

UNIVERSITE DE PROVENCE AIX-MARSEILLE

THESE

Pour l'obtention du titre de

Docteur de l'université Aix-Marseille

Spécialité : Microbiologie moléculaire et Biotechnologie
Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé

Présentée par

Mathieu BEY

**Etude d'une CDH et de glycosyl hydrolases de la famille 61:
Implication dans les processus de dégradation des lignocelluloses**

Directeur de thèse : Jean-Claude Sigoillot

Soutenue le 12 Décembre 2012

Jury

M. Pedro MALDONADO-COUTINHO
Professeur, Polytech'Marseille

M. Tim DUMONCEAUX
Directeur de recherche, CNRC, Saskatoon, Canada

Rapporteur

M. Bernard KUREK
Directeur de recherche, INRA, Reims

Rapporteur

M. Nicolas LOPES-FERREIRA
Ingénieur de recherche, IFPEN, Reuil-Malmaison

M. Jean-Guy BERRIN
Chargé de recherche, INRA, Marseille

M. Jean-Claude SIGOILLOT
Professeur, Polytech'Marseille

Liste des publications

Articles :

Bey M, Berrin JG, Poidevin L, Sigoillot JC : **Heterologous expression of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase in *Pichia pastoris* and implication in saccharification processes.** (2012) *Microbial cell factories* **10**:113

Bey M, Zhou S, Poidevin L, Henrissat B, Coutinho PM, Berrin JG, Sigoillot JC: **Comparison of two lytic polysaccharide monooxygenases (GH61) from *Podospora anserina* reveals differences upon cello-oligosaccharides oxidation.** (2012) *Applied and environmental microbiology*. Sous presse

Brevet:

Bey M, Berrin JG, Sigoillot JC: **Compositions comprising cellobiose dehydrogenase and their use for the degradation of lignocellulosic biomass** (2011) INRA / Projet Futurol.

Ouvrage:

Sigoillot JC, Berrin JG, Bey M, Lesage-Meessen L, Levasseur A, Lomascolo A, Record E, Uzan-Boukhris E : **Chapter: Fungal Strategies for Lignin Degradation.** In Lise Jouanin, Catherine Lapierre, editors: *Lignins*, 61, ABR, UK: Academic Press, 2012, pp. 263-308

Communications:

Bey M: **Production of pre-treatments enzymes for Bioethanol**
(2010) XIII^{ème} congress de l'école doctorale des sciences et de la vie, Marseille, France.

Bey M, Zhou S, Poidevin L, Berrin JG, Sigoillot JC: **Cellobiose dehydrogenase and GH61 as enhancers for the degradation of cellulose by the formation of oxidized compounds**
(2012) Oxizyme, Marseille, France.

Bey M, Zhou S, Poidevin L, Berrin JG, Sigoillot JC: **Cellobiose dehydrogenase and GH61 as enhancers for the degradation of cellulose by the formation of oxidized compounds**
(2012) Lignobiotech symposium II, Fukuoka, Japon.

Table des Matières

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	12
I. MATIERES PREMIERES CELLULOLYTIQUES	13
I.1. La paroi végétale	13
I.2. Les principaux constituants de la paroi végétale	15
I.2.1. La cellulose	15
I.2.2. Les hémicelluloses	17
I.2.3. La lignine	18
I.2.4. Les pectines.....	19
II-LES MICROORGANISMES LIGNOCELLULOLYTIQUES.....	20
II.1. Les champignons de la pourriture molle.....	21
II.1.1 Un exemple d'ascomycète: <i>Podospora anserina</i>	21
II.2. Les champignons de la pourriture brune	21
II.3. Les champignons de la pourriture blanche	22
II.3.1. Un exemple de basidiomycète: <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	22
III. LES ENZYMES LIGNOCELLULOLYTIQUES	24
III.1. Les cellulases	24
III.1.1 Les endoglucanases	24
III.1.2. Les exoglucanases	25
III.1.3. Les β -glucosidases (BGLs)	27
III.1.4. Synergie.....	28
III.2. Les hémicellulases	28
III.3. Les modules de fixation à la cellulose : les CBMs.....	30
III.4. Classification.....	31
III.5. Les ligninases	31
III.5.1. Les laccases	32
III.5.2. Peroxydases fongiques	33
III.5.2.1 Lignine peroxydase	33
III.5.2.2 Manganèse peroxydase	33
III.5.2.3 Versatile peroxydase	34
III.6. Enzymes auxiliaires et mécanismes de dégradation non-enzymatique de la lignocellulose	34
III.6.1 Enzymes auxiliaires.....	34
III.6.2. Mécanismes de dégradations non-enzymatiques	34

III.7. La cellobiose déshydrogénase.....	37
III.8. Les glycosyl hydrolases de la famille 61 ou polysaccharide monooxygénase à cuivre (PMO)	40
IV. BIOETHANOL : CONTEXTE, ENJEUX ECONOMIQUE ET VOIES D'OPTIMISATION.....	44
IV.1. Matières premières pour la production de bioéthanol	45
IV.1.1. Bioéthanol de première génération	45
IV.1.2. Bioéthanol de seconde génération.....	46
IV.2. Les technologies employées pour le prétraitement	47
IV.2.1. Prétraitements à la vapeur et à l'acide.....	48
IV.2.2. Prétraitements en condition alcaline	48
IV.2.3. Prétraitements extractifs.....	49
IV.3. Les enzymes utilisées lors des processus d'hydrolyse	49
IV.4. Les facteurs influençant l'hydrolyse enzymatique.....	49
IV.4.1. Hydrolyse à haute teneur en matière sèche	50
IV.4.2. Optimisation des compositions enzymatiques	51
IV.4.3. Adsorption enzymatique	51
IV.5. La fermentescibilité.....	52
IV.5.1. Les microorganismes	52
IV.5.2. Les systèmes de fermentation pour le bioéthanol	53
IV.6. Distillation	54
IV.6.1. La méthode anhydre.....	54
IV.6.2. Formulation des carburants alcoolisés	54
IV.7. Bioéthanol: marché global, aspects économiques.	54
IV.7.1. Production mondiale de Bioéthanol	54
IV.7.2. Aspects économiques	55
IV.7.3. Balance énergétique de la production de bioéthanol	55
IV.7.4. Aspects environnementaux	57
IV.7.5. Prochainement.....	57
IV.7.5.1 Développement de carburants E20 aux niveaux français et européen.....	57
V.7.5.2 Favoriser le développement des filières superéthanol E85	57
OBJECTIFS.....	59
MATERIEL & METHODE	60
I. Micro-organismes.....	61
II. Milieu et condition de culture.....	61
II.1. <i>Pycnopus cinnabarinus</i> en condition cellulolytique.....	61
II.2. <i>Podospora anserina</i>	61

II.3. <i>Pichia pastoris</i>	62
II.4. <i>Escherichia coli</i>	62
III. Isolation de l'ARNm et clonage de l'ADNc : <i>cdh</i> de <i>P. cinnabarinus</i>	62
III. 1. Construction du vecteur d'expression pPiCzaA- <i>cdh</i>	63
IV. Isolation d'ARNm et clonage de l'ADNc : <i>gh61</i> de <i>P. anserina</i>	64
IV.1. Construction des vecteurs d'expressions pPiCzaA- <i>Pagh61A</i> , pPiCzaA- <i>Pagh61B</i>	66
V. Transformation et sélection	66
VI. Production en fioles agitées de recombinants chez <i>P. pastoris</i>	67
VII. Production en bioréacteur de souches recombinantes de <i>P. pastoris</i>	67
VIII. Purification	68
VIII.1. Ultrafiltration	68
VIII.2. Colonne nickel	68
VIII.3. Tamisage moléculaire	68
IX. SDS-PAGE, Western-blot et zymogramme	69
IX.1. Zymogramme	69
IX.1.1. Sans traitement thermique.....	69
IX.1.2. Avec traitement thermique.....	70
IX.2. Western-blot	70
X. Détermination de la concentration en protéine	71
XI. Construction de modèles basés sur des structures cristallines connues.....	71
XII. Alignement des séquences PMO et GH61.....	72
XIII. Etude de fixation de la CDH à la cellulose	72
XIV. Activités enzymatiques	73
XV. Effet du pH et de la température sur l'activité et la stabilité de CDH	74
XVI. Cinétiques enzymatiques	74
XVII. Tests de réduction du Fe ³⁺ en Fe ²⁺	75
XVIII. Mesure de la production de radicaux hydroxyles.....	75
XIX. Mesure de la viscosité	75
XX. Tests de clivage de la lignocellulose	76
XX.1. Supplémentation des cocktails GC220 et N188 avec la CDH recombinante de <i>P. cinnabarinus</i> (rCDH)	76
XX.2. Hydrolyse de xylane de bouleau	76
XX.3. Clivage de paille micronisée par association CDH/GH61B	77
XX.4. Clivage de la cellulose (PASC) par l'association de CDH et GH61.....	77
XXI. Dosage des mono- et oligosaccharides	77

XXII. Spectrométrie de masse.....	78
Résultats	80
Partie I	81
Expression hétérologue de la CDH de <i>P. cinnabarinus</i> chez <i>P. pastoris</i> : implication dans les procédés de saccharification	81
I. Introduction.....	82
II. Production de CDH par <i>P. cinnabarinus</i> ss3 en condition cellulolytique et analyse du sécrétome.....	83
II.1. Production de CDH en condition cellulolytique	83
II.2. Analyse du sécrétome de <i>P. cinnabarinus</i> en condition cellulolytique.....	83
II.2.1. Activité identifiée dans le sécrétome.....	83
II.2.2. Zymogramme	84
III. Expression hétérologue de la CDH de <i>P. cinnabarinus</i> ss3 chez <i>P. pastoris</i>	86
IV. Construction de modèles structuraux.....	87
V. Caractérisation de la CDH recombinante (rCDH)	89
VI. Application de la CDH aux procédés de saccharification	92
VII. Oxydation des hémicelluloses et production d'acide xylonique : action de la CDH.....	97
VIII. IMPLICATION DE LA CDH DANS LA REACTION DE FENTON ...	100
VIII.1 Réduction du fer par la CDH.....	100
Discussion de la première partie des résultats	103
Partie II	109
Synergie GH61 / CDH : action comparée de deux GH61 de <i>Podospora</i> <i>anserina</i>	109
I. Introduction.....	110
II. Phylogénie des GH61s.....	111
III-Introduction aux travaux réalisés au cours de la thèse	114
IV. Expression hétérologue des GH61A et GH61B de <i>P. anserina</i> chez <i>P.</i> <i>pastoris</i>	114
V. Zymogramme-CMC: révélation de l'activité oxydative des GH61 et de la CDH.....	115

VI. Etude des modèles structuraux de <i>Pa</i> GH61A et <i>Pa</i> GH61B.....	116
VII. Synergie GH61/CDH.....	118
VII.1. Essais sur paille micronisée	118
VII.2. Essais sur PASC (Phosphoric Acid Swollen Cellulose).....	120
Discussion des résultats de la partie II	126
Conclusion générale & Perspectives	131
Références	137

Liste des figures

Figure 01. Schéma des différentes parties composant la paroi végétale	10
Figure 02. La paroi végétale.....	11
Figure 03. Structure des chaînes de cellulose	13
Figure 04. Représentation schématique du xylane.....	14
Figure 05. Exemple de structure d'une lignine.....	16
Figure 06. Structure de la pectine.....	17
Figure 07. <i>P. cinnabarinus</i> et <i>P. anserina</i>	20
Figure 08. Structure d'une endoglucanase et d'une cellobiohydrolase de <i>T. reesei</i>	22
Figure 09. Représentation de Cel7A de <i>T. reesei</i> sur la cellulose.....	24
Figure 10. Mécanisme proposé pour l'amorphogénèse/ dépolymérisation de la cellulose par les cellulases.....	24
Figure 11. Régiospécificité des hémicellulases.....	26
Figure 12. Représentation schématique de l'amorphogénèse des fibres de cellulose par le CBM.....	28
Figure 13. Schéma du mécanisme proposé pour la dégradation du bois par l'ascomycète <i>Serpula lacrymans</i>	35
Figure 14. Structure tridimensionnelle de la cellobiose déshydrogénase de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	36
Figure 15. Réaction catalysée par la cellobiose déshydrogénase.....	37
Figure 16. Structure secondaire de Cel61B.....	39
Figure 17. Structure de la CBP 21 et d'une GH61A.....	40
Figure 18. Site actif de la GH61A.....	41
Figure 19. Réaction des PMO et mécanismes proposés.....	41
Figure 20. Structure et séquence en acide aminé des PMO-2 et -3 de <i>N. crassa</i>	42
Figure 21. Procédé de bioéthanol de seconde génération	44
Figure 22. Schéma d'un réacteur de liquéfaction à cinq chambres.....	49
Figure 23. Schéma des facteurs limitant apparaissant lors des procédés d'hydrolyse de la cellulose.....	50
Figure 24. Production de bioéthanol dans le monde en 2009	55
Figure 25: Cartes des vecteurs utilisés pour les expressions hétérologues	63
Figure 26, Technique de clonage par le système In Fusion®.....	64
Figure 27. <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> en condition cellulolytique	82
Figure 28 : SDS-PAGE et zymogrammes réalisés sur le surnageant de <i>P. cinnabarinus</i>	84
Figure 29. Production de rCDH en bioréacteur de 2L	86
Figure 30. Représentation structurale des parties flaviniques et hémiques de la CDH de <i>P. cinnabarinus</i>	87
Figure 31. Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la CDH recombinante..	88
Figure 32. Isotherme de fixation à la cellulose de la rCDH.....	89
Figure 33. Température et pH optimal de la CDH recombinante, stabilité à la température...	90
Figure 34. Essais de saccharification	94
Figure 35. Essais de saccharification : analyse au DNS	96
Figure 36. Schéma présentant la formation d'acide gluconique par l'action de la CDH.....	96
Figure 37. Hydrolyse de xylane et formation d'acide xylonique	98
Figure 38. Formation d'acide xylonique	98
Figure 39. Réduction du fer par la CDH	100
Figure 40. Mesure de la production de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton	100
Figure 41. Mesure de la viscosité apparente	101
Figure 42. Arbre phylogénétique des glycosides hydrolases de familles 61 de <i>P. anserina</i> ..	111

Figure 43. Alignement de séquence en acide aminé GH61 et PMO. <i>N. crassa</i>	113
Figure 44. Analyse SDS-PAGE et zymogrammes des <i>PaGH61</i>	114
Figure 45. Représentation structurale des GH61A et GH61B de <i>P. anserina</i>	115
Figure 46. Représentation des rendements en sucres des essais de saccharification sur paille micronisée avec addition de CDH et GH61	117
Figure 47. Spectres HPAEC des Produits générés après l'action combinée des <i>PaGH61</i> avec la CDH sur un substrat PASC	119
Figure 48. Spectre MALDI-TOF/TOF	122
Figure 49. Schéma représentant la formation de composés oxydés sous l'action des GH61 et de la CDH.....	123
Figure 50. Schéma représentant la voie oxydative de dégradation de la cellulose par le couple CDH/GH61.....	133

Liste des tables

Table 01. Teneurs en cellulose, hémicellulose et lignine avec leurs écarts-types de diverses biomasses lignocellulosiques	12
Table 02. Liste des principaux prétraitements et leurs effets sur la lignocellulose.....	46
Table 03. Balances énergétiques pour la production de bioéthanol	55
Table 04. Récapitulatif des amorces utilisées pour amplifier les gènes codant pour la CDH et les GH61 A, B	61
Table 05. Activités des enzymes lignocellulolytiques mesurées dans le sécrétome de <i>P. cinnabarinus</i> en condition cellulolytique	83
Table 06. Constantes cinétiques apparentes de la CDH recombinante	91

INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE

I. MATIERES PREMIERES CELLULOLYTIQUES

I.1. La paroi végétale

La paroi cellulaire entourant les cellules végétales est produite en surface de leur membrane plasmique formant ainsi une matrice extracellulaire. La plupart du temps, cette paroi cellulaire est localisée loin du protoplaste et régie un grand nombre de fonctions telles que la liaison des cellules végétales aux tissus, la transmissions de signaux impliqués dans la croissance ou encore la protection physique. La paroi cellulaire végétale a longtemps été considérée comme une boîte inerte rigide. Elle est depuis reconnue comme une structure dynamique jouant un rôle important dans le contrôle de la différenciation cellulaire au cours de l'embryogenèse et de la croissance. Les différentes couches composant la paroi varient d'une épaisseur de 0,1 à 10 μm et sont principalement composées de polysaccharides (cellulose, hémicellulose et pectine) ainsi que d'un hétéropolymère aromatique, la lignine. L'association de ces deux parties est désignée sous le terme de lignocellulose (Somerville 2004; Carpita & Gibeau, 1993).

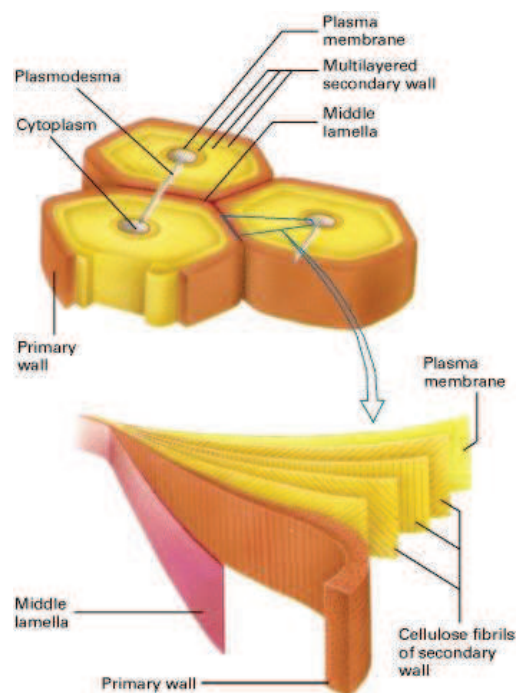


Figure 01. Schéma des différentes parties composant la paroi végétale. D'après Lodish *et al.*, 2000.

La paroi primaire des cellules végétales est une paroi mince et semi-rigide (0,05-1 μm d'épaisseur). Elle est constituée de cellulose, dont les chaînes (microfibrilles) établissent une structure cristalline au sein d'une matrice amorphe hydratée composée d'hémicelluloses, de pectines et de composés phénoliques. On y trouve également des protéines (glycoprotéines et enzymes) ainsi que des ions associés à l'eau et à la cellulose (Carpita et Gibeau 1993;

McNeil *et al.*, 1984; Carpita, 1996). La paroi secondaire se forme lorsque la phase d'expansion cellulaire ralentit, elle se caractérise par un dépôt important de cellulose et d'hémicellulose. Cette paroi, généralement plus épaisse, comprend trois sous-couches qui diffèrent suivant l'orientation des microfibrilles : S1 (externe), S2 (médiane) et S3 (interne) (Figure 01; Figure 02 a, b) (Jarvis et McCann, 2000). Son épaisseur varie de 0,1 à plusieurs μm dans certains tissus de soutien.

A un stade de maturation avancé, la lignine commence à se déposer au niveau de la lamelle moyenne, de la paroi primaire et de la paroi secondaire. Cette dynamique de formation des parois génère des gradients de composition dans les strates pariétales. Ainsi, la lamelle moyenne et la paroi primaire possèdent des concentrations en lignine supérieures à la paroi secondaire. Les cellules adjacentes sont reliées entre elles par une structure rigide nommée lamelle mitoyenne (0,2 à 5 μm d'épaisseur). Elle est essentiellement composée de lignine (60%). Cette dernière assure un maintien des cellules et constitue une couche imperméable sur la paroi végétale.

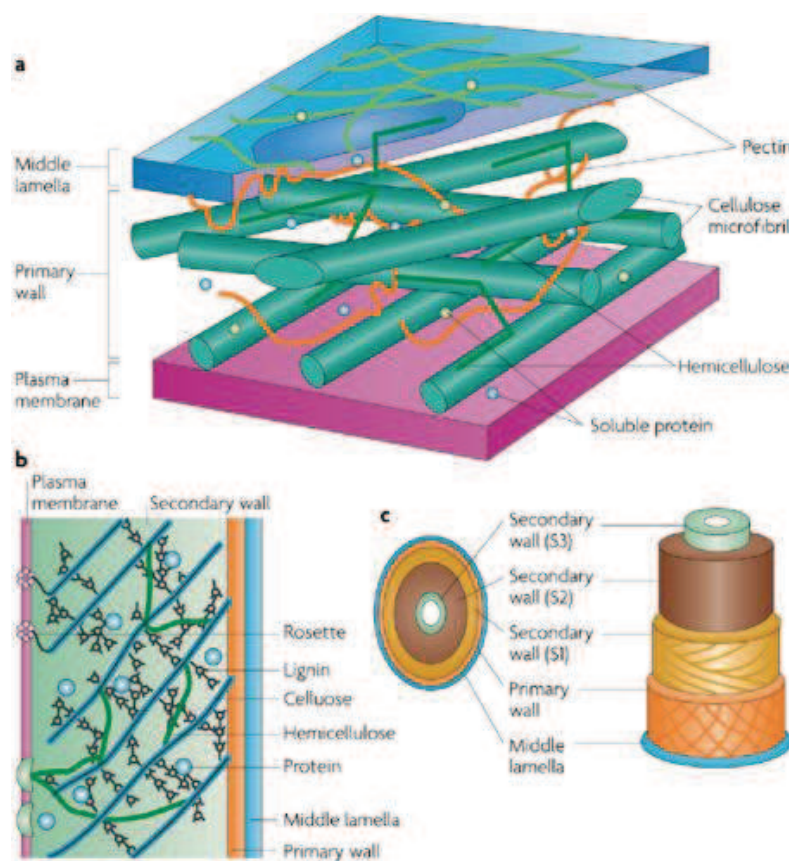


Figure 02. La paroi végétale. (a) Paroi contenant les microfibrilles de cellulose, de l'hémicellulose, de la pectine, de la lignine et des protéines insolubles. La partie b montre les complexes enzymatiques (en forme de rosette) responsables de la synthèse de la cellulose, situés au niveau de la membrane plasmique. (c) La synthèse de lignine apparaît dans les couches S1, S2 et S3 de la paroi cellulaire. D'après Sticklen, 2008.

Au sein de cet ensemble complexe, la proportion de chaque constituant diffère selon les espèces végétales (Table 01).

Biomasse lignocellulosique	Cellulose (kg.100 kg ⁻¹ MS)	Hémicelluloses (kg.100 kg ⁻¹ MS)	Lignine (kg.100 kg ⁻¹ MS)
Bagasse de canne à sucre (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	40,1 ± 6,7	26,3 ± 6,3	17,9 ± 6,8
Maïs fibre (<i>Zea mays</i> L.)	38,0 ± 3,8	27,4 ± 1,2	7,3 ± 1,6
Miscanthus (<i>Miscanthus</i> sp.)	44,0 ± 4,8	25,4 ± 2,2	20,4 ± 4,8
Paille d'avoine (<i>Avena sativa</i> L.)	35,5 ± 4,6	24,3 ± 6,5	13,7 ± 4,0
Paille de blé (<i>Triticum aestivum</i> L.)	37,3 ± 5,1	29,8 ± 7,7	16,9 ± 4,7
Paille de maïs grain (<i>Zea mays</i> L.)	37,3 ± 5,1	25,4 ± 4,3	15,8 ± 3,6
Paille d'orge (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	40,4 ± 7,8	25,6 ± 5,1	12,7 ± 3,6
Paille de riz (<i>Oryza sativa</i> L.)	35,3 ± 4,5	26,7 ± 4,9	9,8 ± 5,5
Paille de seigle (<i>Secale cereale</i> L.)	37,0 ± 3,0	28,9 ± 1,0	12,7 ± 9,6
Sorgho fibre (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench)	42,3 ± 2,6	26,2 ± 0,6	8,0 ± 0,4
Chanvre (<i>Cannabis sativa</i> L.)	60,3 ± 6,2	16,8 ± 3,9	6,8 ± 3,4
Hêtre (<i>Fagus sylvatica</i> L.)	45,4 ± 1,9	27,9 ± 6,8	23,1 ± 1,3
Peuplier (<i>Populus</i> sp.)	42,0 ± 2,9	22,0 ± 6,2	24,8 ± 3,8
Saule (<i>Salix</i> sp.)	46,5 ± 13,5	18,5 ± 6,4	20,0 ± 1,4
Epicea (<i>Picea</i> sp.)	44,3 ± 4,2	26,1 ± 3,7	28,4 ± 0,7

Table 01. Teneurs en cellulose, hémicellulose et lignine avec leurs écarts-types de diverses biomasses lignocellulosiques déterminées par la méthode de Van Soest. D'après Godin *et al.*, 2010.

I.2. Les principaux constituants de la paroi végétale

I.2.1. La cellulose

La cellulose possède une architecture complexe à plusieurs niveaux (Ioelovich et Larina, 1999). Ce polymère naturel est constitué de faisceaux de fibrilles super fines possédant des

diamètres à l'échelle du nanomètre. Chaque fibrille est majoritairement composée de zones cristallines et, dans une moindre proportion de domaines désorganisés (mésomorphe et amorphe). Une chaîne de cellulose individuelle passe par une succession de domaines cristallins et désordonnés (Ioelevich, 2008). Les proportions entre ces deux types de structure définissent l'indice de cristallinité.

La chaîne de cellulose est un polysaccharide linéaire stéréo-régulier formé d'une répétition d'unités D-glucopyrannoses ((C₆H₁₀O₅)_n) reliées par des liaisons de type β-1,4-glycoside (Figure 03) (Klemm *et al.*, 2002). Le degré de polymérisation (DP) des chaînes de cellulose provenant de différentes origines varie de 1000 à 30 000 résidus glucose, ce qui correspond à une longueur de chaîne de 500 à 15 000 nm. Ces chaînes sont orientées et possèdent une extrémité dite réductrice, le groupement hydroxyle en position C₁ (carbone anomérique) étant libre. L'autre extrémité est dite non réductrice et le groupement hydroxyle en C₄ est engagé dans une liaison O-glycosidique. Des liaisons hydrogènes intramoléculaires permettent de stabiliser ces chaînes. La présence de liaisons de type intermoléculaires au sein des microfibrilles leur confèrent diverses propriétés physiques, dont la possibilité de former un réseau cristallin comportant des régions plus désorganisées.

Les fibres de cellulose sont entourées par les fibres d'hémicelluloses qui sont liées de façon covalente à la lignine formant la matrice de la paroi végétale (Figure 2b).

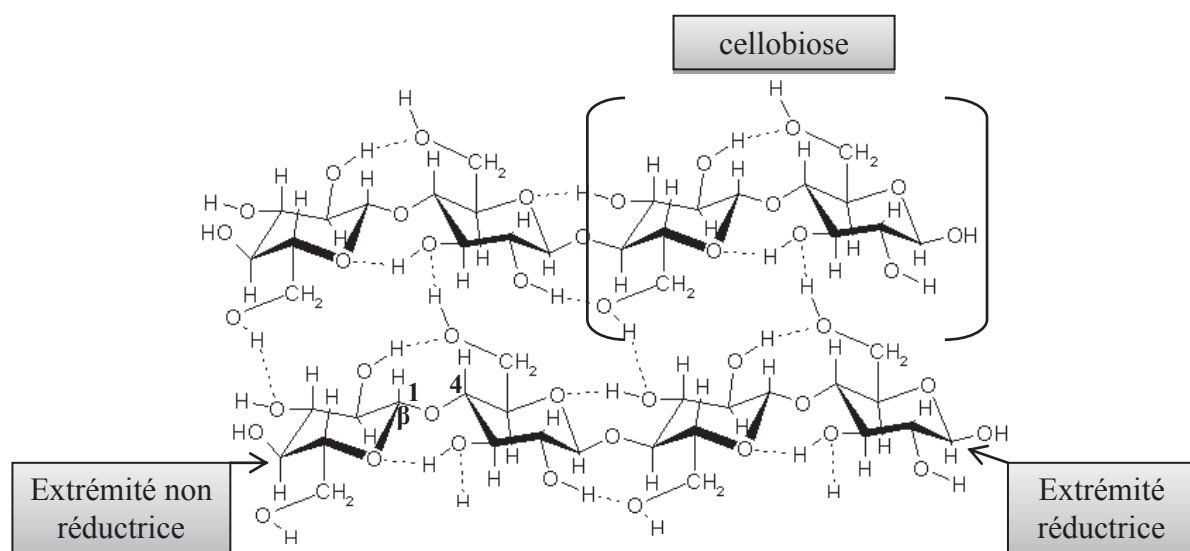


Figure 03. Structure des chaînes de cellulose

I.2.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses contrastent avec la cellulose par leurs hétérogénéités. En effet, ces hétéropolysaccharides sont composés de différents oses. On distingue ainsi des hexoses (glucose, galactose, mannose) et des pentoses (arabinose, xylose), souvent ramifiés, et dont les sucres peuvent être acétylés ou méthylés. Les hémicelluloses constituent une matrice étroitement liée, de façon non covalente, aux fibrilles de cellulose (Girio *et al.* 2010).

Le squelette principal de l'hémicellulose est généralement constitué d'un ou deux sucres qui permettent de classer ces hémicelluloses en différentes catégories. Les hémicelluloses majoritaires sont essentiellement représentées par le xylane (Figure 04). Le squelette principal du xylane est composé d'une chaîne de xyloses liés en β -1,4 ou en β -1,3 et pouvant être ramifiés avec des résidus galactose et arabinose en 1,2 ou 1,3. Des liaisons esters entre les résidus d'acide 4-*O*-méthyl- α -D-glucuronique et les groupements hydroxyles de la lignine peuvent se former. On trouve également des résidus aromatiques, comme l'acide férulique ou l'acide *p*-coumarique, liés en *O*-5 du résidu terminal de l'arabinose. Ces composés aromatiques assurent la cohésion et la rigidité de l'hémicellulose grâce notamment aux ponts diféruliques qui permettent des liaisons avec des chaînes de lignines ou des chaînes de xylane (Scheller et Ulvskov, 2010).

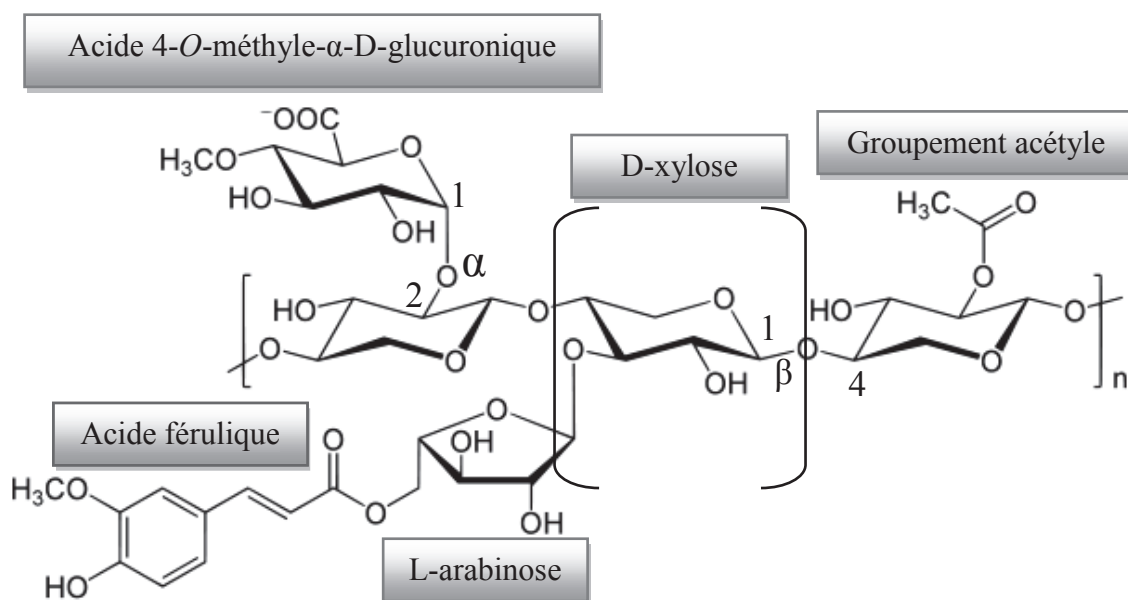


Figure 04. Représentation schématique du xylane.

Les xylanes de céréales contiennent de grandes quantités de L-arabinose et sont appelés arabinoxylanes (Dervilly-Pinel *et al.*, 2004) tandis que les xylanes de bois durs ou

angiospermes ont une forte proportion d'acide galacturonique et sont appelés galacturonoxylanes.

Les xylanes de gymnospermes ou bois tendres sont constitués majoritairement de galactomannane et de galactoglucomannane, qui forment ainsi un groupe structural important des hémicelluloses. Les galactomannanes, abondants chez les légumineuses, possèdent un squelette de résidus D-mannose reliés par des liaisons β -1,6. Dans le cas du galactoglucomannane des liaisons identiques au galactomannane sont mises en jeu, additionnées de liaisons β -1,4 au sein de la chaîne principale. D'autres types d'hémicelluloses existent comme par exemple l'arabinogalactane et les lichenines (mélange de β -D glucanes liés en 1,3-1,4).

I.2.3. La lignine

La lignine est essentiellement présente dans la paroi secondaire des cellules végétales, lui conférant sa rigidité, un pouvoir d'imperméabilisation et une résistance aux attaques microbienne ainsi qu'au stress oxydatif. La lignine est un hétéropolymère amorphe, non soluble dans l'eau. Elle est essentiellement constituée d'unités hydroxyphénylpropanes reliées entre elles par la copolymérisation oxydative de trois dérivés alcooliques du phénylpropane : l'alcool *p*-coumarylique (alcool 4-hydroxycinnamique), l'alcool coniférylique (alcool 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique) et l'alcool sinapylique (alcool 4-hydroxy-3,5-diméthoxycinnamique). Ces précurseurs sont à l'origine des unités *p*-hydroxyphényle (H), guaïacyle (G) et syringyle (S) (Figure 05). Cette synthèse est réalisée par la génération de radicaux libres produits par un système incluant des enzymes oxydatives telles que les peroxydases (Boerjan *et al.*, 2003).

La quantité de chaque unité varie en fonction de la lignée végétale, l'espèce, l'organe et le tissu. La lignine de résineux est constituée à plus de 90% d'unités guaïacyle (G), chez les feuillus, la lignine est constituée d'une combinaison entre les unités guaïacyle (G) et syringyle (S). Les unités *p*-hydroxyphényle (H) ne sont présentes qu'en faible proportion (Figure 05). De nombreux types de liaisons intermonomériques interviennent dans la formation de la lignine. La résultante de cette polymérisation est une structure hétérogène dont les unités sont reliées principalement par des liaisons éther (C-O-C) mais également des liaisons carbone-carbone (C-C). Les liaisons éther (β -O-4 et α -O-4) sont dites labiles ou non condensées alors que les liaisons carbone-carbone et diaryl-éther (5-5, β -5, β -1, β - β et 4-O-5) sont dites condensées. La liaison β -O-4 est la plus fréquente dans les lignines naturelle (45-65%) (Vanholme *et al.*, 2010).

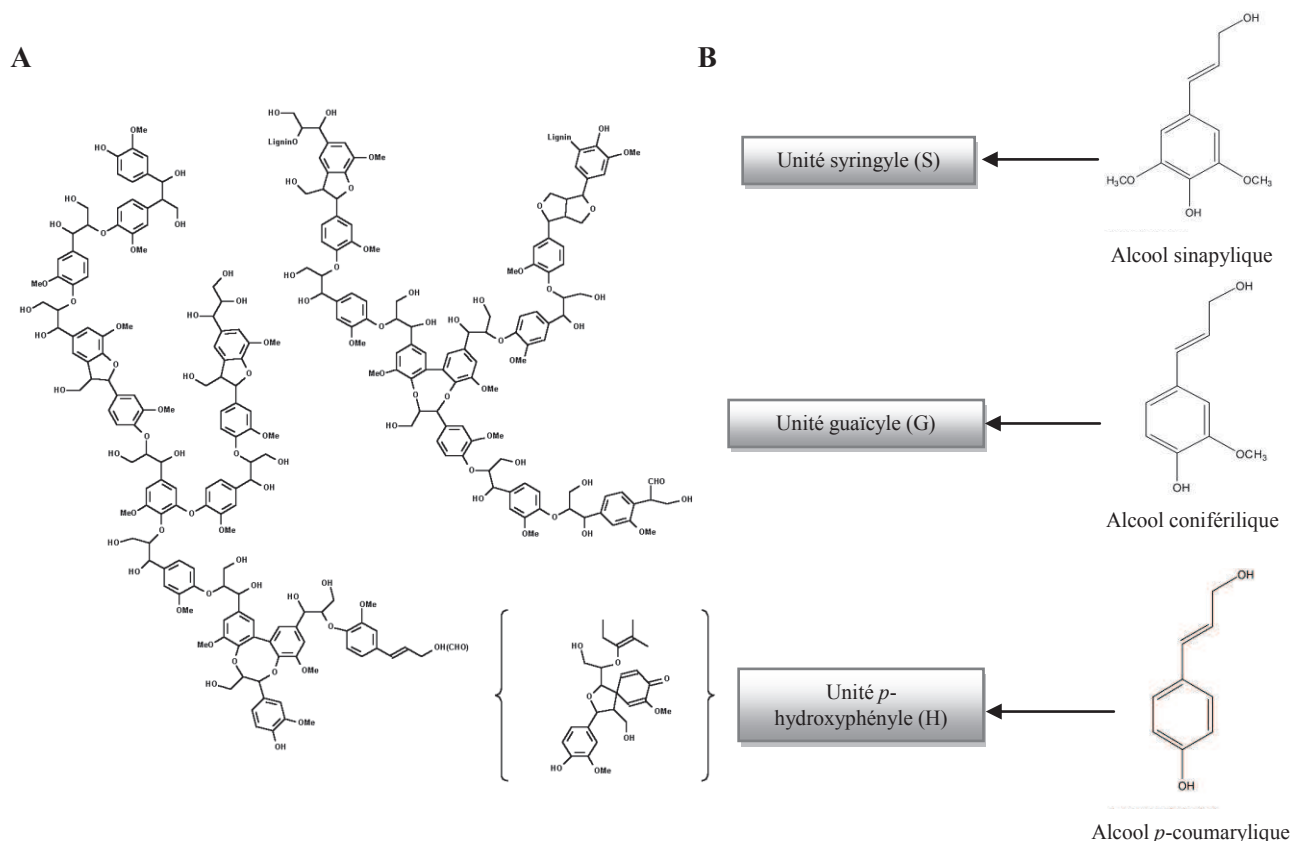


Figure 05. Composition structurale de la lignine. A. Exemple de lignine. Les lignines sont des macromolécules hyper-ramifiées. B. Les trois alcools composant les lignines : l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférique et l'alcool sinapylique.

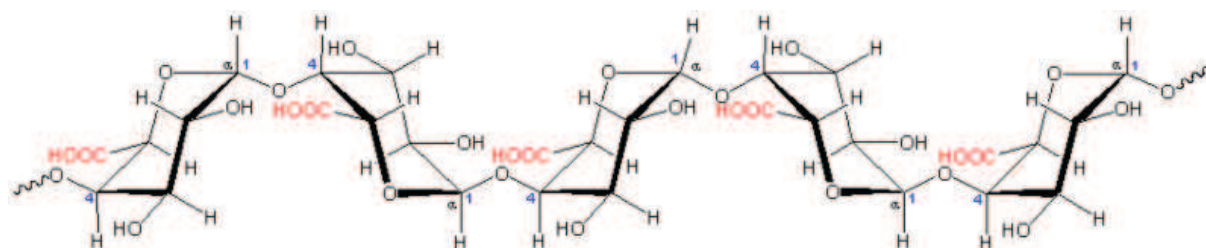
I.2.4. Les pectines

Le rôle des pectines en tant que constituants de la paroi végétale tient à la capacité d'association de ces chaînes capables de former un gel semi-rigide. Cette association se produit par l'intermédiaire d'ions calcium et permet aux pectines de jouer un rôle de maintien dans la structure de la paroi végétale. Les pectines sont présentes en grande quantité dans les fruits (pépins et zestes tout particulièrement) (Ridley *et al.*, 2001; Mohnen, 2008).

La pectine est un hétéropolymère composé majoritairement par de l'acide galacturonique. Au sein de ce polymère, on distingue plusieurs types de régions (Figure 06 B). Des régions composées d'homogalacturonanes (polymère linéaire α -1,4 d'acides D-galacturoniques) pouvant être acétylées en *O*-2 ou *O*-3 ou méthylés en *O*-6, cette région compose la partie 'lisse' de la pectine (Figure 06 A). Les régions composées de rhamnogalacturonane (RG I et RG II) représentent les zones substituées. Le RG I est construit sur une alternance d'acides galacturoniques reliés en α -1,2 et α -1,4 à des résidus L-rhamnose où à des chaînes d'arabinanes (α -1,5) et galactanes (β -1,4). Le RG II est composée d'une chaîne d'acide galacturonique substituée par des chaînes latérales de divers oligosaccharides. La région

xylogalacturonane est constituée d'homogalacturonanes pouvant être méthylés et substitués par des xyloses (Harholt *et al.*, 2010).

A



B

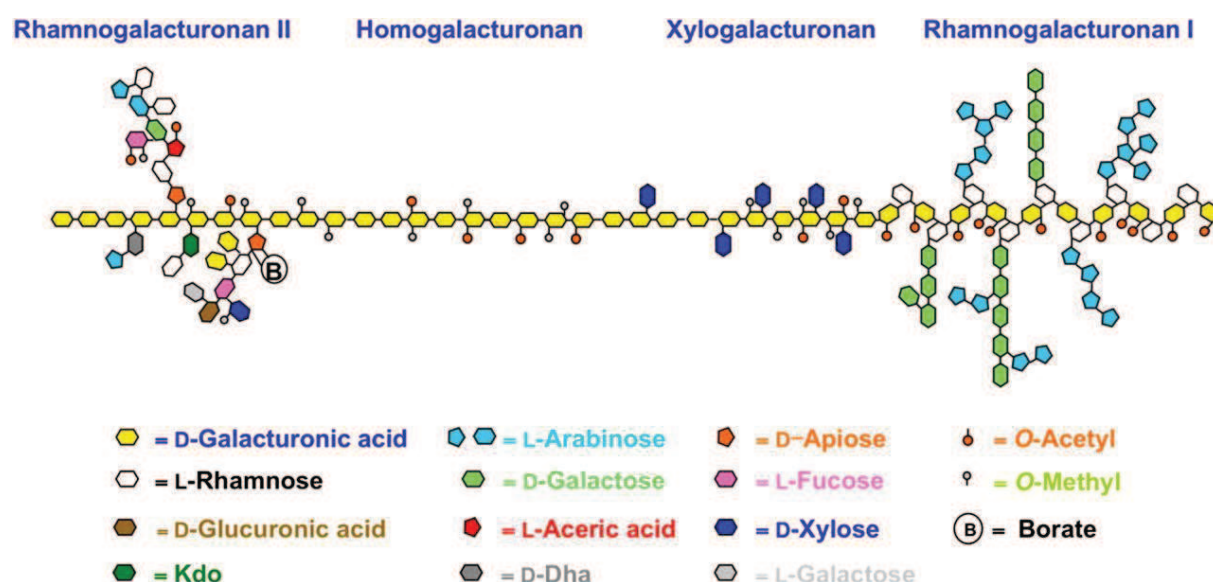


Figure 06. Structure de la pectine. (A) Représentation d'une chaîne d'acide polygalacturonique reliée en α -1,4 pouvant être acétylée en O-2 et O-3 ou méthylée en O-6 ($\text{COOH} \rightarrow \text{COOCH}_3$). (B) Représentation schématique des différents types de régions formant la pectine. D'après Harholt *et al.*, 2010.

II-LES MICROORGANISMES LIGNOCELLULOLYTIQUES

De nombreux microorganismes (bactéries et champignons filamenteux) ont la capacité de dégrader les divers composants de la lignocellulose. La dégradation des parois cellulaires lignifiées réalisée par les bactéries (*Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*) est plutôt limitée en comparaison à la dégradation causée par les champignons (Eriksson *et al.*, 1990). Il est à noter que la dégradation de la lignine par les bactéries pourrait être due à une synergie entre les bactéries et les champignons lignolytiques (Blanchette et Shaw, 1978).

Tous les champignons ne possèdent pas la capacité de dégrader le bois. Les champignons participant à la pourriture du bois sont des ascomycètes et des basidiomycètes, généralement regroupés selon des critères liés aux caractéristiques de la dégradation et de l'aspect du bois. Ainsi, on distingue les champignons de la pourriture molle, de la pourriture brune et de la pourriture blanche.

II.1. Les champignons de la pourriture molle

Ces derniers sont formés par un grand nombre d'Ascomycètes et de Deuteromycètes parmi lesquels, on peut citer : *Chaetomium* ou *Thielavia* (Martinez *et al.*, 2005; Nilsson et Daniel, 1989). Les champignons de la pourriture molle sont capables de dégrader les polysaccharides présents dans le bois mais très faiblement la lignine. Cette action limitée résulte en une consistance molle du bois lorsque celui-ci se trouve dans un environnement humide (le cas le plus fréquent) (Martinez *et al.*, 2005). Dans un environnement sec, le bois devient brun et craquant (Eriksson *et al.*, 1990).

II.1.1 Un exemple d'ascomycète: *Podospora anserina*

P. anserina est un ascomycète se développant exclusivement sur des excréments d'herbivore (Figure 07 B). Il apparaît dans les étapes tardives de la dégradation de ces excréments, après le passage de plusieurs autres espèces fongiques. Ceci s'explique par l'utilisation de sucres complexes (celluloses et hémicellulose) par les ascomycètes. Ces derniers suivent l'action des zygomycètes saprophytes métabolisant les sucres simples. Les basidiomycètes viennent en derniers du fait de leur capacité à dégrader la lignine en vue d'atteindre la cellulose inaccessible aux autres champignons.

Le séquençage du génome de *P. anserina* (Espagne *et al.*, 2008) et son analyse ont permis l'entrée de nouvelles séquences dans la base de données CAZy. Ces dernières ont révélé une machinerie (hémi) cellulolytique importante classant *P. anserina* parmi les trois grands CAZomes fongiques possédant les plus grands nombres de gènes codant pour des protéines dégradant les polysaccharides. De plus, *P. anserina* détient le plus grand nombre de CBM 1 parmi les génomes fongiques séquencés à ce jour.

II.2. Les champignons de la pourriture brune

Ces champignons représentent environ 10% des dégradeurs du bois et attaquent spécifiquement les zones molles. On peut les retrouver dans les écosystèmes de conifère. Ils sont principalement constitués de Basidiomycètes (*Fomitopsis*, *Gleophyllum*, *Postia*, *Serpula*)

(Ryvarden, 1991), cependant quelques ascomycètes font partie de ce groupe (*Aspergillus*, *Fusarium*) (Sanchez, 2009).

Les champignons de la pourriture brune attaquent préférentiellement la cellulose et les hémicelluloses, laissant rapidement place à un bois à un stade avancé de décomposition formé de résidus bruns, craquants et constitué de lignines modifiées. Ils ne possèdent pas d'enzyme de type phénoloxydase et ne dégradent pas la lignine.

II.3. Les champignons de la pourriture blanche

Ce sont les organismes de dégradation du bois les plus fréquemment rencontrés. Ils ont la capacité de dégrader et de minéraliser tous les composants majeurs (cellulose, hémicelluloses et lignine) (Christman et Oglesby, 1971).

L'impact des champignons de la pourriture blanche sur le bois se traduit par une dégradation efficace de la lignine, conférant une apparence blanchie au bois. Des procédés de 'biopulping' se basent notamment sur cette capacité à blanchir. L'action de la pourriture blanche se caractérise par un bois mou, humide et spongieux (Martinez *et al.*, 2005). Ce groupe comprend de nombreux champignons, principalement des Basidiomycètes appartenant aux ordres des Polyporales et des Agaricales (*Lentinus*, *Coriolus*, *Phlebia*, *Pycnoporus*) mais aussi quelques Ascomycètes (*Xylaria*). Les champignons de la pourriture blanche dit 'sélectifs' se caractérisent par la dégradation préférentielle de la lignine et des hémicelluloses (Eriksson *et al.*, 1990; Liese, 1970). La décomposition des lignines est due à l'action d'enzymes modificatrice de la lignine, des métalloenzymes extracellulaires de type oxydoréductases (peroxydases contenant un hème et des laccases), l'intervention de métabolites (acides phénoliques, composés aromatiques, petits peptides, acides organiques, ions métalliques et espèces réactives de l'oxygène) est également impliqué directement ou indirectement (Kundell *et al.*, 2010).

II.3.1. Un exemple de basidiomycète: *Pycnoporus cinnabarinus*

Pycnoporus cinnabarinus est un basidiomycète appartenant à l'ordre des polyporales du genre *Trametes*, son chapeau est reconnaissable par sa couleur rouge-orangé due à la présence d'un pigment, la cinnabarine (Figure 07 A). Ce champignon pathogène des plantes est connu pour dégrader efficacement le bois et son utilisation dans la décoloration des effluents contenant des dérivés aromatiques a depuis longtemps fait ses preuves. Le système enzymatique de *P. cinnabarinus* a fait l'objet d'études portant sur les mécanismes de dégradation de la lignine supportés par la laccase. En effet, ce dernier ne produit pas de manganèse peroxydase et de

lignine peroxydase, ce qui en fait un modèle pour la compréhension de systèmes ligninolytiques basés sur l'utilisation de laccase et de médiateurs naturels d'oxydoréduction. Ce potentiel a été exploité dans les procédés de biopulping et de bioblanchiment (Herpoël *et al.*, 2002) ainsi que dans la bioremédiation des sols (Rama *et al.*, 1998). La laccase de *P. cinnabarinus* est également connue pour promouvoir la synthèse de biopolymères (Figuerola-Espinoza et Rouau, 1998). L'optimisation de la production de laccase par *P. cinnabarinus* a été réalisée par addition de substrats phénoliques (acide férulique), de 2,5-xylidine, d'alcool véricatrylique ou encore de lignosulfonates (Eggert *et al.*, 1996; Herpoel *et al.*, 2000). En raison de la toxicité de certains de ces composés, l'utilisation d'éthanol comme inducteur de l'expression laccase chez *P. cinnabarinus* a été privilégiée. Ainsi, une souche monocaryotique nommée ss3 a été isolée pour son potentiel à surproduire de la laccase et s'est révélée particulièrement sensible à l'induction par l'éthanol (Lomascolo *et al.*, 2003; Herpoel *et al.*, 2000).

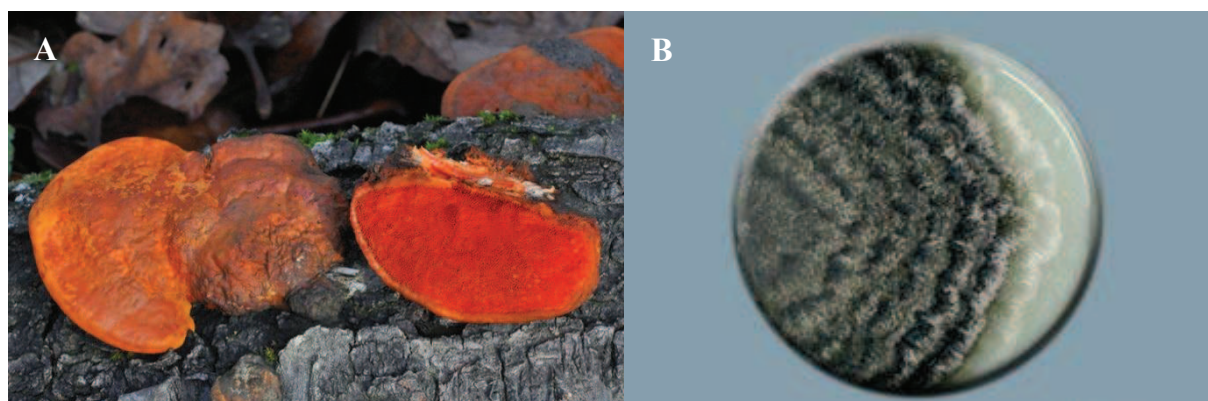


Figure 07. *P. cinnabarinus* et *P. anserina*. Photographies du basidiomycète *Pycnoporus cinnabarinus* (A) et du thalle de *Podospora anserina* (B).

III. LES ENZYMES LIGNOCELLULOLYTIQUES

La dégradation des polymères constituant la paroi végétale fait intervenir de nombreuses catégories d'enzymes. Les principales catégories intervenant dans la dégradation de la lignocellulose seront présentées dans les paragraphes suivants. Ainsi, les cellulases et hémicellulases seront abordées et nous nous attarderons sur les oxydoréductases fongiques intervenant notamment dans la dégradation de la lignine.

III.1. Les cellulases

La dégradation de la cellulose réalisée par les champignons filamenteux fait intervenir un pool d'enzymes possédant différentes spécificités et fonctionnant en synergie. Les cellulases peuvent être divisées en trois types d'activités enzymatiques intervenant dans l'hydrolyse totale de la cellulose (Beguin, 1990).

III.1.1 Les endoglucanases

Les endoglucanases ou endo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.4) hydrolysent aléatoirement les liaisons *O*-glycosidiques des chaînes de cellulose, préférentiellement au niveau de zones amorphes, permettant la génération d'extrémités réductrices et non réductrices. Cette action favorise l'accessibilité aux cellobiohydrolases.

Ces enzymes possèdent un CBM (Cellulose Binding Module) ainsi qu'un domaine catalytique. Ces deux parties sont reliés par une chaîne peptidique (linker) (Ting *et al.*, 2009). Le domaine catalytique est en forme de "crevasse" ce qui lui permet d'attaquer les chaînes de cellulose en divers endroits et pas uniquement au niveau des extrémités (Figure 08 A). L'action des endoglucanases permet la libération d'oligomères solubles, majoritairement du cellobiose bien que des traces de glucose et cellotriose aient été détectées pour certaines endoglucanases. Les endoglucanases génèrent une réduction du degré de polymérisation en s'attaquant de façon aléatoire aux chaînes de cellulose, préférentiellement au niveau de zone amorphe (Karlsson *et al.*, 2002).

