réalisés au cours de cette thèse.

Plus largement, les données obtenues dans ce chapitre et dans le chapitre 4 posent la question de la complexité du substrat et du contexte dans lequel se trouve la cible de l'enzyme lors de l'étude de celle-ci. En effet, nous avons observé que l'activité d'une enzyme varie pour différents couples enzyme-substrat, où la cible de l'enzyme est présente (xylane de hêtre, son de blé broyé, paille de blé broyée ou sous forme de coupes). Dans ce cas, quel serait le substrat révélant la véritable activité de l'enzyme ? Ne faudrait-il pas définir l'activité d'une enzyme en fonction de son activité sur un substrat donné ?

Chapitre 6
Perspectives

Chapitre 6 : Perspectives

Durant ce travail de thèse, trois axes de recherche ont été suivis (Figure 73). Nous avons produit une large variété de protéines chimériques, basées sur le système d'association JoIn. L'utilisation de ce système permettant de former des protéines multimodulaires à façon, a été validée dans le chapitre 3. Nous avons ainsi pu former InNpXyn11A-JoCBM3a, associant le domaine catalytique d'une xylanase et un CBM ciblant la cellulose. L'activité de cette enzyme chimérique a été comparée aux enzymes NpXyn11A, InNpXyn11A et InNpXyn11A-Jo, aussi bien sur des substrats solubles et insolubles (Chapitre 4). Nous avons alors montré que la complexité du substrat influençait l'activité enzymatique. Par la suite, ces enzymes ont été utilisées pour dégrader les xylanes dans des coupes d'entre-nœuds de paille de blé (Chapitre 5), mettant en évidence une différence entre les activités *in vitro* et celles *in muro*. Ainsi, le contexte dans lequel se trouvent les xylanes ciblés a un impact sur l'activité enzymatique. Ce chapitre vise à proposer diverses perspectives envisageables à la suite de cette thèse, appuyées sur quelques résultats obtenus au cours d'expériences préliminaires.

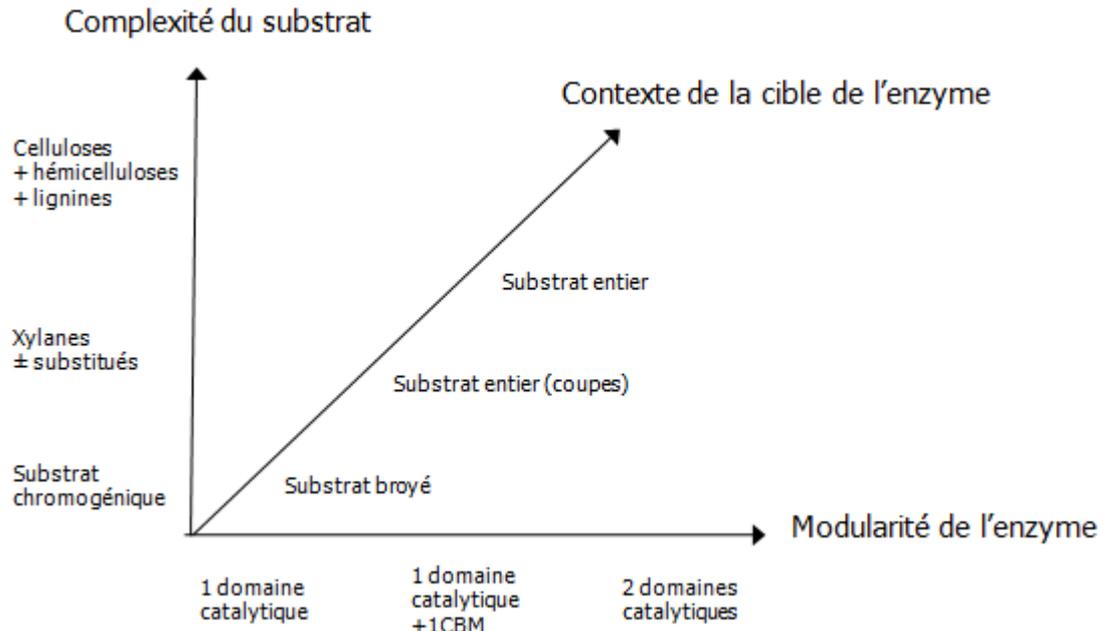


Figure 73 : Schéma des axes de recherche de cette thèse.

1. Etude de la synergie d'action d'enzymes multi-catalytiques.

Après avoir travaillé sur la modularité de l'enzyme avec un CBM et un module catalytique nous avons envisagé d'utiliser le système JoIn pour créer des enzymes multimodulaires avec deux modules catalytiques. Pour cela, il était nécessaire de trouver deux enzymes agissant en synergie, sous leur forme libre. Après la vérification des propriétés biochimiques des enzymes chimériques, le système JoIn aurait permis d'associer les modules mais également de travailler sur la proximité entre ces modules.

Dans la littérature, certaines études ont mis en évidence que les groupements acétyles pouvaient restreindre l'action des xylanases (Selig et al., 2009). De plus, d'autres travaux ont montré l'action synergique de xylanases et carbohydate estérases (Chapitre 1. 11. III. a) (2)) en utilisant des enzymes simultanément (Cybinski et al., 1999) ou séquentiellement (Kam et al., 2005). Une synergie entre une acétyle xylane estérase (AXE) et une xylanase a d'ailleurs été observé sur du son de blé désamidonné (Zheng et al., 2013) ou sur de la paille de blé (Zhang et al., 2011a). Des AXEs putatives provenant d'études métagénomiques menées au laboratoire étaient disponibles dans notre équipe. Un travail préliminaire mené par le Dr. Pablo Alvira a permis de caractériser six de ces enzymes sur du *pNP*-acétate (*pNP*-Ace). Ces enzymes sont la E5UNK, E7 et E8 provenant d'une banque métagénomique réalisée sur le ver de Madagascar *Pontoscolex corethrurus* et les enzymes *Pm13*, *Pm20* et *Pm51* provenant d'une banque métagénomique constituée à partir du système digestif du termite *Pseudacanthotermes militaris*. Malgré plusieurs essais, l'enzyme E5UNK n'a pas pu être produite lors de cette thèse. Les plasmides codant pour les enzymes E5UNK, E7 et E8 en fusion avec Jo (avec ou sans tag histidine) ont été construits par Roos Akkerman, stagiaire en master dans notre équipe.

Les activités spécifiques des AXEs ont été déterminées sur le *pNP*-Ace, dans les conditions décrites par le Dr. Pablo Alvira. La libération du groupement chromogénique au cours de l'hydrolyse est suivie par spectrophotométrie à 405 nm (Tableau 49) (Chapitre 2. 6. I. b).

Toutes les enzymes sont actives, présentant des activités spécifiques variables faibles comprises entre 0,015 et 2,5 UI.mg⁻¹. En effet, l'AXE de *Schizophyllum commune* ou celle de *Lactobacillus plantarum* ont une activité spécifique sur *pNP*-acétate égale à 59,2 U.mg⁻¹ et 128,9 U.mg⁻¹ respectivement (Brod et al., 2010; Halgasová et al., 1994). A partir de l'activité spécifique déterminée pour chaque lot protéique, une moyenne et un écart-type ont été

calculés pour chaque enzyme. Les valeurs écarts-types sont importantes. Ceci pourrait provenir du substrat qui n'est pas stable (Shao and Wiegel, 1995) et/ ou de la faible stabilité des enzymes (données non montrées).

Tableau 49 : Activité spécifique des enzymes sur du *p*NP-Ace.
 UI.mg⁻¹ : libération d'une μmole de *p*NP par minute.

enzyme	AS (UI.mg ⁻¹)	nombre de lots protéiques
E7	1,41 10 ⁻¹ ± 0,56 10 ⁻¹	3
E8	1,50 10 ⁻² ± 1,20 10 ⁻²	2
<i>Pm</i> 13	2,55 ± 1,53	2
<i>Pm</i> 20	1,21 10 ¹ ± 0,24 10 ¹	3
<i>Pm</i> 51	4,9 10 ⁻² ± 2,0 10 ⁻²	3

Dans un premier temps, la synergie d'action de la xylanase *NpXyn11A* en présence ou non de chacune des AXEs a été mesurée en suivant la libération par DNS des sucres réducteurs formés au cours de l'hydrolyse du son de blé, déjà étudié précédemment (Chapitre 4. 2. III), d'après le protocole décrit dans le chapitre 2. 6. II, à l'exception de la concentration en AXE putative (E7, E8, *Pm*13, *Pm*20 ou *Pm*51) qui était de 2,3 10⁻⁶ M (Figure 74). Dans un second temps, les divers produits d'hydrolyses ont été analysés par HPAEC-PAD. Dans un troisième temps, ces enzymes ont été étudiées sur de la paille de blé broyée par DNS (Chapitre 2. 6).

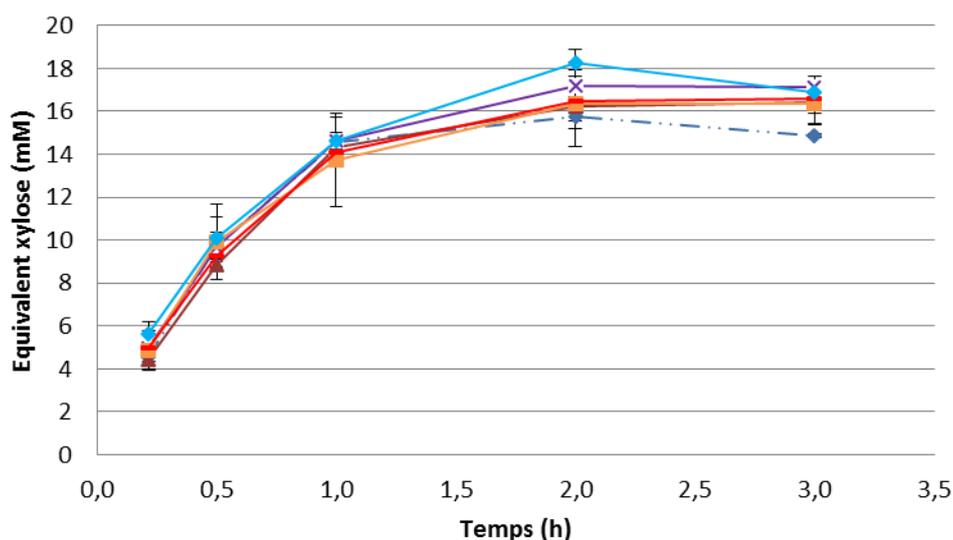


Figure 74 : Cinétique de dégradation du son de blé par *NpXyn11A* seule ou avec une AXE.
 En losange bleu foncé : *NpXyn11A* ; en triangle bordeaux : E7 + *NpXyn11A* ; en croix violet : E8 + *NpXyn11A* ; en carré orange : *Pm*13 + *NpXyn11A* ; en rouge : *Pm*20 + *NpXyn11A* ; en losange bleu clair : *Pm*51 + *NpXyn11A*. Expériences réalisées en triplicat.

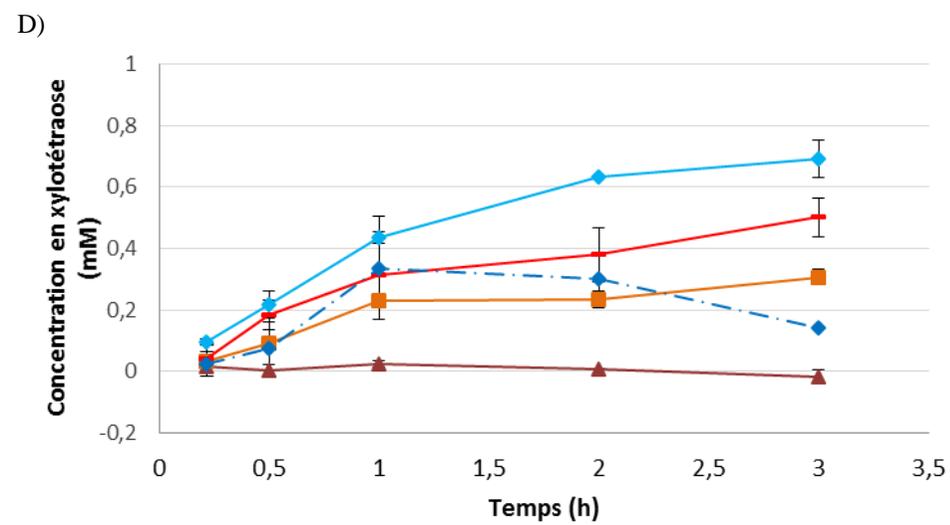
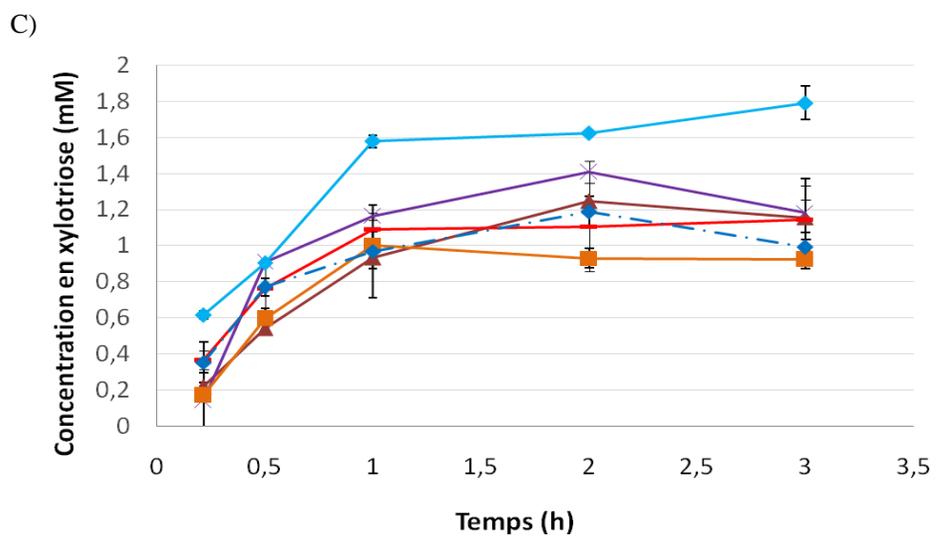
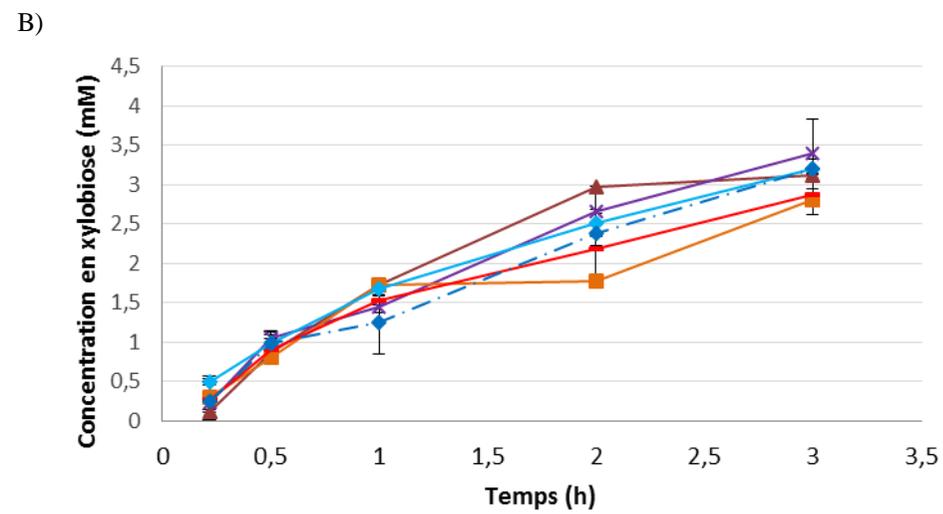
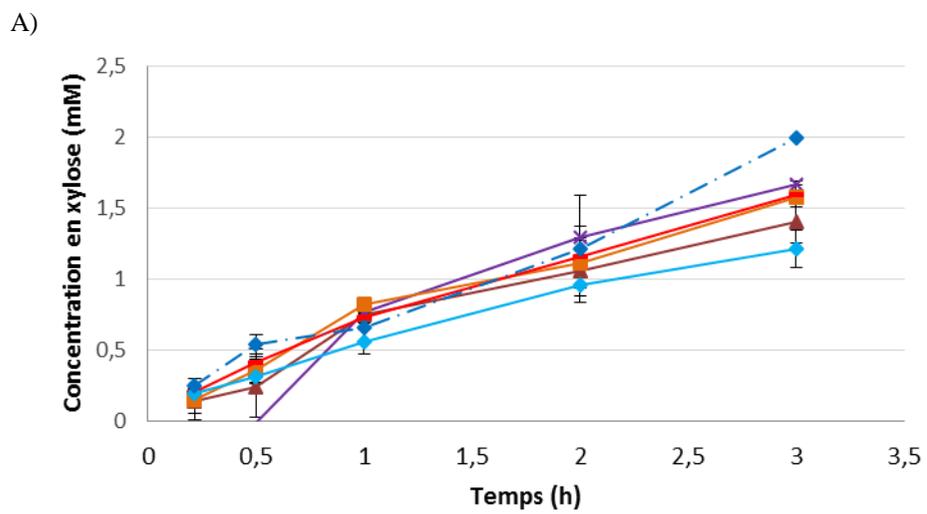
Parmi toutes les AXEs testées, seule la combinaison entre la xylanase et *Pm51* présente une activité supérieure à celle de la xylanase seule. L'ajout de *Pm51* à *NpXyn11A* permet de libérer 17 mM d'équivalent xylose après 3 heures de réaction contre 15 mM d'équivalent xylose pour *NpXyn11A* seule, soit une augmentation de 12 %. L'activité de *Pm51* favorise donc la dégradation des xylanes présents dans le son de blé par la xylanase. De plus, l'enzyme *Pm51* ne permet pas de dégrader le son de blé lorsqu'elle est utilisée seule (environ 0 mM d'équivalent xylose obtenu pendant toute la cinétique). Les enzymes *NpXyn11A* et *Pm51* agissent donc en synergie.

Afin d'obtenir des informations complémentaires, les xylooligosaccharides (du xylose au xylohexaose) produits durant l'hydrolyse ont été analysés par HPAEC-PAD d'après le protocole décrit dans le chapitre 2. 6. III, à l'exception de la concentration en AXE putative qui était de $2,3 \cdot 10^{-6}$ M.

La xylanase *NpXyn11A* produit davantage de xylooligosaccharides lorsque *Pm51* est ajouté au milieu réactionnel (Figure 75). Par exemple, 1,8 mM de xylotriose (produit majoritaire de la xylanase) ont été quantifiés après 3 heures de réaction pour *NpXyn11A* + *Pm51* contre 1 mM pour la xylanase seule, soit 44 % de plus. Par ailleurs, en présence de *Pm51*, *NpXyn11A* produit davantage de xylotétraose, de xylopentaose et de xylohexaose que la xylanase seule, avec respectivement 0,7 mM, 0,1 mM et 0,2 mM après 3 heures. A l'inverse, la xylanase seule dégrade le xylotétraose et le xylopentaose dès 2 heures de réaction et la quantité de xylohexaose est proche de 0, démontrant l'avancement de la réaction pour la xylanase seule qui, ne produisant plus de xylooligosaccharides d'un DP supérieure à 6, hydrolyse des xylooligosaccharides de plus petits DP, substrats non préférentiels. Il semblerait donc que *Pm51* clive des substitutions du xylane présent dans le son de blé, favorisant ainsi l'activité de *NpXyn11A* qui va produire plus de xylooligosaccharides.

Il apparaissait que la dégradation du son de blé était finie après 2 heures de réaction d'après l'allure des courbes de la Figure 74 mais la quantité des xylooligosaccharides évolue entre 2 et 3 heures de réaction (Figure 75). Il serait alors intéressant de refaire ces expériences avec des points après 3 heures de réaction.

A partir de la paille de blé broyée, aucune condition n'a permis d'améliorer l'hydrolyse de ce substrat par rapport à la xylanase seule (Figure 76).



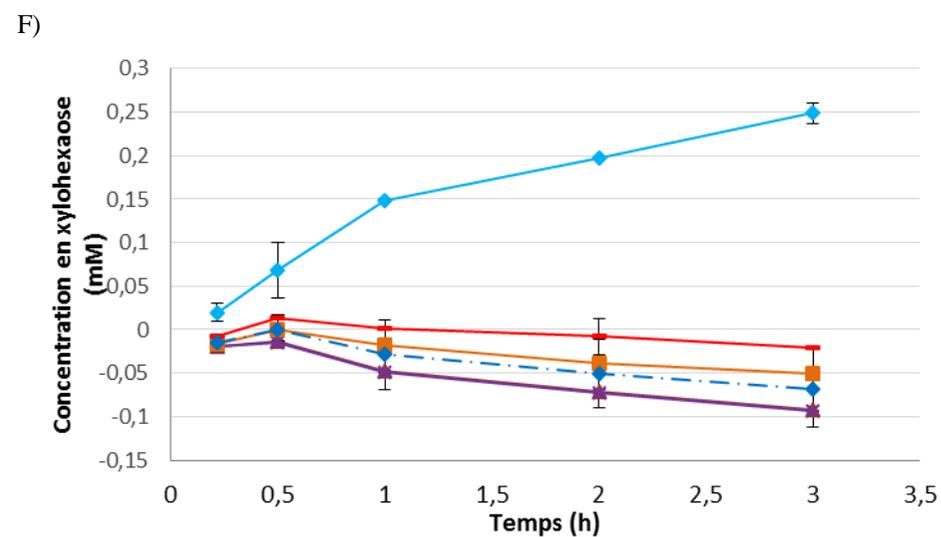
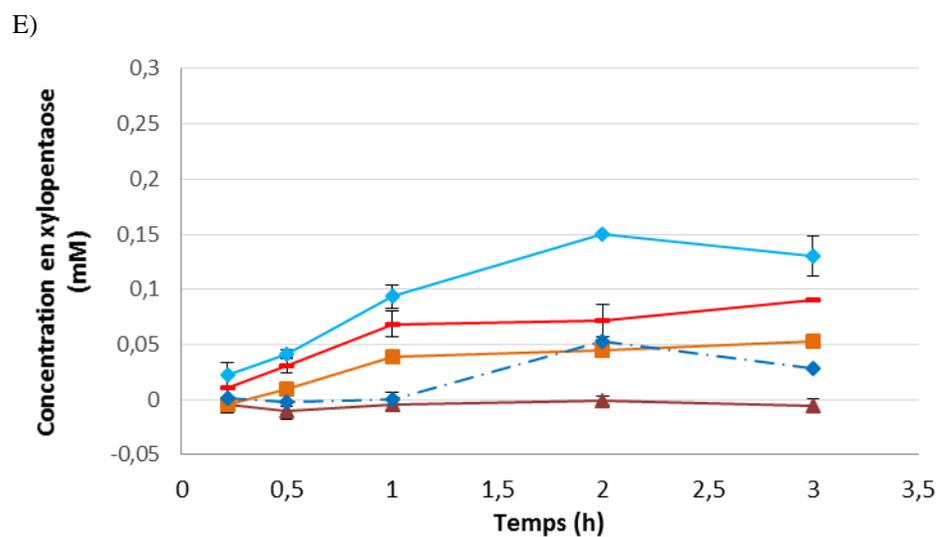


Figure 75 : Variation des concentrations en xylooligosaccharides au cours de l'hydrolyse du son de blé par *NpXyn11A* seule ou avec une AXE. Quantification de A) xylose ; B) xylobiose ; C) xylotriose ; D) xylo tétraose ; E) xylopentaose ; F) xylohexaose. En losange bleu foncé : *NpXyn11A* ; en triangle bordeau : E7 + *NpXyn11A* ; en croix violet : E8 + *NpXyn11A* ; en carré orange : *Pm13* + *NpXyn11A* ; en rouge : *Pm20* + *NpXyn11A* ; en losange bleu clair : *Pm51* + *NpXyn11A*. Expériences réalisées en triplicat.

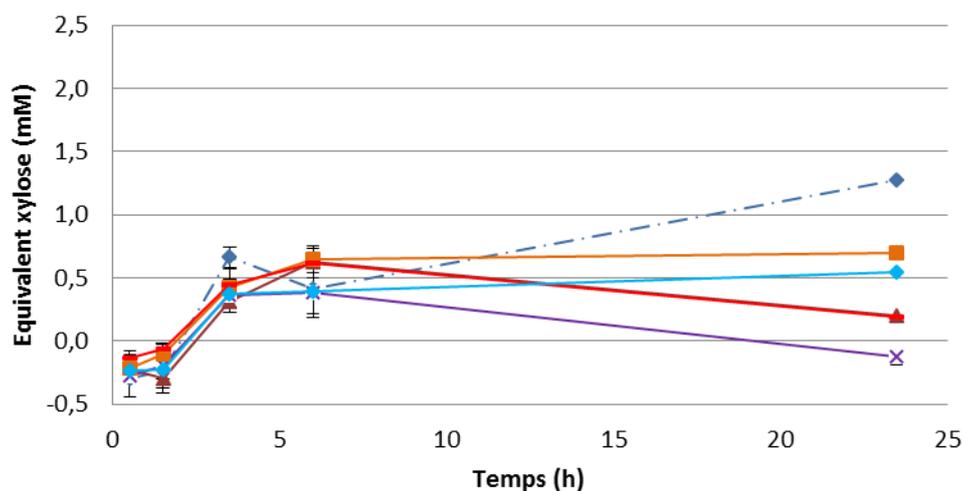


Figure 76 : Cinétique de dégradation de la paille de blé par *NpXyn11A* seule ou avec une AXE. En losange bleu foncé : *NpXyn11A* ; en triangle bordeaux : *E7 + NpXyn11A* ; en croix violet : *E8 + NpXyn11A* ; en carré orange : *Pm13 + NpXyn11A* ; en triangle rouge : *Pm20 + NpXyn11A* ; en losange bleu clair : *Pm51 + NpXyn11A*. Expériences réalisées en triplicat.

Les diverses études de la composition du son de blé n'ont pas mis en évidence la présence de groupements acétyles dans ce substrat (Chapitre 2. 4. II. c). De plus, la paille de blé contient des acides acétiques (Lynch et al., 1980), et pourtant l'ajout de *Pm51* ne permet pas d'augmenter la libération de xylooligosaccharides par la xylanase. Il se pourrait donc que *Pm51* ne soit pas une AXE comme proposé précédemment d'autant plus que son activité sur *pNP-Ace* est faible (Tableau 49). Le *pNP-Ace* ne serait alors pas assez discriminant pour l'activité AXE. D'autres substrats artificiels existent pour cribler les AXEs comme le 4-méthylumbelliféryle acétate (Shao and Wiegel, 1995) ou le α -naphthyle acétate (Poutanen and Puls, 1988) mais à l'heure actuelle l'enzyme *Pm51* n'a pas été étudiée sur ces substrats. Cette enzyme pourrait avoir une autre activité carbohydre estérase. En effet, elle a été classée dans la famille CE1 (CAZy, données non publiées) où on retrouve d'autres activités telles que féruloyle estérase ou cinnamoyle estérase. La présence d'acides féruliques dans le son de blé a été quantifiée à environ 0,5 % (Ralet et al., 1990). Il a d'ailleurs été montré que les acides féruliques relargués étaient plus importants en présence d'une xylanase de *Trichoderma viride* et de la féruloyle estérase FAE-III d'*Aspergillus niger* comparé à l'action de la FAE-III seule (Faulds and Williamson, 1995). Cette hypothèse ne semble pas être la bonne car *Pm51* n'a pas d'activité sur du 4-nitrocatéchol-férulate et du X-férulate qui sont des substrats modèles pour la détection de féruloyle estérases (données non publiées des Drs. Pablo Alvira et Gregory Arnal).

Afin d'approfondir cette synergie d'action entre la *NpXyn11A* et *Pm51* sur le son de blé, il serait intéressant d'associer ces deux enzymes *via* le système JoIn et de comparer l'activité aux enzymes libres. L'étude de l'effet de proximité spatiale entre les domaines catalytiques pourrait également être entreprise en produisant un des deux modules en fusion avec Jo en position N- ou en C-terminale. En effet, Jo et In s'associent tête-bêche. Par le simple fait de placer le module Jo du côté N- ou C-terminal, il est possible de placer les domaines catalytiques soit de part et d'autre du complexe JoIn, soit du même côté, ce qui joue artificiellement sur la distance séparant les deux domaines catalytiques. Ces associations pourraient également être testées sur les coupes d'entre-nœud de paille de blé.

2. Influence du domaine catalytique sur la reconnaissance du ligand du CBM

Lors de l'étude de la modularité de l'enzyme avec un CBM et un module catalytique nous avons utilisé l'enzyme multimodulaire purifiée. Le rôle des CBMs est clairement identifié. Il permet de cibler le substrat de l'enzyme auquel il est associé (Hervé et al., 2009) ou bien de cibler des zones de la paroi végétale en cours de dégradation (Montanier et al., 2009). Mais dans le cas d'une enzyme multimodulaire présentant un ou plusieurs CBMs et un domaine catalytique, et dans le contexte de la paroi végétale, quelle est l'influence du domaine catalytique sur cet effet de ciblage ? Afin d'apporter des éléments de réponse, il serait intéressant de comparer la géolocalisation de l'enzyme multimodulaire In*NpXyn11A*-JoCBM3a préalablement purifiée à celle de la même enzyme mais associée *in muro* après la fixation du CBM sur le substrat. Des travaux préliminaires ont été menés dans ce sens avec In*sfGFP* (In fusionné avec *sfGFP*, un variant de la protéine GFP qui peut se replier correctement après avoir été sécrété (Dammeyer and Tinnefeld, 2012)) et JoCBM3a. Une fois le protocole mis au point avec In*sfGFP* et JoCBM3a, la géolocalisation de l'enzyme In*NpXyn11A*-JoCBM3a aurait pu être étudiée dans ces conditions (domaines associés en amont et purifiés ou associés *in muro*). Cela aurait également pu être réalisé pour d'autres couples enzyme-CBM.

