



UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialités: Biochimie et Biologie moléculaire

Définition des critères d'efficacité d'une hémicellulase pour l'hydrolyse de substrats lignocellulosiques complexes et insolubles

par

Imen BOUKARI

Soutenue le 17 juin 2010 devant le Jury composé de:

Mme C. LAPIERRE, Professeur AgroParisTech, Thiverval-Grignon	Rapportrice
Mr E. RECORD, Chargé de recherche INRA, Marseille	Rapporteur
Mr L. SAULNIER, Directeur de recherche INRA, Nantes	Examinateur
Mr M.J. O'DONOHUE, Directeur de recherche INRA, Toulouse	Directeur de Thèse
Mme B. CHABBERT, Chargée de recherche INRA, Reims	Co-directrice de Thèse
Mme C. RÉMOND, Maître de conférences URCA, Reims	Co-directrice de Thèse

Laboratoire INRA, UMR-614 Fractionnement des Agro-Ressources et Environnement, Reims

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialités: Biochimie et Biologie moléculaire

Définition des critères d'efficacité d'une hémicellulase pour l'hydrolyse de substrats lignocellulosiques complexes et insolubles

par

Imen BOUKARI

Soutenue le 17 juin 2010 devant le Jury composé de:

Mme C. LAPIERRE, Professeur AgroParisTech, Thiverval-Grignon	Rapportrice
Mr E. RECORD, Chargé de recherche INRA, Marseille	Rapporteur
Mr L. SAULNIER, Directeur de recherche INRA, Nantes	Examinateur
Mr M.J. O'DONOHUE, Directeur de recherche INRA, Toulouse	Directeur de Thèse
Mme B. CHABBERT, Chargée de recherche INRA, Reims	Co-directrice de Thèse
Mme C. RÉMOND, Maître de conférences URCA, Reims	Co-directrice de Thèse

Laboratoire INRA, UMR-614 Fractionnement des Agro-Ressources et Environnement, Reims

A ma tendre mère A mon cher père A mes sœurs A tatino

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury de thèse qui ont accepté d'investir leur temps pour évaluer mon travail : Catherine Lapierre, Eric Record et Luc Saulnier.

Je remercie l'INRA et la région Champagne-Ardenne pour avoir financé ma bourse de thèse. Je voudrais remercier Michael O'Donohue, mon directeur de thèse, pour m'avoir acceptée sur ce projet et m'avoir offert l'opportunité de travailler sur un sujet initiateur conjuguant la biochimie et la biologie moléculaire. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée au cours de ces dernières années.

Je souhaite exprimer mes plus sincères reconnaissances et toute ma sympathie à Brigitte Chabbert et à Caroline Rémond qui ont codirigé "sans relâche" mes recherches. Leurs compétences scientifiques ainsi que leur enthousiasme ont été une source de soutien et de motivation permanente. Il me tient à cœur d'insister sur leurs qualités humaines, leur patience, leur disponibilité, leur soutien, leur encouragement...Merci pout tout !

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé au bon déroulement et à la valorisation de cette thèse. J'exprime ma gratitude à Jean Luc Putaux et Bernard Cathala pour leur participation active et leur critique scientifique mise à profit dans mes travaux de recherche. Je tiens à remercier chaleureusement Haryvoni pour ses conseils précieux, sa disponibilité et sa gentillesse. Un merci particulier à celle qui m'a appris ma première PCR, Béatrice Hermant. J'adresse mes sincères remerciements également à Anouck Habrant, Jean Pierre Touzel, David Crônier et Nathalie Aubry pour leur assistance et leur gentillesse.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes de l'unité INRA de Reims. Un grand merci à tous les chercheurs, les techniciens, les post-doctorants, les thésards, les stagiaires et d'autres, que j'ai rencontrés durant ces années à Reims, merci pour l'accueil chaleureux que vous m'avez témoigné ainsi que pour votre aide.

Je tiens à remercier ma famille, en particulier mes parents qui m'ont donné la force et le courage de continuer sur ce chemin. Bien sûr, je pense à mes très chères sœurs, sans leur soutien au quotidien, il m'aurait été difficile de réaliser ce travail.

Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond amour...

Liste des abréviations

AX	arabinoxylanes		
CBD	Cellulose Binding Domain, domaine de fixation à la cellulose		
CBM	Carbohydrate Binding Module, module de fixation aux polysaccharides		
Da	Dalton		
DC	domaine catalytique		
di-FA	dimères d'acide férulique		
DHP	dehydrogenative polymers, lignines de synthèse		
DP	degré de polymérisation		
FA	acide férulique		
G	unité gaïacyle		
GAX	glucuronoarabinoxylanes		
GFP	green fluorescent protein		
GH	glycoside-hydrolase		
Н	unité <i>p</i> -hydroxyphényle		
HX	hétéroxylanes		
HP-SEC	2 High performance size exclusion chromatographic, chromatographie d'exclusion		
	stérique		
k _{cat}	constante catalytique		
K _m	constante de Michaelis-Menten		
LCC	Lignin-Carbohydrates Complexes		
MET	microscopie électronique à transmission		
MQ	méthylène quinone		
pCA	acide p-coumarique		
S	unité syringyle		
SA	site actif		
SSF	site secondaire de fixation		
Tx-Xyl	endoxylanase GH11 de Thermobacillus xylanilyticus		
UI	unités internationales (µmol/min)		
XBD	Xylane Binding Domain, domaine de fixation aux xylanes		
ZL	mode de polymérisation "Zulaufverfahren"		
ZT	mode de polymérisation "Zutropfverfahren"		

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : La bioraffinerie

Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation des lignocelluloses au sein des tissus et de la paroi végétale.

Figure 3 : Structure et organisation de la cellulose dans la paroi végétale

Figure 4 : Représentation schématique de la structure des hétéroxylanes des fibres de maïs

Figure 5: Structure chimique des acides férulique (FA) et *p*-coumarique (pCA)

Figure 6: Formation et structure des différents déhydrodimères de l'acide férulique

Figure 7: Exemples de liaisons inter-monomères au sein des lignines

Figure 8: Modèle structural de lignines d'Angiospermes

Figure 9: Schéma de la polymérisation des monomères de lignines

Figure 10: Modèles structuraux de parois végétales

Figure 11: Réticulation covalente des arabinoxylanes entre eux et avec les lignines

Figure 12 : Représentation schématique de l'organisation supramoléculaire d'un cellulosome à la surface d'une cellule bactérienne

Figure13 : Modes d'action des glycoside hydrolases et relation avec la topologie du site actif.

Figure 14 : Mécanisme d'une β -D-glycoside hydrolase agissant avec rétention de configuration

Figure 15 : Mécanisme d'une β -D-glycoside hydrolase agissant avec inversion de

configuration

Figure 16 : Structure des CBM de type A, B et C

Figure 17 : Classification fonctionnelle et structurale des CBM

Figure 18 : Le CBM1 Cel7A de Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)

Figure19 : Les principales hémicellulases impliquées dans la dégradation des hétéroxylanes

Figure 20 : Structure des principales familles de xylanases GH10 et GH11

Figure 22 : Les différentes topographies des XBD

Figure 22 : Structure des xylanases GH11

Figure 23 : Alignement de séquences de xylanases 11 de structure connue

Figure 24 : Structure du pouce de la xylanase 11 (Tx-Xyl) de Thermobacillus xylanilyticus

Figure 25 : Différences du mode d'action des xylanases 10 et 11 sur les hétéroxylanaes

Figure 26 : Nomenclature des sous-sites de fixation chez les glycoside-hydrolases

Figure 27 : Modélisation des sous-sites d'arrimage et de fixation du xylohexaose dans la crevasse catalytique de la xylanase 11 (Tx-Xyl) de *Thermobacillus xylanilyticus*Figure 28 : Site secondaire de fixation de la xylanase 11 (BcX) de *Bacillus circulans*

Tableau 1 : Composition des lignocelluloses de quelques co-produits agricoles

Tableau 2: Composition en monosaccharides d'hétéroxylanes de différentes origines

Tableau 3: Monomères et unités des lignines

Tableau 3: Monomères et unités des lignines

Tableau 4 : Clans des glycoside-hydrolases

Tableau 5 : Les super-familles de repliement des CBM

Tableau 6 : Classification des CBM en types fonctionnels

Tableau 7: Familles des GH présentant une activité xylanase et principales caractéristiques

Tableau 8: Les principaux CBM associés aux xylanases de structure connue

Tableau 9: Bilan des interactions entre le xylohexaose modélisé et les sous-sites de Tx-Xyl.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
A. La biomasse lignocellulosique : élément de base de la bioraffinerie	5
I. Diversité et potentiels des lignocelluloses	5
II. Les parois végétales lignifiées : constituants majeurs des lignocelluloses	7
III. Variabilité structurale des lignocelluloses : composition biochimique III. 1. La cellulose III. 2. Les hémicelluloses	9 9 10
III. 2. 1. Les hétéroxylanes : Structure générale et hétérogénéité chimique	11
III. 2. 2. Propriétés physico-chimiques des hétéroxylanes	13
III. 2. 2. 1. Structure 3D ou conformation	13
III. 2. 2. 2. Degre de substitution, masse moleculaire	15
III 4 Les lignines	16
III. 4. 1. Variabilité structurale	16
III. 4. 2. Biosynthèse/polymérisation	19
III. 5. Mise en place et interactions entre les constituants du réseau pariétal	20
B. Fractionnement enzymatique des lignocelluloses	23
I. Diversité des stratégies de fractionnement	23
II. Les enzymes dégradant les lignocelluloses : diversité et structure multi- modulaire des glycoside-hydrolases	24
II.1. Les domaines catalytiques (DC)	24
II.1.1. Classification	24
II.1.2. Modes d'action et mécanismes catalytiques	26
II.2. Les domaines de fixation non catalytiques : les CBM	29
II.2.1. Nomenclature et classification des CBM	30
II.2.2. Specificites et mecanismes de fixation de substrats	32 27
II.2.3. Fonctions des CBM II.2.4. Exemple de CBM : le CBM1 Cel7a de <i>Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)</i>	38
III. Dégradation des hémicelluloses : les hémicellulases	41

IV. Les endoxylanases	42
IV.1. Présentation générale	42
IV.1.1. Diversité et classification des endoxylanases	42
IV.1.2. Mécanismes catalytiques	43
IV.1.3. Les CBM des endoxylanases	45
IV.2. Les endoxylanases de la famille 10	47
IV.3. Les endoxylanases de la famille 11	48
IV.3.1. Propriétés structurales : le domaine catalytique (DC)	48
IV.3.2. Propriétés catalytiques et fonctionnelles	52
IV.3.2.1. Catalyse enzymatique : site actif et dynamique moléculaire	52
IV.3.2.2. Spécificité et sélectivité de substrats	54
IV.3.2.3. Stabilité au pH, thermostabilité, sensibilité aux inhibiteurs protéiques	60
IV.3.3. L'endoxylanase GH11 (Tx-Xyl) de Thermobacillus xylanilyticus	61
IV.4. Applications des xylanases	62
V. Facteurs affectant le fractionnement enzymatique des lignocelluloses	63

CHAPITRE I

In vitro model assemblies to study the impact of lignin-carbohydrate 66 interactions on the enzymatic conversion of xylan

67
68
70
73
82
86
93

CHAPITRE II

Effect of lignin content on a GH11 endoxylanase acting on 94 glucuronoarabinoxylan-lignin nanocomposites

Abstract	95
Introduction	96

Materials and methods	98
Results and discussion	102
Conclusion	109
References	111
Figures	114
Tables	119

Probing a family GH11 endo-β-1,4-xylanase inhibition mechanism by 121 phenolic compounds: Role of functional phenolic groups

122
123
125
127
132
136
139
146

CHAPITRE III

Fusion of a cellulose binding module with a GH11 endoxylanase: 147 Impact on the hydrolysis of insoluble lignocellulosic substrates

Abstract	148
Introduction	149
Materials and methods	151
Results	157
Discussion	161
References	165
Figures	170
Tables	175

Fusion of GFP with a GH11 endoxylanase: Probing the impact of protein size on the hydrolysis of insoluble lignocellulosic substrates	177
Introduction	177
Materials and methods	178
Results and discussion	180
Conclusion	184
References	184
Figures	186
Tables	190
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	191
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	200
ANNEXES	225

Introduction générale

Le développement de technologies pour le fractionnement maîtrisé des ressources végétales pour la production de synthons chimiques, de polymères naturels et de biocarburants constitue un enjeu majeur pour la substitution du carbone fossile par le carbone renfermé dans la biomasse végétale. Parmi les différentes stratégies possibles, la technologie enzymatique est particulièrement attirante. En effet, les enzymes présentent une action extrêmement spécifique envers leurs substrats et catalysent leurs réactions dans des conditions réactionnelles généralement douces et non-polluantes. Cependant, la mise en œuvre de ces biocatalyseurs pour le fractionnement de la biomasse végétale n'est pas sans difficulté compte tenu de sa nature complexe et variable ainsi que son insolubilité.

Les ressources lignocellulosiques sont attractives en raison de leur disponibilité et le fait que leur utilisation ne concurrencerait pas systématiquement d'autres voies de valorisation traditionnelles (ex. alimentaire). Cependant, l'utilisation de telles matières comme sources de carbone est complexe en raison de leur variabilité tissulaire, chimique et structurale.

Les enzymes disponibles capables d'hydrolyser la biomasse lignocellulosique (cellulases, hémicellulases notamment xylanases et ligninases) sont nombreuses et leurs mécanismes d'action sont de mieux en mieux connus grâce, notamment, aux nombreuses approches étudiant les relations structure-fonction des protéines. Cependant, malgré ces progrès, les facteurs déterminant l'efficacité des enzymes *in situ* sur des substrats lignocellulosiques complexes et insolubles sont encore mal précisés. Par conséquent, un grand nombre d'enzymes identifiées par une approche classique (analyses de laboratoire à l'aide de substrats solubles) comme étant de bons catalyseurs s'avèrent peu efficaces en présence d'une biomasse complexe. En particulier, au-delà de l'adéquation enzyme/substrat sur un plan catalytique, la biodégradabilité des polysaccharides rencontre de nombreuses limitations lorsque ces constituants sont associés au sein des parois lignocellulosiques. Par ailleurs, au-delà des limitations structurales des substrats, l'accessibilité des polysaccharides au sein des parois aux enzymes peut également être entravée. En effet, la pénétration et la mobilité de l'enzyme peuvent être gênées du fait d'un encombrement au sein du réseau pariétal et/ou d'interactions non spécifiques avec les composants pariétaux tels que les lignines.

L'objectif majeur de cette étude est de mettre en œuvre une approche pluridisciplinaire visant à identifier les paramètres clés pour une conversion efficace des hémicelluloses, constituants majeurs des lignocelluloses, en prenant en compte à la fois la complexité et la variabilité des substrats lignocellulosiques, mais également l'impact des caractéristiques physicochimiques/structurales des hémicellulases ainsi que leur capacité d'interactions (spécifiques et non spécifiques) avec les composants pariétaux. Parmi les hémicellulases, les endoxylanases représentent des biocatalyseurs pouvant apporter une plus-value non négligeable aux procédés de bioraffinerie, notamment, pour la production d'éthanol de seconde génération par la voie des pentoses. Nous avons centré notre étude sur une endoxylanase de *Thermobacillus xylanilyticus* (Tx-Xyl) appartenant à la famille 11 des glycoside hydrolases (GH11), principale famille de xylanases reconnue pour son efficacité sur les substrats insolubles.

La démarche adoptée se situe essentiellement sur un plan cognitif, fondée sur la modulation de la complexité des substrats par emploi de systèmes reconstitués *in vitro* de complexité croissante, mais également sur la modulation de la protéine enzymatique permettant d'affecter son comportement dans les parois lignocellulosiques.

Cette démarche tente globalement de préciser :

1- les limitations dues aux substrats : agencement supramoléculaire des lignocelluloses au sein des parois, contenu en lignines...

2- les caractéristiques enzymatiques en termes de taille et architecture moléculaire autorisant une meilleure efficacité *in situ* sur les substrats lignocellulosiques.

Plan de la thèse

Ce manuscrit est organisé en trois chapitres comportant chacun une introduction, un descriptif du matériel et des méthodes utilisés, les résultats, la discussion ainsi que les références bibliographiques. Cette présentation repose sur un découpage des travaux en quatre articles scientifiques dont l'un est publié et dont trois seront soumis pour publication dans des revues internationales à comité de lecture. Les trois chapitres sont précédés d'une synthèse bibliographique présentant l'état des lieux des connaissances sur les lignocelluloses et leur fractionnement par voie enzymatique. Les principaux résultats sont regroupés et commentés dans une discussion générale, incluant les perspectives possibles de ce travail. Enfin, l'ensemble des références bibliographiques utilisées et les annexes sont regroupés à la fin de ce manuscrit.

Chapitre I : Impact de l'organisation supramoléculaire des assemblages hémicelluloseslignines sur l'action d'une endoxylanase GH11

L'efficacité d'une hémicellulase au sein des parois lignifiées est fortement dépendante de la diversité structurale et la complexité organisationnelle des réseaux pariétaux. En particulier les associations lignines - polysaccharides seraient à l'origine de nombreuses limitations. Afin de préciser ces facteurs limitants propres aux lignocelluloses et mettre en évidence les niveaux d'organisation des polymères lignocellulosiques susceptibles d'entraver ou de limiter l'action de l'enzyme, nous avons étudié, dans une approche biomimétique, l'action de la xylanase GH11 (Tx-Xyl) sur des systèmes de substrats différents et de complexité croissante : hétéroxylanes isolés, assemblages de copolymères reconstitués *in vitro* (hétéroxylanes extraits – lignines synthétiques (DHPs)). De tels dispositifs reflètent partiellement l'architecture des parois végétales et ont permis d'approcher spécifiquement l'influence de l'agencement de certains polymères pariétaux sur l'action de l'enzyme.

Chapitre II : Impact du contenu en lignines et des composés phénoliques solubles sur l'action d'une endoxylanase GH11

Au-delà des limitations de l'accessibilité des polysaccharides aux enzymes, de nombreuses études ont montré que les lignines interféreraient directement avec l'action des cellulases et/ou des hémicellulases *via* des interactions non spécifiques ou non productives. Ces interactions regroupent des interactions avec les lignines, en tant qu'entités macromoléculaires, mais également des interactions avec les composés monomères ou oligomères phénoliques pouvant être libérés à partir des parois.

Ce chapitre est organisé en deux parties. Dans une première partie, nous avons tenté d'établir, dans une approche biomimétique, une corrélation directe entre l'augmentation du contenu en lignines (DHP), de la taille ainsi que de la surface des particules avec la baisse de l'activité de l'enzyme. La deuxième partie est dédiée à l'étude de l'interaction de la xylanase GH11 (Tx-Xyl) avec une gamme de composés phénoliques solubles (incluant les acides cinnamique, *p*-coumarique, caféique, férulique et 3,4,5-trimethoxycinnamique) dans le but de définir les effets de ces composés sur le plan de la catalyse enzymatique.

Chapitre III : Impact des paramètres structuraux d'une endoxylanase GH11 sur ses capacités hydrolytiques

En plus des paramètres du substrat, la compréhension des propriétés structurales des enzymes régissant leur action *in situ* sur les lignocelluloses est indispensable. Afin de préciser les caractéristiques enzymatiques en termes de taille et architecture moléculaire autorisant la pénétration et la diffusion au sein des parois végétales, nous avons développé une stratégie qui vise à modifier, par ingénierie protéique, l'architecture protéique de la xylanase GH11 (Tx-Xyl) en la fusionnant à des modules protéiques différents.

Les endoxylanases GH11 sont des enzymes mono-spécifiques des hétéroxylanes, majoritairement mono-modulaires, constituées d'un seul domaine catalytique et ne comportant pas de domaines dédiés à la fixation aux substrats (CBM). Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de l'addition d'un CBM de la famille 1 fixant spécifiquement la cellulose (le CBM1 de la cellulase Cel7A de *Trichoderma reesei*) sur les propriétés physicochimiques et fonctionnelles de la xylanase (Tx-Xyl) (vis-à-vis de substrats solubles et de parois végétales lignifiées). Dans un deuxième temps, étant donné que les endoxylanases GH11 sont des enzymes relativement de faible masse moléculaire (environ 20 kDa), nous avons exploré l'impact de l'augmentation de la taille de xylanase (Tx-Xyl), suite à sa fusion à la GFP (Green Fluorescent Protein), sur ses capacités hydrolytiques.

L'efficacité des xylanases chimères obtenues est évaluée sur des substrats lignocellulosiques tels que la paille et le son de blé. De par leurs hétérogénéités chimique et structurale, ces coproduits du blé offrent une diversité chimique, structurale et organisationnelle caractéristiques de la variabilité des substrats lignocellulosiques.

Synthèse bibliographique

A. La biomasse lignocellulosique : élément de base de la bioraffinerie

I. Diversité et potentiels des lignocelluloses

Les lignocelluloses, constituants principaux de la matière végétale, représentent le gisement en biomasse le plus important et le plus abondant dans le monde. Les ressources lignocellulosiques exploitables sont très variées et proviennent essentiellement des sousproduits de l'agriculture (pailles de céréales, rafles de maïs, tiges de colza, bagasse de cannes à sucre, etc...), des résidus des exploitations forestières (substrats ligneux tels que feuillus et résineux...), des déchets de l'industrie du bois et du papier, mais également de cultures dédiées de plantes annuelles (triticales) ou d'espèces pérennes à rotation rapide (miscanthus, peuplier, eucalyptus, saule...). Ces cultures représentent le potentiel le plus important en biomasse et constituent actuellement un enjeu considérable, compte tenu de leur niveau de production élevé et de leur impact positif sur l'environnement. [1]

Le regain d'intérêt porté aux ressources lignocellulosiques est lié au caractère dit «renouvelable» du carbone qui les constitue, et à la volonté mondiale de limiter l'emploi des ressources pétrochimiques fossiles, en réponse à des préoccupations socio-économiques (raréfaction et distribution inégale de ces ressources) et écologiques (réchauffement climatique) grandissantes.

La valorisation de la biomasse lignocellulosique implique actuellement, en plus des nombreuses applications en agro-alimentaire, de nouveaux débouchés notamment dans les domaines de la bioénergie (biocarburants, biogaz ...), la chimie (les biomolécules, les intermédiaires de synthèse...) et les biomatériaux, grâce au développement du concept de "bioraffinerie". Selon ce concept, la matière première végétale (principalement composée de cellulose, hémicelluloses et lignines) est utilisée dans son ensemble pour la production d'une gamme complète de produits, en substitution aux produits dérivés des raffineries pétrolières. (Figure 1) [2, 3]

Les lignocelluloses restent, toutefois, des substrats complexes et très diversifiés, ce qui soulève de nombreuses questions de recherche liées à leur mise en place et organisation dans la plante, ainsi qu'à leurs aptitudes aux traitements et donc à satisfaire différents usages. Une bonne connaissance de ces substrats est de ce fait un pré-requis incontournable pour leur valorisation optimale.



Figure 1 : La bioraffinerie. A) Schéma global du concept de bioraffinerie ; B Exemple de la bioraffinerie du blé.

II. Les parois végétales lignifiées : constituants majeurs des lignocelluloses

D'une façon générale, les lignocelluloses correspondent essentiellement à des parois végétales lignifiées. Celles-ci représentent, par exemple, environ 80% de la composition du miscanthus et jusqu'à 90% de la composition du bois.

La nature, la teneur et la composition des lignocelluloses sont fonctions de l'espèce végétale (Tableau1), de la nature de l'organe (racine, tige, feuille...), du type tissulaire et cellulaire, mais sont également la résultante d'une régulation spatio-temporelle liée à des facteurs écophysiologiques (maturation des tissus, développement de la plante,...) et génétiques.

La variabilité structurale des lignocelluloses se manifeste notamment dans leur organisation et répartition différentielle selon les types cellulaires et tissulaires. Ainsi, par exemple, les tissus parenchymateux des céréales (en particulier des graminées) sont pratiquement dépourvus de lignines et renferment majoritairement des polysaccharides, contrairement aux tissus vasculaires fortement lignifiés. Les parois des différents types cellulaires, bien que présentant la même construction de base, sont très variables sur le plan de leur composition chimique et de leur architecture. [4, 5]

Matière	Composition moyenne * (% de matière sèche)		
lignocellulosique	Cellulose	Hémicelluloses	Lignines
Rafles de maïs	45	35	15
Paille de blé	30	50	15-20
Son de blé	30	40	5
Paille de riz	35	25	12
Bagasse	40	24	25

Tableau 1 : Composition des lignocelluloses de quelques co-produits agricoles

* (D'après [6, 7])

La paroi végétale, composante principale de la biomasse, est une structure organisée et complexe, semi rigide et dynamique qui enveloppe la membrane cytoplasmique des cellules végétales. Elle contribue, de part ses propriétés structurales et mécaniques, à la rigidité du végétal, supporte la croissance cellulaire et constitue une barrière physique protégeant la

cellule contre la déshydratation, les chocs osmotiques ou physiques ainsi que les infections par les agents pathogènes.

De point de vue de sa structure, la paroi végétale lignifiée est un composite naturel multicouches et nanostructuré composé majoritairement d'assemblages complexes de polyosides (cellulose, hémicelluloses et pectines) imprégnés de composés phénoliques dont les lignines, mais également de protéines, de sels minéraux. La nature et les proportions relatives de ces différents constituants sont variables à l'échelle spatio-temporelle.

La structure de la paroi végétale présente essentiellement trois niveaux hiérarchiques d'organisation correspondant à des stades successifs de maturation: (de l'extérieur vers l'intérieur) (Figure 2)

- la lamelle moyenne : couche fine de 0,5 à 2 μm d'épaisseur, riche en substances pectiques, qui assure la cohésion entre deux cellules contiguës.
- la paroi primaire : couche très fine de 0,03 à 1 μm d'épaisseur, souple, hydrophile et en majorité composée de microfibrilles de cellulose englobées dans une matrice amorphe riche en hémicelluloses, pectines et glycoprotéines. [8]
- la paroi secondaire : couche épaisse, semi rigide et très résistante se déposant à l'intérieur de la paroi primaire une fois que la croissance des cellules a cessé. Elle est essentiellement constituée de couches de microfibrilles de cellulose présentant des orientations différentes selon des angles variables par rapport à l'axe de la cellule (d'où la différenciation en trois couches S1, S2 et S3), d'hémicelluloses et de lignines. De nombreux types cellulaires ne présentent pas de paroi secondaire, comme les cellules de parenchyme et de collenchyme. [9] Néanmoins, l'essentiel de la masse des lignocelluloses est représentée par les parois secondaires.

L'étude de l'organisation de la paroi végétale à l'échelle supramoléculaire suscite actuellement un intérêt croissant lié aux potentialités qu'elle représente non seulement pour l'utilisation de ses composants comme substituts des dérivés du pétrole, mais aussi comme modèle pour la conception de nouveaux nano matériaux biomimétiques.



Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation des lignocelluloses au sein des tissus et de la paroi végétale. A cellules adjacentes ; B couches de la paroi végétale, LM : lamelle moyenne, P : paroi primaire, S_1 , S_2 , S_3 : couches de la paroi secondaire ; C distribution de la cellulose, des hémicelluloses et des lignines dans la paroi secondaire ([10]).

III. Variabilité structurale des lignocelluloses : composition biochimique

Les lignocelluloses sont des assemblages complexes de polyosides (principalement cellulose, hémicelluloses) imprégnés de composés phénoliques dont les lignines. Les parois secondaires représentent l'essentiel de la masse des lignocelluloses.

III. 1. La cellulose

La cellulose est le principal constituant de la biomasse lignocellulosique, représentant jusqu'à 50% de la matière sèche du bois. C'est un homopolymère linéaire formé de longues chaînes d'unité β –D–glucoses liés en β –(1,4). Les unités successives de glucose présentent entre elles une rotation de 180°, formant un motif répétitif de cellobiose (dimère de glucose). Le nombre d'unités glucose ou degré de polymérisation (DP) des chaînes de cellulose varie sensiblement en fonction de son origine botanique ainsi que du procédé d'isolement. Il peut atteindre jusqu'à 15000 unités, notamment pour la cellulose des parois secondaires, ce qui expliquerait en partie l'insolubilité de la cellulose dans l'eau et dans la plupart des solvants. [11] Bien que la composition chimique de la cellulose soit simple, sa structure tridimensionnelle est toutefois relativement hétérogène et complexe. Les chaînes de cellulose sont stabilisées

par des liaisons hydrogène et des interactions de van der Waals intra- et intermoléculaires et s'associent entre elles pour former des microfibrilles. Ces dernières se groupent en macrofibrilles qui s'incorporent dans la paroi végétale. (Figure 3) Le réseau de liaisons hydrogène favorise ainsi l'établissement d'un état solide ordonné hautement cristallin servant de trame rigide organisé pour la paroi. Dans la nature, la cellulose native (nommée cellulose I) est essentiellement constituée des deux phases cristallines allomorphes I_{α} et I_{β} . La cellulose I peut donner d'autres formes cristallines par suite de traitements chimiques ou thermiques.[12, 13]

Le degré de cristallinité de la fibre de cellulose varie entre 40% et 60% selon son origine botanique et/ou de la nature du traitement. En effet, au sein des fibrilles, des régions hautement cristallines alternent avec des régions amorphes moins structurées et plus sujettes aux dégradations enzymatique ou physicochimique. [10]



Figure 3 : Structure et organisation de la cellulose dans la paroi végétale.

III. 2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses représentent entre 25 et 35% de la biomasse lignocellulosique. Contrairement à la cellulose, il s'agit de polyosides amorphes et hétérogènes, constitués de pentoses (xylose, arabinose), d'hexoses (mannose, glucose, galactose) et d'acides uroniques. La structure des hémicelluloses varie selon l'origine végétale, le type cellulaire et le stade de maturité des tissus. Selon leur composition, on distingue essentiellement les hétéroxylanes, les xyloglucanes et les mannanes. Les xyloglucanes représentent jusqu'à 20% de la matière sèche de la paroi primaire des dicotylédones. Les hétéroxylanes sont les principales hémicelluloses de la biomasse lignocellulosique (bois dur et plantes annuelles...), pouvant constituer jusqu'à 30% de la matière sèche de la paroi secondaire. Par ailleurs, les mannanes (glucomannanes et galactoglucomannanes), rarement présents chez les angiospermes (graminées et céréales), sont les hémicelluloses majoritairement rencontrées dans les parois secondaires des gymnospermes. Dans le bois tendre, les galactoglucomannanes acétylés représentent jusqu'à 25% de la matière sèche. [8, 14-16]

Du fait de leur abondance et de leurs nombreuses applications notamment en bioraffinerie, une part importante de cette synthèse bibliographique sera consacrée à l'étude des propriétés structurales, physico-chimiques et fonctionnelles des hétéroxylanes.

III. 2. 1. Les hétéroxylanes : Structure générale et hétérogénéité chimique

Les hétéroxylanes sont les hémicelluloses les plus représentées dans la majorité des ressources lignocellulosiques. Ces polymères sont constitués de chaînes principales formées par la liaison en β -(1,4) d'unités β -D-xylopyranose, pouvant être (jusqu'à 80%) substitués en position *O*-2 et/ou *O*-3 par des chaînes latérales variées:

- des résidus α-L-arabinose en O-2 et/ou O-3, en mono- ou en di-substitutions;
- des acides glucuroniques ou leurs dérivés 4-O-méthylés en O-2 ;
- des groupements acétyle ;
- des chaînes latérales oligomériques contenant de l'arabinose, du xylose et parfois du galactose.

Les résidus arabinose peuvent être à leur tour estérifiés en position *O*-5 par des acides phénoliques tels que l'acide férulique et l'acide *p*-coumarique. (Figure 4)

La composition des hétéroxylanes est variable en fonction de l'origine botanique, du tissu végétal et du type cellulaire, ce qui génère une grande diversité structurale de ces composés. (Tableau 2) Ainsi, selon la nature et la fréquence des substitutions, on distingue les homoxylanes (polymères linéaires rencontrés chez les algues), les glucuronoxylanes (majoritaires dans les parois secondaires des dicotylédones), les arabinoxylanes (AX) (caractéristiques de l'endosperme (ou albumen) et des couches externes ou sons des grains de céréales et d'autres monocotylédones) et les glucuronoarabinoxylanes (GAX). Ces derniers sont les hémicelluloses majoritaires dans les tissus lignifiés des graminées et des céréales (paille et péricarpe externe des grains...). [7, 17-19]

Chez les graminées, ce sont les GAX et/ou AX qui ponteraient les fibrilles de cellulose. En effet, les zones peu ramifiées de ces polymères sont capables de créer des liaisons hydrogènes inter chaînes et avec la cellulose. De même, ils sont susceptibles d'interagir de manière covalente avec les autres constituants pariétaux, notamment les lignines *via* les acides phénoliques. [20, 21]

Origine	Composition (% molaire)						
	Xylose	Arabinose	Glucose	Galactose	Mannose	Acides uroniques	
Bouleau (Roth) ^a	89,3	1,0	1,4	n.d.	n.d.	8,3	
Blé ^b	65,8	33,5	0,3	0,1	0,1	n.d.	
Avoine ^a	81,4	9,7	3,4	1,1	n.d.	4,3	
Maïs (fibres) ^c	48,0-54,0	33,0-35,0	n.d.	5,0-11,0	n.d	3,0-6,0	
Riz (son neutre) ^d	46,0	44,9	1,9	n.d.	n.d.	1,1	

Tableau 2: Composition en monosaccharides d'hétéroxylanes de différentes origines.

(D'après ^a [22] ; ^b [23] ; ^c [24] ; ^d[25]).



Figure 4 : Représentation schématique de la structure des hétéroxylanes des fibres de maïs (d'après [26]). X : xylose, A : arabinose, G : galactose, GlcA : acide glucuronique, FeA : acide férulique.

III. 2. 2. Propriétés physico-chimiques des hétéroxylanes

III. 2. 2. 1. Structure 3D ou conformation

D'après de nombreuses études de diffraction aux rayons X, la structure 3D des hétéroxylanes est décrite comme un ruban torsadé se répétant environs tous les trois résidus, avec un pas de 1,49 nm. [27, 28, 29] Les chaînes latérales d'arabinose, bien qu'encombrantes, ne semblent pas perturber l'ensemble de la structure. Cette conformation étendue offre une certaine flexibilité à la chaîne de xylane comparée aux chaînes de cellulose. Les hétéroxylanes, en particulier les arabinoxylanes, sont décrits comme étant des polymères semi flexibles. La rigidité de la chaîne est estimée en termes de "longueur de persistance" (Lp), qui représente une évaluation de la longueur de la chaîne du polymère présentant une même direction constante. Des approches de modélisation moléculaire estiment que la (Lp) varie entre 3 à 5 nm, ce qui correspondrait à environs 6 à 10 résidus xylose. [30] Des valeurs expérimentales de 7.8 et 3.1 nm ont été, par exemple, rapportées dans la littérature pour des arabinoxylanes extraits de farine de blé.

Cette conformation semi flexible des arabinoxylanes a été, par ailleurs, confirmée notamment par l'étude de leurs paramètres hydrodynamiques, qui a permis de mettre en évidence une structure en solution en pelote statistique. [31, 32]

Bien que le degré de substitution ne semble pas affecter la conformation des hétéroxylanes en solution, la présence de ponts di-féruliques réticulant les chaînes de polymères entre elles entraîne en général une modification de leurs caractéristiques macromoléculaires par augmentation de la masse moléculaire et aurait par voie de conséquence un effet sur leur conformation et comportement en solution (formation de phase gel). [33]

III. 2. 2. 2. Degré de substitution, masse moléculaire

La masse moléculaire, le degré de substitution, ainsi que la nature et la distribution des substituants sont des paramètres physico-chimiques importants qui déterminent les propriétés de solubilité des hétéroxylanes ainsi que leur capacité d'interaction avec les constituants de la paroi végétale.

Le degré de substitution des hétéroxylanes (AX ou GAX) est généralement évalué en terme de rapport molaire Arabinose/Xylose (Ara /Xyl ou A/X). Ce rapport est très variable selon l'espèce végétale et l'origine tissulaire. (Tableau 2) Néanmoins, il reflète une valeur moyenne qui ne prend pas en compte la longueur de la chaîne principale, ni la nature (mono- ou di-) et

la distribution des substitutions. Une corrélation positive entre le *ratio* A/X et le nombre de résidus xylose di-substitué a pu, toutefois, être établie. La distribution et la fréquence des substitutions le long de la chaîne de xylane ne sont pas aléatoires. Les di-substitutions seraient fréquemment rencontrés en amas (cluster), alternant des séquences de xylose non substitué, et ce même lorsque le *ratio* A/X est proche de 1. Des modèles structuraux, établis à partir de données expérimentales sur la composition des arabinoxylanes (notamment de blé) et de celle de leurs produits de dégradation, s'accordent à les décrire comme une alternance de régions fortement substituées par l'arabinose et de régions moins ramifiées au niveau du squelette principal de xyloses. [34, 35]

La masse moléculaire (ou M_w) des hétéroxylanes dépend de leur structure mais aussi de la méthode analytique d'estimation employée (spectrométrie de masse, viscosimétrie, ultracentrifugation, chromatographie d'exclusion de taille, diffusion de la lumière...). Généralement, les hétéroxylanes (AX, GAX) des céréales présentent des M_w variant entre 60 et 400 ×10³ g/mol, alors que ceux du bois tendre et du bois dur ne dépassent pas 100 ×10³ g/mol. [17, 18]

L'estimation de la masse moléculaire de ces polymères comme celle des autres polysaccharides végétaux reste toutefois relative, car largement affectée par leur état de solubilité. En effet, certains hétéroxylanes, bien qu'hydrosolubles, ont tendance à former des agrégats macromoléculaires et/ou des particules de micro-gels en solution, en conséquence de l'établissement d'interactions hydrogène et/ou hydrophobes intermoléculaires au niveau des zones peu ou pas ramifiées des chaînes de polymères. [36-39]

La solubilité des hétéroxylanes dans les solutions aqueuses est, en effet, la résultante d'un équilibre entre les interactions inter-chaînes et les interactions chaînes de polymère-solvant.

En général, une faible masse moléculaire augmente l'hydrosolubilité, tout comme la présence de substitutions, défavorisant les interactions inter-chaînes. La présence de zones non substituées a au contraire une influence négative, en permettant l'établissement de liaisons intermoléculaires défavorables à l'hydrosolubilité. Une forte teneur en acide férulique semble également diminuer l'hydrosolubilité et augmenter la viscosité en permettant la formation, en présence d'agents oxydants (persulfate d'ammonium...) et/ou de systèmes enzymatiques (peroxydase/H₂O₂, laccase/O₂...), de ponts diféruliques intermoléculaires réticulant les chaînes de polymère entre elles et aboutissant à l'établissement d'un réseau tridimensionnel. Ce phénomène est d'ailleurs à l'origine des propriétés gélifiantes des hétéroxylanes en milieu

oxydant. Outre ces aspects intrinsèques de structure, la solubilité des hétéroxylanes est largement influencée par les interactions covalentes ou non covalentes avec d'autres constituants de la paroi, en particulier les lignines. [19, 33, 38, 40] (Figure 6)

Ces caractéristiques des hétéroxylanes sont à l'origine de nombreuses de leurs propriétés fonctionnelles, technologiques et surtout nutritionnelles. [41-43]

III. 3. Les acides phénoliques

Les parois primaires et secondaires des graminées sont caractérisées par la présence *in situ* d'acides *p*-coumarique (pCA) (jusqu'à 3%) et férulique (FA) (jusqu'à 4%). (Figure 5) D'autres acides hydroxycinnamiques, moins prédominants, ont été également mis en évidence, tels que les acides sinapique et caféique. [44]



Acide Férulique (FA) Acide *p*-Coumarique (pCA)

Figure 5: Structure chimique des acides férulique (FA) et *p*-coumarique (pCA).

Les acides hydroxycinnamiques participent à la morphogenèse des cellules, et ceci grâce en particulier à la capacité de l'acide férulique à se dimériser au sein de la paroi (en présence de systèmes enzymatiques oxydants (peroxydase/H₂O₂, laccase/O₂...) et à former des déhydrodimères (di-FA), trimères et tétramères féruliques. (Figure 6)

Bien que quantitativement peu représentés au niveau des parois, ces composés jouent ainsi un rôle important dans la cohésion pariétale et la résistance physique des végétaux. Par ailleurs, de part leur structure chimique, ces acides phénoliques présentent un potentiel antimicrobien et limiteraient la dégradation des parois par les insectes, les phytopathogènes et les bactéries. [45, 46]



Figure 6: Formation et structure des différents déhydrodimères de l'acide férulique (d'après [47]).

III. 4. Les lignines

III. 4.1. Variabilité structurale

Les lignines comptent parmi les polymères les plus abondants dans la nature, après la cellulose et les hémicelluloses, représentant jusqu'à 20% de la matière sèche de la paille de blé. [48] De point de vue de leurs fonctions, les lignines contribuent au soutien mécanique et à l'imperméabilité de la paroi végétale et lui confèrent une certaine résistance au stress oxydatif et aux attaques par les agents pathogènes.

Ce sont des polymères aromatiques amorphes de structure très hétérogène, issus de la copolymérisation oxydative des trois alcools phénylpropanoïques (ou monolignols) *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique, formant respectivement les unités *p*-hydroxyphényle (H), gaïacyle (G) et syringyle (S). [49](Tableau3)

L'arrangement structural de ces unités monomères est irrégulier et particulièrement complexe. Leurs proportions relatives varient en fonction de l'origine botanique, du type fonctionnel de tissu et du stade de maturation. Ainsi, les lignines des gymnospermes (bois tendre) sont essentiellement constituées d'unités G alors que celles des angiospermes sont formées d'unités G et d'unités S en proportion variable. Les lignines des graminées sont plus complexes et se caractérisent majoritairement par la présence d'unités G et S, mais également à moindre teneur d'unités H. [50, 51]. L'augmentation du rapport S/G renseigne généralement sur l'origine botanique et la maturité des tissus.

Alcool	Alcool Unité		Structure	
p-Coumarylique	p-Hydroxyphényle	Н	HO $\xrightarrow{\left(\begin{array}{c} \frac{1}{2} \\ \alpha \end{array}\right)}^{\beta} \xrightarrow{\alpha}^{\gamma} CH_2OH$	
Coniférylique	Gaïacyle	G	HO-CH ₂ OH	
Sinapylique	Syringyle	S	H ₃ CO HO H ₃ CO	

 Tableau 3: Monomères et unités des lignines

Les différentes unités monomères sont liées entre elles par différents types de liaisons covalentes pour former un réseau tridimensionnel complexe. On distingue les liaisons dites « condensées » résistantes à la plupart des méthodes de dégradation chimique usuelles et qui incluent des liaisons de type carbone-carbone (liaisons 5-5, β -1, β -5, β - β) et des liaisons diaryl éther (liaisons 4-*O*-5), mais également les liaisons dites « non condensés » qui sont la cibles des méthodes de caractérisation chimique des lignines, telles que les liaisons de type éther (liaisons α -*O*-4, β -*O*-4). (Figure 7) Les liaisons β -*O*-4 sont généralement les plus fréquentes dans les lignines naturelles. [52, 53]

Compte tenu de cette grande hétérogénéité chimique, il est généralement admis que les lignines sont des polymères « tridimensionnels en réseau ». La détermination de leur structure est essentiellement basée sur des modèles structuraux hypothétiques. [54] De nombreux modèles ont été proposés, les plus connus sont ceux de Freudenberg (1965), d'Adler (1977) et de Burnow (2001) pour des lignines de Gymnospermes, ou encore de Sun (1997) pour des lignines de Graminées et récemment de Boerjan (2003) pour des lignines de Peuplier. (Figure 8) [55, 56, 57, 58, 59, 60] Les lignines de graminées sont généralement éthérifiées par l'acide férulique (jusqu'à 5% dans le cas des lignines de la paille de blé), estérifiées par

l'acide *p*-coumarique (jusqu'à 90% sur les unités S des lignines de maïs) mais peuvent également être acylées. [48]



Figure 7: Exemples de liaisons inter-monomères au sein des lignines. (R = H ou OCH₃)



Figure 8: Modèle structural de lignines d'Angiospermes. (d'après [59]) Modèle d'un fragment de 20 unités phénylpropane de Lignines de Peuplier (disponible sur http://www.dfrc.ars.usda.gov/LigninModels.html)

III. 4.2. Biosynthèse/polymérisation

La lignification débute après la croissance des cellules, pendant la synthèse de la paroi secondaire.[61] La polymérisation des monolignols est initiée enzymatiquement (grâce des oxydases) au niveau de la paroi primaire déjà formée et s'effectue selon un mécanisme déhydrogénatif (par abstraction d'hydrogène) de type polycondensation, aboutissant dans un premier temps à la formation d'un intermédiaire de synthèse (le méthylène quinone (MQ)) et par suite d'une série d'oxydation et de couplage de radicaux à un polymère aromatique hydrophobe de structure statistique et fortement ramifiée, incrustant la matrice préexistante de polyosides. (Figure 9)

Le recours à des approches biomimétiques, initiées par les travaux pionniers de Freudenberg (1968), notamment par l'emploi de lignines de synthèse (ou dehydrogenative polymers (DHPs)) a largement contribué à l'étude à la fois de la structure et de la réactivité des lignines mais également de leur mise en place dans les parois. [62, 63] Malgré sa complexité, le processus de lignification n'est pas aléatoire, mais dépend fortement des conditions du milieu (pH, polarité, densité ...) et serait sous un contrôle et une régulation cellulaire spatio-temporelle. [59, 64, 65, 66, 67]



Figure 9: Schéma de la polymérisation des monomères de lignines.

III. 5. Mise en place et interactions entre les constituants du réseau pariétal

De nombreux modèles structuraux s'accordent à décrire la paroi végétale lignifiée comme un composite naturel nanostructuré constitué d'une "charpente" de microfibrilles de cellulose englobées dans une matrice amorphe riche en hémicelluloses et incrustée de composés phénoliques dont les lignines, mais également de (glyco)protéines, de lipides et de sels minéraux... [64, 68, 69]



Figure 10: Modèles structuraux de parois végétales

A- modèle de paroi primaire (d'après [68]), **B**- modèle de paroi secondaire lignifiée (d'après [69])

Les différents constituants pariétaux interagissent *via* une multitude d'associations intra- et intermoléculaires covalentes ou non pour former un réseau complexe et enchevêtré.

Des associations par des liaisons non covalentes faibles mais parfois nombreuses peuvent se créer entre la cellulose et les hémicelluloses (xyloglucanes, glucomannanes...), contribuant à la cohésion des assemblages pariétaux. [70] Chez les graminées, ce sont les hétéroxylanes (GAX et/ou AX) qui ponteraient les fibrilles de cellulose. En effet, les zones peu ramifiées de ces polymères sont capables de créer des liaisons hydrogènes inter chaînes et avec la cellulose. Par ailleurs, les hétéroxylanes sont également susceptibles d'interagir de manière covalente entre eux et avec les autres constituants pariétaux, notamment les lignines *via* les acides phénoliques. [20, 21]

Les acides phénoliques, en particulier l'acide férulique (FA), ne sont pas simplement déposés dans la paroi, mais jouent un rôle important dans la réticulation covalente des polymères pariétaux et donc dans la structuration des lignocelluloses.[45] En effet, ce sont des molécules « bifonctionnelles » qui peuvent engager d'une part leur fonction carboxylique dans des liaisons esters et d'autre part leur groupement hydroxy-phénol dans des liaisons éthers. Ainsi, l'acide férulique serait majoritairement estérifié aux hétéroxylanes (AX ou GAX) mais également éthérifié aux lignines. L'oxydation des esters de FA au sein de la paroi aboutit à la formation de composés acides diféruliques (di-FA) ou déhydrodimères, de trimères et de tétramères féruliques. (Figure 6) Ces structures constituent des ponts covalents réticulant les chaînes de AX ou GAX entre elles et/ou avec les lignines, ce qui pourrait renforcer leur résistance contre l'hydrolyse enzymatique. (Figure 11) Selon Ralph et *al.* 1995, ces structures seraient également des points d'initiation de la lignification et joueraient donc un rôle important dans l'organisation des parois des graminées. [47, 71, 72, 73]



Figure 11: Réticulation covalente des arabinoxylanes entre eux et avec les lignines

La lignification est, en effet, un phénomène tardif qui a lieu après le dépôt des polyosides et des protéines. Le dépôt des lignines intervient en premier lieu au niveau des jonctions cellulaires puis se propage tangentiellement dans la lamelle mitoyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire. Les lignines, étant des polymères phénoliques hydrophobes, s'imbriquent aux autres constituants pariétaux au fur et à mesure de leur polymérisation. L'incrustation des lignines se traduirait par un départ des molécules d'eau et contribuerait à renforcer la rigidité des parois [61]

A l'interface lignines/polyosides, se créent alors de nombreuses associations non covalentes (essentiellement hydrophobes, mais également hydrogènes et électrostatiques) et covalentes. De nombreux travaux suggèrent que les monomères et oligomères de lignines sont capables de s'agréger aux hémicelluloses notamment *via* des interactions hydrophobes, mais également de s'adsorber rapidement sur la surface des microfibrilles de cellulose grâce à des interactions électrostatiques. [74-76]

Par ailleurs, durant la polymérisation des lignines, des liaisons covalentes peuvent s'établir avec les polyosides, en particulier avec les hémicelluloses pour former des complexes LCC (Lignin Carbohydrates Complexes). Ces liaisons englobent des liaisons de type benzyle éther ou benzyle ester, formées suite à un mécanisme d'addition nucléophile des groupements hydroxyles (par exemple des résidus arabinose) ou carboxyles (des acides glucuroniques) des polyosides au C_{α} du méthylène quinone (MQ). D'autre part comme il a été déjà mentionné, dans le cas des graminées des liaisons de type éther peuvent se former par couplage radicalaire (oxydatif) des groupements hydroxy-phénol des esters féruliques liés aux hétéroxylanes, au C_{β} des unités constitutives des lignines. Ces liaisons covalentes seraient en partie responsables de la difficulté à isoler les lignines des polysaccharides et de l'insolubilité de ces complexes. L'ensemble de ces liaisons assurent la cohésion du réseau pariétal et limiteraient ainsi sa digestibilité. [20, 72, 73, 77]

Face à la complexité des interactions mises en jeu, comprendre l'organisation tridimensionnelle des lignocelluloses pour expliquer les événements de leur mise en place et donc appréhender avec plus d'efficacité leur déstructuration/valorisation constitue un enjeu important. Dans ce contexte, l'apport des approches d'étude biomimétiques, par le développement de modèles structuraux de parois végétales reconstitués *in vitro* semble incontestable. [78, 79]
B. Fractionnement enzymatique des lignocelluloses

I. Diversité des stratégies de fractionnement

Face à la complexité structurale de la paroi cellulaire végétale, la plupart des microorganismes "lignocellulolytiques" (tels que les bactéries et champignons phytopathogènes, saprophytes, symbiotes, les bactéries du *rumen...*) ont développé diverses stratégies pour attaquer les différents constituants pariétaux (cellulose, hémicelluloses, polyphénols/lignines...). [80, 81]

La production d'enzymes par ces micro-organismes se fait essentiellement selon deux voies. La majorité sécrète dans leur environnement immédiat des cocktails ou mélanges d'enzymes différentes adaptées selon la nature du substrat disponible. La plupart de ces enzymes sont des glycoside hydrolases qui s'attaquent aux polysaccharides pariétaux libérant des mono-, di- et oligosaccharides directement assimilables par le métabolisme microbien. Du point de vue de leur structure, ces enzymes peuvent comporter un ou plusieurs domaines protéiques, avec un domaine catalytique (DC) pouvant être lié à un ou plusieurs domaines de fixation aux polysaccharides (Carbohydrate Binding Module ou CBM).

Certaines bactéries anaérobies ont développé une voie alternative efficace pour dégrader la paroi végétale, en utilisant des complexes membranaires multi-enzymatiques appelés cellulosomes. Décrits pour la première fois chez *Clostridium thermocellum*, ces complexes multi-protéiques (de plus de 1 MDa) assurent à la fois la fixation cellulaire et la dégradation de la cellulose, mais également d'autres polysaccharides de la paroi végétale tels que les hémicelluloses. La structure du cellulosome comporte une composante (ou sous-unité) centrale tenant lieu de charpente qui contient des modules de reconnaissance appelés dockerines. La sous-unité intègre fréquemment un ou plusieurs CBM assurant la reconnaissance spécifique et la fixation directe du complexe (et donc de la cellule) sur le substrat cible. (Figure 12) [82, 83]

En s'inspirant de ces stratégies naturelles, les procédés industriels de fractionnement enzymatique de la biomasse lignocellulosique reposent actuellement sur le développement et la mise en oeuvre *in vitro* de cocktails enzymatiques performants. L'amélioration et l'optimisation de ces outils de fractionnement nécessitent une meilleure compréhension de la relation structure/fonction des enzymes "lignocellulolytiques".



Figure 12 : Représentation schématique de l'organisation supramoléculaire d'un cellulosome à la surface d'une cellule bactérienne. (figure simplifiée du cellulosome de *Clostridium thermocellum*, adaptée de [83]) (DC) : Domaine catalytique – (CBM) : Carbohyrate Binding Module.

II. Les enzymes dégradant les lignocelluloses : diversité et structure multi-modulaire des glycoside hydrolases

La biodégradation des lignocelluloses implique essentiellement des glycoside hydrolases permettant la transformation des polysaccharides en sucres fermentescibles. Ces enzymes présentent généralement une structure modulaire comportant un domaine catalytique (DC) pouvant être lié à un ou plusieurs domaines de fixation aux saccharides (CBM).

II.1. Les domaines catalytiques (DC)

II.1.1. Classification

Les domaines catalytiques des glycoside hydrolases peuvent être classés selon différents critères : la structure primaire (la séquence), la structure tertiaire (le repliement), le type de substrat dégradé et le mécanisme d'action.

Dans la nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IU-BMB) basée sur le type de réaction catalysée et la spécificité de substrat, les glycoside hydrolases possèdent un numéro du type EC 3.2.1.x. Les trois premiers chiffres indiquent qu'elles hydrolysent des liaisons *O*-glycosidiques, le dernier (x) est variable et dépend du substrat transformé (par exemple : les cellulases (3.2.1.4), les xylanases (3.2.1.8), etc.). Ce système de classification permet de nommer précisément la spécificité de substrat d'une enzyme, toutefois il ne reflète pas les aspects structuraux et paraît mal adaptée aux glycoside hydrolases qui peuvent agir sur différents substrats.

Depuis 1991, une classification des domaines catalytiques des glycoside hydrolases, basée sur les similarités de séquences en acides aminés, a donc été proposée, afin de mieux refléter la structure de ces enzymes. Les similarités sont appréciées par la méthode HCA ("Hydrophobic Cluster Analysis") ou encore analyse de groupes hydrophobes, qui repose sur la détection de segments structuraux constituant le cœur hydrophobe des protéines globulaires. Grâce à cette approche, des similarités dans le repliement tridimensionnel peuvent être détectées entre des protéines possédant des identités de séquences très faibles (<20%). [84, 85, 86]

Selon cette classification, les glycoside hydrolases sont regroupées en familles (notées GH). L'intérêt de cette classification est de pouvoir relier entre elles au sein d'une même famille des enzymes de même structure tridimensionnelle mais ayant des activités différentes et *vise versa*, mettant en évidence les phénomènes d'évolution convergentes ou divergentes ainsi que la présence de motifs structuraux préférentiels. A l'heure actuelle, on dénombre 115 familles de glycoside hydrolases (GH) dont un tiers environ comporte des enzymes poly-spécifiques. Les familles d'enzymes partageant le même repliement tridimensionnel sont regroupées dans des niveaux hiérarchiques plus élevés, connus sous le nom de clans ou superfamilles (actuellement au nombre de 14 : GH-A à GH-N).[86] (Tableau 4)

Réactualisée en permanence, cette classification est accessible sur la base de données CAZy ("Carbohydrate-Active enZYmes") et est maintenant étendue à d'autres classes d'enzymes actives sur les sucres, par exemple les glycosyltransférases ou les polysaccharide lyases. [87, 88]

Clan	Repliement	Familles du clan
GH-A	$(\beta/\alpha)_8$	1 2 5 10 17 26 30 35 39 42 50 51 53 59 72 79 51 86 113
GH-B	β–jelly roll	7 16
GH-C	β–jelly roll	11 12
GH-D	$(\beta/\alpha)_8$	27 31 36
GH-E	β –propeller à 6 pales	33 34 83 93
GH-F	β –propeller à 5 pales	43 62
GH-G	$(\alpha/\alpha)_6$	37 63
GH-H	$(\beta/\alpha)_8$	13 70 77
GH-I	$\alpha + \beta$	24 46 80
GH-J	β –propeller à 5 pales	32 68
GH-K	$(\beta/\alpha)_8$	18 20 85
GH-L	$(\alpha/\alpha)_6$	15 65
GH-M	$(\alpha/\alpha)_6$	8 48
GH-N	hélice β	28 49

Tableau 4 : Clans des glycoside hydrolases

II.1.2. Modes d'action et mécanismes catalytiques

En considérant la réaction catalytique dans son ensemble, les glycoside hydrolases peuvent dégrader leur substrat selon deux modes d'action : une attaque au milieu de la chaîne polysaccharidique (mode *endo*), avec la variante où la chaîne reste fixée (mode *endo-processif*), et une attaque en bout de chaîne (mode *exo*). Cependant, l'attribution d'un mode d'action n'est pas exclusive, certaines enzymes pouvant exercer des actions *endo* ou *exo* en fonction du substrat disponible.

Le mode d'action d'une enzyme est dicté par la structure du site actif. Malgré la diversité des repliements, la topologie des sites actifs des GH appartient seulement à trois classes différentes. Ainsi, les *endo*-enzymes présentent une structure ouverte avec un site actif

formant une crevasse ou sillon de dimensions certes variées, mais qui permet la fixation de plusieurs unités saccharidiques. Ces GH sont capables d'hydrolyser une chaîne oligo- ou polysaccharidique de façon aléatoire (par exemple les endoglucanases, les endoxylanases...). Les enzymes *endo-processives* ont la particularité de développer de longues boucles qui referment partiellement la crevasse catalytique pour former une structure en tunnel. Cette topologie en tunnel permet aux GH de fixer la chaîne polysaccharidique et de progresser de façon processive le long de celle-ci, de l'extrémité réductrice vers l'extrémité non réductrice, et d'un site de coupure à l'autre (par exemple les cellobiohydrolases). Enfin, les *exo*-enzymes présentent une structure en "poche", optimale pour la reconnaissance de l'extrémité non-réductrice ou réductrice d'une chaîne d'oligo- ou de polysaccharide (par exemple, les arabinofuranosidases). (Figure 13)



Figure13 : Modes d'action des glycoside hydrolases et relation avec la topologie du site actif. Le site de coupure est indiqué par une flèche, les monosaccharides par des cercles noirs et l'extrémité réductrice est en vert. Le site actif de l'enzyme est indiqué en rouge.

Du point de vue de la catalyse enzymatique proprement dite, l'hydrolyse de la liaison glycosidique par les GH est réalisée selon deux grands mécanismes catalytiques, comme proposé en 1953 par Koshland. [89] Il s'agit de mécanismes de substitution nucléophile qui

résultent soit en l'inversion, soit en la rétention de la configuration du carbone anomérique (α ou β) des unités de sucres, mettant en jeu deux résidus acides carboxyliques critiques du site actif de l'enzyme: un jouant le rôle de résidu acide/base, l'autre de résidu nucléophile/base. Dans la plupart des glycoside hydrolases, il s'agit de résidus glutamate et/ou aspartate.

La rétention de configuration du carbone anomérique lors de l'hydrolyse est la conséquence d'un mécanisme de double déplacement chimique, à deux étapes. L'unité de sucre, liée dans le sous-site situé du côté non-réducteur de la liaison à hydrolyser, adopte une conformation semi-bateau qui place l'oxygène interglycosidique à proximité du résidu catalytique donneur de proton (résidu acide/base) et permet une attaque trans-diaxiale.

Dans une première étape (glycosylation), le résidu acide/base agit comme un catalyseur acide et protone l'oxygène glycosidique, alors que le résidu nucléophile effectue une attaque nucléophile concomitante qui a pour conséquence la rupture de la liaison glycosidique et la formation d'un intermédiaire glycosyl-enzyme covalent.

La réaction se poursuit, par une deuxième étape (déglycosylation) où le résidu acide/base agissant cette fois-ci en tant que base, active une molécule d'eau (en capturant un proton) qui opère alors une attaque nucléophile du carbone anomérique, hydrolysant l'intermédiaire glycosyl-enzyme et libérant un produit de configuration anomérique identique à celle du substrat de départ. Le glycosyl-enzyme est formé et hydrolysé via la formation d'un ion oxocarbanium. Cette seconde étape peut être une transglycosylation si le groupement nucléophile est issu, non pas d'une molécule d'eau (HO⁻), mais d'un sucre (RO⁻). (Figure 14) Chez les GH agissant selon ce mécanisme, la distance séparant les groupements carboxyliques des résidus catalytiques est de l'ordre de 5,5 Å.



Figure 14 : Mécanisme d'une β-D-glycoside hydrolase agissant avec rétention de configuration.

Dans le cas des GH agissant selon un mécanisme d'inversion de configuration, la réaction d'hydrolyse s'opère via un seul déplacement chimique, pendant lequel la molécule d'eau est simultanément activée sous l'action du résidu nucléophile/base (qui agit en tant que base) et attaque directement le carbone anomérique entraînant le clivage de la liaison glycosidique avec inversion de configuration du produit d'hydrolyse. (Figure 15) Les deux résidus catalytiques sont généralement distants d'environs 9,5 Å, ce qui permet d'accommoder la molécule d'eau entre le carbone anomérique et le résidu "base". [90-92]



Figure 15 : Mécanisme d'une β-D-glycoside hydrolase agissant avec inversion de configuration.

II.2. Les domaines de fixation non catalytiques : les CBM

Un CBM (*Carbohydrate Binding Module*) est défini comme un domaine protéique contigu à un domaine catalytique et qui possède des propriétés de fixation de sucres. Initialement découverts (en 1988) chez les cellulases notamment de *Trichoderma reesei* et *Cellulomonas fimi*, ces domaines étaient appelés CBD (*Cellulose Binding Domains*), en raison de leur fixation spécifique sur la cellulose. [93, 94] Leur nom fut par la suite (à partir de 1999) élargi à CBM pour englober des modules protéiques présentant des spécificités de fixation plus variées et capables de fixer, entre autres, la cellulose cristalline, la cellulose non cristalline, la chitine, les β -1,3-glucanes, les β -1,3-1,4-glucanes, les xylanes, les galactanes, les mannanes, les glucomannanes, l'amidon... Par ailleurs, certains CBM présentent des propriétés similaires aux lectines et sont capables de fixer une variété de glycanes présents à la surface des membranes cellulaires.