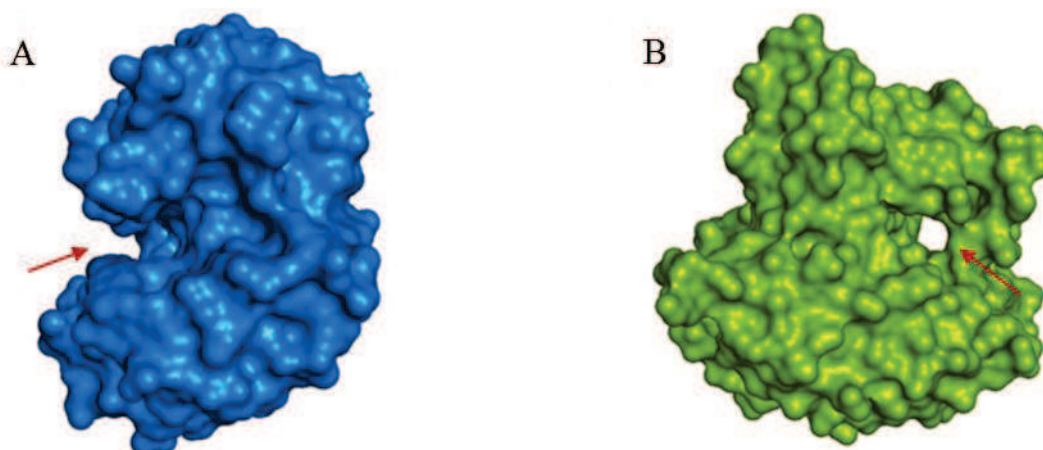


Figure 08. Structure d'une endoglucanase et d'une cellobiohydrolase de *T. reesei*. (A) Représentation structurale de l'endoglucanase 3 de famille 12 de *Trichoderma reesei* (A : Cel12A ; PDB id : 1H8V) avec un domaine catalytique formant une 'crevasse'. (B) La représentation de la cellobiohydrolase 2 (B : CBH2 ; PDB id : 1CB2) de *T. reesei* met en évidence la formation d'un 'tunnel' lui conférant une action processive. Source: A: Sandgren *et al.*, 2001. B : Koivula *et al.*, 1996. Les représentations ont été retravaillées sur Pymol.

Les endoglucanases sont inhibées par les produits de leurs actions. Macarron *et al.* ont prouvé que l'hydrolyse des substrats chromophores utilisés pour mesurer l'activité endoglucanase (tel que le pNPG) n'était pas altérée par la présence de 200 mM de glucose alors que 50 mM de cellobiose pouvait entraîner une diminution allant jusqu'à 50 % de la vitesse d'hydrolyse, cette diminution étant dépendante du substrat hydrolysé (Macaron *et al.*, 1993).

III.1.2. Les exoglucanases

Les exoglucanases ou cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) sont la plupart du temps des enzymes processives agissant à partir des extrémités réductrices ou non réductrices des chaînes de cellulose. Leur action engendre la libération de cellobiose.

A l'instar des endoglucanases, les cellobiohydrolases possèdent une organisation en domaines fonctionnels composés d'un site catalytique et d'un domaine appelé 'Cellulose Binding Module' (CBM). Le domaine catalytique des cellobiohydrolases forme un 'tunnel' (Teeri *et al.*, 1998, Teeri *et al.*, 1997) (Figure 08 B). Cette organisation modulaire, avec la présence d'un linker peptidique reliant le domaine catalytique et le CBM, confère aux enzymes la possibilité d'agir de manière processive (Figure 09).

D'après Beckham *et al.*, 2011, le mode d'action de l'hydrolyse de la cellulose par la CBH I de *T. reesei* (cellobiohydrolase de famille 7 ; Cel7A) se ferait en plusieurs étapes:

- (1) adsorption des cellobiohydrolases en surface de la cellulose par l'intermédiaire du CBD.
- (2) glissement à la surface de la cellulose et reconnaissance d'une chaîne réductrice libre.
- (3) introduction de la chaîne dans le 'tunnel'.
- (4) formation d'un complexe actif (liaison glycosidique-domaine catalytique).
- (5) hydrolyse de la liaison glycosidique puis formation du cellobiose.
- (6) expulsion du cellobiose et réinitialisation du complexe actif.

Les cellobiohydrolases libèrent majoritairement du cellobiose durant leur action. Cependant, quelques traces de glucose et de cellotriose ont été retrouvées durant l'hydrolyse de la cellulose par CBHI. CBHI entraînerait la libération d'une molécule de glucose, cellobiose ou cellotriose avant d'être processive et de libérer notamment le cellobiose (Medve *et al.*, 1998)

Les principaux inhibiteurs de l'action des cellobiohydrolases sont les produits de la réaction soit une inhibition par le cellobiose. Certaines expérimentations ont montré que le glucose pouvait être inhibiteur de l'action des cellobiohydrolases mais dans une moindre proportion (Holtzapple *et al.*, 1990 ; Holtzapple *et al.*, 1984 ; Xiao *et al.*, 2004).

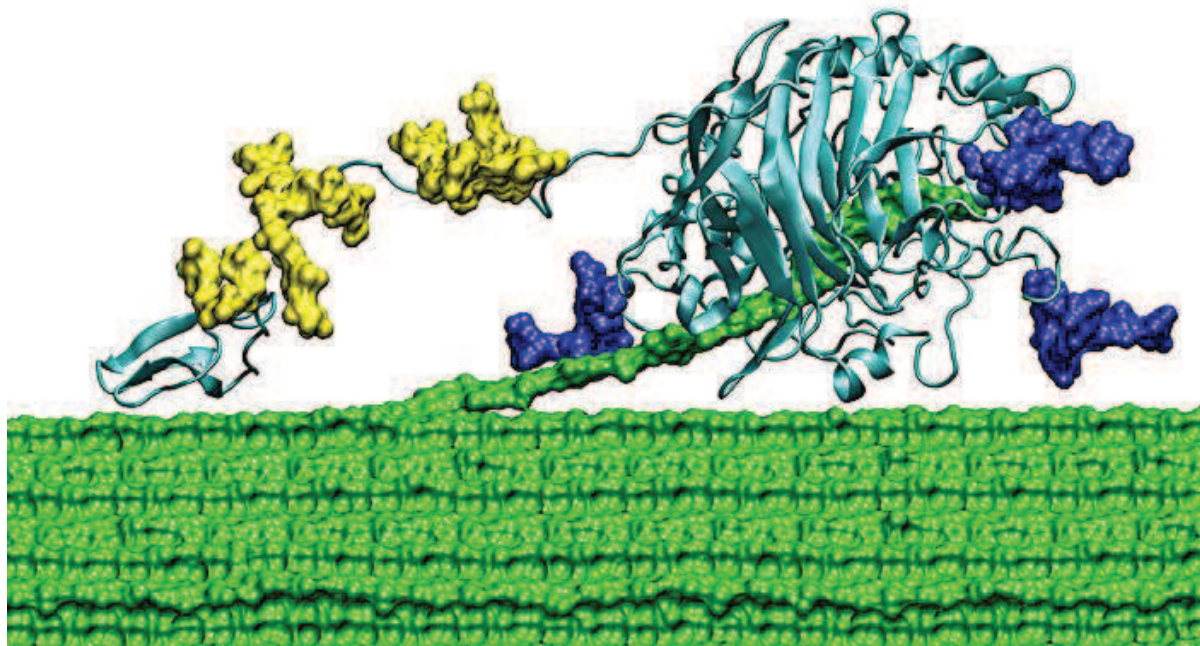


Figure 09. Représentation de Cel7A de *T. reesei* sur la cellulose. L'enzyme est représentée en bleu clair, l'O-glycosylation sur le linker est en jaune, et le N-glycane sur le domaine catalytique est en bleu. La cellulose est en vert, avec une chaîne de cellodextrine entrant dans le tunnel du domaine catalytique. D'après Beckham *et al.*, 2010.

III.1.3. Les β -glucosidases (BGLs)

Les β -glucosidases (EC 3.2.1.21) réalisent l'hydrolyse du cellobiose et des cellodextrines en glucose (Tien et Kirk, 1988) (Figure 10). Elles jouent un rôle essentiel en réduisant l'inhibition des cellobiohydrolases et des endoglucanases par le cellobiose. La β -glucosidase est inhibée par le produit de sa réaction, le glucose. L'inhibition de l'enzyme par le cellobiose a été observée pour des concentrations élevées (Calsavara *et al.*, 1999 ; Bravo *et al.*, 2000).

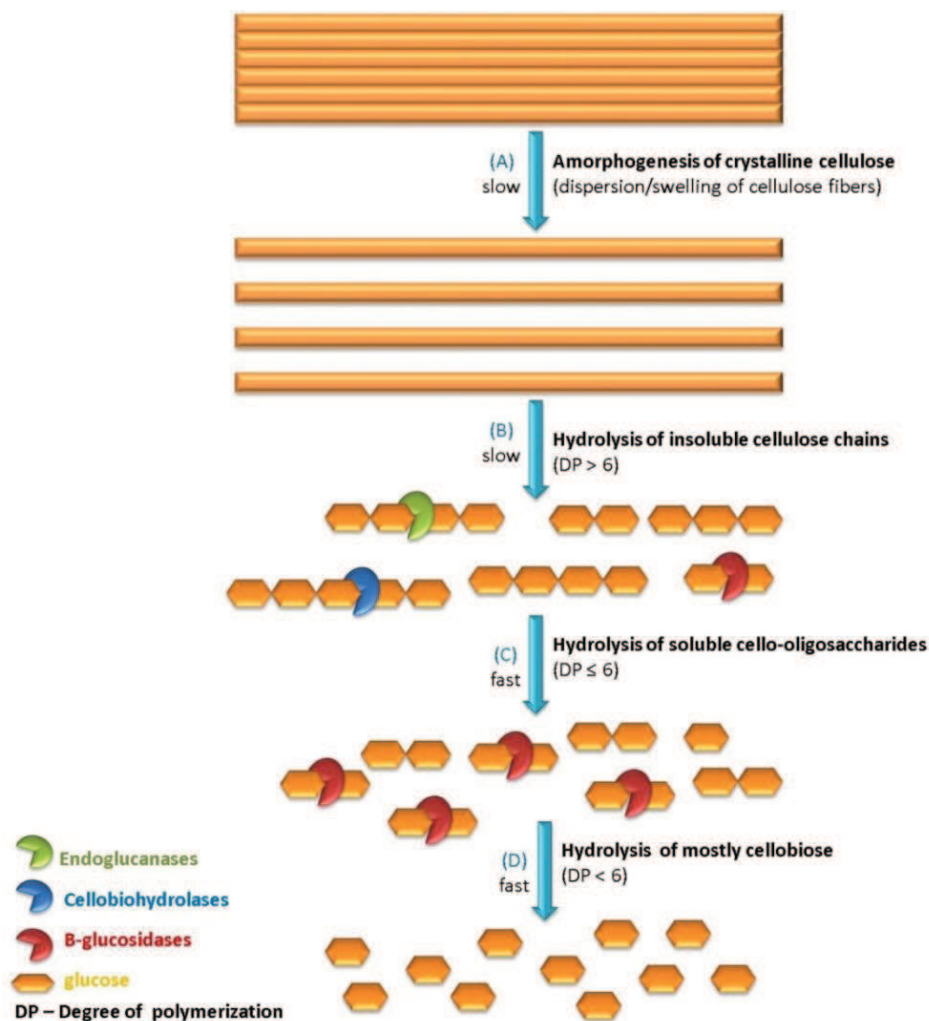


Figure 10. Mécanisme proposé pour l'amorphogénèse/ dépolymérisation de la cellulose par les cellulases. D'après Arantes *et al.*, 2010.

III.1.4. Synergie

La synergie entre les différents types de cellulase décrites précédemment se produit lorsque l'action combinée de deux ou plusieurs enzymes conduit à une activité supérieure à la somme des activités des enzymes séparées.

Il existerait deux types de synergie : i) La synergie cellobiohydrolases-endoglucanases appelée synergie Exo-Endo permet la libération de chaîne de cellulose par les endoglucanases facilitant ainsi le travail des cellobiohydrolases (Medve *et al.*, 1998, Nidetzky *et al.*, 1994). La synergie entre deux cellobiohydrolases appelée synergie Exo-Exo (exemple chez *T. reesei* avec CBHI et CBHII), le mécanisme de cette synergie n'est pas encore clairement défini ii) La synergie entre cellulases dépend du ratio et de la concentration en enzymes (Woodward *et al.*, 1988) ainsi que de la nature du substrat (Hoshino *et al.*, 1997).

III.2. Les hémicellulases

L'hétérogénéité des hémicelluloses implique une grande variété d'enzymes possédant diverses spécificités de substrats. Parmi les hémicellulases, on distingue les xylanases, les xylosidases, les arabinofuranosidases, les estérases, les mannanases ou encore les mannosidases (Girio *et al.*, 2010).

Les xylanases appartiennent à un groupe d'enzyme responsable de l'hydrolyse du xylane. Les principales enzymes impliquées dans ce phénomène sont l'endo-1, 4- β -xylanase (EC 3.2.1.8) et la β -xylosidase (EC 3.2.1.37), toutes deux agissant sur la chaîne principale. La première clive les liaisons glycosidiques du xylane entraînant une réduction du degré de polymérisation du substrat. Les principaux produits d'hydrolyse formés sont les oligomères de β -D-xylopyranosyl transformés par la suite en mono-, di- et trisaccharides (Polizeli *et al.*, 2005). La β -xylosidase hydrolyse les petits xylo-oligosaccharides et le xylobiose libérant des résidus β -D-xylopyranosyl à partir des extrémités non réductrices (Polizeli *et al.*, 2005) (Figure 11B). L'action de certaines enzymes accessoires favorise la dégradation du xylane en clivant les chaînes latérales. (Gray *et al.*, 2006; Polizeli *et al.*, 2005; Ryabova *et al.*, 2009). Ainsi, l' α -D-glucuronidase (EC 3.2.1.139) hydrolyse les liaisons α -1,2 entre l'acide glucuronique et les unités β -D-xylopyranosyle composant la chaîne principale du glucuronoxylane. L' α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) a pour rôle de cliver les liaisons reliant les résidus L-arabinose en position 2 et 3 du β -xylopyranosyle. L'acétylxylane estérase (EC 3.1.1.72) permet de décrocher les groupes O-acétyle des positions 2 et/ou 3 du β -xylopyranosyle de l'acétylexylane (Chavez *et al.*, 2006; Polizeli *et al.*, 2005). Les estérases agissant sur l'acide férulique et l'acide p-coumarique (EC 3.1.1.73) hydrolysent les liaisons

ester du xylane libérant les acides phénoliques liés aux résidus arabinofuranoside (Shallom et Shoham 2003 Chavez *et al.*, 2006; Christov et Prior, 1993; Topakas *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 1998) (Figure 11A).

Les enzymes précédemment citées sont produites par les champignons, les bactéries, les levures et les algues mais également par les insectes, les graines, etc. (Sunna et Antranikian, 1997). La sécrétion de ces enzymes dans le milieu extérieur et les hauts taux de production font des champignons filamenteux des producteurs de xylanases particulièrement intéressants pour le domaine industriel (Kulkarni *et al.*, 1999b).

De même que pour le xylane, le mannane est clivé par des mannanases (EC 3.2.1.78). Cette hydrolyse est suivie par l'action de mannosidases libérant à leur tour des mannoooligosaccharides et du mannose.

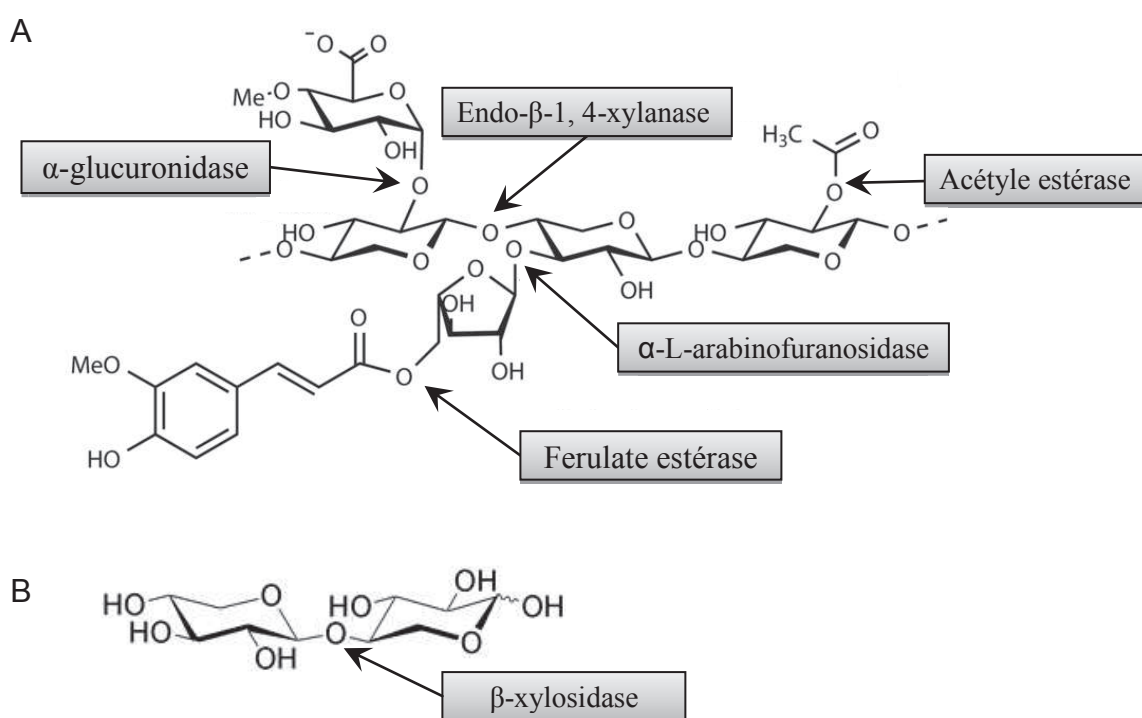


Figure 11. Régiospécificité des hémicellulases. Dégradation enzymatique du xylane (A) et du xylobiose (B).

Les galactoglucomannanes sont composés de D-mannose. Deux classes d'enzymes permettent d'hydrolyser ce substrat en sucres simples : l'endo-1,4- β -mannanases (EC 3.2.1.78) et la β -mannosidases agissant en exo (EC 3.2.1.25). Certaines enzymes, telles que la β -glucosidase (EC 3.2.1.21), l' α -galactosidase (EC 3.2.1.22) et l'acétyle mannane esterase sont requises afin d'éliminer les chaînes latérales reliées au mannane (Dhawan et Kaur, 2007; Wyman, 2003).

Les bactéries, levures et champignons sont connus pour dégrader le mannane (Puchart *et al.*, 2004; Talbot et Sygusch, 1990).

III.3. Les modules de fixation à la cellulose : les CBMs

Les différentes structures composant la lignocellulose rendent difficile l'accessibilité des enzymes aux substrats. Des enzymes telles que les cellulases, les xylanases ou encore certaines feruloyl estérases possèdent des structures constituées de modules reliés par un 'linker'. Ces modules non-catalytiques de taille variable ont la capacité de se fixer à une large gamme de polysaccharides (Hashimoto *et al.*, 2006). Outre l'accessibilité accrue des enzymes aux substrats, les modules tels que les 'Carbohydrate Binding Module' (CBM) ont la particularité d'augmenter l'hydrolyse enzymatique. D'autres rôles concernant l'action des CBMs ont été envisagés comme la participation à la déstructuration des fibres et le maintien de cette désorganisation (Guillén *et al.*, 2010) (Figure 12). En général, les CBMs jouent trois rôles par rapport au domaine catalytique auquel ils sont reliés: (i) l'effet de proximité favorisant la concentration des enzymes autour du substrat (rôle de concentration), (ii) une fonction de ciblage due à la spécificité des motifs CBM pour un substrat de prédilection, (iii) une fonction disruptive consistant en la déstructuration locale de la cellulose cristalline (plus spécifique des CBM liés à des cellulases) (Boraston *et al.*, 2004).

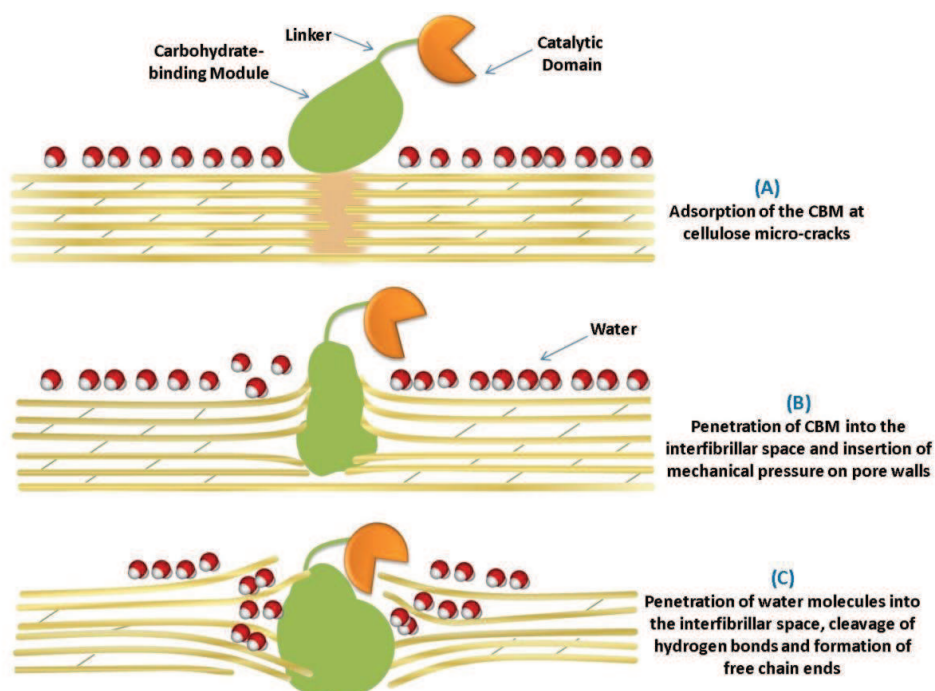


Figure 12. Représentation schématique de l'amorphogénèse des fibres de cellulose par le CBM de la cellobiohydrolase 1 (CBH I). D'après Arantes *et al.*, 2010.

III.4. Classification

L'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (IUBMB : International Union of Biochemistry and Molecular Biology) classe traditionnellement les enzymes en fonction des réactions qu'elles catalysent et de leurs substrats. Ce système de classification a toutefois rencontré des limites. Dans le cas de glycosides hydrolases (GH) plusieurs types d'activités peuvent être rencontrés pour une même enzyme et cette classification ne tient pas compte des informations structurales et de la capacité évolutive des protéines.

A la fin des années 80, Gaboriaud *et al.* ont développé une méthode permettant de comparer et d'analyser des séquences d'acides aminés par l'analyse de clusters hydrophobes. Ceci a permis de démontrer qu'il était possible de comparer les protéines sur la base de similarité de structures secondaires et ainsi mettre en évidence une homologie structurale entre protéines (Gaboriaud *et al.*, 1987).

Cette méthode d'analyse a permis de poser les fondements de la classification des enzymes actives sur des glucides CAZy (<http://www.cazy.org>) pour Carbohydrate Active Enzymes (Henrissat, 1991). La classification s'est ensuite imposée comme une référence pour les informations génomiques qu'elle apporte. Elle reflète les caractéristiques structurales des enzymes ainsi que leurs modes d'actions (Cantarel *et al.*, 2009). Les enzymes sont regroupées en quatre classes : les glycosyl hydrolases, les polysaccharides lyases, les glycosyl transférases et les carbohydrates estérases. Cette classification regroupe également les modules associés tel que les CBMs.

En partant du principe que la structure de l'enzyme (repliement) est plus stable du point de vue de l'évolution que sa séquence en acide aminé, les enzymes et les CBMs sont regroupés en clans ou superfamilles (au nombre de 14 pour les GHs). Deux membres d'un même clan partagent un même repliement et une machinerie catalytique similaire. (Henrissat et Bairoch, 1996).

III.5. Les ligninases

Bien que les unités composant la lignine soient des molécules relativement simples basées sur un squelette phénylpropane, la structure tridimensionnelle de cet hétéropolymère est très complexe et non répétée. Cet assemblage en fait un substrat réticent à la dégradation au vu de la diversité des liaisons entre les différentes unités. Seules les enzymes extracellulaires peuvent accéder à sa surface. La dégradation biologique se fait principalement par des mécanismes oxydatifs (Hammel et Cullen, 2008).

La dégradation de la lignine entraîne une accessibilité accrue à des substrats plus facilement hydrolysables (cellulose et hémicellulose), cependant peu d'organismes ont cette faculté. Parmi ces organismes, on trouve les champignons filamenteux et plus particulièrement les basidiomycètes de la pourriture blanche.

L'oxydation de la lignine implique des biocatalyseurs utilisant des accepteurs d'électrons comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le dioxygène O_2 . D'autres molécules, les médiateurs redox, sont oxydées pour, à leurs tours, oxyder les structures aromatiques composant la lignine.

Dans cette section, nous aborderons les principales activités enzymatiques connues : les phénol oxydases (laccase), les peroxydases à hème telles que la manganèse peroxydase (MnP), la lignine peroxydase (LiP) et la versatile peroxydase (VP). Dans un second temps, les enzymes auxiliaires et les mécanismes de dégradation non enzymatique de la lignocellulose seront traités.

III.5.1. Les laccases

Les laccases (EC 1.10.3.2) furent découvertes en 1883, dans le latex de l'arbre à laque *Rhus vernicefera* (Yoshida, 1883). Les laccases sont présentes chez les plantes supérieures, quelques espèces bactériennes et au sein de nombreux champignons filamenteux (Kurtz et Champe, 1982; Marbach *et al.*, 1983).

De nombreuses molécules aromatiques sont capables d'induire l'expression de laccases chez les champignons. Les laccases fongiques sont impliquées dans la synthèse de pigments comme les phenoxazinones (Thurston, 1994) ou l'acide cinnabarinique chez *P. cinnabarinus* (Eggert *et al.*, 1995). Elles sont également impliquées dans la fructification, la sporulation et la phytopathogénicité chez le champignon (Gianfreda *et al.*, 1999). Cependant, derrière ces nombreuses fonctions, elles jouent un rôle majeur dans la dépolymérisation de la lignine (Hattaka, 1994).

Les laccases sont des oxydases à cuivres (au moins quatre atomes de cuivres par enzyme) utilisant l'oxygène moléculaire pour oxyder des composés aromatiques et non aromatiques via des mécanismes radicalaires (Wong, 2008).

Les laccases catalysent l'oxydation d'un grand nombre de composés incluant les phénols substitués, les polyphénols et les amines aromatiques pour former des radicaux libres, pouvant permettre la formation de dimères, oligomères et polymères (Baldrian et Valaskova, 2008). Cependant, si la laccase ne peut directement oxyder les unités non phénoliques en raison de son faible potentiel redox, elle peut néanmoins utiliser des médiateurs d'oxydoréduction pour

réaliser ce type de réaction. Ces médiateurs dits ‘naturels’ sont probablement des phénols résultant de la dégradation de la lignine. L’utilisation industrielle des laccases a entraîné l’emploi de médiateurs ‘chimiques’ tels que l’ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ou le HBT (N-hydroxybenzotriazole).

III.5.2. Peroxydases fongiques

Les peroxydases sont des enzymes utilisant, dans la plupart des cas, le peroxyde d’hydrogène pour oxyder une multitude de composés organiques et inorganiques. Elles peuvent être divisées en trois superfamilles selon leurs structures et leurs propriétés catalytiques (Welinder, 1992). Les peroxydases fongiques impliquées dans la dégradation de la lignine font partie de la seconde sous-classe de la troisième superfamille des peroxidases (Hiraga *et al.*, 2001). Ces enzymes catalysent l’oxydation des lignines avec l’utilisation de H₂O₂ comme co-facteur (Hammel et Cullen, 2008). Depuis leur première identification chez *P. chrysosporium* (Kuwahara *et al.*, 1984), les peroxidase fongiques ont été détectées chez de nombreuses espèces fongiques comme *Pleurotus eryngii* (Martinez *et al.*, 1996), *C. subvermispora*, *T. versicolor* et *P. radiata* (Cullen et Kersten, 2004).

III.5.2.1 Lignine peroxydase

Découverte au milieu des années 1980, la lignine peroxydase (LiP) (EC 1.11.1.14) est considérée comme une vraie ligninase capable de catalyser directement l’oxydation de la lignine. Ces protéines sont des enzymes monomériques glycosylées contenant un protohème ferrique IX et sont H₂O₂-dépendantes. Les LiPs catalysent l’oxydation monoélectronique d’une large gamme de composés aromatiques via de multiples étapes. Ces réactions induisent la formation de radicaux cationiques générant, par la suite, des produits tels que le glycolate et l’oxalate. Le potentiel redox de la LiP (environ 1.2V à pH 3) permet à ces enzymes d’oxyder des substrats phénoliques, les transformant en radicaux phénoliques, créant ainsi des clivages au sein des chaînes, des déméthylations ou encore des réactions intramoléculaires (additions et réarrangements). Mais les LiPs peuvent également agir indirectement sur la lignine via des médiateurs d’oxydoréduction de faibles poids moléculaires (Fenn et Kirk, 1981; Kersten et Cullen, 2007; Harvey et Palmer, 1990; Chung et Aust, 1995).

III.5.2.2 Manganèse peroxydase

La manganèse peroxydase (MnP) (EC 1.11.1.13) fut identifiée chez *P. chrysosporium* à la même période que la LiP (Glenn *et al.*, 1983; Kuwahara *et al.*, 1984). Elle est décrite en tant que vraie ligninase, de par, son haut potentiel redox. Les MnPs sont des enzymes

monomériques glycosylées contenant un protohème ferrique IX et sont H₂O₂-dépendantes. Le cycle catalytique est similaire à celui des LiPs, à l'exception de l'utilisation du Mn(II) comme seul substrat réducteur (Glenn et Gold 1985 ; Paszczynski *et al.*, 1986). La réaction est dépendante du peroxyde d'hydrogène permettant l'oxydation de la MnP. L'enzyme, une fois oxydée, retrouve son état natif en oxydant à son tour le manganèse (Mn(II)) présent dans le milieu. La présence de certains acides organiques tels que le fumarate, l'oxalate ou le malate permet de stabiliser le Mn (III) (Martinez *et al.*, 2005). Ce dernier a la capacité de diffuser au travers de la structure de la lignocellulose et d'oxyder de nombreux phénols monomériques. Cependant le potentiel redox du système Mn(II)-Mn(III) étant faible, les composés oxydés sont des structures phénoliques de lignine, une oxydation des composés non phénoliques étant difficilement réalisable par ce moyen.

III.5.2.3 Versatile peroxydase

La versatile peroxydase (VP) (EC 1.11.1.16) fut identifiée plus tardivement, en 1996 (Martinez *et al.*, 1996). Cette hémoprotéine regroupe des caractéristiques liées à la MnP et à la LiP (Ruiz-Duenas *et al.*, 1999). En effet, un site de fixation du Mn(II) a été trouvé près de l'hème ainsi que des résidus tryptophanes impliqués dans les interactions de la LiP avec les substrats aromatiques (Camarero *et al.*, 1999; Mester et Field, 1998). L'oxydation de substrats non phénoliques est également possible en surface de l'enzyme via un transfert d'électron passant par les résidus tryptophanes. (Martinez *et al.*, 2005).

III.6. Enzymes auxiliaires et mécanismes de dégradation non-enzymatique de la lignocellulose

III.6.1 Enzymes auxiliaires

Les enzymes auxiliaires participant à la dégradation de la lignine sont pour la plupart des enzymes génératrices de peroxyde d'hydrogène, ce dernier jouant un rôle central dans l'action des peroxydases. Cette formation de peroxyde d'hydrogène est réalisée par l'action d'aryl alcool oxydase (AAO) (EC 1.1.3.7) ou encore de glyoxal oxydase (GLOX) (EC 1.2.3.5).

III.6.2. Mécanismes de dégradations non-enzymatiques

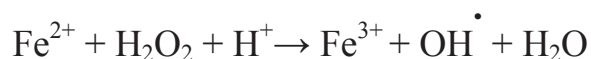
Les enzymes ligninolytiques ne sont pas suffisamment petites pour avoir accès à la paroi cellulaire en passant à travers les constituants de la lignine (Arantes et Milagres, 2009). En conséquence, une partie de la dégradation extracellulaire de la lignocellulose impliquant des mécanismes de dégradation non enzymatique est réalisée par l'intervention de composés de faible poids moléculaire (CFPM). Ces derniers joueraient un rôle clé dans le processus de

dégradation de la lignocellulose chez les champignons de la pourriture brune et blanche (Goodell *et al.*, 1997).

Une grande variété de CFPM ont été identifiés comme des agents de diffusion potentiel dans des mécanismes supportant l'attaque directe de polysaccharides et de lignine ou bien comme médiateurs des enzymes ligninolytiques lors d'attaques indirectes de lignine (Arantes et Milagres, 2009 ; Jellison *et al.*, 1991, Bourbonnais *et al.*, 1990 ; Tanaka *et al.*, 1999). La réaction de Fenton médiée par ces CFPM, impliquant la réduction du Fe^{3+} est la principale responsable de la génération de radicaux hydroxyles (Qian *et al.*, 2002; Enoki *et al.*, 1997 ; Wang et Gao, 2003).

Les radicaux hydroxyles agissent comme de puissants oxydants pouvant dépolymériser les polysaccharides via une abstraction d'hydrogène et également s'attaquer à la lignine par des phénomènes de déméthylation/déméthoxylation (Niemenmaa *et al.*, 2008 ; Filley *et al.*, 2002 ; Arantes *et al.*, 2011 ; Yelle *et al.*, 2001).

La dégradation de la lignocellulose par les champignons de la pourriture brune implique une attaque initiale non enzymatique des cellules composant la paroi du bois (Goodell *et al.*, 1997). Cette attaque est régie par la génération de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton :



Parmi les exigences principales à l'élaboration de la réaction de Fenton, il y a la nécessité d'avoir accès au peroxyde d'hydrogène ainsi qu'au fer piégé dans l'environnement proche.

En ce qui concerne le peroxyde d'hydrogène, celui-ci est généré métaboliquement par des oxydases telles que la glyoxal oxydase (Kersten et Kirk, 1987) ou encore l'aryl-alcool oxydase (Guillen *et al.*, 1990).

Il est désormais reconnu que l'oxalate, les composés type phénolate de faible poids moléculaires ainsi que des petits peptides ont la capacité de fixer et réduire le Fe^{3+} (Xu et Goodell, 2001 ; Varela et Tien, 2003 ; Schmidt *et al.*, 1981 ; Espejo et Agosin, 1991 ; Goodell *et al.*, 1997 ; Wang et Gao, 2003).

Le champignon de la pourriture brune *Gleophyllum trabeum* produit des hydroquinones ayant la capacité de réduire le Fe^{3+} pour donner du Fe^{2+} et des radicaux semiquinones (Kerem *et al.*, 1999 ; Paszczynski *et al.*, 1999 ; Jensen *et al.*, 2001). Les semiquinones peuvent, à leurs tours, réduire l'oxygène moléculaire et le Fe^{3+} formant ainsi des radicaux perhydroxyles ($^{\bullet}\text{OOH}$), du Fe^{2+} et des quinones. La formation de Fe^{2+} et de $^{\bullet}\text{OOH}$ initie la réaction d'oxydoréduction

durant laquelle Fe^{2+} réduira H_2O_2 en générant du peroxyde d'hydrogène (Halliwell et Gutteridge, 1999 ; Suzuki *et al.*, 2006 ; Baldrian et Valaskova, 2008).

Il a été postulé que les petits glycopeptides sécrétés par les champignons réduiraient l'oxygène moléculaire et le Fe^{3+} en peroxyde d'hydrogène et Fe^{2+} (Wang et Gao, 2003 ; Hammel *et al.*, 2002 ; Tanaka *et al.*, 1991 ; Goodell, 2003). La cellobiose déshydrogénase est la seule enzyme connue à catalyser directement la formation de composés responsables de la réaction de Fenton comme le Fe^{3+} (Mason *et al.*, 2003). Les autres enzymes ligninolytiques (laccase et LiP) agissent de façon indirecte sur la génération de Fe^{3+} et O_2 par la formation préalable de formate (CO_2^-) ou encore de radicaux semiquinones ($\text{Q}^\cdot$) (Barr *et al.*, 1992). Le principe du cycle redox quinone repose sur la réduction des quinones en leurs hydroquinones correspondantes, ce mécanisme peut être réalisé par les enzymes ligninolytiques (Gomez-Toribio *et al.*, 2009).

Toutefois, il a été démontré récemment que la laccase produite par *Postia placenta* jouerait un rôle clé dans la formation d'espèces réactives issues de l'oxygène en oxydant les hydroquinones (Wei *et al.*, 2010). De plus, le séquençage génomique de *P. placenta* a montré une absence des gènes codant pour les cellulases conventionnelles et pour la plupart des peroxydases fongiques de classe II. En revanche, une grande variété de gènes potentiellement impliqués dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène ont pu être identifiés (Martinez *et al.*, 2009).

Plus récemment, un mécanisme de dégradation non enzymatique a été étudié chez le champignon de la pourriture brune *Serpula lacrymans* (Eastwood *et al.*, 2011). Ce processus fait intervenir l'action d'une fer réductase dont le gène originel dériverait de la cellobiose déshydrogénase (partie hémique) associé à un CBM. L'acide variégatique et l'action des oxydoréductases produisent le peroxyde d'hydrogène nécessaire à l'élaboration de la réaction de Fenton (Figure 13).

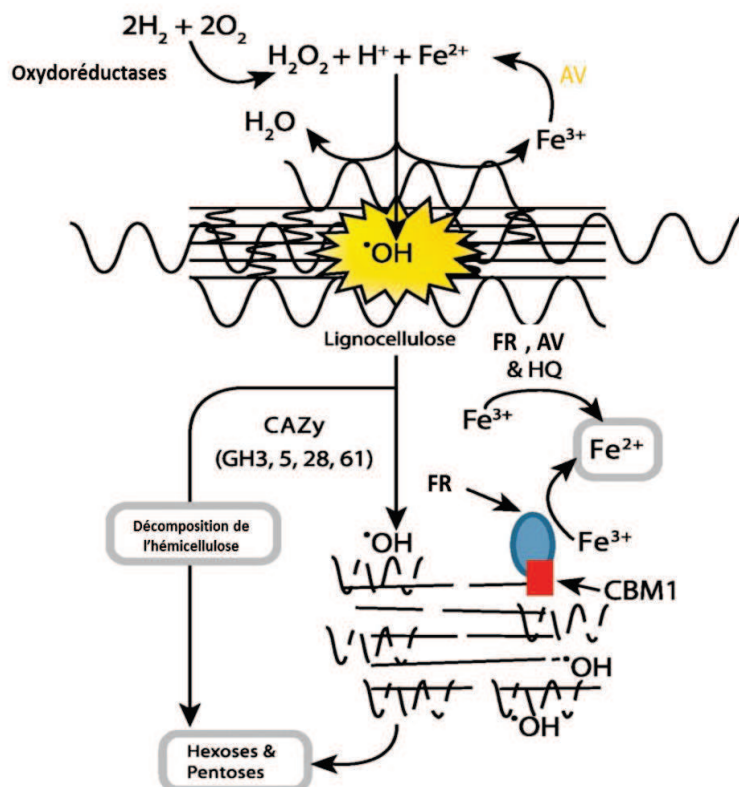


Figure 13. Schéma du mécanisme proposé pour la dégradation du bois par l'ascomycète *Serpula lacrymans*. Les radicaux hydroxyles formés par l'intervention de l'acide varié (VA) et d'oxydoréductases conduisent à la dégradation de la lignocellulose. Cette dégradation facilite l'action des CAZymes sur une structure devenue plus accessible. Une fer réductase (FR) se fixe à la cellulose par l'intermédiaire d'un CBM1 (cellulose-binding module) jouant le rôle de catalyseur pour la réaction de fenton. HQ : hydroquinone. Adapté de Eastwood *et al.*, 2011.

III.7. La cellobiose déshydrogénase

Classée parmi les enzymes ligninolytiques, la cellobiose déshydrogénase (CDH) est une enzyme originale dont la fonction n'a toujours pas été élucidée mais qui semblerait avoir des rôles variés dans les procédés de dégradation de la lignocellulose chez les champignons.

Les cellobiose déshydrogénases (CDH; CE 1.1.99.18; cellobiose: [accepteur] 1-oxydoréductase) sont des hémoflavoenzymes fongiques extracellulaires produites par de nombreux champignons de la pourriture blanche comprenant *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporiopsis subvermispora* et *P. cinnabarinus* (Li *et al.*, 1996; Roy *et al.*, 1996; Moukha *et al.*, 1999; Harreither *et al.*, 2009). Les CDHs sont également produites par des champignons de la pourriture brune comme *Coniophora puteana* (Schmidhalter et Canevascini, 1993) et des champignons de la pourriture molle (*Humicola insolens*) (Schou *et al.*, 1998). Les CDHs des ascomycètes *Myriococcum thermophilum* (Pricelius *et al.*, 2009) et *Neurospora crassa* (Zhang *et al.*, 2010) ont été clonées et exprimées

avec succès dans *Pichia pastoris*. Plus récemment, une CDH de *Thielavia terrestris* (Langston *et al.*, 2012) a été clonée chez *Aspergillus oryzae*.

Les CDHs sont des enzymes monomériques composées de deux groupes prosthétiques, un hème et un domaine comportant une flavine. Le domaine hémique est situé en position N-terminale et contient un hème de type b présentant une liaison originale à une méthionine et une histidine (Hallberg *et al.*, 2000) (Figure 14B). Le domaine flavinique en position C-terminale contient une molécule de FAD liée de façon non covalente (Figure 14A). Cette partie est classée en tant que membre de la famille glucose-méthanol-choline chez les oxydoréductases. Ces deux régions sont séparées par une région 'linker' riche en Thr-Ser (Dumonceaux *et al.*, 1998). Le domaine flavinique de la CDH catalyse une oxydation à deux électrons du cellobiose et, plus généralement, des cellodextrines et mannodextrines en leurs lactones correspondantes (Henriksson *et al.*, 1998) (Figure 15).

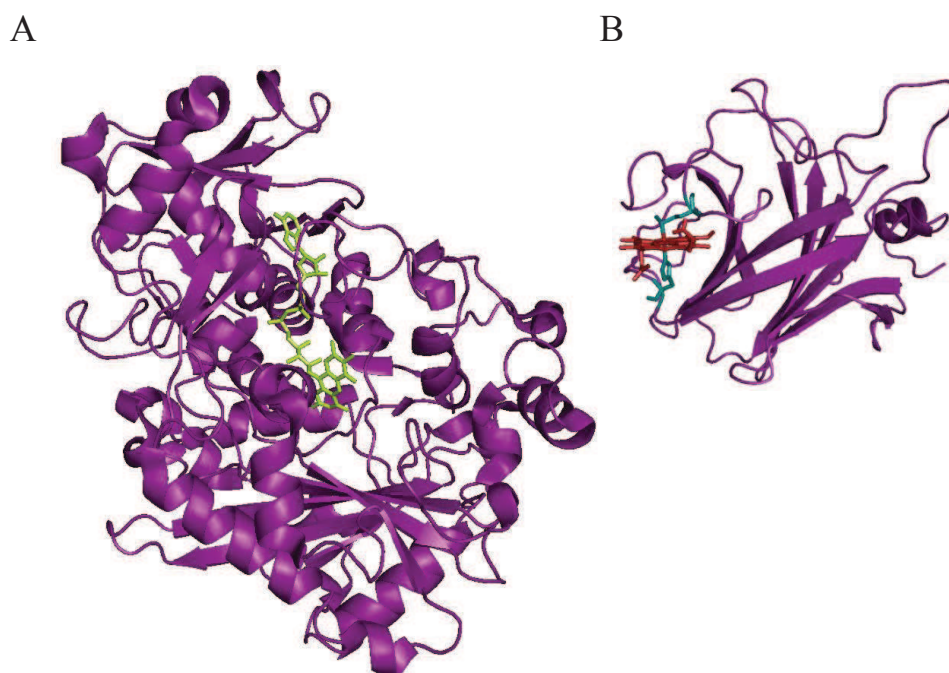


Figure 14. Structure tridimensionnelle de la cellobiose déshydrogénase de *Phanerochaetae chrysosporium*. Le domaine flavinique (PDB id : 1KDG) (A) contient une molécule de FAD (PDB id : 1D7C) (en jaune) et le domaine hémique (B) contient un hème de type b (en rouge) coordonné par une histidine et une méthionine (en bleu). D'après Hallberg *et al.*, 2002 et Hallberg *et al.*, 2000. Les représentations graphiques ont été réalisées à l'aide du logiciel PyMOL.

Lors de ces réactions, les accepteurs d'électrons sont le dioxygène, les quinones ou encore les radicaux phénoxys (Kremer et Wood, 1992; Samejima et Eriksson, 1992; Mason *et al.*, 2002). L'hème est impliqué dans un transfert d'électron interne vers le FAD ou d'autres accepteurs

d'électrons tels que le Fe^{3+} présent dans le milieu réactionnel (Bao et Renganathan 1992; Igarashi *et al.*, 2003). Bien que le rôle des CDHs soit encore incertain, il est établi que ces dernières sont produites dans des conditions cellulolytiques et impliquées dans la dégradation de la cellulose et de la lignine. Les CDHs possèdent la capacité de se lier à la cellulose par deux structures distinctes variant suivant les espèces: une région riche en acides aminés aromatiques chez les basidiomycètes tels que *P. chrysosporium* et *P. cinnabarinus* ou un domaine de liaison à la cellulose semblable à ceux observés chez les cellulases pour les CDHs produites par les ascomycètes et les champignons de la pourriture molle (Renganathan *et al.*, 1990; Henriksson *et al.*, 1997). Leur implication dans de nombreuses réactions a été démontrée comme la réduction des quinones (Westermarck et Eriksson, 1975), l'inhibition de la repolymérisation des radicaux phénoliques (Ander *et al.*, 1990; Henriksson *et al.*, 1993), la production de peroxyde d'hydrogène (Nutt *et al.*, 1997; Pricelius *et al.*, 2011), l'amélioration du turn over de la manganèse peroxydase (Roy et Archibald, 1994) ou encore l'une des réactions la plus souvent citée, la participation à la réaction de Fenton (Henriksson *et al.*, 1995).

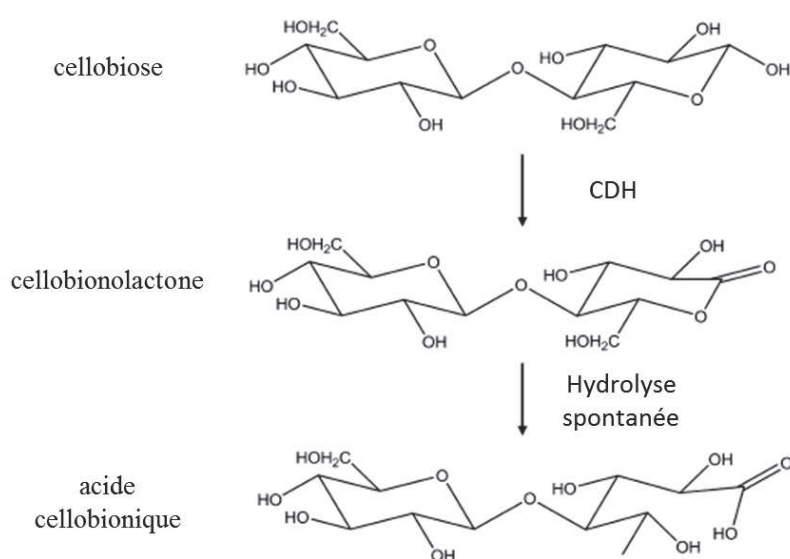


Figure 15. Réaction catalysée par la cellobiose déshydrogénase. Le substrat cellobiose est oxydé pour donner le cellobiono-1, 5-lactone, spontanément hydrolysé en acide cellobionique. Adapté de Henriksson *et al.*, 2000.

III.8. Les glycosyl hydrolases de la famille 61 ou polysaccharide monooxygénase à cuivre (PMO)

En 1956, Reese émet l'hypothèse selon laquelle il existerait une protéine (le composant C₁) permettant de rendre la cellulose plus accessible aux cellulases en s'attaquant aux zones cristalline (Reese *et al.*, 1956).

C'est à la fin des années 90 que la littérature a fait état de la présence de glycosyl hydrolases de famille 61 (d'après la classification CAZy). L'étude des cellulases de *T. reesei* a révélé la présence de ces GH61s, identifiées à l'origine comme des endoglucanases EG IV (Saloheimo *et al.*, 1997). En 2001, Karlsson *et al.* publient des travaux portant sur l'expression homologue et la caractérisation de la GH61 de *T. reesei*. Les premiers résultats montrent la présence d'une faible activité endoglucanase (Karlsson *et al.*, 2001). En parallèle, Wymelenberg *et al.* identifient la présence de glycosyl hydrolases de famille 61 dans le transcriptome de *P. chrysosporium* (Wymelenberg *et al.*, 2002).

En 2005, Vaaje-Kolstad *et al.* décrivent la présence d'une protéine appelée CBP21 (pour Chitin Binding Protein) chez la bactérie *Serratia marcescens*. Les premières observations montrent que la protéine ne possède pas une activité catalytique classique des chitinases mais permet d'augmenter significativement la dégradation de la chitine. La structure de la CBP21 est très proche de celle du CBM33 et de la GH61 (Vaaje-Kolstad *et al.* 2005). Le séquençage génomique du champignon de la pourriture brune *Postia placenta* a montré la présence d'un grand nombre de gènes codant pour des GH61, laissant présager une importante participation des GH61s dans la dégradation de la cellulose (Martinez *et al.*, 2009). En 2008, une GH61 d'*Aspergillus kawachii* est caractérisée mais ne montre pas d'activité catalytique permettant de justifier sa large présence dans les génomes d'organismes cellulolytiques (Koseki *et al.*, 2008). La première structure d'une GH61 (Cel61B d'*Hypocrea jecorina*) apparaît la même année et montre la présence d'un métal divalent au sein d'un site contenant trois résidus intervenant dans sa fixation : His1, His89 and Tyr176 (Figure 16 A et B). Les GH61s sont formées par un repliement en feuillet β avec une surface plane très étendue exposant en son centre une histidine en position N-terminale possédant un groupement méthyle et étant impliquée dans la fixation d'un ion métallique. Une comparaison de structure a également permis de mettre en évidence une forte homologie de structure avec la CBP21, précédemment citée (Karkehabadi *et al.*, 2008).

En 2010, Harris *et al.* montrent que la GH61 agit en synergie avec les cellulases de *T. reesei* et permet de diminuer par deux la quantité d'enzymes utilisée lors des tests d'hydrolyse sur des tiges de maïs prétraitées tout en conservant les mêmes rendements (Harris *et al.*, 2010).

Peu après, Vaaje-Kolstad *et al.*, établissent le mécanisme de fonctionnement de la CBP21 (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010). Les travaux portant sur l'analyse de la structure du domaine de fixation à la chitine (CBP21) et les propriétés d'oxydation de cette dernière ont permis de mettre en lumière certaines propriétés pouvant être extrapolées aux GH61 du fait de leur homologie de structure (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010) (Figure 17 A et B). La CBP21 possède une structure similaire à la GH61 et a démontré un potentiel dans la dégradation de la chitine soluble via des coupures oxydatives du substrat en présence d'acide ascorbique.

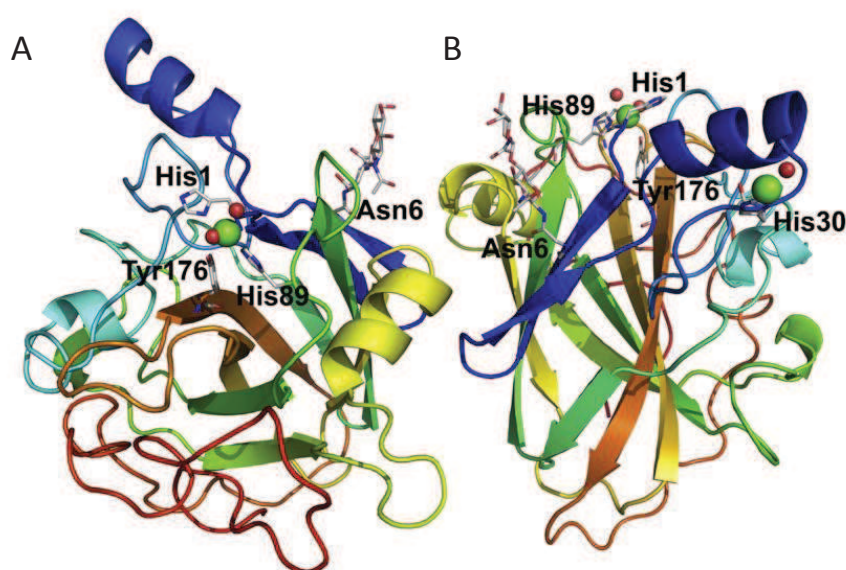


Figure 16. Structure secondaire de Cel61B (A). Les parties bleu et rouge représentent respectivement les domaines N-terminal et C-terminal de chaque protéine. En gris, les chaînes latérales. L'ion Nickel est représenté en vert et les molécules d'eau en rouge. (B) La sphère de nickel (en vert) est hexacoordonnée par deux molécules d'eau, les quatre autres liaisons sont réalisées par trois résidus : His 1, His 89 et Tyr 176. (D'après Karkehadadi *et al.*, 2008)

Le lien étant fait, Quinlan *et al.* publient des travaux montrant le mécanisme d'action oxydatif des GH61. L'activité des GH61s est accentuée par l'action de composants non cellulotiques de la biomasse tels que l'ascorbate et le gallate ainsi que par la présence d'un cofacteur métallique, en l'occurrence un atome de cuivre coordonnés par des acides aminés conservés, deux histidines (dont une, en position 1 de la séquence portant une méthylation en N-terminale) et une tyrosine (Fig. 18) (Quinlan *et al.*, 2011).