Diverses études ont utilisé un CBM lié à une molécule fluorescente comme la GFP (Bras et al., 2011; Ding et al., 2006; Hervé et al., 2010; Porter et al., 2007) dont le couplage CBM3a-GFP (Dagel et al., 2011) ou CBM-FITC (Hildén et al., 2003). Cette approche est

donc envisageable. La protéine *InsfGFP* a été choisie par rapport à *InDsRed* car le signal était plus important en microscopie confocale (données non publiées du Dr. Cédric Montanier). La première partie des tests nous a permis de définir une concentration en JoCBM3a adéquate. A cette concentration, la protéine peut se fixer sur la cellulose présente dans une coupe d'entre-nœud de paille de blé et être détectée par un anticorps primaire anti-tag histidine suivi d'un anticorps secondaire, couplé à une molécule FITC, détectant l'anticorps primaire. Malgré l'utilisation d'une gamme de concentrations croissantes en *InsfGFP*, le signal de la GFP n'a pas pu être détecté suggérant que le complexe JoIn ne s'était pas correctement formé. Le CBM3a lié à la cellulose pourrait entraîner un repliement de Jo le rendant indisponible pour créer la liaison JoIn. Des études RMN préliminaires ont en effet démontré le caractère très désordonné de Jo (données non publiées des Drs. Cédric Montanier et Guy Lippens). Il se pourrait également qu'après formation de la protéine multimodulaire JoCBM3a-*InsfGFP*, la structure de GFP n'émette pas de fluorescence. En effet, le couplage direct entre le CBM et un tag fluorescent pourrait inactiver la protéine comme évoqué par McCartney et collaborateurs (McCartney et al., 2004) à cause d'une interférence entre le fluorophore et le site de liaison du CBM (Knox, 2012). Il a également été décrit que le repliement de la protéine fluorescente qui a une taille importante (Chapitre 1. 12. III, Figure 27), pourrait réduire la capacité de reconnaissance du ligand par le CBM en couvrant son site de liaison au ligand (Paës, 2014). Pour information, la taille d'une protéine fluorescente est de 20 kDa contre 1 kDa pour un fluorophore. Une autre possibilité est la formation d'oligomères de ces protéines fluorescentes comme observé pour la *DsRed* et qui vont perturber la protéine associée (Baird et al., 2000; Lauf et al., 2001). La formation de protéines multimodulaires directement sur coupes n'est donc pas facile et nécessite davantage de travail. Nous envisageons donc d'utiliser le CBM2b1, afin de cibler une autre région de la paroi et peut-être s'affranchir d'une partie des contraintes décrites plus haut.

3. Etude immunocytochimique sur des sections entière de paille de blé

Le contexte des xylanes ciblés a été étudié en travaillant sur de la paille de blé broyée ou sous forme de coupes. Nous proposons ici de se rapprocher d'un substrat naturel en travaillant directement avec des morceaux d'entre-nœuds de paille de blé. Les enzymes pourront-elles diffuser au sein du morceau et dégrader les xylanes ?

Des études antérieures ont déjà été conduites non pas sur des coupes de végétaux, mais sur des morceaux entiers. Par exemple, un travail sur la distribution des ions calcium dans les pectines a été réalisé grâce à un traitement chimique sur des échantillons de 1 mm³ de lin (Jauneau et al., 1992). Cette équipe a ensuite suivi l'hydrolyse des acides galacturoniques des pectines par une polygalacturonase (Novo Industries) afin de déterminer les caractéristiques des pectines dans les parois cellulaires du lin (Jauneau et al., 1994). Nous avons adapté cette méthodologie pour la digestion de morceaux d'entre-nœuds de paille de blé par nos enzymes pour savoir comment ces enzymes accédaient aux xylanes présents dans la paille. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Alain Jauneau (plateforme d'Imagerie cellulaire de la Fédération de Recherche Agrobiosciences Interactions et Biodiversité) et le Pr. Vincent Burlat.

Nous avons utilisé des échantillons d'entre-nœud de paille de blé de 1 cm de longueur. Ils ont été digérés par *NpXyn11A*, *InNpXyn11A* ou *InNpXyn11A-JoCBM3a* puis ont été inclus dans de la résine avant découpe. Cette approche nous a permis de travailler sur des coupes de 1 µm d'épaisseur. La cellulose et les xylanes ont été marqués avec le calcofluor white et l'anticorps LM11 respectivement, comme décrit dans les chapitres 2. 7 et 2. 8, à l'exception de l'incubation avec le LM11 qui n'a duré que 30 minutes. Dans notre cas, le calcofluor white se lie aux β-glucanes dont la cellulose (Knox, 2012; Sauter et al., 1993) mais d'autres polymères peuvent être colorés comme les xyloglucanes, la chitine ou le lichenane. La quantification des images obtenues n'a pas été réalisée car pour cela il est nécessaire de travailler avec des coupes sériées qui représentent exactement la même région d'un entre-nœud. L'hydrolyse sur coupes d'entre-nœuds de paille de blé ou sur morceaux nécessite une technique adaptée (inclusion, microscopie), chacune ayant des avantages et des inconvénients. L'inclusion dans la résine altère la structure de la paroi avec probablement des modifications des propriétés des polymères, rendant l'interprétation des données plus complexe (McCann et al., 1990; Thimm et al., 2000). Par exemple, les arabinoxylanes peuvent être extraits ou s'agréger ce qui diminue l'intensité des arabinoxylanes détectés (Guillon et al., 2004). Par ailleurs, l'utilisation de la microscopie confocale ne permet pas de scanner les lames à haut débit mais les avantages sont le plus fort grossissement et la résolution des images.

L'intégrité de la structure de la tige de blé est conservée quel que soit le traitement enzymatique (Figure 77) mais l'intensité de la fluorescence est moindre après action

enzymatique (Figure 78). La diminution du marquage des xylanes peut simplement s'expliquer par l'action du module catalytique. Or les différentes enzymes utilisées, *NpXyn11A*, *InNpXyn11A* et *InNpXyn11A-JoCBM3a*, n'ont *a priori* pas d'activité sur la cellulose. Celle-ci est étroitement liée aux xylanes (Bornscheuer et al., 2014; Shallom-Shezifi and Shoham, 2003), elle pourrait donc plus facilement se détacher de l'entre-nœud lors de l'hydrolyse des xylanes (Figure 77A, Figure 77B et Figure 77C).

En parallèle, après dégradation enzymatique, l'épiderme et le sclérenchyme se détachent de l'entre-nœud (Figure 77 et Figure 78). Les xylanes présents autour des chambres stomatales pourraient consolider cette structure or lors de l'hydrolyse des xylanes par une des xylanases, la structure serait fragilisée. Les enzymes seraient alors rentrées dans les chambres stomatales par les cellules stomatales qui sont naturellement présentes dans le substrat, s'ouvrant et se fermant lors de la respiration des cellules végétales (Hornsby et al., 1997). Par ailleurs, ceci n'a pas pu être observé dans le cas d'une inclusion en paraffine (Chapitre 5. 2) car les échantillons déchirés se seraient détachés de la lame. Or ici, l'inclusion a été réalisée avec de la résine, fixant la structure de l'entre-nœud après digestion enzymatique. Ainsi, si le sclérenchyme et l'épiderme sont détachés du parenchyme dans la coupe observée mais qu'ils restent attachés à la structure de l'entre-nœud en amont ou en aval, ils ne se décolleront pas de la lame.

De plus, nous observons que l'épaisseur des xylanes détectés dans le parenchyme a diminué après hydrolyse enzymatique (Figure 77 et Figure 78). En effet, les xylanes présents dans le parenchyme sont répartis sur une épaisseur d'environ 230 μm pour le contrôle et de 120 à 130 μm après dégradation par une des enzymes (Figure 77). Il semblerait donc que les enzymes puissent également dégrader les xylanes à partir du chaume, en commençant par les xylanes présents dans le parenchyme puis en atteignant le reste de la structure.

La fluorescence observée dans le cas de la dégradation par *InNpXyn11A-JoCBM3a* est inférieure à celle du traitement enzymatique par *InNpXyn11A* qui elle-même est inférieure à celle de l'hydrolyse par l'enzyme sauvage (Figure 78A, Figure 78B et Figure 78C). L'enzyme multimodulaire semble donc dégrader davantage de xylanes que les autres enzymes. Or lors de la digestion directement sur coupes d'entre-nœuds de paille de blé, l'enzyme *InNpXyn11A* était l'enzyme la plus active (Chapitre 5. 2. IV). Par ailleurs, la concentration et l'activité spécifique sur *pNP-X₃* de *InNpXyn11A-JoCBM3a* sont plus faibles que pour les autres enzymes. En effet, les activités spécifiques sur *pNP-X₃* de *NpXyn11A*,

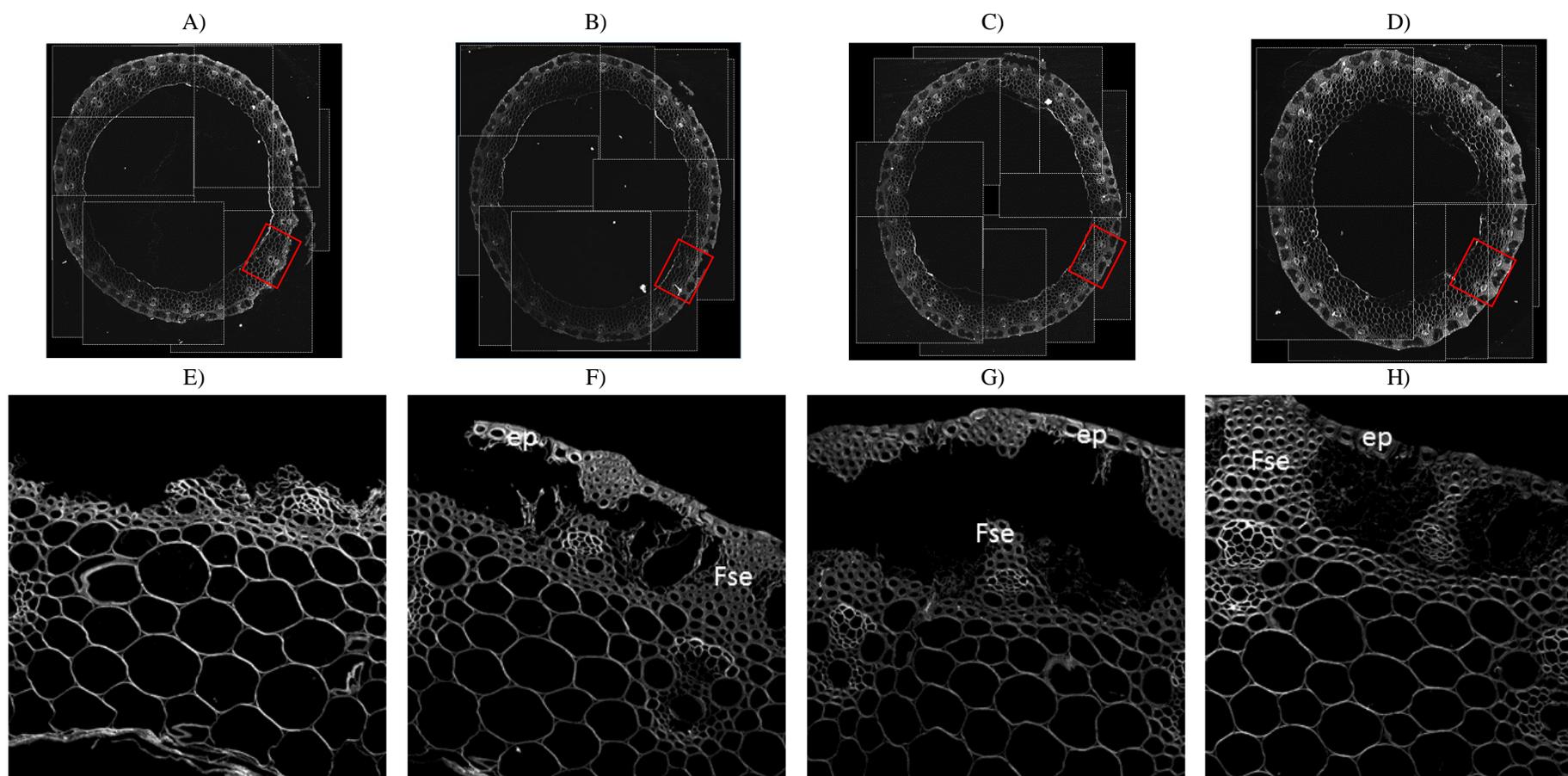


Figure 77 : Marquage de la cellulose dans des sections de paille de blé issues d'échantillons de 1 cm traités par *NpXyn11A*, *InNpXyn11A* ou *InNpXyn11A-JoCBM3a*.

A) et E) : digestion par *NpXyn11A* à $7,6 \cdot 10^{-6}$ M et marquage (calcofluor white). B) et F) : digestion par *InNpXyn11A* à $7,6 \cdot 10^{-6}$ M et marquage (calcofluor white). C) et G) : digestion par *InNpXyn11A-JoCBM3a* à $2,65 \cdot 10^{-6}$ M et marquage (calcofluor white). D) et H) : tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 7 et marquage au calcofluor white ; digestion 24 heures à 37 °C. Les étapes de marquage et la microscopie ont été réalisées par le Dr. Alain Jauneau, plateforme d'Imagerie cellulaire. A), B), C) et D) : Plusieurs images ont été nécessaires pour reconstituer la coupe globale ; E), F), G) et H) : zooms schématisés en rouge sur les figures A à D. ep : épiderme composé d'une assise cellulaire ; Fse : fibres de sclérenchyme sous épidermique.

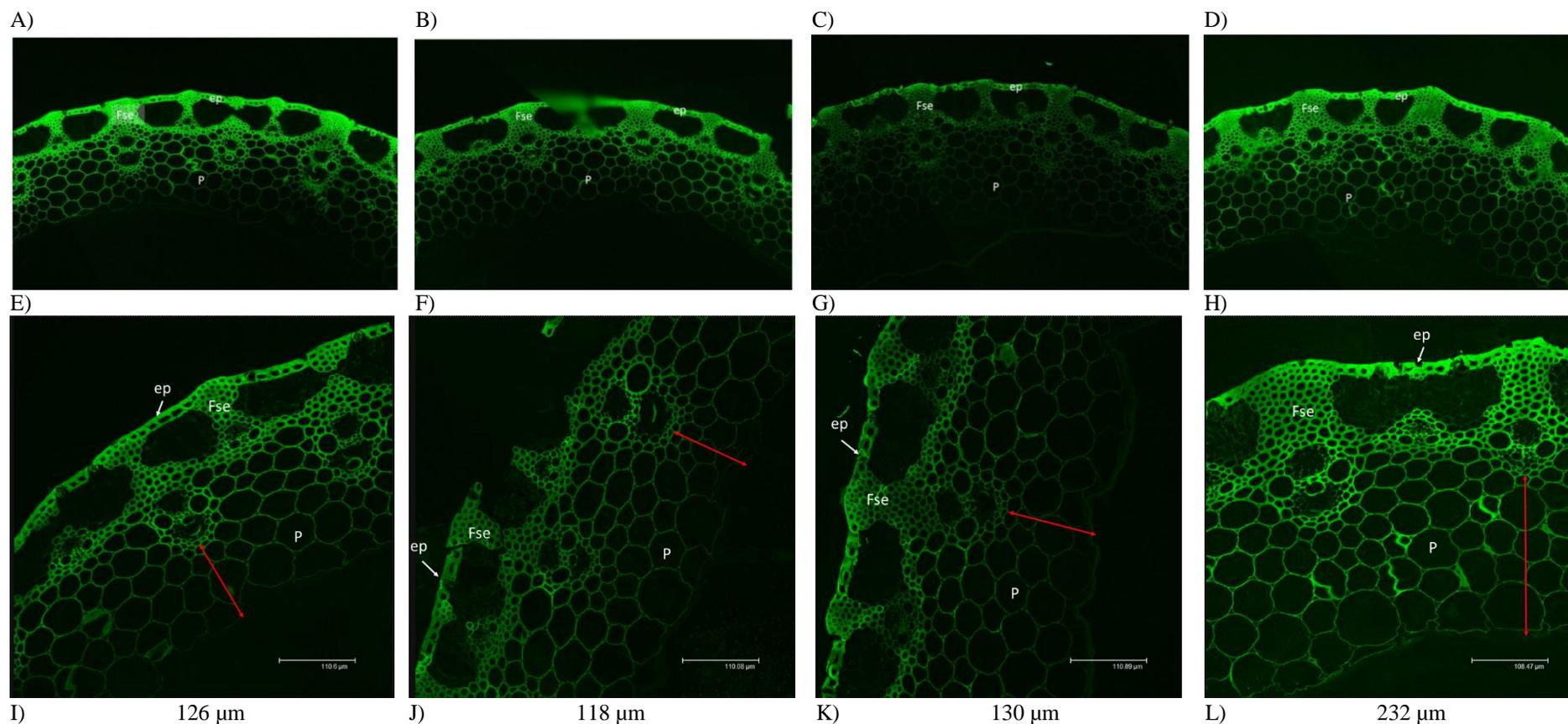


Figure 78 : Marquage des xylanes dans des sections de paille de blé issues d'échantillons de 1 cm traités par *NpXyn11A*, *InNpXyn11A* ou *InNpXyn11A-JoCBM3a*. A) et E) : digestion par *NpXyn11A* à $7,6 \cdot 10^{-6}$ M et marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC). B) et F) : digestion par *InNpXyn11A* à $7,6 \cdot 10^{-6}$ M et marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC). C) et G) : digestion par *InNpXyn11A-JoCBM3a* à $2,65 \cdot 10^{-6}$ M et marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC). D) et H) : contrôle avec le tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 7 et marquage (LM11 + Ac anti rat-FITC) ; digestion 24 heures à 37 °C. Les étapes de marquage ont été réalisées par Noureldin Youssef (stagiaire en master dans notre équipe). La microscopie a été réalisée par les Drs. Aurélie Le Ru et Alain Jauneau, A), B), C) et D) : images prises au Nanozoomer ; E), F), G) et H) : images prises en microscopie confocale. I) épaisseur du parenchyme depuis l'image E) ; J) épaisseur du parenchyme depuis l'image F) ; K) épaisseur du parenchyme depuis l'image G) ; L) épaisseur du parenchyme depuis l'image H). ep : épiderme composé d'une assise cellulaire ; Fse : fibres de sclérenchyme sous épidermique ; P : cellules de parenchyme ; flèche rouge : distance entre un faisceau vasculaire et la matrice interne dont la valeur est écrite sous l'image.

In*Np*Xyn11A et In*Np*Xyn11A-JoCBM3a sont respectivement égales à 4,86 UI.mg⁻¹, 2,99 UI.mg⁻¹ et 2,30 UI.mg⁻¹. La forte activité de l'enzyme multimodulaire ne proviendrait pas des conditions expérimentales mais des propriétés du CBM3a qui faciliterait la dégradation des xylanes par le module catalytique associé. Dans les morceaux d'entre-nœuds le phénomène de diffusion des enzymes est pris en compte contrairement à l'étude des entre-nœuds inclus en paraffine et coupés avant digestion. En effet, cette méthode a plusieurs avantages comme l'absence de tout traitement sur le substrat avant la dégradation enzymatique, des coupes plus fines et qui ne se décrochent pas en cas d'utilisation de l'enzyme à une concentration trop élevée.

Des tests complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces conclusions et étudier la diffusion des enzymes. Le CBM3a interagit de manière réversible avec la cellulose cristalline (Carrard et al., 2000), nous n'avons pas vérifié que l'enzyme In*Np*Xyn11A-JoCBM3a se détachait de la paille de blé à la fin de l'incubation. Or d'autres études ont utilisé la protéinase K en fin de dégradation enzymatique pour protéolyser les enzymes et s'assurer ainsi que les durées de dégradation étaient identiques pour l'ensemble des enzymes étudiées (Hervé et al., 2010). En effet, l'hypothèse de ce travail est l'absence des enzymes lors des étapes de marquage. Plusieurs expériences ont été proposées pour confirmer cette hypothèse (Chapitre 5. 2. IV. a).

D'autres approches pourraient être mises en œuvre comme la redistribution de la fluorescence après photoblanchiment (fluorescence recovery after photobleaching ou FRAP en anglais). Cette technique a été utilisée sur des gels ou des films composés d'arabinoxylanes feruloylés, de DHP (dehydrogenation polymer, modèle de la lignine) et de nanocristaux de cellulose (Fong et al., 2016; Paës and Chabbert, 2012). Lors de l'étude d'une endoglucanase GH45 seule, associée à un CBM1 ou à ce CBM1 répété cinq fois (renommé CBM5), il semblerait que le CBM5 limite les interactions non spécifiques du module catalytique avec la lignine (Fong et al., 2016). Dans notre cas, la présence d'In-JoCBM3a dans l'enzyme In*Np*Xyn11A-JoCBM3a pourrait éventuellement avoir ce rôle. Cependant, les gels utilisés au cours du travail de Paës et collaborateurs sont des modèles de la paroi secondaire. Les interactions entre les polymères sont inconnues et ne représentent probablement pas les interactions retrouvées dans un substrat naturel.

Conclusion générale

La matrice composant la paroi des cellules végétales est un enchevêtrement complexe de cellulose, d'hémicelluloses, de pectines et de lignines. Cette matrice confère aux parois des cellules végétales une résistance aux attaques biologiques et chimiques (Fontes and Gilbert, 2010). Certains microorganismes peuvent dégrader cette biomasse lignocellulosique en produisant une large variété d'activités enzymatiques. Ces enzymes sont majoritairement des glycosides hydrolases (GHs) comprenant un ou plusieurs modules catalytiques et/ ou non catalytiques. Parmi les modules non catalytiques on retrouve des carbohydrate-binding modules (CBMs) qui jouent plusieurs rôles. Ils ciblent dans un substrat complexe leur ligand qui est le substrat de l'enzyme à laquelle ils sont associés ou à proximité de ce substrat, ils favorisent un contact étroit et prolongé entre le module catalytique et son substrat et par conséquent améliorent l'efficacité de l'enzyme. Ces enzymes multimodulaires peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire sous forme libre par des microorganismes aérobies ou être assemblées dans un complexe multienzymatique, nommé cellulosome, et lié à la membrane de microorganismes anaérobies. Les enzymes forment alors un cocktail présentant des activités hydrolytiques complémentaires, fonctionnant de manière synergique. Cette activité est également renforcée dans le cas du cellulosome par la proximité spatiale entre les enzymes (Fierobe et al., 2002).

Les enzymes multimodulaires sont majoritairement étudiées sur des substrats artificiels ou purifiés. Cette approche conduit à sous-estimer deux aspects importants : i) les interactions spécifiques qui existent entre l'enzyme et son substrat "naturel" conduisant à l'hydrolyse. En effet, en présence d'un substrat simple, les conditions de reconnaissance ne sont pas pleinement satisfaites, ce qui pourrait conduire à une mauvaise estimation ou compréhension de l'activité enzymatique *in situ* ; ii) l'accessibilité de l'enzyme à son substrat, qui se retrouve considérablement facilitée dans le cas de substrats solubles ou purifiés, à l'inverse d'un substrat enfoui dans la complexité de la matrice de la paroi végétale. Afin d'apporter des éléments de réponse à ces questions et pour mieux comprendre les stratégies naturelles de déconstruction de la biomasse lignocellulosique par les microorganismes, nous proposons dans cette thèse d'étudier l'activité d'enzymes multimodulaires sur des substrats naturels comme la paille ou le son de blé.

Les enzymes multimodulaires utilisées dans cette thèse sont des protéines chimériques. Elles sont composées d'un domaine catalytique, la xylanase *NpXyn11A* de *Neocallimastix patriciarum* (Vardakou et al., 2008) et d'un domaine de reconnaissance des sucres, le CBM qui est le CBM3a de *Clostridium thermocellum* (Poole et al., 1992) ou le CBM2b1 de *Cellulomonas fimi* (Millward-Sadler et al., 1994). La xylanase hydrolyse en oligosaccharides les xylandes, polymères de xyloses plus ou moins substitués, et les CBMs ciblent la cellulose et les xylandes respectivement. Ces modules sont associés de manière covalente par l'intermédiaire de deux petites protéines, Jo et In, qui ont la particularité de former entre-elles une liaison covalente spontanée (Izoré et al., 2010). Ces protéines sont issues d'un pilus de *Streptococcus pneumoniae*. Elles ont été exprimées en fusion avec le module catalytique ou un des CBMs, ce qui permet d'associer les différents domaines à façon de manière versatile.

Dans un premier temps (Chapitre 3), l'emploi du système Jo-In a été validé sur la xylanase et les différents CBMs. Ce chapitre décrit les différentes constructions des protéines chimériques, leur expression, leur purification et la caractérisation de leurs propriétés biochimiques. Pour les protéines CBM2b1, InCBM2b1, JoCBM2b1, InCBM3a et Jo*NpXyn11A*, une optimisation de la production a été réalisée afin d'obtenir suffisamment de protéines pour permettre leur étude. Les paramètres cinétiques des différentes constructions de xylanases ont ensuite été déterminés sur du xylane de hêtre. L'activité du module catalytique n'a pas été modifiée par la présence du module Jo ou In comparé à l'enzyme sauvage (valeurs similaires du k_{cat}/K_M app). En parallèle, l'affinité de CBM3a ou des protéines chimériques (JoCBM3a et InCBM3a) pour des nanocristaux de cellulose a été évaluée sous la forme d'un EC_{50} par microthermophorèse. Les protéines JoCBM3a et CBM3a présentaient des valeurs d' EC_{50} similaires alors qu'InCBM3a présentait un EC_{50} dix fois plus grand que celui de la protéine sauvage. L'ajout d'In influence donc les propriétés du CBM3a et en conséquence, InCBM3a n'a pas été utilisé dans la suite de cette thèse. Par ailleurs, l'affinité entre le CBM2b1 ou les protéines chimériques et du xylohexaose a été quantifiée par RMN. La constante d'association de JoCBM2b1 pour ce ligand est inférieure d'un facteur $1,4 \cdot 10^6$ à celle du CBM2b1. Cette protéine n'a pas non plus été utilisée dans la suite de cette étude. A l'inverse, la constante d'association d'InCBM2b1 pour le xylohexaose est similaire à celle de la protéine sauvage ce qui valide l'utilisation de cette protéine.

Le chapitre 4 nous a permis d'étudier l'influence de la présence du CBM3a sur l'activité de la xylanase. A partir des différentes constructions validées lors du chapitre précédent, l'association d'In*NpXyn11A* avec JoCBM3a ou Jo afin de former les enzymes multimodulaires In*NpXyn11A*-JoCBM3a ou In*NpXyn11A*-Jo respectivement a été décrite. Par la suite, les activités de chaque enzyme (enzymes libres et enzymes multimodulaires) ont été déterminées sur des substrats de complexité croissante : sur des substrats solubles (substrat chromogénique et xylane de hêtre) puis sur des substrats insolubles (son et paille de blé broyés). Sur les *pNP-X₃*, les enzymes *NpXyn11A* et In*NpXyn11A* avaient des activités similaires alors que sur le xylane de hêtre et les substrats insolubles, l'ajout du module In avait un impact négatif sur l'activité du module catalytique. Par exemple, la production de xylotriose (le produit majeur du module catalytique) à partir de son de blé était 2 fois plus importante dans le cas de l'enzyme sauvage après 1h30 de réaction. Ceci pourrait s'expliquer par la topologie du module In comprenant un canyon et la nature des chaînes latérales des résidus du canyon. En effet, ces deux caractéristiques sont proches des propriétés de certains CBMs de type B reconnaissant divers ligands dont les xylanes. In pourrait alors interagir de manière fortuite avec le xylane ce qui limiterait l'action du module catalytique. En parallèle, les enzymes multimodulaires In*NpXyn11A*-JoCBM3a ou In*NpXyn11A*-Jo étaient moins actives que *NpXyn11A* sur les substrats solubles et leur activité était plus faible voire indétectable sur les substrats insolubles. La taille de ces enzymes étant plus importante que celle de l'enzyme sauvage ou d'In*NpXyn11A*, leur diffusion serait plus lente.

