## UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE INRA UMR FARE 614

## THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biochimie et Biologie moléculaire

## Étude structure/fonction d'hémicellulases thermostables : la xylanase GH–11 et l'arabinofuranosidase GH–51 de *Thermobacillus xylanilyticus*

présentée le 16 septembre 2005 par

## **Gabriel PAËS**

devant le jury ci-dessous :

| Président          | Pr Vinh Tran, Professeur • Université de Nantes  |
|--------------------|--|
| Rapporteurs        | Pr Magali Remaud-Siméon, Maître de Conférence • INSA, Toulouse   |
|                    | Pr Charles Tellier, Professeur • Université de Nantes  |
| Examinateurs       | Dr Jacques Georis, Research Manager • Puratos, Andenne, Belgique   |
|                    | <b>Dr Lars Skov</b> , <i>Associate Professor</i> • Université des Sciences Pharmaceutiques, Copenhague, Danemark |
| Directeur de thèse | Dr Michael J. O'Donohue, Chargé de Recherche • INRA, Reims   |

 $\dot{A}$  mes parents

« On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres : mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison »

Henri Poincaré

## Remerciements

Peut-être l'instant le plus amusant, l'écriture des remerciements a toujours suscité chez moi un vif intérêt, déjà jeune étudiant je me délectais de la lecture de cette première page du manuscrit de thèse, texte souvent conventionnel, parfois humoristique ou sentimental. Bref il s'agit du seul texte libre de la thèse, qui permet de découvrir qu'une personne bien réelle a écrit ce manuscrit, avec ses doutes, ses espoirs, c'est donc le seul moment où l'état d'esprit du rédacteur peut être appréhendé. Pour moi ces quelques lignes font œuvre en quelques sortes de témoignage du travail que j'ai eu la chance de mener durant presque quatre ans et qui est synthétisé ici. Que les personnes qui liront ces lignes sachent que la formation par la thèse permet de se découvrir soi-même, qu'on en retire un bonheur et épanouissement personnels et professionnels que je ne pensais pas pouvoir atteindre. Cette thèse est pour moi l'aboutissement de mes années d'étude débutées à l'Université en septembre 1996, il y a presque neuf ans jour pour jour : que d'expériences, de rencontres durant tout ce temps. Je tiens donc à remercier les personnes que j'ai eues la chance de rencontrer durant cette aventure :

Mme Magali Remaud-Siméon et M. Charles Tellier, pour avoir accepter la rude tâche de juger mon travail au cœur de l'été, et surtout de m'avoir prodigué des réflexions et des conseils en vue de l'amélioration de mon travail.

M. Vinh Tran, pour avoir présidé le jury, et surtout pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche avec rigueur, passion et enthousiasme, il y a de cela déjà 5 ans, et avec qui j'ai toujours eu la chance de continuer à collaborer.

M. Jacques Georis, qui a eu la gentillesse de juger pour la troisième fois cette année un travail de thèse touchant aux xylanases, avec qui nous avons pu partager nos passions pour ces petites enzymes si attachantes, mais qui ne révèlent pas facilement leurs mystères !

M. Lars Skov, qui m'a accueilli durant 6 mois dans son laboratoire de Copenhague, sans qui cette thèse n'aurait sûrement pas été la même. Thank you Lars for all these trips around Europe in synchrotron facilities, and for offering me my first trip on plane! Discovering the Abf structure just a few days before Christmas was a very a nice gift! Thusen tak !

Michael O'Donohue mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, moi jeune étudiant accro à la modélisation *in silico* et sans expérience *in vitro*. Grâce à lui j'ai pu découvrir les joies des expériences biologie moléculaire, de microbiologie et de biochimie, surtout je le remercie pour sa franchise et sa rigueur scientifique et pour m'avoir encouragé dans les moments difficiles, j'espère qu'il ne l'a pas regretté...

Béatrice, la mémoire du laboratoire, qui m'a tant appris, avec ses bonnes pratiques de laboratoire légendaires et son fameux classeur de protocoles jalousement gardé, une page entière de remerciements n'y suffiraient pas ! Simplement merci pour tout, on se reverra belle-maman !

Nathalie, dont la célèbre prose égaye les pauses café et dont le féroce appétit de salade verte est légendaire. Elle et sa collocataire Caroline (la reine de l'Abf et de la tarte au maroilles) m'ont apporté une aide indispensable pour les analyses biochimiques sur Dionex, mais je retiendrai surtout leur bonne humeur, leur gentillesse, et les heures passées à dépanner leur PC !

Jean-Pierre, qu'on peut comparer au chef de cabine d'un avion, toujours prêt à rendre service, à dépanner un PC planté, à trouver une publi ou à réaliser un petit fermenteur. C'est aussi l'homme qui m'a introduit l'expression rémoise « une paire de », pour mon plus grand plaisir !

Delphine, la seule Bretonne expatriée comme moi, qui me consolait à mon arrivée de mon mal du pays (« Désolé mon p'tit gars, y'a pas de crêperie à Reims. »), à qui j'associe l'équipe des secrétaires passée ou présente, Karine, Frédérique et Françoise.

Je tiens également à saluer tous les membres de l'INRA que j'ai rencontrés durant ces quatre années à Reims, permanents, stagiaires, post-docs... et avec qui nous avons pu partager quelque moments autour d'un verre au barbecue ou bien le midi à la « Sodex' ». Bien sûr, cette thèse n'aura pas été possible sans les financement de l'INRA, d'Europôl'Agro et l'attribution d'une bourse Marie-Curie par la Communauté Européenne. Mes remerciements s'adressent également à MM. Masayuki Takashi et Fabrice Fleury pour leur aide précieuse lors des expériences de dichroïsme circulaire et de fluorescence que j'ai pu mener de manière plus que satisfaisante au CNRS, à Nantes.

J'ai également une pensée fraternelle pour les ex-thésards du labo Florent et Johnny ou le vaillant supporter Ardennais Sébastien avec qui nous avons partagé de longues heures de labeur au labo autour des paillasses, mais aussi les petits matchs de foot du mercredi, les soirées musclées OM-PSG au pub, et bien sûr les moments de joies indéscriptibles durant les coupes de ski ADAS, qui ont permis de faire rayonner notre unité INRA comme jamais auparavant ! (hein JP ?)

Enfin et surtout, je garde toujours le meilleur pour la fin (comme un dessert plein de chantilly !), je tiens à remercier mes parents, qui m'ont soutenu durant toutes mes années d'études avec amour et bienveillance (qui ont peut-être craint d'avoir un Tanguy d'ailleurs), mais sans qui je n'aurais sûrement pas eu le courage de persévérer dans mes choix.

Je n'oublie pas ma « ch'tite cocotte » rencontrée entre deux merguez et une cuisse de poulet au barbecue du labo (comme c'est romantique), elle a supporté sans jamais fléchir (ou si peu...) notre emploi du temps ubuesque et mes semaines de travail à rallonge durant la rédaction. Sans sa présence au quotidien, et mes chemises toujours bien repassées, c'est sûr, je n'aurais jamais pu achever cette thèse dans d'aussi bonne conditions : merci !

| délétion d'un acide aminé  |
|--|
| tridimensionnel  |
| acide/base   |
| α–L–arabinofuranosidase  |
| $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de la famille 51 des glycoside-hydrolases  |
| arabinose binding domain, domaine de fixation de l'arabinose               |
| arabinose  |
| <i>cellulose binding domain</i> , domaine de fixation de la cellulose      |
| <i>carbohydrate binding module</i> , module de fixation de polysaccharides |
| chromatographie sur couche-mince   |
| carboxyméthyl cellulose  |
| cellulase de la famille 12 des glycoside-hydrolases                        |
| déoxy nucléotide tri-phosphate   |
| didéoxy nucléotide tri-phosphate   |
| Dalton   |
| dichroïsme circulaire  |
| 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)  |
| degré de polymérisation  |
| dithiothréitol   |
| acide éthylènediaminetétraacétique   |
| état intermédiaire   |
| état de transition   |
| glycoside-hydrolase  |
| isopropyl-β-D-thiogalactoside  |
| constante d'affinité   |
| constante catalytique (turn-over number)                                   |
| constante de dissociation  |
| constante (apparente) de Michaelis-Menten                                  |
| non déterminé (aussi remplacé par — pour plus de clarté)                   |
| non réducteur  |
| nucléophile  |
| para-nitro-phényl-α-L-arabinofuranose                                      |
| para-nitro-phényl-α-L-arabinopyranose                                      |
| paire de base  |
| unité de poids par volume, équivaut à des g/L                              |
| pH optimum d'activité  |
| réducteur  |
| rotation par minute  |
| sodium dodécyl sulfate   |
| temps de demi-vie  |
| température optimale d'activité  |
| tris(hydroxyméthyl)aminométhane  |
| α-L-arabinofuranosidase de Thermobacillus xylanilyticus appartenant        |
| à la famille 51  |
| Tx-Abf dont les résidus Met ont été remplacés par des résidus Se-Met       |
|  |

| Tx-Xyl         | endo $\beta$ -1,4-xylanase de <i>Thermobacillus xylanilyticus</i> appartenant à la |
|----------------|--|
|                | famille 11   |
| UI             | unités internationales (µmol/min)  |
| UV             | ultra-violet   |
| v/v            | unité de volume par volume   |
| XBD            | xylan binding domain, domaine de fixation du xylanase                              |
| X <sub>n</sub> | xylo-oligosaccharide de DP n   |
| Xyl            | xylose   |
| Xyl-10         | xylanase de la famille 10 des glycoside-hydrolases                                 |
| Xyl-11         | xylanase de la famille 11 des glycoside-hydrolases                                 |

## Bases de l'ADN

| А | adénosine |
|---|-----------|
| С | cytosine  |
| G | guanine   |
| Т | thymine   |

## Acides aminés

| A = Ala | alanine          | I = Ile | isoleucine | $\mathbf{R} = \mathbf{Arg}$ | arginine    |
|---------|------------------|---------|------------|-----------------------------|-------------|
| C = Cys | cystéine         | K = Lys | lysine     | S = Ser                     | sérine      |
| D = Asp | acide aspartique | L = Leu | leucine    | T = Thr                     | thréonine   |
| E = Glu | acide glutamique | M = Met | méthionine | V = Val                     | valine      |
| F = Phe | phénylalanine    | N = Asn | asparagine | W = Trp                     | tryptophane |
| G = Gly | glycine          | P = Pro | proline    | Y = Tyr                     | tyrosine    |
| H = His | histidine        | Q = Gln | glutamine  |                             |             |

## Table des matières

| Ren | nercien | nents   | i    |
|-----|---------|---|------|
| Abr | éviatio | ns  | iv   |
| Tab | les des | matières  | vi   |
| Pub | licatio | ns et communications                                      | xiii |
|     |         |   |      |
| INT | rod     | DUCTION GÉNÉRALE  | 1    |
| СН  | APIT    | RE I - ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE                              | 5    |
| A   | La p    | paroi végétale  | 5    |
|     | A.1     | Structure des parois végétales : les lignocelluloses      | 5    |
|     | A.1.    | 1 Composition   | 5    |
|     | A.1.    | 2 Structure   | 6    |
|     | A.2     | Structures des hétéroxylanes                              | 7    |
|     | A.2.    | 1 Composition   | 7    |
|     | A.2.    | 2 Structure   |      |
|     | A.3     | Ecologie des micro-organismes dégradant les hétéroxylanes | 8    |
| В   | Les     | enzymes ou biocatalyseurs                                 | 9    |
|     | B.1     | Les protéines : moteurs de la vie                         | 9    |
|     | B.2     | Structure des protéines                                   |      |
|     | B.2.    | 1 Eléments de structure secondaire et super-secondaire    |      |
|     | B.2.    | 2 Structure tertiaire                                     |      |
|     | B.3     | Les enzymes   |      |
|     | B.4     | Relation structure/fonction                               |      |
|     | B.5     | Les glycoside-hydrolases                                  | 14   |
|     | B.5.    | 1 Classifications   |      |
|     | B.5.    | 2 Mécanisme catalytique                                   |      |
|     | B.6     | Interactions enzyme/substrat                              |      |
|     | B.6.    | 1 Liaisons hydrogène                                      |      |
|     | B.6.    | 2 Forces de van der Waals                                 |      |
|     | B.6.    | 3 Théorie des sous-sites d'arrimage                       |      |
|     | B.7     | Les hémi-cellulases                                       |      |
| С   | Les     | endovvlanases   | 21   |
| U   | $C_{1}$ | Présentation  | 21   |
|     | $C_{1}$ | Multiplicité des endoxylanases                            | 21   |
|     | C.2     | Classification  |      |
|     | C.5     |   |      |
|     | C.4     | Familie 11.   |      |
|     | U.4.    | 1 Etude structurale                                       |      |
|     | C       | 2.4.1.1 Structure et topographie du domanie catalytique   |      |
|     | C.4.    | 2 Homologie de séquences                                  |      |
|     | C.4.    | 3 Stabilité au pH   |      |
|     | C.4.    | 4 Stabilité à la température                              |      |
|     | С       | 2.4.4.1 Relation entre la stabilité et l'activité         |      |
|     | C       | 2.4.4.2 Les xylanases thermostables                       |      |
|     | C       | 2.4.4.3 Facteurs responsables de la thermostabilité       |      |
|     | C       | 5.4.4.4 Amelioration de la thermostabilité                |      |
|     | U.4.    | o Proprietes cataryuques                                  |      |

|    | C.4.5.1 Résidu nucléophile  | 39        |
|----|---|-----------|
|    | C.4.5.2 Résidu acide/base   | 39        |
|    | C.4.6 Spécificité de substrat   |           |
|    | C.4.6.1 Action sur les arabinoxylanes   |           |
|    | C.4.6.2 Sous-sites de fixation  |           |
|    | C.4.7 Inhibiteurs protéiques  |           |
|    | C.4.7.1 XIP-1   |           |
|    | C.4.7.2 IAXI  |           |
|    | C.4.6 La XyI-11 de Inermodaculus xylanilyucus                                   |           |
|    | C.5 Familie 10  |           |
|    | C.5.1 Structure et catalyse   |           |
|    | $C_{6}$ Autres familles de vulgasses  | 45<br>46  |
|    | C 6 1 Famille 5   |           |
|    | C 6 2 Famille 8   | 40.<br>47 |
|    | C.6.3 Famille 43  | 48        |
|    | C.7 Applications des xylanases  |           |
|    | C.7.1 Traitement de la pâte à papier et du papier                               |           |
|    | C.7.2 Valorisation des lignocelluloses : production de bioéthanol               |           |
|    |   | -         |
| D  | Les $\alpha$ -L-arabinofuranosidases  |           |
|    | D.1 Introduction  |           |
|    | D.1.1 Substrats   |           |
|    | D.1.2 Propriétés générales et classification                                    |           |
|    | D.2 Famille 51  |           |
|    | D.2.1 Propriétés physico-chimiques  |           |
|    | D.2.1.1 Stabilité à la température  |           |
|    | D 2 2 Spécificité de substrat et activité                                       |           |
|    | D.2.3 Structure et catalyse   |           |
|    | D.2.3.1 Domaine catalytique   |           |
|    | D.2.3.2 Autres domaines   |           |
|    | D.3 Autres familles d'arabinofuranosidases                                      |           |
|    | D.3.1 Famille 3   |           |
|    | D.3.2 Famille 43  | 59        |
|    | D.3.3 Famille 54  | 60        |
|    | D.3.4 Famille 62  |           |
|    | D.3.5 Famille 93  |           |
|    | D.4 L'Abf–51 de <i>Thermobacillus xylanilyticus</i>                             |           |
|    | D.5 Applications des Abf  | 63        |
| E  | Les autres hémicellulases   | 64        |
| Ľ  | F 1 Xylosidases   | 64        |
|    | E 2 Glucuronidases  | 04<br>65  |
|    | E.2 Ordenformases $E_{\rm s}$   |           |
|    | E.5 Acetyi-esterases et refutoyi-esterases                                      |           |
| F  | Les cellulases  | 66        |
|    | F.1 Les cellulases de la famille 12   |           |
|    | F.2 Comparaison Cel-12 / Xvl-11   |           |
| ~  |   |           |
| G  | Action synergique des hémicellulases <i>in vivo</i> : le concept du cellulosome | 68        |
| СН | APITRE II - MATÉRIELS ET MÉTHODES   | 72        |
|    | Miorobiologio   | 70        |
| A  | Mici obiologie  |           |
|    | A.1 Souches bactemennes.  |           |
|    | A. I. I ESCHEFICHIA COLI ALI-DIUE   |           |
|    |   |           |

| A.1.3 Escherichia coli B834 (DE3) pLysS                       |   |
|---|---|
| A.2 Milieux bactériens  |   |
| A.2.1 Milieux liquides  |   |
| A.2.2 Milieux solides   |   |
| A.2.3 Milieu pour l'expression de protéine Se-Met             |   |
| A 3 Culture et croissance bactériennes                        | 74  |
| A 3 1 Pré-culture   | 74  |
| A 3 2 Croissance et expression                                | 74  |
| A 3 3 Expression de protéines séleno-méthionylées             | 75  |
| A.3.4 Conservation des souches                                |   |
| P. Constárization des ADN recombinants                        | 75  |
| D Caracterisation des ADN recombinants                        | 15/ ۲۵<br>مد                              |
| B.1 Amplification et mutagenese                               |   |
| B.1.1 Amplification par PCR                                   |   |
| B.1.2 Mutagenese dirigee                                      |   |
| B.2 Transformation des cellules compétentes                   |   |
| B.2.1 Préparation des cellules compétentes par voie chimique. |   |
| B.2.2 Transformation par choc thermique                       |   |
| B.3 Purification et dosage                                    |   |
| B.3.1 Purification de l'ADN plasmidique                       |   |
| B.3.2 Extraction d'ADN sur gels d'agarose                     |   |
| B.3.3 Dosage de l'ADN   |   |
| B.4 Caractérisation de l'ADN                                  |   |
| B.4.1 Electrophorèse sur gel d'agarose                        |   |
| B.4.2 Séquençage automatique                                  |   |
| C Caractérisation des protéines recombinantes                 |   |
| C.1 Analyses biochimiques                                     | 80  |
| C 1 1 Extraction et récupération des protéines                | 80  |
| C 1 1 1 Tx-Xvl recombinantes                                  | 80  |
| C = 1 + 2 Tx-Abf recombinantes                                | 81  |
| C 1 2 Purification des Tx-Xyl recombinantes                   | 81  |
| C 1 3 Purification des Tx Aff recombinantes                   | 81  |
| C 1 4 Dosage des protéines                                    |   |
| C 1 5 Dosage des protentes lisulfures                         | 82  |
| C 1 6 SDS-PAGE  | 82  |
| C.1.7 Spectrométrie de masse (MALDI-TOF)                      |   |
| C.1.8 Dichroïsme circulaire (DC)                              |   |
| C.1.8.1 Analyse structurale                                   |   |
| C.1.8.2 Analyse de la dénaturation thermique                  |   |
| C.1.9 Spectrométrie de fluorescence                           |   |
| C.2 Caractérisation de l'activité enzymatique                 |   |
| C.2.1 Enzymologie et interprétation des données cinétiques    |   |
| C.2.2 Criblage d'activité enzymatique                         |   |
| C.2.3 Mesure des paramètres cinétiques des Tx-Xyl recombina   | antes par dosage des sucres réducteurs 90 |
| C.2.4 Mesure des paramètres cinétiques des Tx-Abf recombin    | antes                                     |
| C.2.5 Mesure de la thermoactivité et de la thermostabilité    |   |
| C.2.6 Hydrolyse d'un substrat complexe – analyse des produits | s de réaction93                           |
| C.2.6.1 Chromatographie sur couche-mince (CCM)                |   |
| C.2.6.2 Chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC-PA         | D)  |
| D Cristallographie de protéines aux ravons X                  | 05  |
| D 1 Cristallisation do protéines                              | ۰۰۰۰ ۶۵<br>۵۲                             |
| D.1 Drénomation des échart <sup>11</sup>                      |   |
| D.1.1 Preparation des échantilions                            |   |
| D. I.2 Internotes de cristallisation                          |   |
| D. 1.5 Criotage et conservation des cristaux de proteines     |   |
| D.2 Cristanographie aux rayons A                              |   |
| D.2.1 Collecte des données                                    |   |
| U.Z.Z Resolution des donnees                                  |   |

|     | D.2.3 Facteur de structure, amplitude et problème de phase                              |                |
|-----|---|----------------|
|     | D.2.4 Méthodes d'obtention des phases   |                |
|     | D.2.4.1 Remplacement isomorphe multiple (MIR)   |                |
|     | D.2.4.2 Localisation des sites d'atomes lourds à partir des cartes de Patterson         |                |
|     | D.2.4.3 MAD (Multiple-wavelength Anomalous Dispersion)                                  |                |
|     | D.2.4.4 Remplacement moléculaire : calcul de la phase par utilisation d'une structure h | 10mologue . 98 |
|     | D.2.5 Facteur de température  |                |
|     | D.2.6 Affinement des données  |                |
|     | D.2.7 Cartes de densité électronique  |                |
| Е   | Modélisation moléculaire  | 100            |
| E.  | 1 Objectifs et moyens de la modélisation moléculaire                                    |                |
|     | E.1.1 Caractère empirique   | 101            |
|     | E.1.2 Caractère déterministe  | 101            |
|     | E.1.3 Caractère paramétrable  | 101            |
|     | E.1.4 Conformation et probabilités d'existence  | 102            |
|     | E.1.5 Minimisation de l'énergie potentielle   |                |
| E.: | 2 Analyse 1D, 3D, et superposition de structure   |                |
|     | E.2.1 Analyse 1D : les alignements de séquences   | 103            |
|     | E.2.2 Analyse 3D  |                |
| Е.  | 3 Mesure d'interactions enzyme/substrat   |                |
|     | E.3.1 Modélisation du substrat.   |                |
|     | E.3.2 Mesures des interactions aux niveaux sous-sites et atomiques                      |                |
| Е.4 | 4 Modélisation de boucles protéigues  |                |
|     | · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·   |                |

## CHAPITRE III - ÉTUDE DE LA THERMOSTABILITÉ DE Tx-Xyl .... 107

| A | Problématique                                       |     |
|---|---|-----|
| В | Clonage du gène de Tx-Xyl et caractérisation        |     |
|   | B.1 Clonage du gène de Tx-Xyl                       |     |
|   | B.2 Caractérisation biochimique                     |     |
|   | B.3 Caractérisation enzymatique                     |     |
|   | B.3.1 Thermoactivité et optimum d'activité          |     |
|   | B.3.2 Paramètres cinétiques                         |     |
|   | B.3.3 Thermostabilité                               |     |
|   | B.3.4 Conclusion                                    | 111 |
|   | B.4 Correction du problème de maturation incomplète |     |
|   | B.4.1 Solution pour cliver la Met en N-ter          |     |
|   | B.4.2 Caractérisation biochimique de Tx-Xyl-R2      |     |
|   | B.4.3 Caractérisation enzymatique Tx-Xyl-R2         |     |
|   | B.5 Conclusion                                      |     |
| С | Introduction d'un seul pont disulfure               |     |
| Ũ | C 1 Pont entre le brin B9 et l'hélice a             | 113 |
|   | C. 1 1 Etude de faisabilité                         | 113 |
|   | C.1.2 Création du pont disulfure                    |     |
|   | C.1.3 Caractérisation biochimique                   |     |
|   | C.1.4 Caractérisation enzymatique                   |     |
|   | C.1.5 Conclusion                                    |     |
|   | C.2 Pont entre les extrémités N-ter et C-ter        |     |
|   | C.2.1 Etude de faisabilité                          |     |
|   | C.2.2 Création du pont disulfure                    |     |
|   | C.2.3 Caractérisation biochimique                   |     |
|   | C.2.4 Caractérisation enzymatique                   |     |
|   | C.2.5 Conclusion                                    |     |
| D | Introduction d'un double pont disulfure             |     |

|              | D.1   | Etude de faisabilité et création du double pont  | 118  |
|--------------|---|--|--|
|              | D.2   | Caractérisation biochimique  | 119  |
|              | D.3   | Caractérisation enzymatique  | 119  |
| T            | <br>D'  | •  | 100  |
| E            |   |  | 120  |
|              | E.I   | Variabilité de l'influence des ponts disulfures  | 120  |
|              | E.1.  | 1 Pont entre le brin B9 et l'hélice $\alpha$   | 120  |
|              | E.1.  | 2 Pont entre les extrémités N-ter et C-ter   | 121  |
|              | E.1.  | 3 Double pont  | 122  |
|              | E.2   | Rôle de l'extrémité N-ter  | 122  |
|              | E.3   | Conclusion   | 124  |
| F            | Acti  | on comparée de Tx–Xvl et Tx–Xvl–SS3 sur un substrat complexe   | 125  |
| -            | F 1   | Problématique  | 125  |
|              | Г.1<br>Е Э  | Comparaison de l'hydrolyce du son de blé per Ty Vyl et Ty Vyl SS2  | 125  |
|              | г. <i>2</i>   | Comparaison de l'hydrolyse du son de die par 1x-Ayret 1x-Ayr-555   | 120  |
|              | Г.Z.<br>Г 2 <sup>г</sup>  | Correctórisation des alignessacherides libérés par CCM   | 120<br>126   |
|              | F.Z.  | 2 Caracterisation des ofigosaccharides fiberes par CCM   | 120<br>127   |
|              | F.2.  | 2 Conclusion des oligosaccharides libérés par HPAEC-PAD  | 127  |
|              | F 2   | 5 Interprétation des résultats   | 127<br>129   |
|              | E 3   | Hydrolyse dy son de blé par additions d'anzymes  | 120  |
|              | 1.5<br>E 3  | 1 Choix des conditions expérimentales  | 130<br>130   |
|              | F 3   | 2 Résultats  | 130  |
|              | F 3 1   | 3 Interprétation des résultats   |  |
|              | F /   | Conclusion   | 137  |
| CH           | APIT  | RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx-Xyl  | 134  |
| CH<br>A      | APIT<br>Pro   | CONCLUSION<br>RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl<br>blématique  | <b> 134</b><br>134   |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>Moo   | RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl<br>blématique<br>lélisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl   | 134<br>134<br>I 134  |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>Moo<br>B.1  | RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl<br>blématique<br>lélisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl<br>Modélisation du xylobiose  | <b> 134</b><br><b>134</b><br><b>134</b><br>134   |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Pro<br>Moo<br>B.1<br>B.2  | <b>RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl</b><br>blématique<br>lélisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl<br>Modélisation du xylobiose<br>Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle  | <b> 134</b><br><b>134</b><br>134<br>135  |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Pro<br>B.1<br>B.2<br>B.2.   | <b>RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl</b><br>blématique<br>lélisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl<br>Modélisation du xylobiose<br>Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle<br>1 Construction du substrat et arrimage  | <b> 134</b><br><b>134</b><br>134<br>134<br>135<br>135  |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.  | <b>RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx-Xyl</b><br>blématique<br>lélisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx-Xyl<br>Modélisation du xylobiose<br>Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle<br>1 Construction du substrat et arrimage<br>2 Résultats   | <b> 134</b><br><b> 134</b><br><b> 134</b><br>135<br>135<br>136   |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.  | RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl<br>blématique<br>iélisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl<br>Modélisation du xylobiose<br>Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle<br>1 Construction du substrat et arrimage<br>2 Résultats  | <b> 134</b><br><b> 134</b><br><b> 134</b><br>135<br>135<br>136<br>137  |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Pro<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.   | RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl<br>blématique<br>délisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl<br>Modélisation du xylobiose<br>Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle<br>1 Construction du substrat et arrimage<br>2 Résultats  | <b> 134</b><br><b> 134</b><br><b> 134</b><br><b> 135</b><br><b> 135</b><br><b> 135</b><br><b> 137</b><br><b> 138</b>   |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.3   | <b>RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl</b><br>blématique<br>lélisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl<br>Modélisation du xylobiose<br>Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle<br>1 Construction du substrat et arrimage<br>2 Résultats   | <b> 134</b><br><b> 134</b><br><b> 134</b><br><b> 135</b><br>135<br>136<br>137<br>138<br>139  |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.3<br>Rôle   | Conclusion         RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl         blématique         blématique   | 134<br>134<br>134<br>135<br>135<br>135<br>137<br>138<br>139<br>140   |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Pro<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.3<br>Rôle<br>C.1   | Conclusion         RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl         blématique         Iélisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl         Modélisation du xylobiose  | 134<br>134<br>134<br>135<br>135<br>136<br>138<br>139<br>139<br>140   |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Pro<br>Mod<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>C.1<br>C.2  | <b>RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl Iélisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl</b> Modélisation du xylobiose Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle 1 Construction du substrat et arrimage  | <b> 134</b><br><b> 134</b><br><b> 134</b><br><b> 135</b><br><b> 135</b><br><b> 135</b><br><b> 136</b><br><b> 137</b><br><b> 139</b><br><b> 140</b><br><b> 141</b>  |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>Moc<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.3<br>Rôle<br>C.1<br>C.2<br>C.2.  | <b>RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl</b>   | <b>134</b><br><b>134</b><br><b>134</b><br><b>135</b><br><b>135</b><br><b>135</b><br><b>135</b><br><b>136</b><br><b>139</b><br><b>140</b><br><b>140</b><br><b>141</b><br><b>141</b>   |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>Moc<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.3<br>C.1<br>C.2<br>C.2.<br>C.2.  | Conclusion         RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx-Xyl         blématique  | <b>134</b><br><b>134</b><br><b>134</b><br><b>135</b><br><b>135</b><br><b>135</b><br><b>136</b><br><b>137</b><br><b>139</b><br><b>140</b><br><b>140</b><br><b>141</b><br><b>142</b><br><b>142</b>   |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>Moo<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>C.1<br>C.2<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.   | Conclusion         RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl         blématique         blématique         blématique         délisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl         Modélisation du xylobiose       Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle         1 Construction du substrat et arrimage       2         2 Résultats       3         3 Mesure des interactions par sous-sites du modèle d'arrimage       4         4 Analyse du modèle d'arrimage       Conclusion de l'étude de modélisation moléculaire         c du pouce de Tx–Xyl sur l'activité xylanolytique       Description structurale du pouce de Tx–Xyl         Mutagenèse des résidus du pouce tapissant la crevasse de Tx–Xyl       1         1 Étude du mouvement du pouce par modélisation moléculaire       2         2 Mutagenèse à saturation simultanée des résidus P114–S115–I116 du pouce       2         2.2.1 Contraintes expérimentales       2  | 134<br>134<br>134<br>135<br>135<br>135<br>136<br>137<br>138<br>139<br>140<br>140<br>141<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142   |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>Moo<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>C.1<br>C.2<br>C.2<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.  | Conclusion         RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx-Xyl         blématique         blématique         blématique         Idlisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx-Xyl         Modélisation du xylobiose       Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle         1 Construction du substrat et arrimage       2         2 Résultats       3         3 Mesure des interactions par sous-sites du modèle d'arrimage       4         4 Analyse du modèle d'arrimage       Conclusion de l'étude de modélisation moléculaire         e du pouce de Tx-Xyl sur l'activité xylanolytique       Description structurale du pouce de Tx-Xyl         Mutagenèse des résidus du pouce tapissant la crevasse de Tx-Xyl       1         1 Étude du mouvement du pouce par modélisation moléculaire       2         2 Mutagenèse à saturation simultanée des résidus P114-S115-I116 du pouce       2.2.1 Contraintes expérimentales         .2.2.2 Résultat du criblage d'activité sur boîte de Pétri       2.2.2  | 134<br>134<br>134<br>134<br>135<br>135<br>136<br>139<br>139<br>139<br>140<br>141<br>141<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142   |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>Moo<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>C.2<br>C.2<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2. | Conclusion         RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl         blématique  | 134<br>134<br>134<br>134<br>135<br>135<br>135<br>139<br>139<br>139<br>140<br>141<br>141<br>142<br>142<br>142   |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Pro<br>Mod<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>C.2<br>C.2<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.  | Conclusion         RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl         blématique  | 134<br>134<br>134<br>135<br>135<br>135<br>135<br>139<br>139<br>139<br>140<br>141<br>141<br>142<br>142<br>142<br>142<br>144   |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>Moo<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>C.1<br>C.2<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2. | Conclusion         RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl         blématique         blématique         Idlisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl         Modélisation du xylobiose         Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle         1 Construction du substrat et arrimage         2 Résultats         3 Mesure des interactions par sous-sites du modèle d'arrimage         4 Analyse du modèle d'arrimage         Conclusion de l'étude de modélisation moléculaire         Conclusion de l'étude de modélisation moléculaire         Description structurale du pouce de Tx–Xyl         Mutagenèse des résidus du pouce tapissant la crevasse de Tx–Xyl         1 Étude du mouvement du pouce par modélisation moléculaire         2.2 Résultat du criblage d'activité sur boîte de Pétri         2.2.3 Résultat du criblage d'activité sur boîte de Pétri         2.2.4 Caractérisation et purification des clones les plus actifs         2.2.5 Interprétation des résultats   | 134<br>134<br>134<br>135<br>135<br>135<br>135<br>139<br>139<br>140<br>140<br>141<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>144<br>144  |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>Moo<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>C.1<br>C.2<br>C.2<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.  | <b>RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl</b><br><b>blématique</b><br><b>télisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl</b><br>Modélisation du xylobiose<br>Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle<br>1 Construction du substrat et arrimage<br>2 Résultats<br>3 Mesure des interactions par sous-sites du modèle d'arrimage<br>4 Analyse du modèle d'arrimage<br>Conclusion de l'étude de modélisation moléculaire<br><b>e du pouce de Tx–Xyl sur l'activité xylanolytique</b><br>Description structurale du pouce de Tx–Xyl<br>1 Étude du mouvement du pouce tapissant la crevasse de Tx–Xyl<br>2 Mutagenèse à saturation simultanée des résidus P114–S115–I116 du pouce<br>2.2.2 Résultat u criblage d'activité sur bôîte de Pétri<br>2.2.3 Résultat du criblage d'activité sur bôîte de Pétri<br>2.2.4 Caractérisation et purification des clones les plus actifs<br>3 Mutagenèse dirigée du résidu Ser <sup>115</sup>  | 134<br>134<br>134<br>135<br>135<br>135<br>136<br>137<br>139<br>140<br>140<br>141<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144  |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>Moo<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>C.2<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.  | Conclusion         RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl         blématique         blématique         délisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl         Modélisation du xylobiose         Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle         Arrimage d'un substrat et arrimage         2 Résultats         3 Mesure des interactions par sous-sites du modèle d'arrimage  | 134<br>134<br>134<br>134<br>135<br>135<br>135<br>136<br>139<br>139<br>139<br>140<br>141<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>144<br>145<br>147<br>147   |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>Mod<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.   | RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl         blématique   | 134<br>134<br>134<br>134<br>135<br>135<br>135<br>136<br>137<br>139<br>139<br>140<br>140<br>141<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144<br>144   |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Pro<br>Mod<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.3<br>Rôld<br>C.1<br>C.2<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.3.<br>C.3.   | RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl         blématique         blématique         délisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl         Modélisation du xylobiose         Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle         1 Construction du substrat et arrimage         2 Résultats         3 Mesure des interactions par sous-sites du modèle d'arrimage.         4 Analyse du modèle d'arrimage.         Conclusion de l'étude de modélisation moléculaire         Conclusion de l'étude de modélisation moléculaire         Description structurale du pouce de Tx–Xyl         Mutagenèse des résidus du pouce tapissant la crevasse de Tx–Xyl         1 Étude du mouvement du pouce par modélisation moléculaire         2.2 Résultat du criblage d'activité sur boîte de Pétri         2.2.2 Résultat du criblage d'activité sur boîte de Pétri         2.2.2 Résultat du criblage d'activité par mesure des sucres réducteurs libérés         2.2.4 Caractérisation et purification des clones les plus actifs         2.2.5 Interprétation des résultats.         3 Mutagenèse dirigée du résidu Ser <sup>115</sup> 4 Mutagenèse dirigée du résidu Ser <sup>115</sup>  | 134<br>134<br>134<br>135<br>135<br>135<br>135<br>139<br>139<br>140<br>140<br>141<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>143<br>144<br>144<br>145<br>147<br>148<br>149  |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>Moo<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>C.1<br>C.2<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.3<br>C.3.  | <b>RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl</b><br><b>blématique</b><br><b>idisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl</b><br>Modélisation du xylobiose<br>Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle<br>1 Construction du substrat et arrimage<br>2 Résultats  | 134<br>134<br>134<br>135<br>135<br>135<br>136<br>137<br>139<br>140<br>140<br>140<br>140<br>141<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>145<br>147<br>149<br>150  |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Prol<br>Moo<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>C.1<br>C.2<br>C.2<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.  | <b>RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl</b><br><b>blématique</b><br><b>idisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl</b><br>Modélisation du xylobiose<br>Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle<br>1 Construction du substrat et arrimage<br>2 Résultats<br>3 Mesure des interactions par sous-sites du modèle d'arrimage<br>4 Analyse du modèle d'arrimage<br>Conclusion de l'étude de modélisation moléculaire<br>e du pouce de Tx–Xyl sur l'activité xylanolytique<br>Description structurale du pouce de Tx–Xyl<br>Mutagenèse des résidus du pouce tapissant la crevasse de Tx–Xyl<br>1 Étude du mouvement du pouce par modélisation moléculaire<br>2.1 Contraintes expérimentales<br>2.2.2 Résultat du criblage d'activité sur boîte de Pétri<br>2.2.3 Résultat du criblage d'activité par mesure des sucres réducteurs libérés<br>2.2.4 Caractérisation et purification des clones les plus actifs<br>2.2.5 Interprétation des résultats<br>3 Mutagenèse dirigée du résidu Ser <sup>115</sup><br>4 Mutagenèse dirigée du résidu Ser <sup>115</sup><br>3 Rôle des résidus charnières du pouce<br>1 Suppression du résidu Tyr <sup>111</sup><br>2 Suppression du résidu Tyr <sup>111</sup> | 134<br>134<br>134<br>134<br>135<br>135<br>135<br>136<br>137<br>139<br>140<br>140<br>140<br>140<br>141<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br>140<br> |
| CH<br>A<br>B | APIT<br>Pro<br>Mod<br>B.1<br>B.2<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>B.2.<br>C.1<br>C.2<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.2.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.<br>C.3.  | <b>RE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx–Xyl</b><br><b>blématique</b><br><b>lélisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl</b><br>Modélisation du xylobiose<br>Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle<br>1 Construction du substrat et arrimage<br>2 Résultats<br>3 Mesure des interactions par sous-sites du modèle d'arrimage<br>4 Analyse du modèle d'arrimage<br>Conclusion de l'étude de modélisation moléculaire<br><b>e du pouce de Tx–Xyl sur l'activité xylanolytique</b><br>Description structurale du pouce de Tx–Xyl<br>1 Étude du mouvement du pouce par modélisation moléculaire<br>2 Mutagenèse à saturation simultanée des résidus P114–S115–I116 du pouce<br>2.2.1 Contraintes expérimentales<br>2.2.2 Résultat du criblage d'activité sur boîte de Pétri<br>2.2.3 Résultat du criblage d'activité sur boîte de Pétri<br>2.2.4 Caractérisation et purification des clones les plus actifs<br>2.2.5 Interprétation des résultats<br>3 Mutagenèse dirigée du résidu Ser <sup>115</sup><br>4 Mutagenèse dirigée du résidu Ser <sup>115</sup><br>5 Interprétation des résultats<br>Rôle des résidus charnières du pouce<br>1 Suppression du résidu Thr <sup>121</sup><br>2 Suppression du résidu Thr <sup>121</sup>   | 134<br>134<br>134<br>134<br>135<br>135<br>135<br>139<br>139<br>140<br>140<br>141<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>142<br>144<br>144<br>144<br>145<br>145<br>144<br>145<br>145<br>145<br>145<br>145<br>145<br>145<br>145<br>145<br>145<br>147<br>145<br>   |

| (  | C.4 Conclusion sur le rôle du pouce chez Tx–Xyl sur l'activité xylanolytique  | 152  |
|--|---|--|
| D  | Analyse comparative de Tx–Xyl et des Cel–12   | 153  |
| I  | D.1 Modélisation de l'arrimage d'un substrat cello-oligosaccharidique dans la   |  |
| C  | crevasse de Tx-Xyl  | 153  |
| l  | D.2 Exploration du rôle du résidu Val <sup>35</sup> de Tx–Xyl   | 154  |
|  | D.2.1 Mutagenèse à saturation de Val <sup>35</sup>  | 154  |
|  | D.2.2 Interprétation des résultats et conclusions   | 155  |
| ]  | D.3 Exploration du rôle du pouce de Tx–Xyl par la comparaison structurale ave   | c les  |
| (  | Cel-12  | 156  |
|  | D.3.1 Comparaison structurale de Tx–Xyl et des Cel–12   | 156  |
|  | D.3.1.1 Caracterisation structurale de Tx-Xyl-PT<br>D.3.1.2 Étudo de la fivation d'aligosaccherides sur Tx-Xyl-PT.  | 157  |
|  | D.3.2 Interprétation des résultats  | 150  |
| 1  | D4 Tentative de création d'une activité cellulolytique chez Tx-Xyl  | 162  |
| -  | D.4.1 Combinaison des mutations structurales pour la création d'une activité cellulolytique chez<br>Tx-Xyl-PT   | 162  |
|  | D.4.2 Comparaison des environnements électrostatiques de Tx–Xyl et des Cel–12   | 163  |
|  | D.4.2.1 Topographie et hydrophobie des crevasses  | 163  |
|  | D.4.2.2 Conservation des résidus de Tx-Xyl interagissant avec le substrat chez Sl-Cel   | 164  |
|  | D.4.2.3 Comparaison des dyades catalytiques   | 164  |
|  | D.4.2.4 Mutagenese a saturation de Tyr  | 105  |
| Ε  | Conclusion générale   | 166  |
|  |   |  |
| A  | Problématique   | 167  |
| A<br>B   | Problématique<br>Résolution de la structure de Tx–Abf   | 167<br>168   |
| A<br>B   | Problématique         Résolution de la structure de Tx-Abf.         B.1       Préparation et caractérisation de la protéine séléno-méthionylée  | 167<br>168<br>168  |
| A<br>B<br>]  | Problématique         Résolution de la structure de Tx-Abf         B.1       Préparation et caractérisation de la protéine séléno-méthionylée         B.2       Recherche et optimisation des conditions de cristallisation   | 167<br>168<br>168<br>169   |
| A<br>B<br>]  | Problématique         Résolution de la structure de Tx-Abf.         B.1       Préparation et caractérisation de la protéine séléno-méthionylée         B.2       Recherche et optimisation des conditions de cristallisation.         B.2.1       Criblage aléatoire.         B.2       Optimisation des conditions de cristallisation  | <b> 167</b><br><b> 168</b><br>168<br>169<br>169  |
| A<br>B<br>]  | Problématique         Résolution de la structure de Tx-Abf         B.1       Préparation et caractérisation de la protéine séléno-méthionylée         B.2       Recherche et optimisation des conditions de cristallisation         B.2.1 Criblage aléatoire  | <b> 167</b><br><b> 168</b><br><b> 168</b><br><b> 169</b><br><b> 169</b><br><b> 169</b><br><b> 170</b>  |
| A<br>B<br>]  | Problématique   | <b> 167</b><br><b> 168</b><br><b> 169</b><br><b> 169</b><br><b> 169</b><br><b> 170</b><br><b> 170</b>  |
| A<br>B<br>1<br>1   | Problématique         Résolution de la structure de Tx-Abf         B.1       Préparation et caractérisation de la protéine séléno-méthionylée         B.2       Recherche et optimisation des conditions de cristallisation         B.2.1       Criblage aléatoire         B.2.2       Optimisation des conditions de cristallisation         B.2.3       Préparation des cristaux pour la diffraction aux rayons X et conservation         B.3       Diffraction aux rayons X de Tx-Abf-Se | <b> 167</b><br><b> 168</b><br><b> 169</b><br><b> 169</b><br><b> 169</b><br><b> 169</b><br><b> 170</b><br><b> 170</b><br><b> 170</b>                                  |
| A<br>B<br>1  | Problématique   | <b> 167</b><br><b> 168</b><br><b> 169</b><br><b> 169</b><br><b> 169</b><br><b> 169</b><br><b> 170</b><br><b> 170</b><br><b> 170</b><br><b> 171</b>                   |
| A<br>B<br>I<br>I<br>I  | Problématique         Résolution de la structure de Tx-Abf  | <b> 167</b><br><b> 168</b><br>169<br>169<br>169<br>170<br>170<br>170<br>171<br><b> 171</b>   |
| A<br>B<br>I<br>I<br>C  | Problématique         Résolution de la structure de Tx-Abf         B.1       Préparation et caractérisation de la protéine séléno-méthionylée         B.2       Recherche et optimisation des conditions de cristallisation         B.2.1       Criblage aléatoire         B.2.2       Optimisation des conditions de cristallisation         B.2.3       Préparation des cristaux pour la diffraction aux rayons X et conservation   | <b> 167</b><br><b> 168</b><br><b> 169</b><br><b> 169</b><br><b> 169</b><br><b> 170</b><br><b> 170</b><br><b> 170</b><br><b> 171</b><br><b> 171</b>                   |
| A<br>B<br>I<br>I<br>I<br>C   | Problématique   | 167<br>168<br>169<br>169<br>169<br>170<br>170<br>170<br>171<br>171<br>171<br>171<br>171  |
| A<br>B<br>I<br>I<br>C  | Problématique         Résolution de la structure de Tx-Abf         B.1       Préparation et caractérisation de la protéine séléno-méthionylée         B.2       Recherche et optimisation des conditions de cristallisation         B.2.1       Criblage aléatoire  | <b> 167</b><br><b> 168</b><br>169<br>169<br>169<br>170<br>170<br>170<br><b> 171</b><br><b> 171</b><br>171<br>171<br>172<br>173                                       |
| A<br>B<br>I<br>I<br>C  | Problématique         Résolution de la structure de Tx-Abf  | <b> 167</b><br><b> 168</b><br>169<br>169<br>169<br>170<br>170<br>170<br><b> 171</b><br><b> 171</b><br><b> 171</b><br>171<br>172<br>173<br>174                        |
|  | Problématique         Résolution de la structure de Tx-Abf  | 167<br>168<br>168<br>169<br>169<br>169<br>170<br>170<br>170<br>171<br>171<br>171<br>171<br>171<br>173<br>174<br>176  |
|  | Problématique   | 167<br>168<br>169<br>169<br>169<br>170<br>170<br>170<br>171<br>171<br>171<br>171<br>173<br>174<br>176<br>176   |
|  | Problématique   | 167<br>168<br>168<br>169<br>169<br>170<br>170<br>170<br>171<br>171<br>171<br>171<br>171<br>173<br>176<br>176<br>176<br>179   |
|  | Problématique   | 167<br>168<br>169<br>169<br>169<br>170<br>170<br>170<br>171<br>171<br>171<br>171<br>171<br>173<br>174<br>176<br>176<br>179   |
|  | Problématique   | 167<br>168<br>168<br>169<br>169<br>169<br>170<br>170<br>170<br>170<br>171<br>171<br>171<br>171<br>173<br>176<br>176<br>179<br>179<br>179                             |
| A<br>B<br>1<br>1<br>1<br>1<br>C<br>(<br>0<br>0<br>0<br>1<br>1      | Problématique   | 167<br>168<br>168<br>169<br>169<br>169<br>170<br>170<br>170<br>170<br>171<br>171<br>171<br>171<br>174<br>176<br>176<br>179<br>179<br>180<br>180                      |
| A<br>B<br>1<br>1<br>1<br>1<br>1<br>C<br>0<br>0<br>0<br>0<br>1<br>1 | Problématique         Résolution de la structure de Tx-Abf  |  |
| A<br>B<br>1<br>1<br>1<br>1<br>C<br>(<br>0<br>0<br>1<br>1<br>1<br>1 | Problématique   | 167<br>168<br>168<br>169<br>169<br>169<br>170<br>170<br>170<br>171<br>171<br>171<br>171<br>171<br>173<br>174<br>176<br>176<br>179<br>179<br>179<br>180<br>181<br>181 |

| D. | 4 Conclusion de la comparaison structurale                         |                        |
|----|--|------------------------|
| E  | Relation structure/fonction chez Tx-Abf                            |                        |
| E. | 1 Exploration du rôle du résidu W248 dans l'interaction de stackin | <i>ig</i> du sous-site |
| (+ | 1)   |                        |
|    | E.1.1 Comparaison de l'activité sur le pNP-Araf                    |                        |
|    | E.1.2 Comparaison de l'activité sur le $X_4A$                      |                        |
|    | E.1.3 Interprétation des résultats et conclusion                   |                        |
| E. | 2 Rôle des ponts disulfures  |                        |
|    | E.2.1 Suppression du pont C74–C180 par mutagenèse dirigée          |                        |
|    | E.2.2 Caractérisation biochimique                                  |                        |
|    | E.2.3 Caractérisation de la thermostabilité                        |                        |
|    | E.2.4 Interprétation des résultats et conclusion                   |                        |
| F  | Conclusion générale  |                        |

## **CHAPITRE VI - CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES 189**

| Annexes  |  |
|--|--|
| Masses molaires des acides aminés                |  |
| Code génétique                                   |  |
| Composition du milieu minimal                    |  |
| Rappel sur les calculs d'incertitudes de mesures |  |
| Amorces sens et anti-sens utilisées              |  |
| Alignement de séquences partiel des Abf–51       |  |
| Références bibliographiques                      |  |

## **Publications & Communications**

#### Publications dans des revues à comité de lecture

Paës G., Gajhede M., Rémond C., O'Donohue M. J. & Skov L., *Crystal structure of the GH–51 arabinofuranosidase from* Thermobacillus xylanilyticus, en préparation

Paës G., Takahashi M., Tran V. & O'Donohue M. J., *Investigation of the role of the thumb loop in GH–11 xylanases on substrate specificity*, en préparation

Paës G. & O'Donohue M. J., *Increasing the thermostability of a thermostable GH–11 xylanase and impact on wheat bran degradation*, en préparation

Beaugrand J., Paës G., Reis D., Takahashi M., Debeire P., O'Donohue M. & Chabbert B., *Probing the cell wall heterogeneity of micro-dissected wheat caryopsis using both native and inactive forms of a GH11 xylanase*, Planta, sous presse

Beaugrand J., Chambar G., Wong V. W. K., Goubet F., Rémond C., Paës G., Benamrouche S., Debeire P., O'Donohue M. & Chabbert B., *Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylan*, Carbohydr. Res., 2004, 339, 2529-2540

### **Communications orales**

<u>Paës G.</u>, Boukari I., Takahashi M., Tran V. & O'Donohue M. J., *Engineering of the of GH-11 xylanase "thumb" from* Thermobacillus xylanilyticus, 4<sup>th</sup> European Symposium on Enzymes in Grain Processing, 6 – 8 June 2005, Nantes, France

Beaugrand J., Paës G., Reis D., Rémond C., Guillon F., Debeire P., O'Donohue M. J. & <u>Chabert B.</u>, *Cytological and structural basis of wheat bran enzymatic degradation*, 4<sup>th</sup> European Symposium on Enzymes in Grain Processing, 6 – 8 June 2005, Nantes, France

#### **Communications par affiche**

<u>Paës G.</u> & O'Donohue M. J., *Increasing the thermostability of a thermostable GH–11 xylanase*, 6<sup>th</sup> Carbohydrate Bioengineering Meeting, 3 – 6 April 2005, Barcelona, Spain

<u>Paës G.</u>, Gajhede M., Rémond C., O'Donohue M. J & Skov L., *Crystal structure of a GH–51*  $\alpha$ -*L-arabinofuranosidase from* Thermobacillus xylanilyticus, 6<sup>th</sup> Carbohydrate Bioengineering Meeting, 3 – 6 April 2005, Barcelona, Spain

Beaugrand J., Reis D., Paës G., Guillon F., Debeire P., O'Donohue M. J. and , <u>Chabbert B.</u>, *In situ visualization of xylanase-mediated hydrolysis of wheat bran:further insights using inactive enzyme*, X International Cell Wall meeting, 29 August – 7 September 2004, Sorento, Italy

## Introduction générale

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

La Vie possède les propriétés de réplication, de catalyse et de mutabilité. La biochimie est l'étude de la vie à l'échelle moléculaire. Les protéines, et les enzymes en particulier, sont des acteurs essentiels de la Vie, elles interviennent à tous les niveaux : transport, reconnaissance, catalyse, etc... L'élucidation des premières structures tridimensionnelles de protéines dans les années 1960 a permis peu à peu de comprendre comment ces machines moléculaires complexes participaient au contrôle des myriades de séquences réactionnelles des cellules vivantes. Aujourd'hui, l'Homme essaye de parvenir à décrypter son propre génome et celui des organismes de son environnement, mais l'interprétation de l'ensemble de ces données génétiques reste le Graal des scientifiques. En effet, les gènes ainsi découverts peuvent coder pour une ou plusieurs protéines, dont la structure et la fonction aux niveaux moléculaire, cellulaire, et phénotypique sont a priori inconnues sans l'utilisation de bases de données intégrant des séquences de protéines de fonction et éventuellement de structure déjà connues. L'accumulation du nombre de structures de protéines disponibles a montré le lien évident qui existe entre la structure et la fonction (au moins au niveau moléculaire), mais plusieurs questions restent cependant sans réponse : quels sont précisément les motifs responsables d'une fonction donnée, sont-ils conservés, une fonction particulière est-elle toujours attribuée à une même structure, et vice-versa?

Le paradigme structure/fonction des protéines actuellement abondamment exploré ne révèle que progressivement ses mystères, mais déjà certains outils du vivant sont devenus des acteurs essentiels dans notre vie moderne : il s'agit des bio-catalyseurs, les enzymes. Sans en avoir souvent conscience, l'Homme les utilisent depuis des millénaires dans la fabrication artisanale de la bière, du vin, du fromage, etc. par l'intermédiaire des micro-organismes qui les produisent. Aujourd'hui, les enzymes de ces micro-organismes ont pu être isolées et caractérisées, puis transférées et employées dans des procédés très variés.

Le marché des enzymes employées dans l'industrie a quasiment doublé de 1995 à 2001, passant de 1 milliard à presque 2 milliards d'euros, il continue de se développer avec l'arrivée de nouvelles enzymes et le développement de nouvelles applications (Godfrey & West, 1996 ; Godfrey, 2003). Les enzymes possèdent de multiples avantages par rapport à certains catalyseurs chimiques classiques : spécificité d'action, rendements de réaction élevés, biodégradabilité, conditions de réactions douces (donc économies d'énergie), etc. Même si les besoins en enzymes dans des secteurs comme celui des détergents ont stagné ces dernières

années, ceux de l'alimentation humaine et de l'élevage prévoient des taux annuels de croissance de l'ordre de 4 à 5% (Godfrey, 2003). L'amélioration des outils actuels et la découverte de nouvelles enzymes mieux adaptées, grâce à la compréhension de la relation entre la structure et la fonction, est donc un élément qui apparaît comme essentiel dans l'industrie aujourd'hui.

Les hydrolases constituent 75% du marché des enzymes, les protéases en tête sont suivies des glycosidases comme les cellulases, les amylases, et les hémicellulases, dont les xylanases représentent la plus forte proportion (Bhat, 2000). Or, les conditions d'emploi dans les procédés industriels s'avèrent parfois très sévères, notamment au niveau de la température. Des enzymes d'origine mésophile sont donc peu adaptées, le besoin de nouvelles enzymes thermophiles est évident. En particulier, des enzymes thermophiles seraient intéressantes dans des applications où des étapes de refroidissement ne sont pas économiquement rentables et/ou des températures élevées sont requises pour accroître la solubilité des substrats et/ou pour réduire la viscosité et la contamination.

Au-delà du simple transfert des enzymes d'un système microbien à un système industriel, l'ingénierie enzymatique vise non seulement à comprendre le fonctionnement des enzymes et la relation qui lie la structure à la fonction, mais surtout à apporter des éléments suffisamment pertinents pour améliorer, ou plutôt adapter les enzymes à leur nouvel environnement. Le rêve ultime de tout Biologiste structural serait de pouvoir concevoir des enzymes à façon, un peu à la façon d'un Lego enzymatique, en fonction des conditions physico-chimiques d'utilisation, de la réaction catalysée,... et qui agiraient bien sûr de manière optimale.

Même si ce rêve paraît aujourd'hui utopique étant donné les centaines de milliers (voir sûrement plus...) d'enzymes qui existent, comme pouvait l'être d'ailleurs le décodage du génome humain hier, il le sera peut-être moins demain grâce au nombre toujours plus élevé de structures protéiques révélées, analysées, annotées par des équipes de recherche du monde entier, et surtout grâce aux méthodes de prédiction de structure de plus en plus fiables. Cet ouvrage universel aboutira peut-être à une compréhension totale du paradigme structure/fonction, qui est un peu à la Biologie ce que le « Rêve d'une théorie ultime », chère à Steven Weinberg, est à la Physique moderne.

Ce travail de thèse s'inscrit bien modestement dans la mouvance actuelle d'exploration du paradigme structure/fonction. Il utilisera les techniques de biologie moléculaire et de

biochimie pour manipuler les gènes et les protéines. En particulier, la méthode de mutagenèse dirigée sera la technique de base pour explorer l'incidence d'un changement de structure, local ou global, sur la fonctionnalité enzymatique. L'utilisation de plusieurs méthodes spectroscopiques viendra compléter cette analyse.

Cette thèse s'intéressera à deux hémicellulases impliquées dans la dégradation des composés lignocellulosiques : une xylanase de la famille 11 des glycoside-hydrolases et une arabinofuranosidase de la famille 51, isolées chez le même organisme Thermobacillus xylanilyticus, et appelées respectivement Tx-Xyl et Tx-Abf. Les xylanases sont des outils à fort potentiel industriel dans des domaines variés comme la fabrication du papier, la bioconversion de co-produits agricoles, la panification, etc., tandis que les arabinofuranosidases sont déjà employées dans l'œnologie notamment.

Nous débuterons tout d'abord dans le Chapitre I par un état des lieux des connaissances sur les enzymes en général, et sur les familles GH-11 et GH-51 de ces deux enzymes en particulier, sans oublier un aperçu de leurs applications actuelles et à venir. Les matériels et méthodes employés dans cette thèse seront décrits dans la Chapitre II.

Les Chapitres III et IV seront dédiés à l'étude structure/fonction de Tx-Xyl. Le premier chapitre s'intéressera aux problèmes de thermostabilité et de thermostabilisation de cette enzyme, et la manière dont l'introduction de ponts disulfures a permis d'augmenter considérablement sa thermostabilité. La dégradation d'un substrat complexe, le son de blé, sera aussi investigué. Le second chapitre sera plus fondamental, avec l'examen approfondi et inédit du rôle du « pouce » de Tx-Xyl en tant que marqueur de spécificité, via une série de mutations de résidus sensibles du pouce, qui nous conduira à tenter de recréer une activité de cellulase chez cette enzyme.

Enfin, le Chapitre V exposera la résolution de la structure de Tx-Abf par cristallographie aux rayons X, et l'analyse de sa structure d'abord seule, puis en comparaison à celle d'une autre enzyme de la même famille, analyse qui mettra en évidence des points communs, mais aussi des motifs structuraux originaux, dont certains seront examinés.

Cette thèse se conclura sur le Chapitre VI qui fera le bilan des expériences menées et des perspectives pour ce travail d'investigation.

J'espère que cette thèse aura permis d'apporter de nouvelles informations et aidera à mieux comprendre le modèle structure/fonction. Bonne lecture !

## Chapitre I

# Étude bibliographique

## **CHAPITRE I - ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## A La paroi végétale

#### A.1 Structure des parois végétales : les lignocelluloses

#### A.1.1 Composition

La paroi végétale est une enveloppe qui contribue à la rigidité du végétal et supporte la croissance des cellules. C'est aussi une barrière protégeant la cellule contre la déshydratation, les chocs osmotiques ou physiques, ainsi que les infections microbiennes. Elle est composée majoritairement de lignocelluloses, assemblage complexe de la cellulose, des lignines et des hémicelluloses.<sup>1</sup> On y rencontre aussi des protéines, des lipides, des pigments et des minéraux. Sa structure observée en microscopie électronique révèle trois niveaux d'organisation (**Figure 1**) :

- la lamelle moyenne : couche fine de 0,5 à 2,0 µm d'épaisseur, riche en substances pectiques, qui assure la cohésion entre deux cellules contiguës (Aman, 1993) ;
- la paroi primaire : couche très fine de 0,03 à 1,0 μm d'épaisseur, souple, hydrophile, de faible résistance mécanique, formée au cours de la croissance cellulaire, et en majorité composée de microfibrilles de cellulose englobées dans une matrice amorphe riche en hémicelluloses, pectines et protéines (Mc Neil *et al.*, 1984);
- la paroi secondaire : couche épaisse, compacte, rigide et très résistante issue de cellules en fin de croissance. Elle est construite à partir de dépôts de microfibrilles de celluloses en couches orientées perpendiculairement les unes aux autres, d'où la différenciation en trois couches S1, S2 et S3 de la paroi secondaire.

Alors que la cellulose et les hémicelluloses sont des polymères formés essentiellement à partir de sucres, les lignines sont des polymères aromatiques synthétisés à partir de précurseurs phényl-propanoïdes. La composition de ces macromolécules varie considérablement non seulement d'une espèce à une autre mais aussi au sein d'une même plante en fonction de son âge, de son état de croissance et de facteurs environnementaux.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Etant donnée la diversité structurale de ces composés, on préfèrera les nommer au pluriel. La cellulose étant plus homogène, on la laissera au singulier.



**Figure 1 – Organisation des tissus de la paroi végétale**. **A**, cellules adjacentes ; **B**, couches de la paroi, LM : lamelle moyenne, P : paroi primaire, S1, S2, S3 : couches de la paroi secondaire ; **C**, distribution des cellulose, hémicelluloses et lignines dans la paroi secondaire (Pérez *et al.* 2002, adapté de Kirk & Cullen, 1998).

#### A.1.2 Structure

La cellulose représente 45% de la matière sèche du bois. C'est un polymère linéaire composé de résidus  $\beta$ –D–glucoses liés en  $\beta$ –(1,4) dont les longues chaînes forment des fibrilles dites élémentaires liées entre elles par des liaisons hydrogène et des interactions de van der Waals. Leur assemblage avec les lignines crée des microfibrilles qui, lorsqu'elles se groupent, constituent des fibres de cellulose. Celles-ci forment à leur tour majoritairement de la cellulose cristalline et une faible fraction de cellulose amorphe. C'est dans cet état que la cellulose est la plus sujette à la dégradation enzymatique (Béguin & Aubert, 1994).

Les hémicelluloses (25 à 30% de la matière sèche du bois) sont beaucoup plus complexes que la cellulose. Généralement, il s'agit de glucuronoxylanes dans le bois dur et de glucomannanes dans le bois tendre. Les glucuronoxylanes par exemple sont élaborés à partir d'une chaîne de xylane où des résidus D-xyloses sont liées entre eux par des liaisons  $\beta$ –(1,4), chaîne qui est substituée par divers sucres et acides : L-arabinose, acides D-galacturonique et D-glucuronique. Au contraire de la cellulose, les hémicelluloses, qui ne forment pas d'agrégats, sont plus facilement hydrolysables dans leur ensemble mais les xylo-oligomères issus de l'hydrolyse partielle sont résistants aux attaques enzymatiques.

Les lignines confèrent aux cellules de la paroi végétale la rigidité, l'imperméabilité, la résistance aux attaques microbiennes et au stress oxydatif. Elles sont issues de la polymérisation d'unités de phénylpropanes via des liaisons C–C et aryl-éther. La **Figure 1** (d'après Kirk & Cullen, 1998) schématise l'organisation des tissus dans la paroi végétale.

La biodégradation des ces trois polymères par les micro-organismes rencontre divers obstacles. Ces composés étant insolubles, les enzymes doivent agir de façon exo-cellulaire, en phase hétérogène. De plus, de part leur diversité, l'hydrolyse complète requiert l'utilisation de tout un panel d'enzymes : des hydrolases pour la dégradation de la cellulose et des hémicelluloses, et un système d'enzymes oxydatives qui dégrade les lignines (Pérez *et al.*, 2002).

Les hémicelluloses sont les polysaccharides les plus abondants sur Terre après la cellulose, ils représentent de 20 à 35% de la biomasse lignocellulosique, et les hétéroxylanes sont les hémicelluloses les plus abondantes (Saha, 2003), elles peuvent constituer plus de 30% de la matière sèche des parois végétales (Joseleau *et al.*, 1992). Un intérêt grandissant est porté sur les enzymes qui dégradent ou favorisent la dégradation des hémicelluloses car de nombreuses



**Figure 2 – Représentation schématique de la structure des hétéroxylanes des fibres de maïs** (d'après Saulnier *et al.*, 1995). X : xylose, A : arabinose, G : galactose, GlcA : acide glucuronique, FeA : acide férulique.

applications potentielles existent dans les industries agro-alimentaires, du papier ou pour la conversion de ces composés à faible valeur ajoutée en bio-carburants.

## A.2 Structures des hétéroxylanes

### A.2.1 Composition

Les hétéroxylanes sont formés sur la base d'une chaîne de xylane linéaire constituée de résidus  $\beta$ -D-xylopyranose liés entre eux par des liaisons  $\beta$ -(1,4) (**Figure 2**). Ces xyloses sont substitués à 80% en O2 ou en O3 par des composés variés tels que :

- des résidus α-L-arabinose en O2 ou O3, parfois même des disubstitutions sur la même position ou sur deux positions adjacentes ;
- des acides glucuroniques ou leurs dérivés éther 4–O–méthyl en O2 ;
- des groupements acétyl, féruloyl et *p*-coumaryl ;
- des chaînes latérales oligomériques contenant de l'arabinose, du xylose et parfois du galactose (Brillouet *et al.*, 1982 ; Saulnier *et al.*, 1995).

Bien entendu, la composition des hétéroxylanes varie considérablement en fonction de l'origine botanique (**Tableau 1**, d'après Shibuya & Iwasaki, 1985 ; Gruppen *et al.*, 1992 ; Kormelink & Voragen, 1993). Le degré de polymérisation des xylanes de bois dur est plus élevé (150–200) que celui des xylanes de bois tendre (70–130).

De nombreuses liaisons s'établissent entre les hétéroxylanes via des ponts diféruliques, constituant un réseau dans lequel sont engagées les microfibrilles de cellulose. Ils forment aussi de nombreuses interactions, soit covalentes, soit non-covalentes avec les lignines, la cellulose, et les autres composés qui servent au maintien de l'intégrité de la structure de la paroi végétale.

## A.2.2 Structure

La structure du xylane a pu être établie d'après des résultats de diffraction aux rayons X. Quand il n'est pas ramifié, sa structure cristalline est une hélice se répétant tous les trois résidus, avec un pas de 1,49 nm (Atkins, 1992). Mais même lorsqu'il est ramifié par des résidus  $\alpha$ -L-arabinose encombrants, cette conformation n'est pas perturbée, un pas de trois résidus est toujours observé (contrairement par exemple aux protéines où des changements de chaînes latérales même *a priori* mineurs sont susceptibles d'engendrer de fortes perturbations

| Origine                       | Xylose | Arabinose | Rhamnose | Mannose | Galactose | Glucose | Acides<br>uroniques |
|-------------------------------|--------|-----------|----------|---------|-----------|---------|---------------------|
| Bouleau (Roth) <sup>a</sup>   | 89,3   | 1,0       | n.d.     | n.d.    | n.d.      | 1,4     | 8,3                 |
| Blé <sup>b</sup>              | 65,8   | 33,5      | n.d.     | 0,1     | 0,1       | 0,3     | n.d.                |
| Avoine <sup>a</sup>           | 81,4   | 9,7       | n.d.     | n.d.    | 1,1       | 3,4     | 4,3                 |
| Mélèze <sup>a</sup>           | 55,6   | 11,4      | n.d.     | n.d.    | 3,1       | 25,7    | 4,2                 |
| Riz (son neutre) <sup>c</sup> | 46,0   | 44,9      | n.d.     | n.d.    | 6,1       | 1,9     | 1,1                 |

**Tableau 1 – Composition d'hétéroxylanes de différentes origines en monosaccharides** (pourcentages molaires) (d'après <sup>a</sup>Kormenlink & Voragen, 1993 ; <sup>b</sup>Gruppen *et al.*, 1992 ; <sup>c</sup>Shibuya & Iwasaki, 1985). n.d. : non détecté.

du repliement) (Atkins, 1992). La conformation avec un pas de deux résidus serait thermodynamiquement stable mais n'a jamais été observée.

En ce qui concerne la distribution des substituants le long de la chaîne de xylane, la corrélation des données sur la composition des hétéroxylanes en momomères et de celle de leurs produits de dégradation a permis de montrer au moins chez le blé, le riz, et l'orge que cette distribution ne doit rien au hasard (Goldschmid & Perlin, 1963 ; Bengtsson *et al.*, 1992 ; Voragen *et al.*, 1992). Dans ce modèle, les hétéroxylanes semblent constitués de deux types de séquences répétées :

- une première séquence de résidus xyloses non substitués isolés et séparés par plusieurs résidus mono- ou di-substitués ;
- une seconde séquence d'au moins deux résidus xylose ne portant aucune ramification.

Des blocs de xylanes tantôt substitués, tantôt non substitués rendent ce polymère vraiment hétérogène aussi bien dans sa composition que dans sa structure spatiale. Le calcul du rapport X/A (ratio des quantités de xylose et d'arabinose dans un polymère) ne renseigne que sur la composition globale et ne montre pas l'existence de ces amas, même lorsque X/A est proche de l'unité. Cette structure particulière joue un rôle primordial sur la dégradation enzymatique par les micro-organismes.

## A.3 Écologie des micro-organismes dégradant les hétéroxylanes

Les micro-organismes producteurs d'enzymes hémicellulolytiques existent dans des habitats naturels très diversifiés. La caractérisation de ces enzymes est rendue particulièrement laborieuse à cause de la difficulté d'isoler les micro-organismes producteurs, on estime que plus de 99% d'entre eux ne peuvent en effet pas être cultivés avec les techniques de microbiologie standards (Amann *et al.*, 1995). La dégradation des hétéroxylanes par exemple leur fournit une source de carbone alternative, ou bien elle fait partie d'un programme d'infection et de colonisation des cellules des plantes (Prade, 1995). Par ailleurs, certains de ces micro-organismes vivent en symbiose chez les animaux ruminants, leur présence étant indispensable à ces derniers pour digérer la cellulose ou les xylanes par exemple qui ne sont pas assimilables directement par l'homme. Ils interviennent donc directement dans notre chaîne alimentaire.

Ainsi, le D-xylose est le principal produit de dégradation des hétéroxylanes par les microorganismes et se substitue au glucose en tant que source primaire de carbone. Chez les bactéries et fungi, le xylose est activement transporté à travers la membrane, converti en xylulose, soit directement, soit via un intermédiaire xylitol, puis métabolisé par la voie des pentoses-phosphate en un produit qui peut intégrer la glycolyse (Schneider, 1989).

Même s'ils sont responsables de la contamination et de la perte de nombreuses cultures chaque année dans le monde, ces micro-organismes permettent le recyclage des tissus végétaux morts, le carbone fixé par photosynthèse dans les sucres étant métabolisé avec élimination soit d'eau et de dioxyde de carbone dans des conditions aérobies, soit de méthane dans des conditions anaérobies.

Mais quelles sont les enzymes qui permettent la dégradation des hétéroxylanes, comment agissent-elles ? C'est ce que nous allons découvrir à présent.

## **B** Les enzymes ou biocatalyseurs

#### B.1 Les protéines : moteurs de la vie

Les protéines sont au coeur de l'action dans les processus biologiques. Elles fonctionnent comme enzymes, pour catalyser l'ensemble complexe des réactions chimiques que l'on appelle globalement la Vie. Les protéines sont les régulateurs de ces réactions, à la fois directement comme constituants des enzymes, et indirectement comme messagers chimiques appelés hormones, et comme récepteurs de ces hormones. Elles transportent et mettent en réserve des produits biologiquement essentiels comme l'oxygène, le glucose, les lipides, etc. Sous forme de fibres musculaires et d'autres assemblées contractiles, les protéines assurent le mouvement mécanique coordonné de nombreux processus biologiques, y compris la séparation des chromosomes au cours de la division cellulaire et le mouvement de vos yeux quand vous lisez cette page ! Les protéines du système immunitaire constituent un système de défense indispensable chez les animaux supérieurs. Les protéines sont à la fois des éléments actifs primordiaux et des produits de l'expression de l'information génétique. Les acides nucléiques sont pour la plupart des banques d'informations sur lesquelles agissent les protéines. Néanmoins, les protéines ont également des rôles passifs, comme celui du collagène qui donne aux os, tendons et ligaments leur résistance élastique caractéristique.

La fonction d'une protéine ne peut être comprise que par sa structure, c'est-à-dire les relations tridimensionnelles entre les atomes qui forment la protéine. Leur architecture est présentée traditionnellement selon quatre niveaux d'organisation :



Figure 3 – Diagramme d'énergie des liaisons non-covalentes et covalentes rencontrées dans les protéines.

- la structure primaire d'une protéine est la séquence en acides aminés de sa (ses) chaîne(s) polypeptidique(s);
- la structure secondaire est l'arrangement spatial local des atomes du squelette d'un polypeptide sans tenir compte de la conformation de ses chaînes latérales.
   Pratiquement, le terme structure secondaire désigne des entités structurales bien caractérisées comme les hélices α ou les brins β;
- la structure tertiaire désigne la structure tridimensionnelle du polypeptide entier ;
- la structure quaternaire désigne l'arrangement spatial des chaînes polypeptidiques réunies par des interactions non-covalentes ou des ponts disulfures et appelées sousunités.

## **B.2** Structure des protéines

Les protéines sont constituées de monomères appelés acides aminés, qui existent au nombre de 20, liés entre eux par des liaisons peptidiques et possédant une chaîne latérale. C'est cette chaîne latérale qui est responsables des propriétés de l'acide aminé et des interactions qu'il peut créer ou pas avec ses voisins. Les caractéristiques des acides aminés dépendent des conditions physico-chimiques environnantes (pH, force ionique) et sont aussi influencées par leurs voisins. Les interactions que les acides aminés créent entre eux pour former les structures protéiques sont : les interactions polaires ou apolaires, les forces ioniques, les liaisons hydrogène et les ponts disulfure. De manière générale, les protéines sont donc stabilisées par des interactions faibles (**Figure 3**).

#### **B.2.1** Eléments de structure secondaire et super-secondaire

Les éléments de structure secondaire existent en nombre limité :

- l'hélice α (ou hélice 3,6<sub>13</sub>) : elle est stabilisée par les liaisons hydrogène entre l'atome
   H du groupe amide et l'atome O du carbonyle qui se trouvent dans la liaison
   peptidique. Dans cet arrangement particulièrement rigide, les chaînes latérales se situent à l'extérieur de l'hélice (Figure 4A).
- le brin β (β-*strand*) : constitué à partir d'un ou de deux polypeptides, les brins β s'assemblent de manière parallèle les uns par rapport aux autres pour former des feuillets β (β-*sheets*) stabilisés de la même manière que l'hélice α, i.e. par des liaisons hydrogène intra- ou inter-chaînes qui sont parallèles ou anti-parallèles. Les chaînes latérales se projettent au-dessus et en dessous du feuillet (Figure 4B).



Figure 4 – Structure des hélices  $\alpha$  (A) et des brins et feuillets  $\beta$  (B) constituant les protéines. En haut les squelettes peptidiques (atomes de carbone en vert, d'azote en bleu, d'oxygène en rouge), en bas les représentations symboliques. Les liaisons hydrogène N–H…O–C (pointillés gris) qui stabilisent ces structures s'établissent entre les atomes qui forment les liaisons peptidiques.

- les tours, coudes ou boucles courts et de structure ordonnée ;
- d'autres formes d'hélices (hélices 3<sub>10</sub>, triple hélice du collagène) ;
- les boucles sans structure particulière.

Un regroupement d'un petit nombre de ces éléments peut former des éléments de structure secondaire, ou motifs, que l'on retrouve dans les protéines. Par exemple le motif  $\beta\alpha\beta$  où deux brins  $\beta$  parallèles sont reliés via une hélice  $\alpha$ , ou bien l'épingle à cheveux  $\beta$  qui consiste en une alternance de brins  $\beta$  anti-parallèles.

#### **B.2.2** Structure tertiaire

Jusqu'ici nous avons considéré les protéines sous forme mono- ou bi-dimensionnelle, mais elles n'acquièrent toutes leurs propriétés que lorsqu'elles se trouvent sous forme 3D, c'est-àdire lorsqu'elles sont repliées. On considère que cette étape a lieu spontanément (ou parfois à l'aide de protéines dites chaperonnes) dans les conditions physiologiques, cela implique que la structure primaire d'une protéine dicte sa structure 3D. Ce mécanisme est encore aujourd'hui mal compris, mais on sait que le repliement est sous la dépendance des forces hydrophobes, ce qui permet la formation d'un coeur hydrophobe au centre de la protéine tout en exposant les acides aminés plus hydrophiles en surface.

Les structures ainsi formées sont appelées des domaines lorsqu'elles peuvent maintenir leur architecture indépendamment des autres domaines auxquels elles sont liées. Les protéines peuvent aussi bien contenir un seul domaine que de nombreux domaines de structure et de fonctions différentes. Cette nature modulaire des protéines les rend flexible du point de vue de l'évolution.

Généralement, les protéines s'assemblent en complexes de quelques protéines à plusieurs dizaines de protéines pour effectuer les processus cellulaires, et sont alors appelées des machines moléculaires (transcription de l'ADN, cellulosomes, capsides virales, etc.).

## B.3 Les enzymes

La variété considérable des réactions biochimiques qui constituent la vie sont sous la dépendance de catalyseurs biologiques appelés enzymes, qui sont en fait des protéines possédant une activité catalytique. Elles diffèrent des catalyseurs chimiques classiques sur plusieurs points importants :

- vitesse de réaction généralement plus grande ;
- conditions de réaction plus douces de température et de pH ;
- spécificité de substrat très élevée et fiabilité de la réaction ;
- possibilité de régulation.

Les enzymes se lient à leur substrat grâce à des interactions électrostatiques et une complémentarité géométrique, ce qui leur permet d'avoir une spécificité absolue, aussi bien pour se lier au substrat que pour catalyser la réaction. La spécificité varie selon les enzymes, certaines étant très spécifiques et d'autres plus versatiles.

L'enzymologie étudie l'action des enzymes, mais ce n'est que récemment que les avancées ont été les plus importantes, avec la première séquence en acides aminés de la ribonucléase A de pancréas bovin en 1963 (Smyth *et al.*, 1963) et la structure obtenue par rayons X du lysozyme du blanc d'oeuf de poule en 1965 (Blake *et al.*, 1965). Actuellement, plusieurs milliers d'enzymes ont été purifiées et caractérisées, mais ces protéines ne représentent finalement qu'une faible proportion de toutes celles qui existent dans la Nature. A titre de comparaison, le génome humain contiendrait environ 25000 gènes, codant pour un nombre encore plus important de protéines (le protéome), alors que la plus grande base de données actuelle rassemblant les structures des protéines issus de tous organismes vivants ne contient que 27000 structures de protéines...

### **B.4** Relation structure/fonction

Avec le développement de la génomique, qui consiste à isoler un gène puis à exprimer une protéine, on dispose de très nombreuses séquences primaires, sans pour autant posséder des informations sur la structure et la fonction de la protéine. Il est donc primordial d'essayer de prédire tout d'abord la structure secondaire ou tertiaire à partir de la séquence, c'est-à-dire connaître le mode de repliement de la protéine, et dans un deuxième temps de tenter d'en déduire sa fonction. Celle-ci est intimement liée à la structure et se définit à trois niveaux : moléculaire (interactions protéine/ligand), cellulaire (rôle dans la cellule) et phénotypique (influence sur un organisme entier) (Moult & Melamud, 2000).

L'ambiguïté réside justement dans la complexité de l'attribution d'une fonction à une structure. Hegyi & Gerstein, 1999 ont mené une étude large sur le génome levurien (qui semble représentatif de l'ensemble des génomes), et ont calculé qu'il existe 1,8 fonction par repliement et 2,5 repliements par fonction en moyenne. Cette dernière valeur tendrait à



Figure 5 – Représentation schématique du système de classification de la base de données structurale des protéines SCOP.

montrer que la nature a tendance à réinventer une fonction (évolution convergente) plutôt qu'à en modifier une existante (évolution divergente).

Cette étude s'accorde aussi avec celles d'Orengo (Orengo *et al.*, 1994 ; Orengo *et al.*, 1999) pour distinguer 10 super-repliements, parmi les dizaines existants, qui sont associés à deux fonctions ou plus. La distribution des repliements n'est donc pas uniforme, ce qui rend l'assignation d'une fonction à une structure délicate par la simple comparaison de son repliement à celui d'autres enzymes d'une bibliothèque dont les fonctions sont connues, sans risque de mauvaise attribution.

Pour résoudre ce problème, il est nécessaire de relier des informations structurales à d'autres, d'ordre biochimique, métabolique, etc. dans des bases de données intégratives, qui servent aussi bien en prospective qu'en rétrospective (Gerstein, 2000), afin d'affiner l'attribution.

De plus, il est préférable de travailler avec des structures 3D lorsqu'elles sont disponibles car elles permettent de mettre en relation deux protéines dont les séquences ne sont pas apparentées. D'où la pertinence des bases de données qui cataloguent les protéines en fonction de leurs homologies de repliements, comme SCOP<sup>2</sup> (*Structural Classification of Proteins*, Murzin *et al.*, 1995) (**Figure 5**), qui inclut toutes les structures de protéines obtenues par cristallographie des rayons X ou RMN contenues dans la PDB<sup>3</sup> (*Protein Data Bank*, Berman *et al.*, 2000, contenant plus de 27000 structures de protéines), même si les critères de sélection sont parfois subjectifs.

La conservation des propriétés électrostatiques au sein des familles et super-familles d'enzymes se révèle être un outil intéressant pour la prédiction de la fonction. En effet, les propriétés catalytiques d'une enzyme sont issues de son caractère électrostatique, qui joue un rôle vital dans l'établissement des forces inter- et intra-moléculaires, mais aussi dans la médiation de la formation du complexe enzyme/substrat et dans le site actif des enzymes. Des travaux ont démontré que la conservation des propriétés électrostatiques clés des enzymes permet le maintien de la fonction (Livesay *et al.*, 2003). Alors que les séquences primaires ont tendance à diverger au cours de l'évolution, les propriétés électrostatiques de surface des enzymes sont conservées.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> www.rcsb.org/pdb

À terme, l'amélioration de la compréhension de la relation structure/fonction doit permettre l'ingénierie de nouvelles enzymes, employées dans les industries agro-alimentaires ou non alimentaires et des applications en médecine (recherche de nouvelles cibles, d'inhibiteurs, *drug-design*) (Thornton *et al.*, 2000).

C'est dans ce cadre de travail que le paradigme structure/fonction prend tout son sens, une partie de notre étude visera à rechercher les résidus conservés ou non dans l'espace et dont la structure, les propriétés électrostatiques et la topographie s'avèrent être des éléments de la signature fonctionnelle. Cette relation sera étudiée chez deux glycoside-hydrolases (GH), une xylanase et une arabinofuranosidase.

## B.5 Les glycoside-hydrolases

### **B.5.1** Classifications

Alors que le nombre d'enzymes isolées et caractérisées augmentait fortement vers la fin des années 1950, il n'existait aucune classification reconnue, les découvreurs des enzymes attribuant eux-mêmes sans aucun consensus ni logique un nom à leur protéine. La communauté des biochimistes, dans son désir de tout classer et cataloguer, et surtout de mettre un peu d'ordre dans ses affaires, décida en 1955 de créer une Commission Internationale sur les Enzymes, en accord avec l'IUPAC<sup>4</sup>. Malgré les difficultés inhérentes à la création d'une telle classification, comme le souci de ne pas bouleverser les habitudes bien ancrées des scientifiques, un consensus fut établi après six années de travail et la première classification systématiques des enzymes vit le jour en 1961. Aujourd'hui, c'est la Commission sur la Nomenclature des Enzymes, sous l'égide commun de l'IUPAC et de l'IUBMB<sup>5</sup> qui continue de publier des révisions comprenant des ajouts, modifications ou suppressions d'enzymes de la classification.

Comme nous l'avons vu, une enzyme peut-être décrite simplement selon différents caractères biochimiques : sa structure primaire (la séquence), sa structure tertiaire (le repliement), son mécanisme d'action (création, destruction de liaisons, etc...) et le type de substrat qu'elle dégrade. Or, les caractéristiques structurales étaient peu ou pas disponibles il y a de cela un demi-siècle, seul le type de substrat attaqué était connu, ainsi que le type de réaction catalysée. Il fut alors décidé que la classification des enzymes créée par l'IUBMB serait

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> International Union of Pure and Applied Chemistry – www.chem.qmul.ac.uk/iupac

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> International Union of Biochemistry and Molecular Biology – www.iubmb.unibe.ch



**Figure 6 – Relation entre le mécanisme d'attaque des glycoside-hydrolases (***endo ou exo***) et la topologie du site actif (crevasse ou poche)**. Le site de coupure est indiqué par la flèche rouge, les monosaccharides par des cercles bleus et l'extrémité réductrice est en noir. Les structures représentées sont celles de la xylanase GH–11 de *Thermobacillus xylanilyticus* et de l'arabinofuranosidase GH–51 de *Geobacillus stearothermophilus* (le site actif est indiqué en rouge).

fonction du type de réaction catalysée et de la nature du substrat. Il existe donc six classes d'enzymes (de 1 à 6) correspondant à six grandes fonctions :

| 1 – Oxydo-réductases | 3 – Hydrolases | 5 – Isomérases |
|----------------------|----------------|----------------|
| 2 – Transférases     | 4 – Lyases     | 6 – Ligases    |

Chaque numéro de classe est suivi d'une sous-classe, d'une sous-sous-classe et d'un numéro de série attribuée aux enzymes, chaque enzyme étant codée sur quatre nombres. Par exemple, dans la classe 3 des hydrolases, on rencontre des enzymes qui clivent les liaisons esters (3.1.x.x), glycosidiques (3.2.x.x) etc. Chez ces glycosidases, certaines agissent sur les liaisons O-glycosidiques (3.2.1.x) et enfin parmi celles-ci se trouvent les  $\alpha$ -amylases (3.2.1.1), les cellulases (3.2.1.4), les xylanases (3.2.1.8), etc.

Malheureusement, cette classification ne tient pas compte de la structure des enzymes, et du fait de la complexité d'association d'une structure à une fonction et vice-versa, son intérêt est limité dans l'exploration des relations structure/fonction, mais elle garde tout de même par son côté précurseur et exhaustif un grand intérêt.

Avec l'avènement des séquences et des structures des enzymes ainsi que l'élucidation de leurs mécanismes catalytiques, d'autres modes de classification ont vu le jour. L'un est basé sur la stéréochimie de la réaction enzymatique, plus précisément celle de la liaison glycosydique avant et après la réaction, avec la nomenclature axiale (*a*) ou équatoriale (*e*), ce qui a donné naissance à quatre familles de réactions :  $a \rightarrow e$ ,  $a \rightarrow a$ ,  $e \rightarrow a$  et  $e \rightarrow e$  (Sinnott, 1990).

En considérant la réaction catalytique dans son ensemble, les GH peuvent dégrader leur substrat selon deux mécanismes : une attaque au milieu de la chaîne polysaccharidique (mécanisme *endo*), avec la variante où la chaîne reste fixée (mécanisme *endo*-processif), et une attaque en bout de chaîne (mécanisme *exo*). Même si l'attribution d'un mécanisme n'est pas exclusive, certaines enzymes pouvant posséder les mécanismes *endo* et *exo* en fonction du substrat disponible (**Figure 6**), cette classification renseigne sur la topographie du site actif. En effet, les GH de mécanisme *exo* présentent une « poche » où est situé l'appareillage catalytique, les interactions avec le substrat étant très localisées sur le(s) résidu(s) dont la liaison glycosidique sera clivée. Par opposition, les GH de mécanisme *endo* offrent au substrat une crevasse de dimensions certes variées mais qui permet d'arrimer plusieurs résidus. Cette

| Clan | Repliement                    | Familles du clan                                   |
|------|-------------------------------|--|
| GH-A | $(\beta/\alpha)_8$            | 1 2 5 10 17 26 30 35 39 42 50 51<br>53 59 72 79 86 |
| GH-B | β–jelly-roll                  | 7 16   |
| GH-C | β–jelly-roll                  | 11 12  |
| GH-D | $(\beta/\alpha)_8$            | 27 36  |
| GH-E | β– <i>propeller</i> à 6 pales | 33 34 83   |
| GH-F | β– <i>propeller</i> à 5 pales | 43 62  |
| GH-G | inconnu                       | 37 63  |
| GH-H | $(\beta/\alpha)_8$            | 13 70 77   |
| GH-I | α+β                           | 24 46 80   |
| GH-J | β– <i>propeller</i> à 5 pales | 32 68  |
| GH-K | $(\beta/\alpha)_8$            | 18 20  |
| GH-L | $(\alpha/\alpha)_6$           | 15 65  |
| GH-M | $(\alpha/\alpha)_6$           | 8 48   |
| GH-N | hélice β                      | 28 49  |

Tableau 2 – Clans des glycoside-hydrolases.

crevasse est même refermée parfois chez les GH possédant un mécanisme *endo*-processif pour former une espèce de tunnel, qui oblige le substrat à parcourir la crevasse.

C'est pour cette raison qu'un nouveau mode de classification des enzymes qui agissent sur les substrats glycosidiques a été développé (Jespersen *et al.*, 1991 ; Henrissat, 1991 ; Henrissat & Bairoch, 1993) sur la base de la similarité des séquences primaires et de l'homologie de structure (base de données  $CAZy^6$ ). A l'heure actuelle, 98 familles sont représentées, dont environ un tiers comportent des enzymes poly-spécifiques. L'intérêt de cette base de données est de pouvoir relier entre elles des enzymes de même structure mais d'activités différentes ou bien de même activité mais de structures différentes, ainsi que de faciliter la prédiction de structure connaissant uniquement la séquence, mettant en évidence les phénomènes d'évolutions convergentes ou divergentes ainsi que la présence de motifs structuraux préférentiels. Lorsque des familles partagent le même repliement, elles sont regroupées en clans, on en dénombre treize à l'heure actuelle (**Tableau 2**).

Enfin, il existe une classification uniquement fonction de la structure des protéines, pas seulement des enzymes, appelée SCOP (*Structural Classification Of Proteins*) (Murzin *et al.*, 1995). Son principe est semblable à celui de la taxonomie des espèces, i.e. un ordonnancement à partir de critères communs de plus en plus précis, les protéines sont rangées en classes, repliements, super-familles, familles pour arriver au domaine protéique (**Figure 5**; SCOP rassemble 2630 familles à partir de 24037 structures dans sa version 1.67 de mai 2004). Ce système permet de regrouper des protéines dont les séquences présentent peu d'homologie mais dont les structures sont proches. L'essor de ces bases de données a été rendu possible grâce aux milliers de structures de protéines disponibles en accès libre dans la *Protein Data Bank*, qui compte aujourd'hui plus de 30000 structures dont 27000 de protéines.

Etant donnée la variété des enzymes et de leurs caractéristiques, aucune base de données ne pourra jamais prétendre être idéale, c'est de la complémentarité de ces classifications qu'on peut obtenir par recoupement de nouvelles informations sur le paradigme structure/fonction des enzymes. L'essor du *data mining* scientifique est générateur de nombreuses informations dont il est important de connaître l'origine pour conserver une certaine objectivité et un sens critique aiguë.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/



Figure 7 – Mécanisme catalytique des glycoside-hydrolases par rétention de configuration (exemple d'une xylanase).

### **B.5.2** Mécanisme catalytique

En préambule, il est intéressant de montrer comment le terme « catalyse » prend tout son sens dans les réactions enzymatiques. Chez les glycoside-hydrolases en effet, le taux d'hydrolyse d'une liaison glycosidique est multiplié par un facteur de l'ordre de  $10^{17}$  par rapport à une hydrolyse spontanée, mettant en évidence non seulement la grande stabilité de la liaison mais surtout l'exceptionnelle précision et efficacité du mécanisme enzymatique (Wolfenden *et al.*, 1998).

Le mécanisme de la catalyse des glycoside-hydrolases fut proposé initialement par Koshland (Koshland, 1953) : il s'agit d'une substitution nucléophile d'ordre 2 avec rétention ou inversion de la configuration anomérique ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), mettant en jeu deux résidus acides carboxyliques, l'un jouant successivement le rôle d'un acide puis d'une base, et appelé résidu acide/base A/B, l'autre étant résidu nucléophile Nuc (Sinnott, 1990 ; McCarter & Withers, 1994). On retrouve généralement dans ces dyades catalytiques A/B-Nuc les combinaisons de résidus suivantes : Asp/Glu (amylases de la famille 13), Glu-Glu (xylanases de la famille 11) et plus rarement Asp-Asp (famille 6), jamais Glu-Asp. Afin d'expliciter ce mécanisme catalytique, nous allons prendre l'exemple d'une xylanase agissant par rétention de configuration lors de la coupure d'une liaison xylosidique  $\beta$ –(1,4) (**Figure 7**).

Lorsque le substrat se fixe à l'enzyme, A/B, jouant alors le rôle d'un acide, libère un proton qui se fixe sur l'oxygène glycosidique. L'attaque nucléophile par Nuc provoque la rupture de la liaison C1–O et la formation d'un état de transition oxo-carbonium (ET 1), caractérisé par l'existence d'une double liaison partielle entre C1 et O5, lequel porte une charge positive délocalisée, ce qui induit la planéité des atomes C1, C2, C5 et O5. Ce cycle adopterait alors une conformation en demi-chaise.

Ensuite, cet oxo-carbonium est  $\alpha$ -glycosylé par Nuc, créant ainsi un état intermédiaire EI stable. Un nouvel accepteur R–OH, activé par A/B (en tant que base) qui récupère le proton de l'hydroxyle en C4, peut alors attaquer l'EI au niveau du carbone anomérique. Via un nouvel état de transition oxo-carbonium (ET 2), on obtient un produit de configuration identique à celle de départ, tout en conservant bien sûr les résidus catalytiques dans leur état de protonation initial.

Chez les GH possédant un mécanisme de rétention de configuration, la distance séparant les groupements carboxyliques de A/B et Nuc est de l'ordre de 5,5 Å. Cette distance est de 9,0 Å

chez les enzymes ayant un mécanisme d'inversion de configuration, ce qui permet l'arrivée d'une molécule d'eau simultanée à la formation de l'ET 1, d'où la possibilité d'une attaque directe, sans passer par un deuxième ET (McCarter & Withers, 1994). Les différences de stéréochimie du mécanisme catalytique des GH sont donc essentiellement dues à des différences structurales.

On constate qu'à partir de l'ET 2, une transglycosylation ou une hydrolyse peuvent se produire, quand respectivement R = sucre ou R = H. En fait, une hydrolyse correspond à une transglycosylation où l'accepteur est une molécule d'eau. Nous verrons par la suite que de nombreuses enzymes peuvent réaliser une hydrolyse ou une transglycosylation, le ratio du taux de ces réactions étant contrôlé par des considérations cinétiques et thermodynamiques.

## **B.6** Interactions enzyme/substrat

Les polysaccharides sont des biomolécules qui jouent un rôle primordial dans le fonctionnement des organismes vivants. Outre le fait qu'ils constituent la principale source d'énergie des animaux (hémicelluloses, cellulose ou amidon dégradés en monosaccharides qui servent ensuite à former de l'ATP), ils participent aux phénomènes de reconnaissance (transport, dégradation, signal antigénique) avec les protéines et notamment les enzymes (Vyas, 1991).