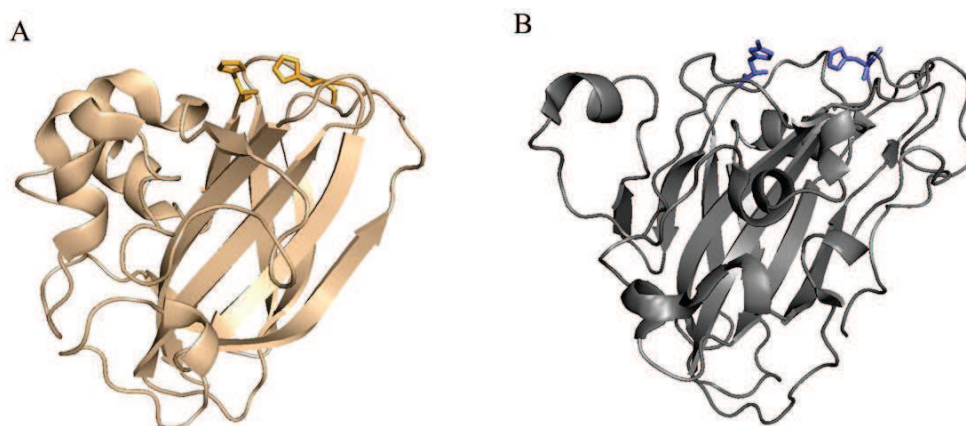


Figure 17. Structure de la CBP 21 et d'une GH61A. Structure cristalline de la CBP21 (A) de *Serratia marcescens* (PDB id : 2BEM) et de la GH61A (B) de *Thermoascus aurantiacus* (PDB id : 2YET). Les chaînes latérales des résidus histidines sont représentées en jaune (A) et en bleu (B). A noter que l'histidine 1 de la GH61A (B) possède une N-méthylation. Source : Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005 (A) ; Quinlan *et al.*, 2011 (B).

Ces travaux ont donc conclu que les GH61 étaient activées par deux facteurs : un agent redox actif et soluble tels que le gallate ou l'ascorbate et un atome de cuivre (Figure 18). Ce dernier serait situé au sein d'un site de type II et serait le siège d'une activation de l'oxygène et de fait d'une dégradation de la cellulose (Balasubramanian *et al.*, 2010). Ce type d'action amène les GH61 à faire partie de la classe des oxydoréductases à cuivre (Tickler *et al.*, 2005; Quinlan *et al.*, 2011).

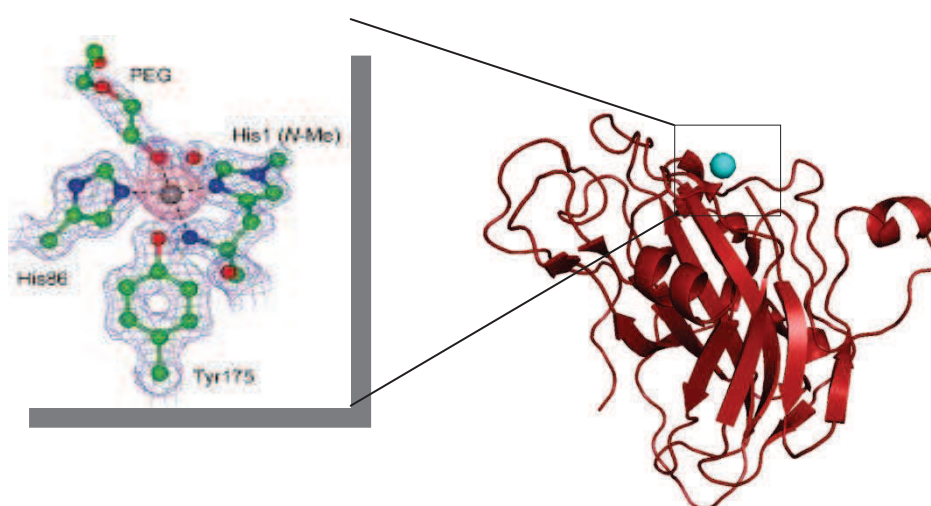
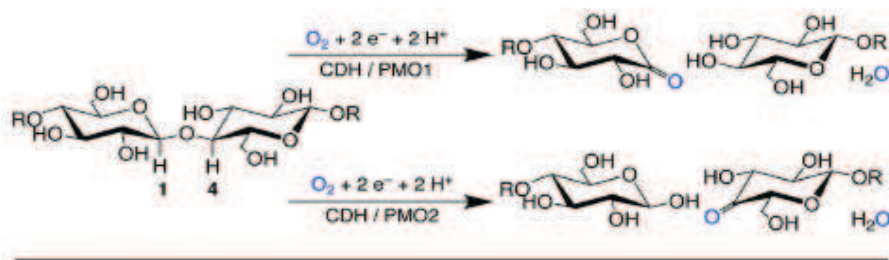


Figure 18. Site actif de la GH61A. Structure cristalline de la GH61A de *T. aurantiacus* et représentation 3D du site actif montrant la position du cuivre et la méthylation de l'histidine N-terminale (Quinlan *et al.* 2011). Représentation graphique réalisé à l'aide du logiciel PyMOL.

En parallèle, Phillips *et al.*, montrent que les enzymes oxydatives de *N. crassa* telles que les GH61 appelées PMO (pour polysaccharides monooxygénases) et la CDH étaient des composants clés au sein de systèmes enzymatiques fongiques et permettaient d'accroître la dégradation de la cellulose. Au cours de cette études, la synergie entre la CDH et les PMO est démontrée et mise en évidence par le clivage de la cellulose via des mécanismes oxydatifs (Figure 19) (Phillips *et al.*, 2011).

A



B

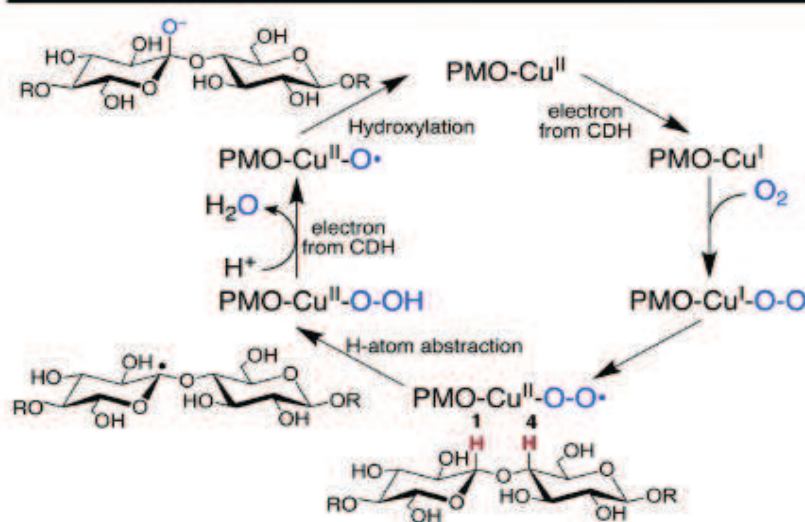


Figure 19. Réaction des PMO et mécanismes proposés. (A) Les PMOs de type 1 arrachent un atome d'hydrogène en position 1 menant à la formation d'une lactone. Les PMOs de type 2 catalysent l'arrachage d'un atome d'hydrogène en position 4 menant à la formation de cétoaldoses. (B) Le mécanisme propose pour les PMOs: un électron issu du domaine hémique de la CDH réduit le cuivre de la PMO (Cu(II) en Cu(I)) ensuite l' O_2 se fixe. Un transfert interne d'électron permet de former un intermédiaire cuivre superoxo, qui par la suite arrachera un H^+ des positions 1 ou 4 du sucre. Un second électron issu de la CDH effectue un clivage homolytique du couple cuivre-hydroperoxyde. Les espèces cuivre oxo (Cu-O $\cdot$) ensuite se couplent avec les substrats radicalaires et insèrent un oxygène sur le substrat. L'addition de l'atome d'oxygène déstabilise les liaisons glycosidiques et provoque la coupure de la molécule et l'élimination des glucanes adjacents. D'après Phillips *et al.*, 2011.

D'autres résultats ont confirmé l'existence d'une association CDH/GH61, en l'occurrence, la CDH d'*Humicola insolens* avec une GH61 de *T. aurantiacus*. Ces deux enzymes agissent en synergie pour dépolymériser la cellulose (Langston *et al.*, 2011).

Les expérimentations génétiques et biochimiques reportées par Phillips *et al.* montrent que la CDH de *N. crassa* fonctionne en tant que seule enzyme extracellulaire possédant une activité

réductase vis-à-vis des PMOs et que le domaine hémique de la CDH est requis lors des processus de dégradation de la matière cellulosique (Phillips *et al.*, 2011). A l'heure actuelle, trois classes de PMOs (PMO-1, PMO-2 et PMO-3) ont été définies suivant leurs régiospécificités oxydatives. Les mécanismes proposés pour ces voies oxydatives montrent un clivage de la cellulose par l'insertion d'une molécule d'oxygène au niveau du carbone 1 (PMO-1) ou au niveau du carbone 4 (PMO-2) d'un glucose composant la cellulose. L'hypothèse d'une existence de PMOs de type trois a récemment été émise. Ces dernières, avec une moindre spécificité, pourraient former des composés présentant une oxydation en C₁ et en C₄. Ces réactions créeraient une coupure irréversible de la chaîne de cellulose car le carbone à l'extrémité réductrice et/ou non réductrice serait oxydé (Beeson *et al.*, 2012). Des différences structurales entre les PMO de type 2 et 3 ont récemment été mises en évidence. Les analyses structurales ont montré la variabilité d'une boucle présente au niveau de la surface plane ainsi qu'une grande variabilité de la composition en acides aminés aromatiques (Lin *et al.*, 2012).

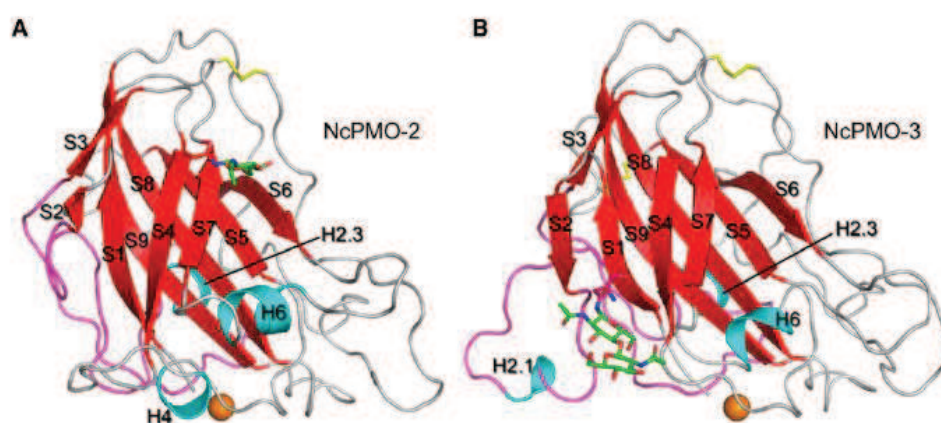


Figure 20. Structure et séquence en acides aminés des PMO-2 et -3 de *N. crassa*. Les surfaces planes des structures de NcPMO-2 (A) et NcPMO-3 (B) sont représentées vers le bas avec la fixation d'un ion cuivre II (orange). La variation de la boucle 2 est montrée en rose.

IV. BIOETHANOL : CONTEXTE, ENJEUX ECONOMIQUE ET VOIES D'OPTIMISATION

La dépendance économique aux énergies fossiles et les impacts environnementaux découlant de leurs utilisations ont contraint à trouver des alternatives. La production de Bioéthanol paraît être une des solutions les plus viables, du fait de l'utilisation de la lignocellulose, la plus grande source renouvelable de carbone. Le bioéthanol pourrait ainsi répondre à

l'exigence du marché, d'un point de vue économique et écologique. Après l'échec de la première génération de bioéthanol dû à l'exploitation de cultures destinées à l'alimentation, la deuxième génération n'entrera pas dans cette compétition car elle utilise des résidus agricoles et forestiers ou encore des champs de culture dédiés. Le concept général de la conversion de lignocellulose en sucres fermentescibles implique une première étape de prétraitement. Cette dernière joue un rôle crucial et permet d'accroître la digestibilité du matériel utilisé par les enzymes lors de l'étape d'hydrolyse destinée à libérer les sucres fermentescibles. La suite du procédé consiste à fermenter ces sucres indépendamment ou simultanément (Figure 21).

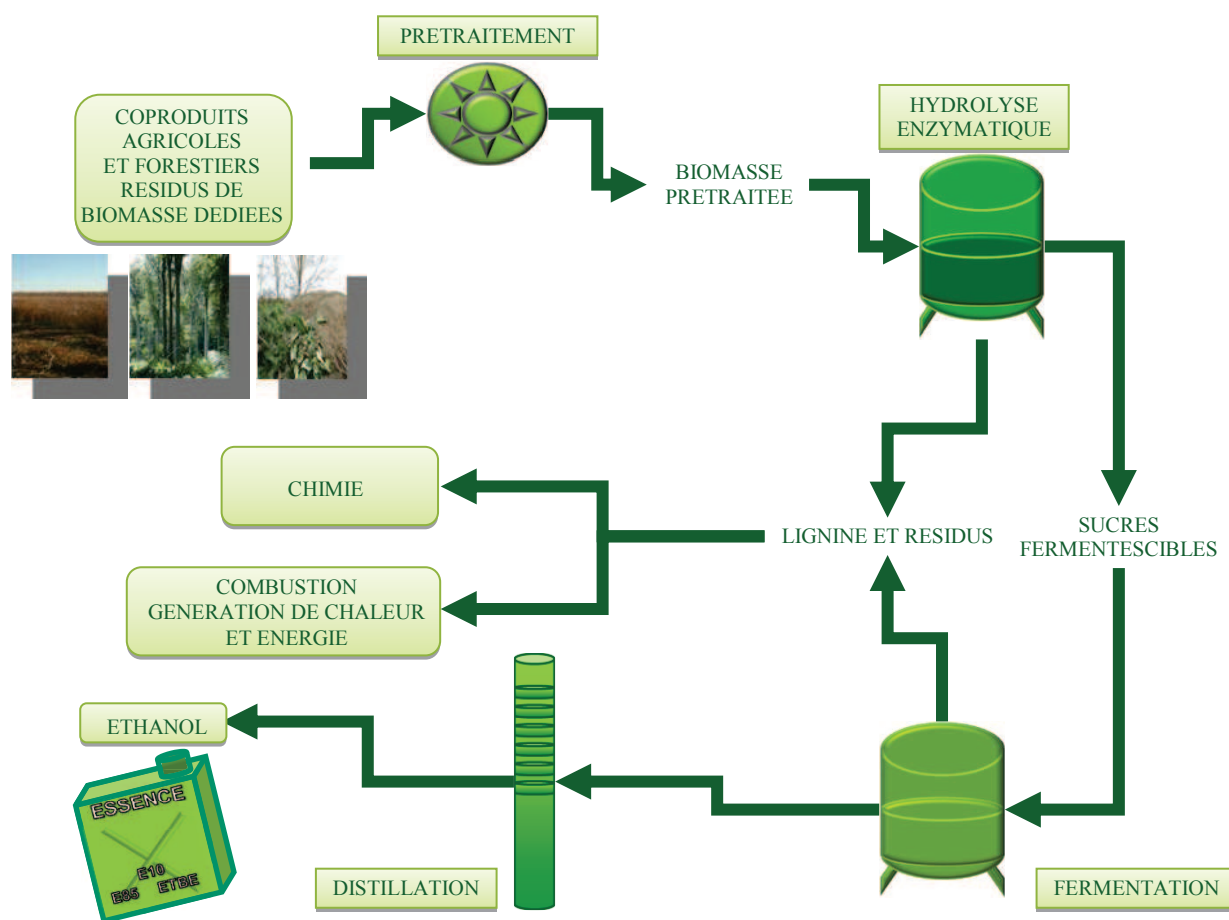


Figure 21. Procédé de bioéthanol de seconde génération. Vue d'ensemble du processus de bioraffinerie conduisant à la production de bioéthanol, de composés chimiques et d'énergie à partir de matériaux lignocellulosiques.

IV.1. Matières premières pour la production de bioéthanol

IV.1.1. Bioéthanol de première génération

Les matières premières utilisées dans les procédés de production de bioéthanol de première génération proviennent essentiellement de champs de céréales (maïs et blé) et de sucres (cannes à sucre et betteraves) qui étaient également destinés à l'alimentation humaine (et

animale) (Lin et Tanaka, 2006). Ces dernières cultures, riches en sucres sont rapidement fermentescibles donc plus efficace et économiquement viable que celles contenant de l'amidon qui doit être hydrolysé au préalable en sucres simples (Sanchez et Cardona 2008).

Les procédés de production de bioéthanol à partir de canne à sucre sont très répandus au Brésil. La récolte de cannes se fait 200 jours par an, son jus contient 15 % de saccharose (Siqueira *et al.*, 2008). Le jus peut être cristallisé ou directement utilisé en fermentation. Lors de la production de sucre, le jus de la canne est clarifié à la chaux et évaporé pour former le saccharose cristallisé. Ce procédé aboutit à des mélasses (un sous-produit sirupeux marron) représentant un très bon milieu de fermentation contenant des sucres tels que le glucose, le fructose et le saccharose mais aussi des minéraux, des vitamines, des acides gras et organiques, ... (Cardona *et al.*, 2010).

Quant à la production de bioéthanol basée sur l'utilisation de plantes amylacées (blé et maïs), le procédé se découpe en différentes étapes comprenant : un broyage, une liquéfaction de l'amidon, une hydrolyse, une fermentation, et enfin, une distillation (Quintero *et al.*, 2008). L'amidon n'est donc pas directement fermenté après broyage et doit subir un prétraitement et une hydrolyse. Ce prétraitement est basé sur une cuisson des céréales aboutissant à une hydrolyse (l'amylolyse) réalisée par des α - et β -amylases, des amyloglucosidases et des glucanases (processus de liquéfaction).

IV.1.2. Bioéthanol de seconde génération

Si la première génération de bioéthanol est basée sur l'utilisation de cultures destinées à l'alimentation, la seconde génération fait référence à l'utilisation de cultures non alimentaires en se servant de matières premières lignocellulosiques.

On distingue parmi cette biomasse deux sous-catégories issues :

- des déchets (pailles, résidus agricoles et forestiers,...)
- des champs destinés à la production d'énergie (taillis à courte rotation (TCR) et herbes énergétiques (switchgrass, miscanthus,...).

Les résidus agricoles, forestiers et les déchets biologiques industriels représentent une source de matériel lignocellulosique durable et écologiquement viable pour la production de bioéthanol tout en offrant une réduction des coûts de production de la matière première. De plus l'utilisation de terrains vierges inexploitable pour des cultures vivrières représente un avantage non négligeable des cultures dédiées à l'énergie. La biomasse lignocellulosique est formée de trois composants majeurs : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. La cellulose reste le composant d'intérêt puisqu'elle se compose de glucose relié par des liaisons β -(1,4),

ce qui en fait la source majoritaire en sucres fermentescibles. L'hémicellulose est un hétéropolysaccharide composée de pentoses et d'hexoses, la fermentation de ces sucres dépend donc de l'organisme utilisé et de la proportion des composants de l'hémicellulose. Seule la lignine reste non fermentescible mais peut toutefois être valorisée sous forme de résines phénoliques (usine pilote de la société CIMV, Pomacle-Bazancourt).

IV.2. Les technologies employées pour le prétraitement

Les matériaux lignocellulosiques utilisés dans les procédés de production de Bioéthanol possèdent une structure complexe et résistante à une hydrolyse directe par les enzymes. Afin d'augmenter les rendements en sucres fermentescibles et diminuer le temps de réaction, les prétraitements sont des prérequis à l'hydrolyse enzymatique.

De nombreux prétraitements, souvent dépendants du substrat utilisé, ont été développés au fil des ans mais nous ne traiterons que de ceux principalement utilisés à l'heure actuelle (Table 02). Leur rôle est d'accroître l'accessibilité des polysaccharides aux enzymes, de diminuer la perte en sucres tout en favorisant la séparation de composés tels que la lignine et les hémicelluloses. Mais ils doivent également minimiser l'addition de composés chimiques, la consommation d'énergie et pouvoir être transposables à l'échelle industrielle.

Méthode de prétraitement	Action principale
• Cuisson acide • Explosion vapeur • Explosion vapeur catalysée à l'acide	Hydrolyse partielle, solubilisation des hémicelluloses et redistribution de la lignine en surface des fibres
• Eau chaude	Elimination des hémicellulose et quelques lignines
• Chaux	Elimination des lignines
• Oxydation par voie humide • Explosion par voie humide	Elimination et dégradation partielle de la lignine, solubilisation et oxydation de quelques hémicelluloses
• AFEX	Clivage de la lignine et dépolymérisation partielle des hémicelluloses et celluloses
• Organosolv/Alcell®	Elimination de la lignine et de quelques Hémicelluloses

Table 02. Liste des principaux prétraitements et leurs effets sur la lignocellulose. D'après Jørgensen *et al.*, 2007.

IV.2.1. Prétraitements à la vapeur et à l'acide

La voie des prétraitements à la vapeur a été ouverte il y a quelques années par l'industrie papetière afin de fractionner le bois ou la paille. Cette méthode a ainsi démontré l'étendue de ses capacités à l'échelle industrielle. Par cette technique, le matériel lignocellulosique est chauffé rapidement avec de la vapeur (180-210°C) pendant 1 à 10 min. La vapeur peut être combinée avec une décharge explosive du matériel donnant lieu à un prétraitement du type explosion à la vapeur (Mason, 1928). Durant ce processus, les hémicelluloses sont hydrolysées et de l'acide peut être utilisé pour catalyser l'hydrolyse partielle des hémicelluloses en mono- et oligosaccharides (Kabel *et al.*, 2007). Ceci dans le but d'augmenter l'accessibilité de la cellulose aux enzymes hydrolytiques. La lignine est éliminée dans une moindre mesure et le plus souvent redistribuée en surface.

Le plus souvent le matériel est imprégné d'acide (entre 0.3 et 3 % (w/w)) avant de subir le traitement à la vapeur. Cette addition permet de diminuer le temps, la température et la formation de composés inhibiteurs. Ce procédé semble être le plus proche d'une réalité commerciale et est utilisé, à l'heure actuelle, au sein de nombreux pilotes pour la production de bioéthanol de seconde génération. (Stenberg *et al.*, 1998)

IV.2.2. Prétraitements en condition alcaline

On peut citer parmi les techniques de prétraitement en condition alcaline : les traitements à la chaux, l'oxydation par voie humide et l'AFEX (Ammonia Fiber/Freeze Explosion). Le principe de traitement alcalin repose sur l'élimination de la lignine.

La chaux est utilisée à des températures allant de 85 à 150°C avec un temps d'incubation plus long (d'une heure à plusieurs jours) (Chang *et al.*, 1998).

L'oxydation par voie humide est un prétraitement thermique à 180-200°C dont la durée varie de 5 à 15 min comprenant l'addition d'agents oxydatifs tels que le peroxyde d'hydrogène ou l'oxygène à haute pression. Ce procédé permet de travailler avec une teneur en matière sèche comprise entre 5 et 20 % et repose sur l'élimination partielle des lignines ainsi que des hémicelluloses dont une partie est oxydée en acides carboxyliques, en CO₂ et en eau. L'intérêt de ce prétraitement repose également sur la possibilité d'oxyder en acide carboxylique les produits de dégradations tels que les phénols et les furanes formés respectivement par les lignines et les sucres (Schmidt *et al.*, 1998).

Une autre technique de prétraitement nommée AFEX consiste à traiter la lignocellulose avec de l'ammoniac liquide à des températures avoisinant les 90-100°C sous haute pression (3,65MPa) pendant 15-20 min. Lorsque la pression est soudainement réduite, l'ammoniac

liquide infiltré dans les fibres congèle et les fait éclater (Dale *et al.*, 1985). La lignine n'est pas éliminée par cette méthode mais les complexes lignines-sucres sont clivés. Les résultats observés suite à l'utilisation de l'AFEX montrent une dépolymérisation de la cellulose et une hydrolyse partielle des hémicelluloses. De plus les sucres ne sont que très légèrement dégradés d'où une faible proportion de composés inhibiteurs.

IV.2.3. Prétraitements extractifs

Les prétraitements organosolv ou procédé Alcell® se basent sur une technique de délignification de la lignocellulose impliquant l'utilisation d'éthanol (40-60 %) à 160-200°C pendant 30-60 min avec un ratio bois-liquide de l'ordre de 1 :7 (w/v) (Ni *et al.*, 1996). L'acide sulfurique ou l'hydroxyde de sodium peuvent être additionnés en tant que catalyseurs. La majorité des hémicelluloses sont décrochées et dégradées (en furfural notamment). A partir du prétraitement organosolv, la lignine de haute qualité peut être isolée et participer à d'autres procédés de bioraffineries.

IV.3. Les enzymes utilisées lors des processus d'hydrolyse

Au sein du processus de production de bioéthanol, l'hydrolyse enzymatique fait figure de point crucial, de nombreuses études portant sur les systèmes enzymatiques ont été réalisés.

Pour que l'hydrolyse du matériel lignocellulosique soit la plus efficace possible, un nombre important d'enzymes est nécessaire. Les trois classes majeures d'enzymes cellulolytiques agissant en synergie sont représentées par les cellobiohydrolases, les endo-1, 4-β-D-glucanases et les 1, 4-β-D-glucosidases (Wilson *et al.*, 2009). À ce système s'ajoutent les hémicellulases incluant entre autres les endo-1, 4- β-D-xylanases, les 1, 4- β-D-xylosidases, les endo-1, 4- β-D-mannanases et les 1, 4- β-D-mannosidases (Beukes and Pletschke, 2011 ; Dredge *et al.*, 2011 ; Sørensen *et al.*, 2005).

Parmi les producteurs de cellulases *T. reesei* est à ce jour l'un des mieux caractérisés. Il possède un arsenal de cellulases composé de deux cellobiohydrolases, cinq endoglucanases et deux β-glucosidases ainsi que des xylanases (Foreman *et al.*, 2003 ; Xiong *et al.*, 2004 ; Herpoël-Gimbert *et al.*, 2008).

IV.4. Les facteurs influençant l'hydrolyse enzymatique

De nombreux facteurs peuvent affecter l'hydrolyse enzymatique de la lignocellulose (Figure 23). L'utilisation de hautes concentrations de substrats ne fait qu'accroître ces phénomènes d'inhibitions amenant la diminution des performances enzymatiques.

IV.4.1. Hydrolyse à haute teneur en matière sèche

La plupart des applications demande une concentration élevée en sucre pour assurer une fermentation des plus efficaces. Le principal problème causé par de hautes teneurs en matière sèche reste l'apparition de produits inhibiteurs ciblant tout particulièrement les systèmes cellulolytiques. De manière générale, les produits d'hydrolyse tels que le glucose pour la β -glucosidase et le cellobiose dans le cas des cellobiohydrolases sont des inhibiteurs. Ces phénomènes d'inhibition peuvent être contrebalancés par l'ajout d'un surplus de β -glucosidase ou par l'utilisation de β -glucosidase possédant un K_i supérieur. Ceci dans le but d'hydrolyser le cellobiose et d'éliminer les phénomènes d'inhibition de la β -glucosidase par le glucose.

Il est également possible de réaliser une saccharification simultanément avec la fermentation (procédé de SSF), le glucose étant fermenté directement en éthanol. Cependant les microorganismes utilisés pour la fermentation ne possèdent pas le même optimum de température que les enzymes hydrolytiques travaillant à 50°C. Un autre problème concerne le produit majoritaire de la fermentation, c'est-à-dire l'éthanol, qui est un inhibiteur de l'action des cellulases tout comme les acides organiques formés durant les étapes de prétraitement de la matière (acide formique, acide vanillique, acide syringique ou encore syringaldéhyde).

Les concentrations en substrats de l'ordre de 10-15 % sont difficilement réalisables en raison de la haute viscosité initiale, cependant par l'intermédiaire d'une première phase d'hydrolyse, la liquéfaction, il devient possible de monter à des teneurs en substrats de 15 à 20 % en poids secs (Tolan, 2002 ; Fan *et al.*, 2003). Certains réacteurs (réacteur de liquéfaction à cinq chambres (Figure 22)) conçus pour des taux élevés en matières sèches sont capable de fonctionner initialement à 40 % de substrats secs (Jørgensen *et al.*, 2006).

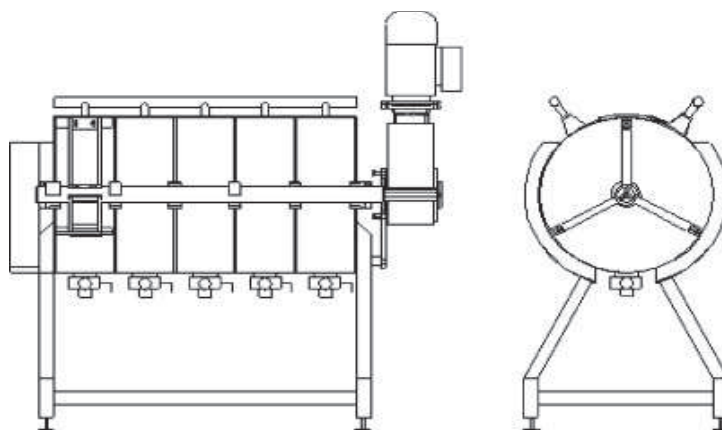


Figure 22. Schéma d'un réacteur de liquéfaction à cinq chambres. D'après Jørgensen *et al.*, 2006.

IV.4.2. Optimisation des compositions enzymatiques

Au cours de ces dernières années, les recherches concernant l'amélioration des performances enzymatiques se sont accentuées. Allant de l'étude de microorganismes producteurs, en passant par des mutations aléatoires de souches fongiques ou d'enzymes d'intérêts. Ces études ciblent tout particulièrement l'optimisation de l'activité spécifique, les interactions cellulose-enzymes, l'augmentation de la tolérance aux produits d'inhibitions ainsi que la stabilité enzymatique aux températures et aux pH (Banerjee *et al.*, 2010).

La présence d'hémicellulose a longtemps été négligée, seule l'hydrolyse de la cellulose étant considérée. Cependant à l'instar de la lignine, les hémicelluloses peuvent couvrir les fibrilles de cellulose et limiter l'accessibilité des cellulases au substrat cellulosique. Grâce aux prétraitements acides, les hémicelluloses sont majoritairement éliminées mais il a été démontré que l'addition de xylanases ou pectinases augmentait significativement les performances des cellulases et finalement la conversion de la cellulose en sucres fermentescibles. La complexité de l'hémicellulose requiert un nombre important d'enzymes possédant des spécificités variées. La composition de système hémicellulase est donc dépendante du substrat. Concernant la paille de blé, composée d'arabinoxylane, il convient d'ajouter aux xylanases, des α -L-arabinofuranosidases afin d'obtenir une hydrolyse des plus efficaces (Merino *et al.*, 2007 ; Sørensen *et al.*, 2007).

Récemment, certaines protéines non-catalytiques ont attiré l'attention, parmi elles se trouvent les swollenines, les expansines ou encore les CBM (cellulose binding module). Elles ont la capacité de désordonner les fibres rendant plus accessible la cellulose aux enzymes (Boraston *et al.*, 2004 ; Merino *et al.*, 2007).

IV.4.3. Adsorption enzymatique

La présence de lignine au sein des matériaux lignocellulosiques est un facteur majeur de l'inhibition de l'hydrolyse enzymatique (Mansfield *et al.*, 1999) (Figure 23). En effet, la lignine forme une barrière empêchant l'action des enzymes et peut également fixer une grande partie (jusqu'à 60-70 %) d'entre elles par des interactions hydrophobes non productives (Esteghlalian *et al.*, 2001). L'intérêt de certains prétraitements (explosion vapeur ; APEX) est d'éliminer la lignine de façon à augmenter la digestibilité du substrat et également à diminuer la quantité d'enzymes à ajouter par rapport à un substrat brut contenant une grande quantité de lignine (Laureano-Pérez *et al.*, 2005).

Afin de résoudre le problème d'adsorption enzymatique sur la lignine, des protéines (BSA) ou des additifs (PEG) sont ajoutés lors de l'hydrolyse enzymatique (Börjesson *et al.*, 2007).

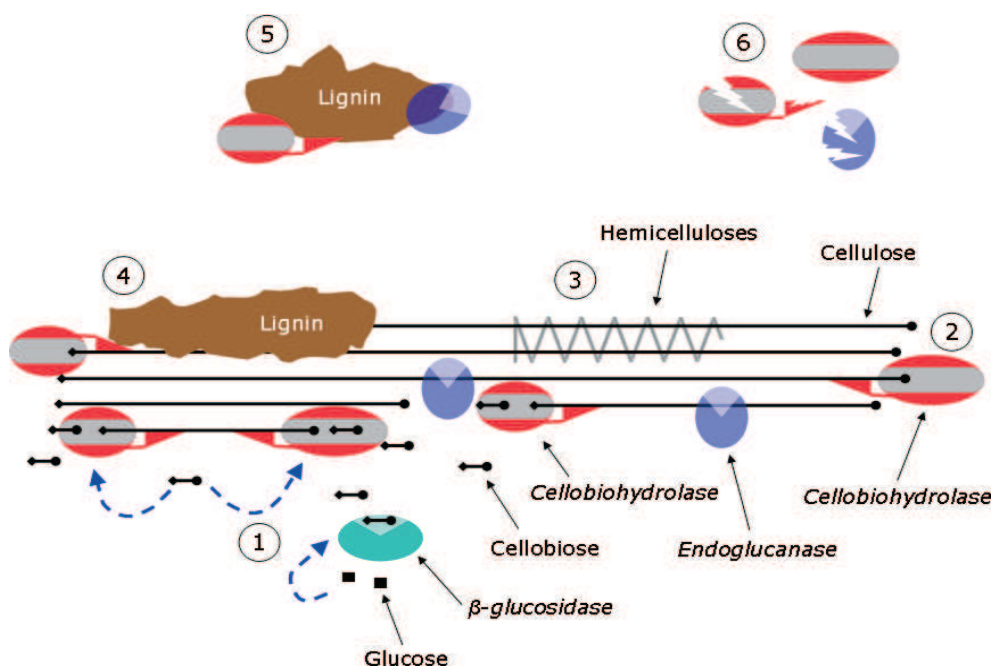


Figure 23. Schéma des facteurs limitants apparaissant lors des procédés d'hydrolyse de la cellulose (ligne noire). 1 : Inhibition des β -glucosidases et cellobiohydrolases par le glucose et le cellobiose. 2 : Fixation non productive de cellobiohydrolase. 3 et 4 : Association des lignines et hémicelluloses aux microfibrilles de celluloses empêchant la progression des cellulases. 5 : adsorption non spécifique des cellulases et hémicellulases aux particules de lignines ou en surface. 6 : dénaturation ou perte d'activité enzymatique due aux activités protéolytiques, à la faible thermostabilité et au cisaillement. D'après Jørgensen *et al.*, 2007.

IV.5. La fermentescibilité

IV.5.1. Les microorganismes

Historiquement, les microorganismes les plus utilisés pour produire de l'éthanol sont les levures et parmi eux, *S. cerevisiae* fait office de référence en matière de fermentation alcoolique. *S. cerevisiae* métabolise le glucose par la voie Embden–Meyerhof. La fermentation chez la levure tient notamment à la combinaison de deux enzymes, l'alcool déshydrogénase et la pyruvate décarboxylase (van Maris *et al.* 2006). Au fil des années, *S. cerevisiae* a évolué au sein de l'industrie du bioéthanol pour devenir plus tolérante aux stress biologiques et physico-chimiques subis au cours du procédé. Il a rapidement été nécessaire de développer des souches de levures résistantes aux hautes concentrations en éthanol (Nevoigt, 2008). Les approches d'ingénierie métabolique consistant à améliorer la production de bioéthanol par *S. cerevisiae* sont entre autres : (i) l'utilisation de pentoses pour la fermentation (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2007) (ii) la tolérance aux substances inhibitrices (HMF et furfural) (Liu *et al.*, 2005).

Sans toutefois créer des organismes génétiquement modifiés, il est possible d'améliorer la résistance des levures grâce à : (i) un pré-enrichissement en stérol, en minéraux, (ii) une adaptation à l'éthanol ou encore (iii) une augmentation à la thermotolérance (pré-heat-shocks) et à l'osmotolérance (conditionnement avec des sels).

Certaines souches particulièrement résistantes (en distillerie) ont pu être isolées et sélectionnées pour la fermentation.

D'autres levures (*Pichia stipitis*) et bactéries (*Zymomonas mobilis*) possèdent toutefois un potentiel non négligeable (Roger *et al.*, 1997).

Zymomonas mobilis, une bactérie gram-négative, a attiré l'attention du fait de son osmotolérance et sa résistance à l'éthanol. Elle a montré une spécificité importante pour le glucose et la production d'éthanol par la voie Entner-Doudoroff en condition anaérobie. Les études ont montré que *Z. mobilis* possédait un potentiel non négligeable pour la production de bioéthanol à partir de jus/sirop de canne à sucre ou encore de mélasse (Lee and Huang, 2000 ; Cazetta *et al.* 2007).

IV.5.2. Les systèmes de fermentation pour le bioéthanol

La fermentation et les procédés d'hydrolyse enzymatique peuvent être effectués de différentes façons : (i) en séparant l'hydrolyse de la fermentation (SHF), (ii) en les combinant simultanément (SSF) ou (iii) par une hydrolyse couplée à une co-fermentation *S. cerevisiae/P. stipitis* (SSCF).

La SHF permet de réaliser les étapes d'hydrolyse et de fermentation dans des compartiments dissociés afin d'être en condition optimale. En revanche, un problème réside dans l'apparition de produits inhibiteurs de l'activité enzymatique (cellobiose et glucose). La SSF permet de résoudre ces problèmes via la fermentation immédiate des sucres en éthanol (Galbe and Zacchi, 2002; Ohgren *et al.*, 2007). Si ce procédé présente également l'avantage de réduire les coûts d'utilisation des réacteurs (un seul est nécessaire), les optimums de température utilisés ne sont pas les mêmes pour les enzymes (50°C) et les levures (30-35°C) (Kadar *et al.*, 2004). La co-fermentation offre l'intérêt de pouvoir utiliser deux organismes aux milieux de cultures similaires mais possédant des cibles fermentescibles différentes (les pentoses pour *P. stipitis*) (Grootjen *et al.*, 1990). Récemment, un procédé de saccharification/fermentation utilisant le même réacteur (SVSF) a permis de combiner les avantages de la SSF et de la SHF, incluant une phase d'hydrolyse des enzymes à leurs optimums suivie d'une phase SSF (avec possibilité de co-fermentation (SVSCF) (Karagöz *et al.*, 2012).

IV.6. Distillation

IV.6.1. La méthode anhydre

L'éthanol ajouté aux essences doit être totalement anhydre sous peine d'altérer les performances. Une distillation standard produit de l'éthanol à environ 95% (v/v) (Azéotrope eau-éthanol). Un tamis moléculaire déshydratant (silicate d'aluminium zéolite) est couramment employé dans les distilleries de bioéthanol pour obtenir de l'alcool anhydre plutôt qu'une distillation azéotropique en présence de solvants tels que le benzène.

IV.6.2. Formulation des carburants alcoolisés

De nombreux mélanges pétrole-éthanol sont utilisés comme carburant. L'éthanol utilisé dans ces carburants est dénaturé (addition de dénaturants tels que le pétrole, les phtalates et l'isopropanol) ce qui le rend impropre à la consommation humaine.

A titre d'exemple, au Brésil l'utilisation de mélange éthanol-pétrole (E20 à E25) est obligatoire pour les transports de marchandise et 20 % des automobiles utilisent de l'E 100 (éthanol anhydre) comme carburant.

Aux Etats-Unis, le bioéthanol est mélangé dans 80 % des cas aux carburants et le pourcentage d'éthanol a récemment été augmenté (E 10 à E 15).

IV.7. Bioéthanol: marché global, aspects économiques.

IV.7.1. Production mondiale de Bioéthanol

Au niveau du secteur des transports, la combustion des énergies fossiles contribue environ 20% des émissions globales de CO₂. Au vu des problèmes environnementaux liés à ces émissions, le bioéthanol et plus généralement les biocarburants représentent un secteur industriel en pleine croissance. A titre d'exemple, le United States Energy Policy Act de 2005 a créé le Renewable Fuel Standard (RFS) qui a été étendu lorsque le congrès des Etats-Unis décida de mettre en place l'Energy Independence and Security Act en 2007. Cela a permis d'envisager la production de 57 milliards de litres en 2012, 136 milliards en 2022 et environ 150 à l'horizon 2030. Cependant, il faudrait plus de 750 milliards de litres pour couvrir les besoins et remplacer les énergies fossiles actuellement utilisées aux Etats-Unis. En 2010, les Etats-Unis, le plus grand producteur de bioéthanol au monde, a produit 56,8 milliards de litres à partir du maïs mais d'autres cibles (cannes à sucre) devront être utilisées pour atteindre les objectifs fixés.

En 1975, le gouvernement Brésilien a lancé un programme intitulé *Proalcool* pour exploiter l'alcool issu de la canne à sucre en réponse au prix croissant de l'huile utilisé dans les gasoils.

Ceci a permis au Brésil de se hisser sur la seconde marche du podium des plus grands producteurs de bioéthanol au monde avec des champs de canne à sucre dédiés au bioéthanol. D'après les prévisions, la production annuelle sera de 37 milliards de litres à l'horizon 2012/2013. En Europe, la production de bioéthanol croît d'année en année, cela étant dû aux obligations nationales et européennes qui imposent à partir de 2020 que 20% de la consommation énergétique provienne de sources renouvelables et que les biocarburants soient présents à hauteur de 10 % dans le secteur des transports.

Les Etats-Unis, le Brésil et l'Europe font parties des grands producteurs (Figure 24 A). À eux trois, ils représentent 80 % de la production mondiale en bioéthanol bien que les industries chinoises et indiennes se développent et pourraient atteindre 125 milliards de litres en 2017 (Sukumaran, Surender *et al.* 2009). La production européenne est essentiellement basée sur le blé et le sucre de betterave. La France, l'Allemagne et l'Espagne en sont les principaux producteurs (Figure 24 B).

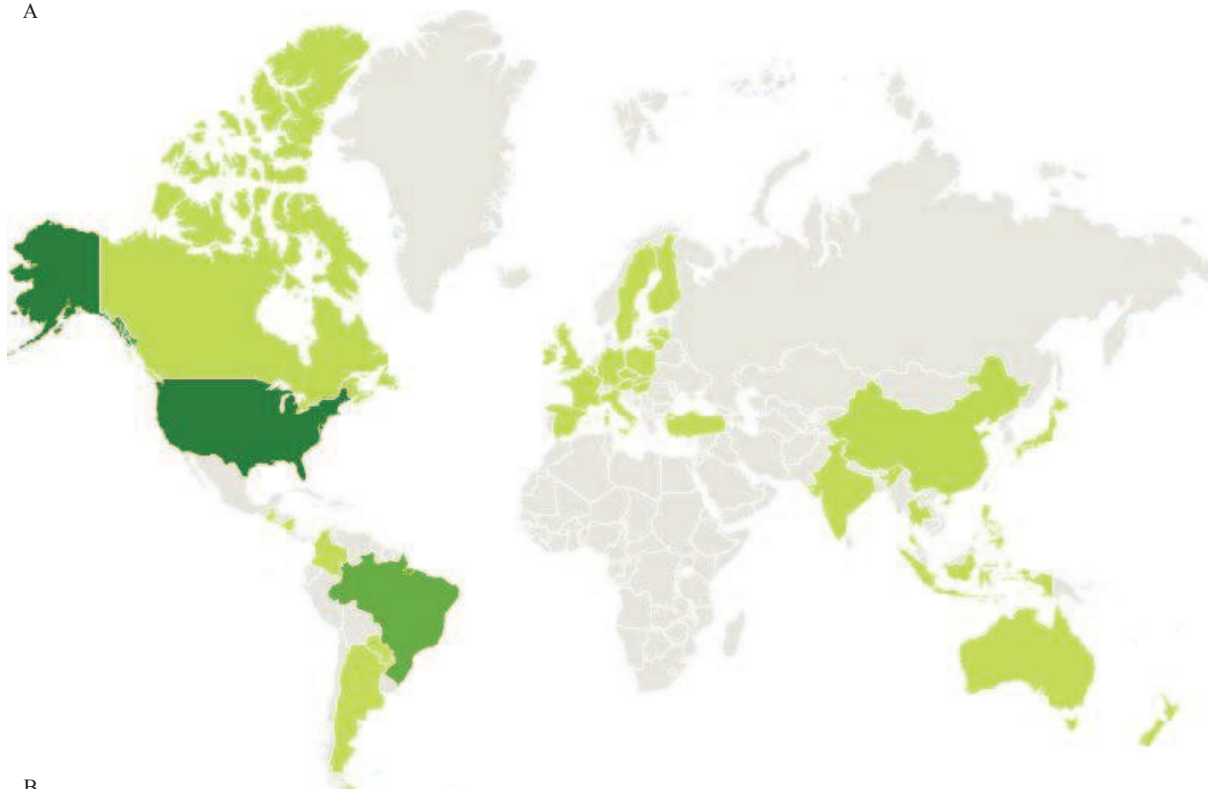
IV.7.2. Aspects économiques

La production de bioéthanol dépend de la biomasse utilisée. Par rapport aux coûts de production du pétrole de l'ordre de 0,25 euro/L, les facteurs tels que la fluctuation du prix des huiles et le coût de production de la biomasse font que le prix de production du bioéthanol reste élevé et instable (de 0,11 à 0,71 euro/L). Ainsi, la canne à sucre brésilienne et les déchets lignocellulosiques sont les biomasses les plus rentables avec des coûts de productions respectifs de 0,16-0,28 et 0,11-0,32 euro/L. Néanmoins l'augmentation du prix du pétrole permet au bioéthanol de rester compétitif.

IV.7.3. Balance énergétique de la production de bioéthanol

En se focalisant sur l'aspect énergétique, la production de bioéthanol et sa consommation énergétique doivent présenter une balance énergétique positive. Dans le cas d'une balance négative cela signifierait que la production de bioéthanol n'est pas rentable par rapport à l'énergie utilisée pour le produire. Actuellement, il est évident que la canne à sucre fait office de référence pour le bioéthanol de première génération au vu de la balance énergétique (supérieure à celle du pétrole) (Table 03). Ceci est en partie dû à la combustion des résidus de cannes à sucres alimentant les distilleries brésiliennes en électricité.

A



B

Pays	Production [Ml]	
Etats-Unis (US)	40130	54%
Brésil (BR)	24900	34%
Chine (CN)	2050	3%
Canada (CA)	1348	2%
France (FR)	1250	2%
Allemagne (DE)	750	1%
Espagne (ES)	465	1%
Thaïlande (TH)	401	1%
Inde (IN)	350	0%
Colombie (CO)	310	0%
Australie (AU)	220	0%
Autriche (AT)	180	0%
Suède (SE)	175	0%
Pologne (PL)	166	0%
Hongrie (HU)	150	0%
Autres	1110	2%
-TOTAL	73954	100%
- dont UE	2855	4%

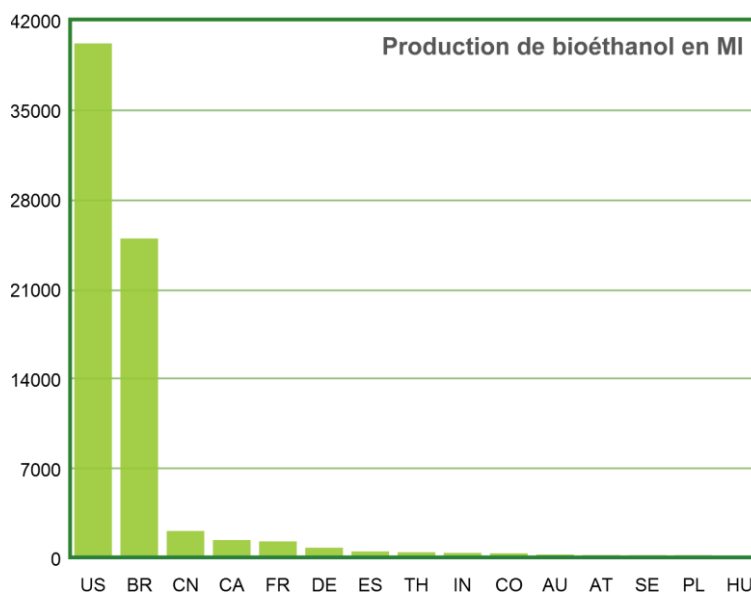


Figure 24. Production de bioéthanol dans le monde en 2009. A : répartition géographique de la production de bioéthanol (plus la production est élevée, plus la couleur verte est sombre). B : production de bioéthanol en millions de litres. Sources: ENERS Energy Concept (Références: eBio (European Bioethanol Fuel Association); RFA (US Renewable Fuels Association); F.O. Licht (FO Licht's World Ethanol & Biofuels Report); EurObserv'ER (Biofuels Barometer / Interactive GIS Barometer); UEPA (European Union of Ethanol Producers); USDA (USDA Foreign Agricultural Service / GAIN reports); UNICA (Brazilian Sugarcane Industry Association)).

Matières premières	Balance énergétique
Canne à sucre	6, 5-9, 5
Sucre de betterave	1, 1-2, 3
Sorgho sucré	0, 9-1, 1
Maïs	1-2

Table 03. Balances énergétiques pour la production de bioéthanol à partir de matières premières utilisées dans les procédés de première génération.

IV.7.4. Aspects environnementaux

La combustion des carburants fossiles contribue à une augmentation de gaz à effet de serre (majoritairement le CO₂) et cause des changements climatiques. Le réseau des transports est responsable de 20 % de ces émissions de gaz. L'utilisation de bioéthanol servirait à réduire ces émissions. La combustion de 18,5 milliards de litres de bioéthanol pourrait éviter la propagation d'environ 8 millions de tonnes de CO₂ dans l'atmosphère, chiffre qui correspondrait à 1,2 million d'automobiles. Le bioéthanol issu de dérivés celluloseux devra réduire de 60% les émissions de gaz à effets de serre (RFA).

IV.7.5. Prochainement

IV.7.5.1 Développement de carburants E20 aux niveaux français et européen

Pour atteindre l'objectif de 10% d'énergie renouvelable consommée en France en 2020 dans le secteur des transports, il est indispensable de mettre sur le marché une essence E20 (20% en volume de bioéthanol) une exigence réglementaire et technique, afin que les constructeurs puissent travailler sur des moteurs adaptés. Elle doit jouer un rôle pilote pour promouvoir ces carburants auprès des institutions européennes, et encourager la mise en place d'une norme européenne.

V.7.5.2 Favoriser le développement des filières superéthanol E85

Les carburants à haute teneur en bioéthanol sont très efficaces pour augmenter rapidement les taux d'incorporation avec un parc de véhicules limité. Le développement de la filière superéthanol-E85 (85% en volume de bioéthanol) nécessite le respect des engagements pris par les constructeurs, les distributeurs et les pouvoirs publics, selon la charte pour le développement du superéthanol signée en 2006.

OBJECTIFS

Le projet Futurol est construit sur la base d'un bioprocédé écologique et économiquement viable de production de bioéthanol de seconde génération. L'utilisation de champignons filamenteux, notamment par l'intermédiaire de secrétomes est devenue chose courante dans les bioprocédés. Ces secrétomes fongiques ont l'avantage de posséder un large éventail d'enzymes lignocellulolytiques fonctionnant selon des mécanismes plus ou moins bien élucidés. Devant la difficulté à convertir la matière lignocellulolytique en sucre fermentescible, des cocktails enzymatiques issus de champignons filamenteux sont utilisés pour dégrader la biomasse lignocellulosique. Afin d'accroître l'efficacité des cocktails et d'en comprendre les mécanismes sous-jacents, nous avons décidé de produire des enzymes fongiques participant à des voies oxydatives de la dégradation de la lignocellulose. Des cibles ont été sélectionnées chez des organismes Basidiomycètes (*Pycnoporus cinnabarinus*) et Ascomycètes (*Podospira anserina*).

En vue d'accroître la production de ces enzymes, ces dernières ont fait l'objet d'expressions hétérologues chez l'hôte *Pichia pastoris*. Enfin, des tests en supplémentation de cocktail enzymatiques commerciaux et des essais synergiques permettront de définir et établir l'intérêt de faire intervenir des enzymes 'auxiliaires' fonctionnant par le biais d'une voie oxydative de dégradation de la matière lignocellulosique.

MATERIEL & METHODE

I. Micro-organismes

La souche monocaryotique ss3 de *P. cinnabarinus* BRFM 137 a été isolée par fructification de la souche dicaryotique I-937 de *P. cinnabarinus* comme décrit précédemment (Herpoel *et al.*, 2000).

La souche de *P. anserina* S mat⁺ a été gracieusement fournie par le Pr. P. Silar (UMR 8621 CNRS, Orsay). La souche X 33 de *P. pastoris* est un composant du système d'expression 'Pichia Easy Select Expression System' ainsi que le vecteur d'expression pPICZαA (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

II. Milieu et condition de culture

II.1. *Pycnoporus cinnabarinus* en condition cellulolytique

P. cinnabarinus a été cultivé à 30°C sur des boîtes MYA₂ (maltose: 20 g/L; extrait de levure: 1 g/L; agar 16 g/L). Après 10 jours d'incubation, des précultures en fioles de Roux contenant 200 ml de milieu ont été inoculées avec cinq disques de gélose MYA₂ colonisés par *P. cinnabarinus* ss3 (Sigoillot *et al.*, 2002). L'inoculum est obtenu après 10 jours de culture statique à 30°C. Une suspension d'inoculum de 10 ml obtenue après broyage des MATs par un broyeur Ultra-Turrax a permis d'inoculer des erlenmeyers bafflés de 500 ml contenant 250 ml d'un milieu composé de : fibres de cellulose medium (Sigma, St. Louis, Mo, USA) (15 g/L); tartrate diammonium (1,84 g/L); tartrate disodium (2,3 g/L); KH₂PO₄ (1,33 g/L); CaCl₂.H₂O (0,1 g/L); MgSO₄.7H₂O (0,5 g/L); FeSO₄.7H₂O (0,07 g/L); ZnSO₄.7H₂O (0,046 g/L); MnSO₄.H₂O (0,035 g/L); CuSO₄.5H₂O (0,007 g/L); extrait de levure (1 g/L); solution de vitamines d'après Tatum *et al.* (Tatum *et al.*, 1950) (1 ml/L); maltose (2,5 g/L) utilisé comme starter et du Tween 80 (1,5 g/L) (Sigoillot *et al.*, 2002).

II.2. *Podospira anserina*

P. anserina S mat⁺ a été cultivé à 27°C sur milieu M2 (KH₂PO₄: 0,25 g/L; K₂HPO₄: 0,3 g/L; MgSO₄.7H₂O: 0,25 g/L; urée: 0,5 g/L; thiamine: 0,05 g/L; biotine: 0,25 µg/L; acide citrique: 2,5 mg/L; ZnSO₄: 2,5 mg/L; CuSO₄: 0,5 mg/L; MnSO₄: 125 µg/L; acide borique: 25 µg/L; molybdate de sodium: 25 µg/L; alumine de fer: 25 µg/L; dextrine: 5 g/L; extrait de levure: 10 g/L; agar: 12,5 g/L ; le pH a été ajusté à 7 avec KH₂PO₄). Des précultures en fioles de roux contenant 200 ml de milieu M2 liquide ont été inoculées avec cinq disques (0,5 cm de diamètre) d'une culture de *P. anserina* sur boîte M2. Après cinq jours d'incubation à 27°C, la suspension servant d'inoculum a été obtenue en broyant 7 MATs avec un Ultra-Turax dans

200 ml d'eau stérile. Dix ml de cette suspension ont été utilisés pour inoculer des fioles bafflées de 500 ml contenant 100 ml de milieu liquide M2.