Dans le chapitre 5, nous avons travaillé avec In*NpXyn11A*-JoCBM3a et des protéines libres sur des sections de paille de blé non traitées. Ces coupes, contrairement à la paille broyée utilisée dans le chapitre précédent, présentent une organisation cellulaire dont chaque zone (épiderme, parenchyme, sclérenchyme) a une composition en polymères spécifique. Par une approche immunocytochimique, en marquant les polymères de la paroi végétale à l'aide de sondes fluorescentes, nous avons étudié sur ces coupes la géolocalisation de l'activité de *NpXyn11A* avec ou sans CBM3a. En effet, l'organisation en cellules différenciées est conservée sur les coupes. Ces cellules différenciées ont des rôles et compositions spécifiques, favorables ou non à l'hydrolyse enzymatique. Nous souhaitons ainsi mettre en avant l'impact du contexte de la cible de notre enzyme sur son activité *in muro*. Dans un premier temps, nous

avons étudié l'impact de plusieurs méthodes de quantification de la fluorescence afin de choisir la méthode la plus appropriée. Cette étude nous a permis de mettre en lumière une différence d'un facteur 8 entre le pourcentage de fluorescence résiduelle pour l'épiderme et le sclérenchyme entre la méthode 1 et la méthode 2 à partir des mêmes images, pouvant conduire à une mauvaise interprétation des résultats. La méthode 2 a été choisie car elle prend en compte un nombre plus grand de zones pour la quantification, ces zones sont plus précises ce qui rend la méthode plus fiable. La méthode d'analyse définie a été appliquée à l'ensemble de nos résultats. Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'importance de la concentration en *NpXyn11A* utilisée pour dégrader les échantillons sur la quantité de xylandes résiduels détectés. La concentration en *NpXyn11A* de 0,2 g.L⁻¹ a été choisie car elle permet de répondre à plusieurs objectifs tels que le niveau mesurable de l'activité de la xylanase et une marge de manœuvre suffisante permettant de mettre en évidence des variations de cette activité en fonction de la modularité de l'enzyme. Il semblerait que l'utilisation d'un cocktail commercial cellulolytique influence légèrement la dégradation des xylandes par *NpXyn11A*. Par ailleurs, l'activité d'*InNpXyn11A* est plus élevée d'un facteur 24 sur les xylandes du parenchyme et de la matrice interne par rapport à celle de l'enzyme sauvage. L'enzyme multimodulaire *InNpXyn11A*-JoCBM3a n'est pas l'enzyme la plus active mais la présence du CBM3a cible des xylandes ayant une géolocalisation différente des cibles d'*InNpXyn11A* et qui par ailleurs, n'ont pas été hydrolysés par l'enzyme sauvage. Pour finir, sur les sections de paille de blé, l'enzyme la plus active est *InNpXyn11A* alors que sur paille de blé broyée il s'agissait de *NpXyn11A*. Cette différence entre la paille de blé sous forme broyée et sous forme de coupes met en évidence l'importance de prendre en compte le contexte des xylandes ciblés par la xylanase.

Enfin, le chapitre 6 de ce manuscrit nous a permis de regrouper des résultats issus d'expériences préliminaires non finalisées mais nous permettant de proposer plusieurs perspectives. La dégradation de substrats complexes nécessite bien évidemment plusieurs activités enzymatiques. Or nous nous sommes limités dans cette thèse à une seule enzyme. Dans notre équipe et grâce aux travaux réalisés sur des projets antérieurs, nous bénéficions d'enzymes auxiliaires découvertes dans des banques métagénomiques issues du ver *Pontoscolex corethrurus* ou du termite *Pseudacanthotermes militaris*. Ces enzymes sont des acétyl xylane estérases putatives (AXE), débranchant les groupements acétyles substituant

certains des xyloses de xylanes. Nous avons mis en lumière une augmentation de 44 % d'oligosaccharides produits par *NpXyn11A* en présence de l'une de ces AXE sur le son de blé mais pas sur la paille de blé. Ce résultat nous interroge sur le véritable substrat de cette AXE. Une des perspectives de cette thèse est de mieux caractériser le rôle de ces enzymes auxiliaires. Nous souhaiterions également utiliser notre approche d'association JoIn pour former des enzymes multimodulaires possédant plusieurs domaines catalytiques afin d'étudier l'impact de cette proximité spatiale entre domaines sur la synergie des activités enzymatiques. Nous avons également travaillé non pas sur des coupes de paille de blé traitées par une enzyme, mais sur un bloc entier de paille de blé traité par une enzyme découpé ensuite en fines sections et analysé, toujours en immunocytochimie. Nous ajoutons ainsi un niveau de complexité, puisque l'enzyme doit pouvoir diffuser dans l'échantillon. Les premiers résultats ont montré que nous retrouvons des profils d'activités en fonction de l'enzyme multimodulaire, puisqu'*InNpXyn11A-JoCBM3a* semble avoir une activité plus importante que celle des autres enzymes, *NpXyn11A* ou *InNpXyn11A*. Ces informations pourront être confirmées avec des expériences complémentaires pour vérifier l'absence des enzymes lors des étapes de marquage. Les enzymes semblent ainsi pénétrer dans l'échantillon, soit par le chaume pour dégrader les xylanes du parenchyme, soit par les cellules stomatales pour hydrolyser les xylanes du sclérenchyme. La littérature décrit très bien le rôle des CBMs pour cibler un ligand et favoriser un contact étroit et prolongé entre le domaine catalytique auquel il est associé et son substrat (Bolam et al., 1998; Ferreira et al., 1993; Hall et al., 1995). Mais dans le contexte d'un échantillon brut, nous souhaiterions aller plus loin et questionner le rôle de l'enzyme et du couple enzyme/ CBM sur ce rôle d'adressage et d'activité enzymatique *in muro*.

En conclusion, cette thèse nous a permis de développer l'utilisation des protéines Jo et In pour faire des enzymes multimodulaires à façon, ce qui doit nous permettre d'investiguer de manière plus systématique le rôle des enzymes multimodulaires dans la déconstruction de la biomasse végétale. Nous avons également démontré l'importance du contexte de la cible de l'enzyme et de la complexité du substrat (substrat soluble et purifié, substrat complexe et insoluble broyé ou entier) et son impact sur les activités enzymatique. Cela soulève même la manière dont il faudrait définir une activité enzymatique. La définir par rapport à un substrat soluble simple qui permet certes de classer et de comparer les enzymes mais qui ne reflète

peut-être pas son véritable rôle *in muro* ? Ou bien par rapport à une activité prenant en compte le contexte naturel ? Faut-il alors définir une notion supplémentaire de classification en fonction de ce contexte naturel ? On peut y réfléchir, mais pour cela, il faudrait être capable de faire de l'enzymologie autrement et de manière systématique, ce qui implique de mieux comprendre le fonctionnement des enzymes et sans doute de nouvelles avancées technologiques.

Références bibliographiques

- Abbott, D.W., Boraston, A.B., 2012. Quantitative approaches to the analysis of carbohydrate-binding module function, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc., pp. 211–231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415931-0.00011-2>
- Abou Hachem, M., Nordberg Karlsson, E., Bartonek-roxa, E., Raghothama, S., Simpson, P.J., Gilbert, H.J., Williamson, M.P., Holst, O., 2000. Carbohydrate-binding modules from a thermostable *Rhodothermus marinus* xylanase: cloning, expression and binding studies. *Biochem. J.* 345, 53–60. <https://doi.org/10.1042/bj3450053>
- Abuja, P.M., Schmuck, M., Pilz, I., Tomme, P., Claeysens, M., Esterbauer, H., 1988. Structural and functional domains of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Eur. Biophys. J.* 15, 339–342. <https://doi.org/10.1007/BF00254721>
- AGP, 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 85, 531–553. <https://doi.org/10.2307/2992015>
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., Staehelin, A., 2010. Plant cell walls from chemistry to biology.
- Araki, R., Ali, M.K., Sakka, M., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K., 2004. Essential role of the family-22 carbohydrate-binding modules for beta-1,3-1,4-glucanase activity of *Clostridium stercorarium* Xyn10B. *FEBS Lett.* 561, 155–158. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00160-7)
- Arbel, N., Ben-Hail, D., Shoshan-Barmatz, V., 2012. Mediation of the antiapoptotic activity of Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein. *J. Biol. Chem.* 287, 23152–23161. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.345918>
- Argos, P., 1990. An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *J. Mol. Biol.* 211, 943–958. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90085-Z](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90085-Z)
- Arnal, G., 2014. Discovery and characterization of biomass-degrading enzymes and enzyme systems in termite gut microbial ecosystems.
- Aspinall, G.O., Mahomed, R.S., 1954. The constitution of a wheat-straw xylan. *J. Chem. Soc.* 0, 1731–1734. <https://doi.org/10.1039/JR9540001731>
- Aspinall, G.O., Meek, E.G., 1956. The constitution of wheat straw hemicellulose. *J. Chem. Soc.* 3830–3834. <https://doi.org/10.1039/JR9560003830>
- Atalla, R.H., VanderHart, D.L., 1984. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science* (80-.). 223, 283–284. <https://doi.org/10.1126/science.223.4633.283>
- Auxtová, O., Liskova, D., Kákoniova, D., Kubackova, M., Karacsonyi, S., Bilisics, L., Lišková, D., Kákoniová, D., Kubačková, M., Karácsanyi, 1995. Effect of galactoglucomannan-derived oligosaccharides on elongation growth of pea and spruce stem segments stimulated by auxin. *Planta An Int. J. Plant Biol.* 196, 420–424. <https://doi.org/10.1007/BF00203638>
- Avella, M., Martuscelli, E., Pascucci, B., Raimo, M., Focher, B., Marzetti, A., 1993. A new class of biodegradable materials: poly-3-hydroxy-butyrates/ steam exploded straw fiber composites. I. Thermal and impact behavior. *J. Appl. Polym. Sci.* 49, 2091–2103. <https://doi.org/10.1002/app.1993.070491205>
- Baaske, P., Wienken, C.J., Reineck, P., Duhr, S., Braun, D., 2010. Optical thermophoresis for quantifying the buffer dependence of aptamer binding. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 49, 2238–2241. <https://doi.org/10.1002/anie.200903998>

- Bachmann, S.L., McCarthy, A.J., 1991. Purification and Cooperative Activity of Enzymes Constituting the Xylan-Degrading System of *Thermomonospora fusca*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2121–2130.
- Badrana, L., Burlat, V., Montanier, C.Y., 2017. CBMs as probes to explore plant cell wall heterogeneity using immunocytochemistry, in: *Protein-Carbohydrate Interactions: Methods and Protocols*. pp. 181–197. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6899-2_14
- Baird, G.S., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y., 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11984–11989. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.22.11984>
- Barral, P., Suárez, C., Batanero, E., Alfonso, C., Alché, J. de D., Rodríguez-García, M.I., Villalba, M., Rivas, G., Rodríguez, R., 2005. An olive pollen protein with allergenic activity, Ole e 10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination. *Biochem. J.* 390, 77–84. <https://doi.org/10.1042/BJ20050456>
- Bartolomé, B., Faulds, C.B., Kroon, P.A., Waldron, K., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., Williamson, G., 1997. An *Aspergillus niger* Esterase (Ferulic Acid Esterase III) and a Recombinant *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* Esterase (XylD) Release a 5-5' Ferulic Dehydrodimer (Diferulic Acid) from Barley and Wheat Cell Walls. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 208–212.
- Basile, D. V., Basile, M.R., 1993. The role and control of the place-dependent suppression of cell division in plant morphogenesis and phylogeny. *Mem. Torrey Bot. Club* 25, 63–84.
- Bastien, G., Arnal, G., Bozonnet, S., Laguerre, S., Ferreira, F., Fauré, R., Henrissat, B., Lefebvre, F., Robe, P., Bouchez, O., Noirot, C., Dumon, C., O'Donohue, M.J., 2013. Mining for hemicellulases in the fungus-growing termite *Pseudacanthotermes militaris* using functional metagenomics. *Biotechnol. Biofuels* 6, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-78>
- Bayer, E.A., Bélaïch, J.-P., Shoham, Y., Lamed, R., 2004. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 521–554. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.091022>
- Bayer, E.A., Chanzy, H., Lamed, R., Shoham, Y., 1998a. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 548–557. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(98\)80143-7](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(98)80143-7)
- Bayer, E.A., Kenig, R., Lamed, R., 1983. Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *J. Bacteriol.* 156, 818–827.
- Bayer, E.A., Morag, E., Lamed, R., 1994. The cellulosome - a treasure-trove for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 12, 379–386. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90039-6)
- Bayer, E.A., Setter-Lamed, E., Lamed, R., 1985. Organization and distribution of the cellulosome in *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 163, 552–559.
- Bayer, E.A., Shimon, L.J.W., Shoham, Y., Lamed, R., 1998b. Cellulosomes-structure and ultrastructure. *J. Struct. Biol.* 124, 221–234. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4065>
- Beaugrand, J., Chambat, G., Wong, V.W.K., Goubet, F., Rémond, C., Paës, G., Benamrouche, S., Debeire, P., O'Donohue, M.J., Chabbert, B., 2004. Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans. *Carbohydr. Res.* 339, 2529–2540. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.08.012>
- Beaugrand, J., Paës, G., Reis, D., Takahashi, M., Debeire, P., O'Donohue, M.J., Chabbert, B., 2005. Probing the cell wall heterogeneity of micro-dissected wheat caryopsis using both active and inactive forms of a GH11 xylanase. *Planta* 222, 246–257. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1538-0>

- Belancic, A., Scarpa, J., Peirano, A., Diaz, R., Steiner, J., Eyzaguirre, J., Díaz, R., Steiner, J., Eyzaguirre, J., 1995. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. *J. Biotechnol.* 41, 71–79. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00057-W](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00057-W)
- Beldman, G., Voragen, A.G.J., Rombouts, F.M., Plinik, W., 1988. Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 173–178. <https://doi.org/10.1002/bit.260310211>
- Benamrouche, S., Crônier, D., Debeire, P., Chabbert, B., 2002. A chemical and histological study on the effect of (1→4)-β-endo-xylanase treatment on wheat bran. *J. Cereal Sci.* 36, 253–260. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2001.0427>
- Bertrand, I., Chabbert, B., Kurek, B., Recous, S., 2006. Can the biochemical features and histology of wheat residues explain their decomposition in soil? *Plant Soil* 281, 291–307. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-4628-7>
- Biely, P., 2012. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 30, 1575–1588. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.010>
- Biely, P., 1985a. Microbial xylanotic systems. *Trends Biotechnol.* 3, 286–290. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(85\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(85)90004-6)
- Biely, P., 1985b. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3, 286–290.
- Biely, P., Kratky, Z., Vršanská, M., 1981. Substrate-Binding Site of Endo-1,4-P-Xylanase of the Yeast *Cryptococcus albidus*. *Eur* 119, 559–564. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb05644.x>
- Biely, P., Mackenzie, C.R., Puls, J., Schneider, H., 1986. Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. *Biotechnology* 4, 6–9. <https://doi.org/10.1038/nbt0886-731>
- Biely, P., Vršanská, M., Tenkanen, M., Kluepfel, D., 1997. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* 57, 151–166. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00096-5)
- Biocore [WWW Document], n.d. URL <http://www.biocore-europe.org/index-2.html> (accessed 1.4.18).
- Black, G.W., Hazlewood, G.P., Millward-Sadler, S.J., Laurie, J.I., Gilbert, H.J., 1995. A modular xylanase containing a novel non-catalytic xylan-specific binding domain. *Biochem. J.* 307, 191–195. <https://doi.org/10.1042/bj3070191>
- Black, G.W., Rixon, J.E., Clarke, J.H., Hazlewood, G.P., Ferreira, L.M.A., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., 1997. Cellulose binding domains and linker sequences potentiate the activity of hemicellulases against complex substrates. *J. Biotechnol.* 57, 59–69. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00089-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00089-8)
- Black, G.W., Rixon, J.E., Clarke, J.H., Hazlewood, G.P., Theodorou, M.K., Morris, P., Gilbert, H.J., 1996. Evidence that linker sequences and cellulose-binding domains enhance the activity of hemicellulases against complex substrates. *Biochem. J.* 319, 515–520. <https://doi.org/10.1042/bj3190515>
- Blake, A.W., Marcus, S.E., Copeland, J.E., Blackburn, R.S., Knox, J.P., 2008. *In situ* analysis of cell wall polymers associated with phloem fibre cells in stems of hemp, *Cannabis sativa* L. *Planta* 228, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0713-5>
- Blake, A.W., McCartney, L., Flint, J.E., Bolam, D.N., Boraston, A.B., Gilbert, H.J., Knox, J.P., 2006. Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding modules in prokaryotic enzymes. *J. Biol. Chem.* 281, 29321–29329. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605903200>

- Blum, D.L., Kataeva, I.A., Li, X.-L., Ljungdahl, L.G., 2000. Feruloyl esterase activity of the *Clostridium thermocellum* cellulosome can be attributed to previously unknown domains of XynY and XynZ. *J. Bacteriol.* 182, 1346–1351. <https://doi.org/10.1128/JB.182.5.1346-1351.2000>
- Bogaert, D., De Groot, R., Hermans, P.W.M., 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: The key to pneumococcal disease. *Lancet Infect. Dis.* 4, 144–154. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00938-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00938-7)
- Bolam, D.N., Ciruela, A., McQueen-Mason, S.J., Simpson, P.J., Williamson, M.P., Rixon, J.E., Boraston, A.B., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J., 1998. *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochemistry* 331, 775–781. <https://doi.org/10.1042/bj3310775>
- Bolam, D.N., Xie, H., Pell, G., Hogg, D., Galbraith, G., Henrissat, B., Gilbert, H.J., 2004. X4 modules represent a new family of carbohydrate-binding modules that display novel properties. *J. Biol. Chem.* 279, 22953–22963. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313317200>
- Bolam, D.N., Xie, H., White, P., Simpson, P.J., Hancock, S.M., Williamson, M.P., Gilbert, H.J., 2001. Evidence for synergy between family 2b carbohydrate binding modules in *Cellulomonas fimi* xylanase 11A. *Biochemistry* 40, 2468–2477. <https://doi.org/10.1021/bi0025641>
- Bonnet, J., Cartannaz, J., Tourcier, G., Contreras-Martel, C., Kleman, J.P., Morlot, C., Vernet, T., Di Guilmi, A.M., 2017. Autocatalytic association of proteins by covalent bond formation: a bio molecular welding toolbox derived from a bacterial adhesin. *Sci. Rep.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep43564>
- Bonnin, E., Garnier, C.D., Ralet, M.-C., 2014. Pectin-modifying enzymes and pectin-derived materials: Applications and impacts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 519–532. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5388-6>
- Boraston, A.B., 2005. The interaction of carbohydrate-binding modules with insoluble non-crystalline cellulose is enthalpically driven. *Biochem. J.* 385, 479–484. <https://doi.org/10.1042/BJ20041473>
- 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. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>
- Boraston, A.B., Chiu, P., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., 2000. Specificity and affinity of substrate binding by a family 17 carbohydrate-binding module from *Clostridium cellulovorans* cellulase 5A. *Biochemistry* 39, 11129–11136. <https://doi.org/10.1021/bi0007728>
- Boraston, A.B., Creagh, A.L., Alam, M., Kormos, J.M., Tomme, P., 2001. Binding specificity and thermodynamics of a family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A. *Biochemistry* 40, 6240–6247. <https://doi.org/10.1021/bi0101695>
- Boraston, A.B., Kwan, E., Chiu, P., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., 2003. Recognition and hydrolysis of noncrystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* 278, 6120–6127. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209554200>
- Boraston, A.B., McLean, B.W., Chen, G., Li, A., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., 2002a. Co-operative binding of triplicate carbohydrate-binding modules from a thermophilic xylanase. *Mol. Microbiol.* 43, 187–194. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02730.x>
- Boraston, A.B., Nurizzo, D., Notenboom, V., Ducros, V.M., Rose, D.R., Kilburn, D.G., Davies, G.J., 2002b. Differential oligosaccharide recognition by evolutionarily-related β -1,4 and β -1,3 glucan-binding modules. *J. Mol. Biol.* 319, 1143–1156. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00374-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00374-1)
- Boraston, A.B., Wang, D., Burke, R.D., 2006. Blood group antigen recognition by a *Streptococcus pneumoniae* virulence factor. *J. Biol. Chem.* 281, 35263–35271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607620200>
- Bornscheuer, U., Buchholz, K., Seibel, J., 2014. Enzymatic degradation of (ligno)cellulose. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 53, 10876–10893. <https://doi.org/10.1002/anie.201309953>

- Bouraoui, H., Desrousseaux, M.-L., Ioannou, E., Alvira, P., Manaï, M., Rémond, C., Dumon, C., Fernandez-Fuentes, N., O'Donohue, M.J., 2016. The GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Paenibacillus* sp. THS1 is multifunctional, hydrolyzing main-chain and side-chain glycosidic bonds in heteroxylans. *Biotechnol. Biofuels* 9, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0550-x>
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., Lamb, C.J., 1992. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell* 70, 21–30. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90530-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90530-P)
- Bras, J.L. a., Cartmell, A., Carvalho, A.L.M., Verzé, G., Bayer, E.A., Vazana, Y., Correia, M.A.S.S., Prates, J. a. M., Ratnaparkhe, S., Boraston, A.B., Romão, M.J., Fontes, C.M.G.A., Gilbert, H.J., Romao, M.J., 2011. Structural insights into a unique cellulase fold and mechanism of cellulose hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5237–5242. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015006108>
- Braun, C., Meinke, A., Ziser, L., Withers, S.G., 1993. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of both the cleavage pattern and the stereochemical outcome of the hydrolysis reactions catalyzed by various glycosidases. *Anal. bio* 212, 259–262.
- Bray, M.R., Clarke, A.J., 1992. Action pattern of xylo-oligosaccharide hydrolysis by *Schizophyllum commune* xylanase A. *Eur. J. Biochem.* 204, 191–196. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16623.x>
- Bray, M.R., Johnson, P.E., Gilkes, N.R., McIntosh, L.P., Kilburn, D.G., Warren, R.A.J., 1996. Probing the role of tryptophan residues in a cellulose-binding domain by chemical modification. *Protein Sci.* 5, 2311–2318. <https://doi.org/10.1002/pro.5560051117>
- Breslauer, K., Freire, E., Straume, M., 1992. Calorimetry: a tool for DNA and ligand-DNA studies. *Methods Enzymol.* 211, 533–567. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(92\)11030-M](https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)11030-M)
- Brillouet, J.M., Joseleau, J.P., Utille, J.P., Lelievre, D., 1982. Isolation, purification and characterization of a complex heteroxylan from industrial wheat bran. *J. Agric. Food Chem.* 30, 488–495. <https://doi.org/10.1021/jf00111a020>
- Brillouet, J.M., Mercier, C., 1981. Fractionation of wheat bran carbohydrates. *J. Sci. food Agric.* ,32,243-251 32, 243–251. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740320307>
- Brod, F.C.A., Vernal, J., Bertoldo, J.B., Terenzi, H., Arisi, A.C.M., 2010. Cloning, expression, purification, and characterization of a novel esterase from *Lactobacillus plantarum*. *Mol. Biotechnol.* 44, 242–249. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9232-2>
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K.B., Ramakrishnan, S., 2011. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Res.* 2011, 1–17. <https://doi.org/10.4061/2011/787532>
- Brown, I.E., Mallen, M.H., Charnock, S.J., Davies, G.J., Black, G.W., 2001. Pectate lyase 10A from *Pseudomonas cellulosa* is a modular enzyme containing a family 2a carbohydrate-binding module. *Biochem. J.* 355, 155–165. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3550155>
- Brunzelle, J.S., Jordan, D.B., McCaslin, D.R., Olczak, A., Wawrzak, Z., 2008. Structure of the two-subsite beta-D-xylosidase from *Selenomonas ruminantium* in complex with 1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane. *Arch. Biochem. Biophys.* 474, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.007>
- Brüx, C., Ben-David, A., Shallom-Shezifi, D., Leon, M., Niefind, K., Shoham, G., Shoham, Y., Schomburg, D., 2006. The structure of an inverting GH43 beta-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its substrate reveals the role of the three catalytic residues. *J. Mol. Biol.* 359, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.005>

- Bruyn, G. a, Zegers, B.J., van Furth, R., 1992. Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. Clin. Infect. Dis. 14, 251–262. <https://doi.org/10.1093/clinids/14.1.251>
- Burlat, V., 1997. Etude immunocytochimique de la distribution ultrastructurale des lignines dans la paille de blé et de son influence sur le mode d'action des champignons ligninolytiques. Application aux pates a papier. Grenoble.
- Burlat, V., Ambert, K., Ruel, K., Joseleau, J.P., 1997. Relationship between the nature of lignin and the morphology of degradation performed by white-rot fungi. Plant physiol Biochem 35, 645–654.
- Burlat, V., Oudin, A., Courtois, M., Rideau, M., St-Pierre, B., 2004. Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derive. Plant J. 38, 131–141. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02030.x>
- Campbell, M.M., Sederoff, R., 1996. Variation in lignin content and composition. Plant Physiol. 110, 3–13. <https://doi.org/10.1104/pp.110.1.3>
- Carpita, N.C., 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. Annu. Rev. Plant Physiol. 47, 445–476. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.445>
- Carpita, N.C., 1983. Hemicellulosic polymers of cell walls of *Zea* coleoptiles. Plant Physiol 72, 515–521. <https://doi.org/10.1104/pp.72.2.515>
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. Plant J. 3, 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x>
- Carrard, G., Koivula, A., Soderlund, H., Beguin, P., 2000. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 10342–10347. <https://doi.org/10.1073/pnas.160216697>
- Casero, P.J.I., Knox, J.P., 1995. The monoclonal antibody JIM5 indicates patterns of pectin deposition in relation to pit fields at the plasma-membrane-face of tomato pericarp cell walls. Protoplasma 188, 133–137. <https://doi.org/10.1007/BF01276804>
- Caspi, J., Barak, Y., Haimovitz, R., Irwin, D.C., Lamed, R., Wilson, D.B., Bayer, E.A., 2009. Effect of linker length and dockerin position on conversion of a *Thermobifida fusca* endoglucanase to the cellulosomal mode. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7335–7342. <https://doi.org/10.1128/AEM.01241-09>
- Charnock, S.J., Bolam, D.N., Nurizzo, D., Szabó, L., Mckie, V.A., Gilbert, H.J., Davies, G.J., 2002. Promiscuity in ligand-binding: the three-dimensional structure of a *Piromyces* carbohydrate-binding module , CBM29-2, in complex with cello- and mannohexaose. PNAS 99, 14077–14082. <https://doi.org/10.1073/pnas.212516199>
- Charnock, S.J., Bolam, D.N., Turkenburg, J.P., Gilbert, H.J., Ferreira, L.M.A., Davies, G.J., Fontes, C.M.G.A., 2000. The X6 “thermostabilizing” domains of xylanases are carbohydrate-binding modules: structure and biochemistry of the *Clostridium thermocellum* X6b domain. Biochemistry 39, 5013–5021. <https://doi.org/10.1021/bi992821q>
- Cho, H., Yukawa, H., Inui, M., Doi, R.H., Wong, S., 2004. Production of minicellulosomes from *Clostridium cellulovorans* in *Bacillus subtilis* WB800. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5704–5707. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5704>
- Chundawat, S.P.S., Beckham, G.T., Himmel, M.E., Dale, B.E., 2011. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng. 2, 121–145. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114205>

- Claassen, P. a. M., van Lier, J.B., Lopez Contreras, a. M., van Niel, E.W.J., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., de Vries, S.S., Weusthuis, R.A., 1999. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 741–755. <https://doi.org/10.1007/s002530051586>
- Clarke, J.H., Laurie, J.I., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., 1991. Multiple xylanases of *Cellulomonas fimi* are encoded by distinct genes. *FEMS Microbiol Lett* 83, 305–310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04481.x>
- Clausen, M.H., Ralet, M.-C., Willats, W.G.T., McCartney, L., Marcus, S.E., Thibault, J.-F., Knox, J.P., 2004. A monoclonal antibody to feruloylated-(1-4)-beta-D-galactan. *Planta* 219, 1036–1041. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1309-3>
- Clausen, M.H., Willats, W.G.T., Knox, J.P., 2003. Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of anti-homogalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM5 and JIM7. *Carbohydr. Res.* 338, 1797–1800. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(03\)00272-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00272-6)
- Cleemput, G., Hessing, M., Van Oort, M., Deconynck, M., Delcour, J.A., 1997. Purification and characterization of a beta-D-xylosidase and an endo-xylanase from wheat flour. *Plant Physiol.* 113, 377–386. <https://doi.org/10.1104/pp.113.2.377>
- Connerton, I., Cummings, N., Harris, G.W., Debeire, P., Breton, C., 1999. A single domain thermophilic xylanase can bind insoluble xylan: evidence for surface aromatic clusters. *Biochim. Biophys. Acta* 1433, 110–121. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00151-X)
- Cornuault, V., Buffet, F., Rydahl, M.G., Marcus, S.E., Torode, T.A., Xue, J., Crépeau, M.J., Faria-Blanc, N., Willats, W.G.T., Dupree, P., Ralet, M.-C., Knox, J.P., 2015. Monoclonal antibodies indicate low-abundance links between heteroxylan and other glycans of plant cell walls. *Planta* 242, 1321–1334. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2375-4>
- Cortés, J., Siméon, T., Ruiz de Angulo, V., Guieysse, D., Remaud-Siméon, M., Tran, V., 2005. A path planning approach for computing large-amplitude motions of flexible molecules. *Bioinformatics* 21, 116–125. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti1017>
- Coutinho, J.B., Gilkes, N.R., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., Miller, R.C., 1992. The binding of *Cellulomonas fimi* endoglucanase C (CenC) to cellulose and Sephadex is mediated by the N-terminal repeats. *Mol. Microbiol.* 6, 1243–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01563.x>
- Creagh, A.L., Ong, E., Jervis, E.J., Kilburn, D.G., Haynes, C.A., 1996. Binding of the cellulose-binding domain of exoglucanase Cex from *Cellulomonas fimi* to insoluble microcrystalline cellulose is entropically driven. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 12229–12234. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12229>
- Crouch, L.I., Labourel, A., Walton, P.H., Davies, G.J., Gilbert, H.J., 2016. The contribution of non-catalytic carbohydrate binding modules to the activity of lytic polysaccharide monoxygenases. *J. Biol. Chem.* 291, 7439–7449. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702365>
- Cuskin, F., Flint, J.E., Gloster, T.M., Morland, C., Baslé, A., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Strazzulli, A., Solovyova, A.S., Davies, G.J., Gilbert, H.J., Baslé, a., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Strazzulli, A., Solovyova, A.S., Davies, G.J., Gilbert, H.J., 2012. How nature can exploit nonspecific catalytic and carbohydrate binding modules to create enzymatic specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 20889–20894. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212034109>
- Cybinski, D.H., Layton, I., Lowry, J.B., Dalrymple, B.P., 1999. An acetylxylan esterase and a xylanase expressed from genes cloned from the ruminal fungus *Neocallimastix patriciarum* act synergistically to degrade acetylated xylans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 221–225. <https://doi.org/10.1007/s002530051512>