Du point de vue de leur structure, ces modules renferment entre 30 à 200 résidus d'acides aminés et peuvent exister en simple, double voir même en triple domaines au sein d'une même protéine. Localisés soit en N-terminal soit en C-terminal, ils sont généralement reliés au domaine catalytique par l'intermédiaire de séquences de liaison (linker) souvent caractérisées par une forte teneur en proline et en acides aminés hydroxylés tels que la sérine et/ou la thréonine. Ces résidus peuvent être, dans certains cas, O-glycosylés, ce qui contribue à la stabilité de ces séquences en les protégeant de la protéolyse. [95] Les séquences de liaison adoptent, en général, une conformation étendue et flexible permettant le bon repliement et le bon fonctionnement des domaines inter-reliés. [96, 97] La longueur de ces séquences peut varier de quelques résidus (6 par exemple dans le cas de l'endoglucanase CenC de Cellulomonas fimi) à plus de cinquante (59 dans le cas de l'endoglucanase EndA de Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa). [98, 99] Des études d'ingénierie protéique ont montré que la longueur de ces séquences est un critère important pouvant affecter l'activité de certaines cellulases et hémicellulases. [100, 101, 102] La délétion du "linker" de la cellulase CenA de Cellulomonas fimi entraîne, en effet, une baisse de l'activité de l'enzyme aussi bien sur la cellulose soluble que cristalline et affecte l'adsorption/désorption de son CBD de la cellulose. [103] D'après Srisodsuk et al., 1993, les séquences de liaison auraient un double rôle, d'une part en maintenant les domaines fonctionnels à une distance évitant toute gène stérique et autorisant leur bon repliement 3D et d'autre part en facilitant le processus dynamique de fixation orientée par les CBM. La présence d'un linker long et suffisamment flexible permettrait aux CBD, par exemple, de s'adsorber aux régions cristallines de la cellulose et de diffuser latéralement le long de la surface entraînant le domaine catalytique des cellulases vers de nouveaux sites d'action potentiellement inaccessibles du substrat. [104]

II.2.1. Nomenclature et classification des CBM

Comme les domaines catalytiques des glycoside hydrolases, les CBM sont classés en fonction de leur homologie de séquences primaires dans environ 55 familles différentes (base de données CAZy). Les CBM d'origine fongique se trouvent exclusivement dans la famille 1, alors que les CBM de bactéries sont représentés dans diverses familles. [105] Certaines familles sont subdivisées en deux sous-familles (a et b) fixant respectivement la cellulose et le xylane. C'est le cas par exemple de la famille 2 qui comprend deux sous-familles 2a et 2b, en

raison d'un polymorphisme Arg/gly qui leur confère des spécificités différentes pour la cellulose et le xylane respectivement. [106]

D'une façon générale, la dénomination des CBM fait référence à leur famille de classification, leur organisme producteur, mais aussi à l'enzyme (DC) à laquelle ils sont associés. Par exemple, le CBM appartenant à la famille 17 de la cellulase Cel5a de *Clostridium cellulovorans* portera le nom de *Cc*CBM17 ou encore *Cc*Cel7aCBM17.

La résolution de la structure 3D de plus de 35 familles de CBM, grâce à des études de cristallographie en rayons X et de spectroscopie RMN, a permis de les classer en sept super-familles structurales (ou de repliement) distinctes.(Tableau 5)(Figure 17)[105]

La grande majorité des CBM (environs 26 familles) présente un repliement 3D en β sandwich, constitué essentiellement de deux feuillets β , comprenant chacun trois à six brins β anti-parallèles. Ce type de repliement inclut des CBM en β -*jelly roll* (représentés par les familles 2, 3, 4, 6, 11, 15, 16, 17, 22, 27, 28, 29, 30, 32, 35, 36, 44, 47, 51) ainsi que des CBM présentant un repliement similaire aux immunoglobulines (représentés par les familles 9, 20, 25, 26, 31, 33, 34). [107, 108-110] A l'exception du CBM 2a de la xylanase 10 de *Cellulomonas fimi*, tous les CBM en β -sandwich renferment un ion métallique qui contribue à leur stabilité structurale. Dans le cas de la famille 36, un ion calcium est plutôt impliqué dans la fixation du ligand. [105]

Les CBM des familles 13 et 42 présentent un repliement 3D caractéristique en β -*trèfle*, constitué d'environs 12 brins β formant 6 structures (boucles) en épingle à cheveux.

Dans l'ensemble, les CBM en β -sandwich et en β -*trèfle* présentent des spécificités de fixation variées de divers polysaccharides des parois végétales contrairement aux CBM appartenant aux super-familles de repliement 3 et 5 (repliement en "*nœud de cystéine*" (ou *Cystéine Knot*) et en motif "*OB*" (ou *Oligonucleotide/oligosaccharide binding*). Ces derniers sont en effet de petits polypeptides de 30 à 60 résidus d'acide aminés renfermant uniquement un feuillet β et une boucle et fixant spécifiquement la cellulose et/ou la chitine. [105]

Super- Familles	Repliement		Familles de CBM
1	β– sandwich	β–jelly roll	2, 3, 4, 6, 11, 15, 16, 17, 22, 27, 28, 29, 30, 32, 35, 36, 44, 47, 51
		Immunoglobuline	9, 20, 25, 26, 31, 33, 34
2	β– <i>trèfle</i>		13, 42
3	Nœud de Cystéine		1
4	Unique		5, 12
5	Motif OB		10
6	Motif <i>Hévéine</i>		18
7	Unique		14

Tableau 5 : Les superfamilles de repliement des CBM (adapté de [105, 107]) ;

II.2.2. Spécificités et mécanismes de fixation de substrats

Bien que les familles de CBM puissent être regroupées en "superfamilles de repliement" sur la base de la conservation de leur repliement protéique, cette classification ne peut en aucun cas être prédictive de la fonction des CBM. En effet, les membres d'une même superfamille de repliement présentent des spécificités de fixation très variées résultant de différences au niveau de la topographie ou de la composition en acides aminés de leur site de fixation.

Pour cette raison une autre classification, basée à la fois sur les similitudes structurales et fonctionnelles, a été proposée. Selon cette classification, les CBM sont groupés en trois types fonctionnels: les CBM fixant les surfaces (type A), les CBM fixant les chaînes de glycanes (type B) et les CBM fixant les petits sucres (type C). [105]

Le Tableau 6 montre les trois types de CBM et les familles correspondantes.

Les CBM de type A incluent des membres des familles 1, 2a, 3, 5 et 10 et fixent la cellulose et/ou la chitine insoluble et fortement cristalline. Le site de reconnaissance et de fixation du ligand de ces CBM comprend principalement des résidus aromatiques (tels que tyrosine,

tryptophane et plus rarement phénylalanine), mais se distingue des autres types de CBM par une topographie plane parfaitement complémentaire aux surfaces planes de la cellulose cristalline. (Figure 16) Une telle topographie augmente, en effet, les forces de "*stacking*" entre les résidus hydrophobes de surface des CBM (essentiellement trois résidus) et les cycles pyranose des molécules de glucose à la surface des fibrilles de cellulose. L'interaction CBM/ligand, dans ce cas implique peu ou pas de liaisons hydrogène. Par ailleurs, ces CBM ne présentent pratiquement pas d'affinité pour les polysaccharides solubles. [111, 112] Les enzymes comprenant des CBM de type A incluent des cellulases, des mannanases, des xylanases, des pectinases... C'est le cas, par exemple de la xylanase Xyn10A, de la mannanase Man5B et de nombreuses cellulases de *Cellvibrio japonicus* qui renferment un CBM2a et un CBM 10 reconnaissant spécifiquement les zones cristallines de la cellulose. [113]

Contrairement aux CBM de type A, les **CBM de type B** ne sont pas capables de se fixer aux surfaces planes des polysaccharides cristallins (tels que la cellulose cristalline), mais leur site de fixation est formé d'une crevasse plus ou moins profonde renfermant des sous-sites capables d'accommoder les unités monomériques de chaînes de polysaccharides isolées. (Figure 16) L'efficacité de fixation de cette classe de CBM est déterminée par le degré de polymérisation (DP) des chaînes de polysaccharides. En effet, des études ont montré que l'affinité de ces CBM est de plus en plus croissante pour des oligosaccharides de DP \geq à 6 et que leur interaction avec des di- ou des tri-saccharides est pratiquement négligeable. Par ailleurs, la profondeur de la crevasse formant le site de fixation est très variable selon sa capacité d'accommoder des cycles d'hexoses (dans le cas de chaînes de β -glucanes, de cellulose amorphe...) ou des cycles de pentoses (dans le cas des chaînes de β -xylanes...).

Comme pour les CBM de type A, les résidus aromatiques jouent un rôle important dans la fixation du ligand des CBM de type B. De même, l'orientation des chaînes latérales de ces résidus au niveau du site de fixation est un critère déterminant pour la spécificité de ces CBM. L'interaction de ces CBM avec les chaînes de polysaccharides implique en plus des interactions hydrophobes, de nombreuses liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyle des sucres et les acides aminés polaires. [114]

Actuellement les CBM de type B incluent des membres des familles 2b, 4, 6, 11, 15, 17, 20, 22, 27, 28, 29, 30, 34, 35 et 36. [106] Parmi ces CBM, le CBM4-1 de Cel9B de *Cellulomonas fimi*, le CBM17 de Cel5A de *Clostridium cellulovorans* et le CBM28 de Cel5 de *Bacillus sp. 1139* reconnaissant et fixant spécifiquement les zones amorphes de la cellulose. [115]

Les **CBM de type C** présentent des propriétés similaires aux lectines et fixent essentiellement des mono-, di- et tri-saccharides. Ce type de CBM comprend des membres des familles 9, 13, 14, 18, 32, 40 et 42. La famille 9 renferme des CBM qui sont exclusivement associés à des xylanases. C'est le cas du CBM 9 de la xylanase 10A de *Thermotoga maritima* qui a la particularité de reconnaître spécifiquement les extrémités réductrices des xylanes et de la cellulose. [116] Le CBM 32 de *Micromonospora viridifaciens* présente le même repliement 3D de la lectine spécifique du fucose de *Anguilla anguilla* et fixe le galactose. [117, 118]

Dans l'ensemble, les CBM de type C sont peu représentés au niveau des glycoside hydrolases actives sur les parois végétales, comparés à ceux du type B ou A. De plus, ces CBM (en particulier ceux des familles 13 et 32) sont plus prévalents dans les toxines bactériennes ou les enzymes (glycoside hydrolases et glycosyl transférases) actives sur les glycanes de la surface cellulaire ou de la matrice extracellulaire des eucaryotes.

Du point de vue de leur structure, la distinction entre ces CBM et les CBM de type B reste, cependant, très subtile malgré le fait que ces derniers présentent une crevasse plus prononcée au niveau de leur site de fixation. (Figure 16) Par exemple, le CBM6 de type B de la xylanase de *Clostridium stercorarium* a un repliement très semblable à celui des CBM "*lectin-like*" de la famille 32, mais fixe des oligosaccharides de DP relativement supérieur. [117] Néanmoins, il semble que le réseau des liaisons hydrogène entre le module protéique et le ligand serait plus étendu dans le cas des CBM de type C que des CBM du type B, en accord avec leur mode de fonctionnement "*lectin-like*". [119]

Туре	Superfamilles*	Familles
Α	1, 3, 4, 5	1, 2a, 3, 5, 10
В	1	2b, 4, 6, 11, 15, 17, 20, 22, 27, 28, 29, 30, 34, 35 36
С	1, 2, 6, 7	9, 13, 14, 18, 32, 40, 42

Tableau 6 : Classification des CBM en types fonctionnels (adapté de [105])

* familles de repliement



Figure 16 : Structure des CBM de type A, B et C (D'après [119])

Le type A est représenté par le CBM2 de la xylanase 10A de *Cellulomonas fimi* (code PDB 1EXG), le type B par le CBM 27 de la mannanase 5 de *Thermotoga maritima* (code PDB 1OH4) et le type C par le CBM 9 de la xylanase 10A de *Thermotoga maritima* (code PDB 1I82). Les surfaces accessibles aux solvants sont représentées en transparent, les résidus aromatiques impliqués dans la fixation en gris et les chaînes de carbohydrates en bleu/rouge.



Figure 17 : Classification fonctionnelle et structurale des CBM (d'après [105])

Des exemples représentatifs de familles de CBM (a-m) sont regroupés en types fonctionnels (A, B et C) et en superfamilles de repliement (de 1 à 7).

(a) CcCBM17 (famille 17), de *Clostridium cellulovorans* en complexe avec du cellotétraose (code PDB 1J84; [120]); (b) TmCBM4-2 (famille 4), de *T. maritima* en complexe avec du laminariohexaose (code PDB 1GUI; [121]); (c) CjCBM15 (famille 15), de *Cellvibrio japonicus* en complexe avec du xylopentaose (code PDB 1GNY; [122]); (d) CtCBM3 (famille 3), de *Clostridium thermocellum* (code PDB 1NBC; [111]); (e) CfCBM2 (famille 2), de *Cellulomonas fimi* (code PDB 1EXG; [123]); (f) TmCBM9-2 (famille 9), de *T. maritima* en complexe avec du cellobiose (code PDB 1I82; [124]); (g) MvCBM32 (famille 32), de *Micromonospora viridifaciens* en complexe avec du galactose (code PDB 1EUU; [118]); (h) EcCBM5 (famille 5), d'*Erwinia chrysanthemi* (code PDB 1AIW; [125]); (i) SICBM13 (famille 13), de *S. lividans* en complexe avec du xylopentaose (code PDB 1MC9; [126]); (j) TrCBM1 (famille 1), de *Trichoderma reesi* (code PDB 1CBH; [127]); (k) CjCBM10 (famille 10), de *Cellvibrio japonicus* (code PDB 1E8R; [128]); (l) CBM18 (famille 18) d'*Urtica dioca* en complexe avec du chitotriose (code PDB 1EN2; [129]); (m) CBM14 (famille 14) de *Tachypleus tridentatus* (code PDB 1DQC; [130]).

II.2.3. Fonctions des CBM

D'une façon générale, les CBM sont considérés comme l'apanage de fixation des glycoside hydrolases dégradant les polysaccharides insolubles et/ou solubles, bien que certains CBM ont la capacité de fixer des oligosaccharides. Ces modules protéiques permettent d'augmenter l'efficacité hydrolytique des domaines catalytiques en exerçant essentiellement trois fonctions principales : la reconnaissance sélective et l'orientation vers le substrat cible, le maintien d'une proximité physique enzyme/substrat et enfin dans certains cas l'altération des propriétés inter-faciales du substrat. [105, 119]

De nombreuses études ont montré que la spécificité de fixation du CBM affecte la fonction de l'enzyme. La substitution du CBM 2a de la cellulase CenA de *Cellulomonas fimi* par un CBM 4 entraîne, en effet, une perte de l'activité de l'enzyme chimère sur la cellulose cristalline en échange d'une nette propension envers la cellulose amorphe. [131]

Par ailleurs, Carrard et *al.*, 2000 ont montré que le domaine catalytique de la CelD de *Clostridium thermocellum* hydrolyse des régions différentes de la cellulose cristalline quand il est couplé à des CBD différents des familles 1, 2a et 3. [132]

Dotés de spécificités diverses et variées, les CBM permettent d'orienter l'action des glycoside hydrolases vers des zones spécifiques de substrats. De récentes études ont montré qu'en plus de la fixation à la chaîne principale des polysaccharides, certains CBM ont la capacité de se fixer spécifiquement aux chaînes latérales des hémicelluloses. C'est ainsi, par exemple, que le CBM 42 d'une α -L-arabinofuranosidase d'*Aspergillus kawachii* reconnaît et fixe spécifiquement les chaînes latérales d'arabinose des arabinoxylanes. [133]

Grâce à cette spécificité fine de fixation, les CBM représentent des outils intéressants pour l'étude de l'organisation structurale de la paroi végétale. Couplés à un marquage fluorescent, ils sont actuellement utilisés (au même titre que les anticorps) pour appréhender la distribution des constituants pariétaux au sein des parois. [115, 134-136]

En plus de leur rôle dans la reconnaissance sélective et l'orientation spécifique des domaines catalytiques, les CBM sont impliqués dans le transfert de phase de l'enzyme sur le substrat. Ils permettent d'augmenter la concentration effective de l'enzyme (DC) à la surface des substrats insolubles et cristallins (CBM de type A) et/ou de maintenir une proximité physique avec les chaînes de polysaccharides (CBM de type B). La suppression par protéolyse de CBM

entraîne, en général, une baisse significative de l'activité des enzymes sur les substrats insolubles et non sur les substrats solubles. [93, 137, 138]

Il est intéressant de noter que les CBM de type A sont généralement associés à divers domaines catalytiques alors que les CBM de type B interagissent et fixent les polysaccharides qui constituent les substrats de leur domaine catalytique respectif. Par exemple, les cellulases, les xylanases et les mannanases peuvent renfermer des CBM de type B fixant respectivement la cellulose, le xylane et le mannane. Les CBM permettent, ainsi, de maintenir une proximité physique entre l'enzyme et le substrat cible à l'intérieur de réseaux supramoléculaires complexes tels que la paroi végétale.

Certains CBM, notamment ceux de type A, ont la capacité d'altérer la structure ordonnée et cristalline des fibres de cellulose. Din et *al.*, 1994 ont suggéré que ces CBM agissent en synergie intramoléculaire totale avec leur domaines catalytiques respectifs. Ils permettent, en effet, d'infiltrer la structure cristalline de la cellulose, libérant les particules faiblement liées (par des liaisons non covalentes) et exposant de ce fait des sites de substrats initialement inaccessibles à leur domaine catalytique. [139, 140, 141] D'après une étude récente de Pinto et *al.*, 2004, l'action de ces CBM entraîne une altération des propriétés inter-faciales des fibres de celluloses, par suite de la baisse de l'acidité ainsi que de la polarité de surface. [142]

II.2.4. Exemple de CBM : le CBM1 Cel7a de Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)

Le champignon filamenteux *Trichoderma reesei* (actuellement *Hypocrea jecorina*) secrète un large panel d'enzymes cellulolytiques dont quatre endoglucanases et deux cellobiohydrolases (Cel6A et Cel7A, anciennement CBHII et CBHI). Ces dernières glycoside hydrolases des familles 6 et 7 hydrolysent les chaînes de cellulose à partir de leur extrémité libérant du cellobiose et sont capables d'agir efficacement sur les régions les plus inaccessibles de la cellulose cristalline, notamment grâce à leur structure modulaire. Les domaines catalytiques de Cel6A et Cel7A sont, en effet, reliés *via* un peptide linker glycosylé au niveau de leur extrémité C-terminale, à un CBM (ou CBD) de la famille 1.

Le CBM 1 de Cel7A compte parmi les CBM les mieux caractérisés dans la littérature. Ses propriétés structurales ainsi que sa spécificité de fixation ont fait l'objet de nombreuses études. Sa structure tridimensionnelle a été résolue par spectroscopie RMN. Il s'agit d'un module protéique composé d'environs 36 résidus d'acide aminés formant trois courts feuillets

 β antiparallèles adoptant le motif de repliement tridimensionnel caractéristique (CK : cystein knot ou nœud de cystéine). Le feuillet β_1 (résidus 5-9) forme des liaisons hydrogène avec le feuillet β_3 (résidus 33-36), lui-même maintenant des liaisons hydrogène avec le feuillet β_2 (résidus 24-28). L'ensemble forme un module compact (de dimensions $30 \times 10 \times 18$ Å) stabilisé par deux pont disulfure entre quatre cystéines conservées : d'une part les Cys 8 et Cys 25 et d'autre part les Cys 19 et Cys 35. (Figure 18) [127]

La structure du CBM 1 Cel7A montre une face aplatie (plane) exposant en surface trois résidus Tyrosine conservés (Tyr 5, Tyr 31 et Tyr 32). Des études de mutagenèse dirigée ont montré que ces trois résidus aromatiques sont déterminants pour la fixation spécifique du CBM 1 Cel7A sur la cellulose cristalline. Ils sont, en effet, impliqués dans des interactions hydrophobes de "*stacking*" avec les cycles pyranose des résidus glucose (résidus 1, 3 et 5 par exemple dans le cas de cellohexaose). Deux autres résidus conservés (Asn 29 et Gln 34) semblent également être impliqués dans des liaisons hydrogène avec la cellulose cristalline. [143, 144, 145]

Concernant sa spécificité de fixation, Le CBM 1 Cel7A se fixe sur la cellulose cristalline de façon réversible et dynamique, facilitant ainsi l'action processive de la cellulase Cel7A. [146] Des études de microscopie électronique à transmission (MET) ont montré que le CBM 1 Cel7A se fixe avec une forte affinité sur la face hydrophobe (110) de la cellulose cristalline qui semble être la plus exposée au niveau de la paroi végétale, de façon à orienter et diriger l'action processive de l'exoglucanase Cel7A vers les extrémités des chaînes les plus accessibles. [147] Blacke et *al.*, 2006 ont également montré que ce CBM peut être utilisé comme sonde spécifique des parois végétales secondaires des faisceaux vasculaires (phloème et xylème). [115]



Figure 18 : Le CBM1 Cel7A de *Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)* **A–** Séquence primaire; les résidus Tyr de fixation sont indiqués en rouge et les deux ponts disulfure en vert. **B–** Structure 3D en complexe avec un cellopentaose (d'après [119]).

III. Dégradation des hémicelluloses : les hémicellulases

Les hétéroxylanes étant les hémicelluloses majoritaires des lignocelluloses, notamment des graminées, nous nous limiterons dans ce qui suit à l'étude de l'hydrolyse enzymatique des hétéroxylanes.

En raison de leur nature complexe, l'hydrolyse totale de ces polymères nécessite l'action concertée d'un véritable "arsenal" enzymatique. On distingue généralement les enzymes qui s'attaquent au squelette principal de xylane (les endoxylanases) et celles dites débranchantes (ou accessoires) qui permettent d'hydrolyser les ramifications portées par la chaîne principale. (Figure 19)



Figure19 : Les principales hémicellulases impliquées dans la dégradation des hétéroxylanes

Parmi les enzymes débranchantes, les α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) sont des exoenzymes capables de libérer les résidus α -L-arbinoses. Principalement réparties dans six familles de GH : 3, 43, 51, 54, 62 et 93, leur spécificité varie considérablement en termes de substrats (arabinanes, arabinogalactanes, gomme arabique, AX, GAX...) et de liaisons (α -(1, 2), α -(1, 3), α -(1, 5). Certaines agissent préférentiellement sur des oligosaccharides, d'autres sur des polysaccharides. De même, certaines arabionofuranosidases, notamment de la famille GH51, sont capables de libérer des résidus arabinoses doublement substitués en *O*-2 et *O*-3 sur un xylose. [148, 149-151] Les α -D-glucuronidases (EC 3.2.1.139) sont également des exo-enzymes qui hydrolysent les liaisons glycosidiques α -(1,2) entre les acides glucuroniques (ou leur dérivés 4-*O*-méthylés) et les résidus xylose de la chaîne d'hétéroxylane. Elles se trouvent presque exclusivement dans les familles GH4 et GH67. [81, 152]

Les acétyl-xylane-estérases (EC 3.1.1.72) catalysent la déacétylation des résidus xyloses pouvant être acétylés en position O-2 ou O-3. Les féruloyl-estérases (EC 3.1.1.73), quant à elles, hydrolysent la liaison ester entre les résidus arabinose et l'acide férulique (en position O-2 et/ou O-5). [153, 154, 155]

Enfin, les β -D-xylosidases (EC 3.2.1.37) sont des exo-glycosidases qui hydrolysent les xylooligosaccharides en monomères de xylose. Elles appartiennent essentiellement aux familles GH 3, 39, 43, 52 et 54. Certaines sont bi-fonctionnelles et présentent une double activité xylosidase-arabinosidase (familles GH 3, 43 et 54). Ces enzymes attaquent très peu les polymères d'hétéroxylane, leur substrat préférentiel est le xylobiose, produit de fin de réaction des endoxylanases GH 11. [81, 156]

IV. Les endoxylanases

IV.1. Présentation générale

IV.1.1. Diversité et classification des endoxylanases

Les endo- β -1,4-xylanases, communément appelées xylanases, sont des *O*-glycoside hydrolases (EC 3.2.1.8) qui catalysent la rupture de la liaison β –(1,4) entre deux résidus β -D-xylopyranose de la chaîne principale des hétéroxylanes. D'abord rapportées en 1955,[157] elles sont à l'origine nommées "pentosanases", pour être par la suite identifiées par l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (IUBMB) en 1961 comme une classe d'enzymes à part entière (EC 3.2.1.8).

Les endoxylanases sont impliquées, avec d'autres enzymes dans la production de xylose, source primaire de carbone pour le métabolisme cellulaire de nombreux micro-organismes tels que les bactéries et champignons phyto-pathogènes, les bactéries du rumen...[158, 159] En plus de produire un large panel d'enzymes qui dégradent les hétéroxylanes, la plupart de ces micro-organismes produisent plusieurs xylanases, variables par leurs propriétés structurales (repliement 3D, présence ou non de domaines tels que les CBM...), et biochimiques (optima de température et de pH) et catalytiques (spécificité de substrat...). C'est le cas par exemple d'*Aspergillus niger* qui secréterait au moins 15 xylanases différentes ou de *Trichoderma viride* qui en produirait 13.

Cette diversité et cette multiplicité des xylanases seraient le résultat de redondance génétique et/ou de modification post-transcriptionnelles, et constitueraient une stratégie adaptative des micro-organismes "lignocellulolytiques" vis-à-vis de la complexité, de l'hétérogénéité et des problèmes d'accessibilité des liaisons xylosidiques au sein des lignocelluloses. [160, 161, 162]

Etant donnée la grande diversité des séquences, des structures et des spécificités de substrats des xylanases, de nombreuses classifications ont été proposées. Une première classification sur la base des propriétés physico-chimiques, comme le poids moléculaire (M_W) et le point isoélectrique (pI) a été introduite par Wong et *al.*, 1988. [162] Les endoxylanases ont alors été séparées en deux classes : d'un côté les xylanases de faible poids moléculaire (M_W < 30 kDa) et de pI basique, de l'autre celles de poids moléculaire élevée (M_W > 30 kDa) et de pI acide. Cependant, ce système de classification n'étant valable que pour 70% des xylanases, c'est la classification plus complète basée sur la similarité des séquences des domaines catalytiques, accessible dans la base de données CAZy, qui est actuellement employée pour les endoxylanases. [84, 85, 86] (Tableau 7)

D'après ce système de classification, les enzymes possédant une activité xylanolytique, c'est à dire ayant la nomenclature EC 3.2.1.8, appartiennent aux familles 5, 7, 8, 10, 11, 16, 26, 43, 52 et 62. [163] Les "vraies" endo- β -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, 52 et 62 contiennent en réalité des enzymes bifonctionnelles avec deux domaines catalytiques différents. C'est le cas, par exemple, d'une enzyme de *Ruminococcus flavefaciens* qui comporte en N-terminal un domaine appartenant à la famille 11 et en Cterminal une β -(1,3-1,4)-glucanase de la famille 16. [164] Quant à la famille 26, il s'agit d'endo- β -1,3-xylanases. Finalement, les endo- β -1,4-xylanases avec un seul domaine catalytique se limitent aux familles 5, 7, 8, 10, 11 et 43.

IV.1.2. Mécanismes catalytiques

La grande majorité des xylanases, notamment celles des familles 5, 7, 10 et 11, catalysent l'hydrolyse des xylanes selon un mécanisme de rétention de configuration. Les résidus catalytiques impliqués sont généralement deux acides glutamiques conservés du site actif. En revanche, les xylanases des familles 8 et 43 fonctionnent typiquement avec inversion de la configuration anomérique, impliquant un résidu glutamate et un résidu aspartate.

Le tableau 7 récapitule l'essentiel des propriétés structurales et catalytiques de ces familles d'enzymes. Les structures tridimensionnelles caractéristiques des principales familles d'endoxylanase (GH10 et GH11) sont représentées sur la figure 20.

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

Tableau 7: Familles des GH présentant une activité xylanase et principales caractéristiques. (D'après [163])

* Non confirmé expérimentalement.



Figure 20 : Structure des principales familles de xylanases GH10 et GH11 (d'après [165]). Xylanase de la famille 10 de *Pseudomonas fluorescens* (pdb 1CLX; [166]) et xylanase de la famille 11 de *Penicillium funiculosum* (pdb 1TE1 ; ([167]).

IV.1.3. Les CBM des endoxylanases

D'une façon générale, La plupart des endoxylanases, notamment des familles 10 et 11 sont formées d'un seul domaine catalytique. Néanmoins, certaines peuvent présenter une structure multi-modulaire et renferment en plus un (ou plusieurs) CBM souvent dédié à la fixation aux xylanes (XBD). La présence d'un CBD a été également démontrée dans certains cas de xylanases 11, notamment la Xyn11A de *Lentinula edodes*, ou la XynA de *Clostridium thermocellum* mais surtout de xylanases 10 telles que les Xyn10A de *Cellvibrio japonicus* et de *Pseudomonas fluorescens*. [128, 168, 169, 170] Ces xylanases ont la capacité de se fixer à la cellulose, mais sont incapables de l'hydrolyser. Ainsi, les CBD conféreraient aux xylanases la capacité de se fixer à de nombreux sites dans la paroi végétale et augmenteraient ainsi leurs chances de rencontre *in situ* avec leurs substrats.

A l'heure actuelle, les structures 3D d'environs 14 XBD différents associés à des endoxylanases des familles 10, 11 et 43 sont connues (base de données CAZY) (Tableau 8). Il s'agit pour la plupart de CBM de type B (en β -sandwich) appartenant essentiellement aux familles 2b, 4, 6, 9, 13, 15, 22, 35 et 36.

La nature et le nombre de ces XBD influencent la spécificité de fixation des xylanases et affectent leur efficacité hydrolytique à la fois sur les xylanes insolubles et/ou sur les xylanes solubles. [171, 172] En effet, les XBD présentent des spécificités différentielles de fixation en fonction du degré de substitution des xylanes. McCartney et *al.*, 2006 ont montré que les XBD des familles 4, 6, 15 et 22 fixent de façon similaire le xylane non substitué d'avoine (composé d'environs 93% de xylose et 6% d'arabinose) et l'arabinoxylane fortement substitué de seigle (composé d'environs 50% de xylose et 50% d'arabinose) alors que les XBD des familles 2b et 35 présentent une forte affinité pour les xylanes peu ou pas substitués. De même, les XBD de la famille 35 ont la particularité de reconnaître spécifiquement les glucuronoarabinoxylanes.

L'étude immuno-histochimique de la fixation de ces XBD sur des coupes de différentes espèces végétales a également montré des profils de fixation différents. Ainsi, les XBD des familles 2b et 15 sont capables de se fixer sur les parois secondaires de nombreuses espèces de dicotylédones (tiges de lin, de tabac...), de la même façon que l'anticorps monoclonal LM11 généralement utilisé pour sonder spécifiquement les arabinoxylanes faiblement substitués. Les XBD des familles 4, 6 et 22 montrent une capacité plus limitée de fixation sur les parois secondaires. En revanche, Les XBD de la famille 35 se distinguent des autres XBD

par le fait qu'ils reconnaissent spécifiquement les parois primaires caractérisées chez les dicotylédones par la présence de glucuronoarabinoxylanes. [173, 174]

Ces différences de spécificité des XBD aussi bien *in vitro* (vis-à-vis de xylanes isolés) que *in vivo* reflètent à la fois l'hétérogénéité et la grande variabilité de la structure fine des xylanes ainsi que leur état d'accessibilité au sein du réseau complexe de la paroi végétale et soulignent, de ce fait, le rôle potentiel de ces modules protéiques dans le sondage des substrats cibles des endoxylanases à travers la paroi végétale.

Ces différences de spécificité sont généralement corrélées à des différences dans la topographie du site de fixation (notamment la profondeur de la crevasse de fixation), l'arrangement des résidus aromatiques impliqués dans les interactions de "*stacking*" avec les unités de sucre des chaînes de polysaccharides, mais également à la flexibilité conformationnelle du site de fixation des XBD. Ainsi, par exemple les XBD 2b disposent d'un site de fixation plus large et peu profond comparé aux XBD 4, 6 et 22, ce qui expliquerait, en partie, leur aptitude à fixer plus efficacement un plus large panel de xylanes des parois secondaires. (Figure 21) Par ailleurs, dans le cas des XBD 6, le ligand est généralement accommodé entre les structures en boucles connectant les deux feuillets β , contrairement aux XBD 22 et 4, où le site de fixation est localisé sur la face concave du *jelly-roll*. [135]



Figure 22 : Les différentes topographies des XBD (d'après [173]).

Les exemples de XBD représentés sont le *Cf*CBM2b-1 de Xyn11A de *C. fimi*, le *Rm*CBM4-2 de Xyn10A de *R. marinus*, le *Ct*CBM6 de Xyn11A de *C. thermocellum*, le *Cj*CBM15 de Xyn10C de *C. japonicus* et le *Ct*CBM22-2 de Xyn10B de *C. thermocellum*. Les résidus impliqués dans le site de fixation sont indiqués en vert.

Famille	Туре	Repliement	Protéine	Code PDB
CBM-2	В	β–sandwich	Xylanase 10A (Cellulomonas fimi)	1EXG
	В	β -sandwich	Xylanase 11A (Cellulomonas fimi)	2XBD
	В	β -sandwich	Xylanase 11A (Cellulomonas fimi)	1HEH
CBM-4	В	β -sandwich	Xylanase 10A (Rhodothermus marinus)	1K45
CBM-6	В	β -sandwich	Xylanase 11A (Clostridium thermocellum)	1UXX
	В	β –sandwich	Xylanase 11A (Clostridium stercorarium)	1NAE
	В	β –sandwich	Xylanase 11A (Clostridium stercorarium)	1UY4
CBM-9	С	β –sandwich	Xylanase 10A (Thermotoga maritima)	1I8A
CBM-10	А	Motif OB	Xylanase 10A (Cellvibrio japonicus)	1QLD
CBM-13	С	β- <i>trèfle</i>	Xylanase 10A (Streptomyces olivaceovidris)	1XYF
	С	β– <i>trèfle</i>	Xylanase 10A (Streptomyces lividans)	1MC9
CBM-15	В	β–sandwich	Xylanase 10C (Cellvibrio japonicus)	1GNY
CBM-22	В	β–sandwich	Xylanase 10B (Clostridium thermocellum)	1DYO
CBM-36	В	β –sandwich	Xylanase 43A (Paenibacillus polymyxa)	1UX7
	В	β –sandwich	Xylanase 11J (Bacillus sp.)	2DCJ

Tableau 8: Les principaux CBM associés aux xylanases de structure connue. ([165])

IV.2. Les endoxylanases de la famille 10

La famille 10 des glycoside hydrolases est essentiellement constituée d'endo- β -1,4-xylanases (EC 3.2.1.8), mais aussi d'endo- β -1,3-xylanases (EC 3.2.1.32) et de cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91).

Du point de vue de leur structure, les endo- β -1,4-xylanases de la famille 10 possèdent, en général, un domaine catalytique de poids moléculaire élevé et de faible pI avec un repliement tridimensionnel caractéristique en tonneau (β/α)₈. (Figure 20) De nombreuses xylanases 10 possèdent également des CBM qui sont le plus souvent spécifiques au xylane (XBD). (Tableau 8) La xylanase Xyn10C de *Cellvibrio japonicus*, par exemple, présente à son

extrémité N-terminale un XBD appartenant à la famille 15 des CBM (type B) et capable de fixer les xylanes solubles ainsi que les xylo-oligosaccharides (de DP > 4). [122, 168]

En accord avec leur mode d'action *endo*, le site actif des xylanases 10 est logé dans une crevasse longue pouvant accommoder de quatre à sept résidus xylose. [175] La catalyse enzymatique s'opère via un mécanisme avec rétention de la configuration anomérique faisant intervenir deux résidus glutamates. (Tableau 7)

Les endo- β -1,4-xylanases de la famille 10 se distinguent par le caractère versatile de leur catalyse, comparées aux xylanases de la famille 11. En effet, des études de spécificité de substrats ont montré qu'en plus des xylanes, les xylanases 10 sont également actives sur des substrats cellulosiques de faibles masses, notamment des aryl-cellobiosides et certains cellooligosaccharides. [95, 176]

De même, les xylanases 10 sont capables de cliver les liaisons β -1,3 dans le rhodymenan (un β -1,3- β -1,4 xylane) et d'hydrolyser des xylanes et des xylo-oligosaccharides fortement ramifiés. [176, 177]

IV.3. Les endoxylanases de la famille 11

IV.3.1. Propriétés structurales : le domaine catalytique (DC)

La majorité des endoxylanases de la famille 11 sont constituées d'un seul domaine fonctionnel globulaire (le domaine catalytique). Certaines renferment en plus un ou plusieurs CBM reliés par des régions fortement enrichies en acides aminées hydroxylés au domaine catalytique.

Ces enzymes appartiennent au clan C et présentent un repliement tridimensionnel caractéristique en β -*jelly-roll*. La structure de leur domaine catalytique comporte principalement deux feuillets β antiparallèles nommés A et B et une hélice α . Le feuillet A est en moyenne composé de 5 brins β (A2-A6), le brin A1 étant le plus souvent remplacé par une courte boucle. (Exemple, la xylanase TRX II de *Trichoderma reesei*) Les brins β du feuillet B (B1-B9) présentent une torsion d'environs 90°, de sorte que le feuillet B se trouve partiellement replié sur lui-même. Les faces hydrophobes des deux feuillets A et B forment une crevasse catalytique étroite et profonde. (Figure 22) Des boucles relativement courtes (d'environs 5 résidus d'acides aminés) joignent les éléments de structure secondaire entre eux. Néanmoins, deux boucles plus longues, d'environs 10 et 12 résidus respectivement, relient d'une part les brins B6 et B9 et d'autre part les brins B8 et B7.

La configuration tridimensionnelle de l'ensemble a inspiré la comparaison avec une main droite partiellement fermée sur elle-même, où les feuillets 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 entre les brins B6 et B9 est appelée "corde". [178, 179] (Figure 22) Du point de vue de leur structure secondaire, les endoxylanases de la famille 11 présentent un niveau de conservation très élevé. Ainsi, parmi les 26 structures de xylanases 11 connues et déposées dans la PDB (Protein Data Bank), les seules variations notables résident dans la présence ou l'absence du brin B1 à l'extrémité N-ter et la prolongation du brin A4 en C-ter par une courte boucle. [179]

En revanche, les structures primaires de ces enzymes apparaissent plus variées. L'identité de séquences au sein de la famille GH11 peut varier de 40 à 98%. Néanmoins, de nombreux résidus d'acides aminés (environs 30 résidus) importants d'un point de vue fonctionnel sont parfaitement conservés.

Actuellement, on dénombre plus de 400 séquences primaires de xylanases 11 dans la base de données CAZy. D'après une étude de Sapag et *al.*, 2002 portant sur 82 xylanases 11 différentes, les séquences des domaines catalytiques renferment en moyenne 175 à 233 résidus d'acides aminées et présentent une masse moléculaire allant de 19 à 26 kDa. Les plus fortes similarités de séquences sont obtenues pour les brins B5, B6 et B8 ainsi que l'extrémité C-ter de l'hélice α. (Figure 23) L'extrémité N-ter des xylanases 11 est faiblement conservée. Les xylanases XYNI et XYN respectivement de *Trichoderma reesei* et *Bacillus circulans* ne comportent pas de brins B1. De même, la xylanase de *Polypastron multivesiculatum* ne comporte pas de brins B1 et B2, ce qui indique que leur présence ne semble pas requise pour l'activité enzymatique. Une faible homologie de séquence est observée pour les boucles reliant respectivement les brins A3-B3, B3-B5 et B7-A6. La boucle correspondant au "pouce" est, par contre, très conservée et présente une séquence consensus PSIXG, où X pouvant être n'importe quel résidu. L'analyse de la structure primaire révèle également la présence de plusieurs motifs fortement conservés tels que YGWT sur le brin B5, PLXEYY sur le brin B6 et TFQYWSVR sur le brin B7. [177, 180, 181]



Figure 22 : Structure des xylanases GH11

Hélice

B9

A Structure 3D de la xylanase 11 (Tx-Xyl) de *Thermobacillus xylanilyticus*. Les brins β du feuillet A sont indiqués en jaune, ceux du feuillet B en bleu, l'hélice en rouge et les boucles en vert. B Structure secondaire des xylanases GH11. Les brins β sont symbolisés par des flèches nommées A ou B. Le brin B1 n'est pas présent chez toutes les xylanases.