II.3. *Pichia pastoris*

La composition des milieux ainsi que les protocoles utilisés dans le cadre des expressions hétérologues de la rCDH et des rPaGH61s sont décrits dans le manuel d'expression de *Pichia* (Invitrogen).

II.4. *Escherichia coli*

Les procédures de sous-clonages effectuées pour le clonage de la rCDH ont été réalisées en utilisant les cellules compétentes *Escherichia coli* TOP 10 et DH5α. Les milieux de cultures sont décrits par le fournisseur (Invitrogen).

III. Isolation de l'ARNm et clonage de l'ADNc : *cdh* de *P. cinnabarinus*

L'isolation des ARN totaux a été réalisée sur le mycélium récolté après quatre jours de culture de *P. cinnabarinus* en condition cellulolytique (voir II. Milieu et condition de culture).

Le kit 'Total RNA Purification from Plant' (Macherey-Nagel, Düren, Germany) a permis d'isoler les ARNt et l'ADN contaminant présent a été digéré par une Turbo DNase (Ambion Inc., Austin, TX, USA). La synthèse d'ADN simple brin a été effectuée en utilisant une reverse transcriptase Superscript (Invitrogen) et des oligo (dT18). Les précédentes étapes ont toutes été réalisées en respectant les instructions des fournisseurs. L'ADNc de la *cdh* a été amplifié à l'aide d'amorces spécifiques (dont les sites de restriction ont été soulignés) : amorce forward *cdhF* (5' TA GAA TTC CAA GTG GCA GCG CCA TAC 3') l'amorce reverse *cdhR* (5' TA TCT AGA CCA GGA CCT CCC GCA AGG GC 3'), ces dernières ont été dessinées à partir de la séquence du gène *cdh* de *P. cinnabarinus* I-937 (NCBI id : AF081574). L'amplification a été réalisée à partir du mélange réactionnel suivant : 315 ng d'ADNc, 300 pmol de chaque amorces *cdhF* et *cdhR*, 200 μM de dNTPs, et 0,5 U de Pfu DNA polymérase (Promega, Madison, WI, USA) (Table 04). Le programme utilisé pour l'amplification se compose des étapes décrites ci-après: 1 cycle à 95°C pendant 5 min, 30 cycles constitués chacun de trois étapes (95°C durant 1 min; 65°C pendant 30 s et 72°C pendant 4 min) complété par une étape finale de 10 min à 72°C. Les amplifications PCR générées par la Pfu DNA polymérase ont des extrémités franches, afin d'ajouter une queue poly-A sur ces fragments PCR avant le sous-clonage dans le vecteur pGEM-T Easy, la Taq DNA polymérase (Promega) a été utilisée comme décrit dans le manuel technique 'pGEM-T

Easy vector' de Promega. Le produit PCR de 2,3 kb a été purifié en utilisant le kit d'extraction Qiaquick (Qiagen, Valencia, CA, USA) puis sous-cloné dans le vecteur pGEM-T Easy (carte du vecteur Fig. 25).

Le séquençage de l'ADNc de la *cdh* a permis d'attester, à l'aide de trois amorces, l'intégrité de la séquence : deux amorces universelles (SP6 et T7) et une amorce dessinée pour le gène de *cdh*, *cdh_{int}* (5' CGA CGC CCA GAA CTC GAA C 3') (GATC Biotech, Mulhouse, France). La séquence de *P. cinnabarinus* a été déposée dans la banque de données NCBI (numéro d'accessibilité GenBank: BankIt1421219 Pycnopus HQ825322). Les comparaisons de séquences entre la *cdh* de *P. cinnabarinus* I-937 (numéro d'accessibilité GenBank: AF081574.1), la *cdh* de *T. versicolor* (numéro d'accessibilité GenBank: AY187939.1) et la *cdh* de *P. chrysosporium* (numéro d'accessibilité GenBank: U46081.1) ont été effectuées avec le logiciel ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Protéines	Sens	Anti-sens
CDH	TA <u>GAA TTC</u> CAA GTG GCA GCG CCA TAC	TA <u>TCT AGA</u> CCA GGA CCT CCC GCA AGG GC
<i>PaGH61A</i>	<u>AGGGGTATCTCTCGAGAAAAGA</u> CACGGCCACGTCTCCC	<u>GAGTTTTGTCTTAGACCGATGC</u> - ACTGGCTGTAGTAAG
<i>PaGH61B</i>	<u>AGGGGTATCTCTCGAGAAAAGA</u> CATTCCACCTTCCAACAGC	<u>GAGTTTTGTCTTAGACCCACGC</u> ACTGGTGATACCA

Table 04. Récapitulatif des amorces utilisées pour amplifier les gènes codant pour la CDH et les GH61 A, B . Les amorces sont orientées dans le sens 5'→3'. Les parties soulignées représentent les sites de restrictions EcoRI (amorce sens) et XbaI (amorce anti-sens) pour la CDH. Pour les trois GH61, les parties soulignées représentent des séquences d'extensions homologues au vecteur pPICZα (Infusion).

III. 1. Construction du vecteur d'expression pPiCzaA-*cdh*

L'ADNc de la *cdh* a été sous-cloné dans le vecteur pGEM-T Easy, après propagation du vecteur chez *E. coli* TOP 10 puis digéré par EcoRI/XbaI et purifié avec le kit d'extraction sur gel Qiaquick. En parallèle, le vecteur pPICZαA a été linéarisé avec les mêmes enzymes de restrictions et la ligation de l'ADNc de la *cdh* a été réalisée au niveau du site situé entre la séquence codant pour le facteur de sécrétion (α -factor de *S. cerevisiae*) et une séquence codant à une étiquette poly-(His)₆ (carte du vecteur Fig. 25B). Le vecteur d'expression pPICZαA-*cdh* a été purifié par Midiprep Qiagen et séquence en utilisant les amorces 3'AOX et 5'AOX afin

de confirmer la bonne insertion de la séquence. Les cartes des vecteurs utilisés pour le clonage et l'expression sont représentées en figure 25.

IV. Isolation d'ARNm et clonage de l'ADNc : *gh61* de *P. anserina*

Un carré d'agar (1 mm²) d'une culture de *P. anserina* sur milieu M2 a été placé dans 500 µl de H₂O et broyé au FastPrep (MP Biomédical, Santa Ana, Californie) pendant 30 s. La suspension obtenue a été utilisée pour inoculer des fioles de Roux contenant 200 ml de milieu liquide M2. Le mycélium a été récolté après 7 jours de culture à 27 ° C puis broyé dans un mortier sous azote liquide. L'isolement des ARN totaux a été effectué sur le mycélium de *P. anserina*, récolté après 3 jours de culture sur des milieux contenant de la cellulose ou du xylane. Les ARNm sont purifiés à l'aide du kit 'mRNA isolation Kit' en respectant les instructions du fournisseur (Roche, Boulogne-Billancourt, France). Une première étape consiste à hybrider les ARNm à des sondes oligo liées à la biotine, qui par affinité à la streptavidine fixée à des particules magnétiques, va permettre la purification des ARNm d'intérêts. Les billes sont séparées grâce à un portoir magnétique, lavées et décrochées en utilisant de l'eau stérile contenant du pyrocarbonate d'éthyle (DEPC). L'ADN contaminant a été digéré par Turbo DNase (Ambion Inc, Austin, TX, Etats-Unis) conformément aux instructions du fabricant. La synthèse des brins d'ADNc a été réalisée à l'aide d'une transcriptase inverse SuperScript (Invitrogen) et d'oligo (DT18) suivant les instructions du fabricant. Les amplifications des ADN complémentaires de *Pagh61A*, B ont été réalisées avec des amorces spécifiques (la partie spécifique du vecteur est soulignée) se basant sur le système Clontech In-Fusion ® PCR Cloning System (Takara Bio Inc., Japon). Cette technologie permet de fusionner par homologie l'extrémité du fragment de PCR à l'extrémité homologue du vecteur linéarisé pPICZαA (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Fig. 26 et carte du vecteur Fig. 25). Les amorces spécifiques ont été dessinées à l'aide de l'outil de conception d'amorces In-Fusion ®.

L'amorce forward *Pagh61A* F: (5' AGGGGTATCTCTCGAGAAAAGACACGGCCA-CGTCTCCC 3') et l'amorce reverse *Pagh61A* R: (5' GAGTTTTTGTCTAGACCGATGC-ACTGGCTGTAGTAAG 3') ont été conçues à partir du gène *P. anserina* S mat⁺ *gh61A* (NCBI geneID : CAP 73254.1). L'amorce forward *Pagh61B* F: (5' AGGGGTATCTCTCGAGAAAAGACATTCCACCTTCCAACAGC 3') et l'amorce reverse *Pagh61B* R: (5'GAGTTTTTGTCTAGACCCACGCACTGGTGATACCA 3 ') ont été conçues à partir du gène *P. anserina* S mat⁺ *gh61B* (NCBI geneID : CAP 68375.1) (Table 04).

L'amplification a été réalisée avec le système PCR Expand High Fidelity PCR en suivant les instructions du fournisseur (Roche). La réaction a été réalisée avec le programme d'amplification suivant: 1 cycle à 94 ° C pendant 2 min, 30 cycles composés de trois étapes pour chaque cycle (94 ° C pendant 15 s; 58 ° C pendant 30 s et 72 ° C pendant 55s), et une étape finale de 72 ° C pendant 7 min.

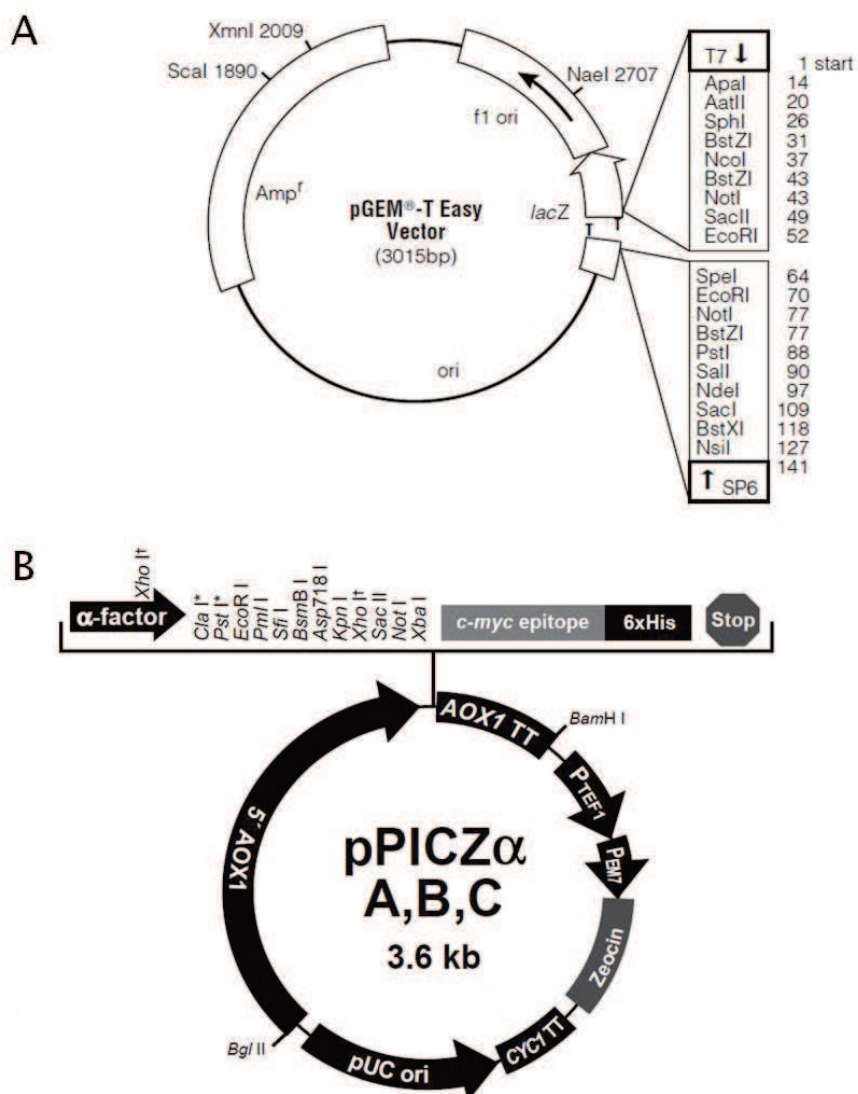


Figure 25: Cartes des vecteurs utilisés pour les expressions hétérologues de la CDH de *P. cinnabarinus* ss3 et des GH61 A et B de *P. anserina*. (A) carte du vecteur de sous-clonage pGEM-T Easy (Promega) utilisé lors de l'expression de la CDH. (B) carte du vecteur d'expression pPICZα (Invitrogen). La version A du vecteur pPICZα a été utilisée pour l'expression hétérologue de la CDH et des GH61 chez *P. pastoris*. Cette version ne contient pas les sites de restriction pour Cla I (version C) et Pst I (version B)

IV.1. Construction des vecteurs d'expressions pPiCzaA-*Pagh61A*, pPiCzaA-*Pagh61B*

Les produits PCR ont été fusionnés aux vecteurs pPICZα-A linéarisés en utilisant les enzymes du kit In-fusion® puis purifiés avec le kit d'extraction sur gel QIAquick. Le vecteur d'expression ne possède qu'un seul site de coupure sur les deux présents à l'origine. En effet, le site de coupure Kex2 composé par la séquence Glu-Lys-Arg précède l'histidine en position 1 des GH61A et GH61B. Dans la littérature, cet acide aminé (His) est essentiel à l'obtention d'une GH61 mature et active. La séquence Glu-Ala-Glu-Ala a été éliminée en raison d'interférences causées par les répétitions du Glu-Ala laissées par Ste13, l'une des enzymes de maturation ne coupant pas au niveau de son site. L'ADNc des *Pagh61A* et B a été séquencé (GATC Biotech, Mulhouse, France) en utilisant les amorces universelles SP6 et T7.

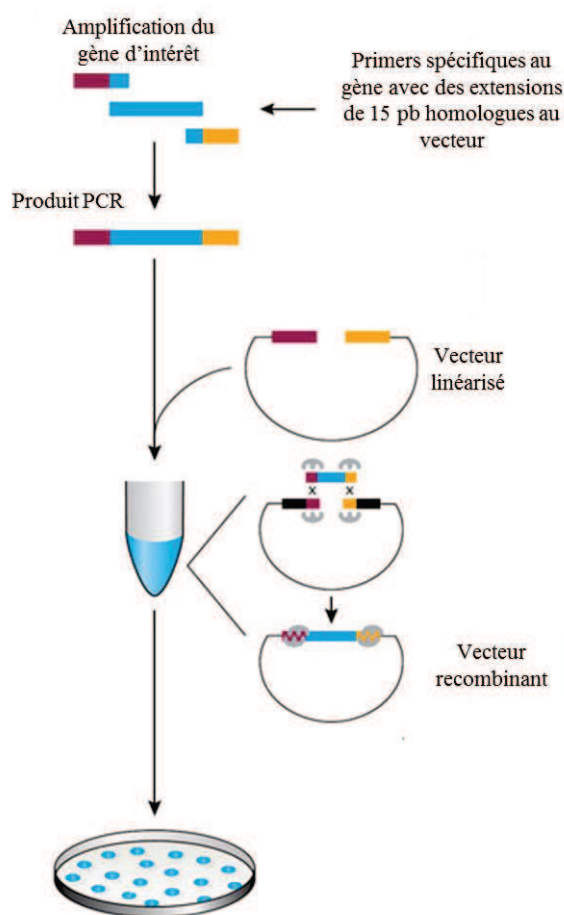


Figure 26. Technique de clonage par le système In Fusion®.

V. Transformation et sélection

La transformation des cellules compétentes X 33 de *P. pastoris* a été réalisée par électroporation après linéarisation de pPICZα A-*cdh*, pPICZα A-*Pagh61A*, pPICZα A-

Pagh61B par *PmeI* comme décrit par Couturier *et al.*, 2010 (Couturier *et al.*, 2010). Le vecteur *pPICZαA* sans insert a été utilisé en tant que contrôle. Les transformants ont été sélectionnés une première fois sur boîtes YPDS à différentes concentrations en zéocine (de 100 à 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Après incubation à 30°C, les transformants ont été repiqués sur des boîtes dextrose minimum (MD) et transférés sur des boîtes méthanol minimum (MM). Les transformants *P. pastoris* résistant à la zéocine ont été choisis pour leurs taux d'expressions à travers une sélection dans 10 ml de BMGY (en tube de 50 ml) à 30°C sous agitation orbitale (200 rpm) pendant 16 h jusqu'à ce que la DO 600 atteigne une valeur comprise entre 2 et 6. L'expression est ensuite induite en transférant les cellules dans 2 ml de milieu BMMY incubé pendant 3 jours dans les mêmes conditions complétées par un ajout quotidien de 3% (v/v) de méthanol. Les surnageants sont ensuite analysés par SDS-PAGE pour déterminer quel transformant montre la meilleure sécrétion de rCDH, rPaGH61A et B.

VI. Production en fioles agitées de recombinants chez *P. pastoris*

Après sélection du transformant présentant la meilleure expression de rCDH, celui-ci a été cultivé dans un litre de milieu BMGY en fioles comme décrit précédemment. Les cellules ont été transférées dans 200 ml de milieu BMMY et maintenues à 30°C pendant 4 jours avec une agitation constante à 200 rpm et ajout quotidien de 3% (v/v) de méthanol.

VII. Production en bioréacteur de souches recombinantes de *P. pastoris*

Les cultures des souches recombinantes de *P. pastoris* produisant de façon hétérologue la GH61A ou B de *P. anserina* ou la CDH de *P. cinnabarinus* ont été réalisées en fermenteur de 2 L pour un volume de culture de 1,5 L. Une préculture inoculée de 100 ml a été réalisée en fiole de 500 mL agitée à 160 rpm dans du milieu BMGY durant 60 h à 28°C sous 130 rpm de sorte que la DO₆₀₀ atteigne la valeur de 1. Cette préculture a ensuite été utilisée pour ensemençer le fermenteur de 2 L.

Un milieu basal (40 g/L de glycérol ; 26,7 ml/L de H₃PO₄ (85%) ; 14,9 g/L de MgSO₄·7H₂O ; 0,93 g/L de CaCl₂ ; 7,7 g/L de KCl ; 4,13 g/L de KOH et 4,35 ml/L de solution saline PTM₁) a été utilisé pour la phase de 'batch'.

La culture en bioréacteur a été réalisée à 30°C, 600 rpm et le pH ajusté constamment à 5 avec de l'hydroxyde d'ammonium (28% v/v). Le flux total d'O₂ a constamment été maintenu à 0,3 vvm (volume de gaz par volume de milieu 'batch' et par minute).

La phase de 'batch' (phase I) a duré 24 h, après quoi, 50 g de sorbitol ont été ajoutés avec 0,5% de méthanol (5 ml) au fermenteur jusqu'à ce que les levures se soient adaptées au méthanol soit trois heures plus tard (phase II). La phase d'induction (phase III) a été réalisée durant 72 h. Du méthanol contenant 12 ml/L de solution saline PTM₁ a été chargé constamment à 5ml/L et l'agitation fixée à 800 rpm afin de conserver l'oxygène dissous à 20%. La température au sein du bioréacteur a été fixée à 25°C afin de favoriser le bon repliement des GH61 A et B en permettant une maturation lente de la protéine. Concernant la production de rCDH la température a été maintenue à 30°C.

VIII. Purification

VIII.1. Ultrafiltration

Le surnageant de culture a été concentré au minimum 10 fois en utilisant des unités de centrifugation Amicon (Millipore, Bedford, MA, USA) possédant un seuil de coupure de 30 kDa. L'étape de centrifugation a été réalisée à 4000 x g. Les cassettes d'ultrafiltration Amicon vivaflow (Millipore, Bedford, MA, USA) ont été utilisées lorsque le volume de culture était plus important (culture en bioréacteur).

VIII.2. Colonne nickel

Les surnageants ultrafiltrés et concentrés sont dialysés contre un tampon A (Tris-HCl 50 mM 7,8, NaCl 150 mM, imidazole 10 mM) et les échantillons chargés sur une colonne (0.7 × 5 cm) nickel composée d'une résine chélatant les résidus histidine (GE Healthcare, Buc, France). La colonne est connectée à un système FPLC Äkta (GE Healthcare) et équilibrée avec le tampon A. Les enzymes recombinantes possédant une queue poly-Histidine en position C-terminale ont été éluées avec le tampon B (Tris-HCl 50 mM pH 7,7, imidazole 500 mM, NaCl 150 mM). Les fractions montrant une activité ont été regroupées, concentrées et dialysées contre un tampon acétate de sodium (50 mM, pH 5). Dans le cas des *rPaGH61A* et *B*, des gels SDS-PAGE ainsi qu'un test de concentration en protéines suivant le protocole de Bradford ont été réalisés sur les différentes fractions pour attester de la présence de l'enzyme.

VIII.3. Tamisage moléculaire

Lors des essais sur PASC, les échantillons ont subi une étape de purification supplémentaire par tamisage moléculaire sur une colonne (16 mm x 100 cm) Sephacryl 200 HR (GE Healthcare) équilibrée avec un tampon HEPES-NaCl buffer (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM)

pH 5, également utilisé pour dialyser les échantillons avant purification. Les fractions de la partie centrale du pic montrant la présence d'enzyme ont été regroupées, concentrées et dialysées contre un tampon acétate de sodium 50 mM, pH 4,8.

IX. SDS-PAGE, Western-blot et zymogramme

L'électrophorèse en gel polyacrylamide (SDS-PAGE) (12%) a été préparée comme décrit par Laemmli (Laemmli, 1970). La révélation des bandes a été effectuée au bleu de Coomassie G 250. En condition dénaturante, la masse moléculaire des protéines analysées a été déterminée en utilisant un marqueur constitué de protéines standard de références (LMW, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France ou unstained protein molecular weight marker, Euromedex, Souffelweyersheim, France).

IX.1. Zymogramme

IX.1.1. Sans traitement thermique

Les tests d'activités enzymatiques ont été réalisés sur gel polyacrylamide contenant le substrat correspondant à l'activité enzymatique recherchée. Les préparations enzymatiques sont chargées sur gel SDS-PAGE co-polymérisé avec, au choix : 0,2 % de xylan soluble, 0,2 % de carboxymethylcellulose (CMC) ou 0,2 % de gomme de caroube correspondant respectivement aux activités xylanase, CMCase et mannanase. Les échantillons protéiques sont mélangés à un tampon de charge (3% SDS w/v; 10% glycérol w/v; 30 mM Tris-HCl pH 6.8) sans agent réducteur (type β -mercaptoéthanol) et chauffés à 100 °C pendant 1 min avant séparation en utilisant un gel polyacrylamide à 12 % (N.B : les zymogrammes réalisés avec les *PaGH61s* ont subi deux traitements, dénaturant et non dénaturant). Après l'électrophorèse, le gel est lavé avec de l'eau déionisée et trempé dans une solution de Triton X 100 (surfactant non-ionique permettant d'éliminer le SDS) à 2,5 % (v/v). Après une heure d'incubation à 4°C, le gel est trempé dans un tampon acétate de sodium à 100 mM (pH 5) et incubé sous faible agitation pendant 2 h à 45°C pour la détection des activités xylanases et CMCases. Concernant les activités GH61 sur CMC, les gels ont été incubés en présence de 5 mM d'acide ascorbique et de 50 mM d'acétate de sodium pH 4, 8 sous agitation toute une nuit. Pour la détection de l'activité mannanase, le gel est incubé dans un tampon phosphate de sodium à 100 mM (pH 7) pendant 1 heure à 50°C. Après incubation, les gels sont colorés avec une solution de rouge congo à 0,1 % sous faible agitation pendant 1 heure et décolorés avec une solution de NaCl 1 M pendant 1 heure. Les bandes montrant une activité xylanase,

CMCase et mannanase sont décolorées par rapport au restant du gel qui apparaît rouge sombre.

IX.1.2. Avec traitement thermique

Concernant les zymogrammes CDH, laccase et GH61, les échantillons ne subissent pas le même traitement mais sont cependant chargés avec le même tampon que décrit précédemment, la différence majeure réside dans l'absence de chauffage à 100°C. Ceci s'explique par le fait que ces enzymes contiennent des métaux et que la dénaturation de ces enzymes empêcherait la renaturation complète et la chélation des métaux. La dénaturation par chauffage est remplacée par une incubation de 15 min à température ambiante avant chargement sur gel SDS-PAGE. Après l'électrophorèse, le gel est trempé dans une solution contenant 2,5 % de Triton X 100 pendant 1 heure à 4°C puis rincé avec de l'eau déionisée et incubé pendant 2 heures à 25°C dans un tampon acétate de sodium à 50 mM (pH 5) contenant du fluorure de sodium à 4 mM pour la CDH et un tampon tartrate de sodium à 50 mM (pH 4) pour la laccase. Les zymogrammes *PaGH61s* sur CMC en condition non dénaturante ont été incubés toute une nuit à 45°C en présence de tampon acétate de sodium 50 mM, pH 4,8 contenant 5 mM d'acide ascorbique. Pour visualiser l'activité laccase, une solution ABTS à 5 mM est ajoutée jusqu'à coloration de bandes. L'activité CDH est visualisée en ajoutant une solution de DCPIP à 50 mM colorant le gel en noir puis en additionnant une solution de cellobiose à 100 mM décolorant les bandes présentant une activité CDH. Le protocole de révélation d'une activité GH61 sur CMC est identique à celui précédemment cité (cf. zymogramme sans traitement thermique).

IX.2. Western-blot

Les analyses en Western blot ont été effectuées en utilisant les anticorps monoclonaux anti-poly-histidine conjugués à une phosphatase alcaline (Sigma). Pour les analyses réalisées sur la CDH recombinante exprimée chez *P. pastoris*, l'enzyme purifiée a été chargée sur un gel polyacrylamide à 12 %. Après électrophorèse, la rCDH a été transférée sur une membrane PVDF en utilisant le système iblot Dry Blotting (Invitrogen). La membrane a ensuite été placée dans un système de détection Snap Protein (Millipore, Bedford, MA, USA) utilisé pour l'immunodétection. Suivant les instructions du fournisseur, la membrane PVDF a été incubée dans une solution de blocage TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 8) contenant 0,1 % de lait en poudre écrémé. La membrane est ensuite lavée avec une solution TBS et l'immunodétection réalisée en utilisant les anticorps monoclonaux cités

précédemment Les bandes sont détectées par une réaction initiée par l'ajout de 60 µl de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate), 60 µl de NBT (4-nitro blue tetrazolium) (Roche Applied Science, Meylan, France) dans 20 ml d'un tampon carbonate 0,05 M pH 9,6 contenant 5 mM de MgCl₂.

Le clivage par la papaïne des deux domaines composant la CDH a été effectué comme décrit par Henriksson *et al.* (Henriksson *et al.*, 1991). La déglycosylation a été réalisée en utilisant la PGNase (New England Biolabs, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) suivant les instructions du fournisseur.

X. Détermination de la concentration en protéine

La concentration en protéine a été déterminée en utilisant le Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), basé sur la procédure décrite par Bradford et en utilisant l'albumine de sérum bovin comme standard (Bradford, 1976).

XI. Construction de modèles basés sur des structures cristallines connues

Les modèles structuraux de *PaGH61A* et *PaGH61B* ainsi que des deux parties composant la CDH ont été construits en utilisant le logiciel SWISS-MODEL workspace afin de prédire les structures et construire un modèle à partir d'une homologie la plus proche possible de la structure cristallographique connue (Arnold *et al.*, 2006). La structure cristalline de la GH61E de *Thielavia terrestris* (PDB ID: 3EJA) a été utilisée comme support pour la construction du modèle *PaGH61B* (PMDB id : PM0077893) avec un pourcentage d'identité de la séquence peptidique de 31% (Harris *et al.*, 2010). Concernant le modèle de *PaGH61A* (PMDB id : PM0077918), la structure de la GH61A de *T. aurantiacus* (PDB ID : 2YET) a servi de base à la construction de ce modèle dont le pourcentage d'identité était de 49% (Quinlan *et al.*, 2011). Les modèles basés sur les parties flaviniques (rCDHf) (PMDB id : PM0077890) et hémiques (rCDHh) (PMDB id : PM0077892) de rCDH ont été construits en se basant respectivement sur les structures connues de la partie flavinique de la CDH de *P. chrysosporium* (PDB ID : 1KDG) et celle de la partie hémique de la même enzyme (PDB ID : 1D7C) (Hallberg *et al.*, 2002 ; Hallberg *et al.*, 2000). Ces dernières montrent, respectivement, une identité de séquence peptidique de 79% et 62% pour les structures existantes de la CDH de *P. chrysosporium*.

Les modèles ont été choisis suivant l'identité de séquence et l'estimation de la qualité des modèles. Les représentations de ces modèles ont été réalisées avec PyMOL (The PyMOL

Molecular graphics System, Version 1.1, DeLano Scientific, USA). Les trois constructions sont enregistrées sur la base de données Protein model database (<http://www.caspar.it/PMDB>). Le docking protéine-protéine entre le modèle de la partie hémique de la CDH de *P. cinnabarinus* et le modèle de la GH61B de *P. anserina* a été réalisé avec Cluspro 2.0 (Structural Bioinformatics Lab, Boston University) puis représenté sous PyMOL (Kozakov *et al.*, 2006 ; Kozakov *et al.*, 2010 ; Comeau *et al.*, 2004 ; Comeau *et al.*, 2004).

XII. Alignement des séquences PMO et GH61

L'alignement des séquences en acides aminés de différentes GH61 et PMO connues a été réalisé sous clustal Ω (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Les identifiants Genbank pour les différentes séquences sont les suivants : *N. crassa* : NcPMO-2 (CAD21296.1), NcPMO-3 (EAA33178.1), NcGH61-3 (EAA36362.1) ; *Myceliophthora thermophila* : MtGH61A (AEO56542.1) ; *Thermoascus aurantiacus* : TaGH61A (ABW56451.1) ; *P. anserina* : PaGH61A (CAP73254.1) et PaGH61B (CAP68375.1) ; *T. reesei* : TrGH61A (CAA71999.1) ; *Thielavia terrestris* : TtGH61B (AEO69043.1), TtGH61E (ACE10234.1) ; *P. chrysosporium* : PcGH61D (BAL43430.1).

XIII. Etude de fixation de la CDH à la cellulose

Les essais ont été réalisés avec 1 mg/ml d'Avicel PH-101 (Sigma) dans un tampon citrate phosphate à 50 mM (pH 5) sous agitation orbitale à température ambiante. L'enzyme recombinante rCDH a été ajoutée à différentes concentrations comprises entre 0,02 et 0,8 $\mu\text{g/L}$. Après trois heures, l'Avicel PH-101 est éliminé par centrifugation et la concentration en enzymes libres ([EL], μM) dans le surnageant est mesurée par un test d'activité. La concentration en enzyme fixée ([EF], μmol par gramme d'Avicel PH-101) a été déterminée en soustrayant [EL] à la concentration totale en protéine. Tous les tests ont été effectués en triplicats. Les paramètres d'adsorption ont été déterminés comme décrit par Couturier *et al.*, (2010), méthode basée une courbe typique en double inverse représentant l'équation $[B] = [UB] \times [B]_{\text{max}} / (K_d + [UB])$, où K_d (μM) et $[B]_{\text{max}}$ (μmol par gramme d'Avicel PH-101) représentent respectivement la constante de dissociation et la quantité maximale de protéine fixée. Deux contrôles ont été réalisés, un sans rCDH et un autre avec de la BSA à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pour estimer la fixation aspécifique de rCDH.

XIV. Activités enzymatiques

Pour mesurer les activités enzymatiques présentes dans le surnageant de culture de *P. cinnabarinus*, le surnageant a été centrifugé pendant 5 min à 3500 rpm et filtré à travers une membrane de porosité 0,45 μm . (Millipore, Bedford, MA, USA). Les activités CDH ont été déterminées en mesurant la réduction du 2,6-dichlorophénol indophénol (DCPIP) à 50 mM dans un tampon acétate de sodium à 100 mM (pH 5) contenant 2 mM de cellobiose et 4 mM de fluorure de sodium (utilisé en tant qu'inhibiteur de l'activité laccase). La diminution de l'absorbance à 520 nm ($\epsilon = 6800 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) a été mesurée à 30°C pendant 1 min. L'activité CDH peut également être mesurée en observant la réduction du cytochrome c (cyt c) à 50 μM dans un tampon acétate de sodium à 100 mM (pH 5) contenant 2 mM de cellobiose. Cette fois la diminution de l'absorbance se fait à 550 nm ($\epsilon = 33,700 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et est réalisée à 30°C pendant 1 min. L'activité glucose oxydase a été déterminée en utilisant le test D-gluconic acid / D-glucono- δ -lactone (Megazyme). La détermination de l'activité laccase a été réalisée en observant l'oxydation de 5 mM d'ABTS (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) à 420 nm (coefficient d'extinction molaire : $36,000 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dans un tampon tartrate de sodium à 50 mM, pH 4. L'activité lignine peroxidase est déterminée par spectrophotomètre à 30°C d'après la méthode de Tien et Kirk (Tien et Kirk 1988). L'activité manganèse peroxydase est mesurée par la méthode mise au point par Paszczynski *et al.* (Paszczynski *et al.*, 1985) en utilisant le peroxyde d'hydrogène et la vanillylacétone comme substrat.

Toutes les activités enzymatiques sont exprimées en unités internationales (UI). Une unité étant définie comme la quantité d'enzyme transformant 1 μmol de substrat en une min.

Les tests d'hydrolyse pour les glycosidases sont effectués dans un tampon acétate à 50 mM (pH 5) contenant 1 mM de substrat dans un volume final de 100 μl .

Les substrats pNP- β -D-glucopyranoside, pNP- β -D-cellobiopyranoside, pNP- β -D-xylopyranoside, α -D-galactopyranoside et pNP- β -D-mannopyranoside ont été commandés chez Sigma. Les tests sont réalisés avec 0,5 et 1 μg de protéine, incubé à 37°C pendant 1 h sous agitation (300 rpm). La réaction est stoppée par addition de 130 μl de Na_2CO_3 à 1 M. L'absorbance est ensuite mesurée à 410 nm. Un contrôle est effectué avec 100 μl de tampon acétate à 50 mM (pH 5) et une gamme référence de 4-nitrophényl dont les concentrations sont comprises entre 0,02 et 0,2 mM est mesurée en parallèle. L'activité enzymatique est basée sur un test colorimétrique des pNP libres dans le milieu réactionnel après hydrolyse du substrat. L'activité spécifique est exprimée en U/mg de protéines.

D'autres tests d'hydrolyse ont été réalisés dans un tampon acétate à 50 mM (pH 5) contenant 1 % (w/v) de substrats. La carboxyméthylcellulose (CMC, basse viscosité) et la pectine d'agrumes ont été fournies par Sigma. L'arabinoxylane de blé (basse viscosité) et le galactomannane (basse viscosité) proviennent de la société Megazyme. Ces tests enzymatiques ont été réalisés avec 10 et 30 µg de protéines, incubées à 37 °C pendant 1 heure sous agitation (150 rpm). Les sucres réducteurs libérés durant l'hydrolyse ont été quantifiés après ajout de DNS (acide 3, 5-dinitrosalicylique) et mesure de la DO à 540 nm comme décrit par Navarro *et al.*, 2010 (Navarro *et al.*, 2010). Les contrôles ont été effectués avec un tampon acétate 50 mM (pH 5) et une gamme glucose (1 à 10 mM) mesurée en parallèle de chaque séries. L'activité enzymatique est exprimée en U/mg de protéines. L'absorbance du sécrétome a été mesurée en triplicats puis soustraite aux valeurs des échantillons. Tous les essais ont été réalisés en triplicats.

XV. Effet du pH et de la température sur l'activité et la stabilité de CDH

Afin de déterminer le pH optimum de la CDH, l'activité a été mesurée par la réduction du DCPIP en utilisant un tampon citrate phosphate à 50 mM avec une gamme de pH comprise entre 2,5 et 7 à 30°C. L'optimum de température a été déterminé avec le DCPIP dans un tampon citrate phosphate 50 mM (pH 5) à des températures variant de 10 à 80°C. La thermostabilité de la CDH a été déterminée en incubant l'enzyme pendant 33 heures à 45, 50 et 55°C et 10 heures à 65°C. Tous les tests ont été réalisés en triplicats.

XVI. Cinétiques enzymatiques

Les paramètres cinétiques ($V_{\max}$ and K_m) ont été déterminés par l'oxydation du cellobiose mesurée à 30°C dans un tampon citrate phosphate 50 mM (pH 4,5) en utilisant le DCPIP ou le cytochrome c. La concentration en cellobiose varie de 10 à 700 µM avec les deux accepteurs d'électrons (DCPIP et cyt c). Les réactions ont été effectuées en triplicats pour s'assurer de la bonne détermination des paramètres cinétiques. Le logiciel Graphpad prism v.4 (Graphpad Software) a été utilisé pour le calcul de la régression linéaire et la détermination des paramètres cinétiques.

XVII. Tests de réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+}

La réduction des ions ferriques en ions ferreux a été réalisée avec ou sans ajout de 4 μg de CDH recombinante dans 3 ml de tampon acétate de sodium (50 mM, pH 4,8) contenant 500 μl d'une solution de FeCl_3 à 10 mM fraîchement préparée, 500 μl d'une solution de ferrozine à 15 mM et 10 mM de cellobiose. La réduction des ions ferriques est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 562 nm liée à la réaction de la ferrozine ($\epsilon = 27900 \text{ } \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) avec les ions ferreux formés (Gibbs, 1976). Les essais ont été effectués en triplicats et mesurés à intervalles réguliers pendant 50 min.

XVIII. Mesure de la production de radicaux hydroxyles

Les différents essais de production de radicaux hydroxyles ont été réalisés dans 2 ml de tampon acétate de sodium (50 mM, pH 4,8) contenant une solution de 2-D-desoxyribose à 4 mM, 10 mM de cellobiose, 1,8 mM de H_2O_2 et 0,1 mM d'une solution fraîchement préparée de FeCl_3 ou de CuSO_4 . Les essais sont effectués en tubes Falcon de 15 ml (BD Bioscience) incubés 3h à 30°C sous agitation orbitale. Après incubation, 1 ml d'une solution d'acide thiobarbiturique (1% (w/v) dans 0,05 mM de NaOH) et 1 ml d'acide trichloracétique (2,8 %) sont ajoutés puis les tubes sont chauffés à 100°C pendant 10 min avant lecture de l'absorbance à 532 nm. Cette méthode est basée sur l'oxydation du 2-D-desoxyribose par les radicaux hydroxyles formant le malonaldéhyde (Halliwell et Getteridge, 1985). Ce dernier réagit avec l'acide thiobarbiturique après chauffage et montre une absorbance caractéristique à 532 nm proportionnelle à la quantité de radicaux hydroxyles formés lors de la réaction. Les essais ont tous été effectués en triplicats.

XIX. Mesure de la viscosité

Les mesures de viscosité ont été réalisées en utilisant un Rhéomètre METTLER Rheomat RM180 avec un volume de 20 ml de CMC à 0,8% (w/v) dans un tampon sodium phosphate (50 mM, pH 5) avec addition de 1,8 mM de H_2O_2 , 0,2 mM de ferricyanure de potassium, 2 mM de cellobiose et 29 nM de CDH recombinante. Les mesures sont réalisées toutes les 15 min durant 75 min.

XX. Tests de clivage de la lignocellulose

XX.1. Supplémentation des cocktails GC220 et N188 avec la CDH recombinante de *P. cinnabarinus* (rCDH)

Les tests de saccharification ont été effectués dans des tubes Falcon de 50 ml (BD Bioscience) contenant 5% (w/v) de paille de blé avec un tampon phosphate de sodium à 50 mM (pH 4,8), de la tetracycline (12,6 mg/ml) et du cycloheximide (10 mg/ml). Le volume final de la réaction était de 20 ml. Les enzymes ajoutées au milieu de base sont : le cocktail commercial GC 220 (Genencor-Danisco, Rochester, NY, USA) produit par *T. reesei* et Novozyme 188 (Novozyme, Franklinton, NC, USA) produit par *Aspergillus niger*, le surnageant de *P. cinnabarinus* contenant l'activité CDH ou la CDH exprimée de façon hétérologue chez *P. pastoris*. Le cocktail enzymatique GC 220 contient 1,41 U CMCCase, 0,79 U β -glucosidase, 0,11 U cellobiohydrolase, 3,85 U xylanase, 0,26 U mannanase et 0,14 U pectinase par mg de protéine totale. Le cocktail enzymatique Novozyme 188 contient : 0,06 cellobiohydrolase, 0,18 U CMCCase, 1,15 U β -glucosidase, 0,33 U xylanase, 0,20 U mannanase, 0,14 U α -galactosidase et 0,43 U pectinase par mg de protéine totale. Ces activités ont été mesurées à 37 °C, pH 5. Les tests de saccharification ont été réalisés en incubateurs (Infors AG, Switzerland) à 45°C sous agitation orbitale (140 rpm) pendant 96 heures. Après 96 heures d'incubation, tous les échantillons sont centrifugés à 3500 rpm pendant 15 minutes. Les surnageants sont filtrés avec une membrane de 0,45 μ m avant détermination et quantification des sucres présents dans les échantillons. Tous les tests de saccharifications sont effectués en triplicats.

XX.2. Hydrolyse de xylane de bouleau

Les tests sur xylane de hêtre ont été réalisés dans des conditions similaires à celles précédemment décrites pour les tests de saccharification. Ainsi les réactions sont effectuées dans des tubes Falcon de 50 ml (BD Bioscience) contenant 5% (w/v) de xylane de hêtre dans un tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 4,8. Le volume final de la réaction était de 20 ml. Le cocktail commercial GC 220 (Genencor-Danisco, Rochester, NY, USA) produit par *T. reesei* a été choisi pour son activité xylanase (3,85 U/mg de cocktail). La CDH recombinante exprimée de façon hétérologue chez *P. pastoris* a été ajoutée en supplémentation au cocktail à raison de 20U/g de xylane. Les essais ont été réalisés en incubateurs (Infors AG, Switzerland) à 45°C sous agitation orbitale (140 rpm) pendant 72 heures. Après la période d'incubation, tous les échantillons sont centrifugés à 3500 rpm pendant 15 minutes. Les surnageants sont

filtrés avec une membrane de 0,45 µm avant détermination et quantification des sucres présents dans les échantillons. Tous les tests de saccharifications sont effectués en triplicats.

XX.3. Clivage de paille micronisée par association CDH/GH61B

Les tests de clivage ont été effectués dans des tubes Falcon de 50 ml (BD Bioscience) contenant 5% (w/v) de paille de blé micronisée (à l'aide d'un broyeur à billes et d'un tamisage < 150 µm) dans un tampon acétate de sodium à 50 mM (pH 4,8) contenant de la tétracycline (12,6 mg/ml) et du cycloheximide (10 mg/ml) pour un volume final de 20 ml. Les enzymes ajoutées au milieu de base sont : le cocktail commercial GC 220 (6 mg/g de paille micronisée) et Novozyme 188 (2 mg/g de paille micronisée), la CDH et *PaGH61B*, toutes deux exprimées de façon hétérologue chez *P. pastoris*. Les essais ont été réalisés en incubateurs (Infors AG, Switzerland) à 45°C sous agitation orbitale (140 rpm) pendant 72 heures. Après 72 heures d'incubation, les échantillons sont centrifugés à 3500 rpm pendant 15 minutes. Les surnageants sont filtrés avec une membrane de 0,45 µm avant détermination et quantification des sucres présents dans les échantillons. Tous les tests de saccharifications sont effectués en triplicats.

XX.4. Clivage de la cellulose (PASC) par l'association de CDH et GH61

Les essais sur le clivage de la PASC ont été réalisés dans des tubes Falcon de 50 mL (BD Bioscience) contenant 1% (w/v) de PASC dans un tampon sodium phosphate à 50 mM (pH 4,8) portant le volume réactionnel total à 10 mL. Le substrat PASC a été préparé comme décrit par Wood *et al.*, 1988. Les enzymes purifiées (CDH, *PaGH61A* et *PaGH61B*) ont été ajoutées au milieu décrit ci-dessus sous différentes conditions: 500 µg/g de PASC pour CDH; 5 mg/g de PASC pour les deux *PaGH61* et 50 mg/g de PASC pour *PaGH61B*. Les tubes Falcon correspondant aux différentes conditions présentées dans la section résultats ont été placés dans des incubateurs (Infors AG, Suisse) à 45°C sous agitation orbitale (140 rpm) pendant 48h. Après 48h d'incubation, les échantillons sont centrifugés à 3500 rpm pendant 15 min et les surnageants sont filtrés à travers une membrane de 0,20 µm avant de déterminer la composition en oligosaccharides oxydés et non oxydés. Les essais ont été réalisés en triplicats.

XXI. Dosage des mono- et oligosaccharides

Les monosaccharides, le cellobiose et l'acide gluconique générés durant l'hydrolyse de la paille de blé ont été quantifiés par une HPAEC (High-Performance Anion Exchange

Chromatography), équipée avec une colonne Carbo-Pac PA-1 (250 × 4 mm), couplée à une détection ampérométrique (PAD) (ICS 3000, Dionex, Sunnyvale, CA, USA).

Les réactions enzymatiques sont stoppées par ajout d'une solution de NaOH à 18 mM servant à diluer les échantillons avant injection de 5 µl dans le système HPAEC. L'élution (1 ml/min) est réalisée contre un gradient acétate de sodium (0 à 250 mM en 25 min). Les courbes de calibration sont réalisées en utilisant des standards xylose, arabinose, galactose et glucose pour les monosaccharides non oxydés. L'acide gluconique et l'acide xylonique ont été utilisés comme standards pour les monosaccharides sous forme d'acide aldoniques (Sigma-Aldrich et MP Biomedical). A partir de ces standards, un facteur de réponse est calculé (Chromeleon program, Dionex) pour chaque sucre et utilisé afin d'estimer la quantité de produit libéré durant les tests d'hydrolyse. Les cello-oligosaccharides avec un DP variant de 2 à 6 et leurs acides aldoniques correspondants générés par addition de CDH ont été utilisés en tant que standards pour l'identification des pics issus des essais sur PASC avec CDH et *PaGH61* selon la méthode en HPAEC mise au point par Forsberg *et al.*, 2011. Toutes les mesures ont été réalisées en triplicats.

XXII. Spectrométrie de masse

L'analyse des produits issus des essais de clivage de la PASC par la combinaison CDH/*PaGH61* a été effectuée sur un appareil Ultraflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonic GmbH, Bremen, Allemagne) possédant un laser smartbeam 200 Hz. La matrice utilisée ainsi que les échantillons ont été traités selon les conditions définies par Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010.

Résultats

Partie I

**Expression hétérologue de la CDH de *P. cinnabarinus*
chez *P. pastoris*: implication dans les procédés de
saccharification**

I. Introduction

La dégradation de la lignocellulose par les champignons filamenteux est un processus faisant intervenir de nombreuses enzymes agissant seules, via des synergies enzymatiques ou par le biais de médiateurs. Ces systèmes lignocellulolytiques ont été étudiés de manière intensive durant ces dernières décennies notamment grâce à l'utilisation du séquençage génomique et des outils protéomiques. Cependant, le fonctionnement des systèmes cellulolytiques n'a pas encore été totalement élucidé, tout particulièrement, la part oxydative de ces systèmes (Martinez *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2009; Kersten et Cullen, 2007). Les champignons de la pourriture blanche sont reconnus comme ayant la capacité de dégrader la lignine par l'action d'oxydoréductases telles que les phénoloxydases (laccase) et les peroxydases modifiant la lignine (Rabinovich *et al.* 2004; Dashtban *et al.* 2009; Lundell *et al.* 2010). Les mécanismes d'oxydoréduction ne sont pas exclusivement dédiés à la dégradation de la lignine mais interviennent également dans les processus cellulolytiques (Quinlan *et al.*, 2011 ; Phillips *et al.*, 2011). Parmi les enzymes oxydatives interagissant de manière indirecte sur la cellulose se trouve la CDH. Cependant, les mécanismes régissant l'action de la CDH et son rôle au sein des phénomènes de dégradation de la matière lignocellulosique restent partiellement non élucidés.

Dans cette première partie, nous traiterons de la CDH de *P. cinnabarinus* et de son implication dans les phénomènes de dégradation oxydatif de la lignocellulose. Le système lignocellulolytique de *P. cinnabarinus* a été analysé et des conditions de culture ont été déterminées afin d'obtenir la meilleure production possible de CDH. L'analyse du sécrétome et les essais de dégradation de la matière lignocellulosique ayant montrés une implication de la CDH, l'expression hétérologue de l'enzyme a été réalisée chez *Pichia pastoris*. L'enzyme recombinante a ensuite été caractérisée en détail et analysée pour sa capacité à dégrader les substrats naturels en supplémentation de cocktails enzymatiques commerciaux.

II. Production de CDH par *P. cinnabarinus* ss3 en condition cellulolytique et analyse du sécrétome

II.1. Production de CDH en condition cellulolytique

La production de CDH est induite chez *P. cinnabarinus* lorsque le champignon est cultivé dans un milieu contenant de la cellulose. Dans ces conditions, la meilleure production observée (355 U/L) a été obtenue au bout de 11 jours de culture en utilisant la cellulose comme seule source de carbone. Cette production est dépendante du type de cellulose utilisé. Les plus hauts taux de productions de CDH ont été obtenus avec une cellulose de fibre medium (Sigma) (Fig. 27). Afin d'évaluer l'implication de la CDH dans les processus de dégradation de la cellulose, nous avons caractérisé le sécrétome de *P. cinnabarinus* dans ces mêmes conditions après 11 jours de culture.

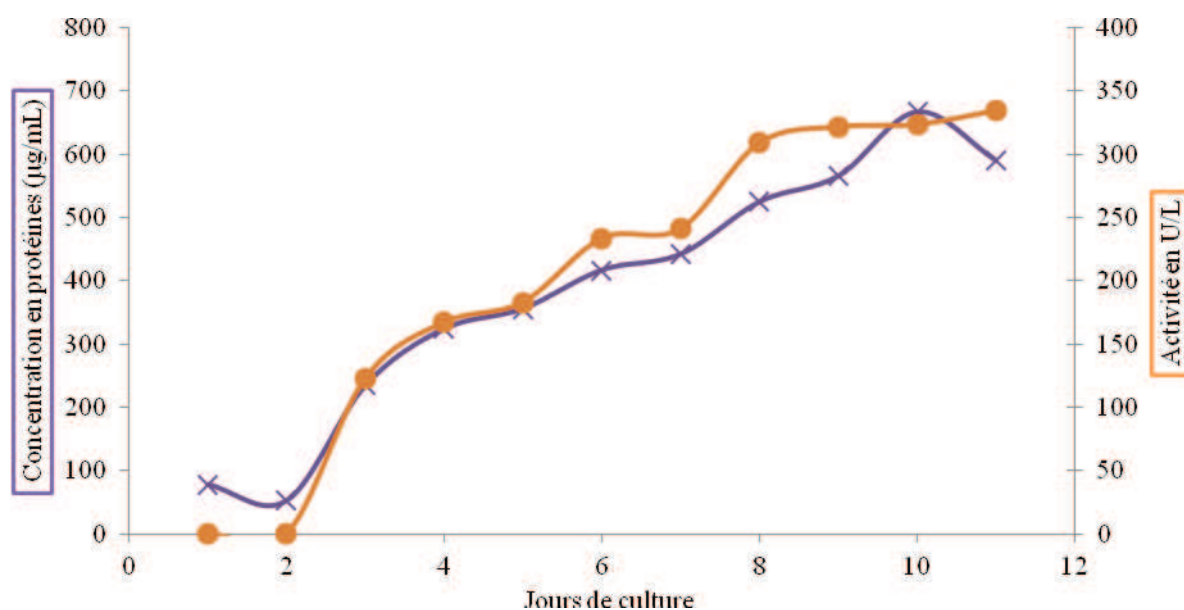


Figure 27. *Pycnoporus cinnabarinus* en condition cellulolytique. Production de CDH (●) et concentration en protéines (×) au cours d'une culture de *P. cinnabarinus* ss3 en conditions cellulolytiques.

II.2. Analyse du sécrétome de *P. cinnabarinus* en condition cellulolytique

II.2.1. Activité identifiée dans le sécrétome

Les principales activités enzymatiques présentes dans le sécrétome de *P. cinnabarinus* ont été mesurées sur une large gamme de substrats (Table 05). Il est à noter l'absence d'activités

laccase et peroxydase. En revanche, le sécrétome de *P. cinnabarinus* contient des enzymes capables d'hydrolyser un large éventail de polysaccharides. Des niveaux importants d'activités sur pNP-glucose, CMC et pNP-cellobiose ont été détectés, ces activités correspondent respectivement à la présence de β -glucosidase (0,35 U/mg), endoglucanase (0,55 U/mg) et cellobiohydrolase (0,32 U/mg). Une grande variété d'activité type hémicellulase a également été identifiée. Les deux principales activités endo-glycosidase présentes correspondent à des endo-mannanase et endo-xylanase (environ 2 U/mg). Les hémicellulases de type exoglycosidase ont été détectées dans une moindre mesure: 0,85 U/mg pour l' α -galactosidase et 0,01 U/mg pour la β -xylosidase.

Types d'activités	Substrats	Activité (U/mg)
CDH	Cellobiose	0.53
Laccase	ABTS	nd ^a
Glucose oxydase	Glucose	nd ^a
Manganèse peroxydase	Vanillylacétone	nd ^a
Lignine peroxydase	Alcool véricatrylique	nd ^a
β -glucosidase	pNP-glucose	0.35 $\pm$ 0.00
Endoglucanase	CMC	0.55 $\pm$ 0.00
Cellobiohydrolase	pNP-cellobiose	0.32 $\pm$ 0.00
β -xylosidase	pNP-xylose	0.01 $\pm$ 0.00
Endo-xylanase	Arabinoxylane Faible viscosité	2.03 $\pm$ 0.08
β -mannosidase	pNP-mannose	nd ^a
Endo-mannanase	Galactomannane	2.03 $\pm$ 0.11
Pectinase	Pectine	0.45 $\pm$ 0.02
α -galactosidase	pNP-galactose	0.85 $\pm$ 0.00

^a activité non détectée.