En effet, l'arrimage d'un polysaccharide sur une enzyme en vue de la catalyse s'effectue grâce à une complémentarité à la fois stéréospécifique et électronique de la surface de la protéine. Celle-ci peut comporter une ou plusieurs crevasses, susceptibles d'accueillir des ligands. Dans 84% des cas, ils se fixent dans la crevasse la plus large, ce qui est en accord avec le fait qu'une grande crevasse permet de maximiser les interactions et de positionner le ligand précisément pour la catalyse, et aussi de le protéger des molécules d'eau (Laskowski *et al.*, 1996).

D'un point de vue énergétique, les liaisons hydrogène constituent le facteur essentiel de spécificité : leurs orientations et leurs énergies d'affinité aboutissent à la création d'un complexe transitoire capable de permettre le bon déroulement de la réaction enzymatique (Quiocho, 1986). Les forces de van der Waals jouent aussi un rôle non négligeable dans l'arrimage des molécules, tout comme les forces hydrophobes. Ces forces sont de même nature que celles qui imposent leur conformation aux protéines elles-mêmes.

#### **B.6.1** Liaisons hydrogène

Les liaisons hydrogène sont des interactions dipôles-dipôles orientées entre un donneur (atome d'hydrogène) et un accepteur (atome fortement électronégatif, soit O ou N dans les protéines). Trois modes de liaisons hydrogène existent dans les complexes enzyme/polysaccharide :

 mode coopératif, le plus commun : un groupement hydroxyle d'un sucre participe à la fois en tant que donneur (par son H) et en tant qu'accepteur (par son O) avec la protéine selon le schéma général suivant (Quiocho, 1986 ; Quiocho, 1989) :

$$\begin{array}{c} O \\ N \end{array} - H_p \longrightarrow O - H_s \longrightarrow O_p$$

(p indique l'appartenance à la protéine et s au sucre)

- mode bidenté : deux hydroxyles vicinaux interagissent avec deux atomes appartenant au même plan (fonction carboxylique de Asp et Glu) (Quiocho, 1986);
- réseau : il résulte des deux modes de liaison précédents et forme un réseau plus étendu et plus élaboré (Quiocho, 1986).

Ces liaisons, prises individuellement, demeurent relativement fortes, soit de l'ordre de -10 à  $-30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , pour une longueur de 2,7 à 3,2 Å. C'est leur nombre élevé et surtout la participation de presque tous les hydroxyles des sucres à la création du réseau qui confèrent la forte affinité stéréospécifique et géométrique du substrat pour l'enzyme. En outre, cette énergie n'est pas suffisamment élevée pour empêcher le relargage des produits de la réaction.

#### **B.6.2** Forces de van der Waals

Les autres interactions favorisant la formation du complexe enzyme/substrat sont les forces de van der Waals. Ce sont des interactions plus faibles que les liaisons hydrogène, de l'ordre de quelques  $kJ \cdot mol^{-1}$  et elles ne sont pas orientées. Elles se créent entre deux dipôles permanents, ou un dipôle induit et un dipôle permanent séparés par la distance *d*. En fait, c'est la résultante de la somme des potentiels électrostatiques d'attraction  $\propto -d^{-6}$  et de répulsion  $\propto d^{-10}$ . Le potentiel global atteint donc un minimum pour une valeur *d* donnée, égale à la somme des rayons de van der Waals des atomes interagissant. Donc les forces de van der Waals fournissent une part importante de l'énergie nécessaire à l'établissement d'interactions stériquement complémentaires entre les protéines et les sucres, surtout lorsque ceux-ci sont en contact.



**Figure 8 – Nomenclature des sous-sites d'arrimage chez les glycoside-hydrolases** (d'après Davies *et al.*, 1997). Les cercles symbolisent les cycles des monosaccharides et les demicercles les sous-sites d'arrimage. La flèche entre les sous-sites (-1) et (+1) indique la zone de coupure.

Un autre phénomène qui participe à l'orientation du substrat est le *stacking* (empilement ou sandwich). C'est l'ensemble des forces mises en jeu (van der Waals et hydrophobes) dans l'interaction entre la partie aromatique d'un résidu d'une protéine (F, W ou Y) et un résidu pyranose ou furanose d'un sucre, dont les plans moyens sont disposés parallèlement. Étant donné l'encombrement de ces cycles aromatiques par rapport à une chaîne latérale aliphatique, ceux-ci orientent souvent le substrat soit pour un pré-arrimage, soit vers le site catalytique, à la manière d'un point d'ancrage.

Ces différentes interactions faibles, orientées ou non, tendent finalement à diminuer l'entropie du complexe en amenant les molécules d'eau au voisinage des groupes polaires et en rassemblant les groupes apolaires, ce qui confère un gain de stabilité au complexe, rendant son existence et la catalyse possibles.

### B.6.3 Théorie des sous-sites d'arrimage

L'étude des mécanismes catalytiques effectuée en enzymologie par l'analyse de la corrélation entre les paramètres cinétiques et la distribution des différents produits obtenus (Hiromi *et al.*, 1973 ; Suganuma *et al.*, 1978 ; Thoma *et al.*, 1971) a permis de définir la théorie des soussites d'arrimage, qui identifie des parties précises et contiguës de l'enzyme qui se lient de manière spécifique au substrat (Suganuma *et al.*, 1978 ; Suganuma *et al.*, 1978 ; Suganuma *et al.*, 1996) et qui sont constituées par un ensemble de résidus.

L'affinité d'un sous-site est supposée indépendante de celle de son voisin et représente l'énergie d'interaction entre celui-ci et le substrat (liaisons hydrogène, forces de van der Waals, interactions électrostatiques). Il est largement admis que les différences observées dans les modes d'action des glycosyl-transférases sont attribuables à la variabilité des soussites (nombre, localisation, affinité).

En ce qui concerne le substrat, on utilise une nomenclature largement employée en enzymologie et affinée par Davies *et al.*, 1997. Elle consiste, en partant de la liaison glycosidique qui subit le clivage, à nommer les sous-sites (+1), (+2), etc. vers le côté réducteur (R) et (-1), (-2), etc. vers le côté non réducteur (NR). Ainsi, les sous-sites (-1) et (+1) se trouvent de part et d'autre de la coupure ; cette convention est applicable à toutes les hydrolases (**Figure 8**).

En ce qui concerne le type d'attaque des enzymes, on distingue l'attaque en *endo*, qui a lieu n'importe où sur la chaîne glycosidique et l'attaque en *exo* qui débute par l'extrémité NR.



Figure 9 – Structure hypothétique d'un hétéroxylane avec ses différents substituants et sites d'attaque des hémicellulases.  $\alpha$ -Glu :  $\alpha$ -D-glucuronidase.\*Si R est H, l'estérase est une *p*-coumaroyl-estérase, si R est OMe, c'est une féruloyl-estérase.

# B.7 Les hémi-cellulases

Sous le terme hémi-cellulases sont rangées les enzymes qui dégradent les hémicelluloses, qui rassemblent tous les éléments pariétaux sauf la cellulose est la lignine. En raison de la nature complexe des hémicelluloses, les micro-organismes ont recours à un véritable « arsenal » enzymatique qui leur permet de parvenir à une dégradation quasi-complète. On distingue généralement les enzymes qui s'attaquent au squelette de xylane (les xylanases) et celles qui sont dites débranchantes, dont le rôle est d'hydrolyser les ramifications présentes sur la chaîne principale (arabinofuranosidases, glucuronidases, etc.) (**Figure 9**).

# C Les endoxylanases

# C.1 Présentation

Les endo- $\beta$ -1,4-xylanases (nom systématique : 1,4- $\beta$ -D-xylane xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) sont les enzymes qui hydrolysent les liaisons  $\beta$ -(1,4) entre deux résidus  $\beta$ -D-xylopyranoses. Il en est fait mention pour la première fois en 1953 même si l'hydrolyse du xylane par des micro-organismes est connue depuis la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. La première préparation enzymatique d'une xylanase et sa purification partielle à partir du mycélium d'*Aspergillus foetidus* date d'un demi siècle seulement (Whistler & Masak, 1955). Il est fait mention de « xylo-dextrinases », qui deviendront quelques années plus tard des « pentosanases » isolées de bactéries du rumen d'animaux d'élevage (Howard *et al.*, 1960). Par la suite, de nombreuses xylanases d'origine bactérienne, fongique, ou même levurienne et végétale sont isolées, purifiées, caractérisées. Avec l'avènement du génie génétique dans les années 1980 et l'invention de la PCR par K. Mullis en 1986 sont apparues les premières xylanases recombinantes, mais il faut attendre 1994, année faste s'il en est, pour que soient publiées les premières structures de xylanases, au nombre de quatre (Derewenda *et al.*, 1994 ; Harris *et al.*, 1994 ; Törrönen *et al.*, 1994 ; White *et al.*, 1994).

# C.2 Multiplicité des endoxylanases

En plus de produire tout un panel d'enzymes qui dégradent les hétéroxylanes, la plupart des micro-organismes produit plusieurs xylanases, libérées à l'extérieur de la cellule, l'encombrement du substrat empêchant sa pénétration dans la cellule. Lors de la croissance de ces micro-organismes, la production des enzymes est induite par la présence de xylane dans le milieu mais réprimée fortement si des substrats facilement métabolisables comme le xylose ou le glucose sont présents (Biely, 1985). Il est admis que la production de xylanases est probablement induite par les seuls produits d'hydrolyse pouvant pénétrer la cellule, i.e. des



**Figure 10 – Structure des xylanases de la famille 11** (exemple de *Thermobacillus xylanilyticus*). Les brins  $\beta$  du feuillet A sont indiqués en jaune, ceux du feuillet B en bleu, l'hélice en rouge et les boucles en vert. **A** : vue dans le prolongement de la crevasse catalytique ; **B** : rotation de 90° par rapport à l'axe x.

xylo-oligomères comme le xylose ou le xylobiose (Biely, 1985) qui sont transportés dans la cellule où des des xylosidases et des xylanases internes achèvent leur dégradation. Les fungi sont les meilleurs producteurs de xylanase par rapport aux bactéries ; le niveau atteint 3350 UI/mL chez une souche de *Trichoderma reesei* immobilisée (Haapala *et al.*, 1994) et jusqu'à 22700 UI/mL en fermentation solide chez *Schizophyllum commune* (Haltrich *et al.*, 1992).

La diversité des xylanases se situe à plusieurs niveaux : biochimique (optima de température et de pH), structurale (différentes architectures de base, présence ou absence de domaines) et catalytique (spécificité de substrat, taux de catalyse). Par exemple *Sporotrichum dimorphosporum* secrèterait 16 formes de xylanases différentes (Comtat, 1983) et *Aspergillus niger* au moins 15 (Biely *et al.*, 1985a). Mis à part les artefacts expérimentaux (lors d'observation de la taille des protéines par SDS-PAGE les xylanases peuvent s'agréger et faire croire à l'existence de nouvelles enzymes (Wong *et al.*, 1988)), cette diversité résulterait de plusieurs facteurs : redondances génétiques (Wong *et al.*, 1988), maturation post-transcriptionnelle de l'ARNm (Biely, 1985), et/ou maturation post-traductionnelle du fait de la glycosylation des xylanases, de la présence d'un peptide signal et de leur protéolyse partielle (Wong *et al.*, 1988).

Cette stratégie de diversité répond probablement à l'hétérogénéité d'accessibilité des liaisons xylosidiques qui en plus évoluent au cours de la croissance des plantes, chaque enzyme produite correspondant à un substrat de structure donnée dans le temps.

# C.3 Classification

Face à l'héterogénéité et la complexité des xylanes, les micro-organismes qui les dégradent ont répondu par une abondante diversité des xylanases. Cette variété au niveau des séquences, des structures et des spécificités de substrat a montré les limites de la classification des enzymes basée uniquement sur le substrat. Une nouvelle classification des xylanases sur leurs propriétés physico-chimiques a alors été introduite (Wong *et al.*, 1988). D'un côté les xylanases de masse moléculaire élevée (> 30 kDa) et de pI acide, de l'autre celles de faible masse moléculaire (< 30 kDa) et de pI basique. Mais ce système présentant lui aussi des exceptions, c'est la classification basée sur la comparaison de séquences des domaines catalytiques uniquement qui est aujourd'hui employée et accessible dans la base de données CAZy (Henrissat, 1991 ; Henrissat & Davies, 1997).



**Figure 11 – Topologie des xylanases de la famille 11**. Les brins  $\beta$  sont symbolisés par des flèches nommées A ou B et l'hélice par un cylindre H. Le brin B1 n'est pas présent chez toutes les xylanases.

D'après cette classification, les enzymes possédant une activité xylanolytique  $\beta$ –(1,4), c'est-àdire avec la nomenclature EC 3.2.1.8, appartiennent aux familles 5, 8, 10, 11, 16, 26, 43 et 62. Les « vraies » endo– $\beta$ –1,4–xylanases et les plus étudiées se trouvent dans les familles 10 (anciennement famille F) et 11 (anciennement famille G). Par contre, les familles 16 et 62 contiennent en réalité des enzymes bifonctionnelles avec deux domaines catalytiques distincts (respectivement Flint *et al.*, 1993, et Hernandez *et al.*, 2001). Quant à la famille 26, il s'agit de  $\beta$ –1,3–xylanases. Finalement, les endo– $\beta$ –1,4-xylanases avec un seul domaine catalytique se limitent aux familles 5, 8, 10, 11 et 43.

Nous allons à présent examiner en détails la famille 11 (Xyl–11), avec en particulier la xylanase issue de *Thermobacillus xylanilyticus* qui sera en partie l'objet de cette étude, puis la famille 10 (Xyl–10) et enfin nous ferons une description plus rapide des autres familles 5, 8 et 43.

### C.4 Famille 11

#### C.4.1 Etude structurale

### C.4.1.1 Structure et topographie du domaine catalytique

La première description structurale d'une xylanase de la famille 11 (Xyl–11) fut celle provenant de *Bacillus pumilus* (Ko *et al.*, 1992 ; Arase *et al.*, 1993) mais l'analyse de la structure présentée a été succincte et les données structurales n'ont jamais été déposées dans le domaine publique. Les premières structures accessibles furent celles de *Trichoderma harzianum* (Campbell *et al.*, 1993) et *Bacillus circulans* (Campbell *et al.*, 1993 ; Wakarchuk *et al.*, 1994a). La structure du domaine catalytique observé est celle d'un  $\beta$ –*jelly-roll*, où deux feuillets  $\beta$  (c'est-à-dire un ensemble de plusieurs brins  $\beta$ ) antiparallèles nommés A et B se faisant face forment une crevasse catalytique étroite et profonde. De nombreuses liaisons hydrogène existent entre les brins  $\beta$  qui constituent ces feuillets. Les brins  $\beta$  du feuillet B présentent une forte torsion, de telle sorte que le feuillet B, au lieu d'être plan, est replié partiellement sur lui-même, formant un angle d'environ 90°. Une hélice  $\alpha$  qui vient se plaquer contre le feuillet B complète cette architecture (**Figures 10 et 11**).

Le repliement  $\beta$ -*jelly-roll* a été identifié pour la première fois dans la lectine (Richardson, 1981), il s'agit d'un super-repliement car sa structure apparaît beaucoup mieux conservée que sa séquence, et il possède des fonctions très variées. Des relations d'évolution entre toutes les structures existantes doivent exister mais malgré des recherches poussées, elles n'ont pas été

| Organisme                                       | Code PDB <sup>a</sup>  | Résidus<br>catalytiques<br>Nuc, A/B | Distance<br>resserrement<br>(Å) <sup>b</sup> | Variations des<br>éléments de structure<br>secondaire | Distance<br>N-ter/C-ter (Å) <sup>c</sup>             | Présence d'un<br>pont<br>disulphure | Référence                    |
|---|--|-------------------------------------|--|---|--|-------------------------------------|------------------------------|
| Aspergillus kawachii F                          | 1BK1   | E79, E170                           | PY 3,8 / 4,7                                 | Absence de B1   | 5,9 (entre le 2 <sup>ème</sup> et le dernier résidu) | C92–C111<br>(corde–B8)              | Fushinobu et al., 1998       |
| Aspergillus niger 🖬                             | 1T6G, <b>1UKR</b>  | E79, E170                           | PY 4,3 / 5,0                                 | Absence de B1   | 9,1 (3 <sup>ème</sup> et dernier)                    | C92–C111<br>(corde–B8)              | Krengel et al., 1996         |
| Bacillus agaradhaerens<br>AC13 <b>B</b>         | 1H4G, 1H4H, 1QH6,<br><b>1QH7</b>                                   | E94, E184                           | PW 4,2                                       | Feuillet A4 plus long suivi d'une boucle              | 20,8 (2 <sup>ème</sup> et dernier)                   | _                                   | Sabini et al., 2002          |
| Bacillus circulans B                            | 1BCX, 1BVV, 1C5H,<br>1C5I, 1HV0, 1HV1,<br><b>1XNB</b> , 1XNC, 2BVV | E78, E172                           | PW 4,4                                       | Absence de B1   | 4,9  | _                                   | Wakarchuk et al., 1994       |
| Bacillus subtilis B230 B                        | 1IGO   | E94, E183                           | PW 5,8                                       | Feuillet A4 plus long suivi d'une boucle              | 18   | _                                   | Oakley <i>et al.</i> , 2003  |
| Bacillus subtilis subsp.<br>subtilis str. 168 🖪 | 1AXK   | E78, E172                           | PW 4,6                                       |   |  | _                                   | Aÿ et al., 1998              |
| Chaetomium thermophilum                         | 1H1A   | E87, E178                           | PW 4,2                                       |   | 19   | _                                   | Hakulainen et al., 2003      |
| Dictyoglomus<br>thermophilum <b>B</b>           | 1F5J   | E90, E180                           | PW 3,8                                       | Feuillet A4 plus long                                 | 37   | _                                   | McCarthy et al., 2000        |
| Nonomureaa flexuosa B                           | 1M4W   | E87, E176                           | PW 3,7                                       | Boucle après A4                                       | 28   | —                                   | Hakulainen et al., 2003      |
| Paecilomyces varioti<br>Bainier                 | 1PVX   | E86, E178                           | PW 6,2                                       | Boucle après A4 38                                    |  | C110–C154<br>(B9–hélice)            | Kumar <i>et al.</i> , 1999   |
| Penicilium funiculosum 🗖                        | 1TE1   | E85, E176                           | PW 6,2                                       |   | 21   |                                     | Payan <i>et al.</i> , 2004   |
| Streptomyces sp. S38 B                          | 1HIX   | E87, E177                           | PW 7,0                                       | PW 7,0 — 17,1 (4 <sup>ème</sup> et dernier résidu     |  |                                     | Wouters et al., 2001         |
| Thermobacillus<br>xylanilyticus B               | structure non déposée  | E76, E169                           | PW 6,7                                       | Absence de B1   | 5,2  | _                                   | Harris <i>et al.</i> , 1997  |
| Thermomyces lanuginosus                         | 1YNA   | E86, E178                           | PW 5,0                                       | Boucle après A4                                       | 35   | C110–C154<br>(B9–hélice)            | Gruber et al., 1998          |
| Trichoderma harzianum<br>(Hypocrea lixii) E58 🗗 | 1XND   | E86, E177                           | PW 5,2                                       | _   | 19   | —                                   | Campbell et al., 1993        |
| Trichoderma reesei<br>(Hypocrea jecorina) 1 🖪   | 1XYN   | E75, E164                           | PY 4,9 / 5,6                                 | Absence de B1   | 5,74   | _                                   | Törrönen & Rouvinen,<br>1995 |
| Trichoderma reesei<br>(Hypocrea jecorina) 2 🖪   | <b>1ENX</b> , 1RED, 1REE, 1REF, 1XYO, 1XYP                         | E86, E177                           | PW 7,2                                       |   | 21   | _                                   | Törrönen et al., 1994        |

**Tableau 3 – Caractéristiques structurales des Xyl–11 de structures connues.**  $\Box$ : organisme fongique ;  $\Box$ : organisme bactérien. <sup>a</sup> En gras le code PDB utilisé pour les mesures de distances. <sup>b</sup> Distance entre d'une part le C $\beta$  de la proline P114 conservée du pouce (*T. xylanilyticus*) et d'autre part soit le CZ2 du tryptophane W7 (distance PW), soit l'OH / le CZ de la tyrosine en position équivalente (distance PY). <sup>c</sup> Distance entre les C $\alpha$  des résidus N–ter et C–ter, sauf mention contraire.

révélées avec les méthodes de comparaison de séquences actuelles (Williams & Westhead, 2002).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que chez les Xyl–11, plus de 55% des résidus appartiennent à des feuillets  $\beta$ , environ 6% à l'hélice  $\alpha$ , donc étant donné le nombre important de ces structures secondaires (e.g. 14 brins  $\beta$  et 1 hélice  $\alpha$  chez la Xyl–11 de *T. reesei* Törrönen *et al.*, 1994), les boucles joignant ces éléments sont relativement courtes (aux alentours de 5 résidus). Néanmoins, les boucles reliant d'une part les brins B6 et B9 et d'autre part B8 et B7 ne comportent pas loin de 10 résidus pour la première et environ 12 pour la deuxième. La topographie de cet ensemble a inspiré la comparaison avec une main droite partiellement recroquevillée sur elle-même (Törrönen *et al.*, 1994) (**Figure 10**) où les feuillets  $\beta$  A et B constituent les « doigts », une partie du feuillet B la « paume », la longue boucle entre les brins B8 et B7 est assimilée au « pouce » et enfin la boucle B6–B9 est appelée une corde, elle forme la base de la crevasse à une de ses extrémités.

Parmi les 16 structures de Xyl-11 connues déposées dans la PDB (**Tableau 3**, neuf structures proviennent de microorganismes fongiques et huit autres de bactéries), le niveau d'homologie structurale est très élevé (**Figure 12**). Ainsi, au niveau des structures secondaires, la seule variation notable est la présence ou l'absence du brin B1 à l'extrémité N-ter, ainsi que la prolongation du brin A4 en C-ter par une courte boucle. Du fait de la prédominance des éléments de structures secondaires dans cette famille, la variabilité des boucles (au niveau du squelette en tout cas) est très limitée. Le pouce possède toujours le même nombre de résidus (sauf chez *Bacillus circulans* (Wakarchuk *et al.*, 1994a) où un résidu de plus est intercalé), seule la corde apparaît plus variable, mais de part son éloignement du site actif il est peu probable qu'elle ait un quelconque rôle fonctionnel. Il est donc important de noter dès à présent que les différences de caractéristiques des Xyl-11 seront plus qualitatives que quantitatives, i.e. que dans une famille d'enzymes aussi homologues d'un point de vue structural, c'est surtout la variabilité des types et des interactions des résidus qui auront une implication sur les propriétés biochimiques et enzymatiques de l'enzyme.

En ce qui concerne la crevasse catalytique des Xyl–11, ses caractéristiques géométriques ont été mesurées en premier chez *Trichoderma reesei* (Törrönen *et al.*, 1994), elle apparaît assez étroite et profonde donc encaissée (~ 4 Å de largeur en moyenne pour ~ 9 Å de profondeur) pour une longueur assez faible de ~ 25 Å, ce qui est en accord avec le caractère *endo* des



Figure 12 – Superposition des Xyl–11 de structures connues (seuls les squelettes protéiques sont affichés). Les 16 structures ont été superposées sur la base des brins B5, B6 et B7 par rapport à la Xyl–11 de *Thermobacillus xylanilyticus*. A : vue de « face », dans le prolongement de la crevasse catalytique ; B : rotation de 90° par rapport à l'axe x.

Xyl-11 (**Figure 13**). Les résidus qui constituent les parois de la crevasse appartiennent d'une part aux brins B2, B3 et B4, et d'autre part essentiellement au brin B8 et au pouce. C'est d'ailleurs entre le résidu proline conservé du pouce (boucle B8–B7) et le résidu aromatique conservé (Trp ou Tyr) qui lui fait fasse sur B2 qu'on observe un net resserrement de la crevasse (en fonction de la représentation surfacique utilisée, la crevasse peut même sembler refermée à ce niveau). Si on mesure l'écart entre ces résidus (**Tableau 3**), la moyenne calculée est de 5,1 Å mais il peut varier du simple au double, soit de 3,7 à 7,5 Å. Même si ces changements peuvent paraître conséquents qualitativement, ils sont très locaux (de petites variations des positions des chaînes latérales provoquent de fortes variations) et ne sont qu'un instantané d'une structure qui « respire ».

En termes d'électrostatisme, la crevasse catalytique apparaît essentiellement tapissée de résidus aromatiques et de quelques résidus polaires, chargés ou non, avec en son centre la dyade catalytique (**Figure 14**). Les résidus composant cette crevasse sont rassemblés dans le **Tableau 4**; on constate que leur type et leur position sur la molécule sont presque parfaitement conservés chez les Xyl–11 dont la structure est connue. Sur 21 résidus identifiés, 10 sont aromatiques dont 9 sont toujours identiques. La conservation à la fois des types et des positions de ces résidus formant la crevasse signale une grande spécificité d'action de ces enzymes et représente un motif structuro/fonctionnel invariant.

Chez certaines xylanases dont la structure a été résolue, un unique pont disulfure est parfois présent : par exemple entre la corde et le brin B8 chez les xylanases d'*Aspergillus kawachii* et *Aspergillus niger* (Fushinobu *et al.*, 1998 ; Krengel & Dijkstra, 1996). Le résidu Cys de la corde appartient à une hélice  $\alpha$  très courte absente chez les autres xylanases, la liaison covalente qu'elle forme avec la Cys du brin B8 servirait à stabiliser la corde mais sa contribution à la thermostabilité semble limitée (du fait du caractère mésophile de ces enzymes). Et même si ces deux enzymes ont le point commun d'être acidophiles (optima de pH respectifs de 2,0 et 3,0) (Ito *et al.*, 1992 ; Krengel & Dijkstra, 1996), il apparaît que d'autres facteurs que ce pont disulfure seraient responsables de cette adaptation, notamment la présence d'une résidu Asp au lieu d'un résidu Asp au début du brin B3 (voir §C.4.3, p. 29).

D'autre part, on retrouve aussi un pont disulfure entre le brin B9 (côté C-ter) et l'hélice (côté N-ter) chez les Xyl-11 de *Paecilomyces varioti Bainier* et *Thermomyces lanuginosus* (Kumar *et al.*, 2000 ; Gruber *et al.*, 1998), alors que les autres xylanases possèdent une liaison hydrogène à cette position. Les xylanases de *P. varioti* et *T. lanuginosus* ont par ailleurs la



Figure 13 – Représentation de la surface des xylanases de la famille 11 (exemple de *Thermobacillus xylanilyticus*). A : vue dans le prolongement de la crevasse catalytique ; B : rotation de  $180^{\circ}$  par rapport à l'axe z. La surface est semi-transparente de sorte que l'on retrouve les éléments de structure secondaire de la Figure 10. Les deux résidus de la dyade catalytique sont indiqués en rouge.

particularité d'être thermostables (c'est-à-dire que leur optimum d'activité est supérieur à 50°C), il apparaîtrait logique d'en conclure que la présence de ces ponts participe à la thermostabilisation de l'enzyme, d'autant plus que l'introduction par mutagenèse dirigée d'un pont disulfure à la même position chez la xylanase thermophile de *Bacillus circulans* (Wakarchuk *et al.*, 1994b) accroît sa thermostabilité. Mais comme nous le verrons plus loin (CHAPITRE I - C.4.4, p. 31), cet élément n'est qu'un facteur parmi d'autres permettant de rendre les Xyl–11 thermostable.

Par contre, il est démontré que le pont disulfure présent chez la Xyl–11 de *Humicola lanuginosa* est indispensable au repliement correct de l'enzyme (Tatu *et al.*, 1990). En effet, après sa coupure, la proportion de brins  $\beta$  passe de 66% à 50% environ ; d'après les auteurs, il est probable que ce pont favorise le rapprochement de segments protéiques normalement éloignés, permettant alors la formation d'interactions non covalentes qui conduisent à une structure secondaire ordonnée.

Jusqu'à présent l'architecture des Xyl–11 a été décrite comme une structure fixe, mais plusieurs indices indiquent que le *jelly-roll* est animée d'un mouvement lors de la catalyse. Le **Tableau 3** récapitule les distance mesurées entre la proline P114 (atome C $\beta$ ) conservée du pouce (numérotation *Thermobacillus xylanilyticus*) et le résidu lui faisant face de l'autre côté de la crevasse, qui est soit un Trp (atome CZ2), soit une Tyr (atomes O de OH et CZ). Comme nous l'avons vu lors de la description de la crevasse, cette distance est assez variable, ce qui implique une mobilité du pouce vers le brin B2. Ainsi, la comparaison des structures de la Xyl–11 de *Trichoderma reesei* native et de complexes avec divers inhibiteurs époxy-alkyl xylosides indique un raccourcissement de la distance entre la Pro et le Trp, qui passe de 6,7 à 4,8 Å avec le plus petit ligand, soit une baisse de presque 30% de la distance (Havukainen *et al.*, 1996). Par ailleurs, les auteurs notent des changements conformationnels au niveau des résidus M154 et Y125 (*T. xylanilyticus*) situés à la base du pouce, la chaîne latérale de ce dernier subissant une rotation de 90°. Mais curieusement, la présence d'un substrat xylotétraose ou d'un inhibiteur chez *Bacillus circulans* ne provoque aucun rapprochement du pouce et du brin B2 (Wakarchuk *et al.*, 1994a ; Sidhu *et al.*, 1999).

Une étude de dynamique moléculaire sur la Xyl-11 de *Trichoderma reesei* a tenté d'explorer les mouvements du pouce : même si le cycle complet de la catalyse semble difficile à appréhender, la combinaison des résultats de cette dynamique avec des données structurales a



**Figure 14 – Représentation de l'hydrophobie de surface des Xyl–11** (exemple de *Thermobacillus xylanilyticus*). La crevasse est observée de dessus comme sur la vue B de la **Figure 9**. Blanc : résidus hydrophobes ; magenta : résidus aromatiques ; cyan : résidus polaires ; bleu : résidus chargés + ; rouge : résidus chargés – ; vert : proline.

| Résidus aromatiques    |           | <b>Y3, W7, Y63, Y67, W69, Y78</b> , Y86, <b>W126, Y163, Y171</b> |
|------------------------|-----------|--|
|                        | Neutres   | Q5, N33, <b>S115</b> , <b>Q124</b>                               |
| Résidus polaires       | Chargés + | R110   |
|                        | Chargés – | E76, E169  |
| Résidus<br>hydrophobes |           | V35, <b>P88</b> , <b>P114</b> , <b>I116</b>                      |

**Tableau 4 – Résidus tapissant la crevasse catalytique des Xyl–11** (exemple de *Thermobacillus xylanilyticus*). Les résidus dont le type et la position sont conservés dans l'espace chez les Xyl–11 (d'après la **Figure 11**) sont indiqués en gras, les autres sont conservés au moins au niveau de leur position : Y/W86, N/D33 et V/L35, sauf Q5 qui est très variable.

pu mettre en évidence que cette enzyme existe sous trois conformations différentes (Muilu *et al.*, 1998). Tout d'abord la conformation liée L (le ligand peut se fixer à l'enzyme), puis la conformation fermée F (le pouce se rapproche du brin B2 pour refermer partiellement la crevasse, la catalyse se produisant alors) et enfin la conformation relâchée R où les produits de réaction sont relargués. Le cycle complet serait donc :  $L \rightarrow F \rightarrow R \rightarrow L \rightarrow ...$  Ces trois états ont été observés dans des structures cristallines, et la capacité d'ouverture et de fermeture du site actif semble être une propriété intrinsèque de la structure, ces conformations lui confèrent des capacités de fixation différentes.

### C.4.1.2 Domaines de fixation non catalytiques : CBM, CBD et XBD

Un CBM (*Carbohydrate Binding Module*) est défini comme un domaine protéique contiguë à un domaine catalytique et qui possède des propriétés de fixation de sucres. La découverte de tels domaines a initialement eu lieu chez les cellulases, d'où le nom attribué de *Cellulose Binding Domain* (CBD, Tomme & Claeyssens, 1989). Ils sont classés comme les glycoside-hydrolases en fonction de leur homologie de séquences dans des familles numérotées de 1 à 13. De manière générale, ils sont composés chez les bactéries d'une centaine de résidus et peuvent être localisés aussi bien en N-ter qu'en C-ter (Gilbert & Hazlewood, 1993). Ils ont en commun d'avoir un résidu Cys à chacune des leurs extrémités, de posséder quatre résidus Trp parfaitement conservés et d'afficher un net déficit de résidus chargés (Ferreira *et al.*, 1991). Leur fixation sur la cellulose serait réalisée par l'intermédiaire des résidus aromatiques via des interactions de *stacking* (Béguin, 1990).

Les CBD sont liés au domaine catalytique par des séquences de liaison (*linkers*) qui sont souvent caractérisées par une forte teneur soit en sérines, soit en prolines et thréonines. La longueur de ces séquences de liaison peut varier de seulement quelques résidus à plus de cinquante (Gilbert & Hazlewood, 1993). De nombreuses Xyl–11 possèdent un ou plusieurs domaines, par exemple celle de *Clostridium thermocellum* possède un CBD (Hayashi *et al.*, 1999). C'est chez la xylanase XlnB de *Streptomyces lividans* que fut postulée pour la première fois l'existence d'un *Xylan Binding Domain* (XBD) (Shareck *et al.*, 1991) en C–ter, mais sans preuve expérimentale.

La Xyl–11 de *Thermomonospura fusca* possède un domaine CBD ayant la faculté de fixer aussi bien la cellulose que le xylane, mais dont la suppression par génie génétique maintien la même activité à l'enzyme (Irwin *et al.*, 1994) ; il ne s'agit donc pas d'un vrai XBD.

|        |              |       | B1         | B2          | A2              | A                  | .3 B3                     | 3           |              |       |
|--------|--------------|-------|------------|-------------|-----------------|--------------------|---------------------------|-------------|--------------|-------|
|        |              |       |            | →           | ▶               | →                  | $\longrightarrow$ —       | →           |              |       |
| т      | xvl          | 1     |            | NTYWOYW     | TDGIGYVNAT      | NGOGGNYSVS         | SNSGNFV                   | IGKE        | -WOYGAHNRV   | 48    |
| А      | kaw          | 1     |            | SAGINYVONY  | NGNLADETYD      | E-SAGTESMY         | MEDGVSSDEV                | VGLG        | -WTTGS-SNA   | 51    |
| 2      | nia          | 1     |            | SAGINYVONY  | NGNLGDETYD      | E-SAGTESMY         | MEDGVSSDEV                | VGLG        | -WTTCS-SKA   | 51    |
| Ъ      | 202          | 1     |            | NUDCYDVEEW  | KDCCCCCTMT      | INUCCTEGAO         |                           | FDVOVVENET  | OTHOOVCIME   | 67    |
| 5      | aya          | 1     | -ÕTAIDU2IG | NADGIDIEFW  | RDSGGSGIMI      | MAGGIFSAQ          |                           | FREGERENEI  | QINQQVGNMS   | 507   |
| в      | cir          | T     |            | -ASTDYWQNW  | TDGGGLVNAV      | NGSGGNYSVN         | WSNTGNFV                  | VGKG        | -WITGSPFRT   | 50    |
| в      | sub B230     | T     | ATTITSNQTG | THDGYDYELW  | KDSGNT-SMT      | LNSGGAFSAQ         | SNIGNAL                   | FREEKFDST   | KTHSQLGNIS   | 67    |
| в      | sub 168      | 1     |            | -ASTDYWQNW  | TDGGGIVNAV      | NGSGGNYSVN         | NSNTGNFV                  | VGKG        | -WTTGSPFRT   | 50    |
| С      | the          | 1     | -QTLTSSATG | THNGYYYSFW  | TDGQGNIRFN      | LESGGQYSVT         | NSGNGNWV                  | GGKG        | -WNPGTDNRV   | 60    |
| D      | the          | 1     | ALTSNASG   | TFDGYYYELW  | KDTGNT-TMT      | VYTQGRFSCQ         | NSNINNAL                  | FRTGKKYN    | QNWQSLGTIR   | 63    |
| н      | jec1         | 1     |            | -ASINYDQNY  | QTG-GQVSYS      | P-SNTGFSVN         | NTQDDFV                   | VGVG        | -WTTGS-SAP   | 47    |
| н      | jec2         | 1     | QTIQPGTG   | YNNGYFYSYW  | NDGHGGVTYT      | NGPGGQFSVN         | SNSGNFV                   | GGKG        | -WQPGTKNKV   | 59    |
| н      | lix          | 1     | QTIGPGTG   | YSNGYYYSYW  | NDGHAGVTYT      | NGGGGSFTVN         | SNSGNFV                   | AGKG        | -WOPGTKNKV   | 59    |
| N      | fle          | 1     | DTTITONOTG | YDNGYFYSFW  | TDAPGTVSMT      | LHSGGSYSTS         | WRNTGNFV                  | AGKC        | -WSTGG-RRT   | 60    |
| Р      | var          | 1     | GTTPNSEG   | WHDGYYYSWW  | SDGGGDSTYT      | NNSGGTYETT         | GNGGNLV                   | GGKG        | -WNPGLNARA   | 59    |
| -<br>D | fun          | 1     | STTTSOTG   | TNNGYYYSFW  | TNCCCFVTYT      | NCONGEVSVT         | ANDCCDFT                  | SCKC        | -WNP-ANAOT   | 58    |
| 2      | c 20         | 1     | DTUTTTNOTO | THIOTIGEN   | TDCCCCVCMN      | TACCOVCTC          | MTNCONEV                  | ACKG        |              | 60    |
| 5      | 1            | 1     | DIVIIINQIG | INNGITISEW  | 1DGGGSV5MN      | LASGGSIGIS         | AGD CONFV                 | AGKG        | -WANGA-RRI   | 50    |
| т      | Lan          | T     | QTTPNSEG   | WHDGIIISWW  | SDGGAQATYT      | NLEGGTYEIS         | WGDGGNLV                  | GGKG        | -WNPGLNARA   | 59    |
|        |              |       | ۸ ۲        | DE          | D               | c                  | <b>D</b> 0                | D0          |              |       |
|        |              |       | AS         | B0          | B'              |                    | 10 B9                     | B8          |              |       |
|        |              |       |            |             |                 |                    |                           |             | pouce        |       |
| т      | xyl          | 49    | VNYNAGAWQP | NGNAYITLYG  | WTRNPLIEYY      | VVDSWGSYRP         | TGDYRGSV                  | YSDGAWYDLY  | HSWRYNAPSI   | 116   |
| А      | kaw          | 52    | ISYSAEYSAS | GSSSYLAVYG  | WVNYPQAEYY      | IVEDYGDYNP         | CSSATSL <mark>G</mark> TV | YSDGSTYQVC  | TDTRTNEPSI   | 121   |
| А      | nig          | 52    | ITYSAEYSAS | GSSSYLAVYG  | WVNYPQAEYY      | IVEDYGDYNP         | CSSATSL <mark>G</mark> TV | YSDGSTYQVC  | TDTRTNEPSI   | 121   |
| в      | aga          | 68    | INYGA-NFQP | NGNAYLCVYG  | WTVDPLVEYY      | IVDSWGNWRP         | PGA-TPK <mark>G</mark> TI | TVDGGTYDIY  | ETLRVNQPSI   | 135   |
| в      | cir          | 51    | INYNAGVWAP | NGNGYLTLYG  | WTRSPLIEYY      | VVDSWGTYRP         | TGTYK <mark>G</mark> TV   | KSDGGTYDIY  | TTTRYNAPSI   | 118   |
| в      | sub B230     | 68    | INYNA-TFNP | GGNSYLCVYG  | WTKDPLTEYY      | IVDNWGTYRP         | TGTPKGTF                  | TVDGGTYDIY  | ETTRINOPSI   | 134   |
| в      | sub 168      | 51    | INYNAGVWAP | NGNGYLTLYC  | WTRSPLIEYY      | VVDSWGTYRP         | TGTYKCTV                  | KSDGGTYDIY  | TTTRYNAPSI   | 118   |
| C      | the          | 61    | TNYTA-DYRP | NGNSYLAVYC  | WTRNPL TEYY     | VVESEGTYDP         | STGATEMESV                | TTDGGTYNTY  | RTORVNAPST   | 129   |
| Ē      | the          | 64    | TTYCA_TVND | NCNSVICTVC  | WSTINDL VIDEV   | TVESWONWDD         | DCA -TSLCOV               | TTDCCTVDTV  | PTTPNNOPST   | 121   |
| л<br>Т | iog1         | 10    | TNECCCECUM | SCTCI LENYO | ACTINE VEF      | TMEDNUNVD_         |                           | TEDGATYTTW  | ENTRANEDST   | 115   |
| п<br>  | Jeci<br>Jeci | 40    | INFGGSFSVN | NCNOVIGUNG  |                 | IMEDNAN IP-        |                           | TSDGAINITW  | DENTRVINEPST | 1 2 0 |
| н      | jecz         | 60    | INFSG-SINP | NGNSYNSVYG  | WSRNELIEYY      | IVENEGTINP         | STGATKLEEV                | TSDGSVYDIY  | RIQRVNQPSI   | 128   |
| н      | 11X          | 60    | INFSG-SYNP | NGNSYIISING | WSRNPLIDYY      | IVENEGTYNP         | STGATKLEEV                | TSDGSVYDIY  | RTORVNOPSI   | 128   |
| Ν      | fle          | 6 I   | VTYNA-SFNP | SGNAYLTLYC  | WTRNELVEYY      | IVESWGTYRP         | TGTYKGTV                  | TTDGGTYDIY  | ETWRYNAPSI   | 127   |
| Р      | var          | 60    | IHFTG-VYQP | NGTSYNSVYG  | WTRNELVEYY      | IVENFGSSNP         | SSGSTDLGTV                | SCDGSTYTLG  | QSTRYNAPSI   | 128   |
| Р      | fun          | 59    | VTYSG-EFNP | SGNAYLAVYG  | WTTDPLVEYY      | ILESYGTYNP         | SSGLTSL <mark>G</mark> QV | TSDGGTYDIY  | STQRVNQPSI   | 127   |
| s      | S38          | 61    | VNYSG-SFNP | SGNAY       | WTANPLVEYY      | IVDNWGTYRP         | TGTYK <mark>G</mark> TV   | TSDGGTYDVY  | QTTRVNAPSV   | 127   |
| т      | lan          | 60    | IHFEG-VYQP | NGNSYLAVYG  | WTRNPLVEYY      | IVENFGTYDP         | SSGATDLGTV                | ECDGSIYRLG  | KTTRVNAPSI   | 128   |
|        |              |       |            |             |                 |                    | —                         |             |              |       |
|        |              |       | B7         | 7           | A6 h            | nélice             | B4                        |             | A4           |       |
|        |              |       | pouce      |             |                 |                    |                           | <b>→</b> -  |              |       |
| т      | xvl          | 117   | DE-TOWOOY  | WSWROOKRPT  | SNVSITEN        | <b>WNAWGAACM</b>   | PMGSSWSYOV                | LATIOGYYSSC | YSNVTVW      | 182   |
| А      | kaw          | 122   | TG-TSTETOY | FSVRESTRTS  | GTVTVAN         | HENREWAOHGE        | GN-SDFNYOV                | MAVIDAWSGAC | SASVTISS     | 184   |
| Δ      | nia          | 122   | TC-TSTETOY | FSVRESTRTS  | GTVTVAN         | HENEWAOHGE         | GN-SDFNYOV                | MAVDAWSGAG  | SASVTISS     | 184   |
|        | 202          | 136   | KG-TANDKOV | WSWPDSKPTS  | GTTSVSN         | HEDA WENT OM       | NM_CKMVEVA                | LTW-CVOSS   | CANVY CNTLD  | 200   |
| 5      | aya          | 110   | DODDT      | WOWROCKEDT  | CNATTERN.       |                    | NI COMUNYOU               | MATEGYOGG   | CONVENTIA    | 100   |
| 5      | CII<br>      | 1 2 5 | TO TRUE    | WSVRQSKRPI  | GSNATTIFIN      | HURK AND I GM      | NLGSNWAIQV                | THITCHOS    |              | 100   |
| в      | sub B230     | 135   | IG-LANEKOY | WSVRQTKRTS  | GTVSVSE         | HFKKWESLEM         | PM-GKMYETA                | LTVDGYQSNG  | SANVTANVLT   | 199   |
| в      | SUD 168      | 119   | DGDRTTFTQY | WSVRQSKRPT  | GSNATITESN      | IVNAWKSHGM         | NLGSNWAYQV                | MATEGYQSSC  | SSNVTVW      | 182   |
| С      | the          | 130   | EG-TKTFYQY | WSVRTSKRTG  | GTVTMAN         | HFNAWRQAGL         | QL-GSHDYQI                | VATEGYYSSG  | SATVNVGGST   | 194   |
| D      | the          | 132   | VG-TAREDOY | WSVRTSKRTS  | GTVTVTD         | #FRAWANREL         | NL-GTIDQIT                | LCVDGYQSSG  | SANITQNTFS   | 196   |
| н      | jec1         | 116   | QG-TATENQY | ISVRNSPRTS  | GTVTVQN         | <b>HFNAWASLC</b> L | HL-GQMNYQV                | VAVDGWGGSG  | SASQSVSN     | 178   |
| н      | jec2         | 129   | IG-TAREYOY | WSVRRNHRSS  | <b>GSVNTAN</b>  | <b>HFNAWAQQG</b> L | TL-GTMDYQI                | VAVEGYFSSG  | SASITVS      | 190   |
| н      | lix          | 129   | IG-TATFYOY | WSVRRNHRSS  | <b>G</b> SVNTAN | <b>HFNAWASHG</b> L | TL-GTMDYQI                | VAVDGYFSSC  | SASITVS      | 190   |
| N      | fle          | 128   | EG-TRTFOOF | WSVRQQKRTS  | GTITIGN         | <b>HFDAWARAC</b> M | NLGSHD-YQI                | MATEGYOSSC  | SSTVSISEGG   | 192   |
| Р      | var          | 129   | DG-TONENOY | WSVRODKRSS  | GTVOTGC         | FDAWASACL          | NVTGDHYYOI                | VATOGYFSSE  | YARITVADVG   | 194   |
| P      | fun          | 128   | EG-TSUENOY | WSVRTEKRVG  | GTVTTAN         | FAAWKALCI.         | EM-GTYNYMT                | VSTOGYESSE  | SSTITVS      | 189   |
| s      | 538          | 128   | EG-TKUENOV | WSVROSKRTG  | GSTTAGN         | <b>FDAWARYCM</b>   | PLGSFNYYMT                | MATEGYOSSE  | SSSISVS      | 190   |
| Ţ      | lan          | 129   | DG-TOTTDOV | WSWRODKRTG  | GTVOTCC         | HEDAWARACT         | NVNGDHVVOT                | VATEGVESS   | YARTTVADVC   | 194   |
| ÷.     |              |       |            |             | 1,5196          |                    | 1.11.0551111.01           |             | 1            |       |

Figure 15 – Alignement de séquences des Xyl–11 de structures connues. Le taux de conservation des résidus est indiqué par un surlignement noir s'il est de 100% ou gris s'il est au moins égal à 80%. Les éléments de structure secondaire de *Thermobacillus xylanilyticus* sont indiqués au-dessus de l'alignement, les flèches symbolisent les brins  $\beta$  et le cylindre l'hélice  $\alpha$ .

T xyl : Thermobacillus xylanilyticus ; A kaw : Aspergillus kawachii ; A nig : Aspergillus niger ; B aga : Bacillus agaradhaerens ; B cir : Bacillus circulans ; B sub B230 : Bacillus subtilis B230 ; B sub 168 : Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 ; C the : Chaetomium thermophilum ; D the : Dictyoglomus thermophylum ; H jec1 : Hypocrea jecorina Xyn1 ; H jec2 : Hypocrea jecorina Xyn2 ; H lix : Hypocrea lixii E58 ; N fle : Nonomura flexuosa ; P var : Paecilomyces varioti Bainier ; P fun : Penicillium funiculosum ; S S38 : Streptomyces sp. S38 ; T lan : Thermomyces lanuginosus.

La mise en évidence d'un CBM spécifique du xylane a été obtenue chez *Cellulomonas fimi* (Black *et al.*, 1995). La xylanase produite contient un domaine catalytique, un domaine CBD identifié comme tel et un autre CBM dont la fonction est au départ inconnue et qui partage 65% d'homologie de séquences avec le CBD. La délétion de ce domaine diminue l'affinité de l'enzyme pour des xylanes insolubles mais pas pour des xylanes solubles. Il s'agit donc bien d'un XBD qui influe uniquement sur l'affinité de l'enzyme et pas sur sa catalyse.

Ainsi, bien que la structure et la composition des xylanes soient très variées en fonction de leur origine botanique, la structure de la cellulose, elle, est invariante. L'acquisition d'un CBD aide les xylanases à se rapprocher de leur substrat en se fixant à la cellulose, car tous les deux sont intimement liés, facilitant l'hydrolyse. Par contre, certaines parois végétales (comme dans les balles de maïs) contiennent peu de cellulose, il est donc probable que des CBD aient évolué en XBD pour accroître sensiblement l'affinité des xylanases. Dans une vision plus générale, la présence d'un CBD permet probablement à tout une batterie d'hémicellulases d'adhérer à la paroi végétale puis de dégrader leur substrat préférentiel (Gilbert & Hazlewood, 1993).

#### C.4.2 Homologie de séquences

Aujourd'hui, environ 200 séquences de Xyl-11 sont déposées dans la base de données CAZy. En, 2002, une étude d'alignements de séquences portant sur les 82 séquences domaines catalytiques de xylanases matures disponibles a été réalisée (Sapag *et al.*, 2002). Ces séquences vont de 175 à 233 acides aminés de long pour des xylanases de masse de 19 à 26 kDa.

Les plus fortes similarités de séquences au niveau des structures secondaires sont obtenues pour les brins B5, B6 et B8 ainsi que l'extrémité C-ter de l'hélice (**Figure 15**). La séquence de la « corde » est très variable, sauf le résidu Pro qui se trouve en son milieu. Le pouce par contre est très conservé et il existe une séquence consensus PSIXG où X peut être quasiment n'importe quel résidu. La proline semble être responsable de la vrille du pouce qui lui donne cette forme de boucle repliée partiellement sur elle-même. On observe une faible homologie de séquences pour les boucles A3–B3, B3–A5 et B7–A6. La xylanase de *Polypastron multvesiculatum* ne comporte pas les brins B1 et B2, indiquant que leur présence ne semble pas requise pour une bonne activité catalytique.

Comme nous l'avons vu lors de l'analyse structurale, de nombreux résidus tapissant la crevasse catalytique sont invariants, et plus généralement on retrouve plusieurs motifs hautement conservés chez toutes les Xyl–11 : 67–YGWT–70 sur le brin B5, 73–PLVEYY–78, 121–TFXQYWSVR–129 sur le brin B7 (numérotation *T. xylanilyticus*).

Les structures en  $\beta$ -*jelly-roll* des xylanases sont globalement très bien conservées, alors que leurs séquences apparaissent plus variées, du moins au niveau des chaînes latérales, mais de nombreux résidus importants d'un point de vue fonctionnel sont invariants. Ceci conforte les conclusions d'études déjà menées sur le super-repliement le plus courant, le *TIM-barrel* ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, qui existe chez 10% des enzymes dont la structure est connue (Farber & Petsko, 1990 ; Wierenga, 2001). En effet, ces travaux ont permis de montrer que les structures 3D évoluent moins vite que les séquences primaires qui subissent des mutations (Reardon & Farber, 1995 ; Janecek & Bateman, 1996). Les Xyl–11 semblent avoir atteint un tel degré de spécificité que non seulement leurs structures, mais aussi leurs séquences, deviennent homologues. Mais comme nous allons le voir par la suite, malgré cette forte homologie, les variabilités fonctionnelles sont dues à un faible nombre d'acides aminés et d'interactions souvent difficiles à localiser.

#### C.4.3 Stabilité au pH

Les xylanases de la famille 11 ont une plage de pH<sub>opt</sub> allant de 2,0 à 9,0 mais celles provenant de bactéries ne présentent pas de pH<sub>opt</sub> inférieur à 5,5, alors que la majorité des Xyl–11 de fungi est acidophile. Par exemple, la xylanase Xyn1C d'*Aspergillus kawachii* possède un pH<sub>opt</sub> égal à 2,0 et n'est même pas inactivée à pH 1,0, ce qui en fait la Xyl–11 la plus acidophile (Ito *et al.*, 1992). *Bacillus* sp. 41 M1 sécrète une xylanase J dont l'activité est supérieure ou égale à 60% de l'optimale sur une large gamme de pH de 5,0 à 9,5, et son pH<sub>opt</sub> est égal à 9,0 (Nakamura *et al.*, 1992).

Malgré le fait qu'il soit difficile de relier la présence d'un motif structural précis à un caractère particulier chez les Xyl–11, la comparaison de deux xylanases produites par *Trichoderma reesei* et d'optima de pH différents a mis en évidence que le pI est fortement corrélé au type de résidu à la position 33 (numérotation chez *Thermobacillus xylanilyticus*) (Törrönen & Rouvinen, 1995) : pI > 5 si un résidu Asn est présent, pI < 5 si c'est Asp. L'explication serait que ce résidu se trouve à proximité du résidu acide/base et influerait sur son état d'ionisation. S'il s'agit d'un acide dans sa forme neutre (Asp), il forme une liaison

hydrogène forte avec le résidu acide/base E169, dont le départ du proton est favorisé. D'après une étude des alignements de séquences (Sapag *et al.*, 2002), cette corrélation est confirmée : pH<sub>opt</sub> basique si un résidu Asn est en position 33, plus acide si c'est un résidu Asp. Néanmoins, on remarquera que la xylanase de XynC de *Fibrobacter succinogenes* produit une xylanase dont le pH<sub>opt</sub> est de 6,0 donc n'est pas considérée comme acidophile mais possède un Asp en position 33 (Zhu *et al.*, 1994).

Par ailleurs, le caractère acidophile de la xylanase Xyn1C serait dû au fait que la protonation des résidus acides du bord de la crevasse à pH acide fait disparaître en partie les répulsion entre le substrat et l'enzyme, ce mécanisme étant essentiel pour la stabilisation à pH acide (Fushinobu *et al.*, 1998). Au contraire, les xylanases basophiles possèdent typiquement moins de résidus acides mais plus de résidus basiques comme des Arg à leur surface. Un autre facteur important serait le nombre de ponts salins qui serait plus élevé chez les xylanases basophiles (Hakulinen *et al.*, 2003). Mais encore une fois il existe une exception, les résultats de l'étude par mutagenèse aléatoire de la xylanase de *Neocallistamix patriciarum* montrent que l'augmentation des charges négatives à la surface et de l'hydrophobie de cette xylanase accroît son pH<sub>opt</sub> (Chen *et al.*, 2001).

Une étude a également porté sur les résidus situés autour du résidu A/B de la xylanase Xyl1de *Streptomyces* sp. S38, dont le pH optimum est de 6,0 (de Lemos Esteves *et al.*, 2004). Il semble que l'orientation du résidu conservé R110 (*T. xylanilyticus*) favorise la mise en place d'un réseau de liaisons hydrogène avec les résidus D33 et E113 chez les xylanases acidophiles et interviendrait directement sur la baisse du pKa du résidu acide/base. Ce réseau n'existe pas chez les alkalophiles car les résidus aux mêmes positions ne sont pas acides (on retrouve N33 et A113 dans Xyl1), la double mutation N33D/A113E chez Xyl1 permet de passer à un pH<sub>opt</sub> de 4,7. La présence d'un résidu Tyr chez les acidophiles en position 7 au lieu d'un Trp permettrait aussi de rapprocher le résidu de la position 33 vers le résidu acide/base, la mutation W7Y/N33D/A113E affiche un pH<sub>opt</sub> de 5,3 alors qu'on s'attend à une baisse plus significative. Cet exemple illustre bien la complexité pour comprendre les causes du pH<sub>opt</sub> des xylanases, l'ajustement très fin des interactions électrostatiques autour de la dyade catalytique est encore mal compris dans son ensemble et est probablement dû à un des facteurs structuraux et électrostatiques multiples.

### C.4.4 Stabilité à la température

Tout d'abord, il est important de rappeler quelques définitions relatives à la stabilité des enzymes à la température. La thermostabilité exprime l'activité résiduelle d'une enzyme après une incubation d'une durée t à une température T en l'absence de substrat. Souvent la mesure d'activité (avec le substrat) est réalisée à une température différente (presque toujours inférieure à T), ce qui malheureusement peut biaiser les mesures car la protéine, si elle a été partiellement dénaturée par le chauffage, peut dans certains cas se renaturer lors du passage à une température plus faible (Daniel *et al.*, 1996). Quant à la thermoactivité, il s'agit de l'activité de l'enzyme mesurée à la température T.

Les micro-organismes vivant dans des milieux de températures très variées, ils peuvent être classés en fonction de la température optimale à laquelle ils peuvent croître :

- moins de 15°C : psychrophiles ;
- de 15 à  $60^{\circ}$ C : mésophiles ;
- de 60 à  $80^{\circ}$ C : thermophiles ;
- plus de 80°C : hyperthermophiles.

Et par analogie, les enzymes que ces micro-organismes produisent entrent dans le même classement. Nous allons tout d'abord présenter quelques concepts sur la stabilité et l'activité des enzymes en fonction de la température, avant d'approfondir le cas des xylanases de la famille 11 et d'étudier les améliorations réussies grâce à la bio-ingeniérie dans cette famille.

### C.4.4.1 Relation entre la stabilité et l'activité

La stabilité conformationnelle d'une protéine P est définie par la différence d'énergie libre  $\Delta G$ entre l'état natif replié (interactions faibles non-covalentes) et l'état dénaturé déplié (forces déstabilisantes dues à l'entropie). Il a été proposé, en supposant des états d'énergie libre de départ identiques, que la différence d'énergie libre d'activation entre deux enzymes soit égale à  $R \cdot T \cdot \ln \Delta t_{1/2}$  où  $\Delta t_{1/2}$  est la différence de temps de demi-vie entre les deux enzymes (Perutz & Raidt, 1975). En choisissant un ratio de 1:10<sup>6</sup> entre une enzyme mésophile et une autre thermophile, la différence d'énergie s'avère relativement faible, de l'ordre de 40 kJ/mol à 70°C, alors qu'une interaction faible peut atteindre 25 kJ/mol (Daniel *et al.*, 1996). Cette différence correspond à un petit nombre d'interactions bien disposées, de faibles changements sur le nombre et la force des interactions stabilisantes auront donc un effet majeur sur la stabilité. Il apparaît donc aussi que des changements structuraux ne sont pas indispensables à

| Organisme  | Nom de la xylanase | $T_{\rm opt}$ | Thermostabilité   | Substrat             | V <sub>m</sub><br>(UI/mg) | K <sub>m (app)</sub><br>(mg/mL) | AS (UI/mg) | Références                        |
|--|--------------------|---------------|---|----------------------|---------------------------|---------------------------------|------------|-----------------------------------|
| Aspergillus nidulans                             | X22                | 62°C          | $t_{1/2} = 2h a 55^{\circ}C$  | xylane<br>d'avoine   |                           | 4,20                            | 410        | Fernandez-Espinar et al., 1993    |
| <i>Caldicellulosiruptor sp.</i> Rt69B.1 <b>E</b> | XynD               | 70°C          | —   | xylane<br>d'avoine   |                           |                                 | —          | Morris et al., 1999               |
| Chaetomium<br>thermophilum 🗗                     | СТХ                | 80°C          | $t_{1/2} = 1500 \text{min à } 60^{\circ}\text{C}$<br>= 58min à 65°C<br>= 15 min à 70°C<br>= 7min à 75°C<br>= 4min à 85°C                        | xylane de<br>bouleau |                           | _                               |            | Hakulinen et al., 2003            |
| Clostridium<br>stercorarium F-9 <b>B</b>         | XynA               | 75°C          | —   | xylane<br>d'avoine   | 2800                      | 1,9                             | 2230       | Sakka <i>et al.</i> , 1994        |
| Clostridium<br>thermocellum B                    | XynA               | 65°C          | _   | xylane<br>d'avoine   |                           |                                 | 689        | Hayashi et al., 1999              |
| Distuscionus                                     | XynB3              | 75°C          | 90% de son activité<br>après 8h à 80°C  | xylane<br>d'avoine   |                           | —                               | 720        | Morris et al., 1998               |
| thermophilum<br>Rt46B.1                          | XynB6              | 85°C          | 100% d'activité après<br>8h à 85°C<br>75% d'activité après<br>8h à 90°C   | xylane<br>d'avoine   | _                         | _                               | 870        | Morris <i>et al.</i> , 1998       |
| Nonomuraea<br>flexuosa <mark>B</mark>            | NFX                | 80°C          | $t_{1/2} = 1500 \text{min à } 75^{\circ}\text{C}$<br>= 273min à 80°C<br>= 148 min à 85°C<br>= 88min à 90°C<br>= 39min à 95°C<br>= 28min à 100°C | xylane de<br>bouleau |                           |                                 |            | Hakulinen et al., 2003            |
| Paecilomyces varioti<br>Bainier                  | xylanase           | 65°C          | _   | xylane de<br>mélèze  |                           | 2,5                             | 490        | Krishnamurthy & Vithayathil, 1989 |
| Thermobacillus<br>xylanilyticus B                |                    | 75°C          | 80% d'activité à 60°C   | xylane de<br>bouleau |                           | 1,6                             | 2000       | Debeire-Gosselin et al., 1992     |
| Thermomonospora<br>fusca B                       | TfxA               | 75°C          | 96% d'activité après<br>18h à 75°C  | xylane de<br>bouleau | 600                       | 1,1                             | 490        | Irwin <i>et al.</i> , 1994        |
| Thermomyces<br>lanuginososus <b>F</b>            |                    | 65°C          | 100% d'activité après<br>51h à 50°C<br>64% d'activité après<br>8h à 60°C  | xylane de<br>hêtre   |                           |                                 | _          | Gomes et al., 1993                |

Tableau 5 – Caractéristiques des Xyl–11 thermostables.■ : organisme fongique ; ■ : organisme bactérien ; — : paramètre non déterminé.

un changement de stabilité, les différences structurales entre des enzymes plus ou moins stables ne sont pas plus importantes qu'entre les enzymes de stabilité similaires (Daniel *et al.*, 1996).

Le modèle du mécanisme d'inactivation d'une enzyme E se déroule en deux étapes :

activeinactiveinactivéeE native $k_1$ E dénaturée $k_3$ E aggrégée

Lors de la première étape réversible, l'augmentation de la température détruit le fragile équilibre des forces non-covalentes qui induisent un repliement correct, la protéine est alors dénaturée (perte de la structure tertiaire et souvent secondaire, phénomène réversible). Si la température augmente encore, il peut survenir un point de non-retour où les résidus hydrophobes normalement enfouis au coeur de la protéine deviennent exposés au solvant et interagissent avec d'autres, d'où le phénomène d'agrégation, irréversible, accompagné de modifications chimiques covalentes (perte de la structure primaire).

La stabilité, l'activité et la flexibilité d'une enzyme sont intimement liées, un équilibre doit être trouvé entre les interactions stabilisantes et déstabilisantes pour faire correspondre les besoins antagonistes de la stabilité d'une part, propriété globale de l'enzyme, et les fonctions catalytiques d'autre part, qui dépendent d'une flexibilité locale, une enzyme moins flexible étant plus stable (Daniel *et al.*, 1996). C'est cet équilibre réglé de manière très fine qui est difficile à appréhender et à transférer des enzymes mésophiles aux enzymes thermophiles.

#### C.4.4.2 Les xylanases thermostables

Le **Tableau 5** présente toutes les xylanases de la famille 11 qui possèdent un optimum de température supérieur à 60°C. Les paramètres cinétiques sont également indiqués. Leur comparaison entre elles est difficile au niveau de la thermostabilité car les mesures ne coïncident pas toujours au niveau des temps et des températures d'incubation. Parmi ces enzymes, on remarque que les  $T_{opt}$  varient de manière notable, de 62°C à 85°C. Un premier groupe d'enzymes possède des optima relativement « faibles », soit aux alentours de 65°C pour quatre d'entre elles : *Aspergillus nidulans* (Fernandez-Espinar *et al.*, 1993), *Clostridium thermocellum* (Hayashi *et al.*, 1999), *Paecilomyces varioti*, qui fut d'ailleurs la première Xyl–11 thermostable caractérisée, Krishnamurthy & Vithayathil, 1989), et *Thermomyces lanuginososus* (Gomes *et al.*, 1993). D'après les auteurs, la thermostabilité de cette dernière

serait due à la présence d'un réseau de résidus chargés à la proximité du site actif, ainsi qu'à l'établissement d'un pont disulfure entre le brin B9 et l'hélice  $\alpha$ , alors qu'on retrouve chez toutes les autres xylanases une liaison hydrogène à cette position.

Un deuxième groupe possédant des  $T_{opt}$  comprises entre 70 et 80°C se dégage ensuite, ses membres sont issus de *Thermobacillus xylanilyticus* D3 (75°C) (Debeire-Gosselin *et al.*, 1992), *Caldicelluosiruptor* sp. Rt69B.1 (70°C) (Morris *et al.*, 1999), *Clostridium stercorarium* (75°C) (Sakka *et al.*, 1994) et *Thermomonospora fusca* ( $T_{opt}$  de 75°C, elle conserve 96% de son activité après une incubation de 18 h à 75°C) (Irwin *et al.*, 1994).

Parmi les Xyl–11 hyperthermostables, on retrouve *Nonomura flexuosa* qui affiche une  $T_{opt}$  de 80°C pour un temps de demi-vie de plus de 24 h à 75°C (Hakulinen *et al.*, 2003), ainsi que *Chaetomium thermophilum* (80°C), qui apparaît cependant moins thermostable puisque son temps de demi-vie n'est que de 4 min à 75°C (Hakulinen *et al.*, 2003). Le clonage du gène XynB de *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1 dans différents plasmides d'expression dans *E. coli* a permis l'expression de sept xylanases différentes dont la thermostabilité s'échelonne de 70 à 85°C, avec notamment les xylanases XynB3 et XynB6 dont les  $T_{opt}$  sont de 75 et 85°C respectivement (Morris *et al.*, 1998). Ces enzymes issues d'un même gène présentent des thermostabilités très variables. Nous allons partir de cette étude pour tenter de définir les facteurs responsables de la thermostabilité.

#### C.4.4.3 Facteurs responsables de la thermostabilité

Les sept xylanases issues du clonage du gène XynB varient au niveau de leurs extrémités N– et C–ter (Morris *et al.*, 1998). Plus l'extrémité N–ter est longue, plus la thermostabilité est élevée, alors que la présence du domaine en C–ter est néfaste à la thermostabilité, peut-être pour des raisons stériques d'après les auteurs (Morris *et al.*, 1998). XynB6 est la plus active avec une  $T_{opt}$  de 85°C pour une activité spécifique de 870 UI/mg, et une activité mesurable même au-delà de 100°C. Mais c'est XynB3 qui affiche une  $T_{opt}$  de 75°C dont la structure a été caractérisée (McCarthy *et al.*, 2000). Les facteurs responsables de sa thermostabilité seraient :

- le pourcentage de la surface polaire est plus élevé (83%) que chez les autres Xyl-11 et donc plus accessible au solvant ;
- la boucle B3–A5 est plus longue de 5 résidus et forme une mini hélice qui vient se plaquer contre l'hélice α et entre les chaînes latérales des brins B3 et A5, créant de nouvelles interactions hydrophobes, ce qui empêche globalement l'exposition au
solvant de résidus hydrophobes. Cette boucle forme par ailleurs de nouvelles liaisons hydrogène avec l'extrémité C-ter.

Cette analyse propose l'idée que la zone autour de l'hélice des Xyl-11 et de l'extrémité C-ter est un point-chaud (*hot-spot*) à l'origine du dépliement de l'enzyme et d'une flexibilité accrue.

De manière générale, on estime que différents facteurs sont susceptibles d'influencer la thermostabilité des xylanases (Gruber *et al.*, 1998 ; Kumar *et al.*, 2000) :

- La présence de ponts disulfures, qui permettent le rapprochement des squelettes, rendant l'architecture plus stable (gain de distance de 0,5 Å chez *P. varioti* entre C110–C154). Également la création de ponts entre les extrémités N– et C–terminales améliore la thermostabilité (Wakarchuk *et al.*, 1994b) (nous reviendrons par la suite sur le rôle des ponts disulfures).
- Les paires d'ions, qui participent à une meilleure cohésion des enzymes, tout comme les interactions ioniques et les paires aromatiques.
- Les molécules d'eau enfouies, car même à haute température, la fixation d'eau est requise d'où l'existence de nombreuses liaisons hydrogène.
- La compacité de la protéine (*packing*) : plus elle est faible, plus la protéine est stable donc thermostable.
- L'oligomérisation : elle serait responsable de la plus grande thermostabilité de la xylanase de *T. xylanilyticus* (Harris *et al.*, 1997). En effet, la présence de nombreux résidus aromatiques dont certains sont uniques à cette position chez les Xyl–11 formeraient des « patchs » hydrophobes permettant aux molécules de l'enzyme d'interagir entre elles et de se stabiliser.

Comme on le voit, de nombreux éléments aussi bien structuraux qu'électrostatiques sont diversement responsables de la stabilité thermique des protéines. Une investigation chez des protéines de toute nature et de diverse thermostabilité a conclu que dans 80% des familles analysées, il existe une corrélation entre la thermostabilité et l'augmentation du nombre de liaisons hydrogène, de paires d'ions et de la proportion de résidus chargés en surface, ce qui augmente la densité de liaisons hydrogène avec l'eau (Vogt *et al.*, 1997). D'un autre côté, les changements d'acides aminés entre les enzymes mésophiles et thermophiles sont faibles, non

conservés, et indétectables dans le bruit de fond des variations fonctionnelles et taxonomiques. Il semble impossible de dégager des règles universelles permettant d'augmenter la thermostabilité à cause de la variabilité des structures et des interactions (Daniel *et al.*, 1996).

Une autre étude a porté sur les facteurs stabilisant les hélices  $\alpha$  des protéines (Facchiano *et al.*, 1998). Statistiquement, les mutations qui améliorent la thermostabilité se trouvent le plus souvent dans les hélices  $\alpha$ . D'après des données structurales et énergétiques prises dans leur globalité, les hélices de ces protéines thermophiles sont plus stables que celles de leurs homologues mésophiles dans 69% des cas. Mais lorsque ces facteurs sont pris indépendamment, ils ne montrent pas d'influence significative sur la thermostabilité. Seule l'absence de résidus branchés en  $\beta$  semble être corrélée à la thermostabilité.

Si des critères universels ne semblent pas pouvoir être dégagés, il est possible de déceler des tendances localement, i.e. au sein d'une famille d'enzymes. Plusieurs études ont été menées sur la comparaison des séquences et des structures des Xyl–11 thermostables avec leurs homologues mésophiles (Sapag *et al.*, 2002 ; Hakulinen *et al.*, 2003), leurs conclusions montrent que :

- au niveau de la séquence primaire, un fort pourcentage de résidu Arg et un rapport élevé du nombre de Thr sur celui de Ser favoriserait la thermostabilité. Par contre un taux de glycine ou de proline faible n'a pas d'effet.
- au niveau de la structure secondaire, l'unique hélice α des xylanases présente plus de résidus Asp et Arg chez les thermophiles. De plus, les brins β sont aussi plus longs que ceux de leurs homologues mésophiles. Cependant, l'existence d'un pont disulfure n'est pas indispensable à l'apparition d'un caractère thermostable.
- au niveau de l'hydrophobie et des caractéristiques de surface, les xylanases thermophiles ont un peu plus d'interactions apolaires que les mésophiles, mais n'ont pas une proportion de résidus aromatiques plus importante.

La thermostabilité est due à un ensemble de caractères présents ou non dont aucun n'est indispensable. Il est difficile de dégager des facteurs de thermostabilité ou de thermoactivité, qui semblent propre à chaque enzyme. Par exemple la présence de « patchs » hydrophobes chez *Thermobacillus xylanilyticus* est probablement un élément déterminant dans sa thermostabilité, mais il lui est propre et n'est retrouvé dans aucune autre enzyme (Harris *et* 

*al.*, 1997). Parmi les xylanases thermostables du **Tableau 5**, seulement deux possèdent un pont disulfure (*P. varioti* et *T. lanuginosus*), à la même position entre le brin B9 et l'hélice  $\alpha$ . Cependant, ces xylanases sont loin d'être les plus thermostables, alors que les xylanases produites par *D. thermophilum*, qui figurent parmi les plus thermostables, ne présentent aucun pont. La présence d'un pont disulfure ne semble donc pas conférer obligatoirement un caractère thermophile. Néanmoins, nous allons voir dans le paragraphe suivant comment l'intégration de ponts disulfures a permis des améliorations notables de la stabilité à la température de xylanases mésophiles.

#### C.4.4.4 Amélioration de la thermostabilité

Diverses études ont été entreprises, le premier essai d'amélioration a porté sur la xylanase de *Bacillus pumilus* par le biais de la mutagenèse aléatoire (Arase *et al.*, 1993). Le gain a été très modeste puisque le temps de demi-vie est passé de 4 min à 12 min à seulement 57°C entre le type sauvage et le mutant double G38S/R48K.

Par contre, la création d'une interaction hydrophobe par mutagenèse dirigée entre des résidus aromatiques sur les brins B1 et B2 de la xylanase de *Streptomyces* sp. S38 a permis l'augmentation considérable de la thermoactivité de 2100 UI/mg à 2500 UI/mg, ainsi que de la  $T_{opt}$  qui passe de 57 à 66°C (Georis *et al.*, 2000).

Shibuya *et al.* ont eu l'idée d'incorporer la partie N-ter de la xylanase thermostable de *Thermomonospora fusca* chez la xylanase mésophile de *Streptomyces lividans* par recombinaison aléatoire des gènes (Shibuya *et al.*, 2000). Alors que le type sauvage de *S. lividans* possède une  $T_{opt}$  de seulement 55°C et une demi-vie d'à peine 1 min à 70°C, les mutants Stx15 et Stx18 ayant intégré une partie de l'extrémité N-ter de *T. fusca* présente une  $T_{opt}$  de 75°C (+ 20°C) et une demi-vie de 120 min à 70°C. Ces mutants se révèlent même 40% plus actifs que *T. fusca* à 70°C. Ces résultats démontrent l'importance de l'extrémité N-ter sur la thermostabilité des xylanases même si son rôle précis est encore mal connu.

Hormis ces études, les essais d'amélioration de la thermostabilité ont surtout été effectués via l'ajout d'un ou de plusieurs ponts disulfures. L'étude pionnière dans le domaine a été réalisée sur la xylanase de *Bacillus circulans* (Wakarchuk *et al.*, 1994b). L'enzyme sauvage conserve 50% de son activité après 30 min d'incubation à 55°C mais est inactivée après 30 min à 57°C. Par contre, l'introduction simultanée de deux ponts disulfures à la fois entre les extrémités N–

et C-ter et entre le brin B9 et l'hélice  $\alpha$  a permis la création d'un mutant qui conserve 80% d'activité après 2 h à 69°C. Ce mutant quoique plus thermostable n'est pas plus thermoactif.

Ces résultats fructueux ont incité le transfert de cette méthode chez *Trichoderma reesei*. L'introduction d'un seul pont entre l'hélice et le brin B9 a diminué l'activité et la  $T_{opt}$ . Par contre, la même mutation combinée à l'ajout de nouveaux résidus carboxyliques en surface a permis la création d'un bien meilleur mutant de même  $T_{opt}$  (55~60°C) mais dont le temps de demi-vie est multiplié par 150 à 65°C (de 40 s à près de 2 h) (Turunen *et al.*, 2001). Sur la même enzyme, l'apport d'un pont disulfure entre l'extrémité N–ter et le brin A2 adjacent provoque une augmentation de la  $T_{opt}$  de ~57°C à 70°C et le temps de demi-vie passe de ~10 s à 6 min à 70°C (Fenel *et al.*, 2004).

Il semblait logique de combiner ces deux mutations : ajouter un pont disulfure entre l'hélice et le brin B9 et un autre entre l'extrémité N-ter et le brin A2, sans oublier l'ajout de nouveaux résidus carboxyliques en surface. Les résultats sont sans commune mesure par rapport aux précédents : la  $T_{opt}$  passe de 55~60°C à 63~74°C et surtout le temps de demi-vie devient égal à presque 6 h à 70°C contre ~10 s pour l'enzyme sauvage (Xiong *et al.*, 2004), ce qui se révèle plus efficace que l'introduction du pont disulfure près de l'hélice  $\alpha$ . Par ailleurs, l'activité de ce mutant thermostable est accrue de ~40% à sa  $T_{opt}$  (63~74°C) par rapport au maximum d'activité de l'enzyme sauvage à sa  $T_{opt}$  (55~60°C).

Ces expériences fournissent plusieurs enseignements :

- la zone de l'hélice α semble être sensible à la dénaturation thermique, en la rendant moins mobile, la thermostabilité peut être accrue. Par contre, une rigidité trop importante peut desservir l'activité catalytique (par exemple en empêchant des changements conformationnels requis par l'enzyme pour la catalyse ou l'adaptation à un changement de pH).
- l'extrémité N-ter a aussi une grande importance sur le maintien de la stabilité et ce sont les expériences permettant d'attacher cette extrémité à une autre partie de la protéine (extrémité C-ter ou brin A2) qui donnent les meilleures améliorations.
- la présence d'un pont disulfure de même topographie chez différentes enzymes n'apporte pas forcément les mêmes améliorations, et les combinaisons de ponts disulfures n'ont pas forcément un effet cumulatif.

Des études ont également porté sur le rôle joué par les ponts disulfures afin de comprendre comment ils interviennent aux niveaux cinétique et thermodynamique. Lors d'une cinétique d'inactivation thermique classique (voir §C.4.4.1, p. 31), on observe une cinétique du 1<sup>er</sup> ordre ( $k_3 > k_1$ ), mais pour la xylanase de *Bacillus circulans* où un pont disulfure a été créé entre l'hélice et le brin B9, la réaction est du second ordre ( $k_3 < k_1$ ). Le pont permet donc l'augmentation de  $k_2$  par rapport à  $k_1$ , ce mécanisme implique un changement de l'étape limitante lors du processus de dénaturation (Davoodi *et al.*, 1998). Surtout, les ponts disulfures au sein des protéines réduisent l'entropie du squelette des protéines dans leur état dénaturé, i.e. déplié, donc augmentent la stabilité de l'état natif (Matsumura *et al.*, 1989).

Même si ces expériences ont apporté des améliorations notables, d'autres sont encore plus spectaculaires. La protéase de *Bacillus stearothermophilus* a ainsi été rendue hyperthermostable par l'ajout d'un pont disulfure du côté N-ter et d'autres mutations dites rigidifiantes (Gly  $\rightarrow$  Ala et Ala  $\rightarrow$  Pro), la rendant active à 100°C (temps de demi-vie de 2,8 h à cette température au lieu de moins de 30 s) et lui conservant toute son activité à basse température comme le type sauvage (Van den Burg *et al.*, 1998).

#### **C.4.5** Propriétés catalytiques

C'est à partir d'homologies de séquences entre certaines régions des Xyl–11 et le site actif du lysozyme du jaune d'oeuf qu'il a été proposé que des groupes carboxyliques (Asp ou Glu) seraient impliqués dans la catalyse de ces enzymes par un mécanisme acide/base (Morosoli *et al.*, 1986 ; Ko *et al.*, 1992). Grâce à la disponibilité de la structure de la xylanase de *Bacillus pumilus*, des résidus ont été mutés en fonction de leur position dans la crevasse et de leur conservation dans les séquences, et l'activité de la xylanase produite testée. Il est apparu que les mutations E93S et E182S (résidus E76 et E169 équivalents chez *T. xylanilyticus*) provoquent une perte totale d'activité, alors que la mutation des autres résidus sélectionnés ne déclenche qu'une baisse de l'activité. Les résidus conservés E93 et E182 semblaient donc être les meilleurs candidats pour être les résidus catalytiques des Xyl–11 (Ko *et al.*, 1992).

Avec l'appui des structures 3D des enzymes natives ou mutées aux positions E76 (Nuc) et E169 (A/B) (Törrönen *et al.*, 1994 ; Wakarchuk *et al.*, 1994a), la dyade catalytique est bien apparue constituée de deux résidus Glu, chacun positionné sur un côté de la crevasse, l'un agissant comme un nucléophile, l'autre comme un acide/base. Le site actif des xylanases de la famille 11 se trouve ainsi au centre d'une crevasse catalytique longue et encaissée, ce qui est en accord avec son activité *endo*.

En ce qui concerne le mécanisme catalytique des Xyl–11, Gebler *et al.* ont montré que ces xylanases fonctionnent via un mécanisme catalytique de rétention de la configuration anomérique du substrat chez le produit (Gebler *et al.*, 1992). Ceci est corroboré par les travaux de Biely *et al.* indiquant que le fungus *Trichoderma reesei* produit deux xylanases qui catalysent des transferts de groupes glycosylés aux fortes concentrations de substrat, ce qui prouve qu'elles utilisent un mécanisme réactionnel à double déplacement lors de l'hydrolyse (Biely *et al.*, 1993).

#### C.4.5.1 Résidu nucléophile

L'environnement du résidu nucléophile E76 est mieux conservé que celui de l'acide/base, car trois résidus Y67, Y87 et Q124 créent des liaisons hydrogène directes avec E76, tandis que Y67 semble maintenu en place par des liaisons avec W69 et Y163 (Törrönen *et al.*, 1994). D'ailleurs, le résultat de la mutation Y67F est une xylanase inactive (Wakarchuk *et al.*, 1994b). Cet environnement hydrophile, en abaissant le pKa de E76 dont la valeur a été estimée à 4,6 chez *Bacillus circulans* (McIntosh *et al.*, 1996), pourrait aider à maintenir son état d'ionisation.

### C.4.5.2 Résidu acide/base

Le résidu acide/base E176 a été observé dans deux états conformationnels distincts dans la structure de la xylanase XYNII de *Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)* (Törrönen *et al.*, 1994), subissant une torsion angulaire de 100° qui provoque un raccourcissement de la distance entre les deux résidus catalytiques, qui passe de 9,0 à 6,0 Å. Ce changement pourrait être induit par une modification du pH ou la fixation d'un ligand. E176 est protoné et non chargé quand le pH est inférieur à 5,0 mais perd son proton et change de conformation lors de la catalyse ou à un pH supérieur.

Le suivi des pKa des résidus catalytiques acide/base E78 et nucléophile E172 a été exploré par RMN chez la xylanase de *Bacillus circulans* (McIntosh *et al.*, 1996) et montre la complexité du film catalytique. En absence de substrat lié et avant la glycosylation, les pKa de E78 et E172 sont respectivement de 4,6 et 6,7, le  $pH_{opt}$  de l'enzyme de 5,7. Dans ces conditions, E78 est sous forme ionisé afin d'agir comme un nucléophile et E172 reste protoné pour agir en tant qu'acide de Brönsted. Dans l'état intermédiaire, le pKa de E172 baisse à 4,2 (E78 étant lié n'a pas de pKa), puis remonte à 6,2 à la fin de la réaction, celui de E78 restant à 4,6. D'après les auteurs, le pKa de E172 oscille autour du pH<sub>opt</sub> pour s'adapter à son rôle dual d'acide et de base. E78 est préférentiellement ionisé lorsque le pH augmente en raison de son

pKa plus faible (pKa mesurés dans des mutants où le partenaire est rendu neutre : 4,63 pour E78 et 5,50 pour E172), ce qui élève le pKa de E172 à 6,7. Les changements de pKa de E172 sont donc à la fois reliés au phénomène catalytique et au cycle du nucléophile entre ses états ionisés et glycosylés, mais aussi à l'environnement changeant du réseau de liaisons hydrogène.

#### C.4.6 Spécificité de substrat

#### C.4.6.1 Action sur les arabinoxylanes

Comme nous l'avons vu précédemment, les arabinoxylanes sont essentiellement des chaînes de xylane substituées, le plus fréquemment par des résidus arabinoses et moins souvent par des acides glucuroniques. Des mesures d'hydrolyse sur les AX mettent en évidence la différence de comportement des Xyl–11 face aux Xyl–10 : ces dernières sont capables de couper les AX jusqu'aux branchements courts, même les isomères liés en  $\beta$ –(1,3), alors que les deux xyloses d'un site de coupure des Xyl–11 ne peuvent pas être ramifiés (Biely *et al.*, 1997). C'est une des différences majeures entre les deux grandes familles de xylanases, à relier à la structure de chacune, les Xyl–10 possèdent une crevasse catalytique encaissée et très spécifique des xylanes alors que les Xyl–10 possèdent une crevasse peu profonde et sont plus versatiles au niveau de la spécificité de substrat (xylanes, cellulose,... voir §C.5, p. 44).

#### C.4.6.2 Sous-sites de fixation

Tout comme les autres GH, les Xyl-11 contiennent en plus du site actif des sous-sites qui interagissent de manière non covalente avec les unités monomériques du substrat pour favoriser sa reconnaissance structurale et stéréochimique.

L'étude du profil d'hydrolyse de xylo-oligosaccharides par la xylanase A de *Schizophyllum commune* a mis en évidence que le DP minimum pour une hydrolyse rapide est égal à 5, les produits majoritaires étant  $X_2$  et  $X_3$  (Bray & Clarke, 1992). Cependant, un temps d'hydrolyse long est nécessaire pour parvenir à la dégradation complète de  $X_3$  et  $X_4$ . Par contre,  $X_2$  ne subit pas de coupure. Chez cette enzyme, le taux d'hydrolyse augmente en même temps que le DP du substrat est élevé mais atteint un maximum pour  $X_7$ , les auteurs ont donc postulé l'existence de 7 sous-sites de (-4) à (+3).

En ce qui concerne les déterminants moléculaires des sous-sites, il est d'abord important de noter que ceux des xylanases et des GH en général contiennent souvent des résidus aromatiques Trp, Tyr et Phe qui permettent de créer des interactions de *stacking* avec les

|                   | Origines des données  | (-2)   | (-1)  | (+ 1)                        | (+ 2) | (+ 3) | Références   |
|-------------------|---|--|---|------------------------------|-------|-------|--|
| A. niger          | X <sub>2</sub> modélisé   | <b>Y10</b> (stacking)<br><b>Y164</b> (l. H)                          |   |                              | W172  | Y89   | Tahir <i>et al.</i> , 2002                                       |
| B. circulans      | Complexe avec<br>X <sub>2</sub><br>Intermédiaire<br>covalent                      | W9 (stacking)<br>Y69 (OH)…O2<br>Y166 (OH)…O2<br>Y166 (OH)…O3         | Y69 (OH)O5<br>E78 (OE2)O2<br><b>R112</b> (NE)O2<br><b>R112</b> (NH2)O3<br><b>P116</b> (O)O3<br>E172 (OE1)O1 |                              |       |       | Wakarchuk <i>et al.</i> , 1994<br>Sidhu <i>et al.</i> , 1999     |
| B. agaradhaerens  | Intermédiaires<br>covalents   | <b>W19</b> (stacking)<br>R49…O2<br>R49…O3<br>Y85(OH)…O2              | L47<br>Y85<br>E94<br><b>R129</b> (NH2)O3<br><b>P133</b> (O)O3<br>Q143                                       |                              |       |       | Sabini et al., 1999  |
| T. lanuginosus    | X7 modélisé   | W18 (stacking)<br>Y172   | Y77<br>E86<br><b>R122</b><br><b>P126</b> (O)<br>Q136  | N44…(O)<br>Q136…(O2)<br>E178 |       |       | Gruber <i>et al</i> ., 1998                                      |
| T. reesei (XynII) | X <sub>5</sub> modélisé à<br>partir d'un<br>xylose<br>Intermédiaires<br>covalents | <b>W18</b> (stacking)<br>Y77 (OH)…O2<br>Y171 (OH)…O2<br>Y171 (OH)…O3 | E86<br>Y88 (l. H)   | E177                         | ¥179  | ¥96   | Törrönen <i>et al.</i> , 1995<br>Havukainen <i>et al.</i> , 1996 |

**Tableau 6 – Modes de fixation des résidus des Xyl–11 interagissant avec le substrat, classés par sous-sites**. En rouge : résidu conservé dans une interaction de *stacking*, en bleu, au niveau d'une liaison hydrogène ; case grisée : pas de données ; l. H : interaction via une liaison hydrogène. Lorsqu'un résidu apparaît seul (i.e. sans …), cela signifie que le mode de fixation n'est pas connu ou hypothétique.

sucres (Vyas, 1991) (par exemple Tx–Xyl expose 7 Tyr et 3 Trp dans sa crevasse, *B. circulans* 6 Tyr et 3 Trp). La difficulté est de pouvoir mesurer de façon qualitative et quantitative les interactions entre le substrat et l'enzyme. Plusieurs techniques sont employées :

- mutation d'un résidu ponctuel et mesure de l'activité de la xylanase mutante ;
- co-cristallisation d'un xylo-oligosaccharide (Wakarchuk *et al.*, 1994a) ou d'un inhibiteur (2-fluoro-xylosides (Sabini *et al.*, 1999; Sidhu *et al.*, 1999) ou époxy-alkyl-xylosides (Havukainen *et al.*, 1996)) qui donne la structure d'un intermédiaire covalent;
- modélisation *ab initio* (Gruber *et al.*, 1998), à partir d'une structure déjà existante (Tahir *et al.*, 2002) d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse ; ou prolongement d'un substrat court déjà co-cristallisé (Törrönen & Rouvinen, 1995) (Tableau 6).

Ainsi, l'étude d'un mutant de la xylanase de *Bacillus circulans* où le résidu acide/base est inactivé a révélé que le xylose du sous-site (-2) forme un *stacking* avec le résidu W9 (*B. circulans*) qui est complété par l'existence de liaisons hydrogène : Y69 forme une liaison hydrogène avec un résidu xylose et une autre avec le résidu nucléophile, ce qui contribuerait à son orientation, et la mutation de ce résidu en Phe inactive totalement l'enzyme. Y166 ne forme qu'une interaction, et semble donc moins important pour l'activité, tout comme R112 (Wakarchuk *et al.*, 1994a).

*Trichoderma reesei* produit deux xylanases XYNI et XYNII qui présentent une répartition des sous-sites différente à cause de divergences au niveau de leur profil d'hydrolyse de xylooligomères (Biely *et al.*, 1993). A l'aide de leurs structures 3D et de la modélisation de substrats dans le site actif à partir d'un résidu xylose co-cristallisé, le nombre de sous-sites a pu être mis en évidence. XYNI possèderait 3 sous-sites de (-2) (*stacking* avec Y9) à (+1) (*stacking* avec W166) alors que XYNII en aurait 5, de (-2) (*stacking* avec W18) à (+3) (Törrönen & Rouvinen, 1995). Cette interaction de *stacking* (-2) a été confirmée grâce à la résolution de la structure de XYNII avec des inhibiteurs époxyalkyl (Havukainen *et al.*, 1996), les autres interactions étant formées avec E86 (nucléophile) en (-1), E177 (acide/base) en (+1), Y179 en (+2) et Y96 en (+3). Le **Tableau 6** récapitule les modes de fixation qui ont pu être mis en évidence. Malgré cet apport d'informations, les renseignements obtenus sont focalisés sur la partie nonréductrice du substrat fixé à l'enzyme, i.e. les sous-sites (-2) et (-1), il n'existe aucune information ou seulement quelques hypothèses sur le nombre et le type de résidus qui interagissent avec l'enzyme du côté réducteur. Cette pauvreté d'informations est malheureusement inhérente aux techniques employées.

Néanmoins, il est possible de déduire quelques caractéristiques communes pour les Xyl–11. Avec l'homologie structurale qui caractérise les Xyl–11, il n'est pas imprudent de considérer que le nombre de sous-sites consensus doit être proche de 5, soit de (-3) à (+2). Par ailleurs, comme le montre le **Tableau 6** qui réunit les résultats issus de plusieurs études, certaines interactions sont conservées au niveau des sous-sites (numérotation chez *T. xylanilyticus*) :

- sous-site (-2):

stacking avec un résidu aromatique conservé Trp ou Tyr en position 7

Tyr163 (OH)…O2 et O3

Tyr67 (OH)---O2

- sous-site (-1):

R110 (NH2)…O3

P133 (O)…O3

Ces interactions semblent bien être des marqueurs de spécificité des Xyl-11.

#### **C.4.7 Inhibiteurs protéiques**

Deux classes d'inhibiteurs protéiques spécifiques des xylanases ont été identifiés chez certaines céréales comme l'orge ou le blé dur : XIP (*xylanase inhibitor protein*) et TAXI (Triticum aesstivum *xylanase inhibitor*). Dans la Nature, ils serviraient aux plantes pour se protéger des organismes pathogènes, en intégrant tout un système de défense incluant des inhibiteurs d'amylases ou de chitinases. Dans les procédés industriels dans lesquels les xylanases sont impliquées (brasserie, panification), la présence d'inhibiteurs constitue un problème technique. Par conséquent, de nombreuses études sont actuellement menées afin de déterminer leur mode d'action (Sorensen *et al.*, 2004).

En ce qui concerne la spécificité de ces inhibiteurs, il est remarquable de noter que lors de tests d'inhibitions sur des xylanases fongiques ou bactériennes de Xyl-10 ou Xyl-11, XIP-I



**Figure 16 – Structure du complexe entre XIP-I et la Xyl–11 de** *Penicillium funiculosum* (d'après la structure 1TE1 déposée à la PDB, Payan *et al.*, 2004). La boucle inhibitrice  $\alpha 4\beta 5$  est indiquée en bleu et la surface de Xyl–11 est rendue transparente pour indiquer la localisation de la boucle dans le site actif, à côté du pouce.

(l'inhibiteur de la classe XIP le plus commun) n'inhibe que les xylanases fongiques, sans préférence pour la famille (Flatman *et al.*, 2002), alors que la classe des inhibiteurs TAXI n'inhibe que les Xyl–11 (Gebruers *et al.*, 2001 ; Goesaert *et al.*, 2001).

# C.4.7.1 XIP-I

XIP-I a été purifiée pour la première fois à partir de la farine de blé (*Triticum aestivum* var. Soisson) (McLauchlan *et al.*, 1999). C'est une protéine monomérique de 29 kDa dont la structure 3D est celle d'une *TIM-barrel* ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (Payan *et al.*, 2003). Elle possède une forte homologie de structure avec les chitinases de la famille 18 des GH, mais elle n'a aucune activité sur la chitine.

Une étude réalisée sur la xylanase d'*Aspergillus niger* a révélé que XIP-I semble se fixer au pouce des xylanases de la famille 11 par l'intermédiaire des nombreux acides aminés dont la chaîne latérale est exposée au solvant. C'est le cas de N117 (*A. niger*) notamment, dont la mutation en Ala abolit la fixation de XIP-I (Tahir *et al.*, 2002).

Par ailleurs, il existe curieusement un phénomène d'inhibition compétitive chez XIP-I entre les xylanases fongiques et bactériennes, quelle que soit la famille, alors que les structures protéiques sont très différentes (Juge *et al.*, 2004). La réponse à cette énigme a été donnée quand la structure du complexe XIP-I et de la xylanase de *Penicillium funiculosum* a été obtenue (Payan *et al.*, 2004). Une seule molécule de XIP-I est en effet capable de fixer simultanément une xylanase de la famille 10 et une autre de la famille 11 par deux sites différents. Lors de l'inhibition des Xyl–11, une « tête » inhibitrice située sur la boucle  $\alpha 4\beta 5$ , et qui comporte notamment un résidu arginine, vient obstruer le site actif en créant des interactions avec les résidus fixant normalement le substrat, l'inhibiteur étant guidé par des marqueurs de reconnaissance importants comme le pouce et la paume (**Figure 16**).

