

# Caractérisation d'une Xyloglucane Endotransglucosylase/Hydrolase (XTH) dans les grains de *Brachypodium distachyon*

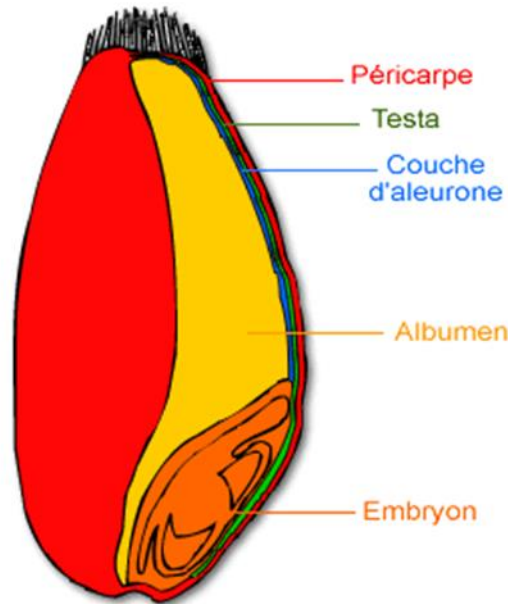
Alexandra Burghilea M1 BTV sous la direction de  
Dr. Francin-Allami Mathilde et Dr. Bonnin Estelle

1

Soutenance le 30.06.2015

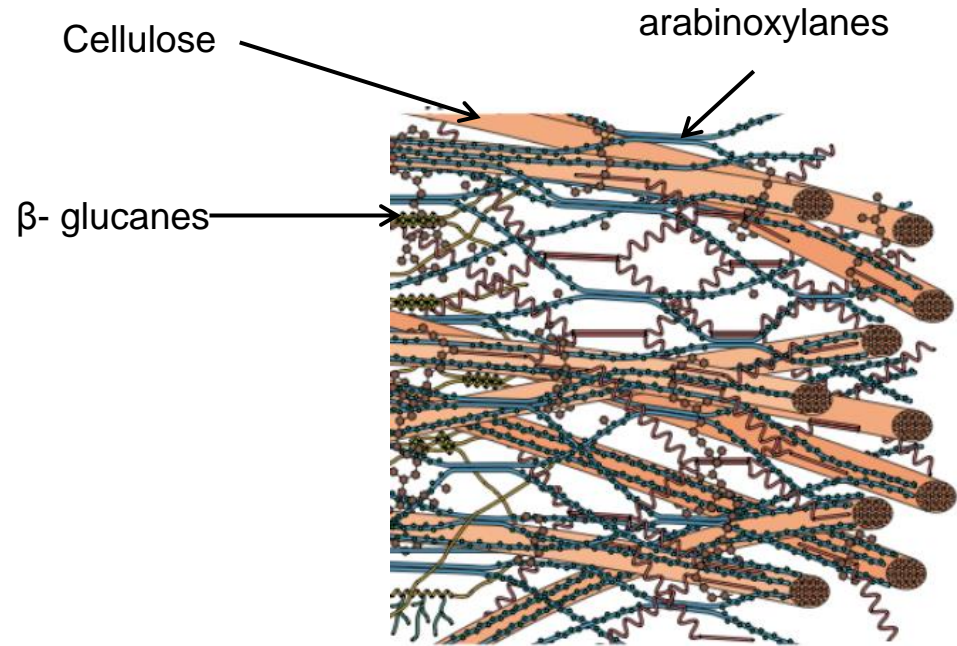


## Le grain de céréales



www.museum.agropolis.fr

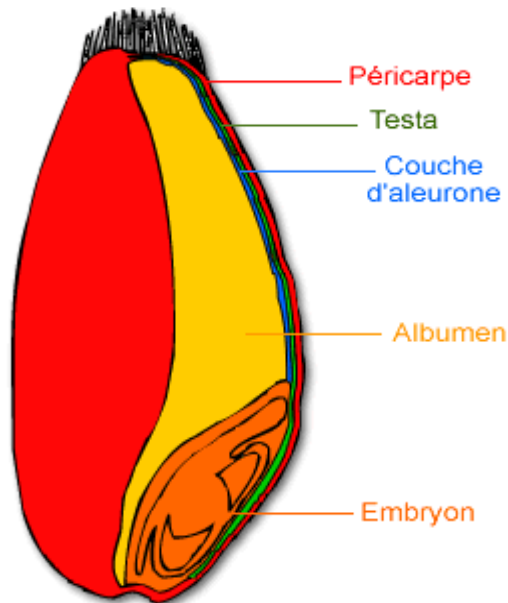
## La paroi cellulaire des monocotylédones