Table 05. Activités des enzymes lignocellulolytiques mesurées dans le sécrétome de *P. cinnabarinus* en condition cellulolytique. Les résultats sont exprimés en U/mg de protéines totales.

II.2.2. Zymogramme

Des zymogrammes ont été réalisés avec le sécrétome de *P. cinnabarinus* afin de donner un aperçu du nombre d'isoformes présentes pour les principales activités enzymatiques mesurées précédemment. Le gel SDS-PAGE du sécrétome de *P. cinnabarinus* (Fig. 28, ligne 2) cultivé

en conditions cellulolytiques présente deux différences majeures par rapport à un surnageant de culture de référence cultivé (condition non-cellulolytique): (i) la présence d'une bande d'environ 100 kDa, attribuable à la CDH et (ii) l'absence de bande à 70 kDa correspondant à la laccase. La confirmation est apportée par le zymogramme montrant une décoloration à 100 kDa correspondant à une activité CDH (Fig. 28, piste 3). L'oxydation de l'ABTS s'est produite à environ 50 kDa (Fig. 28, ligne 4) et n'est pas attribuable à la laccase exprimée d'ordinaire par *P. cinnabarinus* qui possède une masse moléculaire de 70 kDa. Le zymogramme xylanase (Fig. 28, ligne 5) a démontré la présence d'une faible activité à 50 kDa correspondant aux résultats décrits précédemment (Sigoillot *et al.* , 2002).

Le zymogramme CMCase (Fig. 28, ligne 6) a montré au moins cinq bandes avec une décoloration accrue à 25 kDa. Concernant l'activité mannanase (Fig. 28, ligne 7), de nombreuses zones d'activité ont été retrouvées aux alentours d'une zone principale située à 60 kDa.

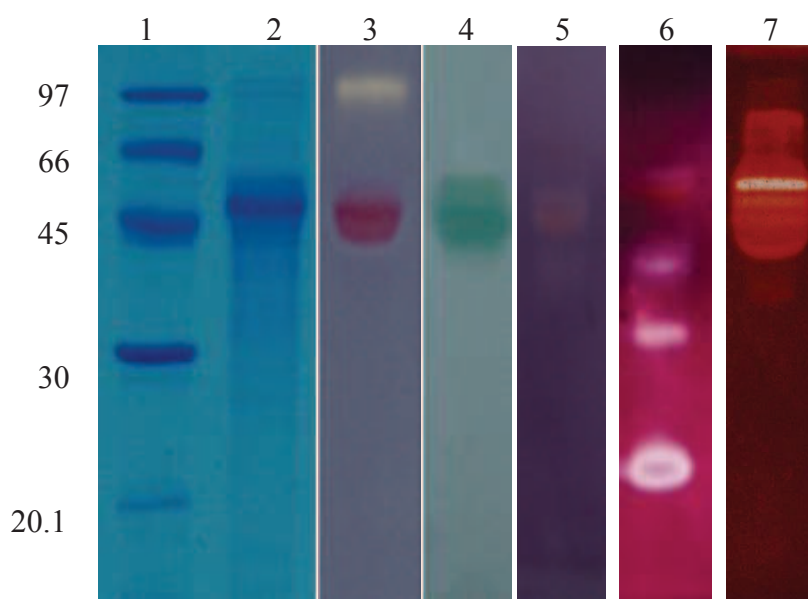


Figure 28 : SDS-PAGE et zymogrammes réalisés sur le surnageant de *P. cinnabarinus* ss3 cultivé en condition cellulolytique. 1, marqueur de poids moléculaires en kDa; 2, SDS-PAGE réalisé avec 10 µg de protéines issu surnageant après une étape d'ultrafiltration; 3, zymogramme CDH; 4, zymogramme avec l'ABTS (laccase); 5, zymogramme avec du xylane soluble de bouleau (xylanase); 6, zymogramme avec CMC (endoglucanase) et 7, zymogramme avec gomme de caroube (mannanase).

III. Expression hétérologue de la CDH de *P. cinnabarinus* ss3 chez *P. pastoris*

Dans le but d'obtenir des taux de production suffisamment élevés pour entreprendre des essais de saccharification, le clonage et l'expression du gène codant pour la CDH de *P. cinnabarinus* ss3 ont été réalisés. Sur la base de la séquence de la *cdh* de *P. cinnabarinus* I-937, des amorces ont été conçues pour amplifier le gène *cdh* à partir d'une culture à J4 induite en présence de cellulose. La séquence des amplicons obtenus (2310 pb) a été comparée avec les séquences de *cdh* disponibles. L'analyse des séquences nucléotidiques a montré 97% d'identité entre la *cdh* de *P. cinnabarinus* I-937 (Moukha *et al.*, 1999) et la *cdh* de *P. cinnabarinus* ss3. Cette dernière est une souche monocaryotique isolée à partir de basidiospores obtenues lors de la fructification de la souche sauvage dicaryotique *P. cinnabarinus* I-937. Des différences sont observables au niveau de la séquence nucléotidique se traduisant au total par 8 changements dans la séquence peptidique concernant les acides aminés aux positions 96 (Ala → Glu), 331 (Arg → Ser), 354 (Ala → Thr), 357 (Asn → Lys), 386 (Tyr → Ser), 426 (Tyr → Phe) et 495 (Gln → Glu). La comparaison avec la séquence *cdh* de *T. versicolor* et celle de *P. chrysosporium* montre, respectivement, des identités de séquence de 77% et 70%. La séquence en acides aminés de la CDH de *P. cinnabarinus* possède les régions conservées correspondant à la famille des GMC oxydoréductases (Glucose-Méthanol-Choline) (Zamocky *et al.*, 2004). La région linker riche en Thr-Ser (position 182 à la position 215), la présence d'un site de liaison au FAD ainsi que le couple d'acides aminés Met / His impliqué dans la fixation de l'hème ont également été identifiés. Il est intéressant de noter que la région Thr-Ser est également riche en proline (28% Pro, 25% Thr, Ser 13%).

La séquence codant pour la CDH a été insérée dans le vecteur d'expression de *P. pastoris* au niveau d'un cadre de lecture regroupant des séquences codant pour le peptide signal présent chez *S. cerevisiae* l' α -factor et un tag(His)₆ situé à l'extrémité C-terminale. Le gène recombinant a ensuite été introduit dans le génome de *Pichia* sous le contrôle d'un promoteur inductible par le méthanol. Les transformants multi-copie ont été criblés afin de sélectionner un clone présentant des niveaux satisfaisants pour la production. L'activité CDH a été détectée dans le surnageant après induction au méthanol et une activité maximale de 1176 U/L a été observée après 4 jours d'induction pour le clone sélectionné. Afin d'augmenter la

production d'enzymes, nous avons optimisé l'expression de la CDH dans un bioréacteur de 2 litres pour le meilleur clone de *P. pastoris*. La CDH recombinante a été sécrétée à des niveaux élevés, atteignant 7800 U/L (Fig. 29). L'enzyme recombinante a été purifiée après 4 jours d'induction, en utilisant le tag(His)₆. En outre, seulement quelques traces de protéines endogènes ont été observées dans le surnageant de culture du transformant *P. pastoris* sécrétant la CDH. L'enzyme purifiée a montré une activité spécifique de 22,2 U/L.

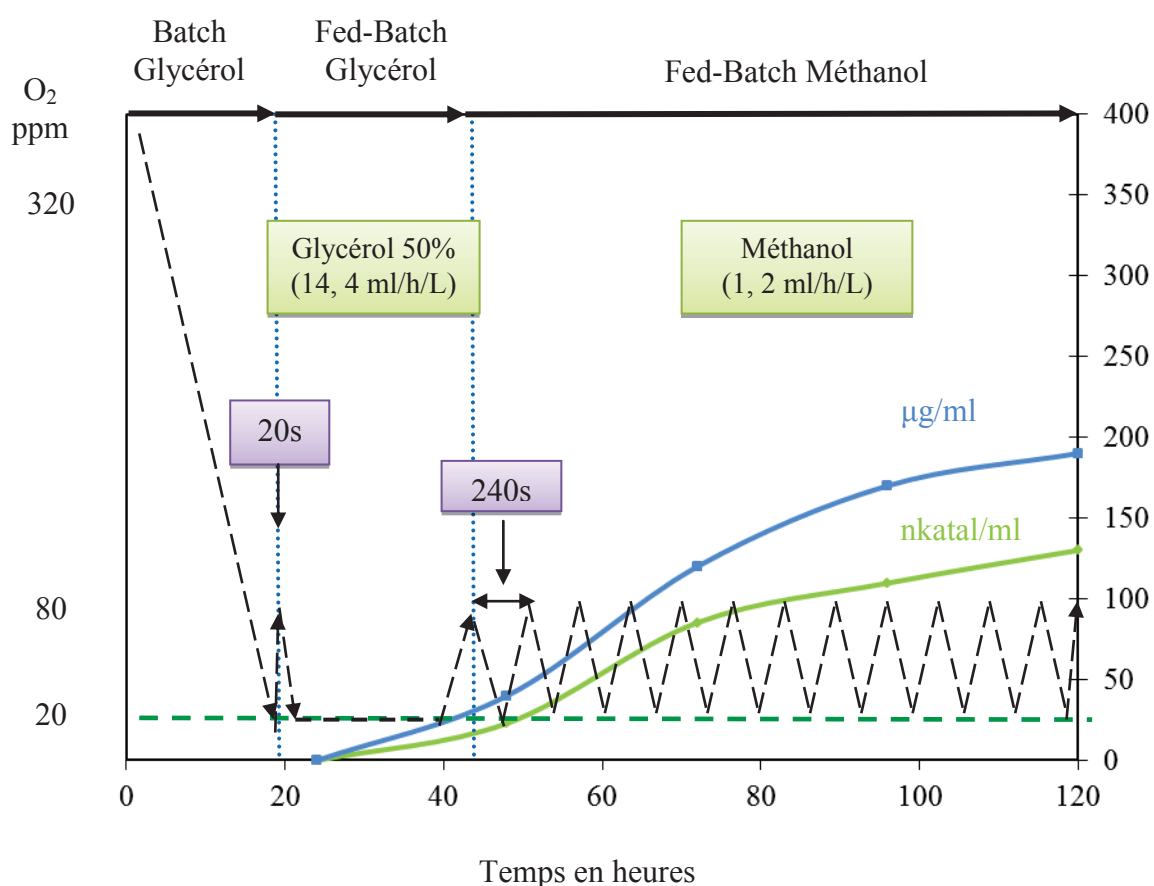


Figure 29. Production de rCDH en bioréacteur de 2L. Le graphique représente la quantité d'oxygène dissous (abscisse à gauche) ainsi que la quantité de protéine (en bleu) et l'activité CDH (en vert) (abscisse à droite) en fonction de temps d'incubation. Les différentes étapes de batch réalisées pour l'expression hétérologue de la rCDH chez *P. pastoris* sont représentées par des flèches noires en haut du graphique.

IV. Construction de modèles structuraux

A partir de la séquence peptidique de la CDH de *P. cinnabarinus*, deux modèles ont été réalisés à partir de structures cristalline existantes. A ce jour, il n'existe aucune structure de CDH complète (avec les deux domaines FAD et hémique). Cependant les deux domaines de

la CDH de *P. chrysosporium* ont été cristallisés indépendamment et ont servis de structures de base pour établir un modèle pour la CDH de *P. cinnabarinus*.

La CDH de *P. cinnabarinus* présente une forte homologie de séquence, respectivement 79 et 62 % pour les domaines flavinique et hémique de l'enzyme (Fig. 30 A et B).

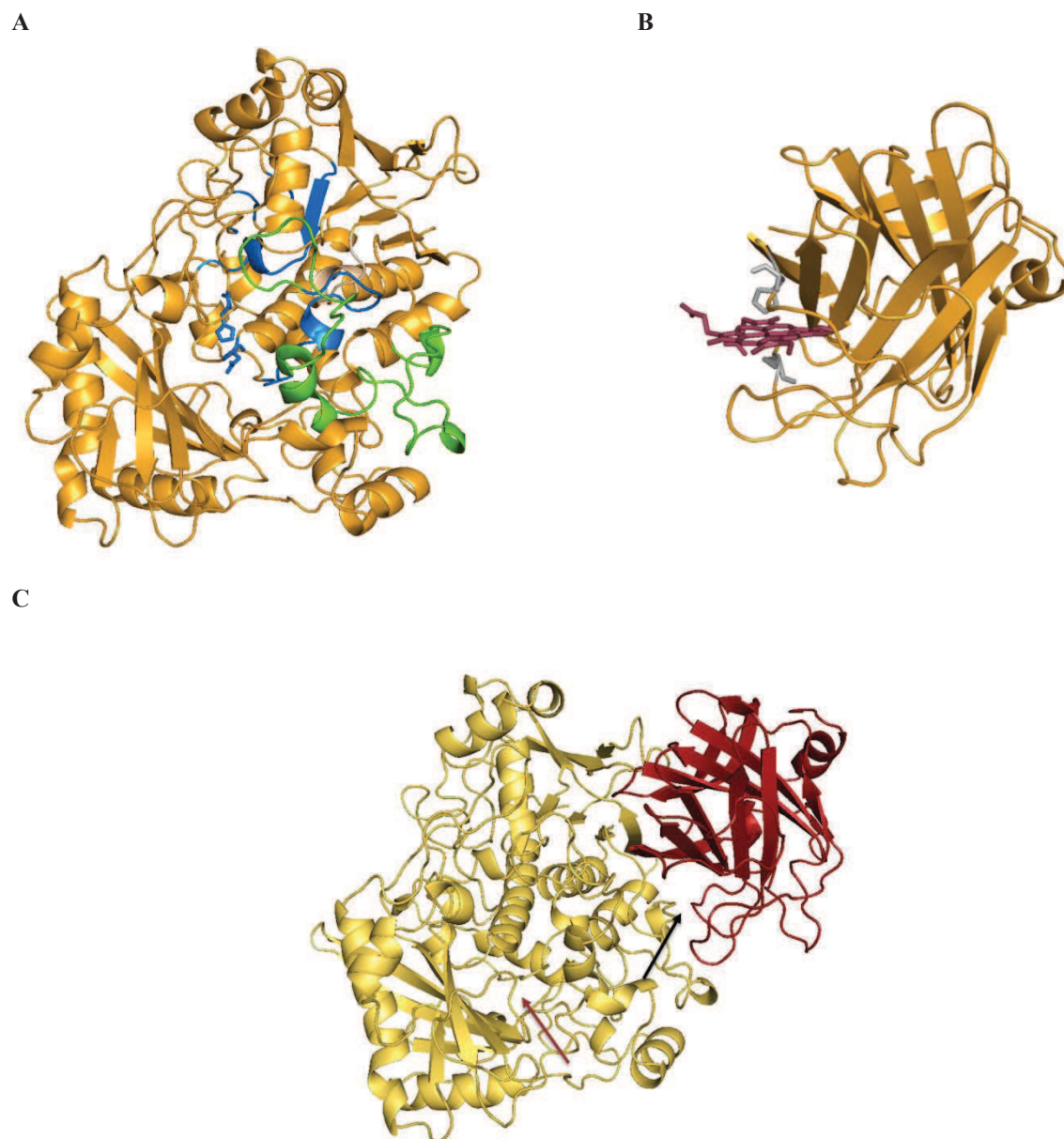


Figure 30. Représentation structurale des parties flaviniques et hémiques de la CDH de *P. cinnabarinus*. La representation de la partie flavinique de la CDH (A) permet de mettre en évidence les zones conservées de la famille des GMC et les acides aminés impliqués dans l'activité catalytique (en bleu) ainsi que le domaine responsable de la fixation à la cellulose (en vert) et le domaine de fixation du FAD (en beige). La représentation de la partie hémique de la CDH (B) montre le cytochrome de type b (en rouge) coordonné par une histidine et une méthionine (en gris). A partir des précédents modèles (A et B), un docking protéine-protéine a été réalisé en utilisant le serveur Cluspro, ceci dans le but de définir les positions potentielles de la partie flavinique (en jaune) et de la partie hémique (en rouge) de la CDH de *Pycnoporus cinnabarinus* (C). La flèche rouge indique l'emplacement du FAD et la flèche noire, celui de l'hème de type b. Les modèles ont été réalisés avec le logiciel PyMOL.

Le modèle proposé en Fig. 30 A montre la partie contenant le FAD sous un angle nous permettant d'observer le domaine susceptible d'être impliqué dans la fixation à la cellulose (en vert). En bleu, sont représentés les domaines caractéristiques des membres de la famille des GMC oxydoréductases ainsi que les acides aminés responsables de l'activité catalytique du domaine flavinique. La Fig. 30 B représente un modèle de la partie hémique avec l'hème de type b (en rouge) ainsi que l'histidine et la méthionine (en blanc) réalisant la coordination de ce dernier. Un docking entre la partie hémique et la partie flavinique a été réalisé et montre la proximité entre l'hème et le FAD (Fig. 30 C).

V. Caractérisation de la CDH recombinante (rCDH)

Après purification à homogénéité de la CDH recombinante, une bande principale d'un poids moléculaire d'environ 110 kDa (Fig. 31, ligne 2) a été observée sur SDS-PAGE. L'analyse par Western blot (Fig. 31, ligne 4) a confirmé la présence d'un tag(His)₆ attribué à l'enzyme recombinante CDH à 110 kDa. Le zymogramme CDH a révélé des bandes actives (à 70 et 110 kDa). La déglycosylation (Fig. 31, ligne 5) de la CDH a montré une augmentation de la dégradation entre les deux parties de l'enzyme et une perte de masse d'environ 10 kDa. Après clivage par la papaïne (présence d'un site de coupure au niveau du linker séparant les deux parties), une bande correspondant au fragment contenant le FAD a été observée sur SDS-PAGE (Fig. 31). Le groupement contenant l'hème n'a pas été observé après coloration, ce qui est probablement dû à la faible présence de résidus aromatiques (Henriksson *et al.* 1991).

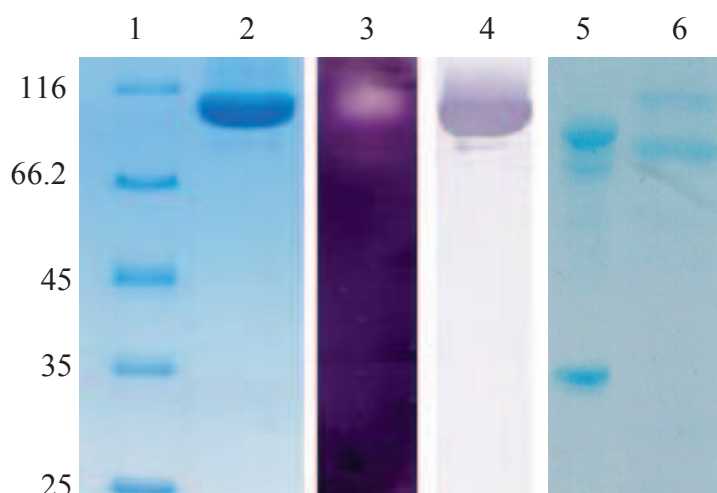


Figure 31. Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la CDH recombinante purifiée rCDH. 1, marqueur de poids moléculaires en kDa; 2, 10 µg de rCDH purifiée; 3, zymogramme CDH; 4, détection par western-blot de l'enzyme réalisée en utilisant des anticorps anti-His; 5, CDH déglycosylée; 6, CDH digérée par la papaïne.

Les études de fixation ont confirmé la capacité de la CDH à se fixer à la cellulose en l'absence d'un véritable domaine de liaison à la cellulose. La cellulose de type Avicel a montré une fixation optimale par rapport à d'autres types de celluloses et a donc été choisie pour définir les constantes de dissociation (K_d) et la capacité de fixation (B_{max}) de la CDH ayant pour valeurs respectives : 0,064 μ M et 20 mg/g d'Avicel.

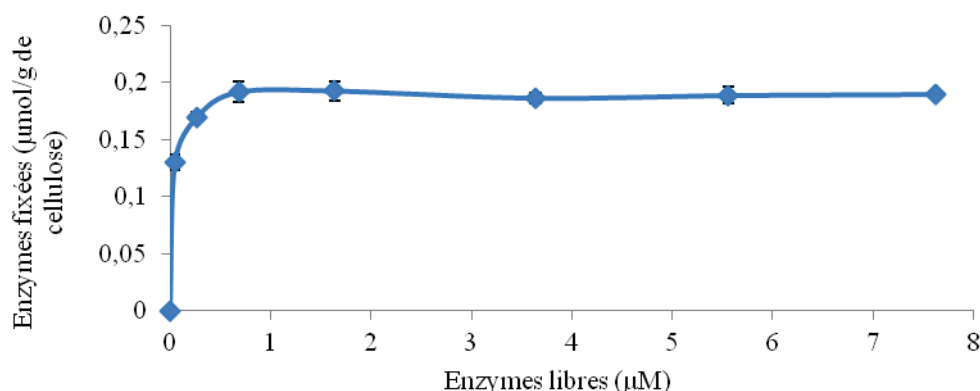
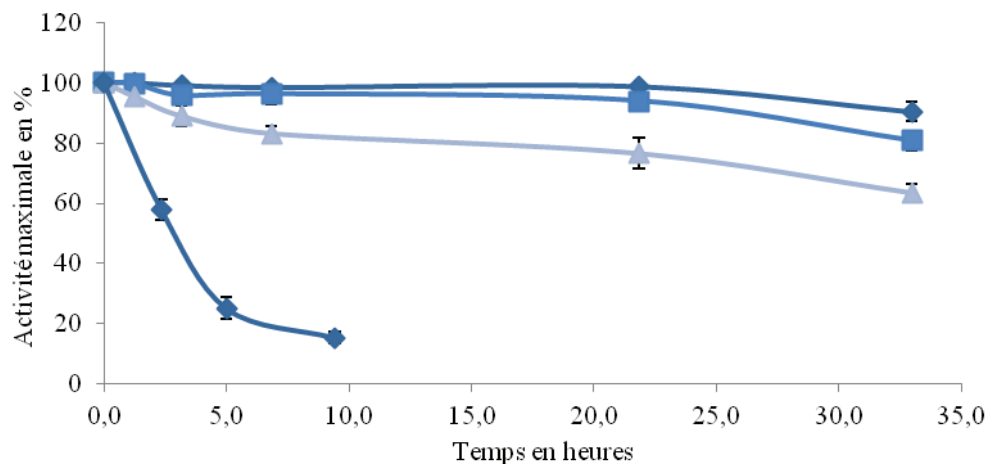


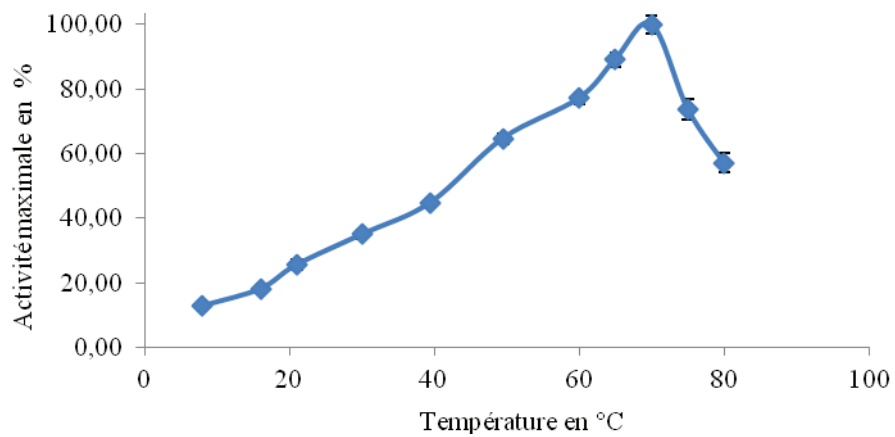
Figure 32. Isotherme de fixation à la cellulose de la rCDH.

L'activité enzymatique de l'enzyme a été testée avec le DCPIP (2,6-dichlorophenol-indophenol) en tant qu'accepteur d'électrons. Le pH optimal a été déterminé à 4,5 pour la CDH recombinante (Fig. 33 C). Cette valeur a été utilisée par la suite pour tester la thermostabilité de l'enzyme. La température optimale mesurée est de 70°C. Par rapport à cette référence (100% d'activité), l'activité n'est que de 10% à 10°C et 55% à 80°C correspondant à la dénaturation thermique de l'enzyme (Fig. 33 B). La stabilité thermique a été mesurée sur une gamme de température variant de 45 à 65°C. Les temps de demi-vie sont respectivement de 227 h à 45°C, 108 h à 50°C, 56 h à 55°C et seulement 3,5 h à 65°C. Ainsi, après 9 h d'incubation à 65°C, l'activité résiduelle ne représente plus que 15% de l'activité initiale. (Fig. 33 A)

A



B



C

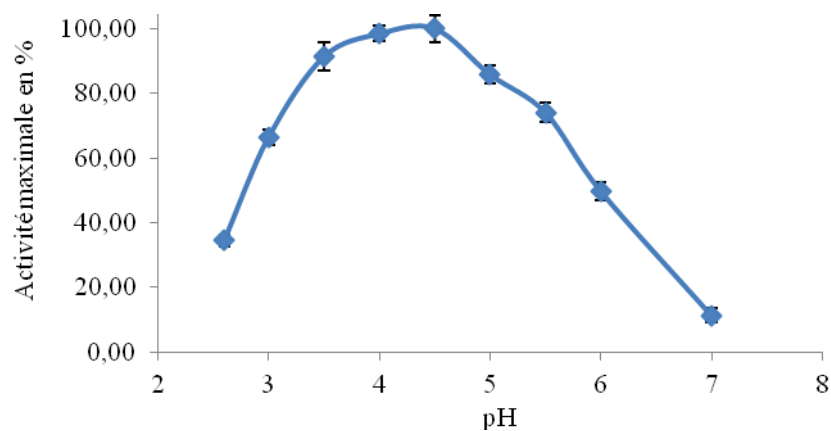


Figure 33. Température et pH optimal de la CDH recombinante, stabilité à la température Effet de la température sur l'activité de rCDH purifiée en utilisant le DCPIP comme accepteur d'électron. L'activité a été déterminée à pH 4,5. (A) Stabilité à la température à 45°C(■), 50°C(◆), 55°C(▲) et 65°C(●).(B) Température optimale. (C) pH optimal. L'activité a été déterminée à 30°C dans du tampon citrate-phosphate avec un pH variant de 2,7 à 7.

La détermination des paramètres cinétiques a permis de définir un $V_{\max} = 22,2$ U/mg et $K_M = 35,5$ μ M lorsque le DCPIP est utilisé comme accepteur d'électron et le cellobiose comme substrat. Ces paramètres sont modifiés avec l'utilisation d'un autre accepteur d'électrons tel que le cytochrome c ($V_{\max} = 3,9$ U/mg et $K_M = 14,7$ μ M) (Table 06).

Accepteur d'électron	K_M (μ M)	$V_{\max}^a$ (μ mol/min/.mg)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M (s^{-1}/mM)
DCPIP	35.5	22.2	40.8	1148
cyt c	14.7	3.9	7.0	474

^a Les paramètres cinétiques ont été déterminés en utilisant le DCPIP ou le cytochrome C comme accepteurs d'électron et le cellobiose comme substrat dans les conditions standards d'essai.

Table 06. Constantes cinétiques apparentes de la CDH recombinante pour deux accepteurs d'électrons différents. Les réactions ont été réalisées à 30°C, pH 4,5 en utilisant le cellobiose comme donneur d'électron.

VI. Application de la CDH aux procédés de saccharification

La gamme d'enzymes lignocellulosiques trouvée dans le surnageant de *P. cinnabarinus* en fait un candidat à la supplémentation du cocktail de *T. reesei* en vue de son utilisation lors de la saccharification de la paille de blé. Nous avons donc décidé de comparer l'efficacité du sécrétome de *P. cinnabarinus* à la CDH recombinante purifiée en supplémentation de cocktails industriels.

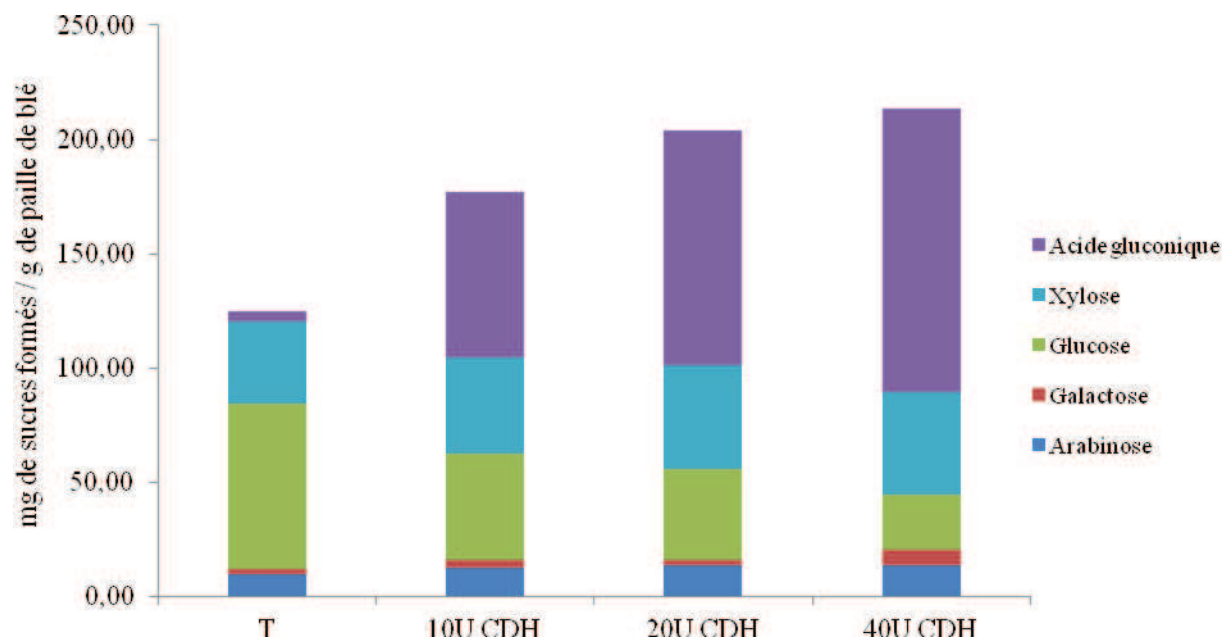
Deux substrats ont été utilisés: la paille de blé avec et sans prétraitement acide à 130 ° C. Le cocktail d'enzymes supplémente (GC220) est issue de *T. reesei* est complété par un autre cocktail majoritairement pourvu en β -glucosidases produit par *A. niger* (N188). Les ajouts du sécrétome de *P. cinnabarinus* (10, 20 et 40 U de CDH/g de substrat lignocellulosique) ou de la CDH pure (10 et 20 U/g de substrat lignocellulosique) ont montré des résultats similaires sur la paille de blé non prétraitée (Fig. 34 A et B). En effet, les résultats de la supplémentation en sécrétome de *P. cinnabarinus* montrant l'augmentation du rendement total en sucres sont équivalents à ceux observés dans le cas d'une supplémentation avec la CDH seule. Cependant, l'hydrolyse globale réalisée sur paille en présence de CDH a montré une

augmentation et notamment la production de grandes quantités d'acide gluconique, de 5 à 100 mg par g de paille de blé, par rapport au témoin. L'apparition d'acide gluconique lors de l'hydrolyse s'explique par l'action combinée de la CDH (formation d'acide cellobionique) et de l'activité β -glucosidase présente dans les cocktails (Fig. 36).

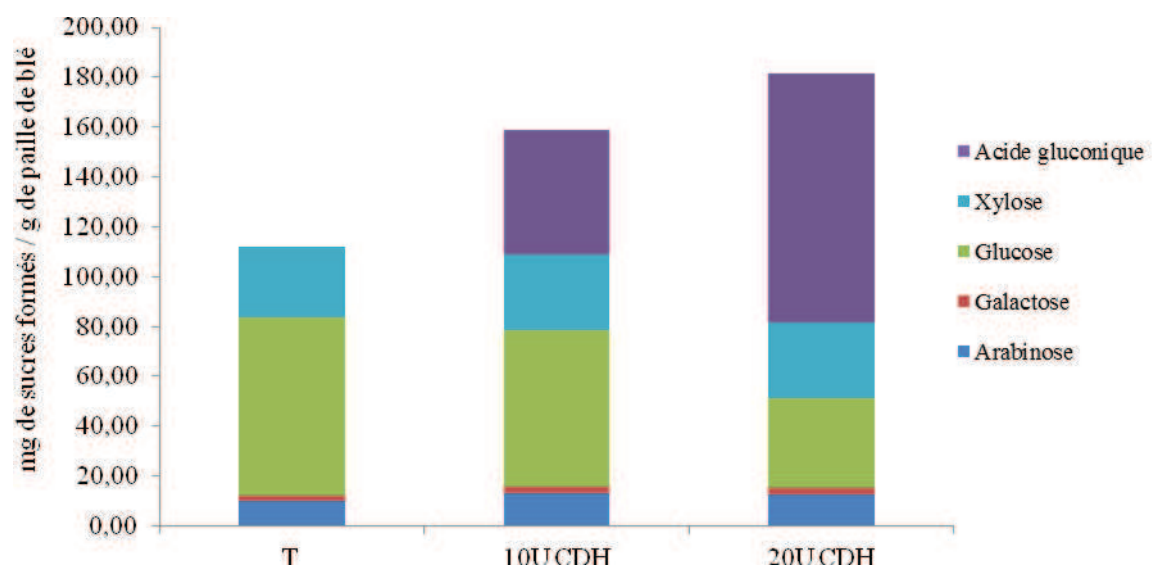
Des rendements plus élevés en xylose, galactose et en arabinose, augmentant respectivement de 35 à 44, de 1,9 à 4 et 9,5 à 13,5 mg/g de paille de blé ont été observés avec plus de 10 U de CDH (Fig. 34 B). L'hydrolyse réalisée sur paille de blé prétraitée (Fig. 34, C) avec addition du sécrétome de *P. cinnabarinus* contenant la CDH a montré (i) la production d'acide gluconique jusqu'à 70 mg par gramme de paille de blé prétraitée (pour une supplémentation avec 40U CDH), (ii) une diminution du rendement en glucose et (iii) une légère augmentation du xylose (26 à 32 mg/g) (Fig. 34 C). Cependant l'augmentation du rendement global en sucres lors de la supplémentation en sécrétome n'ait pas retrouvé dans le cas d'une supplémentation en CDH seule (Fig. 34 D).

Les sucres totaux ont également été déterminés par une méthode de dosage par le DNS, cette méthode permet de mesurer les extrémités réductrices des sucres libérés après saccharification. Les supplémentations en rCDH purifiée ou en sécrétome contenant la CDH ont toutes deux montrées des réponses plus faibles aux DNS que les contrôles composés des cocktails seuls (Fig. 35). Ces résultats contraires aux précédents s'expliquent par la modification des extrémités réductrices des sucres par l'action de la CDH.

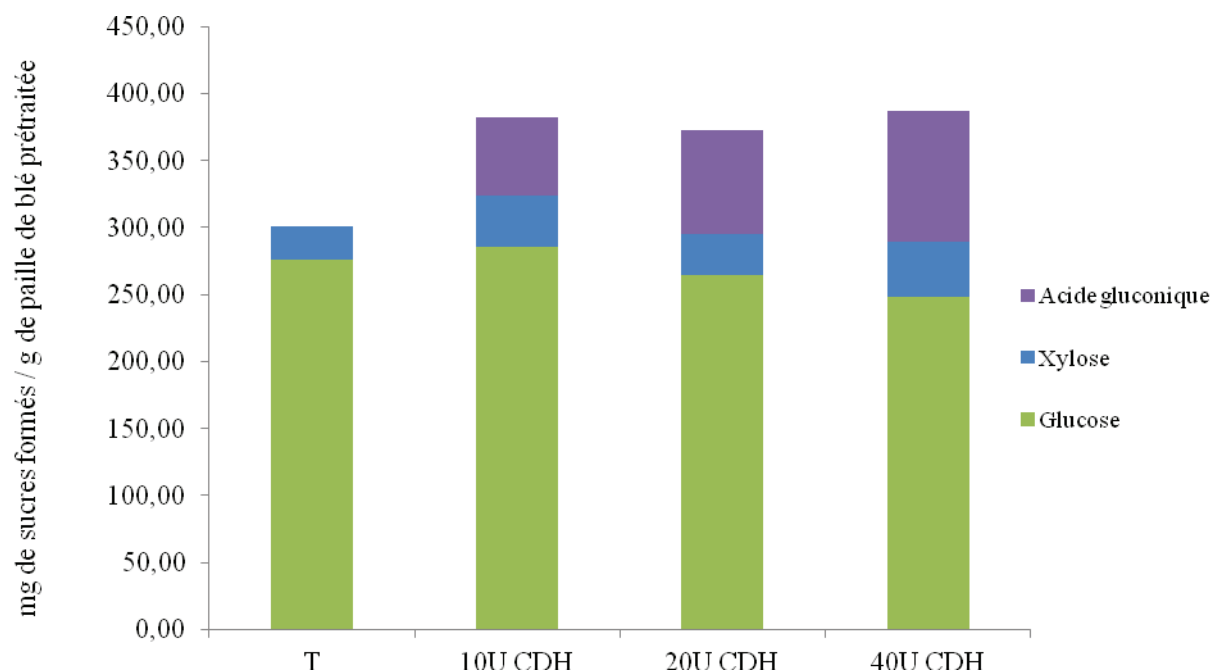
A



B



C



D

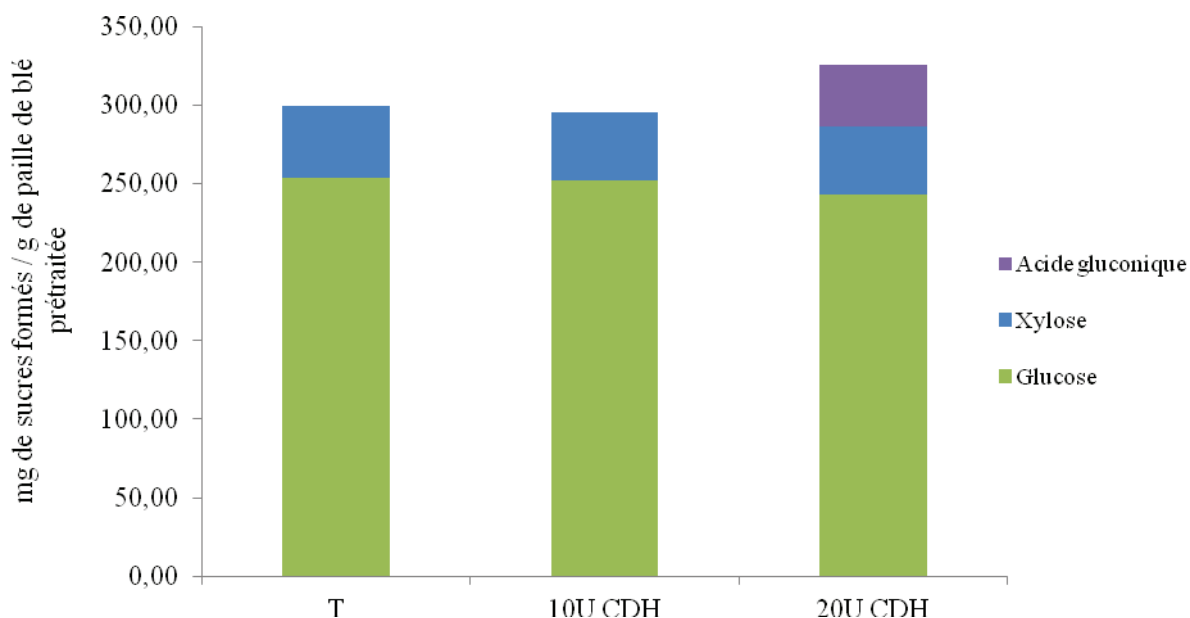


Figure 34. Essais de saccharification. Détermination du rendement en sucres après 96 heures de traitement enzymatique sur paille (A, B) et paille prétraitée (C, D). Les expériences ont été réalisées en triplicats. Pour les analyses en (A) et (C), la signification statistique était, respectivement, $P < 0.1$ et $P < 0.05$. Dans le cas des analyses en (C) et (D), la signification statistique était $P < 0.05$.

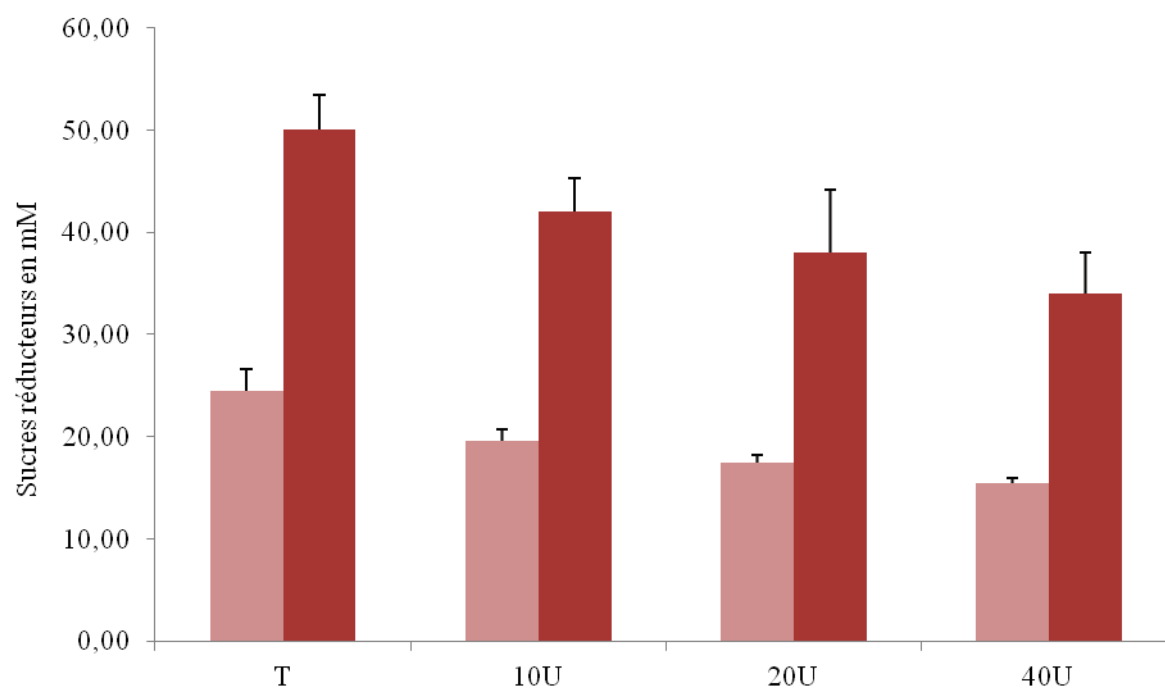
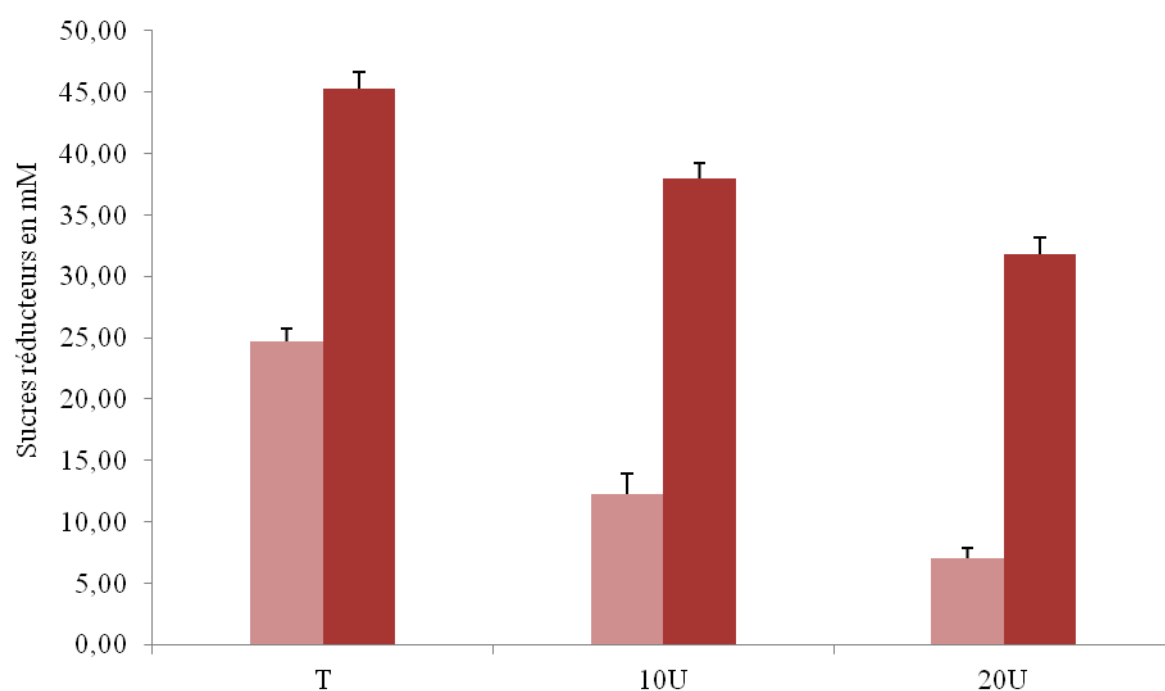
A**B**

Figure 35. Essais de saccharification : analyse au DNS. Analyse des sucres réducteurs totaux après 96 heures de traitement enzymatique sur paille (barres roses) et paille prétraitées (barres rouges). Les expériences ont été réalisées en triplicats avec le sécrétome de *P. cinnabarinus* (A) et CDH purifiée (B).

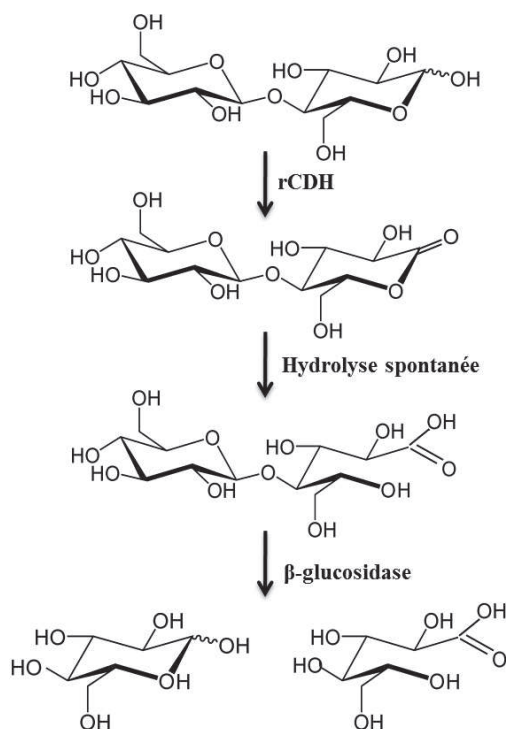


Figure 36. Schéma présentant la formation d'acide gluconique par l'action de la CDH (oxydation du cellobiose) suivi d'une hydrolyse spontanée (formation d'un acide lactonique) puis l'intervention de la β -glucosidase clivant l'acide cellobionique en glucose et acide gluconique.

VII. Oxydation des hémicelluloses et production d'acide xylonique : action de la CDH

Les acides organiques tels que l'acide gluconique sont couramment utilisés dans le domaine alimentaire, en chimie, en industries pharmaceutiques ou encore dans le domaine du bâtiment (conception des ciments) (Singh et Kumar, 2007). Le D-xylolate ou acide xylonique fait partie de ces acides organiques. Il est utilisé de la même façon que le D-gluconate, la différence entre ces deux composés réside dans certaines propriétés spécifiques. En effet, Le D-xylolate présente de meilleures performances concernant la dispersion du ciment que le sodium gluconate ce qui en fait un composé à haute valeur ajoutée (Chun *et al.*, 2006 ; Chun *et al.*, 2003). Certaines bactéries des genres *Pseudomonas* et *Gluconobacter* peuvent produire du D-xylolate à des hauts taux (>0.95 g de D-xylolate par gramme de D-xylose) (Buchert *et al.*, 1986, 1988; Buchert, 1990). L'acide xylonique est formé par la conversion du D-xylose en D-xylono- γ -lactone par l'action de la D-xylose déshydrogénase. Le D-xylono- γ -lactone est ensuite hydrolysé spontanément ou par l'action de lactonase pour obtenir le D-xylolate (Buchert et Viikari, 1988). *Pseudomonas* et *Gluconobacter* produisent une large gamme

d'enzymes oxydantes, avec des degrés de spécificités variés, aboutissant à la conversion du D-xylolate. Récemment, la production de D-xylolate par *S. cerevisiae* a été réalisée en utilisant une D-xylose déshydrogénase (XYD) issue de *T. reesei* (Toivari *et al.*, 2010). Cependant sa production (25–36 mg D-xylolate/L/h) et son rendement (0.4 g D-xylolate [g/[D-xylose consommé]]) sont peu élevés compte tenu du fait que *S. cerevisiae* n'utilise pas naturellement le xylose comme seule source de carbone. Le D-Xylose est transporté par des transporteurs d'hexose (Kötter et Ciriacy, 1993; Hamacher *et al.*, 2002) ce qui entraîne une inhibition du transport du D-xylose en présence d'un excès de D-glucose (Saloheimo *et al.*, 2007). Plus récemment, *Kluyveromyces lactis* a été mis en avant pour sa capacité à utiliser le D-xylose comme source de carbone. La XYD de *T. reesei* est une enzyme requérant l'utilisant d'un cofacteur NADP⁺ (Berghäll *et al.*, 2007) et *K. lactis* possède différentes voies pour la régénération intracellulaire du NADP⁺.

L'expression du gène *xyd1* de *T. reesei* codant pour une D-xylose déshydrogénase NADP⁺ dépendante a été réalisée dans une souche *K. lactis*. Pour réduire la conversion de D-xylose en biomasse, les gènes codant pour une xylose réductase et une XDH potentiel ont été délétés de la souche exprimant le gène *xyd1*. Sous certaines conditions (40 g/D-xylose/L et 10,5 g D-galactose/L) la production de D-xylolate s'élève à 19 ± 2 g D-xylolate/L avec un rendement de 153 mg D-xylolate/L/ h.

Le précédent paragraphe a permis de faire un état des faits concernant la production de cette molécule d'intérêt. Si l'ingénierie métabolique a permis de modifier des souches pour la production de cette molécule, l'utilisation d'enzyme semblait difficile au regard des facteurs nécessaires. La CDH est une hémoflavoenzyme fonctionnant sans l'intervention de co-facteur externe. D'après les précédents résultats obtenus sur paille de blé, cette dernière pourrait avoir un effet sur les hémicelluloses. De ce point de vue, la CDH semble être un candidat à l'oxydation du xylose mais doit compléter un cocktail d'enzymes composés de xylanase et β -xylosidase. Dans cette expérience, le cocktail enzymatique GC220 a été sélectionné pour son activité xylanase (3,85 U/mg) cependant la faible présence d'activité β -xylosidase montre la difficulté d'hydrolyser l'acide xylobionique en acide xylonique et xylose (Fig. 38). Toutefois la CDH additionnée au cocktail (20U/g de xylane) a montré la capacité d'oxyder le xylose issue d'un substrat complexe tel que le xylane de bouleau et ainsi former des composés possédant une grande valeur ajoutée (Fig. 37).

Bien que le procédé n'ait pas été optimisé, ce dernier montre un intérêt par i) l'utilisation d'une enzyme pouvant atteindre des taux de transformations élevés ii) l'utilisation d'un

substrat complexe iii) l'absence de co-facteur type NADP(H) ce qui facilite son utilisation au sein de procédés.

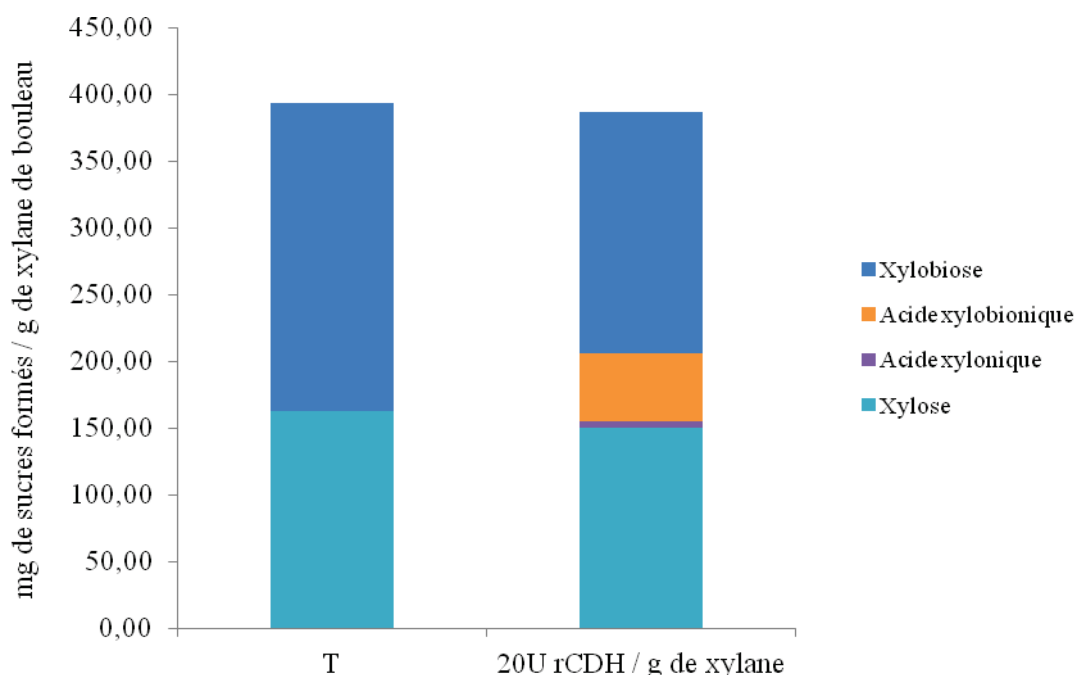


Figure 37. Hydrolyse de xylane et formation d'acide xylonique. Détermination du rendement en C5 après 72 heures de traitement enzymatique sur xylane de bouleau en utilisant le cocktail enzymatique GC220 avec ou sans supplémentation de 20 U de rCDH par gramme de substrat. Les expériences ont été réalisées en triplicats. La signification statistique était $P < 0.05$.