L'absence d'inhibition des Xyl-11 d'origines bactériennes aurait donc pour causes des différences structurales au niveau notamment du pouce. Chez *Bacillus subtilis*, le pouce est plus long d'un résidu, et chez *Bacillus agaradhaerens*, la séquence EGTS conservée chez les Xyl-11 est remplacée par la séquence KGIA, où le résidu Ile au lieu de Thr entrerait en conflit stérique avec la tête inhibitrice et empêcherait sa fixation.

| 4              |   |                          |  |  |  |  |
|----------------|---|--------------------------|--|--|--|--|
| Plant          | Nom   | Tx–Xyl                   |  |  |  |  |
| 1 STURY        | Origine microbienne   | Thermobacillus           |  |  |  |  |
| L ER           |   | xylanilyticus            |  |  |  |  |
| té             | Origine géographique  | Echantillon de terre     |  |  |  |  |
| nti            |   | sous un tas de           |  |  |  |  |
| de             |   | composte, près de Lille, |  |  |  |  |
| -              | Nom do famillo  |                          |  |  |  |  |
|                |   | Familie TT des GH        |  |  |  |  |
|                | Exection  | EU 3.2.1.8               |  |  |  |  |
|                | Nombre de résidus   | endo-p-(1,4)-Xylanase    |  |  |  |  |
| S              | Masse moléculaire   | 102<br>20.602 Do         |  |  |  |  |
| ale            | Repliement  |                          |  |  |  |  |
| onné<br>uctura | Composition   | 57% on fouillets ß       |  |  |  |  |
|                |   | $6\%$ en hélice $\alpha$ |  |  |  |  |
| o tr           | Description   | Crevasse longue et       |  |  |  |  |
|                | A A REPORT OF STREET, | encaissée                |  |  |  |  |
| 182            | Dyade catalytique   | E76 (nucléophile)        |  |  |  |  |
| es             |   | E169 (acide/base)        |  |  |  |  |
| es             | pH optimal  | ~6,0                     |  |  |  |  |
| nn             | Stabilité au pH   | Plus de 50% d'activité   |  |  |  |  |
| on<br>tio      |   | de pH 4,2 à 8,2          |  |  |  |  |
| D 2            | Température optimale  | 75°C                     |  |  |  |  |
| fo             | Activité  | ~1800 UI/mg à 60°C       |  |  |  |  |
|                | Stabilité à la température  | Plusieurs heures à 60°C  |  |  |  |  |
| -              | Signes particuliers   | xylanaso thermostable    |  |  |  |  |
|                | Signes particuliers   | sans activité            |  |  |  |  |
|                |   | cellulolytique           |  |  |  |  |
| - HARRIS       |   |                          |  |  |  |  |

Figure 17 – Caractéristiques principales de Tx–Xyl.

## C.4.7.2 TAXI

La classe des inhibiteurs TAXI existent sous deux formes différentes : une forme mature monomérique de 40 kDa (TAXI-I) et une seconde forme non mature dimérique, composée de deux unités de masse 29 et 11 kDa liées par un pont disulfure.

L'inhibition des Xyl–11 semble réversible et se fait dans un rapport molaire de 1:1 (Gebruers *et al.*, 2004). Pour comprendre le fonctionnement de l'inhibition, différents essais de mutations des résidus à la surface de l'enzyme autour de la crevasse catalytique de l'enzyme ont été menés (Sibbesen & Sorensen, 2001). Il apparaît que la mutation ponctuelle de Asp<sup>11</sup> (*Bacillus subtilis*) en résidus aromatique ou basique annule l'inhibition. Reste à déterminer si c'est le caractère acide de ce résidu qui permet l'inhibition ou bien son remplacement par un résidu plus volumineux qui la supprime (Sibbesen & Sorensen, 2001). Par ailleurs, il est probable que les résidus G12, G13 et G34 jouent également un rôle, car leur mutation provoque des diminutions de l'inhibition (jusqu'à 75%). Ces résultats suggèrent que plusieurs résidus interviennent probablement lors de la fixation des protéines TAXI, qui doivent recouvrir totalement ou partiellement la crevasse catalytique.

## C.4.8 La Xyl-11 de Thermobacillus xylanilyticus

La bactérie Thermobacillus xylanilyticus thermophile et anaérobique a été isolée à partir d'échantillons de sol se trouvant sous un tas de fumier dans le nord de la France. Elle dégrade naturellement les hémicelluloses grâce notamment à la sécrétion d'une endo $-\beta$ -(1,4)-xylanase de la famille 11 Tx-Xyl qu'elle produit en grande quantité, environ 110 UI/mL en 9 h de culture (Samain et al., 1992 ; Samain et al., 1997 ; Touzel et al., 2000). Le mutant catabolique *Thermobacillus xylanilyticus* D3 obtenu par mutagenèse chimique avec de l'éthyl-méthane sulfonate permet une expression plus importante de la xylanase. Le clonage du gène codant pour Tx-Xyl et la résolution de sa structure 3D ont été menés (Harris et al., 1997), les principales caractéristiques de cette enzyme sont rassemblées sur la Figure 17.

### C.5 Famille 10

#### **C.5.1** Structure et catalyse

Les xylanases constituent l'essentiel de cette famille, mais on note la présence dans CAZy de cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) et d'endo $-\beta$ -1,3-xylanases (EC 3.2.1.8). Au contraire des Xyl-11, les Xyl-10 possèdent un domaine catalytique de poids moléculaire plus élevé et un



acide férulique ou p-coumarylique

Figure 18 – Récapitulatif de l'action des xylanases sur les hétéroxylanes. Les sites de coupure sont indiqués par une flèche rouge.

pI plus faible. Ce domaine consiste en un repliement en  $(\beta/\alpha)_8$  et le site actif se trouve au centre d'une crevasse longue et peu enfoncée, délimitée par les huit boucles  $\beta\alpha$  à la surface du domaine (Derewenda *et al.*, 1994). Ces enzymes, comme de nombreuses GH, possèdent des CBM, et aussi d'autres domaines dont le rôle exact n'est pas clairement défini. Dans le cas de la xylanase thermostable XynA chez *Thermotoga maritima*, la suppression d'un tel domaine provoque une baisse de 50% de l'activité à 75°C (Winterhalter *et al.*, 1995). Cependant, un domaine similaire existe aussi chez des Xyl–10 mésophiles. Par conséquent, il a été proposé qu'il jouerait un autre rôle, qui pourrait être celui de XBD, comme proposé chez *Caldibacillus cellulovorans* (Sunna *et al.*, 2000).

La catalyse fait appel à deux résidus Glu parfaitement conservés et se réalise via un mécanisme à double déplacement avec rétention de la configuration anomérique. Le résidu présent sur la boucle  $\beta\alpha 4$  est le résidu acide/base, celui sur la boucle  $\beta\alpha 7$  est le nucléophile. Le maintien de l'état d'ionisation des résidus de cette dyade nécessiterait la présence de deux résidus conservés H81 et H207 chez *Streptomyces lividans*, dont la mutation altère notablement la catalyse (Roberge *et al.*, 1997). Par ailleurs, le nombre de sous-sites moyen serait égal à 4 et semblerait plus faible que celui des Xyl–11, même si cette valeur peut varier d'une enzyme à une autre (Biely *et al.*, 1997).

### C.5.2 Spécificité de substrat

Ce qui est particulièrement intéressant chez les xylanases de la famille 10 est le caractère versatile de leur catalyse : elles sont capables d'hydrolyser les xylo-olgosaccharides jusqu'aux ramifications des arabinoses et peuvent même cliver les liaisons  $\beta$ –(1,3) (Biely *et al.*, 1997). De plus, elles peuvent dégrader des substrats cellulosiques de faibles masses (Gilkes *et al.*, 1991 ; Biely *et al.*, 1997). Cette multiplicité d'activité est tout d'abord à relier au domaine catalytique plus ouvert et moins encaissé que celui des Xyl–11 qui sont mono-spécifiques. Les boucles  $\beta\alpha$  du TIM-barrel apparaissent naturellement plus mobiles que la structure compacte en *jelly-roll* (Biely *et al.*, 1997) (**Figure 18**).

Deux résidus Y87 et L314 chez *Pseudomonas cellulosa* semblent discriminer l'hydrolyse de substrats à base de xylose et de glucose (Andrews *et al.*, 2000). La mutation Y87A augmente l'activité enzymatique probablement grâce à la suppression de la gène stérique avec le groupement OH en position 6 au niveau du sous-site (-2). De plus, le résidu L314 influe, par sa conformation, sur la position du résidu adjacent W313 qui fixe un résidu xylose en (-1). Il

apparaît critique non seulement pour l'arrimage des résidus, mais aussi pour adapter leur conformation à l'état de transition (Andrews *et al.*, 2000).

Les Xyl–10 peuvent être inhibées par XIP-I tout comme les enzymes de la famille 11 (voir \$C.4.7, p. 42), mais seules sont affectées les enzymes fongiques dans ces deux familles. Le site actif est occupé par plusieurs acides aminés aromatiques (Payan *et al.*, 2004). La résistance des Xyl–10 d'origine bactérienne à l'inhibition par XIP-I s'explique par la présence de boucles qui comportent des résidus possédant des chaînes latérales longues capables de provoquer des gênes stériques avec XIP-I.

# C.6 Autres familles de xylanases

# C.6.1 Famille 5

La famille 5 est la famille des GH contentant le plus de séquences. Elle est très hétérogène, car des enzymes provenant de 11 classes (ou EC) différentes sont représentées, parmi lesquelles des chitosanases, cellulases, mannanases et bien sûr des xylanases. Pour montrer la diversité des xylanases de cette famille, où finalement très peu de résidus sont conservés, les modes d'action de trois xylanases sont présentées, une endoxylanase, une exoxylanase et enfin une xylanase ramification-dépendante.

Tout d'abord, la xylanase d'*Aeromonas caviae (punctata)* ME-1 (Suzuki *et al.*, 1997), peut hydrolyser le xylane de bouleau pour libérer des xylotrioses et des xylo-oligosaccharides de plus grand DP, tout comme les xylanases de la famille 11.

*Trichoderma reesei* produit une XYN IV (Tenkanen *et al.*, 2003) qui attaque les xylanes substitués ou non à partir de l'extrémité réductrice, relargant principalement du xylose et du xylobiose. Cette enzyme ne peut pas couper de liaisons où l'un des résidus xylose est substitué, les plus petits produits ramifiés issus de l'hydrolyse d'arabinoxylanes et glucuronoxylanes sont des xylotrioses substitués sur le résidu central.

Enfin, la xylanase d'*Erwinia chrysanthemi* D1 (Hurlbert & Preston, 2001) a la propriété singulière de ne pouvoir reconnaître que le groupe carboxylique d'un acide glucuronique lié en  $\alpha$ -(1,2) sur la chaîne de xylane pour couper la liaison  $\beta$ -(1,4) entre les deux résidus xyloses adjacents. La structure de cette enzyme est composée d'un domaine catalytique ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> lié via deux *linkers* et de nombreuses interactions électrostatiques à ce qui pourrait être un XBD en forme de tonneau  $\beta$ 9, mais n'est pas encore confirmée (Larson *et al.*, 2003, code

PDB 1NOF). Les résidus catalytiques seraient deux acides glutamiques qui agiraient selon un mécanisme de rétention de la configuration anomérique. Comme les Xyl–10, les Xyl–5 appartiennent au clan GH–A. Par conséquent, ces deux familles de xylanases partagent la même architecture et leurs crevasses catalytiques présentent de nombreux résidus aromatiques qui sont conservés chez les deux familles. En ce qui concerne la Xyl–5 d'*Erwinia chrysanthemi*, une crevasse catalytique possédant 6 sous-sites de fixation a été proposée, mais la sélectivité de l'enzyme envers la reconnaissance des acides glucuroniques reste encore inexpliquée (Larson *et al.*, 2003).

#### C.6.2 Famille 8

Peu d'informations sur la fonction des Xyl–8 sont disponibles à ce jour, car seulement quatre organismes produisant des xylanases de cette famille ont été mis en évidence, les autres enzymes de cette famille étant surtout des glucanases. L'enzyme la mieux caractérisée est produite par un organisme psychrophile, *Pseudoalteromonas haloplanktis*. Cette enzyme possède un optimum d'activité de 25°C et un temps de demi-vie de quelques minutes seulement à 55°C (Collins *et al.*, 2003). Elle semble présenter une activité exclusivement xylanolytique puisqu'elle est active uniquement sur les hétéroxylanes et pas sur la cellulose, la CMC, l'amidon ou le chitosane, elle libère des X<sub>3</sub> et X<sub>4</sub> comme produits principaux (Collins *et al.*, 2002).

Sa structure est celle d'un tonneau  $(\alpha/\alpha)_6$  qui présente une crevasse catalytique en son sommet où l'on retrouve une dyade catalytique constituée probablement d'un Glu et d'un Asp agissant avec un mécanisme d'inversion de configuration (Van Petegem *et al.*, 2003, codes PDB 1H12, 1H13, 1H14). En la comparant à l'endoglucanase de *Clostridium thermocellum*, de même famille et de même architecture, les auteurs notent des différences au niveau du nombre de sous-sites ainsi qu'au niveau de leur localisation. La sélectivité de l'enzyme pour le xylane par rapport à la cellulose aurait pour origine non seulement l'absence de résidus formant une interaction avec l'OH6 du glucose dans le sous-site (-2), et en plus l'établissement d'une gêne stérique avec le même hydroxyle (Van Petegem *et al.*, 2003). Par ailleurs, sa structure faiblement fournie en ponts salins et la présence par contre d'un grand nombre de résidus hydrophobes exposés au solvant seraient parmi les causes de sa grande flexibilité nécessaire pour son fonctionnement à basse température.

Récemment, une autre xylanase de la famille 8 a été caractérisée, sa structure avec son repliement  $(\alpha/\alpha)_6$  étant également disponible (codes PDB 1WU4, 1WU5, 1WU6). Il s'agit

| Famille | Clan | Repliement du<br>domaine<br>catalytique | Mécanisme<br>catalytique | Dyade<br>acide/base – nucléophile |
|---------|------|---|--------------------------|-----------------------------------|
| 5       | GH–A | $(\beta/\alpha)_8$                      | Rétention                | Glu – Glu                         |
| 8       | GH-M | $(\alpha/\alpha)_6$                     | Inversion                | Glu – Asp*                        |
| 10      | GH–A | $(\beta/\alpha)_8$                      | Rétention                | Glu – Glu                         |
| 11      | GH–C | β–jelly roll                            | Rétention                | Glu – Glu                         |
| 43      | GH–F | β– <i>propeller</i> à 5<br>pales        | Inversion                | Glu* – Asp*                       |

Tableau 7 – Familles d'enzymes présentant une activité xylanolytique parmi les GH etcaractéristiques associées. \* : existence non confirmée expérimentalement.

d'une enzyme qui n'hydrolyse que les xylo-oligosaccharides mais pas les xylanes. Elle libère uniquement le xylose à partir de l'extrémité réductrice en reconnaissant spécifiquement le groupement OH anomérique dans la confirmation  $\beta$  de l'extrémité R (Honda & Kitaoka, 2004) Ce genre d'activité exo-oligoxylanolytique est unique, et devrait être prochainement mieux caractérisé après l'analyse de la structure.

#### C.6.3 Famille 43

Il s'agit d'une famille peu étudiée aux niveaux physico-chimique et fonctionnel, qui est en plus très diversifiée, avec des  $\beta$ -xylosidases, des  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases et des arabinanases. La seule enzyme présentant une activité xylanolytique provient de *Bacillus polymyxa*, mais ce n'est en fait pas une vraie xylanase, car elle présente aussi une activité d' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. En se basant sur la conservation des structures des autres enzymes de cette famille, les auteurs postulent que les xylanases doivent posséder une architecture en  $\beta$ -propeller à 5 pales (Nurizzo *et al.*, 2002b). De même, étant donné que la famille 43 appartient au même clan que la famille 62, il est probable que la catalyse s'effectue par inversion de la configuration anomérique. La récente parution de la structure d'une  $\beta$ -xylosidase de *Bacillus halodurans* (code PDB 1YRZ) pourrait apporter des renseignements précieux sur cette famille. Le **Tableau 7** et la **Figure 19** récapitulent les caractéristiques catalytiques et structurales essentielles des xylanases.

# C.7 Applications des xylanases

Les xylanases sont impliquées dans des domaines très variés de l'industrie : alimentation humaine (clarification de jus), alimentation animale (amélioration de la digestibilité et de la biodisponibilité des nutriments), traitement de la pâte à papier (blanchiment de la pâte kraft), et conversion des composés lignocellulosiques (bioéthanol, composés de chimie fine) (**Tableau 8**). Ces deux dernières applications vont être présentées plus en détails.

### C.7.1 Traitement de la pâte à papier et du papier

Dans la fabrication du papier, une étape consiste à retirer les lignines de la pâte kraft, qui lui donnent sa couleur marron : c'est le blanchiment, qui permet de rendre le papier kraft blanc. Les procédés traditionnellement employés utilisent des agents chlorés et rejettent de grandes quantités de chlorolignines d'une part, produits toxiques, cancérigènes et non biodégradables (Ali & Sreekrishnan, 2001), et d'autre part des composés phénoliques chlorés toxiques, résistants à la dégradation. Tout ceci constitue une source importante de pollution de l'environnement. De plus, ces procédés peuvent dégrader partiellement la cellulose et



**Figure 19 – Représentation des structures des enzymes xylanolytiques** (code PDB entre parenthèses). GH–5 : *Erwinia chrysanthemi* D1 (1NOF) ; GH–8 : *Bacillus halodurans* C125 (1WU5) ; GH–10 : *Cellulomonas fimi* (2XYL) ; GH–11 : *Thermobacillus xylanilyticus* ; GH–43 : *Bacillus halodurans* C-125 (1YRZ).

diminuer la qualité du papier (Subramaniyan & Prema, 2002). Les xylanases constituent une alternative au blanchiment chimique et permettraient de diminuer le recours aux agents chlorés (Viikari *et al.*, 1986). En effet, les hémicelluloses et les lignines sont intimement liées physiquement et chimiquement à la cellulose. La dégradation enzymatique des hémicelluloses (principalement des hétéroxylanes) permet une déstructuration sélective qui conduit à la solubilisation des xylanes et à l'extraction concomittante des lignines (Lundgren *et al.*, 1994). À condition de disposer d'une préparation de xylanases qui ne présente aucune activité cellulolytique, la cellulose demeure indemne lors de l'extraction, donc la qualité des fibres du papier est préservée. En 2002, la production de papier par des procédés sans chlore avec ou sans enzyme (*totally chlorine-free*, TCF) était de 15% environ, valeur qui pourrait aller à la hausse avec les restrictions d'émissions de composés polluants décidées par les politiques gouvernementales.

### C.7.2 Valorisation des lignocelluloses : production de bioéthanol

Les lignocelluloses représentent sur Terre 50% de la biomasse (soit 10 à 50 milliards de tonnes) (Classen *et al.*, 1999). En partie, il s'agit de coproduits de la filière alimentaire (pailles de blé, sons, rafles de maïs, etc.) dont la valeur commerciale est généralement faible, et dont les volumes dépassent souvent les besoins des utilisations traditionnelles (alimentation et literie animale, enfouissement). Ces co-produits sont pourtant riches en glucides (glucose, arabinose et xylose) qui pourraient être valorisés. En ce qui concerne le xylose, sucre très abondant chez les végétaux, plusieurs voies de valorisation sont envisagées. En plus du xylitol (édulcorant, substitut du saccharose pour les diabétiques) déjà produit à l'échelle industrielle, le xylose pourrait servir pour fabriquer des solvants (en particulier du 2,3-butanediol, solvant précurseur de nombreux polymères et résines synthétiques), des tensio-actifs, et surtout de l'éthanol (biocarburant). C'est ce dernier type de valorisation que nous avons choisi de présenter par la suite.

Dans le monde entier, la conversion de l'amidon (généralement de l'amidon de maïs) en éthanol est une application de biotechnologie à très grande échelle. La demande de bioéthanol, pour l'instant en tant qu'additif à l'essence ordinaire, est en pleine croissance grâce à l'abandon programmé des additifs actuels (le plus commun étant le ter-méthyl-butyl éther) qui contaminent les nappes phréatiques et surtout au déclin programmé avant 2010 de la production d'or noir (Campbell & Laherrere, 1998). Le bioéthanol présente l'avantage d'être renouvelable, et il rentre déjà dans la composition de certains carburants à la hauteur de 10% (v/v) aux États-Unis et au Brésil notamment.

| Marché                  | Application   | Fonction  |  |  |  |  |
|-------------------------|---|---|--|--|--|--|
| Alimentation            | Jus de fruits, nectars, purées, huiles, vins              | Amélioration de la macération et de la clarification des jus, réduction de la viscosité.<br>Augmentation des taux d'extraction et de la filtration.   |  |  |  |  |
| humaine                 | Panification  | Amélioration de l'élasticité et de la résistance de la pâte, meilleure manipulation, meilleure texture du pain  |  |  |  |  |
| Alimentation<br>animale | Nourriture pour animaux<br>monogastriques et<br>ruminants | Diminution du contenu en polysaccharides non-amidon d'où une baisse de la viscosité et une meilleure disponibilité des protéines et de l'amidon qui accroît la digestibilité et la valeur nutritionnelle des aliments.            |  |  |  |  |
| Pâtes et papiers        |   | Blanchiment des pâtes kraft, séparation des encres, donc réduction de l'utilisation en agents chlorés et alcalins<br>Amélioration des procédés mécaniques de <i>pulping</i> qui aboutit à une baisse de la consommation d'énergie |  |  |  |  |
| non-                    | Amidon  | Séparation facilitée de l'amidon et du gluten par réduction de la viscosité   |  |  |  |  |
| alimentaires            | Textiles  | Préparation des fibres par trempage et macération remplaçant les procédés chimiques   |  |  |  |  |
|                         | Bioconversion   | Traitement des déchets<br>Production de composés fermentescibles, carburants renouvelables (bioéthanol), chimie fine<br>(tensio-actifs)   |  |  |  |  |

Tableau 8 – Applications actuelles des xylanases dans les industries alimentaires et non-alimentaires (d'après Collins et al., 2005).

Mais cette bioconversion peut également être effectuée à partir des co-produits lignocellulosiques en deux étapes :

- saccharification : hydrolyse du polymère, délignification pour libérer la cellulose et les hémicelluloses de leur complexe avec la lignine, puis dépolymérisation pour libérer des sucres ;
- fermentation de ces sucres pentoses et hexoses en éthanol.

À la différence de l'amidon, la bioconversion des lignocelluloses en éthanol constitue un défi technologique considérable. D'abord, les lignocelluloses sont des matériaux composites, renfermant de la cellulose, des lignines, et des hémicelluloses, qui sont récalcitrantes aux attaques enzymatiques. Les lignines constituent une matrice hydrophobe avec laquelle interagissent de manière non-spécifique des enzymes. La cellulose, de par sa structure cristalline, constitue une matière résistante. Quant aux hémicelluloses, leur imbrication dans le réseau pariétal et leur complexité chimique et structurale constituent autant de facteurs limitants pour les hémicellulases.

La biodégradation est avantageuse par rapport aux procédés chimiques conventionnels puisqu'elle a lieu à des températures douces, donne de meilleurs rendements, moins de réactions parasites, consomme moins d'énergie, et surtout n'engendre pas de dégradation partielle ou totale de certains constituants de la biomasse (Lee, 1997). En effet, la voie chimique peut détruire les sucres fermentescibles xylose et arabinose, ce qui constitue une perte de valeur importante. De plus, la dégradation du xylose et de l'arabinose provoque la formation de composés furfuraux. Ces molécules sont toxiques pour les levures fermentaires qui sont utilisées lors de la conversion des sucres en bioéthanol.

La saccharification des hétéroxylanes requiert l'emploi d'hémicellulases dont des xylanases, et des enzymes débranchantes comme les arabinofuranosidases (action synergique). Les obstacles à une dégradation totale sont que l'action des xylanases est entravée par les substitutions sur les polymères, et que les enzymes débranchantes ne sont actives que sur des oligosaccharides (Lee & Forsberg, 1987). Les procédures de prétraitements revêtent d'ailleurs une importance considérable pour la bonne marche de la saccharification.

Ensuite, la fermentation du xylose en éthanol n'est aujourd'hui possible que par des levures comme *Pichia stipitis* ou *Candida shehate* qui donnent des taux de production d'éthanol faibles comparée à la fermentation du glucose par *Saccharomyces cerevisiae* par exemple.

L'exploitation commerciale de ces levures se heurte à leur faible tolérance à l'éthanol, aux faibles vitesses de fermentation et à leur sensibilité aux inhibiteurs générés lors de la saccharification comme le furfural (Du Preez, 1994; Hahn-Hagerdal *et al.*, 1994). L'arabinose est également présent dans les hydrolysats mais peu de souches sont capables de le fermenter.

Les efforts de recherche se concentrent sur l'amélioration de la production d'éthanol par fermentation chez les bactéries utilisatrices de sucres variés, et sur l'introduction de la capacité d'utilisation des pentoses chez les levures bonnes productrices d'éthanol.

Une alternative à cette bioconversion à deux étapes est la réalisation simultanée de la saccharification et de la fermentation en ajoutant des enzymes hydrolytiques et des microorganismes fermenteurs dans le réacteur (Chandrakant & Bisaria, 1998). L'inconvénient est le coût du traitement enzymatique qui représente un des facteurs limitants.

Les recherches actuelles doivent permettre l'amélioration de l'efficacité et des coûts des prétraitements, la formulation d'un cocktail enzymatique adapté, et le développement de nouvelles souches plus tolérantes à l'éthanol, meilleures productrices d'éthanol à partir de plusieurs sucres simultanément et moins sensibles aux inhibiteurs.

# **D** Les $\alpha$ -L-arabinofuranosidases

# **D.1** Introduction

Les  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (Abf, nom systématique  $\alpha$ -L-arabinofuranoside arabinofuranohydrolase, E.C. 3.2.1.55) sont les enzymes qui libérent les résidus L-arabinoses à partir des hémicelluloses d'origine végétale : soit des homopolymères comme les arabinanes, soit des hétéropolymères tels que les arabinogalactanes, la gomme arabique et les hétéroxylanes. Chez les bactéries et les organismes fongiques, elles participent de manière synergique à la dégradation des hétéroxylanes en vue de la récupération de sucres pour leur métabolisme énergétique. Chez les plantes, elles sont partie prenante du mécanisme régulateur du dynamisme de la paroi végétale dont la structure doit être adaptée aux conditions environnementales (Fulton & Cobbett, 2003). Nous allons d'abord présenter ces substrats, puis les Abf qui les dégradent.

### **D.1.1 Substrats**

Les hémicelluloses contiennent des résidus arabinoses en quantités très diverses :



Figure 20 – Structure d'un arabinane ramifié.

- les arabinanes (constituants des pectines): ils sont constitués d'au moins 90% de L-arabinofuranoses liés en α-(1,5), soit linéaires, soit substitués en O2 et/ou O3 par d'autres arabinoses (Figure 20). On retrouve aussi d'autres substituants (galactose, rhamnose, acides galacturonique et férulique);
- les arabinogalactanes (constituants des pectines): on les retrouve sur les chaînes latérales des galacturonanes et rhamnogalacturonanes auxquelles ils sont liés en α-(1,3) et α-(1,5);
- la gomme arabique : proche des arabinogalactanes mais avec une forte variabilité de résidus substitués ;
- les hétéroxylanes : comme nous l'avons vu, ils constituent la plus grande fraction des hémicelluloses. La concentration des résidus arabinoses peut varier notablement en fonction de l'origine botanique (Tableau 1) : 1% seulement dans le xylane de bouleau, jusqu'à 45% dans le son de riz neutre. Dans les bois tendres, les arabinoses se lient aux xyloses en O2 et O3, et peuvent en outre être estérifiés par des acides *p*-coumariques ou féruliques (Mueller-Hartley *et al.*, 1986). Au contraire, ils sont presque absents dans les bois durs.

#### D.1.2 Propriétés générales et classification

Les Abf sont généralement des *exo*-enzymes qui hydrolysent à partir de l'extrémité NR, elles sont capables de cliver les liaisons  $\alpha$ -(1,2),  $\alpha$ -(1,3) et  $\alpha$ -(1,5) et sont actives sur le paranitrophényl- $\alpha$ -L-arabinofuranose (pNP-Araf) (Saha, 2000). Il existe également une famille d'enzymes capables de dégrader l'arabinane par un mécanisme *endo* et appelées des arabinanases (1,5- $\alpha$ -L-arabinane 1,5- $\alpha$ -L-arabinofuranohydrolases, GH-43, E.C. 3.2.1.99), qui libèrent des arabinotrioses ou des arabino-oligosaccharides de DP plus élevé.

Certaines  $\beta$ -galactosidases (EC 3.2.1.23) et  $\beta$ -D-fucosidases (EC 3.2.1.38) peuvent aussi hydrolyser les résidus  $\alpha$ -L-arabinoses.

Les plus gros producteurs d'Abf décrits sont *Thermoascus auranticus* et différentes espèces de *Bacillus*. La première description d'une Abf et sa purification ont été réalisés chez *Aspergillus niger*, pour effectuer l'hydrolyse de L-arabinane (Kaji *et al.*, 1969 ; Tagawa & Kaji, 1969). On retrouve de multiples formes d'Abf dans les jus de cultures de nombreuses bactéries. Par ailleurs, des Abf ont été isolées chez des plantes. De nombreux gènes ont été

clonés dans des levures et des bactéries permettant une production recombinante en forte quantité.

Les Abf existent sous forme de monomères et de multimères (2, 4 et 8) de masse très variable (de 31 à 105 kDa) et dont les propriétés physico-chimiques sont très diverses. Par exemple, les optima de pH vont de 3 à 6,9 et les optima de température de 40 à 75°C (Saha, 2000).

À partir des Abf isolées chez *Aspergillus niger*, on a proposé dans un premier temps de distinguer d'un côté les ABF-A actives uniquement sur de petits substrats comme le pNP–Ara*f* et des arabino-oligosacchairdes, et de l'autre les Abf-B qui hydrolysent en plus des substrats branchés comme les arabinoxylanes (Pitson *et al.*, 1996). Comme la stéréochimie est liée à la structure, qui découle de la séquence, les auteurs prédisent, après une analyse des séquences et de la stéréochimie, que les arabinanases procèdent via une inversion de configuration et qu'au contraire, les Abf hydrolysent via une rétention de configuration (Pitson *et al.*, 1996).

Beldman *et al.* ont aussi proposé de les classer selon leur spécificité de substrat : activité sur les polymères, pas d'activité sur les polymères et enfin spécificité d'action sur les arabinoxylanes (Beldman *et al.*, 1997).

Comme les autres GH, les Abf sont classées d'après leur homologie de séquences, et réparties dans six familles d'après la base de données CAZy : 3, 43, 51, 54, 62 et 93. Au sein de chaque famille, plusieurs activités sont souvent recensées, et de nombreuses enzymes apparaissent bifonctionnelles. La spécificité d'action des Abf varie considérablement en termes de liaisons  $\alpha$ -(1,2,),  $\alpha$ -(1,3) et  $\alpha$ -(1,5), et de substrats (arabinanes, arabinoxylanes, arabinogalactanes). Afin de comparer leurs activités respectives, le substrat synthétique pNP-Ara*f* est souvent employé.

Comme pour les xylanases, on constate que différentes classifications co-existent. Puisque la classification CAZy est aujourd'hui la plus employée, nous avons choisi de présenter les caractéristiques des familles d'Abf en mettant en avant la diversité du mode d'action de ces enzymes, en essayant de les relier à leurs structures, lorsque celles-ci sont disponibles.

| Organisme <sup>a</sup>   | Nom de<br>l'Abf  | Masse<br>moléculaire<br>(kDa) <sup>b</sup> | pH <sub>opt</sub> | $T_{opt}$ (°C) | Composés<br>hydrolysés <sup>°</sup> | Composés non<br>hydrolysés <sup>c</sup> | Spécificité de<br>liaison <sup>d</sup> | Référence                   |
|--|------------------|--|-------------------|----------------|-------------------------------------|---|--|-----------------------------|
| Arabidopsis thaliana P   | AtASD1<br>AtASD1 | _  | _                 | _              | _                                   | _                                       | _                                      | Fulton et al., 2003         |
| Aspergillus awamori IFO<br>4033 🖪                              | AbfI             | 81   | 4,0               | 60             | AB, ABD, AG, AX,<br>GA, pNP–Araf    | pNP–Arap                                | 5 > 3 > 2                              | Kaneko et al., 1998         |
| Aspergillus kawachii IFO<br>4308 🖪                             | AkabfA           | 80   | 4,0               | 55             | AX                                  | —                                       | —                                      | Koseki et al., 2003         |
| Aspergillus<br>niger <b>F</b>                                  | AbfA             | 128  | 4,1               | 50             | AB, pNP–Araf                        | ABD, AX                                 | 5                                      | Rombouts et al., 1988       |
| Bacillus pumilus PS213 B                                       | _                | 56 (220)                                   | 7,0               | 55             | pNP–Araf                            | —                                       |  | Degrassi et al., 2003       |
| Bifidobacterium longum<br>B667 <mark>B</mark>                  | AbfB             | 61 (260)                                   | 6,0               | 45             | AB, AX, pNP–Araf                    | ABD                                     | 2, 3, 5                                | Margolles et al., 2003      |
| Cellvibrio japonicus<br>(Pseudomonas cellulosa) <mark>B</mark> | Abf51A           | 57   | 5,5               | 55             | AB, ABD, AX,<br>pNP–Araf            | pNP–Arap                                | 2 = 3 >> 5                             | Beylot <i>et al.</i> , 2001 |
| Clostridium cellulovorans <b>B</b>                             | ArfA             | 56   | 8,0~9,0           | 40~50          | AB, AG, AX,<br>pNP–Araf             | pNP–Arap                                |  | Kosugi et al., 2002         |
| Clostridium stercorarium B                                     | ArfB             | 52 (195)                                   | 5,0               | 70             | AG, AX, pNP–Araf                    | pNP–Arap                                |  | Schwarz et al., 1995        |
| Cytophaga xylanolytica <b>B</b>                                | ArfI             | 56 (160~210)                               | 5,8               | 45             | AB, AX, pNP–Araf                    | pNP–Arap                                |  | Renner et al. 1998          |
| Geobacillus<br>stearothermophilus T-6 <b>B</b>                 | —                | 64 (256)                                   | 5,5~6,0           | 70             | AB, pNP–Araf                        | pNP–Arap                                | —                                      | Gilead et al., 1995         |
| Hordeum vulgare P  | AXAH-I           | 65   | 4,3               | _              | AB, AG, AX,<br>pNP–Araf             | GA                                      | 2, 3, 5                                | Lee et al., 2001            |
| Streptomyces charteusis<br>GS901 B                             | AbfI             | 80   | 5,5               | 55             | AX, AB, ABD, AG,<br>pNP–Araf        | GA                                      | 2 > 3 > 5                              | Matsuo et al., 2000         |
| Streptomyces lividans 66 B                                     | AbfA             | 69 (380)                                   | 6,0               | 60             | AB, ABD, AX,<br>pNP–Araf            | AG, pNP–Arap                            |  | Manin et al., 1994          |
| Thermobacillus xylanilyticus<br>B                              | AbfD3            | 56   | 5,6~6,2           | 75             | AX, XM, pNP–Araf                    | GA, pNP–Arap                            | 2, 3                                   | Debèche et al., 2000        |

# Tableau 9 – Propriétés physico-chimiques et catalytiques des Abf–51.

<sup>a</sup> **F** : organisme fongique ; **B** : organisme bactérien ; **P** : plante. <sup>b</sup> Entre parenthèses la masse multimérique.

<sup>c</sup>AB : arabinane de betterave ; ABD : arabinane de betterave débranché (ou linéaire) ; AG : arabinogalactane ; AX : arabinoxylane de blé ; GA : gomme arabique ; XM : xylane de mélèze. Seuls les composés testés ont été indiqués, si un composé n'est pas indiqué, cela ne signifie pas pour autant qu'il est ou qu'il n'est pas hydolysé.

<sup>d</sup> 2, 3 et 5 correspondent respectivement aux liaisons  $\alpha$ -(1,2),  $\alpha$ -(1,3) et  $\alpha$ -(1,5). Une préférence est indiquée par le signe >, si les spécificités n'ont pas été comparées, les types de liaisons hydrolysées sont simplement séparés par des virgules.

# D.2 Famille 51

Le **Tableau 9** récapitule les caractéristiques physico-chimiques ainsi que les spécificités de substrat des principales enzymes de la famille 51. C'est sur cette base que nous allons analyser les Abf-51.

## **D.2.1** Propriétés physico-chimiques

## D.2.1.1 Stabilité au pH

Les Abf-51 présentent des optima de pH assez variés, de 4,0 pour *Aspergillus kawachii* (Koseki *et al.*, 2003) à 9,0 pour *Clostridium cellulovorans* (Kosugi *et al.*, 2002) environ. En général, elles conservent au moins 50% de leur activité sur une gamme large de pH, qui s'étend environ sur 3 unités de pH de part et d'autre de leur optimum.

Les Abf fongiques apparaissent les plus stables aux pH acides, même si elles sont rapidement inactivées quand le pH devient inférieur à 3 pour *Aspergillus awamori* (Kaneko *et al.*, 1998). Les Abf bactériennes ont un optimum plus élevé à environ 6,0, quant aux Abf végétales, l'une vient d'*Arabidopsis thaliana* (Fulton & Cobbett, 2003) et l'autre de l'orge (*Hordeum vulgare*), mais seule cette dernière a été caractérisée à ce jour, elle possède un pH<sub>opt</sub> de 4,3 (Lee *et al.*, 2001).

### D.2.1.2 Stabilité à la température

Les optima d'activité de température des Abf–51 varient de 45 à 75°C respectivement pour les enzymes de *Bifidobacterium longum* B667 (Margolles & de los Reyes-Gavilan, 2003) et de *Thermobacillus xylanilyticus* D3 (Debeche *et al.*, 2000), mais la plupart sont actives à plus de 50°C. Cette dernière est d'ailleurs très stable à la température puisqu'elle conserve 50% de son activité après 2 h d'incubation à 90°C, ce qui en ferait un outil de choix pour assister des endoxylanases dans la dégradation d'hétéroxylanases dans des procédés où des températures élevées sont requises. De même, l'Abf de *Clostridium stercorarium* possède une demi-vie de plusieurs heures à 85°C, mais seulement de quelques dizaines de minutes à 90°C (Kosugi *et al.*, 2002). L' Abf–51 de *Bacillus pumilus* n'est pas thermoactive car sa  $T_{opt}$  n'est que de 55°C. Elle est néanmoins thermostable car elle résiste aux températures élevées (elle conserve 50% de son activité après 2 h à 75°C) (Degrassi *et al.*, 2003).

Jusqu'à présent, il n'a pas été fait mention dans la littérature de l'existence d'arabinofuranosidases psychrophiles.

#### D.2.2 Spécificité de substrat et activité

Même au sein d'une famille d'enzymes comme celle des Abf-51, on constate des variations notables au niveau de la spécificité de substrat. En général, il est admis que ces enzymes agissent préférentiellement sur des arabinoxylo-oligosaccharides issus de l'hydrolyse préalable des arabinoxylanes par des endoxylanases (Rombouts *et al.*, 1988). Étant généralement considérées comme intra-cellulaires, les Abf-51 ne peuvent en effet s'attaquer qu'à de petits substrats capables de pénétrer la cellule.

Le seul point commun des Abf-51 en ce qui concerne leur spécificité enzymatique est de pouvoir hydrolyser le pNP-Ara*f* mais pas le pNP-Ara*p*, ce qui démontre que seul l'arabinose sous forme pyranique ne peut pas se fixer dans le site actif de l'enzyme. En fait, l'examen des données du **Tableau 9** met en évidence que les Abf-51 se distinguent à deux niveaux : activité *endo* ou *exo* et spécificité des liaisons hydrolysées.

La spécificité d'hydrolyse de liaison n'a pas été caractérisée chez toutes les Abf-51 mais on remarque généralement une capacité à cliver tous les types de liaisons  $\alpha$ -(1,2),  $\alpha$ -(1,3) et  $\alpha$ -(1,5). Certaines enzymes manifestent une préférence, comme par exemple l'Abf de *Cellvibrio japonicus* (Beylot *et al.*, 2001) qui favorise l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -(1,2) et  $\alpha$ -(1,3), ou celle de *Streptomyces charteusis* qui préfère les liaisons  $\alpha$ -(1,2) par rapport aux liaisons  $\alpha$ -(1,3) (Matsuo *et al.*, 2000). Ces enzymes provenant d'ailleurs de bactéries du sol, cela met en évidence qu'elles sont bien adaptées à l'hydrolyse des arabinoses des hétéroxylanes qu'elles rencontrent dans leur milieu, qui sont le plus souvent substitués en O2 et O3.

Par contre, deux Abf-51 issues d'*Aspergillus* ont des spécificités inverses : celle d'*A. awamori* agit préférentiellement sur les liaisons  $\alpha$ -(1,5) par rapport aux liaisons  $\alpha$ -(1,2) et  $\alpha$ -(1,3) (Kaneko *et al.*, 1998) tandis que celle d'*A. niger* est très spécifique des liaisons  $\alpha$ -(1,5) (Rombouts *et al.*, 1988). Cette dernière est d'ailleurs incapable de libérer les résidus arabinoses des arabinoxylanes (ce qui est normal puisque les résidus arabinoses ne sont pas branchés en  $\alpha$ -(1,5) dans ces composés), mais aussi plus curieusement de l'arabinane linéaire. Cette enzyme semble donc être la première Abf-51 travaillant uniquement en mode *exo* sur les liaisons  $\alpha$ -(1,5). Celle d'*A. awamori* est capable de débrancher des arabinoses liés en  $\alpha$ -(1,5) à partir de l'extrémité NR de l'arabinane, mais peut aussi libérer les sucres en O2 ou O3 dans les arabinoxylanes. Enfin, il est important de noter que l'Abf-51 de l'orge (Lee *et al.*, 2001) est capable de libérer des résidus arabinoses doublement substitués en O2 et O3 sur un xylose. Par conséquent, cette enzyme pourrait apporter une aide majeure dans la dégradation totale des arabinoxylanes dans lesquels les doubles substitutions sont souvent un facteur limitant de l'hydrolyse.

Notons l'existence chez *Bifidobacterium breve* K-110 de l'existence de la première enzyme spécifique des arabino*pyr*anoses (au lieu des arabino*fur*anoses), ce qui pourrait induire la naissance d'une nouvelle classe d'enzymes (Shin *et al.*, 2003).

Ces informations illustrent la variété des enzymes de la famille 51 au niveau de leur spécificité, encore une fois corrélée à la variété des substrats qu'elles peuvent attaquer et dans leur composition changeante. À présent, nous allons examiner la structure de la seule Abf–51 connue à ce jour.

## **D.2.3** Structure et catalyse

Des alignements de séquences effectués entre les Abf et d'autres GH ont fait apparaître que trois résidus sont parfaitement conservés (Zverlov *et al.*, 1998), les auteurs ont alors proposé que :

- les Abf appartenant à la famille GH-51, les deux résidus acides glutamiques conservés sont les résidus catalytiques acide/base et nucléophile, qui agissent via un mécanisme de rétention de configuration pendant la catalyse (également proposé par Pitson *et al.*, 1996);
- par analogie avec les familles d'enzymes dont la structure est connue, ils ont proposé que les Abf-51 adopteraient un repliement en (β/α)<sub>8</sub> dont les brins β4 et β7 porteraient à leurs extrémités C-ter ces deux résidus catalytiques.

L'existence d'une dyade catalytique a pu être confirmée par des études de mutagenèse dirigée sur l'Abf–51 de *Thermobacillus xylanilyticus* en compléments d'expérience de réactivation de l'enzyme par l'azide et de dépendance au pH (Debeche *et al.*, 2002). La même étude avec les mêmes résultats a été effectuée chez *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (Shallom *et al.*, 2002a ; Shallom *et al.*, 2002b). Le résidu acide/base est un acide glutamique en position 176 (*T. xylanilyticus*) et le nucléophile un autre acide glutamique en position 298.

## D.2.3.1 Domaine catalytique

Il a fallu attendre l'année 2003 pour que la première structure d'une Abf–51 soit résolue, il s'agit de l'AbfA de *Geobacillus stearothermophilus* T-6. La protéine, qui se présente sous forme d'hexamère dans la maille cristalline, est formée de deux domaines. Un domaine catalytique d'architecture  $(\beta/\alpha)_8$  additionné d'un domaine de topologie *jelly-roll* à 12 brins  $\beta$  (Hövel *et al.*, 2003). Ce dernier domaine présente des similarités structurales avec les domaines C des  $\alpha$ -amylases et aussi avec des CBD. Son rôle précis est encore inconnu, sachant qu'il ne fixe pas le xylane, il pourrait être un CBM ayant perdu sa fonction, ou bien il aurait un rôle de stabilisation du *TIM-barrel*. La dyade catalytique se trouve bien comme prévu aux extrémités des brins  $\beta$ 4 et  $\beta$ 7 (Zverlov *et al.*, 1998).

La co-cristallisation de l'AbfA dont le résidu acide/base a été muté en alanine avec un arabino $-\alpha$ -(1,3)-xylose a mis en évidence que le résidu arabinose est fixé dans le sous-site (-1) et que tous ses hydroxyles sont impliqués dans des liaisons hydrogène via sept résidus de l'enzyme, alors que le résidu xylose en (+1) n'en forme qu'une seule, ce qui expliquerait en partie la capacité des Abf-51 et d'AbfA en particulier à accepter des groupes partants variés et en même temps la grande spécificité pour le cycle L-arabinofuranose.

Par ailleurs AbfA peut fixer des substrats contenant le motif xylopyranose, qui partage une identité spatiale avec l'arabinofuranose, ce qui conforte l'existence d'Abf bifonctionnelles dans les familles 3 et 43 (voir paragraphes suivants).

En ce qui concerne le mécanisme catalytique, la dyade est typique des GH à rétention de configuration (distance de 4,7 Å entre les résidus) et la stabilisation de l'intermédiaire oxocarbonium est effectuée par l'intermédiaire de liaisons hydrogène. Il est probable que dans l'état de transition, le résidu arabinofuranose prend une forme plane qui favorise l'hydrolyse de la liaison.

# D.2.3.2 Autres domaines

Dans le **Tableau 9**, on constate que les Abf–51 se trouvent assez souvent sous forme de multimères et les enzymes monomériques possèdent des masses molaires allant de 56 kDa pour les plus petites comme ArfA de *Clostridium cellulovorans* (Kosugi *et al.*, 2002) à 80 kDa pour les plus grosses comme AbfI de *Aspergillus awamori* IFO 4033 (Kaneko *et al.*, 1998) et même 128 kDa pour l'Abf–51 d'*Aspergillus niger* (Rombouts *et al.*, 1988). Même si aucun CBM n'a pour le moment été mis en évidence, compte tenu de la masse moléculaire

| Famille | Clan | Repliement du domaine<br>catalytique | Mécanisme<br>catalytique | Dyade<br>acide/base – nucléophile |
|---------|------|--------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 3       |      | $(\beta/\alpha)_8$                   | Rétention                | Glu* – Asp                        |
| 43      | GH–F | $\beta$ – <i>propeller</i> à 5 pales | Inversion                | Glu* – Asp*                       |
| 51      | GH–A | $(\beta/\alpha)_8$                   | Rétention                | Glu – Glu                         |
| 54      |      | β–jelly-roll                         | Rétention                | Glu – Asp                         |
| 62      | GH–F | β– <i>propeller</i> à 5 pales*       | Inversion                | Glu* – Asp*                       |
| 93      |      | pas de structure<br>disponible       | Rétention                | Inconnu                           |

Tableau 10 – Familles d'enzymes présentant une activité arabinofuranosidique parmiles GH et caractéristiques associées. \* : existence non confirmé expérimentalement.

d'un *TIM-barrel* moyen (30~35 kDa), on peut soupçonner l'existence d'un, voire de plusieurs modules chez les Abf–51, comme par exemple le seul connu qui serait un CBM chez *Geobacillus stearothermophilus* T6 (Hövel *et al.*, 2003). Reste à déterminer leur rôle (s'ils en ont un) dans la dégradation de la paroi végétale.

De manière générale, malgré leur appartenance à une même famille et un repliement identique, les Abf–51 présentent une variabilité structurale et fonctionnelle bien plus importante par exemple que les Xyl–11. Cette variabilité s'exprime au niveau des substrats hydrolysés et de la stéréochimie de ces coupures, qui prend pour origine des changements structuraux au niveau des sous-sites catalytiques et donc une variabilité au sein des boucles  $\beta\alpha$  du *TIM-barrel*. Nous allons voir qu'il en est de même chez les cinq autres familles d'Abf.

### D.3 Autres familles d'arabinofuranosidases

Les autres Abf appartiennent à des familles où sont regroupées des enzymes de fonctionnalité variée, voire bifonctionnelles. Les « vraies » Abf (au sens de la spécificité de substrat) sont majoritairement issues de la famille 51 comme nous l'avons vu. Même si des familles ne contiennent pas encore de structure d'Abf connue (cas de GH–3, GH–43, GH–62 et GH–93), il est pertinent d'examiner celles des enzymes de la même famille. Comme les repliements et les mécanismes catalytiques sont normalement conservés au sein d'une même famille de GH, cette comparaison peut nous renseigner sur la structure plausible des Abf et la corréler à leur mode d'action, et peut servir à montrer la diversité structurale et fonctionnelle des Abf. Leurs caractéristiques catalytiques et structurales sont regroupées dans le **Tableau 10** et la **Figure 21**.

#### D.3.1 Famille 3

Beaucoup d'enzymes de cette famille possède une activité duale et sont donc apparentées à deux EC différentes. La première structure 3D décrite est celle de la  $\beta$ -D-glucane exohydrolase de l'orge ExoI. Cette enzyme est capable d'hydrolyser des liaisons  $\alpha$ -(1,2),  $\alpha$ -(1,3),  $\alpha$ -(1,4) et  $\alpha$ -(1,6) de divers disaccharides pour libérer du glucose, avec rétention de la configuration (Varghese *et al.*, 1999, code PDB 1EX1). Elle comporte deux domaines distincts (contenant chacun un pont disulfure) reliés par un *linker* analogue à une hélice  $\alpha$  : le premier domaine est un *TIM-barrel* ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, le second un feuillet ( $\alpha/\beta$ )<sub>6</sub>. Un sillon peu profond se trouve à l'interface des deux domaines et comporte une poche en son centre.



Figure 21 – Représentation des structures des familles d'enzymes contenant des arabinofuranosidases. GH-3 :  $\beta$ -D-glucane exohydrolase de l'orge (1EX1) ; GH-43 :  $\alpha$ -L-arabinanase de *Cellvibrio cellulosa* (1GYD) ; GH-51 :  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de *Geobacillus stearothermophilus* T6 (1PZ3) ; GH-54 :  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase d'*Aspergillus kawachii* (1WD3).
D'après cette structure, les résidus acide/base et nucléophile, chacun situé sur un domaine, sont distants de 6,5 Å. À la suite d'une étude de modélisation comparative des structures des GH–3 (Harvey *et al.*, 2000), il a été proposé que le *linker*, en jouant un rôle de charnière, agirait sur le rapprochement des domaines, donc permettrait la variation de la distance entre ces deux résidus, ce qui régulerait l'activité enzymatique. La géométrie du site actif en forme de poche peu profonde serait également corrélée à la grande gamme de substrats acceptés par l'enzyme, en termes de structures et de types de liaisons.

Ainsi, la combinaison d'informations de cristallographie, de modélisation moléculaire et de cinétique enzymatique chez ExoI a montré qu'une paire de résidus Trp permet l'arrimage d'un résidu glucose au niveau du sous-site (+ 1), tout en autorisant une flexibilité de mouvement. Par contre, le résidu glucose en (- 1) est fixé bien plus fermement par plus de dix liaisons hydrogène impliquant six résidus différents (Hrmova *et al.*, 2002), l'activité enzymatique se retrouvant finalement relativement indépendante de la stéréochimie de la liaison.

Une Abf–3 a pu être extraite et purifiée à partir d'extraits d'orge, il s'agit en fait d'une enzyme bifonctionnelle à la fois  $\alpha$ –L–arabinofuranosidase et  $\beta$ –D–xylopyranosidase ARA-I (Lee *et al.*, 2003). En supposant que la structure des domaines est conservée dans la famille 3, il est possible que la flexibilité du sous-site (+ 1) de ExoI soit conservée chez ARA-I. Étant donnée que la stéréochimie des liaisons où sont impliqués des  $\beta$ –D–xylopyranoses ou des  $\alpha$ –L–arabinofuranoses sont similaires au niveau des C1, C2 et C3, les auteurs proposent que cette architecture en deux domaines soit responsable de la capacité d'ARA-I d'accommoder des substrats divers dont les liaisons sont variables.

#### D.3.2 Famille 43

L'Abf-43 ArbA de *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* est capable de libérer de manière *exo* de l'arabinotriose lors de la dégradation des arabinanes linéaires, cette catalyse se déroulant selon un mécanisme d'inversion de configuration. Mais ArbA hydrolyse aussi l'arabinane rouge, substrat normalement clivé uniquement par les *endo* $-\alpha$ -(1,5)-arabinanases, suggérant donc un mécanisme *endo* (McKie *et al.*, 1997). La topographie du site actif de ArbaA doit donc être assez flexible. Par ailleurs, cette enzyme ne comporte pas de CBM, suggérant que son substrat naturel est relativement accessible (McKie *et al.*, 1997).

La structure de l' $\alpha$ -L-arabinanase de *Cellvibrio japonicus* Arb43A a été décrite comme une hélice  $\beta$  à cinq pales ( $\beta$ -*propeller*) (Nurizzo *et al.*, 2002b, codes PDB 1GYD, 1GYE et 1GYH). Cette enzyme libère de l'arabinotriose par coupure des liaisons  $\alpha$ -(1,5), suggérant un mode d'action *exo*, mais elle est aussi douée d'activité *endo*. En fait, il semble que le polymère ne soit pas relâché après son hydrolyse, l'enzyme étant processive. D'après ces travaux, la catalyse de Arb43A ferait appel à une triade catalytique et se déroulerait via un mécanisme d'inversion de configuration. La crevasse catalytique est longue, pouvant contenir 6 sous-sites. La processivité de l'enzyme, encore mal comprise, serait due à des facteurs structuraux comme la présence d'une boucle qui obture la crevasse à une extrémité, empêchant l'hydrolyse prématurée en *endo*, ou des facteurs électrostatiques comme les différences d'énergie d'interactions de chaque sous-site.

Streptomyces chartreusis GS901 produit deux Abf, l'une appartenant à la famille 51, et l'autre à la famille 43. Cette dernière possède un profil d'hydrolyse assez singulier : elle n'agit que sur les arabinanes linéaires pour libérer des arabinoses (Matsuo *et al.*, 2000), et pas du tout sur les autres polymères comportant des arabinoses. Les auteurs proposent de renommer l'enzyme en  $exo-(1,5)-\alpha-L$ -arabinofuranosidase, car c'est pour le moment la seule enzyme de cette famille agissant en mode *exo*. Une comparaison des structures/fonctions avec ses autres partenaires expliquerait probablement les mécanismes des modes *endo* et *exo*.

La diversité des GH–43 devient encore plus grande avec l'existence de l'Abf AXH-d3 qui provient de *Bifidobacterium adolescentis* (Van Laere *et al.*, 1997). Cette enzyme est tout d'abord incapable de dégrader les arabinanes, linéaires ou branchés, et encore moins des arabinoxylo-oligosaccharides monosubstitués. Par contre, elle libère bien des arabinoses à partir d'arabinoxylo-oligosaccharides disubstitués en O2 et O3. Dans ce cas, les substitutions doivent être présentes à l'extrémité NR sur une chaîne principale de 3 xyloses, ou en deuxième position sur une chaîne de 4 xyloses pour que l'enzyme soit active. Mais les monosubstitutions sur une chaîne de 5 xyloses ne sont pas clivées. Il s'agit donc de la première Abf spécifique de l'hydrolyse des ramifications doubles en O2 et O3 sur une chaîne de xylane.

#### D.3.3 Famille 54

Au contraire des Abf de la famille 51, celles appartenant à la famille 54 présentent une meilleure aptitude pour hydrolyser des substrats polymériques comme les arabinoxylanes, même si elles sont capables d'hydrolyser des oligosaccharides. Cette famille est composée

d'enzymes qui agissent avec rétention de la configuration anomérique (Beldman *et al.*, 1997). Par exemple, *Aspergillus awamori* IFO 4033 produit une Abf de la famille 54 qui hydrolyse préférentiellement les liaisons  $\alpha$ –(1,5) des arabinotrisaccharides et débranche les arabinoses de l'arabinane (Kaneko *et al.*, 1998). Parmi le peu d'Abf–54 caractérisées, elles ont en commun de posséder un pH<sub>opt</sub> acide (inférieur ou égal à 4,0) et d'afficher une *T*<sub>opt</sub> assez élevée (au moins 50°C) (De Ioannes *et al.*, 2000).

La résolution de la structure de l' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase AkAbfB d'*Aspergillus kawachii* (Miyanaga *et al.*, 2004b ; Miyanaga *et al.*, 2004a, codes PDB 1WD3 et 1WD4) a révélé une enzyme comportant deux domaines. Le domaine catalytique formé de deux feuillets  $\beta$  organisé en *jelly-roll*, il possède une poche hydrophobe, et est associé à un domaine de fixation de l'arabinose (*arabinose binding domain*, ABD) de structure trèfle  $\beta$ . Le domaine catalytique comporte trois ponts disulfures, et l'ABD un seul, tous sont conservés dans la famille 54. Grâce à une étude de mutagenèse, les deux résidus catalytiques ont pu être identifiés comme E221 (nucléophile) et D297 (acide/base). Ils sont séparés de 5,6 Å, ce qui est bien caractéristique d'un mécanisme de rétention. La poche catalytique contient le soussite (-1) et une molécule d'arabinose co-cristallisée est fixée via de nombreuses liaisons hydrogène (Miyanaga *et al.*, 2004a). La présence d'un pont disulfure entre deux résidus adjacents dans ce sous-site est assez remarquable, il semble qu'il s'y forme une interaction hydrophobe entre la liaison disulfure et la liaison C4–C5 du résidu arabinofuranose. Aucun sous-site (+1) n'a pu être découvert, donc s'il existe, il doit être très faiblement liant, d'où la variété de liaisons clivables par l'enzyme,  $\alpha$ –(1,2) et  $\alpha$ –(1,3).

L'ABD de son côté est capable de fixer au moins deux résidus arabinoses à deux positions différentes, à chaque fois leur atome d'oxygène O1 est orienté vers le solvant. Ceci indique qu'ils peuvent être liés au domaine ABD tout en étant rattachés à une chaîne d'hétéroxylanes ou d'autres polymères. L'existence d'un ABD chez les Abf–54 pourrait expliquer pourquoi ces enzymes présentent une meilleure activité que les Abf–51 sur les substrats insolubles.

#### D.3.4 Famille 62

C'est la seule famille contenant exclusivement des Abf, mais elle est la moins bien décrite à ce jour. Le mécanisme d'action est inconnu, tout comme les résidus qui pourraient participer à la catalyse. L'Abf-62 de *Streptomyces lividans* (AbfB) comporte un domaine catalytique ayant 66% d'homologie de séquence avec celui de la xylanase 10 de *Ps. fluorescens* ainsi

qu'un XBD (Vincent *et al.*, 1997), similaire à celui déjà observé pour les xylanases (Black *et al.*, 1995). Au niveau de la spécificité de substrat, cette enzyme présente un double visage : les arabinoxylanes de céréales constituent le substrat sur lequel elle est le plus active, mais elle n'hydrolyse pas du tout le xylane de bouleau ou l'arabinane. De plus, elle affiche une très faible activité sur le substrat pNP–Araf. Par ailleurs, elle clive facilement les arabinoses des arabinoxylo-oligosaccharides, et après une hydrolyse prolongée, elle hydrolyse aussi les liaisons entre xyloses (Vincent *et al.*, 1997). Les auteurs proposent que la rotation de la liaison  $\alpha$ –(1,3) entre un arabinofuranose et un xylose peut ressembler à une liaison  $\beta$ –(1,4) entre deux xyloses, ce qui expliquerait l'activité duale de AbfB.

L'Abf–62 STX-IV de *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 présente les mêmes caractéristiques que l'Abf de *Streptomyces lividans* (bonne activité sur les arabinoxylanes, pas d'activité sur les xylanes ou l'arabinane et peu sur le pNP–Ara*f*; Tsujibo *et al.*, 2002). Étant donnée l'appartenance des Abf des familles 62 et 43 au même clan F, les auteurs ont proposé que les Abf–62 fonctionneraient via un mécanisme d'action par inversion de la configuration et présenteraient un domaine catalytique en  $\beta$ –*propeller*. Cette proposition contredit celle faite pour l'AbfB de *Streptomyces lividans* pour laquelle une structure en ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> a été proposée. En attendant la résolution de structures, cette dernière information semble être confirmée par une étude d'alignements de séquences menées dans quatre familles de GH (32, 43, 62 et 68) et qui propose que le domaine catalytique des Abf–62 est un  $\beta$ –*propeller* à 5 ou 6 pales et qu'elles agissent par inversion de la configuration via une triade catalytique (Pons *et al.*, 2004).

#### D.3.5 Famille 93

Il s'agit de la famille comportant le moins de séquences disponibles, la structure et le mécanisme catalytique ne sont pas connus. La seule enzyme décrite est l'exo-arabinanase Abnx issue de *Penicillium chrysogenum* 31B, organisme qui produit par ailleurs au moins quatre autres enzymes qui dégradent les arabinanes (Sakamoto & Thibault, 2001). Cette enzyme attaque l'arabinane linéaire à partir de l'extrémité non-réductrice et libère un L-arabinose, mais elle est totalement inactive sur le pNP-Ara*f*. Même si son architecture n'est pas encore connue, des alignements de séquences mettent en évidence sa différence avec les autres arabinanes que l'on rencontre dans la famille 43. Le repliement des enzymes de la famille 93 n'est donc probablement pas un  $\beta$ -propeller (Sakamoto *et al.*, 2004b). Des expériences de transglycosylation montrent non seulement que la configuration anomérique

|                              |                            | ?                           |
|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Identité                     | Nom                        | Tx-Abf                      |
|                              | Origine microbienne        | Thermobacillus              |
|                              |                            | xylanilyticus               |
|                              | ongine geographique        | un tas de composte près     |
|                              |                            | de Lille. France            |
|                              | Nom de famille             | Famille 51 des GH           |
|                              | Classe                     | EC 3.2.1.55                 |
|                              | Fonction                   | α–L–arabinofuranosidase     |
| Données<br>structu-<br>rales | Nombre de résidus          | 495                         |
|                              | Masse moléculaire          | 55985 Da                    |
|                              | Repliement                 | ? $(\beta/\alpha)_8$ prédit |
|                              | Composition                | ?                           |
|                              | Description                | ?                           |
| Données<br>fonctionnelles    | Dyade catalytique          | E176 (acide/base)           |
|                              |                            | E298 (nucléophile)          |
|                              |                            |                             |
|                              | Stabilite au pri           | pH 4 2 à 8 2                |
|                              | Température optimale       | 75°C                        |
|                              | Activité                   | ~460 UI/mg à 60°C           |
|                              | Stabilité à la température | Plusieurs heures à 60°C     |
| 100                          | Substrat favori            | pNP-Araf                    |
| TT-P                         | Signes particuliers        | enzyme thermostable         |
|                              |                            | douée de                    |
|                              |                            | transglycosylation          |

Figure 22 – Caractéristiques principales de Tx-Abf.

est conservée (au contraire des endo–arabinanases de la famille 43), mais qu'en plus, Abnx est capable de transférer un composé arabinobiose sur un groupement hydroxyl primaire d'un sucre, c'est la première enzyme présentant cette aptitude (Sakamoto *et al.*, 2004a).

#### D.4 L'Abf–51 de Thermobacillus xylanilyticus

La bactérie *Thermobacillus xylanilyticus* (voir §C.4.8, p. 44) produit une Abf–51 Tx–Abf dont le gène a pu être isolé, puis cloné dans un vecteur d'expression pET24 sous contrôle du promoteur T7 et exprimée dans *E. coli* BL21 DE3 (Debeche *et al.*, 2000 ; Debeche, 2001). Tx–Abf a été caractérisée au niveau biochimique et catalytique, les résidus nucléophile et acide/base ayant été identifés les premiers de manière indéniable chez une Abf–51 (**Figure 22**, Debeche *et al.*, 2000 ; Debeche, 2001 ; Debeche *et al.*, 2002). Actuellement, elle est étudiée pour sa capacité à compléter l'activité de l'endoxylanase Tx–Xyl pour l'hydrolyse des substrats lignocellulosiques, et également pour sa capacité de glycosynthèse de sucres variés.

#### D.5 Applications des Abf

Lors de la biodégradation des hétéroxylanes, les ramifications de la chaîne de xylane notamment en arabinoses constituent un des facteurs limitants de la déstructuration complète de ces polymères (Beaugrand *et al.*, 2004). Dans la Nature, les micro-organismes produisent des Abf qui agissent en synergie avec les xylanases pour la dégradation des arabinoxylanes. La potentialité d'utilisation des Abf dans des procédés industriels réside donc dans leur implication directe dans la bioconversion des lignocelluloses en sucres fermentescibles pour la production de bioéthanol, ou bien dans la délignification de la pâte à papier. Mais étant donnée la variété des substituants et leur stéréochimie, des efforts doivent encore être menés pour trouver le cocktail enzymatique qui libérera tous les sucres sous forme monomérique.

Les Abf sont aussi utilisés lors de la clarification des jus de fruit. En effet, les concentrés de jus de pomme par exemple développent des précipités lors de leur préparation. Le composé majoritaire isolé dans ces précipités est de l'arabinane presque totalement linéaire. L'action des Abf capables de dégrader les liaisons  $\alpha$ –(1,5) de l'arabinane est donc utilisée pour clarifier ces jus.

Le domaine d'application le plus développé pour les Abf aujourd'hui est sans doute celui de l'oenologie. Ici les Abf sont employées pour la clarification des moûts et la révélation des arômes des vins. Les composés monoterpènes aromatiques des vins peuvent en effet être présents sous forme de précurseurs liés à des glycosides, et libérés par une hydrolyse enzymatique en deux étapes (Gunata *et al.*, 1988). L'action d'une Abf de *Aspergillus niger* transforme d'abord ces précurseurs en monoterpényl– $\beta$ –D–glucosides et arabinoses, puis une  $\beta$ –glucosidase permet la libération des monoterpènes volatils (Gunata *et al.*, 1990).

Une autre application prometteuse développée dans notre laboratoire est l'utilisation de l'Abf de la famille 51 produite par *Thermobacillus xylanilyticus* pour la synthèse par transglycosylation de composés contenant des résidus furanoses, en particulier des  $\alpha$ -L-arabinofuranosides et des  $\beta$ -D-galactofuranosides, ce qui n'avait jamais été réalisé auparavant (Rémond *et al.*, 2004 ; Rémond *et al.*, 2005). Or, la paroi de nombreux organismes pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis* (agent de la tuberculose) contient les motifs structuraux D-arabinofuranosyl-D-galactofuranose ou D-galactofuranosyl-D-galactofuranose. Tx-Abf pourrait se révéler un outil précieux pour la synthèse d'oligosaccharides originaux qui pourraient servir comme bases pour l'élaboration de vaccins, de protocoles de diagnostiques, ou encore pour servir d'inhibiteurs des glycosyl-transférases qui élaborent la paroi d'organismes pathogènes.

#### E Les autres hémicellulases

Dans le cas de la biodégradation des hétéroxylanes, il s'agit essentiellement soit des enzymes accessoires qui débranchent les ramifications sur les résidus arabinoses et favorisent l'action des Abf, soit des enzymes qui terminent la dégradation des petits oligosaccharides issus de l'action conjointe des xylanases et des Abf (xylosidases). En comparaison des xylanases, ces enzymes sont encore peu étudiées aujourd'hui, mais de par leur localisation membranaire en général, elles permettent la libération de sucres qui entrent ensuite directement dans le métabolisme des micro-organismes et sont donc d'un intérêt vital.

#### E.1 Xylosidases

Les  $\beta$ -D-xylosidases (1,4- $\beta$ -D-xylane xylohydrolase, EC 3.2.1.37) appartiennent aux familles 3, 39, 43, 52 et 54. Ces enzymes hydrolysent les xylo-oligosaccharides à partir de l'extrémité NR (Wong *et al.*, 1988). En général, elles n'attaquent pas les hétéroxylanes, mais dans certains cas on a observé une libération lente de xylose (Dekker & Richards, 1976). Le substrat préféré de ces enzymes est le xylobiose, produit de fin de réaction des endoxylanases de la famille 11. L'affinité des xylosidases envers les xylo-oligosaccharides décroît avec l'augmentation du DP (Van Doorsaler *et al.*, 1985). Comme nous l'avons vu chez certaines familles d'Abf, la proximité des structures du L-arabinofuranose et du D-xylopyranose conduit à l'existence d'enzymes possédant les deux activités.

La seule famille qui ne contienne que des xylosidases est la famille 39, dont la xylosidase de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* a été cristallisée (codes PDB 1PX8 et 1UHV) (Yang *et al.*, 2004). C'est la première des xylosidases dont la structure est mise à jour, elle est constituée d'un *TIM-barrel* et de deux domaines annexes. La catalyse fait intervenir deux résidus Glu situés dans une poche (en accord avec l'activité *exo*) et dont la configuration est en accord avec le mécanisme de rétention de configuration. Par ailleurs, un résidu His pourrait aussi être impliqué dans la catalyse en tant que relais du résidu acide/base, ainsi que plusieurs résidus hydrophobes conservés.

#### E.2 Glucuronidases

Les  $\alpha$ -glucuronidases ( $\alpha$ -D-glucosiduronate glucuronohydrolase, EC 3.2.1.139) hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -(1,2) entre les acides 4-O-méthyl-D-glucuroniques et les résidus xylose de la chaîne d'hétéroxylane. Ces enzymes se trouvent exclusivement dans les familles 4 et 67. La première structure mise à jour fut celle de *Cellvibrio japonicus* (Nurizzo *et al.*, 2002a, codes PDB 1GQI, 1GQJ, 1GQK, 1GKL, 1H41). Le domaine catalytique possède un repliement en ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> et abrite une poche catalytique tapissée de groupements carboxylates. L'analyse de l'enzyme complexée avec les produits de réaction indique la présence d'une triade catalytique qui serait responsable de l'hydrolyse par inversion de la configuration anomérique. Récemment, les deux résidus catalytiques jouant le rôle d'une base pour l'un et d'un acide pour l'autre ont été déterminés (Shallom *et al.*, 2005). La sélection de xylo-oligosaccharides ramifiés se ferait du côté NR où la présence d'acide uronique en position O2 du xylose est requise pour l'hydrolyse. Au contraire, le site actif est nettement moins sélectif. La difficulté de détecter les résidus intervenant dans la catalyse est que ces enzymes n'attaquent pas les substrats synthétiques.

#### E.3 Acétyl-estérases et féruloyl-estérases

Les acétyl-xylane estérases (acétyle xylane estérase, EC 3.1.1.72) catalysent la déacétylation des résidus xyloses acétylés en position O2 ou O3. Ces enzymes agissent de préférence sur des oligosaccharides et sont peu spécifiques (Biely *et al.*, 1985b).

Les féruloyl-estérases (4-hydroxy-3-méthoxycinnamoyl-arabinose hydrolase, EC 3.1.1.73) hydrolysent la liaison ester entre les résidu arabinose et l'acide férulique. Cette activité est

importante car l'acide férulique contribue à la réticulation du réseau paritétal, par la formation de ponts diféruliques (qui relient deux polymères d'hémicellulose), soit par la formation de liaisons covalentes avec les lignines. Tout comme les enzymes débranchantes, les féruloyl-estérases préfèrent les oligosaccharides (Mac Kenzie & Bilous, 1988) et sont toujours secrétées dans le milieu.

Les structures de deux féruloyl-estérases appartenant à deux cellulosomes différents de *Clostridium thermocellum* ont été décrites : dans les deux cas, il s'agit de repliements en  $(\beta/\alpha)_8$  fonctionnant avec une triade catalytique Ser-His-Asp localisée dans une poche sur l'enzyme.

#### F Les cellulases

Les cellulases hydrolysent les liaisons  $\beta$ -(1,4) entre les résidus  $\alpha$ -D-glucoses de la cellulose et appartiennent à plusieurs familles des GH, mais sont traditionnellement divisées en deux groupes :

- les endoglucanases (EC 3.2.1.4);
- les cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91), seules capables d'hydrolyser la cellulose cristalline.

Leurs structures 3D sont très variées : des protéines tout en hélice  $\alpha$  à celles tout en brins  $\beta$ , en passant par le tonneau ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, les cellulases couvrent 8 familles de repliements (Schülein, 2000). Elles possèdent souvent une structure modulaire contenant un ou plusieurs domaines catalytiques liés à un ou plusieurs modules non catalytiques qui leur permettent de se rapprocher de leur substrat (voir le cellulosome §G, p. 68). Leur mécanisme catalytique utilise une dyade de résidus acide/base et nucléophile avec ou sans rétention de la configuration anomérique.

Les cellulases figurent parmi les enzymes les plus utilisées dans l'industrie aujourd'hui. Elles interviennent notamment dans les industries du textile et du papier pour le lissage des fibres. De plus, elles auront un rôle essentiel en tant qu'enzyme de saccharification dans les futurs procédés de bioconversion de la biomasse lignocellulosique.

Les cellulases constituant un vaste sujet d'étude, seules les glucanases de la famille 12 des glycoside-hydrolases seront présentées. Ces enzymes présentent en effet une forte homologie



**Figure 23 – Comparaison des structures des Xyl–11 (vert) et Cel–12 (bleu)**. La Xyl–11 est celle de *Thermobacillus xylanilyticus*, la Cel–12 celle de *Streptomyces lividans*. A et B : comparaison des repliements en *jelly-roll* ; C : comparaison des crevasses catalytiques, indiquées par une flèche.

structurale avec les Xyl-11, car elles partagent le même repliement en *jelly-roll*, et appartiennent d'ailleurs au même clan C.

#### F.1 Les cellulases de la famille 12

Cette famille comporte majoritairement des endoglucanases, mais aussi quelques xyloglucane hydrolases et des  $\beta$ -1,3-1,4-glucanases. Nous prendrons comme exemple dans cette famille une des cellulases les plus étudiées, issue de *Streptomyces lividans* et appelée CelB (codes PDB 1NLR, 2NLR) (Sulzenbacher *et al.*, 1997). Son architecture en *jelly-roll* est formée de deux feuillets A et B composés respectivement de 6 et 9 brins  $\beta$ . Ces feuillets constituent une crevasse assez longue, profonde et large, pouvant accommoder environ 5 sous-sites comportant de nombreux résidus aromatiques.

La catalyse s'effectue avec l'intervention de deux résidus E120 (nucléophile) et E203 (acide/base), et se déroule avec une rétention de la configuration anomérique. Les interactions au niveau des sous-sites (-1), (-2) et (-3) sont bien précisées grâce à l'obtention d'un complexe 2-fluorocellotriose co-cristallisé (Sulzenbacher *et al.*, 1999). On note la présence d'une interaction de *stacking* dans les sous-sites (-3) et un autre en (-2) où le résidu Trp responsable est conservé chez les Cel-12.

#### F.2 Comparaison Cel-12 / Xyl-11

Les différences entre les Xyl-11 et les Cel-12 existent à différents niveaux (Figure 23) :

- le substrat : la cellulose est un substrat plus homogène, plus stable grâce à des liaisons hydrogène intra- et inter-moléculaire plus nombreuses, et plus ordonné que le xylane (qui existe plutôt sous forme d'hétéroxylane) (Sulzenbacher *et al.*, 1999);
- le repliement général : l'architecture en *jelly-roll* est globalement parfaitement conservée, mais de nombreuses xylanases ne possèdent pas le premier feuillet B1 ;
- la topologie de la crevasse : elle est très encaissée chez les Xyl-11, mais beaucoup moins chez les Cel-12. En particulier, la longue boucle appelée « pouce » chez les Xyl-11, qui coiffe le côté de la crevasse, est absente chez les Cel-12, mais la corde est par contre bien conservée (Sulzenbacher *et al.*, 1997) ;
- la topologie du site actif : les dyades sont topographiquement équivalentes car elles appartiennent aux mêmes brins β, mais les chaînes latérales des acides glutamiques A/B n'ont pas la même orientation (Sulzenbacher *et al.*, 1999);

 l'activité catalytique : les Cel-12 sont des enzymes versatiles capables d'hydrolyser en plus de la cellulose le xylane (Saarilahti *et al.*, 1990).

Les éléments qui influencent vraisemblablement les différences de fonctionnalité entre les Xyl-11 et les Cel-12 se retrouvent d'une part au niveau de la dyade catalytique, et d'autre part au niveau de l'arrimage du substrat (topographie et propriétés électrostatiques de la crevasse).

Chez les Xyl–11, le résidu acide/base est coincé entre des acides aminés hydrophobes, V/L35 et Y63, et forme des liaisons hydrogène avec N/D33 et Y78, tous ces résidus étant conservés (numérotation *Thermobacillus xylanilyticus*). Le plan du groupe carboxylate se retrouve alors perpendiculaire au plan du sucre du sous-site (– 1), alors qu'ils sont dans le même plan chez les Cel–12 (Sulzenbacher *et al.*, 1997 ; Sabini *et al.*, 1999).

Le résidu aliphatique Val ou Leu conservé à la position 35, en plus de participer au maintien de l'orientation du résidu acide/base chez les Xyl–11, semble favoriser l'arrimage d'un substrat hydrophobe comme le xylose. De plus, ce résidu empêcherait la fixation de la cellulose par la mise en place de contraintes stériques à cause de sa chaîne latérale et aussi par l'absence de partenaires pour former une liaison hydrogène avec l'O6 (Sulzenbacher *et al.*, 1999).

Chez les Xyl–11, le pouce est l'élément qui rend la crevasse étroite et profonde au niveau des sous-sites (-1) et (-2). La triade à l'extrémité du pouce, constituée des résidus Pro–Ser–Ile, expose une surface planne hydrophobe plus susceptible d'accueillir un substrat hydrophobe peu substitué plutôt que de la cellulose (Sulzenbacher *et al.*, 1999).

Avec les familles 11 et 12, le paradigme structure/fonction prend tout son sens : ces enzymes partagent le même repliement mais possèdent des activités différentes, et comme nous le verrons plus tard, l'étude comparée des motifs structuraux variables (peu nombreux) mettra en relief les différences fonctionnelles de chaque famille, c'est-à-dire que des changements structuraux globalement mineurs ont des conséquences fonctionnelles majeures.

### G Action synergique des hémicellulases *in vivo* : le concept du cellulosome

Les hémicelluloses sont des substrats polymériques qui présentent une grande hétérogénéité chimique et structurale. Elles sont imbriquées dans un réseau pariétal où elles sont intimement

associées à la cellulose et aux lignines, l'ensemble constituant un matériau composite insoluble. Pour hydrolyser ce substrat, les micro-organismes lignocellulolytiques disposent de tout un arsenal d'enzymes qui, par une action concertée, permettent la dégradation des parois végétales et la solubilisation de ses composants. Cependant, les enzymes doivent d'abord être secrétées avant de réaliser cette dégradation, ce processus ne pouvant avoir lieu de manière intra-cellulaire en raison de l'insolubilité et de la complexité du substrat. Ainsi, une fois initiée par des enzymes extra-cellulaires, l'hydrolyse conduit à la production d'oligosaccharides solubles qui doivent être importés dans les cellules bactériennes pour permettre la poursuite de leur dégradation. Pour faciliter le déroulement de toutes ces étapes, les micro-organismes adoptent différentes stratégies (Shallom & Shoham, 2003) :

- les micro-organismes aérobies comme les *Trichoderma* ou *Aspergillus* libèrent toute une batterie d'hémicellulases (8 et 12 enzymes respectivement) à forte concentration, qui vont dégrader la biomasse en mono- et disaccharides utilisables directement par les organismes du milieu;
- d'autres micro-organismes aérobies comme les *Bacillus* et *Cellvibrio* ne secrètent que des enzymes dépolymérisantes (par exemple les xylanases) qui s'attaquent au squelette des polymères, donnant des oligosaccharides qui finiront d'être hydrolysés par les enzymes intra-cellulaires ou fixées sur la cellule. L'avantage est de ne pas mettre à disposition des autres micro-organismes en compétition des composés facilement métabolisables ;
- les bactéries anaérobies comme celles du genre *Clostridia* ont favorisé l'évolution d'un complexe unique multi-enzymatique appelé cellulosome.

La définition du concept de cellulosome a été introduite suite à l'étude de *Clostridium thermocellum*, et il a été décrit à l'origine comme un complexe discret multienzymatique exocellulaire de fixation à la cellulose pour la dégradation de substrats cellulosiques (Lamed *et al.*, 1983). Depuis, cette définition a été élargie pour inclure la notion de dégradation d'autres polysaccharides de la paroi végétale comme les hémicelluloses. De nombreux cellulosomes connus contiennent différents types d'hémicellulases (xylanases, Abf, mannanases, lichenases, pectine lyases, etc.) en proportions variées.

En s'inspirant d'une étude du cellulosome de *Clostridium stercorarium*, il a été proposé de reconstituer *in vitro* un cocktail enzymatique pour la dégradation de la biomasse (Adelsberger *et al.*, 2004). Un mélange d'enzymes recombinantes issues du cellulosome de cet organisme a



**Figure 24 – Représentation schématique de l'architecture supramoléculaire d'un cellulosome à la surface d'une cellule bactérienne** (figure simplifiée du cellulosome décrit chez *Acetivibrio cellulolyticus*, Xu et *al.*, 2003).

été préparé. Les auteurs de cette étude ont ainsi pu montré que le meilleur système (i.e. utilisant un nombre minimum d'enzymes pour un rendement maximal) de dégradation possible des arabinoxylanes dé-estérifiés était composé d'une seule xylanase (Xyn11A de la famille 11 ou Xyn10C de la famille 10), d'une  $\beta$ -xylosidases et d'une Abf de la famille 51.

Même si ce genre de cocktail enzymatique semble montrer son efficacité, la récente découverte des cellulosomes a dévoilé une stratégie particulièrement originale développée par certains micro-organismes pour dégrader la paroi végétale, qui représente plus qu'un simple mélange d'enzymes.

La composante centrale du cellulosome est une sous-unité tenant lieu de charpente qui contient des modules de cohésines (généralement en plusieurs exemplaires) servant à l'incorporation à la fois des enzymes et des autres parties du cellulosome (Bayer *et al.*, 2004). Les enzymes portent un module appelé dockerine qui peut se lier fortement aux cohésines de la sous-unité, les interactions mises en place servent à l'intégration des enzymes dans le complexe et déterminent la sélectivité et la stabilité du complexe. La sous-unité intègre fréquemment un CBM par l'intermédiaire duquel le complexe reconnaît son substrat et s'y fixe. Cette sous-unité comporte aussi des dockerines qui sont liées à la paroi via des modules SLH (*S-layer homology*) ancrés dans la cellule. Cette interaction peut se réaliser via une autre sous-unité intermédiaire composée de dockerines et de cohésines (**Figure 24**).

L'observation par microscopie électronique indique que les cellulosomes intacts de *C. thermocellum* possèdent une forme oblongue comme une olive, avec une cavité en son centre délimitée par des structures fibreuses (Madkour & Mayer, 2003). Cette architecture moléculaire n'est pas figée et surtout présente une grande diversité structurale. Dans le cas du cellulosome de *C. thermocellum*, plus de soixante dockerines différentes ont été détectées. Le cellulosome est en fait particulièrement efficace pour la dégradation de la cellulose cristalline, par rapport à un système d'enzymes libres. C'est le résultat de l'action synergique des enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques, rendue possible grâce à deux facteurs : la proximité spatiale des enzymes dans le cellulosome, et le ciblage du substrat grâce au CBM. Dans un écosystème sans oxygène, la biosynthèse du cellulosome représente un coup de fabrication énergétique important, contrebalancé par la forte sélectivité du cellulosome pour la cellulose, le substrat dont la dégradation rapporte le plus d'énergie. Les hémicellulases dans

un premier temps « pèlent » les hémicelluloses autour des microfibrilles, libérant des sucres déjà métabolisables, les cellulases pouvant alors s'attaquer à la cellulose.

Il existe également des structures analogues aux cellulosomes, mais plus spécifiques des hétéroxylanes et appelées des xylanosomes. Le plus grand récemment isolé chez *Streptomyces olivaceoviridis* possède une masse moléculaire de 1200 kDa et contient de manière prépondérante des xylanases (Zheng-Qiang *et al.*, 2004).

Actuellement, des essais sont menés pour exprimer des mini-cellulosomes de manière hétérologue, et au-delà des applications sur la dégradation du matériel végétal, la nature versatile des interactions entre les cohésines et les dockerines permet d'envisager la fabrication d'un nombre quasiment illimité de structures dans des applications variées dans les nanotechnologies.

## Chapitre II

# Matériels et Méthodes

#### **CHAPITRE II - MATÉRIELS ET MÉTHODES**

Dans ce chapitre vont être exposées les techniques utilisées durant ce travail de thèse. Généralement, les protocoles seront précédés d'une présentation de la technique montrant son fonctionnement et le but de son emploi.

#### A Microbiologie

#### A.1 Souches bactériennes

#### A.1.1 Escherichia coli XL1-blue

Ces bactéries de génotype *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI*<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10 (*Tet*<sup>r</sup>)] sont commercialisées par la société Stratagene<sup>1</sup>. Elles sont dites super compétentes car elles permettent d'atteindre des taux de transformation très élevés (supérieurs à 10<sup>8</sup> cfu/µg de plasmide transformé<sup>2</sup>). En plus de sa capacité à stabiliser les plasmides fragilisés, cette souche apparaît très performante lors des expériences de mutagenèse *in vitro*.

#### A.1.2 Escherichia coli JM109 (DE3)

Cette souche de génotype e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17( $r_{K}^{-}m_{K}^{+}$ ) supE44 relA1  $\Delta$ (lac-proAB) [F' tra $\Delta$ 36 proAB lacl<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15] permet l'expression de gènes sous contrôle du promoteur T7, évitant l'expression constitutive de la protéine recombinante. Ce système d'expression développé par Studier & Moffatt, 1986 utilise un promoteur issu du phage T7 qui est particulièrement performant puisqu'il doit dévier naturellement le métabolisme bactérien pour la prolifération virale. La xylanase sauvage a été clonée dans le plasmide pRSETA (Invitrogen<sup>3</sup>, États-Unis) en aval du promoteur T7. Le gène codant pour l'ADN polymérase T7 qui est intégré dans le génome de cette souche se trouve sous le contrôle du promoteur lac, naturellement réprimé. En présence d'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG), la répression est levée et l'induction de la synthèse d'ADN polymérase T7 est déclenchée. Celle-ci peut alors démarrer la transcription du gène hétérologue situé sur le plasmide pRSETA.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> www.stratagene.com

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> cfu : *colony forming unit*, i.e. le nombre de colonies formées

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> www.invitrogen.com

#### A.1.3 Escherichia coli B834 (DE3) pLysS

C'est la souche parentale de BL21 de génotype F *ompT hsdS*<sub>B</sub>( $r_B m_B$ ) *gal dcm met* (DE3) pLysS (Cm<sup>R</sup>) fournie par la société Novagen<sup>4</sup>. Cette souche présente l'intérêt d'être auxotrophe pour la méthionine, et permet donc l'incorporation dans les protéines recombinantes exprimées soit de méthionines radioactives au niveau de d'atome de soufre (<sup>35</sup>S-Met), soit de méthionines dont l'atome de soufre est remplacé par un atome de sélénium, alors appelées des sélénométhionines (Se-Met).

#### A.2 Milieux bactériens

Les milieux de cultures, quoique communs au laboratoire, sont d'une importance considérable en microbiologie. Leur composition et leur stérilité influent grandement sur la vitesse de croissance et la qualité des cultures bactériennes. Quel que soit le milieu utilisé, l'antibiotique utilisé sera toujours ajouté après autoclavage afin d'éviter sa destruction.

#### A.2.1 Milieux liquides

Le milieu de culture liquide universellement employé pour la croissance des souches XL1blue ou JM-109 DE3 est appelé LB, du nom de ses inventeurs Luria et Bertani. Il est composé d'extrait de levure à 5 g/L, de tryptone à 10 g/L et de chlorure de sodium à 10 g/L. Le pH du milieu est ajusté à 7 avant autoclavage.

Un autre milieu de culture largement employé est le SOC. De part sa richesse notamment en glucose, rapidement assimilable par les cellules bactériennes, c'est un milieu idéal pour faire croître des cellules fragilisées par exemple après le processus de transformation. Il est formé sur la base du milieu SOB (bacto-tryptone à 20 g/L, extrait de levure à 5 g/L, chlorure de sodium à 0,5 g/L et chlorure de potassium à 2,5 mM, le tout ajusté à pH 7) auquel on ajoute après autoclavage du chlorure de magnésium à 10 mM et du glucose à 20 mM, chacun en concentration finale.

#### A.2.2 Milieux solides

Le milieu solide est fabriqué à partir du milieu liquide LB auquel est ajouté avant autoclavage de l'agar à concentration finale de 15 g/L. Il est étalé à chaud dans des boîtes de Pétri puis prend la consistance d'un gel solide en refroidissant.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> www.novagen.com

Dans les milieux de criblage d'activité, les substrats sont ajoutés en même temps que l'agar à raison de 0,5% (p/v) pour le xylane de bouleau (Sigma-Aldrich<sup>5</sup>, États-Unis) (recherche d'activité xylanolytique) et de 0,5% (p/v) pour la carboxyméthylcellulose (Sigma-Aldrich) (recherche d'activité cellulolytique), en plus du colorant rouge Congo (1% p/v) qui se fixe sur ces polymères. Lorsque les colonies secrètent des enzymes actives, le polymère est hydrolysé, formant ainsi un halo de lyse autour d'elles.

#### A.2.3 Milieu pour l'expression de protéine Se-Met

Afin de permettre l'incorporation de Se-Met uniquement, le milieu de culture ne doit pas contenir de méthionine naturelle S-Met. On prépare donc un milieu minimal contenant tous les acides aminés sauf la méthionine, remplacée par la Se-Met (voir composition en annexe).

#### A.3 Culture et croissance bactériennes

#### A.3.1 Pré-culture

Elle est réalisée à partir du prélèvement d'une simple colonie issue d'une boîte de Pétri ou bien d'une souche conservée à  $-80^{\circ}$ C, alors placée dans 100 mL de milieu LB avec ajout d'ampicilline à 100 µg/mL pour la culture de Tx–Xyl dans *E. coli* XL1-blue ou JM-109, ou de kanamycine à 10 µg/mL pour la culture de Tx–Abf dans XL1-blue (rajout de chloramphénicol à 20 µg/mL si la culture est réalisée dans BL21). Après une croissance d'une nuit (16 h) à 37°C sous agitation, cette culture sert à inoculer un volume de milieu plus grand.

#### A.3.2 Croissance et expression

Des volumes de culture variés ont été utilisés en fonction des quantités de protéines requises. Généralement, les cultures bactériennes ont été effectuées dans des volumes de LB de 1 L ou 2 L comprenant les mêmes antibiotiques que ceux ajoutés dans la pré-culture. La croissance bactérienne à 37°C sous agitation est ensuite suivie par mesure de l'absorbance à 600 nm. Lorsqu'elle atteint 0,5~0,6, les bactéries sont dans la phase de croissance exponentielle, c'est le moment d'ajouter l'inducteur IPTG à une concentration finale de 0,4 mM (dans le cas seulement des cellules JM109-DE3, les cellules XL1-blue ne possédant pas le promoteur T7 inductible, on utilise simplement l'effet de l'expression constitutive du gène). La croissance cellulaire ralentit alors car les bactéries entrent dans la phase d'expression de la protéine recombinante. On laisse cette phase se poursuivre durant 3~4 h, puis les culots bactériens sont ensuite simplement récupérés lors d'une centrifugation à 6000 rpm/30 min.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> www.sigma-aldrich.com



Figure 1 – Principe de l'amplification exponentielle par PCR.

Afin de produire une quantité plus élevée de protéines recombinantes, nous avons également eu recours à l'utilisation d'un fermenteur de 11 L, commandé par une plateforme BIOFLO 3000 (New Brunswick Scientific<sup>6</sup>, États-Unis). Ce système où la température est fixée à 37°C permet de réguler précisément le pH, le taux d'oxygénation de la culture, et de fournir une forte agitation, permettant des conditions de croissance optimales.

#### A.3.3 Expression de protéines séleno-méthionylées

Une préculture de 5 mL de la souche *E. coli* B834 est d'abord réalisée à 34°C pendant une nuit dans le milieu minimal sans la Se-Met, avec ajout des antibiotiques kanamycine et chloramphénicol à des concentrations finales de 10 et 20  $\mu$ g/mL respectivement. Ensuite, 5 mL de cette culture sont ajoutés à 500 mL du même milieu avec la Se-Met puis la croissance est menée à 30°C. Celle-ci est plus lente que sur un milieu riche comme le LB, mais une fois que l'absorbance à 600 nm atteint 0,5~0,6, l'expression de la protéine sélénométhionylée est induite par ajout d'IPTG à 200  $\mu$ M en concentration finale. Après 4~5 h, on récupère le culot bactérien en centrifugeant le milieu à 6000 rpm/30 min.

#### A.3.4 Conservation des souches

Les souches bactériennes issues d'une culture liquide peuvent être facilement conservées sur de longues périodes (plusieurs années). Il suffit pour cela d'ajouter à parts égales la culture liquide et une solution aqueuse de 50% de glycérol dans un tube cryogénique (environ 1,5 mL de volume final) qui est placé immédiatement dans un congélateur à  $-80^{\circ}$ C. À cette température l'eau forme des cristaux de glace amorphe qui n'endommagent pas les cellules bactériennes. Il suffit de prélever de manière stérile un fragment de la culture ainsi conservée pour procéder à une nouvelle culture liquide.

#### **B** Caractérisation des ADN recombinants

#### B.1 Amplification et mutagenèse

#### **B.1.1** Amplification par PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR pour *Polymerase Chain Reaction*) a pour but l'amplification d'un fragment d'ADN en un grand nombre de copies par la répétition de cycles (de 30 à 40) comportant 3 étapes, de température et de temps variables (**Figure 1**) :

*dénaturation* (95°C, 30 s) : les brins d'ADN se séparent, les réactions enzymatiques sont stoppées ;

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> www.nbsc.com



Figure 2 – Principe de la mutagenèse dirigée avec le kit *QuickChange Mutagenesis* de Stratagene.

- hybridation (54°C, 30 s): les amorces (primers) reconnaissent leurs séquences complémentaires qui encadrent le fragment à amplifier sur les simples brins d'ADN cible. Les liaisons les plus stables permettent à l'ADN polymérase de débuter la copie ;
- *élongation* (72°C, 60 s): l'ADN polymérase incorpore des nucléotides dNTP en travaillant dans le sens 5'→ 3' (car elle lit la matrice dans le sens 3'→ 5').