Carpita, N., & McCann, M. C., 2000

- Soutien structural
- Protection
- Contrôle des échanges

# La paroi des grains de céréales

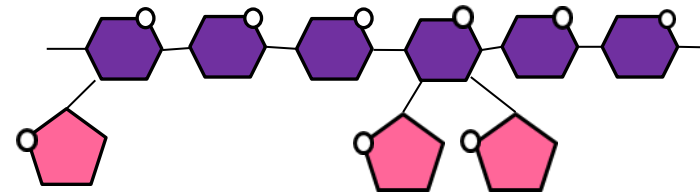


www.museum.agropolis.fr

## arabinoxylanes

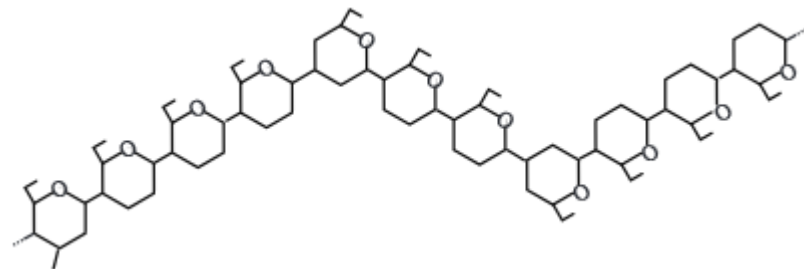
Xylose

Arabinose



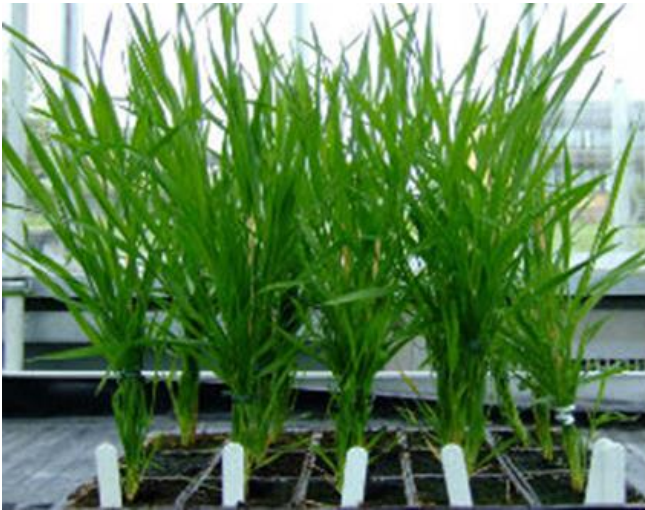
## $\beta$ -glucanes mixtes

Glucose



Scheller et Uliskov, 2010

## *Brachypodium distachyon* comme plante modèle



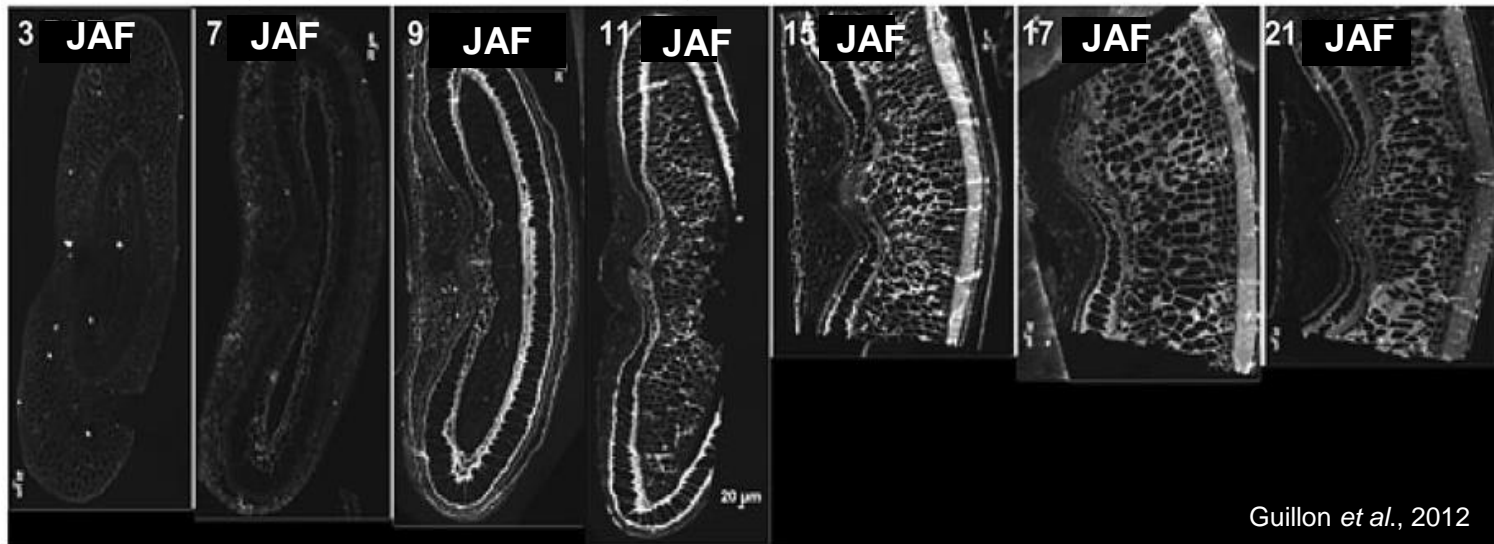
[www.york.ac.uk](http://www.york.ac.uk)