- Czjzek, M., Bolam, D.N., Mosbah, A., Allouch, J., Fontes, C.M.G.A., Ferreira, L.M.A., Bornet, O., Zamboni, V.V., Darbon, H.H., Smith, N.L., Black, G.W., Henrissat, B., Gilbert, H.J., 2001. The location of the ligand-binding site of carbohydrate-binding modules that have evolved from a common sequence is not conserved. *J. Biol. Chem.* 276, 48580–48587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109142200>
- Da Silva, A.S.A., Inoue, H., Endo, T., Yano, S., Bon, E.P.S., 2010. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 7402–7409. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.008>
- Dagel, D.J.J., Liu, Y.S., Zhong, L.L., Luo, Y.H., Himmel, M.E., Xu, Q., Zeng, Y., Ding, S.-Y., Smith, S.P., 2011. *In situ* imaging of single carbohydrate-binding module on cellulose microfibrils. *J. Phys. Chem.* 115, 635–641. <https://doi.org/10.1021/jp109798p>
- Dammeyer, T., Tinnefeld, P., 2012. Engineered fluorescent proteins illuminate the bacterial periplasm. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 3, 1–6. <https://doi.org/10.5936/csbj.201210013>
- Darvill, A.G., McNeil, M., Albersheim, P., 1978. Structure of plant cell walls. *Plant Physiol.* 62, 418–422. <https://doi.org/10.1104/pp.62.3.418>
- Davies, G.J., Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853–859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)
- Davies, G.J., Wilson, K.S., Henrissat, B., 1997. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 321, 557–559. <https://doi.org/10.1042/bj3210557>
- De Vries, R.P., Michelsen, B., Poulsen, C.H., Kroon, P.A., Van Den Heuvel, R.H.H., Faulds, C.B., Williamson, G., Van Den Hombergh, J.P.T.W., Visser, J., 1997. The faea genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* encode ferulic acid esterases involved in degradation of complex cell wall polysaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4638–4644.
- De Vries, R.P., Visser, J., 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65, 497–522. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.4.497>
- Dekker, R.F.H.H., 1983. Bioconversion of hemicellulose: aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymic saccharification of hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 1127–1146. <https://doi.org/10.1002/bit.260250419>
- Dias, F.M. V, Goyal, A., Gilbert, H.J., Prates, J.A.M., Ferreira, L.M.A., Fontes, C.M.G.A., 2004. The N-terminal family 22 carbohydrate-binding module of xylanase 10B of *Clostridium thermocellum* is not a thermostabilizing domain. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.019>
- Din, N., Damude, H.G., Gilkes, N.R., Miller, R.C., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., 1994a. C1-Cx, revisited: intramolecular synergism in a cellulase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 11383–11387.
- Din, N., Forsythe, I.J., Burtnick, L.D., Giikes, N.R., Miller, R.C., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., 1994b. The cellulose-binding domain of endoglucanase A (CenA) from *Cellulomonas fimi*: evidence for the involvement of tryptophan residues in binding. *Mol. Microbiol.* 11, 747–755. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00352.x>
- Din, N., Gilkes, N.R., Tekant, B., Miller, R.C., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., 1991. Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of bacterial cellulase. *Bio/Technology* 9, 1096–1099. <https://doi.org/10.1038/nbt1191-1096>
- Ding, S.-Y., Liu, Y.S., Zeng, Y., Himmel, M.E., Baker, J.O., Bayer, E.A., 2012. How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility? *Science* (80-.). 338, 1055–1060. <https://doi.org/10.1126/science.1227491>

- Ding, S.-Y., Xu, Q., Ali, M.K., Baker, J.O., Bayer, E.A., Barak, Y., Lamed, R., Sugiyama, J., Rumbles, G., Himmel, M.E., 2006. Versatile derivatives of carbohydrate-binding modules for imaging of complex carbohydrates approaching the molecular level of resolution. *Biotechniques* 41, 435–442. <https://doi.org/10.2144/000112244>
- Dodd, D., Cann, I.K.O., 2009. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy* 1, 2–17. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2009.01004.x>
- Doetsch, M., Stampfl, S., Fürtig, B., Beich-Frandsen, M., Saxena, K., Lybecker, M., Schroeder, R., 2013. Study of *E. coli* Hfq's RNA annealing acceleration and duplex destabilization activities using substrates with different GC-contents. *Nucleic Acids Res.* 41, 487–497. <https://doi.org/10.1093/nar/gks942>
- Dupont, C., Daigneault, N., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D., 1996. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase produced by *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.* 319, 881–886. <https://doi.org/10.1042/bj3190881>
- Dupont, C., Roberge, M., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D., 1998. Substrate-binding domains of glycanases from *Streptomyces lividans*: characterization of a new family of xylan-binding domains. *Biochem. J.* 330, 41–45. <https://doi.org/10.1042/bj3300041>
- Dutta, S., Wu, K.C.-W., 2014. Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production. *Green Chem.* 16, 4615–4626. <https://doi.org/10.1039/C4GC01405G>
- E. coli* genotypes [WWW Document], n.d. URL http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes
- Ebringerová, A., 2006. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromol. Symp.* 232, 1–12. <https://doi.org/10.1002/masy.200551401>
- Ebringerová, A., Heinze, T., 2000. Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties - Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun.* 21, 542–556. [https://doi.org/10.1002/1521-3927\(20000601\)21:9<542::AID-MARC542>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1521-3927(20000601)21:9<542::AID-MARC542>3.0.CO;2-7)
- Elazzouzi-hafraoui, S., Nishiyama, Y., Putaux, J.-L., Heux, L., Dubreuil, F., Rochas, C., 2008. The Shape and Size Distribution of Crystalline Nanoparticles Prepared by Acid Hydrolysis of Native Cellulose. *Biomacromolecules* 9, 57–65. <https://doi.org/10.1021/bm700769p>
- Elegir, G., Szakacs, G., Jeffries, T.W., 1994. Purification, characterization, and substrate specificities of multiple xylanases from *Streptomyces* sp. strain B-12-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2609–2615.
- Family: Glyco_hydro-11 (PF00457) [WWW Document], 2017. . EMBL-EBI Pfam. URL <http://pfam.xfam.org/family/PF00457#tabview=tab1> (accessed 6.28.17).
- Fan, Z., Wagschal, K., Lee, C.C., Kong, Q., Shen, K.A., Maiti, I.B., Yuan, L., 2009a. The construction and characterization of two xylan-degrading chimeric enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 684–692. <https://doi.org/10.1002/bit.22112>
- Fan, Z., Werkman, J.R., Yuan, L., 2009b. Engineering of a multifunctional hemicellulase. *Biotechnol. Lett.* 31, 751–757. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9926-3>
- Fang, J.M., Sun, R.C., Salisbury, D., Fowler, P., Tomkinson, J., 1999. Comparative study of hemicelluloses from wheat straw by alkali and hydrogen peroxide extractions. *Polym. Degrad. Stab.* 66, 423–432. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(99\)00095-6](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(99)00095-6)
- Fanutti, C., Ponyi, T., Black, G.W., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J., 1995. The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. *J. Biol. Chem.* 270, 29314–29322. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29314>

- Faulds, C.B., Williamson, G., 1995. Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1082–1087. <https://doi.org/10.1007/BF00166929>
- Fernandes, A.N., Thomas, L.H., Altaner, C.M., Callow, P., Forsyth, V.T., Apperley, D.C., Kennedy, C.J., Jarvis, M.C., 2011. Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, E1195–E1203. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108942108>
- Ferreira, L.M.A., Durrant, A.J., Hall, J., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J., 1990. Spatial separation of protein domains is not necessary for catalytic activity or substrate binding in a xylanase. *Biochem. J.* 269, 261–264. <https://doi.org/10.1042/bj2690261>
- Ferreira, L.M.A., Wood, T.M., Williamson, G., Faulds, C.B., Hazlewood, G.P., Black, G.W., Gilbert, H.J., 1993. A modular esterase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contains a non-catalytic cellulose-binding domain. *Biochem. J.* 294, 349–355. <https://doi.org/10.1042/bj2940349>
- Fierobe, H.-P., Bayer, E.A., Tardif, C., Czjzek, M., Mechaly, A., Bélaïch, A., Lamed, R., Shoham, Y., Bélaïch, J.-P., 2002. Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras. *J. Biol. Chem.* 277, 49621–49630. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207672200>
- Fierobe, H.-P., Mechaly, A., Tardif, C., Bélaïch, A., Lamed, R., Shoham, Y., Bélaïch, J.-P., Bayer, E.A., 2001. Design and production of active cellulosome chimeras. Selective incorporation of dockerin-containing enzymes into defined functional complexes. *J. Biol. Chem.* 276, 21257–21261. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102082200>
- Fierobe, H.-P., Mingardon, F., Mechaly, A., Bélaïch, A., Rincon, M.T., Pagès, S., Lamed, R., Tardif, C., Bélaïch, J.-P., Bayer, E.A., 2005. Action of designer cellulosomes on homogeneous *versus* complex substrates: controlled incorporation of three distinct enzymes into a defined trifunctional scaffoldin. *J. Biol. Chem.* 280, 16325–16334. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414449200>
- Filonova, L., Kallas, Å.M., Greffe, L., Johansson, G., Teeri, T.T., Daniel, G., 2007. Analysis of the surfaces of wood tissues and pulp fibers using carbohydrate-binding modules specific for crystalline cellulose and mannan. *Biomacromolecules* 8, 91–97. <https://doi.org/10.1021/bm060632z>
- Fong, M., Berrin, J.-G., Paës, G., 2016. Investigation of the binding properties of a multi-modular GH45 cellulase using bioinspired model assemblies. *Biotechnol. Biofuels* 9, 12. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0428-y>
- Fontes, C.M.G.A., Gilbert, H.J., 2010. Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 655–681. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-091208-085603>
- Fontes, C.M.G.A., Hazlewood, G.P., Morag, E., Hall, J., Hirst, B.H., Gilbert, H.J., 1995. Evidence for a general role for non-catalytic thermostabilizing domains in xylanases from thermophilic bacteria. *Biochem. J.* 307, 151–158. <https://doi.org/10.1042/bj3070151>
- Freelove, A.C., Bolam, D.N., White, P., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J., 2001. A novel carbohydrate-binding protein is a component of the plant cell wall-degrading complex of *Piromyces equi*. *J. Biol. Chem.* 276, 43010–43017. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107143200>
- Freire, E., Mayorga, O.L., Straume, M., 1990. Isothermal titration calorimetry. *Anal. Chem.* 62, 950–959. <https://doi.org/10.1021/ac00217a002>
- Friedlingstein, P., Andrew, R.M., Rogelj, J., Peters, G.P., Canadell, J.G., Knutti, R., Luderer, G., Raupach, M.R., Schaeffer, M., van Vuuren, D.P., Le Quéré, C., 2014. Persistent growth of CO₂ emissions and implications for reaching climate targets. *Nat. Geosci.* 7, 709–715. <https://doi.org/10.1038/ngeo2248>

- Fujimoto, Z., Jackson, A., Michikawa, M., Maehara, T., Momma, M., Henrissat, B., Gilbert, H.J., Kaneko, S., 2013. The structure of a *Streptomyces avermitilis* α -L-rhamnosidase reveals a novel carbohydrate-binding module CBM67 within the six-domain arrangement. *J. Biol. Chem.* 288, 12376–12385. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460097>
- Fukuda, M., Watanabe, S., Yoshida, S., Itoh, H., Itoh, Y., Kamio, Y., Kaneko, J., 2010. Cell surface xylanases of the glycoside hydrolase family 10 are essential for xylan utilization by *Paenibacillus* sp. W-61 as generators of xylo-oligosaccharide inducers for the xylanase genes. *J. Bacteriol.* 192, 2210–2219. <https://doi.org/10.1128/JB.01406-09>
- Fumagalli, M., Ouhab, D., Boisseau, S.M., Heux, L., 2013. Versatile gas-phase reactions for surface to bulk esterification of cellulose microfibrils aerogels. *Biomacromolecules* 14, 3246–3255. <https://doi.org/10.1021/bm400864z>
- García-Aparicio, M.P., Ballesteros, M., Manzanares, P., Ballesteros, I., Gonzalez, A., Negro, M.J., 2007. Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 137, 353–365. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-181-3_31
- García-Gómez, B.I., Campos, F., Hernández, M., Covarrubias, A. a., 2000. Two bean cell wall proteins more abundant during water deficit are high in proline and interact with a plasma membrane protein. *Plant J.* 22, 277–288. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00739.x>
- George, R.A., Heringa, J., 2003. An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. *Protein Eng.* 15, 871–879. <https://doi.org/10.1093/protein/15.11.871>
- Ghaffar, S.H., Fan, M., 2015. Revealing the morphology and chemical distribution of nodes in wheat straw. *Biomass and Bioenergy* 77, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.03.032>
- Gilad, R., Rabinovich, L., Yaron, S., Bayer, E.A., Lamed, R., Gilbert, H.J., Shoham, Y., 2003. Cell, a noncellulosomal family 9 enzyme from *Clostridium thermocellum*, is a processive endoglucanase that degrades crystalline cellulose. *J. Bacteriol.* 185, 391–398. <https://doi.org/10.1128/JB.185.2.391>
- Gilbert, H.J., 2010. The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. *Plant Physiol.* 153, 444–455. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156646>
- Gilbert, H.J., Hall, J., Hazlewood, G.P., Ferreira, L.M.A., 1990. The N-terminal region of an endoglucanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa* constitutes a cellulose-binding domain that is distinct from the catalytic centre. *Mol. Microbiol.* 4, 759–767. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00646.x>
- Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* 139, 187–194. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-2-187>
- Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., Laurie, J.I., Orpin, C.G., Xue, G.P., 1992. Homologous catalytic domains in a rumen fungal xylanase: evidence for gene duplication and prokaryotic origin. *Mol. Microbiol.* 6, 2065–2072. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01379.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.05.005>
- Gilbert, H.J., Sullivan, D.A., Jenkins, G., Kellett, L.E., Minton, N.P., Hall, J., 1988. Molecular cloning of multiple xylanase genes from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 3239–3247. <https://doi.org/10.1099/00221287-135-5-1395>
- Gilkes, N.R., Henrissat, B., Kilburn, D.G., Miller, R.C., Warren, R.A.J., 1991. Domains in microbial beta-1,4-glycanases: sequence conservation, function and enzyme families. *Microbiol. Rev.* 55, 303–315.

- Gilkes, N.R., Jervis, E.J., Henrissat, B., Tekant, B., Miller, R.C., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., 1992. The adsorption of a bacterial cellulase and its two isolated domains to crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* 267, 6743–6749.
- Gilkes, N.R., Warren, R.A.J., Miller, R.C., Kilburn, D.G., 1988. Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *J. Biol. Chem.* 263, 10401–10407.
- Gill, J., Rixon, J.E., Bolam, D.N., McQueen-Mason, S.J., Simpson, P.J., Williamson, M.P., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J., Queen-mason, S.M.C., 1999. The type II and X cellulose-binding domains of *Pseudomonas xylanase A* potentiate catalytic activity against complex substrates by a common mechanism. *Biochem. J.* 342, 473–80. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3420473>
- Goldstein, M.A., Takagi, M., Hashida, S., Shoseyov, O., Doi, R.H., Segel, I.H., 1993. Characterization of the cellulose-binding domain of the *Clostridium cellulovorans* cellulose-binding protein A. *J. Bacteriol.* 175, 5762–5768. <https://doi.org/10.1128/jb.175.18.5762-5768.1993>
- Grohmann, K., Mitchell, D.J., Himmel, M.E., Dale, B.E., Schroeder, H.A., 1989. The role of ester groups in resistance of plant cell wall polysaccharides to enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 20-21, 45–61. <https://doi.org/10.1007/BF02936472>
- Guais, O., Borderies, G., Pichereaux, C., Maestracci, M., Neugnot, V., Rossignol, M., François, J.M., 2008. Proteomics analysis of “Rovabio™ Excel”, a secreted protein cocktail from the filamentous fungus *Penicillium funiculosum* grown under industrial process fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1659–1668. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0430-x>
- Guillén, D., Sánchez, S., Rodríguez-Sanoja, R., 2010. Carbohydrate-binding domains: Multiplicity of biological roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1241–1249. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2331-y>
- Guillon, F., Tranquet, O., Quillien, L., Utile, J.P., Ordaz-Ortiz, J.J., Saulnier, L., 2004. Generation of polyclonal and monoclonal antibodies against arabinoxylans and their use for immunocytochemical location of arabinoxylans in cell walls of endosperm of wheat. *J. Cereal Sci.* 40, 167–182. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.06.004>
- Ha, M. a, Apperley, D.C., Evans, B.W., Huxham, I.M., Jardine, W.G., Vietor, R.J., Reis, D., Vian, B., Jarvis, M.C., 1998. Fine structure in cellulose microfibrils: NMR evidence from onion and quince. *Plant J.* 16, 183–190. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00291.x>
- Hagan, R.M., Björnsson, R., McMahon, S.A., Schomburg, B., Braithwaite, V., Bühl, M., Naismith, J.H., Schwarz-Linek, U., 2010. NMR spectroscopic and theoretical analysis of a spontaneously formed lys-asp isopeptide bond. *Angew. Chemie* 122, 8599–8603. <https://doi.org/10.1002/ange.201004340>
- Halgasová, N., Kutejová, E., Timko, J., 1994. Purification and some characteristics of the acetylxy lan esterase from *Schizophyllum commune*. *Biochem. J.* 298, 751–755. <https://doi.org/10.1042/bj2980751>
- Hall, J., Black, G.W., Ferreira, L.M.A., Millward-sadler, S.J., Ali, B.R.S., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J., 1995. The non-catalytic cellulose-binding domain of a novel cellulase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* is important for the efficient hydrolysis of Avicel. *Biochem. J.* 309, 749–756. <https://doi.org/10.1042/bj3090749>
- Handford, M.G., Baldwin, T.C., Goubet, F., Prime, T.A., Miles, J., Yu, X., Dupree, P., 2003. Localisation and characterisation of cell wall mannan polysaccharides in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218, 27–36. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1073-9>
- Hansen, M.A.T., Hidayat, B.J., Mogensen, K.K., Jeppesen, M.D., Jørgensen, B., Johansen, K.S., Thygesen, L.G., 2013. Enzyme affinity to cell types in wheat straw (*Triticum aestivum* L.) before and after hydrothermal pretreatment. *Biotechnol. Biofuels* 6, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-54>

- Hansen, M.A.T., Kristensen, J.B., Felby, C., Jørgensen, H., 2011. Pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw (*Triticum aestivum* L.) - The impact of lignin relocation and plant tissues on enzymatic accessibility. *Bioresour. Technol.* 102, 2804–2811. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.030>
- Harper, S.H.T., Lynch, J.M., 1981. The chemical components and decomposition of wheat straw leaves, internodes and nodes. *J. Sci. Food Agric.* 32, 1057–1062. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740321103>
- Harris, G.W., Pickersgill, R.W., Connerton, I., Debeire, P., Touzel, J.P., Breton, C., Pérez, S., 1997. Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 29, 77–86. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(199709\)29:1<77::AID-PROT6>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(199709)29:1<77::AID-PROT6>3.0.CO;2-C)
- Harris, L.J., Larson, S.B., Hasel, K.W., McPherson, A., 1997. Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry* 36, 1581–1597. <https://doi.org/10.1021/bi962514+>
- Harris, P.J., Smith, B.G., 2006. Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41, 129–143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01470.x>
- Hava, D.L., Camilli, A., 2002. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol. Microbiol.* 45, 1389–406. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted>
- Hayashi, H., Takagi, K., Fukumura, M., Kimura, T., Karita, S., Sakka, K., Ohmiya, K., 1997. Sequence of xynC and properties of XynC, a major component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *J. Bacteriol.* 179, 4246–4253.
- Hayashi, T., 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 139–168. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.001035>
- He, Z.H., He, D., Kohorn, B.D., 1998. Requirement for the induced expression of a cell wall-associated receptor kinase for survival during the pathogen response. *Plant J.* 14, 55–63. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00092.x>
- Heiss-Blanquet, S., Zheng, D., Ferreira, N.L., Lapiere, C., Baumberg, S., 2011. Effect of pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw on cell wall composition, hydrophobicity and cellulase adsorption. *Bioresour. Technol.* 102, 5938–5946. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.011>
- Helbert, W., Cavaille, J.Y., Dufresne, A., 1996. Thermoplastic nanocomposites filled with wheat straw cellulose whiskers . Part I: Processing and mechanical behavior. *Polym. Compos.* 17, 604–611. <https://doi.org/10.1002/pc.10650>
- Henrissat, B., Davies, G.J., 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 637–644. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(97\)80072-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(97)80072-3)
- Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C., Schulein, M., 1985. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Biotechnology* 3, 722–726. <https://doi.org/10.1038/nbt0885-722>
- Hernandez-Gomez, M.C., Rydahl, M.G., Rogowski, A., Morland, C., Cartmell, A., Crouch, L.I., Labourel, A., Fontes, C.M.G.A., Willats, W.G.T., Gilbert, H.J., Knox, J.P., 2015. Recognition of xyloglucan by the crystalline cellulose-binding site of a family 3a carbohydrate-binding module. *FEBS Lett.* 589, 2297–2303. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.009>
- Hervé, C., Marcus, S.E., Knox, J.P., 2011. Monoclonal antibodies, carbohydrate-binding modules, and the detection of polysaccharides in plant cell walls, in: *The Plant Cell Wall*. pp. 103–113. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-008-9_7
- 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. *PNAS* 107, 15293–15298. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005732107>

- Hervé, C., Rogowski, A., Gilbert, H.J., Knox, J.P., 2009. Enzymatic treatments reveal differential capacities for xylan recognition and degradation in primary and secondary plant cell walls. *Plant J.* 58, 413–422. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03785.x>
- Hespell, R.B., Cotta, M.A., 1995. Degradation and utilization by *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c of xylans with different chemical and physical properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3042–3050.
- Hildén, L., Daniel, G., Johansson, G., 2003. Use of a fluorescence labelled, carbohydrate-binding module from *Phanerochaete chrysosporium* Ce17D for studying wood cell wall ultrastructure. *Biotechnol. Lett.* 25, 553–558. <https://doi.org/10.1023/A:1022846304826>
- 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* (80-). 315, 804 – 807. <https://doi.org/10.1126/science.1137016>
- 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. <https://doi.org/10.4155/bfs.09.25>
- Hoch, H.C., Galvani, C.D., Szarowski, D.H., Turner, J.N., 2005. Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia* 97, 580–588. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.3.580>
- Hoffmam, Z.B., Zanphorlin, L.M., Cota, J., Diogo, J. a., Almeida, G.B., Damásio, A.R.L., Squina, F., Murakami, M.T., Ruller, R., 2016. Xylan-specific carbohydrate-binding module belonging to family 6 enhances the catalytic performance of a GH11 endo-xylanase. *N. Biotechnol.* 33, 467–472. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.02.006>
- Hogg, D., Pell, G., Dupree, P., Goubet, F., Martín-Orúe, S.M., Armand, S., Gilbert, H.J., Marti, S.M., Gilbert, H.J., 2003. The modular architecture of *Cellvibrio japonicus* mannanases in glycoside hydrolase families 5 and 26 points to differences in their role in mannan degradation. *Biochem. J.* 371, 1027–1043. <https://doi.org/10.1042/bj20021860>
- Holtzapple, M.T., Humphrey, A.E., 1984. The effect of organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 670–676. <https://doi.org/10.1002/bit.260260706>
- Horejsi, V., Ticha, M., 1986. Qualitative and quantitative applications of affinity electrophoresis for the study of protein-ligand interactons: a review. *J. chro* 376, 49–67. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)80823-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)80823-3)
- Hornsby, P.R., Hinrichsen, E., Tarverdi, K., 1997. Preparation and properties of polypropylene composites reinforced with wheat and flax straw fibres Part I Fibre characterization. *J. Mater. Sci.* 32, 443–449. <https://doi.org/10.1023/A:1018521920738>
- Igarashi, K., Uchihashi, T., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Okamoto, T., Penttilä, M., Ando, T., Samejima, M., 2011. Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface. *Science* (80-). 333, 1279–1282. <https://doi.org/10.1126/science.1208386>
- Immergut, E.H., Ranby, B.G., Mark, H.F., 1953. Recent work on molecular weight of cellulose. *Ind. Eng. Chem.* 45, 2483–2490. <https://doi.org/10.1021/ie50527a036>
- Inoue, H., Kishishita, S., Kumagai, A., Kataoka, M., Fujii, T., Ishikawa, K., 2015. Contribution of a family 1 carbohydrate-binding module in thermostable glycoside hydrolase 10 xylanase from *Talaromyces cellulolyticus* toward synergistic enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol. Biofuels* 8, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0259-2>
- Irwin, D.C., Jung, E.D., Wilson, D.B., Al, I.E.T., 1994. Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 763–770.

- Irwin, D.C., Shin, D., Zhang, S., Barr, B.K., Sakon, J., Karplus, P.A., Wilson, D.B., Al, I.E.T., Aacteriol, J.B., 1998. Roles of the catalytic domain and two cellulose binding domains of *Thermomonospora fusca* E4 in cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* 180, 1709–1714.
- Irwin, D.C., Spezio, M., Walker, L.P., Wilson, D.B., 1993. Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 1002–1013.
- Ishii, T., 1997. O-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls. *Plant Physiol.* 113, 1265–1272. <https://doi.org/10.1104/pp.113.4.1265>
- Ishii, T., 1991. Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan hexasaccharide from bamboo shoot cell-walls. *Carbohydr. Res.* 219, 15–22. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(91\)89039-I](https://doi.org/10.1016/0008-6215(91)89039-I)
- Izoré, T., Contreras-Martel, C., El Mortaji, L., Manzano, C., Terrasse, R., Vernet, T., Di Guilmi, A.M., Dessen, A., 2010. Structural basis of host cell recognition by the pilus adhesin from *Streptococcus pneumoniae*. *Structure* 18, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.10.019>
- Izydorczyk, M.S., Biliaderis, C.G., 1995. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* 28, 33–48. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00077-1](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00077-1)
- Jamal-Talabani, S., Boraston, A.B., Turkenburg, J.P., Tarbouriech, N., Ducros, V.M., Davies, G.J., 2004. Ab initio structure determination and functional characterization of CBM36; a new family of calcium-dependent carbohydrate binding modules. *Structure* 12, 1177–1187. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.04.022>
- Jarvis, M.C., 1984. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *plant cell Environ.* 7, 153–164. <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11614586>
- Jauneau, A., Cabin-Flaman, A., Morvan, C., Pariot, C., Ripoll, C., Thellier, M., 1994. Polysaccharide distribution in the cellular junctions of immature fibre cells of flax seedlings. *Histochem. J.* 26, 226–232. <https://doi.org/10.1007/BF00166103>
- Jauneau, A., Morvan, C., Lefebvre, F., Demarty, M., Ripoll, C., Thellier, M., 1992. Differential extractability of calcium and pectic substances in different wall regions of epicotyl cells in young flax plants. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 1183–1189. <https://doi.org/10.1177/40.8.1377735>
- Jeffries, T.W., 1996. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 337–342. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80041-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80041-3)
- Jeffries, T.W., 1994. Biodegradation of lignin and hemicelluloses, in: *Biochemistry of Microbial Degradation*. pp. 233–277.
- Jerabek-Willemsen, M., André, T., Wanner, R., Roth, H.M., Duhr, S., Baaske, P., Breitsprecher, D., 2014. MicroScale Thermophoresis: interaction analysis and beyond. *J. Mol. Struct.* 1077, 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.009>
- Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C.J., Braun, D., Baaske, P., Duhr, S., 2011. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev. Technol.* 9, 342–353. <https://doi.org/10.1089/adt.2011.0380>
- Jervis, E.J., Haynes, C. a., Kilburn, D.G., 1997. Surface diffusion of cellulases and their isolated binding domains on cellulose. *J. Biol. Chem.* 272, 24016–24023. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.24016>
- Johnson, E.A., Reese, E.T., Demain, A.L., 1982. Inhibition of *Clostridium thermocellum* cellulase by end products of cellulolysis. *J. Appl. Biochem.* 4, 64–71.