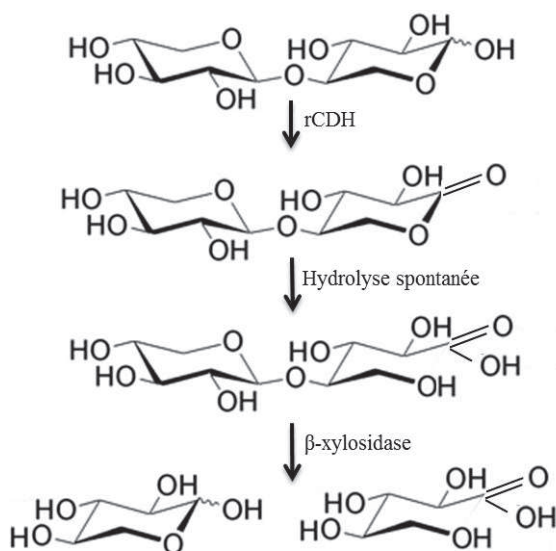


Figure 38. Formation d'acide xylonique. Schéma présentant l'action de la CDH sur le xylobiose et les hydrolyses successives menant à l'obtention d'acide xylonique.

VIII. IMPLICATION DE LA CDH DANS LA REACTION DE FENTON

Afin d'étudier la participation de la CDH à la réaction de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O} + \text{OH}^\cdot$), la capacité de la CDH à réduire le fer en solution a été démontrée. Cette première étape est un point important permettant au fer Fe^{3+} (ion ferrique) de retrouver un état Fe^{2+} (ion ferreux) et ainsi accentuer la production de radicaux hydroxyles. Ces radicaux hydroxyles seraient impliqués dans la dégradation de la lignocellulose par certains champignons filamenteux (Eastwood *et al.*, 2011).

VIII.1 Réduction du fer par la CDH

La ferrozine a été utilisée pour sa capacité à réagir avec les ions ferreux. Il est ainsi possible grâce à cette dernière de suivre une réaction de réduction du fer par l'augmentation de l'absorbance à 562 nm. Lorsque la CDH est ajoutée à un mélange composé d'ion ferrique, de cellobiose et de ferrozine, on observe la formation d'ion ferreux en comparaison à un mélange réactionnel sans CDH ou sans cellobiose. Ces essais ont démontré la capacité de la CDH à former des ions ferreux renforçant ainsi les hypothèses faisant part d'une implication de la CDH dans des réactions de type Fenton (figure 39).

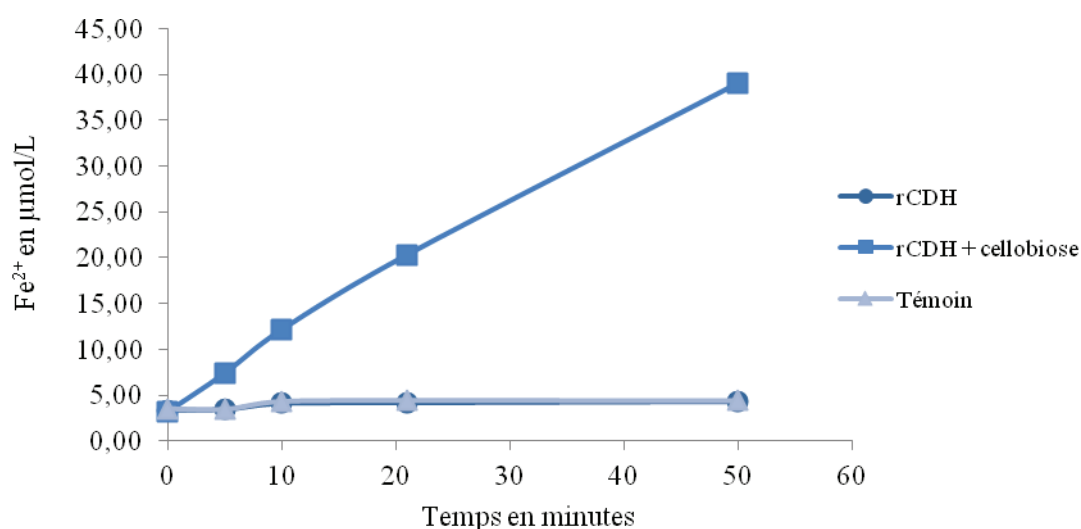


Figure 39. Réduction du fer par la CDH en suivant l'augmentation de l'absorbance à 562 nm avec et sans cellobiose et un témoin sans cellobiose et rCDH. Réalisés en triplicats. ● : rCDH seule ; ■ : rCDH + cellobiose ; ▲ : Témoin (cellobiose).

Afin de confirmer l'implication de la CDH dans la réaction de Fenton, un test en présence de TBA (acide thiobarbiturique) a été réalisé pour mesurer la production de radicaux hydroxyles en présence de CDH. Cette méthode est basée sur l'oxydation du 2-D-désoxyribose par un radical hydroxyle pour former du malonalaldéhyde. Le malonalaldéhyde réagit avec le TBA après chauffage et produit une absorbance caractéristique à 532 nm. Cette absorbance est proportionnelle à la quantité de radicaux hydroxyles formés pendant la réaction. La production de radicaux hydroxyles est observée lors de l'utilisation d'un système constitué par la CDH, le cellobiose, une solution ferrique et du peroxyde d'hydrogène. Lorsque le peroxyde d'hydrogène est éliminé, la production est deux fois plus faible. Quand la réaction est réalisée avec une solution ferrique seule ou avec une solution ferrique et du peroxyde d'hydrogène, les productions en radicaux hydroxyles sont environ 2 fois plus faibles qu'une réaction réalisée en présence de CDH (figure 40). Ce résultat tend à montrer la capacité de la CDH à accentuer la production de radicaux hydroxyles via sa faculté à réduire les ions métalliques.

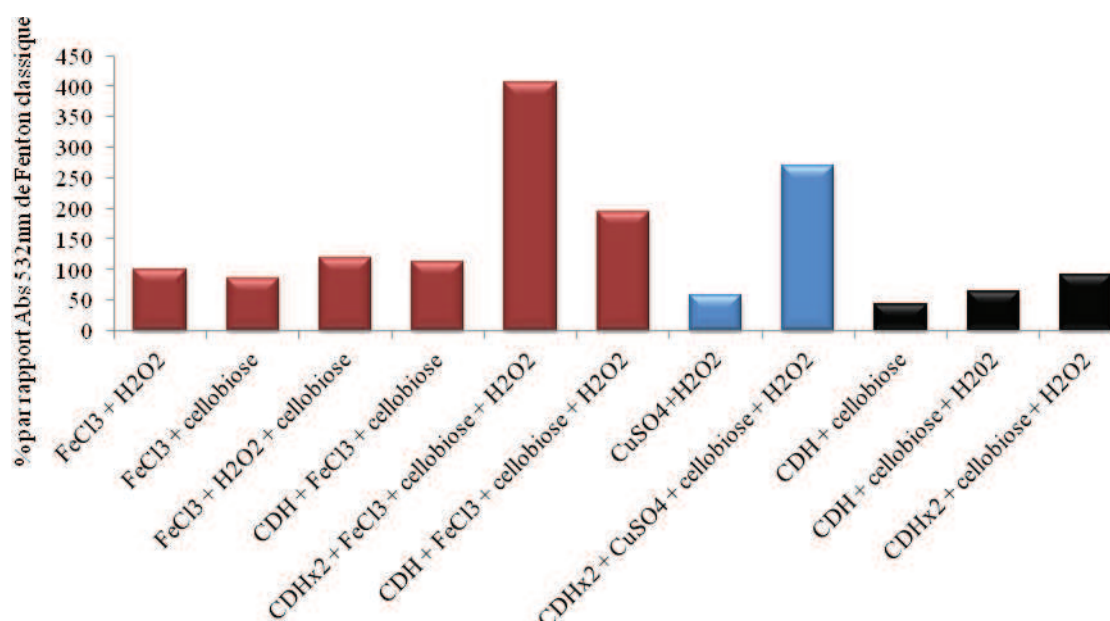


Figure 40. Mesure de la production de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton avec ou sans ajout de rCDH. Réalisée en triplicats. La solution ferrique utilisée est le chlorure de fer FeCl₃ (0,1 mM) ; solution de cuivre CuSO₄ (0,1 mM) ; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène (1,8 mM) ; CDH : cellobiose déshydrogénase (29 nM) ; cellobiose (10 mM).

Dans la littérature, la réaction de Fenton est communément décrite comme productrice de radicaux hydroxyles pouvant dépolymériser la cellulose et la lignine. L'ajout de CDH

améliore considérablement la production de radicaux hydroxyles comme démontré précédemment. Afin de confirmer la réactivité des radicaux hydroxyles vis-à-vis de la cellulose, un test a été réalisé en étudiant la diminution de la viscosité d'une solution de CMC (CarboxyMéthylCellulose) à viscosité medium, la viscosité intrinsèque étant liée à la masse moléculaire moyenne du polymère selon la loi de Mark-Houwink $[\eta] = KM^a$. Pour réaliser les réactions de Fenton, les composés suivant ont été utilisés: solution ferrique et peroxyde d'hydrogène, avec ou sans addition de CDH. La viscosité de la CMC seule a été mesurée en tant que témoin. Les résultats n'ont montré aucun changement dans la viscosité pour le contrôle, mais une faible diminution de la viscosité lors d'une réaction de Fenton sans CDH. En revanche l'ajout de CDH au sein de la réaction de Fenton a permis de diminuer la viscosité de façon significative impliquant une forte dépolymérisation de la CMC. Ces résultats sont conformes à la participation de la CDH à la chimie de Fenton et aux phénomènes de dépolymérisation associés (figure 41).

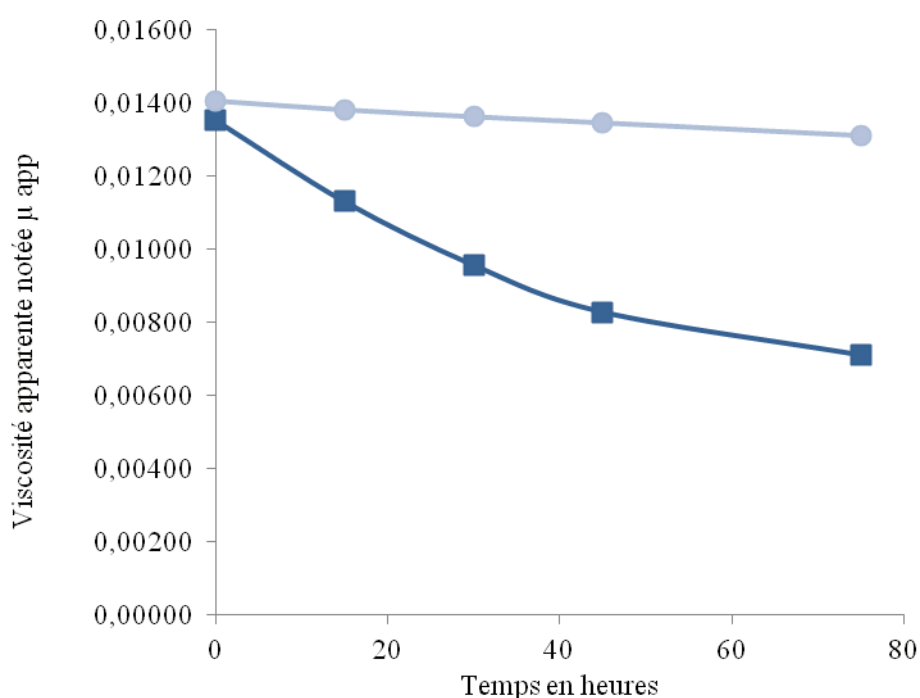


Figure 41. Mesure de la viscosité apparente à 1000 s^{-1} d'une solution à 0,8 % de CMC. La réaction de Fenton est réalisée avec (■) et sans (●) ajout de rCDH. Réalisés en triplicats.

Discussion de la première partie des résultats

Le champignon de la pourriture blanche *P. cinnabarinus* a été étudié ces dernières décennies pour son système ligninolytique basé sur l'utilisation de laccases, sans qu'aucune autre peroxydase connue n'ait été identifiée au sein de son sécrétome (Eggert *et al.* 1996). Ce système, et tout particulièrement la laccase, a été utilisé pour la synthèse de composés à grandes valeurs ajoutés par l'intermédiaire de procédés biotechnologiques originaux (Eggert *et al.*, 1995; Stentelaire *et al.*, 2000; Sigoillot *et al.*, 2004).

Dans cette première partie, la culture de *P. cinnabarinus* avec un milieu composé de cellulose a permis de mettre en évidence les activités présentes dans son système cellulolytique. Les tests d'activités ont montré la présence d'acteurs d'intérêts connus (activités hémicellulase diverses tel que : α -galactosidase, β -xylanase ou galactosidase), et d'autres activités (mannosidases, arabinofuranosidases) non décrites (Ohtakara *et al.* 1981; Ohtakara *et al.* 1984; Sigoillot *et al.* 2002). Les activités endoglucanase et exoglucanase ont été révélées par zymogramme (CMCase) et hydrolyse sur Avicel et CMC. L'absence de peroxydases (manganèse peroxydase et lignine peroxydase) a également été confirmé.

Comme précédemment décrit, *P. cinnabarinus* est souvent cité pour sa production de laccase (Herpoel *et al.* 2000), cependant, en conditions cellulolytiques, la production de cette dernière semble réprimée bien qu'une activité vis-à-vis de l'ABTS soit observée sur zymogramme à hauteur de 50 kDa. Des résultats semblables ont été observés chez *P. chrysosporium* cultivé dans des conditions similaires. A partir d'un zymogramme, les auteurs décrivent la présence de plusieurs bandes assimilées à la laccase possédant une masse d'environ 50 kDa. La confirmation de la présence de laccase a été apportée par résonance paramagnétique électronique (Gnanamani *et al.*, 2006).

A la suite de la caractérisation partielle du sécrétome de *P. cinnabarinus*, nous avons opté pour un clonage suivi d'une expression hétérologue de la CDH chez *P. pastoris* afin d'en faciliter la production et la purification. Les CDHs de *T. versicolor* (Stapleton *et al.*, 2004), *P. chrysosporium* (Yoshida *et al.*, 2001) et, plus récemment, *N. crassa* (Zhang *et al.*, 2010) ont été exprimées avec succès dans le même hôte.

La production de la CDH recombinante en bioréacteur de 2 litres (7800 U/L) a confirmé que l'expression hétérologue de la CDH chez *P. pastoris* est un moyen efficace pour produire ces enzymes fongiques à des taux de production élevés. La caractérisation enzymatique de la CDH recombinante a montré des paramètres cinétiques (V_{max} , K_M) du même ordre de grandeur que ceux observés précédemment pour l'enzyme native (Sigoillot *et al.* 2002) et plus

généralement pour les CDHs recombinantes étudiées dans la littérature (Stapleton *et al.* 2004; Pricelius *et al.* 2009). Outre des caractéristiques similaires, la CDH recombinante de *P. cinnabarinus* a montré une plus grande thermostabilité que les CDHs issues d'autres champignons, avec une température optimale de 70 ° C. Le pH optimal de 4,5 est en accord avec la littérature.

Certaines CDHs produites par les ascomycètes et les champignons de la pourriture molle contiennent un module de fixation aux carbohydrates (CBM) et sont capables de se lier à la cellulose. Dans le cas de la CDH de *P. chrysosporium*, sa capacité à se lier à la cellulose semble être médiée par un domaine précis avec une structure différente des CBMs (Henriksson *et al.* 1997). La capacité de l'enzyme à se lier à une cellulose type Avicel en absence de CBM a été confirmée expérimentalement. Ces résultats additionnés à d'autres observations tels que l'expression simultanée de CDH et de cellulases chez le champignon ainsi que son rôle dans la dégradation de la cellulose en font un acteur d'intérêt dans les phénomènes de dégradation de la lignocellulose. En effet, Bao *et al.* ont constaté que l'addition de la CDH de *P. chrysosporium* à un cocktail commercial de cellulases augmentait le rendement en glucose et produisait du cellobionolactone lors de l'hydrolyse d'une cellulose cristalline (Bao et Renganathan, 1992).

Dans ce travail, nous avons utilisé la CDH pour compléter des cocktails de cellulases de *T. reesei* (GC 220) et d'*A. niger* (N188). Dans une première série d'expériences, le sécrétome de *P. cinnabarinus* contenant la CDH a été additionné à ces cocktails pour l'hydrolyse de deux substrats: la paille de blé et la paille de blé prétraitée par traitement acide à 130 °C.

L'hydrolyse du substrat prétraité a montré que la supplémentation des cocktails avec le sécrétome de *P. cinnabarinus* permettait d'accroître le rendement global en sucres avec la formation d'acide gluconique. En revanche, l'addition de la CDH seule n'a pas montré d'augmentation concrète du rendement sucres. Les substrats prétraités étant plus facilement hydrolysable par les cocktails, l'implication de la CDH a été minimisée.

En utilisant le sécrétome de *P. cinnabarinus* ou la CDH seule, les résultats de l'hydrolyse sur paille de blé ont montré (i) une augmentation des rendements en sucres C5 à partir des hémicelluloses et (ii) une diminution du rendement glucose corrélant avec la formation de grandes quantités d'acide gluconique. La formation de ce composé s'explique par l'action de la CDH. Cette dernière oxyde le cellobiose en cellobionolactone, qui sous l'action de la β -glucosidase (présente dans les cocktails) produit du glucose et du gluconolactone (Igarashi *et al.*, 2003). Bien que le gluconolactone soit un inhibiteur de l'action des β -glucosidases, ces lactones sont instables en solution et s'hydrolyse spontanément en acides aldoniques (Conchie

et al., 1968; Parry *et al.*, 2001). Récemment, des aldonolactonases, produites chez certains champignons ont permis de mettre en évidence une hydrolyse enzymatique des lactones en acide aldoniques (Beeson *et al.*, 2010). L'hydrolyse des lactones pourrait permettre de lever une partie de l'inhibition des β -glucosidases et des glycosidases pour ces lactones (Bruchmann *et al.*, 1987). Cependant, l'acide gluconique a montré une forte inhibition de l'activité β -glucosidase (Cannella *et al.*, 2012).

La présence d'acides aldoniques comme l'acide gluconique diminue le nombre d'extrémités réductrices libérés par les hydrolases comme le montre la diminution de la réponse au DNS. En conséquence, le dosage des extrémités réductrices par le DNS n'est pas une méthode appropriée pour évaluer la dégradation de la cellulose lorsque de grandes quantités de CDH sont présentes dans le sécrétome.

Plus récemment, l'importance de la CDH a été démontrée dans les phénomènes de dégradation oxydative de la cellulose. En effet, la délétion du gène *cdh-1* chez *N. crassa* a montré une diminution de l'activité cellulase contenue dans le sécrétome de 37 à 49% par rapport à la souche sauvage (Phillips *et al.*, 2011). Ce résultat est du à la suppression de la synergie entre la CDH et des monooxygénases à cuivre, les PMO (pour polysaccharide monooxygénases) également connues sous l'appellation GH61.

L'addition de ce type enzymes oxydatives aux cocktails commerciaux (Cellic CTec2) ont permis de booster les capacités d'hydrolyse de la cellulose. Lorsque ce nouveau cocktail est utilisé lors de procédés d'hydrolyse de la lignocellulose prétraité, des composés oxydés tels que l'acide gluconique et l'acide cellobionique sont formés et une augmentation de la conversion de cellulose est observée (jusqu'à 25% d'augmentation par rapport aux anciens cocktails). Cependant, l'acide gluconique a montré une forte inhibition de l'activité β -glucosidase (Cannella *et al.*, 2012).

L'acide gluconique et ses dérivés tels que le gluconate de sodium possèdent un large éventail d'applications (teinture des textiles, l'utilisation en tant qu'additif alimentaire ou encore dans les détergents, les cosmétiques et produits pharmaceutiques) (Ramachandran *et al.*, 2006). Dans les procédés de saccharification, l'utilisation de l'acide gluconique pourrait offrir un moyen important d'améliorer la rentabilité de l'ensemble du processus. Il existe plusieurs organismes utilisant l'acide gluconique par le biais de la voie des pentoses phosphates. *Zymomonas mobilis* est capable de produire de l'éthanol à partir d'acide gluconique par la voie d'Entner-Doudoroff (Strohdeicher *et al.* 1988). La fermentation alcoolique de l'acide gluconique par *Saccharomyces bulderi* a également été démontrée (van Dijken *et al.* 2002). L'introduction de ces organismes en mesure d'utiliser les pentoses et l'acide gluconique

pourrait augmenter le rendement global en éthanol en utilisant des constituants moins fermentescibles et offrirait un moyen de concevoir un processus durable pour la production de bioéthanol de seconde génération.

Récemment, Fan *et al.* appuyèrent cette théorie en proposant une nouvelle voie biochimique basé sur un procédé comprenant le prétraitement, l'hydrolyse enzymatique et la production de cellulase en une seule étape, appelée processus aérobie, où les sucres type acide aldoniques sont produits en tant qu'intermédiaires réactifs pour la production de biocarburant. Ce système a pour objectifs : i) d'augmenter la production d'acide cellobionique via la réduction de β -glucosidase et l'augmentation de cellobiose déshydrogénase et ii) dans une seconde étape d'utiliser des microorganismes (*Escherichia coli* KO 11) ayant la capacité d'utiliser les deux produits d'hydrolyse de l'acide cellobionique, le glucose et l'acide gluconique, comme source de carbone en co-fermentation (Fan *et al.*, 2012).

Les résultats menés sur l'oxydation du xylane de bouleau par la CDH recombinante utilisée en supplémentation au cocktail GC220 a démontré que l'action de la CDH pouvait être étendue à l'oxydation des hémicelluloses. L'utilisation de la CDH recombinante a montré la formation d'acide xylobionique et d'acide xylonique, libérés par action des β -xylosidases. L'action de la CDH sur le xylane a permis de produire un composé de haute valeur ajoutée. En effet, en 2004, le ministère de l'énergie des Etats-Unis (US DOE) a mené une étude portant sur les molécules dérivées de la biomasse présentant un potentiel dans l'élaboration de plateformes pour l'industrie chimique (Top Value Added Chemicals From Biomass - Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas). Seules les molécules issues des sucres et de gaz de synthèse avaient été prises en considération dans cette première étude. Trente molécules (les "top 30") ont ainsi été sélectionnées parmi lesquelles figure l'acide xylonique.

Dumonceau *et al.* ont démontrés que la CDH est essentielle dans les phénomènes de colonisation du bois chez *T. versicolor*, mais n'a aucun effet significatif sur la délignification de la pâte Kraft (Dumonceaux *et al.*, 2001). En l'absence de peroxydase chez *P. cinnabarinus*, la partie hémique de la CDH pourrait participer aux réactions de type Fenton générant ainsi les radicaux hydroxyles pouvant être un élément clé de la dégradation de la lignocellulose (Henriksson *et al.* 1995). Le rôle de la CDH lors de la dégradation du bois par les champignons mérite d'être considéré à la lumière de ces résultats. La cellobiose déshydrogénase est un catalyseur de la réaction de Fenton, si l'enzyme ne peut produire de

radicaux hydroxyles par sa seule présence, l'utilisation d'une solution de Fe^{3+} ainsi que du peroxyde d'hydrogène a montré la formation de composé type radicaux hydroxyles, ceci par la capacité que possède la CDH à réduire les ions métalliques (notamment le cuivre présent dans les GH61). Si les systèmes de dégradation 'nonenzymatique' basé sur l'utilisation de radicaux hydroxyles via des réactions de Fenton ont été étudiés, leurs utilisations dans des procédés industrielles semblent plus délicats, de part le manque de compréhension et le nombre important d'acteurs impliqués au court de ces phénomènes (Eastwood *et al*, 2011).

Partie II

**Synergie GH61 / CDH : action
comparée de deux GH61 de *Podospora
anserina***

I. Introduction

En réponse aux préoccupations environnementales, les procédés industriels tels que la production de bioéthanol de seconde génération sont apparus. Majoritairement basé sur la dégradation de la cellulose, ces processus sont limités par un problème majeur, la récalcitrance de la biomasse lignocellulosique à la dégradation (Margeot *et al.*, 2009 ; Chundawat *et al.*, 2011 ; Foust *et al.*, 2008). Afin de résoudre le problème causé par la récalcitrance du substrat et le coût élevé des cocktails de cellulases, la recherche s'est axée sur de multiples méthodes en vue d'améliorer la conversion de la cellulose (Wilson, 2011). Si l'oxydation était reconnue comme une réaction importante dans la dégradation de la cellulose chez le champignon (Eriksson *et al.*, 1974), ce n'est que plus récemment que quelques études ont révélé le rôle joué par la CDH et les GH61 dans la dégradation oxydative de la cellulose (Beeson *et al.*, 2012 ; Harris *et al.*, 2010 ; Horn *et al.*, 2012 ; Langston *et al.*, 2011 ; Phillips *et al.*, 2011 ; Quinlan *et al.*, 2011 ; Westereng *et al.*, 2011).

Les glycosides hydrolases appartenant à la famille 61 (d'après la classification CAZy) nouvellement appelé PMO (pour Polysaccharide Monooxygénases) ont montré un fort potentiel d'amélioration de l'hydrolyse de la cellulose (Harris *et al.*, 2010 ; Phillips *et al.*, 2011 ; Quinlan *et al.*, 2011 ; Cantarel *et al.*, 2009; www.cazy.org).

A l'origine, les membres appartenant à cette famille ont été identifiés comme des endoglucanases et ce n'est que plus récemment que leur activité de type monooxygénase a été révélée. Par cette action, elles catalysent le clivage de la cellulose et libèrent des cellodextrines (Phillips *et al.*, 2011 ; Beeson *et al.*, 2012 ; Quinlan *et al.*, 2011).

Les acides organiques comme l'acide ascorbique ou l'acide gallique ainsi que les résidus de lignine ont été identifiés comme des composés potentialisant l'action des GH61 (Quinlan *et al.*, 2011; Dimarogona *et al.*, 2012; Westereng *et al.*, 2011).

Ces polysaccharide monooxygénases lytique (LPMOs pour Lytic Polysaccharide MonoOxygenases) serait capable d'agir en surface d'un substrat insoluble sans avoir recourt à une première coupure pour extraire une chaîne de la matrice cristalline (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010).

L'existence d'une synergie entre la CDH et la GH61 a également fait l'objet de recherche. La CDH pourrait agir en tant que réducteur du cuivre présent chez les GH61 (Lin *et al.*, 2012). L'action en synergie de ce couple a permis de définir un rôle clé de ces enzymes au sein des systèmes cellulolytiques (Langston *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2011; Sigmund *et al.*, 2012).

L'efficacité de ce système GH61/CDH semble dépendant de la concentration en enzyme et du type de substrat utilisé. Les sucres oxydés sont les produits majoritaires résultant de la dégradation de la cellulose, nous avons recherché à obtenir plus de détails sur la nature des produits formés. Pour atteindre cet objectif, nous avons réalisé le clonage et l'expression hétérologue de deux GH61 issues de l'ascomycète coprophile *Podospora anserina*. Leurs actions ont été comparées à travers l'identification des composés générés en association avec la CDH de *P. cinnabarinus* (Bey *et al.*, 2012).

II. Phylogénie des GH61s

La genèse de ces travaux prend pour origine la thèse de L. Poidevin (Criblages génomique et fonctionnel des champignons filamenteux pour la complémentation du sécrétome de *Trichoderma reesei*, 2010).

Une partie des travaux réalisés au cours de cette thèse avait pour objectif de produire des GH61s de *P. anserina* chez *P. pastoris*. Un résumé (ci-dessous) retrace l'historique du travail effectué par L. Poidevin.

Résumé des précédents travaux :

Le choix des gènes à cloner chez *P. anserina* était basé sur la présence d'un module CBM 1. Puis, lorsque deux gènes ont montré un pourcentage d'identité de séquence très élevé l'un des deux paralogues a été éliminé arbitrairement. Pour vérifier la représentativité des six GH61s ainsi sélectionnées, une étude phylogénétique a été réalisée. Le jeu de données comprenait les 33 séquences de GH61s de *P. anserina*, ainsi que les séquences de trois enzymes dont la structure 3D est connue et appartenant à la famille GH61 (*Thielavia terrestris* *TtGH61E* et *T. reesei* *TrGH61B*) ou la famille CBM 33 qui présente une structure similaire (*Thermobifida fusca* *TfCBP21*). Lorsque la séquence prédite du gène était partielle, elle a été écartée de l'analyse. La résolution des structures des enzymes *TtGH61E* et *TrGH61B* a révélé trois acides aminés hydrophiles communs, exposés à la surface de l'enzyme : H1, H89 et Y 176 de l'enzyme *TrGH61B* correspondant à H1, H68 et Y153 chez *TtGH61E*. Ces trois acides aminés sont impliqués dans la coordination d'un ion métallique (Harris *et al.*, 2010 ; Karkehabadi *et al.*, 2008). D'autres résidus sont également très conservés, parmi lesquels : H165, Q174 et Y214 (d'après la numérotation *TrGH61B*). Ces derniers sont décrits par

Karkehabadi *et al.* comme faisant partie d'un groupe d'acides aminés en surface, proche du site de liaison du cation divalent.

L'étude phylogénétique découlant de ces alignements de séquences divise les GH61s de *P. anserina* en trois sous-familles (Fig. 42). Deux de ces sous-familles incluent une enzyme dont la structure est connue, ce qui nous a permis de conforter la division en trois clades. L'alignement a été réalisé avec le logiciel Muscle sur le site de l'EBI (pour European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Trois protéines de structures connues ont été ajoutées au jeu de données : *TtGH61E*, *TrGH61B* et une protéine bactérienne de liaison à la chitine : *TfCBP21*. L'alignement des séquences a été réalisé avec Muscle, le modèle de substitution pour le calcul de la matrice de scores est JTT (Jones, Taylor & Thornton, 1992), puis l'arbre a été construit avec deux méthodes de regroupement successives : Secator et Ward. L'annotation de l'arbre est faite avec le logiciel Dendroscope. La longueur des branches représente les distances évolutives, selon l'échelle donnée.

Les gènes de la famille GH61 sélectionnés chez *P. anserina* couvrent les trois sous-familles distinguées par cette analyse phylogénétique. Cette constatation a renforcé le choix des gènes candidats. Malheureusement, les protéines correspondantes n'ont pas toutes été obtenues par la suite. En effet, les gènes codant pour les GH61s de *P. anserina* ont été clonés dans le vecteur pPICza-A et exprimées lorsque cela fut possible chez *P. pastoris*.

La production d'enzymes chez *P. pastoris* est soumise à l'introduction de deux acides aminés (EF) en position N-terminale. En plus de cet ajout, une séquence EAEA a été identifiée en amont, cette dernière correspondant au site de reconnaissance de la protéase Ste 13 de *P. pastoris*. En effet, la maturation des protéines recombinantes dans l'appareil de Golgi de la levure *P. pastoris* a lieu en deux étapes : la peptidase Kex 2 clive après la séquence Lys-Arg et la peptidase Ste 13 reconnaît et clive après une répétition de deux Glu-Ala. En tout, les GH61s avaient six AA supplémentaires (EAEAEF) à l'extrémité N-terminale.

Le peptide signal de chacune des deux protéines recombinantes a été clivé par la protéase Kex 2, mais pas par la protéase Ste 13. L'efficacité du clivage semble dépendre des caractéristiques intrinsèques de la protéine recombinante. Dans ce cas, le premier acide aminé des protéines GH61 natives est une histidine conservée dans 100% des cas. Cette histidine vient se rapprocher physiquement d'un second résidu His parfaitement conservé, pour coordonner un métal divalent essentiel à l'activité de la protéine (Figure 41) (Karkehabadi *et al.* 2008 ; Harris *et al.*, 2010).

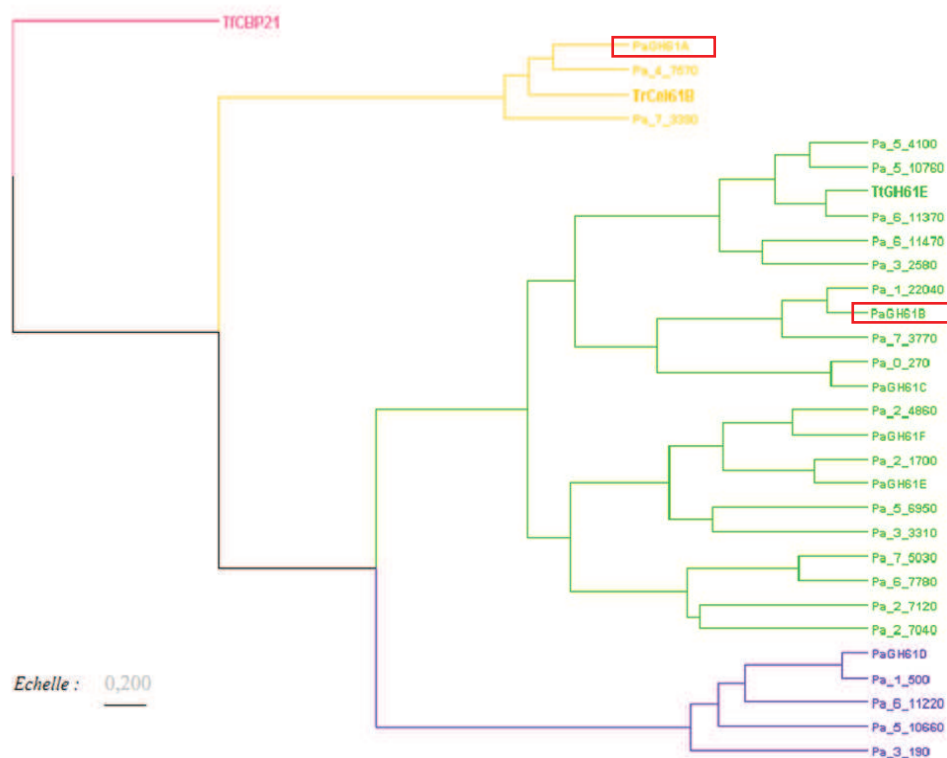


Figure 42. Arbre phylogénétique des glycosides hydrolases de familles 61 de *P. anserina* (travaux issues de la thèse de L. Poidevin). Trois protéines de structures connues avaient été ajoutées au set de données : *TrGH61B*, *TrGH61E* et *TfCBP21* (seules GH61 ou assimilée étudié au moment de la rédaction). Les GH61 étudiées au cours de cette thèse sont encadrées en rouge.

III-Introduction aux travaux réalisés au cours de la thèse

Afin de s'affranchir de la présence d'acides aminés supplémentaires situés en amont de l'Histidine 1 en N-terminal, il a été envisagé d'éliminer l'un des deux sites de coupures du peptide signal. En effet, comme précédemment décrit, le site de coupure par Ste13 ne semblait pas fonctionnel, nous avons donc opté pour une élimination de ce dernier tout en conservant le site de coupure par Kex 2. La technique de clonage InFusion nous a également permis d'éliminer les sites de restriction pour *EcoRI* et *XbaI*, le site *EcoRI* était particulièrement visé par cette stratégie. L'utilisation de ce dernier impliquait la présence d'acides aminés supplémentaires en position N-terminale avant l'Histidine 1. A partir de ces nouvelles constructions, l'expression hétérologue des GH61 de *P. anserina* chez *Pichia pastoris* a pu être envisagée. Les travaux suivants décrivent les résultats obtenus au cours de cette thèse.

IV. Expression hétérologue des GH61A et GH61B de *P. anserina* chez *P. pastoris*

Les récentes données issues de la littérature ont permis de rassembler les GH61s majoritairement étudiés. L'alignement montre la présence des trois résidus impliqués dans la fixation du cuivre de type II, deux histidines et une tyrosine (Fig. 43). Deux gènes codant pour des GH61 A et B de *P. anserina* ont été clonés dans le vecteur d'expression pPICzaA afin d'être exprimé de façon hétérologue chez *P. pastoris*. Après avoir sélectionné des clones présentant les plus hauts taux d'expression (identification par dosage de protéine et SDS-PAGE), deux GH61s sur trois ont pu être exprimées chez *P. pastoris* (*PaGH61A* et *PaGH61B*). Les productions de ces deux enzymes ont été réalisées en bioréacteur de 2L avec des taux de production de 150 mg/L et 1 g/L pour *PaGH61A* et *PaGH61B*. L'analyse SDS-PAGE a révélé la présence de *PaGH61A* et *PaGH61B*, respectivement, à 60 et 50 kDa.

```

PMO-2      HTIFSSL-EVN---GVNQGLGEG-----VRVPTNGFI--EDVTSASIAIC
PMO-3      HGFVDNA-TIG---GQFYQFYQYQDFFMGSPFDRIARKIP--GNGFV--EDVTSALAIQC
TaGH61A    HGFVQNI-VID---GKNYGGVLYNQVYPMSPNPEVIAMSTTATDLGFVDGTGYQTPTDIIC
PaGH61A    HGHVSHI-IVN---GVYQYQYDPTTHFYQFNPFVIGWSALQDQNGFVEPNFSTPTDIIC
TrGH61A    HGHINDI-VIN---GVYQYQYDPTTHFYQFNPFVIGWSALQDQNGFVEPNFSTPTDIIC
NcGH61-3   HTIFQKV-SVN---GADQGLGEG-----IRAFANNFV--TQVMSSTIIC
MtGH61A    HGHVSHI-IVN---GVYQYQYDPTTHFYQFNPFVIGWSALQDQNGFVEPNFSTPTDIIC
TtGH61B    HATFQDL-WID---GVDYG-SQC-----VLFASNSFV--TNVASDDIIC
PaGH61B    HSTFQDL-WVD---GTDYG-SQC-----AALFQNSFV--TNVNSDDIIC
PcGH61D    HATFDFIEPSTVTGDMVYVRE-----TQNHYSNGFV--TDVTSPEFRC
TtGH61E    HATWFRV-----NDGADMQQVRK-----ADNMQDNGFV--GVDTSPEIIC
          *          :          :          :          :          :
PMO-2      NGSPNT-VASTSKVITVQAGTNVTAIMRYMLSTTG--DSPADVMDSSHRGPTIAYLEKKVD
PMO-3      NADSAFAR-----LHASAAAGSTVTLRNTI-----WFDHHRGPFVITYMARCP
TaGH61A    HRGAPFGA-----LTAFFVSPGTVLQWTF-----WFDHHRGPFVINYLAFCN
PaGH61A    HKSAPFGS-----GSATVNAQDKISIVWTF-----WTFEHRGPFVINDYLANCN
TrGH61A    HKNATNAK-----GHASVKAQDTILFQWVF-----WTFEHRGPFVINDYLANCN
NcGH61-3   NAVT-----MKDENVLTVPAGAKVGHFWGHEIGGAAGFNADNPFAAHRGPFVINDYLAED
MtGH61A    HKSATFGS-----GHATVAAGDKINIVWTF-----WTFEHRGPFVINDYLAECN
TtGH61B    NVGTSRPTV-----KCFVKAQSTVTIEM--HQQPGDRSCANEAGGHRGPFVINDYLAECN
PaGH61B    NIIGTRPQV-----KCFVKAQSTVTIEM--HAQNGDRSCANEAGGHRGPFVINDYLAECN
PcGH61D    YELDQNTAGQQTATVTSAGDTVGF-KA-----NSAIHRGPFVINDYLAECN
TtGH61E    FQATPSFAP---SVLNTTAGSTVTY-NA-----NEDVHRGPFVINDYLAECN
          :          *          :          :          :          :
PMO-2      NA-A---TAGVGNGWFKIQDQMDSS-----GVWSTERVI--NGRGRHSIKIPECI
PMO-3      DTGQQDWTFSASDKVWFKIKEGGREG-----TSNVWAATPLM--TAPANVEYAIPLCL
TaGH61A    GD-CS---TVDKTQLEFFKIAESGLIND---DNFFGIMASDNLH--AANNSTWVTIPTTI
PaGH61A    GF-CE---TVDKTSLRWFKIAGGAGYNP-----NTRTWAADDLR--ANGNSWLVQIPADL
TrGH61A    GD-CE---TVDKTLEFFKIDGVGLLSG---G-DPGIMASDNLH--SNNNTWVVKIIPDNL
NcGH61-3   NA-A---TTGSGLEWFKVAEAGLS-N-----GKMAVDLLI--ANNNSWVTFMTOTI
MtGH61A    GD-CE---TVDKTSLRWFKIDGAGYDK-----AAGNMAADDLR--ANGNSWLVQIPADL
TtGH61B    DA-V---T-ADGSGWFKVFDQSWAKNPSGSGTGDGDDVWGTKDLN--SCCGKMNVKIPECI
PaGH61B    DA-L---T-ADGSGWFKIFDDGWRKNPFGSRVGGDDDFWGTKDLN--ACCGKMNVKIPECI
PcGH61D    PA-A-NSEAGTGGTWFVKIYEKPFQ-----ENGQLVFDTTQCEVTFPTIPEKL
TtGH61E    DG-EDINSWNGDGAVWFKVYEDHPTF-----GAQLTWSTGKSSPAVFIPECI
          :          :          :          :          :
PMO-2      APGCYLLRAEMIALHAASNYPGAQFYMECAQLNVVGGTGAKTPTST-VSFFGAYSGSDPGV
PMO-3      KPGVYLLRHEIIALHSAISYPGAQFYPCQCHQLQVTSSTGTRTFSSGLVSPFGAYKSTDPGV
TaGH61A    APGCYLLRHEIIALHSAQNDGGAQNYPQCINLQVTSSTGTRTFSSGLVSPFGAYKSTDPGV
PaGH61A    KAGNYLLRHEIIALHSGGSPFGAQAQYFQCINLQVTSSTGTRTFSSGLVSPFGAYKSTDPGV
TrGH61A    APGCYLLRHEIIALHSAQAGGAQNYPQCINLQVTSSTGTRTFSSGLVSPFGAYKSTDPGV
NcGH61-3   APGCYLLRHEIIALHSAQAGGAQNYPQCINLQVTSSTGTRTFSSGLVSPFGAYKSTDPGV
MtGH61A    KAGNYLLRHEIIALHSAQSPFGAQAQYFQCINLQVTSSTGTRTFSSGLVSPFGAYKSTDPGV
TtGH61B    EPGCYLLRAEIALHVAASGGGAQFYMSYQITVTSSTGTRTFSSGLVSPFGAYKSTDPGV
PaGH61B    PGGCYLLRAEIALHVAASGGGAQFYMSYQITVTSSTGTRTFSSGLVSPFGAYKSTDPGV
PcGH61D    PGGCYLLRHEIIALHVAASGGGAQFYMSYQITVTSSTGTRTFSSGLVSPFGAYKSTDPGV
TtGH61E    KSGCYLLRAEQIGLHVAASGGGAQFYMSYQITVTSSTGTRTFSSGLVSPFGAYKSTDPGV
          *          :          :          :          :          :
PMO-2      KISIIWFP-----VTAYTVGPGSVFTC-----
PMO-3      TVDAYQA-----ATYTIIPGPAVFTC-----
TaGH61A    LINIYQKL-----SSYIIIPGPLYTG-----
PaGH61A    LFNIVYAS-----PNYIVPGFALIAGAVSSI PQSKSTATRTASATLPAGAVVTPTAGP
TrGH61A    LFNITVSP-----LNYIIPGFTVVSGLPTSVAGGSSAATATASATVPGGSGSTPTRT
NcGH61-3   LFNIVGSGSTTNGSKFYQIPGPAFTCPAGGSGGSSPA-PATTAST-PEPTASAPKPV
MtGH61A    LFNIVYSS-----PDYIVPGFALIAGAASSIAQSTSVATATATATVPGGSGGANPTAT
TtGH61B    LINIHAFM-----STYVVGFTVYAGGSKTASAGSSCS-GCEATCTVGGSGSATLTQPT
PaGH61B    QVNIHGAM-----THYIVPGFANVYAGGSKTASAGSSCS-GCEATCAVGGSPFTSLTPTV
PcGH61D    LINIYNLFKN-----FTGYPAFGPAVWQG-----
TtGH61E    LINIYVFP-----TSYQNPFGPAVFTC-----
          :          :          :          :          :

```

Figure 43. Alignement de séquence en acide aminé GH61 et PMO. *N. crassa* : NcPMO-2 (CAD21296.1), NcPMO-3 (EAA33178.1), NcGH61-3 (EAA36362.1); *Myceliophthora thermophila* : MtGH61A (AEO56542.1); *Thermoascus aurantiacus* : TaGH61A (ABW56451.1); *P. anserina* : PaGH61A (CAP73254.1) et PaGH61B (CAP68375.1); *T. reesei* : TrGH61A (CAA71999.1) ; *Thielavia terrestris* : TtGH61B (AEO69043.1), TtGH61E (ACE10234.1) ; *P. chrysosporium* : PcGH61D (BAL43430.1). Réalisé avec Clustal Ω. Encadrés en bleu, les acides aminés conservés impliqués dans la coordination du cuivre de type II.

V. Zymogramme-CMC: révélation de l'activité oxydative des GH61 et de la CDH

A ce jour, aucun test d'activité n'a été mis au point pour identifier l'intégrité des GH61 produites. Afin d'observer l'activité des *PaGH61A* et *PaGH61B*, des zymogrammes comportant de la CMC dans le gel de séparation ont été analysés. Lorsque les gels ont été

réalisés sous conditions natives (PAGE) et incubés avec de l'acide ascorbique, des halos de décoloration ont été révélés dans la partie supérieure du gel, indiquant que la cellulose a été dépolymérisée (Fig. 44, ligne 4 et 5). En condition dénaturante (SDS-PAGE) et incubation avec de l'acide ascorbique, les halos de décoloration ont pu être observés au niveau des poids moléculaires attendus pour *PaGH61A* et *PaGH61B* avec une moindre intensité (Fig. 44, ligne 6 et 7).

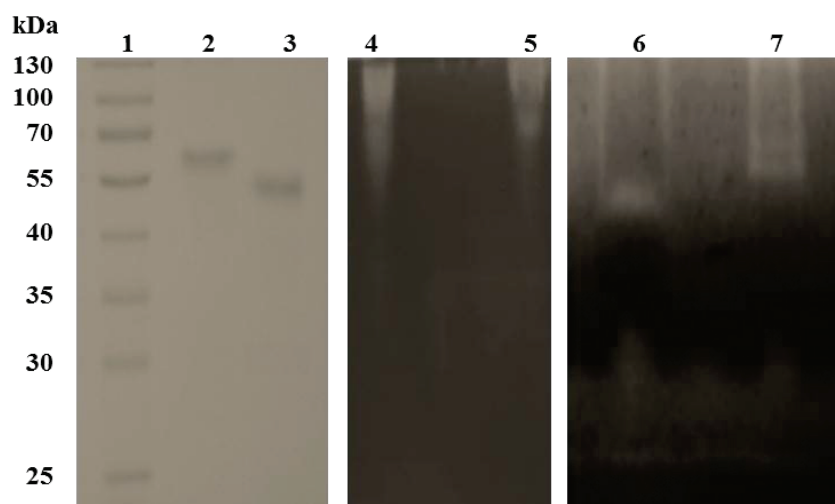


Figure 44. Analyse SDS-PAGE et zymogrammes des *PaGH61*. SDS-PAGE: ligne 1, marqueur de poids moléculaire coloré; ligne 2, 10 µg de *PaGH61A* purifiée; ligne 3, 10 µg de *PaGH61B* purifiée. Après migration des échantillons, les zymogrammes-CMC en condition native (sans traitement thermique) ont été incubés sous agitation à 45°C pendant toute la nuit en présence d'acide ascorbique à 10 mM : ligne 4, 50µg de *PaGH61B* purifiée; ligne 5, 50 µg de *PaGH61A* purifiée. Les zymogrammes-CMC en condition dénaturante ont été incubés avec l'acide ascorbique dans les mêmes conditions que décrites précédemment: ligne 6, 150µg de *PaGH61B* purifiée; ligne 7, 150 µg de *PaGH61A* purifiée.

VI. Etude des modèles structuraux de *PaGH61A* et *PaGH61B*

Les modèles structuraux des GH61 de *P. anserina* A et B ont été réalisés sur la base de structures connues. Ces modèles mettent en évidence les résidus conservés impliqués dans la coordination de l'ion métallique (respectivement His1, His 97, Tyr 173 et His 1, His 79, Tyr 170 pour *PaGH61A* (Fig. 45 A et B) et *PaGH61B* (Fig. 45 C et D)).

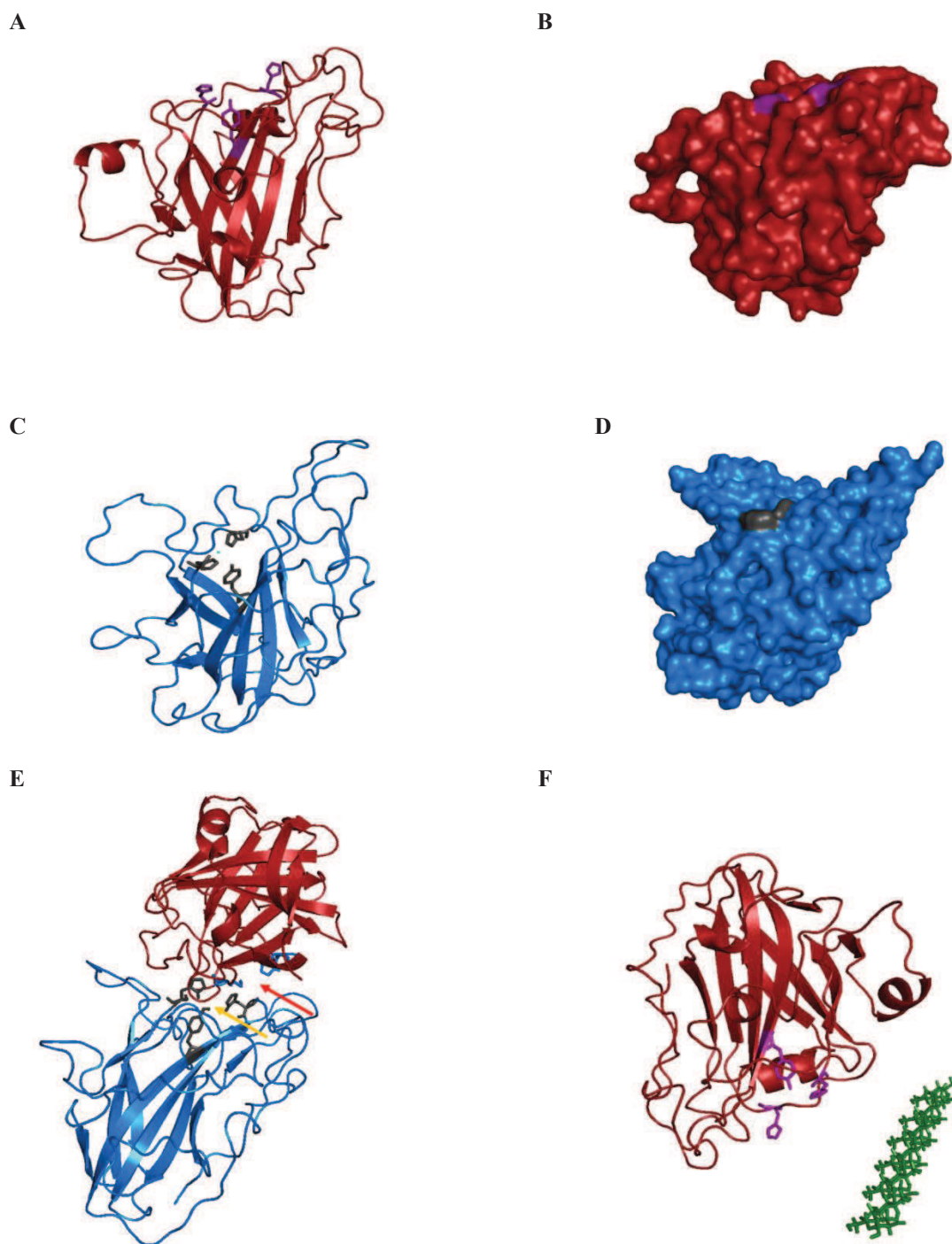


Figure 45. Représentation structurale des GH61A et GH61B de *P. anserina*. La représentation de PaGH61A (A) permet de mettre en évidence les acides aminés impliqués putativement dans la fixation à un ion métallique (en gris). La représentation de PaGH61A en surface (B) montre la zone planaire située au-dessus de la zone de fixation au métal (en gris). La représentation de PaGH61B (C) permet de mettre en évidence les acides aminés impliqués dans la fixation d'un ion métallique (en mauve). La représentation de PaGH61B en surface (D) montre la zone planaire située au-dessus de la zone de fixation au métal (en mauve). L'ion métallique est représenté en bleu clair. Le docking protéine-protéine réalisé grâce au serveur Cluspro a permis de mettre en évidence l'étroite relation entre la partie hémique de la CDH de *P. cinnabarinus* (en rouge) et le modèle proposé pour PaGH61B (en bleu), le domaine de fixation au 'cuivre' est indiqué par la flèche jaune, la flèche rouge indique le domaine de fixation de l'hème de type b (E). Une représentation par docking cellulose-PaGH61A a été réalisée manuellement avec PyMOL, les acides aminés impliqués dans la fixation du cuivre II sont représentés en violet et font face à un brin de cellulose unique (F). Les modèles ont été réalisés grâce au logiciel PyMOL.

La figure 45 E présente le résultat d'une étude de docking entre le modèle structural de la partie hémique de la CDH de *P. cinnabarinus* et le modèle de la GH61B de *P. anserina*. Ce résultat permet de mettre en évidence une proximité entre l'hème et l'ion métallique. Cette proximité pourrait favoriser l'échange électronique entre ces deux enzymes. Partant de ce postulat, une synergie GH61/CDH a fait l'objet d'une étude sur la dégradation de la paille de blé en supplémentation d'un cocktail GC220/N188.