A6

A5

A4

B3

A3

B2

A2

B1

Ν

1				B1	B2	A2	A3	В3	A5	
A. kasehi A. hige: 1	T. xvlanilvticus	1		N	TYWOYWTDGI	GYVNATNGOG	GNYSVSWS	NSGNEVIGK	WOY GAHNRVVNYN AGAWOPNGNA 62	
A. nigge 1	A. kawachi	1		SAGI	NYVQNYNGNL	ADFTYDE-SA	GTFSMYWEDG	VSSDFVVGL	WTT GSS-NAISYS AEYSASGSSS 65	
B. circulans C. based of the second	A. niger	1		SAGI	NYVQNYNGNL	GDFTYDE-SA	GTFSMYWEDG	; VSSDFVVGL <mark>C</mark>	WTT GSS-KAITYS AEYSASGSSS 65	
B. subilis 166 1	B. circulans	1		AST	DYWQNWTDGG	GIVNAVNGSG	GNYSVN <mark>W</mark> S	• NTGNFVVGK	WTT GSPFRTINYN AGVWAPNGNG 64	
 abelis B230 abelis B	B. subtilis 168	1		AST	DYWQNWTDGG	GIVNAVNGSG	GNYSVN <mark>W</mark> S	• NTGNFVVGK	WTT GSPFRTINYN AGVWAPNGNG 64	
 a. stearothermophilum a. theremophilum b. arcsecta in the state of the	B. subtilis B230	1	ATTI	TSNQTGTHDG	YDYELWKDSG	NT-SMTLNSG	GAFSAQ <mark>W</mark> S	• NIGNALFRK	KKFDSTKTHS QLGNISINYN A-TFNPGGNS 80	
C. thermophium 1 APSIERROLL ISSATCHING YYERKOTG MINEYLESG COUNTY ALVORTEN - MUNICARY AGA - TYPENENGEN N. THIVYTG GREAT THIVYTG GREAT AT A DYRENNO - APPRENDE OF TYPENENGEN N. THIVYTG GREAT AT A DYRENNO - APPRENDE OF TYPENENGEN N. THIVYTG GREAT AT A DYRENNO - APPRENDE OF THIVTG AT A DYRENNO - APPRENDE OF THE DYREN A DYRENNO - APPRENDE A DYRENNO	B. stearothermophilus	1		LFGATSSAAT	DYWQYWTDGG	GMVNAVNGPG	GNYSVT <mark>W</mark> Q	• NTGNFVVGK <mark>C</mark>	WTV GSPNRVINYN AGIWEPSGNG 71	
D. thermophilum 1	C. thermophilum	1	APSIEKRQTL	TSSATGIHNG	YYYSFWTDGQ	GNIRFNLESG	GQYSVT <mark>W</mark> S	 GNGNWVGGK 	WNP GIDNRVINYT A-DYRPNGNS 80	
3. Bp.338 1 DTVI TTRGTCING YYSTRIDG GSVENILASC GSVCTARLASC CHCREVARE 1. langinosus 1 DTT TR-SECRED YYSTRIDG GSVCNILASC GSUCCEST	D. thermophilum	1	L	TSNASGTFDG	YYYELWKDTG	NT-TMTVYTQ	GRFSCQ <mark>W</mark> S	· NINNALFRT <mark>C</mark>	KKYNQNWQ SLGTIRITYS A-TYNPNGNS 75	
1. Langinesus 1	S. Sp.S38	1	DTVI	TTNQTGTNNG	YYYSFWTDGG	GSVSMNLASG	GSYGTSWT	 NCGNFVAGK 	WAN GAR-RTVNYS G-SFNPSGNA 73	
1. Electroses 1	T. lanuginosus	1	QTT	PN-SEGWHDG	YYYSWWSDGG	AQATYTNLEG	GTYEISWG	· DGGNLVGGK	WNP GLNARAIHFE G-VYQPNGNS 72	
1. harzianum 1	T. flexuosa	1	DTTI	TQNQTGYDNG	YFYSFWTDAP	GTVSMTLHSG	GSYSTSWR	• NTGNFVAGKC	WST GGR-RTVTYN A-SFNPSGNA 73	
1. recess 1 1	T. harzianum	1	QTI	GP-GTGYSNG	YYYSYWNDGH	AGVTYTNGGG	GSFTVNWS	NSGNFVAGK	WQP GTKNKVINFS G-SYNPNGNS 72	
1. Pessel 2 1. variati 1 2. variati 1 3.	T. reesei 1	1		ASI	NYDQNYQTG-	GQVSYSP-SN	TGFSVNWN	· TQDDFVVGVG	WTT GSS-APINFG GSFSVNSGTG 61	
F. variotil 1	T. reesei 2 D. mariatii	1	VEKRQTI	QP-GTGYNNG	YFYSYWNDGH	GGVTYTNGPG	GQFSVNWS	 NSGNFVGGKC 	WQP GTKNKVINFS G-SYNPNGNS /6	
7. Initialization 1	P. Variotii D. funiculocum	1	GII	PN-SEGWHDG	111SWWSDGG	GDSIIINNSG	GITEIIWG	DCCDETCCK	WND ANACTUTYC C FENDECNA 72	
As Association Association <th< th=""><th>P. Tuniculosum</th><th>T</th><th>B5</th><th>B6</th><th>corde</th><th>B9</th><th>B8</th><th>pouce</th><th>B7</th></th<>	P. Tuniculosum	T	B5	B6	corde	B9	B8	pouce	B7	
T. xylanilyticus 63 VET. RESTON & LEW WAY OR SWIPPIGA TERVISES ANDITHSM YARGENET TO COMPT SENTEND WAY END WAY WAY ANDITHSM YARGENET TO COMPT SENTEND WAY END WAY ANDITHSM YARGENET TO COMPT SETT SETTER WAR 149 A. kawachi 64 VANKEWAY CORSTUPED (DYNNESSA TELEVYSES STUVETTE TERSTON ENTER WAY OR SETTER WAR 149 B. circulans 65 VET. WERTES CLEWWARS WETTERTON TERVISE STUVETTE TARKEN OF THE SETTER TO COMPT CORRECT SETTER WAR 149 B. subtlis 168 55 VET. WERTES CLEWWARS WETERTON TERVISE GIDDITITE VARE TOOR THE OWNE ORFER TOWNE OF THE SAME THE WAR 164 B. subtlis 163 12 VET. WERTEN LIE WAYS SWETERTON THE THE WAS SUDDET ON THE OWNE OF THE SAME THE WAR 165 C. thermophilum 21 VET. WOTEN LIE WAYS SWETERTON THE THE WAYS OF THE THE TOWNE OF THE SAME THE WAR 166 C. thermophilum 16 VALUETEN WAR 1152 WAYS SWETERTON THE THE WAR 166 VALUETEN WAR 166 S. Sp. S38 74 WE THE SWETERON THE THE WAYS SWETER TOWNE WAR 155 VALUETEN WAR 166 T. lanuginosus 73 YALUETEN WAR 1100 WAR 1000 WAR 10000 WAR 10000 WAR 1000 WAR 1000 WAR 1000 WAR 1000 WAR					-				A6 hélice	
A. kwachi 66 YANGOWY DOARDINED YOUNDESSA TELETYYSE STOUTED TREESTERT SETTYTEE STETYSE TO TYNEE STOUTES TYNARENE 151 B. circulans 65 YANGOWY DOARDINED YOUNDESSA TELETYYSE STOUTET TREESTERT SETTYTEE TYNARENE 151 B. circulans 65 YANGOWY DOARDINED YOUNDESSA TELETYYSE STOUTET TREESTERT SETTYTEE TYNARENE 151 B. subtilis 168 65 YANGOWY DOARDINE TRETY YOUNDESSA TELETYYSE STOUTET TREESTERT TETYSE CONSTRUCTION TREESTERT TETTYSE TYNARENE 151 B. subtilis 18230 81 YANGOTRE LITYTIVD WETRET- TYNETYKE GYDITTTE YASKE GYDITTTE YASKE CONSTRUCTION TREESTER AN TITETHANNA 152 C. thermophilum 71 YANGOTRE LITYTIVDE KETRET- TYNETYKE GYDITTTE YASKE CONSTRUCTION TREESTER TETTYTER AND TANDENA 166 D. thermophilum 76 YANGOTRE LITYTIVEY KETRET TYNETYTE GYDIYETTE TYNETYTE OFTOUTET TENESTER TENETYTER TO TYNETYTE TYNETYTE GYDIYETTE AND TANDENA 166 D. thermophilum 76 YANGOTRE LITYTIVEY KETRET TYNETYTE GYDIYETTE TYNETYTE GYDIYETTE AND TYNETYTE TYNETYTE GYDIYETTE AND TYNETYTE TYNETYTE GYDIYETTE AND TYNETYTE TYNETYTE TYNETYTE GYDIYETTE TYNETYTE GYDIYETTE TYNETYTE TYNETYTE TYNETYTE TYNETYTE GYDIYETTE TYNETYTE GYDIYETTE TYNETYTE TYNETYTE TYNETYTE GYDIYETTE TYNETYTE GYDIYETTE TYNETYTE TYNETYTE TYNETYTE TYNETYTE GYDIYETTE TYNETYTE GYDIYETTE TYNETYTE GYDIYETTE TYNETYTE TYNETYTE TYNETYTE TYNETYTE TYNETYTE GYDIYETTE TYNETYTE TYNET	T. xylanilyticus	63	YLTLYGWTRN	PLIEYYVVDS	WGSYRPTG	DYRCSVYSDC	AWYDLYHSWR	YNAPSIDG-T	COTFOOYWSVR OOKRPICSNV SITFENHVNA 149	
A. niger66YANGOWNY VOUNDE ORDEVED YOUNDEDSA TELEVYERSSTUCCTORTWEESTIG-TSETTIGT SETTIGT SETTIGTWINDERSEInterview151B. subtlis 16865YITLYOTESLIENVYUDS WOTRETG TYKTYKESTYKTYKESGTUTYTTE VALUEYANGOTESTYKTYKESGTUTYTTE VALUEYANGOTESTYKTYKESGTUTYTTE YANGOTESGTUTYTES YANGOTESGTUTYTES YANGOTESGTUTYTES YANGOTESGTUTYTES YANGOTESGTUTYTES YANGOTESGTUTYTES YANGOTESGTUTYTES YANGOTESGTUTYTES YANGOTESGTUTYTES YANGOTES <td< th=""><th>A. kawachi</th><th>66</th><th>YLAVYGWVNY</th><th>POAEYYIVED</th><th>YGDYNPCSSA</th><th>TSLGTVYSDG</th><th>STYOVCTDTR</th><th>TNEPSITG-T</th><th>STFTOYFSVR ESTRTSG TVTVANHFNF 151</th></td<>	A. kawachi	66	YLAVYGWVNY	POAEYYIVED	YGDYNPCSSA	TSLGTVYSDG	STYOVCTDTR	TNEPSITG-T	STFTOYFSVR ESTRTSG TVTVANHFNF 151	
B. circulans 65 YTLYGYTES LIPSYVUS WGYTRETG TYK TYKSTEG GTODYTTY YNARS GTODYTTY YNARS THORN TUTTENWAR 362 3000000000000000000000000000000000000	A. niger	66	YLAVYGWVNY	POAEYYIVED	YGDYNPCSSA	TSLGTVYSDG	STYOVCTDTR	TNEPSITG-T	I STFTOYFSVR ESTRTSG TVTVANHFNF 151	
 aubtilis 168 subtilis 168 subtilis 168 subtilis 2230 stearothermophilus yint Kontres aubtilis 223 yint Kontres aubtilis 223 yint Kontres aubtilis 163 stearothermophilus yint Kontres yint Kontres	B. circulans	65	YLTLYGWTRS	PLIEYYVVDS	WGTYRPTG	TYK <mark>C</mark> TVKSDC	GTYDIYTTR	YNAPSIDGDR	R T <mark>TFTQYWSVR</mark> QSK <mark>R</mark> PTGSNA TITFTNHVNA 152	
B. subtilis B230 81 YickWorkD ATTRAVEN WGTYRPTC- TPKTTTWG GTD0 YTETT ISDESTG-1 AFFKYWSW GTRETS TVS95FFKK 164 B. stearoharmophilum 72 YILWGTRN ALTSYWES FGTD95TGA TRASVITC GTD0 YTET GTD0 YTETT SUGSTEG-T SEFYWSW TARTGC TVTMANFNA 158 D. thermophilum 76 YILGTSTRN LUBYWES FGTD95TGA TRASVITC GTD0 YTET VASET C TVTMANF TARTGC TVTMANFNA 156 D. thermophilum 76 YILGTSTRN LUBYWES FGTD95SGA TELEYTTS GTD0 YTET VASET FARMANFNA TARTGC TVTMANFNA 156 T. sagata 74 YILGTSTRN LUBYWES FGTD95SGA TDLCTVCEG STANGART VADSVE-T ALTOVENS OR OPARTS TVTTD1FRA 160 S. Sp. S38 74 YILGTSTRN LUBYWES FGTD95SGA TDLCTVCEG STANGART VADSVE-T ALTOVENS OR OPARTS TVTTD1FFA 158 T. flexuosa 74 YILGTSTRN LUBYWES FGTTP95SGA TDLCTVCEG STANGART VADSVETC TARTVENS OR OPARTS TVTTD1FFA 158 T. reesei 1 62 LUBYWEST ALTOVENS OF TWTTSGA TKLEVTSG SWD1PTG VADSVETC TARTVENS OF NERTSC SWNTANFAA 158 T. reesei 2 77 YEVGOSEN LIEVEN FGTNPSSGS TDLCTVSGC STD1GTGSG STD1GTSGEST VADSVETC TARTVENS OF OPARTS TVTOGCHPA 158 P. functolsum 150 SGAASTRNG SWSYOTATE GYNSSEST TSLOVENCE STD1GTSGEST VADSVETC VADSVETC TARTVENS OF OPARTS TVTOGCHPA 158 P. subilis 168 150 SGAASTWGS WATAVANA GYNTTE GYNSSEST TSLOVENCE STD1GTSGEST VADSVETC TARTVENS OF OPARTS TVTTANFAA B. subtilis 168 150 SGAASTWGS ANT CV	B. subtilis 168	65	YLTLYGWTRS	PLIEYYVVDS	WGTYRPTG	TYK <mark>G</mark> TVKSDG	GTYDIYTTR	YNAPSIDGDR	R T TFTQ YW <mark>SVR</mark> QSK <mark>R</mark> PT <mark>G</mark> SNA TITFSNHVNA 152	
B. stearothermophilus72YITLKGGTRN BLLEGYUVDS WGTYRPTG NYKTWASE GTD01YTTMG YAASIDG-T CTCCCMWV OKRETESNV SITESNUNA 158C. thermophilum72YITLKGGTRN BLLEGYUVDS WGTYRPTG NYKTWASE GTD01YTTMG YAASIDG-T CTCCCMWV OKRETESNV SITESNUNA 158C. thermophilum76YICLKGGTRN BLUGYUVDS WGTYRPTG TYKTVINSE GTD01YTTM YAQSIDG-T STFYCWVV TAKTGG STFACMENA 160S. Sp.S374YITLKGGTRN BLUGYUVDS WGTYRPTG TYKTVINSE GTD01YTTM YAQSIDG-T KTANDYMVV OKRETESNV SITESNUNA 160J. lanuginosus73YIAAYGGTRN BLUGYUVDS WGTYRPTG TYKTVTDG GTD01YTTM YAQSIDG-T KTANDYMVV OKRETES TVTTVPHENA 160T. fersusa74YITLKGTRN BLUGYUVDS WGTYRPTGTYKTVTDG GTD01YETW YAASIDG-T ATFYCWVV OKRETES TVTVQNEPA 157T. harzianum73YISLYGGKRN BLUGYUTUP FGTYNPTGA TKLEEVTSGC SVD01YTTC VADSIDG-T ATFYCWVV RAMESS SVNTAMENA 158T. reesei 162LUSYUTUP FGTNPSTGA TKLEEVTSGC SVD01YTC VADSIDG-T ATFYCWVV RAMESS SVNTAMENA 158P. variotii73YISLYGKGRN BLUGYUTUP FGSNPSSCS TDLCTVSCG GTD01YSTG VADSIDG-T ATFYCWVV RAMESS TVTVQNHENA 162P. variotii73YISLYGKGRN BLUGYUTUP FGSNPSSCS TDLCTVSCG GTD01YSTG VADSIDG-T ATFYCWVV RAMESS TVTTAMENA 158F. xylanilyticus150GAAMEMNC GYSSSSTN TW184AdA. niger152AACHERNC GYSSSSTN TWW185Subtilis 168153KSHENMLG SWAYQVATG GYSSSSTN TWW185Subtilis 168153KSHENMLG SWAYQVATG GYSSSSTN TWW	B. subtilis B230	81	YLCVYGWTKD	PLTEYYIVDN	WGTYRPTG	TPK <mark>G</mark> TFTV DG	GTYDIYETTR	INQPSIIG-I	I A <mark>TF</mark> K <mark>Q</mark> YW <mark>SVR</mark> QTK <mark>R</mark> TS <mark>G</mark> TVSVSE <mark>H</mark> FKK 164	
C. thermophilum 61 YEANGUTER ELEVISIVES FOTDPSTGA TRESTITES GIDNIYRGE VARETE-T SERVEYNEW TAKETG TVITMANETNA 166 D. thermophilum 76 YECIEGEST ELVESTES WONTPEGA TSLOPTING GIDDIYGITE VARETWEET SERVEYNEW TAKETGS TVITTEFAA 160 S. Sp. S38 74 YEILKENTA ELVESTED WONTPEGA TSLOPTING GIDDIYGITE VARETWEET SERVEYNEW TAKETGS TVITTEFAA 160 S. Sp. S38 74 YEILKENTA ELVESTED WONTPEGA TSLOPTING GIDDIYGITE VARETWEET STREAT WORT AND TAKETGS TVITTEFAA 160 S. Sp. S38 74 YEILKENTA ELVESTENDE GIDDIYGITE VARETWEET VARETWEET STREAT TREATING VARET VAR	B. stearothermophilus	72	Y <mark>LTLYGW</mark> TRN	ALIEYYVVDS	WGTYRPTG	NYK <mark>G</mark> TVNSDG	GTYDIYTTMR	YNAPSIDG-T	I Q <mark>TFQQ</mark> FW <mark>SVR</mark> QSK <mark>R</mark> PT <mark>G</mark> SNV SITFSN <mark>H</mark> VNA 158	
D. thermophilum 76 YUCHGWSTN LUPERUSE MCNNRPEGA-TSLEDVIEG GTDDIVRTT VGOGTVG-T AGDOWGWG KISK TVTVTDERA 160 S. Sp. 538 74 YUTLGGTARN LUPERUVEN WOTKPEGA-TSLEDVIEG GTDDIVRTT VGASUG-T KINGVGWSG GKTGG STATANNEPA 157 T. lanuginosus 73 YUANGGTRN LUPERUVEN FGTYDPSGA TDLETVECD SINRLGKTT VGASUG-T KINGVGWSG QKRTSG TTTIGNNEPDA 158 T. faexuosa 74 YUTLGGTARN LUPERUVEN FGTYDPSGA TRLEVTUTG GTDDIVERW YGASETG-T AGGOWGYG QKRTSG TUTVORGHPJA 158 T. harzianum 73 YGSTGGTRN LUPERUVEN FGTYDPSGA TRLEVTTOG GTDDIVERW YGASETG-T AGGOWGYG WORSTG TUTVONEPNA 158 T. reesei 1 62 LUSVGGSTN LUPERUFFGA TRLEVTTOG GNDIVERW YGWSGR RNRSGS STATUNANEPNA 158 T. reesei 2 77 YUSVGGSTN LUPERUFFGA TRLEVTTOG SVDIPTRT VGASUTSW SVR SVR SVR SSG STATUNANEPNA 158 P. variotii 73 YUSVGGTRN LUPERUFFN FGTNPSGA TRLEVTTSG AUTTWENT VGESEG-T AGGOWGYG SVR SVR SVR SVR SSG TUTORNENA 162 P. variotii 73 YUSVGGTRN LUPERUFFGA TRLEVTSGA GUDIYSTG VGOSTGT- AGGO VGASUTSW TUTORGCHPA 158 P. funiculosum 73 YUSVGGTRN LUPERUFFGA TRLEVTSGA GUDIYSTG VGAST SVR SVR SVR SVR SVR SVR STATANEPNA 162 P. variotii 73 YUSVGGTRN LUPERUFFGA TRLEVTSGA GUDIYSTG VGOSTGATG VGAST SVR SVR SVR SVR SVR TVNANEPNA 162 P. funiculosum 74 YUSVGGTRN LUPERUFFGA TRLEVTSGA GUDIYSTG VGOSTGA TANSKI SVR SVR SVR TVNANEPNA 158 F. subtilis 168 153 GGAAGVGTAG GYSSSSSS TUW 185 B. subtilis 168 153 GKSHMILGS NMAYYWAT GYSSSSSS TVW 185 B. subtilis 168 153 KSHMINGS NMAYYWAT GYSSSSSS TVW 185 B. subtilis 168 159 KSKSMLGS SWAYUAT GYSSSSSSS TVW 185 B. subtilis 168 159 KSKSMLGS SWAYUAT GYSSSSSSS TVW 185 B. subtilis 168 159 KSKSMLGS SWAYUAT GYSSSSSSSS TVW 185 B. subtilis 168 159 KSKSMLGS SWAYUAT GYSSSSSSSSST VW	C. thermophilum	81	YLAVYGWTRN	PLIEYYVVES	FGTYDPSTGA	TRM <mark>G</mark> SVTT DG	GTYNIYRSQR	VNAPSIEG-I	f s <mark>tfyq</mark> yw <mark>svr</mark> tak <mark>r</mark> tg <mark>g</mark> tvtman <mark>h</mark> fna 166	
 Sp. 538 74 YTT FGGTAN LUMPYLIVEN GGTKPTG TYRETYSEG GTBOVYOTT VANASVEG-T KFENGYMSVG OSKETGS STATAGEDA 157 Ianuginosus 74 YTT FGGTAN LUMPYLIVEN GGTKPTG TYRETYSEG GTBOVYOTT VANASVEGTG T GFDGYMSVG OSKETGS TVOTGCEPAD 158 flexuosa 74 YTT FGGTAN LUMPYLIVEN FGTYNPSSGA TDLCTVECG SIRELGKTT VANASTEG-T GFDGYMSVG OKKETSS TVOTGCEPAD 157 T. harzianum 73 YESIYGGKEN LLEYYIVEN FGTYNPSTGA TKLEEVISIG SVGDTRTG VANASTEG-T AFFYGYMSVG OKKETSS TVTTGNFPA 156 T. reessi 1 GLUSYGKSKN LLEYYIVEN FGTYNPSTGA TKLEEVISIG SVGDTRTG VANASTEG-T AFFYGYMSVG RNHBSSS SVNTAMFPA 162 P. variotii 73 YESIYGGKEN LLEYYIVEN FGTYNPSTGA TKLEEVISIG SVGDTRTG VANASTEG-T OFFNGYMSVG RNHBSSS SVNTAMFPA 162 P. variotii 73 YESIYGGKEN LLEYYIVEN FGSNPSSGE TDLEVISOG SVGDTRTG VANASTEG-T OFFNGYMSVG RNHBSSS SVNTAMFPA 162 P. funiculosum 73 YESIYGGKEN SLUPYTUEN FGSNPSSGE TDLEVISOG STULGOSTR YAASTEG-T OFFNGYMSVG RNHBSSS SVNTAMFPA 162 P. funiculosum 73 YESIYGGKEN SWSYQVLATE GYSSSSNV TVW 182 A kawachi 152 AGAFFCN-S DFNYQMAWA AWSGASSAS TISS 184 B. circulans 153 KKHOMLGS NWAYQVANE GYSSSSNV TVW 185 B. subtilis 168 153 KKHOMLGS NWAYQVANE GYSSSSNV TWW 185 B. subtilis 168 153 KKHOMLGS NWAYQVANE GYSSSSNV TWW 185 B. subtilis 168 153 KKHOMLGS NWAYQVANE GYSSSSNV TWW 185 B. subtilis 168 153 KKHOMLGS NWAYQVANE GYSSSSNV TWW 185 B. subtilis 168 153 KKHOMLGS NWAYQVANE GYSSSSATV NYGSGSS 199 C. thermophilum 161 ANRELNL-G TIDQITLCY GYSSSATV TANVLT 194 Figure 23 : Alignement de séquences de xylanases 11¹ de structure connue. Les surlignements en noir indiquent des zones conservées à 100%, ceux en gris des zones conservées de transphilus for SNST TVS 190 T. reessi 1 146 ASLELL-G MMYQUAR GYSSSST TVS	D. thermophilum	76	Y <mark>L</mark> CIYGWSTN	PLVEFYIVES	WGNWRPPGA-	TSL <mark>G</mark> QVTI DG	GTYDIYRTTR	VNQPSIVG-I	I A <mark>tf</mark> d <mark>q</mark> yw <mark>svr</mark> isk <mark>r</mark> ts <mark>g</mark> tvtvtd <mark>h</mark> fra 160	
 T. lanuginosus 73 YANYGYTEN LUEYUTEN FGTYDPSSGA TOLETYCCTG SIRLGKTTR VMASSIDG-T CHDCYMSVR OPKTSG TVTTGGTOGFDA 158 T. flaxuosa 74 YTTLGGTEN LUEYUTEN FGTYNPSTGA TKLGEVTSGG SIRLGKTTR VMASSIDG-T CHDCYMSVR OPKTSG TVTTGGTOGFDA 157 T. harzianum 73 YESTYGNEN LLFYTIVEN GTYNPSTGA TKLGEVTSGG SVDTYTTG VMOESITG-T ANDYOWSVR RNHESSC TVTTONGFNA 158 T. reessi 1 62 LSVYGNEN LLFYTIVEN FGTYNPSTGA TKLGEVTSGG STTTGENT VMASSIDG-T ANDYOWSVR RNHESSC SVNTANFNA 162 P. variotii 73 YESYGNEN LLFYTIVEN FGTYNPSTGA TKLGEVTSGG STTLGGSTE YMASSIDG-T OTAN WSVR OPKSSG TVTTONFNA 145 P. variotii 73 YESYGNEN LLFYTIVEN FGTYNPSTGA TKLGEVTSGG STTLGGSTE YMASSIDG-T OTAN WSVR OPKSSG SVNTANFNA 162 P. variotii 150 GGAAMEMGS SWSYOLATE GYTSSGYNV TW 184 B. circulans 152 MAGHEGN-S DENYOWAVE ANGGASASY TISS 184 B. subtilis 168 153 MKSHMNLGS NWAYOWATE GYGSSGSNV TW 185 B. subtilis 168 153 MKSHMNLGS NWAYOWATE GYGSSGSNV TW 185 B. subtilis 168 153 MKSHMNLGS NWAYOWATE GYGSSGSNV TW 191 T. thermophilum 167 MARGLQL-G THDYQIVATE GYSSGSNV TW 191 T. thermophilum 167 MARGLQL-G THDYQIVATE GYSSGSANI TONTFFGGS 199 S. Sp.S38 158 MARGMIGS MAYOWATE GYSSGSANI TWN 194 Filexuosa 159 MARGMING HYYGYNATE GYSSGSANI TONTFFGGS 199 C. thermophilum 161 MARGLNL-G TIDQTITCY GYGSGSANI TONTFFGGS 199 S. Sp.S38 158 MARGMINGS HO-YOMATE GYSSGSANI TONTFFGGS 199 Lanuginosus 159 MARGMING HYYGYNATE GYSSGSANI TONTFFGGS 199 Lanuginosus 159 MARGMING HYYGYNATE GYSSGSANI TONTFFGGS 199 Lanuginosus 159 MARGMING HYYGYNATE GYSSGSANI TONTFFGGS 199 T. reessi 1 146 MASLLH-G TMDYGVAYE GYSSGSANI TSS 194 T. reessi 1 146 MASLLH-G MNYGVAYE GYSSGSANI TSS 194 T. reessi 1 146 MASLLH-G MNYGVAYE GYSSGSANI TSS 194 T. reessi 1 146 MASLLH-G MNYGVAYE GYSSGSANI TSS 194 T. reessi 1 146 MASLLH-G MNYGVAYE GYSSGSANI TSS 194 <l< th=""><th>S. Sp.S38</th><th>74</th><th>Y<mark>LTLYGW</mark>TAN</th><th>PLVEYYIVDN</th><th>WGTYRPTG</th><th>TYK<mark>G</mark>TVTSDG</th><th>GTYDVYQTTR</th><th>VNAPSVEG-I</th><th>i k<mark>tenq</mark>yw<mark>svr</mark> qsk<mark>r</mark>tg<mark>g</mark> sitagn<mark>h</mark>fda 157</th></l<>	S. Sp.S38	74	Y <mark>LTLYGW</mark> TAN	PLVEYYIVDN	WGTYRPTG	TYK <mark>G</mark> TVTS DG	GTYDVYQTTR	VNAPSVEG-I	i k <mark>tenq</mark> yw <mark>svr</mark> qsk <mark>r</mark> tg <mark>g</mark> sitagn <mark>h</mark> fda 157	
 T. flaxuosa 74 YUTIYGATAN LUVEVIVUES WGTYRPTG- TYKATVTTG GTDDIYETM YAASDEG-T REGORMAVE QCRETSG TUTIGMEDA 157 T. neesei 1 62 LUSVYGNSTN LUVEVIYUEN GTYRPTG-A TKLEVTSG SYDDIYKTG VNOSSIEG-T ANTYWYF RNESSG SVNTAMENA 158 T. reesei 2 77 YESYYGNSTN LUVEVITUES GSNPSSG TULEVTSG SYDDIYKTG VNOSSIEG-T ANTYWYF RNESSG SVNTAMENA 162 P. variotii 73 YESYYGNSTN LUVEVIUES YGTYNPSTGA TKLEVTSG SYDDIYKTG VNOSSIEG-T ANTYWYF RNESSG SVNTAMENA 162 P. variotii 73 YESYYGNSTN LUVEVIUES YGTYNPSTGA TKLEVTSG SYDDIYKTG VNOSSIEG-T ANTYWF ROKSSG TVTVQNHENA 145 P. funiculosum 73 YEAYGWTTD LUVEVILES YGTYNPSTGA TKLEVTSG GTDIYSTG VNOSSIEG-T SUNAWEW RNERSSG TVTTAMENA 158 M. Kawachi 150 GGARMEMGS SNSYQULAT GYSSGST UTV 184 A. niger 152 AQHEFGN-S DFNYQWAVA ANSGASASV TISS 184 B. subtilis 153 KKSEMILGS NNAVQWATG GYSSGSSNU TW 185 B. subtilis 153 KKSEMILGS NNAVQWATG GYSSGSSNU TW 184 B. subtilis 165 153 KKSEMILGS NNAVQWATG GYSSGSNU TW 191 B. subtilis 153 KKSEMILGS NNAVQVATG GYSSGSNU TW 191 B. subtilis 165 153 KKSEMILGS NNAVQVATG GYSSGSNU TW 191 B. subtilis 153 KKSEMILGS NNAVQVATG GYSSGSNU TW 191 B. subtilis 165 153 KKSEMILGS NNAVQVATG GYSSGSNU TW 191 B. subtilis 165 153 KKSEMILGS NNAVQVATG GYSSGSNU TW 191 B. subtilis 165 153 KKSEMILGS NNAVQVATG GYSSGSNU TW 191 B. subtilis 164 164 ANFELL-G TIDQITUCG GYSSGSSNU TW 191 B. subtilis 165 165 ANFELL-G TIDQITUCG GYSSGSST NVTG 191 B. subtilis 165 165 ANFELL-G TIDQITUCG GYSSGSNU TW 191 B. stearothermophilum 161 ANFELL-G TIDQITUCG GYSSGSNU TW 194 J. lanuginosus 159 ARAEMILGS HD-YQIATG GYSSGSST TVS 194 J. lanuginosus 159 ARAEMILGS HD-YQIATG GYSSGSST TVS 194 J. faruginosus 159 ARAEMILGS HD-YQIATG GYSSGSASI TVS 194 T. reesei 1 164 ARSULL-G TIDQITUCG GYSSGSAST TV	T. lanuginosus	73	Y <mark>lavygw</mark> trn	PLVEYYIVEN	FGTYDPSSGA	TDL <mark>G</mark> TVEC DG	SIYRLGKTTR	VNAPSIDG-T	I Q <mark>TF</mark> D <mark>Q</mark> YW <mark>SVR</mark> QDK <mark>R</mark> TS <mark>G</mark> TVQTGC <mark>H</mark> FDA 158	
T. harzianum73YBSIRGSRNPLIPYHIVENFGTVNPSTGATKLEVISIGSVROTHERGWEEBSIR-TTHEYOWSVRRNHRSSESVNTAMENA145T. reesei 162LLBYKIVENFGTVNPSTGATKLEVISIGSVROTHERTWEEBSIG-TATHYOWSVRRNHRSSESVNTAMENA145T. reesei 277YBSVGWSTNBLUBYKIVENFGSNPSSGSTDLTVSCRSVROTHERTWEEBSIG-TATHYOWSVRRNHRSSESVNTAMENA162P. variotii73YBSVGWTNBLUBYKIVENFGSNPSSGSTDLTVSCRSTRIGGSTYARSIDE-TCTNOWSVRODKSSESVNTAMENA162P. variotii73YBSVGWTNBLUBYKIVENFGSNPSSGSTDLTVSCRSTRIGGSTYARSIDE-TCTNOWSVRODKSSESVNTAMENA162P. variotii73YBSVGWTNBLUBYKIVENFGSNPSSGSTDLTVSCRSTRIGGSTYARSIDE-TTHEKSVCRSVNTAMENA162P. variotii150GARAGNPMCSSWSYOVIATGYSSTSNVTW182A. kawachi152NAQHFGN-SDFNYQMAYAAWSGASASV TISS184A. niger153KSHEMNLGSNWAYQVIATGYSSTSSNVTW185B. subtilis 168153KSHEMNLGS NWAYQVIATGYSSTSSNVTNUT185B. subtilis 168153KSHEMNLGS NWAYQVIATGYSSTSSNVTNUTD. thermophilum167RQACLQL-GTHQUINTAGGYSSTSSNI TNUT	T. flexuosa	74	YLTLYGWTRN	PLVEYYIVES	WGTYRPTG	TYK <mark>G</mark> TVTT D G	GTYDIYETWR	YNAPSIEG-T	f r <mark>tfqq</mark> fw <mark>svr</mark> qqk <mark>r</mark> ts <mark>g</mark> titign <mark>h</mark> fda 157	
T. reesei 1 62 LESYMEMED NHMYP-AQC TKREVISEC ATTITEENT VERESCORT AND/YIEVE NSPECTSCORT NY AN	T. harzianum	73	YLSIYGWSRN	PLIEYYIVEN	FGTYNPSTGA	TKLGEVTSDG	SVYDIYRTQR	VNQPSIIG-T	I ATFYQYW <mark>SVR</mark> RNH <mark>R</mark> SS <mark>G</mark> SVNTANHFNA 158	
 T. reesei 2 77 YUSYYGARSR JLIDYHIVER FGSNPSSG TLLEVSIG SYNDIYRTCR VNOESTIG-T APRYTYNSYR RAPHESSG SWNTANHEN 162 P. funiculosum 73 YUAYYGARTR JLIDYHIVER FGSNPSSG TDLEVSIG STMITAGOSTR YNAESIGG-T GUNNYWSYR ODRSSG TVTTANHFAA 158 hélice B4 A4 T. xylanilyticus 150 MGAAGMPMGS SWSYQVIATE GYSSYSN TVW 184 A. kawachi 152 MAQHEFGN-S DENYQVMAVE ANSGAGSASY TISS 184 B. subtilis 168 153 MKSHCMMLGS NWAYQVAATE GYSSGSSNV TWW 185 B. subtilis B230 165 WESLGMPM-G KMYETALTVE GYSSGSSNV TWW	T. reesei 1	62	LLSVYGWSTN	PLVEYYIMED	NHNYPAQG	TVKGTVTSDG	ATYTIWENT	VNEPSIQG-T	I ATENQYISVR NSPRISG TVIVQNHFNA 145	
 P. variotii 73 Yusvitemine Elvervatives Personal Statistics in the construction of the product of the	T. reesei 2	77	YLSVYGWSRN	PLIEYYIVEN	FGTYNPSTGA	TKLGEVTSDG	SVYDIYRTQR	VNQPSIIG-T	I ATEYQYWSVR RNHRSSG SVNTANHFNA 162	
 P. funiculosum 73 YMAXYANTID LLONYMILLS YGTYNPSSEL TSLEOVTSUG GINDLYSTOR VADUATE CT SMAXYMEXX TERRVCG TVTTANETAA 158 hélice B4 A4 T. xylanilyticus 150 MGAAGMPMGS SWSYQULATE GYYSSYSNV TWW 182 A. kawachi 152 MAQHEFGN-S DFNYQWAAVE AWSGACSASV TISS 184 B. circulans 153 MKSHEMNLGS NWAYQWAATE GYQSSGSNV TWW 185 B. subtilis 168 153 WKSHEMNLGS NWAYQWAATE GYQSSGSNV TWW 191 B. stearothermophilus 159 WASKEMNLGS SWAYQULATE GYQSSGSNV TWW 191 C. thermophilum 167 WAQACLCL-G THDYQIVATE GYQSSGSNV TWW 191 D. thermophilum 161 WANGCLL-G THDYQIVATE GYQSSGSNV TWWGSATGG 205 D. thermophilum 161 WANGCLL-G THDYQIVATE GYQSSGSNV TWWGSATGG 205 S. Sp.S38 158 WARYGMPLGS FNYYMIMATE GYQSSGSSNV SSS SS 199 S. Sp.S38 158 WARYGMPLGS FNYYMIMATE GYQSSGSSNV SSS SS 199 T. lanuginosus 159 WARACMNNG DHYYQIVATE GYSSGSANI TONTFSQGSS 199 T. flexuosa 158 WARACMNNG HD-YQIWATE GYSSGSST VSIEGGMEN 196 T. harzianum 159 WARACLHL-G QMNYQVAYE GYSSGSST SSS SSI SSS 194 T. reesei 1 146 WASLCHL-G MMYQTAYE GYFSSGASI TVS 194 F. reesei 2 163 WAQQELTL-G TMDYQIVAYE GYFSSGASI TVS 194 F. varitii 159 WASACLWYG DHYYQIVATE GYFSSGASI TVS 194 	P. variotii	73	YLSVYGWTRN	PLVEYYIVEN	FGSSNPSSGS	TDLGTVSCDG	STYTLGQSTR	YNAPSIDG-T	I QTENQYWSVR QDKRSSG TVQTGCHFDA 158	
héliceB4A4T. xylanilyticus150MGAAGMPMGSSWSYQVLATBGYYSSYSNVTVW182A. kawachi152MAQHEFEN-SDFNYQVMAVBAWSGASSASVTISS184A. niger152MAQHEFEN-SDFNYQVMAVBAWSGASSASVTISS184B. circulans153MKSHEMNLGSNWAYQVMATBGYQSSSSNVTVW185B. subtilis168153MKSHEMNLGSSWAYQVLATBGYQSSSSNVTVW185B. subtilis163MSSHEMNLGSSWAYQVLATBGYQSSSSNVTVW185B. subtilis163MSSHEMNLGSSWAYQVLATBGYQSSSSNVTVW199B. stearothermophilus167MROALL-GTIDQITLCVBGYQSSSSNVTVW190C. thermophilum161MARGENL-GTIDQITLCVBGYQSSSSSNVTVW190S. Sp. S38158MARYEMPLGSFNYYMMATBGYQSSSSSTVSISSEGRNFGN190T. flexuosa159MARAGMLGSHDYQIVATBGYSSSSSTVSISSEGRNFGN190T. reesei 1164MASLELHL-GTMDYQIVATBGYFSSSSASITVS190T. reesei 2163MAQCLLL-GTMDYQIVATBGYFSSSSASISS190T. reesei 1164MASLELHL-GTMDYQIVATBGYFSSSSASITVS194T. reesei 1164MASLELHL-GTMDYQIVATBGYFSSSYASI190T. reesei 1164MASLELHL-GGMNYQV	P. funiculosum	13	YII AVYGWITD	PLVDYYILES	IGIINPSSGL	TSLEQVISDE	GINDIYSIQB	VNQPSIEG-1	T STENQYWSVR TEKRVGG IVITANEFAA 158	
T. xylanilyticus150MGAAGMPMGSSWSYQVIATEGYYSSEYSNVTVW182A. kawachi152MQHEFEN-SDFNYQVMAVDAWSGAESASVTISS184A. niger152MQHEFEN-SDFNYQVMAVDAWSGAESASVTISS184B. circulans153MSHEMNLGSNWAYQVMATDGYQSSESSNVTVW185B. subtilis163MSHEMNLGSNWAYQVMATDGYQSSESSNVTVW185B. subtilis153MSHEMNLGSNWAYQVMATDGYQSSESSNVTVW185B. subtilis159MRSKEMNLGSSWAYQVLATDGYQSSESSNVTVW191B. stearothermophilum161MARGLNL-GTIDQITLCVDGYQSSESSNVTVW191D. thermophilum161MARGLNL-GTIDQITLCVDGYQSSESSNVSSN190S. Sp. S38158MARYCMPLGSFNYYMIMATDGYQSSESSNVSSN190T. flexuosa159MARACMNLGSHDYQIVATDGYSSESSNVSSSNV196T. reesei 1146MASLCHL-GTMDYQIVAVDGYFSSESASITVS190T. reesei 2163RAQOELL-GGMNYQVAVDGYFSSESASISSSSSN194T. reesei 1159MASACLNUTGGYFSSESASITVS194TX-Xyl sont indiqués au-dessus de l'alignement, lesbrins β sont symbolisés par des flèches.159MASACLNUTGGYFSSEYARITVADVG194			hélice	B4	A4					
A. kawachi152AQHGFGN-SDFNYQVMAVBAWSGACSASVTISS184A. niger152NAQHGFGN-SDFNYQVMAVBAWSGACSASVTISS184B. circulans153WKSHGMNLGSNWAYQVMATBGYQSSGSSNVTVW185B. subtilis168153MKSHGMNLGSNWAYQVMATBGYQSSGSSNVTVW185B. subtilisB230165MSKGMNLGSSWAYQVLATBGYQSSGSSNVTVW191C. thermophilus159MRSKGMNLGSSWAYQVLATBGYQSSGSSNVTVW191C. thermophilum161MANGLAL-GTHOUTILCVEGYQSSGSSNVTVW191S. Sp. S38158NARGMLGSFNYMIMATBGYQSSGSSNVTVW191T. flexuosa159MARGLIL-GTHOUTILCVEGYQSSGSSNVTVW190T. reesei 1146MASLCLLL-GTMOYQIVAVBGYGSSGSSNVSISEGGNPGN196T. reesei 2163MAQGLIL-GTMOYQIVAVBGYFSSGSASITVS194T. reesei 1159MASHCLTL-GTMOYQIVAVBGYFSSGSASITVS190T. reesei 2163MAQGLIL-GTMOYQIVAVBGYFSSGSASITVS194T. reesei 1163MAQGLIL-GTMOYQIVAVBGYFSSGSASITVS194T. reesei 1163MAQGLIL-GTMOYQIVAVBGYFSSGSASITVS194T. reesei 2163MAQGLIL-GTMOYQIVAVBGYFSSGSAS	T. xylanilyticus	150	WGAAGMPMGS	SWSYQVLAT	GYYSS <mark>G</mark> YSNV	TVW	182			
A. niger152MAQHGFGN-SDFNYQVMAVEAWSGACSASVTISS184B. circulans153WKSHGMLGSNWAYQVMATEGYQSSCSSNVTVW185B. subtilis163MKSHGMLGSNWAYQVMATEGYQSSCSSNVTVW185B. subtilisB230165WESLGMPM-GKMYETALTVEGYQSSCSSNVTWW199B. stearothermophilus159WRSKGMLGSSWAYQVATEGYQSSCSSNVTWW191C. thermophilum161WANGLNL-GTHDUTLCVEGYQSSCSSNVTVW191S. Sp. S38158WARYGMPLGSFNYMIMATEGYQSSCSSSISVS190T. lanuginosus159WARACLNVNGDHYQUVAVEGYSSCSSTVSISEGGNPGN196T. harzianum159WASHCLTL-GTHDYQUVAVEGYGSSCSSISVS190T. reesei 1163MAQQCLL-GTHDYQUVAVEGYGSSCSSISVS190T. reesei 2163MAQQCLL-GTHDYQUVAVEGYGSSCSSISVS190T. reesei 2163MAQQCLL-GTHDYQUVAVEGYGSSCSSITVS190T. reesei 2163MAQQCLL-GTHDYQUVAVEGYFSSCSASITVS190T. reesei 1163MAQQCLL-GTHDYQUVAVEGYFSSCSASI175190T. reesei 2163MAQQCLL-GTHDYQUVAVEGYFSSCSASITVS194T. reesei 2163MAQQCLL-GTHDYQUVAVEGYFSSCSASI<	A. kawachi	152	WAQH <mark>G</mark> FGN-S	DFNYQVMAV	AWSGA <mark>G</mark> SASV	TISS	184			
B. circulans153WKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTVW185B. subtilis163MKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTVW185B. subtilisB230165WESLGMPM-GKMYETALTVEGYQSSGSSNVTVW185B. subtilisB230165WESLGMPM-GKMYETALTVEGYQSSGSSNVTVW185B. stearothermophilus167WRSKGMNLGSSWAYQVLATEGYQSSGSSNVTVW191C. thermophilum161WARACLNL-GTIDQITLCVEGYQSSGSSNVTVW191D. thermophilum161WARACLNL-GTIDQITLCVEGYQSSGSSSISVS190S. Sp. S38158WARYGMPLGSFNYMIMATEGYQSSGSSTVSISEGGNPGN196T. lanuginosus159WARACLNVIGDHYQIVATEGYFSSGSASITVS190T. flexuosa158WARAGMNLGSHD-YQIMATEGYGSSGSSTVSISEGGNPGN196T. reesei 1164WASHELTL-GGMNYQVAVEGYFSSGSASITVS190T. reesei 2163WAQOLTL-GTMDYQIVAVEGYFSSGSASITVS194T. reesei 2163WAQOLTL-GTMDYQIVAVEGYFSSGSASITVS194T. reesei 2163WAQOLTL-GTMDYQIVAVEGYFSSGSASITVS194T. reesei 2163WAQOLTL-GTMDYQIVAVEGYFSSGSASITVS194T. reesei 1164WAQOLTL-GTMDYQIV	A. niger	152	WAQH <mark>G</mark> FGN-S	DFNYQVMAVE	AWSGA <mark>G</mark> SASV	TISS	184			
B. subtilis 168153WKSHEMNLGSNWAYQVMATEGYQSSESSNVTVW185B. subtilis B230165WESLEMPM-GKMYETALTVEGYQSNESANVTANULT199B. stearothermophilus159WRSKEMNLGSSWAYQVLATEGYQSNESANVTANULT199C. thermophilum167WRQACLQL-GTHDYQIVATEGYYSSESANVTNW191C. thermophilum167WRQACLQL-GTHDYQIVATEGYYSSESANVTOWTFSQGSS199S. Sp.S38158WARYCMPLGSFNYMIMATEGYQSSESSISSVS190T. flexuosa159WARACLNVNGDHYYQIVATEGYSSESASITVS190T. reesei 1166WARACMNLGSHD-YQIMATEGYSSESASITVS190T. reesei 2163WAQOCLTL-GTMDYQIVAVEGYFSSESASITVS190T. reesei 2163WAQOCLTL-GTMDYQIVAVEGYFSSESASITVS194T. reesei 2163WAQOCLTL-GTMDYQIVAVEGYFSSESASITVS194T. reesei 2163WAQOCLTL-GTMDYQIVAVEGYFSSESASITVS194T. reesei 2163WAQOCLTL-GTMDYQIVAVEGYFSSESASITVS194T. reesei 1163WAQOCLTL-GTMDYQIVAVEGYFSSESASITVS194T. reesei 2163WAQOCLTL-GTMDYQIVAVEGYFSSESASITVS194T. reesei 2163WAQOCLTL-GTMDYQIVAVEGYFS	B. circulans	153	WKSH <mark>G</mark> MNLGS	NWAYQVMAT	GYQSS <mark>G</mark> SSNV	TVW	185			
B. subtilis B230165WESLEMPM-GKMYETALTVEGYQSNESANVTANVLT199B. stearothermophilus159WRSKEMNLGSSWAYQULATEGYQSSERSNVTWW191C. thermophilum167WRQACLQL-GTHDQITLCVEGYQSSESANUTOWTFSQGSS199D. thermophilum161WANRCLNL-GTIDQITLCVEGYQSSESSINTOWTFSQGSS199S. Sp. S38158WARACLNUNGDHYYQIVATEGYPSSESSINSVS190T. flexuosa159WARACLNUGDHYYQIVATEGYPSSESSINSUSSESSINSUS190T. flexuosa159WARACLNL-GTHOMYQVAVEGYPSSESSINSUS190T. reesei 1146WASLELHL-GOMNYQVAVEGYFSSESASITVS190T. reesei 2163WAQQELTL-GTMDYQIVAVEGYFSSESSINTVS194T. reasei 1163WAQQELTL-GTMDYQIVAVEGYFSSESSINTVS194T. reasei 2163WAQQELTL-GTMDYQIVAVEGYFSSESSINTVS194T. reasei 2163WAQQELTL-GTMDYQIVAVEGYFSSESSINTVS194T. reasei 1159WASLELHL-GOMNYQIVAVEGYFSSESSINTVS194T. reasei 2163WAQQELTL-GTMDYQIVAVEGYFSSESSINTVS194T. reasei 2163WAQQELTL-GTMDYQIVAVEGYFSSESSINTVS194T. reasei 1159WASACLNUTGGYFSSESS	B. subtilis 168	153	WKSH <mark>G</mark> MNLGS	NWAYQVMAT	GYQSS <mark>G</mark> SSNV	TVW	185	Figuro 23	• Alignament de séguences de vylanases	
B. stearothermophilus159WRSK@MNLGSSWAYQULATEGYQSS@RSNVTWW191C. thermophilum167WRQACLQL-GTHDYQIVATEGYQSS@RSNVTWW191D. thermophilum167WRQACLNL-GTHDYQIVATEGYQSS@SANITQNTFSQGS199S. Sp. S38158WARK@MNLGSHDYQIVATEGYQSS@SSISVS190T. lanuginosus159WARACLNVNGDHYQIVATEGYPSS@SSISVS190T. flexuosa158WARA@MNLGSHD-YQIMATEGYQSS@SSIVSISEGGNPGN196T. harzianum159WASHCLTL-GTMDYQIVAVEGYFSS@SASITVS190T. reesei 1146WASLCLHL-GQMNYQIVAVEGYFSS@SASITVS190T. reesei 2163WAQQCLTL-GTMDYQIVAVEGYFSS@SASITVS194T. reesei 2163WAQQCLTL-GTMDYQIVAVEGYFSS@SASITVS194T. reesei 1163WAQQCLTL-GTMDYQIVAVEGYFSS@SASITVS194T. reesei 2163WAQQCLTL-GTMDYQIVAVEGYFSS@SASITVS194T. reesei 2163WAQQCLTL-GTMDYQIVAVEGYFSS@SASITVS194T. reesei 1163WAQQCLTL-GTMDYQIVAVEGYFSS@SASITVS194T. reesei 2163WAQQCLTL-GTMDYQIVAVEGYFSS@SASITVS194T. reesei 3100WASACLNVGMASACLNVGWASACLN	B. subtilis B230	165	WESL <mark>G</mark> MPM-G	KMYETALTVE	GYQSN <mark>G</mark> SANV	TANVLT	199	Figure 25	. Angliement de sequences de xylanases	
C. thermophilum167 WRQACLQL-G THDYQIVATB GYYSS GATV NVGGSATGGG205D. thermophilum161 WANRCLNL-G TIDQITLCVE GYQSS GANI TQNTFSQGSS199S. Sp. S38158 WARYCMPLGS FNYYMIMATB GYQSS SSI SVS190T. lanuginosus159 WARACLNVNG DHYYQIVATB GYFSS GYARI TVADVG194T. flexuosa158 WARACMNLGS HD-YQIMATB GYSS GSASI TVS190T. harzianum159 WASHCLTL-G TMDYQIVAYB GYFSS GSASI TVS190T. reesei 1146 WASLCLHL-G QMNYQVAYB GYFSS GSASI TVS190T. reesei 2163 WAQQCLTL-G TMDYQIVAYB GYFSS GSASI TVS194T. reesei 2163 WAQQCLTL-G TMDYQIVAYB GYFSS GSASI TVS194F. variotii159 WASHCLTL-G TMDYQIVAYB GYFSS GSASI TVS194	B. stearothermophilus	159	WRSKGMNLGS	SWAYQVLAT	GYQSS <mark>G</mark> RSNV	TVW	191	11* de str	ructure connue.	
D. thermophilum161 WARREINL-G TIDQITICUE GYQSSESANI TQNTFSQGSS199Les summentents en non intripuent des zonesS. Sp.S38158 WARYEMPLGS FNYYMIATE GYQSSESSI SVS190T. lanuginosus159 WARACLNVNG DHYYQIVATE GYFSSEYARI TVADVG194T. flexuosa158 WARACMNLGS HD-YQIMATE GYSSESSI SVS190T. flexuosa159 WASHELTL-G TMDYQIVATE GYFSSESASI TVS194T. reesei 1146 WASICLHL-G QMNYQVAVE GYFSSESASI TVS190T. reesei 2163 WAQQELTL-G TMDYQIVAVE GYFSSESASI TVS194T. reesei 2163 WAQQELTL-G TMDYQIVAVE GYFSSESASI TVS194T. reesei 2163 WAQQELTL-G TMDYQIVAVE GYFSSESASI TVS194T. reesei 2163 WAQQELTL-G TMDYQIVAVE GYFSSESASI TVS194Yariotii159 WASAELNVTG DHYYQIVATE GYFSSESASI TVS194	C. thermophilum	167	WRQAGLQL-G	THDYQIVAT	GYYSS <mark>G</mark> SATV	NVGGSATGGG	205	Les surli	gnements en noir indiquent des zones	
 s. sp. s38 is8 wargemples FNYYMIMATE GYOSSESSI SVS 190 conservées à 100%, ceux en gris des zones conservées tis8 wargemples FNYYMIMATE GYESSEGARI TVADVG 194 flexuosa is8 wargemnles HD-yQIMATE GYESSEGARI TVADVG 194 is8 wargemples FNYYMIMATE GYESSEGARI TVADVG 194 marzianum is8 wargemples FNYYMIMATE GYESSEGARI TVADVG 194 wargemples FNYYMIMATE GYESSEGARI TVADVG 194 conservées à 100%, ceux en gris des zones conservées jusqu'à 80%. Les éléments de structure secondaires de T. reesei 1 id6 wastellt-G MNYQVAVE GYESSEGASI TVS 194 T. reesei 2 id6 wastellt-G TMDYQIVAVE GYESSEGASI TVS 194 reesei 2 id6 wastellt-G MYQVIAVE GYESSEGASI TVS 194 variotii is9 wastellt-G TMDYQIVAVE GYESSEGASI TVS 194 variotii 	D. thermophilum	161	WANRGLNL-G	TIDQITLCV	GYQSSCSANI	TQNTFSQGSS	199		> 1000 · 1	
T. lanuginosus159 WARAGLNVNG DHYYQIWAIB GYFSSGYARI IVADVG194jusqu'à 80%. Les éléments de structure secondaires deT. flexuosa158 WARAGMNLGS HD-YQIWAIB GYFSSGSSTV SISEGGNPGN196jusqu'à 80%. Les éléments de structure secondaires deT. harzianum159 WASHELTL-G TMDYQIVAVE GYFSSGSASI TVS190TX-Xyl sont indiqués au-dessus de l'alignement, lesT. reesei 2163 WAQQELTL-G TMDYQIVAVE GYFSSGSASI TVS194brins β sont symbolisés par des flèches.P. variotii159 WASHELTL-G DHYYQIWATE GYFSSGYARI TVADVG194* (voir les références pdb dans Anneyes)	s. Sp.S38	158	WARYGMPLGS	FNYYMIMATE	GYQSSGSSSI	SVS	190	conservée	s a 100%, ceux en gris des zones conservées	
 T. Flexuosa T. Flexuosa T. harzianum T. pessei 1 T. reesei 2 T. flexuosa T. reesei 2 T. flexuosa T. reesei 1 T. reesei 2 T. flexuosa T. flexuosa T. reesei 2 T. flexuosa T. flexuosa T. reesei 3 T. flexuosa T. flexuosa T. reesei 4 T. flexuosa T. flexuosa T. reesei 5 T. flexuosa T. fle	T. Lanuginosus	159	WARAGLNVNG	UHYYQIVATD	GYFSSGYARI	TVADVG	194	iusau'à 80)%. Les éléments de structure secondaires de	
1. narzianum 159 mashelille imbigurate gressesasi ivs 190 IX-Xyl sont indiques au-dessus de l'alignement, les T. reesei 1 146 wasielille g winyovave gressesasi ivs 178 brins β sont symbolisés par des flèches. T. reesei 2 163 waooelille g moyovave gressesasi ivs 194 * (voir les références pdb dans Anneves)	T. Ilexuosa	150	MARAGMNLGS	TMDYOTWAT	GIUSSGSSTV	SISEGGNPGN	190	T V1		
T. reesei 2 T. r	I. NAFZIANUM T reesei 1	175 176	WASIGLIL-G		GIESSGSASI	IVS	178	Tx-Xyl sont indiqués au-dessus de l'alignement, les		
P. variotii 159 WASAGLINVIG DHYYOIVATB GYFSSGYARI TVADVG 194 * (voir les références ndb dans Anneves)	T reesei 2	163 163	WAOOGLTL-C	TMDYOTVAVE	CYFSSCSAST	TVS	194	brins β sont symbolisés par des flèches.		
	P. variotii	159	WASAGLNVTG	DHYYQIVAT	GYFSSGYARI	TVADVG	194	* (voir les références ndh dans Anneves)		

* (voir les références pdb dans Annexes)

IV.3.2. Propriétés catalytiques et fonctionnelles

IV.3.2.1. La catalyse enzymatique : site actif et dynamique moléculaire

En accord avec leur caractère *endo*, le site actif des xylanases 11 est situé au niveau d'une crevasse catalytique assez étroite, longue et encaissée (de ~ 4 Å de largeur et ~ 9 Å de profondeur pour ~ 25 Å de longueur, en moyenne). [178] Les résidus qui constituent les parois de cette crevasse appartiennent d'une part aux brins B2, B3 et B4, et d'autre part essentiellement au brin B8 et au pouce. Il s'agit pour la plupart de résidus aromatiques et quelques résidus polaires, avec au centre la dyade catalytique. Il a été démontré grâce à des études de mutagenèse dirigée et de cristallographie de complexes enzyme-substrat que deux résidus d'acide glutamique conservés forment la dyade catalytique, chacun positionné sur un côté de la crevasse, l'un agissant comme un nucléophile (Nuc) et l'autre comme un acide/base (A/B). [182, 183] Ces résidus correspondent, par exemple, respectivement aux résidus E76 (Nuc) et E169 (A/B) dans le cas de la xylanase de *Bacillus circulans* et aux résidus E76 (Nuc)

L'environnement du résidu nucléophile est généralement plus conservé que celui du résidu acide/base. Un groupe de cinq résidus, dont trois résidus tyrosine, un tryptophane et une glutamine forment un réseau de liaison hydrogène permettant de maintenir l'état d'ionisation de ce résidu glutamate. [178]

Lors de la catalyse, le résidu acide/base peut présenter deux états conformationnels distincts selon son état d'ionisation. En effet, Törrönen et *al.*, 1994 ont montré que, par suite de modification du pH ou de fixation d'un ligand, le résidu acide/base (E177) de la xylanase XYNII de *Trichoderma reesei* subit une torsion angulaire de 100° qui provoque un déplacement de son groupement carboxyle de 2,8 Å et un raccourcissement de la distance entre les deux résidus catalytiques. Les deux conformations du résidu E177 suggèrent qu'il est capable de changer sa valeur de pKa. Il est protoné et non chargé quand le pH est inférieur à 5, mais perd son proton et change de conformation lors de la catalyse ou à un pH supérieur. En général, le pKa du résidu acide/base oscille autour du pH optimum pour s'adapter à son rôle dual d'acide et de base. Ces changements de pKa sont à la fois reliés au phénomène catalytique et au cycle du nucléophile entre ses états ionisé et glycosylé. [178]

Par ailleurs, l'architecture des xylanases 11 n'est pas une structure figée et rigide, mais présente des propriétés dynamiques et plusieurs indices indiquent que le *jelly-roll* est animé

de mouvement lors de la catalyse. En effet, la comparaison de structures cristallines de différentes xylanases 11 a montré que la largeur de la crevasse catalytique varie selon la position du pouce. [179, 180] Ce dernier adopte des positions différentes en fonction des évènements du processus catalytique. Par exemple, la fixation d'un ligand semble induire un mouvement du pouce qui entraîne une fermeture partielle de la crevasse catalytique, par suite de son rapprochement du brin B2. [185]

De nombreuses études de dynamique moléculaire suggèrent que le mouvement du pouce est une propriété intrinsèque de la structure des xylanases 11, jouant un rôle essentiel dans la catalyse enzymatique ainsi que dans la sélectivité/spécificité de substrat.[186] Les résultats de travaux récents d'ingénierie (par mutagenèse dirigée) du pouce de la xylanase 11 (Tx-Xyl) de *Thermobacillus xylanilyticus* montrent que sa suppression annihile toute activité xylanolytique de Tx-Xyl et entraîne une perte de sa sélectivité/spécificité de substrat, permettant la fixation avec une affinité égale aussi bien de xylo- que de cellooligosaccharides. De part sa géométrie adaptée aux résidus xylose liés en β -(1,4), le positionnement correct et précis du pouce dans la crevasse conditionne fortement la fixation de substrat. De même, son mouvement lors de la catalyse faciliterait non seulement le positionnement et le maintien du substrat dans la crevasse, mais aussi le relargage du produit de la réaction enzymatique. [187] (Figure 24)



Figure 24 : Structure du pouce de la xylanase 11 (Tx-Xyl) de *Thermobacillus xylanilyticus*. Le pouce est représenté par la boucle en rouge. Les résidus catalytiques sont indiqués en bleu. ([187])

IV.3.2.2. Spécificité et sélectivité de substrats

Contrairement à d'autres familles de xylanases, notamment la famille 10, la famille 11 est une famille monospécifique, agissant exclusivement sur des hétéroxylanes (HX). Le mode d'action des xylanases 11 est toutefois largement influencé par la structure primaire des hétéroxylanes, en particulier par leur degré de substitution. [188] En effet, ces dernières sont incapables de couper une liaison glycosidique entre deux résidus xyloses portants une ramification (par un résidu arabinose ou acide glucuronique) voire même adjacents à des résidus ramifiés. Ainsi, l'action des xylanases 11 semble plutôt spécifique des zones peu substituées des HX, contrairement aux xylanases de la famille 10 dotées d'une catalyse plus versatile et capables d'hydrolyser les AX jusqu'aux branchements.(Figure 25) Ces différences d'action entre les deux grandes familles de xylanases 10 étant plus ouvert et moins encaissé que celui des xylanases 11 dont le *jelly-roll* est plus compact. [176]



Figure 25 : Différences du mode d'action des xylanases 10 et 11 sur les hétéroxylanaes. Les sites de coupure sont indiqués par des flèches rouges.

En plus du degré de substitution (ou ratio A/X), l'action des xylanases 11 est également affectée par l'état physique et de solubilité des AX. Avec le développement des procédés biotechnologiques des grains de céréales, mettant en œuvre les xylanases, une nouvelle notion analogue à la spécificité, est actuellement utilisée. Il s'agit de la notion de sélectivité de substrat, qui par définition correspond à l'activité relative de l'enzyme vis-à-vis des arabinoxylanes non extractibles (WU-AX) et extractibles à l'eau (WE-AX), issus de grains de céréales. [189] De point de vue de leur structure, les deux fractions d'AX sont très proches, néanmoins les WU-AX, qui sont les AX majoritaires de l'endosperme (albumen) des grains, présentent en moyenne un poids moléculaire et un ratio A/X légèrement plus élevés. [19] L'emploi de xylanases qui agiraient sélectivement sur les WU-AX serait plus avantageux, par exemple, pour les procédés de panification (ex : la xylanase 11 de B. subtilis). [190, 191] Les xylanases d'une même famille et donc ayant une même spécificité peuvent différer par leur sélectivité de substrat. [192] De même la classification actuelle des xylanases (en familles de GH) ne permet pas, à elle seule, de prédire la capacité de ces enzymes à hydrolyser les AX insolubles. [189, 193] A l'heure actuelle, les bases biochimiques et structurales déterminant la sélectivité des xylanases restent peu connues. Néanmoins, certaines données dans la littérature stipulent l'implication de certains résidus de surface. [194]

IV.3.2.2.1. Sous-sites de fixation

En plus des résidus catalytiques, le site actif des xylanases 11 contient des résidus aromatiques (Tryptophane, Tyrosine et Phénylalanine) qui jouent un rôle important dans la reconnaissance, "l'arrimage" (*docking*) et la fixation du substrat. Ces résidus forment des sous-sites de fixation permettant d'établir des interactions hydrophobes de "*stacking*", des interactions de Van der Waals, ainsi que des liaisons hydrogène *via* leurs groupements hydroxyles avec les unités monomériques des sucres. [195]

Selon la nomenclature introduite par Davies et *al.*, 1997, ces sous-sites sont marqués (+1), (+2), etc. en partant de la liaison glycosidique qui subit le clivage vers le côté réducteur, et (-1), (-2), etc. vers le côté non réducteur, les sous-sites (-1) et (+1) se trouvant de part et d'autre de la coupure. [196](Figure 26)



Figure 26 : Nomenclature des sous-sites de fixation chez les glycoside hydrolases La flèche entre les sous-sites (-1) et (+1) indique a zone de coupure.

D'une façon générale, la crevasse catalytique des xylanases 11 permet d'accommoder une chaîne de 4 jusqu'à 7 résidus xylose. [175] Le nombre des sous-sites consensus est, en moyenne proche de 5, soit de (-3) à (+2). Des études de cristallographie en présence de xylooligosaccharides ou d'inhibiteurs (tels que les 2-fluoro-xylosides ou les époxy-alkylxylosides) ont permis de caractériser les sous-sites du côté non réducteur du substrat fixé (i.e. (-2) et (-1)), notamment, de la xylanase de *Bacillus Circulans* [182, 197, 198], de XynII de *Trichoderma reesei* [185] et des xylanases de *Bacillus agaradhaerens* [199] et de *Chaetomium thermophilum* [200].

En revanche, la caractérisation des sous-sites (+1) à (+2) a été essentiellement basée sur des travaux de modélisation moléculaire. Ainsi, la modélisation d'une chaîne de xylohexaose dans la crevasse catalytique de la xylanase Tx-Xyl de *T. xylanilyticus* a permis à Paës et *al.*, 2007 d'identifier 5 sous-sites de fixation. (Figure 27) Ces sous-sites ainsi que le bilan des interactions enzyme/substrat sont résumés sur le tableau 9.

IV.3.2.2.2. Site secondaire de fixation

Les endoxylanases de la famille 11 sont, pour la plupart, constituées d'un seul domaine catalytique et ne renferment pas de CBM. Néanmoins, l'absence de CBM semblerait être compensée par la présence au niveau du domaine catalytique de site secondaire de fixation. Ce site, distant et structuralement indépendant du site actif, est capable d'assurer la reconnaissance spécifique et la fixation de xylo-oligosaccharides ou encore de chaînes polymériques de xylane.



Figure 27 : Modélisation des sous-sites d'arrimage et de fixation du xylohexaose dans la crevasse catalytique de la xylanase 11 (Tx-Xyl) de *Thermobacillus xylanilyticus* ([187]). Les résidus catalytiques (en bleu) ainsi que les résidus indiqués en vert forment des liaisons hydrogène avec les unités de xylose. Les résidus indiqués en rouge créent des interactions de *stacking*. Le pouce est coloré en jaune.

Tableau 9: Bilan des interactions entre le xylohexaose	modélisé et les sous-sites de Tx-
Xyl.	

Sous-	Modes de fixation					
Sites	Stacking	Liaisons hydrogène	Interactions de Van der Waals	de fixation		
(-3)*		O2NE1 (W7) (-3,7) 3,1 Å	S115	- 6,6		
(-2)	W7 (-4,5) 4,1 Å	O3OH (Y163) (-3,3) 2,9 Å	Q5, S115, I116	22.9		
		O2OH (Y67) (-6,0) 3,1 Å		-23,8		
(-1)		O2NH1 (R110) (-7,1) 2,9 Å	W7, N33, V35, Y67, E76, Y78, P114, S115	-14,0		
(+1)		OOE2 (E169) (-5,6) 3,1 Å	N33, Y78, R110, Q124, W126, Y171	-17,7		
(+2)		O2N (T89) (-3,1) 3,5 Å	Y63, P88, T89, W126, Y171	-13,2		
(+3)	Y86 (-3,5) 4,0 Å	O2ND2 (N61) (-4,9) 3,2 Å	Y63, Y86, Y171	-11,0		

* Le sous-site (-3) est incertain. Les résidus impliqués sont indiqués en gras, les distances et les énergies (exprimées en kcal/mol) des interactions sont également mentionnées.

Un site secondaire de fixation de xylane a été notamment mis en évidence chez la xylanase 11 (BcX) de *Bacillus circulans*. Il s'agit d'un sillon peu profond de la surface de l'enzyme, situé à l'opposé du site actif et renfermant principalement des résidus asparagine, serine, thréonine et tryptophane. [201] (Figure 28) De tels résidus sont typiquement trouvés au niveau des CBM et sont généralement impliqués dans des liaisons hydrogène ainsi que des interactions de "*stacking*" avec les sucres. [202]

Ludwiczek et *al.*, 2007 ont montré que le site actif (SA) et le site secondaire de fixation de xylane (SSF) de (BcX) fixent les xylo-oligosaccharides de façon indépendante avec des constantes de dissociation (K_d) de l'ordre du milli-molaire, mais ce dernier (SSF) ne contribue pas à l'hydrolyse de ces petits substrats. Cependant, les deux sites fixent de façon coopérative les polymères solubles et insolubles de xylane, ce qui entraîne une augmentation de l'affinité nette de l'enzyme (BcX) vis-à-vis de ces substrats et par conséquent une amélioration significative de la catalyse par suite de la réduction des valeurs de K_M. En effet, les auteurs suggèrent que la fixation de polymère de xylane sur le (SSF) favorise sa fixation sur le (SA) par suite de l'augmentation de sa concentration locale effective et de la réduction de l'entropie de l'association. (Figure 29) [201]

Récemment, l'existence de site secondaire de fixation a été également montrée à la surface de deux xylanases 11 d'*Aspergillus niger* et de *Bacillus subtilis*. [203] Bien que les emplacements de ces sites varient sensiblement entre ces xylanases, ils restent pour la plupart cantonnés (localisés) au niveau de la région de surface riche en Ser/Thr relativement conservée chez la plupart des membres de la famille 11. [178] Cette zone, décrite pour la première fois par Törrönen et *al.*, 1994, a été assimilée d'un point de vue fonctionnel à un CBM et semble, d'après une étude récente de Moers et *al.*, 2007, jouer un rôle important dans la sélectivité de substrat des xylanases 11. [194]


Figure 28 : Site secondaire de fixation de la xylanase 11 (BcX) de Bacillus circulans. (PDB 1XNB) (d'après [201])

-a- Représentation de la topographie du site secondaire de fixation (surface bleu et rose) et du site actif (surface rouge). La surface rose correspond au résidu W185 de -b-.

-b- Les principaux résidus formant le site secondaire de fixation.





IV.3.2.3. Stabilité au pH, thermostabilité, sensibilité aux inhibiteurs protéiques

La stabilité au pH et la thermostabilité sont des propriétés requises dans de nombreux procédés biotechnologiques mettant en œuvre des xylanases (tels que le bio blanchiment de la pâte à papier).

Le pH optimum d'activité des endoxylanases de la famille 11 est très variable et recouvre une plage allant de 2 à 11. [179, 197] Les xylanases fongiques sont, en grande majorité, acidophiles et actives sur une gamme de pH allant de 2.0 à 6.0. C'est le cas par exemple de la xylanase Xyn1C d'*Aspergillus kawachii* dont le pH optimum est de 2.0. [204] Les xylanases basophiles agissent préférentiellement à un pH situé entre 4.0 et 11.0 et regroupent essentiellement des xylanases d'origine bactérienne.

De nombreuses études ont corrélé les optima de pH des xylanases 11 avec la nature des résidus entourant les 2 résidus d'acides glutamiques formant la dyade catalytique dont les pK_a sont finement ajustés par un réseau complexe de liaisons hydrogènes.[177, 197, 205, 206]

Bien que la plupart des endoxylanases de la famille 11 soient mésophiles (température optimale entre 40 et 60°C), certaines sont stables et performantes à des températures élevées et présentent des températures optimales d'activité supérieures à 60°C. Parmi ces xylanases thermostables, une grande majorité est d'origine bactérienne comme la XynA de *Clostridium thermocellum*, la Tx-Xyl de *Thermobacillus xylanilyticus*, ou encore les XynB3 et XynB6 de *Dictyoglomus thermophilum*. [207, 208] Cette dernière (la XynB6) compte parmi les plus thermostables avec un optimum apparent de température à 85°C et une stabilité de plus de 8h. Les principaux facteurs structuraux responsables de la thermostabilité résident, notamment, dans la structure de la région N-terminale, le ratio de résidus thréonine/sérine, la stabilité de l'hélice α , la compacité (ou *packing*) et les propriétés de surface des endoxylanases. [163, 177, 209, 210, 211, 212, 213] L'hydrophobicité de surface peu commune de la xylanase 11 (Tx-Xyl) de *Thermobacillus xylanilyticus* due à la présence d'environs 8 résidus aromatiques formant des "patchs" hydrophobes, est d'ailleurs considéré comme le principal facteur contribuant à sa thermostabilité. [184]

L'activité des xylanases peut être, par ailleurs, affectée par la présence d'inhibiteurs protéiques dans les céréales (blé, orge, maïs...). Ces inhibiteurs constituent des éléments du système défensif de ces plantes contre les enzymes endogènes et celles des phytopathogènes.

A l'heure actuelle, deux classes d'inhibiteurs ont été caractérisées: XIP (xylanase inhibitor protein) et TAXI (*Triticum aestivum* xylanase inhibitor). [214, 215] Les inhibiteurs de la classe XIP sont des inhibiteurs spécifiques des xylanases fongiques et n'ont aucun effet sur les xylanases bactériennes. Leur action est réversible et compétitive, de stoechiométrie 1:1, et s'exerce indépendamment de la famille (GH10 ou GH11) avec des constantes d'inhibition (K_i) très variables en fonction de l'enzyme. [216, 217] En revanche, les inhibiteurs de type TAXI sont des inhibiteurs exclusifs de xylanases de la famille GH11, quelque soit leur origine (bactérienne ou fongique), mais n'ont pas d'activité sur les xylanases GH10. [218] Récemment, une troisième classe d'inhibiteurs de xylanases a été identifiée dans le blé. Il s'agit de TL-XI (ou thaumatin-like xylanase inhibitor), inhibiteur non compétitif d'un certains nombre de xylanases GH11, mais inactif sur les xylanases GH10. [219]

IV.3.3. L'endoxylanase GH11 (Tx-Xyl) de Thermobacillus xylanilyticus

La bactérie *Thermobacillus xylanilyticus* thermophile et anaérobique a été isolée à partir d'un échantillon de sol à proximité de fumier dans le nord de la France. Elle dégrade naturellement les hémicelluloses grâce notamment à la sécrétion d'une endo- β -(1,4)-xylanase de la famille GH11 (Tx-Xyl) qu'elle produit en grande quantité (environ 110 UI/mL en 9 h de culture). [220-222] Un mutant catabolique *Thermobacillus xylanilyticus* D3 a été obtenu par mutagenèse chimique avec de l'éthyl-méthane sulfonate afin de permettre une production plus importante de l'enzyme.

Le clonage et la résolution de la structure 3D ont permis d'identifier les principales caractéristiques de cette xylanase. [184] Il s'agit d'une enzyme composée d'un seul domaine catalytique de 20 692 Da, dont la séquence primaire renferme 182 résidus d'acides aminés (Figure 23). La structure 3D de Tx-Xyl est celle d'un *jelly-roll* composé d'environ 57% de feuillets β et 6% d'hélice α (Figure 22). Les résidus glutamate E76 (nucléophile) et E176 (acide/base) constituent la dyade catalytique. Le pH optimal et la température optimale d'activité de l'enzyme sont respectivement de 5,8 et 75°C. L'enzyme est particulièrement intéressante du fait de sa stabilité à une large gamme de pH (de 4,2 à 8,2), de sa thermostabilité (plusieurs heures à 60°C) et de son activité spécifique élevée (~1800 UI/mg à 60°C sur le xylane de bouleau). En raison de ces propriétés, Tx-Xyl est considérée comme un outil enzymatique intéressant pour le fractionnement biotechnologique des substrats lignocellulosiques. Cette xylanase permet ainsi de solubiliser jusqu'à 40% et 20%

hétéroxylanes, respectivement du son et de la paille de blé. De nombreuses études ont été dédiées à la compréhension du mode d'action de l'enzyme. [187, 223, 224, 225-227, 228, 229, 230]

IV.4. Applications des endoxylanases

Les xylanases sont impliquées dans des domaines très variés de l'industrie : industries alimentaires (humaine et animale), industrie papetière et bioraffinerie des lignocelluloses... [163, 231]

Dans le domaine de l'alimentation humaine, les xylanases sont essentiellement utilisées dans les procédés de panification et de clarification des jus de fruits. Utilisées comme additifs dans les pâtes boulangères, ces dernières permettent de solubiliser les hétéroxylanes de la farine de blé entraînant une redistribution des molécules d'eau, une amélioration de l'élasticité et de la manipulation des pâtes et par conséquent une diminution du temps de pétrissage ainsi qu'une augmentation du volume et une amélioration de la texture du pain. [232]

En combinaison avec les cellulases, amylases et pectinases, les xylanases contribuent à la clarification et à la stabilité des jus de fruit en augmentant les taux d'extraction et de filtration. Les xylanases sont également employées dans l'alimentation animale. Elles permettent notamment d'améliorer la valeur nutritive, par diminution de la viscosité et augmentation de la digestibilité des aliments fibreux céréaliers pour les animaux monogastriques et ruminants. De même, les oligosaccharides générés sous l'effet de ces enzymes présentent un potentiel prébiotique. [233, 234, 235]

Dans les industries non-alimentaires, en plus des industries du textile, l'application la plus importante des xylanases est actuellement le blanchiment de la pâte à papier. Dans ce secteur, ces enzymes constituent une alternative au blanchiment chimique traditionnellement utilisé pour retirer les lignines de la pâte Kraft et employant des agents chlorés hautement toxiques et polluants. L'avantage de l'emploi des xylanases consiste, en effet, dans leur action sélective qui conduit à la solubilisation des hétéroxylanes et à l'extraction concomitante des lignines sans affecter la qualité des fibres de cellulose. [233, 236]

Par ailleurs, avec l'essor des procédés de bioraffinerie, l'emploi des xylanases dans le fractionnement maîtrisé et la bioraffinerie des lignocelluloses connaît un intérêt croissant. En effet, la dégradation des hétéroxylanes, composés majeurs des lignocelluloses, par une voie

enzymatique est plus avantageuse par rapport aux procédés chimiques conventionnels. La réaction est plus sélective, se déroule dans des conditions plus douces, donne de meilleures rendements, tout en consommant peu d'énergie, et n'engendre pas de dégradation partielle ou totale de certains constituants de la biomasse (ex, la cellulose). La saccharification de ces polymères entraîne la libération de produits à forte valeur ajoutée, dont des oligosaccharides et des pentoses (xylose, arabinose...). En ce qui concerne le xylose, plusieurs voies de valorisations sont envisagées. En plus du xylitol (édulcorant, substitut du saccharose pour les diabétiques), le xylose est utilisé pour la fabrication de tensio-actifs et surtout de biocarburants (de 2^{ème} génération, tels que l'éthanol) par suite de sa fermentation par des systèmes fermentaires appropriés (tels que les levures *Pichia stipitis* ou *Candida shehate...*). [7, 237]

V. Facteurs affectant le fractionnement enzymatique des lignocelluloses

Bien que de nombreuses enzymes (cellulases, hémicellulases...) sont qualifiées de performantes pour l'hydrolyse de substrats simples et solubles (tels que des polymères isolés), elles restent très peu efficaces sur des substrats plus complexes et insolubles comme les lignocelluloses. Leur action *in situ* est, en effet, influencée par divers facteurs regroupant à la fois des facteurs liés à leurs propriétés catalytiques intrinsèques (catalyse enzymatique proprement dite) ainsi que des facteurs liés à l'accessibilité et à l'agencement de leur substrat cible au sein des parois végétales. De plus, les parois végétales présentent une diversité telle qu'il n'est pas possible d'envisager un modèle unique de dégradation enzymatique.

Cependant, malgré les divergences, les parois végétales ont en commun une complexité structurale reposant sur un ensemble de macromolécules et de molécules simples, intimement associées par des liaisons covalentes ou non, formant un réseau dense et enchevêtré autorisant le passage de certaines molécules, comme le suggère le modèle de la paroi végétale proposé par Carpita et Gibeaut (1993). [68]

La plupart des études sur la catalyse enzymatique en milieu solide et hétérogène concernent la dégradation de la cellulose par les cellulases et peu d'études s'adressent aux hétéroxylanes des parois. [238] Le modèle généraliste proposé par Lee et Fan (1992) pour des cellulases peut, néanmoins s'appliquer à d'autres couples enzymes-parois. [239] Selon ce modèle, le

mécanisme conduisant à la dégradation par une enzyme d'un substrat donné appartenant à une paroi végétale peut s'établir essentiellement en 5 étapes :

- Le transfert de l'enzyme du milieu aqueux vers le substrat
- L'adsorption de l'enzyme sur le substrat et la formation du complexe enzyme-substrat
- L'hydrolyse du substrat
- Le transfert des produits de réaction du substrat vers le milieu aqueux

Le transfert de l'enzyme du milieu aqueux vers le substrat (étape 1) s'opère, au moins en partie, au travers de la paroi. Celle-ci est un matériau poreux présentant des volumes accessibles aux molécules circulantes. Ces "pores" ne se présentent pas toutefois sous forme de tunnels uniformes et réguliers, mais plutôt de cavités sans forme précise reliées entre elles. Divers travaux ont été réalisés dans le but de définir la gamme des volumes accessibles d'une paroi. La plupart ont fait appel à des méthodes physiques (sorption de gaz...), ou ont mis en œuvre des molécules marquées (notamment par des sondes fluorescentes...) tels que des dextranes marqués, des polyéthylène glycols ou des protéines de masses moléculaires connues, utilisant des approches de microscopie permettant l'étude du phénomène de diffusion (microscopie de fluorescence, FRET, FRAP...). [240-244] D'autres ont eu recours à des méthodes de microscopie électroniques permettant la visualisation et la mesure directe sur les parois, employant des techniques de congélation rapide (cryofracture et cryodécapage en profondeur ou " Deep-etch"...) [245, 246] Toutefois, les résultats obtenus varient parfois de façon importante selon la méthodologie employée. Certains auteurs ont suggéré que la taille de ces pores serait en moyenne de l'ordre de 3 à 5 nm.

Ainsi, la diffusion d'une molécule, notamment protéique, est fonction de la porosité de la paroi, mais également de sa taille, sa structure (multi-modulaire ou non), sa conformation et du volume hydrodynamique qu'elle occupe dans les trois dimensions de l'espace.

En plus de la notion de pores accessibles, l'accessibilité du substrat au sein de la paroi peut être restreinte d'une part en raison des multiples liaisons intra- et/ou inter moléculaires entre les composants pariétaux (ex, réticulation covalente des hétéroxylanes via les acides phénoliques ou leur imbrication au sein des LCC...), et d'autre part en raison des interactions non spécifiques pouvant avoir lieu entre l'enzyme et certains composés. Les lignines seraient, par exemple, responsables de l'adsorption non spécifique de cellulases et de xylanases *via*, vraisemblablement, des interactions hydrophobes et ont été de ce fait clairement définies comme limitant la pénétration et la dégradation enzymatique des parois. [247-251] Pour cette raison, de nombreux procédés de prétraitements de la biomasse ont été développés pour réduire la teneur en lignine dans l'optique de diminuer ces interactions et améliorer les rendements de la dégradation enzymatique. [252, 253]

La formation du complexe enzyme-substrat (étape 2) est l'étape majeure de l'hydrolyse *in situ* des parois végétales. Contrairement aux polymères isolés, la reconnaissance spécifique et la liaison entre les enzymes et le substrat insoluble dépendent de nombreux paramètres, notamment de son agencement au sein de la paroi. De nombreuses enzymes ont développé des stratégies adaptatives, vis-à-vis de la complexité de la paroi en s'armant de modules protéiques servant de sondes spécifiques des structures pariétales (les CBM). Ces modules protéiques semblent améliorer la reconnaissance et la fixation spécifique des enzymes sur leur substrat cible au sein de la trame pariétale et joueraient un rôle important dans la biodégradation des substrats lignocellulosiques. [100]

En plus des étapes de transfert et de reconnaissance, l'hydrolyse enzymatique du substrat au sein des lignocelluloses est soumise à des contraintes d'ordre catalytique (comme pour les polymères isolés), tels que le degré de cristallinité et la surface accessible des fibres de cellulose pour les cellulases, le degré de substitution des hétéroxylanes pour les xylanases, ou encore la présence de molécules inhibitrices.

Des études récentes ont, par exemple, montré que les composés phénoliques (en particulier les acides phénoliques) constituent de réels verrous à la bioraffinerie des graminées, à cause de leur impact négatif à la fois sur les étapes de fractionnement enzymatique des parois et de fermentation des sirops d'hexoses et de pentoses en éthanol. Ces composés seraient, en effet, des inhibiteurs des cellulases ou des hémicellulases...) et présentent un potentiel antimicrobien. Leur mode d'action reste, toutefois, peu connu. [249, 250, 254, 255, 256]

Chapitre I

Impact de l'organisation supramoléculaire des assemblages hémicelluloses-lignines sur l'action d'une endoxylanase GH11

In vitro model assemblies to study the impact of lignincarbohydrate interactions on the enzymatic conversion of xylan

Imen Boukari^{a,b}, Jean-Luc Putaux^c, Bernard Cathala^d, Abdellatif Barakat^{a,b}, Bodo Saake^e, Caroline Rémond^{a,b}, Michael O'Donohue^{f,g,h}, Brigitte Chabbert,^{a,b}*

^a INRA, UMR 614, Fractionnement des AgroRessources et Environnement, F-51686 Reims, France.

^b University of Reims Champagne Ardenne, UMR 614, Fractionnement des AgroRessources et Environnement, F-51686 Reims, France.

^c Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV-CNRS), BP 53, F-38041Grenoble Cedex 9, France - affiliated with Université Joseph Fourier and member of the Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble

^d INRA, UR1268 Biopolymères, Interactions et Assemblages, F-44300, Nantes, France

^e VTI, Institute for Wood Technology and Wood Biology, 21031 Hamburg, Germany.

^f Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, F-31077 Toulouse, France

^g INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400, France

^hCNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

(publication n°1: publiée dans *Biomacromolecules* 2009. 10(9): p. 2489-2498)

In vitro model assemblies to study the impact of lignin-carbohydrate interactions on the enzymatic conversion of xylan

Abstract

Endo- β -1,4-xylanases (EC 3.2.1.8) are the main enzymes involved in the hydrolysis of xylans, the most abundant hemicelluloses in plant biomass. However, the development of efficient endoxylanases for use in biorefinery processes is currently hampered by insufficient knowledge regarding the impact of the cell wall network organization on the action of the enzyme at the supramolecular level. The action pattern of a GH11 endoxylanase from Thermobacillus xylanilyticus (Tx-xyl) was investigated by means of in vitro reconstituted model systems which can mimic certain cell wall structures. The action of Tx-xyl was evaluated on polymer assemblies displaying increasing complexity using delignified glucuronoarabinoxylan (GAX), then GAX-DHP model complexes obtained by oxidative polymerisation of coniferyl alcohol into dehydrogenation polymers (DHP: lignin model compounds) in presence of GAX. At high concentration of GAX, interchain associations are formed leading to high molecular weight aggregates. These structures did not appear to affect the action of endoxylanase which induces disaggregation of the self-aggregates along with polymer depolymerization. To mimic lignin-carbohydrate interactions, two different GAX-DHP nanocomposites were prepared and incubated with endoxylanase. In both cases, free GAX was hydrolyzed, while the GAX-DHP complexes appeared to be resistant. In the case of the non-covalently linked GAX-DHP_{ZL} complexes, enzyme action favored a decrease in particle size, owing to the removal of their relatively exposed carbohydrate chains, whereas the complex supramolecular organization of the covalently linked GAX-DHP_{ZT} complexes severely hampers the enzyme's access to carbohydrate. Overall, these results establish the negative impact of DHP on the endoxylanase action and provide new knowledge regarding the limitations of the enzyme action in lignocellulose bioconversion processes.