Pratiquement, le mélange réactionnel dans 50 µL dans l'eau est constitué de :

- matrice d'ADN : de 1 à 500 ng
- amorces sens et anti-sens : de 10 à 50 pmol
- dNTP : 200 μM
- tampon de réaction
- ADN polymérase : de 1 à 2 UI/réaction (la polymérase utilisée est la *Pfu* DNA polymérase de Promega<sup>7</sup>, États-Unis)

#### **B.1.2 Mutagenèse dirigée**

La mutagenèse de l'ADN est l'étape pré requise pour l'insertion de mutations au coeur d'une protéine recombinante. Le kit *QuickChange* de Stratagene permet de modifier, supprimer ou encore insérer plusieurs bases de l'ADN (à un seul endroit à la fois). Pour cela, deux amorces oligonucléotidiques complémentaires (ou *primers*, voir liste en annexe) comportant la mutation sont hybridées au gène cible et soumises à des cycles de polymérisation et de dénaturation permettant leur élongation (**Figure 2**), conduisant à l'apparition de nouveaux brins d'ADN portant la mutation. Afin d'éliminer les brins parentaux qui ne comportent pas la mutation désirée, on utilise le fait que cet ADN est méthylé car issu de souches bactériennes. Ainsi, l'endonucléase *DpnI* qui ne reconnaît son site de restriction que lorsque celui-ci est méthylé va digérer l'ADN parental, laissant intact l'ADN néosynthétisé, qui va pouvoir être transféré dans une cellule hôte par le processus de transformation.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> www.promega.com

#### B.2 Transformation des cellules compétentes

#### **B.2.1** Préparation des cellules compétentes par voie chimique

Les cellules XL1-blue sont fournies par la société Stratagene, seules les cellules JM109 DE3 sont rendues compétentes par voie chimique. La méthode utilisée provient du kit *Z-competent* E. coli *transformation kit and buffer set* de la société Zymo Research<sup>8</sup> (États-Unis). Le principe est de réaliser une culture fraîche de 50 mL d'*E. coli* à  $20\sim25^{\circ}$ C jusqu'à atteindre une absorbance de 0,5~0,6 à 600 nm. Les cellules sont ensuite centrifugées 6 min à 2500 rpm à froid et le culot est resuspendu dans un tampon de lavage contenant des chlorures de sodium et de manganèse. Après une nouvelle centrifugation de 6 min à 2500 rpm, le culot est à nouveau suspendu dans un tampon contenant du chlorure de calcium et du glycérol, les bactéries sont réparties dans des tubes qui peuvent être stockés à  $-80^{\circ}$ C.

#### **B.2.2** Transformation par choc thermique

L'ADN plasmidique à transformer est ajouté en quantité déterminée à un aliquot de 500  $\mu$ L de cellules compétentes, qui est laissé sur glace pendant 30 min, temps nécessaire à l'ADN de s'adsorber sur la membrane cellulaire. Pendant le choc thermique de 45 s à 42°C qui suit, la cellule bactérienne active ses gènes du système SOS qui vont permettre la réparation de la cellule, et capture l'ADN qui pénètre alors à l'intérieur de la cellule. Après un passage à nouveau sur glace, 1 mL de milieu SOC est ajouté aux cellules qui sont mises en culture pendant 1 h à 37°C sous agitation. Les cellules sont ensuite étalées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu voulu en présence de l'antibiotique marqueur de sélection afin que seules les bactéries ayant intégré le plasmide puissent se multiplier.

#### B.3 Purification et dosage

#### **B.3.1 Purification de l'ADN plasmidique**

L'ADN plasmidique est extrait des cellules d'*E. coli* grâce au kit *QIAprep Miniprep* de Qiagen<sup>9</sup> (Etats-Unis). Le protocole consiste tout d'abord à centrifuger 1,8 mL de la culture afin de récupérer le culot bactérien, les cellules subissant ensuite une lyse en conditions basiques (dénaturation de l'ADN génomique) en présence de SDS (lyse de la membrane cellulaire), suivie d'une purification par chromatographie échangeuse d'anions. Les plasmides se fixent à la résine, alors que les ARN, protéines, impuretés sont éliminés lors d'un lavage en

<sup>8</sup> www.zymor.com

<sup>9</sup> www.qiagen.com

conditions modérées de sels. L'ADN est ensuite lavé par une solution contenant de l'éthanol et récupéré par centrifugation dans de l'eau.

#### **B.3.2 Extraction d'ADN sur gels d'agarose**

Avec le kit *MinElute* de Qiagen, il est possible d'isoler et de purifier des fragments d'ADN qui ont migré sur un gel d'agarose. Le morceau de gel où se trouve le fragment d'ADN d'intérêt est découpé puis dissous dans un tampon contenant des composés chaotropiques. En présence de fortes concentrations de sels, l'ADN se fixe sur une membrane de silice, et après un lavage qui élimine les impuretés, les fragments d'ADN sont élués et récupérés dans l'eau.

#### **B.3.3 Dosage de l'ADN**

À conditions que l'échantillon d'ADN ne comporte pas de contaminants en quantités importantes (protéines, phénol, ARN), le dosage de l'ADN par spectrophotométrie UV est simple et précis. Pour cela, on mesure l'absorbance de l'échantillon à 260 nm et 280 nm, en considérant qu'une absorbance égale à 1 à 260 nm dans l'eau équivaut à une concentration d'ADN double brin de 50 ng/ $\mu$ L. Le calcul du rapport A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> fournit une estimation de la pureté de l'ADN, il doit être compris entre 1,8 et 2,0. Si le rapport est inférieur, cela indique une contamination par des protéines et des substances aromatiques, s'il est supérieur, de l'ARN se trouve dans l'échantillon.

#### B.4 Caractérisation de l'ADN

#### B.4.1 Electrophorèse sur gel d'agarose

C'est la méthode standard pour séparer, identifier et purifier des fragments d'ADN dont la taille peut aller de 200 pb à 50 kpb. L'agarose, ajouté au tampon TAE (Tris-acétate 20 mM et EDTA 0,5mM, pH 8), puis dissous à chaud forme un gel en se refroidissant. En appliquant un champ électrique de 75V dans le gel, les molécules d'ADN disposées dans des puits vont s'orienter et migrer dans la matrice du gel à des taux inversement proportionnels au logarithme du nombre de paires de bases. En fixant correctement la concentration en agarose dans le gel, on modifiera sa réticulation donc le domaine de séparation accessible.

Les gels à 1% (p/v) permettent d'isoler des fragments allant de 500 pb à 10 kpb (généralement les plasmides), ceux à 2% (p/v) sont plutôt utilisés pour détecter de plus petits fragments de 100 pb à 2,5 kpb. L'ADN est ensuite coloré par une solution de bromure d'éthidium à 1 mg/mL. Cette substance s'intercale entre les bases coplanaires de l'ADN et le complexe ADN-éthidium alors formé réémet de l'énergie dans la région rouge-orange du spectre visible

lorsqu'il est soumis à un rayonnement UV, permettant l'observation et la localisation des fragments d'ADN par rapport à un marqueur de taille.

#### **B.4.2** Séquençage automatique

Le séquençage des gènes mutés de xylanases a été réalisé en grande partie sur un séquenceur automatique à fluorescence MegaBACE 1000 équipé de 16 capillaires d'électrophorèse, de la société Amersham Bioscience<sup>10</sup> (États-Unis). Le fait de posséder cet instrument au laboratoire présentait l'avantage d'obtenir de manière rapide la séquence d'un nouveau gène muté.

La première étape consiste en l'incorporation de ddNTP dans l'échantillon analysé, en utilisant le kit DYEnamic ET Dye Terminator (Amersham Biosciences). Ces ddNTP modifiés comportent un fluorophore composé de deux parties et utilisent le transfert d'énergie pour augmenter l'efficacité d'excitation. La partie donatrice (5-carboxy-fluorescein-FAM), qui est directement excitée par un laser argon (488 nm), transfert de l'énergie à la partie accepteuse qui varie selon le ddNTP considéré. Lors de leur retour à l'équilibre, les quatre parties acceptrices émettent à des longueurs d'onde différentes, permettant d'attribuer le type de ddNTP incorporé donc la séquence d'ADN après analyse.

Ainsi, en partant d'une amorce de séquençage T7 sens ou anti-sens (qui se fixe sur le promoteur T7 ou le terminateur T7 présents sur le plasmide), une ADN polymérase va incorporer normalement les dNTP comme dans une réaction de PCR classique jusqu'à ce qu'un ddNTP marqué termine l'élongation. La fréquence d'incorporation des ddNTP étant faible, une population d'ADN composée de toutes les tailles possibles et marquée par un fluorophore à son extrémité 3' est générée. Le milieu réactionnel d'un volume final de 20  $\mu$ L contient :

- l'ADN à séquencer (120 ng);
- l'amorce T7 de séquençage (5 pmol), sens ou anti-sens uniquement à la fois ;
- le *premix*, mélange de la polymérase appelée *Thermo Sequenase* II, des dNTP classiques et des ddNTP marqués (8 µL).

Les conditions d'élongation suivent le cycle suivant répété 35 fois :

94°C/20 s — 50°C/15 s — 60°C/60 s

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> www.amershambiosciences.com

L'ADN obtenu est ensuite purifié par une précipitation à l'éthanol. On ajoute 2  $\mu$ L (v/v) d'un tampon acétate de sodium / EDTA pour arrêter la réaction puis 80  $\mu$ L d'éthanol à 95%. Une première centrifugation à 13000 rpm/15 min suivie d'une aspiration du surnageant permet de récupérer un culot d'ADN avant un deuxième lavage dans 200  $\mu$ L d'éthanol à 70% (v/v). Le culot est séché et repris dans 10  $\mu$ L d'eau, puis conditionné dans une plaque de 96 puits.

La plaque d'échantillons est ensuite introduite dans le séquenceur et l'ADN est chargé dans les capillaires par application d'une tension de 3 kV pendant 20 s. La migration des fragments d'ADN (9 kV, 100 min) s'effectue dans une matrice LPA (polyacrylamide linéaire) qui permet une séparation en fonction de leurs tailles. En sortie de capillaire est placé un système de détection de la fluorescence des ddNTP, le signal enregistré est traité afin d'obtenir un électrophorégramme (intensité du signal en fonction de la position de la base dans la séquence). En routine, on parvient à séquencer environ 600 bases, sachant que généralement la qualité de l'électrophorégramme sur les 50 premières est insuffisante. En réalisant le séquençage dans les sens  $5' \rightarrow 3'$  et  $3' \rightarrow 5'$ , on parvient à un résultat tout à fait fiable et interprétable, étant donnée la longueur du gène séquencé de la xylanase (550 pb). La qualité du séquençage et le nombre de bases séquencées peuvent être accrus en couplant une diminution du voltage à une augmentation du temps de migration.

#### C Caractérisation des protéines recombinantes

#### C.1 Analyses biochimiques

#### C.1.1 Extraction et récupération des protéines

#### C.1.1.1 Tx-Xyl recombinantes

L'étape préalable à l'analyse des protéines recombinantes est leur récupération à partir de la culture bactérienne. Le milieu est centrifugé à 6000 rpm/30 min afin d'obtenir un culot cellulaire qui est repris dans 10% du volume de culture dans un tampon d'acétate de sodium 50 mM, pH 5,5. Cette solution est soumise à l'action de la sonde d'un sonificateur qui génère des ultrasons pendant 5 s toutes les 5 s sur une période de 40 min, l'ensemble étant maintenu à 4°C. Les ondes produites provoquent un phénomène de cavitation, créant des micro bulles qui lors de leur explosion libèrent une forte énergie qui vient endommager la paroi cellulaire, qui peu à peu est détruite, laissant s'écouler le milieu intra-cellulaire. La destruction totale par sonification est vérifiée par observation microscopique, puis une centrifugation à 6000 rpm/30 min permet de se débarrasser des débris pariétaux et de récupérer le surnageant comportant les protéines recombinantes.

#### C.1.1.2 Tx-Abf recombinantes

Le milieu est centrifugé à 6000 rpm/30 min afin d'obtenir un culot cellulaire qui est repris dans 2% du volume de culture dans un tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Après une étape de sonification identique à celle des Tx–Xyl recombinantes, une étape de pré-purification consiste en un chauffage à 70°C pendant 30 min qui permet de précipiter la plupart des protéines mésophiles d'*E. coli* avant l'étape de purification proprement dite.

Lors de la purification de Tx–Abf–Se, l'étape de chauffage à 70°C est réalisée sous atmosphère protectrice d'azote afin d'éviter l'oxydation des atomes Se.

#### C.1.2 Purification des Tx–Xyl recombinantes

La xylanase sauvage ainsi que ses divers mutants ont tous été purifiés en deux étapes successives, d'après le protocole mis au point par Debeire-Gosselin *et al.*, 1992 :

- une chromatographie échangeuse d'ions : le surnageant des culots bactériens est passé sur une colonne de Q-sepharose (Amersham Biosciences) équilibrée avec du Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 ;
- une chromatographie hydrophobe : l'éluat précédemment obtenu est passé sur un gel de phényl-sepharose (Amersham Biosciences) équilibrée avec le même tampon, où se fixe l'enzyme. De part sa forte hydrophobie, la xylanase se fixe sur la résine, et son élution est réalisée par de l'éthylène glycol à 25% dans le même tampon.

La pureté de la protéine est vérifiée par une analyse SDS-PAGE.

#### C.1.3 Purification des Tx-Abf recombinantes

Le surnageant obtenu après chauffage est ramené à une concentration de 1 M en sulfate d'ammonium et déposé sur une colonne de gel hydrophobe (phényl-sépharose). La purification est assistée par le système Biocad Sprint (PE Biosystems<sup>11</sup>, États-Unis), la Tx–Abf est éluée du gel par un gradient décroissant de 1 à 0 M en sulfate d'ammonium, les fractions contenant l'enzyme sont ensuite désalées par dialyse pour être conservées (d'après le protocole de Debeche, 2001). La pureté est contrôlée par un gel de SDS-PAGE.

#### C.1.4 Dosage des protéines

Connaissant le coefficient d'extinction molaire  $\varepsilon$  à 280 nm de la xylanase sauvage Tx–Xyl, égal à 218592 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> (Debeire P. *et al.*, résultat non publié), on peut mesurer par

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> www.appliedbiosystems.com

spectrophotométrie l'absorbance A à 280 nm de la solution et en déduire la concentration c des différentes xylanases mutantes via la loi de Beer-Lambert :

$$c = \frac{A_{280}}{\varepsilon \cdot l}$$

Le coefficient d'extinction molaire dépend surtout de l'absorbance des résidus Trp, dans une moindre mesure de celle des résidus Tyr et des ponts disulfure. Aucun résidu Trp n'a été supprimé dans les divers mutants créés, les seules mutations susceptibles de modifier  $\varepsilon_{280}$  sont l'ajout de ponts disulfure ou la suppression d'une Tyr, mais les variations de  $\varepsilon_{280}$  ne sont que de 0,2% et 1,4% respectivement (d'après Pace *et al.*, 1995). On considère donc que  $\varepsilon_{280}$  est inchangé.

La concentration de l'arabinofuranosidase Tx–Abf sera calculée de la même manière, en utilisant son coefficient d'extinction molaire égal à 85230  $M^{-1}$ ·cm<sup>-1</sup> (Debeche *et al.*, 2002).

#### **C.1.5** Dosage des ponts disulfures

La protéine à analyser, de concentration connue et contenue dans un volume de 900  $\mu$ L, est tout d'abord dénaturée pendant 30 min à 95°C en présence d'urée 6 M. On ajoute alors ce volume à 100  $\mu$ L d'une solution d'acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) (DNTB) à 3 mM (réactif d'Ellman) dans une cuve transparente de spectrophotomètre. L'absorbance est mesurée à 412 nm jusqu'à ce qu'elle se stabilise (~30 min), l'ion 2-nitro-5-thiobenzoate absorbe au maximum à cette longueur d'onde et possède un coefficient d'extinction molaire de 13700 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Une gamme est réalisée en remplaçant les 900  $\mu$ L de protéine par une solution d'hypochloride de cystéine dont la concentration varie de 0 à 100  $\mu$ M. Un rapport proportionnel direct existe entre l'absorbance et la concentration en Cys libre, ce coefficient est utilisé pour la détermination du nombre de résidu Cys libres chez les mutants testés.

#### C.1.6 SDS-PAGE

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS est le moyen le plus employé pour l'analyse qualitative des protéines, ainsi que pour l'examen de leur pureté, dans des conditions qui assurent leur dissociation en sous-unités et qui minimisent l'agrégation. Le détergent SDS est utilisé avec un agent réducteur (5  $\mu$ L de SDS 8%, 2– $\beta$ –mercaptoéthanol 4%, DTT 80 mM, bleu de bromophénol 0,4%, Tris-HCl 200 mM, glycérol 40%, pH 6,8), 5  $\mu$ L est ajouté à 15 $\mu$ L d'échantillon, avant d'être chauffé à 100°C durant 10 min. La protéine alors dénaturée se lie



Figure 3 – Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF.

au SDS (la quantité de SDS fixée est proportionnelle au poids moléculaire de la protéine et indépendant de sa séquence) et devient chargée négativement.

L'électrophorèse est effectuée dans un système de tampons discontinu dans lequel le tampon de migration (glycine 28,8 g/L, Tris 6 g/L, SDS, pH 8,3) possède une force ionique et un pH différents de ceux utilisés pour couler le gel. Le gel (12% p/v) est composé de chaînes de polyacrylamide polymérisées par le N,N'-méthylènebisacrylamide et est coulé entre deux plaques de verre. L'échantillon déposé dans des puits migre d'abord dans le gel dit de concentration (Tris-HCl 0,5M, pH 6,8) puis passe dans le gel de séparation (Tris-HCl 1,5M, pH 9) sous une tension de 200 V pendant 45 min. Les protéines migrent selon leur taille qui peut être estimée par rapport à un marqueur de taille après coloration au bleu de Coomassie (0,1% p/v) et révélation par décoloration à l'acide acétique à 10% (v/v).

#### C.1.7 Spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

La spectrométrie de masse désigne une méthode d'analyse qui repose sur la détermination des masses des espèces atomiques ou moléculaires individuelles de l'échantillon analysé, ce qui permet de recueillir des informations sur sa nature, sa structure et sa composition (ce qui nous intéresse ici). Son principe en est relativement simple : une très petite quantité de l'analyte est passé sous forme gazeuse puis ionisé afin de soumettre les espèces chargées à l'action d'un champ électrique et/ou magnétique selon le type d'appareil. L'étude des trajectoires où règne un vide poussé (10<sup>-4</sup> Pa) permet de déterminer le rapport masse/charge *m/z* des ions donc leur masse. La méthode, d'une extrême sensibilité, détruit l'échantillon.

Pour la détermination de la masse de nos échantillons de protéines, nous avons eu recours à la spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight*), avec un appareil Voyager DE de Applied Biosystems<sup>12</sup>. On peut classer les étapes successives de l'analyse de la manière suivante (**Figure 3**) :

- ionisation : l'espèce étudiée M est d'abord désalée à l'aide du kit ZipTip (Millipore<sup>13</sup>, États-Unis) puis co-cristallisée en présence de la matrice sur une plaque porteéchantillon. Pour les protéines analysées, la matrice employée est l'acide sinapinique, il est dilué à saturation dans une solution aqueuse d'acétonitrile 50% et d'acide trifluoroacétique 0,1%. Un volume de 1 μL est ajouté à 1 μL de l'échantillon sur la plaque, le mélange est laissé à l'air libre afin d'obtenir des cristaux après évaporation

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> www.appliedbiosystems.com

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> www.millipore.com

des solvants. L'intérêt de la matrice est de favoriser la séparation des molécules par réduction des forces intermoléculaires, d'absorber l'énergie du faisceau laser et de protéger l'analyte. L'impact d'une brève impulsion laser (337 nm) produit un plasma en surface de la cible, la matrice favorisant la désorption des grosses molécules et leur photo-ionisation lors du passage de l'état excité à l'état stable en libérant de l'énergie vibro-rotationnelle, entraînant le passage en phase gazeuse du mélange analyte/matrice. Un transfert de proton se produit alors de la matrice vers l'échantillon, générant des ions majoritairement mono chargés  $[M + H]^+$ ;

- *accélération* : aussitôt formés, les ions sont extraits de la source, focalisés et accélérés par un champ électrique appliqué entre la plaque porte-échantillon et la grille d'extraction (10-25 kV);
- *séparation* : les ions sont filtrés suivant leur rapport m/z par l'analyseur ;
- *détection* : tous les ions ayant été accélérés sur la même distance, ils possèdent la même énergie cinétique, donc le temps de vol (TOF), i.e. le temps s'écoulant entre l'extraction et l'arrivée sur le détecteur, est proportionnel au rapport *m/z*;
- *spectre de masse* : il est obtenu par l'analyse du signal du détecteur, représentant l'intensité de chaque rapport *m/z*.

On effectuera plusieurs mesures pour chaque échantillon (au moins cinq) afin non seulement de minimiser les incertitudes mais aussi de calculer la masse moyenne mesurée. C'est cette valeur accompagnée de son incertitude qui sera mentionnée par la suite.

#### C.1.8 Dichroïsme circulaire (DC)

Les mesures de dichroïsme circulaire donnent accès au repliement général d'une protéine, i.e. la nature et l'ordonnancement des éléments de structure secondaire les uns par rapport aux autres. Cette technique permet donc de comparer entre elles les structures de protéines ainsi que d'étudier l'impact de divers facteurs chimiques ou physiques sur leurs structures (Kelly & Price, 1997).

Une protéine en solution n'est généralement pas optiquement neutre, elle n'interagit pas de la même manière avec les composantes droite  $\vec{D}$  et gauche  $\vec{G}$  d'une onde polarisée à la longueur d'onde  $\lambda$ , car elle modifie l'amplitude (par absorption) et la phase de cette onde. Le lieu géométrique dans lequel se propage la résultante des vecteurs  $\vec{D}$  et  $\vec{G}$  n'est alors plus le



**Figure 4 – Spectres de DC de différentes structures secondaires**. Ligne continue : hélice  $\alpha$ ; tirets : feuillet  $\beta$  antiparallèles ; pointillés : coude  $\beta$  de type I ; tirets et pointillés : structure irrégulière (d'après Kelly & Price, 1997).

plan de polarisation circulaire mais un cylindre elliptique. Un spectropolarimètre mesure la différence d'absorbance  $\Delta A$  des deux composantes à une longueur d'onde donnée, appelée dichroïsme. Celle-ci peut aussi être exprimée sous la forme d'une ellipticité en degrés donnée par la relation  $\theta = \arctan(b/a)$  où *b* et *a* sont les petit et grand axes de l'ellipsoïde résultant.

#### C.1.8.1 Analyse structurale

Une des forces du DC est de pouvoir donner accès de manière quantitative aux éléments de structure secondaire par des mesures dans la région UV lointaine entre 180 et 240 nm. Ainsi, les hélices  $\alpha$  présentent un minimum double à 208 et 222 nm accompagné d'un maximum compris entre 191 et 193 nm. Elles se distinguent des brins  $\beta$  qui ne présentent qu'un seul minimum entre 210 et 225 nm et un seul maximum entre 190 et 200 nm. Les parties déstructurées ou dénaturées se caractérisent par un pic large entre 220 et 230 nm et un minimum à 200 nm (**Figure 4**).

Dans l'UV proche, les résidus aromatiques Trp, Tyr et Phe absorbent entre 250 et 290 nm, chacun présentant un profil particulier, et leur absorbance est influencée par des facteurs structuraux (rigidité de la protéine, interaction avec d'autres résidus aromatiques, nombre de résidus aromatiques). Les expériences de DC fournissent alors de bons indicateurs pour la comparaison de structures tertiaires entre des enzymes sauvage et mutées.

Les expériences de DC ont pu être réalisées grâce à la collaboration de MM. Masayuki Takahashi et Fabrice Fleury du C.N.R.S., à Nantes. Afin de comparer le bon repliement des xylanases mutantes à la xylanase sauvage, nous avons utilisé un spectrophotomètre Jasco J-810 (Jasco<sup>14</sup>, Japon) équipé d'un contrôleur de température à effet Peltier et de cuves en quartz de trajet optique 1 cm. Les mesures ont été effectuées à température ambiante sur des solutions de protéines à 0,010 mg/mL environ dans un volume de 150  $\mu$ L. Afin d'éliminer l'éthylène glycol contenu dans le tampon d'élution lors de la purification des xylanases, les solutions de protéines ont été préalablement dialysées deux fois contre 100 fois un volume du tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 6,5. L'acquisition des données a été réalisée entre 200 et 280 nm avec un incrément de 0,1 nm. Pour chaque série de mesure, le signal du tampon a été soustrait et la moyenne des données a été réalisée sur deux acquisitions au moins pour améliorer le rapport signal/bruit.

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> www.jascoint.co.jp

#### C.1.8.2 Analyse de la dénaturation thermique

La dénaturation d'une protéine par la chaleur peut être étudiée en mesurant les changements du spectre DC en fonction de la température à une longueur d'onde déterminée. Dans le cas de la xylanase étudiée, on observe un fort minimum d'absorbance aux environs de 220 nm, ce qui correspond à la présence de l'unique hélice  $\alpha$  dans la structure des xylanases. En se plaçant à cette longueur d'onde de référence, il est possible de mesurer l'ellipticité en faisant varier la température. On en déduit la température à laquelle 50% des protéines sont dénaturées, appelée température de fusion  $T_m$  (*melting temperature*). C'est une grandeur caractéristique de la thermostabilité des protéines. Dans notre étude, nous avons mesuré l'ellipticité  $\theta_T$  à 220 nm pour des températures *T* allant de 20 à 90°C puis de 90 à 20°C, avec un incrément de 1°C/min. La solution de protéine à 0,010 mg/mL est préparée de la même manière que précédemment dans le tampon phosphate de potassium.

Les mesures ont été converties en fractions dénaturées  $f_D$  de protéines par l'équation :

$$f_D = \frac{\left(\theta_T - \theta_N\right)}{\left(\theta_D - \theta_N\right)}$$

où  $\theta_N$  et  $\theta_D$  sont les ellipticités à l'état natif ( $T = 30^{\circ}$ C) et à l'état dénaturé ( $T = 90^{\circ}$ C). On trace ensuite la courbe  $f_D = f(T)$  qui est une sigmoïde dont le point d'inflexion correspond à  $T_m$ . Dans le but d'affiner nos calculs, nous avons ajusté les courbes expérimentales sur l'équation théorique d'une sigmoïde d'ordre deux avec le logiciel SigmaPlot 2000 6.1 (SPSS<sup>15</sup>, États-Unis) :

$$f_D = f_{D,0} + \frac{a}{1 + \exp\left(\frac{T_0 - T}{b}\right)}$$

Cette modélisation fournit les paramètres a, b et  $T_0$ .  $T_m$  correspondant par définition à la valeur  $f_D = f_{D,0} + a/2$ , i.e. la température au point d'inflexion de la sigmoïde, on obtient  $T_m = T_0$ .

#### C.1.9 Spectrométrie de fluorescence

Une molécule peut absorber un rayonnement électromagnétique par un processus de mécanique quantique où la molécule passe d'un état stable  $E_0(0)$  à un état excité  $E_1(0)$ . L'énergie du photon absorbé correspond à l'énergie entre ces deux états. Cette absorption

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> www.spss.com
résulte en une transition électronique  $E_1(0) \rightarrow E_0(0)$ , les électrons ayant gagné de l'énergie passe de l'orbitale moléculaire occupée la plus haute (HOMO : *highest unoccupied molecular orbital*) à celle inoccupée la plus basse (LUMO : *lowest unoccupied molecular orbital*). La probabilité d'absorption est fonction du coefficient d'extinction molaire  $\varepsilon$ , qui découle de la loi de Beer-Lambert. Différents processus entrent ensuite en compétition lors du retour à l'équilibre : parmi eux, la désactivation radiative ou fluorescence se caractérise par l'émission d'un photon d'énergie égale à la différence d'énergie entre  $E_1(0)$  et un niveau d'énergie vibrationnelle particulier de  $S_1$ . Ainsi, l'électron de l'orbitale antiliante  $\pi^*$  effectue un saut quantique sur l'orbitale  $\pi$  à moitié remplie, émettant un photon.

La fluorescence est souvent l'apanage des molécules aromatiques rigides qui possèdent des liaisons  $\pi$ . Chez les protéines, seuls les résidus Phe, Tyr et Trp absorbent dans l'UV, mais à cause de leurs forts  $\varepsilon$ , seuls Tyr ( $\varepsilon_{276} = 1405 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) et surtout Trp ( $\varepsilon_{280} = 5579 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) sont étudiés. Le fluorophore du groupe indole des résidus Trp possède une émission de fluorescence très sensible à son environnement moléculaire. On observe ainsi des variations d'émission allant de 308 nm pour un Trp enfoui dans le cœur hydrophobe d'une protéine à 350 nm pour un Trp exposé au solvant. Plus généralement, les valeurs vont de 320 à 340 nm. Chez Tx–Xyl, il existe 13 résidus tryptophane, mais celui en position 7 sur la séquence est connu pour interagir (voir Chapitre I, §C.4.6.2, p. 40) avec le substrat. Lors de la fixation de celui-ci, Trp<sup>7</sup> crée une interaction de *stacking* avec un sucre, ce qui diminue à la fois l'intensité de la fluorescence (*quenching*), mais en plus diminue la longueur d'onde d'émission vers les longueurs d'onde bleues (*blue-shift*). Ces variations sont dépendantes de la concentration du substrat, donc en mesurant la fluorescence émise en fonction de cette concentration, il est possible de calculer la constante d'affinité de l'enzyme pour le substrat ainsi que l'enthalpie libre de la réaction.

Les expériences de titration par spectrométrie de fluorescence ont également été réalisées avec l'aide de MM. Masayuki Takahashi et Fabrice Fleury du C.N.R.S, à Nantes. Les mesures ont été réalisées sur un spectrofluorimètre Jasco FP-6500 (Jasco) équipé d'un contrôleur de température à effet Peltier et de cuves en quartz de  $1,0 \times 1,0$  cm avec agitation continue. Les mesures ont été effectuées à 5°C (pour minimiser l'hydrolyse des enzymes) sur des solutions de protéines à 0,1 µM dans un volume de 1,8 mL. Afin d'éliminer l'éthylène glycol contenu dans le tampon d'élution lors de la purification des xylanases, les solutions de protéines ont été préalablement dialysées deux fois contre 100 fois un volume du tampon d'acétate de

sodium 50 mM, pH 5,8. La longueur d'onde d'excitation choisie pour le Trp est de 295 nm et les spectres d'émission ont été collectés sur l'intervalle 300–450 nm, avec une largeur de bande de 3 nm pour l'excitation et l'émission (temps de réponse : 0,2 s ; vitesse d'acquisition : 100 nm/min). Pour chaque série de mesure, le signal du tampon a été soustrait et la moyenne des données a été réalisée sur deux acquisitions pour améliorer le rapport signal/bruit, en tenant compte des changements de volume toujours inférieurs à 2%.

Les mesures consistent à ajouter une quantité connue d'oligosaccharide à la solution d'enzyme directement dans la cuvette de mesure. Afin d'augmenter la précision des mesures, deux longueurs d'onde autour du maximum du spectre qui présentent le maximum de différence d'intensité sont sélectionnées : il s'agit de 320 et 360 nm. Pour chaque concentration du ligand L, on calcule  $\Delta F = F_{360nm} - F_{320nm}$  et la courbe  $\Delta F_0 - \Delta F = \Delta \Delta F$  en fonction de [L] est tracée, où  $\Delta F_0$  est mesurée en l'absence de ligand. En ajustant cette courbe avec une hyperbole d'équation  $\Delta \Delta F = \frac{\Delta \Delta F_{max} \cdot [L]}{K_d + [L]}$  (SigmaPlot 2000 6.1), on aboutit à la détermination de  $\Delta \Delta F_{max}$  et surtout de  $K_a = K_d^{-1}$ .

L'enthalpie libre  $\Delta G^{\circ}$ , qui représente l'énergie de la réaction de fixation du ligand sur l'enzyme, peut aussi être calculée par l'équation  $\Delta G^{\circ} = R \cdot T \cdot \ln K_a$  où R est la constante des gaz parfaits et T la température de la mesure en K.

#### C.2 Caractérisation de l'activité enzymatique

#### C.2.1 Enzymologie et interprétation des données cinétiques

Les mesures de cinétique des réactions enzymatiques sont parmi les moyens d'approche les plus performants pour élucider les mécanismes catalytiques des enzymes. Sans revenir dans les détails, rappelons qu'une réaction enzymatique se déroule en deux étapes élémentaires, d'abord la formation d'un complexe enzyme-substrat ES entre l'enzyme E et le substrat S, qui se décompose pour donner les produits P et l'enzyme non modifiée :

$$E + S \xrightarrow{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Grâce à l'introduction de l'hypothèse de l'état stationnaire, qui postule que la concentration du complexe enzyme-substrat est inchangée au cours de la réaction, on peut exprimer la cinétique de la réaction sous la forme :

$$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}$$
  
avec  $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ .

Cette expression est l'équation de Michaelis-Menten, où  $V_m$  est la vitesse maximale atteinte par l'enzyme, et  $K_m$  la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximum, appelée *constante de Michaelis-Menten*. On peut aussi définir la constante catalytique d'une enzyme :

$$k_{cat} = \frac{V_m}{[E]_{tot}}$$

Cette valeur est appelée le *turn-over number* d'une enzyme car elle est égale au nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps par une seule molécule d'enzyme à saturation. Dans le modèle de Michaelis-Menten, quand  $[S] << K_m$  alors  $k_{cat} = k_2$ ; l'équation de vitesse devient :

$$v \approx \frac{k_{cat}}{K_m} \cdot [E] \cdot [S]$$

où  $k_{cat}/K_m$  est la constante de vitesse d'ordre deux de la réaction enzymatique, la vitesse varie donc selon la fréquence des rencontres entre l'enzyme et le substrat. L'expression  $k_{cat}/K_m$  permet de mesure *l'efficacité catalytique* de l'enzyme.

Il est particulièrement intéressant de calculer la limite supérieure de l'efficacité catalytique :

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_2}{K_m} = \frac{k_1 \cdot k_2}{k_{-1} + k_2}$$

Ce rapport est maximum lorsque  $k_2 >> k_{-1}$  d'où  $k_{cat}/K_m = k_1$ , la constante de vitesse d'ordre deux pour la formation du complexe ES. La valeur de  $k_1$  ne peut naturellement pas être supérieure à la fréquence avec laquelle les molécules d'enzyme et de substrat se rencontrent dans la solution. Cette limite physico-chimique, contrôlée par diffusion, est de l'ordre de  $10^8$  à  $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Donc des enzymes dont les valeurs du rapport  $k_{cat}/K_m$  sont de cet ordre catalysent une réaction chaque fois qu'elles rencontrent une molécule de substrat. Des enzymes comme la catalase ou l'acétylcholinestérase remplissent cette condition et sont donc proches de la perfection catalytique. Sachant que le site actif d'une enzyme n'occupe généralement qu'une petite fraction de sa surface totale, cela démontre la force du guidage électrostatique qu'exerce les enzymes sur leur substrat. L'équation de Michaelis-Menten étant une hyperbole équilatère, la détermination des paramètres cinétiques à partir de son tracé est très imprécise. Afin de surmonter ce problème, des transformations de l'équation pour s'affranchir de la dépendance des deux variables ont été introduites, pour obtenir une relation linéaire. Plusieurs représentations ont été décrites, la plus connue étant la représentation de Lineweaver-Burk 1/v = f(1/[S]), mais c'est malheureusement celle qui apparaît être la moins juste et la moins précise (Ranaldi *et al.*, 1999). On préférera donc utiliser la représentation de Headie-Hofstee v = f(v/[S]) qui minimise l'erreur expérimentale.

#### C.2.2 Criblage d'activité enzymatique

Le premier criblage d'activité est celui sur boîtes de Pétri, lors de la croissance des clones mutés. Le milieu gélosé est additionné de rouge Congo à 1% (p/v) ainsi que de substrats xylane de bouleau à 0,5% (p/v) pour la détection de l'activité xylanolytique ou de carboxyméthycellulose à 0,5% (p/v) pour l'activité cellulolytique. Durant la croissance bactérienne, de nombreuses cellules meurent au sein d'une colonie et libèrent leur contenu. C'est ainsi que les xylanases recombinantes se retrouvent au contact de ces substrats et au cas où elles les dégradent, ils sont en partie solubilisés et forment un halo autour de la colonie.

L'inconvénient de ce genre de crible est la difficulté parfois de s'assurer de la présence d'un halo de lyse à cause soit de la faible activité, soit du grand nombre de colonies présentes et donc de la petite taille du halo. De plus, la surface d'un halo n'est pas forcément un indicateur fiable de l'activité relative d'une colonie par rapport à ses voisines.

## C.2.3 Mesure des paramètres cinétiques des Tx-Xyl recombinantes par dosage des sucres réducteurs

L'hydrolyse du xylane de bouleau par les xylanases libère des oligosaccharides dont on peut doser les extrémités réductrices par la méthode de Kidby et Davidson (Kidby & Davidson, 1973). Son principe est que dans des conditions alcalines à 100°C, les extrémités réductrices des sucres réduisent le ferricyanure de potassium (jaune) en ion ferrocyanate (incolore). En suivant cette réduction par la mesure de l'absorbance à 420 nm, le nombre de liaisons hydrolysées par l'enzyme est quantifié. L'activité enzymatique est déduite de l'utilisation d'une gamme étalon en xylose de concentration connue. Il est important de noter que les oligosaccharides libérés sont de tailles variées et que le xylane de bouleau étant un substrat complexe, nous n'avons pas accès à sa concentration molaire (mol/L) mais à sa concentration massique uniquement (g/L), les paramètres cinétiques obtenus seront donc *apparents*.

Le réactif de Kidby a la composition suivante : 300 mg/L de ferricyanure de potassium et 10 g/L de carbonate de sodium dans l'eau, le pH de cette solution est proche de 12, ce qui présente l'intérêt d'arrêter la réaction enzymatique.

Le substrat xylane de bouleau (ou carboxyméthylcellulose) utilisé pour de simples mesures d'activité est préparé à 5 g/L dans du tampon acétate de sodium à 50 mM, pH 5,8.

Lors de chaque mesure d'activité, on procède comme suit :

- incubation de 900 µL de substrat placé dans un tube fermé placé dans un bain thermostaté à 60°C (5 min);
- ajout de 100 μL de la solution enzymatique à doser (purifiée ou non) ;
- prélèvements de 100 µL du milieu réactionnel toutes les 2 min pendant 10 min (soit six prélèvements). Chaque prélèvement est aussitôt ajouté dans un tube contenant 900 µL de réactif de Kidby, dont le pH très basique inactive l'enzyme. En faisant des prélèvements sur des temps courts, on reste dans des conditions de vitesse initiale ;
- une fois tous les prélèvements terminés, les échantillons sont portés à ébullition pendant 5 min puis refroidis pendant 5 min dans l'eau ;
- la lecture de l'absorbance à 280 nm est alors possible contre de l'eau. Pour la gamme étalon, la solution enzymatique est remplacée par une gamme de solution de xylose dont la concentration s'échelonne de 0 à 400 µg/mL.

On trace ensuite le graphe  $A_{280nm} = f(t)$  pour l'activité enzymatique et  $A_{280} = f([xylose])$ pour la gamme étalon. En tenant compte des différentes dilutions, le rapport des pentes donne l'activité enzymatique exprimée en µg de xylose/min/mL que l'on convertit en µmol de xylose/min/mL. Une unité enzymatique (UI) équivaut donc à la libération de l'équivalent d'une micromole de xylose par minute. Il sera aussi particulièrement utile de calculer *l'activité spécifique* AS d'une enzyme, exprimée en UI/mg d'enzyme, grandeur très importante pour la comparaison des xylanases mutantes dans les mêmes conditions.

Le calcul des paramètres cinétiques consiste à mesurer l'activité enzymatique pour différentes concentrations du substrat, qui s'échelonnent de 10 à 0,1 g/L. D'après l'équation de

Michaelis-Menten, on obtient  $v = V_m - K_{m (app)} \cdot \frac{v}{[S]}$  donc la représentation de Headie-Hofstee v = f(v/[S]) donne une droite dont l'ordonnée à l'origine est la  $V_m$  et la pente la  $K_{m (app)}$ .

#### C.2.4 Mesure des paramètres cinétiques des Tx-Abf recombinantes

Le dosage de l'activité de Tx–Abf est réalisé en continu à 60°C, dans du tampon acétate de sodium à 50 mM, pH 5,8, en mesurant l'action de l'enzyme sur un substrat synthétique, le pNP–Ara*f* (incolore).Celui-ci est en effet hydrolysé par Tx–Abf en paranitrophénol (pNP, produit coloré jaune), dont le coefficient d'extinction molaire dans les conditions physicochimiques de la réaction est égal à 2126  $M^{-1}$ ·cm<sup>-1</sup> à 401 nm. Le protocole suivant est employé :

- incubation à 60°C pendant 2 min de 900 µL de substrat pNP-Araf à 5 mM dans une cuve placée directement dans le spectrophotomètre ;
- ajout de 100  $\mu$ L de la solution enzymatique à doser dans la cuve ;
- l'absorbance à 401 nm est suivie pendant 15 min.

La concentration du produit libéré est donc égale à la concentration en pNP, qui est calculée par la loi de Beer-Lambert, connaissant la variation de l'absorbance sur les 15 min de réaction et en tenant compte des différentes dilutions.

Pour la détermination des paramètres cinétiques  $V_{\rm m}$  et  $K_{\rm m}$ , l'activité enzymatique doit être calculée pour diverses concentrations de substrat de 0,01 à 10 mM, les paramètres étant ensuite déduits de la représentation de Headie-Hofstee v = f(v/[S]).

#### C.2.5 Mesure de la thermoactivité et de la thermostabilité

La thermoactivité d'une enzyme est la mesure de son activité (donc en présence de substrat) à une température donnée. Elle est mesurée exactement comme décrit précédemment en incubant la réaction à la température T puis en réalisant des prélèvements durant 10 min. En variant T de 20 à 90°C, on peut déterminer la température où l'activité enzymatique est la plus élevée, appelée *température optimum*  $T_{opt}$ .

La thermostabilité par contre est la mesure de l'activité dans les conditions standardsCHAPITRE I - ci-dessus après avoir incubé l'enzyme seule durant un temps t à une température T. La représentation de l'activité résiduelle AR en % (activité au temps t divisée

par l'activité à t = 0) en fonction du temps à la température T montre l'inactivation progressive de l'enzyme (si T est proche de  $T_{opt}$ , autrement la variation est plus difficilement mesurable). Comme la dénaturation thermique de la xylanase est irréversible (voir §C.1.8, p. 84), sa cinétique suit une équation exponentielle décroissante du premier ordre, soit :

$$AR_T = a \cdot \exp(-b \cdot t)$$

L'ajustement des courbes expérimentales via le logiciel Sigma Plot 2000 6.1 fournit les paramètres *a* et *b* de l'équation. La grandeur qui nous intéresse pour comparer l'effet de la température pendant une incubation à une température donnée est le temps nécessaire pour que l'activité résiduelle devienne égale à la moitié de l'activité initiale (temps d'incubation nul mais mesure de l'AR à la température *T* et non à 60°C). Cette grandeur est le *temps de demi-vie*  $t_{1/2}$ , elle est obtenue par :

$$AR_T = 50\% \iff t_{1/2} = \frac{1}{b} \cdot \ln\left(\frac{a}{50}\right).$$

Un dernier paramètre pertinent est la température à laquelle une enzyme présente 50% de son activité, appelée  $T_{50}$ . Sa valeur est en générale inférieure à la température de fusion car l'enzyme commence à perdre son activité même lorsqu'elle n'est pas complètement dépliée ( $T_{\rm m}$  reflète l'état de la structure uniquement alors que  $T_{50}$  dépend de l'activité qui dépend de la structure). La comparaison de ces valeurs indique si même une dénaturation locale de l'enzyme influe sur son activité.

#### C.2.6 Hydrolyse d'un substrat complexe - analyse des produits de réaction

Afin de tester les xylanases recombinantes sur des substrats complexes proches de composés dégradés et valorisés dans des procédés industriels, l'activité enzymatique a été mesurée contre des sons de blé désamidonnés, fournis par la société A.R.D. (Agro-industries Recherches et Développements, Pomacle, France). Les réactions sont effectuées dans des petits réacteurs thermostatés dans lesquels est placée une concentration de 5g/L de son de blé dans l'eau sous agitation, auquel est ajouté un témoin interne de fucose à 100  $\mu$ g/mL pour l'analyse ampérométrique. Une première étape de mouillage qui dure au moins 12 h sert à hydrater le substrat en le solubilisant partiellement. Ensuite, les enzymes peuvent être ajoutées dans les réacteurs et des prélèvements sont effectués périodiquement pour analyse.

Ainsi, en plus du calcul des paramètres cinétiques déterminées pour les Tx-Xyl recombinantes, nous avons pu caractériser le type des mono- et oligosaccharides libérés lors

de l'hydrolyse enzymatique du son de blé (par CCM) ainsi que leurs quantités respectives (par HPAEC).

#### C.2.6.1 Chromatographie sur couche-mince (CCM)

Les échantillons de l'hydrolyse enzymatique (environ  $15 \,\mu$ L) sont directement chargés sur une plaque de silice placée ensuite dans une cuve contenant le solvant de migration composé d'acide acétique/butanol/eau dans les proportions 1/2/1 (v/v) (Palo & Savolainen, 1972). Une fois que le front de migration a atteint le haut de la plaque (5~6 h), celle-ci est séchée puis pulvérisée avec une solution d'acide sulfurique à 20% (v/v) contenant de l'orcinol à 14 mM. Les spots de migration apparaissent après une incubation de quelques minutes dans une étuve à 140°C.

#### C.2.6.2 Chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC-PAD)

Cette chromatographie permet l'analyse qualitative et quantitative des monosaccharides neutres. L'appareil utilisé est un Dionex ED40/GP40 équipé d'un passeur d'échantillons AS3500 (Dionex<sup>16</sup>, États-Unis). Son principe est qu'en milieu basique, les monosaccharides se comportent comme des acides faibles, ils possèdent donc une charge négative et peuvent être séparés par chromatographie échangeuse d'anions selon leur pK<sub>a</sub> (HPAEC : *High Performance Anion Exchange Chromatography*). Pour cela, on utilise des colonnes CarboPac PA1 (Dionex) comportant une résine pelliculaire non poreuse MicroBead (Dionex).

Les produits d'hydrolyse qui comportent des résidus solides sont tout d'abord centrifugés 10 min/13000 rpm. Le surnageant, contenant les sucres solubles, est récupéré, on en prend 200  $\mu$ L que l'on ajoute à 200  $\mu$ L d'acide sulfurique 12 M dans un tube en verre qui est incubé 1 h à 100°C, permettant l'hydrolyse complète des oligosaccharides en monosaccharides. L'échantillon est ensuite filtré sur une membrane PTFE de 0,22  $\mu$ m de porosité.

Les monosaccharides sont séparés sur une colonne analytique CarboPac PA1 ( $4 \times 250$  mm), équipée d'une pré-colonne CarboPac PA1 ( $4 \times 250$  mm), par un gradient d'acétate de sodium 0,3 M dans de la soude à 0,1 M. En sortie de colonne, un détecteur ampérométrique (PAD : *Pulsed Amperometric Detection*) mesure le courant généré par l'oxydation des sucres à la surface de l'électrode de travail en or. D'après la loi de Nernst, ce courant est lié à la concentration des sucres. L'utilisation du fucose en concentration connue comme étalon interne permet une bonne calibration et donne le coefficient de réponse. On obtient ainsi les

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> www.dionex.com

| Choix du précipitant  | Sels (sulfate d'ammonium, phosphates, NaCl,)<br>Polymères (PEG)<br>Solvants organiques (méthanol, 2-méthyl-2,4-pentane diol,) |
|---|---|
| Détermination des<br>conditions physico-<br>chimiques                 | pH, température<br>Ligands<br>Additifs (détergents, ions métalliques,)  |
| Choix de la méthode pour<br>atteindre lentement la<br>supersaturation | Cristallisation brute<br>Diffusion de vapeur (goutte pendante ou posée)<br>Diffusion libre à l'interface<br>Microdialyse      |

Tableau 1 – Conditions permettant la formation de cristaux de protéines et méthodes associées.

concentrations totales en monosaccharides des oligosaccharides solubles issus de l'hydrolyse du son de blé. Le calcul des concentrations en monosaccharides du son de blé s'effectue en hydrolysant de la même manière une masse connue du son avec de l'acide sulfurique 12 M pendant 2 h à température ambiante avant filtration et passage sur HPAEC-PAD.

#### D Cristallographie de protéines aux rayons X

#### D.1 Cristallisation de protéines

#### **D.1.1 Préparation des échantillons**

La cristallisation d'une protéine survient lorsque sa concentration en solution est plus élevée que sa limite de solubilité et que la protéine se retrouve dans un état dit supersaturé. Il s'agit en fait d'ajouter un ou plusieurs précipitants à la protéine, puis de trouver les conditions physico-chimiques qui permettront la formation par une précipitation lente de cristaux de taille suffisante en utilisant diverses méthodes (**Tableau 1**).

#### D.1.2 Méthodes de cristallisation

La technique de la goutte pendante consiste à mélanger quelques microlitres de la solution de protéine avec un volume égal de la solution contenant les précipitants du réservoir. Une goutte de ce mélange est déposée sur une plaque en verre qui vient recouvrir le réservoir, la jointure étant réalisée avec de la silicone. Puisque le mélange protéine/précipitant du réservoir de la goutte est moins concentrée que la solution du réservoir, de l'eau s'évapore de la goutte vers le réservoir. Ainsi les concentrations de la protéine et du précipitant augmentent peu à peu dans la goutte et des cristaux peuvent se former (**Figure 5**).

#### D.1.3 Criblage et conservation des cristaux de protéines

Nous avons utilisé les kits de criblage aléatoire de Hampton Research<sup>17</sup> lors de nos premiers essais pour définir des conditions, même grossières, de cristallisation avant de les affiner. Les cristaux de protéines mettent plusieurs jours, voire plusieurs semaines avant d'attendre des tailles satisfaisante pour l'analyse aux rayons X, pendant cette phase de croissance on observe les cristaux périodiquement à l'aide d'une loupe binoculaire. Si des cristaux présentent un profil intéressant, il peut être utile de les retirer de la goutte dans laquelle ils se trouvent afin d'éviter leur dénaturation par évaporation progressive de la goutte. Les cristaux sont prélevés de manière très délicate à l'aide d'une micro-boucle en nylon de quelques dixièmes de micromètres de diamètre fixée au bout d'une baguette et plongés dans l'azote liquide

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> www.hamptonresearch.com



Figure 5 – Méthode de cristallisation des protéines par la technique de la goutte pendante.



Figure 6 – Principe de la diffraction d'un cristal de protéine aux rayons X.

(-196°C), la glace vitreuse alors formée est amorphe et n'altère pas le cristal. La rapidité d'exécution du prélèvement du cristal par l'expérimentateur (quelques secondes) est un facteur essentiel pour le succès futur de l'analyse.

#### D.2 Cristallographie aux rayons X

#### **D.2.1** Collecte des données

Toutes les expériences de collecte de données se font dans des conditions cryogéniques, car elles améliorent de manière considérable la qualité des données en réduisant les dommages dus aux électrons des rayons X et les vibrations thermiques. Des rayons X monochromatiques issus d'un synchrotron (la meilleure source de rayons X) frappent le cristal et sont diffractés dans un ensemble de taches uniques appelées réflexions. L'intensité et la localisation des réflexions sont enregistrées par des caméras CCD. La rotation du cristal fixé sur un goniomètre (dispositif capable de décrire n'importe quel mouvement du cristal avec une précision de l'ordre de 0,01°) et l'enregistrement d'un nouveau jeu de données fournit un motif de réflexions différent, l'intensité et la localisation de chaque réflexion sont changées. L'expérience est poursuivie jusqu'à ce que toutes les réflexions possibles aient été mesurées (ce qui dépend de la symétrie du cristal).

Chaque réflexion est caractérisée par les trois indices de Miller *h*, *k* et *l*. Leur détermination nécessite de savoir avec exactitude l'orientation et le mouvement du cristal lors de l'expérience et l'angle de Bragg (2 $\theta$ ) associé à chaque diffraction (**Figure 6**).

#### D.2.2 Résolution des données

La résolution d est reliée au sinus du plus grand angle que toute réflexion fait avec le faisceau de rayon X et peut-être calculée par la relation de Bragg :

$$\lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin \theta_{hkl}$$

Plus l'angle de Bragg est élevé, et plus le nombre de réflexions augmente, meilleure est la résolution c'est-à-dire plus  $d_{hkl}$  est faible. L'inconvénient est que le nombre de réflexions augmente avec le cube de la valeur de la résolution (e.g. passer d'une résolution de 6 à 2,5 Å nécessite d'accroître le nombre de réflexions par  $(6/2.5)^3 = 14$  !).

#### D.2.3 Facteur de structure, amplitude et problème de phase

Un motif de diffraction est formé d'ondes disperses, ou réflexions, possédant à la fois une amplitude et une phase, chacune de ces ondes est appelée un facteur de structure  $F_{hkl}$ . L'amplitude peut être déterminée directement à partir de l'intensité de toutes les réflexions de Bragg :

$$\left|F_{hkl}\right| = \left[I_{hkl}(obs)\right]^{1/2}$$

et le facteur de structure est :

$$F_{hkl}(calc) = \sum_{j=1}^{n} f_j \cdot e^{-2\pi i \left(hx_j + ky_j + lz_j\right)}$$

où  $f_j$  est le facteur atomique de dispersion pour le  $j^{\text{ème}}$  atome, ce qui représente le pouvoir de diffraction d'un atome à différents angles de dispersion (C, N, O, et S ont des valeurs similaires).

En supposant que l'on connaît l'amplitude et la phase pour toutes les réflexions  $\Theta_{hkl}$ , la carte de densité électronique  $\rho$  peut être calculée pour n'importe quel point (*x*, *y*, *z*) de l'unité cristalline :

$$\rho_{xyz} = \sum_{-h}^{h} \sum_{-k}^{k} \sum_{-l}^{l} |F_{hkl}| \cdot e^{-i\Theta_{hkl}} \cdot e^{2\pi i \cdot (hx + ky + lz)}$$

Mais l'obtention de la phase est en fait problématique, parce qu'elle est perdue au cours de l'expérience : c'est le fameux problème de phase des cristallographes.

#### **D.2.4** Méthodes d'obtention des phases

#### D.2.4.1 Remplacement isomorphe multiple (MIR)

Cette méthode utilise le fait que dans les molécules où des atomes lourds ont été ajoutés, l'addition d'un atome lourd supplémentaire à l'unité cristalline permet de calculer la phase grâce à une construction dite de Harker, connaissant au préalable les facteurs de structure des cristaux de la protéine native (N) et pour le dérivé protéine + atome lourd (NA). Pour localiser les atomes lourds, on calcule la différence entre les amplitudes de  $F_{NA}$  et  $F_N$ :

$$\Delta P_{xyz} = \sum_{-h}^{h} \sum_{-k}^{k} \sum_{-l}^{l} |F_{hkl}|^2 \cdot \cos[2\pi(hx + ky + lz)]$$

avec 
$$\left|\Delta F_{hkl}\right|^2 = \left(\left|F_{NA,hkl}\right| - \left|F_{N,hkl}\right|\right)^2$$

#### D.2.4.2 Localisation des sites d'atomes lourds à partir des cartes de Patterson

La fonction de Patterson est essentiellement une déconvolution du facteur de structure. Elle ne requiert pas la phase et utilise les valeurs des intensités, qui sont facilement accessibles, comme des coefficients de Fourier. Une carte de Patterson présente n(n-1) piques (n est le nombre d'atomes de la molécule), les piques correspondent aux distances inter-atomiques, les distances entre atomes lourds étant facilement identifiables à cause du poids de leurs intensités, proportionnelles au carré de F. Ces cartes sont donc utilisées pour détecter les atomes lourds dans les structures protéiques dans la détermination de la phase par remplacement isomorphique. Elles servent aussi à localiser les anomalies de dispersions, les différences d'anomalies étant utilisées comme des coefficients sur la carte.

#### **D.2.4.3 MAD** (Multiple-wavelength Anomalous Dispersion)

Dans le cas général où aucune dispersion n'est anormale, les amplitudes des réflexions liées par les indices de Miller h, k, l et -h, -k, -l, appelées des paires de Bijvoet, sont égales. Mais des atomes tels que le sélénium Se diffractent les rayons X différemment, en fonction de la direction et des variations importantes de la valeur des paires de Bijvoet sont observées à une longueur d'onde donnée. Par ailleurs, les amplitudes de réfection d'indice h, k, l peuvent varier en fonction de la longueur d'onde (différence de dispersion). Il a été démontré de façon certaine que la conformation des protéines contenant des atomes Se à la place des atomes de soufre n'est pas altérée, donc l'isomorphisme est conservé. Ainsi, des mesures à différentes longueurs d'onde peuvent permettre de calculer la phase, c'est le principe de l'expérience MAD, dont le succès repose de manière critique sur la qualité et la complétude des données recueillies.

# D.2.4.4 Remplacement moléculaire : calcul de la phase par utilisation d'une structure homologue

Si les coordonnées d'une protéine homologue (appelée H) sont connues, alors l'utilisation de dérivés de protéines comportant des atomes lourds peut être évitée. Il faut juste mesurer un jeu de données de diffraction aux rayons X du cristal de la protéine inconnue I et suivre les étapes suivantes :

- acquérir un jeu de données à partir du cristal de la protéine I ;

- comparer les fonctions de Patterson des protéines H et I pour calculer la fonction de rotation afin que l'orientation (et non pas la position) de H et I dans l'unité cristalline soit déterminée ;
- déterminer la fonction de translation correcte de la position de la molécule H dans l'unité de la molécule I. Les valeurs calculées de |F(H)| sont comparées avec celles de |F(I)| jusqu'à parvenir à une bonne corrélation ;
- calculer un ensemble de phases de test  $\Theta_{test,hkl}$  en utilisant les coordonnées orientées et ayant subi une translation de la molécule I dans l'unité. La combinaison avec les amplitudes de la protéine I fournit une carte de densité électronique test :

$$\rho_{xyz} = \sum_{-h}^{h} \sum_{-k}^{k} \sum_{-l}^{l} |F_{\text{obs},hkl}| \cdot e^{-i\Theta_{test,hkl}} \cdot e^{2\pi i \cdot (hx+ky+lz)}$$

#### D.2.5 Facteur de température

Le facteur de structure F doit normalement contenir un terme exponentiel appelé le facteur de température  $B_j$  qui rend compte d'un léger déplacement du  $j^{\text{ème}}$  atome, qui dépend de la température.

$$F_{hkl}(\text{calc}) = \sum_{j=1}^{n} f_i \cdot e^{-2\pi i \left(hx_j + ky_j + lz_j\right)} \cdot e^{-B_j \cdot (\sin\theta_{hkl} / \lambda)^2}$$

avec  $B_j = 8\pi^2 \cdot \mu_j^2$  et  $\mu_j$  le déplacement moyen dans les trois directions du réseau.

Les valeurs de  $B_j$  sont propres à chaque atome et ne peuvent être obtenues qu'après l'affinement des données, elles suggèrent la mobilité conformationnelle des atomes et varient en fonction de leurs localisations dans la structure 3D. En général, les valeurs de *B* vont de 10 à 20 Å<sup>2</sup>, ce qui correspond à un déplacement moyen de 0,35 à 0,5 Å.

#### **D.2.6** Affinement des données

Une fois que les phases ont été obtenues, une carte de densité électronique peut être calculée et interprétée en termes de modèle : les facteurs de structure  $F_{hkl}$  peuvent être calculés et l'affinement consiste à changer les coordonnées x, y et z ainsi que le facteur de température B pour chaque atome jusqu'à faire coïncider du mieux possible les facteurs de structures calculés et observés. L'affinement concerne les longueurs de liaison, les angles de valence, les

angles dièdres, etc. de la protéine modèle afin de rendre le modèle correct d'un point de vue géométrique et au niveau des contraintes stériques et géométriques. Mais à cause du nombre élevé de paramètres à optimiser, c'est un travail qui requiert beaucoup de temps. La précision du modèle peut être testés en calculant le facteur R:

Facteur 
$$R = \frac{\sum \left( \left\| F_{obs,hkl} \right| - \left| F_{calc,hkl} \right| \right)}{\sum \left| F_{obs,hkl} \right|}$$

Quand le facteur R indique que l'affinement est terminé (i.e. qu'il est proche de 0,2), alors les molécules d'eau liées à la protéine peuvent être ajoutées aux coordonnées des atomes de la protéine, en prenant garde que le bruit de fond des données peut indiquer de manière trompeuse la présente d'une molécule d'eau.

#### D.2.7 Cartes de densité électronique

Une carte de densité électronique peut être tracée en sélectionnant des valeurs seuils pour les valeurs de densité électronique  $\rho_{xyz}$  et en connectant tous les points de même densité avec un ensemble de lignes, formant des contours : ce sont les cartes de densité électronique en fil de fer. Ensuite, l'interprétation des cartes en termes de modèles est réalisée en tenant compte de la séquence correcte en acides aminés de la protéine.

Il est également utile de calculer la différence entre deux cartes de densité électronique, par exemple entre un substrat complexé à une enzyme et la même enzyme seule. Ces différences servent à déterminer l'emplacement de sites actifs et les éventuels changements conformationnels apparaissant au cours de la fixation du substrat (même si ces changements doivent demeurer mineurs afin de conserver l'isomorphisme du complexe et de l'enzyme libre).

#### E Modélisation moléculaire

#### E.1 Objectifs et moyens de la modélisation moléculaire

Les approches de modélisation moléculaire se déroulent généralement en trois étapes :

 Visualisation tridimensionnelle de structures moléculaires, qui nécessite des outils matériels et logiciels particulièrement spécifiques pour la représentation d'objets 3D et leur manipulation interactive. Mais l'essentiel réside dans les mesures énergétiques (énergie potentielle, interactions intra- ou inter-moléculaires) qui vont définir la stabilité des constructions moléculaires. Le plus souvent, la mécanique classique est utilisée, mais on peut également employer des méthodes quantiques ou semi-quantiques.

- Compréhension du comportement du système étudié, par la mise en place de protocoles spécifiques dépendants du problème rencontré. Ce sont les calculs en eux-mêmes, comme la minimisation d'interactions ou la dynamique moléculaire, qui calculent l'énergie du système en fonction de la position relative des atomes dans l'espace.
- Prédiction des modifications apportées au système grâce à l'analyse des critères énergétiques.

Ce travail a été réalisé avec l'aimable collaboration du Professeur Vinh Tran, du CNRS, à l'Université de Nantes. La visualisation 3D ainsi que les divers calculs ont été effectués sur des stations de travail Silicon Graphics, à l'aide du logiciel Insight II (Accelrys<sup>18</sup>, anciennement MSI, États-Unis). Dans le cadre de notre projet, nous utiliserons les capacités de visualisation 3D fournies par la modélisation moléculaire, qui permettent une manipulation aisée des différentes molécules étudiées, ainsi que les capacités de calculs énergétiques de la mécanique moléculaire classique, dont une description succincte suit ce paragraphe.

#### E.1.1 Caractère empirique

Les molécules sont formées d'atomes liés entre eux et la géométrie de ces molécules est déterminée par la longueur des liaisons, les angles de valence et les angles dièdres. Il est possible de déterminer expérimentalement ces grandeurs optimales, et tout écart par rapport à ces valeurs déstabilise le système : c'est ce qu'on appelle *l'énergie potentielle du système*, qui est le critère essentiel pour juger de sa stabilité, basée donc sur des mesures empiriques.

#### E.1.2 Caractère déterministe

Comme on le voit, la mécanique moléculaire est essentiellement géométrique, les atomes sont assimilés à des points matériels chargés dont la position ainsi que l'énergie sont connues, à tout instant. Le système ne peut donc évoluer que par sa topographie, il est impossible de prendre en compte par exemple la rupture des liaisons qui peut survenir lors d'un mécanisme catalytique, phénomène non déterministe et impossible à paramétrer.

#### E.1.3 Caractère paramétrable

Les équations qui décrivent les variations de l'énergie potentielle du système en fonction de l'évolution de ces paramètres constituent le champ de force, où la fonction d'énergie est

<sup>18</sup> www.accelrys.com



Figure 7 – Termes du champ de force CFF91.

décomposée en ses termes énergétiques (Figure 7) sur le principe de la mécanique newtonienne :

- termes géométriques de base (numéros 1 à 4) : élongation de liaison, déformations d'angles de valence et dièdre, déformation hors du plan ;
- termes croisés (5 à 11): ils prennent en compte les déformations simultanées, par exemple l'élongation d'une liaison accompagnée de l'angle dièdre associé ;
- terme des interactions entre atomes non liés (12) : c'est l'expression des interactions de van der Waals, somme des potentiels électrostatiques attractifs et répulsifs.

Le champ de forces que nous avons utilisé est CFF91, dont le paramétrage a été établi à partir de mesures sur les protéines et les sucres, il est donc parfaitement adapté à notre étude.

#### E.1.4 Conformation et probabilités d'existence

Un système peut se trouver sous des conformations différentes (A et B), donc des énergies potentielles *E* différentes. La relation de Boltzmann permet de discriminer ces systèmes par le calcul du rapport de leurs *probabilités d'existence P* respectives :

$$\frac{P_{\rm A}}{P_{\rm B}} = \exp\left(\frac{E_{\rm B} - E_{\rm A}}{k \cdot T}\right)$$

où k est la constante de Boltzmann et T la température.

Ainsi, plus l'énergie potentielle de la conformation d'un système sera faible, plus sa probabilité d'existence sera élevée, donc plus il sera considéré comme stable. Ce sera le critère essentiel lors de mesures d'interactions enzyme/substrat ou de comparaison de conformations protéiques.

#### E.1.5 Minimisation de l'énergie potentielle

Lors de l'analyse d'un système, il peut être intéressant de savoir si son énergie est la plus faible, i.e. la conformation trouvée est la plus stable. Le processus de minimisation permet d'explorer la surface énergétique du système à la recherche des minima en faisant varier les paramètres géométriques. La difficulté d'interprétation réside dans le fait qu'il existe de nombreux *minima locaux* M<sub>L</sub>, ne correspondant pas à la conformation la plus stable, qui elle se situe au niveau d'un seul *minimum global* M<sub>G</sub>. La barrière énergétique entre les minima peut parfois être trop élevée pour que l'algorithme « ose » la franchir, c'est donc à l'utilisateur



Figure 8 – Représentation schématique d'une hypersurface énergétique ramenée à une dimension. Les minima locaux  $M_L$  et le minimum global  $M_G$  rencontrés lors de la minimisation du système sont indiqués.

de savoir parfois transgresser ponctuellement des règles géométriques pour mieux parvenir à la solution finale (**Figure 8**).

On emploie pour cela des algorithmes mathématiques, comme la méthode *Steepest Descent*, qui présente l'avantage de toujours converger vers le minimum le plus proche, même s'il reste assez lent. Son efficacité est par contre indéniable lorsque les systèmes moléculaires à affiner sont très proches de leur organisation optimale.

#### E.2 Analyse 1D, 3D, et superposition de structure

#### E.2.1 Analyse 1D : les alignements de séquences

La séquence primaire d'une protéine constitue le premier élément d'informations structurales que l'on possède sur une enzyme. Un alignement de séquences sert à mettre en évidence les parties conservées, dites consensus, chez un ensemble d'enzymes, qu'elles aient ou non des fonctions ou des architectures communes.

L'intérêt de l'alignement de séquences est qu'il requiert uniquement la séquence des protéines à analyser, laquelle est obtenue plus facilement qu'une structure de protéine. Il fournit alors rapidement les résidus conservés (notamment les résidus catalytiques) au sein d'une famille d'enzymes, ce qui apporte des indices concernant leur(s) fonction(s). Nous avons utilisé l'algorithme CLUSTAL\_X (Thompson *et al.*, 1997) implémenté dans le logiciel BioEdit (Hall, 1999) pour l'alignement multiple de séquences de protéines.

Une carence de l'alignement de séquences est que, par principe, il n'étudie pas l'arrangement des résidus dans l'espace. Même s'il existe des méthodes assez fiables pour déterminer les structures secondaires à partir de la séquence primaire, il n'en existe pas pour décrire la topographie des boucles qui n'ont pas de structure prédéfinie et qui possèdent de nombreux degrés de liberté.

L'hypothèse que la superposition dans l'espace (conservation 3D) de certains résidus est un élément important de la signature fonctionnelle nous amène à ré-analyser les alignements de séquences primaires. Le plus souvent, les superpositions 3D sont cohérentes avec les alignements mais assez fréquemment on observe des incompatibilités, car deux résidus conservés en alignements de séquences primaires peuvent apparaître soit éloignés spatialement, soit avoir des squelettes superposés mais des chaînes latérales décalées. L'analyse 3D remédie à ce problème, et permet en plus de connaître la position relative des éléments dans l'espace ainsi que leur éventuelle accessibilité au substrat.

#### E.2.2 Analyse 3D

L'analyse et la comparaison 3D des protéines sont indispensables pour mettre à jour des zones conservées ou non et dont la topographie est reliée à la fonction. Or, la superposition de leurs structures requiert la sélection d'éléments des protéines comme les ponts disulfure ou certains éléments de structure secondaire, parfois irréguliers qui pourraient donc biaiser la comparaison. Les résidus catalytiques, même s'ils sont largement conservés spatialement, sont souvent situés sur des boucles mobiles, ils ne pourront donc pas être utilisés comme éléments de superposition.

Par contre, il est intéressant de s'orienter vers des motifs structuraux impliqués uniquement dans l'architecture globale de la protéine et qui sont conservés. Ainsi, chez les xylanases de la famille 11, nous avons vu que leur structure en *jelly-roll* était parfaitement conservée, elle nous servira de référence de superposition. De même chez les Abf de la famille 51, le repliement de base est le *TIM-barrel*, également conservé, on s'appuiera sur ces éléments de structure secondaire pour conduire à bien notre analyse. Plus précisément, on utilisera le squelette des résidus impliqués dans ces structures (les chaînes latérales sont trop variables et mobiles).

Une fois la superposition effectuée, on pourra comparer les enzymes à plusieurs niveaux. Tout d'abord au niveau local, l'étude du squelette et des chaînes latérales indiquera le niveau de conservation des résidus sur la chaîne polypeptidique. Surtout, son avantage par rapport à la comparaison issue des alignements de séquences est qu'elle révèle des résidus ou des motifs conservés dans l'espace mais pas forcément sur les séquences, qui se trouvent par exemple sur des boucles différentes. D'autre part, à un niveau plus global, on examinera la surface des protéines, en particulier les zones accessibles au substrat. La surface d'une protéine est généralement représentée par une surface de Connoly, qui est la surface accessible d'une sonde sphérique de diamètre égal à celui d'une molécule d'eau. Cette analyse topographique 3D peut par exemple servir à comprendre pourquoi un substrat donné ne peut pas se fixer dans une crevasse catalytique à cause de contraintes stériques. Cette partie de notre travail a pu être réalisée à l'aide du logiciel en libre distribution PyMOL version 0.95 (Delano, ).

#### E.3 Mesure d'interactions enzyme/substrat

#### E.3.1 Modélisation du substrat

Lorsque l'étude d'une enzyme requiert l'étude des interactions formées avec le substrat mais qu'aucun complexe n'est disponible, il est possible soit de construire un substrat *ab initio*, ou

mieux d'utiliser des complexes déjà existants, impliquant des enzymes de la même famille, ou à défaut de même structure. Dans ces complexes, on peut trouver soit un inhibiteur lié ou non de manière covalente à l'enzyme, soit un produit résultant de l'action catalytique de l'enzyme. En général chez les glycoside-hydrolases, ce sont les sous-sites du côté NR qui comportent de telles molécules, la difficulté est alors de prolonger un substrat modèle vers les sous-sites du côté R.

Dans le cas d'un homopolymère glycosidique sans ramification, la géométrie de la propagation des sucres dépend des angles dièdres  $\varphi$  et  $\psi$  de leurs liaisons, qui sont définis par :

$$\varphi = \angle O_5 - C_1 - O_1 - C_4'$$
 et  $\psi = \angle C_1 - O_1 - C_4' - C_5'$ 

Il est possible de construire dans un premier temps ces cartes de contour isoénergétique fonction de la valeur des angles dièdres  $\varphi$  et  $\psi$  qui indiquent les conformations stables ou non. Le substrat modélisé devra alors toujours posséder une conformation vérifiant les angles dièdres de cette carte, sous peine d'avoir une énergie trop élevée et donc une existence improbable dans la crevasse catalytique.

#### E.3.2 Mesures des interactions aux niveaux sous-sites et atomiques

Une fois le substrat placé dans la crevasse catalytique, l'énergie d'arrimage (*docking*) est calculée, c'est-à-dire l'énergie d'interaction enzyme/substrat, qui est la somme des interactions électrostatiques et de van der Waals :

$$E_{\text{interaction}} = \sum_{i} \sum_{j} \left( \frac{q_i \cdot q_j}{\varepsilon \cdot r_{ij}} + \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right)$$

Cette énergie est le critère qui décide de la conservation de la conformation de ce complexe. Les résultats calculés n'ont pas de valeur absolue mais seulement relative : si l'énergie après minimisation est inférieure à la précédente, la nouvelle structure sera conservée.

L'inconvénient inhérent à cette méthode, comme dans tout processus de minimisation énergétique, est que le minimum trouvé est le plus souvent local. En effet, partant d'une certaine géométrie, l'algorithme parvient rapidement au minimum qui se trouve le plus près de la géométrie initiale. Si la barrière énergétique à franchir entre le minimum local et le minimum global est trop élevée, le logiciel ne la passera pas, donc l'interprétation des calculs sera biaisée.



**Figure 9 – Structure et topologie du pouce de Tx–Xyl**. A : représentation schématique de la structure du pouce (les liaisons hydrogène internes sont indiquées par des pointillés) ; B : topologie du pouce et réseau de liaisons hydrogène en alternance de la structure native.

Souvent, il faut modifier manuellement l'orientation des liaisons hydrogène, en particulier les chaînes latérales des résidus. Ces chaînes sont en effet particulièrement mobiles et existent sous de nombreuses conformations, dont les énergies ne diffèrent pas de façon importante mais dont l'orientation peut s'avérer avantageuse pour la création ou l'amélioration d'une liaison hydrogène.

Une fois que l'on juge une conformation enzyme/substrat satisfaisante, la mesure des interactions au niveau d'un sous-site et même au niveau d'une interaction localisée (*stacking* ou liaison hydrogène) est possible, ces données participent alors à la compréhension du mécanisme d'arrimage du substrat et sont à relier aux données enzymatiques.

#### E.4 Modélisation de boucles protéiques

Cette étude a été réalisée au travers du stage de Biologie Informatique de Mlle Virginie Bernard de l'Université Paris 7 en collaboration avec le Professeur Vinh Tran. Elle a consisté à modéliser les différents repliements possibles d'une boucle de la xylanase sauvage, le pouce, en utilisant comme seuls éléments sa structure issue des données cristallographiques et des contraintes géométriques internes à cette boucle.

Le protocole employé utilise la technique du recuit simulé (*simulated annealing*). Il consiste en l'exploration de l'espace conformationnel de la structure de la boucle native en deux phases. La première phase est une montée en température (500 K) afin de permettre l'établissement de conformations à intervalles réguliers. Cet apport d'énergie rompt les liaisons hydrogène entre les résidus de la boucle native, mais elles seront maintenues artificiellement en ajoutant des contraintes de distances fortes, pour conserver la cohésion de la structure du pouce. Le pouce étant une boucle repliée sur elle-même, les contraintes de distance sont définies entre les atomes se faisant face sur la boucle, une distance maximale de 3,2 Å entre les atomes lourds N et C des liaisons peptidiques, en variant les réseaux de contraintes testés (**Figure 9**) (un réseau consiste en un ensemble de liaisons hydrogène définies entre des résidus donnés).

Dans la seconde phase, les conformations obtenues subissent une lente diminution en température, puis une minimisation énergétique finale. Les contraintes de distances sont alors levées et la boucle obtenue peut donc soit conserver son réseau initial de liaisons hydrogène (intégralement ou partiellement), soit évoluer vers un nouveau réseau. Seules les boucles de plus basses énergies seront conservées pour l'analyse dans le contexte de l'enzyme.

# Chapitre III

# Étude de la thermostabilité de Tx-Xyl

### CHAPITRE III - ÉTUDE DE LA THERMOSTABILITÉ DE Tx–Xyl

#### A Problématique

Dans de nombreux procédés industriels, l'utilisation et le besoin d'enzymes thermostables sont considérables. La sélection et le crible des micro-organismes, notamment les extrêmophiles, permettent de découvrir chaque jour de nouvelles enzymes à fort potentiel. L'ingénierie enzymatique constitue de son côté un moyen efficace pour adapter les enzymes à des conditions particulières de travail, et en particulier pour améliorer la thermoactivité et la thermostabilité des enzymes déjà caractérisées. La xylanase Tx-Xyl de la famille 11 produite par *Thermobacillus xylanilyticus* est une enzyme thermostable (plusieurs heures à 60°C) qui possède une excellente activité (1750 UI/mg à 60°C) avec un optimum d'activité à 75°C.

Un problème technique lié à la production de Tx-Xyl de manière recombinante dans *Escherichia coli* a constitué la genèse de ce travail. En effet, la première version recombinante de cette enzyme produite est moins thermostable que l'enzyme sauvage. Ce constat nous a conduit à rechercher la source de ce changement et les moyens techniques pour le corriger.

Une fois que le mécanisme de déstabilisation de l'enzyme a été compris, nous avons décidé de bâtir une stratégie d'ingénierie visant un accroissement de la thermostabilité de l'enzyme recombinante. Cette démarche a été fondée sur une hypothèse concernant l'impact de la température sur l'intégrité structurale des parois végétales. Lorsque nous réalisons des hydrolyses du son de blé à  $60^{\circ}$ C, Tx–Xyl solubilise 40 à 45% des arabinoxylanes. L'ajout de nouveaux lots d'enzymes n'a pas d'effets, indiquant que la limitation est due à l'inaccessibilité du substrat, et non pas à la stabilité de l'enzyme. Par ailleurs, d'autres études ont montré qu'une partie du substrat potentiel (des arabinoxylanes faiblement substitués) n'est pas atteinte par l'enzyme. Par conséquent, nous nous sommes demandés si une température de réaction plus élevée ne pourrait pas augmenter la pénétration de Tx–Xyl en raison d'une déstructuration partielle du réseau pariétal.

Notre travail a donc consisté à déterminer si la thermostabilité de cette xylanase recombinante pouvait être améliorée par l'ajout de ponts disulfures dans sa structure, stratégie déjà testée avec succès chez des xylanases mésophiles.

|  | 10  | 20  | 30   | 40   | 50  | 60   | 70   |
|--|---|---|--|--|---|--|--|
|  |   |   |  |  |   |  |  |
| AACACG   | TACTGGCAGT  | ATTGGACGG   | ATGGCATCO  | GGTATGTGAAC  | GCGACGAAC   | GGACAAGGCG   | GCAACT   |
| ΝΤ   | Y W Q   | Y W T   | DGI  | GYV N  | A T N   | GQG(   | G N  |
|  | 80  | 90  | 100  | 110  | 120   | 130  | 140  |
|  |   |   |  |  |   |  |  |
| ACAGCG   | TAAGCTGGAG  | CAACAGCGG   | CAACTTCGT  | CATCGGCAAGG  | GCTGGCAAT.  | ACGGTGCGCA   | CAACCG   |
| Y <mark>S</mark>   | VSWS  | N S G   | NFV  | I G K  | GWQ.  | Y G A H  | N R  |
|  | 150   | 160   | 170  | 180  | 190   | 200  | 210  |
| .  | .   |   |  |  |   |  |  |
| GGTTGT   | CAACTACAAC  | GCCGGCGCA   | TGGCAGCCG  | AACGGCAACGC  | GTATCTGAC   | GCTGTACGGC   | <b>r</b> ggacg   |
| V V  | N Y N   | A G A   | WQP  | N G N A  | Y L T   | L Y G  | WΤ   |
|  | 220   | 230   | 240  | 250  | 260   | 270  | 280  |
| .  | .   |   |  |  |   |  |  |
| CGCAAC   | CCGCTCATCG  | AATACTACG   | TCGTCGACA  | GCTGGGGCAGC  | TACCGCCCG.  | ACCGGCGACT   | ACCGGG   |
| R N  | PLI   | ΕΥΥ   | V V D  | SWGS   | Y R P   | TGD  | YR   |
|  | 290   | 300   | 310  | 320  | 330   | 340  | 350  |
|  | 220   |   |  |  |   |  |  |
| .  | .   |   |  |  |   |  |  |
| .<br>G <mark>C</mark> AGCG   | TGTACAGCGA  | <br>CGGCGCATG   | <br>G <b>TATGACCI</b>  | <br>CTATCACAGCT  | GGCGCTACA   | <br>ACGCACCGTC   | <br>CATCGA   |
| G S  | .<br>TGTACAGCGA<br>V Y S D  | <br>CGGCGCATG<br>G A W  | GTATGACCI<br>Y D I   | <br>C <b>TATCACAGCT</b><br>YHS   | GGCGCTACA   | <br>ACGCACCGTC<br>N A P S  | <br>CATCGA<br>I D  |
| .<br>GCAGCG<br>G S   | TGTACAGCGA<br>V Y S D<br>360  | <br>CGGCGCATG<br>G A W<br>370   | <br>GTATGACCI<br>Y D I<br>380  | <br>CTATCACAGCT<br>Y H S<br>390  | <br>CGGCGCTACA<br>W R Y 1<br>400  | <br>ACGCACCGTC<br>N A P S<br>410   | <br><b>CATCGA</b><br>I D<br>420  |
| .<br>GCAGCG<br>G S   | .<br>TGTACAGCGA<br>V Y S D<br>360<br>  .  | <br>CGGCGCATG<br>G A W<br>370<br>   | GTATGACCT<br>Y D I<br>380  | <br>CTATCACAGCT<br>Y H S<br>390<br>  | GGCGCTACA<br>W R Y 1<br>400   | <br>ACGCACCGTCG<br>N A P S<br>410<br>  | <br>CATCGA<br>I D<br>420<br>   |
| GCAGCG<br>GS   | TGTACAGCGA<br>V Y S D<br>360<br>  .<br>GCAGACGTTC   | <br>CGGCGCATG<br>G A W<br>370<br>  <br>CAACAATAC  | GTATGACCT<br>Y D I<br>380<br>  | <br>CTATCACAGCT<br>Y H S<br>390<br>   <br>CGTCAGCAGAA  | GGCGCTACA<br>W R Y 1<br>400<br>   | <br>ACGCACCGTCO<br>N A P S<br>410<br>  <br>GGGCAGCAACO   | <br>CATCGA<br>I D<br>420<br>  <br>GTCTCC   |
| GCAGCG<br>GS<br>CGGCAC<br>GT   | .<br>TGTACAGCGA<br>V Y S D<br>360<br>  .<br>GCAGACGTTC<br>Q T F   | <br>CGGCGCATG<br>G A W<br>370<br>  <br>CAACAATAC<br>Q Q Y   | GTATGACCT<br>Y D I<br>380<br> <br>TGGAGCGTT<br>W S V   | <br>CTATCACAGCT<br>Y H S<br>390<br>   <br>CGTCAGCAGAA<br>R Q Q K   | GGCGCTACA<br>W R Y 1<br>400<br> <br>ACGCCCGAC<br>C R P T  | <br>ACGCACCGTCO<br>N A P S<br>410<br>  <br>GGGCAGCAACO<br>G S N  | <br><b>CATCGA</b><br>I D<br>420<br>  <br><b>GTCTCC</b><br>V S                                      |
| GCAGCG<br>GS<br>   | .<br>TGTACAGCGA<br>V Y S D<br>360<br>  .<br>GCAGACGTTC<br>Q T F<br>430  | <br>CGGCGCATG<br>G A W<br>370<br>  <br>CAACAATAC<br>Q Q Y<br>440  | GTATGACCT<br>Y D I<br>380<br> <br>TGGAGCGTT<br>W S V<br>450  | <br>CTATCACAGCT<br>Y H S<br>390<br>   <br>CGTCAGCAGAA<br>R Q Q K<br>460  | GGCGCTACA<br>W R Y 1<br>400<br> <br>ACGCCCGAC<br>C R P T<br>470   | <br>ACGCACCGTC<br>N A P S<br>410<br>  <br>GGGCAGCAAC<br>G S N<br>480   | <br><b>CATCGA</b><br>I D<br>420<br>  <br><b>GTCTCC</b><br>V S<br>490                               |
| GCAGCG<br>GS<br>CGGCAC<br>GT   | TGTACAGCGA<br>V Y S D<br>360<br>  .<br>GCAGACGTTC<br>Q T F<br>430<br>  .  | <br>  | GTATGACCT<br>Y D I<br>380<br> <br>TGGAGCGTI<br>W S V<br>450<br>                                    | <br>CTATCACAGCT<br>Y H S<br>390<br>   <br>CGTCAGCAGAA<br>R Q Q K<br>460<br>  | GGCGCTACA<br>W R Y 1<br>400<br> <br>ACGCCCGAC<br>C R P T<br>470<br>   | <br>ACGCACCGTC<br>N A P S<br>410<br>  <br>GGGCAGCAAC<br>G S N<br>480<br>   | <br><b>CATCGA</b><br>I D<br>420<br>  <br><b>GTCTCC</b><br>V S<br>490<br>                           |
| GCAGCG<br>GS<br>CGGCAC<br>GT<br>   | TGTACAGCGA<br>V Y S D<br>360<br>  .<br>GCAGACGTTC<br>Q T F<br>430<br>  .<br>TTCGAGAACC  | <br>  | GTATGACCT<br>Y D I<br>380<br> <br>TGGAGCGTT<br>W S V<br>450<br> <br>GCATGGGGGCC                    | <br>CTATCACAGCT<br>Y H S<br>390<br>   <br>CGTCAGCAGAA<br>R Q Q K<br>460<br>   <br>CTGCCGGCATG  | GGCGCTACA<br>W R Y 1<br>400<br> <br>ACGCCCGAC<br>C R P T<br>470<br> <br>GCCGATGGGC  | <br>ACGCACCGTC<br>N A P S<br>410<br>  <br>GGGCAGCAAC<br>G S N<br>480<br>  <br>AGCAGCTGGT                           | <br><b>CATCGA</b><br>I D<br>420<br>  <br><b>GTCTCC</b><br>V S<br>490<br>  <br><b>CTTACC</b>        |
| GCAGCG<br>GS<br>CGGCAC<br>GT<br>   | TGTACAGCGA<br>V Y S D<br>360<br>  .<br>GCAGACGTTC<br>Q T F<br>430<br>  .<br>TTCGAGAACC<br>F E N   | <br>GGGCGCATG<br>G A W<br>370<br>  <br>CAACAATAC<br>Q Q Y<br>440<br>  <br>ACGTGAACG<br>H V N            | GTATGACCT<br>Y D I<br>380<br> <br>TGGAGCGTT<br>W S V<br>450<br> <br>CATGGGGCCG<br>A W G            | $ \dots \dots $ $CTATCACAGCT$ $Y H S$ $390$ $ \dots \dots $ $CGTCAGCAGAA$ $R Q Q K$ $460$ $ \dots \dots $ $CTGCCGGCATG$ $A A G M$  | GGCGCTACA<br>W R Y 1<br>400<br> <br>ACGCCCGAC<br>C R P T<br>470<br> <br>GCCGATGGGC<br>P M G                               | <br>ACGCACCGTC<br>N A P S<br>410<br>  <br>GGGCAGCAAC<br>G S N<br>480<br>  <br>AGCAGCTGGT<br>S S W 3                | <br><b>CATCGA</b><br>I D<br>420<br>  <br><b>GTCTCC</b><br>V S<br>490<br>  <br><b>CTTACC</b><br>S Y |
| GCAGCG<br>GS<br>CGGCAC<br>GT<br> .<br>ATCACG<br>IT                               | TGTACAGCGA<br>V Y S D<br>360<br>  .<br>GCAGACGTTC<br>Q T F<br>430<br>  .<br>TTCGAGAACC<br>F E N<br>500  | <br>GGGCGCATG<br>G A W<br>370<br>  <br>CCAACAATAC<br>Q Q Y<br>440<br>  <br>ACGTGAACG<br>H V N<br>510    | GTATGACCT<br>Y D I<br>380<br> <br>TGGAGCGTT<br>W S V<br>450<br> <br>CATGGGGCC<br>A W G<br>520      | <br>CTATCACAGCT<br>Y H S<br>390<br>   <br>CGTCAGCAGAA<br>R Q Q K<br>460<br>   <br>CTGCCGGCATG<br>A A G M<br>530  | GGCGCTACA<br>W R Y 1<br>400<br> <br>ACGCCCGAC<br>C R P T<br>470<br> <br>CCGATGGGC.<br>P M G<br>540                        | <br>ACGCACCGTC<br>N A P S<br>410<br>  <br>GGGCAGCAAC<br>G S N<br>480<br>  <br>AGCAGCTGGT<br>S S W S                | <br><b>CATCGA</b><br>I D<br>420<br>  <br><b>GTCTCC</b><br>V S<br>490<br>  <br><b>CTTACC</b><br>S Y |
| GCAGCG<br>GS<br>CGGCAC<br>GT<br>   | TGTACAGCGA         V       Y       S       D         360            GCAGACGTTC       Q       T       F         430            TTCGAGAAACC       F       E       N         500 | <br>GGGCGCATG<br>G A W<br>370<br>  <br>CAACAATAC<br>Q Q Y<br>440<br>  <br>ACGTGAACG<br>H V N<br>510<br> | GTATGACCT<br>Y D I<br>380<br> <br>TGGAGCGTT<br>W S V<br>450<br> <br>CATGGGGCCG<br>A W G<br>520<br> | $\begin{vmatrix} \dots &   \dots &   \\ \mathbf{CTATCACAGCT} \\ \mathbf{Y} & \mathbf{H} & \mathbf{S} \\ 390 \\   \dots &   \dots &   \\ \mathbf{CGTCAGCAGAA} \\ \mathbf{R} & \mathbf{Q} & \mathbf{Q} & \mathbf{K} \\ 460 \\   \dots &   \dots &   \\ \mathbf{CTGCCGGCATG} \\ \mathbf{A} & \mathbf{A} & \mathbf{G} & \mathbf{M} \\ 530 \\   \dots &   \dots &   \end{vmatrix}$                            | <br>GGCGCTACA<br>W R Y 1<br>400<br> <br>ACGCCCGAC<br>R P T<br>470<br> <br>CCGATGGGC.<br>P M G<br>540<br>                  | <br>ACGCACCGTCG<br>N A P S<br>410<br>  <br>GGCAGCAACG<br>G S N<br>480<br>  <br>AGCAGCTGGT<br>S S W S               | <br><b>CATCGA</b><br>I D<br>420<br>  <br><b>STCTCC</b><br>V S<br>490<br>  <br><b>CTTACC</b><br>S Y |
| .<br>GCAGCG<br>G S<br> .<br>CGGCAC<br>G T<br> .<br>ATCACG<br>I T<br> .<br>AGGTGC |   | <br>  | GTATGACCT<br>Y D I<br>380<br> <br>TGGAGCGTT<br>W S V<br>450<br> <br>CATGGGGCCG<br>A W G<br>520<br> | $\begin{vmatrix} \dots &   \dots &   \\ \mathbf{CTATCACAGCT} \\ \mathbf{Y} & \mathbf{H} & \mathbf{S} \\ 390 \\   \dots &   \dots &   \\ \mathbf{CGTCAGCAGAA} \\ \mathbf{R} & \mathbf{Q} & \mathbf{Q} & \mathbf{K} \\ 460 \\   \dots &   \dots &   \\ \mathbf{CTGCCGGCATG} \\ \mathbf{A} & \mathbf{A} & \mathbf{G} & \mathbf{M} \\ 530 \\   \dots &   \dots &   \\ \mathbf{ETACTCCAACG} \\ \end{vmatrix}$ | <br>CGCCGCTACA<br>W R Y 1<br>400<br> <br>ACCCCCGAC<br>C R P T<br>470<br> <br>CCCGATGGGC<br>P M G<br>540<br> <br>TCACGGTTT | <br>ACGCACCGTCO<br>N A P S<br>410<br>  <br>3GGCAGCAACO<br>G S N<br>480<br>  <br>AGCAGCTGGTO<br>S S W<br> <br>3GTAA | <br><b>CATCGA</b><br>I D<br>420<br>  <br><b>STCTCC</b><br>V S<br>490<br>  <br><b>CTTACC</b><br>S Y |

**Figure 1 – Séquence du gène codant pour la xylanase de la famille 11 de** *Thermobacillus xylanilyticus* (**Tx–Xyl**). Le codon initiateur est omis, la traduction en acides aminés est indiquée sous la séquence du gène.



Figure 2 – Spectres des xylanases sauvage et recombinantes obtenus par analyse MALDI-TOF.



**Figure 3 – Spectres de dichroïsme circulaire de Tx–Xyl et Tx–Xyl–R1**. Les mesures ont été effectuées avec des protéines de concentrations 0,015 mg/ml et 0,050 mg/mL respectivement, dans des cuves de largeur 1 cm et 0,2 cm resp., d'où le décalage en intensité.



Figure 4 – Thermoactivité des xylanases sauvage et recombinante.

#### B Clonage du gène de Tx–Xyl et caractérisation

#### B.1 Clonage du gène de Tx-Xyl

Le gène codant pour la xylanase sauvage Tx–Xyl isolé chez *Thermobacilllus xylanilyticus* avait été précédemment cloné au laboratoire entre les sites de restriction *EcoRI* et *NdeI* dans le plasmide pRSETA sous contrôle du promoteur T7 (**Figure 1**). Après transformation par voie chimique de cette construction dans des cellules d'*Escherichia coli* JM109-DE3, le gène codant pour la xylanase recombinante Tx–Xyl–R1 était exprimé après induction par l'IPTG.

La présence du gène hétérologue avait bien été mise en évidence par séquençage de l'ADN plasmidique, et l'activité de Tx–Xyl–R1 mesurée, mais sa caractérisation biochimique (masse, thermoactivité, thermostabilité) demeurait incomplète. De même, hormis son activité spécifique à 60°C et son optimum d'activité, les propriétés de la xylanase sauvage Tx–Xyl étaient mal connues. Ce fut la première étape de notre étude que de comparer la xylanase sauvage à la xylanase recombinante.

#### **B.2** Caractérisation biochimique

Après l'expression et la purification de Tx-Xyl-R1 comme présentées dans le Chapitre II, la pureté des deux enzymes a été vérifiée par SDS-PAGE et leur taille estimée d'après un marqueur de taille. Les protéines étaient pures et présentaient la même taille apparente, mais à cause du manque de précision de cette méthode, des mesures par spectrométrie de masse MALDI-TOF ont été effectuées.

Les spectres sont présentés sur la **Figure 2**. Après une série de 10 mesures afin de diminuer l'incertitude, la masse de Tx–Xyl s'est révélée conforme à celle attendue d'après la séquence en acides aminés, soit 20692 Da, mais celle de Tx–Xyl–R1 était supérieure de 130 Da, à 20822 Da (**Tableau 1**). Comme les molécules avaient été désalées avant l'analyse, nous avons exclu *a priori* que la présence d'ions avec l'analyte soit responsable de cet écart, d'autant plus que les deux protéines avaient été purifiées de la même manière.

