

Des assemblages de polymères bio-inspirés pour mesurer la diffusion et les interactions des enzymes impliquées dans la déconstruction de la biomasse lignocellulosique

Gabriel Paës^{1,2}, Jean-Guy Berrin^{3,4}, Mats Ohlin⁵

¹INRA et ²Université de Reims Champagne Ardenne, UMR Fractionnement des AgroRessources et Environnement (FARE), Reims, France

³INRA et ⁴Aix-Marseille Université, UMR Biodiversité et Biotechnologie Fongiques (BBF), Marseille, France

⁵Lund University, Department of Immunotechnology, Lund, Suède

CONTEXTE

La biomasse lignocellulosique (BL) est constituée d'un réseau complexe de polymères (cellulose, hémicelluloses et lignines) dont la transformation dans les bio-raffineries peut potentiellement fournir une panoplie de produits chimiques, matériaux et carburants. L'utilisation d'enzymes spécifiques et travaillant dans des conditions douces est un atout mais la complexité architecturale et chimique de la BL restreint l'activité et la mobilité des enzymes.

Dans ce contexte, **il est essentiel de pouvoir caractériser finement les propriétés des enzymes au niveau de leur catalyse et de leurs interactions.** En effet, plusieurs études ont démontré que lors de l'hydrolyse de la BL, les enzymes peuvent être inactivées soit par des inhibiteurs, soit via la formation d'interactions irréversibles avec des motifs chimiques [1,2]. Or, lors de leur caractérisation, les enzymes sont généralement testées sur des substrats simples, ce qui ne permet pas de rendre compte de ces phénomènes : de nouvelles approches doivent donc être mises en œuvre. **C'est ce que nous proposons à travers l'utilisation d'assemblages bio-inspirés de parois végétales qui vont mimer un environnement encombré et des motifs chimiques rencontrés dans la BL.**

STRATÉGIE

1-Préparation des assemblages bio-inspirés

Les assemblages sont constitués à partir d'arabinoxylanes féruloylés (AX), de nanocristaux de cellulose (CNC) et de lignines modèles (DHP), sous 3 états : des solutions, des gels (polymères AX réticulés) et des films [3,4].

2-Préparation des sondes fluorescentes

Les enzymes et CBM à caractériser sont couplés avec le fluorophore FITC par greffage sur les fonctions amines des protéines (N-ter et Lys) ; l'absence de modification des propriétés en présence du fluorophore est vérifiée.

3-Mesure de diffusion et d'interaction des sondes dans les assemblages

Les sondes sont placées dans les différents assemblages et leur diffusion est mesurée en microscopie confocale par la technique de FRAP (recouvrement de fluorescence après photoblanchiment) [5]. Une pseudo-affinité (affinité apparente) est calculée en prenant comme référence la diffusion en absence d'interaction.