Keywords Glucuronoarabinoxylan, aggregation, lignin, dehydrogenation polymers, GH11 endo-β-1,4-xylanase, lignin-carbohydrate complex (LCC)

Introduction

Lignocellulosic biomass is an abundant, renewable resource that can be used for the production of fuel ethanol and industrially-relevant chemicals. However, its use as a raw material for biorefining constitutes a considerable technological challenge, particularly because of its chemical complexity and its recalcitrance. Thermochemical technologies have been developed for the fractionation and upgrading of lignocellulosic biomass, but enzymatic bioconversion offers an alternative, environmentally-friendly strategy. However, the presence of lignin and the cell wall network provide limitations to efficient bioconversion of lignocelluloses.

The lignified plant cell walls are indeed composite materials resulting from the assembly of different biopolymers (cellulose, hemicelluloses, lignin, etc.). These components are interconnected through a variety of covalent and non covalent interactions giving rise to a highly organized network. Lignin is a complex aromatic polymer composed of phenylpropane units¹ that impregnates the preexisting hemicellulose-cellulose network,² thereby imparting both rigidity and biological resistance to the lignocellulosic structure. Over the last few decades, the associations between lignin and hemicelluloses have been extensively studied in order to improve biomass delignification, a key technology for the pulp and paper industry. Lignin associates with hemicelluloses through non-covalent and covalent linkages to form a dense and highly organized network. Covalently linked structures form the so-called lignincarbohydrate-complexes (LCCs).³ Previously, it has been shown that these LCC structures are particularly problematic for lignocellulose bioconversion processes, because lignin impedes enzyme-mediated hydrolysis of carbohydrates. Evidence in the literature suggests that lignin acts as a physical barrier, restricting enzyme access to carbohydrates, ⁴ and may also interact with enzymes through possibly hydrophobic interactions resulting in non-productive binding.⁵ Enzyme inactivation by lignin has also been suggested since phenolic compounds can form soluble inactive enzyme-inhibitor complexes at very low concentrations, and insoluble protein-phenolic complexes at high concentrations.⁶⁻⁹

All these limitations have prompted the emergence and development of a variety of chemical and physical pretreatments aimed at reducing the lignin inhibitory effects, as recently reviewed by Chandra et al.¹⁰ However development of sustainable biorefinery technologies requires reduction in chemicals, toxic effluents and energy-costly processes, and

would take advantage from the use of highly efficient glycoside hydrolases. In this context, a more comprehensive view on the mechanisms that hamper enzymatic conversion would be required to design new efficient enzymes. Although the lignin content and the presence of phenolic cross-linkages have often been negatively correlated with the susceptibility of lignocellulosic biomass to biodegradation, ¹¹⁻¹³ only a few studies have addressed the way in which lignin interactions with polysaccharides and the supramolecular organization of the cell wall network may impact on enzyme action.¹⁴⁻¹⁷ This is because the high complexity and variability of lignified cell walls is an obstacle for the clear interpretation of data. In this respect, the *in vitro* design of model systems constitutes an attractive experimental tool that may be useful to understand the effect of the cell wall polymers assembly on the enzymatic breakdown of lignocelluloses. These mimetic assemblies have proven to be useful tools to investigate the effect of pre-existing polysaccharides on lignification, giving further understanding on the cell wall assembly and biosynthesis. One of the simplest approaches involves in vitro oxidative polymerization of lignin precursors (monolignols) into "lignin-like polymers" or DHPs (dehydrogenation polymers) in the presence of natural or artificially synthesized cell wall components.¹⁸⁻²⁴ This strategy was shown to be advantageous, because the characteristics of the lignin or the lignin-carbohydrate interactions can be controlled through the use of different monolignols, different carbohydrates and different polymerization conditions. Notably, Barakat et al. 25 have successfully modelled lignin-heteroxylan interactions, by performing in vitro oxidative polymerization of lignin precursors in the presence of glucuronoarabinoxylan (GAX), using the well known "bulk" (Zulaufverfahren, ZL) and "end-wise" (Zutropfverfahren, ZT) DHPs polymerization modes. Two complex systems were obtained, GAX-DHP_{ZL} and GAX-DHP_{ZT}, which are characterized by the predominance of non-covalent and covalent interactions respectively.

To study the cell-wall restrictions to hemicellulose bioconversion, we have addressed the action of a thermostable GH11 endo- β -1,4-xylanase (Tx-Xyl) from *Thermobacillus xylanilyticus*.²⁶ This enzyme which does not possess any carbohydrate binding module ²⁷ is quite active on both isolated polymers and complex natural lignocelluloses, but its efficiency does appear to be correlated with lignin content. ²⁸⁻³¹ Endoxylanases are used in food and feed industries as well as pulp and paper technologies,³² and are receiving increasingly interest in bioethanol production,³³ either as added enzymes (with cellulases) or as part of an integrated bioprocess (pentose fermentation, etc.). However, in contrast with the abundant literature on the action pattern of cellulases,¹⁷ fewer data are available on the organizational factors that attenuate endoxylanase action *in planta*. To acquire a more comprehensive view on these

limitations, the impact of the supramolecular organization of the cell wall polymers on Tx-Xyl was investigated. To this end, we propose a new approach which is based on the enzymatic breakdown of *in vitro* reconstructed model systems. The action pattern of Tx-Xyl was evaluated on polymer assemblies displaying increased complexity using self-aggregates of glucuronoarabinoxylan (GAX) and bio-inspired GAX-DHP nanocomposites. In addition to experiments conducted with high levels of enzyme, the use of low concentration of enzyme was chosen to highlight possible distinct restriction patterns.

Materials and methods

Glucuronoarabinoxylan sample (GAX)

Delignified water soluble glucuronoarabinoxylans (GAX) were obtained from oat spelt as previously described.³⁴ Briefly GAX were extracted from oat spelts with 5% (w/v) NaOH at 90 °C and further purified by washing with methanol/water (60/40, v/v), methanol and ether. ClO₂ bleaching was then carried out at 70°C for 3 hours, water-soluble GAXs were then recovered by centrifugation.

Basically, the analytical and structural characterization of the GAX sample indicated an average molecular weight of 22,650 g/mol, an arabinose/xylose ratio of 0.23 and a 4-methyl glucuronic acid content of 8.2% The lignin content was estimated to 4.9% using the Klason procedure.³⁴

Endo-β-1,4-xylanase (Tx-Xyl)

The thermostable GH11 endoxylanase (Tx-Xyl) was produced from *Thermobacillus xylanilyticus* and purified to homogeneity using a two-step chromatographic procedure (ion-exchange (Q Sepharose fast flow) followed by hydrophobic interaction (phenyl Sepharose CL4B) chromatography) according to the previously established protocol.²⁶ The specific activity of the pure protein was 2000 IU/mg protein, where one IU is defined as the amount of endoxylanase required to release 1 μ mol of reducing xylose equivalent from birchwood xylan per min at 60° C.

Fluorescence probe study of GAX aggregation

Fluorescence spectroscopy of pyrene was used to probe GAX self-aggregation. Pyrene is a hydrophobic molecule whose fluorescence properties depend on the polarity of the environment. Following excitation at 335 nm wavelength, the emission spectra of pyrene showed vibronic peaks at 372 nm (intensity I_1) and 382 nm (intensity I_3). The change in I_1/I_3 ratio is sensitive to the hydrophobicity of pyrene's environment (for example, I_1/I_3 is equal to 0.6 in hexane, to 1.3 in methanol and to 1.7 in water) and was used to examine the aggregation behaviour of GAX and to estimate the critical concentration of aggregation (CAC). For this purpose, solutions of increased concentration of GAX (0.1 to 10 g/L) dissolved in water were mixed with pyrene (5×10⁻⁷ M final concentration) and absorption spectra were recorded on a Perkin Elmer LS50B spectrofluorimeter.

Synthesis of carbohydrates-lignin complexes (GAX-DHP)

Coniferyl alcohol (4-hydroxy-3-methoxy cinnamyl alcohol) used in the synthesis of GAX-DHP complexes was prepared according to the procedure described by Ludley and Ralph.³⁵ Dehydrogenation Polymers (DHPs, lignin model compounds) were synthesised by oxidative polymerisation of coniferyl alcohol (1 g/L) using horseradish peroxidase (Sigma) and hydrogen peroxide in presence of glucuronoarabinoxylan (GAX) (1 g/L) as described previously.²⁵ Two polymerisation modes were used according to the speed of reagent addition: bulk (Zulaufverfahren or ZL) mode consists in the simultaneous adding of all reactants whereas in the end-wise (Zutropfverfahren or ZT) polymerisation, reactants were added gradually (dropwise). Both polymerisation methods yielded stable colloidal suspensions of GAX-DHP complexes.

Endoxylanase assays

Enzyme-mediated hydrolysis of free delignified GAX and GAX-DHP complexes was carried out at 60°C, under continuous stirring. To determine maximal hydrolysis rates, samples were incubated with a large excess of Tx-Xyl (2 IU/mg GAX), whereas kinetic studies were performed using limiting amounts of Tx-Xyl (0.05 IU/mg GAX) in order to monitor the enzyme action pattern on each substrate. For all tests, substrates were pre-

incubated at 60°C for 15 min before Tx-Xyl was added. After, aliquots were removed from the reaction mixture at regular intervals, boiled for 15 min to inactivate Tx-Xyl and submitted to both HP-SEC and reducing sugar analyses.

Determination of hydrolysis rates

The rates of hydrolysis of GAX and GAX-DHP complexes were determined by measuring the amount of reducing sugars (xylose and xylo-oligosaccharides) released by the endoxylanase. Reducing sugars were quantified as alditol acetates using gas-liquid chromatography according to the procedure developed by Courtin et *al.*³⁶ except that samples were hydrolysed using sulphuric acid (1 M final concentration) at 100°C for 2h and dichoromethane was used to extract alditol acetates. Chromatographic analysis was performed using a gas chromatograph (GC Hewlett Packard 6890A) equipped with an auto-sampler and a flame ionizing detector. Separation of alditol acetates was achieved at 220°C on a Supelco Sp-2380 polar column (0.25 mm × 30 m) using He (at 1 bar) as the carrier gas. Detection and injection were performed at 250°C. Appropriate mixtures of monomeric reducing sugars were used for calibration and inositol was included as the internal standard.

Multidetector size exclusion chromatography (HP-SEC/MALLS)

High performance size exclusion chromatographic (HP-SEC) system was connected on line to a UV detector (Waters 2996), a refractive index detector (RI) (Waters 410) and a multiangle laser light scattering (MALLS) detector (Dawn MALLS ; 632.8 nm ; Wyatt corporation). The MALLS detector, working simultaneously at 18 angles, was equipped with nine interference filters (on odd numbered detectors) with a bandwidth of 1 nm. Chromatographic separation of 100-200 μ L injected solutions (filtered on 0.45 μ m PTFE filter) was performed with two elution systems: NaNO₃ solution (50 mM) containing 0.02% NaN₃ and a mixture of dimethyl sulfoxide (DMSO)/water (90:10) containing 50 mM of LiBr (abbreviated as DMSO). When using the aqueous eluent, thermostatically controlled (50°C) shodex OH pack (802, 803 and 805) (each 4.6 x 300 mm) columns set were use. (Flow rate of 1 mL/min). In the DMSO eluent system SHODEX KD (802, 804, 806M) (each 8 x 300 mm) columns set were used at 50°C (flow rate of 0.5 ml/min). For the analysis of GAX-self aggregates the aqueous nitrate solution was employed and samples displayed concentrations from 0.1 to 5.0 g/L. The software used (Astra for Windows 4.73, Wyatt technology, Santa Barbara, CA) allowed on-line data collection during HP-SEC runs, as well as calculation of the molecular weights (M_w) and the root mean square radii of gyration (r.m.s) distributions and averages.

The sample recovery rates after HP-SEC analysis were determined as the ratio of the eluted mass (determined according to RI signal and known dn/dc values ³⁷) and the injected mass. Chromatographic yields range about or higher than 50%.

Transmission electron microscopy (TEM)

Droplets of sample suspensions were deposited on glow-discharged carbon-coated grids. The liquid in excess was blotted away with filter paper and a drop of 2% (w/v) uranyl acetate negative stain was added prior to drying. Samples were observed using a Philips CM200 microscope operating at 80 kV. Images were recorded on Kodak SO163 films. The negatives were digitized off-line with a Kodak Megaplus CCD camera and the particle diameter was measured using the ImageJ software.

Results and discussion

Characterization of GAX self-aggregation

Isolated xylans, are rarely perfectly "soluble" in a thermodynamic sense.³⁸ Indeed, several studies have reported that even water extractible xylans undergo temperature and/or concentration-dependant self-association in aqueous solution which gives rise to interchain aggregation.³⁹⁻⁴⁴ Therefore, we first investigated the aggregation behavior of water soluble glucuronoarabinoxylan (GAX). To achieve this, aqueous solutions of GAX (in 50 mM NaNO₃) displaying increasing concentrations (0.1 -5g/L) were analyzed using HP-SEC/MALLS. Only four concentrations (0.25; 0.75; 1 and 5 g/L) were selected and depicted on figure 1.

Refractive index (RI) monitoring revealed that a single relatively monodisperse GAX polymer (at V_e = 23 mL) was present (Figure 1), even though some small peaks were also eluting around V_e = 28 mL and would correspond to small fraction of oligosaccharides. The intensity of the RI signal increased proportionally with increasing GAX concentrations. At 1 g/L, a slight shoulder was observed in the RI signal towards lower elution volumes (at V_e = 18-

19 mL) and an additional small shoulder appeared (at V_e = 16 mL) at the highest GAX concentration (5 g/L). These latter ones correspond to minor GAX populations (approximately 15% of the total GAX) that are weakly detected using the RI detector. However, using MALLS detection, these minor populations provided strong signals, indicating that they are high molecular weight species, probably arising from polymer aggregation. Interestingly, Saake et al.^{42,44} have already described similar results for several types of extracted xylans. These authors reported the tendency of xylans to self-associate and suggested that this aggregation behavior was promoted by lignin impurities. However, in our case, GAX were obtained after extensive ClO_2 bleaching of water extracted oat spelt xylans and the final lignin content was rather low (4.7% w/w).³⁴ Furthermore, the GAX samples did not show any significant UV absorbance over the whole separation range, even when the DMSO mobile phase was used (data not shown). Therefore, we suggest that the presence of small amount of lignin would not be the main promoter of GAX aggregation in this study. Other mechanisms could explain this behavior: ubiquitous intermolecular hydrogen bounds between linear portions of polysaccharide chains ^{40,45} and/or hydrophobic interactions between hydrophobic moieties present on the hydrophilic main chain.

The occurrence of hydrophobic interactions between hydrophobic groups of the polysaccharide is a frequent explanation for the self assembly of polymers in aqueous solutions. Sugget et al. ⁴⁶ proposed that by adopting certain conformations, polysaccharides can generate apolar surfaces that are capable of interacting with each other, as well as with non polar substances. This prompted Shigematsu et al. 47 to suggest that hemicelluloses display hydrophobic properties, which have been evidenced using the hydrophobic fluorescent probe, pyrene. The fluorescence vibrational fine structure of this molecule is sensitive to alterations in environmental polarity,⁴⁸ thus the pyrene I_1/I_3 ratio method has been widely used to characterize micellar structures in surfactant solutions.⁴⁹ Therefore, in this study we used pyrene to probe GAX aggregate formation. The emission spectra of pyrene with different concentrations of GAX were analyzed (spectra not shown). The plot of I_l/I_3 ratio as function of GAX concentration is depicted in Figure 2 and shows a biphasic linear decrease around the GAX concentration of 1 g/L. At GAX concentrations below to 1 g/L, the pyrene I_1/I_3 value is quite stable (1.65) and is indicative of a polar environment. However, at higher GAX concentrations, the I_1/I_3 ratio rapidly decreases, showing that the environment has become more hydrophobic. These results clearly indicate that at concentrations ≥ 1 g/L, GAX form inter-chain aggregates through hydrophobic interactions. The critical aggregation concentration (CAC), determined from the intersection point between the two linear parts of the plot, is estimated at 0.8 g/L.

This value is quite comparable with the one reported by Barakat et *al.* ⁵⁰ using arabinoxylans that display a molar mass of 75,000 g/mol and an arabinose/xylose ratio of 0.35. Overall, these results are in agreement with the conclusions derived from the HP-SEC study of GAX and were confirmed by TEM. Images of a 1 g/L GAX negatively stained solution showed polydisperse spindle-like objects with a length typically varying from 20 to 50 nm, as well as bulkier (but not longer) particles that may correspond to aggregates of spindles (Figure 3).

Endoxylanase action pattern on GAX self-aggregates

To investigate the impact of GAX self-aggregates on endoxylanase action pattern, the action of small amount of Tx-Xyl (0.05 IU/GAX mg) on a concentrated GAX solution (5 g/L >CAC) was evaluated using HP-SEC/MALLS analysis.

The HP-SEC profiles obtained at different reaction times perfectly allowed monitoring of the evolution of both the polymer fraction as well as the aggregate fraction of the GAX sample all along the enzymatic reaction. However, for reason of clarity, the profiles obtained at 4 reaction times (0 min- 30 min- 2h- 7h) were selected and represented in Figure 4. The RI signal shows a progressive shift of the elution profiles to lower molar masses during the course of enzyme-mediated hydrolysis that is indicative of GAX depolymerization and the formation of low molecular weight products. After 7h of incubation, a residual polymeric fraction (at V_e = 20-24 mL) remained recalcitrant to the Tx-Xyl action. Even after a longer incubation time (24h, data not shown), the same residual fraction was observed, yet the enzyme remains active all along the whole reaction duration.²⁷ This recalcitrance might be due to inaccessibility of some polymer regions, most likely as a result of their substitution pattern. Indeed, the side chain substitutions on the xylose backbone are known to impede the action of GH11 endoxylanases.⁵¹

The evaluation of LS signal shows a continuous decrease of the scattered intensity indicating that GAX aggregates were also affected by the endoxylanase action. The multiangle laser light scattering system (MALLS) enables determination and monitoring of average molecular weight $(\overline{M_w})$ and root mean square radius of gyration $(\langle S^2 \rangle^{1/2})$ distributions, from the angular dependence of the scattered light. These data provide information about the macromolecular and solution hydrodynamic properties of polymer

samples.⁵² Table 1 summarizes the $\overline{M_w}$ and $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ values measured for the GAX aggregates at different reaction times. Both parameters progressively decreased all along the enzymatic reaction, revealing that Tx-Xyl affects the macromolecular shape of the GAX aggregates. The molecular density (ρ) of the aggregates also decreased after 7h of reaction, which evidenced a conformational alteration of these structures.

Therefore, these data suggest that Tx-Xyl can act on GAX chains involved in aggregates, and are in a good agreement with the efficiency of this enzyme to degrade solid substrates and polymers.²⁸⁻³⁰ Xylan disruption of these chains would then induce a conformational alteration of the GAX aggregates from dense structures to more extended polymers.

In conclusion, these results indicate that the Tx-Xyl action indirectly induces a physical effect that provokes disaggregation of the initial GAX aggregated particles as a result to the chemical effect of the enzyme on GAX polymer chains (polymer hydrolysis).

Endoxylanase action pattern on carbohydrate-lignin model complexes (GAX-DHP)

To investigate the impact of lignin-carbohydrate interactions on Tx-Xyl action, we prepared GAX-DHP complexes according to two *in vitro* peroxidase-mediated lignin polymerization methods. The first one ("Zulaufverfahren", ZL method) consists in the simultaneous adding of all reactants (coniferyl alcohol, hydrogen peroxide), whereas in the later one ("Zutropfverfahren", ZT method), reagents are slowly added at a controlled flow rate. Reactions were conducted using synthesis conditions and reactants strictly similar to our previous study.²⁵ Previously, we have shown that ZL and ZT methods allowed the recovery of two complexes (GAX-DHP_{ZL} and GAX-DHP_{ZT}) that display different organization patterns and bonding modes. Accordingly, ZL polymerization leads to the formation of GAX-DHP_{ZL} complex mainly characterized by non covalent intermolecular bonds, while ZT polymerization provides a mainly covalently bonded GAX-DHP_{ZT} complex displaying LCC bonds.²⁵

LCCs, as introduced by Bjorkman et *al.*³ are defined as covalent associations that contain both hydrophilic carbohydrates and hydrophobic lignin resulting in the formation of micellar structures in solution.⁵³ Using NMR analysis, we have previously demonstrated the existence of benzyl ether linkages between GAX and DHP_{ZT} molecules involving the C₅ hydroxyl group of the L-arabinosyl moieties and the α carbon of the lignin-like polymer resulting in LCC

formation. On the contrary, in GAX-DHP_{ZL} complexes would mainly involve non covalent hydrophobic interactions between the two components.²⁵

1. Size exclusion chromatography

GAX-DHP synthesis systems that had been incubated for 1 hour with a large excess of Tx-Xyl (2 IU/mg GAX) were analyzed using HP-SEC with on line RI and UV detectors. Two different mobile phases were used in order to achieve complete and detailed identification of the populations present in solution: nitrate eluent (50 mM, NaNO₃) and DMSO/water (9/1) containing 50 mM of LiBr (abbreviated as DMSO). This polar solvent containing the chaotropic salt LiBr can solubilize both lignin and GAX and also dissociate the non covalent interactions. ^{44,54}

Figures 5a and 5b show the polydisperse elution profiles of untreated GAX-DHP samples that were obtained using the aqueous mobile phase. In the case of GAX-DHP_{ZL}, a major GAX polymer fraction was eluted at 23 mL and two other higher molar mass populations displaying both RI and UV signals were eluted at 16 mL and 19 mL. A homologous fraction was also eluted close to 19 mL in the case of GAX-DHP_{ZT}. Since DHPs are the only UV-absorbing components but are at the same time insoluble in the aqueous eluent, it can be assumed that these fractions correspond to micellar hydrosoluble populations that are formed by the association of GAX chains and DHP molecules. The lower HP-SEC recovery (calculated according to RI signal and known dn/dc value) obtained in the case of GAX-DHP_{ZT} system (47%) compared to GAX-DHP_{ZL} (65%) may suggest the presence of larger and more complex associated structures.

Figure 6 shows the HP-SEC elution profiles obtained using DMSO solvent. Two distinct populations are clearly visible in the case of GAX-DHP_{ZL} synthesis as previously reported ²⁵ (Figure 6a). The first one, which eluted at the lower molar masses (at V_e = 45 mL) and provided a strong UV absorbance, was almost certainly DHP molecules, whereas the second one (eluted at 38 mL and only detected by RI detector) was likely to be the GAX fraction. On the other hand, in the case of GAX-DHP_{ZT} system, the elution curve indicates the occurrence of high molar mass components (at 30 mL) that display both RI and UV signals, which could be attributed to covalent lignin-carbohydrate complexes (LCCs) (Figure 6b). As previously discussed, ²⁵ this conclusion was supported by detailed analysis of the ratio between the RI and UV signal that indicates the presence of non- UV absorbing materials (i.e. GAX) in the

peak eluted at 30 mL and that is in favour of LCC formation rather than a high molecular weight fraction of DHP. Covalent linkages in the ZT reaction involving ether bonds between GAX moiety and the α carbon of the lignin monomer were confirmed by ¹³C NMR.²⁵ It is noteworthy that the GAX-DHP_{ZT} complexes are present in both SEC systems, whereas the GAX-DHP_{ZL} complexes only occur in the aqueous eluent. This underlines the previously discussed fact that GAX-DHP_{ZT} complexes are due to covalent bonds while GAX-DHP_{ZL} complexes are mostly based on non-covalent interactions which can not withstand the DMSO solvent system. ²⁵ Overall, HP-SEC analyses of the two GAX-DHP complexes reveal that both contain a mixture of free GAX chains with non covalent GAX-DHP_{ZL} complexes in the case of ZL reaction and covalent GAX-DHP_{ZT} complexes in the case of ZT reaction.

Following a 1h treatment of the two GAX-DHP complexes using a large excess of enzyme, HP-SEC elution curves of both ZL and ZT systems using aqueous and polar solvent showed a decreased intensity of the RI signal that corresponds to the GAX fraction (Figures 5c, 5d, 6c and 6d). A shift to lower molar masses was also observed indicating the enzymatic degradation of the GAX free chains into low molecular weight and oligomeric products. However the elution volumes of the peaks corresponding to GAX-DHP complexes remained unchanged for both ZL and ZT systems (Figure 5a-d), suggesting that these fractions were not apparently affected by the Tx-Xyl action. In the case of GAX-DHP_{ZT}, the intensity of the RI and UV signals of GAX –DHP complex show a slight increase using the two elution systems. Although very modest, this increase could indicate that enzyme-mediated disruption of GAX provoked a reorganization of the GAX fraction.

2. Morphology and Size distribution

In-depth investigation of supramolecular organization patterns and morphology of the GAX-DHP complexes, before and after enzymatic treatment, was achieved by TEM imaging. Figure 7 shows typical images of negatively stained preparations that indicate rather different morphologies for the two GAX-DHP complexes. The GAX-DHP_{ZL} complexes appear as individual spherical particles (Figure 7a) surrounded by an external material whose morphology resembles to that of GAX self-aggregates previously shown in Figure 3. GAX-DHP_{ZT} assemblies are composed of more or less associated smaller spheroidal units (Figure 7b). This self-association may partly be promoted by staining and/or drying of the suspension

during the negative staining procedure. However, similar morphological features have been reported for aqueous solutions of preparations containing LCCs, either in synthetic model systems ³⁷ or for lignin-carbohydrate fractions isolated from birch wood.⁵⁵ In the former case, cryo-TEM images of fast-frozen thin films of heteroxylan-DHP particles confirmed that a partial aggregation existed in solution.³⁷

Based on previous studies,²⁵ it is probable that the observed GAX-DHP_{ZT} aggregates are built up by gradual nucleation/incorporation of the nascent "lignin-like" polymers (DHP_{ZT}) that are linked with the GAX chains via covalent linkage. Moreover, the nucleophilic addition of carbohydrate to the β -O-4 type quinone methide intermediate during the ZT polymerization has been proposed as the mechanism for the formation of the lignin-carbohydrate linkage.²⁵ In conclusion, covalent GAX-DHP_{ZT} systems are structurally more complex than GAX-DHP_{ZL} complexes and than previously described "non- lignified" GAX self-aggregates. Uraki et al.⁵⁵ recently proposed a core-shell structure of fractions containing LCCs with lignin moieties forming the hydrophobic core and hydrophilic polysaccharides forming an external corona. Recent data obtained from the characterization of heteroxylan-DHP_{ZT} nanoparticles using static and dynamic light scattering and atomic force microscopy (AFM) strongly support such core-corona supramolecular organization.⁵⁶

After treatment with a large excess of Tx-Xyl, the changes in the general morphology were rather similar for GAX-DHP_{ZL} and GAX-DHP_{ZT} (Figure 7c and 7d). In both cases, the enzyme action resulted in a significant smoothing effect of the particle surface. Since endoxylanases are xylan specific enzymes, the roughness of the intact particles would likely correspond to the presence of GAX chains. The enzyme would thus proceed by a breakdown of these external GAX chains. In the case of GAX-DHP_{ZL}, the material surrounding the particles was almost completely removed (Figure 7c).

Size distribution histograms of the GAX-DHP particles, determined before and after Tx-Xyl treatment by measuring the particle diameter from TEM images, are shown in Figure 7. The outline of each particle was fitted to an equivalent ellipse and the number and weight average diameters ($\overline{D_n}$ and $\overline{D_w}$, respectively), as well as polydispersity index P_d were calculated using the expressions described elsewhere.⁵⁷ Considering that we do not really know the softness of the particles with precision, a possible deformation after staining and drying cannot be totally excluded. However, Barakat et al.³⁷ have shown that the diameters of negatively stained and fast-frozen heteroxylan-DHP particles were rather similar. Consequently, although the mean values that we measured from TEM images may not exactly be those of the particles in solution, the particle size before and after the enzyme treatment can be relatively compared.

The values summarized in Table 2 clearly show the size differences between the two systems. The GAX-DHP_{ZL} particles are almost 4 times larger than GAX-DHP_{ZT} particles ($\overline{D_n} = 128.1$ nm and 32.8 nm, respectively). The polydispersity indexes reveal that both initial GAX-DHP particles are relatively homogeneous in diameter. In the case of GAX-DHP_{ZL} particles, the apparent particle dimensions ($\overline{D_n}$ and $\overline{D_w}$) decreased after the Tx-Xyl treatment, most likely as a result of the hydrolysis of external GAX chains. Conversely, following Tx-Xyl action the apparent diameters of GAX-DHP_{ZT} particles slightly increased ($\overline{D_n}$ increases from 32.8 to 38.2 nm), probably as a result of a self-aggregation of the LCC rich complexes. At the difference of GAX-DHP_{ZL} particles, this could be explained by a limited accessibility of the enzyme to the GAX fraction.

3. Enzymatic hydrolysis rates

The hydrolysis extent of GAX-DHP_{ZL} and GAX-DHP_{ZT} samples was monitored as function of reaction time using a reducing sugar assay (Figure 8). The final yield, estimated after 1h of reaction with a large excess of enzyme (2 IU/mg GAX), revealed that, when compared to Tx-Xyl treatment of free GAX, 24.5% (\pm 3.9%) and 33% (\pm 0.6%) less reducing xylose equivalents were released from GAX-DHP_{ZL} and GAX-DHP_{ZT} respectively. These results highlight and confirm the general negative impact of lignin (DHPs) on xylanase-mediated GAX degradation but reveal that this phenomenon occurs irrespective of the exact nature of the interactions between GAX and DHPs. Therefore, a covalent lignin-carbohydrate bond is not a pre-requisite for the restrictive impact of lignin on enzyme action as previously suggested.⁵⁸ However, xylanase was less efficient on GAX-DHP_{ZT} whose assembly involves covalent interactions.

It is important to note that the two polymerisation modes that were used to prepare the GAX-DHP complexes not only give rise to different interactions between the GAX and the DHPs, but they also generate different DHP polymer structures. Indeed, rapid bulk (ZL) polymerization, which is likely to be representative of the earliest stages of lignification, favours C-C coupling of monolignols into highly branched polymers, whereas gradual endwise (ZT) polymerization, that probably reflects processes that occur at latter stages favours β -O-4 coupling of monolignols into relatively linear polymers.¹ Therefore, the fact that Tx-Xyl is inhibited in both cases indicates that the pattern of inter-monomer linkage is not a critical determining factor either. In their studies on enzymatic degradability of cell wall

model systems (DHP-CW) obtained by *in situ* polymerization of coniferyl alcohol into primary maize cell walls, Grabber et al.⁵⁹ have also concluded that DHP-CW degradability using enzyme cocktails was not influenced by the mode of coniferyl alcohol polymerization, since they have observed similar effects with lignin (DHPs) formed by "bulk" or "end-wise" polymerization.

However, in addition to the divergence in the lignin structure, the mode of monolignols polymerization determines lignin-carbohydrate interactions of different nature and consequently results in distinct supramolecular assemblies, as it has been evidenced for GAX-DHP_{ZL} and GAX-DHP_{ZT} complexes. Interestingly, both systems have the same DHP content, but a lower hydrolysis yield is obtained in the case of GAX-DHP_{ZT} complexes. This could be manifestly explained by the complexity of the supramolecular organization of these systems. The occurrence of intimate intra- and inter- connections between lignin and GAX within the LCCs may enhance entrapment of GAX and induce a steric hindrance, thereby limiting the accessibility of the polysaccharide chains to the endoxylanase.

4. Kinetic assay

To ascertain the extent to which the supramolecular organization and thus substrate (GAX) accessibility affects Tx-Xyl action pattern, kinetic analyses were performed on GAX, GAX-DHP_{ZL} and GAX-DHP_{ZT} as substrates and limiting amounts of enzyme (0.05 IU/mg of GAX). The extent of enzymatic hydrolysis of GAX fraction in each sample was monitored as a function of incubation time, using HP-SEC analysis operating in aqueous conditions.

Figure 9 shows the HP-SEC profiles after different reaction times. After 7h, the free GAX fraction is extensively hydrolyzed whereas this fraction (at $V_e = 22$ mL) appears to be unaffected by Tx-Xyl action in the GAX-DHP_{ZT} system, and is partially hydrolyzed in the GAX-DHP_{ZL} complex. Considering that all enzymatic reactions were performed with a high substrate to enzyme ratio, the results indicate that Tx-Xyl was hampered either by a potential catalytic inhibition or by substrate inaccessibility or both. Additional studies are required to determine the relative importance of these mechanisms. Nevertheless, in the case of GAX-DHP_{ZT} systems, the almost total absence of Tx-Xyl activity is presumably due to GAX inaccessibility, because any true inhibitory effects would have been identical for both GAX-DHP_{ZT} and GAX-DHP_{ZL} systems. Such substrate inaccessibility could be the result of polysaccharide entrapment within the LCCs or of non-productive binding of the enzyme to the DHP compound.

Conclusion

Using *in vitro* reconstituted systems displaying increased complexity, we have been able to provide new insights on the mechanism of endoxylanase action at a supramolecular level.

First, the Tx-Xyl action pattern on glucuronoarabinoxylan (GAX) self-aggregates revealed an interesting "disaggregating" effect as a result to the well known depolymerization mechanism of this endoglycoside hydrolase. Then the use of *in vitro* reconstituted ligninglucuronoarabinoxylan (GAX-DHP) nanocomposites provided evidence that the way in which cell wall polymers are interconnected can impact on the enzymatic process, in addition to the restriction due to DHP. We show that the supramolecular organization of the lignincarbohydrate complexes, which is a direct consequence of interactions that occur between the two components, influences the enzyme action pattern. Principally, Tx-Xyl action is restricted to the peripheral carbohydrate chains of the GAX-DHP micellar structures. Even though a covalent lignin-carbohydrate bound (LCC) within the GAX-DHP_{ZT} assemblies is not a perquisite for the restrictive action of lignin, these associations severely hamper the access of the enzyme to GAX. With regard to the extrapolation of these observations for the analysis of biomass conversion scenarios, a certain amount of prudence is necessary. This is because, when compared to naturally occurring lignin, the 'lignin-like' DHP polymers are structurally different and rather simple.⁶⁰ In addition, the complexes would only mimic part of the structures encountered in lignified cell walls. However, the fundamental observations of enzyme inhibition, substrate inaccessibility and enzyme-induced supramolecular structural reorganization are all phenomena that should be pinpointed as obstacles for the bioconversion of lignocellulosic biomass. Further investigations of enzyme inhibition and/or non-productive binding by phenolic components are under progress in order to get a more comprehensive view on the way lignin affects the enzymatic conversion of lignocelluloses. All these considerations should be helpful in designing and engineering of more "adapted" and effective new enzymatic tools.

References

Sarkanen, K. V. In *Lignins, occurrence, formation, structure and reactions*. Sarkanen,
 K. V., Ludwig, C. H., Eds.; Wiley-Interscience: New York., **1971**

- (2) Atalla, R. H. Abstracts of Papers of the American Chemical Society 1996, 211, 24.
- (3) Björkman, A. Svensk Papperstidning **1957**, 60, 243-251.
- Mooney, C. A.; Mansfield, S. D.; Touhy, M. G.; Saddler, J. N. *Biores. Technol.* 1998, 64, 113-119.
- (5) Sutcliffe, R.; Saddler, J. N. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **1986**, *17*, 749-762.
- (6) Sharma, A.; Milstein, O.; Vered, Y.; Gressel, J.; Flowers, H. M. *Biotechnol. Bioeng.* 1985, 27, 1095-1101.
- Senior, D. J.; Mayers, P. R.; Breuil, C.; Saddler, J. N. In: Kirk, T.K., Chang, H.-M.(Eds.), Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture. Butterworth-Heinemann, Boston, MA 1990, 169-182.
- Berlin, A.; Balakshin, M.; Gilkes, N.; Kadla, J.; Maximenko, V.; Kubo, S.; Saddler, J. *J. Biotechnol.* 2006, 125, 198-209.
- (9) Pan, X. J. Biobased Mater. Bioenergy **2008**, 2, 25-32.
- (10) Chandra, R. P.; Bura, R.; Mabee, W. E.; Berlin, A.; Pan, X.; Saddler, J. N. Adv Biochem. Engin./Biotechnol. 2007, 108, 67-93.
- (11) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Lapierre, C.; Barriere, Y. Comptes Rendus Biologies 2004, 327, 455-465.
- (12) Akin, D. E. Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofp 2008, 2, 288-303.
- (13) Zhu, L.; O'Dwyer, J. P.; Chang, V. S.; Granda, C. B.; Holtzapple, M. T. *Bioresource Technol.* 2008, 99, 3817-3828.
- Eriksson, J.; Malmsten, M.; Tiberg, F.; Callisen, T. H.; Damhus, T.; Johansen, K. S. Colloid Interf. Sci. 2005, 284, 99-106.
- (15) Ciolacu, D.; Ciolacu, F.; Dumitriu, R.; Vasile, C.; Popa, V. I. Cell. Chem. Technol. 2007, 41, 37-42.
- (16) Ciolacu, D.; Ciolacu, F.; Popa, V. I. Macromol. Symp. 2008, 272, 136-142.
- (17) Ahola, S.; Turon, X.; Osterberg, M.; Laine, J.; Rojas, O. J. *Langmuir* 2008, 24, 11592-11599.
- (18) Higuchi, T.; Ogino, K.; Tanahashi, M. Wood Res. 1971, 51, 1-11.
- (19) Ohnishi, J.; Watanabe, N.; Koshijima, T. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1185-1190.
- (20) Ralph, J.; Helm, R. F.; Quideau, S.; Hatfield, R. D. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1992, 1, 2961-2969.
- (21) Terashima, N.; Atalla, R. H.; Ralph, S. A.; Landucci, L. L.; Lapierre, C.; Monties, B. *Holzforschung* **1995**, *49*, 521-527.

- (22) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D.; Quideau, S.; Kuster, T.; Pell, A. N. J. Agri. Food Chem. 1996, 44, 1453-1459.
- (23) Touzel, J. P.; Chabbert, B.; Monties, B.; Debeire, P.; Cathala, B. J. Agri. Food Chem.
 2003, 51, 981-986.
- (24) Cathala, B.; Rondeau-Mouro, C.; Lairez, D.; Belval, F. B.; Durand, H.; Gorrichon, L.;
 Touzel, J. P.; Chabbert, B.; Monties, B. *Plant Biosystems* 2005, *139*, 93-97.
- (25) Barakat, A.; Winter, H.; Rondeau-Mouro, C.; Saake, B.; Chabbert, B.; Cathala, B. *Planta* **2007**, *226*, 267-281.
- (26) Debeire-Gosselin, M.; Loonis. M.; Samain, E.; Debeire, P. In: Xylans and Xylanases
 (Visser. J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M. A., and Voragen, A. G. J., Eds.).
 Elsevier Science Publishers 1992, 463-466.
- (27) Harris, G. W.; Pickersgill, R. W.; Connerton, I.; Debeire, P.; Touzel, J.-P.; Breton, C.; Pérez, S. Proteins 1997, 29, 77-86.
- Beaugrand, J.; Chambat, G.; Wong, V.; Goubet, F.; Remond, C.; Paës, G., Paës, G., Benamrouche, S., Debeire, P., O'Donohue, M., Chabbert, B. *Carbohydr. Res.* 2004, 339, 2529-2540.
- (29) Benamrouche, S.; Crônier, D.; Debeire, P.; Chabbert, B. J. Cereal Sci. 2002, 36, 253-260.
- (30) Lequart, C.; Nuzillard, J. M.; Kurek, B.; Debeire, P. *Carbohydr. Res.* **1999**, *319*, 102-111.
- (31) Zilliox, C.; Debeire, P. Enzyme Microb. Technol. 1998, 22, 58-63.
- (32) Beg, Q. K.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G. S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 56, 326-338.
- (33) Saha, B. C. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2003, 30, 279-291.
- (34) Winter, H.; Barakat, A.; Cathala, B.; Saake, B. *Macromol. Symp.* 2006, 232, 74-84.
- (35) Ludley, F. H.; Ralph, J. J. Agric. Food Chem. 1996, 44, 2942-2943.
- (36) Courtin, C. M.; Van den Broeck, H.; Delcour, J. A. Journal of Chromatography A 2000, 866, 97-104.
- Barakat, A.; Putaux, J. L.; Saulnier, L.; Chabbert, B.; Cathala, B. *Biomacromolecules* 2007, *8*, 1236-1245.
- (38) Westbye, P.; Kohnke, T.; Glasser, W.; Gatenholm, P. *Cellulose* **2007**, *14*, 603-613.
- (39) Lebel, R. G.; Goring, D. A. I.; Timell, T. E. J. Polymer Sci. Part C: Polym. Symp. 1963, 2, 9-28.
- (40) Blake, J. D.; Richards, G. N. Carbohydr. Res. 1971, 18, 11-21.

- (41) Ebringerová, A.; Hromádková, Z.; Alföldi, J.; Berth, G. *Carbohydr. Polym.* 1992, 19, 99-105.
- (42) Esker, A.; Becker, U.; Jamin, S.; Beppu, S.; Renneckar, S.; Glasser, W.; In Hemicelluloses: science and technology; Gatenholm, P., Tenkanen, M. e., Eds.; ACS Symp., 2004.
- (43) Roubroeks, J.; Saake, B.; Glasser, W.; Gatenholm, P. *In Hemicelluloses: science and technology*; Gatenholm, P., Tenkanen, M. e., Eds.; ACS Symp., **2004**.
- (44) Saake, B.; Kruse, T.; Puls, J. Biores. Technol. 2001, 80, 195-204.
- (45) Linder, A.; Bergman, R.; Bodin, A.; Gatenholm, P. Langmuir 2003, 19, 5072-5077.
- (46) Suggett, A. *In Polysaccharides*; Editor(s): Franks, F., Ed.; Plenum, New York, N. Y
 1975 Vol. 4
- (47) Shigematsu, M.; Goto, A.; Yoshida, S.; Tanahashi, M.; Shinoda, Y. *Mokuzai Gakkaishi* **1994**, *40*, 1214-18.
- (48) Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. J. Am. Chem. Soc. 1977, 99, 2039-2044.
- (49) Winnik, F. M.; Regismond, S. T. A. Colloids Surf. A 1996, 118, 1-39.
- (50) Barakat, A.; Chabbert, B.; Cathala, B. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2118-2125.
- (51) Biely, P.; Vršanska, M.; Tenkanen, M.; Kluepfel, D. J. Biotechnol. 1997, 57, 151-166.
- (52) Wyatt, P. J. Anal. Chim. Acta 1993, 272, 1-40.
- (53) Yaku, F.; Tsuji, S.; Koshijima, T. *Holzforschung* **1979**, *33*, 54-9.
- (54) Ringena, O.; Lebioda, S.; Lehnen, R.; Saake, B. J. Chromatogr A 2006, 1102, 154–163.
- (55) Uraki, Y.; Usukura, Y.; Kishimoto, T.; Ubukata, M. Holzforschung 2006, 60, 659-664.
- Barakat, A.; Gaillard, C.; xe; dric; Lairez, D.; Saulnier, L.; Chabbert, B.; Cathala, B.
 Biomacromolecules 2008, *9*, 487-493.
- (57) Putaux, J.-L.; Buléon, A.; Borsali, R.; Chanzy, H. Int. J. Biol. Macromol. 1999, 26, 145-150.
- (58) Sewalt, V. J. H.; Glasser, W. G.; Beauchemin, K. A. J. Agric. Food Chem. 1997, 45, 1823-1828.
- (59) Grabber, J., H.,; Hatfield, R. D.; Ralph, J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 4984-498.
- (60) Saake, B.; Argyropoulos, D. S.; Beinhoff, O.; Faix, O. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 499-507.

Figures



Figure 1: HP-SEC/MALLS elution curves in aqueous system of increased concentration GAX solutions (0.25; 0.75; 1 and 5 g/L) (——): Refractive index (RI signal); (-----): Light Scattering (LS signal).



Figure 2: I_1/I_3 ratio of vibronic bands intensities of pyrene as function of increased GAX concentrations.



Figure 3: TEM images of a negatively stained preparation from a GAX solution (1 g/L). Scale bars: 100 nm (main image) and 50 nm (inset).



Figure 4: – HP-SEC elution curves during Tx-Xyl-mediated hydrolysis GAX (5g/L) at 0 min, 30 min, 2 h and 7 h time reaction. (——): Refractive index (RI signal); (-----): Light Scattering (LS signal).



Figure 5: HP-SEC elution profiles in aqueous system of GAX-DHP model systems: - before Tx-Xyl treatment (a) GAX-DHP_{ZL}, (b) GAX-DHP_{ZT} - after 1h Tx-Xyl treatment (c) GAX-DHP_{ZL}, (d) GAX-DHP_{ZT}. (——): Refractive index (RI signal); (-----): Ultraviolet (UV signal).



Figure 6: HP-SEC elution profiles in DMSO of GAX-DHP model systems: - before Tx-Xyl treatment (a) GAX-DHP_{ZL}, (b) GAX-DHP_{ZT} - after 1h Tx-Xyl treatment (c) GAX-DHP_{ZL}, (d) GAX-DHP_{ZT}. (-----): Refractive index (RI signal); (------): Ultraviolet (UV signal).



Figure 7: TEM images of negatively stained GAX-DHP particles and corresponding sizedistribution histograms: (a) GAX-DHP_{ZL} and (b) GAX-DHP_{ZT} before Tx-Xyl treatment; (c) GAX-DHP_{ZL}, (d) GAX-DHP_{ZT} after a 1h Tx-Xyl treatment. Scale bars: 200 nm (main images) and 100 nm (insets).



Figure 8: Hydrolysis rates of GAX (•), GAX-DHP_{ZL} (•) and GAX-DHP_{ZT} (\blacktriangle) by Tx-Xyl (2 IU/mg GAX) as function of reaction time.



Figure 9: Hydrolysis kinetics of GAX (**a**), GAX-DHP_{ZL} (**b**) and GAX-DHP_{ZT} (**c**) by Tx-Xyl (0.05 IU/mg GAX). HP-SEC elution profiles in aqueous system at different reaction time

Tables

Table 1: The impact of Tx-Xyl on the size parameters of the GAX aggregates determined from HP-SEC/MALLS analysis. $\overline{M_w}$: average molecular mass in weight; $\langle S^2 \rangle^{1/2}$: root mean square radius of gyration (nm); and ρ : molecular density ($\rho = \overline{M_w} / N_{A^*} (\langle S^2 \rangle^{1/2})^3$)

Time (min)	$\overline{M_w}$ (g/mol)	$\left< S^2 \right>^{1/2} (nm)$	ρ (g/cm ³)
0	1.21×10^7	55.5	0.17
10	5.27 x 10 ⁶	36.7	-
60	$4.37 \ge 10^6$	36.2	-
120	2.71×10^6	32.2	-
300	$1.20 \ge 10^6$	24.6	-
420	$7.65 \ge 10^5$	23.9	0.09

Table 2: Mean number and weight diameters $(\overline{D_n} \text{ and } \overline{D_w}, \text{ respectively})$, standard deviation (std, in brackets) and polydispersity index (P_d) determined from TEM images of negatively stained GAX-DHP particles before and after Tx-Xyl treatment.

Sample	$\overline{D_n}$ [std] (nm)	$\overline{D_{w}}$ (nm)	P_d
GAX-DHP _{ZL}	128.1 [20.7]	131.7	1.06
GAX-DHP _{ZL} + Tx-Xyl	106.0 [19.4]	114.1	1.07
GAX-DHP _{ZT}	32.8 [7.9]	39.5	1.20
GAX-DHP _{ZT} + Tx-Xyl	38.2 [7.6]	51.3	1.34
Chapitre II

Impact du contenu en lignines et des composés phénoliques solubles sur l'action d'une endoxylanase GH11

Effect of lignin content on a GH11 endoxylanase acting on

glucuronoarabinoxylan-lignin nanocomposites

Imen Boukari^{a,b}, Caroline Rémond^{a,b}, Michael O'Donohue^{c,d,e}, Brigitte Chabbert,^{a,b}*

^a INRA, UMR 614, Fractionnement des AgroRessources et Environnement, F-51686 Reims, France.

^b University of Reims Champagne Ardenne, UMR 614, Fractionnement des AgroRessources et Environnement, F-51686 Reims, France.

^c Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, F-31077 Toulouse, France

^d INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400, France

^e CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

(publication n°2: A soumettre dans *Phytochemistry*)

Effect of lignin content on a GH11 endoxylanase acting on glucuronoarabinoxylan-lignin nanocomposites

Abstract

The effects of lignin content on the activity and action pattern of the GH11 endoxylanase from *Thermobacillus xylanilyticus* were investigated by means of *in vitro* reconstituted non covalent lignin-glucuronoarabinoxylan (GAX-DHP) nanocomposites. Four types of nanocomposites were prepared, each displaying a different lignin content. To vary this parameter, variations in the DHP polymerization process were induced, notably by the increase of monolignol (coniferyl alcohol) concentration. Examination of the morphology of the nanocomposites revealed structures composed of globular particles enrobed in a matrix. The size of the particles increased with the concentration of lignin. Physicochemical characterization of the *in vitro* reconstituted GAX-DHPs strongly suggested that increased particle size is directly related to the solubility and reactivity of the coniferyl alcohol, as reflected by the changes in the amount of β -O-4 linkages. Evaluation of the impact of a GH11 endoxylanase on the GAX-DHP nanocomposites revealed a correlation between the proportion of DHP in the nanocomposites and reduction in enzyme activity. Moreover, the results suggested that the organization pattern of DHP within polysaccharide matrix is an important factor affecting enzyme availability and effectiveness.

Keywords:

Lignin model compounds (DHP) – GH11 endoxylanase – lignin-carbohydrates nanocomposites – particle size – enzyme inhibition – adsorption surface

Abbreviations

CA: coniferyl alcohol, GAX: glucuronoarabinoxylan, DHPs: Dehydrogenation polymers, SEC: Size exclusion chromatography, M_w : weight average molecular weight, THF: tetrahydrofuran.

1. Introduction

Nowadays, lignocellulosic biomass is being promoted as a renewable feedstock for the production of fuels and value-added chemicals. This is because lignocellulosic biomass is extremely abundant (availability in 2050 has been estimated in the range 0.79 - 35 Gtoe/year, according to a recent report of the International Energy Agency)¹ and holds the potential to sustain Society's needs.

Lignocellulosic biomass is a composite material containing three major polymers: cellulose, hemicelluloses and lignins. The proportion of each component relative to others is a determining factor with regard to biomass processing steps and is hence a vital consideration when selecting plant species for use as energy crops.² The carbohydrate components (cellulose and hemicelluloses) are considered to be most useful, because they can be used as feedstock for the production of fuels and chemicals, whereas lignins are usually used for combustion/gasification in order to produce heat and electricity or biofuel oil and gas. Nevertheless, innate small proportion of industrially-produced lignins are used for the manufacture of advanced products, such as polymers, resins, adhesives, etc. ^{3,4}

The bioconversion of biomass into fuels and chemicals involves several operations, including pre-treatment and enzymatic hydrolysis, which aim to deconstruct the biomass into fermentable sugars. Nevertheless enzymatic digestibility of lignocelluloses is largely affected by several limiting factors. Although the determinants of theses limitations have not been unambiguously elucidated, these factors have been traditionally divided into two groups: biomass structural features and enzyme mechanism. ^{5,6}.

Regarding biomass structure, it is established that enzyme accessibility and efficiency are affected by a number of factors, including cellulose crystallinity, the degree of polymerization and substitution of hemicelluloses and lignin content and distribution.^{7,8} Nevertheless, it is generally considered that lignin is the single most important obstacle for biomass-degrading enzymes. Research has shown that biomass digestibility is negatively correlated with the lignin content and can be enhanced with increasing lignin removal through pre-treatments. ^{7,9,10} Several hypotheses have been proposed to account for the negative effects of lignins. First, in plant vascular tissues, lignification of the pre-existing polysaccharide edifice leads to the formation of non covalent and covalent polymer cross-linkages between macromolecules and yields a dense and highly organized network, which is more or less impenetrable by enzymes ^{11,12} Secondly, lignins are also suspected of forming non-specific and non-productive

macromolecular interactions with enzymes, thus hindering enzyme diffusion and/or catalysis.^{13,14}

So far, major advances in the comprehension of lignin effects on cellulases and hemicellulases action have been based on the use of particulate, isolated lignin samples derived from various botanical sources by different extraction methods (organosolv softwood lignins, alkali-extracted lignins...) and/or soluble lignin degradation products produced in industrial applications (pulping liquors...).¹³⁻¹⁵ However, owing to the low solubility of lignins in aqueous systems, the use of organic solvents is usually necessary, which might affect enzyme stability and/or activity. Moreover, the heterogeneous nature and variability of lignocellulosic biomass and the multiplicity of the enzymes needed to degrade it render the study of enzyme inhibition rather difficult, because it is complicated to assess the relative contribution of the multiple limiting factors. Therefore, the use of simplified, biomimetic model systems is an attractive alternative to study the influence of lignins on enzyme action.

Since Feudenberg's pioneering work, ¹⁶ it is commonly held that the lignin formation occurs through an enzyme-initiated, but chemically controlled dehydrogenation reaction, which involves the formation and subsequent polymerization of resonance-stabilized radicals. (Fig.1) In this process at least eleven types of intermonomeric linkages (i.e. β -O-4, β -1, β -5, β - β , 4-O-5, 5-5'...) can be formed. ¹⁷ The dehydrogenation process can be reproduced *in vitro* by the synthesis of Dehydrogenation Polymers (DHPs) generated by oxidative polymerization of monolignols using either peroxidase or laccase ¹⁸ Advantageously, this *in vitro* reaction has been used to study the effects of different physicochemical parameters on the final lignin polymer. For instance, the influence of the addition mode of the reactants (bulk (Zulaufverfahren; ZL) or end-wise (Zutropfverfahren; ZT) mode), the type of monomer used, the oxidizing enzyme, the prevailing pH and the presence (at variable concentrations) of polysaccharides are among the reaction variables that have been investigated. Through these studies, it is known that the synthesis of DHP in the presence of polysaccharides leads to the formation of a colloidal complex, which prevents lignin precipitation.¹⁹⁻²¹

In previous work,²² lignin-glucuronoarabinoxylan (GAX-DHP) nanocomposites were prepared in vitro and studied with regard to the action pattern of a GH11 endoxylanase. To further pursue this goal, we describe here the action of a GH11 endoxylanase on nanocomposites of GAX-DHP that display variable lignin content (DHP). These nanocomposites systems thus allowed studying the impact of lignins being interacting with hemicelluloses rather than single polymer. Moreover, to better appreciate the sole impact of lignins on enzyme hydrolysis, the GAX-DHP complexes synthesized almost free of intermolecular covalent linkages.

2. Experimental

2.1. Materials

Delignified water soluble glucuronoarabinoxylans (GAX) were obtained from oat spelt as previously described, ²³ briefly after extraction with 5% (w/v) NaOH at 90°C, further purification by washing with methanol/water (60/40, v/v), methanol and ether and finally ClO_2 bleaching at 70°C and recovery of water-soluble polymer fraction.

Basically, the GAX sample display an average molecular weight of 22.650 g/mol, an arabinose/xylose ratio of 0.23, a 4-methyl glucuronic acid content of 8.2% and a lignin content estimated to 4.9%.²³

The thermostable GH11 endoxylanase (Tx-Xyl) was produced from *Thermobacillus xylanilyticus* (previously designed *Bacillus* sp. D3) ^{24,25} and purified to homogeneity using a two-step chromatographic procedure (ion-exchange (Q Sepharose fast flow) followed by hydrophobic interaction (phenyl Sepharose CL4B) chromatography) according to the previously established protocol. ²⁶ The specific activity of the pure protein is about 2000 IU/mg protein, where one IU is defined as the amount of endoxylanase required to release 1 µmol of reducing xylose equivalent from birchwood xylan per min at 60°C.

2.2. Synthesis of GAX-lignin (DHP) model complexes

Dehydrogenation polymers (DHP) are synthetic analogues of lignins. They are obtained *in vitro* by oxidative polymerization of lignin monomers. In this study, we synthesize DHP by polymerizing coniferyl alcohol using horseradish peroxidase (HRP type VI, E 1.11.1.7, 250-300 unit/mg, purchased for Sigma. One unit will form 1.0 mg purpurogallin from pyrogallol in 20 s at pH 6.0 at 20 °C) and hydrogen peroxide in presence of glucuronoarabinoxylan (GAX) (4 g/L) according to the Zulaufverfahren method.²⁷

Coniferyl alcohol (CA) (4-hydroxy-3-methoxy cinnamyl alcohol) used in the synthesis was prepared according to the procedure described by Ludley and Ralph.²⁸

Four polymerization experiments were conducted with varying (increasing) CA concentrations. Thus, three solutions were prepared as follow:

- Solution 1: Solution of GAX (4 g/L) in water (pH 5.0).

- Solution(s) 2: 12.5, 50, 200 and 400 mg of CA separately dissolved in 3 mL of dioxane and 9.5 mL of Solution 1.

- Solution 3: 12.5 mL of Solution 1 containing hydrogen peroxide (H_2O_2) (2 eq compared to coniferyl alcohol, 13.5, 50, 200 and 400 µL respectively).

Before polymerization, appropriate amounts of the horseradish peroxidase were added to (4x) 25 mL of Solution 1 (0.5, 2.5, 10 and 20 mg respectively). The reactions were started by adding solutions 2 and 3 simultaneously to solution 1 (50 mL final volume) according to the bulk (Zulaufverfahren or ZL) polymerization method and the mixtures were left to react under continuous stirring for 16 h at 25°C. The synthesis yielded four stable colloidal suspensions of GAX-DHP model complexes: GAX-DHP (4/0.25, w/w), GAX-DHP (4/1, w/w), GAX-DHP (4/4, w/w) and GAX-DHP_{ZL} (4/8, w/w) corresponding to CA concentrations of 0.25, 1, 4 and 8 g/L respectively.

2.3. Extraction of DHP molecules from GAX-DHP complexes

After freeze drying, GAX-DHP complexes were dissolved in dioxane–water (95:5) and soluble DHP molecules were recovered after centrifugation (at 13000 rpm, 10 min). Yields of extractions were 62.7%, 68.3%, 85.4% and 95.4% respectively for GAX-DHP (4/0.25), GAX-DHP (4/1), GAX-DHP (4/4) and GAX-DHP (4/8). DHP fractions were then washed three times with distilled water and freeze dried prior to subsequent analysis by thioacidolysis and size exclusion chromatography (SEC).

2.4. Size-exclusion chromatography (SEC) analysis of DHP samples in THF

Prior to SEC analysis, the dioxane–water extracted DHP fractions were acetylated by a mixture of acetic anhydride and pyridine (1/1, v/v) for 24 h at 40 °C. The reaction products were then poured into ice water and extracted with dichloromethane. Organic layers were washed with dilute hydrochloric acid, saturated sodium bicarbonate solutions and finally water. The organic fractions were dried over magnesium sulphate and concentrated in reduced pressure to give the acetylated DHP_{ZL} samples.

The SEC analyses were performed using a multi-detection system consisting of a pump (model 510, Waters), an auto-sampler (U6K injector, Waters), two Polymer Laboratories (PLgel Mixed D, 5 μ 300×7.5 mm) column and a UV-detector (Waters 2996). Separation was performed in tetrahydrofuran (THF) by injecting 100-200 μ l of acetylated samples (1 g/L) into the thermostatically controlled PLgel columns (40 °C) with a flow rate of 1 mL/min. Detection was carried out at 280 nm. Molar mass evaluation (M_w and M_n) was based on the relative calibration method using polystyrene standards (Shodex Standard SL-105).

2.5. Thioacidolysis

Dioxane–water extracted DHP fractions were degraded by thioacidolysis to estimate the content of β -O-4 linked structures according to Lapierre's procedure.²⁹ The procedure consists in an acid-catalysed solvolysis in dioxan/ethanethiol with boron trifluoride, which results in the cleavage of aryl-glycerol β -aryl ether (β -O-4) linkages. The main degradation products (tri-thioethyl phenyl propane compounds) of the different

DHP_{ZL} fractions were analysed by Gas Chromatography as trimethylsilyl (TMS) derivatives using a J&W Scientific column (DB 1, 30 m, 0.25 mm, 0.25 μ m film). Detection was performed by flame-ionization detection (FID) using tetracosane as internal standard.

2.6. Transmission electron microscopy (TEM)

Droplets of GAX-DHP suspensions were deposited on glow-discharged carbon-coated grids. The liquid in excess was blotted away with filter paper and a drop of 2% (w/v) uranyl acetate negative stain was added prior to drying. Samples were observed using a using a Philips CM200 microscope operating at 80 Kv. Images were recorded and the particle diameter was measured using the ImageJ software.

2.7. Endoxylanase (Tx-Xyl) assays

Enzymatic hydrolysis kinetics of the free delignified GAX and GAX-DHP model complexes were carried out under continuous stirring, at 60°C, during 10 min in a final volume of 15 mL. Limiting amounts of Tx-Xyl (0.04 IU/mg GAX) were used in order to compare the relative activity and monitor the enzyme action pattern on each substrate. For all tests, substrates were pre-incubated at 60°C for 10 min before Tx-Xyl was added. After,

aliquots were removed from the reaction mixture at 2 min regular intervals, boiled for 10 min to inactivate Tx-Xyl and submitted to both SEC and reducing sugar analyses.

The relative activity (UI/mL) of Tx-Xyl towards GAX and GAX-DHP complexes was determined by measuring the amount of reducing sugars (xylose and xylo-oligosaccharides) released by the endoxylanase all along the 10 min reaction. Reducing sugars were quantified as alditol acetates using gas-liquid chromatography according to the procedure developed by Courtin et al., ³⁰, but instead of trifluoroacetic acid, samples were hydrolysed using sulphuric acid (1 M final concentration) at 100°C for 2h. Dichoro-methane was used to extract alditol acetates. Chromatographic analysis was performed using a gas chromatograph (GC Hewlett Packard 6890A) equipped with an auto-sampler and a flame ionizing detector. Separation of alditol acetates was achieved at 220°C on a Supelco Sp-2380 polar column (0.25 mm \times 30 m) using He (at 1 bar) as the carrier gas. Detection and injection were performed at 250°C. Appropriate mixtures of monomeric reducing sugars were used for calibration and inositol was included as the internal standard.

The relative activity was expressed as UI/mL, where one IU is defined as the amount of endoxylanase required to release 1 μ mol of reducing xylose equivalent from substrate per min at 60°C.

2.8. Size-exclusion chromatography (SEC) analysis of GAX-DHP complexes in NaNO₃

GAX and GAX-DHP complexes were analysed before and after endoxylanase (Tx-Xyl) action using a high performance size exclusion chromatographic (SEC) system, connected online to a UV detector (Waters 2996) and a refractive index detector (RI) (Waters 410). Chromatographic separation of 100 μ l injected solutions (filtered on 0.45 μ m PTFE filter) was performed in NaNO₃ solution (50 mM) containing 0.02% NaN₃, using thermostatically controlled (50°C) shodex OH pack (802, 803 and 805) (each 4.6 x 300 mm) columns set at a flow rate of 1 mL/min. Molar masses (M_w) were monitored during the hydrolysis kinetics and evaluated based on pullulan standards.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of GAX-DHP complexes

In plant cell walls, lignin polymerization occurs within a polysaccharide matrix. Therefore, in order to mimic this process, DHPs were synthesized using coniferyl alcohol (CA) monomers in presence of glucuronoarabinoxylan (GAX) (4 g/L). Four polymerization reactions were conducted using identical GAX concentration, pH and peroxidase/H₂O₂ ratio, but employing increasing concentrations of lignin monomer (CA). Consistent with our previous study, ²² no precipitation was observed during polymerization reactions. The syntheses yielded four stable colloidal GAX-DHP model systems: GAX-DHP (4/0.25, w/w), GAX-DHP (4/1, w/w), GAX-DHP (4/4, w/w) and GAX-DHP (4/8, w/w), whose macromolecular properties were studied using size exclusion chromatography (SEC), TEM imaging and physico-chemical characterization.