La comparaison des spectres de dichroïsme circulaire a montré que les deux enzymes possédaient un repliement global identique, avec un seul minimum d'absorption légèrement inférieur à 220 nm environ, et qui correspondait à la présence des feuillets  $\beta$  antiparallèles du *jelly-roll* (**Figure 3**).

|  |                                     | Tx–Xyl            | Tx-Xyl-R1       | Tx-Xyl-R2         |  |
|--|-------------------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|--|
| Masse molaire<br>mesurée par MALDI-<br>TOF (Da)                |                                     | $20692\pm3$       | $20822\pm4$     | $20651 \pm 4$     |  |
| Masse molaire<br>théorique d'après la<br>séquence du gène (Da) |                                     | 20692             | 20692           | 20649             |  |
|  | $T_{ m opt}$                        | ~75°C             | ~70°C           | ~75°C             |  |
|  | $T_{ m m \ (app)}$                  | 68,6°C            | 67,4°C          | 69,0°C            |  |
| 60°C   | AS (UI/mg)                          | $1750\pm167$      | $1700 \pm 52$   | $1750 \pm 85$     |  |
|  | $K_{\rm m(app)}({ m g/L})$          | $1,\!79\pm0,\!20$ | $1,75 \pm 0,30$ | $1,\!80\pm0,\!36$ |  |
|  | $k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> ) | 8385 ± 109        | $8220\pm78$     | $8385\pm81$       |  |
|  | $t_{1/2}$                           | >12 h             | ~60 min         | >12h              |  |
| 70°C   | AS (UI/mg)                          | $2380 \pm 18$     | $2370 \pm 43$   | $2390\pm100$      |  |
|  | $t_{1/2}$                           | ~18 min           | ~5 min          | ~18 min           |  |

Tableau 1 – Caractéristiques des xylanases sauvage et recombinantes.

Par contre, une différence importante était que l'enzyme sauvage Tx–Xyl était produite par un *Thermobacillus*, alors que Tx–Xyl–R1 était une protéine recombinante d'*E. coli*, cette différence d'organisme d'expression aurait pu engendrer une maturation post-traductionnelle variable. La glycosylation était une hypothèse à écarter, car c'est justement un des avantages (ou un des inconvénients) de *E. coli* de ne pas glycosyler les protéines synthétisées. De même, une erreur de transcription du gène ou une mutation du gène étaient improbables, le séquençage de l'ADN de divers clones de Tx–Xyl–R1 ayant indiqué la présence du gène intègre. Or, un examen de la masse molaire des acides aminés naturels (voir tableau en annexe) a montré que l'écart de masse observé (auquel on a ajouté la masse d'une molécule d'eau pour obtenir la masse entière d'un acide aminé, soit 148 Da) était proche de la masse molaire des résidus suivants, étant donnée l'incertitude de mesure : Gln, Glu, Lys ou Met. Comme on excluait toute mutation dans le gène, donc dans la protéine, il était possible qu'un acide aminé supplémentaire se trouve sur la protéine recombinante, de forts soupçons pesaient sur la présence d'une Met en position N–ter.

En effet, lors de la traduction de l'ARNm, la synthèse protéique est toujours initiée par une Met (chez les eucaryotes) ou une N-formyl-Met (chez les procaryotes). Chez *E. coli*, le groupement formyl est normalement hydrolysé par une déformylase, laissant la Met en N-ter, qui est ensuite le plus souvent clivée par une méthionyl-aminopeptidase (MAP) (Ben-Bassat *et al.*, 1987). Des études de spécificité d'action sur une MAP recombinante ont montré que cette enzyme possède une activité dépendante du rayon de giration de l'acide aminé qui suit la Met. Plus précisément, la MAP ne fonctionne que si la Met est suivie par un résidu dont la longueur de la chaîne latérale est inférieure ou égale à 0,129 nm, ce qui correspond aux résidus Gly, Ala, Pro, Thr, Ser, Val, Cys (Ben-Bassat *et al.*, 1987 ; Schmitt *et al.*, 1996).

Or, le premier acide aminé sur la séquence en acides aminés de Tx-Xyl est une Asn (**Figure 1**), donc lors de la maturation post-traductionnelle, la Met qui la précède n'était probablement pas clivée à cause de la sélectivité de la MAP, ce qui explique pourquoi la protéine recombinante Tx-Xyl-R1 possédait un excédent de masse de 130 Da.

#### B.3 Caractérisation enzymatique

#### B.3.1 Thermoactivité et optimum d'activité

Nous avons ensuite décidé de comparer les enzymes Tx–Xyl et Tx–Xyl–R1 au niveau de la thermoactivité en mesurant l'activité sur du xylane de bouleau pendant 10 min à différentes



Figure 5 – Thermostabilité des xylanases sauvage et recombinantes à  $60^{\circ}$ C. L'activité résiduelle est obtenue en divisant l'activité mesurée après un temps d'incubation *t* par l'activité mesurée sans incubation.



Figure 6 – Thermostabilité des xylanases sauvage et recombinantes à 70°C.

températures. L'activité spécifique AS a été calculée à chaque température *T* pour chaque enzyme (**Figure 4**). Leurs activités sont identiques de 50 à 70°C, mais ensuite l'activité de Tx–Xyl atteint un maximum à 75°C pour diminuer après, alors que celle de Tx–Xyl–R1 est divisée par deux entre 70 et 80°C. La  $T_{opt}$  de Tx–Xyl est supérieure de 5°C par rapport à celle de Tx–Xyl–R1. Le profil de thermostabilité de Tx–Xyl–R1 est donc apparu moins bon que celui de Tx–Xyl.

#### **B.3.2** Paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques ont été calculés à 60°C pour des concentrations de substrat allant de 10 à 0,1 g/L, ils sont rassemblés dans le **Tableau 1**. Comme les AS étaient identiques à 60°C, nous avons logiquement retrouvé des valeurs de  $K_{m (app)}$  et de  $k_{cat}$  identiques, ce qui montre que les propriétés catalytiques de ces enzymes sont identiques.

#### **B.3.3** Thermostabilité

L'AS résiduelle des enzymes a été mesurée à 60°C après une incubation sur des temps plus longs que lors des mesures de thermoactivité, soit 6 h, à deux températures différentes : 60°C qui est la température habituelle de mesure, et 70°C qui est une température plus proche de l'optimum d'activité situé à 75°C. Pour chaque enzyme et à chaque température de mesure, le temps de demi-vie  $t_{1/2}$  a été calculé (**Tableau 1**).

C'est à ce niveau que nous avons remarqué de forts écarts entre Tx–Xyl et Tx–Xyl–R1 : pendant une incubation à 60°C, Tx–Xyl affiche un  $t_{1/2}$  de plus de 12 h et une activité résiduelle de plus de 70% après 6 h. Au contraire, Tx–Xyl–R1 ne conserve que 10% de son activité dans le même temps, et son temps de demi-vie n'atteint que 1 h environ (**Figure 5**). À 70°C, probablement à cause de l'effet thermodynamique, les enzymes se dégradent beaucoup plus rapidement, avec des temps de demi-vie respectifs de 18 min et 5 min (**Figure 6**). Là encore, la xylanase sauvage est plus stable que la xylanase recombinante.

D'autre part, les températures de fusion  $T_m$  de Tx–Xyl et Tx–Xyl–R1 ont été calculées par dichroïsme circulaire. La dénaturation de chaque enzyme lors de l'augmentation progressive de la température (de 30 à 90°C) a été suivie à 220 nm (**Tableau 1**). L'enzyme sauvage Tx–Xyl présente une  $T_m$  de 68,6°C, alors que celle de l'enzyme recombinante est légèrement inférieure, à 67,4°C. Cette différence de 1,2°C est en accord avec le fait que l'enzyme sauvage sauvage est plus thermostable que l'enzyme recombinante. Dans les deux cas cependant, la dénaturation thermique était irréversible, i.e. que même après refroidissement des protéines de

90 à 30°C, aucun retour au repliement natif n'a été observé. En conséquences, les températures de fusion mesurées sont apparentes ( $T_{m (app)}$ ), et les grandeurs thermodynamiques comme l'enthalpie ou l'entropie de la réaction de dépliement/repliement des enzymes ne peuvent pas être calculées.

#### **B.3.4** Conclusion

Au niveau de l'activité enzymatique, les enzymes Tx-Xyl et Tx-Xyl-R1 présentent la même activité spécifique à 60 et 70°C ainsi que les mêmes paramètres cinétiques. Cependant, des différences considérables apparaissent au niveau de leurs activités à des températures supérieures à 70°C et surtout au niveau de leurs thermostabilités à 60 et 70°C, à chaque fois en défaveur de Tx-Xyl-R1.

Or, l'unique différence structurale existant entre ces deux enzymes est due à Tx-Xyl-R1, dont la masse théorique calculée d'après la séquence d'ADN diffère de la masse observée de la protéine exprimée. D'après nos hypothèses, il s'agit probablement d'une Met située en position N-ter présente uniquement chez Tx-Xyl-R1, qui constitue sans doute l'élément perturbateur responsable de la baisse de thermostabilité de Tx-Xyl-R1. Il est donc nécessaire de trouver un moyen de supprimer ce résidu pour retrouver le profil de thermostabilité de l'enzyme sauvage.

#### B.4 Correction du problème de maturation incomplète

#### B.4.1 Solution pour cliver la Met en N-ter

Afin de tester notre hypothèse, un moyen de cliver cette extra-Met a dû être trouvé. La première idée a été de faire agir une MAP recombinante, mais cette expérience s'est avérée difficile à réaliser à cause du coût d'une enzyme commerciale, et de la difficulté pour vérifier l'efficacité de la réaction, qui aurait pu aboutir à la création d'une population mixte d'enzymes méthionylées et non- méthionylées, biaisant toute expérience future.

Il a semblé plus judicieux de muter le gène de Tx–Xyl–R1 au niveau du premier codon qui code pour Asn<sup>1</sup> afin de favoriser l'action de la MAP naturellement présente chez *E. coli*. Nous avons décidé d'effectuer la mutation<sup>1</sup> Asn<sup>1</sup>  $\rightarrow$  Ala<sup>1</sup>, i.e. le changement AAC  $\rightarrow$  GCC au niveau du gène : celui-ci exprime la protéine recombinante Tx–Xyl–R2.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Les codons de mutagenèse sont rassemblés dans les annexes.
#### B.4.2 Caractérisation biochimique de Tx-Xyl-R2

Comme pour Tx-Xyl-R1, Tx-Xyl-R2 a été caractérisée sur gel de SDS-PAGE après sa purification pour vérifier sa pureté et sa masse apparente. Cette analyse a indiqué que Tx-Xyl-R2 possède une taille très similaire à celle de Tx-Xyl, et le séquençage de l'ADN a confirmé la bonne introduction de la mutation  $Asn^1 \rightarrow Ala^1$ .

Les mesures plus précises de spectrométrie de masse ont signalé par contre un résultat significatif : la masse de Tx-Xyl-R2 est égale à  $20651 \pm 3$  Da, identique à la masse de Tx-Xyl comportant la mutation Asn<sup>1</sup>  $\rightarrow$  Ala<sup>1</sup> (**Tableau 1**). La modification du 1<sup>er</sup> acide aminé en un résidu possédant une chaîne latérale courte a donc permis de rétablir une maturation post-traductionnelle normale chez *E. coli*.

#### B.4.3 Caractérisation enzymatique Tx-Xyl-R2

Les mêmes mesures de thermostabilité et de thermoactivité que précédemment ont été effectuées. La  $T_{opt}$  de Tx–Xyl–R2 est égale à 75°C, elle est donc identique à celle de Tx–Xyl, et son activité spécifique en fonction du temps suit la même tendance. Leurs paramètres cinétiques sont par ailleurs égaux (**Tableau 1**). Au niveau de la thermostabilité aussi, Tx–Xyl–R2 se comporte comme Tx–Xyl : leurs temps de demi-vie sont identiques à 60 et 70°C, alors que celui de Tx–Xyl–R1 est inférieur de presque 75% à 60°C (**Figures 5 et 6**). De plus, les températures de fusion  $T_m$  (*app*) de Tx–Xyl et Tx–Xyl–R2 sont quasiment égales, alors que celle de Tx–Xyl–R1 est bien inférieure (**Tableau 1**), la dénaturation thermique de Tx–Xyl–R2 étant aussi irréversible.

#### **B.5** Conclusion

En définitive, le clonage du gène de Tx–Xyl a illustré combien l'existence d'une seule Met supplémentaire en N–ter pouvait notablement altérer la thermostabilité de l'enzyme recombinante Tx–Xyl–R1. Sa présence est due à une maturation post-traductionnelle incomplète de l'enzyme. Heureusement, cette anomalie est facilement résolue par la mutation du résidu qui suit la Met<sup>-1</sup>. Une telle expérience a permis l'obtention du mutant Tx–Xyl–R2 dont les caractéristiques de thermostabilité sont identiques à celles de l'enzyme sauvage.

Cette difficulté technique a donc révélé l'importance de l'extrémité N-ter de Tx-Xyl pour sa thermostabilité. Ce résultat nous a conduit à nous intéresser de plus près à ce phénomène et



**Figure 7 – Localisation des résidus S98 et N145 chez Tx–Xyl en vue de la création d'un pont disulfure. A** : Les résidus concernés sont colorés en orange, vue de la structure tournée de 90° selon l'axe z par rapport à la **Figure 9** du Chapitre I ; **B** : vue rapprochée.

nous a incité à rechercher des stratégies qui permettraient un accroissement de la thermostabilité.

#### C Introduction d'un seul pont disulfure

Notre stratégie d'amélioration de la thermostabilité de la xylanase a consisté tout d'abord à introduire un seul pont disulfure dans la protéine. C'est sur la base de l'analyse structurale de notre enzyme et d'après les expériences précédemment réalisées par d'autres équipes (voir Chapitre I, §C.4.4.4, p. 36, Wakarchuk *et al.*, 1994b ; Turunen *et al.*, 2001 ; Fenel *et al.*, 2004 ; Xiong *et al.*, 2004) que nous avons choisi la localisation des ponts à introduire.

#### C.1 Pont entre le brin B9 et l'hélice $\alpha$

#### C.1.1 Etude de faisabilité

D'après les données contenues dans la littérature (voir Chapitre I, **Tableau 5**), les deux xylanases de *Paecilomyces varioti* Bainier (Kumar *et al.*, 2000) et *Thermomyces lanuginosus* (Gruber *et al.*, 1998) possèdent un pont disulfure entre le brin  $\beta$  B9 et l'hélice  $\alpha$ , plus précisément entre les résidus 98 et 145 (numérotation de Tx–Xyl), et ces xylanases ont des  $T_{opt}$  qui les classent parmi les enzymes thermostables. D'après l'alignement de séquences des Xyl–11, des cystéines à ces deux positions sont très rares : hormis ces deux enzymes, seule la xylanase produite par *Schizophylum commune* possède des résidus Cys à des positions analogues, mais sa structure n'est pas connue et la présence des ponts n'a pas été vérifiée. En outre, cette enzyme possède un temps de demi-vie de 3 h environ mais à seulement 50°C (Oku *et al.*, 1993), et offre donc peu de perspectives prometteuses.

Pour créer un tel pont disulfure chez Tx–Xyl, il a d'abord fallu contrôler la distance entre les résidus équivalents S98 et N145 (**Figure 7**). Ces résidus appartiennent au brin B9 et à l'hélice  $\alpha$ , éléments structuraux parfaitement conservés chez les Xyl–11. Ainsi, la distance mesurée entre les deux C $\beta$  est de 3,90 Å chez Tx–Xyl. Par comparaison, la même distance mesurée chez les Xyl–11 de *P. varioti* et *T. lanuginosus* est de 3,88 Å et 3,77 Å respectivement. Il ne semblait donc pas exister d'incompatibilité structurale à l'établissement d'un pont disulfure dans cette région.

#### C.1.2 Création du pont disulfure

La création de ce premier pont a été réalisée en deux étapes : d'abord l'introduction de la première cystéine Ser<sup>98</sup>  $\rightarrow$  Cys<sup>98</sup> sur le gène de Tx-Xyl-R2, puis celle de la seconde

|  |                                  | Tx-Xyl-R2         | Tx-Xyl-SS1        | Tx-Xyl-SS2      | Tx-Xyl-SS3      |  |
|--|----------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|--|
| Masse molaire<br>mesurée par MALDI-<br>TOF (Da)                |                                  | $20651\pm4$       | $20654\pm4$       | $20710\pm7$     | ND              |  |
| Masse molaire<br>théorique d'après la<br>séquence du gène (Da) |                                  | 20649             | 20652             | 20712           | 20714           |  |
| T <sub>opt</sub>   |                                  | ~75°C             | ~75°C             | ~70 à 75°C      | ~75°C           |  |
|  | $T_{ m m\ (app)}$                | 69,0°C            | 73,3°C            | 70,4°C          | 74,1°C          |  |
|  | AS (UI/mg)                       | $1750 \pm 167$    | $1690\pm153$      | $2525\pm90$     | $2320\pm112$    |  |
| °C   | $K_{m (app)} (g/L)$              | $1,\!80\pm0,\!36$ | $2,\!06\pm0,\!08$ | $1,86 \pm 0,13$ | $1,68 \pm 0,21$ |  |
| 60   | $k_{\rm cat}$ (s <sup>-1</sup> ) | $8385\pm81$       | $8170\pm108$      | $8210\pm178$    | $11000 \pm 413$ |  |
|  | $t_{1/2}$                        | >12h              | > 12h             | >12h            | >12h            |  |
| 70°C   | AS (UI/mg)                       | $2390\pm18$       | $2050\pm21$       | $3490 \pm 70$   | 3160 ± 190      |  |
|  | $t_{1/2}$                        | ~18 min           | ~75 min           | ~45 min         | ~180 min        |  |

Tableau 2 – Caractéristiques des xylanases sauvage et comportant un ou deux ponts disulfures.

 $Asn^{145} \rightarrow Cys^{145}$ . La présence des mutations a été vérifiée à chaque fois par séquençage de l'ADN. La protéine recombinante alors exprimée a été appelée Tx-Xyl-SS1.

#### C.1.3 Caractérisation biochimique

La protéine Tx–Xyl–SS1 a été purifiée selon le protocole habituel, sa taille apparente étant égale à celle de la xylanase sauvage. La mesure de sa masse, même approximative, par spectrométrie de masse, a montré que la masse attendue était proche de la masse théorique, mais l'imprécision de mesure n'a pas permis de prouver que le pont disulfure avait bien été formé (**Tableau 2**).

Pour le vérifier, un dosage des extrémités thiols –SH libres des résidus Cys a été réalisé par le DNTB, à la fois sur l'enzyme native et sur l'enzyme dénaturée, toutes les deux à 1,50  $\mu$ M. La gamme étalon, réalisée avec de l'hypochloride de cystéine, a permis l'obtention d'une régression linéaire indiquant que la concentration en Cys libre était directement proportionnelle à l'absorbance à 412 nm (**Figure 8**) :

$$A_{412\,nm} = 0,0128 \cdot [\text{Cys libre}]$$

Pour Tx–Xyl–R2, aucun résidu Cys libre n'a pu être détecté, avec ou sans dénaturation. Pour la protéine Tx–Xyl–SS1 native, aucune Cys libre n'a été détectée, mais après dénaturation chimique et thermique, l'absorbance à 412 nm est devenue égale à 0,0386, ce qui équivaut à une concentration de Cys libres de 3,01  $\mu$ M. Cette mesure dévoile donc la présence de 2,00 résidus Cys libres par molécule de Tx–Xyl–SS1 (**Tableau 3**), et indique que le pont disulfure a donc bien été formé entre le brin B9 et l'hélice  $\alpha$ .

Le spectre de dichroïsme circulaire de Tx–Xyl–SS1, comparé à celui de Tx–Xyl, a montré que la création du pont n'impliquait aucun changement structural notable, du moins au niveau du nombre et de la répartition du nombre d'hélice  $\alpha$  et de brins  $\beta$  (**Figure 9**).

#### **C.1.4** Caractérisation enzymatique

L'activité spécifique de Tx–Xyl–SS1 mesurée en fonction de la température a indiqué que la température optimale est de 75°C, donc identique à celle de Tx–Xyl–R2 (**Figure 10**). Par contre, l'activité à cette température, et à toutes les autres testées, est inférieure à celle de Tx–Xyl–R2. De 50 à  $65^{\circ}$ C l'écart n'est pas trop important (10% de baisse en moyenne), mais à 70°C, l'AS passe de 2390 UI/mL pour Tx–Xyl–R2 à 2050 UI/mL pour Tx–Xyl–SS1. Cette progression de la diminution de l'AS (15% à 70°C) a été observée jusqu'aux fortes



**Figure 8 – Gamme de l'absorbance à 412 nm en fonction de la concentration en Cys libre en présence de DTNB**. Le coefficient de la régression linéaire est de 0,99.

|            | [Protéine]<br>(µM) | $A_{412nm}$ | [Cys libre]<br>(µM) | Nombre de résidus Cys<br>[Cys libre] / [Protéine] |
|------------|--------------------|-------------|---------------------|---|
| Tx–Xyl     | 2,11               | 0           | 0                   | 0   |
| Tx-Xyl-SS1 | 1,50               | 0,0386      | 3,01                | 2,00  |
| Tx-Xyl-SS2 | 1,37               | 0,0210      | 1,64                | 1,20  |
| Tx-Xyl-SS3 | 0,75               | 0,0425      | 3,32                | 4,41  |

Tableau 3 – Détermination du nombre de résidus Cys libres dans les xylanases sauvage et comportant un ou deux ponts disulfures après dénaturation chimique et thermique.

températures, pour atteindre presque 30% à 85°C. Cette diminution de l'activité s'est traduite aussi par une baisse très légère de la valeur de  $k_{cat}$  et surtout une augmentation de 10% de la valeur de  $K_{m (app)}$ .

Par contre, au niveau de la thermostabilité, le mutant Tx–Xyl–SS1 possède un temps de demivie de 75 min à 70°C contre seulement 18 min pour Tx–Xyl–R2 à la même température, soit une augmentation par un facteur 4 (**Figure 11**, **Tableau 2**). Surtout, l'intégration de ce pont a permis d'augmenter de façon sensible la température de fusion apparente, qui est passée de 69,0°C à 73,3°C, soit 4,3°C d'écart. Encore une fois, la dénaturation de Tx–Xyl–R2 s'est révélée irréversible, malgré la présence d'un pont disulfure.

#### **C.1.5** Conclusion

Au final, ce mutant dans lequel nous avons intégré un pont disulfure entre le résidu Cys<sup>98</sup> du brin  $\beta$ 9 et le résidu Cys<sup>145</sup> de l'hélice  $\alpha$  possède une thermostabilité accrue grâce justement à la présence de ce pont. Tx–Xyl–SS1 dévoile un double comportement : d'un côté sa thermoactivité est inférieure à celle du type sauvage, et même si la courbe de l'AS en fonction de la température présente le même profil et a la même  $T_{opt}$ , nous avons remarqué que la diminution d'activité par rapport à Tx–Xyl est d'autant plus prononcée que la température augmente. D'un autre côté, la thermostabilité est nettement accrue, l'enzyme conservant plus de 20% de son activité après 4 h d'incubation, soit environ 450 UI/mg, alors que Tx–Xyl est déjà inactive dans ces conditions.

#### C.2 Pont entre les extrémités N-ter et C-ter

#### C.2.1 Etude de faisabilité

Dans la Nature, très peu de protéines circulaires (i.e. dont les extrémités N-ter et C-ter sont liées par une liaison peptidique, *stricto sensu*) existent, et en général, il s'agit de peptides qui jouent le plus souvent un rôle d'inhibiteur (Trabi & Craik, 2002). Récemment, la mise en vente d'un kit commercial permettant de réaliser la circularisation *in vitro* de protéines par épissage d'intéines chimiquement réactives a permis une augmentation sensible de la thermoactivité d'une  $\beta$ -lactamase (Iwai & Plückthun, 1999), ou encore l'accroissement de la stabilité d'une protéine GFP (*green fluorescent protein*) (Iwai, 2000). De plus, comme nous l'avons vu auparavant (voir Chapitre I, §C.4.4.4, p. 36), la circularisation (au sens topologique mais pas au sens peptidique) de xylanases par création d'un pont disulfure entre les extrémités



Figure 9 – Spectres de dichroïsme circulaire de Tx-Xyl et des mutants comportant un ou plusieurs ponts disulfures. Les spectres ont été normalisés en tenant compte de la concentration des protéines et des dimensions des cuves de mesure.



Figure 10 – Thermoactivité des xylanases sauvage et comportant un ou deux ponts disulfures.

N-ter et C-ter de xylanases mésophiles de la famille 11 a déjà permis de bonnes améliorations de la thermostabilité.

Pour appliquer cette stratégie chez Tx–Xyl–R2, il fallait d'abord vérifier que les conditions structurales qui favorisent la formation d'un tel pont étaient remplies. La **Figure 13** indique la position des résidus N–ter et C–ter de Tx–Xyl, Asn<sup>1</sup> et Trp<sup>182</sup> (la structure de Tx–Xyl–R2 n'étant pas connue, nous nous sommes basés sur celle de Tx–Xyl, en supposant que la mutation Asn<sup>1</sup>  $\rightarrow$  Ala<sup>1</sup> n'a pas affecté la conformation locale de l'extrémité N–ter). La distance entre les C $\beta$  de ces deux résidus est de 5,15 Å, alors qu'elle n'était que de 3,9 Å entre les deux résidus S98 et N145, soit une augmentation de la distance de 30% environ. Il est donc apparu difficile de créer un pont à cet endroit car les extrémités –SH des résidus Cys seraient trop éloignées pour réagir ensemble.

Pour éluder ce problème, nous avons essayé d'ajouter les deux résidus Cys aux positions N-ter et C-ter au lieu de remplacer les résidus aux positions terminales 1 et 182. Mais nous avons dû d'abord déterminer justement si les types des résidus à ces postions terminales étaient favorables à l'établissement du pont disulfure. En effet, si des gènes stériques éloignaient les résidus Cys, le pont ne pourrait se former *in vivo*. Or, un résidu Trp avec une chaîne latérale encombrante et très hydrophobe se trouve en position 182. Par contre, une Ala (qui a remplacé une Asn) est présente en position 1.

#### C.2.2 Création du pont disulfure

Afin d'éloigner la Cys en C-ter du résidu  $\text{Trp}^{182}$ , nous avons décidé de prolonger cette extrémité via un résidu  $\text{Gly}^{183}$  qui a donné une liberté de mouvement à Cys<sup>184</sup>, permettant ainsi de minimiser les interactions éventuelles avec les chaînes latérales des autres résidus de la protéine. À l'autre bout de la chaîne, le résidu Ala<sup>1</sup> a été muté en Gly pour des raisons d'équilibre stérique, tandis que le résidu Cys a été inséré en -1 juste avant. De cette façon, les deux résidus Cys en N-ter et C-ter possédaient le même environnement local.

Par conséquent, nous avons décidé de réaliser les mutations-insertions suivantes sur le mutant Tx-Xyl-R2 :

En N-ter : insertion de  $Cys^{-1}$  et mutation Ala<sup>1</sup>  $\rightarrow$  Gly<sup>1</sup> ;

et en C-ter : insertion de Gly<sup>183</sup>-Cys<sup>184</sup>.



Figure 11 – Thermostabilité des xylanases sauvage et comportant un ou deux ponts disulfures à 70°C.



**Figure 12 – Courbes de dénaturation thermique des xylanases sauvage et comportant un ou deux ponts disulfures**. La valeur du dichroïsme est mesurée à 220 nm en fonction de la température et permet de calculer la fraction dénaturée de la protéine considérée.

Les mutations et insertions ont été vérifiées par séquençage de l'ADN plasmidique, la nouvelle protéine exprimée étant appelée Tx-Xyl-SS2.

#### C.2.3 Caractérisation biochimique

Après expression et purification par le protocole habituel, l'analyse par SDS-PAGE a montré que la zone de dépôt de Tx-Xyl-SS2 présentait deux bandes bien distinctes, la taille apparente de l'une était identique à celle de Tx-Xyl, tandis que celle de l'autre semblait très légèrement inférieure (**Figure 14**). Pourtant, l'analyse par MALDI-TOF indiquait que la taille mesurée était proche de la taille attendue (**Tableau 2**). En fait, il est fort probable que malgré la dénaturation des échantillons à 95°C pendant 10 min avant le dépôt sur le gel de SDS-PAGE, Tx-Xyl-SS2 n'a pas été complètement oxydée et l'échantillon contenait un mélange de protéines dénaturées (pont disulfure coupé) et partiellement dénaturées (pont intact). Ces dernières étant plus compactes, elles fixent moins de SDS et migrent *a priori* plus vite dans le réseau du gel, présentant une taille apparente plus faible. Ce phénomène a déjà été observé lors de la création d'un pont disulfure à la même position (Wakarchuk *et al.*, 1994b).

Pour vérifier que le pont disulfure avait bien été créé, nous avons procédé à un dosage des résidus Cys libres. Les résultats ont indiqué l'absence de résidus Cys libres dans l'enzyme native, mais seulement 1,2 résidu par molécule de Tx-Xyl-SS2 lorsque celle-ci était dénaturée (**Tableau 3**). Nous pouvons penser que la dénaturation n'a été que partielle, ce qui expliquerait le déficit en Cys libre par rapport à la concentration attendue.

Comme pour Tx-Xyl-SS1, l'analyse par dichroïsme circulaire n'a montré aucune modification structurale suite à l'introduction de ce pont disulfure (**Figure 9**).

#### C.2.4 Caractérisation enzymatique

La courbe de l'activité spécifique en fonction de la température a indiqué un comportement très différent de Tx–Xyl et de Tx–Xyl–SS1 (**Figure 10**). L'activité est très élevée même à  $55^{\circ}$ C et augmente très rapidement pour atteindre un plateau à 70 et  $75^{\circ}$ C où elle devient égale à 3500 UI/mg, soit environ 50% de plus que Tx–Xyl ou 70% de plus que Tx–Xyl–SS1 à la même température, ce qui représente une amélioration substantielle. La mesure de la température optimale de Tx–Xyl–SS2 a révélé que celle-ci est similaire à celle de Tx–Xyl (soit  $75^{\circ}$ C), même s'il a été difficile d'obtenir une valeur très précise.



**Figure 13 – Localisation des résidus N1 et W182 chez Tx–Xyl en vue de la création d'un pont disulfure**. A : Les résidus concernés sont colorés en orange, vue de la structure tournée de 90° selon les axes y et z par rapport à la Figure 9 du Chapitre I ; B : vue rapprochée.

Au-delà de 75°C par contre, l'activité baisse très rapidement, devenant même inférieure à celles de Tx–Xyl ou Tx–Xyl–SS1 aux températures très élevées (par exemple à 85°C). Il semblerait alors que Tx–Xyl–SS2 se dénature très vite, alors que la décroissance d'activité pour les autres enzymes était beaucoup moins prononcée. Les paramètres cinétiques mesurés à 60°C sont assez proches de ceux de l'enzyme sauvage (**Tableau 2**).

En ce qui concerne sa thermostabilité (**Figure 11**), les analyses ont indiqué que Tx-Xyl-SS2 perd 50% de son activité après une incubation d'une heure à 70°C, ce qui la place au niveau de Tx-Xyl-SS1. Cependant, pour des temps plus longs (6 h d'incubation), l'enzyme conserve un peu plus de 20% de son activité initiale. Cela se caractérise par un temps de demi-vie à 70°C de 45 min, meilleur que celui de Tx-Xyl, mais inférieur à celui de Tx-Xyl-SS1 (**Tableau 2**).

Curieusement, même si ce mutant possède une meilleure thermostabilité que Tx–Xyl–SS1, le suivi de sa dénaturation par dichroïsme circulaire a montré que sa température de fusion est inférieure de presque 3°C (**Figure 12, Tableau 2**). Néanmoins, cette valeur demeure supérieure de 1,8°C à celle de Tx–Xyl. Par ailleurs, nous avons noté que la dénaturation de Tx–Xyl–SS2 est également irréversible.

#### **C.2.5** Conclusion

En résumé, au niveau de la stabilité, Tx–Xyl–SS2 possède de meilleures caractéristiques que Tx–Xyl–SS1. Sa thermoactivité est largement accrue aux températures testées et sa thermostabilité est légèrement plus élevée, demeurant très supérieure à celle de l'enzyme sauvage. Le seul bémol concerne la perte très rapide d'activité de l'enzyme dès que la température dépasse 75°C, signe d'une dénaturation très rapide à ce niveau. Par ailleurs, il apparaît délicat de corréler directement les  $T_{m (app)}$  avec les temps de demi-vie des xylanases mutantes.

Après avoir ajouté individuellement deux ponts disulfures, il a semblé assez logique de créer un mutant comportant simultanément ces deux ponts.

#### D Introduction d'un double pont disulfure

#### D.1 Etude de faisabilité et création du double pont

La création du mutant Tx-Xyl-SS3 comportant deux ponts disulfures a été relativement simple : il a suffi d'utiliser le gène codant pour Tx-Xyl-SS2 et d'y introduire les mutations



**Figure 14 – Gel SDS-PAGE de Tx–Xyl–SS2**. La bande de gauche correspond à Tx–Xyl–SS2, celle de droite à Tx–Xyl. L'existence de deux bandes pour Tx–Xyl–SS2 est due à la présence simultanée de deux formes de l'enzymes : la forme partiellement dénaturée en bas qui a conservé son pont disulfure et donc migre plus vite dans le réseau du gel, et la forme complètement dénaturée qui apparaît à la même taille que l'enzyme sauvage.

| Séquences  | -1 | 1 | 2 | 39 | 98             | 145 | 5     | 181 | 182 | 183 | 184 |
|------------|----|---|---|----|----------------|-----|-------|-----|-----|-----|-----|
| Tx–Xyl     |    | N | Т | Y  | S              | Ν   | •••   | V   | W   |     |     |
| Tx-Xyl-R1  | М  | N | Т | Y  | s              | N   | • • • | V   | W   |     |     |
| Tx-Xyl-R2  |    | A | Т | Y  | s              | Ν   | •••   | V   | W   |     |     |
| Tx-Xyl-SS1 |    | A | Т | Y  | <b>c</b>       | С   | •••   | V   | W   |     |     |
| Tx-Xyl-SS2 | C  | G | Т | Y  | s              | N   | • • • | V   | W   | G   | C   |
| Tx-Xyl-SS3 | С  | G | Т | Y  | <mark>C</mark> | С   | • • • | V   | W   | G   | C   |

Figure 15 – Résumé des mutations effectuées sur Tx–Xyl–R1 en vue de la création de ponts disulphures.

de Tx-Xyl-SS1, dont la présence a été vérifiée par séquençage de l'ADN. Le bilan des mutations effectuées se trouve sur la **Figure 15**.

#### D.2 Caractérisation biochimique

Une fois la protéine exprimée et purifiée, nous avons réalisé un gel de SDS-PAGE, qui a indiqué que la taille apparente de Tx–Xyl–SS3 était très légèrement inférieure à celle de Tx–Xyl, tout comme l'était celle de Tx–Xyl–SS2. Le dosage des extrémités SH libres avant dénaturation n'a montré aucune Cys libre ; après dénaturation par contre, on a dénombré 4,4 résidus Cys par molécule de Tx–Xyl–SS3 (**Tableau 3**). Cette valeur indique que l'enzyme possède quatre résidus Cys et qu'ils sont bien impliqués dans deux ponts disulfures.

Même avec l'introduction de ces deux ponts disulfures, l'analyse par dichroïsme circulaire n'a révélé aucun changement structural majeur chez Tx–Xyl–SS3 (**Figure 9**).

#### D.3 Caractérisation enzymatique

La thermoactivité de Tx–Xyl–SS3 présentait comme pour ses prédécesseurs un maximum à 75°C, température à laquelle l'activité maximale était identique à celle de Tx–Xyl–SS2, soit environ 3500 UI/mg (**Figure 10**). Cependant, il existe une différence notable entre ces deux mutants. Pour des températures inférieures à 75°C, nos analyses ont indiqué que Tx–Xyl–SS3 manifeste une activité qui est inférieure à celle de Tx–Xyl–SS2. Leurs activités à toutes les températures testées restent de toute façon supérieures à celles de Tx–Xyl–SS1 et Tx–Xyl. Mais au dessus de 75°C, les mesures ont indiqué que l'activité de Tx–Xyl–SS3 diminue nettement moins rapidement que celle de Tx–Xyl–SS2, qui baisse de plus de 35% en passant de 75 à 80°C. Sur la même gamme de température, l'activité de Tx–Xyl–SS3 ne perd que 15% par rapport à l'activité maximale, et Tx–Xyl–SS1 moins de 10%.

En ce qui concerne la thermostabilité, Tx–Xyl–SS3 est apparue comme le mutant le plus stable parmi ceux qui comportaient un pont disulfure. Après 1 h d'incubation à 70°C, il conserve 60% de son activité, et après 6 h encore plus de 40%, il affiche alors une activité spécifique encore très élevée de 1400 UI/mg (**Figure 11**). L'effet du double pontage se fait donc surtout ressentir à ce niveau, avec un temps de demi-vie de 180 min environ à 70°C, c'est-à-dire tout de même 10 fois supérieur à celui de l'enzyme sauvage (**Tableau 2**).

Par ailleurs, même si la dénaturation de ce mutant était irréversible comme celle de ses prédécesseurs, l'examen des températures de fusion apparentes a montré que Tx-Xyl-SS3

possède la valeur la plus élevée, à 74,1°C, soit 5,1°C de plus que la xylanase sauvage. Il semble exister un effet partiellement additif des températures de fusion, Tx–Xyl–SS3 bénéficiant simultanément des augmentations de  $T_{\rm m \ (app)}$  de Tx–Xyl–SS1 et Tx–Xyl–SS2 (**Tableau 2, Figure 12**).

#### E Discussion

#### E.1 Variabilité de l'influence des ponts disulfures

Les mesures de thermoactivité et de thermostabilité des mutants dans lesquels un ou deux ponts disulfures ont été intégrés ont indiqué clairement que l'effet du pontage dépendait de sa localisation dans la structure de l'enzyme. L'explication des améliorations apportées par ces mutants se trouve essentiellement dans les principes thermodynamiques et cinétiques. Dans une réaction enzymatique en effet, l'augmentation de la température a un double effet antagoniste : elle accroît la vitesse des réactions par effet thermodynamique (effet positif, les atomes possédant plus d'énergie, ils deviennent plus mobiles donc la diffusion des molécules est facilitée), mais dans le même temps, elle affaiblit les interactions faibles qui stabilisent l'enzyme, et le fragile équilibre entre les interactions stabilisantes et déstabilisantes peut être détruit à partir d'une température seuil, provoquant la dénaturation de la structure (effet négatif).

Cette considération s'est traduite chez les mutants étudiés par une activité plus élevée à 70°C qu'à 60°C (effet positif), mais en contrepartie, leurs thermostabilités à 70°C ont été bien plus faibles qu'à 60°C (effet négatif). Or, quel que soit le mutant considéré dans notre étude, l'équilibre entre ces deux effets s'est toujours situé vers 75°C. Ceci démontre que l'introduction d'un pont disulfure agit essentiellement sur la cinétique de dénaturation de l'enzyme (en ralentissant sa dénaturation) mais peu ou pas du tout sur sa thermodynamique (l'énergie de dénaturation ne change pas).

#### E.1.1 Pont entre le brin B9 et l'hélice $\alpha$

Le pont situé entre le brin B9 et l'hélice  $\alpha$  chez Tx–Xyl–SS1 a provoqué une baisse de la thermoactivité par rapport au type sauvage (–15% à 70°C), alors que la thermostabilité était augmentée de manière substantielle (+ 315% à 70°C). D'après les connaissances actuelles sur l'interdépendance mutuelle de l'activité, la stabilité et la flexibilité des enzymes (voir Chapitre I, §C.4.4, p. 31), ce pont a semblé apporter un net gain de rigidité à la protéine, ce qui lui a permis de résister plus facilement à la dénaturation thermique, car il relie deux

éléments de structure secondaires. Cette proposition est corrélée par le fait que la température de fusion passe de 69,0°C pour Tx–Xyl à 73,3°C pour Tx–Xyl–SS1, cette différence montrant que l'énergie nécessaire pour dénaturer Tx–Xyl–SS1 est bien plus élevée.

En contrepartie, cette rigidité a certainement diminué la flexibilité locale de l'enzyme requise pour une bonne activité, effet remarqué auparavant chez les xylanases de *Bacillus circulans* et de *Trichoderma reesei* lors de l'introduction d'un pont disulfure à la même position (Wakarchuk *et al.*, 1994b ; Turunen *et al.*, 2001). En effet, ce pont disulfure est situé à la base de la structure supposée constituer la charnière du pouce des Xyl–11, lequel semble être animé d'un mouvement lors de la fixation du substrat et du départ du produit (Muilu *et al.*, 1998). Si certains éléments de cette charnière sont rendus plus rigides, la catalyse se réalise moins vite, ce qui se traduit par une valeur de  $k_{cat}$  plus faible. L'introduction de ce pont possède donc deux effets antagonistes.

Cette expérience a donc révélé que la zone du brin B9 et de l'hélice  $\alpha$  est non seulement une région dont la flexibilité est impliquée dans la catalyse par son mouvement, mais qu'il s'agit aussi d'un « point chaud » de la dénaturation thermique de Tx–Xyl, puisque sa rigidification rend l'enzyme plus thermostable.

#### E.1.2 Pont entre les extrémités N-ter et C-ter

La création de ce pont chez Tx–Xyl–SS2 a permis à la fois une augmentation de la thermoactivité par rapport au type sauvage (+ 45% à 70°C) et un gain important de la demivie (+ 150% à 70°C). D'un point de vue structural, ce pont est éloigné du site actif et n'appartient à aucun élément susceptible d'intervenir dans le mouvement supposé de l'enzyme nécessaire à son activité. C'est sans doute pourquoi cette pseudo-cyclisation de l'enzyme (elle devient circulaire via une liaison disulfure et non pas une liaison peptidique) a permis un gain de stabilité sans pour autant abaisser l'activité, car sa présence n'entrave pas la flexibilité de l'enzyme. Ce pont supprime tout élément mobile libre dans la protéine comme les extrémités N–ter et C–ter, qui peuvent être la source du dépliement de l'enzyme, et donc de sa dénaturation *in fine*. Chez la xylanase de *B. circulans*, l'introduction de ce même pont augmente la thermostabilité, mais l'activité n'augmente que pour des températures supérieures à 50°C par rapport au type sauvage (Wakarchuk *et al.*, 1994b).

La température de fusion de Tx-Xyl-SS2 atteint 70,4°C, valeur plus élevée que celle de Tx-Xyl mais inférieure à celle de Tx-Xyl-SS1. L'établissement d'interactions

supplémentaires via le pont entre les extrémités N-ter et C-ter permet, comme le pont de Tx-Xyl-SS1, de retarder la dénaturation, mais de façon moins prononcée, car le temps de demi-vie est plus faible. Par contre, il n'a pas induit de contrainte de flexibilité catalytique et a procuré une plus forte activité.

La comparaison de l'effet de l'introduction des deux ponts disulfures a donc mis en évidence que le pont entre le brin B9 et l'hélice  $\alpha$  est plus résistant à la dénaturation thermique, mais diminue l'activité de l'enzyme en la rigidifiant trop. Le pont entre les extrémités N-ter et C-ter est moins résistant, mais ne restreint pas la flexibilité, donc accroît l'activité de l'enzyme.

#### E.1.3 Double pont

D'après ces conclusions, le mutant aux deux ponts disulfures a semblé cumuler les effets de chacun des ponts décrits précédemment :

- le pont entre les extrémités N-ter et C-ter lui a fourni une forte activité et une bonne stabilité aux températures inférieures à 75°C ;
- le pont entre le brin B9 et l'hélice α a rigidifié l'intérieur de la structure, ce qui s'est traduit par une légère baisse d'activité chez Tx-Xyl-SS3 par rapport à Tx-Xyl-SS2 en dessous de 75°C. Par contre, il a permis à Tx-Xyl-SS3 de maintenir son intégrité structurale plus longtemps aux fortes températures où la rigidification, qui était un élément préjudiciable aux basses températures, ne l'était plus.

En fonction des conditions d'utilisation considérées en termes de températures et de temps de fonctionnement, les mutants Tx-Xyl-SS2 et Tx-Xyl-SS3 présenteront chacun un intérêt : le premier pour des applications où une activité élevée est réclamée sur des temps courts (1 à 2 h) à des températures proches de 70 à 75°C mais pas au-delà ; le second pour des procédés où le maintien d'une activité moyenne durant quelques heures mais à des températures plus élevées de l'ordre de 70 à 80°C prime avant tout.

#### E.2 Rôle de l'extrémité N-ter

En outre, notre étude a apporté de nouvelles informations sur le rôle joué par l'extrémité N-ter sur la stabilité des enzymes. Tout d'abord, nous avons pu constater que la présence d'un résidu Met en N-ter chez le mutant Tx-Xyl-R1 provoquait une forte baisse de la stabilité de l'enzyme, alors que l'activité (mesurée sur des temps courts de 10 min) n'était pas

T. xylanilyticus 1 ----------NTYWQYWTDGIGYVNATNGQGGNYSVSWSNSGN- 33 A. nidulans -APSDQSIAERSLSERSTPSSTGTSGGYYYSFWTDGGGDVTYTNGDGGSYTVEWTKVGN- 58 1 C.sp. Rt69B 1 MCVVLANPFYAQAAMTFTSNATGTYDGYYYELWKDT-GNTTMTVDTGGRFSCQWSNINNA 59 C. thermophilum 1 -----QTLTSSATGTHNGYYYSFWTDGQGNIRFNLESGGQYSVTWSGNGN- 45 -----DVVITSNQTGTHGGYNFEYWKDT-GNGTMVLKDGGAFSCEWSNINNI 46 C. thermocellum 1 C. stercorarium F-9 1 -----GRIIYDNETGTHGGYDYELWKDY-GNTIMELNDGGTFSCQWSNIGNA 46 D. thermophilum -----ALTSNASGTFDGYYYELWKDT-GNTTMTVYTQGRFSCQWSNINNA 44 1 N. flexuosa -----DTTITQNQTGYDNGYFYSFWTDAPGTVSMTLHSGGSYSTSWRNTGN- 46 1 P. varioti Bainier 1 -----GTTPNSEGWHDGYYYSWWSDGGGDSTYTNNSGGTYEITWGNGGN- 44 T. fusca 1 -----AVTSNETGYHDGYFYSFWTDAPGTVSMELGPGGNYSTSWRNTGN- 44 T. lanuginosus -----QTTPNSEGWHDGYYYSWWSDGGAQATYTNLEGGTYEISWGDGGN- 44 1

B1

B2

Figure 16 – Alignements de séquences des Xyl–11 dont la T<sub>opt</sub> est supérieure à 60°C.

du tout affectée. Cela revient à penser que cette Met favorise le dépliement de l'enzyme et/ou défavorise son repliement, le bilan étant qu'elle déplace l'équilibre vers l'état dénaturé  $(k_1 > k_2)$  dans le modèle de dénaturation thermique des enzymes :

P native 
$$\xrightarrow{k_1}$$
 P dénaturée  $\xrightarrow{k_3}$  P aggrégée

Les propriétés d'autres protéines méthionylées ont déjà été étudiées en comparaison avec leurs équivalents natifs ne comportant pas ce résidu. Ainsi, la présence d'une Met non native chez le lysozyme du blanc d'oeuf entraîne une baisse de la solubilité, mais son remplacement par une sérine permet de retrouver une solubilité normale (Mine *et al.*, 1997). Une Met<sup>-1</sup> chez une  $\alpha$ -lactalbumine recombinante diminue la stabilité de la protéine et accroît sa charge nette apparente (Chaudhuri *et al.*, 1999). D'après les auteurs, la déstabilisation n'est pas due à la perte d'interactions électrostatiques entre la protéine sauvage et la protéine recombinante, mais plutôt à un effet entropique conformationnel dans l'état dénaturé. En comparaison avec d'autres études, il apparaît que lorsque la région N–ter d'une protéine est rigide, l'addition d'une Met en N–ter déstabilise sa conformation, et vice-versa. Or, la Met présente chez Tx–Xyl–R1 se situe justement au début d'un brin  $\beta$  (B2), élément de structure secondaire intrinsèquement rigide. Ceci pourrait expliquer en partie la déstabilisation de la xylanase par ajout d'une Met (Tx–Xyl–R1). Par opposition, la rigidification de cette région par ajout d'un pont disulfure (Tx–Xyl–SS2) possède un effet de stabilisation de l'architecture.

Par ailleurs, nous savons que l'agrégation des protéines dénaturées est induite par des interactions hydrophobes défavorables entre les résidus hydrophobes, qui sont normalement enfouis au coeur de la protéine. La Met étant un résidu hydrophobe, elle pourrait contribuer non seulement à ralentir le taux de renaturation comme nous l'avons vu, mais aussi favoriser l'agrégation de Tx–Xyl–R1. Il semble donc qu'une seule Met pourrait provoquer à la fois l'augmentation des constantes de dénaturation ( $k_1$ ) et d'agrégation de l'enzyme ( $k_3$ ), et aussi la diminution de sa constante de renaturation ( $k_2$ ).

Chez les Xyl–11 d'ailleurs, un alignement de séquences (**Figure 16**) montre que toutes les enzymes dont l'optimum d'activité est supérieur à 60°C possèdent un brin B1 (avant le brin B2), la seule exception à cette règle est précisément la xylanase Tx–Xyl. L'inverse cependant n'est pas vrai : les enzymes avec un brin B1 ne sont pas forcément toutes thermostables. Pour les enzymes avec un brin B1 dont la structure est connue, de nombreuses interactions existent

entre les brins B1, B2 et A2, et notamment l'interaction chez *T. fusca* entre le résidu Tyr<sup>9</sup> et  $Phe^{14}$  serait responsable de sa thermostabilité, car son transfert chez la xylanase mésophile de *S.* sp. S38 confère un gain substantiel de la thermostabilité (Georis *et al.*, 2000). Ceci montre bien que l'extrémité N-ter des Xyl-11 est bien une zone amorce de la dénaturation thermique, mais que sa stabilisation par la création d'interactions peut préserver, et même accroître sa thermostabilité.

#### E.3 Conclusion

Jusqu'à présent, divers facteurs étaient connus pour être responsables de la meilleure tolérance à la température des xylanases, mais jamais ces facteurs n'avaient été additionnés, que ce soit chez une enzyme mésophile ou thermophile. Chez Tx–Xyl, le principal facteur supposé responsable de sa thermoactivité élevée est la présence de zones hydrophobes en surface qui stabiliseraient l'enzyme grâce à la formation d'oligomères (Harris *et al.*, 1997). Notre étude est la première à mettre en évidence que l'amélioration de la thermostabilité et de la thermoactivité d'une xylanase déjà thermostable est encore possible, par l'ajout de ponts disulfures dans des zones sensibles.

En effet, il est clair qu'existent chez cette enzyme des régions d'instabilité conformationnelle qui apparaissent à haute température et qui sont la cause de la dénaturation protéique. La stabilisation de ces zones par la création de liaisons covalentes permet de maintenir plus longtemps une conformation active, et d'accroître l'activité, même si le choix de leur localisation est essentielle, car la rigidification d'une zone impliquée *a priori* dans la flexibilité fonctionnelle de l'enzyme peut engendrer une baisse de l'activité (comme le montre la création du pont entre le brin B9 et l'hélice  $\alpha$ ). À l'inverse, la région N-ter qui semble être le germe de la dénaturation thermique gagne à être stabilisée (pont entre les extrémités N-ter et C-ter).

Grâce aux progrès de l'ingénierie enzymatique, il est possible aujourd'hui d'améliorer les propriétés physico-chimiques des protéines comme leur stabilité au pH ou à la température, mais notre étude montre toute la complexité à la fois pour déterminer la multiplicité des critères qui en sont la cause et à quantifier leurs effets individuels et additifs. Les combinaisons d'éléments d'ordre structural et électrostatique sont ténues et difficiles à mettre en évidence, aucun paramètre évident par exemple ne distingue les protéines mésophiles des protéines thermophiles, nos connaissances dans ce domaine restent encore fragmentaires.

Enfin, il est important de noter que les améliorations apportées dans cette étude sont faibles au regard des propriétés d'autres xylanases non modifiées génétiquement, comme celle de *Dictyoglomus thermophilum* (XynB6) dont l'optimum de température est de 85°C et qui conserve 100% de son activité après une incubation de 8 h à 85°C (Morris *et al.*, 1998).

#### F Action comparée de Tx–Xyl et Tx–Xyl–SS3 sur un substrat complexe

#### F.1 Problématique

Afin d'évaluer l'utilité technologique de l'action du mutant Tx-Xyl-SS3 par rapport à l'enzyme sauvage, nous avons voulu tester leurs efficacités respectives durant l'hydrolyse d'un substrat complexe, le son de blé. En effet, une des motivations majeures de la précédente démarche d'ingénierie des protéines a été la création d'une nouvelle xylanase plus thermostable, qui permettrait une hydrolyse plus efficace des substrats complexes tels que le son de blé. La logique de cette stratégie reposait sur l'hypothèse que l'emploi d'une température plus élevée pendant la dégradation enzymatique permettrait un meilleur désassemblage du réseau pariétal, et donc une plus grande accessibilité des arabinoxylanes pour la xylanase.

Le son de blé est un co-produit de la transformation des grains de blé en farines et semoules, fraction obtenue lors de la mouture de ces grains, qui fournit par ailleurs le germe et la farine. La composition des sons varie selon la contamination par les autres composés du grain, de la variété considérée et du degré de maturité du grain. Les polysaccharides les plus largement représentés dans le son de blé sont la cellulose et les hémicelluloses, et en particulier les arabinoxylanes.

Rappelons que les sons de blé représentent une production annuelle de plus de 6 millions de tonnes en France et ils constituent 15 à 20% de la masse du grain, mais comme ils sont essentiellement destinés à l'alimentation animale pour leur potentiel nutritionnel important, leur valorisation est encore incomplète et représente un enjeu économique majeur.

La dégradation de ce composé est réalisée à l'échelle industrielle par une société partenaire du laboratoire, la société ARD, les sucres libérés étant utilisés dans la fabrication notamment de surfactants qui entrent dans la composition de produits cosmétiques.



Figure 17 – Chromatographie sur couche mince des produits d'hydrolyse du son de blé par Tx–Xyl et Tx–Xyl–SS3 à 60°C en fonction du temps sur 24 h. À chaque prélèvement sont déposés côte à côte les produits d'hydrolyse de Tx–Xyl et Tx–Xyl–SS3. Un témoin T contient un mélange de xylose (X), xylobiose (X<sub>2</sub>), xylotriose (X<sub>3</sub>) et xylotétraose (X<sub>4</sub>), le fucose F est ajouté lors de chaque réaction comme témoin pour l'analyse HPAEC-PAD. AX indique les taches identifiées comme étant des arabinoxylo-oligosaccharides.

| Concentration des monosaccharides (µg/mL) | Essai 1 | Essai 2 | Moyenne        |
|---|---------|---------|----------------|
| Xylose                                    | 1543,9  | 1847,4  | 1695,6±214,6   |
| Arabinose                                 | 1007,8  | 1224,4  | 1116,1 ± 153,2 |
| Glucose                                   | 281,6   | 339,0   | 310,3 ± 40,6   |
| Galactose                                 | 94,8    | 108,0   | 101,4 ± 9,3    |

Tableau 4 – Concentrations en monosaccharides du son de blé mesurées par HPAEC-PAD après hydrolyse acide. L'hydrolyse du son de blé a été largement étudiée au laboratoire au niveau des conditions enzymatiques et physico-chimiques permettant l'obtention de rendements maximaux de dégradation des arabinoxylanes, et des facteurs limitant sa déstructuration ont été mis en évidence (forte substitution de la chaîne de xylane, présence d'inhibiteurs protéiques, concentrations relatives d'enzyme et de substrat). L'action comparée de Tx–Xyl par rapport à son équivalent plus thermostable et plus actif (Tx–Xyl–SS3) a permis d'examiner le facteur de thermostabilité intrinsèque aux enzymes lors de la dégradation des sons de blé à deux températures différentes. D'abord à 60°C, température usuelle de travail des enzymes, qui sont alors stables durant plusieurs heures. Puis à 70°C, car Tx–Xyl–SS3 possède à cette température un temps de demi-vie dix fois supérieur à celui de Tx–Xyl et une meilleure activité.

### F.2 Comparaison de l'hydrolyse du son de blé par Tx–Xyl et Tx–Xyl–SS3

#### F.2.1 Choix des conditions expérimentales

Des études précédentes ont montré que l'action de Tx–Xyl sur le son de blé permet la solubilisation de 45 à 50% des arabinoxylanes (Benamrouche-Stitou, 2002). Ce maximum est atteint en utilisant une concentration en enzyme de 15 à 30 UI/mL (soit environ de 0,4 à 0,8  $\mu$ M). Mais même à 1 UI/mL (0,03  $\mu$ M), le rendement mesuré est quasiment maximal. Par conséquent, pour la caractérisation de l'action de Tx–Xyl–SS3 sur le son de blé, nous avons utilisé une concentration en enzyme de 0,1  $\mu$ M et une concentration identique pour l'enzyme sauvage. Ainsi, les réactions ont été effectuées dans des conditions où la concentration enzymatique ne représente pas un facteur limitant.

Après l'ajout des enzymes dans les réacteurs contenant le son de blé incubé à 60°C, des prélèvements ont été effectués pendant 24 h, une partie a servi à l'analyse qualitative des sucres libérés par CCM, et une autre à la quantification des monomères xylose et arabinose composant les oligomères solubles libérés. La même série de mesures a été effectuée en réalisant l'hydrolyse à 70°C.

#### F.2.2 Caractérisation des oligosaccharides libérés par CCM

L'analyse par CCM des produits d'hydrolyse à 60°C a mis en évidence les différents xylooligosaccharides libérés sous l'effet de l'action enzymatique. D'un point de vue qualitatif, les oligosaccharides qui ont été essentiellement libérés après 1 h de réaction sont le xylobiose, le

| $\mathbf{T}_{a}$                           | Tx-                        | -Xyl                 | Tx-Xyl-SS3        |                      |  |
|--|----------------------------|----------------------|-------------------|----------------------|--|
| Temps (n)                                  | Xylose (µg/mL)             | Arabinose<br>(µg/mL) | Xylose (µg/mL)    | Arabinose<br>(µg/mL) |  |
| 0,25                                       | 749,2 ± 8,9                | $249,0\pm7,9$        | 933,0 ± 75,2      | 317,1 ± 23,0         |  |
| 0,5  | 792,7 ± 16,9               | 259,4 ± 2,3          | $1065,3 \pm 23,1$ | 333,9 ± 13,2         |  |
| 1,0  | 782,2 ± 14,2               | 261,8±5,2            | 934,4 ± 26,0      | 314,6 ± 3,4          |  |
| 2,0  | 803,6 ± 20,2               | 264,4 ± 11,9         | 1040,6 ± 32,9     | 330,5 ± 18,5         |  |
| 4,0  | 773,6±40,4                 | 257,8 ± 16,7         | 1045,6 ± 18,8     | 342,0 ± 5,5          |  |
| 6,0  | 828,5 ± 11,9               | $281,7 \pm 2,7$      | 1046,0 ± 52,9     | 348,4 ± 18,2         |  |
| 9,0  | 802,0 ±40,1                | 278,1 ± 15,2         | 984,0 ± 33,7      | 338,7 ± 19,9         |  |
| 24,0                                       | 804,9 ± 41,0               | 277,4 ± 11,5         | 1019,6 ± 53,1     | 342,0 ± 18,5         |  |
| % Xylose libéré                            | 47,5                       | ± 8,4                | $60,1\pm10,7$     |                      |  |
| % Arabinose<br>libéré                      | % Arabinose $24,9 \pm 4,4$ |                      | $30,6 \pm 5,9$    |                      |  |
| % Xylose +<br>Arabinose<br>libéré          | 38,5                       | ± 6,9                | 6,9 48,4 ± 8,9    |                      |  |
| Rapport X/A<br>des composés<br>libérés     | 2,90                       | ± 0,27               | $2{,}98\pm0{,}31$ |                      |  |
| Rapport X/A<br>des composés<br>non libérés | 1,06                       | ± 0,51               | 0,87 ± 0,53       |                      |  |

Tableau 5 – Concentrations en monosaccharides des xylo-oligosaccharides solubles libérés lors de l'hydrolyse du son de blé à 60°C par Tx–Xyl et Tx–Xyl–SS3. Les pourcentages de sucres libérés sont calculés en divisant les concentrations mesurées après 24 h d'hydrolyse par les concentrations totales contenues dans le son de blé. xylotriose et le xylotétraoase chez les deux enzymes (**Figure 17**). Comme la coloration des sucres favorise la détection des oligosaccharides plus longs, une comparaison quantitative est délicate. Après 8 h d'hydrolyse néanmoins, il est apparu que la quantité de  $X_4$  libérée diminuait légèrement, et devenait encore plus faible après 24 h d'hydrolyse. Dans le même temps, la quantité de  $X_2$  a semblé évoluer vers une augmentation légère.

Par ailleurs, en comparaison avec des résultats précédents (Beaugrand *et al.*, 2004), nous avons pu identifier une tache migrant moins loin que le X<sub>4</sub>, donc de DP plus élevé, comme étant des arabinoxylo-oligosaccharides (**Figure 17**). La quantité de ces produits a diminué progressivement au cours du temps, tandis que les produits de tailles plus élevées n'ont quasiment pas migré sur la CCM. Enfin, comme pour la réaction catalysée par Tx–Xyl, l'hydrolyse par Tx–Xyl–SS3 n'a pas permis la libération d'arabinose ou de xylose sous forme monomérique. À 70°C, les mêmes observations ont été effectuées, les profils de produits libérés sont identiques qualitativement.

#### F.2.3 Conclusion

L'hydrolyse du son de blé par Tx–Xyl ou Tx–Xyl–SS3 a donc permis la libération majoritairement des mêmes xylo-oligosaccharides, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> et X<sub>4</sub>, et pas du tout de xylose (du moins au niveau du seuil de détection de la méthode). Le produit majoritaire est le X<sub>3</sub>, tandis que la diminution lente de la concentration de X<sub>4</sub> dans le temps a semblé indiqué que ce produit n'était pas le substrat préférentiel de l'enzyme, mais était peu à peu hydrolysé en xylobiose, comme en a attesté l'augmentation de la concentration de ce composé. Le plus petit xylo-oligosaccharide hydrolysable par Tx–Xyl ou Tx–Xyl–SS3 semble donc être le X<sub>4</sub>. Le bilan de cette analyse préliminaire est que les deux xylanases testées possèdent des profils d'hydrolyse identiques au niveau qualitatif, que ce soit à 60°C ou 70°C. Nous allons à présent déterminer de façon quantitative les quantités de monosaccharides libérées.

#### F.2.4 Composition des oligosaccharides libérés par HPAEC-PAD

L'analyse des produits d'hydrolyse par HPAEC-PAD a permis la quantification en monosaccharides de la fraction soluble. Il était nécessaire tout d'abord de calculer la concentration totale en monosaccharides contenue dans le son de blé avant hydrolyse afin de déterminer le rendement de la réaction. Pour cela, une hydrolyse du son de blé broyé a été réalisée par l'acide sulfurique 12 M avant l'analyse chromatographique, les concentrations des sucres monomériques étant reportées dans le **Tableau 4**. La concentration en xylose est environ 50% plus élevé que celle en arabinose dans l'échantillon, ce qui donne un rapport des



Figure 18 – Concentrations en xylose et arabinose des oligosaccharides solubles issus de l'hydrolyse du son de blé à 60°C par Tx–Xyl et Tx–Xyl–SS3.

concentrations de xylose/arabinose X/A proche de  $1,5 \pm 0,4$ . Cependant, cette valeur masque une très forte hétérogénéité de la substitution des arabinoxylanes qui affichent des zones parfois très ramifiées et d'autres qui le sont très peu. Par ailleurs, des réactions témoins ont indiqué que les quantités de sucres libérées sans ajout d'enzyme étaient négligeables.

Le **Tableau 5** présente les résultats de l'analyse quantitative des fractions solubles en fonction du temps, et les cinétiques des différentes réactions sont représentées sur la **Figure 18**. Tout d'abord, nous avons constaté qu'après seulement 1 h d'hydrolyse à 60°C, les concentrations en Xyl et Ara évoluaient très peu dans le temps, quelle que soit l'enzyme considérée. Ceci montre que l'action des enzymes Tx–Xyl et Tx–Xyl–SS3 est rapide et qu'après 1 h de réaction, un plateau est atteint. De manière importante, les concentrations de Xyl et Ara libérés par Tx–Xyl–SS3 ont été nettement plus élevées que celles produites par Tx–Xyl. Après 24 h d'hydrolyse, la concentration de xylose était de 1020 µg/mL contre 805 µg/mL, ce qui équivaut à un pourcentage de xylose libéré par rapport à la quantité totale présente dans le son de blé égal de plus de 60% pour Tx–Xyl–SS3, contre moins de 50% pour Tx–Xyl. L'écart est semblable pour la libération d'arabinose, qui atteint presque 31% pour Tx–Xyl–SS3 contre 25% pour Tx–Xyl. Le rendement d'hydrolyse des arabinoxylanes est donc passé de 38,5% avec l'utilisation de l'enzyme sauvage à presque 50% avec l'enzyme comportant deux ponts disulfures. À 70°C, les mêmes rendements de solubilisation ont été mesurés pour chaque enzyme, donc le gain d'hydrolyse par Tx–Xyl–SS3 est aussi conservé.

Le rendement de solubilisation des arabinoxylanes par l'action de Tx-Xyl (38,5%) est inférieur aux valeurs observées précédemment (Benamrouche-Stitou, 2002 ; Beaugrand *et al.*, 2004), mais a été obtenu de manière reproductible dans nos différents essais. De même, l'écart mesuré entre les rendements de dégradation des deux enzymes Tx-Xyl et Tx-Xyl-SS3 (10 points) a été parfaitement reproductible.

Les rapports X/A des produits solubilisés et des fractions résiduelles (solides) générées par l'action de Tx–Xyl ou de Tx–Xyl–SS3 se trouvent dans le **Tableau 5**. Avant hydrolyse, le rapport X/A des arabinoxylanes du son de blé est égal à 1,5. Après hydrolyse, le rapport de la fraction résiduelle passe à 1,06 pour Tx–Xyl et 0,87 pour Tx–Xyl–SS3. Dans les fractions solubles, les produits présentent des rapports X/A de 2,90 et 2,98 respectivement.

#### F.2.5 Interprétation des résultats

L'hydrolyse du son de blé catalysée par Tx–Xyl ou Tx–Xyl–SS3 à 60°C ou 70°C a permis la solubilisation d'une partie des arabinoxylanes. D'un point de vue quantitatif, les fractions solubles issues des deux réactions présentaient des compositions identiques. Des xylooligosaccharides de faible DP (xylobiose, xylotriose et xylotétraose) sont les produits majoritaires. D'un point de vue qualitatif par contre, nos analyses ont révélé que l'utilisation de Tx–Xyl–SS3 conduit à un rendement de solubilisation des arabinoxylanes à 60°C plus élevé (48,4% au lieu de 38,5% avec Tx–Xyl). Mais l'augmentation de la température à 70°C n'influence pas le rendement final, ni avec Tx–Xyl , ni avec Tx–Xyl–SS3 est légèrement plus faible (0,87 au lieu de 1,06), indiquant que l'étendue de l'action de Tx–Xyl–SS3 dépasse celle de Tx–Xyl.

Examinons les hypothèses qui pourraient être à l'origine de la dégradation plus prononcée du son de blé par Tx-Xyl-SS3. Les enzymes ajoutées dans chaque réacteur ont des concentrations molaires identiques de 0,1 µM, mais le mode de calcul des concentrations par spectrophotométrie pourrait générer des erreurs. En effet, nous avons supposé jusqu'à présent que le nombre de résidu aromatiques Trp et Tyr contenus dans Tx-Xyl était suffisamment élevé (13 Trp et 21 Tyr) pour que même la suppression d'un résidu ou l'ajout d'un autre ne modifie le coefficient d'extinction molaire  $\varepsilon$  que de quelques pourcents, ce qui est négligeable par rapport à l'incertitude des mesures. Or, l'introduction de ponts disulfures modifie peutêtre la structure de sorte que l'environnement d'un ou de plusieurs résidus aromatiques soit modifié, ce qui provoquerait une variation de ɛ. Mais lors des analyses des spectres de dichroïsme circulaire (Figure 9), les spectres ont été normalisés en fonction des concentrations des enzymes dans la cuve de mesure. Le DC est une grandeur très sensible à la concentration en protéines, tous les paramètres étant par ailleurs égaux. Or, les spectres de Tx-Xyl et de Tx-Xyl-SS3 sont parfaitement superposables, ce qui montre que la mesure de la concentration en enzymes dans les réacteurs n'est pas la source de l'écart d'activité entre les deux enzymes. De plus, des résultats antérieurs (Benamrouche-Stitou, 2002) indiquent qu'une concentration en enzyme de 0,1 µM est suffisante pour atteindre un taux d'hydrolyse maximal. Dans ces conditions, la concentration en enzyme ne devrait pas influer sur les résultats obtenus.



Figure 19 – Principe de l'hydrolyse comparée en deux étapes du son de blé par Tx-Xyl et Tx-Xyl-SS3.

Par ailleurs, les concentrations en UI dans les réacteurs sont différentes (Tx–Xyl et Tx–Xyl–SS3 possèdent des activités spécifiques différentes : 1750 UI/mg et 2320 UI/mg respectivement à  $60^{\circ}$ C). Les milieux réactionnels contenaient donc 3,6 UI/mL et 4,8 UI/mL respectivement, soit un écart de 33% du nombre d'UI. Mais pour la même raison que précédemment, cette variation ne peut pas avoir d'influence sur le rendement d'hydrolyse.

Par conséquent, le gain obtenu serait dû à des facteurs intrinsèques à l'enzyme Tx–Xyl–SS3 : soit sa thermostabilité accrue, soit des propriétés biochimiques différentes de celles de Tx–Xyl. Pour vérifier la première hypothèse, nous avons décidé de procéder à une nouvelle série d'expériences.

#### F.3 Hydrolyse du son de blé par additions d'enzymes

#### F.3.1 Choix des conditions expérimentales

Comme nous l'a vu, la thermostabilité de Tx–Xyl et Tx–Xyl–SS3 sont similaires à 60°C, la perte d'activité après quelques heures est faible pour les deux enzymes puisque leurs temps de demi-vie dépassent les 12 h (**Tableaux 1 et 2**). Le taux maximal d'hydrolyse du son de blé étant atteint après seulement 2 h, il semble donc difficile d'expliquer comment la thermostabilité pourrait être mise en cause pour expliquer la différence de rendement d'hydrolyse du son de blé.

Pour explorer la différence d'hydrolyse observée précédemment, nous avons proposé de réaliser dans un premier temps la dégradation du son de blé dans les mêmes conditions que précédemment (20 mL de solution de son de blé à 5 g/L sous agitation, 100  $\mu$ g/mL de fucose témoin, thermostatation à 60°C) dans six réacteurs A1, A2, A3 et B1, B2, B3 avec l'enzyme sauvage Tx–Xyl (0,1  $\mu$ M). Au bout de 4 h d'hydrolyse (temps suffisant pour atteindre le rendement maximal d'après nos expérience précédentes), un prélèvement a été réalisé dans chaque réacteur pour l'analyse des sucres solubilisés (fin de la première étape).

Nous avons alors ajouté l'enzyme Tx–Xyl (0,1  $\mu$ M finale) dans les réacteurs A1, A2, A3, et l'enzyme Tx–Xyl–SS3 (0,1  $\mu$ M finale) dans les réacteurs B1, B2, B3. Au bout de 4 h de réaction après ces nouveaux ajouts, de nouveaux prélèvements ont été effectués dans chaque réacteur (fin de la seconde étape) (**Figure 19**). Les prélèvements ont donc été analysés à la fin de chaque hydrolyse et par deux méthodes différentes, dosage des sucres réducteurs et chromatographie HPAEC-PAD.

| Méthode de quantification |                                | Hydrolyse de 4 h par Tx–Xyl<br>(A1, A2, A3, B1, B2, B3<br>après 4 h) | Hydrolyse de 4 h par Tx–Xyl<br>puis de 4 h par Tx–Xyl<br>(A1, A2, A3 après 4 + 4 h) | Hydrolyse de 4 h par Tx–Xyl<br>puis de 4 h par Tx–Xyl–SS3<br>(B1, B2, B3 après 4 + 4 h) |
|---------------------------|--------------------------------|--|---|---|
| HPAEC-PAD                 | % Xylose + Arabinose<br>libéré | $60,2 \pm 17,7$  | 60,9 ± 19,1   | 70,1 ± 25,5   |
| Sucres<br>réducteurs      | Concentration (µg/mL)          | $1637 \pm 17$  | $1635 \pm 38$   | $1933 \pm 16$   |

Tableau 6 – Rendements d'hydrolyse des arabinoxylanes du son de blé après l'action d'une seule xylanase ou de deux xylanases consécutivement à 60°C.

#### F.3.2 Résultats

Après la première étape d'hydrolyse de 4 h du son de blé par Tx–Xyl dans les six réacteurs, le rendement de solubilisation des arabionxylanes a atteint 60% (**Tableau 6**). Après rajout de Tx–Xyl et une nouvelle incubation pendant 4 h, le rendement n'a pas évolué et est toujours identique à 60%, la quantité de sucres réducteurs mesurée est aussi inchangée : le supplément d'enzyme « fraîche » n'a pas du tout accrû le taux d'hydrolyse du son de blé. Par contre, lorsque Tx–Xyl–SS3 a été ajoutée à la suite de l'action de Tx–Xyl, le rendement final d'hydrolyse est passé de 60% à 70%, soit une augmentation de 10 points. Par ailleurs, la concentration de sucres réducteurs libérés a été accrue de 18%.

#### F.3.3 Interprétation des résultats

Tout d'abord, les taux de solubilisation des arabinoxylanes pour chaque enzyme se sont révélés plus élevés que dans l'expérience précédente (voir F.2, p.126) : 60,2% contre 38,5% pour Tx–Xyl et 70,1% contre 48,4% pour Tx–Xyl–SS3, alors qu'ils devraient être identiques. Ces écarts sont dus à des problèmes expérimentaux concernant la récupération de la fraction soluble. Dans les deux cas cependant, le résultat essentiel concerne la différence de rendement de dégradation entre Tx–Xyl–SS3 et Tx–Xyl, qui elle est demeurée inchangée et proche de 10 points de rendement.

Cette expérience a donc mis en évidence que le rendement de dégradation de l'enzyme sauvage Tx–Xyl n'était en réalité pas limité par sa thermostabilité comme nous l'avions envisagé, car l'ajout d'un nouveau lot d'enzyme après 4 h d'hydrolyse n'a pas augmenté la libération de sucres. Par contre, Tx–Xyl–SS3 a encore été capable de libérer des sucres à partir du son de blé déjà hydrolysé par l'action de Tx–Xyl, ce qui signifie que Tx–Xyl–SS3 s'attaque à des zones du substrat inaccessibles à Tx–Xyl.

Il est donc fortement probable que ni les propriétés de thermostabilité de Tx-Xyl et Tx-Xyl-SS3 (quasiment égales dans les conditions expérimentales décrites), ni leurs propriétés catalytiques (identiques) ne sont en cause dans les différences de rendements de dégradation du son de blé mesurées. Des différences de propriétés physico-chimiques des enzymes en seraient plus probablement la cause, du fait certainement de l'introduction des ponts disulfures, qui favoriserait une diffusion plus libre de Tx-Xyl-SS3 dans certaines couches du substrat. En effet, la diffusion de Tx-Xyl est un des facteurs qui lui permet de mieux hydrolyser le son de blé par rapport aux xylanases de la famille 10 qui sont plus

volumineuses (Beaugrand *et al.*, 2004). Des observations microscopiques ont par ailleurs montré que des arabinoxylanes résiduels non attaqués par Tx–Xyl se situeraient soit dans le péricarpe du son de blé, soit dans les parois cellulaires de l'aleurone (Beaugrand *et al.*, 2004), c'est ce substrat que Tx–Xyl–SS3 serait peut-être capable d'hydrolyser.

Les raisons d'une meilleure accessibilité au substrat peuvent être multiples :

- l'oligomérisation de l'enzyme : nous ne savons pas actuellement sous quelle forme se trouve la xylanase sauvage en solution, mais des données cristallographiques indiquent qu'elle cristallise sous forme de tétramères. Ce résultat n'implique en aucun cas qu'elle se trouve sous la forme de tétramères en solution, mais si tel était le cas, l'introduction des deux ponts disulfures pourrait éventuellement entraver cette multimérisation, à cause d'une gêne stérique et/ou électrostatique. L'enzyme se retrouvant sous forme monomérique, elle accèderait peut-être plus facilement à certaines zones de substrat ;
- l'hydrophobie de l'enzyme (liée aussi à l'oligomérisation) : nous savons que Tx-Xyl est une enzyme hydrophobe (sa purification nécessite l'utilisation d'éthylène glycol), la présence des ponts disulfures notamment celui entre les extrémités N-ter et C-ter pourrait moins exposer certains résidus hydrophobes au solvant (Trp<sup>182</sup> en particulier), donc rendrait l'enzyme plus hydrophile, et favoriserait sa diffusion et son rapprochement du substrat ;
- la compacité de l'enzyme : comme précédemment, l'influence des ponts disulfures sur la compacité de Tx-Xyl-SS3 n'est pas à exclure, mais puisque les expériences de dichroïsme circulaire n'ont montré aucun changement évident de la structure secondaire, cette hypothèse semble tout de même peu probable.

Les hypothèses présentées ne sont pas exclusives et une combinaison de celles formulées cidessus, ou avec d'autres, est aussi envisageable pour tenter d'expliquer les différences de rendements d'hydrolyse observées.

#### F.4 Conclusion

La dégradation de co-produits agricoles, des sons de blé en particulier, et leur valorisation dans un domaine en plein essor comme la production de xylose, en tant que sucre fermentescible pour la synthèse de bioéthanol comme carburant, est d'une importance économique, écologique et politique aujourd'hui grandissante. Le coût de production des enzymes est actuellement un des facteurs limitants du développement de procédés industriels à grande échelle. À notre connaissance, notre étude est la première à comparer l'action sur un substrat complexe comme le son de blé d'une xylanase de la famille 11 à la même enzyme modifiée dont la thermostabilité a été accrue par l'introduction de ponts disulfures par génie génétique. Leurs profils d'hydrolyse demeurent identiques au niveau qualitatif, mais leurs rendements d'hydrolyse des arabinoxylanes sont très différents : le rendement de solubilisation des arabinoxylanes sous l'action du mutant plus thermostable est accru de 10 points. Contrairement à ce que nous envisagions dans notre objectif initial, l'utilisation d'une température de réaction de 70°C au lieu de 60°C n'a pas eu d'effet sur le rendement final. Nous avons pu montré que ce gain n'est pas dû à la meilleure thermostabilité de l'enzyme mutante, mais à de nouvelles propriétés physico-chimiques qu'elle a acquises et qui lui confèrent une meilleure accessibilité au substrat. La détermination précise de ces propriétés bénéfiques reste à effectuer.

Cette découverte pourrait représenter une avancée majeure quant à l'augmentation de la bioconversion du son de blé en sucres sous forme monomérique. De plus, les réactions s'effectuent avec des concentrations en enzymes assez faibles à  $0,1 \mu$ M, soit à peu près 400  $\mu$ g d'enzyme/g de substrat. Comme l'ont montré des travaux au laboratoire sur la xylanase sauvage, une augmentation de la concentration du substrat est probablement envisageable avec un rendement similaire pour la xylanase plus thermostable, ce qui diminuerait encore la quantité nécessaire pour la dégradation du son de blé. Il reste néanmoins à comprendre comment l'augmentation du rendement d'hydrolyse est rendue possible.

## **Chapitre IV**

# Ingénierie du « pouce » de Tx–Xyl
## CHAPITRE IV - INGÉNIERIE DU « POUCE » DE Tx-XyI

## A Problématique

Afin de mieux appréhender les relations structure/fonction chez la xylanase de *Thermobacillus xylanilyticus*, nous nous sommes intéressés à l'élément structural le plus caractéristique qu'elle comporte, c'est-à-dire le pouce, boucle qui surplombe la crevasse catalytique. L'étude bibliographique a montré que ce motif est parfaitement conservé chez les Xyl–11, aussi bien au niveau de la séquence qu'au niveau du repliement. Il serait également un motif indispensable pour la reconnaissance des inhibiteurs XIP-I. C'est au niveau du pouce que la crevasse des Xyl–11 est d'ailleurs la plus étroite. Une étude de dynamique moléculaire a proposé que le pouce serait animé d'un mouvement d'ouverture et de fermeture de la crevasse lors du cycle catalytique. Enfin, de part son hydrophobie et son positionnement, l'extrémité du pouce serait un des éléments responsables de la grande sélectivité de substrat des Xyl–11. Mais son implication précise durant la catalyse enzymatique reste encore largement méconnue.

Dans notre étude, nous avons combiné une approche de modélisation moléculaire avec différentes méthodes de mutagenèse afin d'explorer l'importance du pouce. D'abord, nous avons construit un modèle d'arrimage enzyme/substrat avec un xylo-oligosaccharide. Ce modèle a permis de préciser la structure du site actif, et surtout de réaliser une première évaluation de l'interaction entre le pouce et le substrat. Ensuite, des études de mutagenèse dirigée et l'analyse des protéines mutées ont apporté des éléments concernant le rôle du pouce dans le cycle catalytique. Enfin, une expérience de mutagenèse par délétion et l'étude de la protéine tronquée, dépourvue du pouce, a révélé le rôle essentiel joué par le pouce dans la sélectivité de substrat des Xyl–11. Ces derniers résultats ont permis de mettre en évidence de manière expérimentale la relation étroite entre les Xyl–11 et les endoglucanases de la famille 12 des GH.

## B Modélisation de l'arrimage d'un xylo-oligosaccharide dans la crevasse de Tx–Xyl

## B.1 Modélisation du xylobiose

Pour réaliser la construction du substrat xylo-oligosaccharidique qui a été ensuite arrimé dans la crevasse de Tx–Xyl, il était nécessaire de connaître tout d'abord les valeurs des angles



Figure 1 – Carte d'isocontours énergétiques du xylobiose. Les angles dièdres sont définis par  $\varphi = \angle O_5 - C_1 - O_1 - C_4$  et  $\psi = \angle C_1 - O_1 - C_4 - C_5$ .

| Minima<br>énergétiques | $\phi = \angle O_5 - C_1 - O_1 - C_4$ | $\psi = \angle C_1 - O_1 - C_4 - C_5$ |
|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>S</b> 1             | $-85^{\circ}$                         | - 90°                                 |
| S2                     | - 135°                                | - 140°                                |
| S3                     | $+48^{\circ}$                         | - 110°                                |
| S4                     | - 95°                                 | + 50°                                 |

Tableau 1 – Valeurs des angles dièdres  $(\phi, \psi)$  correspondant aux quatre conformations d'énergies minimales du xylobiose.

dièdres  $\varphi$  et  $\psi$  des liaisons xylosidiques possibles du substrat, et qui correspondaient à des conformations stables. Pour cela, l'énergie du plus petit xylo-oligosaccharide (i.e. un xylobiose), dont les cycles liés par une liaison  $\beta$ –(1,4) ont été maintenus dans des conformations rigides, a été mesurée en fonction de toutes les conformations que la liaison xylosidique pouvait adopter. Dans le champ de forces CFF91, la valeur des angles dièdres a été incrémentée par pas de 1° et l'énergie *E* du système a été mesurée, c'est-à-dire que pour chaque valeur de  $\varphi$ , toutes les valeurs de  $\psi$  de 0 à 360° ont été testées, ce qui a donné  $360 \times 360 = 129600$  paramètres énergétiques à la fin de l'itération. En reportant ces valeurs sur une carte d'isocontours  $E = f(\varphi, \psi)$ , les régions où les couples de valeurs ( $\varphi, \psi$ ) indiquaient les zones d'énergie les plus basses ont été identifiées. Ces zones de basses énergies correspondent aux conformations de la molécule de xylobiose les plus stables (**Figure 1**).

L'analyse des résultats a montré l'existence de quatre zones correspondant à autant de couples de solutions S1, S2, S3 et S4 pour lesquelles les valeurs des énergies des différentes conformations du xylobiose étaient équivalentes et ne pouvaient pas être différenciées (**Tableau 1**). Lors de la construction du xylo-oligosaccharide à arrimer dans la crevasse de Tx–Xyl, nous avons considéré que les valeurs des angles dièdres mesurées devaient rester dans le domaine des solutions acceptables d'après la carte d'isocontours, sans nécessairement correspondre exactement aux solutions d'énergies minimales.

# B.2 Arrimage d'un substrat xylo-oligosaccharidique et analyse du modèle

#### **B.2.1** Construction du substrat et arrimage

Afin d'optimiser les interactions entre le substrat et l'enzyme du modèle, il était préférable de construire des xylo-oligosaccharides de DP croissant (du monomère xylose jusqu'à un DP qui permettait au substrat d'occuper la totalité de la crevasse de bout en bout) directement dans la crevasse de Tx–Xyl. Pour cela, nous avons choisi comme point de départ un résidu xylose déjà présent dans la crevasse au niveau du sous-site (– 1), et provenant du complexe entre la Xyl–11 de *Bacillus circulans* inactivée (à cause de la mutation du résidu nucléophile E172 en Cys) et un xylobiose (code PDB 1BCX). Notre travail a consisté à rajouter au fur et à mesure un résidu xylose de chaque côté NR ou R, tout en vérifiant que lors du prolongement du substrat les angles dièdres correspondaient à des solutions autorisées d'un point de vue énergétique, et que, après minimisation, les énergies d'interactions entre le substrat et

| Xylo-oligosaccharide | Occupation des sous-sites | Energie d'arrimage<br>(kcal/mol) |
|----------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Xylose               | (-1)                      | - 42,5                           |
| $X_2$                | (- 1) à (+ 1)             | - 62,8                           |
| X <sub>3</sub>       | (- 2) à (+ 1)             | - 76,8                           |
| X4                   | (- 2) à (+ 2)             | - 102,0                          |
| X <sub>6</sub>       | (-3) à (+3)               | - 133,2                          |

Tableau 2 – Énergie d'arrimage et occupation des sous-sites des différents xylooligosaccharides modélisés dans la crevasse de Tx-Xyl.

l'enzyme étaient correctes (**Tableau 2**). Lorsque certaines interactions des xylanases avec le substrat étaient connues et conservées dans les sous-sites de fixation (voir Chapitre I, §C.4.6.2, p. 40), nous avons adapté le substrat afin de favoriser ces interactions.

#### **B.2.2 Résultats**

Ainsi, lors du calcul de l'énergie d'interaction entre  $X_1$  et Tx–Xyl, l'énergie obtenue était assez faible (– 42,5 kcal/mol). En effet, seul dans le site actif, ce résidu possédait une grande latitude de positionnement dans la crevasse. Néanmoins, nous avons essayé de former la liaison hydrogène entre R110 et l'hydroxyle O2 du résidu xylose, interaction conservée chez les Xyl–11.

Ensuite, nous avons prolongé de façon simultanée le substrat de chaque côté en ajoutant un résidu xylose en (+ 1) et un autre en (- 2). Nous avons modifié les angles dièdres pour favoriser l'interaction de *stacking* conservée en (- 2) avec Trp<sup>7</sup> et la liaison hydrogène également conservée Y67 (OH)···O2 en (+ 1). Sans minimisation, la valeur de l'énergie d'interaction était très élevée, de l'ordre de  $10^6$  kcal/mol, mais après minimisation, elle est passée à - 81 kcal/mol. Les angles ( $\phi, \psi$ ) mesurés correspondaient bien aux solutions S1 et S2 respectivement, et les interactions imposées étaient bien conservées, la minimisation ayant porté essentiellement sur le réarrangement des hydroxyles des xyloses, qui pour certains, entraient en conflit stérique avec la protéine, d'où une énergie d'interaction très élevée. Au niveau du sous-site (+ 1), le résidu catalytique acide/base semblait dans une position favorable pour former une liaison hydrogène avec l'atome d'oxygène de la liaison glycosidique des résidus en (+ 1) et (- 1). Nous avons d'ores et déjà noté que le substrat pouvait difficilement être plus prolongé du côté NR, i.e. au-delà du sous-site (- 2), car le résidu supplémentaire se retrouverait alors presque en dehors de la crevasse.

Après l'ajout d'un résidu en (+2) et la minimisation de l'interaction, l'énergie mesurée était de -112 kcal/mol, mais l'analyse de la structure a indiqué que les résidus E169 et Y171 étaient dans des conformations inhabituelles. Après avoir modifié leurs conformations et suite à une nouvelle minimisation, l'énergie d'interaction obtenue est devenue égale à -102 kcal/mol, ce qui était très proche de la valeur précédente, mais avec les interactions conservées cette fois.

|               | $\phi = \angle O_5 - C_1 - O_1 - C_4$ | $\Psi = \angle C_1 - O_1 - C_4 - C_5$ |
|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| (-3)/(-2)     | - 86,2°                               | - 75,0                                |
| (-2)/(-1)     | - 87,6°                               | $-150,0^{\circ}$                      |
| (-1)/(+1)     | - 56,1°                               | - 60,3°                               |
| (+ 1) / (+ 2) | - 164,0°                              | - 107,4°                              |
| (+ 2) / (+ 3) | - 91,9°                               | - 165,6°                              |

Tableau 3 – Angles dièdres des liaisons xylosidiques du substrat xylohexaose modélisé.

| Sous- | ous- Modes d'arrimage |       |  |       |  | Énergies   |  |
|-------|-----------------------|-------|--|-------|--|------------|--|
| sites | Stac                  | king  | Liaisons hydrogène<br>(énergie et distance)          |       | Interactions de van<br>der Waals           | d'arrimage |  |
| (- 3) |                       |       | 02…NE1 ( <b>W7</b> ) <i>(</i> - <i>3</i> , <i>7)</i> | 3,1 Å | S115                                       | - 6,6      |  |
| ( )   | W7                    | Å     | O3…OH ( <b>Y163</b> ) <i>(</i> - <i>3,3)</i>         | 2,9 Å | Q5, S115, I116                             | - 23,8     |  |
| (- 2) | - 4,5                 | 4,1 A | 02…OH ( <b>Y67</b> ) <i>(</i> -6,0)                  | 3,1 Å |  |            |  |
| (– 1) |                       |       | O2…NH1 ( <b>R110</b> ) (- 7,1)                       | 2,9 Å | W7, N33, V35, Y67,<br>E76, Y78, P114, S115 | - 14,0     |  |
| (+ 1) |                       |       | O…OE2 ( <b>E169</b> ) <i>(- 5,6)</i>                 | 3,1 Å | N33, Y78, R110, Q124,<br>W126, Y171        | - 17,7     |  |
| (+ 2) |                       |       | O2…N ( <b>T89</b> ) <i>(</i> - <i>3, 1)</i>          | 3,5 Å | Y63, P88, T89, W126,<br>Y171               | - 13,2     |  |
| (+ 3) | <b>Y86</b><br>- 3,5   | 4,0 Å | 02…ND2 ( <b>N61</b> ) <i>(- 4,9)</i>                 | 3,2 Å | Y63, Y86, Y171                             | - 11,0     |  |

**Tableau 4 – Bilan des interactions entre le substrat xylohexaose modélisé et Tx–Xyl au niveau atomique et au niveau des sous-sites**. Pour chaque mode d'arrimage, les résidus de Tx–Xyl sont indiqués en gras et les valeurs des interactions énergétiques en italique (en kcal/mol).

La modélisation du substrat s'est poursuivie par l'ajout d'un résidu xylose en (-3) et un autre en (+3). Comme nous l'avons vu auparavant, le résidu en (-3) ne semblait pas pouvoir former d'interaction avec l'enzyme car il était partiellement en dehors de la crevasse. L'énergie d'interaction après une minimisation rapide (1000 itérations) était de -94 kcal/mol, mais après une minimisation plus longue (20000 itérations), elle est passée à -125 kcal/mol. Nous avons remarqué que le résidu Y86 était susceptible de créer une interaction de *stacking* avec le résidu xylose du sous-site (+ 3), mais les plans moyens des cycles n'étaient pas du tout parallèles. Nous avons décidé de modifier les angles dièdres des trois liaisons glycosidiques précédant ce résidu pour établir une coplanarité, tout en veillant à conserver des valeurs d'angles possibles. La valeur de l'interaction obtenue après minimisation est devenue égale à -133 kcal/mol. L'examen du complexe a indiqué que les valeurs des angles dièdres appartenaient bien aux solutions permises et que les interactions conservées chez les Xyl–11 au niveau des sous-sites (-2) et (-1) étaient bien présentes dans notre modèle (**Tableau 3**, **Figure 2**). Ensuite, une analyse plus fine du xylohexaose modélisé dans la crevasse de Tx–Xyl au niveau de chaque sous-site a été possible.

#### B.2.3 Mesure des interactions par sous-sites du modèle d'arrimage

Afin de définir toutes les interactions existant au niveau de chaque sous-site (liaisons hydrogène, interactions de *stacking* et de van der Waals), il a été nécessaire de fixer, autour de chaque résidu xylose, une distance limite au-delà de laquelle on ne comptabilisait plus les résidus d'acides aminés en interaction. Nous avons fixé cette distance à 4 Å entre les atomes lourds<sup>1</sup> (C, N, O ou S) de chaque résidu xylose et les résidus d'acides aminés de Tx–Xyl, car les liaisons hydrogène et les interactions de van der Waals deviennent négligeables au delà de cette distance, lorsque les atomes sont trop éloignés. Ensuite, nous avons recherché les différents modes d'arrimage qui existaient pour chaque sous-site, i.e. pour chaque résidu xylose (**Tableau 4**) :

 les *stackings* entre les résidus xyloses et les résidus aromatiques : nous avons calculé l'énergie d'interaction entre les résidus seuls (sans les hydroxyles pour les xyloses et sans le squelette principal pour les résidus d'acides aminés) ainsi que la distance entre les barycentres de ces cycles ;

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Dans ce chapitre, les atomes dits *lourds* seront toujours C, N, O et S.



**Figure 2 – Représentation de l'arrimage du substrat xylohexaose modélisé dans la crevasse catalytique de Tx–Xyl**. En rouge les résidus qui créent des interactions de *stacking*, en bleu ceux qui forment des liaisons hydrogène (d'après le **Tableau 4**). Le pouce est coloré en jaune.

- les liaisons hydrogène : lorsqu'il existait un alignement entre un atome polaire (N ou
   O), un atome d'hydrogène et un autre atome polaire, l'énergie de la liaison a été calculée et la distance entre les deux atomes polaires mesurée ;
- les interactions de van der Waals : comme elles ne sont pas localisées, nous avons considéré que tous les résidus dont au moins un atome lourd était à moins de 4 Å d'un des atomes lourds du résidu xylose considéré apportaient de l'énergie d'interaction par le biais des interactions de van der Waals. Par contre, le calcul de l'énergie apportée par ces interactions était impossible étant donnée sa délocalisation intrinsèque. Pour y avoir accès, nous avons calculé l'énergie totale du sous-site, puis les éventuelles interactions de *stacking* et les liaisons hydrogène présentes ont été retranchées pour fournir la valeur des interactions de van der Waals.