- Johnson, P.E., Tomme, P., Joshi, M.D., McIntosh, L.P., 1996. Interaction of soluble cellooligosaccharides with the N-terminal cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* Cenc. 2. NMR and ultraviolet absorption spectroscopy. *Biochemistry* 35, 13895–13906. <https://doi.org/10.1021/bi961186a>
- Jones, J.L., Seymour, G.B., Knox, J.P., 1997. Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1->4)-beta-D-galactan. *Plant Physiol.* 113, 1405–1412. <https://doi.org/113/4/1405> [pii]
- Jorgensen, H., Kristensen, J.B., Felby, C., 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 1, 119–134. <https://doi.org/10.1002/bbb.4>
- Juy, M., Amit, A.G., Alzari, P.M., Poljak, R.J., Claeysens, M., Béguin, P., Aubert, J.-P., 1992. Three-dimensional structure of a thermostable bacterial cellulase. *Nature* 357, 89–91. <https://doi.org/10.1038/357089a0>
- Kahel-Raifer, H., Jindou, S., Bahari, L., Nataf, Y., Shoham, Y., Bayer, E.A., Borovok, I., Lamed, R., 2010. The unique set of putative membrane-associated anti- σ factors in *Clostridium thermocellum* suggests a novel extracellular carbohydrate-sensing mechanism involved in gene regulation. *FEMS Microbiol. Lett.* 308, 84–93. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01997.x>
- Kam, D.K., Jun, H., Ha, J.K., Inglis, G.D., Forsberg, C.W., 2005. Characteristics of adjacent family 6 acetylxyylan esterases from *Fibrobacter succinogenes* and the interaction with the Xyn10E xylanase in hydrolysis of acetylated xylan. *Can. J. Microbiol.* 51, 821–832. <https://doi.org/10.1139/W05-074>
- Kellett, L.E., Poole, D.M., Ferreira, L.M.A., Durrant, A.J., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J., 1990. Xylanase B and an arabinofuranosidase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contain identical cellulose-binding domains and are encoded by adjacent genes. *Biochem. J.* 272, 369–376.
- Kerstens-Hilderson, H., Claeysens, M., Van Doorslaer, E., De Bruyne, C.K., 1976. Determination of the anomeric configuration of D-xylose with D-xylose isomerases. *Carbohydr. Res.* 47, 269–273. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84192-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84192-0)
- Kim, S., Dale, B.E., 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 26, 361–375. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.08.002>
- Klinke, H.B., Ahring, B.K., Schmidt, A.S., Thomsen, A.B., 2002. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresour. Technol.* 82, 15–26. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00152-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00152-3)
- Knowles, J., Lehtovaara, P., Teeri, T.T., 1987. Cellulase families and their genes. *Tibtech* 5, 255–261. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(87\)90102-8](https://doi.org/10.1016/0167-7799(87)90102-8)
- Knox, J.P., 2012. *In situ* detection of cellulose with carbohydrate-binding modules, 1st ed, *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415931-0.00012-4>
- Knox, J.P., 2008. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.001>
- Knox, J.P., 1997. The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *Int. Rev. Cytol.* 171, 79–120. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62586-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62586-3)
- Knox, J.P., Day, S., Roberts, K., 1989. A set of cell surface glycoproteins forms an early marker of cell position, but not cell type, in the root apical meristem of *Daucus carota* L. *Development* 106, 47–56.
- Knox, J.P., Linstead, P.J., King, J., Cooper, C., Roberts, K., 1990. Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta* 181, 512–521. <https://doi.org/10.1007/BF00193004>

- Knox, J.P., Linstead, P.J., Peart, J., Cooper, C., Roberts, K., 1991. Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. *Plant J.* 1, 317–326. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1991.t01-9-00999.x>
- Knox, J.P., Peart, J., Neill, S.J., 1995. Identification of novel cell surface epitopes using a leaf epidermal-strip assay system. *Planta* 196, 266–270. <https://doi.org/10.1007/BF00201383>
- Knox, R.B., Heslop-Harrison, J., Reed, C., 1970. Localization of antigens associated with the pollen grain wall by immunofluorescence. *Nature* 225, 1066–1068. <https://doi.org/10.1038/2251066a0>
- Kolenová, K., Vršanská, M., Biely, P., 2006. Mode of action of endo- β -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. *J. Biotechnol.* 121, 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.001>
- Komalavilas, P., Mort, A.J., 1989. The acetylation of O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. *Carbohydr. Res.* 189, 261–272. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(89\)84102-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(89)84102-3)
- Kormos, J.M., Johnson, P.E., Brun, E., Tomme, P., McIntosh, L.P., Haynes, C. a., Kilburn, D.G., 2000. Binding site analysis of cellulose binding domain CBD N1 from endoglucanase C of *Cellulomonas fimi* by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 39, 8844–8852. <https://doi.org/10.1021/bi000607s>
- Kristensen, J.B., Thygesen, L.G., Felby, C., Jorgensen, H., Elder, T., 2008. Cell wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnol. Biofuels* 1, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-5>
- Kudlicka, K., Brown, R.M., Saxena, I.M., Kudlicka, K., 1996. Cellulose biosynthesis in higher plants. *Acta Soc. Bot. Pol.* 1, 149–155. <https://doi.org/10.5586/asbp.1996.003>
- Kuhad, R.C., Singh, A., Eriksson, K.-E.L., 1997. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls, in: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.* pp. 45–125. <https://doi.org/10.1007/BFb0102072>
- Lally, D., Ingmire, P., Tong, H.Y., He, Z.H., 2001. Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology. *Plant Cell* 13, 1317–1331. <https://doi.org/10.2307/3871298>
- Lamed, R., Setter-Lamed, E., Bayer, E.A., 1983a. Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 156, 828–836.
- Lamed, R., Setter-Lamed, E., Kenig, R., Bayer, E.A., 1983b. The cellulosome - A discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities. *Biotechnol. Bioeng.* 13, 163–181.
- Lamed, R., Tormo, J., Chirinol, A.J., Morag, E., Bayer, E.A., 1994. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the major cellulose-binding domain of the cellulosome from *Clostridium thermocellum*. *J. Mol. Biol.* 244, 236–237. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1721>
- Langan, K.J., Nothnagel, E.A., 1997. Cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to cell proliferation and viability. *Protoplasma* 196, 87–98. <https://doi.org/10.1007/BF01281062>
- Langsford, M.L., Gilkes, N.R., Singh, B., Moser, B., Miller, R.C., Warren, R.A.J., D.G., K., 1987. Glycosylation of bacterial cellulase prevents proteolytic cleavage between functional domains. *FEBS Lett.* 225, 163–167. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)81150-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81150-X)
- Lauf, U., Lopez, P., Falk, M.M., 2001. Expression of fluorescently tagged connexins: a novel approach to rescue function of oligomeric DsRed-tagged proteins. *FEBS Lett.* 498, 11–15. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02462-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02462-0)

- Lawther, J.M., Sun, R.C., Banks, W.B., 1995. Extraction, fractionation, and characterization of structural polysaccharides from wheat straw. *J. Agric. Food Chem* 43, 667–675. <https://doi.org/10.1021/jf00051a021>
- Lee, Marcus, S.E., Knox, J.P., 2011. Cell wall biology: perspectives from cell wall imaging. *Mol. Plant* 4, 212–219. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq075>
- Lee, S.B., Shin, H.S., Ryu, D.D., Mandels, M., 1982. Adsorption of cellulase on cellulose: effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 2137–2153. <https://doi.org/10.1002/bit.260241003>
- Lee, Y.-E., Lowe, S.E., Henrissat, B., Zeikus, J.G., 1993. Characterization of the active site and thermostability regions of endoxylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. *J. Bacteriol.* 175, 5890–5898. <https://doi.org/10.1128/jb.175.18.5890-5898.1993>
- Lee, Y.-E., Zeikus, J.G., 1993. Genetic organization, sequence and biochemical characterization of recombinant beta-xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-RI. *J. Gen. Microbiol.* 1235–1243. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-6-1235>
- Lehtio, J., Sugiyama, J., Gustavsson, M., Fransson, L., Linder, M., Teeri, T.T., 2003. The binding specificity and affinity determinants of family 1 and family 3 cellulose binding modules. *PNAS* 100, 484–489. <https://doi.org/10.1073/pnas.212651999>
- Lequart, C., Nuzillard, J.M., Kurek, B., Debeire, P., 1999. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: Production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 319, 102–111. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00110-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00110-X)
- Levasseur, A., Navarro, D., Punt, P.J., Bélaïch, J.-P., Asther, M., Record, E., 2005. Construction of engineered bifunctional enzymes and their overproduction in *Aspergillus niger* for improved enzymatic tools to degrade agricultural by-products. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8132–8140. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8132-8140.2005>
- Li, N., Shi, P., Yang, P., Wang, Y., Luo, H., Bai, Y., Zhou, Z., Yao, B., 2009. A xylanase with high pH stability from *Streptomyces* sp. S27 and its carbohydrate-binding module with/without linker-region-truncated versions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 99–107. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1810-x>
- Liberato, M. V., Silveira, R.L., Prates, E.T., De Araujo, E. a., Pellegrini, V.O. a., Camilo, C.M., Kadowaki, M. a., Neto, M.D.O., Popov, A., Skaf, M.S., Polikarpov, I., 2016. Molecular characterization of a family 5 glycoside hydrolase suggests an induced-fit enzymatic mechanism. *Sci. Rep.* 6, 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep23473>
- Lin, C.C., Melo, F.A., Ghosh, R., Suen, K.M., Stagg, L.J., Kirkpatrick, J., Arold, S.T., Ahmed, Z., Ladbury, J.E., 2012. Inhibition of basal FGF receptor signaling by dimeric Grb2. *Cell* 149, 1514–1524. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.033>
- Linder, M., Salovuori, I., Ruohonen, L., Teeri, T.T., 1996. Characterization of a double cellulose-binding domain. Synergistic high affinity binding to crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* 271, 21268–21272. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.35.21268>
- Liners, F., Letesson, J.J., Didembourg, C., Van Cutsem, P., 1989. Monoclonal antibodies against pectin: recognition of a conformation induced by calcium. *Plant Physiol.* 91, 1419–1424. <https://doi.org/10.1104/pp.91.4.1419>
- Liu, R., Yu, H., Huang, Y., 2005. Structure and morphology of cellulose in wheat straw. *Cellulose* 12, 25–34. <https://doi.org/10.1007/s10570-004-0955-8>
- Liu, Y.S., Zeng, Y., Luo, Y., Xu, Q., Himmel, M.E., Smith, S.J., Ding, S.-Y., 2009. Does the cellulose-binding module move on the cellulose surface? *Cellulose* 16, 587–597. <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9306-0>

- 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, 490–495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Lymar, E.S., Li, B., Renganathan, V., 1995. Purification and characterization of a cellulose-binding (beta)-glucosidase from cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2976–2980.
- Lynch, J.M., Gunn, K.B., Panting, L.M., 1980. On the concentration of acetic acid in straw and soil. *Plant Soil* 1, 93–98. <https://doi.org/10.1007/BF02197956>
- Manna, S., McAnalley, B.H., 1993. Determination of the position of the O-acetyl group in a β -(1,4)-mannan (acemannan) from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydr. Res.* 241, 317–319. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)80122-U](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)80122-U)
- Marcus, S.E., Blake, A.W., Benians, T.A.S., Lee, K.J.D., Poyser, C., Donaldson, L., Leroux, O., Rogowski, A., Petersen, H.L., Boraston, A.B., Gilbert, H.J., Willats, W.G.T., Knox, J.P., 2010. Restricted access of proteins to mannan polysaccharides in intact plant cell walls. *Plant J.* 64, 191–203. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04319.x>
- Marcus, S.E., Verherbruggen, Y., Hervé, C., Ordaz-Ortiz, J.J., Farkas, V., Pedersen, H.L., Willats, W.G.T., Knox, J.P., 2008. Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-60>
- Margolles-Clark, E., Tenkanen, M., Söderlund, H., Penttilä, M., 1996. Acetyl xylan esterase from *Trichoderma reesei* contains an active-site serine residue and a cellulose-binding domain. *Eur. J. Biochem.* 237, 553–560. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0553p.x>
- Marshall, K., Sixsmith, D., 1974. Some physical characteristics of microcrystalline cellulose. (1) Powders for pharmaceutical use. *Drug Dev Commun* 1, 57–71. <https://doi.org/10.3109/03639047409088168>
- Massiot, P., Thibault, J.-F., Rouau, X., 1989. Degradation of carrot (*Daucus carota*) fibres with cell-wall polysaccharide-degrading enzymes. *J. Sci. Food Agric.* 49, 45–57. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740490106>
- Matte, A., Forsberg, C.W., 1992. Purification, characterization, and mode of action of endoxylanases 1 and 2 from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 157–168.
- Mattinen, M.-L., Linder, M., Teleman, A., Annala, A., 1997. Interaction between cellohexaose and cellulose binding domains from *Trichoderma reesei* cellulases. *FEBS Lett.* 407, 291–296. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00356-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00356-6)
- McCann, M.C., Wells, B., Roberts, K., 1990. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *J. Cell Sci.* 96, 323–334.
- McCarter, J.D., Withers, S.G., 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 885–892. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(94\)90271-2](https://doi.org/10.1016/0959-440X(94)90271-2)
- McCartney, L., Blake, A.W., Flint, J.E., Bolam, D.N., Boraston, A.B., Gilbert, H.J., Knox, J.P., 2006. Differential recognition of plant cell walls by microbial xylan-specific carbohydrate-binding modules. *PNAS* 103, 4765–4770. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508887103>
- McCartney, L., Gilbert, H.J., Bolam, D.N., Boraston, A.B., Knox, J.P., 2004. Glycoside hydrolase carbohydrate-binding modules as molecular probes for the analysis of plant cell wall polymers. *Anal. Biochem.* 326, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.11.011>
- McCartney, L., Marcus, S.E., Knox, J.P., 2005. Monoclonal Antibodies to Plant Cell Wall Xylans and Arabinoxylans. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 543–546. <https://doi.org/10.1369/jhc.4B6578.2005>

- McCartney, L., Ormerod, A.P., Gidley, M.J., Knox, J.P., 2000. Temporal and spatial regulation of pectic (1-4)-beta-D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. *Plant J.* 22, 105–113. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00719.x>
- McCleary, B. V., McGeough, P., 2015. A Comparison of polysaccharide substrates and reducing sugar methods for the measurement of endo-1,4- β -xylanase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 177, 1152–1163. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1803-z>
- McKean, W.T., Jacobs, R.S., 1997. *Wheat straw as a paper fiber source*, Washington, USA: Clean Washington Center.
- Mckie, V.A., Vincken, J.-P., Voragen, A.G.J., Van den Broeck, H., Stimson, E., Gilbert, H.J., 2001. A new family of rhamnogalacturonan lyases contains an enzyme that binds to cellulose. *Biochem. J.* 355, 167–177. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3550167>
- McLean, B.W., Boraston, A.B., Brouwer, D., Sanaie, N., Fyfe, C.A., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., Haynes, C.A., 2002. Carbohydrate-binding modules recognize fine substructures of cellulose. *J. Biol. Chem.* 277, 50245–50254. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204433200>
- McNeil, M., Darvill, A.C., Fry, S.C., Peter, A., 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 625–663.
- Megazyme, n.d. Xylan (Beechwood; purified) [WWW Document]. URL <https://secure.megazyme.com/Xylan-Beechwood-purified> (accessed 7.10.17).
- Meikle, P.J., Bonig, I., Hoogenraad, N.J., Clarke, A.E., Stone, B.A., 1991. The location of (1,3)-beta-glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana glauca* using a (1,3)-beta-glucan-specific monoclonal antibody. *Planta* 185, 1–8. <https://doi.org/10.1007/BF00194507>
- Meikle, P.J., Hoogenraad, N.J., Bonig, I., Clarke, A.E., Stone, B.A., 1994. A (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)- β -glucan-specific monoclonal antibody and its use in the quantitation and immunocytochemical location of (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)- β -glucans. *Plant J.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1994.5010001.x>
- Menon, V., Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* 38, 522–550. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>
- Merino, S.T., Cherry, J., 2007. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization, in: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. pp. 95–120. https://doi.org/10.1007/10_2007_066
- Millward-Sadler, S.J., Davidson, K., Hazlewood, G.P., Black, G.W., Gilbert, H.J., Clarket, J.H., 1995. Novel cellulose-binding domains, NodB homologues and conserved modular architecture in xylanases from the aerobic soil bacteria *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* and *Celivibrio mixtus*. *Biochem. J.* 312, 39–48. <https://doi.org/10.1042/bj3120039>
- Millward-Sadler, S.J., Poole, D.M., Henrissat, B., Hazlewood, G.P., Clarke, J.H., Gilbert, H.J., 1994. Evidence for a general role for high-affinity non-catalytic cellulose-binding domains in microbial plant-cell wall hydrolases. *Mol. Microbiol.* 11, 375–382. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1994.Tb00317.X>
- Mingardon, F., Be, A., Tardif, C., 2005. Heterologous production, assembly, and secretion of a minicellulosome by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1215–1222. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1215>
- Mingardon, F., Chanal, A., López-Contreras, A.M., Dray, C., Bayer, E.A., Fierobe, H.-P., 2007. Incorporation of fungal cellulases in bacterial minicellulosomes yields viable, synergistically acting cellulolytic complexes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3822–3832. <https://doi.org/10.1128/AEM.00398-07>

- Miyoshi, T., Ito, K., Murakami, R., Uchiumi, T., 2016. Structural basis for the recognition of guide RNA and target DNA heteroduplex by Argonaute. *Nat. Commun.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms11846>
- Moller, I., Marcus, S.E., Haeger, A., Verhertbruggen, Y., Verhoef, R.P., Schols, H.A., Ulvskov, P., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P., Willats, W.G.T., 2008. High-throughput screening of monoclonal antibodies against plant cell wall glycans by hierarchical clustering of their carbohydrate microarray binding profiles. *Glycoconj. J.* 25, 37–48. <https://doi.org/10.1007/s10719-007-9059-7>
- Mondolot, L., Roussel, J.L., Andary, C., 2001. New applications for an old lignified element staining reagent. *Histochem. J.* 33, 379–385. <https://doi.org/10.1023/A:1013798426161>
- Montanier, C.Y., Correia, M.A.S.S., Flint, J.E., Zhu, Y., Baslé, A., McKee, L.S., Prates, J.A.M., Polizzi, S.J., Coutinho, P.M., Lewis, R.J., Henrissat, B., Fontes, C.M.G.A., Gilbert, H.J., 2011. A novel, noncatalytic carbohydrate-binding module displays specificity for galactose-containing polysaccharides through calcium-mediated oligomerization. *J. Biol. Chem.* 286, 22499–22509. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.217372>
- Montanier, C.Y., van Bueren, A.L., Bueren, V., Dumon, C., Flint, J.E., Correia, M.A.S.S., Prates, J.A.M., Firbank, S.J., Lewis, R.J., Grondin, G.G., Ghinet, M.G., Gloster, T.M., Hervé, C., Knox, J.P., Talbot, B.G., Turkenburg, J.P., Kerovuo, J., Brzezinski, R., Fontes, C.M.G.A., Davies, G.J., Boraston, A.B., Gilbert, H.J., 2009. Evidence that family 35 carbohydrate binding modules display conserved specificity but divergent function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3065–3070. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808972106>
- Morag, E., Bayer, E.A., Lamed, R., 1990. Relationship of cellulosomal and noncellulosomal xylanases of *Clostridium thermocellum* to cellulose-degrading enzymes. *J. Bacteriol.* 172, 6098–6105.
- Moraïs, S., Barak, Y., Caspi, J., 2010a. Cellulase-xylanase synergy in designer cellulosomes for enhanced degradation of a complex cellulosic substrate. *MBio* 1, 1–8. <https://doi.org/10.1128/mBio.00285-10>
- Moraïs, S., Barak, Y., Caspi, J., Hadar, Y., Lamed, R., Shoham, Y., Wilson, D.B., Bayer, E.A., 2010b. Contribution of a xylan-binding module to the degradation of a complex cellulosic substrate by designer cellulosomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3787–3796. <https://doi.org/10.1128/AEM.00266-10>
- Motte, J.-C., Escudié, R., Beaufils, N., Steyer, J.P., Bernet, N., Delgenès, J.P., Dumas, C., 2014. Morphological structures of wheat straw strongly impacts its anaerobic digestion. *Ind. Crops Prod.* 52, 695–701. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.038>
- Mueller-Harvey, I., Hartley, R.D., Harris, P.J., Curzon, E.H., 1986. Linkage of *p*-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydr. Res.* 148, 71–85. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(86\)80038-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(86)80038-6)
- Muilu, J., Törrönen, A., Perakyla, M., Rouvinen, J., 1998. Functional conformational changes of endo-1,4-xylanase II from *Trichoderma reesei*: a molecular dynamics study. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 31, 434–444. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19980601\)31:4<434::AID-PROT9>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19980601)31:4<434::AID-PROT9>3.0.CO;2-H)
- Murzin, A.G., 1993. OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.* 12, 861–867.
- Murzin, A.G., Lesk, A.M., Chothiap, C., 1992. Beta-trefoil fold patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitorsinterleukins - 1 beta and 1 alpha and fibroblast growth factors. *J. Mol. Biol.* 223, 531–543. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90668-A](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90668-A)
- Nagy, T., Simpson, P.J., Williamson, M.P., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J., Orosz, L., 1998. All three surface tryptophans in type IIa cellulose binding domains play a pivotal role in binding both soluble and insoluble ligands. *FEBS Lett.* 429, 312–316. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00625-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00625-5)

- Najmudin, S., Guerreiro, C.I.P.D., Carvalho, A.L.M., Prates, J.A.M., Correia, M.A.S.S., Alves, V.D., Ferreira, L.M.A., Roma, M.J., Gilbert, H.J., Bolam, D.N., Fontes, C.M.G.A., 2006. Xyloglucan is recognized by carbohydrate-binding modules that interact with beta-glucan chains. *J. Biol. Chem.* 281, 8815–8828. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510559200>
- Nataf, Y., Bahari, L., Kahel-Raifer, H., Borovok, I., Lamed, R., Bayer, E.A., Sonenshein, A.L., Shoham, Y., 2010. *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes are regulated by extracytoplasmic polysaccharides via alternative sigma factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18646–18651. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012175107>
- Nelson, A.L., Ries, J., Bagnoli, F., Dahlberg, S., Fälker, S., Rounioja, S., Tschöp, J., Morfeldt, E., Ferlenghi, I., Hilleringmann, M., Holden, D.W., Rappuoli, R., Normark, S., Barocchi, M.A., Henriques-Normark, B., 2007. RrgA is a pilus-associated adhesin in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 66, 329–340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05908.x>
- Novagen, 2003. pET System Manual, Biosystems. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs015>
- Novozymes, 2009. Celluclast 1.5L.
- Novozymes, n.d. Novozymes Cellic CTec2 and HTec2 enzymes for hydrolysis of lignocellulosic.
- Nurizzo, D., Turkenburg, J.P., Charnock, S.J., Roberts, S.M., Dodson, E.J., McKie, V.A., Taylor, E.J., Gilbert, H.J., Davies, G.J., 2002. *Cellvibrio japonicus* alpha-L-arabinanase 43A has a novel five-blade beta-propeller fold. *Nat. Struct. Biol.* 9, 665–668. <https://doi.org/10.1038/nsb835>
- O'Neill, M. a., Ishii, T., Albersheim, P., Darvill, A.G., 2004. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 109–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141750>
- O'Neill, M., Albersheim, P., Darvill, A., 1990. The pectic polysaccharides of primary cell walls, in: *Methods in Plant Biochemistry*, 2. pp. 415–441.
- O'Sullivan, A., 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4, 173–207.
- Ong, E., Gilkes, N.R., Miller, R.C., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., 1993. The Cellulose-Binding Domain (CBDcex) of an exoglucanase from *Cellulomonas fimi*: production in *Escherichia coli* and characterization of the polypeptide. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 401–409. <https://doi.org/10.1002/bit.260420402>
- Ong, E., Greenwood, J.M., Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Miller, R.C., Warren, R.A.J., 1989. The cellulose-binding domains of cellulases: tools for biotechnology. *Tibtech* 7, 239–243. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(89\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0167-7799(89)90014-0)
- Ordaz-Ortiz, J.J., Devaux, M.-F., Saulnier, L., 2005. Classification of wheat varieties based on structural features of arabinoxylans as revealed by endoxylanase treatment of flour and grain. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8349–8356. <https://doi.org/10.1021/jf050755v>
- Ordaz-Ortiz, J.J., Marcus, S.E., Knox, J.P., 2009. Cell wall microstructure analysis implicates hemicellulose polysaccharides in cell adhesion in tomato fruit pericarp parenchyma. *Mol. Plant* 2, 910–921. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp049>
- Orfila, C., Knox, J.P., 2000. Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation to pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp. *Plant Physiol.* 122, 775–781. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.775>
- Orfila, C., Sørensen, S.O., Harholt, J., Geshi, N., Crombie, H., Truong, H.N., Reid, J.S.G., Knox, J.P., Scheller, H.V., 2005. QUASIMODO1 is expressed in vascular tissue of *Arabidopsis thaliana* inflorescence stems, and affects homogalacturonan and xylan biosynthesis. *Planta* 222, 613–622. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0008-z>

- Paës, G., 2014. Fluorescent probes for exploring plant cell wall deconstruction: a review. *Molecules* 19, 9380–9402. <https://doi.org/10.3390/molecules19079380>
- Paës, G., Berrin, J.-G., Beaugrand, J., 2012a. GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnol. Adv.* 30, 564–592. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.003>
- Paës, G., Burr, S., Saab, M.B., Molinari, M., Aguié-Béghin, V., Chabbert, B., 2013. Modeling progression of fluorescent probes in bioinspired lignocellulosic assemblies. *Biomacromolecules* 14, 2196–2205. <https://doi.org/10.1021/bm400338b>
- Paës, G., Chabbert, B., 2012. Characterization of arabinoxylan/cellulose nanocrystals gels to investigate fluorescent probes mobility in bioinspired models of plant secondary cell wall. *Biomacromolecules* 13, 206–214. <https://doi.org/10.1021/bm201475a>
- Paës, G., Cortés, J., Siméon, T., O'Donohue, M.J., Tran, V., 2012b. Thumb-loops up for catalysis: a structure/function investigation of a functional loop movement in a GH11 xylanase. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 1, e201207001. <https://doi.org/10.5936/csbj.201207001>
- Paës, G., Skov, L.K., O'Donohue, M.J., Rémond, C., Kastrup, J.S., Gajhede, M., Mirza, O., 2008. The structure of the complex between a branched pentasaccharide and *Thermobacillus xylanilyticus* GH-51 arabinofuranosidase reveals xylan-binding determinants and induced fit. *Biochemistry* 47, 7441–7451. <https://doi.org/10.1021/bi800424e>
- Paës, G., Tran, V., Takahashi, M., Boukari, I., O'Donohue, M.J., 2007. New insights into the role of the thumb-like loop in GH-11 xylanases. *Protein Eng. Des. Sel.* 20, 15–23. <https://doi.org/10.1093/protein/gzl049>
- Pagès, S., Bélaïch, A., Bélaïch, J.-P., Morag, E., Lamed, R., Shoham, Y., Bayer, E.A., 1997. Species-specificity of the cohesin-dockerin interaction between *Clostridium thermocellum* and *Clostridium cellulolyticum*: prediction of specificity determinants of the dockerin domain. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 29, 517–527. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(199712\)29:4<517::AID-PROT11>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(199712)29:4<517::AID-PROT11>3.0.CO;2-P)
- Palonen, H., Tjerneld, F., Zacchi, G., Tenkanen, M., 2004. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *J. Biotechnol.* 107, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.09.011>
- Pan, X., Gilkes, N.R., Saddler, J.N., 2006. Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Holzforschung* 60, 398–401. <https://doi.org/10.1515/HF.2006.062>
- Park, A.R., Cho, S.K., Yun, U.J., Jin, M.Y., Lee, S.H., Sachetto-Martins, G., Park, O.K., 2001. Interaction of the *Arabidopsis* receptor protein kinase Wak1 with a glycine-rich protein, AtGRP-3. *J. Biol. Chem.* 276, 26688–26693. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101283200>
- Pattathil, S., Avci, U., Baldwin, D., Swennes, A.G., McGill, J.A., Popper, Z. a., Bootten, T., Albert, A., Davis, R.H., Chennareddy, C., Dong, R., O'Shea, B., Rossi, R., Leoff, C., Freshour, G., Narra, R., O'Neill, M. a., York, W.S., Hahn, M.G., 2010. A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies. *Plant Physiol* 153, 514–525. <https://doi.org/10.1104/pp.109.151985>
- Payne, C.M., Resch, M.G., Chen, L., Crowley, M.F., Himmel, M.E., Taylor, L.E., Sandgren, M., Ståhlberg, J., Stals, I., Tan, Z., Beckham, G.T., 2013. Glycosylated linkers in multimodular lignocellulose-degrading enzymes dynamically bind to cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 14646–14651. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309106110>
- Pedersen, H.L., Fangel, J.U., McCleary, B. V., Ruzanski, C., Rydahl, M.G., Ralet, M.-C., Farkas, V., Von Schantz, L., Marcus, S.E., Andersen, M.C.F., Field, R., Ohlin, M., Knox, J.P., Clausen, M.H., Willats, W.G.T., 2012. Versatile high resolution oligosaccharide microarrays for plant glycobiology and cell wall research. *J. Biol. Chem.* 287, 39429–39438. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.396598>