3.1.1. Size exclusion chromatography (SEC) analysis of GAX-DHP complexes

The macromolecular organization in solution of the different GAX-DHP nanocomposites was analyzed by SEC using an aqueous mobile phase (NaNO₃) and both RI and UV detection. Compared to the GAX alone, the GAX-DHP complexes were characterized by polydisperse elution profiles (Fig. 2a), which varied according to the DHP concentration in nanocomposites. Thus, in the case of GAX-DHP (4/0.25) a slight shoulder associated with the main peak (corresponding to the major GAX polymer eluted at 23 mL) appeared at 18 mL (Fig. 2b). Two additional peaks were also detected (at 17 and 19.5 mL elution volumes) for GAX-DHP (4/1) (Fig. 2c) and peaks of increasing intensity (eluted at 16 and 19 mL) were observed for GAX-DHP (4/4) and GAX-DHP (4/8) respectively (Fig. 2d, 2e). All of these peaks correspond to high molecular weight populations that display both RI and UV signals. Given that DHPs are the only UV-absorbing components, but are at the same time insoluble in the aqueous eluant, it can be assumed that these fractions correspond to micellar hydrosoluble populations that are formed by the association of the hydrophilic, soluble GAX polymers and the hydrophobic DHP molecules. These SEC patterns were consistent with previous results obtained from a similar synthesis of GAX-DHP using coniferyl alcohol.²²

According to previous results, ³¹ the GAX-DHP complexes described here would mainly involve non covalent hydrophobic interactions between the two components. During the synthesis process, these interactions drive the formation of soluble micelle-like structures that can keep the originally insoluble DHPs molecules in solution like in the case of surfactant system. The presence of GAX in solution, thereby, prevented the precipitation of the lignin models during coniferyl alcohol polymerization. ^{19,20}. This effect could be related to the "sugar in" effect observed by Shigematsu et *al.* (1994), who demonstrated that monolignol solubility is increased in sugar solutions. ³² In plant cell walls, the occurrence of non-covalent interactions, in addition to covalent lignin-carbohydrate linkages, could take part in the formation of high molar mass lignin, by avoiding or limiting precipitation and thus controlling the phase-separation of the growing lignin polymer in the polysaccharide gel.

Overall, our SEC analyses revealed that the different GAX-DHP nanocomposites contain a mixture of free GAX chains with non covalent GAX-DHP complexes. The increase in the intensities of both RI and UV signal of the non-covalently associated GAX-DHP fractions (eluted at high molar mass volumes) indicated that these populations display increasing molecular weight and concentration as the DHPs concentration increases within the nanocomposites. Therefore, variations in the concentration of coniferyl alcohol (CA) during polymerization would affect the molecular weight and the relative density of the resulting non covalent GAX-DHP complexes, probably as a consequence of the combined effect of solubility improvement of CA and thus of DHPs and monomer concentration increase.

3.1.2. Morphology and Size distribution of GAX-DHP complexes

Morphological characterization of the different GAX-DHP nano-composites was achieved by TEM imaging. Typical images of negatively stained preparations indicated that the GAX-DHP nanocomposites appeared as individual spherical particles embedded in a matrix (Fig.3). Such an organization is consistent with their amphiphilic nature, since they are formed by the non covalent assembly of rather hydrophilic GAX polymers (composed of poly-hydroxylated sugar subunits) and hydrophobic DHP compounds (composed of phenyl-propanyl units with fewer hydroxyl groups). So it is reasonable to hypothesize that they would organize, in aqueous solution, in a minimum energy surface, i.e., a sphere. Moreover, nanoscale studies of the supramolecular structure of natural and/or model lignins (dehydrogenate polymers) have usually revealed globular shaped macromolecular assemblies.³³⁻³⁵

The size of the globular nano-composites was determined by fitting, the outline of each particle to equivalent ellipse. The diameter was calculated as the average between the largest and smallest diameters of the ellipse. The number and weight average diameters ($\overline{D_n}$ and $\overline{D_w}$, respectively), as well as the polydispersity index P_d were calculated using the expressions presented previously by Putaux et al. ³⁶ Although the mean values measured may not be exactly those of the systems in solution, since possible deformation after staining and drying cannot be totally excluded, they provide a means to compare particles size. The sizedistribution histograms of GAX-DHP (4/1), GAX-DHP (4/4) and GAX-DHP (4/8) are shown in Fig.4. The histograms are symmetric and tending respectively towards increasingly larger diameters. Table 1 summarizes the diameter values obtained. The polydispersity indexes reveal that several GAX-DHP particles are relatively homogeneous in diameter and indicate that particle diameter increases with increasing DHP content. The GAX-DHP (4/8) particles were for instance almost 2 times larger than GAX-DHP (4/1) particles ($\overline{D_n}$ =205.4 nm and 113.5 nm, respectively). Interestingly, the SEC behaviour of the different nanocomposites showed that the concentrations of GAX-DHP complexes (with high molar masses) increased as the DHP concentration increased. One might thus hypothesize that the particles would correspond to GAX-DHP micellar complexes. The assembly of DHP polymers into GAX-DHP supramolecular globular structures presumably involves cooperative electrostatic interactions between the DHP precursors and GAX as well as interfacial interactions (hydrophilic/hydrophobic) in the course of the non covalent complexes formation. ^{31,37} In this respect, the increased size of the particles may reflect higher frequency of non covalent interactions between GAX and the growing-DHP as well as higher DHP content. Such a trend may result from combined higher concentration of DHP and increased size of the DHP polymer within the composites. Indeed GAX may enhance the solubility which in turn may favour the reactivity of coniferyl alcohol, thereby leading to DHP with higher polymer size as previously reported for covalent GAX-DHP nanocomposites.¹⁹

3.1.3. Characterization of DHP extracted from GAX-DHP complexes

One of the consequences of the increased concentration of DHP precursor concentration in the GAX solution should be a greater solubility and thus reactivity of the synthesized DHP polymers, which would otherwise precipitate in the absence of a polysaccharide matrix. ^{19,20} Therefore, this could give rise to final DHP polymers that display higher molecular weights.

In order to check this hypothesis, DHP molecules were extracted f from the respective GAX-DHP model systems by dioxane–water (95:5) and further submitted to molar mass determination (SEC) and chemical analysis (thioacidolysis). Yields of extractions were 62.7%, 68.3%, 85.4% and 95.4% respectively for GAX-DHP (4/0.25), GAX-DHP (4/1), GAX-DHP (4/4) and GAX-DHP (4/8) (based on starting CA concentration). These yields were relatively high, revealing a rather good solubility of the DHP components, so analysis would be significantly representative of the total DHPs formed. When coniferyl alcohol is polymerized in absence of polysaccharides, DHP oligomers precipitate out of aqueous solutions and consequently the dehydrogenation process cannot be further continued. However, in a polysaccharide matrix the solubility of DHPs can be improved, notably by the formation of colloidal aggregates, as previously suggested by Barakat et *al.* 2007, thus allowing more frequent coupling between oligomers. ^{19,20,38} Besides, extraction yields were increasingly higher as the DHP/GAX *ratio* increased, since residual carbohydrate content usually reduces DHP solubility in dioxane.

In order to evaluate the DHP molar mass, DHP fractions were acetylated and submitted to SEC analysis in THF. The use of THF as elution system decreases the interactions between DHP chains avoiding macromolecular associations and thus overestimation of the molecular weight.^{39,40} The elution curves are plotted in Fig. 5, they show relatively broad molecular weight distributions. Higher molecular weight products were clearly detected in the case of DHP extracted from both GAX-DHP (4/8) and GAX-DHP (4/4) as evidenced by the shoulders of the elution profiles observed respectively at 14.4 and 14.5 mL, comparatively to GAX-DHP (4/1) (relative peak maximum at 14.9 mL). The respective M_w were calculated based on polystyrene calibration and reported in table 2. DHPs generated by the ZL (or bulk) polymerization method are generally low molecular weight products. Consistent with the available literature data on DHP synthesized under similar conditions,^{41,42} the molecular weight of extracted DHPs ranged 1800-2300 g. mol⁻¹ and showed increasing value with the DHP concentration increase within the complexes. A similar trend was already reported for DHP derived from covalent GAX-DHP nanocomposites produced in reaction media with gradually increasing concentrations.¹⁹ As previously pointed out, this higher molar mass could be explained by a reinforced reactivity and solubility of DHP.

To verify this hypothesis, the DHP extracted fractions were further characterised by thioacidolysis. This degradation method provides information on the relative amounts of uncondensed guaiacyl propane bonds, by cleaving specifically the alkyl aryl ether bonds (β -O-4) that are formed during the polymerization of conideryl alcohol. (Fig.1) The results for

the degradation products of the different DHP reported in table 2 indicate that the relative content of the β -O-4 structures is substantially low in the case of DHP extracted from GAX-DHP (4/0.25) (154 µmol/g DHP) and progressively increases with the increase of DHP concentration (i.e. 620 µmol/g DHP extracted from GAX-DHP (4/8)). These results would illustrate an enhanced reactivity during DHP polymerization. It is worthwhile to mention that in the ZL polymerization process, the reaction begins with coupling of monomeric radicals leading to dimeric products (quinone methide). These dimers polymerize rapidly to larger molecules mainly by the formation of 5-5' bonds, but also to a lesser extent of β -O-4 linkages through the exclusion of water molecules (Fig.1). ¹⁷

In our case, the increase of β -O-4 linkages frequency in the DHP could be directly related to the increase of DHP monomers (CA) concentration in two ways. Indeed, the solubility of the increasing amounts of CA monomers in polysaccharides solution would enhance their availability ^{20,32} and thus partly favours the reaction between monomer and oligomer radicals leading to a DHP polymer with an enriched β -O-4 content. ¹⁷ Furthermore, as suggested by Barakat el *al.*, ¹⁹ non covalent interactions between GAX and DHP result in the formation of hydrophobic micro domains ³¹ that would likely explain the formation of colloidal suspensions of GAX-DHP complex. Such a trend would be enhanced by the densification of the GAX-DHP system owing to the increase of CA and thus DHP concentration. Therefore, preferential location of DHPs in these hydrophobic micro domains would allow continuous water removal during the polymerization. ³⁸ Hence, increased system hydrophobicity may promote frequent reactions between the phenoxy radical and the β -radical resulting in an increase of β -O-4 linkages. (Fig.1)

Based on SEC and thioacidolysis results, we suggest that the increase of the size of GAX-DHP non covalent particles can be directly related to the increase of the molar mass of their elementary DHP constituents, as a result of solubility and reactivity improvement of DHP monomers. Overall, our results were rather analogue to those previously reported for covalent GAX-DHP nanocomposites with similar underlying mechanisms.¹⁹

3.2. Enzymatic hydrolysis of GAX-DHP complexes

The GAX sample and the different GAX-DHP (4/0.25; 4/1; 4/4 and 4/8) model systems previously described were submitted to the GH11 endoxylanase (Tx-Xyl) action. Hydrolysis kinetics were performed with low amounts of Tx-Xyl (0.04 IU/mg of GAX) to monitor the enzyme action pattern. The endoxylanase efficiency on each system was evaluated in terms of

relative enzyme activity (IU/mL). The extent of enzymatic hydrolysis of GAX fraction by the endoxylanase in each sample was also monitored as a function of incubation time, using SEC analysis operating in aqueous conditions.

3.2.1. Relative activity of Tx-Xyl on GAX-DHP complexes

The relative activity of the endoxylanase (Tx-Xyl) on GAX and GAX-DHP model systems was determined by measuring the amount of reducing sugars (xylose and xylooligosaccharides) released during 10 min of hydrolysis reaction and expressed as (IU/mL). Results are reported in table 3. The maximum efficiency of Tx-Xyl (88.52 IU/mL) was obtained on the delignified GAX sample. Tx-Xyl was relatively efficient on GAX sample, as moderately branched polymer (arabinose/xylose *ratio* of 0.23). In contrast, results indicate a gradually decrease of enzyme activity as the DHPs content increases in the GAX-DHP systems. Indeed, the enzyme loses almost 28% and 39% of its initial activity on GAX in the case of GAX-DHP (4/0.25) and GAX-DHP (4/1) respectively and nearly up to 58% for both GAX-DHP (4/4 and 4/8). Such results are relatively expected since it is well recognized in the literature that ligning have a negative impact on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. ^{5,43,44} The data in the literature abound regarding the lignin impact on cellulases. In contrast, even if fewer studies directly deal with this subject in the case of xylanases, similar conclusions were drawn. Thus in this context, Senior et al., (1990) investigated the recovery of enzyme activity after interaction of a xylanase from T. harzianum E58 with various substrates containing lignin (unbleached sulfite pulp...). They found that the substrates with higher lignin content caused the greatest loss in activity. The authors suggested that the loss of enzyme activity can be caused by either binding of enzymes onto insoluble lignin, or inactivation by soluble materials that leach out of the pulps.¹⁴

The results presented herein concerning the GAX-DHP model systems are consistent with these results. Thus, we can hypothesize that the loss of Tx-Xyl activity would likely be due to non-productive interactions between the enzyme and the increasing DHPs content. The increase of the DHP content in the *in vitro* build nanocomposites would result in an increase of the DHP size and corresponding GAX-DHP complexes. This will induce increase of the available surface for non productive binding of xylanase and/or increase of the amounts of reactive functions (i.e. hydroxyl functional groups) that can interfere with enzyme functionality (i.e. through an inhibition/inactivation mechanism). ^{45,46}

3.2.1. SEC monitoring of hydrolysis kinetics of GAX-DHP complexes by Tx-Xyl

To study Tx-Xyl action pattern as function of the DHPs content, the extent of enzymatic hydrolysis of GAX fraction in each GAX-DHP model system was monitored as a function of incubation time, using SEC analysis operating in aqueous conditions with RI detection (Fig 6). The elution profiles show a progressive shift of the GAX peak to lower molar masses during the course of endoxylanase-mediated hydrolysis that is indicative of GAX depolymerization and the formation of low molecular weight products. However, when comparing the enzyme action on the different GAX-DHP model systems, the extent of the GAX hydrolysis gets less important with the increase of the DHPs content, as can be deduced from the decline of the RI signal intensity and elution volume. Likewise, especially in the case of GAX-DHP (4/8) nanocomposite, the GAX fraction was only weakly affected by the enzyme action. The evolution of GAX fraction average molecular weight was monitored during the kinetics, using calculation based on pullulan standard calibration. The M_w values are reported in table 3. From the results, it is noticeable that the delignified GAX sample is the most effectively degraded by Tx-Xyl since after 10 min, the polymer M_w passes from 55 348 to 10 356 g/mol, while comparatively, as the DHPs content increases, the enzyme action gradually decreased, as can be deduced from the increase of M_W of the residual GAX fraction (17 566; 29 489; 31 979 and 36.501 g/mol for GAX-DHP 4/0.25; 4/1; 4/4 and 4/8 respectively). These results would reveal an increasingly limited accessibility within the enzyme-substrate system during the reaction, most likely due to either a lack of accessibility of the GAX substrate to the enzyme or inversely of the enzyme to the substrate. Considering that all enzymatic reactions were performed with a high substrate to enzyme ratio and that the supra-molecular organisation of the different non covalent GAX-DHP model systems would not presumably pose any physical hindrance to GAX access, ²² we can assume that the second suggestion is rather the most plausible. Hence, increasingly limited accessibility of Tx-Xyl to the substrate GAX, as the DHPs content increases, can be a result of non-productive interactions between the enzyme and the increasingly available interacting surfaces of the GAX-DHP globules. According to the suggestions of Senior et al., 1990, such interactions would limit xylanase action by reducing the effective concentrations of the enzyme and also prevent its resolubilization and thus limit its recyclability during the hydrolysis reaction.¹⁴ Non specific adsorption or binding of cellulases and hemicellulases to lignin surface has often been proposed as the main mechanism that leads to loss of enzyme activity and thus to decline of the hydrolysis rates of lignocellulosic substrates. ⁴⁷⁻⁵¹ The hydrophobicity of lignin surface

has generally been regarded as a very important factor; the more hydrophobic the surface is the higher the extent of adsorption, although electrostatic interactions may interfere with this trend. Generally, adsorption of proteins onto lignin hydrophobic surfaces is considered to be irreversible, due to the fact that many proteins undergo changes (*i.e.* tertiary configuration changes) upon adsorption onto hydrophobic surfaces. ⁵¹⁻⁵⁴ Recently, Berlin et *al.*, 2006 have examined the inhibition of a broad panel of hydrolytic enzymes (cellulases, β -glucosidases and xylanases from *Trichoderma*, *Penicillium* and *Aspergillus spp*. culture filtrates) by two lignin preparations that had similar particle sizes and surface areas but differed significantly in other physical properties and in their chemical compositions. The authors correlated the differences in the adsorption behaviour of the enzymes with differences in the chemical interactions between enzymes and lignin, but little is known about the exact nature of these interactions.¹³

In our case, results rather highlight the impact of the surface areas and particle sizes of the GAX-DHP globules on endoxylanase activity, suggesting most likely a surface interaction phenomenon (such as non specific adsorption). Nevertheless, the enzyme action could as well be hampered by a potential catalytic inhibition through interactions with soluble aromatic compounds (monomeric, dimeric or even oligomeric polymerization intermediates...). Further investigations on macromolecular change of the endoxylanase and possibly related inhibition pattern by phenolic compounds as well as on the role of surface interfacial behavior of the protein in the biocatalysis of such heterologous systems are required to understand the adsorption process of the enzyme to lignins.

4. Conclusion

In vitro modelling of lignins by dehydrogenation polymers (DHPs) is a useful tool to understand the complexity of the enzymatic degradation process of lignocelluloses while considering the variability of these substrates.

Variability in lignin content and in particle size parameters of lignocelluloses were successfully modelled using *in vitro* reconstituted GAX-DHP model systems. Characterization of these systems revealed interesting conclusions regarding the impact of lignin (DHP) polymerization conditions on the final phenolic polymer. Indeed, we have demonstrated that the growing DHP in GAX solutions form GAX-DHP complexes which presumably behave as globular particles. The particles size could be directly related to the

initial monolignol concentration. Also variations in the proportion of the β -O-4 linkages are strongly consistent with possible changes in the reactivity of the monolignols.

The susceptibility of the GAX-DHP model systems to the GH11 endoxylanase (Tx-Xyl) action was then evaluated. Results highlight the negative impact of the lignin (DHP) content on enzyme activity and suggest that particle size and surface area of the GAX-DHP complexes would be important factors affecting enzyme availability and effectiveness. Future work will focus on the study of the macromolecular change of the endoxylanase during interactions with phenolic components as well as the protein partition parameters and interfacial behaviour within the heterelogous carbohydrate-lignin systems⁵⁵ in order to understand more in detail the exact nature of lignin-endoxylanase non specific interactions.

5. References

- (1) International Energy Agency *Information paper* February 2010.
- (2) McKendry, P. *Bioresource Technology* **2002**, *83*, 37–46.
- (3) Kumar, M. N. S.; Mohanty, A. K.; Erickson, L.; Misra, M. Journal of Biobased Materials and Bioenergy 2009, 3, 1-24.
- (4) Stewart, D. Industrial Crops and Products 2008, 27, 202-207.
- (5) Zhu, L.; O'Dwyer, J. P.; Chang, V. S.; Granda, C. B.; Holtzapple, M. T. *Bioresource Technology* **2008**, *99*, 3817-3828.
- (6) Anderson, W.; Akin, D. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2008, 35, 355-366.
- (7) Chang, V.; Holtzapple, M. Applied Biochemistry and Biotechnology 2000, 84-86, 5-37.
- (8) Wyman, C. E. *Biotechnology Progress* **2003**, *19*, 254 262.
- (9) Draude, K. M.; Kurniawan, C. B.; Duff, S. T. B. *Bioresource Technology* **2001**, *79*, 113–120.
- (10) Chandra, R. P.; Bura, R.; Mabee, W. E.; Berlin, A.; Pan, X.; Saddler, J. N. Adv Biochem Engin/Biotechnol 2007, 108, 67-93.
- (11) Chesson, A. In H.G. Jung et al (ed.) Forage cell wall structure and digestibility. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. **1993**, 347–376.
- (12) Grabber, J. H. Crop Sci **2005**, 45, 820-831.
- (13) Berlin, A.; Balakshin, M.; Gilkes, N.; Kadla, J.; Maximenko, V.; Kubo, S.; Saddler, J. *Journal of Biotechnology* **2006**, *125*, 198-209.
- (14) Senior, D. J.; Mayers, P. R.; Breuil, C.; Saddler, J. N. In: Kirk, T.K., Chang, H.-M.(Eds.), Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture. Butterworth-Heinemann, Boston, MA 1990, 169-182.
- (15) Kaya, F.; Heitmann, J.; Joyce, T. Cellulose Chemistry and Technology 1999 33 203-213
- (16) Freudenberg, K. Science 1965, 148, 595-600.
- Sarkanen, K. V. In *Lignins, occurrence, formation, structure and reactions.*; Sarkanen,
 K. V., Ludwig, C. H., Eds.; Wiley-Interscience: New York., 1971.
- (18) Freudenberg, K.; Neish, A. *Biosynthesis of Lignin*; Springer ed.: Berlin, 1968.
- (19) Barakat, A.; Chabbert, B.; Cathala, B. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2118-2125.

- (20) Cathala, B.; Monties, B. International Journal of Biological Macromolecules 2001, 29, 45-51.
- (21) Higuchi, T.; Ogino, K.; Tanahashi, M. Wood research 1971, 51, 1-11.
- Boukari, I.; Putaux, J.-L.; Cathala, B.; Barakat, A.; Saake, B.; Rémond, C.;
 O'Donohue, M.; Chabbert, B. *Biomacromolecules* 2009, *10*, 2489-2498.
- (23) Winter, H.; Barakat, A.; Cathala, B.; Saake, B. *Macromolecular Symposia* **2006**, *232*, 74-84.
- (24) Samain, E.; Debeire, P.; Touzel, J. P. Journal of Biotechnology 1997, 58, 71-78
- (25) Samain, E.; Touzel, J. P.; Brodel, B.; Debeire, P. in : Xylans and Xylanases (édité par Visser J., Beldman G., Kusters-van Someren M. A. et Voragen A.G.J.), Elsiever Science Publishers B.V., Amsterdam, The Neverlands, 1992, 7, 467-470.
- (26) Debeire-Gosselin, M.; Loonis. M.; Samain, E.; Debeire, P. In: Xylans and Xylanases
 (Visser. J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M. A., and Voragen, A. G. J., Eds.).
 Elsevier Science Publishers 1992, 463-466.
- (27) Tanahashi, T., A.,; Higuchi, T. Holzforschung 1982, 36, 117-122.
- (28) Ludley, F. H.; Ralph, J. J. Agric. Food Chem. 1996, 44, 2942-2943.
- (29) Lapierre, C.; Monties, B.; Rolando, C. *Holzforschung* 1986, 40, 113-118.
- (30) Courtin, C. M.; Van den Broeck, H.; Delcour, J. A. Journal of Chromatography A 2000, 866, 97-104.
- (31) Barakat, A.; Winter, H.; Rondeau-Mouro, C.; Saake, B.; Chabbert, B.; Cathala, B. *Planta* **2007**, *226*, 267-281.
- (32) Shigematsu, M.; Goto, A.; Yoshida, S.; Tanashi, M.; Shinoda, Y. *Mokuzai gakkaishi* 1994, 40, 321-327.
- (33) Košíková, B.; Zákutná, L.; Joniak, D. Holzforschung 1978, 32, 15-18.
- (34) Radotic, K.; Micic, M.; Jeremic, M. Annals of the New York Academy of Sciences **2005**, *1048*, 215-229.
- (35) Micic, M.; Radotic, K.; Jeremic, M.; Djikanovic, D.; Kämmer, S. B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2004**, *34*, 33-40
- (36) Putaux, J.-L.; Buléon, A.; Borsali, R.; Chanzy, H. International Journal of Biological Macromolecules 1999, 26, 145-150.
- (37) Micic, M.; Radotic, K.; Jeremic, M.; Leblanc, R. M. *Macromolecular Bioscience* **2003**, *3*, 100-106.
- (38) Lairez, D.; Cathala, B.; Monties, B.; Bedos-Belval, F.; Duran, D.; Gorrichon, L. *Biomacromolecules* **2005**, 763-774.

- (39) Chum, H. L.; Johnson, D. K.; Tucker, M. P.; Himmel, M. E. *Holzforschung* **1987**, *41*, 97-108.
- (40) Faix, O.; Lange, W. Holzforschung 1981, 35, 137-140.
- (41) Cathala, B.; Saake, B.; Faix, O.; Monties, B. *Polymer Degradation and Stability* **1998**, 59, 65-69.
- (42) Saake, B.; Argyropoulos, D. S.; Beinhoff, O.; Faix, O. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 499-507.
- (43) Vinzant, T.; Ehrman, C.; Adney, W.; Thomas, S.; Himmel, M. Applied Biochemistry and Biotechnology **1997**, 62, 99-104.
- (44) Mooney, C. A.; Mansfield, S. D.; Touhy, M. G.; Saddler, J. N. *Biores. Technol.* 1998, 64, 113-119.
- (45) Kawamoto, H.; Nakatsubo, F.; Murakami, K. Mokuzai gakkaishi 1992, 38, 81-84.
- (46) Pan, X. Journal of Biobased Materials and Bioenergy 2008, 2, 25-32.
- (47) Sutcliffe, R.; Saddler, J. N. Biotechnol. Bioeng. Symp. 1986, 17, 749-762.
- (48) Converse, A.; Ooshima, H.; Burns, D. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1990**, 24-25, 67-73.
- (49) Ooshima, H.; Burns, D. S.; Converse, A. O. *Biotechnology and Bioengineering* **1990**, *36*, 446-452.
- (50) Eriksson, T.; Karlsson, J.; Tjerneld, F. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2002**, *101*, 41-60.
- (51) Palonen, H.; Tjerneld, F.; Zacchi, G.; Tenkanen, M. Journal of Biotechnology 2004, 107, 65-72
- (52) Zilliox, C.; Debeire, P. Enzyme and Microbial Technology 1998, 22, 58-63.
- (53) Roach, P.; Farrar, D.; Perry, C. C. Journal of the American Chemical Society 2005, 127, 8168-8173.
- (54) Van Oss, C. J. v. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 1995, 5, 91-11.
- (55) Tu, M.; Chandra, R. P.; Saddler, J. N. *Biotechnology Progress* 2007, 23, 398-406.

6. Figures



--8------

Figure 1. Lignin polymerisation: two examples for the formation of intermonomeric linkages.



Figure 2: SEC-NaNO₃ elution profiles of GAX-DHP model systems before Tx-Xyl treatment (a) GAX, (b) GAX-DHP (4/0.25), (c) GAX-DHP (4/1), (d) GAX-DHP (4/4), (e) GAX-DHP (4/8). (——): Refractive index (RI signal); (-----): Ultraviolet (UV signal).



Figure 3: TEM images of negatively stained GAX-DHP particles before Tx-Xyl treatment: (a) GAX-DHP (4/0.25), (b) GAX-DHP (4/1), (c) GAX-DHP (4/4) and (d) GAX-DHP (4/8). Scale bars: 500 nm.



Figure 4: Size-distribution histograms of the GAX-DHP (4/1; 4/4; 4/8) particles before Tx-Xyl treatment.



Figure 5: SEC-THF elution profiles of the DHP extracted with dioxane-water (95:5) from GAX/DHP (4/1) (-----), GAX/DHP (4/4) (-----), and GAX/DHP (4/8) (------) complexes.



Figure 6: Hydrolysis kinetics of (**a**) GAX, (**b**) GAX-DHP (4/0.25), (**c**) GAX-DHP (4/1), (**d**) GAX-DHP (4/4) and (**e**) GAX-DHP (4/8) by Tx-Xyl (0.04 IU/mg GAX). SEC-NaNO₃ elution profiles at different reaction times.

7. Tables

Table 1. Mean number and weight diameters $(\overline{D_n} \text{ and } \overline{D_w}, \text{ respectively})$, standard deviation (std, in brackets) and polydispersity index (P_d) determined from TEM images of negatively stained GAX-DHP particles before Tx-Xyl treatment.

Sample	$\overline{D_n}$ [std] (nm)	$\overline{D_{w}}$ (nm)	P_d
GAX-DHP(4/1)	113.5 [13.4]	118.1	1.04
GAX-DHP(4/4)	159.9 [21.3]	168.4	1.05
GAX-DHP(4/8)	205.4 [26.3]	216.2	1.05

Table 2. Characterization of the DHP extracted with dioxane-water (95:5) from the respective GAX/DHP (4/0.25; 4/1; 4/4; 4/8; w/w) complexes: Yield of thioethylated (β -O-4) monomers recovered from thioacidolysis and weight average molecular weight (M_w) determined from SEC-THF analysis.

Samples	<i>β-0-4</i> (µmol/g of DHP)	M_w (g/mol)	Р
DHP 0.25	154	_	_
DHP 1	452	1855	1.6
DHP 4	529	2201	1.3
DHP 8	620	2306	1.4

 $P = M_w / M_n$: Polydispersity; M_w : weight average molecular weight (g/mol); M_n : number average molecular weight (g/mol)

Table 3. Kinetics of the GAX/DHP_{ZL} complexes hydrolysis by Tx-Xyl: SEC-NaNO₃ analysis of the evolution of the weight average molecular weight (M_w) of the GAX fraction as function of reaction times and determination of enzyme activity from reducing sugars quantification.

T: (!)	M_w (of GAX) x 10 ⁻³ (g/mol)					
Time (min) –	GAX	GAX/DHP	GAX/DHP	GAX/DHP	GAX/DHP	
		(4/0.25)	(4/1)	(4/4)	(4/8)	
0	55.348	55.348	54.811	51.038	50.022	
2	19.843	38.795	44.715	45.181	46.099	
4	14.631	34.343	39.996	41.233	44.281	
6	12.433	29.489	36.501	37.243	41.233	
8	11.121	19.639	33.312	34.701	38.395	
10	10.356	17.566	29.489	31.979	36.501	
Endoxylanase	88.52	64.07	53.53	36.76	36.57	
Loss of activity (%)	0.00	27.62	39.52	58.47	58.69	

Probing a family GH11 endo-β-1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups

Imen Boukari^{a,b}, Caroline Rémond^{a,b}, Michael O'Donohue^{c,d,e}, Brigitte Chabbert,^{a,b}*

^a INRA, UMR 614, Fractionnement des AgroRessources et Environnement, F-51686 Reims, France.

^b University of Reims Champagne Ardenne, UMR 614, Fractionnement des AgroRessources et Environnement, F-51686 Reims, France.

^c Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, F-31077 Toulouse, France

^d INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400, France

^e CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

(publication n°3: A soumettre dans *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*)

Probing a family GH11 endo-β-1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups

Abstract

Phenolic compounds generated from lignin degradation during the pre-treatment step in the process of producing bioethanol from lignocellulosic biomass are known to be inhibitory to enzymatic hydrolysis and fermentation. The inactivation mechanism of a GH11 endoxylanase (Tx-Xyl) by several phenolic compounds varying in their hydroxyl and methoxyl radical content was investigated. Apparent kinetic inactivation parameters were measured as an approximate index of the inhibitory effects. All the tested aromatic compounds had strong negative impact on enzyme activity and kinetic analysis revealed non competitive multi-site inhibition mechanism. The interactions between Tx-Xyl and the phenolic compounds were further studied by steady fluorescence spectroscopy. Changes in λ_{max} of emission and quenching of fluorescence intensity indicated changes in the microenvironment of tryptophan residues, suggesting alterations in tertiary structure of the enzyme protein through phenolic compound binding. In agreement with the kinetic parameters, the fluorescence derived binding constants evidenced higher enzyme-phenolics interaction affinity with increasing phenolic hydroxyl radical content, suggesting clear correlations of such radicals with the inhibitory effects. Results indicated that the inhibitory effects of phenolic compounds on Tx-Xyl activity are most likely brought about by conformational alterations of the enzyme protein inducing steric inactivation.

Keywords

Inhibition - lignin degradation products- endoxylanase- phenolic compounds

1. Introduction

Rising environmental and economic concerns linked to Man's dependency on fossil fuels are currently driving R&D aimed at the development of viable energy alternatives, such as ethanol, using biomass as a lignocellulosic feedstock. To attain this goal, it is necessary to design cost-efficient manufacturing processes that will allow both the production of ethanol from cellulose and hemicelluloses sugars and the optimal conversion of the hemicellulose and lignin components into other valuable products.¹

Currently, the basic concept for the production of ethanol from lignocellulosic biomass consists of several distinct steps, which includes biomass pretreatment, enzymatic hydrolysis and yeast-mediated fermentation.²⁻⁴ Most enzymatic hydrolysis technologies employ enzyme cocktails including cellulases (endoglucanases, cellobiohydrolases, and β-glucosidases), hemicellulases (mainly endoxylanases), and/or lignin-degrading enzymes.⁵ Recalcitrance of lignocelluloses to bioconversion is mainly due to their structural complexity, but also to their aromatic constituents which include both lignins and phenolic acids.⁶ Thus, although pretreatment is a significant cost-driver, it is indispensable prior to enzymatic processes. Indeed, pre-treatment disrupts the plant cell wall network, partially separates the major polymer components (lignin, cellulose and hemicellulose) and increases the accessibility of cellulose fibers to enzymes.⁷ However, depending on the exact nature of the pre-treatment, the consequences for the non-cellulose components is variable.⁸ Frequently, pre-treatment yields poor quality lignins and/or provides only partial separation of the lignin component. Additionally, the non-specific conditions of pre-treatment can lead to the generation of undesirable soluble by-products, such as furfurals and aromatics. Along with residual lignins, these latter compounds are known to inhibit both the subsequent enzymatic hydrolysis and fermentation steps.^{9-11,12,13} Therefore, the optimal removal of lignin and other aromatic biomass components (which are potentially valuable co-products of the biorefining process) is a key challenge to increase enzyme access to the polysaccharide components and ultimately to increase the efficiency and economics of lignocellulose conversion processes.^{14,15}

In terms of composition and concentration, the degradation products of lignins depend both on the actual botanical origin of the lignocellulosic biomass and on the physical and chemical conditions that prevail in the pre-treatment process. Undesirable pre-treatment by-products include a wide range of phenolic monomers and oligomers derived from the cell wall phenolic acids such as ferulic acid and *p*-coumaric acid, and lignins. ¹⁶⁻¹⁸ Lignins are polymers composed of three basic subunits, hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl, which differ only

with regard to the number of methoxyl substitutions of the aromatic ring (0, 1 and 2 respectively). Often referred to as monolignols, these subunits are bonded together in lignins *via* different linkages (β -*O*-4, β -5, or β - β ether bonds and 5-5 bonds). ^{19,20} During pre-treatment, cleavage of the β -O-4 aryl ether bonds results in the release of soluble mono- and oligoaromatic compounds and an increase in the concentration free phenolic radicals.¹⁸ Therefore, interactions between free phenolic hydroxyl or methoxyl groups and hydrolytic enzymes could take place and to some extent directly affect enzyme activity.

The effects of phenolic compounds on cellulose and hemicellulose-degrading glycoside hydrolases have been largely evidenced and documented in literature. Sharma et *al.* 1985 reported that guaiacol (2-methoxyphenol) and caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid) significantly inhibited the activity of a xylanase contained in crude extracts from *Aspergillus japonicus.*²¹ Similarly, Senior et *al.* (1991) showed that compounds leaching from lignin in pulping liquors produced significant inhibition of a xylanase from *Trichoderma harzianum.*²² Kaya et *al.* 2000 found that some lignin degradation products present in alkaline spent pulping liquors, such as vanillic acid, protocatechuic acid, guaiacol and vanillin had varying effects on xylanase activity, depending on the exact concentration of these molecules. At low concentration, positive activation effects were measured, while at higher concentrations enzyme activity was lost.²³ Regarding cellulases, inhibition of commercial cellulase cocktails was evidenced in presence of steam-exploded softwood liquid fraction and vanillin, syringaldehyde, trans-cinnamic acid, and hydroxybenzoic acid. ^{13,24}

Overall, despite proposals that phenolic hydroxyl groups might form a key element in the inhibition potency of lignin-derived aromatics towards enzymes ^{25,26}, little is actually known about the nature of the interactions or of the inhibitory mechanisms. Therefore, the acquisition of new knowledge in this area is a prerequisite for the further optimisation of biorefining processes either through the engineering of effective enzymatic treatment, by selecting adequate pre-treatment methods that release less strong inhibitors, developing specific detoxification methods (i.e., specific removal of inhibitors prior to enzymatic treatment and/or fermentation), choosing or designing more "adapted" enzymes.

In the present study, the mechanism of inhibition of a GH11 endo- β -1,4-xylanase from *Thermobacillus xylanilyticus* by several phenolic compounds has been investigated. A fluorescence approach was employed to examine in details the nature and impact of the enzyme-phenol interactions in order to address the way by which such compounds could affect enzyme function. The role of functional phenolic groups in such interactions was

further discussed. Results give new insights into the comprehension of lignin degradation products effects on hemicellulases functionality.

2. Material and methods

2.1. Phenolic compounds and preparation of solutions

Five phenolic compounds were used as models of lignin degradation products. (Fig.1.) Cinnamic acid ($\geq 99.5\%$), *p*-coumaric acid (4-hydroxycinnamic acid) ($\geq 98\%$), caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid) ($\geq 99\%$), ferulic acid (3-methoxy,4-hydroxycinnamic acid) ($\geq 98\%$) and 3,4,5-trimethoxycinnamic acid ($\geq 98\%$) were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. Concentrated solutions (100 mM) of these compounds were prepared by dissolving them in 50% (v/v) methanol, 50 mM preheated sodium acetate buffer, pH 5.8. Solutions of lower concentration were then obtained by dilution in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.8.

2.2. Endo-β-1,4-xylanase (Tx-Xyl) preparation

The thermostable GH11 endo- β -1,4-xylanase (Tx-Xyl) produced by *Thermobacillus xylanilyticus* was used. ²⁷⁻²⁹ The native enzyme was produced and purified as previously described.³⁰ The specific activity of the pure enzyme was 2000 IU/mg protein, where one IU is defined as the amount of endoxylanase required to release 1 µmol of reducing xylose equivalent from birchwood xylan per min at 60° C.

2.3. Activity assay

Xylanase activity was assayed by monitoring the release of reducing sugars using a colorimetric method (Kidby and Davidson, 1973).³¹ Birchwood xylan (Sigma-Aldrich) (0.5% w/v) was used as substrate in 50 mM sodium acetate, pH 5.8. Measurements were performed by incubating the substrate with appropriately diluted Tx-Xyl aliquot for 10 min at 60°C in a final volume of 1 mL. At 2 min intervals, samples of 100 μ L were removed and mixed with 1.5 mL of Kidby solution (1% Na₂CO₃ and 0.03% potassium hexacyanoferrate [III]). Coloration was developed by heating (at 100°C) for 5 min, and spectral absorbance was

measured at 420 nm. The amount of released sugar was determined using a xylose calibration curve $(0 - 400 \,\mu g \,mL^{-1})$. Activity was expressed in terms of International Unit (IU) as defined above.

2.4. Kinetics of inactivation of xylanase by phenolic compounds

The enzyme (Tx-Xyl) (0.5 μ M) was incubated with different phenolic compounds at various concentrations (0 – 1 – 5 – 10 – 20 – 50 – 70 – 80 – 100 mM) in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.8, in a total volume of 1 mL at 60°C. Aliquots of 100 μ L were withdrawn periodically at 0 – 5 – 10 – 15 – 30 min, appropriately diluted into buffer and assayed for residual Tx-Xyl activity. The log percent residual activity for each concentration of phenolic compound was plotted versus time. Apparent inactivation rate constants (k_{app}) were obtained from the slopes of these plots, which were then used as a measure of the rates of inactivation (V_i).

Assays and the appropriate controls were carried out in triplicate and average values were considered throughout. Control tests, performed in the absence of phenolic compounds were carried out to determine whether methanol caused inhibition of Tx-Xyl, but no reduction of activity occurred in the presence of methanol (up to 50%, v/v).

Kinetic data analysis of Tx-Xyl inactivation by the several phenolic compounds was done using a sigmoidal V_{imax} (maximal inactivation rate) calculation model. Values of inactivation rates (V_i) at various inhibitor concentrations were fitted to the Hill equation (Eq. 2, see results) using a non linear least-squares regression of SigmaPlot 2000 6.1 (SPSS, USA). The software allowed calculations of the apparent inactivation kinetic parameters (V_{imax} and K_{0.5}) and their associated standard errors. The results presented in this paper are representative of triplicate data-sets.

2.5. Fluorescence study

Steady-state fluorescence analysis was performed on Tx-Xyl samples (5 μ M) that had been previously incubated (for 30 min at 60°C with stirring) with different concentrations of the phenolic compounds (0 – 1 μ M – 2,5 μ M – 5 μ M – 7,5 μ M – 10 μ M – 25 μ M – 50 μ M – 100 μ M – 1 mM – 5 mM – 10 mM – 20 mM – 50 – 70 – 80 – 100 mM) in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.8. All fluorescence measurements were made on a SPECTRAmax GEMINI micro-plate spectrophotometer (Molecular Devices Corporation, California) at 25 ± 1°C. An excitation wavelength (λ_{exc}) of 295 nm was used to ensure selective excitation of tryptophan residues. Emission spectra were recorded in the range 300 to 500 nm using increments of 2 nm. The fluorescence of the phenolic compounds and the buffer was also measured at the same excitation wavelength and used to correct the observed fluorescence. The fluorescence quenching processes were studied using the Stern-Volmer theory.³²

3. Results

3.1. Kinetics of the inactivation of Tx-Xyl by phenolic compounds

3.1.1 Inactivation mechanism

The kinetics of inactivation of Tx-Xyl by phenolic compounds were assessed by incubating the enzyme with varying concentration of phenolics. At concentrations inferior to 10 mM, none of the phenolic compounds inhibited Tx-xyl activity. However, at higher concentrations (up to 100 mM) a time- and concentration-dependant loss of enzymatic activity was observed (Fig.2.). For example, at low concentration (20 mM) cinnamic acid reduced Tx-Xyl activity by more than 40% after 30 min, whereas an equivalent loss of activity was observed after 5 min when the concentration of cinnamic acid was 70 mM. At high concentration (100 mM), all of the phenolic compounds caused almost complete enzyme inactivation (\geq 95% loss of activity after 15 min incubation).

The fact that inhibition is time-dependant precludes competitive inhibition, characterized by tight and reversible binding, but rather is consistent with non competitive irreversible inhibition. In this case, inhibition is expected to increase with incubation time, following pseudo-first order kinetics.^{33,34} Therefore semilogarithmic plots of % residual Tx-Xyl activity versus incubation time were represented. In all cases, these reveal a linear relationship that is consistent with a pseudo-first order inactivation process (Fig.2.). Using equation 1 described by Levy 1963,³⁵ it was possible to calculate the apparent pseudo-first order rate constants (k_{app}) from the slopes of the semilogarithmic plots.

Log
$$([E_a]_t/[E_a]_0) = -k_{app.}$$
 (t) (Eq. 1)

Where E_a represents active enzyme and (t) the incubation time.

Afterwards, plotting of the k_{app} values versus phenolic concentrations revealed a saturation behaviour (Fig.2. insets), indicating that the inhibition process leads to the formation of an
inactive Tx-Xyl – phenolic compound complex. However, the plots yielded sigmoidal-shaped curves rather than rectangular hyperbolas that would be typically associated with Michaelis-Menten kinetics. This suggests that more than one phenolic compound molecule is involved in the inhibition of one enzyme molecule. According to Monod et *al.* 1965, ³⁶ such sigmoidal inhibition curves can be ascribed to cooperative interaction between inhibitor "binding" sites on the enzyme molecule.

3.1.2 Kinetic inhibition parameters

The non hyperbolic behaviour of plots of k_{app} versus phenolic concentration was confirmed by our failure to fit the data to linear equations, such Lineweaver-Burk or Eadie -Hofstee relationships. Hence, it was impossible to determine the kinetic inhibition parameters V_{imax} (maximal inactivation rate) and K_i using these methods. To access these parameters, the Hill equation (Eq.2) was employed. This not only provided V_{imax} and K_i , but also allowed the determination of the degree cooperativity between the inhibitory binding sites.

Assuming that inhibition obeys the following reaction process,

$$E + n I \qquad \stackrel{\mathbf{K}}{\longleftrightarrow} \qquad (E - I_n)$$

then,

$$\mathbf{K} = [\mathbf{E} - \mathbf{I}_n] / [\mathbf{E}] [\mathbf{I}]^n$$

The Hill equation:

$$V_i = V_{imax}$$
 . $[I]^n / K_{0.5}^n + [I]^n$ (Eq. 2)

and

 $log \left(V_{i} \ / \ V_{imax}$ - $V_{i} \ \right)$ = n. log [I] - n.log $K_{0.5}$

where E = free and active enzyme (Tx-xyl)

I = inhibitor (phenolic compound)

 $E-I_n$ = inactive enzyme-inhibitor complex

- n = Hill coefficient that represents apparent number of phenolic compound (inhibitor)
 molecules reacting with enzyme molecule to form an inactive enzyme complex,
 with one active site per enzyme molecule
- K = apparent over-all association constant; $K_{0.5}$ denotes the inhibitor concentration which gives an inactivation rate (V_i) equal to half the maximal inactivation rate (V_{imax})

Table 1 summarises the kinetic parameters that characterise the inactivation of Tx-xyl by the different phenolic compounds. The estimated values for V_{imax} were quite comparable for the five phenolic compounds, although cinnamic acid appeared to induce the fastest inactivation of Tx-xyl (0.19 min^{-1}) . However, the comparison of the apparent association constants revealed that caffeic acid displayed higher K_{0.5} value (90.05 mM) than ferulic acid (79.32 mM), tri-methoxycinnamic acid (75.91 mM), cinnamic acid (72.81 mM) and p-coumaric acid (71.29 mM), suggesting that more caffeic acid is involved in the enzyme-inhibitor complex when an inactivation rate equivalent to 50% of V_{imax} is reached. This greater interaction between caffeic acid and Tx-Xyl was further investigated by analysis of the corresponding Hill coefficient (n), an index of binding cooperativity that is dependent both on the number of inhibitor "binding" sites and the strength of the interactions between them. A value of n=1indicates that binding sites are independent, whereas cooperativity is indicated by n > 1, where the integral value is equal to the number of sites. The Hill coefficients presented in table 1 were derived from the slopes of linear Hill plots (Fig.3.). All values for n were significantly greater than 1, indicating that the binding of the phenolic compounds obeys to a positive cooperative process. In the case of cinnamic, p-coumaric, ferulic and tri-methoxycinnamic acids, the Hill coefficients were close to a value of 3, indicating that at least 3 molecules bind cooperatively to Tx-xyl. In the case of caffeic acid, this value was close to 4. Accordingly, these results confirm the apparent higher affinity of caffeic acid towards Tx-Xyl.

3.2. Fluorescence study of the interaction of Tx-Xyl with phenolic compounds

3.2.1 Tryptophan fluorescence quenching: evidence for Tx-Xyl conformational changes

To investigate the binding of the phenolic compounds to Tx-xyl using fluorescence spectroscopy, the fluorescence emission from tryptophan was used, as the fluorescence of the indole chromophore is highly sensitive to its micro-environment making it an ideal choice for reporting protein conformation changes and interactions with other molecules.^{37,38} Excitation and emission wavelengths were 295 and 340 nm respectively. In these conditions, the fluorescence emission from cinnamic acid was almost undetectable, while the emission

spectra from caffeic, ferulic, p-coumaric acids were weak. Only tri-methoxy-cinnamic acid displayed a strong emission, but this reached a maximum at approximately 430 nm. (Fig. 4.f) As depicted in Fig.4., decreases in the fluorescence intensity of the emission spectra of Tx-Xyl correlated with increases in the concentration of phenolic compounds (from 1 μ M to 10 mM), indicating that a concentration-dependant quenching of the intrinsic protein fluorescence had occurred. Maximal quenching was obtained at 10 mM, so emission spectra recorded at higher concentrations (20-100 mM) are not shown. Furthermore, quenching of the fluorescence emission was accompanied by a substantial blue-shift (of 12 to 14 nm) that reduced the emission maximum from 340 nm to 326-328 nm. Tx-Xyl contains at least 13 tryptophan residues distributed throughout its 182 residues primary sequence, 3 at the surface and 10 embedded in the protein core.²⁷ Thus, the fluorescence quantum yield of the whole Tx-Xyl macromolecule reflects in reality the mean value of the yields of all 13 tryptophan residues in different environments. The observed phenolic-induced decreases in Tx-Xyl intrinsic fluorescence could result from local protein conformation changes in the bound state, which alter the interactions of some tryptophan residues with neighbouring groups and consequently their emission. Tryptophan fluorescence is, indeed, exquisitely sensitive to position (protein surface or interior) and environment (hydrophobic, polar...) which are in turn directly influenced by the protein conformation. Emission maximum is red-shifted (λ_{max} in the range of 345-355 nm) when tryptophan residues are exposed to a polar environment (exposed to solvent) and have high mobility, while in an apolar environment, tryptophan residues (buried in the protein) display blue-shifted emission (λ_{max} in the range of 325-335 nm).^{37,39,40} A λ_{max} of 320 nm has been reported for free tryptophan in hexane and is considered as typical for buried tryptophan residues in a hydrophobic environment with significant quenching by nearby amino-acid residues. The occurrence of blue shift reveals a selective quenching of solvated tryptophan residues which emit at longer wavelength and presumably suggests that the interactions between the several phenolic compounds and Tx-Xyl would be mainly surface interactions.

3.2.2 Mechanism of fluorescence quenching

Fluorescence quenching can be dynamic, resulting from collisional encounters between the fluorophore and the quencher, or static resulting from the formation of a non-fluorescent

ground state complex between the fluorophore and the quencher. To interpret the data from the fluorescence titration experiments of Tx-Xyl in presence of the phenolic compounds, the Stern-Volmer equation, which can be used to describe both static and dynamic processes, was used:

$$F_0/F = 1 + K_Q \cdot \Gamma_0 \cdot [Q] = 1 + K_{SV} \cdot [Q]$$
 Eq (3)

where F_0 and F are the fluorescence intensities of Tx-Xyl in the absence and presence of quencher, respectively. [Q] is the concentration of the quenching agent (i.e. phenolic compounds) and K_{SV} is the Stern-Volmer quenching constant, which can be written as $K_{SV} = K_Q.\Gamma_0$, where K_Q is the bimolecular quenching rate constant and Γ_0 is the lifetime of the fluorophore in the absence of quenching agent.

Plots of F₀/F versus [Q], are shown in Fig.5. These were linear for concentrations ≤ 1 mM, while a slight downward deviation from linearity was displayed at higher concentrations (> 1 mM) (data not shown). This could be explained by the presence of two classes of fluorophore that differentially interact with the quenching agent.⁴¹ The Stern-Volmer quenching constants (K_{SV}) were determined from the slopes of the F₀/F versus [Q] plots, using the linear part (0 to 1mM). Considering that the Γ_0 of a bio-molecule is approximately 10⁻⁸ s,⁴² the quenching rate constants K_Q were calculated.

As summarized in table 2, the average K_Q values ranged from 4.33.10¹¹ M⁻¹s⁻¹ to 10.8.10¹¹ M⁻¹s⁻¹ for the five phenolic acids. These values are 10 to 100 fold higher than the upper limit value of K_Q associated with a diffusion-controlled bimolecular quenching process involving dynamic quenchers (~10¹⁰ M⁻¹s⁻¹).⁴³ Therefore, it is unlikely that the quenching of Tx-Xyl is initiated by dynamic collision, but most probably by static quenching through the formation of a complex between Tx-Xyl and the phenolic compounds.

3.2.3 Binding constants

Assuming that the fluorescence quenching of Tx-Xyl was primarily static, it was possible to derive the binding (or affinity) constant (K_A) and from the plot of log (F_0 -F)/F versus log ([Q]), based on the following equation:

$$\log (F_0 - F)/F = \log K_A + n \log ([Q])$$
 Eq. (4)

Fig.6. shows the double logarithmic curves obtained for the five phenolic compounds. The plots were almost linear for the whole concentration range $(1\mu M - 10 \text{ mM})$ and thus allowed calculation of the corresponding K_A and n given in table 2. Results indicate that Tx-Xyl

displays a higher binding affinity for caffeic acid $(10.9.10^2 \text{ M}^{-1})$ than for *p*-coumaric acid $(8.41.10^2 \text{ M}^{-1})$ and ferulic acid $(7.39.10^2 \text{ M}^{-1})$. The lowest affinities were obtained with cinnamic acid $(3.60.10^2 \text{ M}^{-1})$ and 3,4,5 tri-methoxy-cinnamic acid $(3.61.10^2 \text{ M}^{-1})$. In full agreement with the association constants deduced from the inhibition kinetic study, these results clearly indicate that the affinity of Tx-Xyl increased with the increased hydroxyl group content of the phenolic compounds. Thus, it can be concluded that the presence of aromatic hydroxyl groups play a rather more important role than the methoxyl groups in the interaction of Tx-Xyl with the phenolic compounds.

The values of binding sites (n) were not considered, since the binding equilibrium given by the double logarithm equation (Eq. 4) assumes that small quencher molecules bind independently to a set of equivalent and similar binding sites in the protein molecule, and doesn't take into account any cooperative effect (negative or positive) between the binding sites like it was previously demonstrated by the kinetic approach.

4. Discussion

Understanding the interactions of soluble inhibitors that may be generated during biomass pre-treatment with hydrolytic enzymes is an important step towards the optimization of biorefining processes and the enzymes used therein. Two approaches were pursued in order to better investigate the inactivation mechanism of the xylanase (Tx-Xyl) by several phenolic compounds varying in their hydroxyl and methoxyl radical content.

The kinetic analysis demonstrated that the inhibition of Tx-Xyl by the different phenolic compounds followed a "multi-site" non competitive inhibition mechanism, indicating that more than one aromatic molecule interacts with the enzyme molecule to induce its complete inactivation. Accordingly, the Tx-Xyl inhibition by the phenolic compounds does not involve direct interaction with the enzyme active site, but occurs through the formation of phenolic compound-enzyme complex, consistently with the earliest suggestions of Sharma et *al.* 1985. Indeed, these authors proposed that phenolic compounds could directly affect *in vitro* enzyme activity in two ways: first, by forming a soluble but inactive enzyme-inhibitor complex at low phenolic concentrations, and second by reducing the solubility of enzyme proteins by forming insoluble protein-phenolic complex at high phenolic concentrations. Our kinetic data rather support the formation of inactive enzyme-phenolic complex and confirm the finding of Senior

et *al.* (1991) who reported a non competitive inhibition of a xylanase from *Trichoderma harzianum* by lignin degradation products generated in spent sulfite pulping liquor.

However, a noteworthy aspect of the inhibition mechanism observed for Tx-Xyl is the cooperative effect between multiple binding sites of phenolics. This feature assumes the presence of inter-dependant and interacting phenolic binding sites on the protein molecule with differential affinities. Thus, initial binding of aromatic molecules would occur at high affinity binding sites, which then influence the binding of further inhibitor molecules to other low affinity sites. To some extent, we can consider this as an allosteric behaviour. According to the simplest definition proposed by Taketa el *al.* 1965,⁴⁴ allosteric inhibition would be the interaction of an enzyme and an inhibitor at a site on the enzyme that is distinct from the catalytic active site and which results in the loss of enzyme activity. To our knowledge, such an inhibition mechanism has never been described for an enzyme that obeys Michaelien kinetics. Therefore, this observation is no doubt an indication of the quite complex kinetics of catalysis performed by GH11 xylanases.

A characteristic feature of an allosteric inhibition is that loss of enzyme activity is provoked by changes in protein conformation. In the case of Tx-xyl, such changes are strongly suggested by the significant alterations to the florescence emission spectra (blue shift and decrease in the fluorescence quantum yield) that occurred upon binding of the phenolic compounds to the enzyme. Recently, Paes et al. 2007 evidenced modest blue-spectral shifts (2.4 to 3.3 nm) in fluorescence emission spectra of Tx-Xyl when xylotetraose or xylopentaose were bound. These shifts were attributed to the implication of residues tryptophan 7 and/or tyrosine 86 in the interaction.⁴⁵ However, in the present case the more profound effect of binding of phenolic compounds (notably the blue-shifts of 12 to 14 nm) can not be simply attributed to interactions with multiple surface aromatic residues, but would also involve protein conformational changes that could affect the micro-environment of internal aromatic residues. Since such Tx-Xyl fluorescence spectral changes have arisen at low phenolic compound concentrations (lower than 1 mM), while the kinetic inhibitions effects only started to be detected at an approximately 10 fold higher concentration (10 mM), we can hypothesize that protein conformation changes precede and thus lead to the loss of enzyme activity. Change in a xylanase three dimensional structure in presence of lignin black liquor was already observed by circular dichroïsm.²³

In a broader context, interactions of phenolic compounds with proteins have been largely documented in the literature, given their important biological and antioxidant properties. ⁴⁶ Phenolics were found to influence protein biological functions by altering their

physicochemical properties (such as solubility, electrophoretical behaviour, hydrophobicity, secondary and tertiary structure, as well as thermodynamic parameters). ⁴⁷⁻⁵⁰ Studies showed that the non covalent binding of ferulic acid to human serum albumin, bovine serum albumin, and lysozyme caused significant changes in the protein tertiary structure, while the non covalent interactions of human serum albumin with cinnamic acid, *p*-coumaric acid and caffeic acid were found to further induce concomitant changes in the secondary structure of the protein.⁵¹⁻⁵³ Our results strongly support that phenolic compounds induce conformational changes of Tx-Xyl but further studies (notably circular dichroïsm) are under progress in order to valid this hypothesis.

The most of phenolic compounds interactions with Tx-Xyl would likely be surface interactions, as can be deduced from the selective quenching of the solvated tryptophan residues. These interactions may include both hydrophobic interactions between aromatic ring of the phenolic compounds and the exposed hydrophobic amino acid residues and/or ionic-type interactions between their charged (COOH, OH) functional groups and the basic amino acid residues. The elucidation of the relative importance of the two types of interaction requires further detailed studies. However, the presence of about 11 surface-exposed hydrophobic patches on Tx-Xyl macromolecule may constitute potential phenolic binding sites.²⁷

With regards to the role of phenolic functional radicals in the inhibitory interactions, although all the five phenolic compounds displayed rather similar and comparable inhibitory effects on Tx-xyl activity, association constants deduced from the kinetic study and the fluorescence analysis underlined a higher interaction affinity of the enzyme with caffeic acid. Thus, clear correlations could be established between the hydroxyl (OH) content and the inhibitory effects. On the other hand, no evidence could be found concerning the impact of methoxyl radicals, since results obtained for the 3,4,5 tri-methoxy-cinnamic acid are rather similar to those of cinnamic acid. Recently, Pan 2008 has reported practically similar effects of hydroxyl and methoxyl groups of lignin on the action of cellulase cocktail.²⁵ The author strongly supports the implication of free phenolic hydroxyl groups in enzyme inactivation, based on the fact that chemical block of these groups by hydroxypropylation could significantly remove the inhibitory effect of lignin samples. It is largely believed that phenolic hydroxyl groups play a key role in lignin-enzyme interactions. Studies revealed that phenolic hydroxyl groups are necessary and important sites for the protein-adsorption capacity of tannins and lignins, ⁵⁴ since they would notably mediate inter-linkages between nucleophilic sites of proteins and the quinone methide groups of lignins.⁵⁵ Thus, the protein adsorption by

lignins was suggested to be significantly dependent upon phenolic hydroxyl group content and distribution pattern.

Although it is difficult to draw general conclusions about the effects of soluble phenolic compounds on hemicellulases and cellulases due to both the large structural differences between enzymes and the diversity of lignin degradation products, this work provides a significant improvement in the understanding of the interactions between a GH11 endoxylanase and soluble inhibitors that may be generated during biomass pre-treatment. Interestingly, the interaction nature of soluble phenolic compounds with Tx-Xyl could to some extent explain the adsorption capacities of particulate lignins to enzyme proteins. As it is well known, lignins act as enzyme attractant resulting in non-productive binding. The surface properties of lignins, as polydisperse aromatic biopolymers would be essentially conditioned by their structure and so all the elementary aromatic molecules would be more or less involved in terms of sorption.

Overall, the results may contribute to a rational design of pre-treatment technology and lignocellulose hydrolysis process by considering certain important factors. Firstly, the formation of inhibitors can be minimised through optimisation of the pre-treatment conditions. Secondly, specific low cost detoxification methods can be developed for efficient removal of inhibitors before enzymatic processing.⁵⁶ Besides of substrate treatment, selection or engineering of "weak phenolics interacting enzymes", as introduced by Berlin et *al.* 2005, will offer an alternative mean of bioconversion process improvement.⁵⁷

5. References

- (1) Cardona, C. A.; Sánchez, Ó. J. *Bioresource Technology* **2007**, *98*, 2415-2457.
- (2) Merino, S. T.; Cherry, J. *Biofuels* **2007**, *108*, 95-120.
- (3) Lin, Y.; Tanaka, S. Applied Microbiology and Biotechnology **2006**, 69, 627-642.
- (4) Sun, Y.; Cheng, J. *Bioresource Technology* **2002**, *83*, 1-11
- (5) Kumar, R.; Singh, S.; Singh, O. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2008, 35, 377-391.
- (6) Akin, D. E. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr* **2008**, *2*, 288-303.
- (7) Chandra, R. P.; Bura, R.; Mabee, W. E.; Berlin, A.; Pan, X.; Saddler, J. N. Adv Biochem Engin/Biotechnol 2007, 108, 67-93.
- (8) Hendriks, A. T. W. M.; Zeeman, G. *Bioresource Technology* **2009**, *100*, 10-18.
- (9) Mes-Hartree, M.; Saddler, J. N. *Biotechnology Letters* **1983**, *5*, 531-536.
- (10) Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B.; Galbe, M.; Zacchi, G. *Enzyme and Microbial Technology* **1996**, *19*, 470-476.
- (11) Larsson, S.; Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B.; Tengborg, C.; Stenberg, K.; Zacchi, G.; Nilvebrant, N.-O. *Enzyme and Microbial Technology* **1999**, *24*, 151-159.
- (12) Palmqvist, E.; Hahn-Hagerdal, B. *Bioresource Technology* **2000**, *74*, 25-33.
- (13) Ximenes, E.; Kim, Y.; Mosier, N.; Dien, B.; Ladisch, M. *Enzyme and Microbial Technology* **2010**, *46*, 170-176.
- (14) Zhang, Y. H. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2008, 35, 367-375.
- (15) Kleinert, M.; Barth, T. Chemical Engineering & Technology 2008, 31, 736-745.
- (16) Cantarella, M.; Cantarella, L.; Gallifuoco, A.; Spera, A.; Alfani, F. *Biotechnology Progress* 2004, 20, 200-206.
- (17) Hodge, D. B.; Karim, M. N.; Schell, D. J.; McMillan, J. D. *Bioresource Technology* 2008, 99, 8940-8948.
- (18) Ko, J. J.; Shimizu, Y.; Ikeda, K.; Kim, S. K.; Park, C. H.; Matsui, S. Bioresource Technology 2009, 100, 1622-1627.
- (19) Freudenberg, K. Science **1965**, 148, 595-600.
- (20) Ralph, J.; Brunow, G.; Boerjan, W. Encyclopedia of Life Sciences. Copyright © 2007 John Wiley & Sons, 2007, 1-10.