#### B.2.4 Analyse du modèle d'arrimage

L'analyse de ce modèle d'arrimage a tout d'abord montré que les sous-sites situés aux extrémités interagissent faiblement avec les résidus de la crevasse catalytique, en particulier le sous-site (-3). Son énergie totale est la plus faible, avec seulement -6,6 kcal/mol, et il ne comporte qu'une seule liaison hydrogène potentielle avec Trp<sup>7</sup>, un seul résidu contribue à donner de l'énergie de van der Waals. Étant donnée sa faible énergie, l'existence même de ce sous-site prête donc à discussion. À l'autre bout de l'oligosaccharide de DP 6, le sous-site (+3) possède une énergie tout de même 60% plus grande égale à -11,0 kcal/mol, et surtout il comporte un stacking au niveau du résidu Y86 et plusieurs résidus aromatiques pour les interactions de van der Waals. Ce résidu Y86 situé sur la corde du jelly-roll apparaît très conservé chez les Xyl-11, où il n'est remplacé qu'occasionnellement par un autre résidu aromatique, à savoir un Trp. L'existence d'une interaction de stacking a été suggérée chez Aspergillus niger, considérant que la mutation du résidu équivalent en Ala provoque une diminution de l'activité spécifique de 50% environ, due principalement à une baisse de la valeur de  $K_{\rm m}$  (Tahir *et al.*, 2002). Cette dernière information tendrait à montrer que Y86, de part son positionnement au bord de la crevasse, jouerait probablement un rôle de pré-fixation du substrat, mais il ne semblerait pas indispensable à la catalyse. D'ailleurs, la liaison hydrogène entre le résidu N61 et l'hydroxyle O2 du xylose renforce cette idée. Ce résidu N61 est parfaitement conservé chez les Xyl-11, et son positionnement juste après Y86 dans la crevasse indique que le rôle de ce sous-site serait probablement de positionner le substrat dans une conformation donnée, afin qu'il s'adapte aux besoins conformationnels de la catalyse.

Par contre, le *stacking* au niveau du sous-site (-2) est parfaitement conservé chez les Xyl-11, et a déjà été décrit plusieurs fois (Wakarchuk et al., 1994a ; voir Chapitre I, §C.4.6.2, p. 40). C'est d'ailleurs ce sous-site qui possède l'énergie la plus élevée. Chez Aspergillus niger, la mutation Y10A déclenche une perte quasi-totale de l'activité (division par plus de 150, Tahir et al., 2002). Il intervient donc à la fois sur l'arrimage et sur la catalyse, probablement de manière indirecte. En effet, le couplage de ce stacking avec la présence de deux liaisons hydrogène impliquant les hydroxyles O2 et O3 du résidu xylose via Y67 et Y163 permet certainement de bloquer le xylose dans une conformation donnée, avec ses hydroxyles orientés vers le fond de la crevasse. Ceci force le résidu suivant au niveau du sous-site (-1) à orienter ses hydroxyles vers le haut de la crevasse et la liaison C1–O–C4' à avoir son atome d'oxygène dirigé vers le haut. La complexité du film catalytique et les changements de conformation du résidu xylose en (-1), qui passe dans l'intermédiaire de transition à une conformation  ${}^{2,5}$ B au lieu d'une conformation  ${}^{4}C_{1}$  habituellement observée chez les glycosidehydrolases (Sabini et al., 1999), rendent difficiles les interprétations à partir de tels modèles. On peut simplement noter l'existence d'une liaison hydrogène très forte (-7,1 kcal/mol) entre le résidu R110 (NH1) très conservé chez les Xyl-11 et l'O2 du xylose du sous-site (-1), ainsi que la présence de très nombreux résidus générant des interactions de van der Waals.

Le profil du sous-site (+1) est relativement similaire, avec une énergie de valeur moyenne, beaucoup d'interactions délocalisées et une seule liaison hydrogène avec le résidu nucléophile. D'ailleurs, ce dernier est idéalement placé pour attaquer le C1 du résidu xylose en (-1) comme le requiert son rôle. Enfin, l'analyse du sous-site (+2), de plus faible énergie, montre l'existence d'une liaison hydrogène avec le résidu T89 qui ne doit pas être spécifique, car on retrouve à cette position des résidus divers comme Ser, Pro ou Gly.

#### B.3 Conclusion de l'étude de modélisation moléculaire

La modélisation d'un substrat dans la crevasse de Tx–Xyl a été réalisée à partir d'un monomère xylose présent dans le sous-site (-1) chez la xylanase de *B. circulans*. Les étapes successives d'allongement du substrat et de minimisation de l'énergie d'interaction ont abouti à un modèle de xylohexaose qui occupe toute la crevasse, du sous-site (-3) au sous-site (+3), même si la faible énergie du sous-site (-3) laisse penser que ce sous-site pourrait être un artefact, la crevasse de Tx–Xyl se limitant à 5 sous-sites dont l'existence serait certaine. Les quatre sous-sites (-1) à (+3) présentent des énergies d'affinité proches autour de 14 kcal/mol, alors que celle du sous-site (-2) est presque deux fois plus élevée. Le fait que

les sous-sites (-2) et (+3) situés aux extrémités de la crevasse offrent une interaction de *stacking* signifie sûrement qu'ils jouent un rôle dans l'orientation conformationnelle du substrat, en particulier le sous-site (-2), dont les résidus parfaitement conservés chez les Xyl–11 seraient indispensables à la fixation optimale du substrat. D'ailleurs, les interactions du côté NR sont plus fortes et mieux conservées que celles du côté R, probablement parce que l'orientation correcte du xylose en (-1), qui subit un changement conformationnel lors de la catalyse, est indispensable.

D'autre part, les orientations prises par les hydroxyles des xyloses de notre modèle semblent indiquer que des résidus arabinoses substitués au niveau des résidus en (-1) ou (+1) entreraient immédiatement en conflit stérique avec le squelette des résidus de la crevasse (c'est à ce niveau que la crevasse est la plus resserrée), ce qui expliquerait pourquoi Tx–Xyl, et les Xyl–11 en général, sont incapables d'accommoder une chaîne de xylane ramifiée et donc de l'hydrolyser. Il semble alors difficile d'imaginer qu'une xylanase de la famille 11 non modifiée puisse cliver une liaison où au moins un résidu xylose du sous-site (-1) ou (+1) est substitué par un arabinose.

Avant tout, ce modèle d'arrimage a mis en évidence les interactions enzyme/substrat au niveau de chaque sous-site, et même s'il ne tient pas compte de la mobilité de l'enzyme en général et de celui du pouce en particulier, il met bien évidence le contact étroit qui existe entre l'enzyme et le substrat au niveau du sous-site (-2), sous-site qui possède par ailleurs la plus forte énergie. Le pouce, qui fait partie de ce sous-site, pourrait donc jouer un rôle primordial dans la sélectivité du substrat, de part sa géométrie et son positionnement.

## C Rôle du pouce de Tx–Xyl sur l'activité xylanolytique

## C.1 Description structurale du pouce de Tx–Xyl

Chez Tx–Xyl, qui compte 182 résidus, environ 115 d'entre eux (soit 63% ; l'assignation des éléments de structure secondaire peut varier d'un ou deux résidus selon les logiciels utilisés) sont impliqués dans 13 brins  $\beta$  et une seule hélice  $\alpha$ , ce qui laisse seulement 67 résidus pour réaliser les 13 boucles qui connectent ces éléments (en omettant des boucles en N–ter et C–ter). La conséquence est donc l'existence de boucles courtes de 5 résidus à peu près en moyenne, ce qui est confirmé par la structure 3D : ces boucles possèdent donc généralement peu de variabilité d'une xylanase à une autre. Cependant, deux exceptions notables sont rencontrées au niveau de la crevasse catalytique : la boucle appelée corde, qui compte 7



Figure 3 – Représentation de la structure du pouce de Tx–Xyl. Pour chaque vue sont indiquées les structures du pouce, avec (au milieu) et sans les chaînes latérales (en haut à gauche), les liaisons hydrogène intra-boucles sont signalées par des tirets gris. A : position du pouce sur les brins B9 et B8 ; B : rotation de 90° selon l'axe z.

résidus, et surtout le pouce, qui est de loin la boucle la plus longue des Xyl–11, avec 11 résidus. Cette boucle débute à la fin du brin B8 avec le résidu Y111 pour terminer au résidu T121 au début du brin B7, sa séquence étant la suivante :

## 111-Y N A P S I D G T Q T-121

Non seulement sa structure de boucle partiellement repliée et vrillée sur elle-même est parfaitement conservée chez les Xyl–11 (voir Chapitre I, **Figure 11**), mais l'analyse de l'alignement de séquences des Xyl–11 a montré en plus que la moitié des résidus qui la composent est aussi conservée (résidus grisés ci-dessus). Le pouce possédant une topographie d'épingle à cheveux, des liaisons hydrogène intra-moléculaires existent entre les atomes N et O impliqués dans les liaisons peptidiques, on retrouve un schéma de liaisons comparable à celui des feuillets  $\beta$  anti-parallèles. Ainsi, la paire de résidus A113/Q120 crée deux contacts, comme la paire S115/G118 (**Figures 3** et **4**), qui servent à stabiliser la structure.

La description de la structure des Xyl–11 a montré que la crevasse catalytique est étroite, profonde, encaissée, à cause d'un côté du feuillet B composé de brins  $\beta$ , et de l'autre côté du pouce qui fait face aux brins B2, B3 et B4 (voir Chapitre I, **Figure 13**). En particulier, les résidus P114, S115 et I116 sont les plus exposés car ils tapissent la crevasse et participent aux sous-sites (– 2) et (– 1) (**Tableau 4**). La crevasse est la plus étroite au niveau des résidus P114 et W7, la distance les séparant atteignant seulement 6,7 Å (voir Chapitre I, **Tableau 3**). Dans un premier temps, nous avons étudié le rôle de ces résidus sur l'activité enzymatique, puis l'incidence de la suppression des résidus charnière qui connectent le pouce aux brins B9 et B8.

#### C.2 Mutagenèse des résidus du pouce tapissant la crevasse de Tx-Xyl

Puisque les résidus P114, S115 et I116 du pouce tapissent la crevasse, et que le pouce serait d'après certaines étude animé d'un mouvement d'ouverture/fermeture durant le cycle catalytique (Havukainen *et al.*, 1996 ; Muilu *et al.*, 1998), il est cohérent d'imaginer que ces trois résidus qui sont déjà en interaction avec le substrat soient spécifiques du substrat de part leur topographie originale conservée et leur hydrophobie. L'étude par résonance magnétique nucléaire de la Xyl–11 de *Bacillus circulans* a déjà mis en évidence l'existence d'une liaison hydrogène de type amide-aromatique entre I116 et W69, ce dernier étant situé sous le pouce, du même côté de la crevasse (Plesniak *et al.*, 1996). Des interactions avec d'autres résidus de



**Figure 4 – Représentation schématique de la structure du pouce de Tx–Xyl**. Les liaisons hydrogène internes sont indiquées par des pointillés.



**Figure 5 – Représentation des différentes conformations de meilleures énergies du pouce de Tx–Xyl**. En rouge : conformation cristallographique ; en vert : conformations modélisées et en bleu la conformation modélisée la plus proche de la conformation cristallographique.

l'enzyme n'ont jamais été investiguées, nous avons donc exploré par mutagenèse aléatoire le rôle des trois résidus PSI, en commençant par étudier l'amplitude du mouvement du pouce par modélisation moléculaire.

#### C.2.1 Étude du mouvement du pouce par modélisation moléculaire

La construction *de novo* du pouce par recuit simulé, en intégrant les réseaux de contraintes à l'intérieur de la boucle, a donné naissance à un ensemble de boucles dont les énergies étaient comparables, mais dont les conformations étaient assez variables. Une des boucles possédait une conformation quasi identique à la conformation cristallographique, ce qui a confirmé la fiabilité de la méthode employée (**Figure 5**). Lorsque les boucles ont été replacées dans leur contexte, i.e. rebranchées sur la structure en *jelly-roll* de Tx–Xyl, nous avons bien observé une flexibilité du pouce, dans des conformations extrêmes qui ont laissé pensé qu'il était animé d'un mouvement d'ouverture et de fermeture au-dessus de la crevasse. Dans la position maximale d'ouverture, les résidus de l'extrémité du pouce se sont retrouvés environ 10 Å plus haut qu'en position normale par rapport au fond de la crevasse, tandis qu'en position fermée le pouce venait obturer complètement la crevasse en se plaquant contre les brins B2 et B3.

Cette étude a donc mis en évidence que le pouce était susceptible d'adopter des conformations variables, dans des positions où la crevasse, soit était largement ouverte, soit devenait inaccessible. Toutes ces conformations ayant des énergies semblables, elles ont des probabilités d'existence identiques. Donc les trois résidus Pro<sup>114</sup>, Ser<sup>115</sup> et Ile<sup>116</sup> du pouce orientés vers la crevasse seraient animés d'un mouvement qui les ferait interagir avec le substrat et/ou le produit.

## C.2.2 Mutagenèse à saturation simultanée des résidus P114–S115–I116 du pouce

#### C.2.2.1 Contraintes expérimentales

Afin de réaliser la mutagenèse à saturation simultanément sur les trois résidus consécutifs Pro, Ser et Ile du pouce, les trois codons déterminant les résidus PSI ont été chacun remplacés par un codon NNN, de sorte qu'on obtienne les  $64^3 = 262144$  codons possibles dans la banque d'ADN, qui permettent la traduction de  $20^3 = 8000$  variants protéiques. Deux problèmes se sont alors posés : comment cribler un nombre aussi élevé de clones sur boîtes, et parmi les clones actifs sélectionnés, comment réaliser des tests d'activité plus qualitatifs de manière efficace et rapide sur des surnageants de culture ? La solution à la première question a été simplement de réaliser les transformations sur un grand nombre de boîtes de Pétri, dix pour une première série et seize par la suite. Le crible utilisé a été celui de l'activité xylanolytique, donc toutes les boîtes utilisées contenaient du xylane de bouleau en présence de rouge Congo.

Concernant le second problème, la difficulté n'était pas tant de réaliser plusieurs dizaines de cultures liquides en parallèle, mais plutôt de pouvoir récupérer le surnageant des cellules bactériennes où l'enzyme recombinante était exprimée. En effet, la méthode utilisée habituellement emploie un sonificateur pour briser les cellules, mais ce procédé appliqué à des dizaines de clones aurait pris un temps interminable... À la place, nous avons choisi d'utiliser des cycles de congélation/décongélation pour libérer le milieu intra-cellulaire. À cette fin, les culots bactérien ont d'abord été centrifugés et repris dans 10% du volume de culture comme d'habitude, puis ils ont été plongés dans de l'azote liquide à –196°C durant 1 min avant d'être réchauffés dans un bain-marie à 40°C pendant 1 min, ce cycle étant répété 5 fois. La lyse cellulaire a été vérifiée ensuite par microscopie optique. L'avantage de cette méthode est de permettre la récupération des milieux bactériens d'une dizaine de clones à la fois, mais comme la congélation devait être rapide afin de briser les parois bactériennes, seuls de petits volumes de l'ordre de quelques millilitres ont été utilisables, ce qui a néanmoins suffi pour des tests d'activité préliminaires.

#### C.2.2.2 Résultat du criblage d'activité sur boîte de Pétri

Dans un premier temps, le criblage sur boîte 24 h après l'étalement des bactéries transformées a permis de détecter les halos de lyse, signes d'une activité xylanolytique. En moyenne, nous avons observé entre 150 et 500 colonies par boîte, mais le nombre de halos était assez faible, soit par exemple 12 halos sur une boîte contenant 500 colonies et 4 sur une autre présentant 175 colonies. En moyenne, sur les 26 boîtes qui comptaient presque 8000 clones (7900 environ), à peu près 90 halos de lyse ont été observés, soit 1,1% du nombre total de colonies. Cela signifie que très peu de combinaisons d'acides aminés ont pu finalement remplacer la triade PSI originelle tout en conservant une activité xylanolytique similaire.

Une nouvelle difficulté ensuite a été la sélection des colonies pour leur repiquage en milieu liquide : les halos étant relativement petits à cause du nombre de colonies sur chaque boîte, aucune différence notable au niveau de leur taille n'a pu être observée. Par conséquent, 16 colonies au total appelées PSI–1 à PSI–16 ont été prélevées sur différentes boîtes de façon complètement aléatoire.

| Numéro du clone PSI | Activité (UI/mL) |
|---------------------|------------------|
| 1                   | 16,6             |
| 2                   | 6,9              |
| 3                   | 16,8             |
| 4                   | 15,5             |
| 5                   | 22,9             |
| 7                   | 6,2              |
| 8                   | 104,6            |
| 9                   | 19,3             |
| 10                  | 54,3             |
| 11                  | 33,9             |
| 12                  | 88,9             |
| 13                  | 57,8             |
| 14                  | 0                |
| 15                  | 141,5            |
| 16                  | 54,6             |

Tableau 5 – Activité des clones non purifiés issus de la mutagenèse à saturation de la triade PSI du pouce de Tx-Xyl. Les clones les plus actifs sont grisés.

*C.2.2.3 Résultat du criblage d'activité par mesure des sucres réducteurs libérés* Pour établir une comparaison efficace de l'activité des surnageants des culots bactériens lysés et non purifiés, les conditions de croissance puis de reprise des culots devaient être considérées comme identiques, et même dans cette situation, des paramètres biologiques comme la vitesse de croissance de chaque clone ou le taux d'expression des plasmides recombinants étaient difficilement paramétrables. Nous avons néanmoins supposé que, toute chose étant par ailleurs égale, les différences d'activités mesurées seraient dues en grande partie à des différences intrinsèques des enzymes, et non à leurs taux d'expression par le système bactérien.

Après une croissance de 16 h et la récupération des milieux intracellulaires bactériens par l'application des cycles de congélation/décongélation décrits ci-dessus, les surnageants ont été testés par dosage des sucres réducteurs selon la méthode usuelle, les valeurs obtenues sont rapportées dans le **Tableau 5**.

Hormis le cas de PSI–14 dont l'activité était nulle (probablement une erreur de prélèvement de la colonie sur boîte...), tous les clones étaient bien actifs, comme l'avait indiqué la présence d'un halo de lyse. Mais les valeurs des activités variaient très notablement de 6 UI/mL (PSI–7) à environ 140 UI/mL (PSI–15). Nous avons donc décidé de prélever les quatre clones les plus actifs, en supposant encore une fois que leurs différences d'activité étaient essentiellement dues à des différences intrinsèques de l'activité de l'enzyme et non à des variabilités d'expression ou de taux de récupération des protéines.

#### C.2.2.4 Caractérisation et purification des clones les plus actifs

Les clones les plus actifs sont précisés dans le **Tableau 5** : il s'agit des mutants numéro 15, 8, 12 et 13, par ordre décroissant d'activité. L'ADN plasmidique de ces mutants a tout d'abord été séquencé pour déterminer le génotype au niveau des codons 114, 115 et 116, puis ces quatre mutants ont aussi été exprimés en parallèle dans des cultures de 1 L en vue de leur purification pour une caractérisation enzymatique.

Pour les clones 15, 12 et 13, les résultats du séquençage n'ont pas indiqué de modification de la triade, même pas au niveau des codons : soit il s'agissait de type sauvage, soit la mutation à saturation a retrouvé le type sauvage. Le clone 8 par contre a subi la triple mutation suivante :

Pro<sup>114</sup> (CCG) → Pro<sup>114</sup> (CCT) Ser<sup>115</sup> (TCC) → Gly<sup>115</sup> (GGA)



Figure 6 – Gel SDS-PAGE des mutants PSI–8 et PSI–15 purifiés.

|  | Tx–Xyl        | PSI-8          |
|--|---------------|----------------|
| $k_{\rm cat}({ m s}^{-1})$   | 8385 ± 109    | $10344\pm454$  |
| $K_{m (app)} (g/L)$  | $1,79\pm0,20$ | 1,90 ± 0,21    |
| $k_{\text{cat}} / K_{\text{m (app)}} (\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ | $4684\pm630$  | $5444 \pm 841$ |
| AS 60°C (UI/mg)  | $1750 \pm 90$ | 2121 ± 72      |
| T <sub>opt</sub>   | ~75°C         | ~75°C          |
| <i>t</i> <sub>1/2, 60°C</sub>  | > 12 h        | > 12 h         |
| <i>t</i> <sub>1/2,70°C</sub>   | ~18 min       | ~20 min        |

Tableau 6 – Paramètres cinétiques et thermostabilité comparés de Tx–Xyl et du mutant PSI–8.

 $Ile^{116} (ATC) \rightarrow Cys^{116} (TGC)$ 

Le clone PSI-8 code donc pour une xylanase dont la triade PSI a été mutée en PGC. D'après ces résultats, nous avons décidé de ne purifier que ce clone, les autres étant des types sauvages n'apportant aucune information nouvelle.

La xylanase mutante PSI–8 une fois purifiée possède bien une taille apparente identique à la xylanase sauvage comme le montre la **Figure 6**, et ses paramètres cinétiques sont reportés dans le **Tableau 6**. Les valeurs de  $K_{m (app)}$  des deux enzymes sont très proches, alors que la valeur de la constante  $k_{cat}$  de PSI–8 est environ 20% plus élevée que celle de Tx–Xyl, ce qui est corroboré par une activité spécifique à 60°C plus élevée, à environ 2100 UI/mg contre 1750 UI/mg pour le type sauvage.

Concernant la thermoactivité et la thermostabilité de PSI–8, son optimum est apparu identique à celui de Tx–Xyl à 75°C, tandis que leurs temps de demi-vie sont égaux à 60°C et 70°C : la mutation introduite dans PSI–8 n'a donc pas modifié sa stabilité à la température.

#### C.2.2.5 Interprétation des résultats

La campagne de mutagenèse à saturation de la triade PSI du pouce de Tx–Xyl a mis en évidence que seulement 1% des colonies exprimaient une xylanase active. Comme nous avons retrouvé le génotype sauvage parmi les clones séquencés, il est probable que certains clones actifs constituent le bruit de fond de la mutagenèse. Par conséquent, le nombre de triades nouvelles permettant un maintien de l'activité est très faible. Cependant, une analyse précise des résultats de la mutagenèse est très difficile. D'abord, l'apparition du génotype sauvage peut être le résultat du bruit de fond (jusqu'à 20% d'après le fournisseur du kit de mutagenèse), ou bien d'une mutagenèse où aucun changement n'a été introduit. D'autre part, il existe toujours un biais dans une expérience de mutagenèse, ce qui a pour conséquence une représentation inégale des codons. Enfin, il aurait fallu obtenir une population de taille très significative (au moins deux fois 8000 clones, soit 16000 clones) et séquencer un plus grand nombre de clones actifs.

Par ailleurs, le crible sur boîte de Pétri ne s'est pas révélé comme le meilleur moyen de comparer les activités des clones, et même le criblage de l'activité des mutants à partir de la récupération du milieu cellulaire bactérien s'est avéré plus biaisé que prévu, les valeurs d'activités des surnageants des culots lysés étant dépendantes de plusieurs facteurs

| Type de  | Fréquence c | Moyonno                                  |      |      |      |
|----------|-------------|--|------|------|------|
| résidu – | don         | donnee par rapport a la proteine entiere |      |      |      |
|          | 1           | 1+1                                      | 1+2  | 1+3  |      |
| Ile      | 0,66        | 0,61                                     | 0,42 | 0,68 | 0,59 |
| Phe      | 0,98        | 0,66                                     | 0,96 | 0,95 | 0,89 |
| Val      | 0,72        | 0,70                                     | 0,54 | 0,84 | 0,70 |
| Leu      | 0,73        | 0,67                                     | 0,47 | 0,78 | 0,66 |
| Trp      | 0,62        | 0,65                                     | 0,76 | 0,79 | 0,70 |
| Met      | 0,70        | 0,48                                     | 0,41 | 0,68 | 0,57 |
| Ala      | 0,81        | 0,96                                     | 0,66 | 0,89 | 0,83 |
| Gly      | 1,09        | 1,04                                     | 2,14 | 1,64 | 1,48 |
| Cys      | 1,42        | 0,73                                     | 0,98 | 1,20 | 1,08 |
| Tyr      | 1,04        | 0,75                                     | 0,83 | 1,07 | 0,92 |
| Pro      | 1,48        | 2,45                                     | 0,63 | 0,96 | 1,38 |
| Thr      | 1,08        | 0,79                                     | 0,94 | 1,20 | 1,00 |
| Ser      | 1,29        | 1,23                                     | 1,06 | 1,03 | 1,15 |
| His      | 1,25        | 0,95                                     | 1,16 | 0,93 | 1,07 |
| Glu      | 0,87        | 1,35                                     | 0,92 | 0,89 | 1,01 |
| Asn      | 1,54        | 1,02                                     | 2,14 | 1,06 | 1,44 |
| Gln      | 0,89        | 0,94                                     | 0,93 | 1,01 | 0,94 |
| Asp      | 1,56        | 1,24                                     | 1,86 | 0,99 | 1,41 |
| Lys      | 0,8         | 1,22                                     | 0,94 | 1,10 | 1,01 |
| Arg      | 0,69        | 0,93                                     | 0,75 | 0,93 | 0,82 |

Tableau 7 – Fréquence de présence des résidus dans les tours  $\beta$  classés par ordre d'hydrophobie décroissante (tableau issu de Hutchinson & Thornton, 1994). Le surlignage gris indique les résidus de Tx-Xyl.

expérimentaux, et pas seulement de l'activité intrinsèque des enzymes comme nous le supposions. Par exemple, PSI–8 présentait une activité spécifique plus élevée que celle de PSI–15, lequel semblait pourtant plus actif lors du criblage des extraits bruts (**Tableau 5**).

Même si la pertinence de nos différents criblages se trouve être finalement quelque peu aléatoire d'un point de vue qualitatif, nous avons réussi à mettre en évidence une nouvelle xylanase dont la triade originelle du pouce PSI est remplacée par PGC, et qui présente un gain d'activité d'environ 20%. Ce gain reste modeste, mais notre expérience a montré que la triade PSI ultra-conservée chez les Xyl–11 n'était pas indispensable pour le maintien d'une activité xylanolytique.

L'extrémité du pouce des Xyl–11 possède une structure en tour  $\beta$ , ces tours  $\beta$  sont définis de manière générale par quatre résidus consécutifs numérotés i, i + 1, i + 2 et i + 3. Une étude portant sur 3899 tours  $\beta$  identifiés dans 205 chaînes de protéines a classé les fréquences de positionnement de chaque résidu d'acides aminés dans ces tours, et a pu mettre en évidence de fortes variations de distribution des résidus sur le tour, à la fois dépendantes du résidu considéré, et aussi de sa position, à cause de l'occupation volumique et de l'électrostatisme variables des résidus des tours  $\beta$  (Hutchinson & Thornton, 1994, **Tableau 7**). Ainsi, en position i par exemple, le résidu le plus fréquemment rencontré est Asp, alors que c'est Pro en i + 1 ou Gly et Asn en i + 2.

Dans le cas de Tx–Xyl, les résidus du tour  $\beta$  du pouce sont Ser<sup>115</sup> (i), Ile<sup>116</sup> (i + 1), Asp<sup>117</sup> (i + 2) et Gly<sup>118</sup> (i + 2), deux des trois résidus mutés aléatoirement y appartiennent (**Figure 4**). D'après un alignement de séquences portant sur 100 séquences des Xyl–11, la conservation de ces résidus est respectivement de 100%, 91%, 43% et 100%, seul Asp<sup>117</sup> est très variable donc non spécifique puisqu'on retrouve sept autres résidus de tous types à cette position (**Tableau 8**). Dans le mutant PSI–8 sont présents les résidus Gly<sup>115</sup> et Cys<sup>116</sup>, ils n'existent pas chez les Xyl–11 à ces positions (**Tableau 8**). Par contre, d'après les fréquences de rencontre des résidus dans les tours  $\beta$  du **Tableau 7**, un résidu Gly en position i et un résidu Cys en i + 1 possèdent une fréquence de rencontre cumulée de 1,82, presque égale à celle de Ser (i) et Ile (i + 1) (type sauvage) qui est de 1,90. Ces données statistiques montrent que, d'un point de vue structural, une paire de résidus Gly–Cys en positions i et i + 1 au niveau d'un tour  $\beta$  a autant de chance d'être rencontrée qu'une paire Ser–Ile. La découverte d'une

| Type de | Nombre de résidus identiques rencontrés (référence Tx-Xyl) |         |             |             |             |
|---------|--|---------|-------------|-------------|-------------|
| résidu  | 114  | 115 (i) | 116 (i + 1) | 117 (i + 2) | 118 (i + 3) |
| Pro     | 99   |         |             |             |             |
| Ser     |  | 100     |             |             |             |
| Ile     |  |         | 91          |             |             |
| Asp     |  |         |             | 43          |             |
| Gly     |  |         |             |             | 100         |
| Ala     | 1  |         |             |             |             |
| Val     |  |         | 7           | 2           |             |
| Leu     |  |         | 2           | 1           |             |
| Glu     |  |         |             | 26          |             |
| Ile     |  |         |             | 9           |             |
| Gln     |  |         |             | 7           |             |
| Lys     |  |         |             | 6           |             |
| Thr     |  |         |             | 6           |             |

Fréquence de Pro en position 114 : 99% Ser en position 115 : 100% Gly en position 115 : 0% Ile en position 116 : 91% Cys en position 116 : 0%

**Tableau 8 – Nombre et fréquences de présence des résidus aux positions 114 à 118 du pouce des Xyl–11 d'après un alignement de 100 séquences**. En gras la séquence de Tx–Xyl.

triade PGC au lieu de PSI au niveau du pouce ne constitue donc pas une aberration structurale.

Ensuite, il restait à comprendre comment cette double mutation avait permis une augmentation de la valeur de la constante catalytique  $k_{cat}$  de 20% sans que la valeur de la constante d'affinité  $K_{m (app)}$  ne soit modifiée. Afin de discerner le rôle de chaque mutation de Ser<sup>115</sup> et Ile<sup>116</sup>, nous avons construit les simples mutants Ser<sup>115</sup>  $\rightarrow$  Gly<sup>115</sup> d'une part, et Ile<sup>116</sup>  $\rightarrow$  Cys<sup>116</sup> d'autre part, pour découvrir si l'amélioration observée chez le clone PSI-8 provenait de l'un des résidus ou de l'autre uniquement, ou bien de leur présence simultanée.

#### C.2.3 Mutagenèse dirigée du résidu Ser<sup>115</sup>

Toujours à partir du clone Tx–Xyl–R2, la mutation  $\text{Ser}^{115} \rightarrow \text{Gly}^{115}$  a été réalisée, ce mutant appelé Tx–Xyl–PGI a été ensuite exprimé, purifié et caractérisé (**Tableau 9**). Son activité spécifique est du même ordre que celle de la xylanase sauvage, tandis que la valeur de sa constante catalytique  $k_{\text{cat}}$  est légèrement plus élevée, et la valeur de  $K_{\text{m}}$  légèrement plus faible. Quant à sa thermostabilité et son optimum de température, ces paramètres sont restés inchangés. Tx–Xyl–PGI, possède donc globalement les mêmes caractéristiques que Tx–Xyl.

#### C.2.4 Mutagenèse dirigée du résidu Ile<sup>116</sup>

La mutation Ile<sup>116</sup>  $\rightarrow$  Cys<sup>115</sup> effectuée sur le clone Tx–Xyl–R2 a créé le mutant Tx–Xyl–PSC dont les paramètres cinétiques ont été mesurés après son expression et sa purification (**Tableau 9**). Les valeurs de  $k_{cat}$  et de  $K_{m (app)}$  sont un peu plus élevées que celles de Tx–Xyl–PGI mais l'écart n'est pas réellement significatif, sa stabilité à la température à 60 et 70°C est identique également.

Finalement, aucun des deux résidus pris individuellement n'est directement responsable du gain d'activité observé chez PSI–8, ce serait plutôt leur présence simultanée qui en serait la cause. Afin de mieux cerner le rôle de Ile<sup>116</sup>, dont la mutation en Cys n'a pas semblé affecter l'activité enzymatique, nous avons décidé de le muter en un petit résidu, une Ala. Le mutant Tx–Xyl–PSA possède les caractéristiques regroupées dans le **Tableau 9**. Contrairement aux deux mutations précédentes, de nets changements sont observés : l'AS est divisée par quatre tandis que la valeur de  $k_{cat}$  est réduite par trois et celle de  $K_{m (app)}$  multipliée par deux. Ce mutant possède donc une efficacité catalytique six fois inférieure au type sauvage, uniquement à cause de la mutation Ile<sup>116</sup>  $\rightarrow$  Ala<sup>116</sup>, ce qui révèle l'importance du résidu Ile<sup>116</sup>

|  | Tx–Xyl            | Tx-Xyl-PGI      | Tx-Xyl-PSC    | Tx–Xyl–PSA    |
|--|-------------------|-----------------|---------------|---------------|
| $k_{\rm cat}$ (s <sup>-1</sup> )   | 8385 ± 109        | $8673\pm239$    | $8769\pm269$  | $2500 \pm 81$ |
| $K_{\rm m(app)}({\rm g/L})$  | $1,\!79\pm0,\!20$ | $1,67 \pm 0,05$ | $1,71\pm0,05$ | 3,45 ± 0,11   |
| $k_{\text{cat}} / K_{\text{m (app)}} (\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ | $4684 \pm 630$    | 5193 ± 299      | $5075\pm304$  | $724 \pm 47$  |
| AS 60°C (UI/mg)  | $1750\pm90$       | $1720 \pm 47$   | $1778 \pm 54$ | 439 ± 14      |
| T <sub>opt</sub>   | ~75°C             | ~75°C           | ~75°C         | ND            |
| <i>t</i> <sub>1/2, 60°C</sub>  | >12 h             | >12 h           | >12 h         | ND            |
| <i>t</i> <sub>1/2</sub> , 70°C   | ~18 min           | ~18 min         | ~18 min       | ND            |

Tableau 9 – Paramètres cinétiques et thermostabilité de Tx-Xyl-PGI, Tx-Xyl-PSC et Tx-Xyl-PSA.

#### C.2.5 Interprétation des résultats

L'ensemble de nos résultats tend bien à montrer que le pouce, et en particulier ses résidus exposés à la crevasse catalytique, influent considérablement sur la catalyse enzymatique. En effet, cet évènement étant réglé de manière très fine, des changements *a priori* minimes sur des résidus absolument conservés chez les Xyl–11 peuvent avoir des effets positif (double mutation Gly<sup>115</sup>– Cys<sup>116</sup>), négatif (mutation Ala<sup>116</sup>) ou nuls (mutations Gly<sup>115</sup> ou Cys<sup>116</sup>) sur l'activité enzymatique.

L'étude du mouvement du pouce par modélisation moléculaire a mis en évidence l'existence d'un mouvement probable de grande amplitude d'ouverture/fermeture du pouce au dessus de la crevasse, qui pourrait avoir lieu lors de la catalyse enzymatique comme le laisse penser les données cristallographiques de la xylanase de *Bacillus circulans* seule et complexée : c'est dans cette perspective que nous avons essayé d'apporter une interprétation de nos résultats.

Tout d'abord, essayons d'examiner l'effet des mutations sur la structure du pouce. La dernière liaison hydrogène à l'extrémité du pouce de la xylanase sauvage se situe entre Ser<sup>115</sup> (O) et Gly<sup>118</sup> (NH), la distance entre les deux atomes lourds étant de 3,4 Å. La suppression de la chaîne latérale de Ser<sup>115</sup> dans la mutation Ser<sup>115</sup>  $\rightarrow$  Gly<sup>115</sup> a très probablement permis la conservation de cette interaction, mais a autorisé aussi une plus grande flexibilité de l'extrémité du pouce. Seul, ce changement n'a pas modifié les propriétés catalytiques de l'enzyme.

De même, la mutation Ile<sup>116</sup>  $\rightarrow$  Cys<sup>116</sup>, qui a conduit à la substitution d'une longue chaîne latérale hydrophobe par une chaîne plus courte possédant un groupe hydrophile (- SH), n'a pas provoqué de perturbations majeures au niveau des paramètres catalytiques.

Par contre, c'est la combinaison de ces deux mutations qui a accru la valeur de  $k_{cat}$  de 20%, donc cette double mutation agit uniquement sur la catalyse et non sur l'arrimage du substrat. On peut postuler que la présence de Gly<sup>115</sup>, en laissant plus de flexibilité au bout du pouce, permet à Cys<sup>116</sup> d'interagir avec le résidu xylose du sous-site (-2) avec les hydroxyles O2 ou O3 lorsque le pouce a fixé un substrat, et donc qu'il est dans sa position la plus refermée.

Après la coupure de la liaison glycosidique entre les résidus des sous-sites (-1) et (+1), le cycle catalytique doit être achevé par le relargage des produits. Deux scénarios sont alors envisageables. Le premier propose que le redressement du pouce au-dessus de la crevasse



Figure 7 – Représentation du substrat xylohexaose modélisé dans la crevasse de Tx–Xyl (A) et dans celle de PSI–8 (B) au niveau du pouce. En haut, vue dans le prolongement de la crevasse, en bas vue du dessus.

induirait l'expulsion des produits. Dans le type sauvage, d'après notre modèle d'arrimage, le résidu xylose dans le sous-site (-2) est coincé entre les résidus  $Pro^{114}$  et  $Ile^{116}$  qui le maintiennent en place dans la crevasse. Grâce au mouvement concerté du pouce, ce résidu en (-2) pourrait être expulsé alors par une sorte d'effet catapulte après catalyse (**Figure 7A**). Notre hypothèse est que ce relargage du substrat pourrait être facilité si une liaison hydrogène existait entre Cys<sup>116</sup> et un hydroxyle du résidu xylose en (-2), la flexibilité indispensable du pouce apportée par la présence de Gly<sup>115</sup> permettrait alors à la triade PGC du pouce de maximiser les contacts électrostatiques et d'épouser parfaitement la forme du substrat puis du produit (**Figure 7B**). Dans le cas du mutant Ala<sup>116</sup>, la petite chaîne aliphatique de ce résidu ne favoriserait pas les contacts entre le substrat et le pouce, le relargage du produit ne serait donc pas facilité, ralentissant du même coup l'arrimage du substrat et le départ du produit.

Dans le second scénario, un mouvement horizontal du pouce ferait glisser l'enzyme le long de la chaîne de résidus xylose vers le côté réducteur. Ce mouvement provoquerait le relargage des produits du côté NR et permettrait une nouvelle attaque du substrat. Cette deuxième hypothèse suppose que l'enzyme agirait via un mécanisme d'attaque aléatoire suivie par une action processive. Ce scénario est appuyé par le fait que Tx–Xyl possède une valeur de  $k_{cat}$  élevée, et que son adsorption sur son substrat semble être irréversible (Rémond-Zilliox, 1996).

La conclusion de ces expériences est que, si on admet un mouvement concerté du pouce durant la catalyse enzymatique, alors le pouce faciliterait non seulement le positionnement du substrat dans la crevasse, mais aussi le relargage du produit de réaction, qui serait bien entendu plus rapide que la diffusion libre du substrat et des produits. Le pouce servirait alors à compenser la relative faiblesse de l'arrimage de Tx–Xyl (seulement deux interactions de *stacking* et six liaisons hydrogène d'après notre modèle) en optimisant la fixation du substrat et le départ des produits. Dans cette optique, son mouvement a donc été étudié en examinant le rôle de ses résidus qui joueraient le rôle de charnières.

## C.3 Rôle des résidus charnières du pouce

La description du pouce a montré qu'il s'agit d'une boucle de 11 résidus branchée sur deux brins  $\beta$ . En assimilant ces brins à des structures rigides et le pouce à une structure mobile, nous proposons que les résidus qui connectent le pouce soient assimilés aux charnières qui génèrent les mouvements du pouce : ces résidus charnières sont Y111 et T121 chez Tx–Xyl (**Figures 3** et **4**). Pour explorer cette hypothèse, nous avons créé trois mutations Y111 $\emptyset$ ,

|  | Tx–Xyl            | Tx–Xyl–Y111Ø      | Tx–Xyl–T121Ø | Tx–Xyl–Y111Ø<br>–T121Ø |
|--|-------------------|-------------------|--------------|------------------------|
| $k_{\rm cat}$ (s <sup>-1</sup> )   | 8385 ± 109        | $2216\pm47$       | 492 ± 19     | ND                     |
| $K_{\rm m(app)}~(g/L)$   | $1,\!79\pm0,\!20$ | $1,\!48\pm0,\!12$ | 4,55 ± 0,41  | ND                     |
| $k_{\text{cat}} / K_{\text{m (app)}} (\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ | $4684\pm630$      | $1497 \pm 153$    | $108 \pm 14$ | ND                     |
| AS 60°C (UI/mg)  | $1750 \pm 90$     | $492\pm20$        | 71 ± 5       | $7,5 \pm 0,6$          |

Tableau 10 – Paramètres cinétiques des mutants dont l'un ou les deux résidus charnières du pouce de Tx-Xyl ont été supprimés.

T121Ø et Y111Ø–T121Ø. En analysant les paramètres cinétiques obtenus lors de réactions d'hydrolyse réalisées par ces mutants, nous avons tenté de préciser le rôle de ces résidus dans le fonctionnement du pouce, pour l'arrimage du substrat et pour la catalyse proprement dite.

#### C.3.1 Suppression du résidu Tyr<sup>111</sup>

Les paramètres cinétiques du mutant Tx–Xyl–Y111Ø sont rassemblés dans le **Tableau 10**. Par rapport à l'enzyme sauvage Tx–Xyl, la valeur de  $K_{m (app)}$  est restée pratiquement inchangée, par contre la valeur de  $k_{cat}$  a été divisée par un facteur de trois environ, ce qui a généré une baisse de l'efficacité catalytique de 70% environ. De même, l'activité spécifique est passée de 1750 UI/mg à 492 UI/mg, soit une diminution par 3,5 de l'activité. Tx–Xyl–Y111Ø a donc la particularité de demeurer actif malgré la délétion d'un des deux résidus charnière du pouce, sa perte d'activité étant due non pas à une baisse de l'affinité pour le substrat, qui reste inchangée, mais à une diminution de la constante catalytique.

#### C.3.2 Suppression du résidu Thr<sup>121</sup>

Les caractéristiques du mutant Tx–Xyl–T121Ø sont très différentes du mutant précédent (**Tableau 10**). L'AS est égale à seulement 71 UI/mg, soit une diminution de 96% par rapport à celle de Tx–Xyl. Cette perte sévère d'activité est due à la fois à une augmentation de la valeur de  $K_{m (app)}$  (multiplication par presque 3) et une diminution de la valeur de  $k_{cat}$  (division par quasiment 17). Ces changements ont conduit à un effondrement de l'efficacité catalytique de 98%, analogue à la perte d'AS. Malgré la symétrie des mutations des résidus charnière, les conséquences sur l'évolution des activités et des paramètres cinétiques sont donc très dissemblables.

#### C.3.3 Suppression simultanée de Tyr<sup>111</sup> et Thr<sup>121</sup>

Enfin, le double mutant  $Tx-Xyl-Y111\varnothing-T121\varnothing$  dans lequel les deux résidus charnières du pouce ont été supprimés ne présente qu'une très faible activité, ce qui a exclu tout possibilité de déterminer ses paramètres cinétiques. Seule l'activité spécifique a pu être calculée, elle n'est que de 7,5 UI/mg (**Tableau 10**), ce qui représente une de perte d'activité de 99,6% par rapport à Tx-Xyl.

#### C.3.4 Interprétation des résultats

Le pouce est une structure très conservée aussi bien au niveau de sa séquence qu'au niveau de sa structure chez les Xyl–11. La seule variation observée est l'insertion d'un acide aspartique entre les résidus Gly<sup>118</sup> et Thr<sup>119</sup> chez quelques xylanases, comme celle de *Bacillus circulans* 



Figure 8 – Représentation des structures des mutants Tx–Xyl–Y111Ø (A, pouce rouge), Tx–Xyl–T121Ø (B, pouce bleu) et Tx–Xyl–Y111Ø–T121Ø (C, pouce rose). En haut, vue du dessus de la crevasse et en bas, vue dans le sens de la longueur. Le pouce de Tx–Xyl en vert sert de référence.

dont la structure est connue, mais aucune conséquence structurale particulière n'est observée. Ce résidu aurait néanmoins un rôle particulier, celui d'empêcher l'inhibition de la xylanase par XIP–I en créant des conflits stériques avec certains résidus de l'inhibiteur (Payan *et al.*, 2004).

Nos résultats ont montré que, si on assimile les résidus Y111 et T121 à des charnières sur lesquelles le pouce est branché, leur suppression n'a pas du tout le même effet. Pour comprendre cette différence, il est tout d'abord nécessaire d'examiner le positionnement du pouce par rapport à la crevasse d'un point de vue purement géométrique, en le considérant comme une structure rigide grâce à la présence de ses liaisons hydrogène internes. L'analyse de la topographie du pouce montre qu'il est connecté de manière très oblique au *jelly-roll* (**Figures 2** et **3**), donc en supprimant Y111, il semble possible que la seconde partie du pouce subisse un redressement par effet de compensation géométrique. Au contraire, la délétion de T121 le ferait plonger dans la crevasse en le déplaçant vers le côté NR, alors que l'effet de la double délétion serait un abaissement du pouce de plusieurs angströms dans la crevasse. La **Figure 8** décrit une telle analyse géométrique, en intégrant le substrat xylohexaose modélisé précédemment pour rechercher une éventuelle gêne stérique avec le substrat.

Puisque le pouce comporte un réseau de liaisons hydrogène internes, il est probable qu'elles participent à son repliement correct et qu'elles génèrent sa structure si particulière, donc à partir du moment où les résidus qui contribuent à ces liaisons ne sont pas modifiés, nous pouvons supposer que le pouce conservera *a priori* sa structure de boucle en épingle à cheveux. Dans le cas de la délétion de Y111, notre évaluation géométrique indique que le pouce conserverait une topographie proche du type sauvage, et qu'aucune gêne stérique évidente n'apparaîtrait (**Figure 8A**). En particulier, puisque l'arrimage ne semble pas modifier car la valeur de  $K_{m (app)}$  est inchangée, et que la perte de l'efficacité catalytique est due à une baisse de la valeur de  $k_{cat}$ , cette diminution serait probablement due au mouvement du pouce moins approprié pour l'accomplissement du cycle catalytique, en particulier le relargage du produit pourrait être ralenti.

Par contre, la délétion de T121 ferait basculer le pouce vers le côté NR de la crevasse. Puisque notre modèle indique la naissance d'un conflit avec les résidus situés à la fin du brin B5 (notamment Y67 et W69), il est probable que le repliement et/ou le positionnement de ce pouce raccourci soient différents (**Figure 8B**). Ainsi, à cause des interactions perturbatrices générées sur les résidus de la crevasse, ceux-ci adopteraient également de nouvelles

conformations, ce qui risquerait de bouleverser par un effet de cascade tous les sous-sites, le (-2) en particulier. Étant donnée l'importance des résidus de ce sous-site pour l'orientation et l'arrimage du substrat (**Tableau 4**), alors l'orientation non optimale de certaines chaînes latérales ajoutée à la présence d'un pouce de géométrie défectueuse (occasionnant peut-être à la fois une gêne stérique et un ralentissement de la catalyse) provoquerait une chute radicale de l'activité catalytique. Ce phénomène se traduit par une augmentation de la valeur de  $K_{m (app)}$  et une chute de la valeur de  $k_{cat}$ .

Quant à la double délétion des résidus charnières, elle génèrerait un pouce positionné encore plus profondément dans la crevasse, qui bien sûr perturberait tout le réseau d'interactions de la crevasse, il en résulte le même effet qu'avec la délétion de T121 mais amplifié (**Figure 8C**). Ce mutant présente d'ailleurs une activité plus de 99% inférieure à celle de l'enzyme sauvage.

#### C.4 Conclusion sur le rôle du pouce chez Tx–Xyl sur l'activité xylanolytique

Cette étude de mutagenèse dirigée sur le pouce de Tx–Xyl a donc permis de préciser la fonction du pouce sur différents points. Tout d'abord, son positionnement précis dans la crevasse conditionne fortement l'activité enzymatique, tout changement de son orientation de base étant préjudiciable. La conservation de sa structure semble donc indispensable au maintien de l'activité. D'autre part, ses trois résidus qui tapissent la crevasse entrent directement en interaction avec le substrat et influencent notablement le taux de catalyse, en favorisant probablement les vitesses de fixation du substrat et de relargage des produits. Nous avons également montré que d'autres résidus peuvent remplacer cette triade et conférer à l'enzyme une activité au moins aussi bonne. De part sa géométrie adaptée aux résidus xylose liés en  $\beta$ –(1,4), le pouce jouerait un rôle prépondérant dans la catalyse enzymatique. Il pourrait être l'élément responsable de la forte efficacité catalytique des Xyl–11 dans leur dispositif catalytique.

L'ensemble de ces travaux a donc précisé le rôle de certains résidus du pouce, mais certains aspects de son fonctionnement demeurent encore obscurs. En premier, le mouvement du pouce n'a jamais été correctement caractérisé, seules des images instantanées de son mouvement ont pu être mises en évidence. Les hypothèses formulées sur son rôle dans la fixation et la catalyse du substrat pourraient être confirmées par l'étude du mouvement du pouce par l'utilisation de la robotique moléculaire, et à termes, la résolution de structures 3D

de mutants confirmeraient (ou infirmeraient) le rôle des résidus analysés. Le paragraphe suivant va montrer combien le pouce est l'élément spécifique et distinctif de l'activité xylanolytique des Xyl–11 par rapport à d'autres enzymes de même architecture.

## D Analyse comparative de Tx–Xyl et des Cel–12

Après l'étude sur le rôle de certains résidus du pouce sur l'activité xylanolytique, il est apparu pertinent de poursuivre l'étude structure/fonction du pouce par la comparaison de Tx–Xyl avec des enzymes proches d'un point de vue structural mais de fonction différente : les Cel–12. Celles-ci partagent en effet avec les Xyl–11 une architecture commune en *jelly-roll*, mais les Cel–12 hydrolysent la cellulose, polymère de résidus glucose liés en  $\beta$ –(1,4). L'exploration des différences de spécificité de substrat des Xyl–11 et des Cel–12 a donc pu être conduite grâce à l'analyse des motifs structuraux conservés ou non, en particulier du pouce.

## D.1 Modélisation de l'arrimage d'un substrat cellooligosaccharidique dans la crevasse de Tx–Xyl

Pour comprendre comment un substrat cellulosique pourrait se fixer dans la crevasse de Tx–Xyl, nous avons décidé d'utiliser le modèle d'arrimage du xylo-oligosaccharide de DP 6 élaboré précédemment, dans lequel chaque résidu xylose a été remplacé par un résidu glucose. Le but de cette opération n'a pas été de réaliser un nouveau modèle d'arrimage avec un nouveau substrat (ce qui implique de nouveaux calculs etc.), mais plutôt d'étudier les éventuels contraintes stériques qu'imposerait un substrat cellulosique par rapport à un substrat xylosidique au niveau de chaque sous-site. Il faut donc considéré ce modèle comme n'apportant que des informations structurales.

Après une rapide minimisation, l'énergie d'interaction entre le cellohexaose modélisé et Tx–Xyl est devenue très élevée, à 400 kcal/mol, mais l'augmentation de l'énergie semblait due à des gênes stériques localisées seulement au niveau de deux sous-sites. En effet, aucune gêne ne paraissait exister avec les sous-sites (-3), (+1), (+2) et (+3). Par contre en (-2), le groupement CH<sub>2</sub>OH sur le C5 du résidu glucose entrerait en conflit avec les chaînes latérales des résidus S115 et I116 du pouce de l'enzyme mais aussi avec leurs squelettes, quelles que soient les conformations de ce groupement. Cette gêne n'aurait pu être levée que par la suppression de ces deux résidus au moins. Dans le sous-site (-1), le même groupement CH<sub>2</sub>OH du résidu glucose entrait en conflit avec la chaîne latérale du résidu Val<sup>35</sup>; en

| Codon en position 35 | Acide aminé<br>en position 35 | $k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> ) | $K_{\mathrm{m(app)}}\left(\mathrm{g/L}\right)$ | $\frac{k_{\text{cat}} / K_{\text{m (app)}}}{(\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})}$ | AS (UI/mg)     |
|----------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--|--|----------------|
| GTC (type sauvage)   | Val                           | 8385 ± 110                          | 1,60 ± 0,15                                    | 5240   | $1710 \pm 130$ |
| GTA                  | Val                           | $8580\pm610$                        | $1,\!70\pm0,\!12$                              | 5050   | $1800 \pm 80$  |
| GTT                  | Val                           | $8730\pm445$                        | 1,65 ± 0,08                                    | 5290   | $1750\pm100$   |
| ACT                  | Thr                           | $7245\pm305$                        | $2,00 \pm 0,08$                                | 3620   | $1435\pm60$    |
| ACA                  | Thr                           | $7475\pm300$                        | $2,20 \pm 0,10$                                | 3400   | $1396 \pm 70$  |
| AAC                  | Asn                           | $2200 \pm 121$                      | 2,90 ± 0,16                                    | 760  | $684 \pm 52$   |
| СТА                  | Leu                           | $660 \pm 23$                        | 4,80 ± 0,20                                    | 140  | 208 ± 13       |

Tableau 11 – Paramètres cinétiques des clones de Tx-Xyl obtenus par mutagenèse dégénérée du codon de l'acide aminé Val<sup>35</sup>.



Figure 9 – Occupation volumique comparée des chaînes latérales des résidus Val (vert), Thr (bleu), Asn (rouge) et Leu (jaune).

réalisant la mutation *in silico* V35A, la nouvelle énergie d'arrimage mesurée passait à - 97 kcal/mol seulement.

Le passage d'un substrat xylosidique à un substrat cellulosidique a donc laissé entrevoir que les gênes stériques dues à l'arrimage de ce dernier dans la crevasse de Tx–Xyl pourraient être surmontées par la suppression simultanée du résidu Val<sup>35</sup> voisin du résidu acide/base et des résidus Ser<sup>115</sup> et Ile<sup>116</sup> situés à l'extrémité du pouce. Ces trois résidus sont conservés parfaitement chez les Xyl–11 (la seule alternative à Val<sup>35</sup> est un résidu Leu) mais leurs rôles sur la spécificité de fonction des Xyl–11 n'ont encore jamais été investigués.

## D.2 Exploration du rôle du résidu Val<sup>35</sup> de Tx–Xyl

#### D.2.1 Mutagenèse à saturation de Val<sup>35</sup>

Le moyen que nous avons choisi pour explorer la fonctionnalité du résidu Val<sup>35</sup> a consisté en l'utilisation de la mutagenèse à saturation. D'un point de vue pratique, le codon GTC déterminant l'acide aminé Val<sup>35</sup> a été remplacé par un codon NNN. Les bactéries transformées ont ensuite été étalées sur un milieu contenant du xylane de bouleau de sorte que l'on puisse sélectionner les clones présentant encore une activité xylanolytique. Le nombre de codons possibles était de  $4^3 = 64$  mais comme certains sont dégénérés, le nombre de variants protéiques attendus était égal à 20.

Sur les boîtes de Pétri obtenues, 30 colonies environ présentaient un halo de lyse, sur un total de 200 colonies. Il a été impossible (pour des raisons de coût) de prélever toutes les colonies possédant un halo de lyse pour les remettre en cultures et les séquencer, nous avons décidé de n'en sélectionner que 10 que nous avons remises en culture liquide afin de pouvoir séquencer leur ADN plasmidique. Nous avons aussi prélevé trois colonies qui ne possédaient pas de halo de lyse, comme contrôle de la mutagenèse à saturation.

Les résultats du séquençage des 10 clones séquencés ont montré qu'on retrouvait uniquement quatre résidus possibles à la position 35, qui permettaient le maintien d'une activité xylanolytique : Val (4 fois), Thr (3 fois), Asn (2 fois) et Leu (1 fois) (**Tableau 11**). Sur les 3 clones sélectionnés sans halo de lyse, les résidus présents étaient Trp (2 fois) et Asp (1 fois). Ceci démontre que la mutagenèse à saturation a fonctionné et que tous les clones possibles ont été générés *a priori*. Surtout, la position 35 chez Tx–Xyl n'a semblé tolérer la présence que d'un petit acide aminé dont l'occupation est analogue à celle de Val. En effet, la **Figure 9**
indique que les chaînes latérales des résidus Thr, Asn et Leu possèdent des encombrements très proches de celle de Val, avec une courte chaîne aliphatique ou polaire.

Afin de comparer les activités des enzymes mutées, un clone séquencé actif correspondant à chaque acide aminé possible (Val, Thr, Asn et Leu) a été remis en culture, et la xylanase recombinante alors exprimée a été purifiée afin de déterminer ses paramètres catalytiques par la méthode de Kidby (**Tableau 11**). Il est apparu clairement que le résidu Val de l'enzyme sauvage confére la meilleure activité, celle du mutant Tx–Xyl–V35T est légèrement plus faible de 25%, alors que le mutant avec Asn<sup>35</sup> affiche une baisse d'activité de 60% et celui avec Leu<sup>35</sup> une réduction de près de 90%. Au niveau des constantes catalytiques, la diminution d'activité de Tx–Xyl–V35T est surtout due à une baisse de la valeur de  $k_{cat}$  plus importante, les valeurs de  $K_{m (app)}$  étant assez proches. Par contre, les mutants Tx–Xyl–V35N et Tx–Xyl–V35L ont tous les deux des valeurs de  $k_{cat}$  beaucoup plus faibles et des valeurs de  $K_{m (app)}$  plus élevées.

#### **D.2.2 Interprétation des résultats et conclusions**

Ces résultats ont dévoilé le rôle critique de Val<sup>35</sup> sur l'activité de Tx–Xyl. Une activité de l'ordre de 75% de celle du type sauvage est conservée uniquement s'il est remplacé par un résidu qui possède des atomes lourds aux mêmes positions. Le seul acide aminé à remplir ces conditions est Thr. D'autres résidus d'occupation volumique analogue sont également possibles (Asn et Leu), mais l'activité est diminuée considérablement. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que d'autres résidus de taille semblable comme Ile ou Ser puissent aussi permettre le maintien d'une activité xylanolytique, mais nous n'avons pas analysé suffisamment de clones pour détecter ces phénotypes.

Sur les alignements de séquences des Xyl-11, on retrouve uniquement les résidus Val ou Leu à la position 35. Nos résultats montrent donc que d'autres résidus peuvent occuper cette position, même s'ils engendrent une baisse de l'activité par rapport au type sauvage chez Tx-Xyl.

D'après notre modèle d'arrimage, ce résidu qui appartient au sous-site (-1) et au brin B3, est coincé entre quatre résidus des brins adjacents B2 et B4. Ces résidus participent directement à la fixation du substrat et/ou à l'architecture des sous-sites : le résidu catalytique acide/base Glu<sup>169</sup>, le résidu Trp<sup>7</sup> du sous-site (-2) qui forme une interaction de *stacking* très conservée chez les Xyl–11, Tyr<sup>67</sup> qui forme une liaison hydrogène au niveau du sous-site (-2), elle



Figure 10 – Positionnement du résidu Val<sup>35</sup> dans le sous-site (-1) de Tx–Xyl. La surface semi-transparente du résidu indique son occupation volumique et les distances avec ses plus proches voisins sont indiquées.

aussi spécifique des Xyl–11, et enfin  $Asn^{33}$  qui appartient aux sous-sites (– 1) et (+ 1) (**Figure 10**). De part son hydrophobie et sa position privilégiée, Val<sup>35</sup> permet très probablement un positionnement relatif optimal de ces résidus, son remplacement désorganise la topographie des sous-sites, ayant juste pour effet une baisse de l'activité enzymatique avec des résidus qui ont des occupations volumiques semblables (Thr, Asn, Leu), mais une suppression complète si le résidu substitué est trop volumineux (cas de Trp) ou susceptible de former des interactions électrostatiques perturbatrices (cas de Asp).

En plus de son rôle de structuration des sous-sites, ce résidu empêcherait probablement la fixation d'un substrat cellulosique par la mise en place d'une forte gêne stérique avec l'hydroxyle du C6 du résidu glucose en (– 1), et par l'absence de partenaires pour la formation d'une liaison hydrogène avec ce groupement (Sulzenbacher *et al.*, 1999). Dans notre modèle d'arrimage, nous avons ajouté au seul résidu xylose en (– 1) un groupe –CH<sub>2</sub>OH sur le C5 pour former un résidu glucose. Sans minimisation des contraintes stériques, l'énergie d'arrimage mesurée entre ce substrat et l'enzyme a été énorme (+ 400 kcal/mol), mais la mutation *in silico* en un petit acide aminé Val<sup>35</sup>  $\rightarrow$  Ala<sup>35</sup> a ramené cette valeur à seulement – 97 kcal/mol, soit du même ordre de grandeur que l'énergie mesurée pour la fixation du xylohexaose (– 133 kcal/mol). Au niveau de ce sous-site, l'empêchement de la fixation d'un résidu glucose est donc bien dû essentiellement à la chaîne latérale du résidu Val<sup>35</sup>, sa suppression rendrait *a priori* possible l'arrimage d'un résidu glucose, au moins au niveau de ce sous-site.

## D.3 Exploration du rôle du pouce de Tx–Xyl par la comparaison structurale avec les Cel–12

Comme l'a montré notre modèle d'arrimage de Tx–Xyl avec un xylohexaose, les principales gênes stériques à la fixation d'un substrat cellulosique sont la présence du résidu  $Val^{35}$ , et surtout la présence du pouce, dont les squelettes des résidus  $Ser^{115}$  et  $Ile^{116}$  préviendraient tout arrimage du résidu dans le sous-site (– 2). Notre stratégie a logiquement consisté à comparer les architectures de Tx–Xyl et d'une cellulase de la famille 12.

#### D.3.1 Comparaison structurale de Tx-Xyl et des Cel-12

Tx-Xyl et les Cel-12 possèdent un repliement en *jelly-roll*, donc grâce à cette similitude, la structure de la cellulase de *Streptomyces lividans* (Sl-Cel, prise comme élément représentatif de cette famille) a pu être superposée sur celle de Tx-Xyl (**Figure 11**, voir Chapitre I,



**Figure 11 – Comparaison des squelettes des boucles entre les brins B8 et B7 de Tx–Xyl** (vert) et Sl–Cel (pourpre). Les squelettes sont communs jusqu'à S108/G153 puis à nouveau à partir de Q123/D159. Les résidus de Tx–Xyl supprimés sont indiqués par un surlignement noir.

|     |                | 150     |        | 160                         |    |
|-----|----------------|---------|--------|-----------------------------|----|
|     |                |         |        |                             |    |
| s.  | lividans       | RTWEVWS | GGN    | GSND-VLSFVAI                | PS |
| Α.  | niger          | KSWEVWY | GSTTQA | GAE <mark>QRTYSFVS</mark> E | ES |
| Stı | reptomyces sp. | RSWEVWT | GSN    | GSND-VISFLAI                | PS |
| т.  | reesei         | QSWTLYY | GYN    | GAMQ-VYSFVAÇ                | QΤ |
| н.  | schweinitzii   | QTWTLYY | GYN    | GAMQ-VYSFVAÇ                | QS |
| R.  | marinus        | ATWEVWY | ADW    | -DWNYIAYRRTT                | ГР |

**Figure 12 – Alignement partiel de séquences des cellulase de la famille 12**. Les résidus de la boucle B8–B7 sont grisés.

**Figure 23**). Globalement, les structures sont très bien conservées, les brins  $\beta$  et l'hélice  $\alpha$  de chaque *jelly-roll* se superposent correctement. Le seul élément structural variable est justement la boucle en forme de pouce de Tx–Xyl qui est inexistante chez Sl–Cel, où elle est remplacée par une petite boucle de cinq résidus seulement.

Dans le sens des séquences de Tx–Xyl et Sl–Cel, les squelettes protéiques sont communs jusqu'aux résidus  $Ser^{108}$  et Gly<sup>153</sup> respectivement avant de diverger au niveau du pouce, puis redeviennent superposés à partir des résidus Gln<sup>123</sup> et Asp<sup>159</sup> resp. Les boucles entre ces deux zones communes ont donc des longueurs de 16 et 7 résidus respectivement, soit une différence de 9 résidus en faveur de Tx–Xyl. La **Figure 12** présente un alignement de séquences partiel de quelques séquences de cellulases de la famille 12. Il indique que la boucle équivalente au pouce de Tx–Xyl est peu variable en longueur chez les Cel–12 et surtout aucun résidu n'y apparaît parfaitement conservé. La longueur de la boucle semble être un élément plus essentiel que le type de résidus qu'elle comporte.

La différence structurale majeure de Tx–Xyl par rapport à Sl–Cel est donc la présence de ces 9 résidus supplémentaires. Le pouce est-il donc responsable de la différence de spécificité de substrat des Xyl–11 et des Cel–12 ? Pour tester cette hypothèse, nous avons alors décidé de supprimer 9 résidus du pouce de Tx–Xyl en deux étapes (une seule étape était techniquement plus complexe) : d'abord les cinq résidus Ala<sup>113</sup>–Pro<sup>114</sup>–Ser<sup>115</sup>–Ile<sup>116</sup>–Asp<sup>117</sup> puis les quatre résidus Trp<sup>109</sup>–Arg<sup>110</sup>–Tyr<sup>111</sup>–Asn<sup>112</sup>. Cette série de délétions a produit le mutant Tx–Xyl–PT (PT pour pouce tronqué) (**Figure 11**).

#### D.3.1.1 Caractérisation structurale de Tx-Xyl-PT

Une fois la mutagenèse effectuée, ce mutant a été exprimé et purifié. Le séquençage de son ADN plasmidique a confirmé la délétion des neufs résidus décrits ci-dessus. L'analyse SDS-PAGE a montré curieusement que Tx-Xyl-PT présentait une taille apparente inférieure à celle de Tx-Xyl (**Figure 13**). Il était difficile d'établir un rapport entre cet écart et la suppression des résidus du pouce, la différence de masse théorique entre les deux enzymes étant seulement de 1146 Da, soit environ 5% de la masse de l'enzyme sauvage. La seule explication possible était que, même après dénaturation de la protéine, la suppression du pouce a influé sur la migration de Tx-Xyl-PT dans le gel d'acrylamide.



Figure 13 – Gel SDS-PAGE de Tx-Xyl et du mutant Tx-Xyl-PT purifié.



Figure 14 – Spectres de dichroïsme circulaire de Tx-Xyl et Tx-Xyl-PT.

Lors des essais de mesures de l'activité xylanolytique de Tx–Xyl–PT, il a fallu attendre plusieurs heures avant de détecter une libération de sucres suffisante pour pouvoir estimer son activité, qui est égale à environ 1 UI/mg. Même si l'activité est demeurée très faible, elle est mesurable et supérieure au bruit de fond, et elle indique que l'enzyme possède néanmoins un repliement globalement conservé. Pour vérifier le repliement de ce mutant sans pouce par un moyen plus direct, nous avons décidé de comparer le spectre de dichroïsme circulaire de Tx–Xyl–PT à celui de Tx–Xyl (**Figure 14**). Les deux courbes possèdent globalement le même profil et montrent toute les deux un minimum à 218 nm qui correspond à la présence des nombreux brins  $\beta$ , les architectures en *jelly-roll* sont donc *a priori* bien conservées.

Durant ces mesures, nous avons observé que, malgré la normalisation des courbes par rapport à la concentration en protéines, un écart persistait entre les minima des deux courbes. Vraisemblablement, cette différence est due au mode de mesure de la concentration de nos mutants, par évaluation de l'absorbance à 280 nm : comme deux résidus aromatiques W109 et Y111 ont été supprimés chez Tx–Xyl–PT, cela pourrait provoquer une baisse de la valeur du coefficient d'extinction molaire, sans compter que la suppression partielle du pouce expose probablement au solvant des résidus aromatiques qui étaient auparavant cachés par le pouce dans la crevasse. En conservant le coefficient de l'enzyme sauvage, nous avons donc abouti à une sous-estimation de la concentration de Tx–Xyl–PT.

De manière générale, nos données indiquent que la suppression de neuf résidus du pouce de Tx-Xyl pour créer un « mini pouce » ne perturbe pas l'intégrité structurale de l'enzyme mais engendre une perte importante de l'activité xylanolytique. Par contre, aucune activité cellulolytique n'a été observée pour Tx-Xyl-PT sur le substrat CMC, même après plusieurs heures d'incubation de la réaction. Donc même avec une architecture très voisine de celle des cellulases de la famille 12, Tx-Xyl-PT est restée incapable d'hydrolyser la cellulose.

#### D.3.1.2 Étude de la fixation d'oligosaccharides sur Tx-Xyl-PT

La faible activité de Tx–Xyl–PT sur le xylane de bouleau a exclu toute possibilité d'analyse des paramètres cinétiques pour cette réaction. Par conséquent, il a été impossible de déterminer si la suppression du pouce a plus affecté un paramètre catalytique qu'un autre, ou encore les deux simultanément.

Afin d'aborder l'analyse de Tx-Xyl-PT différemment, nous avons décidé d'étudier la fixation d'oligosaccharides sur Tx-Xyl-PT par spectroscopie de fluorescence. Pour cela, il



Figues 15 – Spectres de fluorescence de la titration de Tx–Xyl par du X<sub>5</sub> à 5°C. Les concentrations de X<sub>5</sub> (courbes de haut en bas) sont de 0, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 400 et 800  $\mu$ M.



Figure 16 – Spectres de fluorescence de la titration de Tx–Xyl–PT par du X<sub>5</sub> à 5°C. Les concentrations de X<sub>5</sub> (courbes de haut en bas) sont de 0, 10, 15, 20, 25, 50, 100 et 200  $\mu$ M.

était nécessaire d'observer une variation de la fluorescence des résidus aromatiques lorsque l'enzyme est seule, et lorsqu'elle est complexée avec un oligosaccharide. Nous avons vu que la crevasse catalytique de Tx–Xyl contient de très nombreux résidus aromatiques (3 résidus Trp et 7 résidus Tyr). En particulier, le résidu Trp<sup>7</sup> parfaitement conservé chez les Xyl–11 crée une interaction de *stacking* avec le substrat dans le sous-site (– 2) comme l'ont montré des études de mutagenèse, des données cristallographiques et notre modèle d'arrimage. Par ailleurs, le résidu Tyr<sup>86</sup> forme probablement un autre *stacking* en (+ 3), et d'autres résidus aromatiques, même sans forcément interagir directement avec le substrat, sont partiellement occultés lors de sa fixation. L'analyse de la fluorescence des résidus de la crevasse catalytique comme sonde de fixation de ligands semblait donc un moyen efficace de mesurer l'affinité relative de différentes enzymes pour divers oligosaccharides.

La titration par fluorescence a été effectuée en parallèle sur l'enzyme native et sur Tx–Xyl–PT à 0,1  $\mu$ M chacune, en commençant avec des xylo-oligosaccharides de DP 5 (xylopentaoses). La température de mesure a été réglée à 5°C pour minimiser l'hydrolyse du substrat par l'enzyme sauvage. À chaque fois qu'une quantité donnée de X<sub>5</sub> a été ajoutée, le spectre de fluorescence a été mesuré de 300 à 450 nm, jusqu'à ce que la variation de la fluorescence devienne négligeable (**Figures 15** et **16**). Pour les deux enzymes, une nette variation de la fluorescence a été observée lors de l'ajout de X<sub>5</sub>. Ce *quenching* de l'intensité a démontré qu'elles sont capables de fixer ce substrat l'une comme l'autre. Le fait qu'un résidu aromatique (ou plusieurs) interagisse avec le xylo-oligosaccharide a été confirmé par un léger décalage spectral (de 3,3 nm pour Tx–Xyl et 1,3 nm pour Tx–Xyl–PT) vers les faibles longueurs d'onde du bleu (**Tableau 12**).

Ces mesures de fluorescence ont aussi permis de calculer la constante d'association et l'enthalpie libre de la fixation du substrat. L'arrimage du xylopentaose semble être favorisé chez Tx–Xyl–PT, puisque ce mutant affiche une constante d'affinité de  $59,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  contre  $2,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  pour l'enzyme sauvage, ce qui se traduit par une enthalpie libre de réaction 40% plus élevée pour le mutant au pouce tronqué par rapport à Tx–Xyl (**Tableau 12**).

Une expérience similaire de titration par fluorescence a été effectuée avec un substrat plus petit, le xylotétraose. Pour les deux enzymes, les constantes d'affinité ont subi de fortes diminutions, celle de Tx–Xyl est divisée par deux, alors que celle de Tx–Xyl–PT est divisée

|                |  | Tx–Xyl                 |  |                                       | Tx-Xyl-PT              |  |
|----------------|--|------------------------|--|---------------------------------------|------------------------|--|
|                | $K_{\rm a} (10^3 \times { m M}^{-1})$        | Décalage spectral (nm) | $\Delta G^{\circ} (\mathrm{kJ} \cdot \mathrm{mol}^{-1})$ | $K_{\rm a} (10^3 \times { m M}^{-1})$ | Décalage spectral (nm) | $\Delta G^{\circ} (\mathrm{kJ} \cdot \mathrm{mol}^{-1})$ |
| $X_4$          | 1,11   | - 2,4                  | 16,2   | 8,26                                  | - 1,0                  | 20,8   |
| $X_5$          | 2,62   | - 3,3                  | 18,2   | 58,82                                 | - 1,3                  | 25,4   |
| C <sub>4</sub> | aucune variation de la fluorescence détectée |                        |  | 74,07                                 | - 0,6                  | 25,9   |

Tableau 12 – Constantes d'affinité, décalages spectraux et enthalpies libres de réaction mesurées par spectroscopie de fluorescence lors de la fixation d'oligosaccharides sur Tx-Xyl et Tx-Xyl-PT.

par plus de sept. De même, les décalages spectraux vers les faibles longueurs d'onde ont été moins importants, tout comme les enthalpies libres des réactions (**Tableau 12**).

Ensuite, afin de tester l'affinité de Tx–Xyl–PT pour la cellulose, nous avons mesuré son affinité pour du cellotétraose. Lors de la titration de la xylanase sauvage, aucune variation de la fluorescence n'a pu être détectée. Cette enzyme semble donc incapable de fixer un cellooligosaccharide de DP 4. Par contre, cette même expérience sur Tx–Xyl–PT a montré une variation très importante de l'intensité de fluorescence, même en présence d'une concentration faible de 10  $\mu$ M du ligand (**Figure 17**). Déjà à partir de 50  $\mu$ M, la variation de fluorescence devient presque nulle, ce qui signifie que toutes les molécules d'enzymes sont alors saturées (**Figure 18**). La constante d'affinité calculée est d'ailleurs très élevée (75 × 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>), du même ordre de grandeur que celle mesurée pour le X<sub>5</sub>, et l'énergie de la réaction de fixation de C<sub>4</sub> atteint presque 26 kJ/mol (**Tableau 12**).

#### **D.3.2 Interprétation des résultats**

La suppression de neuf résidus du pouce de Tx–Xyl a permis la création d'une enzyme dont la boucle B8–B7 est analogue en termes de longueur à celle des cellulases de la famille 12. Cette transformation s'est accompagnée de plusieurs évolutions notables :

- d'un point de vue structural, Tx-Xyl-PT n'a pas subi pas de changements majeurs par rapport à l'enzyme sauvage, le repliement en *jelly-roll* est conservé ;
- Tx-Xyl-PT a conservé une très faible activité xylanolytique, mais n'a pas acquis d'activité cellulolytique;
- Tx-Xyl-PT a été capable de fixer les xylo-oligosaccharides X<sub>4</sub> et X<sub>5</sub> avec des constantes d'affinité plus élevées que la xylanase sauvage. Surtout, ce mutant s'est révélé capable de fixer le cellotétraose avec une très bonne affinité, alors que Tx-Xyl en est totalement incapable.

Ces résultats s'accompagnent aussi de nouvelles informations sur le mode de fixation du substrat dans la crevasse de Tx-Xyl. Lors de la titration par du  $X_4$  ou du  $X_5$ , nous avons observé chez les deux enzymes un *blue-shift* concomitant avec la baisse de la fluorescence. Ce décalage spectral peut être interprété comme une augmentation de l'hydrophobie locale des résidus aromatiques (Trp en particulier), i.e. que ces résidus deviennent moins exposés au solvant, à cause de l'expulsion des molécules d'eau lors de la fixation du substrat.



Figure 17 – Spectres de fluorescence de la titration de Tx–Xyl–PT par du C<sub>4</sub> à 5°C. Les concentrations de C4 (courbes de haut en bas) sont 0, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150 et  $200 \mu$ M.



Figure 18 – Variation de la fluorescence lors de la titration de Tx-Xyl-PT par du C<sub>4</sub>.

L'observation minutieuse de la crevasse de Tx–Xyl révèle que seulement trois résidus aromatiques ont leurs cycles exposés au solvant : W7, Y86 et Y171, les autres sont plus enfouis dans la protéine et affleurent seulement au niveau de la crevasse, notamment au niveau de leurs hydroxyles pour les Tyr (on ne tient pas compte des éventuels résidus qui deviendraient plus exposés au solvant quand le pouce est supprimé chez Tx–Xyl–PT).

Or, d'un point de vue biochimique, nous savons que la dégradation de X<sub>4</sub> par Tx-Xyl produit majoritairement du xylobiose : il est donc probable que ce substrat se fixe dans les sous-sites (-2) à (+2), et le *blue-shift* observé alors serait dû principalement au résidu Trp<sup>7</sup> du sous-site (-2). Le X<sub>5</sub> est dégradé en xylobiose et xylotriose, deux modes d'arrimages sont donc a priori possibles dans la crevasse : de (-3) à (+2) ou de (-2) à (+3). Sur la base de notre modèle d'arrimage, le sous-site (-3) est soit inexistant, soit d'énergie très faible, à cause du manque d'interaction enzyme/substrat à ce niveau. Par contre, le sous-site (+3) serait candidat pour offrir une interaction de *stacking* par l'intermédiaire du résidu Tyr<sup>86</sup>. Or, que ce soit pour Tx-Xyl ou Tx-Xyl-PT, la fixation de X<sub>5</sub> s'est révélée plus forte que celle de X<sub>4</sub>, et surtout l'intensité du blue-shift a été accrue pour les deux enzymes, mais la contribution du résidu xylose supplémentaire en interaction avec l'enzyme était moins importante. En effet, pour Tx-Xyl par exemple, la fixation avec du X<sub>4</sub> provoque un décalage de 2,4 nm, et de 3,3 nm avec X<sub>5</sub>. Par conséquent, la fixation de X<sub>4</sub> contribue pour un décalage de 2,4 nm et celle de xylose supplémentaire dans X<sub>5</sub> pour 0,9 nm de plus. Ceci démontre qu'un deuxième résidu aromatique interagit très certainement avec  $X_5$ , donc soit en (-3), soit en (+3). Nous proposons que, de part son positionnement, ce résidu soit Tyr<sup>86</sup>, donc le mode de fixation de  $X_5$  dans Tx-Xyl ferait intervenir les sous-sites (- 2) à (+ 3).

D'ailleurs, les valeurs obtenues pour les constantes d'affinité pour  $X_4$  et  $X_5$  concordent avec les valeurs mesurées sur la Xyl–11 de *Chainia* sp., qui sont de  $3,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  et  $3,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  à  $25^{\circ}$ C (valeurs obtenues par spectrométrie de fluorescence) et de  $1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  et  $1,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (valeurs obtenues par calorimétrie isothermale) (Hegde *et al.*, 1998). Les enthalpies libres de réaction calculées sont aussi du même ordre de grandeur. De plus, même si Tx–Xyl et Tx–Xyl–PT présentent des affinités comparables pour le  $X_4$  et le  $X_5$  au niveau qualitatif, Tx–Xyl–PT possède des constantes d'affinité bien plus fortes. On peut expliquer cette différence par le fait que, même si nous ne disposons pas de la structure 3D de ce mutant, la suppression de neuf résidus du pouce a engendré un réarrangement de la crevasse qui s'en trouve élargie, et qui expose alors au solvant des résidus qui étaient cachés sous le pouce chez Tx–Xyl. En particulier, le résidu Phe<sup>122</sup> qui se trouve dans le brin B8 ou bien  $Trp^{69}$  qui est voisin de Tyr<sup>67</sup> du sous-site (– 2). Le mode de fixation du C<sub>4</sub> n'est peut-être pas non plus identique à celui du X<sub>4</sub> dans la crevasse, ce qui entraînerait des changements de fluorescence. Mais sans structure cristallographique de ce mutant, ce phénomène reste encore difficile à interpréter.

Le résultat le plus intéressant de ce travail est sans doute la démonstration que la suppression du pouce chez Tx–Xyl, et par extrapolation chez les Xyl–11, n'affecte pas l'affinité de l'enzyme pour son substrat/ligand. Par contre, cette modification majeure qui conduit à la création d'une boucle analogue à celle des Cel–12, semble engendrer une perte de la capacité catalytique de l'enzyme. De plus, la suppression du pouce diminue la sélectivité de Tx–Xyl–PT à l'égard des ligands. Par conséquent, nos résultats indiquent que le pouce est bien le déterminant majeur de l'étroite sélectivité de substrat des Xyl–11. Nous avons alors envisagé de créer une activité cellulolytique chez Tx–Xyl pour essayer de valider cette hypothèse.

#### D.4 Tentative de création d'une activité cellulolytique chez Tx-Xyl

## D.4.1 Combinaison des mutations structurales pour la création d'une activité cellulolytique chez Tx-Xyl-PT

Connaissant à présent les propriétés de fixation de Tx–Xyl–PT sur des substrats cellulosiques, nous avons essayé de déterminer quels autres changements pourraient permettre la création d'une activité cellulolytique chez Tx–Xyl–PT, en termes de fixation du substrat et de catalyse. Nous avons déjà décrit comment la chaîne latérale du résidu Val<sup>35</sup> entrerait en conflit stérique avec l'hydroxyle du C6 du résidu glucose qui se fixerait dans le sous-site (– 1) de notre modèle d'arrimage. Mais même sans cette mutation, le substrat C<sub>4</sub> semble pouvoir s'accommoder dans la crevasse. La réalisation de la mutation V35A sur le mutant Tx–Xyl–PT a donc été entreprise pour vérifier si la fixation pouvait être améliorée.

Le séquençage du gène a bien indiqué la présence des modifications désirées, mais la purification de la protéine qui a suivi son expression a posé problème. En effet, la première étape de la purification sur une résine échangeuse d'ions s'est déroulée sans encombre, l'éluat récupéré comportant bien la xylanase mutante. Mais lors du passage de cet éluat sur la colonne de phényl-sépharose, Tx-Xyl-PT-V35A a semblé incapable de pouvoir se fixer sur

la résine, car elle était éluée directement par le tampon de lavage au lieu d'être décrochée par le tampon d'éthylène glycol. Malgré plusieurs tentatives pour résoudre ce problème (concentration/dilution des échantillons, essai de purification par dénaturation thermique, essai d'un nouveau gradient d'élution), cette protéine n'a jamais pu être purifiée, nos expériences ayant indiqué que ce mutant était probablement moins hydrophobe que l'enzyme sauvage, d'où les échecs successifs de sa purification avec la méthode habituelle.

Des tests d'activité ont tout de même été réalisés, à la fois sur des boîtes de Pétri et avec des enzymes partiellement purifiées, mais là encore, aucune activité cellulolytique n'a pu être détectée, et toute activité xylanolytique a été perdue, cette enzyme s'est révélée finalement complètement inactive.

En considérant que l'environnement structurale de Tx-Xyl-PT-V35A était relativement proche de celui des chez et les Cel-12 pour limiter les contraintes stériques évidentes avec un substrat cellulosique, nous nous sommes intéressés aux différences des environnements électrostatiques, dont nous ne nous étions pas préoccupé jusqu'à présent.

## D.4.2 Comparaison des environnements électrostatiques de Tx-Xyl et des Cel-12

Si nos travaux ont permis de favoriser la fixation d'un substrat cellulolytique chez Tx–Xyl grâce à des changements purement structuraux, le transfert de l'environnement catalytique des Cel–12 vers Tx–Xyl est plus problématique. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les similitudes et les points communs au niveau de la topographie et de l'électrostatisme des crevasses des Xyl–11 (Tx–Xyl) et des Cel–12 (Sl–Cel), en particulier au niveau des dyades catalytiques, puis nous avons cherché le moyen de transposer les particularités des Cel–12 vers Tx–Xyl.

#### D.4.2.1 Topographie et hydrophobie des crevasses

Nous avons vu dans l'introduction bibliographique (voir Chapitre I, §F.2, p. 67) que les Cel–12 sont des enzymes versatiles, capables d'hydrolyser aussi bien la cellulose que des xylanes (mais avec une efficacité nettement moindre que les Xyl–11). Ce caractère transparaît dans la crevasse catalytique de Sl–Cel, qui est plus large, ouverte, moins profonde, et finalement plus accessible que celle de Tx–Xyl.



**Figure 19 – Représentation de l'hydrophobie de surface de Sl–Cel**. La crevasse est alignée dans le même axe que celle de Tx–Xyl.

| Résidus<br>aromatiques |           | F8, W24, Y57, F61, Y66, W106, W124                                    |
|------------------------|-----------|---|
|                        | Neutres   | T10, Q20, N22, N51, H65, N68, Q99, Q132, N155, S102, Q132, S157, Q199 |
| Résidus polaires       | Chargés + | _   |
|                        | Chargés – | D104, E120, E203  |
| Résidus<br>hydrophobes |           | G52, A53, I134, P133  |



Les profils d'hydrophobie de ces deux enzymes présentent des différences notables. La crevasse de Tx–Xyl présente une majorité de résidus aromatiques (48%), quelques résidus hydrophobes et polaires (19% chacun), et seulement trois résidus chargés (14%) (voir Chapitre I, **Figure 14**). La crevasse de Sl–Cel, au contraire, est tapissée de 59% de résidus polaires (dont 11% de résidus chargés), contre 26% de résidus aromatiques seulement, et 15% de résidus hydrophobes (**Figure 19, Tableau 13**). Ce fort contraste a révélé en fait que la crevasse de Sl–Cel est mieux adaptée que celle de Tx–Xyl pour accueillir des substrats hydrophiles constitués de résidus glucoses. Il a donc été nécessaire d'étudier plus en détails les résidus de la crevasse de Tx–Xyl

#### D.4.2.2 Conservation des résidus de Tx-Xyl interagissant avec le substrat chez Sl-Cel

À partir de notre modèle d'arrimage entre Tx–Xyl et un xylohexaose, nous avons recherché les résidus de Tx–Xyl qui participaient à la fixation du substrat et qui étaient conservés chez Sl–Cel. Parmi les deux résidus aromatiques qui créent des interactions de *stacking* chez Tx–Xyl, seul Trp<sup>7</sup> possède un équivalent (Trp<sup>24</sup>), alors que Tyr<sup>86</sup> n'est pas conservé. Au niveau des autres résidus aucune conservation des types de résidus n'est constatée, Asn<sup>61</sup> est remplacé par Ile<sup>131</sup>, Thr<sup>89</sup> par Trp<sup>151</sup> et Tyr<sup>163</sup> par His<sup>62</sup>. D'ailleurs ces résidus ne peuvent pas interagir avec le substrat à cause de leur manque de polarité et de leur orientation.

Même si la crevasse de SI–Cel contient de nombreux résidus polaires, très peu sont susceptibles d'interagir avec le substrat, car la grande majorité d'entre eux possèdent des chaînes latérales mal orientées qui ne pointent pas vers l'intérieur de la crevasse. Les seules interactions conservées sont le *stacking* avec Trp<sup>7</sup>, comme l'indique des études de complexes de SI–Cel (Sulzenbacher *et al.*, 1999), et celles de la dyade catalytique.

#### D.4.2.3 Comparaison des dyades catalytiques

Les résidus nucléophile et acide/base de Tx–Xyl sont  $\text{Glu}^{76}$  et  $\text{Glu}^{169}$ , leurs équivalents à la fois fonctionnels et structuraux chez Sl–Cel sont  $\text{Glu}^{120}$  et  $\text{Glu}^{203}$ . Les résidus nucléophiles de ces deux enzymes ont des orientations identiques vers le centre de la crevasse, ce sont des résidus parfaitement homologues. Par contre, les chaînes latérales de  $\text{Glu}^{169}$  et  $\text{Glu}^{203}$ , bien qu'appartenant aux mêmes brins  $\beta$ , ne possèdent pas les mêmes orientations, en particulier les plans des groupes acides carboxyliques sont tournés de  $180^{\circ}$  l'un par rapport à l'autre. Les environnements de chaque résidu sont en effet différents :  $\text{Glu}^{169}$  est coincé entre les résidus



**Figure 20 – Représentation des sites actifs de Tx–Xyl (en haut) et Sl–Cel (en bas)**. Les dyades sont orientées sur la base de la superposition des structures.

hydrophobes Val<sup>35</sup> et Tyr<sup>63</sup>, et surtout Tyr<sup>78</sup> le maintient dans une conformation bien définie grâce à la liaison hydrogène qu'il forme avec le groupement carboxyle (**Figure 20**). Au contraire, Glu<sup>203</sup> est beaucoup moins contraint, du fait de l'absence de résidus adjacents encombrants, et adopte donc une conformation plus libre, qui s'avère différente. La distance entre les atomes de carbone des groupements carboxyliques des deux résidus catalytiques s'en ressent : elle est de 7,6 Å pour la cellulase, et de 6,9 Å pour la xylanase, à cause probablement de la liaison hydrogène avec Tyr<sup>78</sup> qui rapproche les résidus. Ce résidu d'ailleurs n'intervient pas dans la fixation du substrat, sa localisation dans le site actif à côté du résidu acide/base lui confère certainement un rôle pour l'orientation optimale de ce résidu.

#### D.4.2.4 Mutagenèse à saturation de Tyr<sup>78</sup>

Nous avons alors décidé d'entreprendre une étude de mutagenèse à saturation sur le résidu Tyr<sup>78</sup> du mutant Tx–Xyl–PT–V35A afin d'explorer son rôle sur l'activité cellulolytique. Après transformation des colonies, elles ont été étalées sur des boîtes contenant soit du xylane, soit de la CMC. Après une nuit de culture, aucun halo n'est apparu, les boîtes de Pétri ont été placées à 5°C et inspectées quotidiennement. Après quelques jours, une colonie sur une boîte de CMC a présenté un halo naissant, qui est devenu clairement visible après une semaine. Cette colonie a été prélevée et mise en culture afin de caractériser la protéine recombinante produite.

Le séquençage de l'ADN plasmidique a indiqué la présence de la mutation  $Tyr^{78} \rightarrow Trp^{78}$ , le clone a donc été appelé Tx–Xyl–PT–V35A–Y78W (plus simplement Tx–Xyl–PTW). Des essais de purification de cette enzyme mutante se sont révélés infructueux comme pour Tx–Xyl–PT–V35A, les activités n'ont pu être mesurées que sur des surnageants de culots bactériens lysés.

Nous avons décidé de comparer l'activité de Tx–Xyl–PTW à celle de l'enzyme sauvage sur CMC, tout d'abord par la méthode des sucres réducteurs habituelle. Mais l'activité observée était trop faible comparée à l'incertitude de mesure. Pour améliorer la précision des résultats, nous avons effectué des dosages d'activité par la méthode DNS, qui consiste à mesurer la réduction de l'acide 3,5–dinitrosalicylique de couleur jaune (DNS) par les sucres réducteurs en un composé rouge-orangé, à 540 nm.

Lors du dosage de Tx–Xyl, aucune activité n'a pu être mesurée avec cette méthode, même au bout de 72 h d'incubation du jus enzymatique. Avec Tx–Xyl–PTW par contre, une variation



Figure 21 – Évolution de l'activité cellulolytique de Tx-Xyl et Tx-Xyl-PTW.

certes faible mais certaine de l'absorbance à 540 nm en fonction du temps a été observée (**Figure 21**). Cette expérience a donné des résultats répétables, l'activité enzymatique déduite est de  $5,1 \pm 0,4 \mu g$  de glucose libéré/mL/h, soit environ 0,5 mUI/mL.

#### E Conclusion générale

Cette étude a clairement révélé la nature du rôle joué par le pouce des Xyl–11. Cet élément structural est un facteur déterminant de l'activité et de la sélectivité de ces enzymes, de part sa géométrie et sa composition en acides aminés. En ce qui concerne l'activité enzymatique, ce motif qui n'est pas présent chez les xylanases d'autres familles, semble jouer un rôle essentiel dans le relargage des produits et dans l'accomplissement du cycle catalytique. Quant à la sélectivité, le pouce, et notamment son extrémité, sont parfaitement adaptés au substrat xylane. Cette adéquation a pour conséquence d'empêcher l'accès au site actif à d'autres molécules telles que des cello-oligosaccharides.

L'élimination du pouce de Tx–Xyl par mutagenèse a permis de montrer que cet élément constitue une des principales différences fonctionnelles entre les enzymes des familles 11 et 12. La tentative de création d'une activité cellulolytique chez Tx–Xyl nous a alors conduit à essayer de recréer l'environnement électrostatique des Cel–12, en particulier autour du résidu acide/base de la dyade catalytique. Nous sommes parvenus à créer un mutant présentant une activité cellulolytique, dont l'intensité demeure cependant six ordres de grandeur plus faible que l'activité xylanolytique de Tx–Xyl. Au niveau du modèle structure/fonction et au niveau de l'évolution des enzymes, les différences entre les Xyl–11 et les Cel–12 s'avèrent finalement être relativement ténues, il est probable que l'une de ces familles ait évolué à partir de l'autre, ou bien qu'elles aient toutes les deux un ancêtre commun.

Cette étude rationnelle n'aurait pas pu être effectuée par les méthodes de mutagenèse aléatoire classique (*error-prone PCR* ou *DNA shuffling*) et aurait été rendue plus ardue et compliquée par *family shuffling*. Néanmoins, l'amélioration de l'activité cellulolytique de ce mutant bénéficierait clairement de l'apport de la mutagenèse aléatoire puisque la mutagenèse rationnelle a, selon nous, atteint ses limites.

## Chapitre V

# Résolution de la structure de Tx-Abf et relation structure/fonction

### CHAPITRE V - RÉSOLUTION DE LA STRUCTURE DE Tx-Abf ET RELATION STRUCTURE/FONCTION

#### A Problématique

L'a-L-arabinofuranosidase de Thermobacillus xylanilyticus (Tx-Abf) est une enzyme qui offre une large palette de réactions. C'est une enzyme robuste qui possède une bonne activité des arabinoxylo-oligosaccharides, donc catalytique sur facilite l'hydrolyse des lignocelluloses, augmentant ainsi le taux de dégradation des arabinoxylanes. De plus, elle catalyse diverses réactions de transglycosylation et ainsi, permet la synthèse de glycoconjugués originaux. Cependant, le manque d'informations structurales rend difficile aujourd'hui la manipulation de ses caractéristiques catalytiques, soit pour accroître sa capacité d'hydrolyse des arabinoxylanes polymériques, soit pour créer de nouveaux produits de synthèse plus stéréospécifiques.

Dans le but de mieux comprendre la relation entre la structure de Tx-Abf et sa fonction, un projet visant à déterminer sa structure 3D a été lancé en 2002 avec le Docteur Lars Skov de l'équipe du Professeur Michael Gajhede, du département de Chimie Médicale, à l'Université des Sciences Pharmaceutiques de Copenhague, au Danemark. Malgré plusieurs mois d'essais pour former des cristaux de Tx-Abf susceptibles d'être soumis aux rayons X, la taille des cristaux obtenus ne permettait pas une diffraction suffisante et la faible résolution obtenue ne permettait pas d'identifier la structure. Bénéficiant de l'allocation d'une bourse doctorale Marie-Curie de 6 mois à Copenhague, j'ai personnellement eu la possibilité de participer à l'élaboration de cristaux de Tx-Abf de meilleure qualité, pour finalement parvenir à déterminer la structure de cette enzyme, après quelques voyages dans les différents sites de synchrotrons européens.