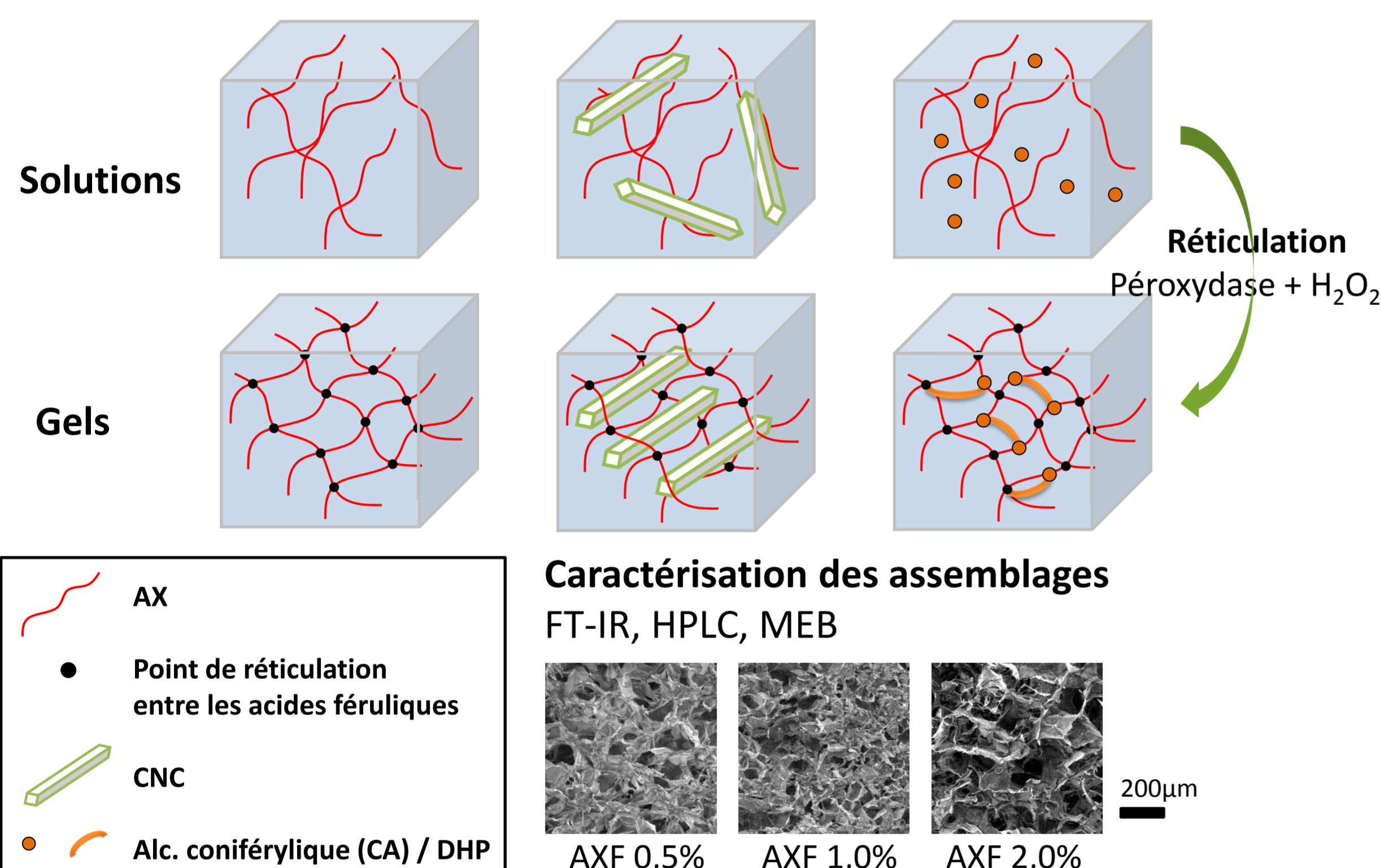
4-Modélisation et interprétation des mesures

Les données de pseudo-affinité sont corrélées aux paramètres variés au niveau des propriétés des assemblages et des sondes par une analyse statistique.

RÉSULTATS

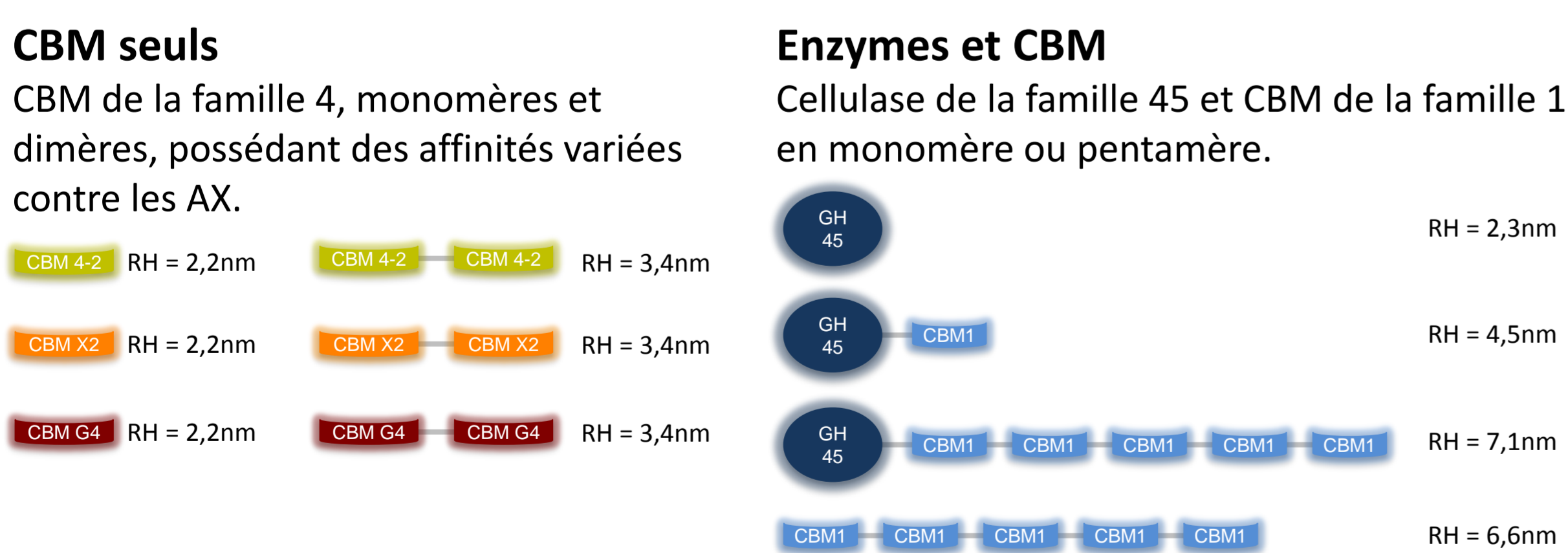
1 Assemblages bioinspirés [3,4]