- ✓ Herbe de la famille des Graminées
- ✓ Un court cycle de vie
- ✓ Une facilité de culture
- ✓ Un petit génome séquencé

# Evolution de la composition et de la structure des polysaccharides au cours du temps dans les grains de *B. distachyon*

Immunomarquage avec anticorps ciblant les  $\beta$ -glucanes,

JAF: Jour après floraison



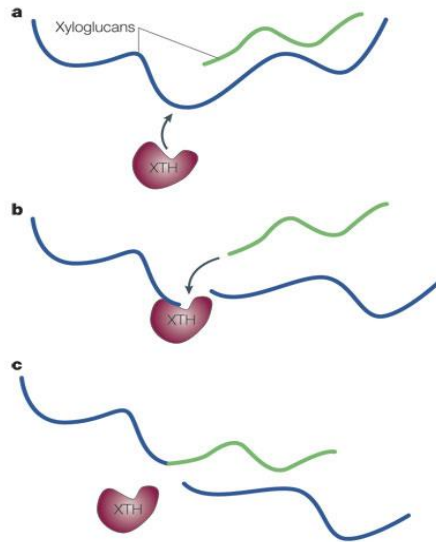
Analyse protéomique du grain de *B. distachyon*, Francin-Allami et al., 2015



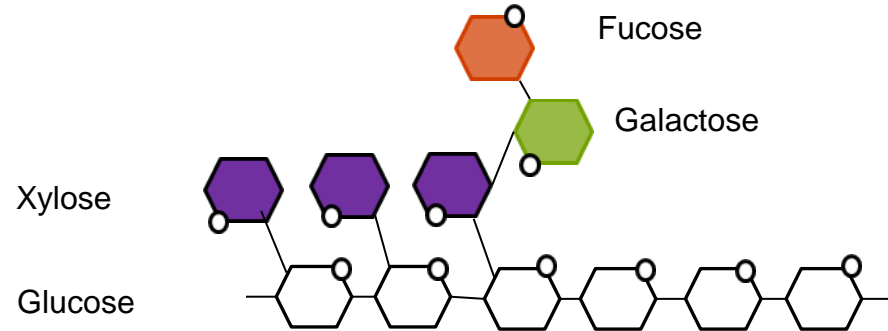
Xyloglucane Endotransglucosylase/Hydrolase (XTH) en forte quantité

# Xyloglucane endotransglucosylase/hydrolase (XTH)

Substrat connu: Xyloglucanes



Cosgrove, 2005

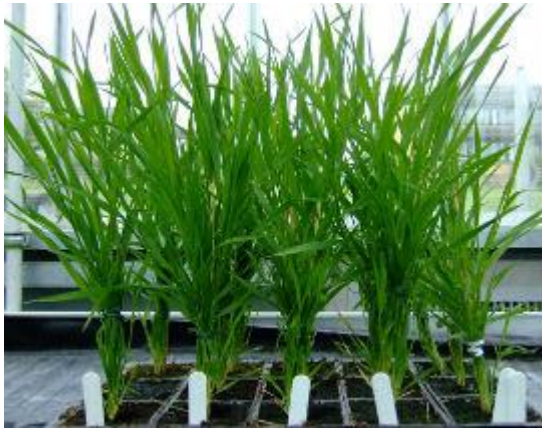


Grain de céréales ?