- (21) Sharma, A.; Milstein, O.; Vered, Y.; Gressel, J.; Flowers, H. M. *Biotechnol. Bioeng.* 1985, 27, 1095-1101.
- (22) Senior, D. J.; Mayers, P. R.; Breuil, C.; Saddler, J. N. In: Kirk, T.K., Chang, H.-M.(Eds.), Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture. Butterworth-Heinemann, Boston, MA 1990, 169-182.
- (23) Kaya, F.; Heitmann, J. A.; Joyce, T. W. Journal of Biotechnology 2000, 80, 241-247.
- (24) Tengborg, C.; Galbe, M.; Zacchi, G. *Enzyme and Microbial Technology* **2001**, *28*, 835-844.
- (25) Pan, X. Journal of Biobased Materials and Bioenergy 2008, 2, 25-32.
- (26) Sewalt, V. J. H.; Glasser, W. G.; Beauchemin, K. A. J. Agric. Food Chem. 1997, 45, 1823-1828.
- Harris, G. W.; Pickersgill, R. W.; Connerton, I.; Debeire, P.; Touzel, J.-P.; Breton, C.;
 Pérez, S. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 1997, 29, 77-86.
- (28) Samain, E.; Debeire, P.; Touzel, J. P. Journal of Biotechnology 1997, 58, 71-78
- Touzel, J.; O'Donohue, M.; Debeire, P.; Samain, E.; Breton, C. International Journal Of Systematic and Evolutionary Microbiology 2000 50, 315-320
- (30) Debeire-Gosselin, M.; Loonis. M.; Samain, E.; Debeire, P. In: Xylans and Xylanases(Visser. J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M. A., and Voragen, A. G. J., Eds.). Elsevier Science Publishers 1992, 463-466.
- (31) Kidby, D.; Davidson, D. Analytical Biochemistry 1973 55 321-325
- (32) Stern, V. O.; Volmer, M. Physik. Zeitschr. 1919, 20, 183-188.
- (33) Hazen, S. L.; Zupan, L. A.; Weiss, R. H.; Getman, D. P.; Gross, R. W. J. Biol. Chem. 1991, 266, 7227-7232.
- (34) Renosto, F.; Seubert, P. A.; Knudson, P.; Segel, I. H. J. Biol. Chem. 1985, 260, 11903-11913.
- (35) Levy, H. M.; Leber, P. D.; Ryan, E. M. J. Biol. Chem. 1963, 238, 3654-3659.
- (36) Monod, J.; Wyman, J.; Changeux, J. P. *Journal of Molecular Biology* **1965**, *12*, 88-118.
- (37) Eftink, M. R. Methods of Biochemical Analysis 1991, 35, 127-205.
- (38) Engelborghs, Y. Journal of Fluorescence 2003, 13, 9-16.
- (39) Eftink, M. R.; Ghiron, C. A. Biochemistry 1976, 15, 672-680.
- (40) Vivian, J. T.; Callis, P. R. *Biophysical Journal* 2001, *80*, 2093-2109.
- (41) Lehrer, S. S.; Leavis, P. C. Methods Enzymol 1978, 49, 222-36.

- (42) Valensin, G.; Kushnir, T.; Navon, G. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1982**, *46*, 23-29.
- (43) Ware, W. R. *The Journal of Physical Chemistry* **1962**, *66*, 455-458.
- (44) Taketa, K.; Pogell, B. M. J. Biol. Chem. 1965, 240, 651-662.
- (45) Paes, G.; Tran, V.; Takahashi, M.; Boukari, I.; O'Donohue, M. J. Protein Engineering, Design and Selection 2007, 20, 15-23.
- (46) Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Food Chemistry 2006, 99, 191-203.
- (47) Kang, J.; Liu, Y.; Xie, M.; Li, S.; Jiang, M.; Wang, Y. *Biochimica et Biophysica Acta-General subjects* **2004**, *1674* 205-214.
- (48) Rawel, H. M.; Frey, S. K.; Meidtner, K.; Kroll, J.; Schweigert, F. J. Molecular Nutrition & Food Research 2006, 50, 705-713.
- (49) Rawel, H. M.; Rohn, S.; Kruse, H.-P.; Kroll, J. Food Chemistry 2002, 78, 443-455.
- (50) Rohn, S.; Rawel, H. M.; Kroll, J. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002, 50, 3566-3571.
- (51) Rawel, H. M.; Meidtner, K.; Kroll, J. Journal of Agricultural and Food Chemistry **2005**, *53*, 4228-4235.
- (52) Min, J.; Meng-Xia, X.; Dong, Z.; Yuan, L.; Xiao-Yu, L.; Xing, C. Journal of Molecular Structure 2004, 692, 71-80.
- (53) Zhang, Y.; Yue, Y.; Li, J.; Chen, X. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 2008, 90, 141-151
- (54) Kawamoto, H.; Nakatsubo, F.; Murakami, K. Mokuzai Gakkaishi 1992, 38, 81-84.
- (55) Sewalt, V. J. H.; Glasser, W. G.; Fontenot, J. P.; Allen, V. G. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1996**, *71*, 195-203.
- (56) Mussatto, S. I.; Roberto, I. C. *Bioresource Technology* **2004**, *93*, 1-10.
- (57) Berlin, A.; Gilkes, N.; Kurabi, A.; Bura, R.; Tu, M. B.; Kilburn, D.; Saddler, J. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2005**, *121*, 163-170.

6. Figures



Fig.1. Model phenolic compounds. (A) cinnamic acid; (B) *p*-coumaric acid; (C) caffeic acid;(D) ferulic acid; (E) 3,4,5 trimethoxy-cinnamic acid



40 60 80 [CA]mM

25

30

15 20 Time (min)

0 + 0

5

10

Fig.2. Kinetics of inactivation of Tx-Xyl by phenolic compounds.

Pseudo first-order plots for the inactivation of Tx-Xyl by cinnamic acid (a), *p*-coumaric acid (b), caffeic acid (c), ferulic acid (d), tri-methoxy-cinnamic acid (e). Tx-Xyl (0,5 μ M) was preincubated at 60°C with 0 mM (\bullet), 10 mM (\blacksquare), 20 mM (\blacktriangle), 50 mM (x), 70 mM (*), 80 mM (\bullet) and 100 mM (+) of each phenolic compound. Aliquots were withdrawn at indicated time intervals and assessed for residual xylanase activity. Insets: Replots of the apparent pseudo first-order inactivation rate constants (K_{app}) calculated from the main figure as function of phenolic concentration.



Fig.3. Hill plots : Linear regressions of the plots of log $[v_i/V_{imax}-v)]$ vs log of concentration of cinnamic acid (\blacklozenge), *p*-coumaric acid (\blacksquare), caffeic acid (\blacktriangle), ferulic acid (\bullet), tri-methoxy-cinnamic acid (\ast).



Fig.4. Representative fluorescence emission spectra of Tx-Xyl (5 x 10^{-6} mol 1^{-1}) in the absence and the presence of increasing amounts (from 1 x 10^{-6} to 10 x 10^{-3} mol 1^{-1}) of cinnamic acid (a), *p*-coumaric acid (b), caffeic acid (c), ferulic acid (d), tri-methoxy-cinnamic acid (e) in 10 mM sodium acetate buffer, pH 5,8 after 30 min of incubation at 60°C. (f)-control emission spectra of the 5 phenolics (20 x 10^{-3} mol 1^{-1}) (TMCI: tri-methoxy-cinnamic acid). The excitation wavelength was 295 nm.



Fig.5. Stern - Volmer plots of fluorescence quenching of Tx-Xyl of Tx-Xyl treated at 60°C with different concentrations of cinnamic acid (CI) (\blacklozenge), *p*-coumaric acid (CO) (\blacksquare), caffeic acid (CA) (\blacktriangle), ferulic acid (FE) (\blacklozenge), tri-methoxy-cinnamic acid (TMCI) (\ast). $\lambda_{ex} = 295$ nm.



Fig. 6. Logarithmic plots of fluorescence quenching of Tx-Xyl treated at 60°C with different concentrations (from 1 x 10⁻⁶ to 10 x 10⁻³ mol l⁻¹) of cinnamic acid (CI) (\blacklozenge), *p*-coumaric acid (CO) (\blacksquare), caffeic acid (CA) (\blacktriangle), ferulic acid (FE) (\blacklozenge), tri-methoxy-cinnamic acid (TMCI) (*). $\lambda_{ex} = 295$ nm.

7. Tables

	<i>K</i> _{0.5} (mM)	$V_{imax}(\min^{-1})$	Hill coefficient (n)
Cinnamic acid	72.81 ± 4.95	0.19 ± 0.02	2.58
<i>p</i> -coumaric acid	71.29 ± 4.26	0.12 ± 0.01	2.89
Caffeic acid	90.05 ± 6.13	0.17 ± 0.02	3.43
Ferulic acid	79.32 ± 11.83	0.13 ± 0.03	2.59
3,4,5 tri-methoxy-cinnamic acid	75.91 ± 7.04	0.13 ± 0.02	2.79

Table 1: Kinetic parameters of Tx-Xyl inactivation by phenolic compounds

Table 2: Quenching rate constants (K_Q) and binding constants (K_A) of Tx-Xyl to phenolic compounds:

	$K_Q \ge 10^{-11} (M^{-1}s^{-1})$	$K_A \ge 10^{-2} (M^{-1})$
Cinnamic acid	4.33	3.60
<i>p</i> -coumaric acid	9.88	8.41
Caffeic acid	10.2	10.9
Ferulic acid	10.8	7.39
3,4,5 tri-methoxy-cinnamic acid	9.91	3.61

Chapitre III

Impact des paramètres structuraux d'une endoxylanase GH11 sur ses capacités hydrolytiques

Fusion of a cellulose binding module with a GH11 endoxylanase: Impact on the hydrolysis of insoluble lignocellulosic substrates

Imen Boukari^{a,b}, Caroline Rémond^{a,b}, Brigitte Chabbert,^{a,b}, Michael O'Donohue^{c,d,e} *

^a INRA, UMR 614, Fractionnement des AgroRessources et Environnement, F-51686 Reims, France.

^b University of Reims Champagne Ardenne, UMR 614, Fractionnement des AgroRessources et Environnement, F-51686 Reims, France.

^c Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, F-31077 Toulouse, France

^d INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400, France

^e CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

(publication n°4: A soumettre dans Applied Microbiology and Biotechnology)

Fusion of a cellulose binding module with a GH11 endoxylanase: Impact on the hydrolysis of insoluble lignocellulosic substrates

Abstract

Endo- β -1,4-xylanases (EC 3.2.1.8) are the main enzymes involved in the hydrolysis of xylans, the most abundant hemicelluloses in plant biomass. While it is very common that GH 10 endoxylanases have structurally CBMs binding either cellulose (CBD) or xylan (XBD), GH 11 endoxylanases are mainly non modular enzymes comprising only a catalytic module. To investigate the impact of CBMs on the biotechnological performance of these enzymes towards lignocellulosic substrates, the family 1 CBD from Hypocrea jecorica (previously Trichoderma reesei) cellulase (Cel7A) was fused at the C-terminus of the thermostable GH11 endoxylanase from Thermobacillus xylanilyticus (Tx-Xyl). The constructed chimeric xylanase was expressed in *Escherichia coli*, purified to homogeneity, and then subjected to detailed characterization. Binding studies on cellulose indicated that the CBD fused xylanase had acquired the ability to bind crystalline cellulose. The stability of the chimeric xylanase was studied and its catalytic properties and efficiency determined on soluble xylans and insoluble lignocellulosic substrates. Results showed a slightly decreased thermoactivity and thermostablity of the chimeric enzyme compared to Tx-Xyl as well as an important loss of enzyme efficiency on soluble polymers (i.e. Birchwood xylan), but interestingly a modestly enhanced hydrolysis rates towards complex lignocellulosic substrates (i.e. wheat bran and straw). Hence, the CBD may potentiate the catalytic activity of the endoxylanase by either targeting potentially inaccessible xylan zones and/or improving enzyme diffusion within the complex plant wall network.

Keywords: GH11 xylanase, family 1 cellulose binding module (CBM), chimeric fusion enzyme, lignocellulose hydrolysis

Abbreviations: EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid); DTT (Dithiothreitol); IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside,); PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)

Introduction

Rising environmental and economic concerns linked to Man's dependency on fossil fuels are currently driving R&D aimed at the development of viable energy alternatives, such as ethanol, using biomass as a lignocellulosic feedstock. The selection and design (through protein engineering) of new enzymatic tools, to achieve efficient breakdown of lignocellulosic polysaccharides actually represent the most important challenge for biotechnologists to develop cost-effective biorefining processes.¹

At a structural level, most lignocellulolytic enzymes (cellulases, hemicellulases...) often have a complex modular architecture comprising a catalytic module appended to one or more non catalytic carbohydrate-binding modules (CBMs) via a flexible linker sequence.

The generic term CBM refers to as non catalytic protein modules that are associated with glycoside-hydrolysing or -modifying enzymes and that display carbohydrate-binding activity.^{2,3} By analogy with the catalytic modules of glycoside hydrolases (GHs), CBMs are currently categorized into 59 defined families based on amino acid sequence similarities, and members of each family share a common structural fold, but not necessarily specificity. (http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html)⁴ A functional classification of CBM is also adopted, grouping them into three types: surface binding CBMs (type A), glycan-chain binding CBMs (type B) and small-sugar binding CBMs (type C).⁵

Generally, CBMs play a central role in the optimization of the enzymatic catalysis of cellulases or hemicellulases through their ability to target the catalytic module to specific plant structural and storage polysaccharides (cellulose, glucan, xylan, mannan...) thereby increasing the effective concentration of the enzymes on the surface of insoluble substrates, and/or by their possible disruptive effects on the plant wall network. ^{6,7} Accordingly, CBMs typically increase the activity of cellulases and hemicellulases towards polymeric or insoluble substrates and are thus of biotechnological interest, ⁸⁻¹⁰ particularly those targeting crystalline cellulose ^{11,12} which forms the core of carbohydrate microfibrils that provide structure and strength to plant cell walls. Family 1 CBMs, which are associated to fungal glycoside hydrolases, are of particular interest. The most studied CBM among this family is the CBM of the cellobiohydrolase Cel7A (previously CBH I) produced by *Trichoderma reesei* (currently *Hypocrea jecorina*), the most common source of commercial cellulases today.^{13,14} Numerous studies have demonstrated that this small 36 amino acid domain stabilised by two S–S bridges

not only aids in binding to crystalline cellulose but exerts a thermodynamic driving force on the Cel7A enzyme during its processive action, thus enhancing the cellulose hydrolysis.¹⁵⁻²⁰

Endo- β -1,4-xylanases (EC 3.2.1.8) are the main enzymes, involved in the hydrolysis of heterroxylans, the most abundant hemicelluloses in plant biomass. To date, more than 39 three-dimensional (3D) structures of xylanases have been solved, essentially from the two main GH families, GH10 and GH11. The GH11 family is monospecific, comprising only "true xylanases" with exclusive substrate specificity towards D-xylose containing polymeric substrates. At the opposite, GH10 xylanases have a higher catalytic versatility and in addition to their xylanolytic activity, display tolerance for a range of glucose-derived substrates, such as aryl cellobiosides.²¹⁻²³ The substrate specificity of the two xylanase families is mainly reflected by the structural features of their active site, but could be also related to their overall molecular structure. Indeed, in addition to their catalytic domain, GH10 xylanases are frequently linked at their N- or C-terminal ends to one or more non catalytic xylan (XBD) or cellulose (CBD) binding domain, while GH 11 endoxylanases are mainly non modular enzymes comprising only a catalytic domain. In total, the 3D structures of 15 CBM from different families and types associated with xylanases from GH10, 11 and 43 are currently known (Table 1).²⁴ These CBM are mostly specific to xylan (XBD) and to date rare are the identified GH 11 xylanases having a cellulose binding module. It is the case of the fungal Xyn11A from *Lentinula edodes* connected at its C-terminus to a family 1 CBD,²⁵ the bacterial XylA from *Clostridium stercorarium*, ²⁶ and XynA and XynB from the cellulosome complex of *Clostridium thermocellum*²⁷ that contain all a family 6 dual CBM (binding to both xylan and amorphous cellulose).

In single domain GH11 xylanases, the lack of XBD is thought to be compensated by the presence of a xylan-specific secondary binding site (SBS).²⁸ The existence of a SBS was recently reported at the surface of GH11 xylanases from *B. circulans*, *A. niger* and *B. subtilis*.^{28,29} Although such secondary sites may bind small oligosaccharides weakly in synergy with active site, they can significantly enhance the specificity and affinity of a xylanase for its natural cell-wall substrates. The role of the CBDs located in some xylanases (notably GH11) is still unclear. The rationale for the evolution of xylanases that have acquired CBDs, rather than XBDs, could be a consequence of the composition of the plant cell wall, the structure and chemical nature of cellulose is invariant. Thus the acquisition of a CBD would enable a xylanase to adhere to plant cell walls regardless of their origin. ³⁰ One

hypothesis, suggested by Ferreira et al. (1990),³¹ is that CBDs may potentiate the catalytic activity of xylanases in particular and hemicellulases in general, by mediating intimate contact between the enzymes and the plant cell wall. Otherwise, it is possible that the CBD, by bringing an array of different enzymes (celullases, hemicellulases) into close contact with the plant cell wall, enhances the synergism that is known to exist between the plant cell-wall hydrolases (like in the case of cellulosome). ³⁰

To gain new insights into the potential role of CBD and to investigate the impact of such binding domain on the biotechnological performance of GH11 xylanases, we have fused the family 1 CBD from *Hypocrea jecorica* cellulase (Cel7A) at the C-terminal of the thermostable GH11 endoxylanase from *Thermobacillus xylanilyticus* (Tx-Xyl). This enzyme, which does not possess any carbohydrate binding module, is highly active on heteroxylan polymers and thermostable.³² Its efficiency as well as its action pattern on complex natural lignocellulosic substrates have been already well studied. ³³⁻³⁷ The small size and high specificity of the Cel7A CBD towards crystalline and non crystalline cellulose make it an interesting probe that may alter the binding and/or diffusion properties of the endoxylanase within lignocelluloses. The stability of the chimeric xylanase was studied and its catalytic properties and efficiency determined on soluble xylans and insoluble lignocellulosic substrates.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids and reagents

The *Escherichia coli* XL1- blue strain (Stratagene) was used as bacterial cloning host, while expression of the recombinant proteins was performed by *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen) and Rosetta (DE3) pLysS (Novagen) cells. The pET28b(+) vector (Novagen) was used as expression vector. Restriction enzymes (*Acl*I, EcoRI, *Nde*I and *Hind*III) were purchased from New England Biolabs, Ozyme, France. T4-DNA ligase and Pfu DNA polymerase were obtained from Promega.

All reagents were analytical grade unless stated otherwise and were purchased from Sigma-Aldrich.

DNA manipulations in E. coli

All routine DNA technologies like PCR and ligation were performed according to standard protocols. ³⁸ QIAprep Spin Miniprep kit, QIAQuick Gel extraction kit and/or Quiaquick PCR purification kit (Qiagen) were used for the purification of plasmids and PCR products. Restriction enzymes and other DNA-modifying enzymes were used as specified by the suppliers (New England Biolabs; Promega). Standard protocols were used for the transformation of competent *E. coli* cells.³⁹ DNA-sequencing reactions were carried out at MWG-Biotech.

Construction of the gene encoding the chimeric protein (Tx-Xyl-CBM1)

The *xyl* gene encoding the GH11 endoxylanase (Tx-Xyl) from *Thermobacillus xylanilyticus* was previously cloned into the *Nde*I and *Eco*RI sites of the T7 promoter-based pRSETA vector, generating the pECXYL plasmid. ⁴⁰ Thus, pECXYL was used as DNA template. Given its small size (~ 246 pb), the nucleotide sequence encoding the CBM1 along with the linker region of the cellobiohydrolase Cel7A from *Hypocrea jecorina* (previously *Trichoderma reesei*) was designed by *in silico* back translation of the amino acid sequence (EMBL accession code: CQ757626.1) and synthesized (GENECUST, France). Codon usage was optimized for *E. coli* expression and the synthesized gene was sub-cloned into pUC57 vector.

For the construction of the chimeric gene encoding the Tx-Xyl-CBM1 protein, a three-step procedure was adopted (Figure 1). In the first step, *AclI* restriction site was introduced at the end of *xyl* gene *via* a silent single mutation. Mutagenesis was carried out using the Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit® (Stratagene) with pECXYL as template DNA and a pair of complementary mutagenic primers (*xyl-AclI*) (Table 2) according to the manufacturer's instructions. Full-length *xyl* gene and the gene segment encoding the CBM1 and the linker (from pUC57) were then amplified using primers 1, 2 and 3, 4, respectively (Table 2). Primers 3 and 4 had *AclI* and *Hind*III restriction sites. In the second step, both amplified genes were digested with *AclI*, prior ligation.

Finally, in the last step the generated fusion gene was amplified using primers 1 and 4, then digested with *NdeI* and *HindIII* and cloned into expression vector pET28b(+), previously digested with the same restriction enzymes. Similarly, full-length *xyl* gene was excised from

pECXYL plasmid and cloned into the *Nde*I and *Eco*RI sites of pET28b(+). This vector carries a T7lac promotor and the resulting recombinant proteins contained an N-terminal His₆-tag to facilitate purification.

The constructed *pET28-xyl* and *pET28-xyl-cbm1* expression vectors were transformed into *E. coli* X11Blue competent cells and confirmed by sequencing. For the expression of the recombinant proteins, confirmed vectors were afterwards transformed into *E. coli* BL21 Star (DE3) and Rosetta (DE3) pLysS competent cells.

Expression and purification of the recombinant proteins

The expression strains *E. coli* BL21 Star (DE3) and Rosetta (DE3) pLysS harbouring respectively the *pET28-xyl* and *pET28-xyl-cbm1* recombinant vectors were grown under shaking (150 rpm) at 37°C in 1L of Luria-Bertani medium supplemented with kanamycin (30 μ g/mL) until the absorbance at 600 nm (A₆₀₀) reached approximately 0.5–0.6.

At this stage, protein expression was induced by the addition of IPTG to a final concentration of 1 mM and incubation was continued for additional 6–8 h. Cells were then harvested by centrifugation (6000 rpm, 15 min) and pellets were suspended in 100 mL of the respective lysis buffers (buffer 1: 50 mM Tris-HCL, 300 mM NaCl, 1mM PMSF, 5 mM imidazole, pH8 and buffer 2: 50 mM Tris-HCL, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 1mM PMSF, pH8 respectively). Cell lysis was achieved by incubation with lysozyme (1 mg/mL) and DNase (1 μ g/mL) for 30 min at room temperature followed by French press disruption (16 000 psi, three cycles at 4°C) using a French press cell disruption system (American Instrument company). Cell lysates were then separated from supernatant by centrifugation (13000 rpm, 20 min). Solubility of the produced recombinant proteins was checked using SDS-PAGE and western blotting (data not shown). (His₆)Tx-Xyl was recovered in soluble active form in the supernatant, while (His₆)Tx-Xyl-CBM1 almost exclusively accumulated as inclusion bodies in the insoluble fraction of the cell lysate.

For the purification of $(His_6)Tx$ -Xyl, the cell lysate supernatant was loaded on a 1 mL Hi-trap chelating HP column (GE Healthcare, Orsay, France) previously equilibrated with the same buffer 1. Column was washed with 50 mM Tris-HCL, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH8 and the recombinant protein was eluted (under native conditions) by increasing the imidazole concentration to 250 mM. Loading and elution were performed at a flow rate of 1 mL.min⁻¹.

In the case of (His₆)Tx-Xyl-CBM1, the collected pellets containing cell debris and inclusion bodies were resuspended in a washing solution (50 mM Tris-HCL, 5 mM EDTA, 50 mM DTT, 0.1% (v/v) triton X-100, pH8) and centrifuged at 13000 rpm for 20 min at 4°C. Subsequently, the pellets were washed twice with 50 mM Tris-HCL pH8 and once with distilled water to remove contaminating salt and detergent and centrifuged again (at 13000 rpm for 20 min at 4°C). Purified (His₆)Tx-Xyl-CBM1 inclusion bodies were then solubilised in denaturing buffer (50 mM Tris-HCL, 200 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol, 8 M urea, 2 mM reduced glutathione (GSH)/0.2 mM oxidized glutathione (GSSG), 5 mM imidazole, pH8). For complete solubilisation and reduction, the inclusion bodies were left for 4 h at room temperature under gentle stirring. The urea-insoluble material was removed by centrifugation (at 13000 rpm for 20 min at 4°C) and the urea-soluble protein was refolded and purified using its metal-binding ability as follow. On-column refolding and purification were performed on Profinity IMAC Ni-charged resin (Biorad) by several changes of buffers. The resin (5-7 mL bed volume) was packed into a glass column of 2 x 5 cm diameter (Pharmacia). First, the column was equilibrated with denaturing buffer for 10 column volumes, before loading with denatured-reduced (His₆)Tx-Xyl-CBM1 in denaturing buffer at 0.8 mL.min⁻¹ flow rate. The column was then rinsed and re-equilibrated using the denaturing buffer containing 10 mM imidazole to remove non-specifically bound contaminants. Refolding of the immobilized (His₆)Tx-Xyl-CBM1 protein was initiated by applying a gradient of decreasing urea concentration simultaneously to buffer exchange to refolding buffer (50 mM Tris-HCL, 200 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 2 mM reduced glutathione (GSH)/0.2 mM oxidized glutathione (GSSG), 10 mM imidazole, pH8) at 0.4 mL.min⁻¹ flow rate for more than 4h and further washing with refolding buffer. Following refolding, the flow rate was increased to 1 mL.min⁻¹ and the refolded protein eluted by increasing the imidazole concentration to 250 mM. All chromatographic steps were performed on an FPLC system (BioCad SPRINT, perfusion chormatography system). The purified (His₆)Tx-Xyl and (His₆)Tx-Xyl-CBM1 proteins were dialyzed against buffer containing 10 mM Tris-HCL, 25% ethylene glycol, pH 8 for long time storage.

Characterization of (His₆)Tx-Xyl and (His₆)Tx-Xyl-CBM1 recombinant proteins

1. Protein analysis

The homogeneity of the purified enzymes was evaluated by standard SDS-PAGE, using a 12% running gel ⁴¹ and Coomassie blue staining. Sigma Marker (wide range) (Sigma-Aldrich) was used as a standard. The protein concentrations were determined spectrophotometrically at 280 nm using the theoretical molar extinction coefficients (100.829 M⁻¹.cm⁻¹ and 106.090 M⁻¹.cm⁻¹ respectively for (His₆)Tx-Xyl and (His₆)Tx-Xyl-CBM1) calculated from the primary amino acid sequences. ⁴²

To verify the correct re-folding of (His₆)Tx-Xyl-CBM1, the polydispersity and the native protein molecular weight were determined using analytical high performance size exclusion chromatographic (HP-SEC) system, connected on-line to a UV detector (Waters 2996).

The HP-SEC system was equipped with a thermostated (40 °C) Shodex Kw 803 column (Shodex Denko Europe GmbH, Munich, Germany). Column flow rate was 0.5 mL.min⁻¹, and the mobile phase was Tris-HCl (10 mM), pH 8. The column was calibrated using the following proteins: β -amylase, 200 kDa; alcohol dehydrogenase, 150 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa; and cytochrome c, 12 kDa (purchased from Sigma).

2. Activity assay, temperature and pH optima and thermal stability

Xylanase activity was assayed by monitoring the release of reducing sugars using a colorimetric method (Kidby and Davidson, 1973). ⁴³ Birchwood xylan (Sigma-Aldrich) (0.5% w/v) was used as substrate in 50 mM sodium acetate, pH 5.8. Measurements were performed by incubating the substrate with appropriately diluted (His₆)Tx-Xyl or (His₆)Tx-Xyl-CBM1 aliquot for 10 min at 60°C in a final volume of 1 mL. At 2 min intervals, samples of 100 μ L were removed and mixed with 1.5 mL of Kidby solution (1% Na₂CO₃ and 0.03% potassium hexacyanoferrate [III]). Coloration was developed by heating (at 100°C) for 5 min, and spectral absorbance was measured at 420 nm. The amount of released sugar was determined using a xylose calibration curve (0 – 400 μ g mL⁻¹). Activity was expressed in terms of International Unit (IU). One IU is defined as the amount of endoxylanase required to release 1 μ mol of reducing xylose equivalent from birchwood xylan per min at 60°C.

Optimal conditions for the recombinant enzymes were determined by performing assays at variable temperatures (20 to 90 °C) or pH values (3.5 to 11). To vary pH, the Britton and Robinson's universal buffer was used. ⁴⁴ The activity of the xylanases over the pH range was measured with birchwood xylan (0.5%, in universal buffer) at 60°C.

Thermostability measurements were performed by incubating enzyme solution at a given temperature for various time periods. After, residual xylanase activity was quantified at 60°C using the Kidby–Davidson procedure described above. Enzyme half life ($T_{1/2}$) was deduced by fitting Log (A/A₀) versus time, where A was the residual activities at different time periods and A₀ the initial activity at each temperature.

3. Kinetic measurements on soluble substrates

Kinetic parameters of the hydrolysis of soluble birchwood xylan by both (His₆)Tx-Xyl and (His₆)Tx-Xyl-CBM1 enzymes were determined using variable substrate concentrations (0.5-10 g.L⁻¹) in the standard enzyme assay. Experiments were performed in triplicates and the kinetic parameters k_{cat} and K_m and their associated standard errors were derived from Michaelis–Menten representations using the SigmaPlot 2000 software (version 6.1 with Enzyme Kinetics module 1.0, SPSS Science, Paris, France). Owing to the heterogeneous nature of the polymeric substrates, their molar concentrations could not be calculated. Consequently, only an apparent value for the Michaelis constant, $K_{m(app)}$, was determined.

4. Adsorption assay on cellulose

Adsorption studies of the recombinant xylanases onto microcrystalline cellulose (Sigma) were performed by mixing cellulose (20 mg) with the purified xylanases (~ $2.8 - 20.5 \mu g$ enzyme g⁻¹cellulose) in 2 mL of buffer (Tris HCl 10 mM, pH 8). The mixtures were incubated at 60°C with continuous stirring and samples were withdrawn periodically (during 6 h incubation) and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The amount of enzyme in the supernatant was determined from the measurement of enzymatic activity, since the lowest quantities of enzyme did not allow protein quantification. The quantity of adsorbed enzyme was calculated by subtracting the amount of the enzyme in the supernatants from the amount of enzyme added initially. Experiments were performed in duplicate and mean values are reported.

Protein adsorption on the solid surface can be described by the Langmuir equation:

$$E_{ads} = (E_{max}.K_p) / (1 + K_p.E_f)$$

Where E_{ads} is the adsorbed enzyme (mg/L), E_{max} is the maximum adsorbed enzyme, K_p is the adsorption equilibrium constant, and E_f is the free enzyme concentration in the liquid phase. The E_{max} and K_p can be calculated by a number of mathematical methods or software.⁴⁵

Evaluation of the hydrolytic ability of (His₆)Tx-Xyl and (His₆)Tx-Xyl-CBM1 on lignocellulosic substrates

Destarched wheat bran and milled wheat straw (of 1 mm particle size) (provided by ARD, Pomacle, France) were used as lignocellulosic substrates. Duplicate experiments were performed in double enveloped, thermostated reactors, in which substrates were hydrated in 10 mM Tris–HCl, pH 8 (1% w/v containing 100 μ g.ml⁻¹ fucose) for 16 h at 60°C with continuous stirring. Enzymes were then added (350 IU/g of substrate) and incubation was continued for 24 h. Periodically, aliquots were withdrawn at defined reaction times, and immediately heated at 100 °C for 10 min to inactivate the enzymes and stop the reaction. After, samples were centrifuged (10000 rpm, 10 min) and limpid supernatants were recovered for analysis. Qualitative and quantitative analyses were performed using high-performance anion exchange chromatography (HPAEC) with pulsed amperometric detection (PAD) on a Dionex system (Dionex, CA, USA) equipped with a CarboPac PA-1 column (Dionex, 250×4.5 mm) and a suitable guard column. Commercially available monosaccharide standards were used and fucose was the internal quantitative standard.

Results

Construction, expression and purification of chimeric xylanase

The endoxylanase (Tx-Xyl) from *Thermobacillus xylanilyticus* bacterial strain is a single domain enzyme consisting of a catalytic domain belonging to glycoside hydrolase family 11. ³² In order to examine the effect of addition of a specific cellulose binding domain (CBD) on Tx-Xyl catalytic activity and action pattern on soluble and insoluble substrates, we constructed a chimeric xylanase (Tx-Xyl-CBM1) by fusion a family 1 CBM (from *T. reesei* Cel7a) *via* a linker sequence to the C-terminus of Tx-Xyl. The chimeric gene was successfully cloned into the bacterial expression vector pET-28b(+) in frame with a sequence coding for a

6 His-N terminal tag. The integrity of the complete construct was verified by DNA sequencing. (Figure 2) The full length chimeric gene encode a 273 amino acid residues fusion protein ((His₆)Tx-Xyl-CBM1) comprising the N-terminal his-tagged GH11 catalytic domain (182 residues) linked *via* a 34 residue (proline/threonine) rich linker sequence to the C-terminal family 1 CBM (36 residues). As a control experiment, the gene encoding free Tx-Xyl catalytic domain was cloned into the same vector, thus generating similarly an N-terminal His-tagged xylanase ((His₆)Tx-Xyl).

Expression of the fusion protein (His₆)Tx-Xyl-CBM1 as well as (His₆)Tx-Xyl was performed in E. coli strains under the control of the inducible T7 promoter of vector pET-28b(+). (His₆)Tx-Xyl was recovered in soluble form from cell lysate and was easily purified to homogeneity under native conditions using metal chelate affinity chromatography. However, (His₆)Tx-Xyl-CBM1 accumulated predominantly in the form of insoluble, biologically inactive inclusion bodies (Figure 4, lane 3) A variety of experimental conditions were tested in order to enhance protein solubility, including the use of lower IPTG concentrations, induction at different cell densities, growth at low temperatures, variation of growth media (addition of glucose or ethanol) and the use of diverse E. coli strains (JM109(DE3), BL21(DE3)pLysS...), but all these attempts were unsuccessful. Hence, the methodology focused on the conditions to optimize the amount of inclusion bodies. A chromatographic procedure was then set up to recover the fusion protein (His₆)Tx-Xyl-CBM1 from the inclusion bodies. After solubilisation in 8 M urea and immobilization of the inclusion bodies on Ni²⁺chelated resin, the protein was refolded by changing the buffer from denaturating to native renaturating conditions. Elution resulted in a single protein peak as showed on the chromatography profile. (Figure 3) The refolding yield was about 40% based on the dry weight of inclusion bodies. The procedure yields a stable and active (His₆)Tx-Xyl-CBM1 protein.

After purification, homogeneity of the recombinant enzymes was analysed using SDS-PAGE (Figure 4). Purified wild type Tx-Xyl enzyme produced by *Thermobacillus xylanilyticus* D3 was used as the control (Figure 4, lane 2). High purity proteins were obtained as indicated by single bands on SDS-PAGE. Western blot analysis using antibody raised against His-tag confirmed that the visible bands represent the heterologously expressed Histagged proteins (data not shown). Furthermore, in good agreement with the theoretical *Mw* calculated on the basis of the deduced amino acid sequence (22.81 kDa and 29.67 kDa, for

(His₆)Tx-Xyl and (His₆)Tx-Xyl-CBM1 respectively), protein bands revealed apparent molecular weights that approximated 23 kDa and 30 kDa respectively.

Otherwise, analysis of the refolded and purified $(His_6)Tx$ -Xyl-CBM1 using high performance size-exclusion chromatography revealed that the eluant contained almost 80% of monomeric form of the fusion protein (eluted at 23 mL, with an estimated native Mw of 29.8 kDa) and about 20% of dimers (eluted at 19 mL, Mw = 60 kDa). No large molecular weight aggregates were detected, which would suggest rather efficient refolding of the protein. (Figure 5) The correct 3D folding of both the catalytic module and the binding module within the overall structure of the chimeric fusion protein should be further investigated notably through circular dichroism.

Biochemical characterization of the recombinant enzymes

1. Effect of pH and temperature on enzyme activity and stability

Purified (His₆)Tx-Xyl and (His₆)Tx-Xyl-CBM1 were assayed for their physicochemical properties, notably their optima of pH and temperature and their stability. (Table 3) No significant differences were found in the pH profiles or in the pH stability (data not shown). Both enzymes displayed an optimum pH of 5.8 when assayed at 60°C and had a broad pH range from pH 5–9. However, the two enzymes were different regarding their thermoactivity and thermostability. Indeed, measurements demonstrated that maximal activity of (His₆)Tx-Xyl occurred at ~70–72°C, whereas in the case of the chimeric enzyme (His₆)Tx-Xyl-CBM1, the optimum temperature was shifted to 65°C.(Table 3) Both enzymes were inactivated at temperatures above 85°C. Likewise, thermostability measurements performed at 60°C and 70°C revealed a decreased stability at 60°C for the fusion protein (His₆)Tx-Xyl-CBM1 (half-life time $t_{b'_2}$ of 7h) compared to (His₆)Tx-Xyl ($t_{b'_2}$ ~12h), whereas at 70°C both enzymes had approximately similar stability. (Table 3)

2. Kinetic measurements on soluble substrates

The efficiency of (His₆)Tx-Xyl and (His₆)Tx-Xyl-CBM1 on soluble birchwood xylan was evaluated. A significant difference of the specific activity was observed between the two enzymes. Indeed, compared to (His₆)Tx-Xyl, the chimeric fusion enzyme (His₆)Tx-Xyl-

CBM1 displayed a 4-fold lower specific activity towards soluble xylan. (Table 4) Hydrolysis kinetics of this substrate followed a first order process and both enzymes exhibited Michaelis–Menten type kinetics. Table 4 summarizes the kinetic constants determined at 60°C. Results revealed that the CBM fused enzyme displayed a similar or slightly higher $K_{m(app)}$ value, suggesting a slightly lower enzyme affinity to substrate, whereas k_{cat} was almost 4-fold lower than (His₆)Tx-Xyl, probably as a result of reduced hydrolysis rate. Accordingly, the chimeric enzyme catalytic efficiency ($k_{cat}/K_{m(app)}$) on Birchwood xylan was 4-fold lower.

3. Adsorption on cellulose

The adsorption experiments on microcrystalline cellulose were conducted at 60°C to match the hydrolysis conditions performed with the recombinant enzymes. Results obtained after 6h incubation allowed plotting of the enzyme adsorption isotherms given in Figure 6. The plots clearly indicated the ability of the chimeric enzyme (His₆)Tx-Xyl-CBM1 to bind microcrystalline cellulose, whereas (His₆)Tx-Xyl, which is devoid of CBD did not show significant adsorption. The maximum adsorption efficiency (defined as the percentage of the bound protein from the total protein) reached more than 80% in the case of (His₆)Tx-Xyl-CBM1, against only 5% for (His₆)Tx-Xyl. The data fitted a Langmuir-type adsorption and the maximum adsorbed amount of protein (E_{max}) and the adsorption equilibrium constant (K_p) were estimated at 18 mg/g of cellulose and 4.1 L.mg⁻¹ of protein for (His₆)Tx-Xyl-CBM1, against 2 mg/g of cellulose and 2.2 L.mg⁻¹ for (His₆)Tx-Xyl. Overall these results evidenced the ability of the chimeric fusion protein to bind crystalline cellulose, and thereby somehow confirmed the correct working and thus refolding of the CBM module.

Wheat bran and straw degradation

Wheat bran and straw are abundant agricultural by-products that represent attractive renewable resources for lignocellulose biorefinery. Destarched wheat bran and straw contain up to 40% and 25% (of the dry weight) of arabinoxylans (AX) respectively. Their cellulose content is 11% and 35% respectively.

The ability of (His₆)Tx-Xyl and chimeric (His₆)Tx-Xyl-CBM1 to hydrolyse the arabinoxylan of these lignocellulosic substrates was investigated. Reactions were carried out at 60°C in

presence of large excess of enzymes and the efficiencies of arabinoxylan degradation were compared over a 24 h period using quantitative analyses (HPAEC-PAD) of the soluble sugar products.

Both enzymes mainly released short xylo-oligomers and to less extent xylose. No differences in product spectrum between the native enzyme and fusion enzyme were observed (data not shown). However, at quantitative level, monitoring of arabinoxylan hydrolysis yields as function of reaction time, as represented in Figure 7, revealed modestly better efficiency of the chimeric (His₆)Tx-Xyl-CBM1 compared to (His₆)Tx-Xyl. Indeed, after 24 h reaction, the yield of soluble arabinoxylan released from wheat bran was 27.3% (\pm 1.09) for (His₆)Tx-Xyl and 32.5% (\pm 1.49) for (His₆)Tx-Xyl-CBM1. On the other hand, the two enzymes released 14.1% (\pm 0.82) and 17.8% (\pm 1.06) respectively of wheat straw arabinoxylan.

Enzymatic reactions on both wheat bran and straw appeared to be complete after the first 4 h of incubation since released arabinoxylane concentrations had reached a plateau.

Nevertheless, different action patterns could be deduced when comparing the two enzymes. In the case of wheat straw, at the beginning of the reaction both enzymes displayed similar efficiencies until 2 h of incubation. Afterwards, a modestly enhanced activity was observed when using the CBM1 fused xylanase. On the other hand, hydrolysis rate of wheat bran arabinoxylan was higher from the first 30 min of reaction for (His₆)Tx-Xyl-CBM1 and evolved similarly until 24 h. These results would suggest different enzyme-substrate affinities most likely as a result of differential accessibilities of arabinoxylans within the complex lignocellulosic network of wheat bran and straw towards (His₆)Tx-Xyl and chimeric (His₆)Tx-Xyl-CBM1.

Discussion

Innovative and rational design of new generations of biocatalysts either by structural protein engineering or by directed evolution methods (DNA shuffling, random mutagenesis...) for efficient and specific fractionation of lignocellulosic biomass is a major and challenging step towards the development of profitable biorafineries.

GH 11 endo- β -1,4-xylanases are key enzymes in the degradation of arabinoxylans, the main hemicelluloses in grass cell walls. To investigate the potential impact of grafting a cellulose

binding module on enzyme physicochemical properties and efficiency on complex lignocellulosic substrates such as wheat by-products, we designed a chimeric xylanase by fusion the linker sequence and the CBM1 (from Cel7A of T. reesei) at the C-terminal of the catalytic domain of the thermostable GH11 xylanase Tx-Xyl (from *T.xylanilyticus*).

The cloning of the fusion gene in pET28b was successful, but when expressed in *E.coli*, the chimeric enzyme (His₆)Tx-Xyl-CBM1 accumulated mainly in the form of insoluble and inactive inclusion bodies. Nevertheless, active and stable enzyme was successfully recovered from urea solubilised inclusion bodies by performing an immobilization/refolding chromatographic procedure, based on the protein affinity to Ni²⁺chelated resin. The use of histidine tags fused to proteins is generally the straightforward classic method to recover highly purified proteins in only one step.

Biochemical characterization of (His₆)Tx-Xyl-CBM1 revealed a lower thermoactivity and thermostability than (His₆)Tx-Xyl, although the chimeric fusion protein remained thermoactive and thermostable. Similar results were reported in the literature. The fusion of tandem CBM6 structures to the C-terminal region of a GH10 xylanase from B. halodurans strain resulted in a downward shift in the optimal temperature by 10°C, but did not significantly affect the thermal stability. ⁴⁶ The transfer of the N-terminal xylan binding domain to the C-terminus region of the same xylanase (XynX) of Clostridium thermocellum has also drastically decreased the optimum temperature of the xylanase from 65 to 30°C.⁴⁷ Likewise a decrease in thermal stability was reported after the fusion of a CBM22 to a xylanase from *Bacillus halodurans*.⁴⁸ However, it should be pointed out that the presence of CBM leads to variable effects on thermal properties of enzymes and it is difficult to predict the effect of the addition of a CBM on these characteristics. Kittur et al. (2003) reported a chimeric xylanase having an optimum temperature similar to that of the native enzyme.⁴⁹ Otherwise, the N-terminal CBM structures of xylanases (most often xylan binding domains, notably family 22 CBMs) have been originally referred to as thermostabilizing domains because they somehow impart thermostabilizing effect to catalytic domains.^{50,51} Their deletion caused a decrease in thermostability and/or optimal temperature of enzymes.⁵² The role of CBMs in defining the thermal properties of catalytic modules remains nevertheless elusive and unresolved, since no mechanism has been proposed in literature to explain these effects. Thermostabilizing or conversely thermosensitivating effect of CBM on catalytic domain would most likely be an accessory property that might result from intimate interactions established between the two modules. ⁵³ Furthermore, CBM are generally
connected either at N-terminal or C-terminal end of the catalytic domain. Spatial stability of the N- and C-terminal regions plays major role in the thermostability of GH 11 xylanases. Numerous studies have demonstrated that exchanging of different segments of gene in these regions might significantly alter xylanase thermal stability.^{54,55} Conversely, stabilisation through engineering of disulphide bridge linking the N- and C-termini increased both the thermal activity and stability.⁴⁰ So, we can hypothesize that in the case of Tx-Xyl, simultaneous addition of the His-tag and the linker-CBM respectively at the N and C terminal ends may affect the mobility of these extremities thereby decreasing the overall protein stability.

The fusion of CBM1 drastically reduced the soluble xylan hydrolysis efficiency of Tx-Xyl. (His₆)Tx-Xyl-CBM1 presented a similar or slightly higher $K_{m(app)}$ value, while k_{cat} was particularly lower than that of (His₆)Tx-Xyl. It can therefore be suggested that the affinity of the xylanase towards soluble xylan was not really affected, whereas its catalytic efficiency was modified owing to the fusion of the CBM1.

It is generally believed that substrate-binding domains are not required for the degradation of soluble substrates. Most of the CBMs studied to date are known to enhance catalytic activity only toward insoluble substrate and had no effects on soluble substrate hydrolysis. Members of families 2b (except the CBM2b of *Streptomyces thermoviolaceus*), 6, 13, and 22, though, bind soluble xylan chains, but they enhance the catalytic activity only toward insoluble xylan.⁴⁹ The major reported effect these modules have on the catalytic properties of xylanases is to increase the enzyme affinity for insoluble xylan, as generally reflected in a diminished K_M value, this by raising the local concentration of substrate in the vicinity of the enzyme and thus enhancing the enzyme catalytic activity. However, as a rule, the presence of a noncatalytic substrate-binding domain does not modulate the enzyme specific activity against either soluble or insoluble xylan and thus affects neither the rate of hydrolysis (V_{max}) nor the catalytic efficiency (k_{cat}) .⁵⁶ Nevertheless certain observations deny this assumption. Recently, it was shown that the versatile GH10 xylanase Xyn10B from C. stercorarium comprising a dual cellulose/xylan binding module CBM22 displayed higher catalytic efficiency towards β-1,3-1,4 glucan than xylan. The removal of this binding module from the structure of the enzyme drastically reduced its catalytic activity towards β -1,3-1,4 glucan.⁵⁷ In the case of (His₆)Tx-Xyl-CBM1, changed enzyme specific activity, and k_{cat} towards soluble xylan rather reflect a disturbance of the overall enzyme integrity probably as a result of C-terminal CBM fusion as well as N-terminal His₆-tagging that may reduce the flexibility of the catalytic domain and thus hinder the correct substrate uptake and processing. Bioinformatic modelling of the 3D structure of the chimeric fusion enzyme should allow as to get more insights on its thermodynamic stability.

Interestingly, although less efficient on soluble substrates, the chimeric enzyme (His₆)Tx-Xyl-CBM1 displayed modestly better hydrolytic activity on complex lignocellulosic substrates such as destarched wheat bran and straw than (His₆)Tx-Xyl. These results underlined the potential role a cellulose binding domain could have in enhancing GH11 endoxylanase efficiency on lignocellulosic substrate. The importance of naturally occurring CBD has been previously evidenced by Black et *al.* 1997 in the case of GH10 endoxylanase.⁵⁸ Known family 1 CBMs are generally connected to diverse cellulose or hemicellulose hydrolyzing enzymes such as cellobiohydrolases, endoglucanases, ⁵⁹ GH10 xylanases, ⁶⁰ mannanases,⁶¹ fungal acetyl xylan esterases ⁶² and cinnamoyl esterases. ⁶³Although the functions of these CBMs are well established in cellulases, they still remain ambiguous and speculative in other hemicelullases. Moreover, the impact of such modules on the hydrolytic performance of theses modular enzymes has usually been assessed on rather simple substrates (insoluble extracted xylan, amorphous or crystalline cellulose...) but not in the context of complex cell wall network.

Generally cellulose binding modules play pivotal role in the activity of cellulases, by performing three primary functions including proximity effects, substrate targeting and microcrystalline fibre disruption.^{2,3,59} By analogy, it could be argued that the C-terminal CBM1 fused to Tx-Xyl fulfils similar functions. A possible explanation of the results may be that the addition of CBM1 increased the ratio of productive enzyme-substrate complex. Cellulose adsorption assay revealed that CBM1 fusion conferred to Tx-Xyl an unusual binding feature for a GH 11 xylanase by allowing it to bind crystalline cellulose. Thus, CBM1 may promote the enzyme phase transfer by enhancing association of the enzyme with the substrate surface and subsequently increases the effective xylanase concentration (proximity effect). Otherwise, within wheat bran and straw, cellulose microfibrils are intimately associated with other polysaccharides (notably xylan) forming dense cell wall networks. The enhanced hydrolysis yields obtained with (His₆)Tx-Xyl-CBM1 could be a result of modified diffusion properties of the enzyme within the cell wall network. Dynamic and processive binding of the CBM1 on crystalline cellulose surface could bring the fused Tx-Xyl catalytic domain via the flexible linker to intimate and prolonged contact with potentially inaccessible xylan regions (targeting effect).⁶⁴ Finally, CBM1 could disrupt the ordered structure of

cellulose fibers, thus altering the cell wall network and enhancing xylan accessibility to the catalytic module (disruptive effect).^{7,65,66} The results presented herein did not allow to verify these hypotheses. However, hydrolytic patterns of the chimeric (His₆)Tx-Xyl-CBM1 on wheat bran and straw were found to be different. Indeed in contrast to wheat bran, the enhancement of arabinoxylan hydrolysis in the case of wheat straw occurred with long time incubation (starting from 2h incubation). Wheat bran and straw cellulose content and distribution are different. Destarched wheat bran has low cellulose content (~11%), whereas wheat straw contains approximately 35% cellulose homogenously distributed on all cell types. Thus, we can hypothesize according to the results that the action of the CBM1 involved progressive fibre disruption which would result in enhanced arabinoxylan accessibility within the cell wall network.

Additional studies, notably through comparative adsorption experiments on lignocellulosic substrates, studies of the effects on fibre cristallinity and microscopy experiments (histological analysis of the altered structures within the lignocellulose networks as well as immunocytochemical localization of both (His₆)Tx-Xyl and (His₆)Tx-Xyl-CBM1) would be required to further investigate the potential impact of CBM1 on the diffusion/action properties *in planta* of the GH11 xylanase.

To conclude, the present results evidence, for the first time, the possible contribution of a family 1 CBM to a GH11 xylanase in the bioprocessing of complex lignocellulosic substrates.

References

- (1) Merino, S.; Cherry, J. In *Biofuels*, 2007.
- Boraston, A. B.; Bolam, D. N.; Gilbert, H. J.; Davies, G. J. *The Biochemical journal*.
 2004, 382, 769-781.
- Boraston, A. B.; Lammerts van Bueren, A.; Ficko-Blean, E.; Abbott, D. W.; Johannis,
 P. K. In *Comprehensive Glycoscience*; Elsevier: Oxford, 2007.
- (4) Coutinho, P. M.; Henrissat, B. In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999, 3-12.

- Blake, A. W.; McCartney, L.; Flint, J. E.; Bolam, D. N.; Boraston, A. B.; Gilbert, H. J.; Knox, J. P. *Journal of Biological Chemistry* 2006, 281, 29321-29329.
- Bolam, D. N.; Ciruela, A.; McQueen-Mason, S.; Simpson, P.; Williamson, M. P.;
 Rixon, J. E.; Boraston, A.; Hazlewood, G. P.; Gilbert, H. J. *Biochem J JT The Biochemical journal.* 1998, 331 (Pt 3), 775-781.
- (7) Din, N.; Gilkes, N. R.; Tekant, B.; Miller, R. C.; Warren, R. A. J.; Kilburn, D. G. Nat Biotech 1991, 9, 1096-1099.
- (8) Hashimoto, H. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS) 2006, 63, 2954-2967.
- (9) Shoseyov, O.; Shani, Z.; Levy, I. Microbiology and Molecular Biology Reviews JO -Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2006, 70, 283-295.
- (10) Guillén, D.; Sánchez, S.; Rodríguez-Sanoja, R. Applied Microbiology and Biotechnology 2010, 85, 1241-1249.
- (11) Teeri, T. T. Trends in Biotechnology **1997**, 15, 160 167.
- (12) Tomme, P.; Driver, D. P.; Amandoron, E. A.; Miller, R. C.; Warren, J.; Kilburn, D. G. *Journal of Bacteriology* **1995**, *177*, 4356–4363.
- (13) Gilkes, N. R.; Henrissat, B.; Kilburn, D. G.; MillerJr, R. C.; Warren, R. A. *Microbiol Rev.* 1991, 55, 303–315.
- Kraulis, P. J.; Clore, G. M.; Nilges, M.; Jones, T. A.; Pettersson, G.; Knowles, J.; Gronenborn, A. M. *Biochemistry* 1989, 28, 7241-7257.
- (15) Barr, B. K.; Hsieh, Y.-L.; Ganem, B.; Wilson, D. B. *Biochemistry* **1996**, *35*, 586-592.
- Beckham, G. T.; Matthews, J. F.; Bomble, Y. J.; Bu, L.; Adney, W. S.; Himmel, M. E.; Nimlos, M. R.; Crowley, M. F. *The Journal of Physical Chemistry B* 2010, *114*, 1447-1453.
- (17) Chandrika, M.; Peter, J. R. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 2005, 60, 598-605.
- (18) Divne, C.; Ståhlberg, J.; Teeri, T. T.; Jones, T. A. Journal of Molecular Biology 1998, 275, 309-325.
- (19) Nimlos, M. R.; Matthews, J. F.; Crowley, M. F.; Walker, R. C.; Chukkapalli, G.; Brady, J. W.; Adney, W. S.; Cleary, J. M.; Zhong, L.; Himmel, M. E. Protein Engineering, Design and Selection 2007, 20, 179-187.
- (20) Rouvinen, J.; Bergfors, T.; Teeri, T.; Knowles, J. K.; Jones, T. A. Science 1990, 249, 380-386.

- Biely, P.; Vršanská, M.; Tenkanen, M.; Kluepfel, D. Journal of Biotechnology 1997, 57, 151-166
- (22) Törrönen, A.; Rouvinen, J. Journal of Biotechnology 1997 57 137-149
- (23) Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G. FEMS Microbiology Reviews 2005, 29, 3-23.
- (24) Berrin, J.-G.; Juge, N. Biotechnoly Letters 2008, 30, 1139–1150.
- (25) Lee, C. C.; Wong, D. W. S.; Robertson, G. H. The Protein Journal 2005, 24, 21-26.
- (26) Sakka, K.; Takada, G.; Karita, S.; Ohmiya, K. Annals of the New York Academy of Sciences **1996**, *15*, 241-51.
- (27) Hayashi, H.; Takehara, M.; Hattori, T.; Kimura, T.; Karita, S.; Sakka, K.; Ohmiya, K. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1999**, *51*
- (28) Ludwiczek, M. L.; Heller, M.; Kantner, T.; McIntosh, L. P. Journal of Molecular Biology 2007, 373, 337-354
- (29) Vandermarliere, E.; Bourgois, T. M.; Rombouts, S.; Campenhout, S. v.; Volckaert, G.;
 Strelkov, S. V.; Delcour, J. A.; Rabijns, A.; Courtain, C. M. *Biochem. J.* 2008, 410.
- (30) Gilbert, H. J.; Hazlewood, G. P. Journal of General Microbiology 1993, 139, 187-194.
- (31) Ferreira, L. M.; Fau Durrant, A. J.; Durrant, A. J.; Fau Hall, J.; Hall, J.; Fau Hazlewood, G. P.; Hazlewood, G. P.; Fau Gilbert, H. J.; Gilbert, H. J. Biochem J JT The Biochemical journal. JID 2984726R 1990, 269 IP 1, 261-264.
- (32) Harris, G. W.; Pickersgill, R. W.; Connerton, I.; Debeire, P.; Touzel, J.-P.; Breton, C.; Pérez, S. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **1997**, *29*, 77-86.
- (33) Beaugrand, J.; Chambat, G.; Wong, V.; Goubet, F.; Remond, C.; Paës, G., et al. *Carbohydrate Research* **2004**, *339*, 2529-2540.
- (34) Beaugrand, J.; Reis D; Guillon, F.; Debeire, P.; Chabbert, B. International Journal Of *Plant Science* **2004** *165*, 553-563
- (35) Benamrouche, S.; Crônier, D.; Debeire, P.; Chabbert, B. *Journal of Cereal Science* **2002**, *36*, 253-260.
- (36) Debeire-Gosselin, M.; Loonis. M.; Samain, E.; Debeire, P. In: Xylans and Xylanases
- (Visser. J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M. A., and Voragen, A. G. J., Eds.). Elsevier Science Publishers 1992, 463-466.
- (37) Zilliox, C.; Debeire, P. Enzyme and Microbial Technology 1998, 22, 58-63.
- (38) Sambrook, J.; Russel, D. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 2001.

- (39) Chung, C. T.; Niemela, S. L.; Miller, R. H. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **1989**, 86, 2172-2175.
- (40) Paës, G.; O'Donohue, M. J. Journal of Biotechnology 2006, 125, 338-350.
- (41) Laemmli, U. K. *Nature* **1970**, 227, 680-685.
- (42) Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. Protein Science 1995, 4, 2411-2423.
- (43) Kidby, D.; Davidson, D. Analytical Biochemistry 1973 55 321-325
- (44) McKenzie, H. In: Dawson R, Elliot C, Elliot W, Jones K (eds) Data for biochemical research. Oxford University Press, Oxford, **1969**, 476–506.
- (45) Bothwell, M. K.; Walker, L. P. *Bioresource Technology* **1995**, *53*, 21-29.
- Mangala, S. L.; Kittur, F. S.; Nishimoto, M.; Sakka, K.; Ohmiya, K.; Kitaoka, M.;
 Hayashi, K. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2003, 21, 221-230.
- (47) Shin, E.-S.; Yang, M.-J.; Jung, K. H.; Kwon, E.-J.; Jung, J. S.; Park, S. K.; Kim, J.;
 Yun, H. D.; Kim, H. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 3496-3501.
- (48) Mamo, G.; Hatti-Kaul, R.; Mattiasson, B. Extremophiles 2007, 11, 169-177.
- (49) Kittur, F. S.; Mangala, S. L.; Rus'd, A. A.; Kitaoka, M.; Tsujibo, H.; Hayashi, K. *FEBS Letters* 2003, 549, 147-151.
- (50) Meissner, K.; Wassenberg, D.; Liebl, W. Molecular Microbiology 2000, 36, 898-912.
- (51) Charnock, S. J.; Bolam, D. N.; Turkenburg, J. P.; Gilbert, H. J.; Ferreira, L. M. A.; Davies, G. J.; Fontes, C. M. G. A. *Biochemistry* **2000**, *39*, 5013-5021.
- (52) Araki, R.; Karita, S.; Tanaka, A.; Kimura, T.; Sakka, K. *Bioscience, Biotechnology,* and Biochemistry **2006**, 70, 3039-3041.
- (53) Dias, F. M. V.; Goyal, A.; Gilbert, H. J.; Prates, J. A. M.; Ferreira, L. M. A.; Fontes, C. M. G. A. *FEMS Microbiology Letters* 2004, 238, 71-78.
- (54) Sun, J.-Y.; Liu, M.-Q.; Xu, Y.-L.; Xu, Z.-R.; Pan, L.; Gao, H. *Protein Expression and Purification* **2005**, *42*, 122-130
- (55) Wang, Q.; Xia, T. Applied Biochemistry and Biotechnology 2008, 144, 273-282.
- (56) Black, G. W.; Fau Hazlewood, G. P.; Hazlewood, G. P.; Fau Millward-Sadler, S. J.;
 Millward-Sadler, S. J.; Fau Laurie, J. I.; Laurie, J. I.; Fau Gilbert, H. J.; Gilbert, H. J. Biochem J JT The Biochemical journal. JID 2984726R 1995, 307 (Pt 1), 191-195.
- (57) Araki, R.; Ali, M. K.; Sakka, M.; Kimura, T.; Sakka, K.; Ohmiya, K. FEBS Letters 2004, 561, 155-158.

- Black, G. W.; Rixon, J. E.; Clarke, J. H.; Hazlewood, G. P.; Ferreira, L. M. A.; Bolam,D. N.; Gilbert, H. J. *Journal of Biotechnology* 1997, *57*, 59-69.
- (59) Linder, M.; Teeri, T. T. Journal of Biotechnology 1997, 57, 15-28.
- (60) Alcocer, M. J. C.; Furniss, C. S. M.; Kroon, P. A.; Campbell, M.; Archer, D. B. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2003**, *60*, 726-732.
- (61) Hägglund, P.; Eriksson, T.; Collén, A.; Nerinckx, W.; Claeyssens, M.; Stålbrand, H. Journal of Biotechnology 2003, 101, 37-48.
- (62) Margolles-Clark, E.; Tenkanen, M.; Söderlund, H.; Penttilä, M. *European Journal of Biochemistry* **1996**, *237*, 553-560.
- (63) Kroon, P. A.; Williamson, G.; Fish, N. M.; Archer, D. B.; Belshaw, N. J. European Journal of Biochemistry **2000**, 267, 6740-6752.
- Black, G. W.; Rixon, J. E.; Clarke, J. H.; Hazlewood, G. P.; Theodorou, M. K.;
 Morris, P.; Gilbert, H. J. *The Biochemical journal*. **1996**, *319 (Pt 2)*, 515-520.
- (65) Creagh, A. L.; Ong, E.; Jervis, E.; Kilburn, D. G.; Haynes, C. A. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **1996**, 93, 12229-12234.
- (66) Pei-Ji, G.; Guan-Jun, C.; Tian-Hong, W.; Ying-Shu, Z.; LIU-Jie Acta Biochimica et Biophysica Sinica 2001, 33, 13-18.

Figures



Fig1. Strategy for the construction of the chimeric enzyme (His₆)Tx-Xyl-CBM1

1	ATG	GGC	AGC	AGC	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAC	AGC	AGC	GGC	CTG	GTG	45
1	M	G	S	S	H	H	H	H	H	H	S	S	G	L	V	15
46	CCG	CGC	GGC	AGC	CAT	ATG	GCC	ACG	TAC	TGG	CAG	TAT	TGG	ACG	GAC	90
16	P	R	G	S	H	M	A	T	Y	W	Q	Y	W	T	D	30
91	ggc	ATC	GGG	TAT	GTG	AAC	GCG	ACG	AAC	GGA	CAA	GGC	GGC	AAC	TAC	135
31	g	I	G	Y	V	N	A	T	N	G	Q	G	G	N	Y	45
136	AGC	GTA	AGC	TGG	AGC	AAC	AGC	GGC	AAC	TTC	gtc	ATC	GGC	AAG	GGC	180
46	S	V	S	W	S	N	S	G	N	F	V	I	G	K	G	60
181	TGG	CAA	TAC	GGT	GCG	CAC	AAC	CGG	GTT	gtc	AAC	TAC	AAC	GCC	GGC	225
61	W	Q	Y	G	A	H	N	R	V	V	N	Y	N	A	G	75
226	GCA	TGG	CAG	CCG	AAC	GGC	AAC	GCG	TAT	CTG	ACG	CTG	TAC	GGC	TGG	270
76	A	W	Q	P	N	G	N	A	Y	L	T	L	Y	G	W	90
271	ACG	CGC	AAC	CCG	CTC	ATC	GAA	TAC	TAC	GTC	GTC	GAC	AGC	TGG	GGC	315
91	T	R	N	P	L	I	E	Y	Y	V	V	D	S	W	G	105
316	AGC	TAC	CGC	CCG	ACC	GGC	GAC	TAC	CGG	GGC	AGC	gtg	TAC	AGC	GAC	360
106	S	Y	R	P	T	G	D	Y	R	G	S	V	Y	S	D	120
361	ggc	GCA	TGG	TAT	GAC	CTC	TAT	CAC	AGC	TGG	CGC	TAC	AAC	GCA	CCG	405
121	g	A	W	Y	D	L	Y	H	S	W	R	Y	N	A	P	135
406	TCC	ATC	GAC	GGC	ACG	CAG	ACG	TTC	CAA	CAA	TAC	TGG	AGC	GTT	CGT	450
136	S	I	D	G	T	Q	T	F	Q	Q	Y	W	S	V	R	150
451	CAG	CAG	AAA	CGC	CCG	ACG	GGC	AGC	AAC	GTC	TCC	ATC	ACG	TTC	GAG	495
151	Q	Q	K	R	P	T	G	S	N	V	S	I	T	F	E	165
496	AAC	CAC	GTG	AAC	GCA	TGG	GGC	GCT	GCC	GGC	ATG	CCG	ATG	GGC	AGC	540
166	N	H	V	N	A	W	G	A	A	G	M	P	M	G	S	180
541	AGC	TGG	tct	TAC	CAG	GTG	CTC	GCA	ACC	GAA	GGC	TAT	TAC	AGC	AGC	585
181	S	W	s	Y	Q	V	L	A	T	E	G	Y	Y	S	S	195
586	gga	TAC	TCC	AAC	GTT	ACG	GTT	TGG	GGC	AGC	ACC	GGC	AAC	CCG	AGC	630
196	G	Y	S	N	V	T	V	W	G	S	T	G	N	P	S	210
631 211	GGC G	GGC G	AAC N	CCG P	CCG P	GGC G	GGC G	AAC N	CGT R	GGC G	ACC T	lin ACC T	ker ACC T	ACC T	CGT R	675 225
676 226	CGT R	CCG P	GCG A	ACC T	ACC T	ACC T	GGC G	linke AGC S	er AGC S	CCG P	GGC G	CCG P	ACC T	CAG Q	AGC S	720 240
721 241	CAT H	TAT Y	GGC G	CAG Q	TGC C	lin GGC G	nker GGC G	ATT I	GGC G	TAT Y	AGC S] GGC G	↑ CCG ₽	ACC T	GTG V	765 255
766	TGC	GCG	AGC	GGC	ACC	ACC	TGC	CAG	GTG	CTG	AAC	CCG	TAT	TAT	AGC	810
256	C	A	S	G	T	T	C	Q	V	L	N	P	Y	Y	S	270
811 271	CAG Q	TGC	CTG L													819 273

Fig.2 The nucleotide and deduced amino acid sequence of (His₆)Tx-Xyl-CBM1. The Tx-Xyl catalytic domain is indicated in bold, the linker region is delimitated by arrows and dotted line and the carbohydrate-binding module (CBM1) shown in grey.