- Pell, G., Taylor, E.J., Gloster, T.M., Turkenburg, J.P., Fontes, C.M.G.A., Ferreira, L.M.A., Nagy, T., Clark, S.J., Davies, G.J., Gilbert, H.J., 2004. The mechanisms by which family 10 glycoside hydrolases bind decorated substrates. *J. Biol. Chem.* 279, 9597–9605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312278200>
- Pennell, R.I., Janniche, L., Kjellbom, P., Scofield, G.N., Peart, J., Roberts, K., 1991. Developmental regulation of a plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oilseed rape flowers. *Plant Cell* 3, 1317–1326. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.12.1317>
- Pennell, R.I., Knox, J.P., Scofield, G.N., Selvendran, R.R., Roberts, K., 1989. A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants. *J. Cell Biol.* 108, 1967–1977. <https://doi.org/10.1083/jcb.108.5.1967>
- Pereira, C.S., Silveira, R.L., Dupree, P., Skaf, M.S., 2017. Effects of xylan side-chain substitutions on xylan-cellulose interactions and implications for thermal pretreatment of cellulosic biomass. *Biomacromolecules* 18, 1311–1321. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00067>
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5, 53–63. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>
- Pettolino, F.A., Hoogenraad, N.J., Ferguson, C., Bacic, A., Johnson, E., Stone, B.A., 2001. A (1→4)-β-mannan-specific monoclonal antibody and its use in the immunocytochemical location of galactomannans. *Planta* 214, 235–242. <https://doi.org/10.1007/s004250100606>
- Philippe, S., Saulnier, L., Guillon, F., 2006. Arabinoxylan and (1,3),(1,4)-beta-glucan deposition in cell walls during wheat endosperm development. *Planta* 224, 449–461. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0209-5>
- Pohlschroder, M., Leschine, S.B., Canale-parola, E., 1994. Multicomplex cellulase-xylanase system of *Clostridium papyrosolvans* C7. *J. Bacteriol.* 176, 70–76.
- Pointon, J.A., Smith, W.D., Saalbach, G., Crow, A., Kehoe, M.A., Banfield, M.J., 2010. A highly unusual thioester bond in a pilus adhesin is required for efficient host cell interaction. *J. Biol. Chem.* 285, 33858–33866. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.149385>
- Pollet, A., Vandermarliere, E., Lammertyn, J., Strelkov, S. V., Delcour, J.A., Courtin, C.M., 2009. Crystallographic and activity-based evidence for thumb flexibility and its relevance in glycoside hydrolase family 11 xylanases. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 77, 395–403. <https://doi.org/10.1002/prot.22445>
- Poole, D.M., Hazlewood, G.P., Huskisson, N.S., Virden, R., Gilbert, H.J., 1993. The role of conserved tryptophan residues in the interaction of a bacterial cellulose binding domain with its ligand. *FEMS Microbiology Lett.* 106, 77–84. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb05938.x>
- Poole, D.M., Morag, E., Lamed, R., Bayer, E.A., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J., 1992. Identification of the cellulose binding domain of the cellulosome subunit S1 from *Clostridium thermocellum* YS. *FEMS Microbiol. Lett.* 99, 181–186.
- Poon, D.K.Y., Withers, S.G., McIntosh, L.P., 2007. Direct demonstration of the flexibility of the glycosylated proline-threonine linker in the *Cellulomonas fimi* xylanase Cex through NMR spectroscopic analysis. *J. Biol. Chem.* 282, 2091–2100. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609670200>
- Popper, Z. a., 2008. Evolution and diversity of green plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.02.012>
- Porter, S.E., Donohoe, B.S., Beery, K.E., Xy, Q., Ding, S.-Y., Vinzant, T.B., Abbas, C.A., Himmel, M.E., 2007. Microscopic analysis of corn fiber using starch- and cellulose-specific molecular probes. *Biotechnol. Bioeng.* 98, 123–131. <https://doi.org/10.1002/bit21409>

- Poutanen, K., Puls, J., 1988. Characteristics of *Trichoderma reesei* beta-xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 425–432.
- Poutanen, K., Sundberg, M., Korte, H.E., Puls, J., 1990. Deacetylation of xylans by acetyl esterases of *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 506–510. <https://doi.org/10.1007/BF00172542>
- Prates, J.A.M., Tarbouriech, N., Charnock, S.J., Fontes, C.M.G.A., Ferreira, L.M.A., Davies, G.J., 2001. The structure of the feruloyl esterase module of xylanase 10B from *Clostridium thermocellum* provides insights into substrate recognition. *Structure* 9, 1183–1190. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00684-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00684-0)
- Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the advisory committee on immunization practices [WWW Document], 1997. MMWR. URL <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00047135.htm>
- Puhlmann, J., Bucheli, E., Michael, J., Dunning, N., Albersheim, P., Darvill, A.C., Hahn, M.C., 1994. Generation of monoclonal antibodies against plant cell-wall polysaccharides. *Plant Physiol.* 104, 699–710.
- Puls, J., 1997. Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *Macromol. Symp.* 120, 183–196. <https://doi.org/10.1002/masy.19971200119>
- Puls, J., Tenkanen, M., Korte, H.E., Poutanen, K., 1991. Products of hydrolysis of beechwood acetyl-4-O-methylglucuronoxylan by a xylanase and an acetyl xylan esterase. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 483–486. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(91\)90006-V](https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90006-V)
- Quentin, M., Ebbelaar, M., Derksen, J., Mariani, C., Van Der Valk, H., 2002. Description of a cellulose-binding domain and a linker sequence from *Aspergillus* fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 658–662. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0937-4>
- Quioco, F. a., 1989. Protein-carbohydrate interactions: basic molecular features. *Pure Appl. Chem.* 61, 1293–1306. <https://doi.org/10.1351/pac198961071293>
- Raikhel, N. V., Lee, H.-I., Broekaert, W.F., 1993. Structure and function of chitin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 591–615. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.44.060193.003111>
- Ralet, M., Crépeau, M.J., Lefèbvre, J., Mouille, G., Hofte, H., Thibault, J.-F., 2008. Reduced number of homogalacturonan domains in pectins of an *Arabidopsis* mutant enhances the flexibility of the polymer. *Biomacromolecules* 9, 1454–1460. <https://doi.org/10.1021/bm701321g>
- Ralet, M.-C., Thibault, J.-F., Della Valle, G., 1990. Influence of extrusion-cooking on the physico-chemical properties of wheat bran. *J. Cereal Sci.* 11, 249–259. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(09\)80169-0](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(09)80169-0)
- Ratanakhanokchai, K., Waeonukul, R., Pason, P., Chakrit Tachaapaikoon, Kyu, K.L., Sakka, K., Kosugi, A., Mori, Y., 2013. *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 multienzyme complex: a novel system for biomass utilization, in: *Biomass Now*. pp. 369–394. <https://doi.org/10.5772/51820>
- Reid, J.S.G., 1985. Cell-wall storage carbohydrates in seeds - biochemistry of the seed gums and hemicelluloses, in: *Advances In Botanical Research Incorporating Advances In Plant Pathology*. pp. 125–155. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)60170-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60170-6)
- Reinikainen, T., Ruohonen, L., Nevanen, T., Laaksonen, L., Kraulis, P.J., Jones, T.A., Knowles, J.K.C., Teeri, T.T., 1992. Investigation of the function of mutated cellulose-binding domains of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 14, 475–482. <https://doi.org/10.1002/prot.340140408>
- Reinikainen, T., Teleman, O., Teeri, T.T., 1995. Effects of pH and high ionic strength on the adsorption and activity of native and mutated cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 22, 392–403. <https://doi.org/10.1002/prot.340220409>

- Rémond, C., Boukari, I., Chambat, G., O'Donohue, M.J., 2008. Action of a GH 51 α -L-arabinofuranosidase on wheat-derived arabinoxylans and arabino-xylooligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* 72, 424–430. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.09.008>
- Ridley, B.L., O'Neill, M. a., Mohnen, D., 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling, in: *Phytochemistry*. pp. 929–967. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00113-3)
- Riedel, K., Bronnenmeier, K., 1998. Intramolecular synergism in an engineered exo-endo-1,4- beta-glucanase fusion protein. *Mol. Microbiol.* 28, 767–775. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00834.x>
- Ringel, R., Sologub, M., Morozov, Y.I., Litonin, D., Cramer, P., Temiakov, D., 2011. Structure of human mitochondria RNA polymerase. *Nature* 478, 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature10435>
- Robinson, C.R., Sauer, R.T., 1998. Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 5929–5934. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.5929>
- Rodrigues, A.C., Haven, M.Ø., Lindedam, J., Felby, C., Gama, M., 2015. Celluclast and Cellic CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid-liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. *Enzyme Microb. Technol.* 79-80, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.019>
- Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T.T., Knowles, J.K.C., Jones, T.A., 1990. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* (80-.). 249, 380–386. <https://doi.org/10.1126/science.2377893>
- Rubin, E.M., 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454, 841–845. <https://doi.org/10.1038/nature07190>
- Ryden, P., Sugimoto-Shirasu, K., Smith, a C., Findlay, K., Reiter, W.-D., McCann, M.C., 2003. Tensile properties of *Arabidopsis* cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. *Plant Physiol.* 132, 1033–1040. <https://doi.org/10.1104/pp.103.021873>
- Rye, C.S., Withers, S.G., 2000. Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 573–580.
- Saha, B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 279–291. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>
- Saha, B.C., 2000. α -L-arabinofuranosidases: biochemistry , molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18, 403–423. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00044-6)
- Sammond, D.W., Payne, C.M., Brunecky, R., Himmel, M.E., Crowley, M.F., Beckham, G.T., 2012. Cellulase linkers are optimized based on domain type and function: insights from sequence analysis, biophysical measurements, and molecular simulation. *PLoS One* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048615>
- Sapag, A., Wouters, J., Lambert, C., de Ioannes, P., Eyzaguirre, J., Depiereux, E., 2002. The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. *J. Biotechnol.* 95, 109–131. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00002-0)
- Sarkar, P., Bosneaga, E., Auer, M., 2009. Plant cell walls throughout evolution: Towards a molecular understanding of their design principles. *J. Exp. Bot.* 60, 3615–3635. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp245>
- Saulnier, L., Sado, P.E., Branlard, G., Charmet, G., Guillon, F., 2007. Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *J. Cereal Sci.* 46, 261–281. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.06.014>

- Sauter, M., Seagull, R.W., Kende, H., 1993. Internodal elongation and orientation of cellulose microfibrils and microtubules in deepwater rice. *Planta* 190, 354–362. <https://doi.org/10.1007/BF00196964>
- Scalbert, A., Monties, B., Guittet, E., Lallemand, J.Y., 1986. Comparison of wheat straw lignin preparations - I. Chemical and spectroscopic characterizations. *Holzforschung* 40, 119–127. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1986.40.2.119>
- Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J.Y., Guittet, E., Rolando, C., 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* 24, 1359–1362. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81133-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81133-4)
- Schaeffer, F., Matuschek, M., Guglielmi, G., Miras, I., Alzari, P.M., Béguin, P., 2002. Duplicated dockerin subdomains of *Clostridium thermocellum* endoglucanase Cel1D bind to a cohesin domain of the scaffolding protein CipA with distinct thermodynamic parameters and a negative cooperativity. *Biochemistry* 41, 2106–2114. <https://doi.org/10.1021/bi011853m>
- Schneidman-Duhovny, D., Hammel, M., Tainer, J.A., Sali, A., 2016. FoXS, FoXSDock and MultiFoXS: Single-state and multi-state structural modeling of proteins and their complexes based on SAXS profiles. *Nucleic Acids Res.* 44, 424–429. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw389>
- Schubert, T., Pusch, M.C., Diermeier, S., Benes, V., Kremmer, E., Imhof, A., Längst, G., 2012. Df31 Protein and snoRNAs Maintain Accessible Higher-Order Structures of Chromatin. *Mol. Cell* 48, 434–444. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.021>
- Schultz, C., Gilson, P., Oxley, D., Youl, J., Bacic, A., 1998. GPI-anchors on arabinogalactan- proteins: implications for signalling in plants. *Trends Plant Sci.* 3, 426–431. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01331-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01331-4)
- Schwarz, W.H., Zverlov, V. V., Bahl, H., 2004. Extracellular glycosyl hydrolases from *Clostridia*. *Adv. Appl. Microbiol.* 56, 215–260. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(04\)56007-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(04)56007-0)
- Seidel, S.A.I., Wienken, C.J., Geissler, S., Jerabek-Willemsen, M., Duhr, S., Reiter, A., Trauner, D., Braun, D., Baaske, P., 2012. Label-free microscale thermophoresis discriminates sites and affinity of protein-ligand binding. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 51, 10656–10659. <https://doi.org/10.1002/anie.201204268>
- Selig, M.J., Adney, W.S., Himmel, M.E., Decker, S.R., 2009. The impact of cell wall acetylation on corn stover hydrolysis by cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Cellulose* 16, 711–722. <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9322-0>
- Selig, M.J., Knoshaug, E.P., Adney, W.S., Himmel, M.E., Decker, S.R., 2008. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. *Bioresour. Technol.* 99, 4997–5005. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.064>
- Serpe, M.D., Nothnagel, E.A., 1994. Effects of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: Evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. *Planta* 193, 542–550. <https://doi.org/10.1007/BF02411560>
- Setter-Lamed, E., Morais, S., Stern, J., Lamed, R., Bayer, E.A., 2017. Modular organization of the *Thermobifida fusca* exoglucanase Cel6B impacts cellulose hydrolysis and designer cellulosome efficiency. *Biotechnol. J.* 12, 1–23. <https://doi.org/10.1002/biot.201700205>
- Shallom-Shezifi, D., Leon, M., Bravman, T., Ben-david, A., Zaide, G., Belakhov, V., Shoham, G., Schomburg, D., Baasov, T., Shoham, Y., 2005. Biochemical characterization and identification of the catalytic residues of a family 43 beta-D-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6. *Biochemistry* 44, 387–397.
- Shallom-Shezifi, D., Shoham, Y., 2003. Microbial hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 219–228. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00056-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00056-0)

- Shao, W., Wiegel, J., 1995. Purification and characterization of two thermostable acetyl xylan esterases from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 729–733.
- Shen, H., Schmuck, M., Pilz, I., Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Miller, R.C., Warren, R.A.J., 1991. Deletion of the linker connecting the catalytic and cellulose-binding domains of endoglucanase A (CenA) of conformation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 266, 11335–11340.
- Shen, M.-Y., Sali, A., 2006. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci.* 15, 2507–2524. <https://doi.org/10.1110/ps.062416606>. Instead
- Shiiba, K., Yamada, H., Hara, H., Okada, K., Nagao, S., 1993. Purification and characterization of two arabinoxylans from wheat bran. *Cereal Chem.* 70, 209–214.
- Showalter, A.M., 2001. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1399–1417. <https://doi.org/10.1007/PL00000784>
- Showalter, A.M., 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5, 9–23. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.1.9>
- Shulami, S., Gat, O., Sonenshein, A.L., 1999. The glucuronic acid utilization gene cluster from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *J. Bacteriol.* 181, 3695–3704.
- Silva, G.G.D., Couturier, M., Berrin, J.-G., Buléon, A., Rouau, X., 2012. Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw. *Bioresour. Technol.* 103, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.073>
- Simpson, P.J., Bolam, D.N., Cooper, A., Ciruela, A., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J., Williamson, M.P., 1999. A family IIb xylan-binding domain has a similar secondary structure to a homologous family IIa cellulose-binding domain but different ligand specificity. *Structure* 7, 853–864. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80108-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80108-7)
- Simpson, P.J., Xie, H., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Williamson, M.P., 2000. The structural basis for the ligand specificity of family 2 carbohydrate-binding modules. *J. Biol. Chem.* 275, 41137–41142. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006948200>
- Sinnott, M.L., 1990. Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem Rev* 90, 1171–1202. <https://doi.org/10.1021/cr00105a006>
- Smallwood, M., Beven, A., Donovan, N., Neill, S.J., Peart, J., Roberts, K., Knox, J.P., 1994. Localization of cell wall proteins in relation to the developmental anatomy of the carrot root apex. *Plant J.* 5, 237–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1994.05020237.x>
- Smallwood, M., Martin, H., Knox, J.P., 1995. An epitope of rice threonine- and hydroxyproline-rich glycoprotein is common to cell wall and hydrophobic plasma-membrane glycoproteins. *Planta* 196, 510–522. <https://doi.org/10.1007/BF00203651>
- Smallwood, M., Yates, E. a., Willats, W.G.T., Martin, H., Knox, J.P., 1996. Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. *Planta* 198, 452–459. <https://doi.org/10.1007/BF00620063>
- Smith, B.G., Harris, P.J., 1999. The polysaccharide composition of *Poales* cell walls: *Poaceae* cell walls are not unique. *Biochem. Syst. Ecol.* 27, 33–53. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(98\)00068-4](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(98)00068-4)
- Smith, M.M., Hartley, R.D., 1983. Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydr. Res.* 118, 65–80. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(83\)88036-7](https://doi.org/10.1016/0008-6215(83)88036-7)

- Song, L., Dumon, C., Siguier, B., André, I., Eneyskaya, E., Kulminkaya, A., Bozonnet, S., O'Donohue, M.J., 2014. Impact of an N-terminal extension on the stability and activity of the GH11 xylanase from *Thermobacillus xylanilyticus*. *J. Biotechnol.* 174, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.01.004>
- Song, L., Laguerre, S., Dumon, C., Bozonnet, S., O'Donohue, M.J., 2010. A high-throughput screening system for the evaluation of biomass-hydrolyzing glycoside hydrolases. *Bioresour. Technol.* 101, 8237–8243. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.097>
- Song, L., Siguier, B., Dumon, C., Bozonnet, S., O'Donohue, M.J., 2012. Engineering better biomass-degrading ability into a GH11 xylanase using a directed evolution strategy. *Biotechnol. Biofuels* 5, 3. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-3>
- Sørensen, H.R., Meyer, A.S., Pedersen, S., 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. <https://doi.org/10.1002/bit.10519>
- Sørensen, H.R., Pedersen, S., Meyer, A.S., 2007. Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 908–918. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.026>
- Southall, S.M., Simpson, P.J., Gilbert, H.J., Williamson, G., Williamson, M.P., 1999. The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Lett.* 447, 58–60. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00263-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00263-X)
- Spokane, R.B., Gill, S.J., 1981. Titration microcalorimeter using nanomolar quantities of reactants. *Rev. Sci. Instrum.* 52, 1728–1733. <https://doi.org/10.1063/1.1136521>
- Srisodsuk, M., Reinikainen, T., Penttilä, M., Teeri, T.T., 1993. Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* 268, 20756–20761.
- Sternberg, D., Vuayakumar, P., Reese, E.T., 1977. β -Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Can. J. Microbiol.* 23, 139–147. <https://doi.org/10.1139/m77-020>
- Stocker, T.F., 2013. The Closing Door of Climate Targets. *Science* (80-.). 339, 280–282. <https://doi.org/10.1126/science.1232468>
- Subramanian, S., Prema, P., Division, B.P., 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22, 33–46. <https://doi.org/10.1080/07388550290789450>
- Sun, J.L., Sakka, K., Karita, S., Kimura, T., Ohmiya, K., 1998. Adsorption of *Clostridium stercorarium* xylanase A to insoluble xylan and the importance of the CBDs to xylan hydrolysis. *J. Ferment. Bioeng.* 85, 63–68. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)80355-8](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)80355-8)
- Sun, R.C., Lawther, J.M., Banks, W.B., 1996. Fractional and structural characterization of wheat straw hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* 29, 325–331. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(96)00018-5)
- Sun, R.C., Tomkinson, J., 2002. Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw. *Carbohydr. Polym.* 50, 263–271. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00037-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00037-1)
- Sun, X.F., Sun, R.C., Tomkinson, J., Baird, M.S., 2004. Degradation of wheat straw lignin and hemicellulosic polymers by a totally chlorine-free method. *Polym. Degrad. Stab.* 83, 47–57. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(03\)00205-2](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(03)00205-2)

- Sunna, A., Gibbs, M.D., Bergquist, P.L., 2001. Identification of novel beta-mannan- and beta-glucan-binding modules: evidence for a superfamily of carbohydrate-binding modules. *Biochem. J.* 356, 791–798. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3560791>
- Szabó, L., Jamal, S., Xie, H., Charnock, S.J., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J., 2001. Structure of a family 15 carbohydrate-binding module in complex with xylopentaose: evidence that xylan binds in an approximate 3-fold helical conformation. *J. Biol. Chem.* 276, 49061–49065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109558200>
- Taiz, L., Zeiger, E., 2002. *Plant Physiology, Annals of Botany.* Sinauer Associates. <https://doi.org/10.1104/pp.900074>
- Talmadge, K.W., Keegstra, K., Bauer, W.D., Albersheim, P., 1973. The structure of plant cell walls I. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol.* 51, 158–173.
- Tamaru, Y., Doi, R.H., 2001. Pectate lyase A, an enzymatic subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *PNAS* 98, 4125–4129. <https://doi.org/10.1073/pnas.071045598>
- Telke, A.A., Ghatge, S.S., Kang, S.H., Thangapandian, S., Lee, K.W., Shin, H.D., Um, Y., Kim, S.W., 2012. Construction and characterization of chimeric cellulases with enhanced catalytic activity towards insoluble cellulosic substrates. *Bioresour. Technol.* 112, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.066>
- Thimm, J.C., Burritt, D.J., Ducker, W.A., Melton, L.D., 2000. Celery (*Apium graveolens* L.) parenchyma cell walls examined by atomic force microscopy: effect of dehydration on cellulose microfibrils. *Planta* 212, 25–32. <https://doi.org/10.1007/s004250000359>
- Thygesen, L.G., Hidayat, B.J., Johansen, K.S., Felby, C., 2011. Role of supramolecular cellulose structures in enzymatic hydrolysis of plant cell walls. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 975–983. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0870-y>
- Timell, T.E., 1967. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci. Technol.* 1, 45–70. <https://doi.org/10.1007/BF00592255>
- Tomme, P., Boraston, A.B., Kormos, J.M., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., 2000. Affinity electrophoresis for the identification and characterization of soluble sugar binding by carbohydrate-binding modules. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 453–458. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00246-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00246-5)
- Tomme, P., Boraston, A.B., McLean, B.W., Kormos, J.M., Creagh, A.L., Sturch, K., Gilkes, N.R., Heynes, C.A., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., 1998. Characterization and affinity applications of cellulose-binding. *J. Chromatogr.* 715, 283–296. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00053-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00053-X)
- Tomme, P., Creagh, A.L., Kilburn, D.G., Haynes, C. a., 1996. Interaction of polysaccharides with the N-terminal cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* CenC. 1. Binding specificity and calorimetric analysis. *Biochemistry* 35, 13885–13894. <https://doi.org/10.1021/bi961185i>
- Tomme, P., Tilbeurgh, H.V.A.N., Pettersson, G., Damme, J.V.A.N., Vandekerckhove, J., Knowles, J., Teeri, T.T., Claeyssens, M., 1988. Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. *Eur. J. Biochem.* 170, 575–581. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13736.x>
- Tormo, J., Lamed, R., Chirinol, A.J., Morag, E., Bayer, E.A., Shoham, Y., Steitz, T.A., 1996. Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. *EMBO J.* 15, 5739–5751.
- Torronen, A., Harkkil, A., Rouvinen, J., Törrönen, A., 1994. Three dimensional structure of endo-1,4-3-xylanase II from *Trichoderma reesei* : two conformational states in the active site. *EMBO J.* 13, 2493–2501.

- Urbanowicz, B.R., Catalá, C., Irwin, D.C., Wilson, D.B., Ripoll, D.R., Rose, J.K.C., 2007. A tomato endo-beta-1,4-glucanase, SICel9C1, represents a distinct subclass with a new family of carbohydrate binding modules (CBM49). *J. Biol. Chem.* 282, 12066–12074. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607925200>
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S.J., van Aalten, D.M.F., Synstad, B., Eijsink, V.G.H., 2005. The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J. Biol. Chem.* 280, 28492–28497. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504468200>
- Van Bueren, A.L., 2013. Type A surface [WWW Document]. Cazypedia. URL <https://www.cazypedia.org/index.php/File:TypeAsurface.png>
- Van Bueren, A.L., Boraston, A.B., 2004. Binding sub-site dissection of a carbohydrate-binding module reveals the contribution of entropy to oligosaccharide recognition at “non- primary” binding subsites. *J. Mol. Biol.* 340, 869–879. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.038>
- Van Bueren, A.L., Higgins, M., Wang, D., Burke, R.D., Boraston, A.B., 2007. Identification and structural basis of binding to host lung glycogen by streptococcal virulence factors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 76–84. <https://doi.org/10.1038/nsmb1187>
- Van Doorslaer, E., Kersters-Hilderson, H., De Bruyne, C.K., 1985. Hydrolysis of beta-D-xylosidase from *Bacillus pumilus*. *Carbohydr. Res.* 140, 342–346. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(85\)85136-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(85)85136-3)
- Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 30, 1458–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>
- Van Tilbeurgh, H., Tomme, P., Claeysens, M., Bhikhabhai, R., Pettersson, G., 1986. Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Separation of functional domains. *FEBS Lett.* 204, 223–227. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80816-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80816-X)
- Vandenbosch, K. a, Bradley, D.J., Knox, J.P., Perotto, S., Butcher, G.W., Brewin, N.J., 1989. Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *EMBO J.* 8, 335–342.
- Vardakou, M., Dumon, C., Murray, J.W., Christakopoulos, P., Weiner, D.P., Juge, N., Lewis, R.J., Gilbert, H.J., Flint, J.E., 2008. Understanding the structural basis for substrate and inhibitor recognition in eukaryotic GH11 xylanases. *J. Mol. Biol.* 375, 1293–1305. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.11.007>
- Vardakou, M., Flint, J.E., Christakopoulos, P., Lewis, R.J., Gilbert, H.J., Murray, J.W., 2005. A family 10 *Thermoascus aurantiacus* xylanase utilizes arabinose decorations of xylan as significant substrate specificity determinants. *J. Mol. Biol.* 352, 1060–1067. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.051>
- Vazana, Y., Moraïs, S., Barak, Y., Lamed, R., Bayer, E.A., 2010. Interplay between *Clostridium thermocellum* family 48 and family 9 cellulases in cellulosomal *versus* noncellulosomal states. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3236–3243. <https://doi.org/10.1128/AEM.00009-10>
- Venditto, I., Luís, A.S., Rydahl, M.G., Schückel, J., Fernandes, V.O., Vidal-Melgosa, S., Bule, P., Goyal, A., Pires, V.M.R., Dourado, C.G., Ferreira, L.M.A., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Knox, J.P., Baslé, A., Najmudin, S., Gilbert, H.J., Willats, W.G.T., Fontes, C.M.G.A., 2016. Complexity of the *Ruminococcus flavefaciens* cellulosome reflects an expansion in glycan recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 7136–7141. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601558113>
- Venditto, I., Najmudin, S., Luís, A.S., Ferreira, L.M.A., Sakka, K., Knox, J.P., Gilbert, H.J., Fontes, C.M.G.A., 2015. Family 46 carbohydrate-binding modules contribute to the enzymatic hydrolysis of xyloglucan and β -1,3-1,4-glucans through distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 290, 10572–10586. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.637827>

- Verherbruggen, Y., Marcus, S.E., Haeger, A., Ordaz-Ortiz, J.J., Knox, J.P., 2009a. An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydr. Res.* 344, 1858–1862. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.11.010>
- Verherbruggen, Y., Marcus, S.E., Haeger, A., Verhoef, R.P., Schols, H.A., McCleary, B. V., McKee, L.S., Gilbert, H.J., Knox, J.P., 2009b. Developmental complexity of arabinan polysaccharides and their processing in plant cell walls. *Plant J.* 59, 413–425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03876.x>
- Vernet, T., Di Guilmi, A.M., 2012. Peptides capable of forming a covalent complex, and uses thereof. <https://doi.org/WO/2012/127060>
- Vincken, J.-P., Schols, H.A., Oomen, R.J.F.J., McCann, M.C., Ulvskov, P., Voragen, A.G.J., Visser, R.G.F., 2003. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.* 132, 1781–1789. <https://doi.org/10.1104/pp.103.022350>
- Vogel, J., 2008. Unique aspects of the grass cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.002>
- Von Ossowski, I., Eaton, J.T., Czjzek, M., Perkins, S.J., Frandsen, T.P., Schülein, M., Panine, P., Henrissat, B., Receveur-Bréchet, V., 2005. Protein disorder: conformational distribution of the flexible linker in a chimeric double cellulase. *Biophys. J.* 88, 2823–2832. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.050146>
- Voragen, A.G.J., Coenen, G.J., Verhoef, R.P., Schols, H. a., 2009. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct. Chem.* 20, 263–275. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>
- Vreeland, V., 1970. Localization of cell wall polysaccharide in a brown alga with labeled antibody. *J Histochem Cytochem* 18, 371–373. <https://doi.org/10.1177/18.5.371>
- Vršanská, M., Grobacheva, I. V., Kratky, Z., Biely, P., Gorbacheva, I. V., Krátký, Z., 1982. Reaction pathways of substrate degradation by an acidic endo-1,4- β -xylanase of *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* 704, 114–122. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(82\)90138-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(82)90138-8)
- Wakarchuk, W.W., Campbell, R.L., Sung, W.L., 1994. Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Sci.* 3, 467–475. <https://doi.org/10.1002/pro.5560030312>
- Walker, J.A., Takasuka, T.E., Deng, K., Bianchetti, C.M., Udell, H.S., Prom, B.M., Kim, H., Adams, P.D., Northen, T.R., Fox, B.G., 2015. Multifunctional cellulase catalysis targeted by fusion to different carbohydrate-binding modules. *Biotechnol. Biofuels* 8, 220. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0402-0>
- Walker, L.P., Belair, C.D., Wilson, D.B., Irwin, D.C., 1993. Engineering cellulase mixtures by varying the mole fraction of *Thermomonospora fusca* E5 and E3, *Trichoderma reesei* CBHI, and *Caldocellum saccharolyticum* beta-glucosidase. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 1019–1028. <https://doi.org/10.1002/bit.260420902>
- Warren, R.A.J., Beck, C.F., Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Langsford, M.L., Miller, R.C., O'Neill, G.P., Scheufens, M., Wong, W.K.R., 1986. Sequence conservation and region shuffling in an endoglucanase and an exoglucanase from *Cellulomonas fimi*. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 1, 335–341. <https://doi.org/10.1002/prot.340010407>
- Webb, B., Sali, A., 2014. Comparative protein structure modeling using modeller, in: Sons, J.W.& (Ed.), *Current Protocols in Bioinformatics*. pp. 5.6.1–5.6.32.
- Wienken, C.J., Baaske, P., Duhr, S., Braun, D., 2011. Thermophoretic melting curves quantify the conformation and stability of RNA and DNA. *Nucleic Acids Res.* 39, 1–10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr035>