Paramètres contrôlés : type et concentration des polymères, nature des interactions covalentes



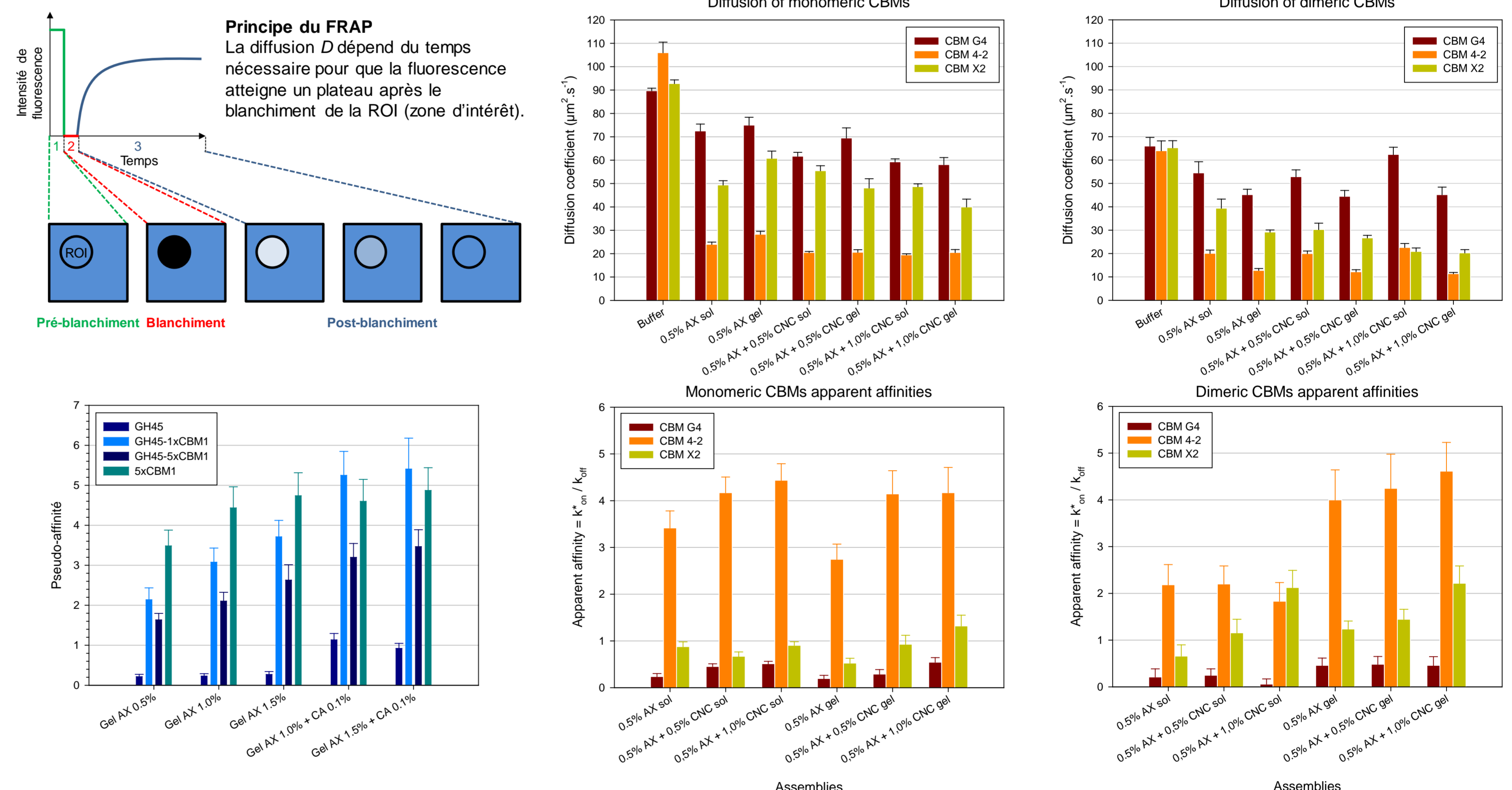
2 Sondes fluorescentes

Paramètres contrôlés : taille (rayon hydrodynamique RH), modularité, affinité



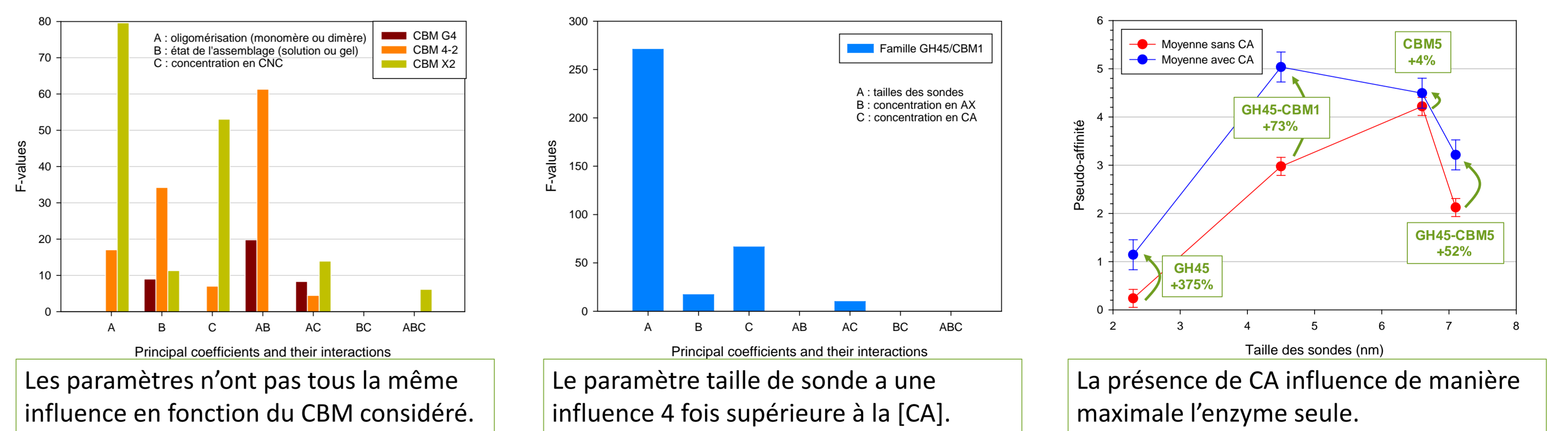
3 Diffusion et interaction des sondes [5]

Calcul de la diffusion et de la pseudo-affinité pour chaque sonde dans plusieurs assemblages



4 Modélisation et interprétation des mesures

Quantification et hiérarchisation des paramètres en fonction de leur influence sur l'affinité



CONCLUSION

Les assemblages bio-inspirés se révèlent être des outils efficaces pour mettre en évidence certaines interactions non spécifiques des enzymes et CBM impossibles à mesurer avec des méthodes standards. En effet, la caractérisation sur des substrats simples ne rend pas compte des phénomènes complexes qui peuvent survenir dans la BL. Surtout, ces assemblages permettent de comparer de façon quantitative les facteurs influençant la progression des sondes. Ainsi, les facteurs modulés n'ont pas tous le même impact en fonction des sondes analysées. En particulier, en ce qui concerne la lignine modèle, son interaction est maximale sur l'enzyme seule, plus limitée lorsque l'enzyme est attachée à un CBM, et inexistant sur le CBM seul. Le DHP interagit donc spécifiquement avec des motifs présents sur l'enzyme.

RÉFÉRENCES

[1] Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B and Ladisch M (2011) Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 54-60
 [2] Zhang JH, Tang M and Viikari L (2012) Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases. *Bioresource Technol.* 121, 8-12
 [3] Paës G and Chabbert B (2012) Characterization of arabinoxylan / cellulose nanocrystals gels to investigate fluorescent probes mobility in bio-inspired models of plant secondary cell wall. *Biomacromolecules* 13, 206-214
 [4] Paës G, Burr S, Saab MB, Molinari M, Aguié-Béghin V and Chabbert B (2013) Modeling progression of fluorescent probes in bioinspired lignocellulosic assemblies. *Biomacromolecules* 14, 2196-2205
 [5] Paës G (2014) Fluorescent probes for exploring plant cell wall deconstruction: a review. *Molecules* 19, 9380-9402

Ces travaux ont été financés par l'INRA (projet MOBIPROT) et le Swedish Research Council.