VII. Synergie GH61/CDH

VII.1. Essais sur paille micronisée

Dans le but de démontrer la présence d'une synergie entre les GH61s de *P. anserina* et la CDH de *P. cinnabarinus*, des essais d'hydrolyse ont été réalisés sur paille de blé micronisée (0,8 μm). Le substrat paille de blé a été sélectionné afin d'observer l'implication des GH61s et de la CDH en supplémentation d'un cocktail commercial de cellulases (GC 220/ N188). L'utilisation d'un tel substrat offre l'avantage de pouvoir travailler avec une biomasse récalcitrante constituée notamment de cellulose et d'hémicelluloses. La figure 46 A montre les rendements en sucres totaux (oxydés et non oxydés) résultant de l'addition de différentes quantités de CDH et *PaGH61B* avec une isoconcentration de cocktails commerciaux (GC 220 et N 188). L'oxydation du substrat est représentée majoritairement par l'apparition d'acide gluconique formé par une action croisée entre les enzymes oxydatives et la β -glucosidase contenue dans les cocktails. La variation de concentration en *PaGH61* ne montre pas d'influence sur le rendement en sucres totaux et n'est pas identifiée comme un facteur permettant d'influencer la concentration des sucres en C5 et C6. Au contraire, sa présence serait même susceptible d'entraîner une diminution du rendement en sucre. Cet effet pourrait être dû à un encombrement stérique au niveau des fibres de celluloses accessibles aux cellulases. En revanche, la CDH, comme précédemment démontré, permet d'accroître la dégradation de la cellulose (Fig. 46 B) via des dégradations oxydatives. Concernant la conversion des hémicelluloses, aucune augmentation des rendements n'est visible.

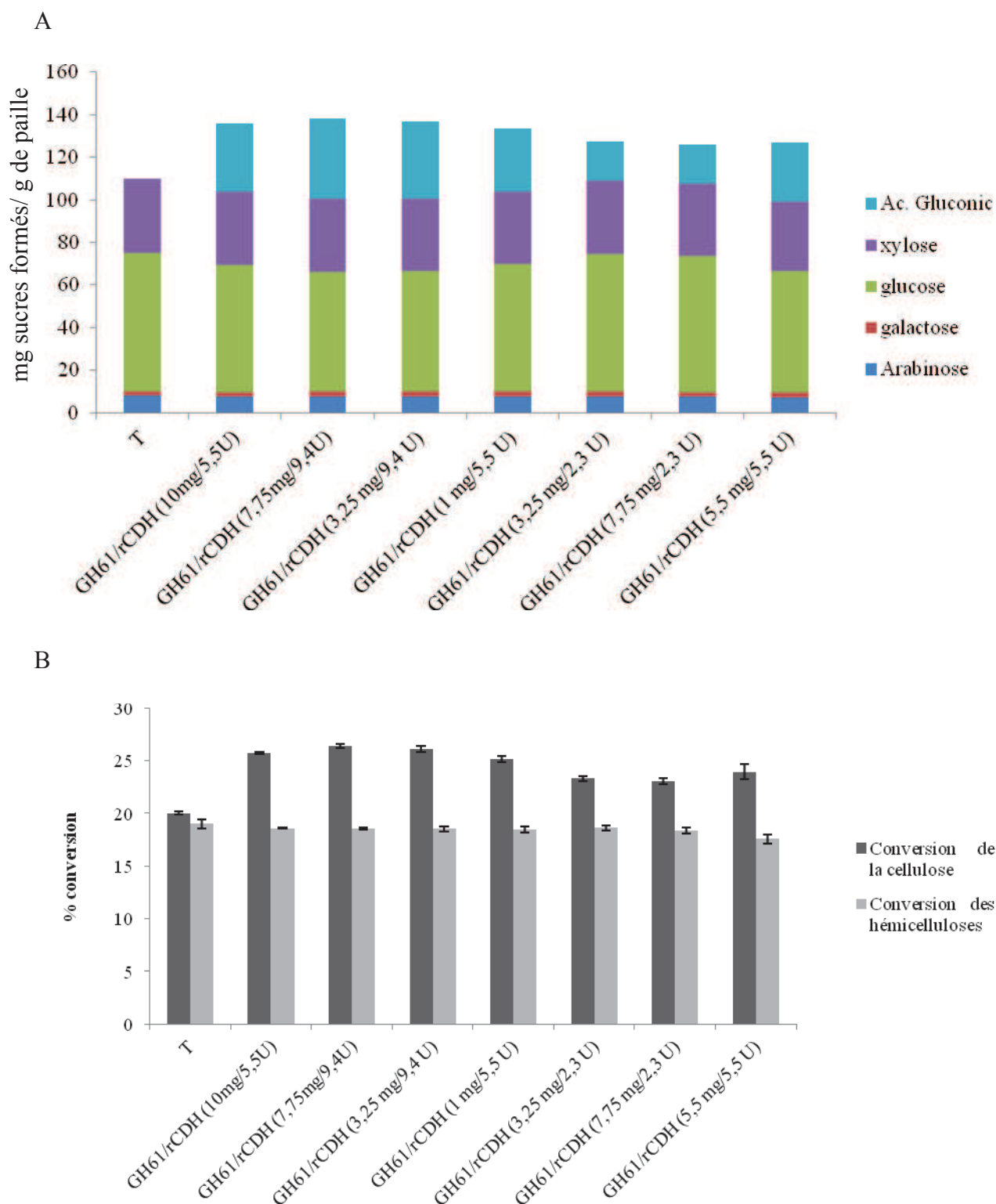


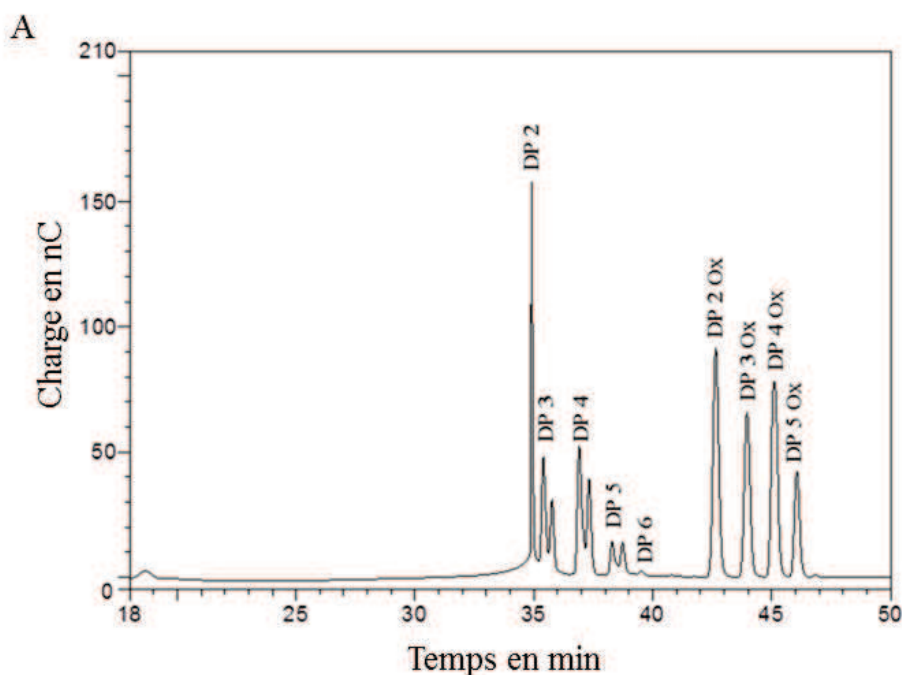
Figure 46. Représentation des rendements en sucres des essais de saccharification sur paille micronisée avec addition de CDH et GH61. Le cocktail GC220/N188 (3 :1) a été utilisé à une concentration constante, seules les concentrations en CDH et *Pa*GH61B ont variées. Après 72 heures de réaction à 45°C sous agitation horizontale en utilisant une paille de blé micronisée comme substrat, les échantillons ont été analysés en HPAEC, après filtration. Les rendements en sucres (mg/g de paille de blé) oxydés et non oxydés ont été déterminés et présentés en A. En B, ces mêmes rendements ont été reportés en pourcentage de conversion des hémicelluloses détectés (arabinose, galactose et xylose) et de la cellulose (acide gluconique et glucose). Toutes les expériences ont été réalisées en triplicats.

VII.2. Essais sur PASC (Phosphoric Acid Swollen Cellulose)

Afin d'attester de la présence d'une synergie entre la CDH et les GH61 de *P. anserina* (*PaGH61A* et *PaGH61B*), nous avons réalisé des essais sur PASC (pour Phosphoric Acid Swollen Cellulose). Le choix du substrat s'est porté sur la PASC, une cellulose ayant subi une première hydrolyse acide la rendant dans sa très grande majorité amorphe et plus sensible à l'hydrolyse enzymatique. Ce substrat 'cellulose' nous a donc permis de nous abstenir de cocktails enzymatiques.

Les produits formés durant le clivage de la cellulose ont été analysés par HPAEC-PAD (Fig. 47) et spectrométrie de masse (Fig. 48). Des réactions de contrôles ont également été réalisées avec la CDH et les GH61 sans complément d'agent réducteurs. Les résultats en HPAEC-PAD n'ont montré qu'une très faible trace de composés oxydés (pour les *PaGH61*) et oxydés (pour la CDH).

La figure 47 illustre le type de composé formé lorsque *PaGH61* est incubée avec la CDH sur de la cellulose amorphe. En utilisant l'HPAEC, il a été possible de discriminer les cello-oligosaccharides oxydés (de DP 2ox à DP 5ox) et non oxydés (allant d'un DP 2 à un DP 6) (Fig. 47). Les pics proches des cello-oligosaccharides non oxydés et apparaissant comme un épaulement ont été identifiés comme des intermédiaires lactones grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse ($m/z -2$) (Fig. 48). L'éventuelle présence de cellodextrines oxydées en C_1 ($m/z +16$) a été confirmée par spectrométrie de masse tout comme les composés correspondant à une double oxydation des cellodextrines en C_1 et C_4 ($m/z +14$).



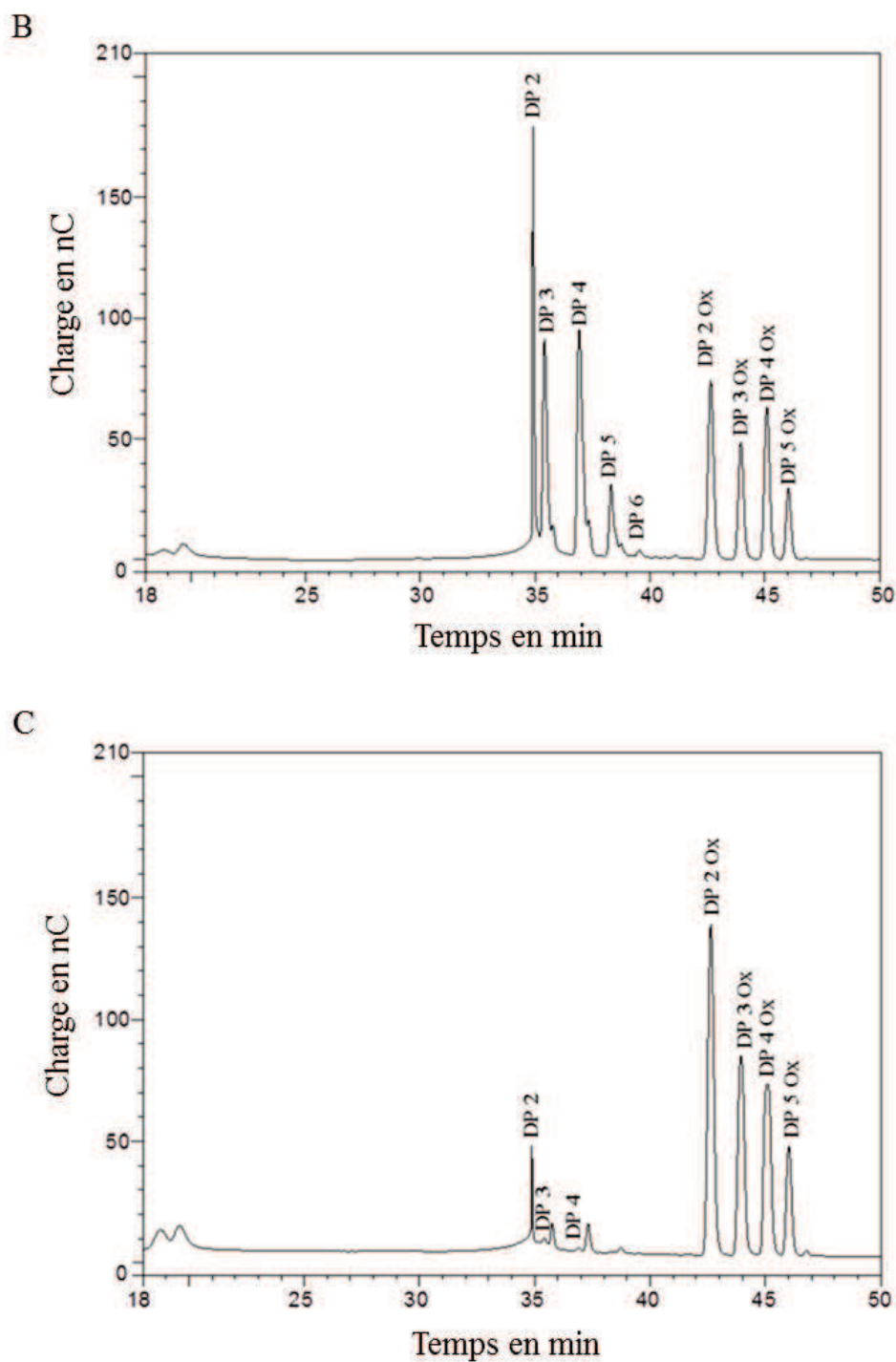
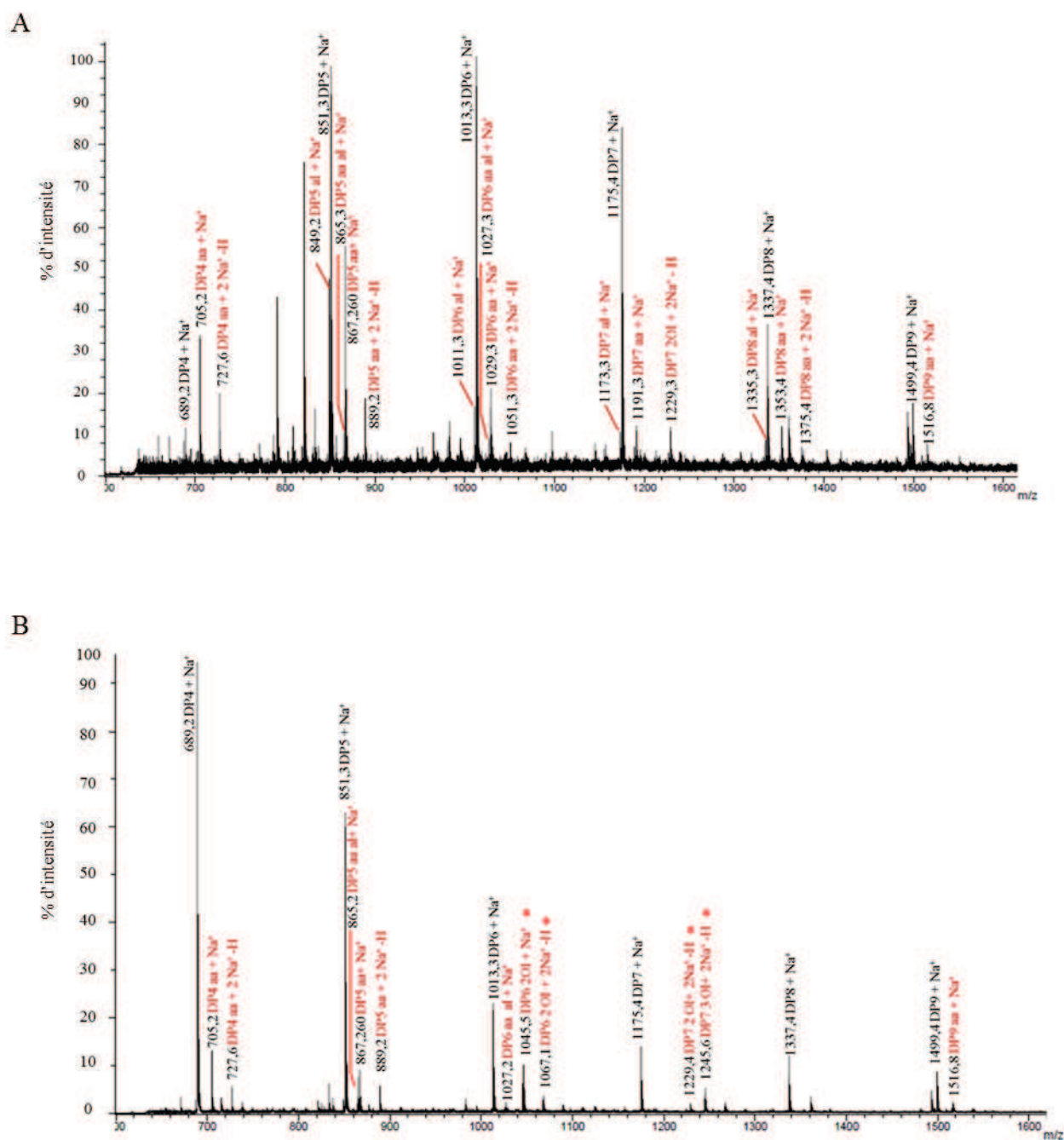
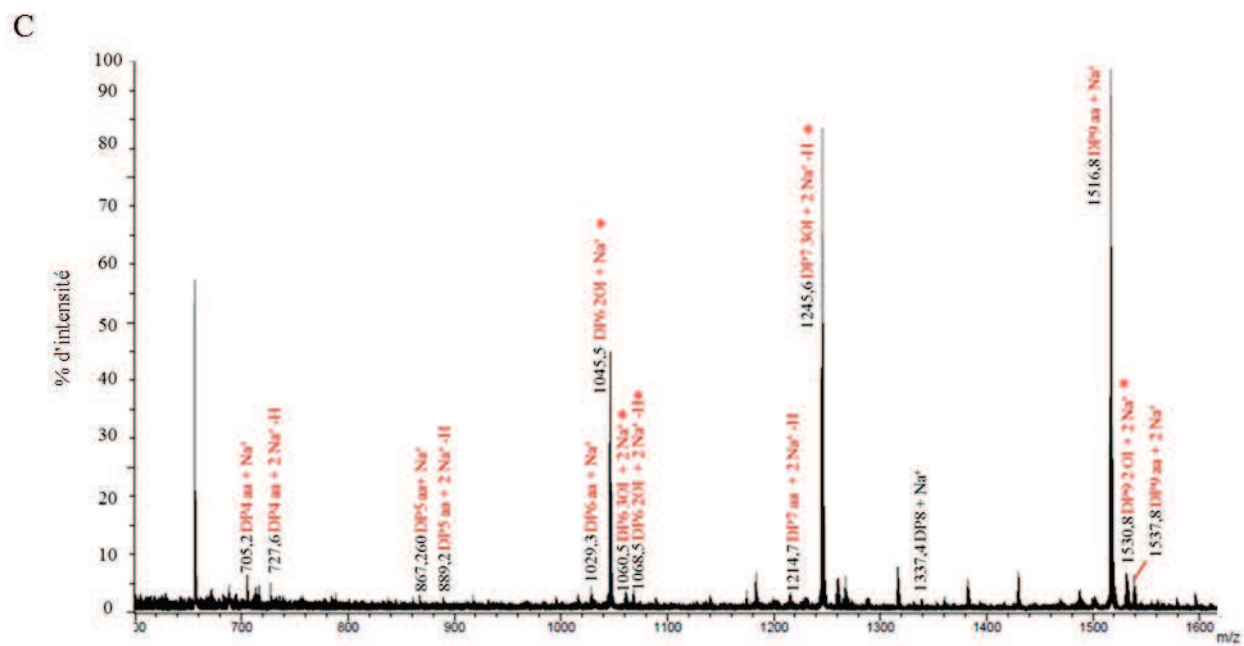


Figure 47. Spectres HPAEC des Produits générés après l'action combinée des *PaGH61* avec la CDH sur un substrat PASC 1% (w/v). Les analyses ont été réalisées en HPAEC-PAD après 48h d'incubation à 45°C sous agitation dans un tampon sodium-acétate 50 mM à pH 5. L'action de *PaGH61A* (5 mg/g) et *PaGH61B* (5 mg/g) avec la CDH (500 µg/g) sont, respectivement, représentées en A et B. Les produits formés par l'association de 50 mg/g de *PaGH61B* avec 500 µg/g de CDH sont présentés en C. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicats.

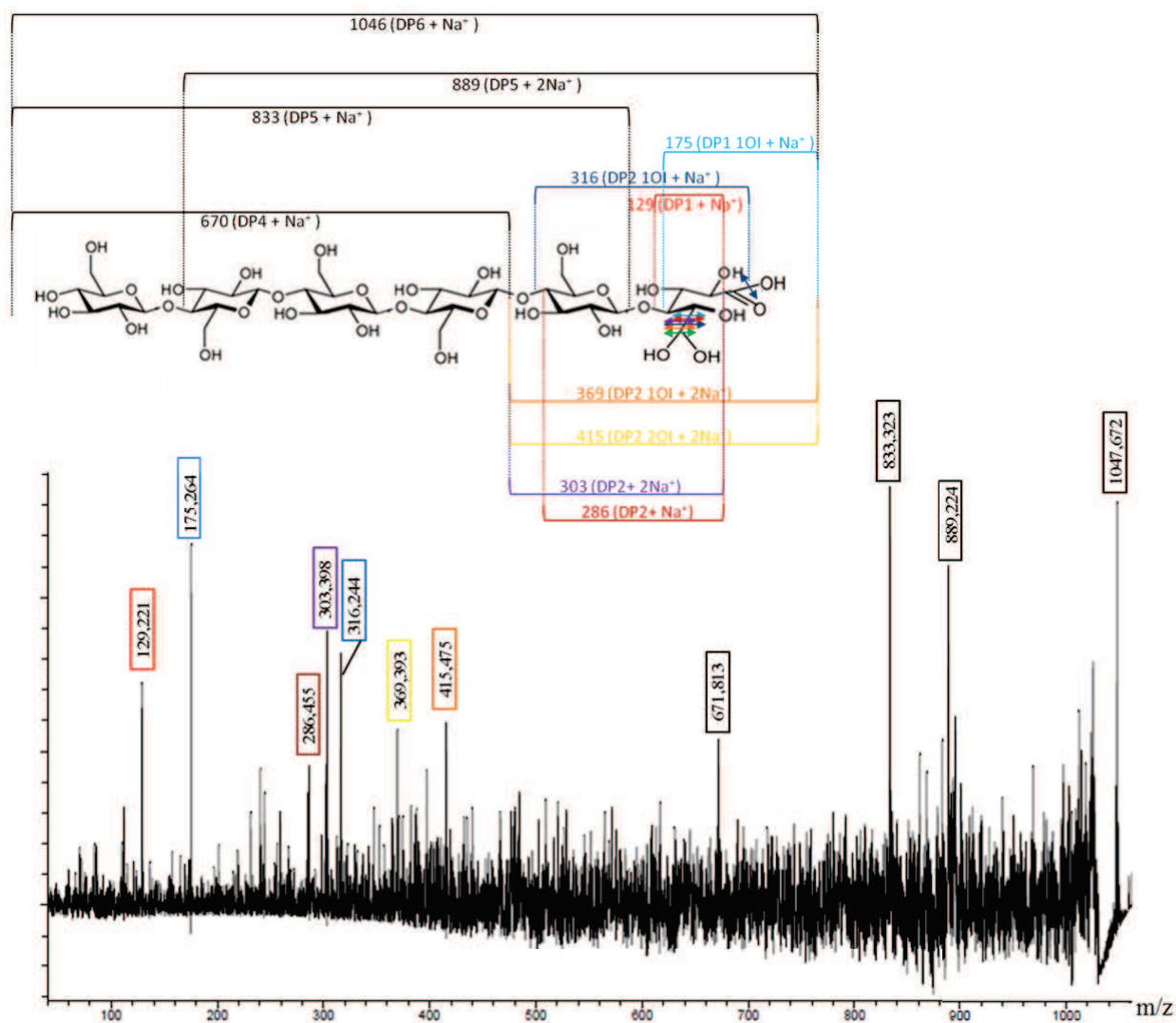
Les analyses en spectrométrie de masse ont révélées que les composés oxydés étaient sous-estimés en comparaison aux analyses en HPAEC-PAD, ceci étant dû à la présence de cations provenant du tampon Na-acétate à 50 mM utilisé durant les réactions d'hydrolyse. La

présence des ions Na^+ forme des adduits en spectrométrie de masse (composés oxydés avec Na^+ ou 2Na^+) (figure 48). La comparaison entre les deux *PaGH61* a révélée que l'action de *PaGH61A* permettait d'obtenir un meilleur rendement en lactones que *PaGH61B* (Fig. 47 A et 47 B ; 48 A et 48 B). La différence majeure entre ces deux enzymes réside dans la présence, parmi les composés oxydés de deux pics additionnels à $m/z = 1045$ et $m/z = 1245$ (Fig. 48 B) observés lorsque que *PaGH61B* est utilisée et absents des spectres réalisés sur l'hydrolysats *PaGH61A* (Fig. 48 A).





D



E

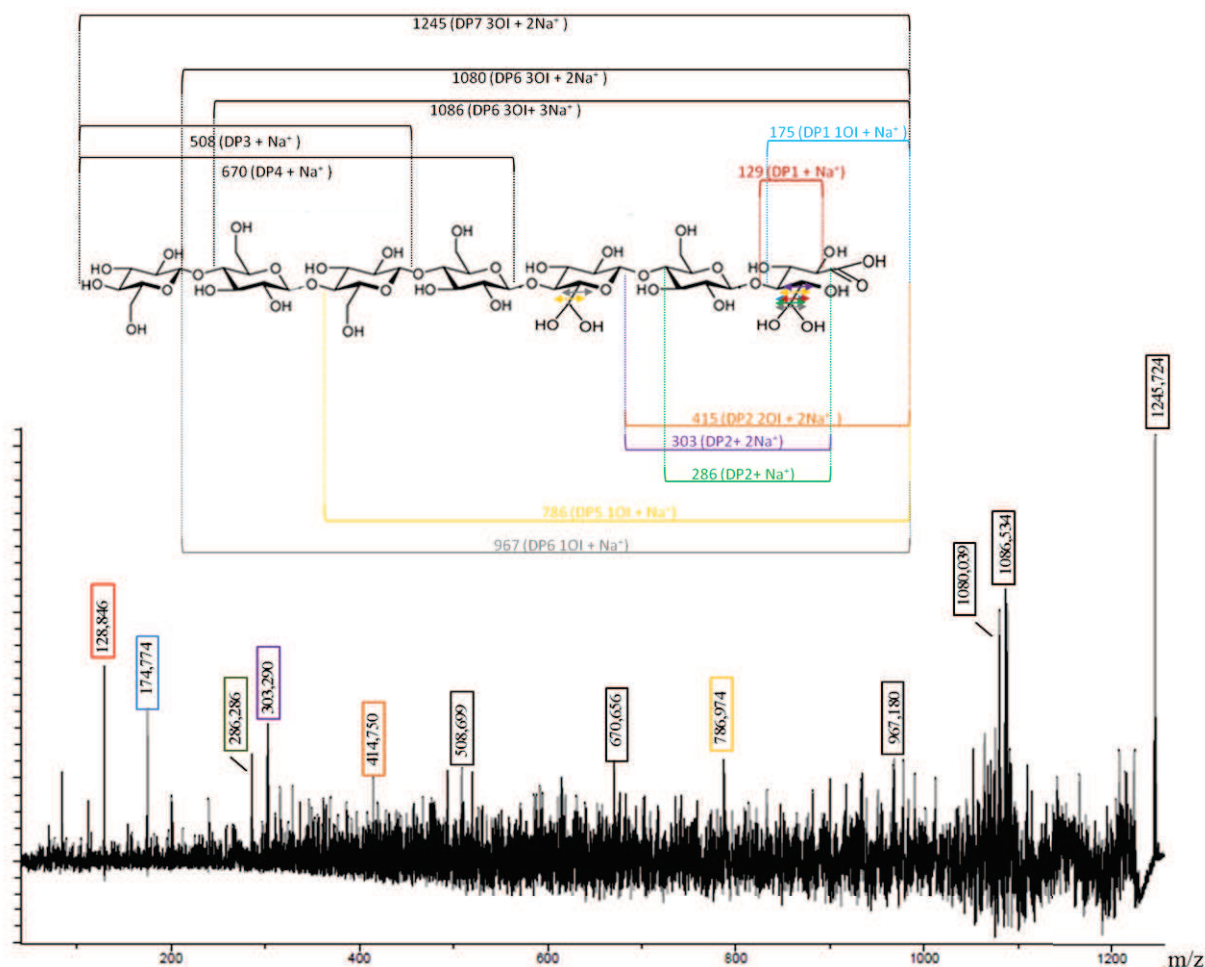


Figure 48. Spectre MALDI-TOF/TOF représentant la dégradation de PASC (0,01% w/v) réalisé par ajout simultané de 500µg de CDH/g de PASC et 5 mg de *PaGH61A* de g de PASC (A). Le spectre en B représente l'analyse des produits libérés dans les mêmes conditions à l'exception du remplacement de *PaGH61A* par *PaGH61B*. L'analyse en spectrométrie de masse des produits formés par l'action synergique de 500µg de CDH / g de PASC couplés à 50 mg de *PaGH61B* / g de PASC est représenté en C. La fragmentation MS/MS des pic correspondant à m/z= 1045 (D) et m/z = 1245 (E). Ces composés sont libérés lors de la réaction entre la CDH et *PaGH61B* sur un substrat PASC, aux concentrations respectives de 500 µg et 50 mg/g de substrat. Les composés identifiés en noire représentent des cellodextrines non oxydés, les cellooligosaccharides identifiés en rouge sont oxydés. aa : acide aldonique ; al : lactone ; OI : incorporation d'oxygène. Les composés marqués par * sont soumis à l'hypothèse.

Le produit correspondant à m/z = 1045 pourrait être expliqué par une combinaison d'oxydations telles qu'un cello-oligosaccharides DP6 oxydé (m/z + 32) avec un adduit Na⁺ (m/z + 23). Le produit à m/z = 1245 pourrait correspondre à une triple oxydation du DP7 (m/z +48) avec 2 Na⁺ - H⁺ (m/z +47). L'identification de ce type de composé pouvant représenter un nouveau type d'oxydation, nous avons augmenté la concentration en *PaGH61B* de façon à accroître ce phénomène (Fig 47 C). L'augmentation par dix fois de la concentration en

PaGH61B permet d'obtenir la formation quasi-exclusive de cellodextrines oxydés (Fig. 47 C et 48 C).

Comme attendu, les résultats en spectrométrie de masse ont montré une augmentation des pics correspondant à $m/z = 1045$ et $m/z = 1245$ (Fig. 48 C). La fragmentation MS/MS de $m/z = 1045$ et $m/z = 1245$ a révélé la présence de cellodextrines oxydés avec un DP6 (Fig. 48 D) et un DP7 (Fig. 48 E). Dans les deux cas, les schémas de fragmentation pourrait s'expliquer par une oxydation en position C₆ (formation d'un diol géminale) de l'extrémité réductrice (Fig. 48 D et 48 E).

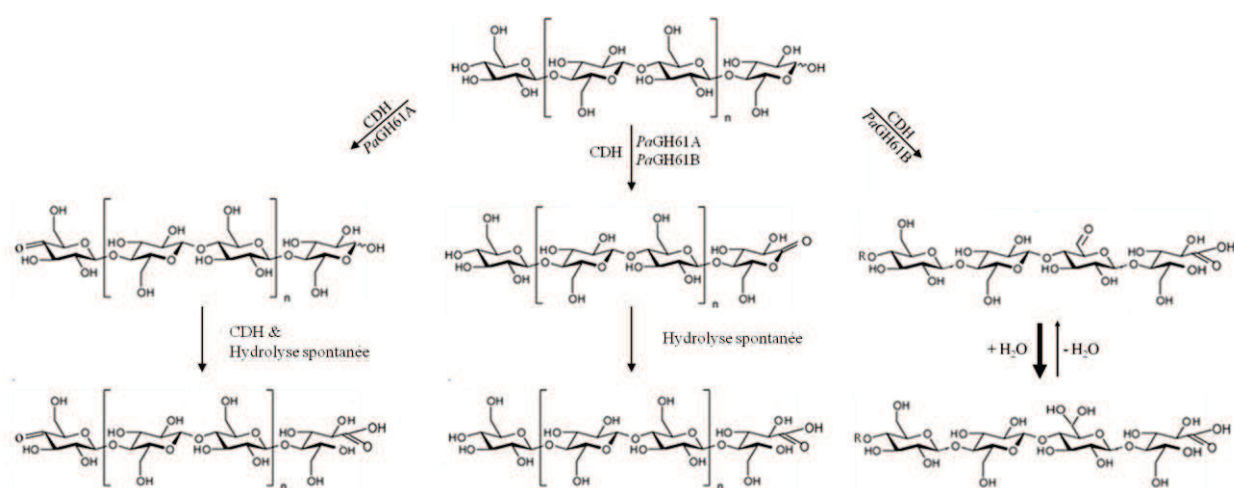


Figure 49. Schéma présentant la formation de composés oxydés sous l'action des GH61 et de la CDH.

Discussion des résultats de la partie II

Podospira anserina est un modèle d'intérêt pour l'étude des systèmes oxydatifs de déconstruction de la lignocellulose. En effet, l'analyse de son génome a révélé que ce champignon coprophile possédait de nombreux gènes codant pour des GMC oxydoréductases parmi lesquels figurent des gènes codant pour des CDH. La découverte la plus étonnante réside dans l'identification de 33 gènes codant pour des GH61 putatives (Espagne *et al.*, 2008). La présence en grand nombre de ces gènes (dont 8 possèdent une séquence codant pour un CBM 1), la diversité des familles (classées selon leurs structures (famille A-E)), et le rôle énigmatique des GH61 ont été autant d'indices pour supposer un rôle important dans les phénomènes de dégradation de la lignocellulose.

Les 8 gènes codant pour des GH61 possédant un CBM 1 en C-terminal avaient été ciblés dans une étude préliminaire (thèse de L. Poidevin). La présence d'un module CBM fait référence à une activité de type cellulolytique, bien que certaines GH61 (nouvellement appelée PMO pour polysaccharide monooxygénase) aient démontré une activité en l'absence de CBM (Phillips *et al.*, 2011). La sélection de GH61 a été affinée afin d'obtenir la plus grande diversité possible et les gènes restant ont été clonés de façon hétérologue chez l'hôte d'expression *P. pastoris* sous le contrôle du promoteur AOX 1.

Depuis ces premières tentatives, l'expression hétérologue de GH61 chez *P. pastoris* a été réalisée avec succès. Le site de coupure classique (Ste 13) du peptide signal a été substitué par un site de coupure à l'enterokinase afin d'assurer la présence d'une histidine en position 1. Cette stratégie, bien qu'efficace, fait intervenir une étape de coupure à l'enterokinase après production de l'enzyme recombinante chez *P. pastoris* (Westereng *et al.*, 2011). Plus récemment, l'expression hétérologue chez *P. pastoris* d'une GH61 de *Sporotrichum thermophile* a été réalisée et malgré l'important taux de glycosylation, les enzymes ont montré une activité (Dimarogona *et al.*, 2012). D'autres expression hétérologues de GH61 ont également été réalisées chez *Aspergillus oryzae* (Harris *et al.*, 2009).

Dans le cadre des précédentes études, les premières tentatives d'expression des GH61 de *P. anserina* chez *P. pastoris* ont montré la présence d'acides aminés supplémentaires en amont de l'histidine 1, rendant l'utilisation et l'activité des GH61 impossibles. Une nouvelle stratégie d'expression a donc été mise en œuvre. Cette dernière s'est basée sur l'élimination du site de coupure au peptide signal Ste 13 afin d'obtenir une coupure franche avec une

histidine en première position. Le clonage de deux gènes codant des GH61 de famille A et B a été effectué.

Au stade de la production, *PaGH61* A et B ont été sécrétées à des taux respectifs de 150 mg/L et 1 g/L en bioréacteur de 2 L. A ce jour, aucun test d'activité n'avait été élaboré pour mesurer l'activité des GH61. Dans cette étude, nous avons utilisé des zymogrammes constitués de CMC pour attester d'une activité endoglucanase des GH61 en présence d'un agent réducteur (ascorbate). Les zymogrammes en condition native ou dénaturante ont montré la présence de halos de décoloration confirmant la présence d'une activité enzymatique et l'intégrité des enzymes recombinantes produites.

Dans le but d'intégrer les GH61 aux processus de saccharification de paille micronisée, les cocktails commerciaux de cellulase (GC 220/N188) ont été supplémentés en CDH et GH61. L'analyse des rendements en sucres totaux ainsi que les taux de conversion de la cellulose et des hémicelluloses n'ont pas montré d'accroissement visible du rendement. Ces résultats nous ont amené à conclure qu'une utilisation des *PaGH61* sur un substrat non prétraité ne permettait pas d'accroître la dégradation de la cellulose. L'accessibilité à la cellulose étant plus difficile sur ce type de substrat, les grandes quantités de GH61 additionnées aux cocktails (1-10 mg/g de paille) pourrait induire des problèmes d'accessibilité. A ce jour, les études réalisées sur les GH61 n'ont pas été réalisées sur des substrats lignocellulosiques non prétraités, confirmant ainsi la difficulté d'observer un effet significatif des GH61 sur ce type de substrat.

A l'inverse, les études sur les substrats prétraités (PCS) ou cellulose prétraitée (PASC) ont été étudiées fréquemment. Lors de l'utilisation d'un substrat PASC, les GH61 ont montré une capacité à cliver la cellulose sans ajout de cellulases mais en présence d'agents réducteurs ou de CDH. (Harris *et al.*, 2010 ; Quinlan *et al.*, 2011 ; Westereng *et al.*, 2011 ; Phillips *et al.*, 2011). Les essais sur PASC ont été réalisés avec deux composantes enzymatiques provenant d'organismes différents, un basidiomycète *P. cinnabarinus* (CDH) et un ascomycète *P. anserina* (GH61). Le résultat obtenu montre que la synergie entre CDH et GH61 peut être réalisée sans que ces deux acteurs soient issus du même organisme. Deux autres études attestent de ce phénomène (Phillips *et al.*, 2011 ; Langston *et al.*, 2011).

L'action combinée des *PaGH61* et de la CDH de *P. cinnabarinus* a révélé la formation de cellodextrines non-oxydés, oxydés une fois et oxydés plusieurs fois (Fig. 47), comme précédemment démontré (Langston *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2011).

L'apparition de cellodextrines natives (non oxydées) serait due à des clivages oxydatifs proche des extrémités réductrices, libérant des parties non réductrices intactes (Phillips *et al.*,

2011). Lorsque *PaGH61A* et *PaGH61B* sont associées avec la CDH, on distingue différents coöportements. L'utilisation de *PaGH61A* génère plus de produits lactones que *PaGH61B*. Ces produits lactones sont spontanément hydrolysés en leurs produits oxydés en C₁ correspondants (Fig. 4). Dans le cas de *PaGH61A*, des composés doublement oxydés ont été détectés ; ils présentent des masses correspondant vraisemblablement à une oxydation en C₄ (cétone en C₄ du sucre) et une oxydation en C₁ (acide aldonique). Les expériences menées avec *PaGH61B* ont montré l'apparition de pics correspondant principalement à des cello-oligosaccharides oxydés et ce phénomène a été augmenté lorsque *PaGH61B* a été utilisé à des concentraions plus élevées. Une autre différence significative entre les deux *PaGH61* concerne l'identification de deux composés possédant des masses respectives de $m/z=1045$ et $m/z=1245$ lorsque *PaGH61B* est associée avec la CDH.

L'identification de ces produits de hautes masses serait compatible avec une double ($m/z = 1045$) et une triple oxydation ($m/z = 1245$). Il a été proposé que des produits semblables à $m/z = 1245$ puissent résulter de la formation d'acétals à partir de sucres oxydés (cétone) en C₄ (Phillips *et al.*, 2011). Toutefois, un acétal en C₆ (Diol géminale) semble plus probable du fait de (i) sa plus grande stabilité qu'un acétal en C₄, (ii) il serait favorisé en condition acide et (iii) il pourrait être stabilisé par l'environnement. Une forme équivalente a déjà été observée lors de l'oxydation des sucres par la galactose oxydase. En effet, les galactose oxydases fongiques (E.C. 1.1.3.9) sont des métalloenzymes à cuivre catalyzant l'oxydation de l'alcool primaire en son aldéhyde correspondant avec une régiosélectivité stricte. La galactose oxydase de *Fusarium spp.* a montré qu'elle ciblait le C₆ du galactose pour produire un aldéhyde. Cette aldéhyde a été identifié par RMN comme un Diol géminale dans l'eau (Parika et Tenkanen, 2009). Dans le cas de *PaGH61B*, l'hypothèse est supportée par la fragmentation MS/MS des composés $m/z=1245$ et $m/z = 1045$ qui correspondraient respectivement à une triple oxydation d'un DP7 et une double oxydation d'un DP6 à l'extrémité réductrice (Fig. 45 D et E).

L'abstraction de l'hydrogène en position C₁ ou C₄ conduirait à la formation d'intermédiaire cuivre hydroperoxo entraînant la coupure de la liaison glycosidique, l'explication la plus probable pour le schéma de fragmentation des produits à $m/z = 1245$ et $m/z = 1045$ serait une triple oxydation ($m/z + 48$) composé d'un acide aldonique en C₁ et deux Diol géminale en C₆ et d'une double oxydation ($m/z + 32$) composé d'un acide aldonique en C₁ et d'un Diol géminale en C₆ (Fig. 45 D et E). L'augmentation de ces espèces oxydées en présence d'une plus haute concentration de *PaGH61B* pourrait être interpréter de deux facons : les oxydations supplémentaires pourraient intervenir directement sur la cellulose ou sur les cello-

oligosaccharides soluble. De telles oxydations en C₆ pourraient se produire le long de la chaîne de cellulose durant l'abstraction de l'hydrogène sans entraîner de coupure.

A ce jour, trois classes de LPMOs ont été décrites. Les LPMO de type 1 générant des produits oxydés en C₁, probablement dans une forme lactone initiale, qui deviendrait un acide aldonique après hydrolyse spontanée. Les LPMO de type 2 générant des produits oxydés à l'extrémité non-réductrice. La formation de cétoaldose en position 4 pourrait résulter d'une coupure oxydative suivant un mécanisme similaire à celui décrit pour l'oxydation en C₁. Il a été suggéré que des LPMOs de type 3 catalyseraient l'oxydation de la cellulose avec une spécificité moindre que les LPMO-1 et les LPMO-2 (Beeson *et al.*, 2012 ; Lin *et al.*, 2012). Les régiospécificités de *PaGH61A* et *PaGH61B* observées lors de ces travaux ne permettent pas de leur assigner une classe de LPMO au regard de la présence de CDH.

L'analyse du genome de *P. anserina* a montré un arsenal enzymatique inattendu (Espagne *et al.*, 2008). Ce champignon coprophile présente une large gamme de GMC oxydoréductases incluant notamment deux CDHs, cette information coïnciderait avec une synergie *in vivo* avec les LPMOs. Nous sommes au début de la caractérisation du cocktail enzymatique de *P. anserina*. La caractérisation biochimique de deux membres appartenant à la famille des GH61 de *P. anserina* ont révélé des différences significatives dans leurs régiospécificités. Il a été démontré que *PaGH61A* et *PaGH61B* sont capables de travailler de concert avec la CDH de *P. cinnabarinus* pour dégrader la cellulose avec une libération concomitante de composés oxydés d'un nouveau genre incluant des oxydations en position C₆ pour une de ces enzymes. Des caractérisations supplémentaires des GH61s de *P. anserina* seront nécessaires pour répondre aux questions concernant la spécificité de ces enzymes et leurs rôles *in vivo*.

Conclusion générale & Perspectives

La biomasse lignocellulosique présente dans la paroi végétale sert de structure et de protection aux plantes, et par conséquent est récalcitrante et résistante à la dégradation. Le défi majeur des processus de bioconversions à l'échelle industrielle est de convertir cette biomasse lignocellulosique hétérogène en sucres simples, en composés aromatiques ou autres substances transformables. Parmi les nombreux procédés physiques, chimiques et biologiques, ceux reposant sur l'utilisation d'enzymes sont particulièrement attrayants. La dégradation naturelle de la lignocellulose ainsi que son utilisation sont réalisées par des enzymes spécifiques d'organismes tels que les champignons filamenteux et les bactéries. Le rôle de ces enzymes en tant que catalyseurs industriels pour la conversion de la biomasse pourrait être de fournir une spécificité élevée, une faible consommation d'énergie ou de produits chimiques et une pollution moindre de l'environnement. Le principal rôle des enzymes convertissant la biomasse est de dégrader la cellulose ou l'hémicellulose en sucres simples, qui peuvent ensuite être fermentés par des micro-organismes, ou servir de plateforme pour la synthèse de molécules de carburant ou de produits chimiques de haute valeur ajoutée. Les cellulases et les hémicellulases peuvent dégrader la cellulose et l'hémicellulose, respectivement en hexoses (C6) et pentoses (C5). En général, ces enzymes doivent travailler en synergie pour bénéficier de leurs spécificités mais également afin d'atténuer les inhibitions (causées par différents composants lignocellulosiques ou produits de la dégradation).

Les sécrétomes de la plupart des champignons filamenteux contiennent également des oxidoréductases. Leur principale fonction réside dans la dégradation de la lignine et représente un intérêt pour les procédés de conversion de la biomasse puisque la lignine diminue l'accessibilité à la cellulose et aux hémicelluloses et cause l'inactivation des cellulases et hémicellulases par des phénomènes d'adsorption. Parmi les oxydoréductases les plus communément citées (LiP, MnP, Laccase et glyoxal oxidase) se trouve la CDH. Cette hémoflavoenzyme produite par de nombreux champignons lignocellulolytiques peut oxyder les cellodextrines en leurs lactones correspondantes avec réduction concomitante de divers accepteurs d'électrons. Le rôle biologique de la cellobiose déshydrogénase n'est pas clairement élucidé. Les fonctions attribuées à la CDH sont diverses et variées mais les plus souvent citées sont la participation aux réactions de Fenton et l'oxydation des cellodextrines.

Dans le but d'améliorer l'action des cocktails enzymatiques impliqués dans la déconstruction de la lignocellulose, nous avons partiellement étudié le sécrétome de *P. cinnabarinus* et observé que la CDH avait un rôle essentiel dans la dégradation d'un substrat complexe. L'ajout de faibles concentrations de l'enzyme à ces cocktails permettrait d'augmenter le

rendement global d'hydrolyse mais également de faire apparaître des quantités importantes d'acides gluconiques formés au travers de l'action de la CDH.

Si l'acide gluconique est un composé valorisable pour l'industrie, il en est de même pour un composé similaire, l'acide xylonique. A partir d'expériences d'hydrolyse sur le xylane, l'addition de CDH a montré, dans une moindre mesure, une capacité à produire cet acide et ainsi à participer à la dégradation des hémicelluloses.

Cependant, l'une des réactions les plus souvent décrites concernant le mode d'action des CDH est la réaction de Fenton. Lors d'expériences réalisées en présence de peroxyde d'hydrogène et de fer nous avons démontré l'implication de la CDH dans ces phénomènes et mesuré une production de radicaux hydroxyles accrue en présence de l'enzyme. Ces radicaux sont connus pour être de puissants agents lytiques de la matière lignocellulosique et les essais de liquéfaction sur un modèle CMC ont montré qu'en présence de CDH, la production de radicaux hydroxyles permettait d'abaisser la viscosité de la CMC de façon plus importante que par le biais d'une réaction de Fenton sans CDH.

Si nous avons démontré que la CDH pouvait être présente à plusieurs niveaux du processus de dégradation de la matière lignocellulosique, elle agit également en synergie avec une seconde famille d'enzymes. Cette synergie a permis de mettre en évidence l'importance de la dégradation oxydatives de la cellulose.

En 1956, Reese *et al.*, avaient prédit qu'il pourrait exister un facteur non hydrolytique permettant d'accroître les phénomènes de dégradation de la cellulose, le composant C₁ (Reese *et al.*, 1956). Dans son hypothèse, l'action de ce composant s'additionnerait à celle d'un composant C_x, à l'origine une endoglucanase. Par la suite, la notion de composant C_x évolua vers un système endo-exo (cellobiohydrolases, endoglucanases et β -glucanases). Au sein du processus de déconstruction de la matière lignocellulosique, le rôle central des enzymes hydrolytiques composant ce système endo-exo a été mis en évidence et a ainsi succité de nombreuses recherches visant à mettre au point des procédés enzymatiques. Afin de réduire les coûts élevés liés à l'utilisation de ces enzymes, les recherches se sont axées sur l'amélioration de la production par des champignons filamenteux (plus particulièrement *T. reesei*), le prétraitement de la biomasse et l'élaboration de nouveaux cocktails. Malgré ces efforts, les taux de conversion restent bien en dessous des 100% théoriques.

De récents travaux ont permis de mettre à jour les fonctions des GH de famille 61. Depuis 2010, le rôle énigmatique des GH61 a été révélé (Vaaje-Kolstad *et al.*, Quinlan *et al.*, Phillips *et al.*). Ces dernières possèdent la capacité de cliver la cellulose par des réactions oxydatives lorsqu'elles sont en présence d'un agent réducteur ou comme démontré dans la littérature et

au cours de cette thèse, par une synergie avec la CDH. Un mécanisme généraliste a été établi pour ces enzymes dont l'activité de type monooxygénase réside en quelques points essentiels :

- i) Ces métalloenzymes requièrent la présence d'un atome de cuivre type II coordonné par des acides aminés hautement conservés, deux histidines et une tyrosine.
- ii) Le besoin d'un agent réducteur (acide organique, résidu de lignine ou réducteur d'origine enzymatique).
- iii) Un substrat cellulosique.

Différentes régiospécificités liées à l'action des GH61s, plus justement appelées PMO pour Polysaccharides MonoOxygénases ont fait l'objet d'hypothèses. Les PMOs de type 1 sont caractérisées par des oxydations au niveau du carbone 1 de l'extrémité réductrice de la cellulose. Les PMO de type 2 sont définies comme des monooxygénases dont l'oxydation se porte sur le carbone 4 de l'extrémité non réductrice de la cellulose. Le dernier type de PMO posséderait une régiospécificité plus large. (Phillips *et al.*, 2011 ; Beeson *et al.*, 2012 ; Lin *et al.*, 2012).

Au court de ces travaux, l'hypothèse d'une oxydation sur le carbone 6 a été soutenue mais ne semble pas faire intervenir de coupure dans la chaîne de cellulose. De nombreuses questions restent en suspens concernant le mode d'action de ces enzymes. Ces questions portent sur le/les agents réducteurs 'naturels' des GH61s, sur les facteurs de transcriptions ou encore l'importance de la présence d'un CBM. L'étude de PMOs issues de *Neurospora crassa* a montré que le CBM n'était pas essentiel à l'activité de ces monooxygénases. Au cours de cette thèse, la sélection des GH61s a été basée sur la présence de CBM comme indicateur prévisionnel d'une activité cellulolytique. D'autres interrogations portent sur la régiospécificité des GH61s. En effet, peu d'études ont été réalisées sur les GH61s/PMOs en comparaison aux grands nombres de gènes présents dans le génome d'organismes cellulolytiques.

Les outils génomiques ont permis de fournir des informations sur l'importance des GH61s au sein de ces microorganismes. Cette classe d'enzyme est présente au sein de nombreux génomes et pour la majorité d'entre eux, plus de trois gènes codent pour des GH61s. Certains comme *Podospora anserina* (étudié dans cette thèse), *Chaetomium globosum* ou encore *Coprinopsis cinerea* possèdent même jusqu'à 30 à 44 gènes de ce type. Ce grand nombre de gènes peut être expliqué par une duplication (Espagne *et al.*) ou pourrait être du à une spécificité d'action des GH61s. Pour une majorité de ces organismes, la présence de gènes codant pour la CDH a été identifiée dans leurs génomes.

Ces deux classes d'enzymes oxydatives ont toutes deux montré des modes d'actions différents impliqués dans les phénomènes de déconstruction de la matière lignocellulosique. Cependant, quelques études ainsi que les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence une synergie entre la CDH et les GH61s. De cette synergie, le postulat d'une fonction biologique a pu être, en partie, avancé. L'action commune de ces enzymes permet d'accroître la dégradation de la cellulose par un système auxiliaire venant s'articuler autour d'un système basé sur l'action d'enzymes hydrolytiques. Ces nouvelles données amènent des composantes supplémentaires au système plus 'classique' et démontrent les connexions complexes entre les différents acteurs participant aux phénomènes de dégradation de la biomasse.

Chez *T. reesei*, qui possède, en outre, un des arsenaux enzymatiques les plus efficaces pour la déconstruction de la lignocellulose, une GH61A est sécrétée mais aucun gène codant pour une CDH n'est présent au sein du génome. Ce fait démontre que les GH61s sont une composante importante du système de dégradation 'in vivo' mais non dépendante de l'intervention de la CDH. Cependant, afin de créer un système de dégradation, le plus efficace possible, il conviendra de se baser sur un système central composé d'enzymes hydrolytiques autour desquels un système oxydatif pourrait être mis en place. La composition de nouveaux cocktails demandera des études plus approfondies sur la spécificité des GH61s en fonction de la biomasse utilisée ainsi qu'une étude sur les concentrations les plus adaptées pour faire fonctionner le système oxydatif à deux composants CDH/GH61. Les GH61 sont également présentes en grand nombre dans les différents génomes d'organisme cellulolytique et des réponses concernant ce point devront être apportées. D'autres interrogations demeurent sur les facteurs de transcription mis en jeu dans l'expression des GH61.

Au regard de ces informations, de nouvelles voies de production de biocarburants ont été proposées via l'utilisation de ce système. Ces voies font intervenir des processus aérobies et utilisent des voies métaboliques incorporant les sucres de type acides aldoniques dans des procédés de fermentation (Fan *et al.*). A la lumière de ces découvertes sur les enzymes oxydatives, il convient de repenser la conception classique de la dégradation de la lignocellulose et d'adapter ces nouvelles découvertes à la composition de futurs cocktails enzymatiques.