Fig 3. Profile of urea gradient refolding and metal chelate affinity purification of (His₆)Tx-Xyl-CBM1, dashed line: urea gradient.



Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the purified proteins. Lane 1: Tx-Xyl control (purified as previously described in ³⁶); lane 2: (His₆)Tx-Xyl; lane 3: (His₆)Tx-Xyl-CBM1 inclusion bodies; and lane 4: refolded and purified (His₆)Tx-Xyl-CBM1. M: protein molecular weight markers (Sigma Marker)



Fig. 5 Size exclusion chromatography of the refolded and purified (His₆)Tx-Xyl-CBM1



Fig. 6 Xylanase adsorption isotherms on microcrystalline cellulose at 60°C (10 g/L cellulose in Tris HCl 10 mM, pH 8; incubation time 6h).



Fig. 7 Arabinoxylan hydrolysis rates as a function of reaction time of a): wheat straw; b): wheat bran.

Tables

Table 1. CBMs of known structure linked to xylanases (²⁴)

Family	Туре	Fold	Protein	PDB code
CBM-2	В	β –sandwich	Xylanase 10A (Cellulomonas fimi)	1EXG
	В	β –sandwich	Xylanase 11A (Cellulomonas fimi)	2XBD
	В	β –sandwich	Xylanase 11A (Cellulomonas fimi)	1HEH
CBM-4	В	β –sandwich	Xylanase 10A (Rhodothermus marinus)	1K45
CBM-6	В	β –sandwich	Xylanase 11A (Clostridium thermocellum)	1UXX
	В	β –sandwich	Xylanase 11A (Clostridium stercorarium)	1NAE
	В	β –sandwich	Xylanase 11A (Clostridium stercorarium)	1UY4
CBM-9	С	β –sandwich	Xylanase 10A (Thermotoga maritima)	1I8A
CBM-10	А	OB fold	Xylanase 10A (Cellvibrio japonicus)	1QLD
CBM-13	С	β -trefoil ^a	Xylanase 10A (Streptomyces olivaceovidris)	1XYF
	С	β– trefoil	Xylanase 10A (Streptomyces lividans)	1MC9
CBM-15	В	β –sandwich	Xylanase 10C (Cellvibrio japonicus)	1GNY
CBM-22	В	β –sandwich	Xylanase 10B (Clostridium thermocellum)	1DYO
CBM-36	В	β –sandwich	Xylanase 43A (Paenibacillus polymyxa)	1UX7
	В	β –sandwich	Xylanase 11J (Bacillus sp.)	2DCJ

^a*OB*, oligonucleotide/oligosaccharide binding

Table 2.	Oligonucleotide	primers used	d in the const	ruction of (H	His ₆)Tx-Xyl-CBM1	fusion
protein						

Primer	Oligonucleotide sequence $(5' \rightarrow 3')$
xyl-AclI	CAGCGGATACTCC <u>AACGT</u> ACGGTTTGGTAAGAATTC GAATTCTTACCAAACCGT <u>AACGTT</u> GGAGTATCCGCTG
1 (T7 forward)	TAATACGACTCACTATAGGG
2 (T7 reverse)	TATGCTAGTTATTGCTCAG
3	GTCGGATCC <u>AACGTT</u> ACGG
4	GTCTAG <u>AAGCTT</u> CAGGCACTGG

Restriction sites (AclI and HindIII) are underlined

Tal	ble	3.	Ph	ysico	chemical	charac	teristics	of	recom	binant	enzy	mes
											~	

	(His ₆)Tx-Xyl	(His ₆)Tx-Xyl-CBM1
M_{w} (kDa)	22.812	29.676
pH _{Opt}	5.8	5.8
T_{Opt} (°C)	~ 70 –72°C	~ 65°C
<i>t</i> _{1/2} , 60°C	> 12 h	~ 7 h
<i>t</i> _{1/2} , 70°C	~ 20 min	~ 30 min

 $t_{1/2}$: half life time

Table 4. Kinetic parameters and activity of recombinant enzymes towards soluble Birchwood xylan

	(His ₆)Tx-Xyl	(His ₆)Tx-Xyl-CBM1
SA 60°C (IU/mg)	$586,00 \pm 14,29$	$152,35 \pm 13,58$
k_{cat} (s ⁻¹)	$382,46 \pm 10,9$	$103,28 \pm 4,92$
$K_{m (app)}(g/L)$	$2,80 \pm 0,37$	$3,14 \pm 0,38$
$k_{cat}/K_{m (app)} (\text{L.g}^{\cdot 1}.\text{s}^{\cdot 1})$	$136,43 \pm 22,06$	$32,89 \pm 4,22$

SA: specific activity

Fusion of GFP with a GH11 endoxylanase: Probing the impact of protein size on the hydrolysis of insoluble lignocellulosic substrates

Introduction

Endo- β -1,4-xylanases (EC 3.2.1.8) are the main enzymes, involved in the hydrolysis of hetreroxylans, the most abundant hemicelluloses in plant biomass. Based on the structural and sequence classification of glycoside hydrolases, two major xylanase families (GH10 and GH11) that differ both in structure and in catalytic properties have been distinguished. The GH10 family members all possess a catalytic domain, which exhibits an eightfold (β/α) barrel architecture and displays an average molecular mass of approximately 40 kDa. In contrast, the GH11 members are generally smaller (approximately 20kDa) and display a β-jelly roll structure.^{1,2} Although, GH10 xylanases display certain enzymological characteristics, which could theoretically make them better candidates for enzymatic upgrading of lignocellulosic biomass (such as permissivity and versatility in terms of substrate specificity, ability to hydrolyse highly decorated arabinoxylo-oligosaccharides...), GH11 xylanases are the most frequently chosen for industrial processes.^{3,4} This is because; importantly GH11 xylanases are most active against insoluble polymeric xylans and/or complex lignocellulosic substrates, whereas GH10 xylanases are preferentially active against soluble substrates and can readily hydrolyse small xylooligosaccharides. Furthermore, architecture and structural properties of GH11 xylanases (notably the small protein size) would facilitate its progression/action within cell wall network.⁵

In order to study the impact of molecular size and architecture of GH11 xylanases on their hydrolytic activity towards lignocellulosic substrates, we designed a chimeric xylanase with increased molecular mass by fusion the GH11 endoxylanase from *Thermobacillus xylanilyticus* (Tx-Xyl) to the green fluorescent protein (GFP). GFP is a 27-29 kDa protein with barrel-like structure.^{6,7} Their characteristic properties make this protein a good candidate for use as a molecular reporter to monitor patterns of protein localization,

Materials and methods

Construction, expression and purification of the chimeric protein ((His₆)Tx-Xyl-GFP)

The DNA fragment encoding the xylanase GH11 (Tx-Xyl) and its N-terminal His-tag was first amplified by PCR from the previously constructed *pET28-xyl* vector using the pair of primers (forward primer:5'-CGGTAT<u>CTGCAG</u>CATGGGCAGCAGCCATCATC-3' and reverse primer:5'GCTACC<u>GGTACC</u>GTCGGGGTCGGGGTCGGGGGTCGGGGTGCCCCAAACCGTGACGTT GGAGTA-3'). The forward and reverse primers had *Pst*I and *Kpn*I restriction sites (underlined sequences) respectively. Reverse primer was designed to add a DNA fragment encoding a GT (PT)₄ linker sequence at the C-terminus of Tx-Xyl. The amplified fragment was then cloned into *Pst*I and *Kpn*I sites of pGFP_{UV} vector (Clontech) in frame with a 3' GFP encoding sequence. This vector allows high expression of GFP_{UV} as well as GFP_{UV} fusion proteins under tight control of the lacZ protein β -galactosidase promoter/repressor. The constructed vector was afterwards transformed into *E. coli* JM109 competent cells (Novagen) and confirmed by sequencing.

For the expression of the fusion protein, confirmed vector was transformed into *E. coli* BL21 Star (DE3) competent cells (Invitrogen). The expression strains were grown under shaking (150 rpm) at 37°C in 1L of Luria-Bertani medium supplemented with ampicillin ($100\mu g/mL$). When the absorbance at 600 nm reached approximately 0.5, incubation temperature was cooled down to 17° C and protein expression was induced by the addition of IPTG to a final concentration of 0.5 mM and incubation was continued for additional 6–8 h.

Cells were then harvested by centrifugation (6000 rpm, 15 min) and pellets were suspended in 100 mL of lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1mM PMSF, 5 mM imidazole, pH8). Cell lysis was achieved by incubation with lysozyme (1 mg/mL) and DNase (1 μ g/mL) for 30 min at room temperature followed by French press disruption (16 000 psi, three cycles at 4°C) using a French press cell disruption system (American Instrument company). Cell debris was removed by centrifugation (13000 rpm, 20 min) and the protein-containing supernatant was recovered. Purification of the fusion protein (His₆)Tx-Xyl-GFP from the supernatant was achieved using Profinity IMAC Ni-charged resin (Biorad) and elution was performed with 250 mM imidazole in buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH8). The purified protein was dialyzed against buffer containing 10 mM Tris-HCL, 25% ethylene glycol, pH 8 for long time storage.

The homogeneity of the purified chimeric enzyme was evaluated by standard SDS-PAGE, using a 12% running gel ⁸ and Coomassie blue staining. The protein concentration was determined spectrophotometrically at 280 nm using the theoretical molar extinction coefficient (120.710 M^{-1} .cm⁻¹) calculated from the primary amino acid sequence. ⁹

Biochemical characterization of the chimeric protein $((His_6)Tx-Xyl-GFP)$ and action on wheat straw

Temperature and pH optima and thermal stability of the chimeric enzyme (His₆)Tx-Xyl-GFP as well as its specific activity and kinetic parameters on soluble birchwood xylan were determined as previously described (see the experimental section of the characterization of the fusion protein (His₆)Tx-Xyl-CBM1). Molecular masses were measured by MALDI-TOF mass spectrometry using a Voyager-DE spectrometer (Perseptive Biosystems, USA). For mass analysis, 4-hydroxy-3,5 dimethoxycinnamic acid in 50% (v/v) acetonitrile and 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid was used as the matrix.

Evaluation of the hydrolytic ability of (His₆)Tx-Xyl-GFP on lignocellulosic substrates was also achieved on wheat straw as previously described.

Microscopy experiments were performed to localize the $(His_6)Tx$ -Xyl-GFP fluorescent protein within wheat straw. Semi-thin sections (30 µm) of wheat straw stems were incubated during 24h in presence of diluted solution of $(His_6)Tx$ -Xyl-GFP, prior to be rinsed and observed using a confocal microscope (Bio-Rad). The confocal microscope consisted of laser scanning mirrors, filters for excitation and emission, and photomultiplier tube(s) (PMT) mounted onto a conventional Nikon Optiphot-II microscope. A 100-milliwatt krypton/argon laser was used for excitation at 488 nm. Excited fluorescence intensity was measured using a 535-nm band pass filter and PMT. The PMT gain was adjusted to maximize the dynamic range in all images.

Results and discussion

Construction, expression and purification of chimeric xylanase ((His₆)Tx-Xyl-GFP)

The DNA sequence encoding the GH11 endoxylanase Tx-Xyl with an N-terminal His-tag and a C-terminal GT (PT)₄ linker sequence was cloned into pGFP_{UV} vector, in order to generate a chimeric xylanase fused at its C-terminus to GFP, namely (His₆)Tx-Xyl-GFP. The GT (PT)₄ linker sequence was designed to prevent unfavourable inter-domain interactions, thereby allowing correct folding and working of the fused domains. ^{10,11} Proline-rich peptides, particularly Pro-Thr repeats, are frequently employed as linkers due to their apparent resistance to proteolytic degradation and their frequent presence as peptides connecting domains in multi-domain proteins.¹²⁻¹⁴ In many microbial cellulases and xylanases, catalytic module is connected to carbohydrate binding module *via* linkers rich in proline and threonine.^{15,16}

The cloning and expression of (His₆)Tx-Xyl-GFP were straightforward and successful, although a low protein level was obtained. The integrity of the constructed fusion gene was verified by DNA sequencing. (Figure 1) The full length gene encode a 468 amino acid residues fusion protein comprising the N-terminal His-tagged GH11 catalytic domain (182 residues) linked *via* linker sequence to GFP (238 residues) as C-terminal domain.

When expressed in *E. coli*, the (His₆)Tx-Xyl-GFP fusion protein was recovered in soluble form from cell lysate and was easily purified using metal chelate affinity chromatography. Homogeneity of the purified enzyme was analysed using SDS-PAGE (Figure 2). In good agreement with the theoretical *Mw* calculated on the basis of the deduced amino acid sequence (52.49 kDa), a single band with an apparent molecular weight between 46 kDa and 58 kDa was obtained. Mass analysis using MALDI-TOF mass spectrometry revealed that (His₆)Tx-Xyl-GFP had a molecular mass of approximately 52.6 kDa, whereas (His₆)Tx-Xyl displayed a molecular mass of 22.9 kDa, thus a ~2 fold increased mass.

Biochemical characterization of the chimeric xylanase ((His₆)Tx-Xyl-GFP)

Effect of pH and temperature on enzyme activity and stability

Physicochemical properties, notably the optima of pH and temperature and thermal stability of (His₆)Tx-Xyl-GFP were studied. (Figure 3) The chimeric xylanase displayed an optimum

pH of 5.8 when assayed at 60°C and had a broad pH range from pH 5–9. Measurements of thermoactivity revealed that maximal activity was recorded at ~ 70 –72°C and the chimeric enzyme was inactivated at temperatures above 85°C. The enzyme was also thermostable and conserved 60% of its initial activity after 6-h incubation at 60°C. Its half life time was approximately 8-9 hours and 24 min at 60°C and 70°C respectively. As summarized in Table 1, the comparison between (His₆)Tx-Xyl-GFP fusion protein and (His₆)Tx-Xyl did not indicate significant differences in the pH and temperature profiles, although the GFP fused xylanase displayed a slightly decreased thermostability at 60°C. Overall, the chimeric xylanase retained similar physicochemical properties as (His₆)Tx-Xyl and no significant alterations affected the catalytic domain stability after GFP fusion. It is noteworthy that GFP_{uv} is a 27–29 kDa monomer that is exceptionally resistant to high temperature (70-95°C), alkaline pH (between 5.5 and 12; the optimum pH between 7 and 8) some chaotropic salts and organic solvents.^{7,17} Studies have shown that GFP_{uv} remained stable after 3h, and more than 6h when incubated at 70°C and 60°C respectively.¹⁸ This could to some extent explain the global stability of the (His₆)Tx-Xyl-GFP fusion protein.

Kinetic measurements on birchwood xylan

The efficiency of (His₆)Tx-Xyl-GFP was evaluated on soluble birchwood xylan. Compared to (His₆)Tx-Xyl, the chimeric enzyme (His₆)Tx-Xyl-CBM1 displayed a drastically lower specific activity towards soluble xylan. Table 2 summarizes the hydrolysis kinetic constants determined at 60°C. Results revealed that the GFP fused xylanase displayed a rather similar $K_{M(app)}$ value, suggesting unaltered enzyme affinity to substrate, whereas k_{cat} was almost 4-fold lower than (His₆)Tx-Xyl, as a result of reduced hydrolysis rate. Accordingly, the chimeric enzyme catalytic efficiency ($k_{cat}/K_{m(app)}$) on birchwood xylan was 4-fold lower. Thus the chimeric xylanase would recognize and bind soluble xylan polymers similarly (with same affinity) as the non fused xylanase, but correct substrate processing would be hindered probably through steric constraints within the catalytic site thereby lowering the hydrolysis and product release rate and as a result the xylanase turnover. This alteration of the xylanase catalytic efficiency towards soluble xylan, due to GFP fusion, could to some extent reflect a disturbance of the overall flexibility of the catalytic domain. Endo-glycoside hydrolases, in general, and particularly GH11 familly enzymes display a dynamic three dimensional structure to ensure the correct operation of the catalytic events (substrate selectivity and

docking, accommodation of the xylan polymer into the catalytic cleft and finally cleavage of the glycosidic bound).^{19,20} This dynamic structure is stabilized by a delicate balance of entropic, hydrophobic, electrostatic, hydrogen bounding and Van der Walls interactions. Alteration or disturbance of such equilibrium could generate steric constraints as well as a lack of three-dimensional flexibility that would modify the topology of the active site and thus hamper the substrate processing and the correct working of the enzyme.

Previously, we have obtained similar effects after fusion of the C terminal end of Tx-Xyl to a family 1 carbohydrate binding module (CBM1) and we have hypothesized that alteration of the mobility of N and/or C terminal extremities through domain fusion may induce a decrease of the overall protein flexibility.

Wheat straw degradation

The hydrolytic activity of the chimeric (His₆)Tx-Xyl-GFP on wheat straw was evaluated and compared to (His₆)Tx-Xyl. The arabinoxylan hydrolysis yields were monitored as function of reaction time (Figure 4) and compared over a 24 h period using quantitative analyses (HPAEC-PAD) of the soluble sugar products. Results revealed lower efficiency of the chimeric (His₆)Tx-Xyl-GFP compared to (His₆)Tx-Xyl. Indeed, after 24h reaction, the chimeric enzyme released 11.5% (\pm 0.32) of wheat straw arabinoxylan, thus almost 20% less than (His₆)Tx-Xyl (14.1% (\pm 0.82)). Wheat straw arabinoxylans are relatively low branched polymers (with an average arabinose/xylose *ratio* of ~ 0.18), thus potentially accessible to GH11 xylanase action. Low hydrolysis yield obtained with (His₆)Tx-Xyl, as previously demonstrated for native wild type xylanase, could be explained by the non specific and non productive interactions of the enzyme notably with the lignin component which represents up to 15% of wheat straw.²¹ Furthermore, as previously suggested by Remond et *al.* 1997, lignins in wheat straw would limit arabinoxylan accessibility and hinder xylanase diffusion within the cell wall network.²²

Nevertheless, the results obtained for the chimeric (His₆)Tx-Xyl-GFP evidenced additional limitations of xylanase action due to GFP grafting. These results could be explained by the lower catalytic efficiency of the chimeric enzyme to hydrolyse polymer chains, as evidenced by the decreased ($k_{cat} / K_{M(app)}$) on isolated xylan. Decreased hydrolytic activity of the fusion enzyme *in situ* would limit its penetration within the cell wall network and thereby result in reduced substrate degradation. Indeed, Beaugrand et *al.*, 2005, by monitoring the diffusion

properties *in planta* of active and inactive forms of Tx-Xyl, have demonstrated that xylanase penetration is intrinsically linked to its hydrolytic activity, with progressive arabinoxylan depletion and concomitant cell wall disassembly facilitating cell wall penetration.²³ Otherwise, the limited cell wall penetration of (His₆)Tx-Xyl-GFP would reflect limited diffusion properties of the chimeric enzyme probably due to the enzyme size and structure. (His₆)Tx-Xyl-GFP displayed a 2 fold higher molecular mass than (His₆)Tx-Xyl (~50 kDa versus ~22 kDa), thus we can hypothesized that the size and the modular architecture of the chimeric xylanase would be factors limiting its diffusion/mobility within the wheat straw cell wall network, although non specific interactions of GFP with cell wall components could not be totally excluded.

Previous immunolocalization studies of GH11 xylanase (Tx-Xyl) on wheat straw stems revealed that the diffusion of the enzyme was rapid and widespread, since it occurred within all cell wall types (epidermis, parenchyma, sclerenchyma...), suggesting that the small size of the protein allowed its easy diffusion into wheat straw cell wall network.²² According to former studies, the mobility/diffusion of enzymes would be function of porosity of the cell wall network.^{24,25} The pore sizes in wheat straw cell walls would be estimated to 3–5 nm.²⁶ Accordingly, only molecules with effective diameters inferior to those of pores, equivalent to globular proteins of approximately 20 kDa, could freely penetrate and diffuse through the wall. Thus, it can be argued that the size of the chimeric xylanase (His₆)Tx-Xyl-GFP could prevent it from effectively penetrating and degrading the cell wall network. To check this hypothesis, the diffusion of (His₆)Tx-Xyl-GFP within semi-thin wheat straw sections was studied using confocal microscopy based on the innate fluorescence properties of GFP. (Figure 5)

Unfortunately, the high auto-fluorescence of the wheat straw cell walls due to their high content in phenolic compounds did not allow clear interpretation of the data. Fluorescence signals displayed by vessel cell walls as well as parenchyma cell walls, in both untreated and (His₆)Tx-Xyl-GFP wheat straw treated sections, were rather similar. Nevertheless, recorded images of sclerenchyma in wheat straw sections incubated in presence of the chimeric GFP fused xylanase showed an over-intensity of the fluorescence signal compared to the control untreated sections, probably indicating that a part of fluorescence was due to GFP localization within this tissue. Such observation would suggest that the diffusion of the chimeric enzyme (His₆)Tx-Xyl-GFP was limited to sclerenchyma and that probably parenchyma and vessels would not be accessible to the enzyme. However, this suggestion is speculative and further investigations (immunolocalization...) are required to confirm the enzyme diffusion pattern.

183

Conclusion

Employing protein engineering, a chimeric xylanase fused to GFP has been successfully constructed without destroying the hydrolytic activity of the native enzyme, or the fluorescence properties of GFP. The fusion xylanase remained thermoactive and thermostable as the native xylanase, but its catalytic properties towards xylan were altered. Likewise, when assayed on complex lignocellulosic substrates such as wheat straw, the chimeric enzyme was less efficient. Although complete characterization was not yet finalized, results suggest that GH11 xylanase size and structure, associated with physical constraints related to the interwoven cell wall network are relevant factors for determining enzyme diffusion and thus efficiency on lignocellulosic substrates.

References

- (1) Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G. FEMS Microbiology Reviews 2005, 29, 3-23.
- (2) Sapag, A.; Wouters, J.; Lambert, C.; De Ioannesa, P.; Eyzaguirre, J.; Depiereux, E. *Journal of Biotechnology* **2002**, *95*, 109-131.
- (3) Berrin, J.-G.; Juge, N. *Biotechnoly Letters* **2008**, *30*, 1139–1150.
- Biely, P.; Vršanská, M.; Tenkanen, M.; Kluepfel, D. Journal of Biotechnology 1997, 57, 151-166
- (5) Beaugrand, J.; Chambat, G.; Wong, V.; Goubet, F.; Remond, C.; Paës, G., et al. *Carbohydrate Research* **2004**, *339*, 2529-2540.
- (6) Tsien, R. Y. Annual Review of Biochemistry 1998, 67, 509-544.
- Ward, W. W. In Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols ed. Chalfie, M. and Kain, S. pp. 45–75. New York: Wiley-Liss. 1998.
- (8) Laemmli, U. K. *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- (9) Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. Protein Science 1995, 4, 2411-2423.
- (10) Gokhale, R. S.; Khosla, C. Current Opinion in Chemical Biology 2000, 4, 22-27.

- (11) Wriggers, W.; Chakravarty, S.; Jennings, P. A. Peptide Science 2005, 80, 736-746.
- (12) Argos, P. Journal of Molecular Biology **1990**, 211, 943-958.
- (13) Gustavsson, M.; Lehtio, J.; Denman, S.; Teeri, T. T.; Hult, K.; Martinelle, M. Protein Engineering Design and Selection JO - Protein Eng. 2001, 14, 711-715.
- (14) Kavoosi, M.; Creagh, A. L.; Kilburn, D. G.; Haynes, C. A. *Biotechnology and Bioengineering* **2007**, *98*, 599-610.
- (15) Gilkes, N. R.; Henrissat, B.; Kilburn, D. G.; MillerJr, R. C.; Warren, R. A. *Microbiol Rev.* 1991, 55, 303–315.
- (16) Shen, H.; Schmuck, M.; Pilz, I.; Gilkes, N. R.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C., Jr.; Warren, R. A. Journal of Biological Chemistry JO - J. Biol. Chem. 1991, 266, 11335-11340.
- (17) Phillips, G. N. Current Opinion in Structural Biology 1997, 7, 821-827.
- (18) Penna, T. C. V.; Ishii, M.; Cholewa, O.; Souza, L. C. d. Letters in Applied Microbiology 2004, 38, 135-139.
- (19) Paes, G.; Tran, V.; Takahashi, M.; Boukari, I.; O'Donohue, M. J. Protein Engineering, Design and Selection 2007, 20, 15-23.
- (20) Törrönen, A.; Rouvinen, J. Journal of Biotechnology 1997, 57, 137-149.
- (21) Zilliox, C.; Debeire, P. *Enzyme and Microbial Technology* **1998**, *22*, 58-63.
- (22) Remond-Zilliox, C.; Debeire, P.; Reis, D.; Vian, B. International Journal of Plant Science 1997, 158, 769–777.
- (23) Beaugrand, J.; Paës, G.; Reis, D.; Takahashi, M.; Debeire, P.; O'Donohue, M.; Chabbert, B. *Planta* 2005, 222, 246-257.
- (24) Carpita, N.; Sabularse, D.; Montezinos, D.; Delmer, D. P. Science **1979**, 205, 1144-1147.
- (25) Grethlein, H. E. *Biotechnology* **1985**, *3*.
- (26) Chesson, A.; Gardner, P. T.; J. Wood, T. Journal of the Science of Food and Agriculture **1997**, 75, 289-295.

Figures

1	ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	CAT	GCC	TGC	AGC	ATG	GGC	AGC	45
1	M	T	M	I	T	P	S	L	H	A	C	S	M	G	S	15
46	AGC	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAC	AGC	AGC	GGC	CTG	GTG	CCG	CGC	GGC	90
16	S	H	H	H	H	H	H	S	S	G	L	V	P	R	G	30
91	AGC	CAT	ATG	GCC	ACG	TAC	TGG	CAG	TAT	TGG	ACG	GAT	GGC	ATC	GGG	135
31	S	H	M	A	T	Y	W	Q	Y	W	T	D	G	I	G	45
136	TAT	gtg	AAC	GCG	ACG	AAC	gga	CAA	GGC	GGC	AAC	TAC	AGC	GTA	AGC	180
46	Y	V	N	A	T	N	g	Q	G	G	N	Y	S	V	S	60
181	TGG	AGC	AAC	AGC	ggc	AAC	TTC	GTC	ATC	GGC	AAG	ggc	TGG	CAA	TAC	225
61	W	S	N	S	g	N	F	V	I	G	K	g	W	Q	Y	75
226	GGT	GCG	CAC	AAC	CGG	GTT	gtc	AAC	TAC	AAC	GCC	ggc	GCA	TGG	CAG	270
76	G	A	H	N	R	V	V	N	Y	N	A	g	A	W	Q	90
271	CCG	AAC	GGC	AAC	GCG	TAT	CTG	ACG	CTG	TAC	GGC	TGG	ACG	CGC	AAC	315
91	P	N	G	N	A	Y	L	T	L	Y	G	W	T	R	N	105
316	CCG	CTC	ATC	GAA	TAC	TAC	gtc	GTC	GAC	AGC	TGG	ggc	AGC	TAC	CGC	360
106	P	L	I	E	Y	Y	V	V	D	S	W	g	S	Y	R	120
361	CCG	ACC	ggc	GAC	TAC	CGG	ggc	AGC	GTG	TAC	AGC	GAC	ggc	GCA	TGG	405
121	P	T	g	D	Y	R	G	S	V	Y	S	D	G	A	W	135
406	TAT	GAC	CTC	TAT	CAC	AGC	TGG	CGC	TAC	AAC	GCA	CCG	tcc	ATC	GAC	450
136	Y	D	L	Y	H	S	W	R	Y	N	A	P	s	I	D	150
451	ggc	ACG	CAG	ACG	TTC	CAA	CAA	TAC	TGG	AGC	GTT	CGT	CAG	CAG	AAA	495
151	g	T	Q	T	F	Q	Q	Y	W	S	V	R	Q	Q	K	165
496	CGC	CCG	ACG	GGC	AGC	AAC	gtc	tcc	ATC	ACG	TTC	GAG	AAC	CAC	GTG	540
166	R	P	T	G	S	N	V	s	I	T	F	E	N	H	V	180
541	AAC	GCA	TGG	GGC	GCT	GCC	ggc	ATG	CCG	ATG	ggc	AGC	AGC	TGG	TCT	585
181	N	A	W	G	A	A	G	M	P	M	G	S	S	W	S	195
586	TAC	CAG	gtg	CTC	GCA	ACC	GAA	GGC	TAT	TAC	AGC	AGC	GGA	TAC	TCC	630
196	Y	Q	V	L	A	T	E	G	Y	Y	S	S	G	Y	S	210
631	AAC	gtc	ACG	GTT	TGG	GGC	ACC	CCG	ACC	CCG	ACC	CCG	ACC	CCG	ACG	675
211	N	V	T	V	W	G	T	P	T	P	T	P	T	P	T	225
						11				1	inke	er				
676	GTA	CCG	GTA	GAA	AAA	ATG	AGT	AAA	GGA	GAA	GAA	CTT	TTC	ACT	GGA	720
226	V	P	V	E	<u>K</u>	M	S	K	G	E	E	L	F	T	G	240
721	GTT	GTC	CCA	ATT	CTT	GTT	GAA	TTA	GAT	GGT	GAT	GTT	AAT	GGG	CAC	765
241	V	V	P	I	L	V	E	L	D	G	D	V	N	G	H	255
766 256	AAA K	TTT F	TCT	GTC V	AGT S	GGA G	GAG E	GGT G	GAA	GGT G	GAT D	GCA A	ACA T	TAC Y	GGA G	810 270
811	AAA	CTT	ACC	CTT	AAA	TTT	ATT	TGC	ACT	ACT	GGA	AAA	CTA	CCT	GTT	855
271	K	L	T	L	K	F	I	C	T	T	G	K	L	P	V	285
856	CCA	TGG	CCA	ACA	CTT	GTC	ACT	ACT	TTC	TCT	TAT	GGT	GTT	CAA	TGC	900
286	P	W	P	T	L	V	T	T	F	S	Y	G	V	Q	C	300
901	TTT	TCC	CGT	TAT	CCG	GAT	CAT	ATG	AAA	CGG	CAT	GAC	TTT	TTC	AAG	945
301	F	S	R	Y	P	D		M	K	R	H	D	F	F	K	315

946	AGT	GCC	ATG	CCC	GAA	GGT	TAT	GTA	CAG	GAA	CGC	ACT	ATA	TCT	TTC	990
316	S	A	M	P	E	G	Y	V	Q	E	R	T	I	S		330
991	AAA	GAT	GAC	GGG	AAC	TAC	AAG	ACG	CGT	GCT	GAA	GTC	AAG	TTT	GAA	1035
331	K	D	D	G	N	Y	K	T	R	A	E	V	K	F	E	345
1036	GGT	GAT	ACC	CTT	GTT	AAT	CGT	ATC	GAG	TTA	AAA	GGT	ATT	GAT	TTT	1080
346	G	D	T	L	V	N	R	I	E	L	K	G	I	D		360
1081	AAA	GAA	GAT	GGA	AAC	ATT	CTC	GGA	CAC	AAA	CTC	GAG	TAC	AAC	TAT	1125
361	K	E	D	G	N	I	L	G	H	K	L	E	Y	N	Y	375
1126	AAC	TCA	CAC	AAT	GTA	TAC	ATC	ACG	GCA	GAC	AAA	CAA	AAG	AAT	GGA	1170
376	N	S	H	N	V	Y	I	T	A	D	K	Q	K	N	G	390
1171	ATC	AAA	GCT	AAC	TTC	AAA	ATT	CGC	CAC	AAC	ATT	GAA	GAT	GGA	TCC	1215
391		K	A	N	F	K	I	R	H	N	I	E	D	G	S	405
1216	GTT	CAA	CTA	GCA	GAC	CAT	TAT	CAA	CAA	AAT	ACT	CCA	ATT	GGC	GAT	1260
406	V		L	A	D	H	Y	Q	Q	N	T	P	I	G	D	420
1261	GGC	CCT	GTC	CTT	TTA	CCA	GAC	AAC	CAT	TAC	CTG	TCG	ACA	CAA	TCT	1305
421	G	P	V	L	L	P	D	N	H	Y	L	S	T	Q	S	435
1306	GCC	CTT	TCG	AAA	GAT	CCC	AAC	GAA	AAG	CGT	GAC	CAC	ATG	GTC	CTT	1350
436	A	L	S	K	D	P	N	E	K	R	D	H	M	V		450
1351	CTT	GAG	TTT	GTA	ACT	GCT	GCT	GGG	ATT	ACA	CAT	GGC	ATG	GAT	GAG	1395
451	L	E	F	V	T	A	A	G	I	T	H	G	M	D	E	465
1396 466	CTC L	TAC Y	AAA K													

Fig.1 The nucleotide and deduced amino acid sequence of (His₆)Tx-Xyl-GFP. The Tx-Xyl catalytic domain is indicated in bold, the linker region is delimitated by arrows and dotted line and the GFP domain shown in grey.



Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified (His₆)Tx-Xyl-GFP. Lane 1: (His₆)Tx-Xyl control; lane 2: (His₆)Tx-Xyl-GFP; M: protein molecular weight markers (Broad range Sigma Marker)



Fig. 3 Optimal pH (A), optimal temperature (B) and thermal stability (C) of the fusion protein (His₆)Tx-Xyl-GFP. Temperature stability was estimated after incubation at 60 °C (\blacktriangle) and 70°C (\blacksquare).



Fig. 4 Wheat straw arabinoxylan hydrolysis rates as a function of reaction time.



Fig. 5 Fluorescence micrographs of wheat straw sections after 24h incubation in absence (A) and in presence (B) of $(His_6)Tx$ -Xyl-GFP. (A-1; B-1): sclerenchyma; (A-2; B-2): parenchyma; (A-3; B-3): vessels. Scale bar: 20 μ m.

Tables

Table 1. Physicochemical characteristics of the fusion protein (His₆)Tx-Xyl-GFP compared to (His₆)Tx-Xyl

	(His ₆)Tx-Xyl	(His ₆)Tx-Xyl-GFP
M_w (kDa)	22.9	52.6
pH _{Opt}	5.8	5.8
T_{Opt} (°C)	~ 70 –72°C	~ 70 –72°C
<i>t</i> _{1/2} , 60°C	> 12 h	~ 8 - 9 h
$t_{1/2}, 70^{\circ}\mathrm{C}$	~ 20 min	~ 24 min

 $t_{1/2}$: half life time

Table 2. Kinetic parameters and activity of the fusion protein (His₆)Tx-Xyl-GFP towards soluble birchwood xylan compared to (His₆)Tx-Xyl

	(His ₆)Tx-Xyl	(His ₆)Tx-Xyl-GFP
SA 60°C (IU/mg)	$586,00 \pm 14,29$	$78,94 \pm 12,82$
\mathbf{k}_{cat} (s ⁻¹)	$382,46 \pm 10,9$	95,18 ± 3,38
$K_{m (app)}(g/L)$	$2,80 \pm 0,37$	$2,78 \pm 0,25$
$k_{cat}/K_{m (app)} (L.g^{-1}.s^{-1})$	$136,43 \pm 22,06$	$34,24 \pm 4,29$

SA: specific activity

Discussion générale et perspectives

Discussion générale

Les ressources lignocellulosiques sont abondantes, diverses et variées (résidus de récoltes, espèces pérennes, coproduits agricoles...). Par ailleurs, plusieurs centaines d'hémicellulases (répertoriées dans la bases de donnés CAZY) sont à nos jours identifiées et caractérisées. En conséquence, l'identification des paramètres clés pour une conversion efficace des hémicelluloses, constituants majeurs des lignocelluloses, ne peut se faire sans prendre en compte à la fois la complexité et la variabilité des substrats lignocellulosiques, l'impact des caractéristiques physicochimiques/structurales mais également des hémicellulases. La démarche adoptée lors de notre étude est une démarche double qui vise à la fois à mettre en évidence les niveaux d'organisation des polymères lignocellulosiques susceptibles d'entraver ou de limiter l'action de l'enzyme, mais également à définir les paramètres structuraux clés pour une hémicellulase (en particulier une endoxylanase) en termes d'architecture et de taille moléculaire. Bien qu'il soit difficile d'établir des relations univoques et généralisables à tout couple enzyme-substrat, notre modèle d'étude repose sur un aspect commun à tous les procédés de transformation enzymatique de la biomasse lignocellulosique : l'action d'une enzyme au sein d'un réseau complexe et enchevêtré de polymères lignocellulosiques : la paroi végétale lignifiée.

Impact du réseau pariétal : l'organisation supramoléculaire des hétéroxylanes et des associations hétéroxylanes-lignines

Afin d'appréhender les évènements chimiques et organisationnels susceptibles d'entraver ou de limiter l'action de l'endoxylanase GH11 (Tx-Xyl) au sein d'une matrice lignocellulosique, nous avons étudié l'action de l'enzyme sur des systèmes de substrats différents et de complexité croissante : hétéroxylanes isolés - complexes binaires de copolymères synthétisés *in vitro* (hétéroxylanes extraits – lignines synthétiques (DHPs)).

Le recours à de tels systèmes nous a permis, dans un premier temps, de préciser l'impact de l'agrégation en solution des polymères d'hétéroxylanes sur leur susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique. De nombreuses études ont en effet montré que les hétéroxylanes même hydrosolubles ont tendance à s'auto-associer en solution sous l'effet de l'augmentation de la température et/ou de la concentration, ce qui entraîne la formation d'agrégats inter-chaines par suite de l'établissement d'interactions de faible énergie (de type hydrogène et/ou hydrophobe). [37, 257, 258] Ce comportement physique témoigne de l'inexistence d'un état de "solubilité absolue" des hétéroxylanes en solution. Nous avons pu mettre en évidence ce phénomène sur des glucuronoarabinoxylanes (GAX) hydrosolubles extraits d'avoine. [259] A partir d'une certaine concentration dite concentration critique d'agrégation, ces GAX forment des amas de chaînes enchevêtrées qui ont tendance à se condenser et à adopter à forte concentration une conformation particulaire compacte. L'endoxylanase GH11 (Tx-Xyl) agit sur ces particules en altérant leur organisation conformationnelle, générant dans un premier temps des structures en pelotes statistiques de conformation moins condensée et plus flexible, ensuite des chaînes polymériques de plus faibles tailles moléculaires susceptibles à leur tour d'être dégradées par l'enzyme en oligosaccharides de plus faible degré de polymérisation. En définitif, l'état d'agrégation des hétéroxylanes ne semble pas entraver l'action de l'endoxylanase.

L'agrégation des hétéroxylanes engendre au fur et à mesure de la densification du système un environnement apolaire par suite de la formation de micro-domaines hydrophobes. Ces derniers favorisent l'agglomération et l'élongation de molécules hydrophobes tels que les monolignols et peuvent, de ce fait, guider la lignification. [66, 260, 261] Dans le contexte de la paroi végétale, la lignification est, en effet, un phénomène tardif qui a lieu après le dépôt des polyosides. Les lignines, étant des polymères phénoliques hydrophobes, s'imbriquent aux autres constituants pariétaux au fur et à mesure de leur polymérisation. L'incrustation des lignines dans la matrice pariétale se traduirait par un départ des molécules d'eau et à l'interface lignines/polyosides, se créent alors de nombreuses associations non covalentes (essentiellement hydrophobes, mais également hydrogènes et électrostatiques). Par ailleurs, de nombreuses liaisons covalentes peuvent s'établir avec les polyosides, en particulier avec les hémicelluloses pour former des complexes LCC (Complexes Lignines-Carbohydrates).

L'étude à l'échelle supramoléculaire de systèmes biomimétiques GAX - lignines (DHPs) synthétisés *in vitro* selon deux modes de polymérisation ("Zulaufverfahren", ZL et "Zutropfverfahren", ZT) nous a permis de révéler des niveaux d'organisation, des morphologies et des caractéristiques physico-chimiques différents en fonction de la nature des associations polysaccharides – lignines de synthèse. D'après Barakat et *al.* 2007, [260] ces modèles de synthèse, obtenus sous forme de colloïdes stables, se distinguent en effet par la prédominance de liaisons non covalentes (essentiellement de type hydrophobes) dans le cas

des systèmes GAX-DHP_{ZL}, et de LCC (ou Lignin carbohydrate complex) formés par suite de l'établissement de liaisons covalentes de type benzyle éther entre le C_5 des résidus arabinose des GAX et le C_{α} des molécules de DHP) dans le cas des systèmes GAX-DHP_{ZT}. Nous avons pu mettre en évidence que le mode de polymérisation des DHP ainsi que la nature des interactions au sein des complexes binaires GAX-DHP impliquent une organisation supramoléculaire différente avec la formation de structures micellaires en cœur-couronne. Les nano-composites covalents GAX-DHP_{ZT} présentent, toutefois une plus grande complexité avec l'établissement d'un réseau d'agglomérats d'unités sphéroïdes piégeant les chaînes hydrophiles de polysaccharides. Les deux systèmes reconstitués in vitro représentent dans une certaine mesure deux scénarii pouvant mimer des agencements supramoléculaires de la paroi. Les systèmes non covalents GAX-DHP_{zL} peuvent refléter les premières étapes de lignification. La disponibilité des monolignols dans une matrice polysaccharidique relativement hydratée favoriserait leur polymérisation en masse par couplage monomèremonomère et la formation d'un polymère phénolique riche en liaisons condensées (C-C), stabilisé par des interactions de faible énergie avec les polysaccharides. La formation des nano-composites GAX-DHP_{ZT} reflèterait les étapes les plus tardives de la lignification ayant lieu dans un système plus dense et appauvri en eau. L'apport progressif en monomères permet de maintenir une concentration locale peu élevée, ce qui favoriserait d'une part le couplage radicalaire entre oligomères et monomères phénoliques générant des lignines plutôt linéaires et riches en liaisons β -O-4, mais d'autre part l'établissement de liaisons covalentes avec la matrice de polysaccharides générant des LCC. [63, 74, 262]

L'étude de l'action de l'endoxylanase GH11 sur les deux nano-composites a permis de souligner l'effet négatif des lignines (DHP) sur l'hydrolyse des GAX par l'enzyme. Cet effet se manifeste indépendamment de la nature des associations polysaccharides – lignines, bien que l'organisation supramoléculaire des LCC limiterait d'avantage l'action de l'enzyme, probablement en limitant l'accessibilité des chaines de polysaccharides à l'enzyme.

Les LCC sont largement considérés comme des structures récalcitrantes à la biodégradation. Nos résultats apportent des éléments de compréhension sur ces limitations qui reposent, essentiellement sur l'agencement tridimensionnel et supramoléculaire de ces complexes. Néanmoins, nos résultats sont en accord avec les hypothèses de Senior et *al.* 1996 suggérant que l'effet négatif des lignines sur l'action hydrolytique des cellulases et/ou hémicellulases s'exerce indépendamment de la présence ou non de LCC et serait d'avantage expliqué par l'importance des interactions non spécifiques directes enzymes/lignines. [263]

Impact du contenu en lignines

Il est largement admis que la présence de lignines constitue le facteur major limitant le fractionnement enzymatique de la biomasse. De ce fait, de nombreux procédés de prétraitements visant à réduire le contenu en lignines se sont développés ces dix dernières années.[252] Au-delà des limitations de l'accessibilité des polysaccharides aux enzymes, de nombreuses études ont montré que les lignines interféreraient directement avec l'action des cellulases et/ou des hémicellulases *via* des interactions non spécifiques ou non productives. [248, 249, 251]

La mise en œuvre des systèmes colloïdaux de synthèse GAX-DHP_{ZL} nous a permis d'étudier l'effet de l'augmentation du contenu en lignines, tout en s'affranchissant des problèmes d'insolubilité de ces polymères phénoliques en milieu aqueux. La variation du contenu en lignines a été reconstituée *in vitro* en procédant à la polymérisation de concentrations croissantes de monomères de lignines (dans notre cas l'alcool coniférylique) en présence des GAX.

La caractérisation des nano-composites GAX-DHP_{ZL} obtenus a permis de mettre en évidence l'impact des conditions de polymérisation (notamment la concentration et la solubilité des monomères) sur la réactivité des monolignols et les caractéristiques des DHP résultants (taille moléculaire, contenu en β -O-4). Par ailleurs les complexes GAX-DHP générés se présentaient sous forme de particules globulaires dont la taille augmenterait de façon proportionnelle au contenu en DHP. La mise en œuvre de l'endoxylanase (Tx-Xyl) sur ces systèmes a permis de mettre en évidence une baisse de l'activité enzymatique en fonction de l'augmentation du contenu en DHP et de la taille des particules, suggérant vraisemblablement une augmentation des surfaces susceptibles de former des interactions non productives limitant l'accès de l'enzyme aux chaînes de polysaccharides.

Impact des interactions enzyme-acides phénoliques

Les interactions non spécifiques ou non productives enzymes-composés phénoliques regroupent des interactions avec les lignines, en tant qu'entités macromoléculaires, mais également des interactions avec les composés monomères ou oligomères phénoliques pouvant être libérés à partir des parois. Des acides phénoliques, tels que l'acide *p*-coumarique ou

férulique existent à des teneurs variables relativement faibles dans les parois de graminées. [47] Par ailleurs, les procédés de prétraitement de la biomasse peuvent entraîner la dégradation des lignines et générer divers composés phénoliques tels que le guaiacol, l'acide vanillique, l'acide caféique...[264]

L'étude de l'interaction de l'endoxylanase GH11 (Tx-Xyl) avec une gamme de composés phénoliques (incluant les acides cinnamique, *p*-coumarique, cafféique, férulique et 3,4,5-trimethoxycinnamique) différents par leur contenu en groupements hydroxyle et/ou methoxyle a permis de mettre en évidence un phénomène d'inactivation non compétitive multi-site. En conséquence, l'inactivation de l'enzyme n'impliquerait pas d'interactions directes avec le site actif, mais se produirait par la formation de complexe inactif enzyme-acides phénoliques. L'analyse cinétique a, par ailleurs, permis de révéler l'implication de nombreux sites de fixation (en moyenne 3 sites) agissant de façon coopérative. Les effets inhibiteurs induits suite à la fixation des acides phénoliques à l'endoxylanase se manifesteraient par l'altération de la stabilité conformationnelle de l'enzyme entraînant son inactivation, d'une façon analogue à un mécanisme d'inhibition allostérique. Les résultats obtenus suggèrent également que les interactions (Tx-Xyl)-acides phénoliques seraient essentiellement des interactions de surface avec une plus grande affinité pour les composés hydroxylés (tels que l'acide caféique).

Dans une certaine mesure, de telles interactions de surface pourraient expliquer les capacités d'adsorption des lignines aux protéines enzymatiques. Les propriétés de surface des lignines, en tant que polymères phénoliques polydisperses, seraient essentiellement conditionnées par leur structure. Ainsi, toutes les unités aromatiques élémentaires constitutives de ces polymères seraient plus ou moins impliquées en termes de sorption.

Impact de l'architecture protéique et de la spécificité de fixation de l'enzyme

Les endoxylanases GH11 sont des enzymes relativement bien conservées, monospécifiques des hétéroxylanes, majoritairement mono-modulaires, constituées d'un seul domaine catalytique et ne comportant pas de domaines dédiés à la fixation aux substrats (CBM). Les séquences des domaines catalytiques renferment en moyenne 175 à 233 résidus d'acides aminés et présentent une masse moléculaire allant de 19 à 26 kDa. [177] C'est le cas de l'endoxylanase GH11 (Tx-Xyl) de *T. xylanilyticus* qui comporte uniquement un domaine catalytique d'environ 20 kDa.

Afin d'étudier l'impact de l'architecture protéique (en terme de taille moléculaire) et/ou la spécificité de fixation de cette enzyme sur ses performances hydrolytiques notamment sur des substrats lignocellulosiques, nous l'avons fusionnée (au niveau de son extrémité Cterminale) via des séquences "linker" à des modules protéiques différents: le CBM1 de la cellulase Cel7A de Trichoderma reesei fixant spécifiquement la cellulose cristalline et la GFP (Green Fluorescent Protein). La caractérisation des deux protéines de fusion (His₆)Tx-Xyl-CBM1 et (His₆)Tx-Xyl-GFP révèle des poids moléculaires de 29.676 et 52.368 Da respectivement, comparé à la xylanase (His₆)Tx-Xyl dont le poids moléculaire est de 22.812 Da. Les deux protéines chimères gardent pratiquement les mêmes propriétés de stabilité au pH que l'endoxylanase et tout comme cette dernière sont thermoactives et thermostables. La fusion au CBM1 entraîne toutefois une perte de la thermoactivité (de ~ $5-7^{\circ}$ C) et de la thermostabilité de l'enzyme. Cet effet "thermosensibilisant" ne serait pas dû au CBM luimême, mais plutôt à une potentielle déstabilisation des extrémités N- et C-terminales de l'endoxylanase via la fusion simultanée respectivement du tag poly-histidine et de la séquence linker–CBM1. Par ailleurs, comparées à la xylanase (His₆)Tx-Xyl, les protéines chimériques (His₆)Tx-Xyl-CBM1 et (His₆)Tx-Xyl-GFP sont moins efficaces sur les substrats solubles, tels que le xylane de bouleau. Leur activité spécifique à 60°C sur ce substrat est diminuée d'un facteur de 4 et 7 respectivement. L'étude de leurs paramètres cinétiques montre également une baisse importante de leur efficacité catalytique (k_{cat}) avec des affinités au substrat (K_m) relativement inchangées (légèrement diminuée dans le cas de l'enzyme de fusion (His₆)Tx-Xyl-CBM1). Ces résultats pourraient refléter un manque de flexibilité globale du domaine catalytique au sein des enzymes chimères, ce qui affecterait la prise en charge du substrat au niveau du site actif et entraînerait par conséquent une diminution du "turn-over" (k_{cat}/K_m) des enzymes. Cependant, la mise en œuvre de ces endoxylanases chimères sur des substrats lignocellulosiques insolubles, tels que la paille et le son de blé, révèle des modes d'action différents. En effet, le rendement d'hydrolyse est légèrement amélioré (de $\sim 4\%$) dans le cas de (His₆)Tx-Xyl-CBM1, alors qu'il est diminué dans le cas de (His₆)Tx-Xyl-GFP par rapport à celui obtenu par (His₆)Tx-Xyl seule. Ces résultats suggèrent fortement que les deux xylanases chimériques pourraient présenter des propriétés de mobilité/diffusion différentes au sein des parois de paille et de son de blé et tendent à montrer l'implication et/ou l'importance
du CBM1 ainsi que la taille/architecture moléculaire de l'endoxylanase Tx-Xyl dans son action *in situ* sur des substrats complexes et insolubles.

Concernant la fusion au CBM1, le comportement de l'endoxylanase chimère (His₆)Tx-Xyl-CBM1 pourrait être expliqué de différentes façons. Il est généralement admis que les domaines de fixation à la cellulose jouent un rôle important dans l'optimisation de l'action des cellulases en exerçant trois fonctions principales : un effet de proximité enzyme-substrat, un effet de sondage/orientation ou "targeting" du domaine catalytique et enfin un effet physique de rupture de la structure ordonnée et cristalline des fibres de cellulose.[105, 141] Par analogie, le CBM1 fusionné en C-terminal de l'endoxylanase peut exercer des fonctions similaires. Contrairement à (His₆)Tx-Xyl, l'enzyme chimère (His₆)Tx-Xyl-CBM1 est dotée d'une double capacité de fixation, fixant les hétéroxylanes (par son domaine catalytique) mais également la cellulose cristalline (grâce au CBM1). Ceci pourrait faciliter le transfert de phase de l'enzyme du milieu aqueux vers le substrat et contribuerait donc à l'augmentation de la concentration effective de l'enzyme sur le substrat (effet de proximité). La fixation dynamique et processive du CBM1 à la surface de la cellulose cristalline pourrait également favoriser le contact direct (via la séquence "linker" flexible) du domaine catalytique avec des zones du substrat (notamment de xylanes) potentiellement inaccessibles à l'endoxylanase seule (effet d'orientation). Enfin, la rupture potentielle de la structure ordonnée des fibres de cellulose pourrait favoriser la diffusion de la protéine au sein du réseau pariétal et donc améliorer l'accessibilité aux xylanes. Le mécanisme d'action exact in situ de l'endoxylanase chimère (His₆)Tx-Xyl-CBM1 reste toutefois à élucider et les hypothèses émises à confirmer par des études complémentaires plus approfondies (notamment par la comparaison des capacités d'adsorption des deux enzymes sur les substrats (paille et son de blé), la visualisation *in situ* par des approches de microscopie (par immuno-localisation) ou encore l'étude de l'impact potentiel de l'enzyme chimère (His₆)Tx-Xyl-CBM1 sur la cellulose (effet sur la cristallinité)...).

Par ailleurs, la taille d'une endoxylanase GH11 semble être un facteur important déterminant sa progression au sein d'une matrice lignocellulosique complexe. Au cours de travaux antérieurs de Beaugrand et *al.*, 2005, [229] la mise en œuvre d'une xylanase GH11 (Tx-Xyl) inactive, obtenue par mutagenèse, a permis de révéler que la déstructuration de parois non lignifiées occasionnée par l'enzyme active facilite la pénétration et la progression de cette dernière, ce qui suggérait que la taille de l'enzyme est potentiellement un facteur déterminant dans l'accessibilité au substrat dans le cas d'un réseau pariétal organisé. L'emploi

d'une endoxylanase chimère, dont la taille a été augmentée (d'environ un facteur 2) *via* la fusion de la GFP ((His₆)Tx-Xyl-GFP), nous a permis d'approcher cet effet, étant donné que l'enzyme chimère est moins active *in situ* sur la paille de blé. La GFP est une protéine qui n'est pas dotée de capacités de fixation spécifique aux composants pariétaux, bien qu'on ne puisse pas exclure de potentielles interactions non spécifiques. Etant donné que les deux enzymes (His₆)Tx-Xyl et (His₆)Tx-Xyl-GFP présentent des affinités similaires aux hétéroxylanes (mêmes valeurs de K_m vis-à-vis du xylane de bouleau), la performance diminuée de l'enzyme chimère serait essentiellement due à ses capacités catalytiques diminuées (valeur de k_{cat} diminuée vis-à-vis du xylane de bouleau) mais également à des capacités de microscopie) du comportement des deux enzymes *in situ* sur des parois de paille de blé n'a pas pu être suffisamment développée pour conduire à des conclusions quant à la comparaison de leur capacité de progression au sein des parois lignifiées. En effet, nous avons notamment été confrontés à des problèmes d'auto-fluorescence des parois.

L'ensemble de nos résultats nous permet malgré tout formuler quelques hypothèses. On peut considérer qu'une endoxylanase GH11 dotée d'une capacité supplémentaire d'accès et de fixation à la cellulose serait plus efficace pour l'hydrolyse des substrats lignocellulosiques. En revanche, une endoxylanase GH11 dont la masse moléculaire serait augmentée (par exemple de l'ordre de 50 kDa) serait moins efficace, probablement à cause d'une progression restreinte au sein du réseau pariétal.

Conclusions générales et perspectives

Pour conclure, l'ensemble de ces travaux souligne que la reconstitution *in vitro* de systèmes biomimétiques des assemblages lignines-hémicelluloses ainsi que l'étude de leur organisation supramoléculaire à l'échelle nanométrique permettent la compréhension des interactions lignines-hémicelluloses. La prise en compte de ce niveau d'organisation permet, en effet, de mieux comprendre la formation des parois lignifiées et par conséquent d'apprécier les mécanismes sous-tendant leurs propriétés notamment leur aptitude au fractionnement enzymatique.

Cette stratégie permet d'envisager des possibilités et des combinaisons infinies de systèmes biomimétiques (variation de la nature des hémicelluloses et/ou des DHP (G, S...), élaboration de complexes ternaires cellulose-hémicelluloses-DHP...) pouvant refléter la grande variabilité des structures lignocellulosiques dans la nature. Il serait intéressant de poursuivre cette approche, notamment, par l'emploi de systèmes impliquant des interactions hémicelluloses-lignines *via* un pontage par l'acide férulique afin d'évaluer l'impact de la réticulation des polymères pariétaux sur l'action des endoxylanases. L'acide férulique est un agent qui joue un rôle important dans la réticulation et la cohésion des parois lignifiées des graminées.[45, 47]

Par ailleurs, il est clair que la mise en œuvre des techniques d'ingénierie protéique est indispensable pour comprendre la relation structure/fonction des hémicellulases, en particulier des xylanases, (tels que l'impact de la taille moléculaire, ou encore l'effet de greffage de modules protéiques tels que les CBM), mais également pour le design rationnel et innovant d'enzymes améliorées et performantes. Cette approche n'est cependant pas sans difficultés. La problématique majeure étant l'expression hétérologue et la production des protéines recombinantes sous leur forme native soluble, l'intégration de systèmes d'expression différents (notamment eucaryotes, par exemple *Pichia...*) devrait être envisagée afin d'améliorer l'expression et la solubilité des enzymes chimères, notamment (His₆)Tx-Xyl-CBM1 et (His₆)Tx-Xyl-GFP.

Les interactions non productives des xylanases avec les lignines constituent les principaux facteurs limitant leur action *in situ*. Ces interactions semblent impliquer essentiellement des phénomènes inter-faciaux (de surface) protéine-polymère phénolique dont le mécanisme reste toutefois peu connu. Des études peuvent, en particulier, être envisagées pour la détermination et la modification des éléments structuraux de l'endoxylanase GH11 (Tx-Xyl) responsables de ses interactions non spécifiques avec les lignines. La mise en œuvre de méthodologies analytiques appropriées devra permettre de préciser certains mécanismes sous-tendant ces interactions.

En plus des approches d'étude à l'échelle macromoléculaire, l'emploi de la microscopie devra permettre l'évaluation des capacités de diffusion/mobilité des enzymes chimères *in situ* au sein du réseau des parois.

Références bibliographiques

- 1. Yuan, J. S.; Tiller, K. H.; Al-Ahmad, H.; Stewart, N. R.; Stewart Jr, C. N., Plants to power: bioenergy to fuel the future *Trends in Plant Science* **2008**, 13, (8), 421-429
- Hayes, D. J., An examination of biorefining processes, catalysts and challenges *Catalysis Today* 2009, 145, (1-2), 138-151
- Octave, S.; Thomas, D., Biorefinery: Toward an industrial metabolism *Biochimie* 2009, 91, (6), 659-664
- 4. Harris, P. J.; Smith, B. G., Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *International Journal of Food Science and Technology* **2006**, 41, (2), 129-143.
- Harris, P. J., Diversity in plant cell walls. In: Plant Diversity and Evolution: Genotypic and Phenotypic Variation in Higher Plants (edited by R.J. Henry). Wallingford: CAB International Publishing. 2005, 201–227.
- Howard, R. L.; Abotsi, E.; Jansen van Rensburg, E. L.; Howard, S., Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production *African Journal of Biotechnology* 2003 2, (12), 602-619.
- Saha, B., Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2003, 30, (5), 279-291.
- 8. McNeil, M.; Darvill, A. G.; Fry, S. C.; Albersheim, P., Structure and Function of the Primary Cell Walls of Plants. *Annual Review of Biochemistry* **1984**, 53, (1), 625-663.
- 9. Popper, Z. A., Evolution and diversity of green plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* **2008**, 11, 286–292.
- Pérez, J.; Muñoz, D.; Muñoz-Dorado, J.; de la, R.; Rubia, T. d. l.; Martínez; Martínez, J., Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* 2002, 5, (2), 53-63.
- Bochek, A. M., Effect of Hydrogen Bonding on Cellulose Solubility in Aqueous and Nonaqueous Solvents. *Russian Journal of Applied Chemistry* 2003, 76, (11), 1711-1719.
- Atalla, R. H.; Vanderhart, D. L., Native Cellulose: A Composite of Two Distinct Crystalline Forms. *Science* 1984, 223, (4633), 283-285.
- O'Sullivan, A., Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 1997, 4, (3), 173-207.

- 14. Carpita, N. C., Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **1996**, 47, (1), 445-476.
- 15. Srivastava, M.; Kapoor, V. P., Seed Galactomannans: An Overview. *Chemistry & Biodiversity* **2005**, 2, (3), 295-317.
- Capek, P.; Kubacková, M.; Alföldi, J.; Bilisics, L.; Lisková, D.; Kákoniová, D., Galactoglucomannan from the secondary cell wall of Picea abies L. Karst. *Carbohydrate Research* 2000, 329, 635–645.
- Ebringerová, A., Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. *Macromolecular Symposia* 2005, 232, (1), 1-12.
- Ebringerová, A.; Heinze, T., Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Xylan and xylan derivates- biopolymers with valuable* properties, 1.Macromol. Rapid Commun. 2000, 21 542-556
- Saulnier, L.; Sado, P.-E.; Branlard, G.; Charmet, G.; Guillon, F., Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties *Journal* of Cereal Science 2007, 46, 261-281.
- 20. Fry, S. C., Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of plant Physiology* **1986**, 37, 165-186.
- Wallace, G.; Russel, T.; Lomax, J., A.,; Jarvis, M.; Lapierre, C.; Chesson, A., Extraction of phenolic-carbohydrate complexes from graminaceous cell walls. *Carbohydrate research* 1995, 272, 41-53.
- 22. Kormelink, F. J. M.; Voragen, A. G. J., Degradation of different[(glucurono)arabino]xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1993**, 38, (5), 688-695.
- 23. Gruppen, H.; Hamer, R. J.; Voragen, A. G. J., Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 2. Fractionation of alkali-extracted polymers and comparison with water-extractable arabinoxylans *Journal of Cereal Science* **1992**, 16, (1), 53-67
- 24. Doner, L. W.; Hicks, K. B., Isolation of Hemicellulose from Corn Fiber by Alkaline Hydrogen Peroxide Extraction. *Cereal Chemistry* **1997**, 74, (2), 176-181.
- Shibuya, N.; Iwasaki, T., Structural features of rice bran hemicellulose *Phytochemistry* 1985, 24, (2), 285-289
- 26. Saulnier, L.; Marot, C.; Chanliaud, E.; Thibault, J. F., Cell-Wall Polysaccharide Interactions in Maize Bran. *Carbohydrate Polymers* **1995**, 26, (4), 279-287.