- Wienken, C.J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D., Duhr, S., 2010. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat. Commun.* 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms1093>
- Wilkie, K.C.B., 1979. The hemicelluloses of grasses and cereals, in: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. pp. 215–264. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60237-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60237-1)
- Willats, W.G.T., Gilmartin, P.M., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P., 1999a. Cell wall antibodies without immunization: generation and use of de-esterified homogalacturonan block-specific antibodies from a naive phage display library. *Plant J.* 18, 57–65. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00427.x>
- Willats, W.G.T., Limberg, G., Buchholt, H.C., Van Alebeek, G.J.W.M., Benen, J. a. E., Christensen, T.M.I.E., Visser, J., Voragen, A.G.J., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P., 2000. Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydr. Res.* 327, 309–320. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00039-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00039-2)
- Willats, W.G.T., Marcus, S.E., Knox, J.P., 1998. Generation of a monoclonal antibody specific to (1,5)-alpha-L-arabinan. *Carbohydr. Res.* 308, 149–152. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00070-6)
- Willats, W.G.T., McCartney, L., Steele-King, C.G., Marcus, S.E., Mort, A.J., Huisman, M., Van Alebeek, G.J.W.M., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., Le Goff, A., Bonnin, E., Thibault, J.-F., Knox, J.P., 2004. A xylogalacturonan epitope is specifically associated with plant cell detachment. *Planta* 218, 673–681. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1147-8>
- Willats, W.G.T., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H.C., Van Alebeek, G.J.W.M., Voragen, A.G.J., Marcus, S.E., Christensen, T.M.I.E., Mikkelsen, J.D., Murray, B.S., Knox, J.P., 2001. Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls: Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 276, 19404–19413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011242200>
- Willats, W.G.T., Steele-King, C.G., Marcus, S.E., Knox, J.P., 1999b. Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. *Plant J.* 20, 619–628. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00629.x>
- Williamson, G., Kroon, P.A., Faulds, C.B., 1998. Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases. *microbiology* 144, 2011–2023. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-8-2011>
- Wilson, D.B., Irwin, D.C., 1999. Genetics and properties of cellulases. *Adv. Appl. Microbiol.* 65, 1–21.
- Wilson, S.M., Schmutzler, B.S., Brittain, J.M., Dustrude, E.T., Ripsch, M.S., Pellman, J.J., Yeum, T.S., Hurley, J.H., Hingtgen, C.M., White, F.A., Khanna, R., 2012. Inhibition of transmitter release and attenuation of anti-retroviral-associated and tibial nerve injury-related painful peripheral neuropathy by novel synthetic Ca²⁺ channel peptides. *J. Biol. Chem.* 287, 35065–35077. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.378695>
- Winterhalter, C., Heinrich, P., Candussio, A., Wich, G., Li, W., 1995. Identification of a novel cellulose-binding domain within the multidomain 120 kDa xylanase XyoA of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Mol. Microbiol.* 15, 431–444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02257.x>
- Withers, S.G., 2015. CAZypedia [WWW Document]. Glycoside Hydrolase Fam. URL <https://www.cazypedia.org>
- Woodward, J., Lima, M., Lee, N.E., 1988. The role of cellulase concentration in determining the degree of synergism in the hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biochem. J.* 255, 895–899. <https://doi.org/10.1042/bj2550895>
- Wu, H., Montanier, C.Y., Dumon, C., 2017. Quantifying CBM carbohydrate interactions using microscale thermophoresis, in: *Protocols, S. (Ed.), Proteins-Carbohydrate Interactions*. pp. 129–141. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6899-2_10

- Xie, H., Bolam, D.N., Nagy, T., Szabó, L., Cooper, A., Simpson, P.J., Lakey, J.H., Williamson, M.P., Gilbert, H.J., 2001a. Role of hydrogen bonding in the interaction between a xylan binding module and xylan. *Biochemistry* 40, 5700–5707. <https://doi.org/10.1021/bi010034z>
- Xie, H., Gilbert, H.J., Charnock, S.J., Davies, G.J., Williamson, M.P., Simpson, P.J., Raghothama, S., Fontes, C.M.G.A., Dias, F.M. V, Ferreira, L.M.A., Bolam, D.N., 2001b. *Clostridium thermocellum* Xyn10B carbohydrate-binding module 22-2: The role of conserved amino acids in ligand binding. *Biochemistry* 40, 9167–9176. <https://doi.org/10.1021/bi0106742>
- Xu, G., Ong, E., Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Muhandiram, D.R., Harris-brandts, M., Carver, J.P., Kay, L.E., Harvey, T.S., 1995. Solution structure of a cellulose-binding domain from *Cellulomonas fimi* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 34, 6993–7009. <https://doi.org/10.1021/bi00021a011>
- Xu, Q., Ding, S.-Y., Brunecky, R., Bomble, Y.J., Himmel, M.E., Baker, J.O., 2013. Improving activity of minicellulosomes by integration of intra- and intermolecular synergies. *Biotechnol. Biofuels* 6, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-126>
- Yang, B., Wyman, C.E., 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 2, 26–40. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Yang, R.C.A., Mackenzie, C.R., Bilous, D., Narang, S. a, Yang, R.C.A., Mackenzie, C.R., Mackenzie, C.R., Bilous, D., Bilous, D., Narang, S. a, Narang, S. a, 1989. Identification of two distinct *Bacillus circulans* xylanases by molecular cloning of the genes and expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 568–572.
- Yang, Y., Ko, T.P., Liu, L., Li, J., Huang, C.H., Chan, H.C., Ren, F., Jia, D., Wang, A.H.J., Guo, R.T., Chen, J., Du, G., 2014. Structural insights into enzymatic degradation of oxidized polyvinyl alcohol. *Chembiochem Commun.* 15, 1882–1886. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402166>
- Yaniv, O., Fichman, G., Borovok, I., Shoham, Y., Bayer, E.A., Lamed, R., Shimon, L.J.W., Frolow, F., 2014. Fine-structural variance of family 3 carbohydrate-binding modules as extracellular biomass-sensing components of *Clostridium thermocellum* anti- σ I factors. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 70, 522–534. <https://doi.org/10.1107/S139900471302926X>
- Yaniv, O., Morag, E., Borovok, I., Bayer, E.A., Lamed, R., Frolow, F., Shimon, L.J.W., 2013. Structure of a family 3a carbohydrate-binding module from the cellulosomal scaffoldin CipA of *Clostridium thermocellum* with flanking linkers: Implications for cellulosome structure. *Acta Crystallogr.* 69, 733–737. <https://doi.org/10.1107/S174430911301614X>
- Yaron, S., Morag, E., Bayer, E.A., Lamed, R., Shoham, Y., 1995. Expression, purification and subunit-binding properties of cohesins 2 and 3 of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *FEBS Lett.* 360, 121–124. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00074-J](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00074-J)
- Yates, E.A., Valdor, J.F., Haslam, S.M., Morris, H.R., Dell, A., Mackie, W., Knox, J.P., 1996. Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* 6, 131–139. <https://doi.org/10.1093/glycob/6.2.131>
- Yip, V.L.Y., Withers, S.G., 2006. Breakdown of oligosaccharides by the process of elimination. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.005>
- Yoshida, M., Igarashi, K., Wada, M., Kaneko, S., Suzuki, N., Matsumura, H., Nakamura, N., Ohno, H., Samejima, M., 2005. Characterization of carbohydrate-binding cytochrome b 562 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4548–4555. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4548>
- Zakeri, B., Howarth, M., 2010. Spontaneous intermolecular amide bond formation between side chains for irreversible peptide targeting. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 4526–4527. <https://doi.org/10.1021/ja910795a>

- Zeikus, J.G., Wellstein, A.L., Kirk, T.K., 1982. Molecular basis for the biodegradative recalcitrance of lignin in anaerobic environments. *FEMS Microbiol. Lett.* 15, 193–197. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1982.tb00066.x>
- Zhang, J., Siika-Aho, M., Tenkanen, M., Viikari, L., 2011a. The role of acetyl xylan esterase in the solubilization of xylan and enzymatic hydrolysis of wheat straw and giant reed. *Biotechnol. Biofuels* 4, 60. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-60>
- Zhang, J., Tuomainen, P., Siika-aho, M., Viikari, L., 2011b. Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 102, 9090–9095. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.085>
- Zhang, X., Rogowski, A., Zhao, L., Hahn, M.G., Avci, U., Knox, J.P., Gilbert, H.J., 2014. Understanding how the complex molecular architecture of mannan-degrading hydrolases contributes to plant cell wall degradation. *J. Biol. Chem.* 289, 2002–2012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.527770>
- Zhang, Y., Lu, X., Pizzi, A., Delmotte, L., 2003. Wheat straw particleboard bonding improvements by enzyme pretreatment. *Holz als Roh- und Werkst.* 61, 49–54. <https://doi.org/10.1007/s00107-002-0349-2>
- Zheng, F., Huang, J., Yin, Y., Ding, S., 2013. A novel neutral xylanase with high SDS resistance from *Volvariella volvacea*: Characterization and its synergistic hydrolysis of wheat bran with acetyl xylan esterase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 1083–1093. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1312-4>
- Zilliox, C., Debeire, P., 1998. Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase: Adsorption and kinetic studies. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 58–63. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00105-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00105-1)
- Zillner, K., Jerabek-Willemsen, M., Duhr, S., Braun, D., Längst, G., Baaske, P., 2012. Microscale thermophoresis as a sensitive method to quantify protein: nucleic acid interactions in solution, in: *Functional Genomics: Methods and Protocols*. pp. 241–252. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-424-7>
- Zverlov, V. V., Kellermann, J., Schwarz, W.H., 2005. Functional subgenomics of *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes: identification of the major catalytic components in the extracellular complex and detection of three new enzymes. *Proteomics* 5, 3646–3653. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401199>
- Zverlov, V. V., Piotukh, K., Dakhova, O., Velikodvorskaya, G., Borriss, R., 1996. The multidomain xylanase A of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana* is extremely thermoresistant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 245–247. <https://doi.org/10.1007/s002530050678>
- Zykwinska, A.W., Ralet, M.-C., Garnier, C.D., Thibault, J.-F., 2005. Evidence for *in vitro* binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiol.* 139, 397–407. <https://doi.org/10.1104/pp.105.065912>
- Zykwinska, A.W., Thibault, J.-F., Ralet, M.-C., 2007. Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged. *J. Exp. Bot.* 58, 1795–1802. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm037>

Annexes

Annexe 1 : Séquences nucléotidiques et protéiques des différentes protéines

Tableau 50 : Informations complémentaires sur les protéines d'étude

	séquence nucléotidique (bp)	séquence protéique (acides aminés)	masse molaire (g.mol ⁻¹)	pI théorique	coefficient d'extinction molaire (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
pETDuet_CBM2b1	5678	107	10826,5	7,01	18115
pET28_CBM3a	5717	169	18769,5	6,02	35410
pET28a_E5UNK		243	26337,5	5,68	33000
pET28a_E7		240	26295,12	6,45	21095
pET28a_E8		245	26216,4	5,31	33000
pACYCDuet_In	4386	147	16449,1	5,58	7450
pET28_InCBM2b1	6029	257	27018,3	5,62	25565
pETDuet_InCBM3a	6326	323	35286,5	5,36	42860
pACYCDuet_InDsRed	5160	407	45228,1	5,62	41830
pET28_InNpXyn11A avec un tag histidine	6377	375	41544,8	5,67	69330
pET28_InNpXyn11A sans un tag histidine	6353	369	40547,8	5,18	69330
pADG16_InsfGFP	1226	403	45374,66	5,71	27975
pETDuet_Jo	5636	93	10659,5	5,9	15930
pETDuet_JoCBM2b1	5966	203	21170,7	5,93	28545
pETDuet_JoCBM3a	6164	269	29438,9	5,53	45840
pETDuet_JoDsRed	6410	353	39380,5	5,75	44810
pET28_JoNpXyn11A	6239	329	36465,1	5,99	72310
pET22b_NpXyn11A	6045	234	25981,7	6,35	61880
pDEST17_Pm13		285	32280,38	6,39	58455
pDEST17_Pm20		305	35084,44	5,48	65455
pDEST17_Pm51		302	33642,15	6,05	60405

Annexe 2 : Génotype des cellules compétentes utilisées

Tableau 51 : Explications pour chaque génotype

souches d' <i>E. coli</i>	génotype	caractéristiques
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> str. B F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) [malB ⁺] _{K-12} (λ ^S)	cellules de la souche B d' <i>E. coli</i> avec DE3, un prophage λ portant le gène de la polymérase ARN T7. Cellules dérivées des cellules B834.
JM109 (DE3)	JM109 + λ(DE3)	le prophage DE3 a la cassette d'expression de la polymérase T7. Résistance à l'acide nalidixique.
C41 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻)(DE3)	cellules dérivées des cellules BL21(DE3). Cellules de la souche B d' <i>E. coli</i> avec DE3, un prophage λ portant le gène de la polymérase ARN T7. Evite la mort cellulaire à cause de protéines toxiques.
Rosetta (DE3)	<i>E. coli</i> str. B F ⁻ ompT gal dcm lon [?] hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) [malB ⁺] _{K-12} (λ ^S) pLysSRARE[T7p20 ileX argU thrU tyrU glyT thrT argW metT leuW proL ori _{p15A}](Cm ^R)	cellules de la souche B d' <i>E. coli</i> avec DE3, un prophage λ portant le gène de la polymérase ARN T7. Résistance au chloramphénicol.
Top 10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	cellules très similaires aux cellules DH10B. Résistance à la streptomycine.
Tuner (DE3)		délétion du lacZY par rapport aux cellules BL21, ce qui permet un ajustement des niveaux d'expression des protéines. DE3 correspond au prophage λ portant le gène de la polymérase ARN T7

("E. coli genotypes," n.d.)

Annexe 3 : Choix des paramètres des images immunocytochimiques

I. Quantification des images

Tableau 52 : Exemple de paramètres choisis pour les images

numéro de figure	marquage	zone	NDP.view2					Image J seuil	
			gamma	% FITC	% TRITC	% DAPI	% rouge/ bleu		% vert
figure 65	CBM3a	parenchyme	1,1	100	0	0	100	100	14
		sclérenchyme	1,1	100	0	0	100	100	14
figure 67A	LM11	parenchyme	0,9	75	0	0	100	75	25
		sclérenchyme	0,6	75	0	0	100	75	28
figure 67B et 67C	LM11	parenchyme	0,8	75	0	0	100	75	17
		sclérenchyme	0,7	50	0	0	100	75	19
figure 67D	LM11	parenchyme	0,9	50	0	0	100	75	17
		sclérenchyme	0,7	50	0	0	100	75	22
figure 68	LM11	parenchyme	1,4	100	0	0	100	150	20
		sclérenchyme	1,1	100	0	0	100	150	15
figure 70A	LM11	parenchyme	0,9	50	0	0	100	50	15
		sclérenchyme	0,6	50	0	0	100	50	14
figure 70D	LM11	parenchyme	1	50	0	0	100	50	15
		sclérenchyme	0,7	50	0	0	100	50	14

II. Images proposées dans le manuscrit

Tableau 53 : Exemple de paramètres choisis pour les images

numéro de figure	NDP.view2						
	gamma	% FITC	% TRITC	% DAPI	% rouge	% bleu	% vert
figure 65	1,1	100	0	0	100	100	100
figure 67	0,8	50	0	0	100	100	100
figure 68	1,5	150	0	0	100	100	100
figure 70	0,8	50	0	0	100	100	75
figure 72A, figure 72D, figure 72G et figure 72J	1,4	100	0	0	100	100	100
figure 72B, figure 72E, figure 72H et figure 72K	1,4	0	0	100	100	100	100
figure 72C, figure 72F, figure 72I et figure 72L	1,4	100	0	100	100	100	100
figure 78	1,4	100	0	0	100	100	100

Tableau 54 : Exemple de traitements d'images (Power point) rajoutés

numéro de figure	luminosité	contraste
figure 65	+ 40 %	X
figure 67	+ 40 %	+ 20 %
figure 68 (A, B et C)	+ 40 %	+ 20 %
figure 68 (D, E, F)	+ 40 %	X
figure 70	+ 40 %	+ 20 %
figure 72	+ 40 %	+ 20 %
figure 77	X	X
figure 78 (A, B, C et D)	+ 20 %	+ 20 %
figure 78 (E, F, G et H)	X	X

Chapter 14

CBMs as Probes to Explore Plant Cell Wall Heterogeneity Using Immunocytochemistry

Louise Badruna, Vincent Burlat, and Cédric Y. Montanier

Abstract

Immunocytochemistry is a widely used technique to localize antigen within intact tissues. Plant cell walls are complex matrixes of highly decorated polysaccharides and the large number of CBM families displaying specific substrate recognition reflects this complexity. The accessibility of large proteins, such as antibodies, to their cell wall epitopes may be sometimes difficult due to steric hindrance problems. Due to their smaller size, CBMs are interesting alternative probes. The aim of this chapter is to describe the use of CBM as probes to explore complex polysaccharide topochemistry *in muro* and to quantify enzymatic deconstruction.

Key words Wheat straw section, Immunocytochemistry, Enzymatic hydrolysis, Fluorescence, Microscopy

1 Introduction

The plant cell wall organization is highly complex and continuous investigation needs to be performed to explore this complexity. Indeed, biomass is a combination of cellulose, hemicelluloses, pectins, proteins, and other polymers such as lignins. During 475 million years, terrestrial plants, and more particularly plant cell wall evolved up to the point making them particularly recalcitrant to chemical or biological attack [1]. Furthermore, its composition is highly specific among species, organs, cell types, and cell wall microdomains [2, 3]. In this context, immunocytochemistry displays many advantages to allow researchers to obtain more evidence about how all these macromolecules are spatially organized and how they interact with each other. For example, Knox and coworkers used this approach to localize precisely many polymer-specific epitopes *in muro* and describe at which developmental stage pectic (1→4)-β-D-galactan appears in pea [4].

Briefly, plant tissues sections have to be prepared in a way preventing or minimizing structural changes within plant cell wall [5]. Series of monoclonal antibodies specific to plant cell wall polymers

have been developed and are available (*e.g.*, <http://www.plant-probes.net/index.php>; https://www.crc.uga.edu/~carbosource/CSS_home.html; <http://www.biosupplies.com.au/price.htm>). These antibodies are directed against various epitopes included within polysaccharidic polymers such as mannans, xyloglucans, xylans, rhamnogalacturonans, homogalacturonans, callose, or proteins such as extensins or arabinogalactan proteins. For instance, LM10 and LM11 that target xylans could be used to discriminate (1→4)-β-D-xylan from (1→4)-β-D-arabinoxylan, respectively [6]. An anti-rat or anti-mouse IgG labeled secondary antibody is then used against the first antibody to enhance the signal and to enable detection by microscopy [4]. The secondary antibody may display an alkaline phosphatase activity or a peroxidase activity for use with chromogenic substrates. It may also be labeled with a fluorochrome or gold particles, for fluorescent or transmission electron microscopy (TEM), respectively.

CBMs are domains which are found independently or next to an enzyme that hydrolyzes polysaccharides from plant cell walls [7]. They can be produced alone with correct folding and functions. A lot of CBMs have been found in Nature with different ligand specificities, *e.g.*, xylans [8], crystalline cellulose [9], amorphous cellulose [10], mannans [11], or starch [12].

Pioneer studies in the 1980s used the carbohydrate binding capacities of CBM contained within carbohydrate hydrolyzing enzymes by producing carbohydrate hydrolyzing enzyme-colloidal gold complexes for labeling at the TEM level [13, 14]. Then, Johansson and coworkers introduced for the first time the use of CBM-fluorochrome to probe cellulose in lignocellulose material such as birchwood or pulp fibers [15]. The family 1 CBM from *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D was covalently labeled to fluorescein isothiocyanate (FITC) through α-amino group. Alternatively, Knox and coworkers used Histidine-Tagged CBMs as molecular probes, which introduced experimental flexibility as the CBM could be revealed with anti-HistidineTag antibodies and then with a tertiary labeled antibody. This latter approach also presents the advantage of preventing inactivation of the CBM due to the FITC labeling [16].

CBMs have advantageous properties over immunocytochemistry, being easy to produce and purify, facilitating implementation and reproducibility of their use [17]. They show affinity for their ligand and relatively high selectivity for their target in a specific context [18]. Indeed, different CBMs displaying affinity to the same ligand *in vitro* may target different polysaccharides in plant cell walls sections [19]. CBMs could also be used to monitor enzymatic glycoside hydrolysis activity. In the situation where CBM ligands were masked within the dense plant cell wall matrix, their accessibility could be recovered using pretreatment with enzymes such as pectate lyase Pel10A from *Cellvibrio japonicus* decloaking

cellulose microfibrils on tobacco [20]. Another parameter that can be considered is the three-dimensional orientation of the CBM within the protein that may reflect the ligand context through protein/carbohydrate interactions.

Other classical cytochemical labeling methods may also be useful in combination to CBMs or antibodies or by themselves. These include carmine [21] or calcofluor white [22] that recognizes β -glucans [23], Pontamine Fast Scarlet 4B that target cellulose [24]. Tolidine Blue O that block cell wall autofluorescence may also be used for better visualization of the exogenous fluorescent labeling [23].

Sample preparation is a crucial step and the way samples are prepared may affect the way CBMs or enzymes act on plant cell wall polymers. Sample preparation should also be performed in accordance with the microscopic technique to be used. The thickness of the plant cell wall section is important and it may be adjusted in direct link to the stiffness of the sample and to the resolution required. For instance, resin is more resolute than paraffin/wax since allowing thinner sections, but this irreversible embedding technique may hide or restrict CBM/antibody accessibility, since the labeling is basically restricted to the surface of the section. In our protocol, we used wheat straw, a particularly rigid sample difficult to cut, but we choose a smooth weak fixation associated with a reversible paraffin embedding approach, minimizing as much as possible further chemical modification of the cell wall polymers and accessibility of the probes to their targets.

Otherwise, a sample predigestion may highlight polymer recognition by antibodies or CBMs as illustrated with a xylanase (hydrolyzing β -1,4 linkages of xylans main chain) and/or a pectate lyase (hydrolyzing homogalacturonans) used on tobacco [18]. Some works are also based on an esterase (splits off acetyl groups) [25] or a mannanase (breaking down mannans) [26].

Below, we will use the family 3 CBM3a from *Clostridium thermocellum* as a probe to illustrate our protocol. This CBM is part of the multicomponent multienzyme complex, called the cellulosome [27]. The cellulosome is a discrete cell surface organelle of *C. thermocellum* which exhibits separate cellulose binding and various cellulolytic activities [28]. CBM3a is part of the scaffold protein CipA and displays the highest affinity for crystalline cellulose. This CBM is widely used in immunocytochemistry [29–31], in glycan binding assay [32] or even as a probe using atomic force microscopy [33]. However, this protocol should be applicable to other CBMs or antibodies.

2 Material

2.1 Chemicals

1. Acetic acid.
2. Absolute ethanol.

3. Tert-butanol.
4. Distilled water (dH₂O).
5. Paraplast Plus® (Sigma-Aldrich).
6. Xylene.
7. 3-Aminopropyl-triethoxysilane.
8. Agarose.
9. Nonfat dry milk (Régilait).
10. Triton X-100.
11. Tris base.
12. Sodium chloride.
13. HCl.
14. Sodium dihydrogen phosphate dehydrate.
15. Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate.
16. Prolong antifade mounting reagent (Thermofisher Scientific).

2.2 Fixatives and Buffers

1. 1 M Tris-HCl pH 7.5: weigh 121 g of Tris and dissolve in 900 mL of dH₂O. Bring to a pH of 7.5 with 1 M HCl. Bring the solution to a final volume of 1 L.
2. 5 M NaCl: weigh 292 g of NaCl and dissolve in 1 L of dH₂O.
3. 2 M CaCl₂: weigh 2.22 g of CaCl₂ and dissolve in 10 mL of dH₂O.
4. TTBS₅₀₀ buffer: weigh 6 g of Triton X-100, add 20 mL of 1 M Tris pH 7.5, 200 mL of 5 M NaCl, 2 mL of 2 M CaCl₂ and bring the solution to a final volume of 2 L.
5. TTBS₅₀₀-milk: weigh 10 g of nonfat dry milk (Régilait) and dissolve in 200 mL of TTBS₅₀₀.
6. AA fixative: use 500 mL of ethyl alcohol, add 50 mL of acetic acid, and bring the solution to a final volume of 1 L (*see Note 1*).
7. 50 mM Sodium phosphate buffer pH 7: weigh 31.21 g of NaH₂PO₄·2H₂O (sodium dihydrogen phosphate dihydrate) and dissolve in 1 L of dH₂O to prepare a 0.2 M monobasic sodium phosphate stock solution. Weigh 71.64 g of Na₂HPO₄·12H₂O (disodium hydrogen phosphate dodecahydrate) and dissolve in 1 L of dH₂O to prepare a 0.2 M dibasic sodium phosphate stock solution. Mix 97.5 mL of the monobasic sodium phosphate with 152.5 mL of the dibasic sodium phosphate and check the pH. Add 750 mL of dH₂O.
8. Solution with 1% agarose: weigh 0.1 g of agarose and dissolve in 10 mL of dH₂O.

2.3 Biological Material

1. Wheat straw internodes [34].
2. Commercial enzymatic cocktail Ctec2 (Novozymes).
3. CBM3a (homemade production with an Histidine-Tag (*see Note 2*)).
4. Mouse monoclonal anti-Histidine Tag antibody (A00186-100, GenScript)
5. Goat anti-mouseIgG-FITC antibodies (Sigma, F2012).

2.4 Sample Preparation Materials

1. Dry oven.
2. Vacuum chamber.
3. Metallic embedding base molds (38 × 25 × 12 mm, Tissue-Tek 4133; Delta Microscopies, Mauressac, France).
4. White embedding ring adaptable to the above metallic molds.
5. Rotary microtome (Seit 1872 Jung AG Microtome).
6. Tissue Floating Bath (Premiere XH-1003, Delta Microscopies, Mauressac, France).
7. Large slide warmer (slide warmer, Labscientific XH-2001, Delta Microscopies, Mauressac, France).
8. Starfrort microscopy slides.
9. Polypropylene staining racks for 20 slides (Kartell polypropylene staining racks 354; Ref 391058 Dutscher SAS, Brumath, France).
10. Coverslips (24 × 50 mm).
11. Humid chamber (*see Note 3*).
12. Microincubation chamber (22 × 40 × 0.2 mm deep; (200 μL), #70324-20, Electron Microscopy Science).
13. Nanozoomer RS slide scanner (Hamamatsu).

2.5 Computer Software

1. ImageJ [35].
2. NDP scan (Hamamatsu, Japan).
3. NDP.view2 (Hamamatsu, Japan).

3 Methods

3.1 Plant Material Fixation

1. Submerge samples (about 1-cm-long wheat straw sections) in 20–30 mL of AA (*see Note 1*).
2. Do five cycles of vacuum infiltration (1 min vacuum and vacuum release in a vacuum chamber).
3. Incubate samples for 8 or 16 h at 4 °C in AA.
4. Wash four times in a solution containing 500 mL of absolute ethanol and 500 mL of water for 10 min each (*see Note 4*).

5. Dehydrate progressively in a gradient series of dH₂O/absolute ethanol/tert-butanol for 1 h each, at room temperature (adapted from [36]). Solutions are respectively composed of:
 - (a) 50 mL of dH₂O, 40 mL of absolute ethanol, and 10 mL of tert-butanol.
 - (b) 30 mL of dH₂O, 50 mL of absolute ethanol, and 20 mL of tert-butanol.
 - (c) 15 mL of dH₂O, 50 mL of absolute ethanol, and 35 mL of tert-butanol.
 - (d) 45 mL of absolute ethanol and 55 mL of tert-butanol.
 - (e) 25 mL of absolute ethanol and 75 mL of tert-butanol.
6. Incubate in pure tert-butanol overnight at room temperature above 25 °C.
7. Change the tert-butanol solution and incubate for 1 h.
8. Replace half of the tert-butanol solution by melted Paraplast Plus and incubate in a dry oven at 60 °C for 5 h.
9. Renew with fresh solution containing 50 mL of tert-butanol and 50 mL of Paraplast Plus and incubate overnight at 60 °C.
10. Change the Paraplast Plus solution, once or twice per day, for 2 or 3 days (*see* **Notes 5** and **6**).

3.2 ParaplastPlus Embedding

1. Set the slide warmer at 62 °C and protect it with aluminum foil.
2. Place melted Paraplast Plus into metallic embedding base molds at 62 °C.
3. In parallel, fill Petri dishes with samples in melted Paraplast Plus at 62 °C.
4. Use preheated metallic spatula and tweezers to dispose the sample in the molds allowing further desired section orientation (*e.g.*, cross-section).
5. Cover each mold by a white embedding ring enabling further positioning of the paraffin bloc to the microtome harm.
6. Write the reference on each embedding ring using a pencil to avoid mark disappearing in **step 9**.
7. Incubate for at least 1 h at 4 °C to obtain the Paraplast Plus solidification.
8. Separate samples and molds (*see* **Notes 7** and **10**).
9. Immerse for 24–48 h in a solution containing 100 mL of acetic acid and 900 mL of absolute ethanol at 4 °C [37]

3.3 Microtomy

3.3.1 Microscopy Slides Coating Pretreatment

1. Place Starfrost microscopy slides in polypropylene staining racks for 20 slides.
2. Dip the rack for 5 min in 200 mL of freshly prepared solution containing 4 mL of 3-aminopropyltriethoxysilane and 196 mL of acetone within a glass-staining jar disposed under a fume hood.