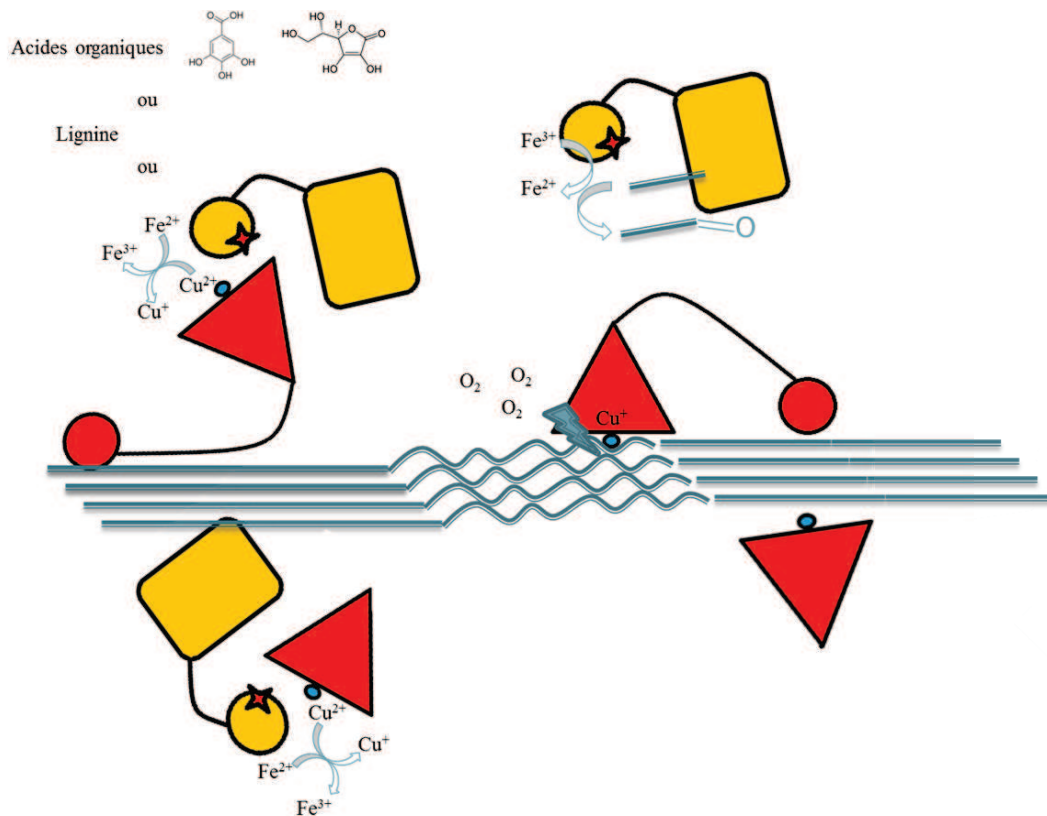


Figure 50. Schéma représentant la voie oxydative de dégradation de la cellulose par le couple CDH/GH61. Cette réaction fait intervenir la GH61 (en rouge) pouvant fixer la cellulose (en bleu) par l'intermédiaire d'un CBM (rond rouge) et portant un cuivre de type II (cyan) responsable de l'activité monooxygénase. La réduction du cuivre est réalisée par l'intervention d'acides organiques tels que l'acide ascorbique ou gallique mais peut être effectuée via des résidus de lignine ou encore par voie enzymatique. Cette voie est menée par l'action de la CDH (en jaune) via un hème de type b (étoile rouge). Cette étape de réduction du cuivre

Références

Ander P, Mishra C, Farrell RL, Eriksson KEL: **Redox reactions in lignin degradation: Interactions between laccase, different peroxidases and cellobiose: quinone oxidoreductase.** (1990) *J. Biotechnol.* **13**:189-198.

Arantes V, Milagres AMF: The relevance of low molecular weight compounds in wood biodegradation by fungi. (2009) *Quim. Nova.* **30**:1586–1595.

Arantes V, Saddler JN: **Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis.** (2010) *Biotechnology for Biofuels* **3**:4.

Arantes V, Milagres AMF, Filley TR, Goodell B: **Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: The relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions.** (2011) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**:541–555.

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T: **The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling.** (2006) *Bioinformatics* **22**: 195-201.

Balasubramanian R, Smith SM, Rawat S, Yatsunyk LA, Stemmler TL, Rosenzweig AC: **Oxidation of methane by a biological dicopper centre.** (2010) *Nature* **465**: 115–119.

Baldrian P, Valaskova V: **Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi.** (2008) *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 501–521.

Banerjee G, Scott-Craig JS, Walton JD: **Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective.** (2010) *Bioenerg Res* **3**: 82–92.

Bao WJ, Renganathan V: **Cellobiose oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* enhances crystalline cellulose degradation by cellulases.** (1992) *FEBS Lett.* **302**:77-80.

Barr DP, Shah MM, Grover TA, Aust SD: **Production of hydroxyl radical by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*.** (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **298**:480-485.

Beckham GT, Bomble YJ, Matthews JF, Taylor CB, Resch MG, Yarbrough JM, Decker SR, Bu L, Zhao X, McCabe C, Wohler J, Bergenstr hle M, Brady JW, Adney WS, Himmel ME, Crowley MF: **The O-Glycosylated Linker from the *Trichoderma reesei* Family 7 Cellulase Is a Flexible, Disordered Protein.** (2010) *Biophysical Journal* **99**(11): 3773-3781.

Beckham GT, Bomble YJ, Bayer EA, Himmel ME, Crowley MF: **Applications of computational science for understanding enzymatic deconstruction of cellulose.** (2011) *Curr Opin Biotechnol* **22**:231-238.

Beeson WT, Phillips CM, Cate JH, Marletta MA: **Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases.** (2012) *J. Am. Chem. Soc.* **134**(2): 890-2.

Beeson WT, Iavarone AT, Hausmann CD, Cate JHD, Marletta MA: **Extracellular aldonolactonase from *Myceliophthora thermophila***. (2010) *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**(2):650-656.

Beguin P: **Molecular Biology of Cellulose Degradation**. (1990) *Annual Review of Microbiology* **44**: 219-248.

Berghäll S, Hilditch S, Penttilä M, Richard P: **Identification in the mould *Hypocrea jecorina* of a gene encoding an NADP+: D-xylose dehydrogenase**. (2007) *FEMS Microbiol. Lett.* **277**:249–253.

Beukes N, Pletschke BI: **Effect of alkaline pre-treatment on enzyme synergy for efficient hemicellulose hydrolysis in sugarcane bagasse**. (2011) *Bioresour Technol* **102**: 5207–5213.

Blanchette, RA and Shaw, CG: **Associations among bacteria, yeasts and basidiomycetes during wood decay**. (1978) *Phytopathology* **68**: 631–637.

Boerjan W, Ralph J, Baucher M : **Lignin bioynthesis**. (2003) *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 519-546.

Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ: **Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition**. (2004) *Biochem J* **382**: 769–781.

Börjesson J, Engqvist M, Sipos B, Tjerneld F: **Effect of poly (ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose**. (2007) *Enzyme Microb. Technol.* **41**: 186–195.

Bourbonnais R, Paice MG: **Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation**. (1990) *FEBS Lett.* **26**: 99–102.

Bradford MM: **Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding**. *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.

Bravo V, Paez MP, Aoulad M, Reyes A: **The influence of temperature upon the hydrolysis of cellobiose by beta-1,4-glucosidases from *Aspergillus niger***. (2000) *Enzyme and Microbial Technology* **26**:614-620.

Bruchmann EE, Schach H, Graf H: **Role and properties of lactonase in a cellulase system**. (1987) *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **9**:146-159.

Buchert J: **Biotechnical oxidation of D-xylose and hemicellulose hydrolyzates by *Gluconobacter oxydans***. (1990) Dissertation, Publication 70, VTT Technical Research Centre of Finland, Espoo.

Buchert J, Viikari L: **Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans***. (1988) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**:375–379.

Buchert J, Puls J, Poutanen K: **Comparison of *Pseudomonas fragi* and *Gluconobacter oxydans* for production of xylonic acid from hemicellulose hydrolyzates**. (1988) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**:367–372.

Calsavara LPV, De Moraes FF, Zanin GM: **Modeling cellobiose hydrolysis with integrated kinetic models.** (1999) *Applied Biochemistry and Biotechnology* **77**(9):789- 806.

Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Duenas FJ, Martinez MJ, Martinez AT: **Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites.** (1999) *Journal of Biological Chemistry* **274**: 10324–10330.

Cannella D, Hsieh CWC, Felby C, Jørgensen H: **Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content.** *Biotechnol for Biofuels*, 2012 **5**: 26.

Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B: **The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics.** (2009) *Nucleic Acids Res* **37**:D233-238.

Cardona CA, Quintero JA, Paz IC: **Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives.** (2010) *Bioresour. Technol.* **101**(13): 4754-4766.

Carpita NC, Gibeau DM: **Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth.** (1993) *Plant Journal* **3**(1): 1-30.

Carpita NC: **Structure and biogenesis of the cell walls of grasses.** (1996) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**:445-476.

Cazetta ML, Celligoi MAPC, Buzato JB, Scarmino IS: **Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production.** (2007) *Bioresource Technology* **98**: 2824–2828.

Chavez R, Bull P, Eyzaguirre J: **The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*.** (2006) *J. Biotechnol.* **123** (4): 413–433.

Christov LP, Prior BA: **Esterases of xylan-degrading microorganisms:production, properties and significance.** (1993) *Enzyme Microb. Technol.* **15**(6): 460–475.

Chang VS, Nagwani M, Holtzaple MT: **Lime pretreatment of crop residues: bagasse and wheat straw.** (1998) *Applied Biochemistry and Biotechnology* **74**: 135–159.

Christman RF, Oglesby RT: **Microbiological degradation and the formation of humus.** In *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions*, Eds: K. V. Sarkanen KV, Ludwigs CH. 769–795. (1971) Wiley Intersciences, New York, USA.

Chun BW, Dair B, Porteneuve CB, Jeknavorian AA, Cheung JH, Roberts LR: **Beneficiated water reducing compositions.** (2003) Patent WO0378347

Chundawat SP, Beckham GT, Himmel ME, Dale BE: **Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals.** (2011) *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2**:121-145.

Chung N, Aust SD: **Inactivation of lignin peroxidase by hydrogen peroxide during the oxidation of phenols.** (1995) *Archives of Biochemistry and Biophysics* **316**: 851–855.

Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ: **ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes.** (2004) *Bioinformatics*. **20**(1): 45-50.

Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ: **ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking.** (2004) *Nucleic Acids Research*. Vol. **32**, Web Server issue.

Conchie J, Gelman AL, Levvy GA: **Inhibition of glycosidases by aldonolactones of corresponding configuration.** (1968) *Biochem. J.*, **106**:135-40.

Couturier M, Haon M, Coutinho PM, Henrissat B, Lesage-Meesen L, Berrin JG: ***Podospira anserina* hemicellulases potentiate *Trichoderma reesei* secretome for the saccharification of lignocellulosic biomass.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **77**(1):237-246.

Cullen D, Kersten PJ: (2004). **Enzymology and molecular biology of lignin degradation.** (2004) *The Mycota III, Biochemistry and Molecular Biology* 2nd ed: 249–273. Brambl R, Marzluf GA (Eds.) Springer-Verlag.

Dashtban M, Schraft H, Syed TA, Qin W: **Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin.** (2010) *Int J Biochem Mol Biol.* **1**:36–50.

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.** (2004) *Carbohydrate Polymers* **55**: 171–177.

Dhawan S, Kaur J: **Microbial mannanases: an overview of production and applications.** (2007) *Crit. Rev. Biotechnol.* **27**(4): 197–216.

van Dijken JP, van Tuijl A, Luttik MAH, Middelhoven WJ, Pronk JT: **Novel pathway for alcoholic fermentation of delta-gluconolactone in the yeast *Saccharomyces bulderi*.** (2002) *J. Bacteriol.*, **184**:672-678.

Dimarogona M, Topakas E, Olsson L, Christakopoulos P: **Lignin boosts the cellulase performance of a GH-61 enzyme from *Sporotrichum thermophile*.** (2012) *Bioresour. Technol.* **110**:480-487.

Dredge JH, Radloff SE, Van Dyk JS, Pletschke BI: **Lime pretreatment of sugar beet pulp and evaluation of synergy between ArfA, ManA and XynA from *Clostridium cellulovorans* on the pretreated substrate.** (2011) *3 Biotech* **1**: 151–159.

Dumonceaux TJ, Bartholomew KA, Charles TC, Moukha SM, Archibald FS: **Cloning and sequencing of a gene encoding cellobiose dehydrogenase from *Trametes versicolor*.** (1998) *Gene* **210**(2):211-219.

Eastwood DC, Floudas D, Binder M, Majcherczyk A, Schneider P, Aerts A, Asiegbu FO, Baker SE, Barry K, Bendiksby M, Blumentritt M, Coutinho PM, Cullen D, de Vries RP, Gathman A, Goodell B, Henrissat B, Ihrmark K, Kauserud H, Kohler A, LaButti K, Lapidus

A, Lavin JL, Lee Y-H, Lindquist E, Lilly W, Lucas S, Morin E, Murat C, Oguiza JA, Park J, Pisabarro AG, Riley R, Rosling A, Salamov A, Schmidt O, Schmutz J, Skrede I, Stenlid J, Wiebenga A, Xie X, Kües U, Hibbett DS, Hoffmeister D, Högberg N, Martin F, Grigoriev IV, Watkinson SC : **The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi.** (2011) *Science* **333**:762–765.

Eggert C, Temp U, Dean JFD, Eriksson KEL: **Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid.** (1995) *FEBS Letters* **376**: 202–206.

Eggert C, Temp U, Eriksson KEL: **The lignolytic system of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase.** (1996) *Appl Environ Microbiol* **62**:1151–1158.

Enoki A, Itajura S, Tanaka H: **The involvement of extracellular substances for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric ion to ferrous iron in wood degradation by wood decay fungi.** (1997) *J. Biotechnol.* **53**:265–272.

Eriksson KE, Blanchette RA, Ander P: **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components.** (1990) In Springer Series in Wood Science Springer-Verlag, Heidelberg, Germany 407 pp.

Espagne E, Lespinet O, Malagnac F, Da Silva C, Jaillon O, Porcel BM, Couloux A, Aury JM, Segurens B, Poulain J, Anthouard V, Grossetete S, Khalili H, Coppin E, Dequard-Chablat M, Picard M, Contamine V, Arnaise S, Bourdais A, Berteaux-Lecellier V, Gautheret D, de Vries RP, Battaglia E, Coutinho PM, Danchin EG, Henrissat B, Khoury RE, Sainsard-Chanet A, Boivin A, Pinan-Lucarre B, Sellem CH, Debuchy R, Wincker P, Weissenbach J, Silar P: **The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospira anserina*.** (2008) *Genome Biol.* **9**(5): R77.

Espejo E, Agosin E: **Production and degradation of oxalic acid by brown rot fungi.** (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1980–1986.

Esteghlalian AR, Svivastava V, Gilkes N, Gregg DJ, Saddler JN: **An overview of factors influencing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic feedstocks.** (2001) Himmel ME, Baker W, Saddler JN (Eds.), *Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion*, ACS 100–111.

Fan Z, Wu W, Hildebrand A, Kazuga T, Zhang Ruifu, Xiong X: **A novel biochemical route for fuels and chemicals production from cellulosic biomass.** *Plos one*, 2012 **7**(2): e31693.

Fan ZL, South C, Lyford K, Munsie J, van Walsum P, Lynd LR: **Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor.** (2003) *Bioprocess Biosyst Eng* **26**:93–101.

Fenn P, Kirk TK: **Relationship of nitrogen to the onset and suppression of lignolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*.** (1981) *Archives of Microbiology* **130**: 59–65.

Figueroa-Espinoza MC, Rouau X: **Oxidative cross-linking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase: mechanism of linkage between feruloylated arabinoxylans.** (1998) *Cereal Chem* **75**:259–265.

Filley TR, G.D. Cody GD, Goodell B, Jellison J, Noser C, Ostrofsky A: **Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi.** (2002) *Organic Geochemistry* **33**:111-124.

Foreman PK, Brown D, Dankmeyer L, Dean R, Diener S, Dunn-Coleman NS, Goedegebuur F, Houfek TD, England GJ, Kelley AS, Meerman HJ, Mitchell T, Mitchinson C, Olivares HA, Teunissen PJ, Yao J, Ward M: **Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*.** (2003) *J Biol Chem* **278**:31988-31997.

Forsberg Z, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Bunæs AC, Stenstrøm Y, MacKenzie A, Sørlie M, Horn SJ, Eijsink VGH: **Cleavage of cellulose by a CBM33 protein.** *Protein science*, 2011 **20**:1479-1483.

Foust TD, Ibsen KN, Dayton DC, Hess JR, Kenney KE: **The biorefinery. In Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy.** (2008)1st edition. Edited by Himmel ME. United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd. 7-37.

Gaboriaud C, Bissery V, Benchetrit T, Mornon JP: **Hydrophobic cluster analysis: an efficient way to compare and analyse amino acid sequences.** (1987) *FEBS letters* **224**(1): 149-155.

Galbe M, Zacchi G: **A review of the production of ethanol from softwood.** (2002) *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**: 618–628.

Gianfreda L, Xu F, Bollag JM: (1999). **Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes.** (1999) *Bioremediation Journal* **3**:1–25.

Gibbs CR: **Characterization and application of ferrozine iron reagent as a ferrous iron indicator.** *Anal. Chem.* 1976, **48**: 1197–1201.

Gírio FM, Fonseca C, Carneiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Lukasik R: **Hemicelluloses for fuel ethanol: A review.** (2010) *Bioresource Technology* **101**(13): 4775–4800.

Glenn JK, Morgan MA, Mayfield MB, Kuwahara M, Gold MH: **An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.** (1983) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **114**: 1077–1083.

Glenn JK, Gold MH: **Purification and characterization of extracellular Mn(II)-dependant peroxidase from the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.** (1985) *Archives of Biochemistry and Biophysics* **242**:329–341.

Gnanamani A, Jayaprakashvel M, Arulmani M, Sadulla S: **Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes.** (2006) *Enzyme Microb. Technol.*, **38**:1017-1021.

Godin B, Ghysel F, Agneessens R, Schmit T, Gofflot S, Lamaudière S, Sinnaeve G, Goffart JP, Gerin PA, Stilmant D, Delcarte J: **Cellulose, hemicelluloses, lignin, and ash contents in various lignocellulosic crops for second generation bioethanol production.** (2010) *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **14**(S2): 549-560.

Gomez-Toribio V, García-Martín A, Martínez MJ, Martínez AT, Guillen F: **Induction of extracellular hydroxyl radical production by white-rot fungi through quinone redox cycling.** (2009) *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 3944–3953.

Goodell B, Jellison J, Liu J, Daniel G, Paszczynski A, Fekete F, Krishnamurthy S, Jun L, Xu G: **Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood.** (1997) *J. Biotechnol.* **53**:133–162.

Goodell B: **Brown-rot fungal degradation of wood: our evolving view.** (2003) *Wood Deterior. Preserv.* **845**: 97–118.

Gray KA, Zhao L, Emptage M: **Bioethanol.** (2006) *Current Opinion in Chemical Biology* **10**(2):141–146.

Grootjen D, Meijlink L, van der Lans R, Luyben K: **Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*.** (1990) *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 860–864.

Guillén D, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R: **Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles.** (2010) *Appl Microbiol Biotechnol* **85**:1241–1249.

Guillen F, Martinez AT, Martinez MJ: **Production of hydrogen peroxide by aryl alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*.** (1990) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 465–469.

Hallberg BM, Bergfors T, Backbro K, Pettersson G, Henriksson G, Divne C: **A new scaffold for binding haem in the cytochrome domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase.** (2000) *Structure Fold.Des.* **8**: 79-88.

Hallberg BM, Henriksson G, Pettersson G, Divne C: **Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase** (2002) *J.Mol.Biol.* **315**: 421-434.

Halliwell B, Gutteridge JMC: **Hydroxyl radicals assayed by aromatic hydroxylation and dextrin degradation.** In: Green-Wald RA (Ed) *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, 1985, 177–180. CRC Press, Boca Raton, FL.

Halliwell B, Gutteridge JMC: **Free Radicals in Biology and Medicine.** (1999) Oxford, UK: Oxford University Press.

Hamacher T, Becker J, Gardonyi M, Hahn-Hägerdal B, Boles E: **Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization.** (2002) *Microbiology*, **148**: 2783–2788.

Hammel KE, Cullen D: **Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis.** (2008) *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 349–355.

Hammel KE, Kapich AN, Jensen KA, Ryan ZC: **Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi.** (2002) *Enzyme Microb. Technol.* **30**: 445–453.

Hahn-Hagerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, and Gorwa-Grauslund MF: **Towards industrial pentose-fermenting yeast strains.** (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**:937–953.

Harholt J, Suttangkakul A, Scheller HV: **Biosynthesis of pectins.** (2010) *Plant Physiol* **153**: 384–395.

Harreither W, Sygmund C, Dunhofen E, Vicuna R, Haltrich D, Ludwig R: **Cellobiose dehydrogenase from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*.** *Appl Environ Microbiol.* (2009) **75**(9):2750-2757.

Harris PV, Welner D, McFarland KC, Re E, Navarro Poulsen JC, Brown K, Salbo R, Ding H, Vlasenko E, Merino S, Xu F, Cherry J, Larsen S, Lo Leggio L: **Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family.** (2010) *Biochemistry* **49**: 3305-3316.

Harvey PJ, Palmer JM: **Oxidation of phenolic compounds by ligninases.** (1990) *Journal of Biotechnology* **13**: 169–179.

Hashimoto H: **Recent structural studies of carbohydrate-binding modules.** (2006) *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 2954–2967.

Hattaka A: **Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: Production and role in lignin degradation.** (1994) *FEMS Microbiology Review* **13**:125–135.

Henriksson G, Pettersson G, Johansson G, Ruiz A, Uzcategui E: **Cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* can be cleaved by papain into two domains.** *Eur J Biochem* 1991, **196**:101-106.

Henriksson G, Sild V, Szabo IJ, Pettersson G, Johansson G: **Substrate specificity of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*.** (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* **1383**(1): 48-54.

Henriksson G, Salumets A, Divne C, Pettersson G: **Studies of cellulose binding by cellobiose dehydrogenase and a comparison with cellobiohydrolase 1.** (1997) *Biochem. J.* **324**: 833-838.

Henriksson G, Johansson G, Pettersson G: **Is cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* a one-electron reductase?** (1993) *Biochim. Biophys. Acta.* **1144**(2): 184-190.

Henriksson G, Ander P, Pettersson G: **Cellobiose dehydrogenase (cellobiose oxidase) from *Phanerochaete chrysosporium* as a wood degrading enzyme. Studies on cellulose, xylan and synthetic lignin.** (1995) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**(5): 790-796.

Henriksson G, Johansson G, Pettersson G: **A critical review of cellobiose dehydrogenases.** (2000) *J. Biotechnol.* **78**(2): 93-113.

Henrissat B: **A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.** (1991) *Biochem. J.* **280**:309-316.

Henrissat B, Bairoch A: **Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases.** (1996) *Biochem. J.* **316**:695-696.

Herpoël I, Moukha S, Lesage-Meessen L, Sigoillot JC, Asther M: **Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production.** (2000) *FEMS Microbiol. Lett.* **183**:301-306.

Herpoël I, Jeller H, Fang G, Petit-Conil M, Bourbonnais R, Robert JL, Asther M, Sigoillot JC: **Efficient enzymatic delignification of wheat straw pulp by a sequential xylanase laccase mediator treatment.** (2002) *J Pulp Pap Sci* **28**:67-71.

Herpoël-Gimbert I, Margeot A, Dolla A, Jan G, Mollé D, Lignon S, Mathis H, Sigoillot JC, Monot F, Asther M: **Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains.** (2008) *Biotechnol Biofuels* **1**: 18.

Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD: **Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production.** (2007) *Science* **315**(5813): 804-807.

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H: **A large family of class III plant peroxidases.** (2001) *Plant and Cell Physiology* **42**: 462-468.

Holtzapple MT, Caram HS, Humphrey AE: **Determining the Inhibition Constants in the Hch-1 Model of Cellulose Hydrolysis.** (1984) *Biotechnology and Bioengineering* **26**:753-757.

Holtzapple M, Cognata M, Shu Y, Hendrickson C: **Inhibition of *Trichoderma-Reesei* Cellulase by Sugars and Solvents.** (1990) *Biotechnology and Bioengineering* **36**:275-287.

Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink, VG: **Novel enzymes for the degradation of cellulose.** (2012) *Biotechnol. Biofuels.* **5**(1):45.

Hoshino E, Shiroishi M, Amano Y, Nomura M, Kanda T: **Synergistic actions of exo-type cellulases in the hydrolysis of cellulose with different crystallinities.** (1997) *Journal of Fermentation and Bioengineering* **84**:300-306.

Igarashi K, Tani T, Kawai R, Samejima M: **Family 3 beta-glucosidase from cellulose-degrading culture of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is a glucan 1, 3-beta-glucosidase.** (2003) *J. Biosci. Bioeng.* **95**: 572-576.

Ioelovich M, Larina E: **Parameters of crystalline structures and their influence on the reactivity of C1.** (1999) *Cellulose Chem. Technol.* **33**: 3-12.

Ioelovich M: **Nanostructured cellulose: Review.** (2008) *Bioresources* **3**(4): 1403-1418.

Jarvis MC, McCann MC: **Macromolecular biophysics of the plant cell wall: concepts and methodology** (2000). *Plant Physiol Biochem.* **38**(1/2): 1-13.

Jellison J, Chandhoke V, Goodell B, Fekete FA: **The isolation and immunolocalization of iron-binding compounds produced by *Gloeophyllum trabeum***. (1991) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**:805–809.

Jensen KA, Houtman CJ, Ryan Z, Hammel KE: **Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum***. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2705–2711.

Jørgensen H, Vibe-Pedersen J, Larsen J and Felby C: **Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations**. (2006) *Biotechnol Bioeng* **96**: 862–870.

Jørgensen H, Kristensen JB, Felby C: **Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities**. (2007) *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **1**(2): 119–134.

Kabel MA, Bos G, Zeevalking J, Voragen AJG, Schols HA: **Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw**. (2007) *Bioresource Technology* **98**(10): 2034-2042.

Kadar Z, Szengyel Z, Reczey K: **Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol**. (2004) *Industrial Crops and Products* **20**: 103–110.

Karagöz P, Rocha IV, Özkan M, Irini Angelidaki I: **Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by Same Vessel Saccharification and Co-Fermentation**. (2012) *Bioresource Technology* **104**: 349–357.

Karkehabadi S, Hansson H, Kim S, Piens K, Mitchinson C, Sandgren M: **The first structure of a glycoside hydrolase family 61 member, Cel61B from *Hypocrea jecorina*, at 1.6 Å resolution**. (2008) *J.Mol.Biol.* **383**: 144-154.

Karlsson J, Saloheimo M, Siika-aho M, Tenkanen M, Penttilä M, Tjerneld F: **Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei***. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**:6498–6507.

Karlsson J, Siika-aho M, Tenkanen M, Tjerneld F: **Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei***. (2002) *Journal of Biotechnology* **99**: 63-78.

Kelley LA, Sternberg MJE: **Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server**. (2009) *Nature Protocols.* **4** : 363 – 371.

Kerem Z, Jensen KA, Hammel KE: **Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction**. (1999) *FEBS Lett.* **446**: 49–54.

Kersten PJ, Cullen D: **Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading**

Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. (2007) *Fungal Genetics and Biology* **44**: 77–87.

Kersten PJ, Kirk TK: **Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*.** (1987) *J. Bacteriol.* **169**: 2195–2201.

Klemm D, Schmauder HP, Heinze T: **Cellulose.** (2002) *Biopolymers, vol. 6. Polysaccharides II*. Wiley. Weinheim :275–319. Vandamme EJ, De Baets S, Steinbuchel A (Eds).

Koivula A, Reinikainen T, Ruohonen L, Valkeajärvi A, Claeysens M, Teleman O, Kleywegt GJ, Szardenings M, Rouvinen J, Jones TA, Teeri TT: **The active site of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II: the role of tyrosine 169.** (1996) *Protein Eng.* **9**: 691–699.

Koseki T, Mese Y, Fushinobu S, Masaki K, Fujii T, Ito K, Shiono Y, Murayama T, Iefuji H: **Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*.** (2008) *Appl Microbiol Biotechnol* **77**:1279–1285.

Kostylev M, Wilson D: **Synergistic interactions in cellulose hydrolysis.** (2012) *Biofuels* **3**(1): 61–70.

Kötter P, Ciriacy M: **Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*.** (1993) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**:776–783.

Kozakov D, Brenke R, Comeau SR, Vajda S: **PIPER: An FFT-based protein docking program with pairwise potentials.** (2006) *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **65**:392–406.

Kozakov D, Hall DR, Beglov D, Brenke R, Comeau SR, Shen Y, Li K, Zheng J, Vakili P, Paschalidis IC, Vajda S: **Achieving reliability and high accuracy in automated protein docking: Cluspro, PIPER, SDU, and stability analysis in CAPRI rounds 13–19.** (2010) *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **78**: 3124–3130.

Kremer SM, Wood PM: **Production of Fenton reagent by cellobiose oxidase from cellulolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*.** (1992) *Eur. J. Biochem.* **208**: 807–814.

Kulkarni N, Shendye A, Rao M: **Molecular and biotechnological aspects of xylanases.** (1999) *FEMS Microbiol. Rev.* **23**(4): 411–456.

Kundell TK, Mäkelä M R, Hilden K: **Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes—Ecological, functional and phylogenetic review.** (2010) *Journal of Basic Microbiology* **50**: 5–20.

Kurtz M, Champe S: **Purification and characterization of the conidial laccase EC 1.10.3.2 of *Aspergillus nidulans*.** (1982) *Journal of Bacteriology* **15**:1338–1345.

Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH: **Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*.** (1984) *FEBS Letters* **169**:247–250.

Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-5.

Langston JA, Shaghasi T, Abbate E, Xu F, Vlasenko E, Sweeney MD: **Oxidoreductive cellulose depolymerisation by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61.** (2011) *App. Environ. Microbiol.* **77**(19):7007-7015.

Langston JA, Brown K, Xu F, Borch K, Garner A, Sweeney MD: **Cloning, expression, and characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Thielavia terrestris* induced under cellulose growth conditions.** (2012) *Biochim. Biophys. Acta.* Epub ahead of print.

Laureano-Pérez L, Teymouri F, Alizadeh H, Dale BE: **Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass.** (2005) *Appl. Biochem. Biotechnol.* **121**: 1081–1099.

Lee EC, Huang CT: **Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grown on the media containing glucose and fructose.** (2000) *Biochem. Eng. J.* **4**: 217–227.

Levasseur A, Piumi F, Coutinho PM, Rancurel C, Asther M, Delattre M, Henrissat B, Pontarotti P, Asther M, Record E : **FOLy: an integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds.** (2008) *Fungal Genet. Biol.* **45**(5): 638-45.

Li B, Nagalla SR, Renganathan V: **Cloning of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase, a hemoflavoenzyme from *Phanerochaete chrysosporium*.** (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(4):1329-1335.

Liese W: **Ultrastructural aspects of woody tissues disintegration.** (1970) *Annual Review of Phytopathology* **8**: 231–258.

Lin Y, Tanaka S: **Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects.** (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**: 627–642.

Liu LZ, Slininger PJ, Gorsich SW: **Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains.** (2005) *Appl. Biochem. Biotechnol.* **121–124**:451–460.

Lin X, Beeson WT, Phillips CM, Marletta MA, Cate JHD: **Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases.** (2012) *Structure* doi:10.1016/j.str.2012.04.002.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, James Darnell J: **The Dynamic Plant Cell Wall.** (2000) *Molecular Cell Biology.* 4th edition. New York: Freeman WE (Eds) Section 22.5.

Lomascolo A, Record E, Herpoël-Gimbert I, Delattre M, Robert JL, Georis J, Dauvrin T, Sigoillot JC, Asther M: **Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer.** (2003) *Journal of Applied Microbiology* **94**(4): 618-624.

Lundell TK, Makela MR, Hilden K: **Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review.** (2010) *J. Basic Microbiol.* **50**: 5–20.

Macarron R, Acebal C, Castillon MP, Dominguez JM, Delamata I, Pettersson G, Tomme P, Claeyssens M: **Mode of action of Endoglucanase-III from *Trichoderma reesei*.** (1993) *Biochemical Journal* **289**:867-873.

Mansfield SD, Mooney C, Saddler JN: **Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis.** (1999) *Biotechnol. Prog.* **15**: 804–816.

Marbach I, Harel E, Mayer A: **Inducer and culture medium dependent properties of extracellular laccase from *Botrytis cinerea*.** (1983) *Phytochemistry* **22**:1535–1538.

Margeot A, Hahn-Hagerdal B, Edlund M, Slade R, Monot F: **New improvements for lignocellulosic ethanol.** (2009) *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**(3):372-80.

Martinez MJ, Ruiz-Duenas FJ, Cuillen F, Martinez AT: **Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*.** (1996) *European Journal of Biochemistry* **237**: 424–432.

Martinez AT, Speranza M, Ruiz-Duenas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillen F, Martinez M J, Gutierrez A, Del Rio JC: **Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin.** (2005) *International Microbiology* **8**: 195–204.

Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, Gelpke MD, Huang K, Chapman J, Helfenbein KG, Ramaiya P, Detter JC, Larimer F, Coutinho PM, Henrissat B, Berka R, Cullen D, Rokhsar D: **Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78.** (2007) *Nat. Biotechnol.*, **22**(7): 899.

Martinez D, Challacombe J, Morgenstern I, Hibbett D, Schmoll M, Kubicek CP, Ferreira P, Ruiz-Duenas FJ, Martinez AT, Kersten P, Hammel KE, Wymelenberg AV, Gaskell J, Lindquist E, Sabat G, BonDurant SS, Larrondo LF, Canessa P, Vicuna R, Yadav J, Doddapanenik H, Subramanian V, Pisabarro AG, Lavín JL, Oguiza JA, Master E, Henrissat B, Coutinho PM, Harris P, Magnuson JK, Baker SE, Bruno K, Kenealy W, Hoegger PJ, Kües U, Ramaiya P, Lucas S, Salamov A, Shapiro H, Tu H, Chee CL, Misra M, Xie G, Teter S, Yaver D, James T, Mokrejs M, Pospisek M, Grigoriev IV, Brettin T, Rokhsar D, Berka R, Cullen D: **Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion.** (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **106**: 1954–1959.

Mason WH: **Apparatus for the process of explosion fibrillation of lignocellulose material.** U.S. Patent 1,655,618, 1928.

Mason MG, Wilson MT, Ball A, Nicholls P: **Oxygen reduction by cellobiose oxidoreductase: the role of the haem group.** (2002) *FEBS Lett.* **518**:29-32.

Mason MG, Nicholls P, Wilson MT: **Rotting by radicals - the role of cellobiose oxidoreductase?** (2003) *Biochem. Soc. Trans.* **31**:1335-1336.

McNeil M, Darvil AG, Fry SC, Albersheim P: **Structure and function of the primary cells of plants.** (1984) *Ann. Rev. Biochem.* **53**(1): 625-663.

Medve J, Karlsson J, Lee D, Tjerneld F: **Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: Adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes.** (1998) *Biotechnology and Bioengineering* **59**:621-634.

Merino ST, Cherry J: **Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization.** (2007) *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **108**: 95–120.

Mester T, Field JA: **Characterization of a novel manganese peroxidase lignin peroxidase hybrid enzyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese.** (1998) *Journal of Biological Chemistry* **273**: 15412–15417.

Mohnen D: **Pectin structure and biosynthesis.** (2008) *Curr Opin Plant Biol* **11**: 266–277.

Moukha SM, Dumonceaux TJ, Record E, Archibald FS: **Cloning and analysis of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase.** (1999) *Gene.* **234**: 23-33.

Navarro D, Couturier M, da Silva GGD, Berrin JG, Rouau X, Asther M, Bignon C: **Automated assay for screening the enzymatic release of reducing sugars from micronized biomass.** *Microb Cell Fact* 2010, **9**:58.

Nevoigt E: **Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*.** (2008) *Microbiology and molecular biology reviews* 379–412.

Ni Y, Van Heiningen ARP: **Lignin removal from Alcell® pulp by washing with ethanol and water.** (1996) *Tappi Journal* **79** (3): 239 – 243.

Nidetzky B, Steiner W, Claeysens M: **Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei* - Adsorptions of two cellobiohydrolases, two endocellulases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis.** (1994) *Biochemical Journal* **303**:817-823.

Niemenmaa O, Uusi-Rauva A, Hatakka A: **Demethoxylation of [O¹⁴CH₃]-labelled lignin model compounds by the brown-rot fungi *Gloeophyllum trabeum* and *Poria (Postia) placenta*.** (2008) *Biodegradation* **19**:555–565.

Nilsson, T, Daniel, G: **Chemistry and microscopy of wood decay by some higher Ascomycetes.** (1989) *Holzforschung* **43**: 11–18.

Nutt A, Salumets A, Henriksson G, Sild V, Johansson G: **Conversion of O₂ species by cellobiose dehydrogenase (cellobiose oxidase) and glucose oxidase: a comparison.** (1997) *Biotechnol. Lett.* **19**: 379-383.

Ohgren K, Bura R, Lesnicki G, Saddler J, Zacchi G: **A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover.** (2007) *Process Biochemistry* **42**: 834–839.

Ohtakara A, Hayashi N, Mitsutomi M: **Purification and some properties of acid beta galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*.** (1981) *J. Ferment. Technol.*, **59**:325-328.

Ohtakara A, Mitsutomi M, Uchida Y: **Purification and enzymatic properties of alpha-galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*.** (1984) *Agri. Biol. Chem.*, **48**:1319-1327.

Parry NJ, Beever DE, Owen E, Vandenberghe I, Van Beeumen J, Bhat MK: **Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*.** (2001) *Biochem. J.*, **353**:117-127.

Paszczynski A, Huynh VB, Crawford R: **Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*.** *FEMS Microbiol Lett* 1985, **29**:37-41.

Paszczynski A, Huynh VB, Crawford R: **Comparison of ligninase-I and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*.** (1986) *Archives of Biochemistry and Biophysics* **244**:750–765.

Paszczynski A, Crawford R, Funk D, Goodell B: **De novo synthesis of 4, 5-dimethoxycatechol and 2, 5-dimethoxyhydroquinone by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*.** (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 674–679.

Phillips CM, Beeson WT, Cate JHD, Marletta MA: **Cellobiose dehydrogenase and a copper dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*.** (2011) *ACS Chem. Biol.* DOI: 10.1021/cb200351y.

Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS: **Xylanases from fungi: properties and industrial applications.** (2005) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**(5): 577-591.

Pricelius S, Ludwig R, Lant N, Haltrich D, Guebitz GM: **Substrate specificity of *Myriococcum thermophilum* cellobiose dehydrogenase on mono-, oligo-, and polysaccharides related to in situ production of H₂O₂.** (2009) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**(1): 75-83.

Pricelius S, Ludwig R, Lant NJ, Haltrich D, Guebitz GM: **In situ generation of hydrogen peroxide by carbohydrate oxidase and cellobiose dehydrogenase for bleaching purposes.** (2011) *J. Biotechnol.* **6**(2): 224-230.

Puchart V, Vrsanska M, Svoboda P, Pohl J, Ogel ZB, Biely P: **Purification and characterization of two forms of endo-β-1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749).** (2004) *BBA-Gen. Subj.* **1674**(3): 239–250.

Qian Y, Goodell B, Genco JM: **The effect of a chelator mediated Fenton system on the fiber and paper properties of hardwood Kraft pulp.** (2002) *J. Wood Chem. Technol.* **22**:267–284.

Quinlan RJ, Sweeney MD, Leggio LL, Otten H, Poulsen JCN, Johansen KS, Krogh KBRM, Jørgensen CI, Tovborg M, Anthonsen A, Tryfona T, Walter CP, Dupree P, Xu F, Davies GJ,

Walton PH: **Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components.** (2011) *Proc. Nat. Ac. Sci.* DOI: 10.1073/pnas.1105776108.

Quintero JA, Montoya MI, Sanchez OJ, Giraldo OH, Cardona CA: **Fuel ethanol production from sugarcane and corn: comparative analysis for a Colombian case.** (2008) *Energy* **33**: 385-399.

Rabinovich ML, Bolobova AV, Vasil'chenko LG: **Fungal Decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics.** (2004) *Appl. Biochem. Microbiol.*, **40**: 1-17.

Rama R, Mougin C, Boyer FD, Kollmann A, Malosse C, Sigoillot JC: **Biotransformation of benzo[a]pyrene in bench scale reactor using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus*.** (1998) *Biotechnol Lett* **20**:1101–1104.

Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, Larroche C : **Gluconic acid: properties, applications and microbial production.** (2006) *Food Technol. Biotechnol.*, **44**:185–195.

Reese ET: **Enzymatic hydrolysis of cellulose.** (1956) *Appl. Microbiol.* , **4**:39-45.

Renganathan V, Usha SN, Lindenburg F: **Cellobiose oxidizing enzymes from the lignocellulose-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: interaction with Microcrystalline Cellulose.** (1990) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**(5): 609-613.

Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D: **Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling.** (2001) *Phytochemistry* **57**: 929–967.

Rogers P, Joachimsthal E, Haggett K: **Ethanol from lignocellulosics: potential for *Zymomonas*-based process.** (1997) *Australasian Biotechnol.* **7** (5): 304–309.

Roy BP, Archibald F: 1994. **An indirect free radical-based assay for the enzyme cellobiose: quinone oxidoreductase.** (1994) *Anal. Biochem.* **216**(2): 291-298.

Roy BP, Dumonceaux T, Koukoulas AA, Archibald FS: **Purification and characterization of cellobiose dehydrogenases from the white rot fungus *Trametes versicolor*.** (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(12):4417-4427.

Ruiz-Duenas FJ, Martinez MJ, Martinez AT : **Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*.** (1999) *Molecular Microbiology* **31**: 223–235.

Ryabova O, Vrsanska M, Kaneko S, van Zyl WH, Biely P: **A novel family of hemicellulolytic α -glucuronidase.** (2009) *FEBS Lett.* **583** (9): 1457–1462.

Ryvarden L: **Type of rot. Genera of Polypores, Nomenclature and Taxonomy** In Synopsis Fungorum Fungiflora. (1991) Oslo, Norway, **5**: 49–58.

Saloheimo A, Rauta J, Stasyk OV, Sibirny AA, Penttilä M, Ruohonen L: **Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases.** (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**: 1041–1052.

Saloheimo M, Nakari-Setälä T, Tenkanen M, Penttinen M: **cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast.** (1997) *Eur. J. Biochem.* **249**: 584-591.

Samejima M, Eriksson K-E: **A comparison of the catalytic properties of cellobiose: quinone oxidoreductase and cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*.** (1992) *Eur. J. Biochem.* **207**:103-107.

Sanchez, C: **Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi.** (2009) *Biotechnology Advances* **27**: 185–194.

Sanchez OJ, Cardona CA: **Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks.** (2008) *Bioresour. Technol.* **99**: 5270-5295.

Sandgren M, Shaw A, Ropp TH, Wu S, Bott R, Cameron AD, Ståhlberg J, Mitchinson C, Jones TA: **The X-Ray Crystal Structure of the *Trichoderma Reesei* Family 12 Endoglucanase 3, Cel12A, at 1.9 Å Resolution.** (2001) *J. Mol. Biol.* **308**(2): 295-310.

Scheller HV, Ulvskov P: **Hemicelluloses.** (2010) *Annu Rev Plant Biol.* **61**:263-89.

Schmidhalter DR, Canevascini G: **Isolation and characterization of the cellobiose dehydrogenase from the brown-rot fungus *Coniophora puteana* (Schum Ex-Fr) Karst.** (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **300**(2):559-563.

Schmidt CJ, Whitten BK, Nicholas DD: **A proposed role for oxalic acid in non-enzymatic wood decay by brown-rot fungi.** (1981) *Am. Wood Preserv. Assoc.* **77**:157–164.

Schmidt AS, Thomsen AB: **Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw.** (1998) *Bioresour. Technol.* **64**:139–151.

Schou C, Christensen MH, Schulein M: **Characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Humicola insolens*.** (1998) *Biochem. J.* **330**:565-571.

Shallom D, Shoham Y: **Microbial hemicellulases.** (2003) *Curr. Opin. Microbiol.* **6**(3): 219-228.

Sygmund C, Kracher D, Scheiblbrandner S, Zahma K, Felice AK, Harreither W, Kittl R, Ludwig R: **Characterization of the two *Neurospora crassa* cellobiose dehydrogenases and their connection to oxidative cellulose degradation.** (2012) *Appl. Environ. Microbiol. AEM*.01503-12.

Sigoillot C, Record E, Belle V, Robert JL, Levasseur A, Punt PJ, van den Hondel C, Fournel A, Sigoillot JC, Asther M: **Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching.** (2004) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**:346-352.

Sigoillot C, Lomascolo A, Record E, Robert JL, Asther M, Sigoillot JC: **Lignocellulolytic and hemicellulolytic system of *Pycnoporus cinnabarinus*: Isolation and characterization of a cellobiose dehydrogenase and a new xylanase.** (2002) *Enzyme Microb. Technol.* **31**:876-883.

Singh OV, Kumar R: **Biotechnological production of gluconic acid: Future implications.** (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**(4): 713-722.

Siqueira PF, Karp SG, Carvalho JC, Sturm W, Rodríguez-León JA, Tholozan JL, Singhanian RR, Pandey A, Soccol CR: **Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales.** (2008) *Bioresour. Technol.* **99**: 8156–8163.

Somerville CR, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredez A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H: **Toward a systems approach to understanding plant cell walls.** (2004) *Science* **306**: 2206–2211.

Sørensen HR, Pedersen S, Vikso-Nielsen A, Meyer AS: **Efficiencies of designed enzyme combinations in releasing arabinose and xylose from wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue.** (2005) *Enzyme Microb Technol* **36**: 773–784.

Sørensen HR, Pedersen S, Jørgensen CT, Meyer AS: **Enzymatic hydrolysis of wheat arabinoxylan by a recombinant “minimal” enzyme cocktail containing β -xylosidase and novel endo-1,4- β -xylanase and α -L-arabinofuranosidase activities.** (2007) *Biotechnol Prog* **23**:100–107.

Stapleton PC, O’Brien MM, O’Callaghan J, Dobson ADW: **Molecular cloning of the cellobiose dehydrogenase gene from *Trametes versicolor* and expression in *Pichia pastoris*.** (2004) *Enzyme Microb. Technol.*, **34**:55-63.

Stenberg K, Tengborg C, Galbe M, Zacchi G: **Optimisation of steam pretreatment of SO₂-impregnated mixed softwoods for ethanol production** (1998) *J Chem Tech Biotech.* **71**:299-308.

Stentelaire C, Lesage-Meessen L, Oddou J, Bernard O, Bastin G, Ceccaldi BC, Asther M: **Design of a fungal bioprocess for vanillin production from vanillic acid at scalable level by *Pycnoporus cinnabarinus*.** (2000) *J. Biosci. Bioeng.*, **89**:223-230.

Sticklen MB: **Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol.** (2008) *Nature Reviews Genetics* **9**, 433-443.

Strohdeicher M, Schmitz B, Bringermyer S, Sahm H: **Formation and degradation of gluconate by *Zymomonas mobilis*.** (1988) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**:378-382.

Sunna A, Antranikian G: **Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria.** (1997) *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**(1): 39–67.

Suzuki MR, Hunt CG, Houtman CJ, Dalebroux ZD, Hammel KE: **Fungal hydroquinones contribute to brown rot of wood.** (2006) *Environ. Microbiol.* **8**: 2214–2223.

Talbot G, Sygusch J: **Purification and characterization of thermostable bmannanase and α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*.** (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(11): 3505–3510.

Tanaka H, Fuse G, Enoki A: **An extracellular H₂O₂-producing and H₂O₂-reducing glycopeptide preparation from the lignin-degrading white rot fungus, *Irpex lacteus*.** (1991) *Mokuzai Gakkaishi* **37**: 986–988.

Tanaka H, Itakura S, Enoki A: **Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.** (1999) *Holzforschung* **53**:21–28.

Tatum EL, Barrat RW, Frios N, Bonner D: **Biochemical mutant strains of *Neurospora* produced by physical and chemical treatment.** (1950) *Am. J. Bot.* **37**:38-46.

Tien M, Kirk TK: **Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*.** *Methods Enzymol* 1988, **161**:238-249.

Teeri TT: **Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases.** (1997) *Trends in Biotechnology* **15**:160-167.

Teeri TT, Koivula A, Linder M, Wohlfahrt G, Divne C, Jones TA: ***Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose?** (1998) *Biochemical Society Transactions* **26**:173-178.

Thurston CF: **The structure and function of fungal laccases.** (1994) *Microbiology* **140**: 19–26.

Tickler AK, Smith DG, Ciccotosto GD, Tew DJ, Curtain CC, Carrington D, Masters CL, Bush AI, Cherny RA, Cappai R, Wade JD, Barnham KJ: **Methylation of the imidazole side chains of the Alzheimer disease amyloid-beta peptide results in abolition of superoxide dismutase-like structures and inhibition of neurotoxicity.** (2005) *J. Biol. Chem.* **280**: 13355–13363.

Ting CL, Makarov DE, Wang ZG: **A Kinetic Model for the Enzymatic Action of Cellulase.** (2009) *Journal of Physical Chemistry B* **113**:4970-4977.

Toivari MH, Ruohonen L, Richard P, Penttilä M, Wiebe MG: ***Saccharomyces cerevisiae* engineered to produce D-xylonate.** (2010) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**:751–760.

Tolan JS: **Iogen's process for producing ethanol from cellulosic biomass.** (2002) *Clean Techn Environ Policy* **3**:339–345.

Topakas E, Vafiadi C, Christakopoulos P: **Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases.** (2007) *Process Biochem.* **42**(4): 497–509.

Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, van Aalten DMF, Synstad B, Eijsink VGH: **The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation.** (2005) *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 28492-28497.

Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu Z, Zhai H, Sørle M, Eijsink VGH: **An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides.** (2010) *Science* 330 (219): DOI: 10.1126/science.1192231.

Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W: **Lignin biosynthesis and structure.** (2010) *Plant Physiol* **153**: 895–905.

van Maris AJA, Abbott DA, Bellissimi E, van den Brink J, Kuyper M, Luttik MAH, Wisselink HW, Scheffers A, van Dijken JP, Pronk JT: **Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status.** (2006) *Antonie van Leeuwenhoek* **90**:391–418.

Varela W, Tien M: **Effect of pH and oxalate on hydroquinone- derived hydroxyl radical formation during brown rot wood degradation.** (2003) *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6025–6031.

Wang W, Gao PJ: **Function and mechanism of a low molecular-weight peptide produced by *Gleophyllum trabeum* in biodegradation of cellulose.** (2003) *J. Biotechnol.* **101**:119–130.

Wei DS, Houtman CJ, Kapich AN, Hunt CG, Cullen D, Hammel KE: **Laccase and its role in the production of extracellular reactive oxygen species during wood decay by the brown-rot basidiomycete *Postia placenta*.** (2010) *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:2091–2097.

Welinder KG: **Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases.** (1992) *Current Opinion in Structural Biology* **2**: 388–393.

Westereng B, Ishida T, Vaaje-Kolstad G, Wu M, Eijsink VGH, Igarashi K, Samejima M, Ståhlberg J, Horn SJ, Sandgren M: **The putative endoglucanase PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* is a metal-dependent oxidative enzyme that cleaves cellulose.** (2011) *Plos one* **16** (11): e27807.

Westermarck U, Eriksson KE: **Purification and properties of cellobiose: quinone oxidoreductase from *Sporotrichum pulverulentum*.** (1975) *Acta Chemica Scandinavica Series B-Organic Chemistry and Biochemistry* **29**(4): 419-424.

Williamson G, Faulds CB, Kroon PA: **Specificity of ferulic acid (feruloyl) esterases.** *Biochem. Soc. Trans.* (1998) **26**(2): 205–209.

Wilson DB: **Cellulases and biofuels.** (2009) *Curr Opin Biotechnol* **20**: 295–299.

Wilson DB: **Processive and nonprocessive cellulases for biofuel production-lessons from bacterial genomes and structural analysis.** (2011) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, DOI **10.1007/s00253-011-3701-9**

Wong DW: **Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes.** (2008) *Applied Biochemistry and Biotechnology* **157**:174–209.

Wood TM: **Preparation of crystalline, amorphous, and dyed cellulase substrates.** (1988) *Methods Enzymol.* **160**: 19-25.

Wood TM, McCrae SI: **Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose.** (1979) *Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis* **10**:181–209; *Advances in Chemistry*, Vol. 181.

Woodward J, Lima M, Lee NE: **The role of cellulase concentration in determining the degree of synergism in the hydrolysis of microcrystalline cellulose.** (1988) *Biochemical Journal* **255**:895-899.

Wyman CE: **Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and power.** (2003) *Biotechnol. Prog.* **19**(2): 254–262.

Wymelenberg AV, Denman S, Dietrich D, Bassett J, Yu X, Atalla R, Predki P, Rudsander U, Teeri TT, Cullen D: **Transcript Analysis of Genes Encoding a Family 61 Endoglucanase and a Putative Membrane-Anchored Family 9 Glycosyl Hydrolase from *Phanerochaete chrysosporium*.** (2002) *Applied and environmental Microbiology* **68**(11): 5765–5768.

Xiao ZZ, Zhang X, Gregg DJ, Saddler JN: **Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates.** (2004) *Applied Biochemistry and Biotechnology* **113**(16):1115-1126.

Xiong H, Turunen O, Pastinen O, Leisola M, von Weymarn N: **Improved xylanase production by *Trichoderma reesei* grown on L-arabinose and lactose or D-glucose mixtures.** (2004) *Appl Microbiol Biotechnol*, **64**: 353-358.

Xu G, Goodell B: **Mechanism of wood degradation by brown-rot fungi: chelator-mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose.** (2001) *J. Biotechnol.* **27**:43–57.

Yelle DJ, Ralph J, Lu F, Hammel KE: **Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete.** (2001) *Environ. Microbiol.* **10**:1844–1849.

Yoshida H: **Chemistry of lacquer (urushi).** (1883) *Journal of the Chemical Society* **43**: 472–486.

Yoshida M, Igarashi K, Kawai R, Aida K, Samejima M: **Differential transcription of beta-glucosidase and cellobiose dehydrogenase genes in cellulose degradation by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.** (2004) *FEMS Microbiol. Lett.*, **235**:177-182.

Yoshida M, Ohira T, Igarashi K, Nagasawa H, Aida K, Hallberg BM, Divne C, Nishino T, Samejima M: **Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.** (2001) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**:2050-2057.

Zamocky M, Hallberg M, Ludwig R, Divne C, Haltrich D: **Ancestral gene fusion in cellobiose dehydrogenases reflects a specific evolution of GMC oxidoreductases in fungi.** (2004) *Gene*, **338**:1-14.

Zhang R, Fan Z, Kasuga T: **Expression of cellobiose dehydrogenase from *Neurospora crassa* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization.** (2010) *Protein Expr. Purif.* **75**(1):63-69.