- 27. Morris, E. R.; Rees, D. A.; Thom, D.; Welsh, E. J., Conformation and intermolecular interactions of carbohydrate chains. *Journal of Supramolecular Structure* **1977**, 6, (2), 259-274.
- 28. Atkins, E. D. T., Three-dimensional structure, interactions and properties of xylan. In: J. Visser, G. Beldman, S. van Kusters and A.G.L. Voragen, Editors, Xylan and Xylanases: Progress in Biotechnology 7, Elsevier, Amsterdam **1992**, 39–50.
- Yui, T.; Imada, K.; Shibuya, N.; Ogawa, K., Conformation of an Arabinoxylan Isolated from the Rice Endosperm Cell Wall by X-Ray Diffraction and a Conformational Analysis *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1995, 59, (6), 965-968
- 30. Mazeau, K.; Moine, C.; Krausz, P.; Gloaguen, V., Conformational analysis of xylan chains *Carbohydrate Research* **2005**, 340, (18), 2752-2760
- Dervilly-Pinel, G.; Thibault, J.-F.; Saulnier, L., Experimental evidence for a semiflexible conformation for arabinoxylans. *Carbohydrate Research* 2001, 330, (3), 365-372.
- 32. Picout, D. R.; Ross-Murphy, S. B., On the chain flexibility of arabinoxylans and other β -(1 \rightarrow 4) polysaccharides *Carbohydrate Research* **2002**, 337, (19), 1781-1784
- Dervilly, G.; Saulnier, L.; Roger, P.; Thibault, J. F., Isolation of Homogeneous Fractions from Wheat Water-Soluble Arabinoxylans. Influence of the Structure on Their Macromolecular Characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48, (2), 270-278.
- Gruppen, H.; Kormelink, F. J. M.; Voragen, A. G. J., Water unextractable cell-wall material from wheat-flour. 3. A structural model for arabinoxylans. *Journal of Cereal Science* 1993, 18, (2), 111–128.
- Dervilly-Pinel, G.; Tran, V.; Saulnier, L., Investigation of the distribution of arabinose residues on the xylan backbone of water-soluble arabinoxylans from wheat flour. *Carbohydrate Polymers* 2004, 55, 171–177.
- Chanliaud, F.; Roger, P.; Saulnier, L.; Thibault, J. F., Static and dynamic light scattering studies of heteroxylans from maize bran in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers* 1996, 31, (1-2), 41-46.
- 37. Ebringerová, A.; Hromádková, Z.; Alföldi, J.; Berth, G., Structural and solution properties of corn cob heteroxylans. *Carbohydrate Polymers* **1992**, 19, (2), 99-105.

- Ebringerová, A.; Hromádková, Z.; Heinze, T., Hemicellulose. In *Polysaccharides I*, 2005; pp 1-67.
- Schooneveld-Bergmans, M. E. F.; van Dijk, Y. M.; Beldman, G.; Voragen, A. G. J., Physicochemical Characteristics of Wheat Bran Glucuronoarabinoxylans. *Journal of Cereal Science* 1999, 29, (1), 49-61.
- 40. Izydorczyk, M. S.; Biliaderis, C. G.; Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers* **1995**, 28, 33–48.
- 41. Izydorczyk, M. S.; Biliaderis, C. G.; Bushuk, W., Oxidative gelation studies of watersoluble pentosans from wheat. *Journal of Cereal Science* **1990**, 11, 153–169.
- 42. Dervilly-Pinel, G.; Rimsten, L.; Saulnier, L.; Andersson, R.; Aman, P., Water-extractable arabinoxylan from pearled flours of wheat, barley, rye and triticale. Evidence for the presence of ferulic acid dimers and their involvement in gel formation. *Journal of Cereal Science* 2001, 34, 207–214.
- 43. Carvajal-Millan, E.; Landillon, V.; Morel, M. H.; Rouau, X.; Doublier, J. L.; Micard, V., Arabinoxylan gels: impact of the feruloylation degree on their structure and properties. *Biomacromolecules* 2005, 6, 309–317.
- 44. Vogel, J., Unique aspects of the grass cell wall *Current Opinion in Plant Biology* 2008, 11, (3), 301-307
- 45. Faulds, C. B.; Williamson, G., The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1999**, 79, (3), 393-395.
- Buanafina, M. M. D., Feruloylation in Grasses: Current and Future Perspectives. *Molecular Plant* 2009, 2, (5), 861-872.
- 47. Hatfield, R. D.; Ralph, J.; Grabber, J. H., Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1999, 79, (3), 403-407.
- 48. Buranov, A. U.; Mazza, G., Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products* **2008**, 28, (3), 237-259.
- Monties, B.; Fukushima, K., Occurrence, function and biosynthesis of lignins. *Biopolymers* 2001, 1, 1-64.
- Monties, B., Botanical variability and mechanical function of lignins: two critical aspects of the plant phenolic secondary metabolism. *Advances in Phytochemistry* 2003, 1-48.

- 51. Monties, B., Biological variability of lignins. *Cellulose Chemistry and Technology* **2005**, 39, (5-6), 341-367.
- 52. Lapierre, C.; Monties, B.; Rolando, C., Thioacidolysis of poplar lignins : Identification of monomeric syringyl products and characterisation of guaiacyl-syringyl lignins fractions. *Holzforschung* **1986**, 40, 113-118.
- Lapierre, C., Application of New Methods for the Invistigation of Lignin Structure. In Forage Cell Wall Structure and Digestibility, Jung, H. G.; Buxton, D. R.; Hatfield, R. D.; Ralph, J., Eds. American Society of Agronomy: Madison, 1993; p 133-163.
- Terashima, N.; Noriyuki, M.; Atsushi, K., Possible approaches for studying three dimensional structure of lignin. In *Progress in Biotechnology*, Elsevier: 2001;Volume 18, pp 257-262.
- 55. Freudenberg, K., Lignin: Its Constitution and Formation from p-Hydroxycinnamyl Alcohols: Lignin is duplicated by dehydrogenation of these alcohols; intermediates explain formation and structure. *Science* **1965**, 148, (3670), 595-600.
- Adler, E., Lignin chemistry-Past, Present and Future. *Wood Science and Technology* 1977, 11, 169-218.
- 57. Sun, R.; Lawther, J. M.; Banks, W. B., A tentative chemical structure of wheat straw lignin *Industrial Crops and Products* **1997**, 6, (1), 1-8
- 58. Brunow, G., Methods to Reveal the Structure of Lignin. *In: Hofrichter M and Steinbuchel A (eds) Lignin, Humic Substances and Coal. Weinheim: Wiley-VHC.* 2001, 1, 89–116.
- 59. Ralph, J.; Lundquist, K.; Brunow, G.; Lu, F.; Kim, H.; Schatz, P. F.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D.; Ralph, S. A.; Christensen, J. H.; Boerjan, W., Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochemistry Reviews* 2004, 3, (1), 29-60.
- 60. Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M., Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **2003**, 54, (1), 519-546.
- 61. Donaldson, L. A., Lignification and lignin topochemistry an ultrastructural view *Phytochemistry* **2001**, 57, (6), 859-873
- 62. Freudenberg, K.; Neish, A., *Biosynthesis of Lignin*. Springer ed.; Berlin, **1968**.
- Sarkanen, K. V., Precursors and their polymerization. In *Lignins-Occurrence*, *Formation, Structure and Reaction*, Sarkanen K. V.; Ludwig G. H., Eds. New-York, 1971; pp 95-155.

- 64. Hatfield, R.; Vermerris, W., Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiology* **2001**, 126, (4), 1351-1357.
- Grabber, J. H.; Hatfield, R. D.; Ralph, J., Apoplastic pH and Monolignol Addition Rate Effects on Lignin Formation and Cell Wall Degradability in Maize. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, (17), 4984-4989.
- Barakat, A.; Chabbert, B.; Cathala, B., Effect of reaction media concentration on the solubility and the chemical structure of lignin model compounds. *Phytochemistry* 2007, 68, (15), 2118-2125.
- Davin, L. B.; Lewis, N. G., Dirigent Proteins and Dirigent Sites Explain the Mystery of Specificity of Radical Precursor Coupling in Lignan and Lignin Biosynthesis. *Plant Physiol.* 2000, 123, (2), 453-462.
- 68. Carpita, N. C.; Gibeaut, D. M., Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* **1993**, 3, (1), 1-30.
- Bidlack, J.; Malone, M.; Benson, R., Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science* 1992, 72, 51-56.
- Chanzy, H., Aspects of cellulose structure. In Cellulose sources and exploitation Kennedy, J. F. Phillips, G. O. & Williams, P.A. (Eds.), Ellis Horwood Limited. New York: 1990, 3–12.
- Ralph, J.; Grabber, J. H.; Hatfield, R. D., Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydrate Research* 1995, 275, (1), 167-178.
- 72. Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D., Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, (12), 6106-6113.
- 73. Ralph, J., Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochemistry Reviews* 2009.
- Atalla, R., Cellulose and the hemicelluloses: patterns for the assembly of lignin. In Lignin and Lignan Biosynthesis, Lewis NG, Sarkanen S (eds). ACS Symposium Series, ACS: Washington, DC, 1998, 697, 172.
- Houtman, C. J.; Atalla, R. H., Cellulose-Lignin Interactions (A Computational Study). *Plant Physiol.* 1995, 107, (3), 977-984.

- 76. Besombes, S.; Mazeau, K., The cellulose/lignin assembly assessed by molecular modeling. Part 2: seeking for evidence of organization of lignin molecules at the interface with cellulose. *Plant Physiology and Biochemistry* **2005**, 43, (3), 277-286.
- Björkman, A., Studies on finely divided wood. part 3. Extraction of lignincarbohydrate complexes with neutral solvents. *Svensk Papperstidning* 1957, 60, 243-251.
- Grabber, J. H., How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science* 2005, 45, (3), 820-831.
- Barakat, A.; Gaillard, C.; xe; dric; Lairez, D.; Saulnier, L.; Chabbert, B.; Cathala, B., Supramolecular Organization of Heteroxylan-Dehydrogenation Polymers (Synthetic Lignin) Nanoparticles. *Biomacromolecules* 2008, 9, (2), 487-493.
- Gilbert, H. J.; Stålbrand, H.; Brumer, H., How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation *Current Opinion in Plant Biology* 2008, 11, (3), 338-348
- Shallom, D.; Shoham, Y., Microbial hemicellulases *Current Opinion in Microbiology* 2003, 6, (3), 219-228
- Bayer, E. A.; Belaich, J.-P.; Shoham, Y.; Lamed, R., THE CELLULOSOMES: Multienzyme Machines for Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Annual Review of Microbiology* 2004, 58, (1), 521-554.
- 83. Gilbert, H. J., Cellulosomes: microbial nanomachines that display plasticity in quaternary structure. *Molecular Microbiology* **2007**, 63, (6), 1568-1576.
- 84. Henrissat, B., A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* **1991**, 280, 309–316.
- 85. Henrissat, B.; Davies, G., Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases *Current Opinion in Structural Biology* **1997**, 7, (5), 637-644
- 86. Davies, G. J.; Sinnott, M. L., Sorting the diverse: the sequence-based classifications of carbohydrate-active enzymes. *Biochem J.*, **2008**.
- Coutinho, P. M.; Henrissat, B., Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. . In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999, 3-12.

- Cantarel, B. L.; Coutinho, P. M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat,
 B., The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for
 Glycogenomics. *Nucl. Acids Res.* 2009, 37, (suppl-1), D233-238.
- Koshland, D., Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological Reviews of the Cambridge philosophical society* 1953, 28 (4), 416-436
- 90. McCarter, J. D.; Withers, G. S., Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology* **1994**, 4, (6), 885-892.
- 91. Zechel, D. L.; Withers, S. G., Glycosidase Mechanisms: Anatomy of a Finely Tuned Catalyst. *Accounts of Chemical Research* **2000**, 33, (1), 11-18.
- Rye, C. S.; Withers, S. G., Glycosidase mechanisms *Current Opinion in Chemical Biology* 2000, 4 (5), 573-580
- 93. Gilkes, N. R.; Warren, R. A.; Miller, R. C., Jr.; Kilburn, D. G., Precise excision of th cellulose binding domains from two Cellulomonas fimi cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, (21), 10401-10407.
- 94. Tomme, P.; Tilbeurgh, H.; Pettersson, G.; Damme, J.; Vandekerckhove, J.; Knowles, J.; Teeri, T.; Claeyssens, M., Studies of the cellulolytic system of Trichoderma reesei QM 9414. *European Journal of Biochemistry* 1988, 170, (3), 575-581.
- 95. Gilkes, N. R.; Henrissat, B.; Kilburn, D. G.; MillerJr, R. C.; Warren, R. A., Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol Rev.* **1991**, 55, (2), 303–315.
- 96. Wriggers, W.; Chakravarty, S.; Jennings, P. A., Control of protein functional dynamics by peptide linkers. *Peptide Science* **2005**, 80, (6), 736-746.
- Argos, P., An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion *Journal of Molecular Biology* 1990 211, (4), 943-958
- 98. Coutinho, J. B.; Moser, B.; Kilburn, D. G.; Warren, R. A. J.; Miller Jr, R. C., Nucleotide sequence of the endoglucanase C gene Cellulomonas fimi, its high-level expression in Escherichia coli, and characterization of its products. *Molecular Microbiology* 1991, 5, (5), 1221-1233.
- 99. Hall, J.; Gilbert, H. J., The nucleotide sequence of a carboxymethylcellulase gene from Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa. *Molecular and General Genetics MGG* 1988, 213, (1), 112-117.

- Black, G. W.; Rixon, J. E.; Clarke, J. H.; Hazlewood, G. P.; Ferreira, L. M. A.; Bolam, D. N.; Gilbert, H. J., Cellulose binding domains and linker sequences potentiate the activity of hemicellulases against complex substrates. *Journal of Biotechnology* 1997, 57, (1-3), 59-69.
- Black, G. W.; Rixon, J. E.; Clarke, J. H.; Hazlewood, G. P.; Theodorou, M. K.;
 Morris, P.; Gilbert, H. J., Evidence that linker sequences and cellulose-binding domains enhance the activity of hemicellulases against complex substrates. *Biochem J JT The Biochemical journal.* 1996, 319 (Pt 2), 515-520.
- 102. Ferreira, L. M.; Fau Durrant, A. J.; Durrant, A. J.; Fau Hall, J.; Hall, J.; Fau Hazlewood, G. P.; Hazlewood, G. P.; Fau Gilbert, H. J., Spatial separation of protein domains is not necessary for catalytic activity or substrate binding in a xylanase. *Biochem J JT The Biochemical journal. JID 2984726R* 1990, 269 IP 1, (0264-6021 (Print)), 261-264.
- 103. Shen, H.; Schmuck, M.; Pilz, I.; Gilkes, N. R.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C., Jr.; Warren, R. A., Deletion of the linker connecting the catalytic and cellulose-binding domains of endoglucanase A (CenA) of Cellulomonas fimi alters its conformation and catalytic activity. *Journal of Biological Chemistry JO - J. Biol. Chem.* **1991**, 266, (17), 11335-11340.
- Srisodsuk, M.; Reinikainen, T.; Penttila, M.; Teeri, T. T., Role of the interdomain linker peptide of Trichoderma reesei cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. *Journal of Biological Chemistry JO - J. Biol. Chem.* 1993, 268, (28), 20756-20761.
- 105. Boraston, A. B.; Bolam, D. N.; Gilbert, H. J.; Davies, G. J., Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *The Biochemical journal.* 2004, 382, (Pt 3), 769-781.
- Simpson, P. J.; Xie, H.; Bolam, D. N.; Gilbert, H. J.; Williamson, M. P., The Structural Basis for the Ligand Specificity of Family 2 Carbohydrate-binding Modules. *Journal of Biological Chemistry JO - J. Biol. Chem.* 2000, 275, (52), 41137-41142.
- 107. Hashimoto, H., Recent structural studies of carbohydrate-binding modules. *Cellular* and Molecular Life Sciences (CMLS) **2006**, 63, (24), 2954-2967.

- Bae, B.; Ohene-Adjei, S.; Kocherginskaya, S.; Mackie, R. I.; Spies, M. A.; Cann, I. K. O.; Nair, S. K., Molecular Basis for the Selectivity and Specificity of Ligand Recognition by the Family 16 Carbohydrate-binding Modules from Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum ManA. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, (18), 12415-12425.
- Boraston, A. B.; Wang, D.; Burke, R. D., Blood Group Antigen Recognition by a Streptococcus pneumoniae Virulence Factor. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, (46), 35263-35271.
- Gregg, K. J.; Finn, R.; Abbott, D. W.; Boraston, A. B., Divergent Modes of Glycan Recognition by a New Family of Carbohydrate-binding Modules. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, (18), 12604-12613.
- 111. Tormo, J.; Lamed, R.; Chirino, A. J.; Morag, E.; Bayer, E. A.; Shoham, Y.; Steitz, T. A., Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. *EMBO J JT The EMBO journal.* 1996, 15, (21), 5739-5751.
- McLean, B. W.; Bray, M. R.; Boraston, A. B.; Gilkes, N. R.; Haynes, C. A.; Kilburn, D. G., Analysis of binding of the family 2a carbohydrate-binding module from Cellulomonas fimi xylanase 10A to cellulose: specificity and identification of functionally important amino acid residues. *Protein Engineering Design and Selection JO Protein Eng.* 2000, 13, (11), 801-809.
- Hogg, D.; Pell, G.; Dupree, P.; Goubet, F.; Martín-Orúe, S. M.; Armand, S.; Gilbert, H. J., The modular architecture of Cellvibrio japonicus mannanases in glycoside hydrolase families 5 and 26 points to differences in their role in mannan degradation. *Biochemical Journal* 2003, 371 1027-43.
- Pell, G.; Williamson, M. P.; Walters, C.; Du, H.; Gilbert, H. J.; Bolam, D. N., Importance of Hydrophobic and Polar Residues in Ligand Binding in the Family 15 Carbohydrate-Binding Module from Cellvibrio japonicus Xyn10C. *Biochemistry* 2003, 42, (31), 9316-9323.
- Blake, A. W.; McCartney, L.; Flint, J. E.; Bolam, D. N.; Boraston, A. B.; Gilbert, H. J.; Knox, J. P., Understanding the Biological Rationale for the Diversity of Cellulose directed Carbohydrate-binding Modules in Prokaryotic Enzymes. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, (39), 29321-29329.

- Boraston, A. B.; Creagh, A. L.; Alam, M. M.; Kormos, J. M.; Tomme, P.; Haynes, C. A.; Warren, R. A. J.; Kilburn, D. G., Binding Specificity and Thermodynamics of a Family 9 Carbohydrate-Binding Module from Thermotoga maritima Xylanase 10A *Biochemistry* 2001, 40, (21), 6240-6247.
- Boraston, A. B.; Notenboom, V.; Warren, R. A. J.; Kilburn, D. G.; Rose, D. R.;
 Davies, G., Structure and Ligand Binding of Carbohydrate-binding Module CsCBM6-3 Reveals Similarities with Fucose-specific Lectins and "Galactose-binding" Domains. *Journal of Molecular Biology* 2003, 327, (3), 659-669.
- 118. Gaskell, A.; Crennell, S.; Taylor, G., The three domains of a bacterial sialidase: a β propeller, an immunoglobulin module and a galactose-binding jelly-roll *Structure* 1995, 3, (11), 1197-1205
- Boraston, A. B.; Lammerts van Bueren, A.; Ficko-Blean, E.; Abbott, D. W.; Johannis,
 P. K., Carbohydrate-Protein Interactions: Carbohydrate-Binding Modules. In *Comprehensive Glycoscience*, Elsevier: Oxford, 2007; pp 661-696.
- Notenboom, V.; Boraston, A. B.; Chiu, P.; Freelove, A. C. J.; Kilburn, D. G.; Rose, D. R., Recognition of cello-oligosaccharides by a family 17 carbohydrate-binding module: an X-ray crystallographic, thermodynamic and mutagenic study. *Journal of Molecular Biology* 2001, 314, (4), 797-806.
- Boraston, A. B.; Nurizzo, D.; Notenboom, V.; Ducros, V.; Rose, D. R.; Kilburn, D. G.; Davies, G. J., Differential Oligosaccharide Recognition by Evolutionarily-related β-1,4 and β-1,3 Glucan-binding Modules *Journal of Molecular Biology* 2002, 319, (5), 1143-1156
- Szabo, L.; Jamal, S.; Xie, H.; Charnock, S. J.; Bolam, D. N.; Gilbert, H. J.; Davies, G. J., Structure of a Family 15 Carbohydrate-binding Module in Complex with Xylopentaose. Evidence That Xylan Binds In An Approximate 3-Fold Helical Conformation. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, (52), 49061-49065.
- Xu, G.-Y.; Ong, E.; Gilkes, N. R.; Kilburn, D. G.; Muhandiram, D. R.; Harris-Brandts, M.; Carver, J. P.; Kay, L. E.; Harvey, T. S., Solution Structure of a Cellulose-Binding Domain from Cellulomonas fimi by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biochemistry* 2002, 34, (21), 6993-7009.
- 124. Notenboom, V.; Boraston, A. B.; Kilburn, D. G.; Rose, D. R., Crystal Structures of the Family 9 Carbohydrate-Binding Module from Thermotoga maritima Xylanase 10A in Native and Ligand-Bound Forms. *Biochemistry* 2001, 40, (21), 6248-6256.

- 125. Brun, E.; Moriaud, F.; Gans, P.; Blackledge, M. J.; Barras, F.; Marion, D., Solution Structure of the Cellulose-Binding Domain of the Endoglucanase Z Secreted by *Erwinia chrysanthemi. Biochemistry* **1997**, 36, (51), 16074-16086.
- 126. Notenboom, V.; Boraston, A. B.; Williams, S. J.; Kilburn, D. G.; Rose, D. R., High-Resolution Crystal Structures of the Lectin-like Xylan Binding Domain from *Streptomyces lividans* Xylanase 10A with Bound Substrates Reveal a Novel Mode of Xylan Binding. *Biochemistry* 2002, 41, (13), 4246-4254.
- 127. Kraulis, P. J.; Clore, G. M.; Nilges, M.; Jones, T. A.; Pettersson, G.; Knowles, J.; Gronenborn, A. M., Determination of the three-dimensional solution structure of the Cterminal domain of cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry* **1989**, 28, (18), 7241-7257.
- Raghothama, S.; Simpson, P. J.; Szabo, L.; Nagy, T.; Gilbert, H. J.; Williamson, M. P., Solution Structure of the CBM10 Cellulose Binding Module from Pseudomonas Xylanase. *Biochemistry* 2000, 39, (5), 978-984.
- Saul, F. A.; Rovira, P.; Boulot, G.; Damme, E. J.; Peumans, W. J.; Truffa-Bachi, P.;
 Bentley, G. A., Crystal structure of Urtica dioica agglutinin, a super-antigen presented
 by MHC molecules of class I and class II. *Structure Fold. Des.* 2000, 8, 593–603.
- Suetake, T.; Tsuda, S.; Kawabata, S.-i.; Miura, K.; Iwanaga, S.; Hikichi, K.; Nitta, K.; Kawano, K., Chitin-binding Proteins in Invertebrates and Plants Comprise a Common Chitin-binding Structural Motif. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, (24), 17929-17932.
- 131. Coutinho, J. B.; Gilkes, N. R.; Kilburn, D. G.; Warren, R. A. J.; Miller Jr., R. C., The nature of the cellulose-binding domain effects the activities of a bacterial endoglucanase on different forms of cellulose. *FEMS Microbiology Letters* 1993, 113, (2), 211-217.
- 132. Carrard, G.; Koivula, A.; Soderlund, H.; Beguin, P., Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences JO - PNAS* 2000, 97, (19), 10342-10347.
- 133. Miyanaga, A.; Koseki, T.; Matsuzawa, H.; Wakagi, T.; Shoun, H.; Fushinobu, S., Crystal Structure of a Family 54 {alpha}-L-Arabinofuranosidase Reveals a Novel Carbohydrate-binding Module That Can Bind Arabinose. *Journal of Biological Chemistry JO - J. Biol. Chem.* **2004**, 279, (43), 44907-44914.

- 134. Knox, J. P., Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls *Current Opinion in Plant Biology Volume*, *Issue*, *June*, *Pages* **2008**, 11, (3), 308-313
- 135. McCartney, L.; Blake, A. W.; Flint, J.; Bolam, D. N.; Boraston, A. B.; Gilbert, H. J.; Knox, J. P., Differential recognition of plant cell walls by microbial xylan-specific carbohydrate-binding modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences JO -PNAS* 2006, 103, (12), 4765-4770.
- 136. McCartney, L.; Gilbert, H. J.; Bolam, D. N.; Boraston, A. B.; Knox, J. P., Glycoside hydrolase carbohydrate-binding modules as molecular probes for the analysis of plant cell wall polymers. *Anal Biochem JT - Analytical biochemistry*. 2004, 326, (1), 49-54.
- 137. Bolam, D. N.; Ciruela, A.; McQueen-Mason, S.; Simpson, P.; Williamson, M. P.; Rixon, J. E.; Boraston, A.; Hazlewood, G. P.; Gilbert, H. J., Pseudomonas cellulose binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochemical Journal* 1998, 331, 775 - 781.
- Boraston, A. B.; Kwan, E.; Chiu, P.; Warren, R. A. J.; Kilburn, D. G., Recognition and Hydrolysis of Noncrystalline Cellulose. *Journal of Biological Chemistry JO - J. Biol. Chem.* 2003, 278, (8), 6120-6127.
- 139. Din, N.; Gilkes, N. R.; Tekant, B.; Miller Jr., R. C.; Warren R., A. J.; Kilburn, D. G., Non-hydrolytic disruption of cellulose fibers by the binding domain of a bacterial cellulase. *Bio/Technology* 1991, 9, 1096 - 1099.
- 140. Din, N.; Damude, H. G.; Gilkes, N. R.; Miller, R. C., Jr.; Warren, R. A. J.; Kilburn, D. G., C1-Cx Revisited: Intramolecular Synergism in a Cellulase. *Proceedings of the National Academy of Sciences JO PNAS* 1994, 91, (24), 11383-11387.
- 141. Linder, M.; Teeri, T. T., The roles and function of cellulose-binding domains. *Journal* of *Biotechnology* **1997**, 57, (1-3), 15-28.
- Pinto, R.; Moreira, S.; Mota, M.; Gama, M., Studies on the Cellulose-Binding Domains Adsorption to Cellulose. *Langmuir* 2004, 20, (4), 1409-1413.
- 143. Reinikainen, T.; Ruohonen, L.; Nevanen, T.; Laaksonen, L.; Kraulis, P. J.; Jones, T. A.; Knowles, J. K. C.; Teeri, T. T., Investigation of the function of mutated cellulose-binding domains of Trichoderma reesei cellobiohydrolase I. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 1992, 14, (4), 475-482.

- 144. Linder, M.; Mattinen, M. L.; Kontteli, M.; Lindeberg, G.; Stahlberg, J.; Drakenberg, T.; Reinikainen, T.; Pettersson, G.; Annila, A., Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of Trichoderma reesei cellobiohydrolaseI. *Protein Science JO Protein Sci* 1995, 4, (6), 1056-1064.
- 145. Mattinen, M. L.; Kontteli, M.; Kerovuo, J.; Linder, M.; Annila, A.; Lindeberg, G.; Reinikainen, T.; Drakenberg, T., Three-dimensional structures of three engineered cellulose-binding domains of cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei. *Protein Science JO - Protein Sci* 1997, 6, (2), 294-303.
- Carrard, G.; Linder, M., Widely different off rates of two closely related cellulose binding domains from Trichoderma reesei. *FEBS Journal JO - Eur J Biochem* 1999, 262, (3), 637-643.
- 147. Lehtio, J.; Sugiyama, J.; Gustavsson, M.; Fransson, L.; Linder, M.; Teeri, T., The binding specificity and affinity determinants of family 1 and family 3 cellulose binding modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences JO - PNAS* 2003, 100, (2), 484-489.
- 148. Saha, B. C., alpha-L-Arabinofuranosidases biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances* **2000**, 18, 403 423.
- Hövel, K.; Shallom, D.; Niefind, K.; Belakhov, V.; Shoham, G.; Baasov, T.; Shoham,
 Y.; Schomburg, D., Crystal structure and snapshots along the reaction pathway of a family 51 -L-arabinofuranosidase. *The EMBO Journal* 2003, 22, 4922 4932.
- 150. Debeche, T.; Cummings, N.; Connerton, I.; Debeire, P.; O'Donohue, M. J., Genetic and biochemical characterization of a highly thermostable alpha-Larabinofuranosidase from Thermobacillus xylanilyticus. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, 66, 1734 - 1736.
- 151. Paes, G.; Skov, L. K.; O'Donohue, M. J.; Rémond, C.; Kastrup, J. S.; Gajhede, M.; Mirza, O., The Structure of the Complex between a Branched Pentasaccharide and *Thermobacillus xylanilyticus* GH-51 Arabinofuranosidase Reveals Xylan-Binding Determinants and Induced Fit. *Biochemistry* 2008, 47, (28), 7441-7451.
- Nurizzo, D.; Nagy, T.; Gilbert, H.; Davies, G., The structural basis for catalysis and specificity of the Pseudomonas cellulosa alphaglucuronidase, GlcA67A. *Structure* 2002, 10, 547-556.

- 153. Biely, P.; Côté, G. L., Microbial hemicellulolytic carbohydrate esterases. *In: Ching, T.H. (Ed.), Handbook of Industrial Biocatalysis.Taylor & Francis Group, Boca Raton.* 2005 21–24.
- Crepin, V. F.; Faulds, C. B.; Connerton, I. F., Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004, 63, (6), 647-652.
- 155. Koseki, T.; Fushinobu, S.; Ardiansyah; Shirakawa, H.; Komai, M., Occurrence, properties, and applications of feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009.
- 156. Smaali, I.; Rémond, C.; Skhiri, Y.; O'Donohue, M. J., Biocatalytic conversion of wheat bran hydrolysate using an immobilized GH43 beta-xylosidase. *Bioresource Technology* 2009 100, (1), 338-344.
- 157. Whistler, R. L.; Masak, E., Enzymatic Hydrolysis of Xylan1. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, 77, (5), 1241-1243.
- 158. Howard, B. H.; Jones, G.; Purdom, M. R., The pentosanases of some rumen bacteria. *Biochemical Journal* **1960**, 74, (1), 173–180.
- 159. Sunna, A.; Antranikian, G., Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* **1997**, 17, (1), 39 67.
- Biely, P., Microbial xylanolytic systems *Trends in Biotechnology* 1985, 3, (11), 286-290
- 161. Biely, P.; Markovič, O.; Mislovičová, D., Sensitive detection of endo-1,4-β-glucanases and endo-1,4-β-xylanases in gels *Analytical Biochemistry* **1985**, 144, (1), 147-151
- Wong, K. K.; Tan, L. U.; Saddler, J. N., Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*. 1988 52, (3), 305–317.
- 163. Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G., Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* **2005**, *29*, (1), 3-23.
- 164. Flint, H. J.; Martin, J.; McPherson, C. A.; Daniel, A. S.; 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. Bacteriol.* **1993**, 175, (10), 2943-2951.
- 165. Berrin, J.-G.; Juge, N., Factors affecting xylanase functionality in the degradation of arabinoxylans. *Biotechnoly Letters* **2008**, 30, 1139–1150.

- 166. Harris, G. W.; Jenkins, J. A.; Connerton, I.; Cummings, N.; Leggio, L. L.; Mandy Scott1; Hazlewood, G. P.; Laurie, J. I.; Gilbert, H. J.; 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, (11), 1107-1116
- 167. Payan, F.; Leone, P.; Porciero, S.; Furniss, C.; Tahir, T.; Williamson, G.; Durand, A.; Manzanares, P.; Gilbert, H. J.; Juge, N.; Roussel, A., The Dual Nature of the Wheat Xylanase Protein Inhibitor XIP-I: Structural basis for the inhibition of family 10 and family 11 xylanases. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, (34), 36029-36037.
- 168. Pell, G.; Szabo, L.; Charnock, S. J.; Xie, H.; Gloster, T. M.; Davies, G. J.; Gilbert, H. J., Structural and Biochemical Analysis of *Cellvibrio japonicus* Xylanase 10C: How variation in substrate-binding cleftinluences the catalyticprofile of family GH-10 xylanases. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, (12), 11777-11788.
- Lee, C. C.; Wong, D. W. S.; Robertson, G. H., Cloning and Characterization of the Xyn11A Gene from *Lentinula edodes The Protein Journal* 2005, 24, 21-26.
- 170. Hayashi, H.; Takehara, M.; Hattori, T.; Kimura, T.; Karita, S.; Sakka, K.; Ohmiya, K., Nucleotide sequences of two contiguous and highly homologous xylanase genes xynA and xynB and characterization of XynA from *Clostridium thermocellum Applied Microbiology and Biotechnology* **1999**, 51
- 171. Kittur, F. S.; Mangala, S. L.; us; rsquo; Abu, A.; Kitaoka, M.; Tsujibo, H.; Hayashi, K., Fusion of family 2b carbohydrate-binding module increases the catalytic activity of a xylanase from *Thermotoga maritima* to soluble xylan. *FEBS Letters* 2003, 549, (1-3), 147-151.
- Mamo, G.; Hatti-Kaul, R.; Mattiasson, B. o.; Fusion of carbohydrate binding modules from Thermotoga neapolitana with a family 10 xylanase from *Bacillus halodurans* S7. *Extremophiles* 2007, 11, (1), 169-177.
- 173. McCartney, L.; Blake, A. W.; Flint, J.; Bolam, D. N.; Boraston, A. B.; Gilbert, H. J.; Knox, J. P., Differential recognition of plant cell walls by microbial xylan-specific carbohydrate-binding modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103, (12), 4765-4770.
- McCartney, L.; Marcus, S. E.; Knox, J. P., Monoclonal Antibodies to Plant Cell Wall Xylans and Arabinoxylans. J. Histochem. Cytochem. 2005, 53, (4), 543-546.

- Biely, P.; Kratky, Z. B.; Vranska, M., Substrate-Binding Site of Endo-1,4-beta-Xylanase of the Yeast *Cryptococcus albidus*. *European Journal of Biochemistry* 1981, 119, (3), 559-564.
- 176. Biely, P.; Vršanská, M.; Tenkanen, M.; Kluepfel, D., Endo-β-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties *Journal of Biotechnology* **1997**, 57, (1-3), 151-166
- Sapag, A.; Wouters, J.; Lambert, C.; De Ioannesa, P.; Eyzaguirre, J.; Depiereux, E., The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships *Journal of Biotechnology* 2002, 95, (2), 109-131.
- 178. Törrönen, A.; Harkki, A.; Rouvinen, J., Three-dimensional structure of endo-1,4-betaxylanase II from Trichoderma reesei: two conformational states in the active site. *EMBO J.* 1994 13, (11), 2493–2501.
- 179. Törrönen, A.; Rouvinen, J., Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4-β -xylanases *Journal of Biotechnology* **1997** 57 (1-3,), 137-149
- 180. Campbell, R. L.; Rose, D. R.; Wakarchuk, W. W.; To, R. J.; Sung, Z.; Yagushi, M., A comparaison of the structures of the 20 kd xylanases from Trichoderma harzianum and Bacillus circulans. In Suominen, P. and Reinikainen, T. (eds), Trichoderma Reesei Cellulases and other Hydrolases. Foundation for biotechnological and industrial fermentation research, Espoo. Finland, 1993, vol 8, 63-72.
- Torronen, A.; Rouvinen, J., Structural Comparison of Two Major endo-1,4-Xylanases from *Trichoderma reesei*. *Biochemistry* 1995, 34, (3), 847-856.
- 182. Wakarchuk, W. W.; Campbell, R. L.; Sung, W. L.; Davoodi, J.; Yaguchi, M., Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Science* **1994**, 3, (3), 467-475.
- 183. Ko, E. P.; Akatsuka, H.; Moriyama, H.; Shinmyo, A.; Hata, Y.; Katsube, Y.; Urabe, I.; Okada, H., Site-directed mutagenesis at aspartate and glutamate residues of xylanase from *Bacillus pumilus*. *Biochem. J.* **1992**, 288 117–121.
- 184. Harris, G. W.; Pickersgill, R. W.; Connerton, I.; Debeire, P.; Touzel, J.-P.; Breton, C.; Pérez, S., Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **1997**, 29, (1), 77-86.
- 185. Havukainen, R.; Torronen, A.; Laitinen, T.; Rouvinen, J., Covalent Binding of Three Epoxyalkyl Xylosides to the Active Site of endo-1,4-Xylanase II from *Trichoderma reesei. Biochemistry* **1996**, 35, (29), 9617-9624.

- 186. Muilu, J.; Törrönen, A.; Peräkylä, M.; Rouvinen, J., Functional conformational changes of endo-1,4-xylanase II from *Trichoderma reesei*: A molecular dynamics study. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **1998**, 31, (4), 434-444.
- 187. Paes, G.; Tran, V.; Takahashi, M.; Boukari, I.; O'Donohue, M. J., New insights into the role of the thumb-like loop in GH-11 xylanases. *Protein Engineering, Design and Selection* 2007, 20, (1), 15-23.
- 188. Li, K.; Azadi, P.; Collins, R.; Tolan, J.; Kim, J. S.; Eriksson, K.-E. L., Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme and Microbial Technology* 2000, 27, (1-2), 89-94.
- 189. Moers, K.; Celusa, I.; Brijs, K.; Courtin, C. M.; Delcour, J. A., Endoxylanase substrate selectivity determines degradation of wheat water-extractable and water-unextractable arabinoxylan *Carbohydrate Research* 2005, 340, (7), 1319-1327
- Courtin, C. M.; Delcour, J. A., Relative Activity of Endoxylanases Towards Water extractable and Water-unextractable Arabinoxylan *Journal of Cereal Science* 2001, 33, (3), 301-312
- 191. Courtin, C. M.; Gelders, G. G.; Delcour, J. A., Use of Two Endoxylanases with Different Substrate Selectivity for Understanding Arabinoxylan Functionality in Wheat Flour Breadmaking. *Cereal Chemistry* 2001, 78, (5), 564-571.
- Moers, K.; Courtin, C. M.; Brijs, K.; Delcour, J. A., A screening method for endo-β-1,4-xylanase substrate selectivity *Analytical Biochemistry* 2003, 319, (1), 73-77.
- Bonnin, E.; Daviet, S.; Sorensen, J. F.; Sibbesen, O.; Goldson, A.; Juge, N.; Saulnier, L., Behaviour of family 10 and 11 xylanases towards arabinoxylans with varying structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006, 86, (11), 1618-1622.
- Moers, K.; Bourgois, T.; Rombouts, S.; Beliën, T.; Campenhout, S. V.; Volckaert, G.;
 Robben, J.; Brijs, K.; Delcour, J. A.; Courtin, C. M., Alteration of *Bacillus subtilis* XynA endoxylanase substrate selectivity by site-directed mutagenesis *Enzyme and Microbial Technology* 2007 41 (1-2), 85-91.
- 195. Vyas, N. K., Atomic features of protein-carbohydrate interactions *Current Opinion in Structural Biology* **1991**, 1, (5), 732-740
- Davies, G.; Wilson, K.; Henrissat, B., Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal* 1997, 321, 557-559

- 197. Joshi, M. D.; Sidhu, G.; Pot, I.; Brayer, G. D.; Withers, S. G.; McIntosh, L. P., Hydrogen bonding and catalysis: a novel explanation for how a single amino acid substitution can change the ph optimum of a glycosidase. *Journal of Molecular Biology* 2000, 299, (1), 255-279
- 198. Sidhu, G.; Withers, S. G.; Nguyen, N. T.; McIntosh, L. P.; Ziser, L.; Brayer, G. D., Sugar Ring Distortion in the Glycosyl-Enzyme Intermediate of a Family G/11 Xylanase. *Biochemistry* 1999, 38, (17), 5346-5354.
- 199. Sabini, E.; Wilson, K. S.; Danielsen, S.; Schulein, M.; Davies, G. J., Oligosaccharide binding to family 11 xylanases: both covalent intermediate and mutant product complexes display 2,5B conformations at the active centre. *Acta Crystallographica Section D* 2001, 57, (9), 1344-1347.
- Jänis, J.; Hakanpää, J.; Hakulinen, N.; Ibatullin, F. M.; Hoxha, A.; Derrick, P. J.; Rouvinen, J.; Vainiotalo, P., Determination of thioxylo-oligosaccharide binding to family 11 xylanases using electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and X-ray crystallography. *FEBS Journal* 2005, 272, (9), 2317-2333.
- 201. Ludwiczek, M. L.; Heller, M.; Kantner, T.; McIntosh, L. P., A Secondary Xylanbinding Site Enhances the Catalytic Activity of a Single-domain Family 11 Glycoside Hydrolase *Journal of Molecular Biology* **2007**, 373, (2), 337-354
- 202. Boraston, A. B.; Bolam, D. N.; Gilbert, H. J.; Davies, G. D., Carbohydrate binding modules: fine tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal* 2004, 382, 769 781.
- 203. Vandermarliere, E.; Bourgois, T. M.; Rombouts, S.; Campenhout, S. v.; Volckaert, G.; Strelkov, S. V.; Delcour, J. A.; Rabinj, A.; Courtain, C. M., Crystallographic analysis shows substrate binding at the -3 to +1 active-site subsites and at the surface of glycoside hydrolase family 11 endo-1,4-b-xylanases. *Biochem. J.* **2008**, 410, (71–79).
- 204. Ito, K.; Ogasawara, H.; Sugimoto, T.; Shikawa, T. I., Purification and Properties of Acid Stable Xylanases from Aspergillus kawachii. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1992, 56, (4), 547-550
- 205. Fushinobu, S.; Ito, K.; Konno, M.; Wakagi, T.; 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. *Protein Eng.* **1998**, 11, (12), 1121-1128.

- 206. De Lemos Esteves, F.; Ruelle, V.; Lamotte-Brasseur, J.; Quinting, B.; Frère, J.-M., Acidophilic adaptation of family 11 endo-beta-1,4-xylanases: Modeling and mutational analysis. *Protein Science* **2004**, 13, (5), 1209-1218.
- 207. Hayashi, H.; Takehara, M.; Hattori, T.; Kimura, T.; Karita, S.; Sakka, K.; Ohmiya, K., Nucleotide sequences of two contiguous and highly homologous xylanase genes xynA and xynB and characterization of XynA from *Clostridium thermocellum. Applied Microbiology and Biotechnology* **1999**, 51, (3), 348-357.
- 208. Morris, D. D.; Gibbs, M. D.; Chin, C. W. J.; Koh, M.-H.; Wong, K. K. Y.; Allison, R. W.; Nelson, P. J.; 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, (5), 1759-1765.
- 209. Purmonen, M.; Valjakka, J.; Takkinen, K.; Laitinen, T.; Rouvinen, J., Molecular dynamics studies on the thermostability of family 11 xylanases. *Protein Engineering*, *Design and Selection* 2007, 20, (11), 551-559.
- Paes, G.; O'Donohue, M. J., Engineering increased thermostability in the thermostable GH-11 xylanase from *Thermobacillus xylanilyticus*. *Journal of Biotechnology* 2006, 125, 338 350.
- 211. Sun, J.-Y.; Liu, M.-Q.; Xu, Y.-L.; Xu, Z.-R.; Pan, L.; Gao, H., Improvement of the thermostability and catalytic activity of a mesophilic family 11 xylanase by N terminus replacement *Protein Expression and Purification* **2005**, 42, (1), 122-130
- 212. Georis, J.; De Lemos Esteves, F.; Lamotte-Brasseur, J.; Bougnet, V.; Giannotta, F.; Frère, J.-M.; Devreese, B.; Granier, B., An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: Structural basis and molecular study. *Protein Science* **2000**, 9, (3), 466-475.
- 213. Turunen, O.; Vuorio, M.; Fenel, F.; Leisola, M., Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of Trichoderma reesei endo-1,4-[beta]-xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH. *Protein Engineering* 2002, 15, (2), 141-145.
- 214. Goesaert, H.; Elliott, G.; Kroon, P. A.; Gebruers, K.; Courtin, C. M.; Robben, J.;
 Delcour, J. A.; Juge, N., Occurrence of proteinaceous endoxylanase inhibitors in cereals *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Proteins & Proteomics* 2004, 1696, (2), 193-202

- Juge, N.; Delcour, J. A., Xylanase inhibitors: structure, function and evolution. *Current Enzyme Inhibition* 2006, 2, 29–35.
- 216. Juge, N.; Payan, F.; Williamson, G., XIP-I, a xylanase inhibitor protein from wheat: a novel protein function. *Biochimica et Biophysica Acta* **2004**, 1696, 203–211.
- 217. Flatman, R.; McLauchlan, W. R.; Juge, N.; Furniss, C.; Berrin, J.-G.; Hughes, R. K.; Manzanares, P.; Ladbury, J. E.; O'Brien, R.; Williamson, G., Interactions defining the specificity between fungal xylanases and the xylanase-inhibiting protein XIP-I from wheat. *Biochem. J.* 2002, 365, 773-81.
- 218. Gebruers, K.; Brijsa, K.; Courtin, C. M.; Fierens, K.; Goesaert, H.; Rabijns, A.; Raedschelders, G.; Robben, J.; Sansen, S.; Sørensen, J. F.; Campenhout, S. V.; Delcour, J. A., Properties of TAXI-type endoxylanase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Proteins & Proteomics* 2004, 1696, (2), 213-221
- 219. Fierens, E.; Rombouts, S.; Gebruers, K.; Goesaert, H.; Brijs, K.; Beaugrand, J.; Volckaert, G.; Van campenhout, S.; Proost, P.; Courtin, C. M.; Delcour, J. A., TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family. *Biochem. J.* 2007, 403, 583–591.
- 220. Samain, E.; Touzel, J. P.; Brodel, B.; Debeire, P., Isolation of a thermophilic bacterium producing high level of xylanase. *in : Xylans and Xylanases (édité par Visser J., Beldman G., Kusters-van Someren M. A. et Voragen A.G.J.), Elsiever Science Publishers B.V., Amsterdam, The Neverlands,* **1992,** 7, 467-470.
- 221. Samain, E.; Debeire, P.; Touzel, J. P., High level production of a cellulase-free xylanase in glucose-limited fed batch cultures of a thermophilic Bacillus strain *Journal of Biotechnology* **1997**, 58, (2), 71-78
- 222. Touzel, J.; O'Donohue, M.; Debeire, P.; Samain, E.; Breton, C., *Thermobacillus xylanilyticus gen. nov., sp nov.*, a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil. *International Journal Of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2000 50, 315-320
- 223. Debeire-Gosselin, M.; Loonis. M.; Samain, E.; Debeire, P., Purification and properties of a 22 kDa endoxylanase excreted by a new strain of thermophilic Bucillus. *In:Xylans and Xylanases (Visser. J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M. A., and Voragen, A. G. J., Eds.). Elsevier Science Publishers* 1992, 463-466.

- 224. Zilliox, C.; Debeire, P., Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase: Adsorption and kinetic studies. *Enzyme and Microbial Technology* **1998**, 22, 58-63.
- 225. Connerton, I.; Cummings, N.; Harris, G. W.; Debeire, P.; Breton, C., A single domain thermophilic xylanase can bind insoluble xylan: evidence for surface aromatic clusters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure and Molecular Enzymology* **1999**, 1433, (1-2), 110-121.
- 226. Benamrouche, S.; Crônier, D.; Debeire, P.; Chabbert, B., A Chemical and Histological Study on the Effect of (1-4)-β-endo-xylanase Treatment on Wheat Bran. *Journal of Cereal Science* 2002, 36, 253-260.
- 227. Beaugrand, J.; Chambat, G.; Wong, V.; Goubet, F.; Remond, C.; Paës, G., et al., Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans. *Carbohydrate Research* 2004, 339, 2529-2540.
- 228. Beaugrand, J.; Reis D; Guillon, F.; Debeire, P.; Chabbert, B., Xylanase-mediated hydrolysis of wheat bran: Evidence for subcellular heterogeneity of cell walls. *International Journal Of Plant Science* 2004 165, (4), 553-563
- 229. 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 active and inactive forms of a GH11 xylanase. *Planta* 2005, 222, (2), 246-257.
- Paës, G.; O'Donohue, M. J., Engineering increased thermostability in the thermostable GH-11 xylanase from Thermobacillus xylanilyticus. *Journal of Biotechnology* 2006, 125, (3), 338-350.
- 231. Beg, Q. K.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G. S., Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001, 56, (3), 326-338.
- 232. Courtin, C. M.; Delcour, J. A., Arabinoxylans and Endoxylanases in Wheat Flour Bread-making. *Journal of Cereal Science* **2002**, 35, (3), 225-243.
- 233. Bhat, M. K., Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* **2000**, 18, 355 383.
- 234. Courtin, C. M.; Broekaert, W. F.; Swennen, K.; Lescroart, O.; Onagbesan, O.; Buyse, J.; Decuypere, E.; Van de Wiele, T.; Marzorati, M.; Verstraete, W.; Huyghebaert, G.; Delcour, J. A., Dietary Inclusion of Wheat Bran Arabinoxylooligosaccharides Induces Beneficial Nutritional Effects in Chickens. *Cereal Chemistry* 2008, 85, (5), 607-613.

- 235. Grootaert, C.; Abbeele, P. V. d.; Marzorati, M.; Broekaert, W. F.; Courtin, C. M.; Delcour, J. A.; Verstraete, W.; Wiele, T. V. d., Comparison of prebiotic effects of arabinoxylan oligosaccharides and inulin in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology* **2009**, 69, (2), 231-242.
- 236. Viikari, L.; Kantelinen, A.; Sundquist, J.; Linko, M., Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiology Reviews* **1994**, 13, 335 350.
- 237. Mielenz, J. R., Ethanol production from biomass: technology and commercialization status *Current Opinion in Microbiology* **2001**, 4, (3), 324-329.
- 238. Eriksson, T.; Karlsson, J.; Tjerneld, F.; , A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of Trichoderma reese. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2002, 101, (1), 41-60.
- Lee, Y.-H.; Fan, L. T., Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Analysis of the initial rates. *Biotechnology and Bioengineering* 1982, 24, (11), 2383-2406.
- 240. Carpita, N.; Sabularse, D.; Montezinos, D.; Delmer, D. P., Determination of the Pore Size of Cell Walls of Living Plant Cells. *Science* **1979**, 205, (4411), 1144-1147.
- 241. Chesson, A.; Gardner, P. T.; J. Wood, T., Cell wall porosity and available surface area of wheat straw and wheat grain fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1997**, 75, (3), 289-295.
- 242. Grethlein, H. E., The Effect of Pore Size Distribution on the Rate of Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Substrates. *Biotechnology* **1985**, 3, (155 160).
- 243. Jung, H.-J. G.; Jorgensen, M. A.; Linn, J. G.; Engels, F. M., Impact of accessibility and chemical composition on cell wall polysaccharide degradability of maize and lucerne stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2000**, 80, (3), 419-427.
- 244. Kramer, E. M.; Frazer, N. L.; Baskin, T. I., Measurement of diffusion within the cell wall in living roots of Arabidopsis thaliana. *J. Exp. Bot.* **2007**, 155.
- 245. McCann, M. C.; Wells, B.; Roberts, K., Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *J Cell Sci* **1990**, 96, (2), 323-334.
- 246. McCann, M. C.; Carpita, N. C., Designing the deconstruction of plant cell walls *Current Opinion in Plant Biology* **2008**, 11, (3), 314-320
- Akin, D. E., Plant cell wall aromatics: influence on degradation of biomass. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr* 2008, 2, (4), 288-303.

- 248. Berlin, A.; Balakshin, M.; Gilkes, N.; Kadla, J.; Maximenko, V.; Kubo, S.; Saddler, J., Inhibition of cellulase, xylanase and [beta]-glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal of Biotechnology* **2006**, 125, (2), 198-209.
- Kaya, F.; Heitmann, J.; Joyce, T., Effect of dissolved lignin and related compounds on the enzymatic hydrolysis of cellulose model compound *Cellulose Chemistry and Technology* 1999 33, (3-4), 203-213
- Kaya, F.; Heitmann, J. A.; Joyce, T. W., Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. *Journal of Biotechnology* 2000, 80, (3), 241-247.
- 251. Senior, D. J.; Mayers, P. R.; Breuil, C.; Saddler, J. N., The interaction of xylanase with pulps: non-selective adsorption and inactivation of xylanase. *In: Kirk, T.K., Chang, H.-M.(Eds.), Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture. Butterworth-Heinemann, Boston, MA* **1990**, 169-182.
- 252. Chandra, R. P.; Bura, R.; Mabee, W. E.; Berlin, A.; Pan, X.; Saddler, J. N., Substrate Pretreatment: The key to effective Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosics? *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 2007, 108, 67-93.
- 253. Bin Yang, C. E. W., Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **2008**, *2*, (1), 26-40.
- Sharma, A.; Milstein, O.; Vered, Y.; Gressel, J.; Flowers, H. M., Effects of aromatic compounds on hemicellulose-degrading enzymes in *Aspergillus japonicus*. *Biotechnol. Bioeng.* 1985, 27, 1095-1101.
- 255. Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B.; Galbe, M.; Zacchi, G., The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* **1996**, 19, (6), 470-476.
- 256. Beaugrand, J.; Crônier, D.; Debeire, P.; Chabbert, B., Arabinoxylan and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility. *Journal of Cereal Science* 2004, 40, (3), 223-230.
- 257. Esker, A.; Becker, U.; Jamin, S.; Beppu, S.; Renneckar, S.; Glasser, W.; Self-assembly behaviour of some co- and heteropolysaccharides related to hemicelluloses. In *Hemicelluloses: science and technology*, Gatenholm, P.; Tenkanen, M. e., Eds. ACS Symp., 2004, 198–219.

- 258. Roubroeks, J.; Saake, B.; Glasser, W.; Gatenholm, P., Contribution of the molecular architecture of 4-O-methyl glucuronoxylan to its aggregation behavior in solution. In *Hemicelluloses: science and technology*, Gatenholm, P.; Tenkanen, M. e., Eds. ACS Symp., 2004, 167–183.
- Winter, H.; Barakat, A.; Cathala, B.; Saake, B., Preparation of arabinoxylan and its sorption on bacterial cellulose during cultivation. *Macromolecular Symposia* 2006, 232, 74-84.
- 260. Barakat, A.; Winter, H.; Rondeau-Mouro, C.; Saake, B.; Chabbert, B.; Cathala, B., Studies of xylan interactions and cross-linking to synthetic lignins formed by bulk and end-wise polymerization: a model study of lignin carbohydrate complex formation. *Planta* 2007, 226, (1), 267-281.
- Lairez, D.; Cathala, B.; Monties, B.; Bedos-Belval, F.; Duran, H.; Gorrichon, L., Aggregation during Coniferyl Alcohol Polymerization in Pectin Solution: A Biomimetic Approach of the First Steps of Lignification. *Biomacromolecules* 2005, 6, (2), 763-774.
- Jurasek, L., Experimenting with Virtual Lignins. In *Lignin and Lignan Biosynthesis*, American Chemical Society: Washington, DC, **1998**, 276-293.
- 263. Sewalt, V. J. H.; Beauchemin, K. A.; Dixon, R. A.; Fontenot, J. P.; Glasser, W. G., A pre-established lignin-carbohydrate bond is not a prerequisite for inhibiting enzymic cellulose degradation. In *Book of Abstracts, 211th ACS National Meeting, New Orleans, LA, March 24-28*, **1996**
- 264. Ko, J. J.; Shimizu, Y.; Ikeda, K.; Kim, S. K.; Park, C. H.; Matsui, S., Biodegradation of high molecular weight lignin under sulfate reducing conditions: Lignin degradability and degradation by-products. *Bioresource Technology* 2009, 100, (4), 1622-1627.

ANNEXE

Références pdb des séquences de xylanases alignées dans la Figure 23 :

T. xylanilyticus	non déposée
A. kawachi	1BK1
A. niger	2QZ2
B. circulans	3HD8
B. subtilis 168	3EXU
B. subtilis B230	1IGO
B. stearothermophilus	non déposée
C. thermophilum	1H1A
D. thermophilum	1F5J
S. Sp.S38	1H1X
T. lanuginosus	1YNA
T. flexuosa	3B5L
T. harzianum	1XND
T. reesei 1	1XYN
T. reesei 2	2JIC
P. variotii	1PVX
P. funiculosum	1TE1

Définition des critères d'efficacité d'une hémicellulase pour l'hydrolyse de substrats lignocellulosiques complexes et insolubles

Le développement de technologies enzymatiques constitue un enjeu majeur pour le fractionnement maîtrisé et la valorisation des ressources lignocellulosiques (biocarburants, biopolymères, synthons...). L'efficacité de ces biocatalyseurs est cependant limitée par de multiples facteurs liés à la fois à leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles, mais également à la nature complexe de la biomasse lignocellulosique (riche en parois secondaires lignifiées).

Dans le but d'identifier les paramètres clés pour une conversion efficace des hémicelluloses, constituants majeurs des lignocelluloses, nous avons centré notre étude sur l'endoxylanase (Tx-Xyl) de *Thermobacillus xylanilyticus* appartenant à la famille 11 des glycoside-hydrolases (GH11).

L'efficacité d'une hémicellulase au sein des parois lignifiées est fortement dépendante de la diversité structurale et la complexité organisationnelle des réseaux pariétaux. Afin de préciser les facteurs limitants propres aux lignocelluloses et de mettre en évidence les niveaux d'organisation des polymères lignocellulosiques susceptibles d'entraver ou de limiter l'action de l'enzyme, nous avons étudié, dans une approche biomimétique, l'action de la xylanase GH11 (Tx-Xyl) sur des substrats différents et de complexité croissante (hétéroxylanes isolés, assemblages de copolymères reconstitués *in vitro*...). L'emploi de nano-composites hétéroxylanes extraits - lignines (DHPs) synthétisés *in vitro* selon deux modes de polymérisation ("Zulaufverfahren", ZL et "Zutropfverfahren", ZT) nous a permis de révéler différents niveaux d'organisation, morphologies et caractéristiques physico-chimiques des associations polysaccharides - lignines et de souligner l'effet négatif des lignines (DHPs) sur l'hydrolyse des hétéroxylanes par la xylanase (Tx-Xyl). Cet effet se manifeste indépendamment de la nature des associations hétéroxylanes - lignines (covalentes ou non), mais serait accentué par l'agencement tridimensionnel des complexes covalents (LCC) qui limiterait l'accessibilité des hétéroxylanes à l'enzyme. Au-delà des limitations de l'accessibilité, les lignines interféreraient directement avec l'action de l'enzyme *via* des interactions non spécifiques ou non productives. Une corrélation directe a pu, en effet, être établie entre l'augmentation du contenu en lignines des nano-composites et la baisse de l'activité de l'enzyme. Par ailleurs, l'étude des interactions de Tx-Xyl avec divers acides hydroxycinamiques (*p*-coumarique, férulique, cafféique...) a permis de mettre en évidence un phénomène d'inhibition non compétitif de l'enzyme par ces composés phénoliques.

En plus des paramètres inhérents au substrat, la compréhension des propriétés structurales des enzymes régissant leur action *in situ* sur les lignocelluloses est indispensable. A l'instar des endoxylanases de la famille GH11, Tx-Xyl est une enzyme constituée d'un domaine catalytique d'environs 20 kDa et elle ne comporte pas de domaine dédié à la fixation au substrat (Carbohydrate Binding Module ou CBM). Moyennant des outils de biologie moléculaire, nous avons développé une stratégie qui vise à modifier l'architecture protéique et/ou la spécificité de fixation de Tx-Xyl en la fusionnant *via* des séquences "*linker*" à des modules protéiques différents: le CBM1 de la cellulase Cel7A de *Trichoderma reesei* fixant spécifiquement la cellulose cristalline et la GFP (Green Fluoerescent Protein). Les protéines chimériques Tx-Xyl-CBM1 et Tx-Xyl-GFP obtenues sont moins efficaces sur les xylanes solubles (faible K_{cat}) comparées à Tx-Xyl. Cependant, leurs modes d'action sur des substrats lignocellulosiques (tels que les coproduits du blé : paille et son de blé) semblent différents. En effet, des rendements d'hydrolyse légèrement augmentés sont obtenus dans le cas de Tx-Xyl-CBM1, suggérant un impact positif du CBM1 sur la migration et/ou l'action de l'enzyme *in situ*, contrairement à Tx-Xyl-GFP dont la taille serait un facteur limitant sa diffusion/pénétration au sein des parois végétales.

Mots clés : lignocelluloses, xylanases, lignines (DHPs), hétéroxylanes, acides phénoliques, accessibilité, inhibition, CBM, GFP.

Definition of the effectiveness criteria of a hemicellulase for the hydrolysis of complex and insoluble lignocellulosic substrates

The development of enzymatic technologies offers an alternative, environmentally-friendly interesting strategy for controlled fractionation and upgrading of lignocellulosic biomass (biofuels, biopolymers, industrially-relevant chemicals...). The effectiveness of these biocatalysts is, nevertheless, limited by multiple factors related to their structural and functional characteristics, but also to the complex nature of the lignocellulosic biomass (rich in lignified secondary cell walls).

In order to identify the key parameters for an effective bioconversion of hemicelluloses, the major components of lignocelluloses, we have focused our study on the endoxylanase (Tx-Xyl) of *Thermobacillus xylanilyticus*, a family 11 glycoside-hydrolase (GH11).

The effectiveness of hemicellulases within the lignified cell walls is strongly dependent on the structural diversity and organisational complexity of the cell wall networks. In order to specify lignocellulose structural limiting factors and to get more knowledge regarding the impact of the cell wall network organization on the enzyme action of at supramolecular level, we have studied, in a biomimetic approach, the action pattern of Tx-Xyl on different substrates displaying increasing complexity (isolated heteroxylans, *in vitro* reconstituted copolymer assemblies...).

The use of nano-composites of heteroxylans - lignins (DHPs) synthesized *in vitro* according to two polymerization methods ("Zulaufverfahren", ZL and "Zutropfverfahren", ZT) has enabled us to reveal different organizations, morphologies and physicochemical characteristics of the polysaccharides - lignins associations and to underline the negative effect of lignins (DHPs) on heteroxylan hydrolysis by the xylanase (Tx-Xyl). This effect would be irrespective to the nature of heteroxylans - lignins associations (covalent or not). Nevertheless, the complex supramolecular organization of the covalent complexes (LCC) would severely hamper the enzyme's access to carbohydrates. Otherwise, lignins would interfere directly with the action of the enzyme through nonspecific or not productive interactions. A direct correlation has been, indeed, established between the increase in the lignin content of the nano-composites and the decrease of the enzyme activity. In addition, the study of the interactions of Tx-Xyl with various hydroxycinamic acids (*p*-coumaric, ferulic, caffeic acids...) has revealed a non-competitive inhibition of the enzyme by these phenolic compounds.

In addition to substrate parameters, understanding the structural properties of the enzymes determining their action *in situ* on lignocelluloses is essential. As a member of GH11endoxylanase family, Tx-Xyl is a non modular enzyme comprising only a catalytic module (20 kDa) and no Carbohydrate Binding Module (CBM). Using protein engineering, we have developed a strategy which aims at modifying the Tx-Xyl architecture and/or specificity by grafting, through "*linker*" sequences, different protein modules: the CBM1 of the cellulase Cel7A from *Trichoderma reesei* binding specifically crystalline cellulose and the GFP (Green Fluoerescent Protein). The chimeric fusion proteins Tx-Xyl-CBM1 and Tx-Xyl-GFP obtained have been less effective on soluble xylans (low K_{cat}) than Tx-Xyl. However, their efficiency on lignocellulosic substrates (such as wheat by products; straw and bran) was different. Indeed,

Xyl. However, their efficiency on lignocellulosic substrates (such as wheat by products; straw and bran) was different. Indeed, modestly enhanced hydrolysis rates were obtained in the case of Tx-Xyl-CBM1, suggesting that the CBM1 may potentiate *in situ* action of the enzyme, contrary to Tx-Xyl-GFP whose size would be a factor limiting its diffusion/action within the cell wall network. **Key words:** lignocelluloses, xylanases, lignins (DHPs), heteroxylans, phenolic acids, accessibility, inhibition, CBM, GFP.