3. Air-dry for 15 min under the fume hood.
4. Rinse the slides sequentially in three baths of dH₂O (200 mL) in three glass staining jars disposed under a fume hood.
5. Dry overnight at 37 °C (*see Note 8*).

3.3.2 Microtomy

1. Annotate slides (*see Note 9*).
2. Set the Tissue Floating Bath at 36 °C.
3. Cut serial sections of 10–20 µm with the rotary microtome (*see Notes 10–12*).
4. Align section ribbon on a kimwipe and carefully individualize the sections with a needle and a paintbrush.
5. Place a section in the dH₂O bath using a spatula (*see Note 13*).
6. Wait for about 2 min to flatten the sections (*see Note 14*).
7. Immerse a slide in the dH₂O with an angle of 45°.
8. Use a paintbrush to position and maintain the floating section in front of the slide and when there is a contact between the slide and the section, maintain the section position with the paintbrush while removing the slide from the dH₂O.
9. Place each section on the same orientation and on the same position on each slide (*see Notes 15 and 16*).
10. Dry slides overnight at 35 °C on the slide warmer to allow full adherence of the section to the slide.

3.4 Deparaffinization

Slides are handled in polypropylene staining racks for 20 slides fitting to glass-staining jars each containing around 200 mL of solution. Figure 1 shows a slide with a cross-section of wheat straw internodes ready for a labeling following paraffin solubilization.

1. Immerse slides in pure xylene for 10 min to solubilize paraffin.
2. Repeat this step in the second bath with the same conditions.
3. Sequentially rehydrate slides for 5 min in a solution with
 - (a) 200 mL of pure ethanol (twice).
 - (b) 200 mL of ethanol 95%.
 - (c) 140 mL of ethanol and 60 mL of dH₂O.
 - (d) 100 mL of ethanol and 100 mL of dH₂O.
4. Rinse slides in dH₂O, two times 5 min.
5. Dry slides on the slide warmer at 40 °C.

3.5 Digestion

1. Digest section with commercial enzymatic cocktail, Ctec2 diluted at 1/20 (200 µL) or sodium phosphate buffer 50 mM at pH 7 as a control (*see Notes 17–19*).
2. Incubate in a dH₂O saturated humid chamber placed in an oven at 50 °C for 1 h.
3. Wash in fresh TTBS₅₀₀ for 5 min, two times.

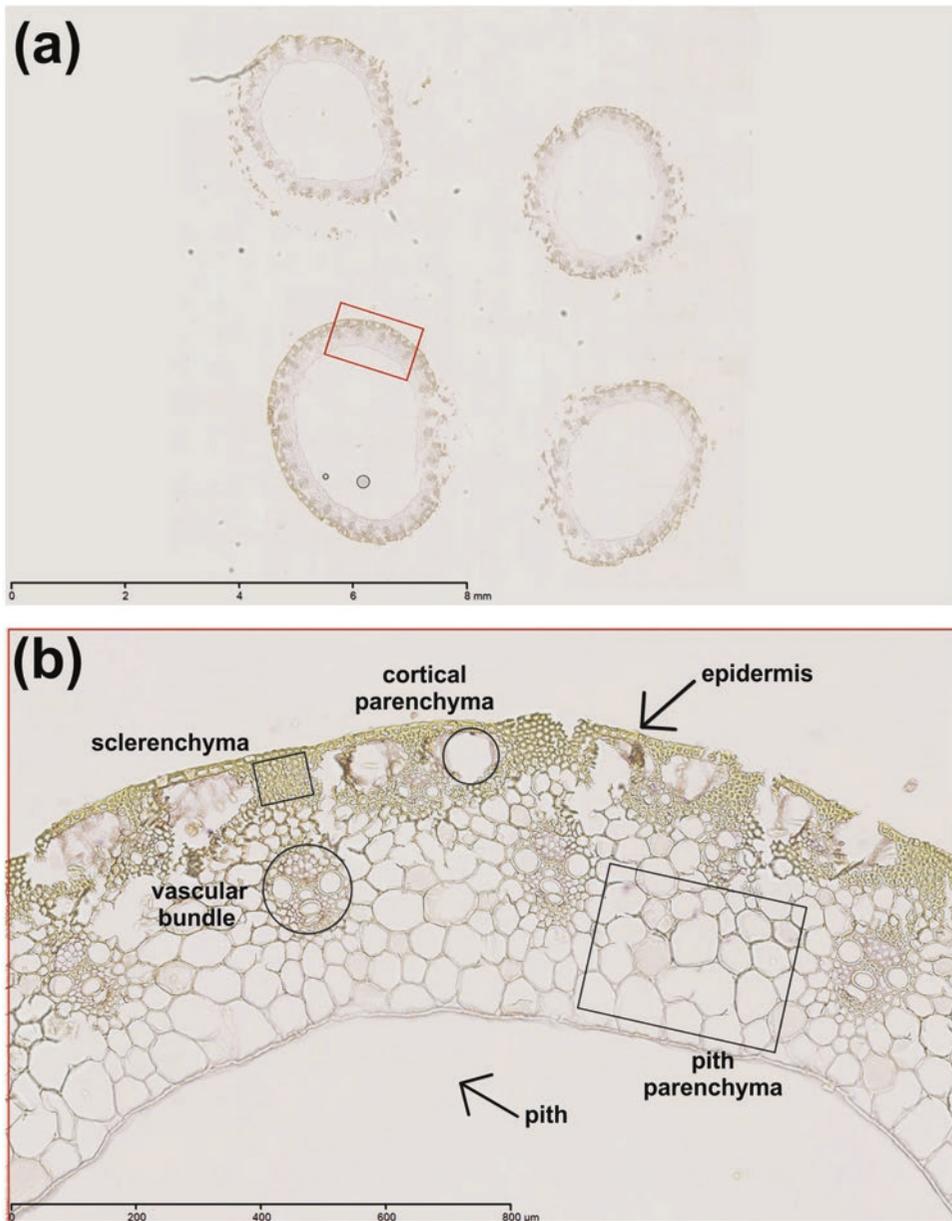


Fig. 1 Wheat straw internodes cross-section morphology, taken with Bright-field microscopy. **(a)** Overview of the tissue-array comprising 4 wheat straw internodes cross-sections. The red frame represents the zoom used for following image. **(b)** Main anatomical tissues from a wheat straw cross-section

3.6 Section Labeling and Visualization

1. Block nonspecific interactions with TTBS₅₀₀-milk for 30 min at room temperature (*see Note 20*).
2. Incubate the sample with CBM3a with an Histidine-Tag diluted at 3 μg/mL in TTBS₅₀₀-milk for 1–2 h at room temperature (100 μL) (*see Notes 21–23*).
3. Carefully remove coverslips (*see Note 24*).

4. Wash with 200 mL of TTBS₅₀₀ for 5 min, six times.
5. Incubate with a secondary antibody Anti-Histidine diluted at 1/100 in TTBS₅₀₀-milk for 1 h at room temperature (100 μ L).
6. Process as in **step 3**.
7. Process as in **step 4**.
8. Add the tertiary antibody, Anti-mouse IgG-FITC diluted at 1/100 in TTBS₅₀₀-milk for 1 h at room temperature protected from light (100 μ L).
9. Process as in **step 3**.
10. Wash with 200 mL of TTBS₅₀₀ for 5 min, three times.
11. Wash with 200 mL of dH₂O, quickly, six times to remove the detergent.
12. Dry on the slide warmer at 40 °C.
13. Mount in Prolong Antifade (add one drop per slide and add a coverslip).
14. Allow the mounting media to spread under the coverslip on the slide warmer at 40 °C.
FITC detection can be done by epifluorescence or confocal microscopy. A slide scanner allows a higher throughput.
15. Place each slide on a Nanozoomer RS (slides scanner).
16. Set each parameter (FITC detection: 473–491 nm excitation filter set; 488 nm dichroic mirror; 510–540 nm emission filter set, DAPI detection: 381–393 nm excitation filter set; 405 nm dichroic mirror; 420–460 nm emission filter set, bright field, color balance) by testing with positive and negative control slides.
17. Scan and save images.

3.7 Section Analysis

The following analyses are possible on the images using the NDP.view2 freeware. A qualitative protocol consists in a comparison between series of images taken from serial sections synchronized on the same zone on the computer screen: with/without the first probe to estimate the background level and with/without an enzymatic treatment to estimate the enzymatic action. A quantitative protocol can be to count cells before and after an enzymatic treatment. The next step is an analysis to quantify the relative fluorescence intensity with ImageJ on selected areas, *e.g.*, pith parenchyma and sclerenchyma/cortical parenchyma/epidermis (*see Note 25*). The protocol is as follows.

1. Open images to be compared with NDP.view2.
2. Determine and apply the same exact parameters for the images to be analyzed (color balance, brightness, contrast, gamma, and so on).
3. Zoom on an area of interest.

4. Align, synchronize, and frame each image on the same area for serial sections (*see* **Notes 26** and **27**).
5. Save the images of this area.
6. Open first an image with ImageJ.
7. Split channels (red, green, blue).
8. Choose a reference channel.
9. Set a threshold with triangle method (*see* **Note 28**).
10. Measure the intensity.
11. Repeat **steps 6–10** for all images.
12. Save and plot data (Microsoft Excel file).
13. Compare data.

As an example, three wheat straw serial cross-sections individually treated for three conditions are illustrated in Fig. 2 and the quantified results of mean for at least two repeats of similar areas are represented in Fig. 3. Maximum fluorescence was obtained for Fig. 2b and the lowest fluorescence was for Fig. 2c allowing estimating the nonspecific background due to autofluorescence. The relative action of the enzymatic cocktail can therefore be selectively quantified for various tissues on the same sections.

This method and the presented examples clearly illustrate the possibilities to measure relative fluorescence intensities for different tissues found on the same section and to compare these with the same zone differentially treated on serial sections. This example shows that the enzymatic action is more pronounced in the sclerenchyma/cortical parenchyma/epidermis zone as compared to the pith parenchyma.

4 Notes

1. This fixative is adapted from the classical FAA fixative deprived from the 3.7% (v/v) cross-linking formaldehyde. FAA (100 mL of Formalin (37 mL of formaldehyde Sigma-Aldrich F1635 and 63 mL of dH₂O), 500 mL of ethyl alcohol, 50 mL of acetic acid, 350 mL of dH₂O) could be used instead of AA. However, formaldehyde may prevent enzymatic pretreatment degradation and/or CBM recognition as it is a covalent cross-linker and could disrupt polymers.
2. CBM3a homemade production was done by the authors as in [20] with the Histidine-Tag at the C-terminal end of the construct. This CBM is also commercially available (Plant Probes or CZ00411 on NZytech).

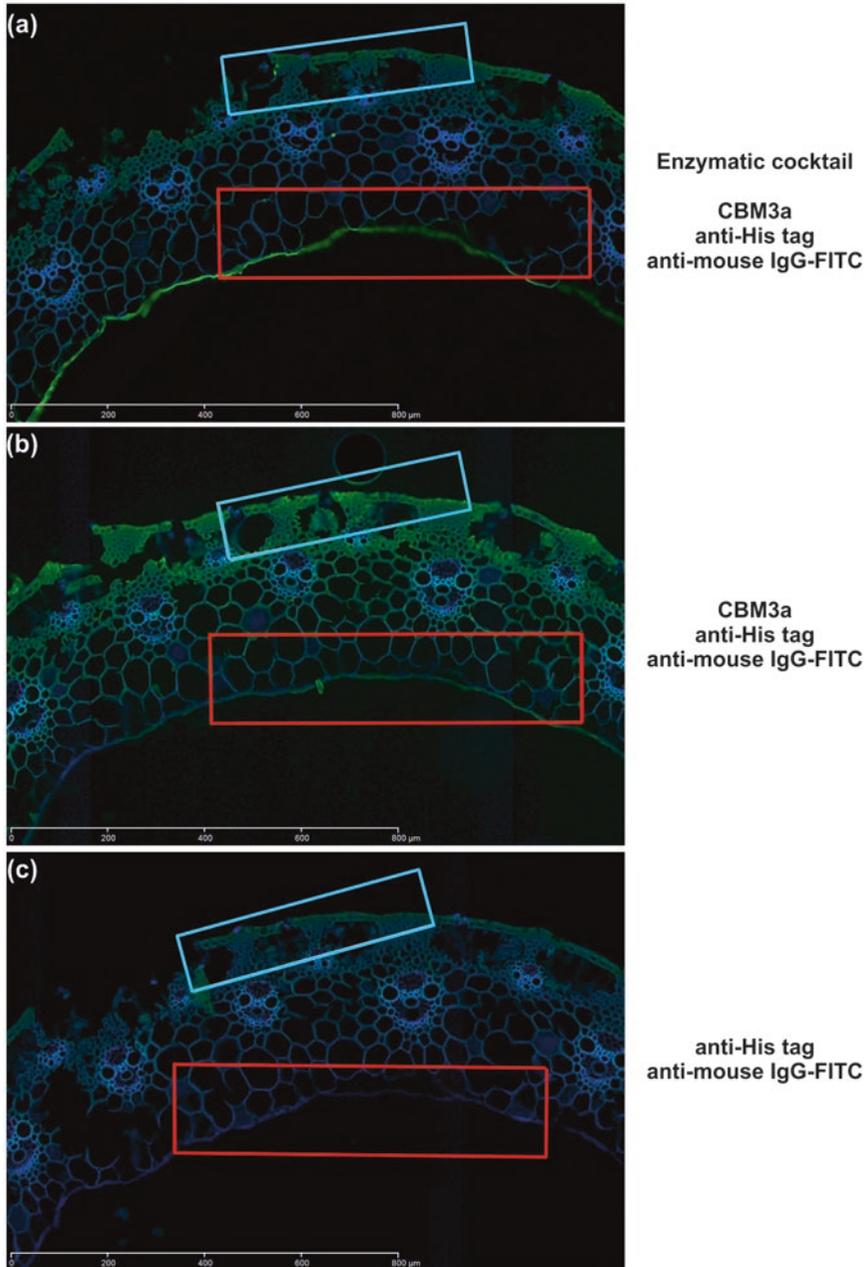


Fig. 2 Zoom on the same exact zone of three serial sections treated as described in the right panel. The frames correspond to examples of the zones used for image analysis quantified in Fig. 3: red for pith parenchyma and blue for a zone encompassing sclerenchyma/cortical parenchyma/epidermis. The crystalline cellulose detected by CBM3a is displayed in green (FITC channel). The blue channel shows the lignin autofluorescence used as a control (DAPI channel) to check the structure preservation

- Humid chamber can be bought or homemade chamber can be assembled with large Petri dishes and two lines of broken Pasteur pipets taped at the bottom to accommodate the slides, preventing them from being flooded by the dH_2O placed at the bottom of the Petri dish.

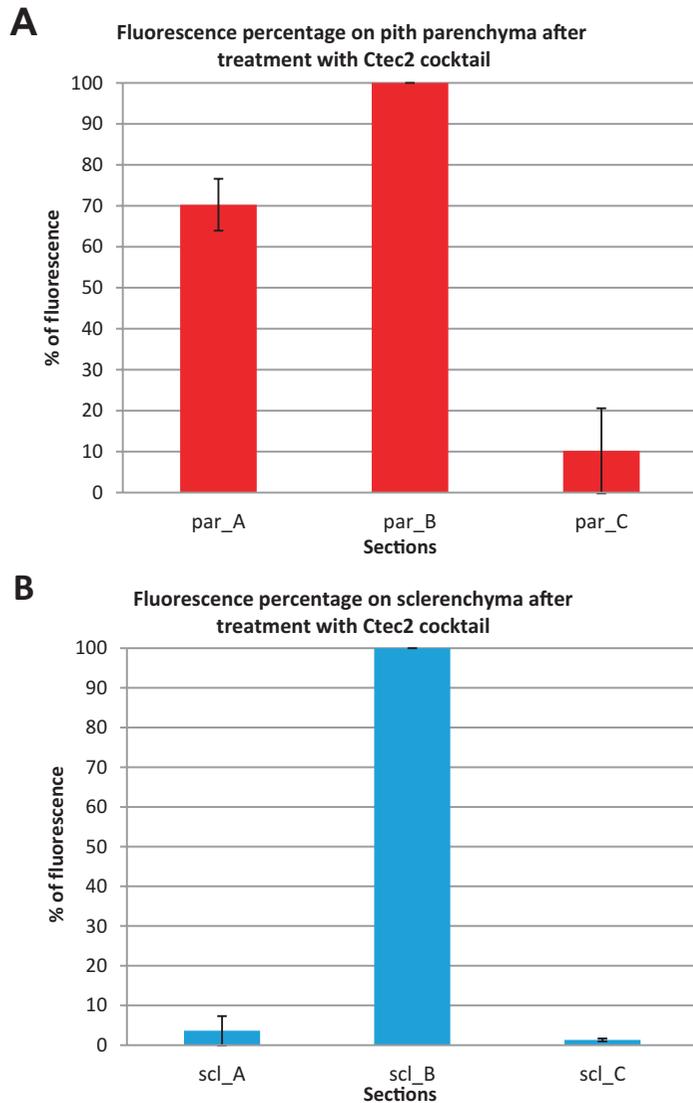


Fig. 3 Relative fluorescence quantification for two anatomical regions from images exemplified in Fig. 2. (a) The mean of two frames of similar anatomical views taken on one wheat straw cross-sections for pith parenchyma area \pm standard deviation is shown. par_A, par_B and par_C refer to the zones exemplified in Fig. 2a–c, respectively. (b) The mean of two frames of similar anatomical views taken on two wheat straw cross-sections for sclerenchyma, cortical parenchyma and epidermis area \pm standard deviation is shown. scl_A, scl_B and scl_C refer to the zone exemplified in Fig. 2a–c, respectively

4. Samples can be treated directly or stored for months at 4 °C in a solution containing 10 mL of ethanol and 10 mL of dH₂O.
5. Take off the cap from the tubes for these incubations to allow the evaporation of the residual tert-butanol.

6. The tissue embedding can be realized directly or Paraplast infiltrated tissues may be stored with cap at 4 °C for years. In this case, on restart, samples need to be incubated for 1 day at 60 °C before performing the tissue embedding.
7. The separation between metallic embedding base molds and samples could be done directly or after storage at 4 °C for years.
8. Slides after treatment can be stored at room temperature for months.
9. Use a pencil because pen marks would disappear with solvent.
10. The soaking of the Paraplast embedded bloc in a solution of acetic acid and ethanol (step A-2-9) for few weeks may improve sectioning efficiency for hard tissues.
11. Sample sectioning is easier when performed directly with cooled samples directly following taking out these from 4 °C.
12. Keep the same thickness for all sections to allow a comparison of labeling intensities between serial sections. 10 µm was chosen for wheat straw internodes because it is a relatively hard material.
13. Use this dH₂O bath for only four sections in parallel to keep the order of serial sections.
14. The incubation is material dependent, for some samples 20 s could be enough.
15. Be careful about the serial sections positioning on the sequential slides to be able to further compare the same area on serial sections treated with different conditions.
16. The use of tissue floating bath is useful, especially for breakable tissues since it avoids excessive volumes of dH₂O between the section and the slide. However, another method without such a bath exists: degas dH₂O in a vacuum chamber for at least 1 h to avoid air bubble formation. Annotate slides. Place on a slide warmer at 35 °C. Add 2–3 mL of degassed dH₂O. Cut serial sections of 10–20 µm with the rotary microtome. Separate sections. Place them on the same orientation and on the same position on each slide. Remove dH₂O in excess with a pipette. Dry overnight at 35 °C on the slide warmer.
17. To find reaction conditions, do preliminary tests with a range of concentrations for example. The aim is to find an intermediate concentration enabling sufficient digestion to observe changes and avoiding excessive digestion that could result in section detachment from the slide.
18. Use a micro-incubation chamber with a silicone seal to avoid the solution evaporation.
19. To improve micro-incubator use, cut a thin opening (1 mm wide) in the silicone. Firmly press this 200 µL micro-incubation

chamber on the top of the section area and distribute 200 μL through this opening. Finally, close it by adding 10–20 μL of 1% agarose in fusion (around 40 °C). After the incubation, remove agarose with the use of a razor blade. Such micro-incubation chambers may be washed and reused.

20. Sections should not dry during the labeling process, since this could result in excessive unspecific background. Insure to add the next solution at each step just after the removal of the previous one. For blocking and washing steps, slides are commonly handled in polypropylene staining racks for 20 slides fitting to glass staining jars each containing around 200 mL of solution. For incubation steps, slides are handled individually within a humid chamber with smaller volumes (100–200 μL with a coverslip on each slide to avoid the evaporation).
21. Samples may be labeled in several ways. For example, the first step can be done using antibody directed against cell wall polymer (e.g., rat monoclonal LM11 antibody from Plant Probes, which binds to unsubstituted β -1,4 xylans or arabinoxylans displaying a low degree of arabinose substitutions). The second step consists of using a secondary antibody. This one could be the Anti-RatIgG-FITC (Sigma) or the Anti-rat IgG-alkaline phosphatase (AP) conjugates. In the last case, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)/nitroblue tetrazolium (NBT) is used as the AP substrate. The enzymatic activity will release a blue to purple insoluble NBT diformazan end product (some washes with dH_2O will stop the reaction).
22. Each CBM probe has to be chosen regarding the target of interest within the plant section. We choose to work with a monoclonal secondary antibody that recognizes specifically the Histidine-Tag from the CBM. The tertiary species-specific labeled antibody will target the secondary antibody. In each experiment, to have details on the background, controls need to be performed with the same labeling except the first probe.
23. Usually, CBMs are used at a concentration comprised between 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [23] but dilutions should be tested to optimize the signal/background ratio.
24. Remove coverslips gently after each antibody incubation to avoid a section tearing. For this, allow the coverslip to fall by itself or dip the slide in a TTBS_{500} bath to facilitate coverslip fall over. Do not remove the coverslip by hand since the applied pressure could result in section damage.
25. Many samples can be accommodated within a slide as in Fig. 1a, constituting so-called tissue microarrays [38]. This multiplication of samples secures final analysis if one sample is lost from the slide or damaged during the labeling process, and this allows comparing more samples (e.g., mean \pm standard deviation,

various developmental stages, organs, or species) between treatment/labeling conditions.

26. This step is very important. To compare each treatment or labeling, sections of interest need to be aligned very precisely on all directions to compare the exact same zone on serial sections differentially treated.
27. NDP.view2 has a lot of functions (zoom, scale bar addition, work with only one channel, exportation of the image for example). It allows annotations (rectangle to delimit the area where the work is done, color) and a comment (sample number for example) to avoid working two times on the same area.
28. The threshold will delimit the fluorescence quantification. The image without the first probe can be used to set the threshold.

Acknowledgments

We acknowledge Alain Jauneau and Aurelie Le Ru for technical assistance on Nanozoomer RS provided by the TRI-genotoul facility (<http://trigenotoul.com/>).

References

1. Himmel ME, Ding S-Y, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW et al (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315:804–807
2. Velickovic D, Ropartz D, Guillon F, Saulnier L, Rogniaux H (2014) New insights into the structural and spatial variability of cell-wall polysaccharides during wheat grain development, as revealed through MALDI mass spectrometry imaging. *J Exp Bot* 65(8):2079–2091
3. Scheller HV, Ulvskov P (2010) Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol* 61(1):263–289
4. McCartney L, Ormerod AP, Gidley MJ, Knox JP (2000) Temporal and spatial regulation of pectic (1-4)-beta-D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. *Plant J* 22(2):105–113
5. Freshour G, Clay RP, Fuller MS, Albersheim P, Darvill AG, Hahn MG (1996) Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiol* 110(4):1413–1429
6. McCartney L, Marcus SE, Knox JP (2005 Apr) Monoclonal antibodies to plant cell wall xylans and arabinoxylans. *J Histochem Cytochem* 53(4):543–546
7. Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J* 371:769–781
8. Black GW, Hazlewood GP, Millward-Sadler SJ, Laurie JI, Gilbert HJ (1995) A modular xylanase containing a novel non-catalytic xylan-specific binding domain. *Biochem J* 307(1):191–195
9. Van Tilbeurgh H, Tomme P, Claeysens M, Bhikhabhai R, Petterson G (1986) Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett* 204(2):223–227
10. Coutinho JB, Gilkes NR, Warren RAJ, Kilburn DG, Miller RC (1992) The binding of *Cellulomonas fimi* endoglucanase C (CenC) to cellulose and Sephadex is mediated by the N-terminal repeats. *Mol Microbiol* 6(9):1243–1252
11. Stoll D, Boraston A, Stålbrand H, McLean BW, Kilburn DG, Warren RAJ (2000) Mannanase Man26A from *Cellulomonas fimi* has a mannan-binding module. *FEMS Microbiol Lett* 183(2):265–269
12. Sorimachi K, Le Gal-Coëffet M-F, Williamson G, Archer DB, Williamson MP (1997) Solution structure of the granular starch binding domain

- of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to β -cyclodextrin. *Structure* 5(5):647–661
13. Ruel K, Joseleau JP (1984) Use of enzyme-gold complexes for the ultrastructural localization of hemicelluloses in the plant cell wall. *Histochemistry* 81(6):573–580
 14. Bendayan M, Banhamou N (1987) Ultrastructural localization of glucoside residues on tissue sections by applying the enzyme-gold approach. *J Histochem Cytochem* 35(10):1149–1155
 15. Hilden L, Daniel G, Johansson G (2003) Use of a fluorescence labelled, carbohydrate-binding module from *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D for studying wood cell wall ultrastructure. *Biotechnol Lett* 25:553–558
 16. McCartney L, Gilbert HJ, Bolam DN, Boraston AB, Knox JP (2004) Glycoside hydrolase carbohydrate-binding modules as molecular probes for the analysis of plant cell wall polymers. *Anal Biochem* 326:49–54
 17. Tomme P, Boraston A, McLean B, Kormos J, Creagh AL, Sturch K et al (1998) Characterization and affinity applications of cellulose-binding. *J Chromatogr* 715:283–296
 18. Hervé C, Rogowski A, Gilbert HJ, Knox JP (2009) Enzymatic treatments reveal differential capacities for xylan recognition and degradation in primary and secondary plant cell walls. *Plant J* 58(3):413–422
 19. McCartney L, Blake AW, Flint J, Bolam DN, Boraston AB, Gilbert HJ et al (2006) Differential recognition of plant cell walls by microbial xylan-specific carbohydrate-binding modules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(12):4765–4770
 20. Blake AW, McCartney L, Flint JE, Bolam DN, Boraston AB, Gilbert HJ et al (2006 Sep) Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding modules in prokaryotic enzymes. *J Biol Chem* 281:29321–29329
 21. Mondolot L, Roussel JL, Andary C (2001) New applications for an old lignified element staining reagent. *Histochem J* 33(7):379–385
 22. Sauter M, Seagull RW, Kende H (1993) Internodal elongation and orientation of cellulose microfibrils and microtubules in deep-water rice. *Planta* 190(3):354–362
 23. Knox JP (2012) *In situ* detection of cellulose with carbohydrate-binding modules. In: *Methods in Enzymology*, 1st edn. Elsevier Inc., Amsterdam, pp 233–245
 24. Hoch HC, Galvani CD, Szarowski DH, Turner JN (2005) Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia* 97(3):580–588
 25. Marcus SE, Blake AW, Benians TAS, Lee KJD, Poyser C, Donaldson L et al (2010 Oct) Restricted access of proteins to mannan polysaccharides in intact plant cell walls. *Plant J* 64:191–203
 26. Ordaz-Ortiz JJ, Marcus SE, Knox PJ (2009) Cell wall microstructure analysis implicates hemicellulose polysaccharides in cell adhesion in tomato fruit pericarp parenchyma. *Mol Plant* 2(5):910–921
 27. Lamed R, Setter E, Bayer EA (1983) Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *J Bacteriol* 156(2):828–836
 28. Shoham Y, Lamed R, Bayer EA (1999) The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends Microbiol* 7(7):275–281
 29. Leroux O, Leroux F, Bagniewska-Zadworna A, Knox JP, Claeys M, Bals S et al (2011) Ultrastructure and composition of cell wall appositions in the roots of *Asplenium* (Polypodiales). *Micron* 42(8):863–870
 30. Hervé C, Rogowski A, Blake AW, Marcus SE, Gilbert HJ, Knox JP (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(34):15293–15298
 31. Matos DA, Whitney IP, Harrington MJ, Hazen SP (2013) Cell walls and the developmental anatomy of the *Brachypodium distachyon* stem internode. *PLoS One* 8(11):1–9
 32. Moller I, Sørensen I, Bernal AJ, Blaukopf C, Lee K, Øbro J et al (2007) High-throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays. *Plant J* 50:1118–1128
 33. Zhang M, Wang B, Xu B (2013) Measurements of single molecular affinity interactions between carbohydrate-binding modules and crystalline cellulose fibrils. *Phys Chem Chem Phys* 15:6508–6515
 34. Bertrand I, Chabbert B, Kurek B, Recous S (2006) Can the biochemical features and histology of wheat residues explain their decomposition in soil? *Plant and Soil* 281(1–2):291–307
 35. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7):671–675
 36. Burlat V, Oudin A, Courtois M, Rideau M, St-Pierre B (2004 Apr) Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates mul-

- ticellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derive. *Plant J* 38:131–141
37. Ruzin BSE (1999) *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford Univ Press, Oxford
38. Francoz E, Ranocha P, Pernot C, Le Ru A, Pacquit V, Dunand C et al (2016) Complementarity of medium- throughput in situ RNA hybridization and tissue-specific transcriptomics : case study of *Arabidopsis* seed development kinetics. *Sci Rep* 6:24644