Après la présentation de la résolution de la structure de Tx–Abf, nous analyserons ici en détails sa structure 3D, en précisant son architecture globale, la topographie de son site actif et les éléments originaux qu'elle comporte. Puis la comparaison avec la structure de l'unique Abf–51 déjà caractérisée à ce jour mettra en évidence des motifs du site actif parfaitement conservés mais aussi des différences inattendues au sein de cette famille d'enzymes. Enfin, quelques expériences de mutagenèse sur des résidus dont la position leur conférerait un rôle *a priori* critique viendront compléter cette étude structure/fonction de Tx–Abf.

| Concentration de Tx-Abf-Se | 1, 1 - 1, 2 - 1, 3 - 1, 4 - 1, 5 - 1, 6 |
|----------------------------|---|
| dans la goutte (mg/mL)     |   |
| pH de la goutte            | 4,5 - 4,6 - 4,7 - 4,8 - 4,9             |

Tableau 1 – Gammes de concentration de protéine et de pH testées.

#### B Résolution de la structure de Tx-Abf

#### B.1 Préparation et caractérisation de la protéine sélénométhionylée

Afin de faciliter la détermination de la phase par l'utilisation de la méthode MAD lors de la cristallographie aux rayons X, (voir Chapitre II, §D.2.4.3, p. 98), nous avons décidé d'intégrer des résidus séléno-méthionines (Se-Met) dans la protéine Tx–Abf. Ces acides aminés modifiés ont été directement introduits dans le milieu de croissance bactérien en remplacement de la Met normale, et des souches de *Escherichia coli* modifiées B834 ont permis l'assimilation de ce composé dans les protéines recombinantes exprimées. Normalement, les résidus Se-Met remplacent les résidus Met sans affecter les propriétés de la protéine. Après différents essais d'expression de cette nouvelle protéine Tx–Abf–Se, notamment en variant la température d'expression de 30 à 37°C, les purifications ont été effectuées par le protocole utilisé habituellement pour l'enzyme native, les quantités de protéines obtenues variant de 3,15 mg à 7,4 mg. La pureté des échantillons et leurs tailles ont été analysées par SDS-PAGE.

D'après la séquence en acides aminés de Tx–Abf, la protéine de masse 55985 Da comporte 16 résidus Met (en considérant la présence de la Met en N–ter), qui devraient être tous substitués par des Se-Met. Un atome de Se possédant une masse molaire de 78,96 g/mol contre 32,07 g/mol pour un atome de soufre, le gain de masse théorique serait de  $(78,96–32,07) \times 16 = 750,24$  g/mol pour Tx–Abf–Se soit un poids moléculaire final de 56735 Da. Malheureusement, la mesure de la masse par MALDI-TOF s'est révélée trop imprécise pour confirmer l'incorporation de Se-Met sur tous les sites possibles.

Afin de tester le repliement correct de Tx-Abf-Se, nous avons effectué une mesure d'activité classique sur le pNP-Araf. Pour l'enzyme sauvage, une activité spécifique de 465 UI/mg a été mesurée, alors qu'elle est de 460 UI/mg pour Tx-Abf-Se. Les activités spécifiques des deux enzymes étant identiques, nous en avons déduit que non seulement le repliement de Tx-Abf-Se était correct, mais en plus la présence de Se-Met n'avait pas affecté l'activité de l'enzyme.

Avant les premiers essais de cristallisation, l'enzyme a été dialysée contre un tampon contenant un mélange de Tris HCl 20 mM, NaCl 50 mM, DTT 5 mM et d'azide de sodium 0,2‰, sa concentration étant de 2,8 mg/mL.



A – Petits cristaux de Tx–Abf–Se

Conditions : Hepes 0,05 M, pH 4,7, Na, K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,8 M, [protéine] = 1,2 mg/mL



B – Cristaux de Tx–Abf–Se

Conditions : Hepes 0,05 M, pH 4,5, Na, K  $H_2PO_4$  0,8 M, [protéine] = 1,5 mg/mL



Figure 1 – Cristaux de Tx–Abf–Se obtenus par la technique de la goutte pendante.

#### B.2 Recherche et optimisation des conditions de cristallisation

#### **B.2.1** Criblage aléatoire

La cristallisation des protéines est probablement un des domaines de la science qui comporte le plus d'incertitude, c'est-à-dire qu'il n'existe pas de conditions universelles pour cristalliser une protéine. Par exemple, deux protéines appartenant à une même famille et se révélant homologues d'un point de vue structural peuvent cristalliser dans des conditions physico-chimiques tout à fait différentes. C'est pourquoi, lors des premiers essais de cristallisation de Tx-Abf-Se par la technique de la goutte pendante, nous avons utilisé des kits de criblage aléatoire qui nous ont permis de tester rapidement des conditions de pH, de force ionique et divers tampons qui auraient pu favoriser la formation de cristaux, dans des plaques de 24 puits. Dans ce cas, le seul paramètre que nous n'avons pas fait varier a été la concentration en protéines, maintenue à 1,4 mg/mL.

Après plusieurs jours d'observation, nous avons eu la chance d'observer de petits cristaux de protéines dans un seul puit, celui correspondant au tampon numéro 35 du kit de criblage. La solution dans le puit correspondant est formée sur la base du tampon Hepes 0,1 M à pH 7,5 et d'un mélange de sels de phosphate de potassium et de sodium à 0,8 M. Même si les cristaux obtenus n'étaient pas utilisables pour une expérience de diffraction aux rayons X à cause de la leur petite taille, ces conditions se sont révélées favorables à la formation de cristaux de Tx-Abf-Se, et nous avons tenté d'accroître leur taille, en se basant sur le principe que plus un cristal de protéine est volumineux, plus ses chances de diffracter à une haute résolution sont élevées.

#### **B.2.2** Optimisation des conditions de cristallisation

Différents paramètres influencent la croissance et la taille des cristaux, parmi eux le pH et la concentration en protéines, et de très faibles changements peuvent aussi entraîner de grandes différences au final sur la taille des cristaux obtenus. De plus, la répétition d'une expérience dans les mêmes conditions est souvent nécessaire du fait de la difficulté à reproduire des conditions identiques.

Des tests préliminaires ont mis en évidence que des cristaux de meilleure qualité étaient obtenus avec un pH proche de 5,0. En décidant de conserver les concentrations du tampon Hepes à 0,05 M et des sels à 0,4 M dans la goutte, nous avons d'abord fixé une gamme de concentrations de protéine et une autre de pH à tester (**Tableau 1**). L'analyse des résultats de cristallisation dans différentes conditions a permis d'optimiser peu à peu les paramètres à

|                              | SAD         | Haute résolution |
|------------------------------|-------------|------------------|
| Domaine de résolution (Å)    | 25 – 2,5    | 68 – 2,1         |
| Nombre de réflexions uniques | 97077       | 162137           |
| Complétude (%)               | 99,4        | 99,9             |
| Redondance (anormale)        | 20,1 (10,7) | 9,3 (5,4)        |
| R                            | 15,9        | 24,5             |
| I / σI (extérieur)           | 15 (3,0)    | 1,8 (1,1)        |
| d'' / σd'' (extérieur)       | 2,3 (0,87)  |                  |
| Nombre d'atomes de Se        | 44          | _                |

Tableau 2 – Données cristallographiques et statistiques de l'affinement.

chaque étape, même s'il est fréquemment arrivé que des conditions de cristallisation identiques ont donné des résultats parfois très différents... Et bien souvent nous avons obtenu des cristaux de trop petites tailles (**Figure 1A**).

Néanmoins, après plus de 400 essais de cristallisation, nous sommes parvenus à générer à plusieurs reprises des cristaux de Tx-Abf-Se dont la taille atteignait environ 0,1  $\mu$ m de largeur, pour un pH de 4,5 et une concentration en protéines de 1,5 mg/mL dans la goutte (**Figures 1B et 1C**). La forme des cristaux était proche de celle d'une bi-pyramide à 5 faces et à base carrée.

#### **B.2.3** Préparation des cristaux pour la diffraction aux rayons X et conservation

La dernière étape avant l'analyse aux rayons X constituait à prélever les cristaux à partir de la goutte de tampon où ils avaient atteint leur taille définitive, soit après 4 à 5 semaines. Cette manipulation a été effectuée à l'aide d'une micro-boucle située au bout d'une tige, les cristaux étant ensuite plongés dans une autre goutte qui contenait le même tampon de cristallisation avec 25% de glycérol, pour favoriser la conservation. Enfin, les cristaux n'ayant pas été détruits durant cette étape ont été conservés dans des tubes cryogéniques dans l'azote liquide. Il était important après cette étape de posséder plusieurs cristaux de bonne qualité, car quelques uns ont malheureusement été altérés lors de leur prélèvement, du fait de leur fragilité.

#### B.3 Diffraction aux rayons X de Tx-Abf-Se

#### **B.3.1** Collecte des données

Les données cristallographiques ont tout d'abord été collectées au cours de divers séjours au synchrotron de l'EMBL à Hambourg (Allemagne) puis à celui du MaxLab de Lund (Suède), mais les résolutions supérieures à 4 Å des jeux de données obtenus ne permettaient malheureusement pas de déterminer une structure 3D. En effet, nous avons pu déterminer que Tx-Abf-Se cristallisait dans un groupe d'espace hexagonal  $P6_522$ , les dimensions de la maille élémentaire étant : a = 158 Å, b = 158 Å et c = 380 Å. La taille élevée de cette maille indiquait que plusieurs molécules (de 3 à 6) étaient susceptibles de se trouver dans l'unité asymétrique, ce qui a accru la difficulté pour analyser ce genre de structure.

L'opportunité d'accéder durant 24 h à une source de rayons X parmi les plus intenses au monde, au synchrotron de l'EMBL à Grenoble (France), nous a permis enfin de collecter un jeu de données de qualité suffisante. Sur le faisceau BM14, des données ont été enregistrées



**Figure 2 – Représentation de la structure de Tx–Abf**. Le domaine catalytique en tonneau  $(\beta/\alpha)_8$  possède des brins  $\beta$  jaunes et des hélices  $\alpha$  rouges, le domaine C-ter possède des brins  $\beta$  bleus. Voir la **Figure 3** pour la topologie.



**Figure 3 – Topologie de Tx–Abf**. Les brins  $\beta$  sont indiqués par des flèches larges, les hélices  $\alpha$  par des cylindres et les boucles par des flèches fines.

| Numéro de la<br>boucle βα | Premier<br>résidu | Dernier résidu | Longueur | Séquence                                 |
|---------------------------|-------------------|----------------|----------|--|
| 1                         | 26                | 53             | 28       | FSEHLGRCIYEGLWVGEDSPIPNTNGIR             |
| 2                         | 70                | 109            | 40       | WPGGCFADEYHWKDGVGPREKRKRMVNTHWGGVIENNHFG |
| 3                         | 128               | 135            | 8        | GNVGSGTV                                 |
| 4                         | 173               | 185            | 13       | VGNENWGCGGNMR                            |
| 5                         | 212               | 220            | 9        | CGANTADYH                                |
| 6                         | 243               | 261            | 19       | TVPGPWEKKGPATGFTTDE                      |
| 7                         | 301               | 319            | 19       | WYDVEPGTNPGFLYQQNSI                      |
| 8                         | 345               | 367            | 23       | AQLVNVLQSVLLTEGERMLLTPT                  |

Tableau 3 – Identification des boucles  $\beta \alpha$  de Tx–Abf.

au niveau du pic d'absorption de l'atome de Se ( $\lambda = 0.9789$ ) sur un détecteur CCD Marmosaic 225. L'analyse des données a indiqué que seulement trois molécules de Tx-Abf-Se se trouvaient dans chaque unité asymétrique, donnant une concentration de solvant de 70%.

#### **B.3.2** Construction du modèle et affinement

La structure de Tx–Abf a été résolue en employant un jeu de données hautement redondant (redondance anormale de 10,7) à partir d'une expérience de dispersion anormale à une seule longueur d'onde (*single wave-length anomalous dispersion*) à 2,5 Å (**Tableau 2**). L'analyse des données a été effectuée avec la suite de logiciels HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997), la localisation des atomes lourds et la résolution de la phase ont utilisé les logiciels SHELX-D et SHELX-E (Sheldrick & Schneider, 1997). Le groupe d'espace a pu être assigné sans ambiguïté au groupe  $P6_522$ , et même si trois molécules de Tx–Abf–Se ont été retrouvées dans l'unité de base, les enzymes étaient assemblées sous formes d'hexamères à cause de la symétrie du cristal. La résolution du modèle construit a pu être abaissée à 2,1 Å en utilisant un jeu de données à haute résolution (**Tableau 2**). Le programme ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 2001) a permis de tracer automatiquement 80% de la structure, le reste étant effectuée manuellement. Le modèle inclut 1482 résidus d'acides aminés, deux ions phosphate et 550 molécules d'eau, pour un facteur R de 22,4% (R<sub>libre</sub> = 24,0%) (**Tableau 2**).

#### C Analyse de la structure de Tx-Abf

La structure de Tx–Abf se compose de deux domaines : un domaine  $(\beta/\alpha)_8$  ou *TIM-barrel* qui est le repliement le plus courant chez les enzymes dont la structure est connue à ce jour (Farber & Petsko, 1990 ; Wierenga, 2001), et un autre domaine en position C–ter composé de 11 brins  $\beta$  et dont le repliement est celui d'un *jelly-roll* (**Figures 2 et 3**). Ces domaines ont chacun été étudiés au niveau de leur topographie et de leur électrostatisme, tout en mettant à jour les particularités des éléments rencontrés.

#### C.1 Domaine catalytique

#### C.1.1 Analyse de la topographie du TIM-barrel

Ce domaine est formé alternativement de brins  $\beta$  et d'hélices  $\alpha$  qui se succèdent 8 fois. Ces éléments sont reliés par des boucles de longueurs variables. On nomme les boucles d'après les éléments qu'elles relient, i.e. la boucle  $\beta 3\alpha 3$  joint le brin  $\beta 3$  à l'hélice  $\alpha 3$ . L'ensemble de ces éléments forme une sorte de tonneau (d'où son nom de *TIM-barrel*) dans lequel la face intérieure est constituée par les brins  $\beta$  et la face extérieure par les hélices  $\alpha$ . Dans le cas



Figure 4 – Représentation des ponts disulfures C74–C180 et C117–C122 de Tx–Abf. Pour des raisons de clarté, seul les brins  $\beta$  du tonneau ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> sont indiqués.

idéal, les brins et les hélices ont des dimensions identiques, mais souvent la structure du tonneau est plus ou moins déformée à cause de la variabilité de ses éléments et de l'insertion de courts éléments de structures secondaires.

Ainsi, nous avons constaté que le brin  $\beta 6$  et l'hélice  $\alpha 6$  étaient chacun deux fois plus longs environ qu'un brin ou une hélice moyenne (4~6 résidus et 10~12 résidus respectivement). Le résultat est que la boucle  $\beta 6\alpha 6$  se trouve bien au-dessus des autres et donc semble plus mobile. Il en est de même pour les brins et hélices 7 et la boucle  $\beta 7\alpha 7$ .

Globalement, l'architecture en  $(\beta/\alpha)_8$  de Tx-Abf n'est pas trop déformée mais possède cependant quelques éléments insérés. Ainsi, deux brins  $\beta$  sont présents à l'extrémité N-ter et font en réalité partie du domaine C-ter. Mais surtout, trois courtes hélices  $\alpha$  sont insérées dans la boucle  $\beta 2\alpha 2$ , une autre plus longue (8 résidus) dans la boucle  $\alpha 3\beta 4$  et une dernière dans la boucle  $\beta 7\alpha 7$ , tous ces éléments contribuant à façonner la surface de l'enzyme. Enfin, deux brins  $\beta$  anti-parallèles se trouvent sur la boucle  $\beta 8\alpha 8$ .

En ce qui concerne les boucles  $\beta\alpha$  elles-mêmes, là aussi nous avons remarqué une grande variabilité de tailles (**Tableau 3**) : la plus petite comporte 8 résidus ( $\beta3\alpha3$ ) contre 40 pour la plus longue ( $\beta2\alpha2$ ), les boucles mesurent 20 résidus en moyenne. Ces différences de longueur sont à l'origine de la topographie particulière et *a priori* unique de Tx–Abf, car ce sont à la fois la composition et la longueur des boucles  $\beta\alpha$  des architectures en *TIM-barrel* qui, en quelque sorte, sculptent le site actif, alors que les brins  $\beta$ , les hélices  $\alpha$  du tonneau et les boucles  $\alpha\beta$  jouent majoritairement un rôle structural et varient assez peu (Reardon & Farber, 1995).

#### C.1.2 Présence de deux ponts disulfures

De façon encore plus intéressante, l'examen de la structure de Tx–Abf a révélé l'existence de deux ponts disulfures (**Figure 4**) : le premier, C74–C180, crée une connection entre les boucles  $\beta 2\alpha 2$  et  $\beta 4\alpha 4$ , alors que le second, C117–C122, est à l'intérieur de la boucle  $\alpha 1\beta 2$ . Jusqu'à présent, la présence de ponts disulfures chez les Abf de la famille 51 n'avait jamais été rapportée. L'examen d'alignements de séquences indique que l'une ou l'autre de ces deux paires de résidus Cys est souvent conservée mais jamais les deux en même temps (voir alignement en annexe). La seule Abf–51 qui possède ces résidus aux mêmes positions est celle de *Clostridium stercorarium*, mais comme Tx–Abf (Debeche, 2001), elle semble





**Figure 5 – Représentation du site actif de Tx–Abf**. Les figures sont tournées de 180° l'une par rapport à l'autre. La dyade catalytique est en rouge.
insensible à l'action d'agents réducteurs (Schwarz *et al.*, 1995). Cela signifie soit que même si les Cys sont présentes, aucun pont n'existe ; soit que ces ponts ne sont pas essentiels pour le maintien de l'activité ; ou encore qu'ils le sont mais pour une caractéristique qui n'a pas encore été testée.

#### C.1.3 Topographie et électrostatisme du site actif

Les résidus catalytiques avaient été identifiés auparavant comme étant Glu<sup>176</sup> (acide/base) et Glu<sup>298</sup> (nucléophile) (Debeche *et al.*, 2002), des alignements de séquences avec d'autres glycoside-hydrolases corrélés à des structures 3D connues avaient prédit leur localisation au niveau des boucles  $\beta 4\alpha 4$  et  $\beta 7\alpha 7$ . Cette information est confirmée avec la structure 3D, qui permet en plus de localiser précisément le site actif sur le tonneau ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>. Il se trouve au fond d'une poche, ce qui est en accord avec le caractère *exo* de l'enzyme, et est délimité essentiellement par les résidus des boucles  $\beta \alpha 1$ , 2, 3, 4, 7 et 8 (**Figure 5**). Mais contrairement à d'autres *exo*-enzymes où la poche catalytique affleure au niveau de la surface, ici elle se trouve au milieu d'une sorte de crevasse relativement longue (30 Å) et irrégulière au niveau des parois qui la forment, tantôt raides, tantôt douces. La poche catalytique accueille probablement le résidu L–arabinose dans le sous-site (– 1), la dyade catalytique se trouvant sur le côté de la poche et non en-dessous.

L'analyse de la surface de Tx-Abf (**Figure 6**) a permis de distinguer deux pseudo-crevasses Crev1 et Crev2 (on entend par *pseudo-crevasse* une crevasse hypothétique) situées de part et d'autre du site actif, un peu à la manière d'une *endo*-enzyme, mais on ne peut pas prédire si l'une, l'autre, aucune ou les deux jouent un rôle du côté réducteur lors de la fixation du substrat. Nous proposons d'adopter la nomenclature suivante : Crev1 pour le côté R et Crev2 pour le côté R', et nous allons simplement décrire leur topographie par les boucles qui les constituent.

Crev1 est constituée des résidus des boucles 5 et 6 et forme le côté de la crevasse le plus étroit et le plus asymétrique, au sens où la paroi formée par la boucle 6 est une protubérance très saillante, alors que celle de la boucle 5 est beaucoup moins volumineuse. Le sillon ainsi créé est donc plus ouvert et accessible du côté de la boucle 5 que de la boucle 6. De l'autre côté du site actif, Crev2 est beaucoup moins encaissée et composée par les résidus des boucles 1, 2, et 7, en particulier la longue boucle  $\beta 2\alpha 2$  légèrement en retrait du site actif qui surplombe cette partie.



**Figure 6 – Représentation de l'hydrophobie de surface de Tx-Abf** (pour l'échelle d'hydrophobie voir la **Figure 14** du Chapitre I). Les zones R, R' et NR de la crevasse sont délimitées par des pointillés.



**Figure 7 – Représentation de la surface de Tx–Abf en fonction du facteur de température B des résidus**. L'orientation de la molécule est la même que sur la **Figure 6**. La couleur varie du bleu (élément quasi-immobile) au rouge (élément très mobile) en passant par le vert et le jaune (éléments moyennement mobiles).

|         |                        | Résidu      | Elément structural                     | % de conservation<br>chez les Abf–51 |
|---------|------------------------|-------------|--|--------------------------------------|
|         |                        | E28         | β1α1                                   | 62%                                  |
|         | Arrimage               | E176        | β4α4                                   | 100%                                 |
|         |                        | Y242        | fin du brin β6                         | 100%                                 |
|         |                        | E298        | fin du brin $\beta$ 7                  | 56%                                  |
|         | arabinose              | Q347        | β8α8                                   | 56%                                  |
| ND(1)   |                        | C74–C180    | $\beta 2\alpha 2$ et $\beta 4\alpha 4$ | 56% et 44%                           |
| NK(-1)  |                        | F26         | β1α1                                   | 56%                                  |
|         |                        | L30         | β1α1                                   | 50%                                  |
|         | Structure<br>sous-site | C74–C180    | $\beta 2\alpha 2$ et $\beta 4\alpha 4$ | 56% et 44%                           |
|         |                        | W302        | β7α7                                   | 56%                                  |
|         |                        | L314        | β7α7                                   | 79% et 100% avec M                   |
|         |                        | L352        | β8α8                                   | 56% (I, L ou V)                      |
| Côté R  |                        | N216        | β5α5                                   | 21%                                  |
|         |                        | T/N/S217    | β5α5                                   | 53%                                  |
|         |                        | Y241        | fin du brin $\beta 6$                  | 38%                                  |
|         |                        | Y242        | fin du brin $\beta 6$                  | 100%                                 |
|         |                        | V/L/I244    | β6α6                                   | 24%                                  |
|         |                        | W248        | β6α6                                   | 26%                                  |
|         |                        | K268        | hélice α6                              | 21%                                  |
|         |                        | F/Y271      | hélice α6                              | 38%                                  |
| Côté R' |                        | H29         |  | 56%                                  |
|         |                        | Côté R' F75 |  | 71%                                  |
|         |                        | E78         | β2α2                                   | 23%                                  |

Tableau 4 – Prédiction des résidus pouvant participer à l'arrimage du résidu arabinose en (– 1) et à la fixation des résidus xylose dans les autres pseudo-sous-sites en R et R'. Les éléments de structure secondaire du domaine catalytique auxquels ces résidus appartiennent sont indiqués dans la  $2^{eme}$  colonne, ainsi que leurs pourcentages de conservation d'après l'alignement de séquences des Abf–51. En ce qui concerne le type des résidus qui composent cette crevasse (**Figure 6**), on remarque que de nombreux résidus aromatiques pavent Crev1 : l'accès au site actif est formé par K268, F271, Y241 et Y242, alors que la protubérance de la boucle 6 est due à W248 et V244, l'autre face de la crevasse étant par contre plus polaire avec N216 et T217. Dans le site actif, on retrouve des résidus chargés ou polaires qui pourraient intervenir dans la fixation de l'arabinose : E28, Y242 dont l'OH pointe vers la poche, Q347, et bien sûr les deux résidus de la dyade. Surtout, la poche est partiellement refermée sur un côté à cause de la présence du pont disulfure C74–C180 qui constitue une petite protubérance hydrophobe au-dessus de la dyade. Ce pont rapproche les boucles 2 et 4, cette dernière porte d'ailleurs le résidu acide/base E176, ce qui laisse penser que la formation de ce pont participe peut-être au repliement correct du site actif. En face se trouvent les résidus hydrophobes L30, L314 et L352. La suite de la crevasse, Crev2, est plus variée au niveau électrostatique, elle est formée des résidus H29, F75 et E78, avec notamment les résidus N96–T97–H98–W99–G100 situés au bout de la boucle 2 qui surplombent le côté de Crev2.

La **Figure 7** est la représentation de la surface de Tx–Abf en fonction du facteur de température B des résidus, i.e. la mobilité intrinsèque des résidus d'après les données cristallographiques. L'ensemble de la molécule est moyennement mobile  $(10 \text{ Å}^2 < B < 30 \text{ Å}^2)$  en particulier le domaine catalytique, profil que l'on retrouve chez toutes les protéines. La singularité de cette structure est que la boucle 2, qui se trouve être la plus longue du domaine catalytique, apparaît plus mobile que les autres avec en particulier les deux résidus H98 et W99 qui affichent des facteurs de température très elevés (~ 60 et 65 Å<sup>2</sup> resp.), signe qu'ils sont probablement animés d'un mouvement coordonné, mais qu'il semble difficile de définir pour le moment. L'hydrophobie de cette boucle est elle-même segmentée : l'extrémité exposée au solvant est hydrophobe (W99), suivent une petite portion polaire non chargée (N96–T97–H98) et un segment hydrophobe (V95 et G100–G101–V102–I103).

#### C.1.4 Conservation des résidus impliqués dans l'arrimage du substrat

Le **Tableau 4** récapitule les résidus qui pourraient être impliqués, d'après leur localisation et leur type, dans la fixation du résidu arabinose en (-1) et des éventuels résidus xyloses en R et R'. Il est intéressant de rechercher dans l'alignement de séquences des Abf-51 le niveau de conservation de ces résidus. Il ne s'agit peut-être pas de la meilleure méthode pour détecter des résidus conservés, à cause de la variabilité des boucles, et du fait que des résidus pourtant distants sur une séquence peuvent se retrouver proches dans l'espace. Mais étant donné le peu

de structure disponibles, c'est le moyen le moins mauvais, nous pouvons penser que les variabilités des boucles ne sont pas trop prononcées au sein d'une même famille comme celle des Abf–51. Dans ce cas, nous pouvons nous attendre à ce que des résidus conservés d'après un alignement de séquences soient effectivement superposés dans l'espace, mais la non-conservation au niveau d'un alignement ne démontre pas pour autant l'absence de conservation d'un résidu donné. La preuve en est que le résidu nucléophile E298 n'apparaît conservé qu'à 56% chez les Abf–51, alors qu'il s'agit d'un résidu essentiel qui est assurément présent chez toutes les enzymes de la famille 51.

Ainsi, au niveau des acides aminés pouvant fixer le substrat en (- 1), tous les résidus sont conservés à plus de 50%, d'ailleurs Y242 existe chez toutes les Abf-51 : grâce à son OH orienté vers la poche catalytique, ce résidu forme probablement une liaison hydrogène indispensable avec l'arabinose. Mais au total, le nombre de résidus qui seraient capables de créer des liaisons hydrogène avec le substrat est limité : E28, E176, Y242, E298 et Q347. Au niveau de la structuration de ce sous-site, on remarque qu'un résidu L ou M est conservé à 100% à la position 314, alors que L30 l'est à 30%. À cause de sa position privilégiée en bordure de la poche, ce résidu à chaîne aliphatique pourrait permettre la sélection du substrat au niveau de son hydrophobie et orienter les hydroxyles de l'arabinose. Les résidus aromatiques F26 et W302 sont présents dans la poche mais leurs chaînes latérales ne sont pas du tout disposées pour la formation d'un *stacking*, ils n'ont probablement qu'un rôle structural.

Concernant le côté R par contre, le niveau de conservation apparaît bien plus faible, hormis Y242 (100%). On peut y voir deux causes : la première est structurelle, inhérente aux alignements de séquence comme nous l'avons vu, et l'autre, plus probable, est due à la variabilité des résidus qui peuvent se substituer à ceux que nous avons sélectionnés, la structure peut être plus facilement conservée que la séquence comme c'est souvent le cas. Du côté R', les résidus H29 et F75 sont bien plus conservés (56 et 71% resp.) mais il paraît audacieux de leur attribuer plus qu'un rôle structural.

Finalement, en supposant que notre sélection de résidus ayant *a priori* un rôle fonctionnel et/ou structural (d'après leur localisation et leur type) s'avère à peu près correcte, on constate que seuls les résidus qui seraient impliqués dans la fixation de l'arabinose sont conservés, les résidus des sous-sites hypothétiques en R et R' sont nettement plus variés.

#### C.2 Domaine secondaire

Ce domaine est un sandwich  $\beta$  composé de 11 brins  $\beta$  ayant une topographie en *jelly-roll*. Deux brins proviennent en fait du domaine catalytique comme nous l'avons vu (brins  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2, **Figures 2** et **3**), et ce domaine est divisé en deux feuillets  $\beta$  formés chacun de quatre brins  $\beta$  (brins 1, 7, 10 et 9 d'une part et 5, 6, 11 et 8 d'autre part) qui sont plaqués l'un contre l'autre grâce à la présence de nombreux résidus hydrophobes (**Figure 3**). Ce domaine se trouve en contact étroit avec le domaine catalytique au niveau justement des hélices  $\alpha$ 6 et  $\alpha$ 7 qui apparaissaient être anormalement longues, ainsi qu'avec l'hélice  $\alpha$ 8. Quelques liaisons hydrogène et interactions hydrophobes existent d'ailleurs entre les hélices du *TIM-barrel* et les feuillets du *jelly-roll*, ce qui permet probablement une stabilisation mutuelle de l'ensemble :

W262 et L421 (interaction hydrophobe)

K267 (NZ)…E398 (O)

H378 (NE2)····S417 (OG) (liste non exhaustive).

L'examen d'alignements de séquences indique que ces résidus ne sont absolument pas conservés au sein de la famille 51 et donc que ces interactions semblent non-spécifiques.

Le rôle de ce domaine est encore inconnu, des recherches de séquences homologues par BLAST indique sa grande conservation chez les Abf-51 mais pas chez les Abf des autres familles ou chez d'autres enzymes.

#### C.3 Conclusion de l'analyse structurale

L'analyse de la structure de Tx–Abf a montré que cette enzyme est constituée d'un domaine catalytique en  $(\beta/\alpha)_8$  et d'un domaine C–ter de fonction encore inconnue de topographie en *jelly-roll*. Ces deux domaines ne sont pas séparés par un *linker* comme c'est souvent le cas avec les CBM, mais ils interagissent entre eux au niveau de liaisons hydrogène entre des hélices du tonneau et des feuillets du *jelly-roll*. Par ailleurs, les brins  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 qui font partie du *jelly-roll* d'un point de vue topologique appartiennent en fait au domaine catalytique, ce qui renforce les liens entre ces domaines. Même si le domaine C–ter possède une structure proche de celle du domaine C des  $\alpha$ -amylases, ce pourrait être un CBD qui aurait perdu sa fonction de fixation au substrat durant l'évolution (Hövel *et al.*, 2003). Des interactions

semblables à l'interface des deux domaines existent chez l' $\alpha$ -amylase II de *Thermoactinomyces vulgaris* R-47, où les auteurs proposent que les interactions avec des hélices du *TIM-barrel* participent à la structuration du site actif (Kamitori *et al.*, 1999). Ainsi, on peut supposer que le domaine en *jelly-roll* de Tx-Abf stabilise le domaine catalytique, d'une part en masquant les hélices hydrophobes  $\alpha 6$  et  $\alpha 7$  du *TIM-barrel*, et d'autre part en faisant barrière au solvant.

En ce qui concerne le site actif, il se trouve au centre d'une pseudo-crevasse non rectiligne assez irrégulière sur ses côtés et dont l'hydrophobie varie selon la localisation. La zone Crev1 est très hydrophobe et comporte plusieurs résidus aromatiques avec juste une petite partie polaire. Il est possible notamment que le résidu W248 forme une interaction de *stacking* avec un résidu xylose dans le sous-site (+ 1) étant donnée sa localisation juste avant le site actif, mais ce résidu ne semble pas conservé d'après l'alignement de séquences des Abf–51. Sa localisation sur la boucle protubérante  $\beta\alpha\beta$  obligerait le(s) résidu(s) de(s) sous-site(s) hypothétique(s) (+ 1) et/ou (+ 2) à adopter une géométrie qui favoriserait l'arrimage de l'arabinose dans le site actif.

Une interaction de *stacking* juste avant l'entrée du sous-site (- 1) d'une exo-enzyme est assez commune, par exemple chez la  $\beta$ -D-glucane exohydrolase d'orge de la famille 3 (Varghese *et al.*, 1999) les résidus W286 et W434 constituent une fente qui prend en sandwich le résidu glucose du sous-site (+ 1). Chez la  $\beta$ -D-xylosidase d'*Erwinia chrysanthemi* (Larson *et al.*, 2003), la poche catalytique est moins prononcée mais le résidu Y282 est idéalement placé pour créer un *stacking* en (+ 1). Mais le rôle précis de ces résidus n'a pas été investigué, malgré son importance. En effet, la fixation du substrat en (- 1) est forte chez les exoenzymes, car c'est ce sous-site qui concentre toute la spécificité de l'enzyme (plus ou moins élevée d'ailleurs), la topographie des autres sites adjacents servant plus à sélectionner le substrat (en terme d'encombrement stérique et d'électrostatisme) qu'à le fixer.

D'après l'alignement de séquences des GH–51, nous avons identifié toutes les boucles  $\beta\alpha\delta$ sur la base de celle de Tx–Abf (qui comporte le résidu W248) et sur les éléments conservés des brins  $\beta\delta$  et des hélices  $\alpha\delta$  aux extrémités. Quatre groupes d'enzymes se distinguent en fonction de la longueur des boucles  $\beta\alpha\delta$  : 4 résidus, 12~13 résidus, 22~23 résidus (groupe où l'équivalent de W248 est conservé à plus de 80%) et même une boucle de 43 résidus ! Hormis dans ce 3<sup>ème</sup> groupe, aucun résidu aromatique n'est présent, le *stacking* hypothétique de W248 n'est pas conservé sur cette boucle, donc soit il existe un équivalent spatial qui est situé sur une autre boucle, soit sa présence n'est pas indispensable.

La zone Crev2, de l'autre côté du site actif, semble pouvoir accueillir un, voir deux sous-sites (+1') et (+2'), mais la topographie peu marquée et la variété des résidus présents tendent à montrer que des interactions à ce niveau seraient peu spécifiques. Par contre, le fait que les résidus H98 et W99 de la boucle  $\beta 2\alpha 2$  possède des facteurs de température B élevés rend compte d'une mobilité très probable de la boucle. Or, elle est située juste au-dessus des pseudo-sous-sites (+1') et (+2'), elle pourrait intervenir par son mouvement dans la fixation et/ou l'orientation du substrat. Par ailleurs cette boucle quoique la plus longue chez les Abf–51, apparaît plutôt bien conservé, le résidu W99 à l'extrémité de la boucle étant présent à la même position sur presque 90% des séquences. Le fait d'exposer au solvant un résidu aussi hydrophobe signifie probablement que l'augmentation d'entropie qui en découle doit être contrebalancée par un rôle bénéfique pour l'enzyme qui pour le moment demeure inconnu.

Le sous-site (- 1) contenu dans le site actif possède lui *a priori* plusieurs résidus polaires et très conservés susceptibles d'interagir avec le résidu arabinose, et sa forme de poche est accentuée par la présence d'un pont disulfure hydrophobe sur le côté. Il existe chez l'Abf-54 AkAbfB d'*Aspergillus kawachii* IFO 4308 un pont disulfure dont la liaison S–S favoriserait la reconnaissance de la liaison avec les atomes de carbone 5 et 6 du résidu arabinose, par la création d'une interaction hydrophobe (Miyanaga *et al.*, 2004a). Or, si on superpose les structures de AkAbfB et de Tx–Abf sur la base des dyades catalytiques, le résidu W99 de Tx–Abf se situe à la même position que le pont disulfure de AkAbfB. Ce résidu est très bien conservé chez les Abf–51, peut-être une interaction hydrophobe est conservée chez les Abf des familles 51 et 54 soit pour favoriser la reconnaissance de l'arabinose, soit pour orienter et/ou arrimer le résidu xylose en (+1').

En conclusion, même si des éléments tendent à montrer le rôle que pourraient jouer certains résidus conservés dans la structuration du site actif et la fixation du substrat, le voile ne pourra être levé que lors de l'analyse de complexes enzyme/substrat. Afin d'infirmer ou de confirmer nos hypothèses, nous allons comparer la structure de Tx–Abf avec celle de la seule autre structure d'Abf–51 caractérisée à ce jour.



**Figure 8 – Superposition de Tx–Abf et de Gs–Abf**. Couleurs de Tx–Abf/Gs–Abf : hélices α en rouge/orange, brins β en jaune/violet et boucles en vert/bleu.

| Numéro i de        |       | Tx–Abf |                    |       | Gs-Abf |                    |
|--------------------|-------|--------|--------------------|-------|--------|--------------------|
| $\beta_i \alpha_i$ | Début | Fin    | Longueur<br>boucle | Début | Fin    | Longueur<br>boucle |
| 1                  | 26    | 53     | 28                 | 27    | 53     | 27                 |
| 2                  | 70    | 109    | 40                 | 70    | 108    | 39                 |
| 3                  | 128   | 135    | 8                  | 127   | 134    | 8                  |
| 4                  | 173   | 185    | 13                 | 172   | 186    | 15                 |
| 5                  | 212   | 220    | 9                  | 212   | 224    | 13                 |
| 6                  | 243   | 261    | 19                 | 247   | 257    | 11                 |
| 7                  | 301   | 319    | 19                 | 297   | 323    | 27                 |
| 8                  | 345   | 367    | 23                 | 349   | 371    | 23                 |

Tableau 5 – Identification des résidus de début et de fin des boucles  $\beta\alpha$  des domaines  $(\beta/\alpha)_8$  de Tx-Abf et de Gs-Abf.



(voir légende page suivante)

#### D Comparaison structurale avec une autre Abf–51

L'unique structure d'Abf-51 disponible est issue de *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (Gs-Abf), l'avantage qu'elle présente est que, en plus de la structure native, diverses molécules ont été complexées avec l'enzyme Gs-Abf inactivée : pNP-Araf, Ara-(1,3)-Xyl, et un intermédiaire covalent (Hövel *et al.*, 2003 ; codes PDB 1PZ3, 1QW9, 1QW8 et 1PZ2).

#### D.1 Structure globale

Gs–Abf est organisée de la même manière que Tx–Abf en deux domaines, un domaine catalytique en *TIM-barrel* et un domaine C–ter en *jelly-roll*. Afin d'effectuer une comparaison structurale rigoureuse, nous avons d'abord dû superposer les structures. Pour cela, nous avons utilisé le fait que ces deux enzymes partagent des éléments de structure secondaire conservés comme les hélices  $\alpha$  du domaine ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>. En sélectionnant comme référence de superposition les hélices 1, 3 et 5, les domaines s'alignent de manière tout à fait correcte, la déviation RMS sur les atomes C $\alpha$  étant de 0,95 (**Figure 8**).

Au niveau de la structure globale, nous n'avons pas observé de différences notables entre les domaines  $(\beta/\alpha)_8$  et les *jelly-rolls*. Les mêmes hélices 6 et 7 du *TIM-barrel* se révèlent plus longues que la normale et elles se trouvent aussi en contact étroit avec le domaine C–ter, qui comporte juste un brin  $\beta$  de plus que celui de Tx–Abf, ce qui ne modifie absolument pas sa structure, cette différence ayant probablement pour origine une divergence d'assignation de structures secondaires par les logiciels de modélisation moléculaire. Cette grande similitude était prévisible du fait d'un taux de conservation des résidus très élevé au niveau de l'alignement de séquences (26% de résidus conservés à l'identique et 51% de résidus similaires au niveau de leurs types). Il est plus intéressant de comparer les boucles  $\beta\alpha$  du *TIM-barrel*, à l'origine de la structure du site actif et de la spécificité de l'enzyme.

#### **D.2** Boucles $\beta \alpha$ du *TIM-barrel*

Les boucles  $\beta_{i\alpha i}$  ont été identifiées en prenant le dernier résidu du brin *i* jusqu'au premier résidu de l'hélice *i*. Le **Tableau 5** rassemble les numéros des résidus de début et de fin des boucles, ainsi que leurs longueurs. Cette première analyse purement arithmétique a mis en évidence que les boucles 1, 2, 3 et 8 possèdent des longueurs identiques, alors que les boucles 4, 5 et surtout 6 et 7 sont nettement plus variables. L'examen plus approfondie de l'organisation 3D relative de ces boucles (**Figure 9**) s'est ensuite avéré nécessaire, en essayant de rechercher les résidus conservés ou non sur la base de leur localisation et de leur



Figure 9 – Comparaison des boucles  $\beta\alpha$  des domaines ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> de Tx-Abf (vert) et de Gs-Abf (bleu).

rôle potentiel chez Tx-Abf (structuration de la crevasse, interaction avec le substrat) (**Tableau 4**).

#### **D.2.1** Boucles conservées

Les boucles 1 sont parfaitement identiques au niveau spatial, et de nombreux résidus sont conservés en plus au niveau des chaînes latérales, parmi lesquels E28 et L30 qui ont été identifiés comme faisant partie de la poche catalytique, ainsi que H29 du côté R'.

Les boucles 2 débutent toutes les deux par une hélice  $\alpha$  suivie de deux autres plus petites, mais leurs extrémités présentent des positionnements différents. Alors que la boucle de Tx-Abf reste au-dessus de la crevasse, celle de Gs-Abf est refermée sur le côté R' avec le résidu conservé W99 qui obture la crevasse de ce côté.

La boucle 3 est très courte et très conservée, mais aucun résidu présent n'a été identifié comme pouvant jouer un rôle fonctionnel ou structural au niveau de la crevasse.

Dans la boucle 8, seul le résidu Q347 pourrait intervenir au niveau du sous-site (- 1) et il est d'ailleurs conservé chez Gs-Abf. Même si cette boucle est une des plus longues, son repliement est identique chez les deux enzymes.

#### **D.2.2** Boucles non conservées

Les boucles 4 ont un repliement identique sur leur première moitié, les positions des résidus catalytiques acide/base E176 étant conservées. Mais quoique de longueurs quasiment égales, la position du pont disulfure C74–C180 en milieu de boucle chez Tx–Abf provoque un rapprochement de la boucle 4 vers la boucle 2, ce qui vrille fortement la boucle 4 et modifie son occupation spatiale.

La boucle 5 est plus longue de quatre résidus chez Gs–Abf, ce qui lui confère un repliement tortueux notamment à cause de la présence de P221. Le résidu N216 est remplacé par une Ser dont la position est décalée, mais le résidu T217 par contre est conservé en type et en position.

Au contraire, la boucle 6 de Tx-Abf possède huit résidus de plus, ce qui rend les boucles très différentes, celle de Gs-Abf étant très courte. Les résidus V244 et W248 ne possèdent aucun équivalent spatial alors que la position privilégiée de W248 à l'entrée du site actif du côté R pourrait lui conférer un rôle fonctionnel. On note que le résidu Y242 situé juste avant cette boucle est parfaitement conservé chez les deux enzymes et même chez toutes les Abf-51



Figure 10 – Représentation de la surface des boucles du domaine  $(\beta/\alpha)_8$  de Tx–Abf (à gauche) et de Gs–Abf (à droite).

d'après les alignements de séquences. Nous reviendrons plus tard sur l'importance de cette boucle 6.

Enfin, la boucle 7 de Gs–Abf comporte huit résidus de plus, seules les extrémités des boucles sont communes, avec tout de même le résidu L314 conservé, et bien sûr le résidu catalytique nucléophile E298 situé juste à la fin du brin  $\beta$ 7 également.

#### D.3 Structure comparée du site actif

#### **D.3.1** Topographie

La **Figure 10** représente la surface occupée par les boucles  $\beta\alpha$  du *TIM-barrel* chez Tx–Abf et Gs–Abf. En premier lieu, la poche catalytique de Gs–Abf apparaît moins enfoncée que celle de Tx–Abf. Surtout, l'accès au site actif du côté R possède une topographie totalement différente. Les boucles 5 et 6 qui forment une entrée abrupte du côté de la boucle 6 et douce du côté de la boucle 5 ont des occupations spatiales inverses. En effet, la boucle 6 de Tx–Abf est bien plus volumineuse que son équivalent, grâce notamment à la présence de W248 qui délimite la crevasse de Tx–Abf, alors que la boucle 5 de Gs–Abf avec ses résidus N217 et N219 semble limiter l'entrée de la crevasse. Les profils des entrées des crevasses sont symétriques l'une par rapport à l'autre en quelques sorte, mais celle de Tx–Abf, avec une largeur de 8 Å, est plus étroite et plus encaissée que celle de Gs–Abf, plus ouverte, et de 10 Å de large.

Ce qui est par ailleurs remarquable est que la boucle 4 de Gs–Abf, dont on a vu qu'elle était assez semblable à celle de Tx–Abf, occupe un volume plus important, et qu'elle « creuse » l'entrée vers le site actif par sa proéminence. L'élément important est qu'elle expose juste audessus de la poche catalytique un résidu aromatique W180, inexistant chez Tx–Abf mais qui apparaît comme le symétrique de W248, qui se trouve lui sur la boucle 6.

Si on observe en enfilade le côté R et la poche catalytique, les crevasses apparaissent symétriques au niveau de leur topographie, car c'est le côté droit qui est plus hydrophobe et escarpée chez Tx–Abf, alors que c'est le gauche chez Gs–Abf. La face droite de Gs–Abf est plus accessible alors que c'est celle de gauche chez Tx–Abf. La boucle 7 très volumineuse chez Gs–Abf, accompagnée de la boucle 2, semble former une crevasse bien plus raide du côté R' par rapport à celle de Tx–Abf à cause des positons différentes des boucles 2.



Figure 11 – Superposition des résidus du site actif de Gs–Abf (mauve) interagissant avec un substrat Ara– $\alpha$ –(1,3)–Xyl (vert) avec leurs équivalents spatiaux chez Tx–Abf (bleu ciel) présentée sous deux vues différentes (A et B). Les liaisons hydrogène sont indiquées par des pointillés et les résidus des *stackings* potentiels sont indiquées en jaune pour Gs–Abf et orange pour Tx–Abf.

| Gs-Abf         | E29 | N74   | N174 | E175 | Y246   | E294 | Q351 |
|----------------|-----|-------|------|------|--------|------|------|
| Tx-Abf         | E28 | (C74) | N175 | E176 | Y242   | E298 | Q347 |
| Arabinose (-1) | O3  | O3    | O2   |      | O4, O5 | O2   | 05   |
| Xylose (+ 1)   |     | O2    |      |      |        |      |      |

Tableau 6 – Détails des interactions moléculaire entre Gs–Abf et Ara– $\alpha$ –(1,3)–Xyl et les résidus équivalents chez Tx–Abf. Les interactions avec le résidu catalytique E175 ne sont pas mentionnées car il est muté en Ala dans la structure du complexe.

#### D.3.2 Résidus du site actif

D'après la structure du complexe de Gs-Abf inactivée (le résidu acide/base E175 est muté en Ala) avec un substrat Ara- $\alpha$ -(1,3)-Xyl, Hövel *et al.* ont pu établir la liste des résidus de l'enzyme arrimant cette molécule (Hövel et al., 2003). Ce qui caractérise cette interaction est que pas moins de 7 liaisons hydrogène potentielles peuvent être créées entre les résidus du sous-site (-1) et le résidu Ara, alors qu'une seule interaction existe au niveau du sous-site (+1) avec le résidu xylose (Figure 11 et Tableau 6). Lorsqu'on recherche les résidus équivalents chez Tx-Abf, on retrouve les mêmes résidus non seulement au niveau du type, mais en plus au niveau de leur position dans l'espace (Figure 11). Les résidus du sous-site (-1) de Gs-Abf sont conservés à l'identique chez Tx-Abf. Une exception notable est l'absence des interactions N74(N)...Ara(O3) et N74(ND2)...Xyl(O2) car le résidu N74 de Gs–Abf est remplacé par C74 chez Tx–Abf, lequel est impliqué dans un pont disulfure avec C180. Cela signifie, en supposant que le substrat se fixe de la même manière dans les sites actifs des deux enzymes, que deux liaisons hydrogène manquent chez Tx-Abf pour arrimer le résidu arabinose dans le sous-site (-1), notamment l'unique interaction avec le résidu xylose en (+ 1) est perdue. Cela influerait notablement sur la liberté inhérente au sous-site (+ 1) pour fixer divers composés, lui conférant une non-spécificité importante. Les alignements de séquences montrent en outre qu'à la position 74 (en référence à Tx–Abf), une Cys ou une Asn est toujours retrouvée, ce qui pourrait représenter un marqueur de spécificité des Abf-51. Par contre, la spécificité au niveau du sous-site (-1) est très grande, aussi bien d'un point de vue géométrique, par la sélection du substrat grâce à la forme de poche de la cavité catalytique, et aussi par le grand nombre d'interactions établies avec tous les hydroxyles du résidu arabinose.

Toujours d'après l'analyse du complexe, on remarque que le résidu W180 pourrait effectuer un *stacking* avec le xylose en (+ 1), élément qui n'a pas été mentionné par les auteurs de l'étude. Les plans des cycles sont quasiment parallèles et la distance entre le barycentre des deux cycles est environ de 4,8 Å. Cette valeur paraît un peu élevée pour créer un interaction spécifique mais il est probable que la position de ce résidu à l'entrée de la poche catalytique au niveau du sous-site (+ 1) joue au moins un rôle structural. D'ailleurs, on retrouve son équivalent chez Tx–Abf de l'autre côté de la crevasse (W248).

#### D.4 Conclusion de la comparaison structurale

La comparaison des architectures des deux Abf-51 Tx-Abf et Gs-Abf a montré que, malgré des séquences primaires proches et des architectures identiques, la seule variabilité des

boucles  $\beta\alpha$  des *TIM-barrel* suffisait à modeler des crevasses catalytiques de topographie symétrique selon leur axe principal, où seule la poche catalytique qui contient le sous-site (-1) est conservée. En particulier, un résidu aromatique présent chez Gs–Abf sur un côté de la crevasse et susceptible d'interagir dans le sous-site (+1) possède un résidu symétrique exactement chez Tx–Abf.

Même si pour le moment nous ne disposons pas de molécules complexées avec Tx–Abf, la prédiction des résidus susceptibles d'interagir avec un résidu arabinose au niveau du sous-site (-1) s'est révélée concluante si on la compare avec les résidus de Gs–Abf en interaction avec une molécule Ara– $\alpha$ –(1,3)–Xyl (**Tableaux 4** et **6**). En effet, nous avions supposé que les résidus E28, E176, Y242, E298 et Q347, de part l'orientation de leurs chaînes latérales et leur position autour du site actif, seraient de bons candidats. L'analyse précédente indique, à condition bien sûr que les interactions soient conservées entre Gs–Abf et Tx–Abf, que ce sont les mêmes résidus équivalents qui fixeraient l'arabinose chez Tx–Abf. Seule l'interaction avec le résidu Aljacent est normalement le résidu catalytique acide/base muté en Ala dans le complexe, la place libérée pourrait permettre l'établissement de cette liaison hydrogène artéfactuelle. Chez Tx–Abf, le rôle du pont C74–C180 localisé dans le site actif mais inexistant chez Gs–Abf reste encore à élucider, tout comme celui du pont C117–C122.

L'étude bibliographique a montré que malgré leur appartenance à la même famille, les Abf–51 possédaient des spécificités d'hydrolyse variables (**Tableau 9**). Actuellement, le manque de structures disponibles rend difficile la recherche des motifs structuraux spécifiques d'une fonction donnée, car seule la corrélation entre la position de ces motifs et l'activité enzymatique fournira des éléments pour comprendre et modifier la spécificité de substrat. À partir des résultats de notre étude structurale, nous nous sommes attelés à examiner quelques uns de ces motifs.

#### E Relation structure/fonction chez Tx-Abf

Afin de tester le rôle de certains résidus susceptibles d'être impliqués dans la fixation du substrat et sa sélection, nous avons procédé à l'étude de l'impact de leurs mutations sur la fonctionnalité de Tx-Abf. D'autre part, nous avons investigué la fonction que pourrait avoir le pont disulfure C74-C180 sur la thermostabilité de l'enzyme.



Figure 12 – Structure du X<sub>4</sub>A.

| Substrat         | Enzyme       | $k_{\rm cat}$ (s <sup>-1</sup> ) | $K_{\rm m}$ (mM) | $\frac{k_{\rm cat} / K_{\rm m}}{({\rm s}^{-1} \cdot {\rm m}{\rm M}^{-1})}$ | AS<br>(UI/mg) |
|------------------|--------------|----------------------------------|------------------|--|---------------|
| pNP–Araf         | Tx–Abf       | $426\pm29$                       | 3,5 ± 0,5        | $123\pm24$   | 465 ± 10      |
|                  | Tx-Abf-W248A | $107 \pm 5$                      | 3,1 ± 0,4        | 34,7 ± 6,2   | 89 ± 1        |
| X <sub>4</sub> A | Tx–Abf       | 356 ± 11                         | $2,2 \pm 0,5$    | $160 \pm 41$   | ND            |
|                  | Tx-Abf-W248A | $218 \pm 18$                     | 21,6 ± 2,7       | $10,1 \pm 2,1$   | ND            |

Tableau 7 – Paramètres cinétiques et activité de Tx–Abf et Tx–Abf–W248.

## E.1 Exploration du rôle du résidu W248 dans l'interaction de *stacking* du sous-site (+ 1)

La comparaison structurale de Tx–Abf avec Gs–Abf et l'examen de l'arrimage d'un substrat Ara– $\alpha$ –(1,3)–Xyl ont montré que le résidu W248 situé à l'entrée de la poche catalytique semblait idéalement placé pour former une interaction de *stacking* avec le résidu xylose du sous-site (+ 1). Pour explorer cette hypothèse, nous avons effectué la mutation W248A pour supprimer toute interaction avec le substrat au niveau du sous-site (+ 1) et mesurer ainsi l'activité et les paramètres cinétiques du mutant Tx–Abf–W248A sur un substrat court (pNP–Araf) où ce sous-site n'interviendrait pas *a priori*, et sur un oligosaccharide X<sub>4</sub>A où un résidu arabinose est branché sur le deuxième résidu xylose d'un xylotétraose en partant du côté NR (**Figure 12**).

#### E.1.1 Comparaison de l'activité sur le pNP-Araf

Les activités des deux enzymes ainsi que leurs paramètres cinétiques ont donc d'abord été testées sur le substrat synthétique pNP-Ara*f* (**Tableau 7**). L'affinité de Tx-Abf-W248A pour ce substrat est identique, voire même un peu meilleure que celle de Tx-Abf, mais la constante catalytique de cette dernière est presque quatre fois supérieure, ce qui se traduit par une efficacité catalytique quatre fois plus élevée. La mesure de l'activité spécifique suit la même tendance.

#### E.1.2 Comparaison de l'activité sur le X<sub>4</sub>A

Sur cet oligosaccharide, les mêmes mesures ont été réalisées (**Tableau 7**). Contrairement aux résultats précédents, l'affinité de Tx-Abf-W248A se retrouve presque 10 fois inférieure à celle de l'enzyme sauvage, tandis que sa constante catalytique n'a subi une baisse que de seulement 40% environ. Mais au final, l'activité est plus de quinze fois plus faible. Nous remarquons d'ailleurs que l'affinité de Tx-Abf pour le X<sub>4</sub>A est meilleure que pour le pNP-Ara*f*.

#### E.1.3 Interprétation des résultats et conclusion

Sur le pNP–Ara*f*, les deux enzymes ont globalement des activités du même ordre de grandeur, mais Tx–Abf–W248A est moins active, uniquement à cause d'une baisse de la catalyse et pas de l'affinité au substrat. Cela signifie que la mutation W248A n'a pas engendré de modification de l'arrimage mais par contre défavorise la catalyse, pour une raison qui ne semble pas évidente à déterminer pour le moment.



Figure 13 – Spectres de dichroïsme circulaire normalisés de Tx-Abf et Tx-Abf-C180A.

Sur le  $X_4A$  par contre, l'affinité de Tx-Abf-W248A est très largement diminuée, entraînant une chute de l'activité enzymatique. Ce résultat établit que pour des substrats qui occupent au moins le sous-site (+ 1), la suppression du résidu W248 est préjudiciable à l'arrimage du substrat.

Ce résidu apparaît donc primordial à Tx-Abf pour l'orientation d'arabinoxylooligosaccharides dans la crevasse. Le fait que l'affinité de l'enzyme sauvage pour le X<sub>4</sub>A soit meilleure que pour le pNP-Araf renforce l'idée que le sous-site (- 1) n'est pas le seul soussite d'arrimage de l'enzyme. Mais le gain d'affinité (de 3,5 à 2,2 mM) pourrait être dû à un ou plusieurs résidus xyloses fixés dans les sous-sites R et/ou R'. Néanmoins, l'étude structurale a indiqué que le sous-site (+ 1), de part sa topographie et la présence du résidu aromatique W248 serait le meilleur candidat pour interagir avec un résidu xylose. Et comme la suppression de ce résidu a eu un effet néfaste sur l'affinité, nous proposons que ce résidu crée bien une interaction de stacking en (+ 1), laquelle permettrait d'augmenter l'affinité de l'enzyme pour de courtes chaînes de xyloses ramifiées, et ainsi guiderait le résidu arabinose dans le sous-site (- 1).

#### E.2 Rôle des ponts disulfures

Notre expérience sur l'étude de la thermostabilité de Tx-Xyl a montré l'importance des ponts disulfures dans la thermostabilisation des enzymes. Or, la structure de Tx-Abf comporte deux ponts disulfures, dont l'un participe à la structure de la poche catalytique et se trouve à proximité du résidu catalytique acide/base. L'exploration du rôle du pont à proximité de la dyade catalytique a donc été entreprise.

#### E.2.1 Suppression du pont C74–C180 par mutagenèse dirigée

Afin de s'assurer de la coupure du pont C74–C180, nous avons décidé de réaliser la mutation  $Cys^{180} \rightarrow Ala^{180}$ , qui est préférée à une dénaturation chimique de la cystine. En effet, cette dernière méthode peut parfois échouer à rompre des liaisons disulfures difficilement accessibles, comme c'est le cas du pont considéré qui se trouve coeur du site actif, dans la poche catalytique. Le mutant ainsi formé Tx–Abf–C180A a été séquencé, la mutation confirmée, puis il a été exprimé et purifié avec la méthode usuelle.

#### E.2.2 Caractérisation biochimique

L'analyse du mutant par SDS-PAGE a indiqué la présence d'un échantillon pur et une masse apparente identique à celle de l'enzyme sauvage. Le calcul de l'activité spécifique de



Figure 14 – Thermostabilité de Tx–Abf et Tx–Abf–C180A à 80°C.



Figure 15 – Courbes de dénaturation thermique normalisées de Tx-Abf et Tx-Abf-C180A obtenues par mesure du dichroïsme circulaire à 222 nm.

Tx-Abf-C180A a fourni une valeur de 341 UI/mg contre 360 UI/mg pour Tx-Abf, ces valeurs étant considérées comme identiques, considérant les incertitudes relatives.

L'analyse par dichroïsme circulaire nous a renseigné sur les éventuels changement structuraux que la rupture du pont aurait pu engendrer. Les spectres de dichroïsme circulaire normalisés des deux enzymes présentent tous les deux un double minimum correspondant aux hélices  $\alpha$  du *TIM-barrel*, mais aucune différence n'est observable (**Figure 13**).

#### E.2.3 Caractérisation de la thermostabilité

Pour découvrir des différences de thermostabilité, nous avons procédé à une mesure de la thermostabilité des deux enzymes en les incubant à 80°C pendant plusieurs heures, puis en testant leurs activités résiduelles à 60°C (**Figure 14**). Les deux enzymes ont été presque inactivées après 3 h d'incubation et l'ont été totalement après 6 h. Les profils de dénaturation des deux enzymes sont très proches, Tx-Abf-C180A paraît résister aussi bien que Tx-Abf à l'incubation à 80°C. Les temps de demi-vie sont d'ailleurs presque égaux : 1,10 h pour Tx-Abf et 0,98 h pour Tx-Abf-C180A, ce qui représente moins de 10% de baisse d'activité.

La dénaturation thermique par dichroïsme circulaire nous a aussi permis de calculer la température de fusion de ces protéines (**Figure 15**). Nous avons noté une différence assez sensible au niveau des courbes de dénaturation thermique, ce qui s'est traduit par une  $T_{m (app)}$  de 71,7°C pour Tx–Abf, supérieure de presque 2°C à celle de Tx–Abf–C180A qui atteint 69,8°C. Mais pour les deux enzymes, la dénaturation thermique s'est révélée irréversible, donc les températures de fusion calculées ont été apparentes.

#### E.2.4 Interprétation des résultats et conclusion

La suppression du pont disulfure C74–C180 de Tx–Abf par mutagenèse dirigée n'a eu qu'une incidence faible sur le temps de demi-vie à 80°C (diminution de 10%), ainsi que sur l'activité résiduelle après différents temps d'incubation à 80°C. Par contre, l'écart observé lors du calcul des températures de fusion apparentes est plus conséquent puisqu'il a atteint 2°C. Cette dernière mesure tendrait à montrer que le mutant sans pont disulfure serait moins stable que l'enzyme native, alors que les mesures d'activité n'ont montré qu'un mince écart. En fait, deux hypothèses pour expliquer cette inadéquation existent :

- soit il n'existe pas de corrélation évidente directe entre  $T_{m (app)}$  et  $t_{1/2}$ , comme nous avions pu le constater lors de notre étude sur la thermostabilité de Tx-Xyl; donc

même un écart de  $T_{m (app)}$  qui peut sembler important n'implique pas de différence de  $t_{1/2}$  de même amplitude ;

 soit cette différence est due au protocole de mesure de la thermostabilité employé : lors des mesures d'activité résiduelle à 60°C, les enzymes qui étaient incubées à 80°C ont peut-être le temps de se renaturer, avec ou sans pont disulfure pour assister leur repliement, ce qui induirait des mesures de temps de demi-vie identiques.

Il aurait fallu pouvoir réaliser les mesures d'activité à  $80^{\circ}$ C, ce qui était malheureusement impossible d'un point de vue technique. Quoiqu'il en soit, le pont C74–C180 de Tx–Abf ne semble pas posséder de rôle prépondérant, ni dans la structuration du site actif, puisque sa suppression ne change pas l'activité, ni dans la thermostabilisation de Tx–Abf; son importance (s'il en a une) reste encore à démontrer.

#### F Conclusion générale

L'analyse par cristallographie aux rayons X d'un dérivé sélono-méthionylé de l'Abf–51 de *Thermobacillus xylanilyticus* a permis de déterminer sa structure 3D à une résolution de 2,1 Å, il s'agit seulement de la deuxième structure résolue dans cette famille à ce jour. Son analyse structurale a révélé une architecture catalytique en domaine  $(\beta/\alpha)_8$ , avec une poche catalytique assez profonde en son milieu, accompagnée d'un domaine en *jelly-roll* en C–ter dont la fonction est encore inconnue pour le moment.

La comparaison avec l'Abf–51 de *Geobacillus stearothermophilus* a révélé que Tx–Abf a la particularité de posséder deux ponts disulfures, dont l'un nous a semblé dans un premier temps structurer le site actif, mais sa suppression n'a engendré ni changement dans l'activité enzymatique, ni dans la thermostabilité, du moins dans les conditions testées. Cette observation pourrait être expliquée par le fait que les résidus qui interagissent avec un petit substrat pNP–Araf sont les mêmes chez ces deux enzymes, et eux seuls sont donc importants pour l'arrimage du substrat.

La différence la plus évidente entre ces Abf–51 est la symétrie de leur sillon catalytique par rapport à l'axe principal, avec notamment un résidu Trp conservé qui se trouve juste en amont du site actif. Nous avons pu montrer que ce résidu  $Trp^{248}$  chez Tx–Abf avait une influence notable sur l'activité uniquement avec un oligosaccharide, indiquant son rôle capital sur la fixation et l'orientation du substrat.

Des travaux sont en cours pour finaliser l'analyse structurale de complexes de Tx–Abf avec le substrat X<sub>4</sub>A, ce qui nous renseignera sur le mode de fixation de ce substrat et précisera la présence de sous-sites sur les côtés R et R' comme nous l'avons envisagée. De plus, le rôle de la longue boucle  $\beta 2\alpha 2$  du *TIM-barrel* et de son mouvement éventuel pourra être précisé. D'autre part, grâce à cette structure, de nouveaux résidus influençant la stéréospécificité de l'enzyme pourront être mutés, et à termes, le comportement de Tx–Abf sera probablement mieux appréhendé et permettra de la transformer en outil de transglycosylation encore plus performant.

# Chapitre VI

# Conclusions générales et Perspectives

### CHAPITRE VI - CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

Notre travail sur les deux hémicellulases Tx–Xyl et Tx–Abf a pu mettre en évidence combien il était délicat d'établir des relations univoques généralisables entre la structure et la fonction d'une enzyme. Néanmoins, sur les enzymes considérées, de nouvelles pistes ont été investiguées et ont apporté de nouveaux résultats qui pourraient représenter de futurs axes de recherche.

Dans le cas de l'amélioration de la thermostabilité de Tx-Xyl, plusieurs facteurs de thermostabilisation des enzymes étant connus, nous avons choisi de transférer chez cette enzyme le facteur qui était le plus facile à mettre en oeuvre et le plus étudié chez les xylanases, c'est-à-dire l'ajout de pont disulfures. Les résultats ont montré que même une enzyme thermostable pouvait voir sa thermostabilité et sa thermoactivité augmenter, sans modification pour autant de son optimum. Donc certains facteurs de thermostabilisation connus possédent des effets additifs. Le problème qui se pose aujourd'hui est de pouvoir quantifier leurs effets à l'avance et de pouvoir prédire la limite où ces facteurs peuvent encore être additionnés, certains n'ayant pas le même effet chez une enzyme ou une autre.

En ce qui concerne l'objectif des travaux de thermostabilisation, c'est-à-dire faciliter l'utilisation d'une température plus élevée pour induire une meilleure déstructuration de la matière végétale, cette stratégie n'a pas permis d'obtenir les résultats escomptés. L'utilisation d'une température de réaction de 70°C au lieu de 60°C n'a pas eu d'effet sur le rendement final. Il est probable que des températures bien plus élevées (supérieures à 100°C) seraient nécessaires pour avoir un impact mesurable sur la réaction. Cependant, cette stratégie de themostabilisation de Tx–Xyl a tout de même permis une augmentation du rendement d'hydrolyse, et ce à une température modérée (60°C). Ce résultat inattendu est très intéressant, car il indique que des changements subtils de structure peuvent permettre des augmentations de la performance enzymatique. Cependant, l'origine de cet accroissement de rendement est loin d'être claire.

Pour l'instant, l'hypothèse la plus probable est que l'enzyme accèderait plus facilement à des zones du substrat inaccessibles à l'enzyme sauvage, peut-être grâce à une hydrophobie restreinte ou encore à une oligomérisation de la protéine mutante en solution différente de

celle de la protéine native. Le comportement de Tx–Xyl–SS3 en solution devrait être mieux caractérisé par des mesures de chromatographie sur gel filtration pour déterminer sous quelle forme elle existe en solution, et comment l'introduction de ponts disulfures influe sur son état.

Pour mieux préciser le mécanisme de cette augmentation de performance enzymatique, plusieurs pistes sont à explorer. D'abord, il faudra comparer la performance de Tx–Xyl et de Tx–Xyl–SS3 sur d'autres substrats. Ceci permettra d'établir si le changement de rendement observé est lié à la structure particulière du son de blé, ou bien si le phénomène est plus général. Ensuite, une démarche expérimentale faisant appel aux outils d'analyse tels que la microscopie ou l'immunomarquage de l'enzyme pourrait permettre de suivre la progression de Tx–Xyl–SS3 dans les tissus qui constituent le son de blé. Enfin, une analyse de l'action de Tx–Xyl–SS3 sur des arabinoxylanes du son de blé présentant des rapports X/A différents permettrait de vérifier que la spécificité de Tx–Xyl–SS3 est inchangée.

L'ingénierie du pouce de Tx–Xyl a établi que cette boucle joue un rôle essentiel dans la catalyse enzymatique, puisque sa suppresion annihile tout activité xylanolytique, tandis que le repliement de l'enzyme et son affinité pour des xylo-oligosccharides de DP 4 ou 5 demeurent inchangés. Par ailleurs, le pouce sert de motif de sélection du substrat, en son absence l'enzyme présente autant d'affinité pour des cello-oligosaccharides de DP 4 que pour des xylo-oligosaccharides de DP 5. D'ailleurs, le moindre changement de la géométrie du pouce, notamment via la délétion de ses résidus charnières, déclenche une perte de catalyse enzymatique essentiellement due à une diminution de la constante catalytique. L'extrémité du pouce conservée chez les Xyl–11 semble jouer un rôle capital pour la reconnaissance du substrat et le relargage des produits de réaction. L'étude prochaine du mouvement du pouce par robotique moléculaire devrait permettre de créer un modèle de sa dynamique en présence de substrat et évaluer le rôle de diverses mutations en corrélation avec la mesure des paramètres cinétiques correspondants.

Quant à Tx–Abf, la résolution de sa structure a permis d'ouvrir la voie vers la compréhension des multiples réactions que cette enzyme est capable de catalyser. Au contraire de Tx–Xyl qui est spécifique et très active sur un substrat donné, Tx–Abf est bien plus versatile et catalyse des réactions de stéréospécificité variée. L'analyse de sa structure a dévoilé une architecture globale identique à celle de l'autre Abf de structure connue de la même famille 51, mais certains éléments structuraux sont uniques. En particulier, la présence de deux ponts

disulfures avérés est indédite chez une Abf-51, mais le rôle de celui participant à la structure du site actif, malgré sa suppression, reste encore à déterminer, en tout cas il ne semble pas influencer la thermostabilité de l'enzyme. Par contre, le résidu Trp<sup>248</sup> situé à l'entrée de la poche catalytique au niveau d'un hypothétique sous-site (+1) s'est révélé essentiel quant à l'arrimage d'arabinoxylo-oligosaccharides X<sub>4</sub>A, sa suppression engendrant une perte conséquente de l'efficacité catalytique. Même si le mode d'arrimage d'un résidu arabinose dans le sous-site (-1) semble conservé chez les Abf-51, la résolution prochaine de la structure du complexe Tx-Abf:X4A devrait sans doute permettre d'affiner la nature des interactions existantes. Le mouvement supposé de la boucle  $\beta 2\alpha 2$  du domaine catalytique apparaît comme un motif spécifique des Abf-51 qu'il conviendra aussi d'examiner attentivement. Les informations recueillies aideront certainement à mieux cerner les déterminants de la stéréo/régio-sélectivité de Tx-Abf et à comprendre le déroulement du cycle catalytique. Notamment, ce travail pourrait aboutir à la création d'un outil de synthèse de galacto-furano-oligosaccharides liés en  $\beta$ -(1,5) ou  $\beta$ -(1,6) d'intérêt thérapeutique potentiel. Par ailleurs, les données recueillies serviront à améliorer l'action de Tx-Abf sur des polymères, pour en faire un partenaire plus performant des xylanases lors de la dégradation de la matière lignocellulosique.

# Annexes

| Acides aminés | Masses<br>molaires (Da)    |  |  |
|---------------|----------------------------|--|--|
| Ala           | 89,09                      |  |  |
| Arg           | 174,20                     |  |  |
| Asn           | 132,12                     |  |  |
| Asp           | 133,10                     |  |  |
| Cys           | 121,16                     |  |  |
| Gln           | 146,15                     |  |  |
| Glu           | 147,13                     |  |  |
| Gly           | 75,07                      |  |  |
| His           | 155,16                     |  |  |
| Ile           | 131,17                     |  |  |
| Leu           | 131,17                     |  |  |
| Lys           | 146,19<br>149,21<br>165,19 |  |  |
| Met           |                            |  |  |
| Phe           |                            |  |  |
| Pro           | 115,13                     |  |  |
| Ser           | 105,09                     |  |  |
| Thr           | 119,12                     |  |  |
| Trp           | 204,23                     |  |  |
| Tyr           | 181,19                     |  |  |
| Val           | 117,15                     |  |  |

#### Masses molaires des acides aminés

#### Code génétique



|        |                      | Т |       |
|--------|----------------------|---|-------|
|        | Т                    | С | ILE   |
|        |                      | Α |       |
|        |                      | G | MET   |
|        |                      | Т |       |
|        | $\mathbf{C}$         | С | ТНР   |
| •      |                      | Α |       |
| Λ      |                      | G |       |
| H      |                      | Т | ASN   |
|        | Λ                    | С | 11011 |
|        | $ $ $\boldsymbol{A}$ | Α | LYS   |
|        |                      | G | 215   |
|        |                      | Т | SER   |
|        | C                    | С | SER   |
|        | U                    | Α | ARG   |
|        |                      | G |       |
|        | Т                    | Т |       |
|        |                      | C | VAL   |
|        |                      | A |       |
|        |                      | G |       |
|        | С                    | Т |       |
|        |                      | C | ALA   |
| $\sim$ |                      | A |       |
|        |                      | G |       |
| U      |                      | Т | ASP   |
|        | A                    | C |       |
|        |                      | A | GLU   |
|        |                      | G |       |
|        | G                    | T |       |
|        |                      | C | GLY   |
|        |                      | A |       |
|        |                      | G |       |

## Composition du milieu minimal pour l'expression de protéines sélénométhionylées

Pour 1,5 L de milieu dans l'eau doublement distillée, ajouter :  $(NH_4)_2SO4$ 1,5 g  $KH_2PO4$ 6,75 g K<sub>2</sub>HPO4 15,75 g Citrate de sodium 0,75 g Tous les acides aminés sauf la Met 63 mg chacun Mélange des 4 bases nucléotidiques 187,5 mg de chaque base Après autoclavage, ajouter successivement les composés suivants, stérilisés par filtration : 18,75 mL Glucose à 40% v/v MgSO<sub>4</sub> 1M 1,5 mL Thiamine 10 mg/mL 0,6 mL D-biotine 2 mg/mL 3.0 mL

#### Rappel sur les calculs d'incertitude de mesures

L-Se-Met 10 mg/mL

Addition et soustraction de mesures : on additionne les *erreurs absolues*. Ex. : 10 cm à 5% + 5 cm  $\pm$  1 cm = 10 cm  $\pm$  0,5 cm + 5 cm  $\pm$  1 cm = 15 cm  $\pm$  1,5 cm

4,5 mL

Multiplication et division de mesures : on additionne les erreurs relatives.

Ex.:  $\frac{20 \text{ cm} \pm 2 \text{ cm}}{10 \text{ cm} \pm 4 \text{ cm}} = \frac{20 \text{ cm} à 20\%}{10 \text{ cm} à 40\%} = 2 \text{ cm} à 60\% = 2 \text{ cm} \pm 1,2 \text{ cm}$
#### Amorces sens et anti-sens utilisées au cours des études de mutagenèse

Les amorces sont classées par ordre d'apparition dans les chapitres et en fonction de la mutation effectué, elles sont écrites dans le sens  $5' \rightarrow 3'$ , l'amorce sens (*forward*) précédant l'amorce antisens (*reverse*). Les codons mutés sont soulignés.

| Chapitre III  |  |
|---|--|
| $Asn^1 \rightarrow Ala^1$   | CTTTAAGAAGGAGATATACATATG <u>GCC</u> ACGTACTGGCAGTATTGG<br>CCAATACTGCCAGTACGT <u>GGC</u> CATATGTATATCTCCTTCTTAAAG |
| $\mathrm{Ser}^{98} \rightarrow \mathrm{Cys}^{98}$                                 | GGCAGCGTGTAC <u>TGC</u> GACGGCGCATGG<br>CCATGCGCCGTC <u>GCA</u> GTACACGCTGCC                                     |
| $Asn^{145} \rightarrow Cys^{145}$   | CCATCACGTTCGAG <u>TGC</u> CACGTGAACGCATGG<br>CCATGCGTTCACGTG <u>GCA</u> CTCGAACGTGATGG                           |
| Insertion de Cys <sup>-1</sup> et Ala <sup>1</sup> $\rightarrow$ Gly <sup>1</sup> | GGAGATATACATATG <u>TGC</u> GCCACGTACTGGCAG<br>CTGCCAGTACGTGGC <u>GCA</u> CAT ATG TATATCTCC                       |
| Insertions de Gly <sup>183</sup> et Cys <sup>184</sup>                            | CCAACGTCACGGTTTGG <u>GGCTGC</u> TAAGAATTCGAAGC<br>GCTTCGAATTCTTA <u>GCAGCC</u> CCAAACCGTGACGTTGG                 |

#### **Chapitre IV**

| Val <sup>35</sup> → codon dégénéré   | GCAACAGCGGCAACTTC <u>NNN</u> ATCGGCAAGGGCTGGC<br>GCCAGCCCTTGCCGAT <u>NNN</u> GAAGTTGCCGCTGTTGC     |
|--|--|
| Pro <sup>114</sup> −Ser <sup>115</sup> −Ile <sup>116</sup> → codons<br>dégénérés | TGGCGCTACAACGCA <u>NNNNNNNNG</u> ACGGCACGCAGACG<br>CGTCTGCGTGCCGTC <u>NNNNNNNN</u> TGCGTTGTAGCGCCA |
| $\operatorname{Ser}^{115} \to \operatorname{Gly}^{115}$                          | GCTACAACGCACCG <u>GGG</u> ATCGACGGCACGC<br>GCGTGCCGTCGAT <u>CCC</u> CGGTGCGTTGTAGC                 |
| $Ile^{116} \rightarrow Cys^{116}$  | GCTACAACGCACCGTCC <u>TGC</u> GACGGCACGCAG<br>CTGCGTGCCGTC <u>GCA</u> GGACGGTGCGTTGTAGC             |
| $Ile^{116} \rightarrow Ala^{116}$  | AACGCACCGTCC <u>GCC</u> GACGGCACGCAG<br>CTGCGTGCCGT <u>CGG</u> CGGACGGTGCGTT                       |
| $\operatorname{Tyr}^{111} \to \emptyset$   | CTATCACAGCTGGCGCAACGCACCGTCCATCG<br>CGATGGACGGTGCGTTGCGCCAGCTGTGATAG                               |

| $\operatorname{Thr}^{121} \to \emptyset$  | CCGTCCATCGACGGCCAGACGTTCCAAC<br>GTTGGAACGTCTGGCCGTCGATGGACGG                                 |
|---|--|
| Ala <sup>113</sup> –Pro <sup>114</sup> –Ser <sup>115</sup> –Ile <sup>116</sup> –Asp <sup>117</sup> $\rightarrow \emptyset$          | CAGCTGGCGCTACAACGGCACGCAGACGTTCCAAC<br>GTTGGAACGTCTGCGTGCCGTTGTAGCGCCAGCTG                   |
| $\mathrm{Trp}^{109}-\mathrm{Arg}^{110}-\mathrm{Tyr}^{111}-\mathrm{Asn}^{112}\rightarrow \varnothing$                                | TATGACCTCTATCACAGCGGCACGCAGACGTTC<br>GAACGTCTGCGTGCCGCTGTGATAGAGGTCATA                       |
| $\operatorname{Val}^{35} \to \operatorname{Ala}^{35}$   | CAACAGCGGCAACTTC <u>GCA</u> ATCGGCAAGGGCTGG<br>CCAGCCCTTGCCGAT <u>GCA</u> GAAGTTGCCGCTGTTG   |
| $\mathrm{Tyr}^{78}  ightarrow \mathrm{codon} \mathrm{d}\mathrm{\acute{e}g}\mathrm{\acute{e}n}\mathrm{\acute{e}r}\mathrm{\acute{e}}$ | ACCCGCTCATCGAATAC <u>NNN</u> GTCGTCGACAGCTGG<br>CCAGCTGTCGACGAC <u>NNN</u> GTATTCGATGAGCGGGT |

#### Chapitre V

| $\mathrm{Trp}^{248} \rightarrow \mathrm{Ala}^{248}$ | GTTCCGGGCCCC <u>GCG</u> GAGAAGAAAGGACC<br>GGTCCTTTCTTCTC <u>CGC</u> GGGGCCCGGAAC         |
|---|--|
| $\mathrm{Cys}^{180} \rightarrow \mathrm{Ala}^{180}$ | AACGAGAACTGGGGC <u>GCA</u> GGCGGCAACATGCGC<br>GCGCATGTTGCCGCC <u>TGC</u> GCCCCAGTTCTCGTT |

#### Alignement de séquences partiel des Abf-51

|  |            | 290                      |                         | 300                             | 310                  | 320                                     | 330                   | 34                    | 0 350                                    | 36                        | 0 37                     | 0 38                          | 0 39                      | 0 40                       | 00 41                        | 0 420                    | D          |
|--|------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------|----------------------|---|-----------------------|-----------------------|--|---------------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------|------------|
| Thermobacillus xylanilyticus                               | 54         |                          | <mark>D</mark> VLE      | AL KQMKI                        | PV <mark>LRW</mark>  | P <mark>GGC</mark> AD                   |                       | <mark>E</mark> THWKD  | G <mark>V</mark> CPR <mark>B</mark> KRKR | MVNT                      | н <mark>w</mark> gg      | VIEN HF                       | •TH <mark>E •</mark> MMLC | LLCCEPY                    | SGN <mark>V</mark> GSGTV-    |                          | 135        |
| Alicyclobacillus acidocaldariu<br>Arabidopsis thaliana 2   | 258<br>123 | GLNAAVWDSG               | LNSQTVIS                | EV QALHP<br>MM VDLKP            | ALIRW<br>RFIRE       | PCCSISD<br>PCCCFVEGDW                   | LGN                   | NYNWET                | NTRNDGGYVN<br>TVRAWEERP-                 | PGHYGD                    | v <mark>n</mark> k       | YWTDDGL                       | TFDN MQFVN                | A <mark>VC</mark> ASPI     | TVNYGTGTP-                   |                          | 340<br>188 |
| Arabidopsis thaliana                                       | 249        |                          | <mark>DL</mark> FQ      | MM ADIKP                        | PRF IR P             | P <mark>GGC</mark> EVEGEW               | LSN                   | AFRWKE                | TVCPWEERP-                               | GHFGD                     | v <mark>w</mark> k       | YWTDDGL                       | CHFEFFQMAB                | DICAAPIWVE                 | NNGISHNDE-                   |                          | 331        |
| Aspergillus kawachi<br>Aspergillus awamori                 | 226        |                          | QLAN                    | VL ADMKG                        | SFLR                 | PGGNNLEGNS                              | AEN                   | RWKWNE                | TICDLWDRPG                               | REGIWI                    |                          | YYNTDGL                       | LHEYFYWCE                 | DLCLVPVLG                  | WDGFALESG-                   |                          | 313        |
| Aspergillus niger<br>Bacillus balodurans?                  | 226<br>52  |                          | QLAN                    | VL DDMKG                        | SFLRE                | PGGNNLEGNS                              | AEN                   |                       | TICDLCDRPG                               | REGTWT                    | H <sup>O</sup> GG        | YYNTDGL                       | CLHEY FYWCE               | DLCLVPVLG                  | WDGFALESG-                   |                          | 313        |
| Bacillus halodurans  | 53         |                          | DVIR                    | LV QELQV                        | PLVRY                | P <mark>GGN</mark> FVS                  |                       | GYNWED                | GVC PVSERPK                              | RLDL                      | Awr                      | TTET EI                       | TNE VDWAK                 | KVSAEVN                    | AVNLGSRGV-                   |                          | 133        |
| Bacillus subtilis2<br>Bacillus subtilis                    | 53<br>52   |                          | DVLE                    | AL KOLHI<br>LI KELOV            | PVLRW                | PCCCEAD                                 |                       | EHWAN                 | GVCDRKT<br>GVCPVPNRPR                    | MLNT<br>RLDL              | H0GG                     | TIES EF                       | THE MMLCE                 | LIECEPY                    | AVNLGTRGI-                   |                          | 131        |
| Bacteroides ovatus2  | 73         |                          | DVFN                    | AL KDLSV                        | 'PV <mark>LRW</mark> | P <mark>GGCE</mark> AD                  |                       | EYHWMD                | G <mark>IC</mark> PKENRPK                | MVNN                      | NWGG                     | TIED SF                       | • THE CLNLCE              | MLCCEPY                    | SGNVGSGTV-                   |                          | 154        |
| Bifidobacterium longum                                     | 222<br>94  |                          | DLAQ                    | LV KELGV                        | TCVFR                | PGGCIVEGID<br>PGGNEVS                   | LET                   | NNNED                 | GICPRENEP-                               | RRDL                      | AWH                      | CTET EM                       | IDD YRWS                  | KACTEIM                    | AVNMGTRGL-                   | ND                       | 174        |
| Caulobacter crescentus                                     | 75<br>72   |                          | DVVG                    | AL KAIKT                        | PVIRW                | PGGCEAD                                 |                       |                       | GICPRDKRPS                               | RKNN                      | WWGG                     | SPET AF                       | THE MDFAR                 | QVCADPY                    | AVNVGSSNP-                   |                          | 156        |
| Clostridium acetobutylicum                                 | 236        |                          | DLVE                    | RL KDLKP                        | RFLR                 | PGCCIVEGNS                              | KEE                   | INNWKD                | TICNVEERK-                               | ENT-N                     | LWG                      | YNQSYGL                       | FYEVFQLCE                 | DICATPVPVI                 | NCGMTCQARG                   | VNGV                     | 328        |
| Clostridium cellulovorans<br>Clostridium stercorarium      | 51<br>51   |                          |                         | AL KETKL                        | PVLRW                | PGGCEAD                                 |                       | EYHWKD                | GICDPEMRPR                               | MVNA<br>MINT              | HWGG                     | TVEN HF                       | TDE MELCR                 | MLSAEPY                    | NGNVGSGTV-                   |                          | 132        |
| Cytophaga xylanolytica2                                    | 86         |                          | <mark>DV</mark> VK      | AL KATKV                        | 'PN <mark>VRW</mark> | P <mark>GGC</mark> FAD                  |                       | QYHWRD                | GICAPEERKS                               | RINV                      | s <mark>w</mark> GG      | SPEANTF                       | THE FDFIS                 | QISSEAFI                   | SANVGSGTV-                   |                          | 167        |
| Cytophaga xylanolytica<br>Fibrobacter succinogenes         | 72<br>281  | LAMYIDNNDW               | SGVTYSLG                | AL RDMKV<br>EG KFIDL            | SKVRD                | RCCEAD                                  | KLGGE                 | TNNRD<br>KLYVGILDNO   | GICPKQNRPS<br>GNDIKSOTKV                 | IVNI<br>GLNDWIKVSK        | HUGG                     | VTED SF<br>R-FTDKGKAW         | OTHE FDFCE                | LICAEPY<br>DIKWDKIOE       | NLNVGSGTV-                   | GEPGKPAPVT               | 153        |
| Geobacillus stearothermophilus                             | 54         |                          | DVIE                    | LV KELQV                        | PIIRY                | P <mark>GGN</mark> FVS                  |                       | GYNNED                | GVCPKEQRPR                               | RLDL                      | Awk                      | SVET EI                       |                           | MVGAEVN                    | AVNLGTRGI-                   |                          | 134        |
| Hordeum vulgarez<br>Hordeum vulgare                        | 239        |                          | BLIS                    | ML LDLKP                        | RFLR                 | PGGCEVEGEW<br>PGGCEVEGSW                | LRN                   | ARWRD                 | SICPWEERP-                               | GHYGD                     | vwn                      | YWTDDGL                       | YYE LQLAR                 | DLCAAPIWVF                 | 7 NNGISHNDE-                 |                          | 329        |
| Malus domestica<br>Mesorbizobium loti                      | 245        |                          | DLVQ                    | ML ADLKP                        | RFFR                 | PGGCEVEGEW                              | LRN                   |                       | TICPWEERP-                               | GHFGD                     | VWM                      | YWTDDGL                       | CYFE LQLSE                | DLCSLPIWVE                 | NNGISHNDQ-                   |                          | 333        |
| Oryza sativa   | 246        |                          | DLAS                    | ML ANLKP                        | QFLK                 | P <mark>GGNY</mark> AMGNY               | LRN                   |                       | TV°PWEERP-                               | GHFND                     | Awg                      | YWTDDGL                       | FFEELQLAS                 | DLCASPVWV                  | NDGASQNEE-                   |                          | 334        |
| Sinorhizobium meliloti<br>Streptomyces chartreusis         | 51<br>227  |                          | DVLD                    | MV RDLDM                        | IPIVRY<br>GFVR       | PGGNEVS                                 | MEDYSAASGW            | ORKRSYONKD            | GICPREERPV                               | RLDL<br>TNA-N             | AWR                      | TRET QV                       | VNE ADWAK                 | LASTEMMI                   | AMNLGSRGL-                   |                          | 131        |
| Streptomyces coelicolor2                                   | 226        |                          | <mark>dl</mark> ae      | KI EALHP                        | GFLR                 | P <mark>GG</mark> CLVNTGS               | MEDYSADSGW            | QRKRSYQWKD            | TICPVEERA-                               | TNA-N                     | F <mark>w</mark> G       | YNQSYGL                       | SYYEY FRFAE               | DICAMPLPV                  | PALVTGCGQ-                   |                          | 324        |
| Streptomyces coelicolor<br>Streptomyces lividans           | 52<br>52   |                          | DVLE                    | LV RELGV<br>LV RELGV            | TAVRY<br>TAVRY       | PGGNEVS<br>PGGNEVS                      |                       | GYKNED                | SV PVBDRPR<br>SV PVBDRPR                 | RLDL<br>RLDL              | ANR                      | STET RF                       | LSEVIAFL                  | KI PQAEPM<br>KI PQAEPM     | AVNLGTRGV-                   |                          | 134        |
| Thermotoga maritima  | 51         |                          | <mark>DV</mark> LE      | AV KRIKV                        | 'PN <mark>LRW</mark> | P <mark>GG</mark> NFVS                  |                       | NYHWED                | G <mark>IC</mark> PK <mark>D</mark> QRPV | RFDL                      | А <mark>w</mark> Q       | QEETNRF                       | oTDEFIEYCR                | EI <mark>C</mark> AEPYI    | SINMGTGTL-                   |                          | 131        |
|  |            | 430                      |                         | 440                             | 450                  | 460                                     | 470                   | 48                    | 0 490                                    | 50                        | 0 51                     | 0 52                          | 0 53                      | 0 54                       | 10 55                        | 560                      | 0          |
| Thermobacillus xylanilyticus                               | 135        |                          | Q <mark>D</mark> M      | .   <br>SE W <mark>VE</mark> VI | <br>TFDGE            | SPMANWRREN                              | <br><mark>c</mark> re |                       | <br>K <u>PW</u>                          | RIKYWG <mark>VC</mark> NE | <br>NWGCGGNM             | <br>RAEY <mark>Y</mark> ADLYR | QFQTY <mark>I</mark> RNY- | GDNK HK                    | <br>C GANTADYHWT             | <br>EVLMKQA              | 230        |
| Alicyclobacillus acidocaldariu                             | 340        |                          | QLA                     | AD WVKVA                        | DVTHH                | DNVLYWEIGN                              | EIYGNGYYNG            |                       | NGW                                      | EADDHAVPNO                | PQKGNPGL                 | SPQAYAQNAL                    | QFIQAMRAVD                | PNIKIGAVLI                 | MPYNWPWGAT                   | VNGNDDWNTV               | 446        |
| Arabidopsis thaliana                                       | 337        | VETAS                    | IMPFVQEA                | LD GIE A                        | RGDAN                | stwgsv <mark>r</mark> akm               | RQ                    |                       | EPE                                      | ELKYVAICNE                | DC                       | GKTYRGNYI                     | VFYDAIKKA-                | -YPDIKIISN                 | CDGSSHPLD-                   | -HPADYYDYH               | 436        |
| Aspergillus kawachi<br>Aspergillus awamori                 | 313<br>313 | -GNTPITGDA<br>-GNTPITGDA | LTPYIDDV                | LN ELEVI<br>LN ELEVI            | LGDTS                | TYGAWRAAN                               | QE                    |                       | EPW                                      | NI TMVEI CNE              | DMLGG                    | GCESTAERFT                    | AFYDAIHAA-                | -YPDUILUAS                 | 5 TSEADCLPES<br>5 TSEADCLPES | MPEGSWVDYH<br>MPEGSWVDYH | 421        |
| Aspergillus niger  | 313        | -GNTPLTGDA               | LTPYID <mark>D</mark> V | LN ELEVI                        | LGDTS                | T TYGAW <mark>R</mark> AAN              | QE                    |                       | EPW                                      | NLTMVEICNE                | DMLGG                    | GCESTAERFT                    | AFYDA <mark>I</mark> HAA- | -YPDLILIAS                 | 5 TSEADCLPES                 | MPEGSWVDYH               | 421        |
| Bacillus halodurans2<br>Bacillus halodurans                | 133        |                          |                         | RN LVEYC                        | NHPSG                | SYMANWRIEN<br>SYWSDLRISH                | скв                   |                       | DPH                                      | NIKTWCLONE                | NWGCGGHM<br>MDGPWQIGQK   | TAEE GRVAA                    | EAGKVMKLV-                | -DPSIELVAC                 | GANVDDYRWT<br>GSSNSKMATF     | ADWEATVLDH               | 228        |
| Bacillus subtilis2   | 131        |                          | Q <mark>B</mark> M      | SE WIEVM                        | TFEEG                | TPMSDWRKQN                              | RE                    |                       | EPW                                      | KLKYFGVONE                | NWGCGGNM                 | HPEY ADLYR                    | RFQTY <mark>V</mark> RNY- | SGNDTYKTAG                 | GANVDDFNWT                   | DVLMKKA                  | 226        |
| Bacteroides ovatus2  | 154        |                          | EEL                     | AK WVEYM                        | ITSDGD               | SIWSDLERSH<br>SPMANL <mark>R</mark> RKN | RD                    |                       | KAW                                      | KLKYLGVGNE                | SWGCGGSM                 | RPEY ADLYR                    | RYSTYCRNY-                | DGNRUFKIAS                 | GASDYDYKWT                   | DVLMNRV                  | 249        |
| Bacteroides ovatus<br>Rifidobacterium longum               | 322        | -PKAHVAVCD               | LDNYIQDA                | LD LIEFA                        | NGNVN                | TTWGKVRADM                              | HP                    |                       | AP <mark>F</mark>                        | NIKFIGICNE                | MDGBWOVGWN               | GK-EVPERLE                    | PFIKAIRKA-                | -HPEIKIVGS                 | SGPNSEGKD-                   | -FDYLWPEMK               | 424        |
| Caulobacter crescentus                                     | 156        |                          | TVM                     | RE WIEVM                        | TSPGE                | DTLAQERRAN                              | RD                    |                       | KPW                                      | KVPFIGIONE                | SWGCGGEN                 | TPEYNANEYR                    | RFSSFFHKN-                | SDNPAVRVAS                 | GANSFDVNWT                   | DVVTKAA                  | 251        |
| Cellvibrio japonicus2<br>Clostridium acetobutylicum        | 153<br>329 | PNYMAPVGPD               | LDPYIONA                | AE WLEYM<br>VD LVEVA            | ITAEGK               | STLAELRRKN                              | RD                    |                       | KPF                                      | QVQYFAICNE<br>NLKYMAICNE  | AWGCGGNN                 | GP-EYHKRFE                    | HYATFLKAP-                | AHNAPKL                    | G-GHTEDTSW<br>AGTSPSGST-     | AAHLTAN<br>-FDDNWNWIK    | 247<br>431 |
| Clostridium cellulovorans                                  | 132        |                          | Q <mark>E</mark> M      | RE WIEVM                        | TFDGE                | SPMANL <mark>R</mark> AAN               | • RK                  |                       | NPW                                      | EIKYFG <mark>VC</mark> NE | SWGCGGNN                 | RPEYNADLFR                    | RYGSY <mark>V</mark> RNF- | SGNQVYK I AC               | GPNSVDYNWT                   | EVLMREA                  | 227        |
| Ciostridium stercorarium<br>Cytophaga xylanolytica2        | 131        |                          | QBS.                    | AD WLEYL                        | TASG-                | SPMSELRAKN<br>STLALERARN                | HP                    |                       | DPY                                      | DVAFWGVCNE                | NWGCGGNM<br>VWGCGGPF     | TPQEXITELK                    | KFATFTNNYN                | ANVNTQFVAV                 | / GPDSFDEYSF                 | GYPEAIMEAW               | 226        |
| Cytophaga xylanolytica<br>Ribrobacter sugginggenes         | 153        | VEVDOTTETS               |                         | AQ W <mark>VE</mark> YI         | TSNNP                | SPMTNL <mark>R</mark> KEN               | RD                    | PROLERVE              | NCAFEKSNCL                               | DIKYFCICNE                | NWGCGGHM                 | TPEY ADLYR                    | NYATYCG                   | GVKYKIAG                   | GPNVDDYRWT                   | EVLMNKT                  | 244        |
| Geobacillus stearothermophilus                             | 134        |                          | DAA                     | RN LVEYC                        | NHPSG                | SYYSDLRIAH                              | YK                    |                       | EPH                                      | KIKTWCLONE                | MDGPWQIGHK               | TAVE                          | EAAKVMKWV-                | -DPTIELVVC                 | GSSNRNMPTF                   | AEWEATVLDH               | 233        |
| Hordeum vulgare2<br>Hordeum vulgare                        | 327<br>329 | VSTAA                    | IAPFVKDV                | LD SLECA                        | RGSAN                | STWGSVRAAM                              | HP                    |                       | EPF                                      | PVKYVAICNE                | DC                       | GKENTRGNYL                    | KFYNAIRES-                | - YPDTQMTSN<br>- YPDTOMTSN | CDGSSKPLD-                   | -HPADLYDFH<br>-HPADLYDFH | 426        |
| Malus domestica  | 333        | VDTSS                    | VLPFVQ <mark>B</mark> A | LD G <mark>IEC</mark> A         | RGSPN                | stwgsl <mark>r</mark> aam               |                       |                       | EPF                                      | DLRYVAI CNE               | DC                       | GKKN <mark>Y</mark> RGNYL     | KFYSAIRNA-                | -YPDIKMISN                 | I CDGSSRQLD-                 | -HPADMYDFH               | 432        |
| Mesorhizobium loti<br>Oryza sativa                         | 131<br>334 | VSTAT                    | IASLVKDV                | RA FVBVV<br>VD GIECA            | RGGPK                | SYWSDLRATN<br>TWGSVRAAM                 | RA                    |                       | QPW<br>QPE                               | NCRLWCL SND<br>NLDYVSICNO | MDGPWQVGHK               | SASE GHLAN                    | ETAKALRGL-<br>KFYSAIKAA-  | - DPTVELVVC<br>- YPDINVVSS | C GSSHSNMPTY<br>5 CDKSTISPS- | PQWEATVLEA<br>-NPADLYDVH | 433        |
| Sinorhizobium meliloti                                     | 131        |                          |                         | RN FLEYC                        | NHPGG                | TYWSDL <mark>R</mark> SKH               | <mark>е</mark> ҮК     |                       | EPH                                      | NVRIWCLONE                | MDGPWQVGHK               | SAAE GHLAN                    | EVSKAFKYF-                | -DKTLETVVC                 | GSSNDKMKTY                   | PEWEATVLEA               | 230        |
| Streptomyces coartreusis<br>Streptomyces coelicolor2       | 325<br>324 | -NKAVDDEAL               | LKRHIQDT                | LD LIE A                        | NGPAT                | SEWGRVRAEM<br>SEWGGK <mark>R</mark> AEM | HP                    |                       | KPF                                      | HLTHLEVONE                | EN                       | LPKE FARFE                    | QFRAATEAE-                | -YPDITVVSP                 | SGPDDAGTT-                   | -FDTAWKLNR<br>-FDTAWQLNR | 420        |
| Streptomyces coelicolor<br>Streptomyces lividans           | 134        |                          | ABA                     | LE LOEVA                        | NHPSG                | TALSDLRAEH                              | DK                    |                       | DPF                                      | GURLWCLONE                | MDGPWQTGHK               | TAEEYGRVAA                    | ETARAMRQI-                | -DPDVELVAC                 | C GSSGQSMETF                 | AEWEATVLKE               | 233        |
| Thermotoga maritima  | 131        |                          | DEA                     | LH WLEYC                        | NGKGN                | TYYAQL <mark>R</mark> RKY               | CHP                   |                       | EPY                                      | NVKFWGICNE                | MYGEWQVGHN               | TADETARAAK                    | EYTKWMKVF-                | -DPTIKATA                  | / GCDDP                      | -IWNLRVLQE               | 224        |
|  |            | 570                      |                         | 580                             | 590                  | 600                                     | 610                   | 62                    | 0 630                                    | 64                        | 0 65                     | 0 66                          | 0 67                      | 0 68                       | 30 69                        | 0 700                    | 0          |
| Thermobacillus xylanilyticus                               | 231        | <br>APFMH                | GLSLHY                  | .  <br>VP G-PWE                 |                      | · · · ·   · · · ·                       | <br>кк                | GPATGFTTDE            | <br>WWVTLKKALF                           | MDRLVTKHSA                | IMDVYDPDKR               | IDLIVDEWGT                    | <br>WYDVEP                |                            | <u> </u>                     | ···· ····                | 307        |
| Alicyclobacillus acidocaldariu                             | 447        | VLKALGPYID               | FVDVHW P                | ET PGQET                        |                      |   | DA                    | GLLADTDQIP            | AMVAELKREI                               | NAYAGSNAKN                | IQIFVTETNS               | VSYNPGQQST                    | NLPEALFLAD                | DLAGFVQAGA                 | A ANVDWWDLLN                 | GAEDNYTSPS               | 563        |
| Arabidopsis thallana 2<br>Arabidopsis thaliana             | ⊿/8<br>436 | чг                       | IQI T                   | GA 8                            |                      |   |                       |                       | DLFSKSHD<br>NLFSMYHQ                     | FORTSRKGPK                | AFVSEYAVNE               | KDAGTGSLLA                    | SLAEAA                    |                            |                              |                          | 332<br>486 |
| Aspergillus kawachi<br>Aspergillus awamori                 | 422<br>422 | D                        |                         | TP D                            |                      |   |                       |                       | GLVGQFNY                                 | FDNLDRSVP-                | YFIGEYSRWE               | IDWPNMKG                      | SVSEAV                    |                            |                              |                          | 468        |
| Aspergillus niger  | 422        | D                        | <mark>x</mark> s        | TP D                            |                      |   |                       |                       | GLVGQFNY                                 | FDNLNRSVP-                | YFIGEYSRWE               | IDWPNMKG                      | SVAEAV                    |                            |                              |                          | 468        |
| Bacillus halodurans2<br>Bacillus halodurans                | 229<br>233 | AHLMD<br>TYDYVD          | GLSLHYYT<br>YISLHTYY    | VP GDFWE<br>GN R                |                      |   | NK                    | GSALDDRESE<br>DDDLANY | WFKTLKKSFR<br>LAQSMDMDEF                 | MDELLTKHST<br>IRSVIAIADY  | IMDRYDPEKR<br>VKAKKRSKK1 | VGLIVDEWGT<br>IHLSFDEWNV      | WFDVEP<br>WFHSN           |                            |                              | EADRQ                    | 306        |
| Bacillus subtilis2   | 227        | AGLMD                    | GLSLHYT                 | IP GDFWK                        |                      |   | GK                    | GSATEFTEDE            | WFITMKKAKY                               | IDELIQKHGT                | IMDRYDPEQR               | VGLIIDEWGT                    | WFDPEP                    |                            |                              | ENDAR                    | 304        |
| Bacteroides ovatus2  | 250        | GHRMD                    | GLSLHY                  | VT G-WSG                        |                      |   | sk                    | GSATQFNKDD            | YYWTMGKCLE                               | VEDVLKKHCT                | IMDKYDKDKK               | IALLLDEWGT                    | WWDEEP                    |                            |                              | BADKK                    | 326        |
| Bacteroides ovatus<br>Bifidobacterium longum               | 425        | RLKVD                    | LVDEHFTR                | PE S<br>FD RGHKT                |                      |   | R-                    |                       | WFLAQGAR                                 | YDNYDRKGPK                | VFAGEYACHG               | KGKKWNHYHA                    | ALLEAA                    | DOW                        |                              |                          | 484        |
| Caulobacter crescentus                                     | 252        | AKRMD                    | AISLHYT                 | IQ TGDWN                        | r                    |   | кк                    | GAATGFDKAA            | WGKSFAQTLR                               | MDDLLRQHIA                | VLDRNDPQKR               | IGLYVDEWGT                    | WYDTEP                    |                            |                              |                          | 329        |
| Cellvibrio japonicus2<br>Clostridium acetobutylicum        | 248<br>432 | VKPNWSLKMD<br>EKAPNT     | AVSFHY T                | LP TGKWD<br>SP D                | )                    |   | кк                    | GAAIGFPEAE            | WMSTLVNTLR<br>WFLSNTNR                   | MDDFIVNNKK<br>YDKYDRNSNK  | VMDKNDPEKK<br>VFVGEYASOS | VGFYVDEWGT                    | WYDVEA<br>ALAEGA          |                            |                              |                          | 330        |
| Clostridium cellulovorans                                  | 228        | GQFMD                    | ALTLHY <mark>Y</mark> T | IG TGVWE                        |                      |   | NK                    | GSATEFEEDL            | WFRTMKNTLV                               | MEELVTKHDE                | IMTKYDPEKR               | VALIVDEWGT                    | WFEVEK                    |                            |                              |                          | 305        |
| Ciostridium stercorarium<br>Cytophaga xylanolytica2        | 227<br>266 | GRFMD<br>AKKTWTWDIQ      | GLSLHY T                | vr -GTWH<br>RGGWP               | <br>                 |   | SK<br>AV              | GSSTRFTEEE            | WYITLFKTLK<br>YAAVIKETLE                 | MDELITKHTA<br>MDKFISDNRA  | INDKFDPEHK               | IGLVVDEWGT<br>VSIMVDEWGT      | WIDVEP<br>WYAPTE          |                            |                              |                          | 303<br>346 |
| Cytophaga xylanolytica                                     | 245        | QHHKFLMQ                 | GLSLHY                  | FP G-RWE                        |                      |   | DK                    | GSSIVFDEQS            | WHQTLRHTLR                               | MQELISKHGE                | IMDKYDPKKQ               | IGLIVDEWGT                    | WYDVMP                    |                            |                              |                          | 324        |
| Fibrobacter succinogenes<br>Geobacillus stearothermophilus | 555<br>234 | TTLLVP-FRT<br>TYDHVD     | FGKFPYQ<br>YISLHQYY     | GN R                            | чатърг               | KGVTALDFKP                              | ogegtaggfk            | DNDTANY               | LALSLEMDDF                               | IRSVVAIADY                | VENPNÍSGGI<br>VKAKKRSKKI | FGINAALWDG<br>IHLSFDEWNV      | WYHSN                     | QIREYAKRIN                 | м ндII<br>                   | RIPGGLRADD               | 687<br>307 |
| Hordeum vulgare2   | 426<br>429 |                          | VT                      | DS K                            |                      |   |                       |                       | TLFNMKGT                                 | FDKTSRTGPK                | AFVSEYAVWR               | TDAGRGSLLG                    | SLAEAA                    |                            |                              |                          | 476        |
| Malus domestica  | 432        |                          |                         | SA S                            |                      |   |                       |                       | NLFSMANH                                 | FDHTSRNGPK                | AFVSEYAVTG               | KDAGRGSLLA                    | ALAEAG                    |                            |                              |                          | 482        |
| Mesorhizobium loti<br>Oryza sativa                         | 231<br>433 | TYEQVD                   | YISLHMYF                | EN Y<br>SS S                    |                      |   |                       | EKNTSEY               | LALPAKLDRY                               | IGTVAGIIDY<br>FDNTTRSGP   | VKAKTRSKRI<br>AIVSEYAVTO | VKISFDEWNV<br>KDAGKGTLVF      | WYHQRK                    |                            |                              | QDAER                    | 305<br>487 |
| Sinorhizobium meliloti                                     | 231        | SYDSVD                   | YISLHKYF                | GN E                            |                      |   |                       | EQDTLNY               | YAKAIELDRY                               | IVTIGGVIDY                | IKAKKRSKRI               | VKICFDEWNV                    | WYHDRK                    |                            |                              | EDGER                    | 305        |
| streptomyces chartreusis<br>Streptomyces coelicolor2       | 429<br>428 | EANVE<br>DAGVD           | MVDEHYNN<br>MVDEHYNN    | SP N<br>SP Q                    |                      |   |                       |                       | WFLQNNDR<br>WFLQNNDR                     | YDSYDRGGPK<br>YDSYDRNGPK  | VFLGEYASQG               | NAWKN                         | GLSEAA<br>ALAEAA          |                            |                              |                          | 483<br>482 |
| Streptomyces coelicolor                                    | 234        | TYDLVD                   | HISLHAY                 | EP H                            |                      |   |                       | DGDVDSF               | LASAVDMESF                               | IENVVATCDH                | VGARLKSKKK               | INLSFDEWNV                    | WYMTKT                    |                            |                              | QAEVS                    | 308        |
| Thermotoga maritima  | 234<br>225 | AGDVID                   | FISYHFY                 | GS D                            |                      |   |                       | DGDVDSF               | VSTVYLLKER                               | LIGVKKLIDM                | VDTARKRG                 | VKIALDEWNV                    | WYRVSD                    |                            |                              | QAEVS                    | 290        |
|  |            |                          |                         |                                 |                      |   |                       |                       |  |                           |                          |                               |                           |                            |                              |                          |            |

| Thermobacillus sylanilytics 307  |                                |     | 710           | 720       | 730                       | 74          | 0 75       | 0 760      | 0 770      | D 7       | 80 79        | 30 8                       | 00         | 810 82        | 0 830      | ) 840      |     |
|--|--------------------------------|-----|---------------|-----------|---------------------------|-------------|------------|------------|------------|-----------|--------------|----------------------------|------------|---------------|------------|------------|-----|
| Thermobalilus xylanilyticus         307  |                                |     |               |           |                           |             |            |            |            |           |              |                            |            | .             |            |            |     |
| Alioyclobacilus acidocalarii 564 LYGQMEDDY GLESSGAT FGQ REPORT FLEPYTYGFU VEPKTYGFU VEFKTYGFU VEPKTYGFU VEFKTYGFU VEFKTYFU VEFKTYFU VEFKTYFU VEFKTYFU VEFKTYGFU VEFKTY | Thermobacillus xylanilyticus   | 307 | GTNP GF       | YQQNSIR   | ALVAGATLH                 | IFHRHCDRVR  | MANIAQ     |            |            | LVN       | V LQSVILTEGE | E RMLLTPTY                 | V FNMFKVHQ | DA ELLD       |            |            | 385 |
| Arabidopsis thaliana 2 332PCLLEKS LUMPOYAP PVINTERK HPAIV  | Alicyclobacillus acidocaldariu | 564 | LYGQNLFGDY GL | SSGQATP I | KG <mark>V</mark> QEPPQYT | PLPPYYGFQL  | VSDFARPGDT | LLGSASSQSD | IDVHAVREPN | GDIALMLVN | R SPSTIYSADI | NVLGVGP <mark>Y</mark>     | I TKALVYGE | 3S SAVSPALTLP | TAHSVKLMPY | sg         | 695 |
| Arabiopsis thaliana       466  | Arabidopsis thaliana 2         | 332 | F             | LGLEKNS   | DIVEMVSYAP                | LFVNTNDRRW  | IPDAIV     |            |            | FNS       | s            | - HLYGTPS <mark>Y</mark> W | V QHFFTESS | 3A TLLN       |            |            | 395 |
| Appergillus kawachi       468  | Arabidopsis thaliana           | 486 | F             | LIGLEKNS  | DIVEMASYAP                | LFVNTNDRRW  | NPDAIV     |            |            | FNS       | s            | - HLYGTPS <mark>Y</mark> W | V QRFFAESS | GA TLLT       |            |            | 549 |
| Appergillus avanori       468  | Aspergillus kawachi            | 468 | F             | MIGFERNS  | V V KMAAYAP               | LQLVNSTQW   | TPDLIG     |            |            | YTQ       | S PD         | - DIFLSTS <mark>Y</mark> M | V QEMFSRNR | 3D            |            |            | 529 |
| Appergillus niger       468  | Aspergillus awamori            | 468 | F             | MIGFERNS  | VVKMAAYAP                 | LQLVNSTQW   | TPDLIG     |            |            | YTQ       | S PD         | - DIFLSTS <mark>Y</mark> M | V QEMFSRNR | 3D            |            |            | 529 |
| Bacillus halodurans2       306      GTND GP TQUYTTE APVARUMENE PHENETTE APVARUMENE ANTLAQ  | Aspergillus niger              | 468 | F             | MIGFERNS  | VVKMAAYAP                 | LQLINSTQW   | TPDLIG     |            |            | YTQ       | S PG         | - DIFLSTS <mark>Y</mark> M | V QEMFSRNR | 3D            |            |            | 529 |
| Bacillus halodurans       307       TI-PWSVAP PLEDITTE ALVASHET TLIKLADORUK IACLAQ   | Bacillus halodurans2           | 306 | GTNP GF       | YQQNTIR   | ALVAGVHFH                 | IFHEHNDRVH  | MANIAQ     |            |            | MVN       | V LQAMVLTEGH | E QMLLTPT <mark>Y</mark> H | V FNMYKVHQ | DA TRLE       |            |            | 384 |
| Bacillus subbilis       304      GTN GP TQQNTIR ACTASHEF PROLENCE MAILAG   | Bacillus halodurans            | 307 | ITPWSVAP PL   | LEDIYTFE  | DALLVGSMLI                | TLLKHADRVK  | IACLAQ     |            |            | LVN       | V IAPIMTEKGO | F PAWKQTI                  | P YMHASVYG | RG VALQ       |            |            | 388 |
| Bacilius subbilis       306       VBPWITAR PJ EDITINE BAUVGELI TMLCHARVE IACLAQ  | Bacillus subtilis2             | 304 | GTNP GF       | YQQNTIR   | ALVAASHFH                 | IFHQHCRRVQ  | MANIAQ     |            |            | TVN       | V LQAMILTEGE | E RMLLTPT <mark>Y</mark> H | V FNMFKVHQ | DA SLLA       |            |            | 382 |
| Bacteroides ovatus2       326      FTR GH_TQONTLE _AFVALSLD _FENTTREK MAILAG   | Bacillus subtilis              | 306 | VEPWITAR PI   | LEDIYNFE  | ALLVGSLLI                 | TMLQHADRVK  | IACLAQ     |            |            | LVN       | V IAPIMTEKGO | EAWRQPI                    | P YMHASVYG | RG ESLK       |            |            | 387 |
| Bacteroides ovatus 404   | Bacteroides ovatus2            | 326 | GTIK GH       | LYQQNTLR  | AFVASLSLD                 | VFHKYTDRLK  | MANIAQ     |            |            | IVN       | V LQSMILTKD  | C EMVLTPTY                 | V FKMYKVHQ | DA TYLP       |            |            | 404 |
| Bifidobacterium longum       364       LHHEPWEKSP HurgeDITITA AQVEGSLATI LLKHCDEVNE SASRAQ   | Bacteroides ovatus             | 484 | F             | MTGLERNA  | DIVHMATYAP                | LFAHVEGWQW  | RPDMIW     |            |            | FDN       | L            | - NSVRTTS <mark>Y</mark> Y | V QQLYAQNK | GT NVLP       |            |            | 547 |
| Caulobacter crescentus         329        GTNP GREYCLATLER OGLAAVNEN         PHEHABEVER MANIAQ   | Bifidobacterium longum         | 364 | LHHEPWPKSP HL | LEDIYTAA  | AVVEGSLMI                 | TLLKHCDRVR  | SASRAQ     |            |            | LVN       | V IAPIMAEEHO | F PAWRQTT                  | P FAEAALHA | RG QAYA       |            |            | 447 |
| Callvirio japonicus2       330      GEN GF YQONSER DAVALNYNN FINIAQ  | Caulobacter crescentus         | 329 | GTNP GH       | LYQLNTLR  | <b>GVLAAVNFN</b>          | IFHKHAERVR  | MANIAQ     |            |            | TIN       | V LQAVILTKGI | O QMVLTPT <mark>Y</mark>   | A HQMYMPFQ | DS TAIP       |            |            | 407 |
| Clostridium acetobutylicum         487   | Cellvibrio japonicus2          | 330 | GENP GF       | LYQQNSLR  | DAVVAALNFN                | 1 FHKHADRVH | MTNIAQ     |            |            | MVN       | V LQAMILTDKE | E KMILTPT <mark>Y</mark> M | A YKMYVPFQ | DA TSLP       |            |            | 408 |
| Clostridium cellulovorans 305GTNP GEVGONTER PAVAGININ FUNENCEVE MANIAQTI V LQAVILTEGE KULLTF HV FMYKVEQDA ELVE   | Clostridium acetobutylicum     | 487 | Y             | TGLERNS   | IVKMASYAP                 | LFAKADDYQW  | SPDMIW     |            |            | FNG       | N            | - TNYVTPN <mark>Y</mark>   | V QKLFSTNL | GT QIVKGDLIKP | TAHVKNDIKG | GVLLGAWSTQ | 576 |
| Clostridium stercorarium       303      GTMP GF2VQ0MTMR PAVAGINLN FIRHENCV MANLAQ  | Clostridium cellulovorans      | 305 | GTNP GF       | YQQNTIR   | ALVAGINLN                 | IFNEHCDRVK  | MANIAQ     |            |            | TIN       | V LQAVILTEGI | P KMLLTPT <mark>Y</mark> H | V FNMYKVHQ | DA ELLE       |            |            | 383 |
| Cytophaga xylanolytica       346      GTMP GF20Q0MSQR PalLALMINN FIRHARENUK GANIAQ   | Clostridium stercorarium       | 303 | GTNP GF       | LYQQNTMR  | DALVAGINLN                | IFNKHSDKVV  | MANLAQ     |            |            | TIN       | V LQAVILTEGE | E KMLLTPT <mark>y</mark> f | V FDMYKEHQ | JA ELVE       |            |            | 381 |
| Cytophaga sylanolytica         324        GTM GETYQONTER DAFVAGININ         PENNNDEVX MANIAQWU V LQAVILIGOD ENLINFT VY FENNVNEHAG TILP   | Cytophaga xylanolytica2        | 346 | GTNP GF       | QQQNSQR   | AVLAALNFN                 | IFIRHAERVK  | GANIAQ     |            |            | MIN       | V LQAMILTEGE | E KMVLTPT <mark>Y</mark> H | T FRMYVPFQ | DA TRLP       |            |            | 424 |
| Fibrobacter succinogenes       688       DHWKELLDNH DWWDTDEEL SWEKTGSNN FY FURNESGT VKERADWWKH TH  | Cytophaga xylanolytica         | 324 | GTNP GF       | LYQQNTLR  | ALVAGINLN                 | IFNNNADRVK  | MANIAQ     |            |            | MVN       | V LQAVILTQGI | ) EMILTPTY                 | V FKMYNVHH | GA TLIP       |            |            | 402 |
| Geobacillus stearchermophilus         308         IEPWTVAP PuzeDIYNEE         SAZUGGMLI TIMEKADEVKI TACLAQ   | Fibrobacter succinogenes       | 688 | DHWKEILDNH DW | MVDTDEFL  | <sup>3</sup> WLKKTGSNA    | MFTVNFGSGT  | VKEAADWVKH | TN         |            | ID        | K KAGILYWEIG | 3 NEIYGNW <mark>H</mark> I | Y YEKYGKDG | GT IYGKRAR    |            |            | 779 |
| Hordeum vulgare2       476   | Geobacillus stearothermophilus | 308 | IEPWTVAP PL   | LEDIYNFE  | ALLVGCMLI                 | TLMKHADRVK  | IACLAQ     |            |            | LVN       | V IAPIMTEKNO | F PAWKQTI                  | P FMHASVYG | RG VALH       |            |            | 389 |
| Hordeum vulgare         478  | Hordeum vulgare2               | 476 | F             | TGLEKNS   | DIVHMASYAP                | L FVNDNDQTW | NPDAIV     |            |            | FNS       | w            | - QQYGTPS <mark>Y</mark>   | M QKFFRESS | GA MIHP       |            |            | 539 |
| Malus domestica         482  | Hordeum vulgare                | 478 | F             | LTGLEKNS  | VV QMASYAP                | LFINDNDRTW  | NPDAIV     |            |            | FNS       | w            | - QQYGTPS <mark>Y</mark> W | M QTLFRESS | JA TVHP       |            |            | 541 |
| Mesorbizobium loti       306       MESGNDWEEAP RLZEDIVNE DWGVGCILT FIRERDVVR IACIAQ  | Malus domestica                | 482 | F             | LIGLEKNS  | DIVEMASYAP                | LFVNTHDRRW  | NPDAIV     |            |            | FDS       | s            | - QLYGTPS <mark>Y</mark> W | V QCLFNESS | 3A TLYN       |            |            | 545 |
| Oryza sativa       483      FWQULERNS DWERASCAP FUTUNDERW SPDATU   | Mesorhizobium loti             | 306 | MRGWDWPEAP RL | LEDIYNFE  | VLQVGCIIN                 | TFIRRSDVVR  | IACIAQ     |            |            | LVN       | V IAPIMTDPGC | GAWRQTI <mark>Y</mark>     | P FMLASRHG | RG TALQ       |            |            | 389 |
| Sinorhizobium meliloti       306       LASMDWPEAP PLZEELVILE DAFYOSLIN PLTREDEVK LACKAQ  | Oryza sativa                   | 483 | F             | LVGLERNS  | VVEMASCAP                 | LFVNDNDRRW  | SPDAIV     |            |            | FNS       | w            | - QNYGCPN <mark>Y</mark>   | M LHFFKDSC | GA TFHP       |            |            | 546 |
| Streptomyces chartrewisis       483  | Sinorhizobium meliloti         | 306 | IASWDWPEAP PL | LEELYNLE  | AIFVGSLLN                 | VFIRRSDRVK  | IACMAQ     |            |            | LVN       | V IAPILTKAGO | F PAWRQSI                  | P LQYASKYG | RG TALT       |            |            | 389 |
| Streptomyces coelicolor2 482   | Streptomyces chartreusis       | 483 | F             | MTGLERNA  | VVKLASYAP                 | LANEDYVQW   | RPDLVW     |            |            | FNN       | R            | - ASWNSAN <mark>Y</mark> B | V QKLFMNNV | 3D RVVP-SKATT | TPDVSGPITG | AVGLSTWATG | 571 |
| Streptomyces coelicolor 309 ALDMPEAP RUZEDNYSYM DAVYGSLLI ALLRHADEVT VACLAQ  | Streptomyces coelicolor2       | 482 | F             | MTGLERNA  | VVKLASYAP                 | LSNEDYVQW   | SPDLIW     |            |            | FNN       | н            | - ASWGSAN <mark>Y</mark> I | V QKLFMNNT | GD RVVP-STATG | TPSVSGPITG | GVGLSTWATS | 570 |
| Streptomyces lividans 309 ALDWPEAP RLWEDNYSVM DAWYFGSLLI ALLRHADRVT VACLAQ   | Streptomyces coelicolor        | 309 | ALDWPEAP RL   | LEDNYSVM  | AVVFGSLLI                 | ALLRHADRVT  | VACLAQ     |            |            | LVN       | V IAPIMTEPGO | F PAWRQTT                  | P FSQASKYG | RG EVLD       |            |            | 390 |
| Thermotoga maritima 290 NK BEEPYDLK DOBRACGVLV BLOKMSDIVP LANLAQ IND A LGAIHTEKDG -LILIPPUKA FELIVNHSGE KLVK 363   | Streptomyces lividans          | 309 | ALDWPEAP RL   | LEDNYSVM  | AVVFGSLLI                 | ALLRHADRVT  | VACLAQ     |            |            | LVN       | V IAPIMTEPGO | F PAWRQTT                  | P FSQASKYG | RG EVLD       |            |            | 390 |
|  | Thermotoga maritima            | 290 | NK            | LEEPYDLK  | GUFACGVLV                 | LQKMSDIVP   | LANLAQ     |            |            | LVN       | A LGAIHTEKDO | 3 -LILTPV <mark>Y</mark> P | A FELIVNHS | GE KLVK       |            |            | 363 |

Thermobacillus xvlanilvticus Alicyclobacillus acidocaldariu Arabidopsis thaliana 2 Arabidopsis thaliana Aspergillus kawachi Aspergillus awamori Aspergillus niger Bacillus halodurans2 Bacillus halodurans Bacillus subtilis2 Bacillus subtilis Bacteroides ovatus2 Bacteroides ovatus2 Bacteroides ovatus Bifidobacterium longum Caulobacter crescentus Cellvibrio japonicus2 Clostridium cellulvorans Clostridium cellulvorans Clostridium seteroorarium Cytophaga xylanolytica2 Cytophaga xylanolytica2 Geobacillus stearothermoph Hordeum vulgare2 Hordeum vulgare Malus domestica Mesorhicobum loti Malus comescies Mesorhizobium loti Orvza sativa Sinorhizobium meliloti Streptomyces chartreusis Streptomyces coelicolor2 Streptomyces coelicolor Streptomyces lividans Thermotoga maritima

384

387

447 407 577 383 381 424 402 779 389 539 -ophilus 545 546 571 363 Thermobacillus xylanilyticus Alicyclobacillus acidocaldariu Arabidopsis thaliana 2 Arabidopsis thaliana Aspergillus kawachi Aspergillus avengi 562 Aspergillus kawachi Aspergillus awamori Aspergillus niger Bacillus halodurans Bacillus subtilis2 Bacillus subtilis2 Bacteroides ovatus2 Bacteroides ovatus Bifidobacterium longum Callobacter crescentus Cellvibrio japonicus2 542 398 399 396 398 418 560 458 420 422 Clostridium acetobutylicum Clostridium cellulovorans 397 Clostridium teriniovoran Cytophaga xylanolytica Cytophaga xylanolytica 437 Cytophaga xylanolytica Fibrobacter succinogenes Geobacillus stearothermophilus Hordeum vulgare Malus domestica Mesorhizobium loti 559 400 708 Oryza sativa Sinorhizobium meliloti Streptomyces chartreusis Streptomyces coelicolor2 Streptomyces coelicolor Streptomyces lividans Thermotoga maritima 401 401 384

|                      |            |                           |                           | 10. |
|----------------------|------------|---------------------------|---------------------------|-----|
|                      |            |                           |                           | 403 |
|                      |            |                           |                           | 384 |
|                      |            |                           |                           |     |
| 109                  | 90 110     | 0 11                      | LO 112                    | 0   |
|                      |            |                           |                           |     |
| RVKP                 | APFRDFKLEG | -GHLNAS                   | MSVTVLELTA                | 49  |
| NISI                 | APGDTVTIQT | TFANVSSTDA                | LQNGLIDMEV                | 890 |
| MIVP                 | QESLLEMTEQ | -EDLMFVLPP                | HSFSSFDLLT                | 503 |
| εκ <mark>ν</mark> ν₽ | HESLLELAE- | -EDMTVVLPP                | HSFSSFDLLK                | 65' |
| LVTP                 | SESTVQASN- | -GTFTFSLPA                | WAVAV AAN-                | 621 |
| LVTP                 | SESTVQASN- | -GTFTFSLPA                | WAVAVIAAN-                | 621 |
| LVTP                 | SESTVQASN- | -GTFTFS <mark>L</mark> PA | WAVAVLAAN-                | 621 |
| IEVEP                | VPYEPASVSG | -HEMELK <mark>V</mark> PA | SSVLRVTIRP                | 491 |
| 2-VT₽                | HHNGDSAIDQ | -GRLTANLAK                | LSWNVIRLGK                | 499 |
| IH <mark>V</mark> KΡ | ESFRQYTLSK | -NKLKVK <mark>L</mark> PP | MSVVLLTLRA                | 493 |
| IN <mark>V</mark> VP | HSNGSSSVSE | -NGLTAHFTP                | LSWNVIRLKK                | 491 |
| IIVK₽                | APFKEVKINK | -GTMKVK <mark>L</mark> PA | KSIVTLELQ-                | 514 |
| GIVP                 | QETPVSIEG- | -NVFTTELEP                | T FAVYKFTK                | 659 |
| <b>AVT</b> P         | QP-LDIAMNA | TGTCTAT <mark>L</mark> PA | ISWIS <mark>V</mark> EFHG | 566 |
| PAVVP                | VPFKGGKLSG | -DRLTLD <mark>I</mark> PS | KSVVVVRLD-                | 516 |
| IAIKP                | VSYS-AKAVN | -GKLSLE <mark>L</mark> PA | KSVVVVAVE-                | 51  |
| ENVSI                | KTKKLNNIS- | -KNFDYDADK                | YSVSVIRIKL                | 834 |
| 0KVK₽                | SEFSDYSLDN | -NKITLT <mark>V</mark> PA | MSVLVLELQ-                | 493 |
| ST <mark>V</mark> KP | QTFDKISVRQ | -NGLVIE <mark>I</mark> PP | VSVVSITVD-                | 493 |
| INVAP                | TSIN-ASLTG | -SNVSVT <mark>V</mark> QP | QSVTVLEIVS                | 533 |
| MVGL                 | KAFNVAKPKG | -NKLTVE <mark>I</mark> PA | KSVVLVQMK-                | 510 |
| DITP                 | EGGDYGYLTR | SGEECMNCPR                | PSYWAFQMAS                | 950 |
| PVVP                 | HRNGDAQLSD | -RKVSATLPK                | LSWNVIRIGK                | 503 |
| KVV₽                 | VTSQLHNAA- | -EQMQVTLAA                | HSFSSFDLAL                | 64  |
| πkvv₽                | VTVELRDAA- | -EEMQVTLPP                | HSLTAFDLAL                | 649 |
| KVIP                 | KRSLLESAG- | -EEMEVVISP                | RSFTSIDLLM                | 656 |
| DTVSP                | VKGNGAALSS | KGMTLN-LPP                | HSYSMVRVTL                | 503 |
| 0KVAP                | VSSPVDNAN- | -EQMGVLVDP                | YSLTSFDLLL                | 656 |
| RIVP                 | KSGKELTMDD | TGTLVGSLPP                | RSYHFULSV                 | 503 |
| -VTP                 | ATSTFSGVT- | -DRFTYTFPA                | NSVTFILRLKQ               | 824 |
| -VTP                 | VTSTFSGAA- | -SEFTYTFPA                | NSVTFIRIRQ                | 823 |
| RVVP                 | HPVDGTSLRD | -GRLTAALEP                | LSWNSTRLR-                | 503 |
| RWVP                 | HPVDGTSLRD | -GRLTAA EP                | LSWNS RCAD                | 502 |

398

398

## **Références bibliographiques**

En plus des articles cités ci-après, de nombreux livres ont été source d'aide et d'inspiration durant cette thèse (particulièrement pendant la rédaction !), je ne voudrais pas omettre de citer ces précieux ouvrages :

Analyse chimique, F. Rouessac et A. Rouessac, Dunod, 4<sup>ème</sup> édition (1998)

*Biochimie*, Voet D. et Voet J. G., DeBoeck Université, 2<sup>ème</sup> édition (1998)

*Lexique des règles typographiques*, Imprimerie Nationale, 4<sup>ème</sup> édition (1997)

*Molecular cloning, a laboratory manual*, J. Sambrook, E. F. Fritsch et T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>ème</sup> édition (1989)

Protein stability and folding, theory and practice, édité par B. A. Shirley, Humana Press (1995)

Spectrophotometry & Spectrofluorimetry, édité par M. G. Gore, Oxford University Press (2000)

Stéréochimie et chiralité en chimie organique, C. Rabiller, DeBoeck Université (1999)

## Α

Adelsberger H., Hertel C., Glawischnig E., Zverlov V. V., et Schwarz W. H., Enzyme system of *Clostridium stercorarium* for hydrolysis of arabinoxylan: reconstitution of the in vivo system from recombinant enzymes, *Microbiology*, **2004**, 150, 2257-2226

Ali M. & Sreekrishnan T. R., Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review, *Adv. Environ. Res.*, **2001**, 5, 175-196

Aman P., Composition and structure of cell wall polysaccharides in forage, in: Forage cell wall structure and digestibility (édité par Jung H. G., Buxton D. R., Hatfield R. D., et Ralph J.), **1993**, 183-199

Amann R. I., Ludwig W., et Schleifer K. J., Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microb. Rev.*, **1995**, 59, 143-169

Andrews S. R., Charnock S. J., Lakey J. H., Davies G. J., Claeyssens M., Nerinckx W., Underwood M., Sinnott M. L., Warren R. A., et J. G. H., Substrate specificity in glycoside hydrolase family 10. Tyrosine 87 and leucine 314 play a pivotal role in discriminating between glucose and xylose binding in the proximal active site of Pseudomonas cellulosa xylanase 10A, *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 23027-23033

Arase A., Yomo T., Urabe I., Hata Y., Katsube Y., et Okada H., Stabilisation of xylanase by random mutagenesis, *FEBS Lett.*, **1993**, 316, 123-127

Atkins E. D. T., Three-dimensional structure, interactions and properties of xylans, in: Xylans and Xylanases (édité par Visser J., Beldman G., A. K.-v. S. M., et Voragen A. G. J.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, **1992**, 7, 39-50

Aÿ J., Götz F., Borriss R., et Heinemann U., Structure and function of the *Bacillus* hybrid enzyme GluXyn-1: native-like jellyroll fold preserved after insertion of autonomous globular domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 6613-6618

#### В

Bayer E. A., Belaich J.-P., Shoham Y., et Lamed R., The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides, *Annu. Rev. Microbiol.*, **2004**, 58, 521-554

Beaugrand J., Chambat G., Wong V. W. K., Goubet F., Rémond C., Paës G., Benamrouche-Stitou S., Debeire P., O'Donohue M. J., et Chabbert B., Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans, *Carbohydr. Res.*, **2004**, 339, 2529-2540

Béguin P., Molecular biology of cellulose degradation, Annu. Rev. Microbiol., **1990**, 44, 219-248

Béguin P. & Aubert J.-P., The biological degradation of cellulose, *FEMS Microbiol. Rev.*, **1994**, 13, 25-58

Beldman G., Schols H. A., Piston S. M., Searle-van Leeuwen M. J. F., et Voragen A. G. J., Arabinans and arabinan-degrading enzymes, *Adv. Macromol. Carbohydr. Res.*, **1997**, 1, 1-64

Benamrouche-Stitou S., Biochimie et histologie de la dégradation enzymatique du son de blé par une endoxylanase, Thèse de doctorat, **2002**, Université de Reims Champagne-Ardenne

Ben-Bassat A., Bauer K., Chang S.-Y., Myambo K., Boosman A., et Chang S., Processing of the initiation methionine from proteins: properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure, *J. Bact.*, **1987**, 169, 751-757

Bengtsson S., Aman P., et Andersson R. E., Structural studies on water-soluble arabinoxylans in rye grain using enzymatic hydrolysis, *Carbohydr. Polym.*, **1992**, 17, 277-284

Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., et Bourne P. E., The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 235-242

Beylot M.-H., McKie V. A., Voragen A. G. J., Doesswijk-Voragen C. H. L., et Gilbert H. J., The *Pseudomonas cellulosa* glycoside hydrolase family 51 arabinofuranosidase exhibits wide substrate specificity, *Biochem. J.*, **2001**, 358, 607-614

Bhat M. K., Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnol. Adv.*, **2000**, 18, 355-383

Biely P., Microbial xylanolytic systems, Trends Biotechnol., 1985, 3, 286-290

Biely P., Markovic O., et Mislovicova D., Sensitive detection of endo-1,4- $\beta$ -glucanases and endo-1,4-xylanases in gels, *Anal. Biochem.*, **1985a**, 144, 147-151

Biely P., Puls J., et Schneider H., Acetyl xylan esterases in fungal xylanolytic systems, *FEBS Lett.*, **1985b**, 186, 80-84

Biely P., Vrsanka M., Tenkanen M., et Kluepfel D., Endo- $\beta$ -1,4-xylanases families: differences in catalytic properties, *J. Biotech.*, **1997**, 57, 151-166

Biely P., Vrsanska M., Kremnicky L., Tenkanen M., Poutanen K., et Hayn M., Catalytic properties of endo- $\beta$ -1,4-xylanases of *Trichoderma reesei*, Proceedings of the *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases, Espoo, Finland, **1993**, 125-135

Black G. W., Hazlewood G. P., Millward-Sadler S. J., Laurie J. I., et Gilbert H. J., A modular xylanase containing a novel non-catalytic xylan-specific binding domain, *Biochem. J.*, **1995**, 307, 191-195

Blake C. C., Koenig D. F., Mair G. A., North A. C., Phillips D. C., et Sarma V. R., Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstroms resolution, *Nature*, **1965**, 206, 757-761

Bray M. R. & Clarke A. J., Action pattern of xylo-oligosaccharide hydrolysis by *Schizophyllum commune* xylanase A, *Eur. J. Biochem.*, **1992**, 204, 191-196

Brillouet J. M., Joseleau J. P., Utille J. P., et Lelievre D., Isolation, purification, and characterization of a complex heteroxylan from industrial wheat bran, *J. Agr. Food Chem.*, **1982**, 30, 488-495

## С

Campbell C. J. & Laherrere J. H., The end of cheap oil, Sci. Am., 1998, 3, 78-83

Campbell R. L., Rose D. R., Wakarchuk W. W., To R., Sung W. S., et Yaguchi M., A comparison of the structure of the 20 kd xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Bacillus circulans*, Proceedings of the *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases, Espoo, Finland, **1993**, 63-72

Chandrakant P. & Bisaria V. S., Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol, *Critic. Rev. Biotech.*, **1998**, 18,

Chaudhuri, T. K., Horii K., Yoda T., Arai M., Nagata S., Terada T. P., Uchiyama H., Ikura T., Tsumoto K., Kataoka H., Matsushima M., Kuwajima K., et Kumagai I., Effect of the extra N-terminal methionine residue on the stability and folding of recombinant  $\alpha$ -lactalbumin expressed in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **1999**, 285, 1179-1194

Chen Y. L., Tang T. Y., et Cheng K. J., Directed evolution to produce an alkalophilic variant from a *Neocallimastix patriciarum* xylanase, *Can. J. Microbiol.*, **2001**, 47, 1088-1094

Classen 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., et Weusthuis R. A., Utilisation of biomass for the supply of energy carriers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1999**, 52, 741-755

Collins T., Meuwist M.-A., Gerday C., et Feller G., Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments, *J. Mol. Biol.*, **2003**, 328, 419-428

Collins T., Meuwist M.-A., Stals I., Claeyssens M., Fellert G., et Gerday C., A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 35133-35139

Comtat J., Isolation, properties and postulated role of some of the xylanases from the basidiomycete *Sporotrichum dimorphosporum, Carbohydr. Res.*, **1983**, 118, 215-231

## D

Daniel R. M., Dines M., et Petach H. H., The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures, *Biochem. J.*, **1996**, 317, 1-11

Davies G. J., Wilson K. S., et Henrissat B., Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases, *Biochem. J.*, **1997**, 321, 557-559

Davoodi J., Wakarchuk W. W., Surewicz W. K., et Carey P. R., Scan-rate dependence in protein calorimetry: the reversible transitions of *Bacillus circulans* xylanase and a disulfide-bridge mutant, *Prot. Sci.*, **1998**, 7, 1538-1544

De Ioannes P., Peirano A., Steiner J., et Eyzaguirre J., An  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: production, purification and properties, *J. Biotech.*, **2000**, 76, 253-258

de Lemos Esteves F., Ruelle V., Lamotte-Brasseur J., Quinting B., et Frère J.-M., Acidophilic adaptation of family 11 endo- $\beta$ -1,4-xylanases: modeling and mutational analysis, *Prot. Sci.*, **2004**, 13, 1209-1218

Debeche T., Etude d'une alpha-L-arabinofuranosidase : un outil enzymatique pour le fractionnement et la valorisation d'agro-ressources, Thèse de doctorat, **2001**, Université de Reims Champagne-Ardenne

Debeche T., Bliard C., Debeire P., et O'Donohue M. J., Probing the catalytically essential residues of the  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*, *Prot. Eng.*, **2002**, 15, 21-28

Debeche T., Cummings N., Connerton I., Debeire P., et O'Donohue M. J., Genetic and biochemical characterization of a highly thermostable  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus, Appl. Environ. Microbiol.*, **2000**, 66, 1734-1736

Debeire-Gosselin M., Loonis M., Samain E., et Debeire P., Purification and properties of a 22kDa endoxylanase excreted by a new strain of thermophilic *Bacillus*, in: Xylans and Xylanases (édité par Visser J., Beldman G., Kusters- van Someren M. A., et Voragen A. G. J.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, **1992**, 7, 463-466

Degrassi G., Vindigni A., et Venturi V., A thermostable  $\alpha$ -arabinofuranosidase from xylanolytic *Bacillus pumilus*: purification and characterization, *J. Biotech.*, **2003**, 101, 63-79

Dekker R. F. H. & Richards G. N., Hemicellulases: their occurence, purification, properties and mode of action, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1976**, 32, 277-352

Delano W. L., The PyMOL Molecular Graphics System, **2004**, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA, <u>www.pymol.org</u>

Derewenda U., Swensson L., Green R., Wei Y., Morosoli R., Shareck F., Kluepfel D., et Derewenda Z. S., Crystal structure at 2.6-A resolution, of the Streptomyces lividans xylanase

A, a member of the F family of beta-1,4-D-glycanases, J. Biol. Chem., **1994**, 269, 20811-20814

Du Preez J. C., Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts, *Enzyme Microb. Tech.*, **1994**, 16, 944-956

# F

Facchiano A. M., Colonna G., et Ragone R., Helix stabilizing factors and stabilization of thermophilic proteins: an X-ray based study, *Prot. Eng.*, **1998**, 11, 753-760

Farber G. K. & Petsko G. A., The evolution of barrel enzymes  $\alpha/\beta$  barrel enzymes, *Trends Biochem. Sci.*, **1990**, 15, 228-234

Fenel F., Leisola M., Jänis J., et Turunen O., A de novo designed N-terminal disulphide bridge stabilizes the *Trichoderma reesei* endo-1,4-β-xylanase II, *J. Biotech.*, **2004**, 108, 137-143

Fernandez-Espinar M. T., Piñaga F., Sanz P., Ramon D., et Vallés S., Purification and characterization of a neutral endoxylanase from *Aspergillus nidulans, FEMS Microbiol. Lett.*, **1993**, 113, 223-228

Ferreira L. M. A., Hazlewood G. P., Barker P. J., et Gilbert H. J., The cellodextrinase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* consists of multiple functional domains, *Biochem. J.*, **1991**, 279, 793-799

Flatman R., McLauchlan W. R., Juge N., Furniss C., Berrin J.-G., Hughes R. K., Manzanares P., Ladbury J. E., O'Brien R., et Williamson G., Interactions defining the specificity between fungal xylanases and the wheat proteinaceous inhibitor, XIP-I, *Biochem. J.*, **2002**, 365, 773-781

Flint H. J., Martin J., McPherson C. A., Daniel A. S., et Zhang J.-X., A bifunctional enzyme, with separate xylanase and beta(1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the *xynD* gene of *Ruminococcus flavefaciens*, *J. Bact.*, **1993**, 175, 2943-2951

Fulton L. M. & Cobbett C. S., Two  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase genes in *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during vegetative growth and flower development, *J. Exp. Bota.*, **2003**, 54, 2467-2477

Fushinobu S., Ito K., Konno M., Wakagi T., et Matsuzawa H., Crystallographic and mutational analyses of an extremely acidophilic and acid-stable xylanase: biased distribution of acidic residues and importance of Asp37 for catalysis at low pH, *Prot. Eng.*, **1998**, 11, 1121-1128

#### G

Gebler J., Gilkes N. R., Claeyssens M., Wilson D. B., Béguin P., Wakarchuk W. W., Kilburn D. G., Miller R. C., Warren R. A., et Withers S. G., Stereoselective hydrolysis catalyzed by related  $\beta$ -1,4-glucanases and  $\beta$ -1,4-xylanases, *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 12559-12561

Gebruers K., Brijs K., Courtin C. M., Fierens K., Goesaert H., Rabijns A., Raedschelders G., Robben J., Sansen S., Sorensen J. F., Van Capenhout S., et Delcour J. A., Properties of TAXI-type endoxylanase inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, 1696, 213-221

Gebruers K., Debyser W., Goesaert H., Proost P., Van Damme J., et Delcour J. A., *Triticum aestivum* L. endoxylanase inhibitor (TAXI) consists of two inhibitors, TAXI I and TAXI II, with different specificities, *Biochem. J.*, **2001**, 353, 239-244

Georis J., de Lemos Esteves F., Lamotte-Brasseur J., Bougnet V., Devreese B., Giannotta F., Granier B., et Frere J. M., An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study, *Prot. Sci.*, **2000**, 9, 466-475

Gerstein M., Integrative database analysis in structural genomics, *Nat. Struct. Biol.*, **2000**, 11, 960-963

Gilbert H. J. & Hazlewood G. P., Bacterial cellulases and xylanases, *J. Gen. Microbiol.*, **1993**, 139, 187-194

Gilkes N. R., Claeyssens M., Aebersold R., Henrissat B., Meinke A., Morrisson H. D., Kilburn D. G., Warren R. A., et Miller R. C., Structural and functional relationships in two families of beta-1,4-glycanases, *Eur. J. Biochem.*, **1991**, 202, 151-166

Godfrey T., The enzyme market for grain processing, in: Recent advances in enzymes in grain processing (édité par Courtin C. M., Veraverbeke W. S., et Delcour J. A.), Kat. Univ. Leuven., Leuven, Belgium, **2003**, 401-406

Godfrey T. & West S., Industrial enzymology, 1996, Macmillan Press Ltd., London

Goesaert H., Debyser W., Gebruers K., Proost P., Van Damme J., et Delcour J. A., Purification and partial characterization of an endoxylanase inhibitor from barley, *Cereal Chem.*, **2001**, 78, 453-457

Goldschmid H. R. & Perlin A. S., Interbranch sequences in the wheat arabinoxylan. Selective enzymolysis studies, *Can. J. Chem.*, **1963**, 41, 2272-2277

Gomes J., Gomes I., Kreiner W., Esterbauer H., Sinner M., et Steiner W., Production of high level of cellulase-free and thermostable xylanase by a wild strain of *Thermomyces lanuginosus* using beechwood xylan, *J. Biotech.*, **1993**, 30, 283-297

Gruber K., Klintschar G., Hayn M., Schlacher A., Steiner W., et Kratky C., Thermophilic xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: high-resolution X-ray structure and modeling studies, *Biochemistry*, **1998**, 37, 13475-13485

Gruppen H., Hamer R. J., et Voragen A. G. J., Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 2. Fractionation of alkali-extracted polymers and comparison with water-extractable arabinoxylans, *J. Cereal Sci.*, **1992**, 16, 53-67

Gunata Z. Y., Bitteurt S., Brillouet J.-M., Voirin S., Baumes R., et Cordonnier R., Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape, *Carbohydr. Res.*, **1988**, 184, 139-149

Gunata Z. Y., Brillouet J. M., Voirin S., Baumes R., et Cordonnier R., Purification and some properties of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on grape monoterpenyl arabinofuranosylglucosides, *J. Agr. Food Chem.*, **1990**, 38, 772-776

# Н

Haapala R., Linko S., Parkkinen E., et Suominen P., Production of beta (1,4) endoglucanase and xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyuretan foam, *Biotechnol. Tech.*, **1994**, 8, 401-406

Hahn-Hagerdal B., Jeppson H., Skoog K., et Prior B. A., Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts, *Enzyme Microb. Tech.*, **1994**, 19, 933-943

Hakulinen N., Turunen O., Jänis J., Leisola M., et Rouvinen J., Three-dimensional structures of thermophilic  $\beta$ -1,4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa*, *Eur. J. Biochem.*, **2003**, 270, 1399-1412

Hall T. A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis, **1999**, <u>www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html</u>

Haltrich D., Prenner E., Prieb M., et Steiner W., Production of extremely high values of xylanase activity by *Schizophyllum commune*, in: Biotechnology in the pulp and paper industry (édité par Kuwahara M. et Shimada M.), University of Tokyo, Tokyo, Japan, **1992**, 123-128

Harris G. W., Jenkins J. A., Connerton I., Cummings N., Lo Leggio L., Scott M., Hazlewood G. P., Laurie J. I., Gilbert H. J., et Pickersgill R. W., Structure of the catalytic core of the family F xylanase from *Pseudomonas fluorescens* and identification of the xylopentaose-binding sites, *Structure*, **1994**, 2, 1107-1116

Harris G. W., Pickersgill R. W., Connerton I., Debeire P., Touzel J.-P., Breton C., et Pérez S., Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase, *Proteins*, **1997**, 29, 77-86

Harvey A. J., Hrmova M., De Gori R., Varghese J. N., et Fincher G. B., Comparative modeling of the three-dimensional structures of family 3 glycoside hydrolases, *Proteins*, **2000**, 41, 257-269

Havukainen R., Törrönen A., Laitinen T., et Rouvinen J., Covalent binding of three epoxyalkyl xylosides to the active site of endo-1,4-xylanase II from *Trichoderma reesei*, *Biochemistry*, **1996**, 35, 9617-9624

Hayashi H., Takehara M., Hattori T., Kimura T., Karita S., Sakka K., et Ohmiya K., Nucleotide sequences of two contiguous and highly homologous xylanase genes *xynA* and *xynB* and characterization of XynA from *Clostridium thermocellum, Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1999**, 51, 348-357

Hegde S. S., Kumar A. R., Ganesh K. N., Swaminathan C. P., et Khan M. I., Thermodynamics of ligand (substrate/end product) binding to endoxylanase from *Chainia* sp. (NCL-82-5-1): isothermal calorimetry and fluorescence titration studies, *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1388, 93-100 Hegyi H. & Gerstein M., The relationship between protein structure and function: a comprehensive survey with application to the yeast genome, *J. Mol. Biol.*, **1999**, 288, 147-164

Henrissat B., A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem. J.*, **1991**, 280, 309-316

Henrissat B. & Bairoch A., New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem. J.*, **1993**, 293, 781-788

Henrissat B. & Davies G. J., Structural and sequences-based classification of glycoside hydrolases, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **1997**, 7, 637-644

Hernandez A., Copa-Patino J. L., et Soliveri J., *xln23* from *Streptomyces chattanoogensis* UAH23 encodes a putative enzyme with separate xylanase and arabinofuranosidase catalytic domains, *DNA seq.*, **2001**, 12, 167-177

Hiromi K., Nitta Y., Numata C., et Ono S., Subsite affinities of glucoamylase: examination of the validity of the subsite theory, *Biochim. Biophys. Acta*, **1973**, 302, 362-375

Honda Y. & Kitaoka M., A family 8 glycoside hydrolase from *Bacillus halodurans* C-125 (BH2105) is a reducing end xylose-releasing exo-oligoxylanase, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 55097-55103

Hövel K., Shallom D., Niefind K., Belakhov V., Shoham G., Baasov T., Shoham Y., et Schomburg D., Crystal structure and snapshots along the reaction pathway of a family 51  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, *EMBO J.*, **2003**, 22, 4922-4932

Howard B. H., Jones G., et Purdom M. R., The pentosanases of some rumen bacteria, *Biochem. J.*, **1960**, 74, 173-180

Hrmova M., De Gori R., Smith B. J., K. F. J., Driguez H., Varghese J. N., et Fincher G. B., Structural basis for broad substrate specificity in higher plant  $\beta$ -D-glucan glucohydrolase, *Plant Cell*, **2002**, 14, 1033-1052

Hurlbert J. C. & Preston J. F., Functional characterization of a novel xylanase from a corn strain of *Erwinia chrysanthemi*, *J. Bact.*, **2001**, 183, 2093-2100

Hutchinson E. G. & Thornton J. M., A revised set of potentials for  $\beta$ -turn formation in proteins, *Prot. Sci.*, **1994**, 2, 2207-2216

#### 

Irwin D., Jung E. D., et Wilson D. B., Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1994**, 60, 763-770

Ito K., Ogasawara H., Sugimoto T., et Ishikawa T., Purification and properties of acid stable xylanases from Aspergillus kawachii, *Biosci. Biotech. Bioch.*, **1992**, 56, 547-550

Iwai H., Cyclic green fluorescent protein produced in vivo using an artificially split PI-*Pfu*I intein from *Pyrococcus furiosus, J. Biol. Chem.*, **2000**, 276, 16548–16554

Iwai H. & Plückthun A., Circular  $\beta$ -lactamase: stability enhancement by cyclizing the backbone, *FEBS Lett.*, **1999**, 459, 166-172

#### J

Janecek S. & Bateman A., The parallel  $(\alpha/\beta)_8$ -barrel: perhaps the most universal and the most puzzling protein folding motif, *Biologia*, **1996**, 51, 613-628

Jespersen H. M., MacGregor E. A., Sierks M. R., et Svensson B., Comparison of the domainlevel organization of starch hydrolases and related enzymes, *Biochem. J.*, **1991**, 180, 51-55

Joseleau J. P., Comtat J., et Ruel K., Chemical structure of xylans and their interactions in the plant cell walls, in: Xylans and Xylanases (édité par Visser J., Beldman G., A. K.-v. S. M., et Voragen A. G. J.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, **1992**, 7, 1-15

Juge N., Payan F., et Wiiliamson G., XIP-I, a xylanase inhibitor protein from wheat: a novel protein function, *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, 1696, 203-211

# Κ

Kaji A., Tagawa K., et Ichimi T., Properties of purified α-L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger, Biochim. Biophys. Acta*, **1969**, 171, 186-188

Kamitori S., Kondo S., Okuyama K., Yokota T., Shimura Y., Tonozuka T., et Sakano Y., Crystal structure of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α-amylase II (TVAII) hydrolysing cyclodextrins and pullulan at 2.6 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **1999**, 287, 907-921

Kaneko S., Arimoto M., Ohba M., Kobayashi H., Ishii T., et Kusakabe I., Purification and substrate specificity of two α-L-arabinofuranosidases from *Aspergillus awamori* IFO 4033, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1998**, 64, 4021-4027

Kelly S. M. & Price N. C., The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding, *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, 1338, 161-185

Kidby D. K. & Davidson D. J., A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range, *Anal. Biochem.*, **1973**, 55, 321-325

Kirk K. & Cullen D., Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi, in: Environment friendly technologies for pulp and paper industry (édité par Young R. A. et Akjtar M.), Wiley, New-York, USA, **1998**, 273-307

Ko E. P., Akatsuka H., Moriyama H., Shinmyo A., Haya Y., Katsube Y., Urabe I., et Okada H., Site-directed mutagenesis at aspartate and glutamate residues of xylanase from *Bacillus pumilus, Biochem. J.*, **1992**, 288, 117-121

Kormelink F. J. M. & Voragen A. G. J., Degradation of different [(glucurono)arabino]xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1993**, 38, 688-695

Koseki T., Okuda M., Sudoh S., Kizaki Y., Iwano K., Aramaki I., et Matsuzawa H., Role of two α-L-arabinofuranosidases in arabinoxylan degradation and characteristics of the encoding genes from shochu koji molds, *Aspergillus kawachii* and *Aspergillus awamori*, *J. Biosci. Bioeng.*, **2003**, 96, 232-241

Koshland D. E., Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions, *Biol. Rev.*, **1953**, 28, 416-436

Kosugi A., Murashima K., et Doi R. H., Characterization of two noncellulosomal subunits, ArfA and BgaA, from *Clostridium cellulovorans* that cooperate with the cellulosome in plant cell wall degradation, *J. Bact.*, **2002**, 184, 6859-6865

Krengel U. & Dijkstra B. W., Three-dimensional structure of endo-1,4-β-xylanase I from *Aspergillus niger*: molecular basis for its low pH optimum, *J. Mol. Biol.*, **1996**, 263, 70-78

Krishnamurthy S. & Vithayathil P. J., Purification and characterization of endo-1,4-βxylanase from *Paecilomyces varioti* Bainier, *J. Ferment. Bioeng.*, **1989**, 67, 77-82

Kumar P. R., Eswaramoorthy S., Vithayathil P. J., et Viswamitra M. A., The tertiary structure at 1.59 Å resolution and the proposed amino acid sequence of a family-11 xylanase from the thermophilic fungus *Paecilomyces varioti* Bainier, *J. Mol. Biol.*, **2000**, 295, 581-593

#### L

Lamed R., Setter E., Kenig R., et Bayer E. A., The cellulosome: a discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **1983**, 13, 163-181

Larson S. B., Day J., Barba de la Rosa A. P., Keen N. T., et McPherson A., First crystallographic structure of a xylanase from glycoside hydrolase family 5: implications for catalysis, *Biochemistry*, **2003**, 42, 8411-8422

Laskowski R. A., Luscombe N. M., Swindells M. B., et Thornton J. M., Protein clefts in molecular recognition and function, *Prot. Sci.*, **1996**, 5, 2438-2452

Lee J., Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol, J. Biotech., 1997, 56, 1-24

Lee R. C., Burton R. A., Hrmova M., et Fincher G. B., Barley arabinoxylan arabinofuranohydrolases: purification, characterization and determination of primary structures from cDNA clones, *Biochem. J.*, **2001**, 356, 181-189

Lee R. C., Hrmova M., Burton R. A., Lahnstein J., et Fincher G. B., Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -D-xylosidase activity, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 5377-5387

Lee S. F. & Forsberg C. W., Purification and characterization of an α-L-arabinofuranosidase from *Clostridium acteobutylocum* ATCC 824, *Can. J. Microbiol.*, **1987**, 33, 1011-1016

Livesay D. R., Jambeck P., Rojnuckarin A., et Subramaniyan S., Conservation of electrostatic properties within families and superfamilies, *Biochemistry*, **2003**, 42, 3464-3473

Lundgren K. R., Bergkvist L., Hogman S., Joves H., Eriksson G., Bartfai T., Laan J. V. D., Rosenberg E., et Shoham Y., TCF mill trial on soft wood pulp with Korsäs thermostable and alkaline stable xylanase T6, *FEMS Microbiol. Rev.*, **1994**, 13, 365

#### Μ

Mac Kenzie C. R. & Bilous D., Ferulic acid esterase activity from *Schizophyllum commune, Appl. Environ. Microbiol.*, **1988**, 54, 1170-1173

Madkour M. & Mayer F., Structural organization of the intact bacterial cellulosome as revealed by electron microscopy, *Cell Biol. Int.*, **2003**, 27, 831-836

Margolles A. & de los Reyes-Gavilan C. G., Purification and functional characterization of a novel α-L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2003**, 69, 5096-5103

Matsumura M., Signor G., et Matthews B. W., Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds, *Nature*, **1989**, 342, 291-293

Matsuo N., Kaneko S., Kuno A., Kobayashi H., et Kusakabe I., Purification, characterization and gene cloning of two α-L-arabinofuranosidases from *Streptomyces chartreuis* GS901, *Biochem. J.*, **2000**, 346, 9-15

Mc Neil M., Darvill A. G., Fry S. C., et Albersheim P., Structure and function of the primary cell walls of plants, *Annu. Rev. Biochem.*, **1984**, 53, 625-663

McCarter J. D. & Withers S. G., Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **1994**, 4, 885-892

McCarthy A. A., Morris D. D., Berquist P. L., et Baker E. N., Structure of XynB, a highly thermostable  $\beta$ -1,4-xylanase from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, at 1.8 Å resolution, *Acta Crystallogr.*, **2000**, D56, 1367-1375

McIntosh L. P., Hand G., Johnson P. E., Joshi M. D., Körner M., Plesniak L. A., Ziser L., Wakarchuk W. W., et Withers S. G., The pKa of the general acid/base carboxyl group of a glycosidase cycles during catalysis: a <sup>13</sup>C-NMR study of *Bacillus circulans* xylanase, *Biochemistry*, **1996**, 35, 9958-9966

McKie V. A., Black G. W., Millward-Sadler S. J., Hazlewood G. P., Laurie J. I., et Gilbert H. J., Arabinanase A from *Pseudomonas fluorescens* subsp. cellulosa exhibits both an endo- and an exo- mode of action, *Biochem. J.*, **1997**, 323, 547-555

McLauchlan W. R., Garcia-Conesa M. T., Williamson G., Roza M., et Revestein P., A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases, *Biochem. J.*, **1999**, 338, 441-446

Mine S., Ueda T., Hashimoto Y., et Imoto T., Improvement of the refolding yield and solubility of hen egg-white lysozyme by altering the Met residue attached to its N-terminus to Ser, *Prot. Eng.*, **1997**, 10, 1333-1338

Miyanaga A., Koseki T., Matsuzawa H., Wakagi T., Shoun H., et Fushinobu S., Crystal structure of a family 54  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase reveals a novel carbohydrate-binding module that can bind arabinose, *J. Biol. Chem.*, **2004a**, 279, 44907-44914

Miyanaga A., Koseki T., Matsuzawa H., Wakagi T., Shoun H., et Fushinobu S., Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of α-L-arabinofuranosidase B from *Aspergillus kawachii*, *Acta Crystallogr.*, **2004b**, D60, 1286-1288

Morosoli R., Roy C., et Yaguchi M., Isolation and partial primary sequence of a xylanase from the yeast *Cryptococcus albidus, Biochim. Biophys. Acta*, **1986**, 870, 473-478

Morris D. D., Gibbs M. D., Chin C. W. J., Koh M.-H., Wong K. K. Y., Allison R. W., Nelson P. J., et Bergquist P. L., Cloning of the xynB gene from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1 and action of the gene product on kraft pulp, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1998**, 64, 1759-1765

Morris D. D., Gibbs M. D., Ford M., Thomas J., et Bergquist P. L., Family 10 and 11 xylanase genes from *Caldicellulosiruptor* sp. strain Rt69B.1, *Extremophiles*, **1999**, 3, 103-111

Moult J. & Melamud E., From fold to function, Curr. Opin. Struc. Biol., 2000, 10, 384-389

Mueller-Hartley I., Hartley R. D., Harris P. J., et Curzon E. H., Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw, *Carbohydr. Res.*, **1986**, 148,

Muilu J., Törrönen A., Peräkylä M., et Rouvinen J., Functional conformational changes of endo-1,4-xylanase II from *Trichoderma reesei*: a molecular dynamics study, *Proteins*, **1998**, 31, 434-444

Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T., et Chothia C., SCOP: a structural classification of proteins databases for the investigation of sequences and structures, *J. Mol. Biol.*, **1995**, 247, 536-540

## Ν

Nakamura S., Aono R., Wakabayashi K., et Horikoshi K., Alkaline xylanase produced by newly isolated alkaliphilic *Bacillus* sp., in: Xylans and Xylanases (édité par Visser J., Beldman G., A. K.-v. S. M., et Voragen A. G. J.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, **1992**, 7, 443-446

Nurizzo D., Nagy T., Gilbert H. J., et Davies G. J., The structural basis for catalysis and specificity of the *Pseudomonas cellulosa* alpha-glucuronidase, *Structure*, **2002a**, 10, 547-556

Nurizzo D., Turkenburg J. P., Charnock S. J., Roberts S. M., Dodson E. J., McKie V. A., Taylor E. J., Gilbert H. J., et Davies G. J., *Cellvibrio japonicus*  $\alpha$ -L-arabinanase 43A has a novel five-blade  $\beta$ -propeller fold, *Nat. Struct. Biol.*, **2002b**, 9, 665-668

## 0

Oakley A. J., Heinrich T., Thompson C. A., et Wilce M. C. J., Characterization of a family 11 xylanase from *Bacillus subtilis* B230 used for paper bleaching, *Acta Crystallogr.*, **2003**, D59, 627-636

Oku T., Roy C., Watson D. C., Wakarchuk W. W., Campbell R. L., Yaguchi M., Jurasek L., et Paice M. G., Amino acid sequence and thermostability of xylanase A from *Schizophyllum commune, FEBS Lett.*, **1993**, 334, 296-300

Orengo C. A., Jones D. T., et Thornton J. M., Protein superfamilies and domain superfolds, *Nature*, **1994**, 372, 631-634

Orengo C. A., Todd A. E., et Thornton J. M., From protein structure to function, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **1999**, 9,

Otwinowski Z. & Minor W., Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.*, **1997**, 276, 307-326

# Ρ

Pace C. N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., et Gray T., How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Prot. Sci.*, **1995**, 4, 2411-2423

Palo J. & Savolainen H., Thin layer chromatographic demonstration of aspartylglycosylamina and a novel acidic carbohydrate in human tissues, *Agric. Biol. Chem.*, **1972**, 47, 957-963

Payan F., Flatman R., Porciero S., Wiiliamson G., Juge N., et Roussel A., Structural analysis of xylanase inhibitor protein (XIP-I), a proteinaceous xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*, var. Soisson), *Biochem. J.*, **2003**, 372, 399-405

Payan F., Leone P., Porciero S., Furniss C., Tahir T. A., Williamson G., Durand R., Manzanares P., Gilbert H. J., Juge N., et Roussel A., The dual nature of the wheat xylanase protein inhibitor XIP-1 - Structural basis for the inhibition of family 10 and family 11 xylanases, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 36029-36037

Pérez J., Muñoz-Dorado J., de la Rubia T., et Martinez J., Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview, *Int. Microbiol.*, **2002**, 5, 53-63

Perrakis A., Harkiolaki M., Wilson K. S., et Lamzin V. S., ARP/wARP and molecular replacement, *Acta Crystallogr.*, **2001**, D57, 1445-1450

Perutz M. F. & Raidt H., Stereochemical basis of heat stability in bacterial ferredoxins and in haemoglobin A2, *Nature*, **1975**, 255, 256-259

Pitson S. M., Voragen A. G. J., et Beldman G., Stereochemical course of hydrolysis catalyzed by arabinofuranosyl hydrolases, *FEBS Lett.*, **1996**, 398, 7-11

Plesniak L. A., Wakarchuk W. W., et McIntosh L. P., Secondary structure and NMR assignments of *Bacillus circulans* xylanase, *Prot. Sci.*, **1996**, 5, 1118-1135

Pons T., Naumoff D. G., Martinez-Fleites C., et Hernandez L., Three acidic residues are at the active site of a beta-propeller architecture in glycoside hydrolase families 32, 43, 62 and 68, *Proteins*, **2004**, 54, 424-432

Prade R. A., Xylanases: from biology to biotechnology, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **1995**, 13, 101-131

## Q

Quiocho F. A., Carbohydrate-binding: tertiary structures and protein-sugar interactions, *Annu. Rev. Biochem.*, **1986**, 55, 287-315

Quiocho F. A., Protein-carbohydrate interactions: basic molecular features, *Pure Appl. Chem.*, **1989**, 61, 1293-1306

## R

Ranaldi F., Vanni P., et Giachetti E., What students must know about the determination of enzyme kinetic parameters, *Biochemical Education*, **1999**, 27, 87-91

Reardon D. & Farber G. K., The structure and evolution of  $\alpha/\beta$  barrel proteins, *FASEB J.*, **1995**, 9, 497-503

Rémond C., Plantier-Royon R., Aubry N., Maes E., Bliard C., et O'Donohue M. J., Synthesis of pentose-containing disaccharides using a thermostable  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, *Carbohydr. Res.*, **2004**, 339, 2019-2025

Rémond C., Plantier-Royon R., Aubry N., et O'Donohue M. J., An original chemoenzymatic route for the synthesis of  $\beta$ -D-galactofuranosides using an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, *Carbohydr. Res.*, **2005**, 340, 637-644

Rémond-Zilliox C., Etude des mécanismes de dégradation enzymatique des parois végétales. Application à l'hydrolyse de la paille de blé par une endoxylanase purifiée., Thèse de doctorat, **1996**, Université de Reims Champagne-Ardenne

Richardson J. S., The anatomy and taxonomy of protein structure, *Adv. Prot. Chem.*, **1981**, 34, 167-339

Roberge M., Shareck F., Morosoli R., Kluepfel D., et Dupont C., Characterization of two important histidine residues in the active site of xylanase A from *Streptomyces lividans*, a family 10 glycanase, *Biochemistry*, **1997**, 36, 7769-7775

Rombouts F. M., Voragen A. G. J., Searle-van Leeuwen M. J. F., Geraeds C. C. J. M., Schols H. A., et Pilnik W., The arabinanases of *Aspergillus niger* - Purification and characterisation of two  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases and an endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanase, *Carbohydr. Polym.*, **1988**, 9, 25-47

#### S

Saarilahti H. T., Henrissat B., et Pavla E. T., CelS: a novel endoglucanase identified from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Gene*, **1990**, 90, 9-14

Sabini E., Sulzenbacher G., Dauter M., Dauter Z., Jorgensen P. L., Schulein M., Dupont C., Davies G. J., et Wilson K. S., Catalysis and specificity in enzymatic glycoside hydrolysis: a 2,5B conformation for the glycosyl-enzyme intermediate revealed by the structure of the *Bacillus agaradhaerens* family 11 xylanase, *Chem. Biol.*, **1999**, 6, 483-492

Sabini E., Wilson K. S., Danielsen S., Shülein M., et Davies G. J., Oligosaccharide binding to family 11 xylanases: both covalent intermediate and mutant product complexes display  $^{2,5}B$  conformations at the active centre, *Acta Crystallogr.*, **2001**, D57, 1344-1347

Saha B. C.,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology, *Biotechnol. Adv.*, **2000**, 18, 403-423

Saha B. C., Hemicellulose bioconversion, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2003, 30, 279-291

Sakamoto T., Fujita T., et Kawasaki H., Transglycosylation catalyzed by a *Penicillium chrysogenum* exo-1,5-α-L-arabinanase, *Biochim. Biophys. Acta*, **2004a**, 1674, 85-90

Sakamoto T., Ihara H., Shibano A., Kasai N., Inui H., et Kawasaki H., Molecular characterization of a *Penicillium chrysogenum* exo-1,5-α-L-arabinanase that is structurally distinct from other arabinan-degrading enzymes, *FEBS Lett.*, **2004b**, 560, 199-204

Sakamoto T. & Thibault J.-F., Exo-arabinanase of *Penicillium chrysogenum* able to release arabinose from  $\alpha$ -1,5-L-arabinan, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, 67, 3319-3321

Sakka K., Kojima Y., Kondo T., Karita S., Shimada K., et Ohmiya K., Purification and characterization of xylanase A from *Clostridium stercorarium* F-9 and a recombinant *Escherichia coli, Biosci. Biotech. Bioch.*, **1994**, 58, 1496-1499

Samain E., Debeire P., et Touzel J. P., High level production of a cellulase-free xylanase in glucose-limited fed batch cultures of a thermophilic *Bacillus* strain, *J. Biotech.*, **1997**, 58, 71-78

Samain E., Touzel J. P., Brodel B., et Debeire P., Isolation of a thermophilic bacterium producing high levels of xylanase, in: Xylans and Xylanases (édité par Visser J., Beldman G., Kusters-van Someren M. A., et Voragen A. G. J.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, **1992**, 7, 467-470

Sapag A., Wouters J., Lambert C., de Ioannes P., Eyzaguirre J., et Depiereux E., The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships, *J. Biotech.*, **2002**, 95, 109-131

Saulnier L., Marot C., Chanliaud E., et Thibault J.-F., Cell wall polysaccharide interactions in maize bran, *Carbohydr. Polym.*, **1995**, 26, 279-287

Schmitt E., Guillon, J. M., Meinnel T., Mechulam Y., Dardel F., et Blanquet S., Molecular recognition governing the initiation of translation in *Escherichia coli*. A review, *Biochimie*, **1996**, 76, 543-554

Schneider H., Conversion of pentoses to ethanol by yeasts and fungi, *Critic. Rev. Biotech.*, **1989**, 9, 1-40

Schülein M., Protein engineering of cellulases, Biochim. Biophys. Acta, 2000, 1543, 239-252

Schwarz W. H., Bronnenmeir K., Krause B., Lottspeich F., et Staudenbauer W. L., Debranching of arabinoxylan: properties of the thermoactive recombinant α-Larabinofuranosidase from *Clostridium stercorarium, Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1995**, 43, 856-860

Shallom D., Belakhov V., Solomon D., S. G.-G., Baasov T., Shoham G., et Shoham Y., The identification of the acid-base catalyst of  $\alpha$ -arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase, *FEBS Lett.*, **2002a**, 514, 163-167

Shallom D., Belakhov V., Solomon D., Shoham G., Baasov T., et Shoham Y., Detailed kinetic analysis and identification of the nucleophile in  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from

*Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase, *J. Biol. Chem.*, **2002b**, 277, 43667-43673

Shallom D., Leon M., Bravman T., Ben-David A., Zaide G., Belakhov V., Shoham G., Schomburg D., Baasov T., et Shoham Y., Biochemical characterization and identification of the catalytic residues of a family 43  $\beta$ -D-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-*6, Biochemistry*, **2005**, 44, 387-397

Shallom D. & Shoham Y., Microbial hemicellulases, Curr. Opin. Microbio., 2003, 6, 219-228

Shareck F., Roy C., Yaguchi M., Morosoli R., et Kluepfel D., Sequences of the three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans, Gene*, **1991**, 107, 75-82

Sheldrick G. M. & Schneider H., SHELXL: high-resolution refinement, *Methods Enzymol.*, **1997**, 277, 319-343

Shibuya H., Kaneko S., et Hayashi K., Enhancement of the thermostability and hydrolytic activity of xylanase by random gene shuffling, *Biochem. J.*, **2000**, 349, 651-656

Shibuya N. & Iwasaki T., Structural features of rice bran hemicellulose, *Phytochem.*, **1985**, 24, 285-289

Shin H.-Y., Park S.-Y., Sung J. H., et Kim D.-H., Purification and characterization of  $\alpha$ -Larabinopyranosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium breve* K-110, a human intestinal anaerobic bacterium metabolizing ginsenoside Rb2 and Rc, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2003**, 69, 7116-7123

Sibbesen O. & Sorensen J. F., Xylanse variants having altered sensitivity to xylanse inhibitors, Patent application WO 01/66711, **2001** 

Sidhu G., Withers S. G., Nguyen N. T., McIntosh L. P., Ziser L., et Brayer G. D., Sugar ring distorsion in the glycosyl-enzyme intermediate of a family G/11 xylanase, *Biochemistry*, **1999**, 38, 5346-5354

Sinnott M. L., Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer, *Chem. Rev.*, **1990**, 90, 1171-1202

Smyth D. G., Stein W. H., et Moore S., The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: revisions and confirmations, *J. Biol. Chem.*, **1963**, 238, 227-234

Sorensen M., Kragh K. M., Sibbesen O., Delcour J. A., Goesaert H., Svensson B., Tahir T. A., Brufau J., Perez-Vendrell A. M., Bellicampi D., D'Ovidio R., Carmadella L., Giovane A., Bonnin E., et Juge N., Potential role of glycosidase inhibitors in industrial biotechnological applications, *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, 1696,

Studier F. W. & Moffatt B. A., Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.*, **1986**, 289, 113-130

Subramaniyan S. & Prema P., Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application, *Critic. Rev. Biotech.*, **2002**, 22, 33-64

Suganuma T., Matsuno R., Ohnishi M., et Hiromi K., A study of the mechanism of action of taka-amylase  $A^1$  on linear oligosaccharides by product analysis and computer simulation, *J. Biochem.*, **1978**, 84, 293-316

Suganuma T., Ohnishi M., Hiromi K., et Nagahama T., Elucidation of the subsite structure of bacterial saccharifying alpha-amylase and its mode of degradation of maltose, *Carbohydr*. *Res.*, **1996**, 282, 171-180

Sulzenbacher G., Mackenzie L. F., Wilson K. S., Withers S., Dupont C., et Davies G. J., The crystal structure of a 2-fluorocellotriosyl complex of the *Streptomyces lividans* endoglucanase CelB2 at 1.1 Å resolution, *Biochemistry*, **1999**, 38, 4826-4833

Sulzenbacher G., Shareck F., Morosoli R., Dupont C., et Davies G. J., The *Streptomyces lividans* family 12 endoglucanase: construction of the catalytic core, expression, and X-ray structure at 1.75 Å resolution, *Biochemistry*, **1997**, 36, 16032-16039

Sunna A., Gibbs M. D., et Bergquist P. L., The thermostabilizing domain, XynA, of *Caldibacillus cellulovorans* xylanase is a xylan binding domain, *Biochem. J.*, **2000**, 346, 583-586

Suzuki T., Ibata K., Hatsu M., Takamizawa K., et Kawai K., Cloning and expression of a 58kDa xylanase VI gene (*xynD*) of *Aeromonas caviae* ME-1 in *Escherichia coli* which is not categorized as a family F or family G xylanase, *J. Ferment. Bioeng.*, **1997**, 84, 86-89

# Т

Tagawa K. & Kaji A., Preparation of L-arabinose-containing polysaccharides and the action of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase on these polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, **1969**, 11, 293-301

Tahir T. A., Berrin J.-G., Flatman R., A. R., Roepstorff P., Williamson G., et Juge N., Specific characterization of substrate and inhibitor binding sites of a glycosyl hydrolase family 11 xylanases from *Aspergillus niger, J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 44035-44043

Tatu U., Murthy S. K., et Vithayathil P. J., Role of a disulfide cross-link in the conformational stability of a thermostable xylanase, *J. Prot. Chem.*, **1990**, 9, 641-646

Tenkanen M., Burgermeister M., Vrsanka M., Biely P., Saloheimo M., et Siika-Aho M., A novel xylanase XYN IV from *Trichoderma reesei* and its action on different xylans, in: Recent advances in enzymes in grain processing (édité par Courtin C. M., Veraverbeke W. S., et Delcour J. A.), Kat. Univ. Leuven., Leuven, Belgium, **2003**, 41-46

Thoma J. A., Rao G. V. K., Brothers C., Spradlin J., et Li L. H., Subsite mapping of enzymes. Correlation of product patterns with Michaelis parameters and substrate-induced strain, *J. Biol. Chem.*, **1971**, 246, 5621-5635

Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., et Higgins D., The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignement aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25, 4876-4882

Thornton J. M., Todd A. E., Milburn D., Borkakoti N., et Orengo C. A., From structure to function: approaches and limitations, *Nat. Struct. Biol.*, **2000**, 11, 991-994

Tomme P. & Claeyssens M., Identification of the functional important carboxylgroup in cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*: a chemical modification study, *FEBS Lett.*, **1989**, 243, 239-243

Törrönen A., Harkki A., et Rouvinen J., Three-dimensional structure of endo-1,4- $\beta$ -xylanase II from *Trichoderma reesei*: two conformational states in the active site, *EMBO J.*, **1994**, 13, 2493-2501

Törrönen A. & Rouvinen J., Structural comparison of two major endo-1,4-xylanases from *Trichoderma reesei, Biochemistry*, **1995**, 34, 847-856

Touzel J. P., O'Donohue M. J., Debeire P., Samain E., et Breton C., *Thermobacillus xylanilyticus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **2000**, 50, 315-320

Trabi M. & Craik D. J., Circular proteins - no end in sight, *Trends Biochem. Sci.*, **2002**, 27, 132-138

Tsujibo H., Takada C., Wakamatsu Y., Kosaka M., Tsuji A., Miyamoto K., et Inamori Y., Cloning and expression of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase gene (*stxIV*) from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520, and characterization of the enzyme, *Biosci. Biotech. Bioch.*, **2002**, 66, 434-438

Turunen O., Etuaho K., Fenel F., Vehmaanperä J., Wu X., Rouvinen J., et Leisola M., A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the  $\alpha$ -helix region of *Trichoderma reesei* endo-1,4- $\beta$ -xylanase II increases the thermal stability through synergism, *J. Biotech.*, **2001**, 88, 37-46

# V

Van den Burg B., Vriend G., Veltman O. R., Venema G., et Eijsink V. G. H., Engineering an enzyme to resist boiling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 2056-2060

Van Doorsaler E., Kersers-Hilderson H., et De Bruyne C. K., Hydrolysis of  $\beta$ -D-xylooligosaccharides by  $\beta$ -D-xylosidase from *Bacillus pumilus, Carbohydr. Res.*, **1985**, 140, 342-346

Van Laere K. M. J., Beldman G., et Voragen A. G. J., A new arabinofuranohydrolase from *Bifidobacterium adolescentis* able to remove arabinosyl residues from double-substituted xylose units in arabinoxylan, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1997**, 47, 231-235

Van Petegem F., Collins T., Meuwist M.-A., Gerday C., Feller G., et Van Beeumen J., The structure of a cold-adapted family 8 xylanase at 1.3 A resolution, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 7531-7539

Varghese J. N., Hrmova M., et Fincher G. B., Three-dimensional structure of a barley  $\beta$ -D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase, *Structure*, **1999**, 7, 179-190

Viikari L., Ranua M., Kantelinen A., Sundquist J., et Linko M., Bleaching with enzymes, Proceedings of the 3rd International Conference on Biotechnology Pulp and Paper Industry, Stockolm, Sweden, **1986**, June 16-19, 67-69 Vincent P., Shareck F., Dupont C., Morosoli R., et Kluepfel D., New  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase produced by *Streptomyces lividans*: cloning and DNA sequence of the *abfB* gene and characterization of the enzyme, *Biochem. J.*, **1997**, 322, 845-852

Vogt G., Woell S., et Argos P., Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs, *J. Mol. Biol.*, **1997**, 269, 631-643

Voragen A. G. J., Gruppen H., Verbruggen M. A., et Viëtor R. J., Characterization of cereal arabinoxylans, in: Xylans and Xylanases (édité par Visser J., Beldman G., A. K.-v. S. M., et Voragen A. G. J.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, **1992**, 7, 51-67

Vyas N. K., Atomic features of protein-carbohydrate interactions, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **1991**, 1, 732-740

#### W

Wakarchuk W. W., Robert L., Campbell R. L., Sung W. L., Davoodi J., et Yaguchi M., Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase, *Prot. Sci.*, **1994a**, 3, 467-475

Wakarchuk W. W., Sung W. L., Campbell R. L., Cunningham A., Watson D. C., et Yaguchi M., Thermostabilization of the *Bacillus circulans* xylanase by the introduction of disulfide bonds, *Prot. Eng.*, **1994b**, 7, 1379-1386

Whistler R. L. & Masak E., Enzymatic hydrolysis of xylan, J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 1241-1243

White A., Withers S. G., Gilkes N. R., et Rose D. R., Crystal structure of the catalytic domain of the beta-1,4-glycanase cex from *Cellulomonas fimi, Biochemistry*, **1994**, 33, 12546-12552

Wierenga R. K., The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes, *FEBS Lett.*, **2001**, 492, 193-198

Williams A. & Westhead D. R., Sequence relationships in the legume lectin fold and other jelly rolls, *Prot. Eng.*, **2002**, 15, 771-774

Winterhalter C., Heinrich P., Candussio A., Wich G., et Liebl W., Identification of a novel cellulose-binding domain within the multidomain 120 kDa xylanase XynA of the hyperthemophilic bacterium *Thermotoga maritima, Mol. Microbiol.*, **1995**, 15, 431-444

Wolfenden R., Lu X., et Young G., Spontaneous hydrolysis of glycosides, J. Am. Chem. Soc., **1998**, 120, 6814-6815

Wong K. K. Y., Tan L. U. L., et Saddler J. N., Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications, *Microb. Rev.*, **1988**, 52, 305-317

Wouters J., Georis J., Engher D., Vandenhaute J., Dusart J., Frere J. M., Depiereux E., et Charlier P., Crystallographic analysis of family 11 endo- $\beta$ -1,4-xylanase Xyl1 from *Streptomyces* sp. S38, *Acta Crystallogr.*, **2001**, D57, 1813-1819

# Χ

Xiong H., Fenel F., Leisola M., et Turunen O., Engineering the thermostability of *Trichoderma reesei* endo-1,4- $\beta$ -xylanase II by combination of disulphide bridges, *Extremophiles*, **2004**, 8, 393-400

# Y

Yang J. K., Yoon H.-J., Ahn H. J., Lee B. I., Pedelacq J.-D., Liong E. C., Berendzen J., Laivenieks M., Vieille C., Zeikus J. G., Vocadlo D. J., Withers S. G., et Suh S. W., Crystal structure of  $\beta$ -D-xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, a family 39 glycoside hydrolase, *J. Mol. Biol.*, **2004**, 335, 155-165

## Ζ

Zheng-Qiang J., Wei D., Li-Te L., Chang-He D., Isao K., et Sze-Sze T., A novel, ultra-large xylanolytic complex (xylanosome) secreted by *Streptomyces olivaceoviridis, Biotechnology Letters*, **2004**, 26, 431-436

Zhu H., Paradis F. W., Krell P. J., Phillips J. P., et Forsberg C. W., Enzymatic specificities and modes of action of the two catalytic domains of the XynC xylanase from *Fibrobacter* succinogenes S85, J. Bact., **1994**, 176, 3885-3894

Zverlov V. V., Liebl W., Bachleitner M., et Schwarz W. H., Nucleotide sequence of arfB of *Clostridium stercorarium*, and prediction of catalytic residues of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases based on local similarity with several families of glycosyl hydrolases, *FEMS Microbiol. Lett.*, **1998**, 164, 337-343

# Étude structure/fonction d'hémicellulases thermostables : la xylanase GH–11 et l'arabinofuranosidase GH–51 de *Thermobacillus xylanilyticus*.

*Résumé* : Les enzymes dégradant les hémicelluloses, comme les xylanases ou les arabinofuranosidases, possèdent un fort potentiel en tant que biocatalyseurs dans des applications industrielles. Ces enzymes sont déjà employées dans des secteurs variés comme l'industrie du papier dans l'étape du blanchiment de la pâte à papier, l'alimentation animale où elles permettent d'accroître la valeur nutritionnelle, l'industrie du vin pour favoriser la libération des arômes, etc. De plus, les hémicellulases apparaissent comme des éléments essentiels dans le futur développement de bioraffineries qui convertiront les déchets agricoles en carburant et autres produits chimiques.

Pour améliorer notre compréhension des motifs structuraux qui jouent un rôle dans la fonctionnalité des hémicellulases, nous avons étudié la relation structure/fonction d'enzymes appartenant à deux familles d'hémicellulases. La technique de mutagenèse dirigée a été employée pour explorer différents aspects fonctionnels d'une xylanase GH–11 thermostable (Tx–Xyl), et une analyse cristallographique a été menée sur une arabinofuranosidase GH–51 thermostable (Tx–Abf), ces deux enzymes étant issues du micro-organisme *Thermobacillus xylanilyticus*.

Concernant Tx–Xyl, à la fois sa thermostabilité et un des ses motifs structuraux majeur (le « pouce ») ont été étudiés. Dans le but d'augmenter sa thermostabilité et donc le rendement de dégradation de la biomasse lignocellulosique, une stratégie déjà connue consistant en l'introduction de ponts disulfures a été utilisée. Un mutant affichant un temps de demi-vie à 70°C accru (par un facteur 10) et une plus forte activité spécifique (+ 30%) a été obtenu. Par ailleurs, ce mutant est capable de mieux dégrader les arabinoxylanes constituant le son de blé. Mais de manière surprenante, cette augmentation n'est pas due à la meilleure thermostabilité du mutant.

À partir d'études de modélisation moléculaire, des modifications de la composition en acides aminés du pouce de Tx–Xyl sur des positions clés ont contribué à augmenter ou diminuer l'activité catalytique. La suppression du pouce par mutagenèse dirigée a entraîné un changement de spécificité de substrat, et a aboli l'activité enzymatique. En particulier, l'enzyme sans pouce a acquis la faculté de fixer le cellotétraose, sans pour autant que ce ligand ne soit hydrolysé.

Enfin, l'étude par cristallographie de Tx–Abf a fourni un modèle structural de cette enzyme à une résolution de 2,1 Å. Cette nouvelle structure, la deuxième dans la famille GH–51, a montré que le domaine catalytique possède une architecture en  $(\beta/\alpha)_8$  et aussi la présence d'un domaine en *jelly-roll* de fonction inconnue. En comparaison avec l'unique autre structure existant dans cette famille GH–51, Tx–Abf comporte deux ponts disulfures dont l'un est proche du site actif. De plus, la topologie de la crevasse des deux enzymes s'avère différente. La mutagenèse dirigée du résidu Trp<sup>248</sup> a révélé son rôle essentiel pendant l'hydrolyse d'arabinoxylo-oligosaccharides de DP3 ou plus.

Mots-clés : xylanase, arabinofuranosidase, thermostabilité, pont disulfure, pouce

# Structure/function relationship of two thermostable hemicellulases: the GH–11 xylanase and the GH–51 arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*.

*Abstract*: Hemicellulose-degrading enzymes such as xylanases and arabinofuranosidases are potentially useful as biocatalysts for industrial applications. Theses enzymes are already used in numerous sectors such as paper industry for paper pulp whitening, in animal feed preparation to increase nutritional value, in the wine industry to improve bouquet properties etc. In addition, hemicellulases will be key enzymes for the future development of biorefineries which will convert agricultural wastes into transport fuels and other renewable chemicals.

To increase understanding of the structural features that are important for the functionality in hemicellulases, we have studied structure/function relationships in enzymes belonging to two hemicellulases families. Directed mutagenesis methods have been used to probe different functional aspects in a thermostable GH–11 endoxylanase (Tx–Xyl), and a crystallographic analysis has been used to study a thermostable GH–51 arabinofuranosidase (Tx–Abf), both enzymes being from *Thermobacillus xylanilyticus*.

Tx-Xyl has been studied with regard to its thermostability and with regard to one of its major structural features, the "thumb". In order to increase thermostability and hence the usefulness for the degradation of lignocellulosic biomass, an already-tested strategy involving the introduction of disulphide bonds was used. A mutant that exhibits both an increased (10-fold) half-life at 70°C and higher specific activity (30% increase) has been obtained. Gratifyingly, this mutant also displays an increased aptitude for the hydrolysis of arabinoxylans embedded in wheat bran. However, intriguingly, this increase is independent of the increased thermostability.

On the basis of a molecular modelling study, modifications of the amino acid composition of Tx-Xyl thumb at key positions lead to increased or decreased catalytic activity. The abolition of the thumb by deletion mutagenesis altered substrate selectivity, and destroyed catalytic activity. In particular, the thumbless enzyme acquired the ability to fix cellotetraose, although this ligand could not be hydrolysed.

Finally, a crystallographic study of Tx–Abf has provided a structural model for this enzyme at a resolution of 2.1 Å. This new structure, the second for GH–51, revealed that the catalytic domain exhibits  $(\beta/\alpha)_8$  architecture and the presence of a jelly-roll domain of unknown function. Compared to the only available structure for GH–51, Tx–Abf contains two putative disulphide bridges, one of which is close to the catalytic apparatus. In addition, the architecture of the catalytic cleft is topologically different to that of the other GH–51 structure. Site-directed mutagenesis of Trp<sup>248</sup> has indicated an essential role for this residue in the hydrolysis of arabino-xylo oligosaccharides having a size of DP3 or more.

Key-words: xylanase, arabinofuranosidase, thermostability, disulphide bridge, thumb