# Recherche des substrats de la XTH dans les grains de *B. distachyon*

## Stratégie



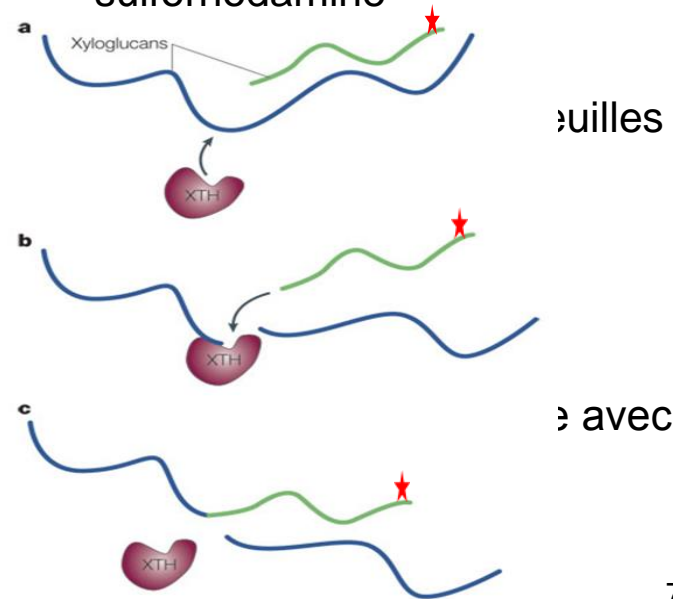
[www.york.ac.uk](http://www.york.ac.uk)

- 1. Marquage d'oligosaccharides avec sulforhodamine

- 2. Exp

- 3. Ext

- 4. Do différi



# 1. Marquage et caractérisation d'oligosaccharides

Polysaccharides  
β-glucanes (BG),  
arabinoxylanes (AX)  
xyloglucanes (XG)

Hydrolyse  
enzymatique

Oligomères

Sulforhodamine

**Oligomères-rhodamine**

BGOS-SR

AXOS-SR

Xyl-5-SR

XGOS-SR

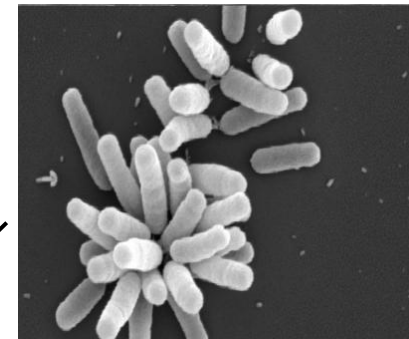
Kosik & Farkas, 2007

Arabinoxylane	Concentration (mg/mL)	Volume final (mL)	Quantité totale(mg)	Rendement en %
AXOS	20	5	100	
AXOS-SR	2,72	2	5,44	5,44

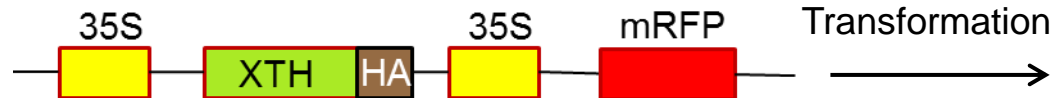


## 2. Infiltration de feuilles de tabac

*Agrobacterium*



[www.eurekalert.org](http://www.eurekalert.org)



Insert = XTH

Contrôle= insert GT61-55

Contrôle=*Agrobacterium* non transformé

Infiltration



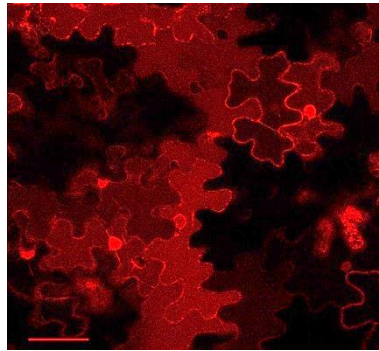
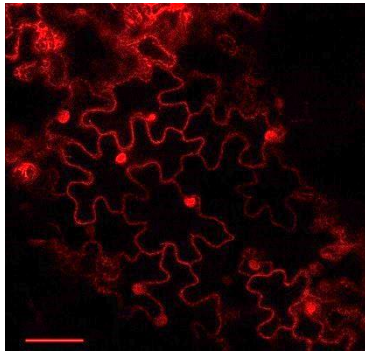
Imogen et al., 2006

### 3. Extraction de protéines issues du tabac infiltré

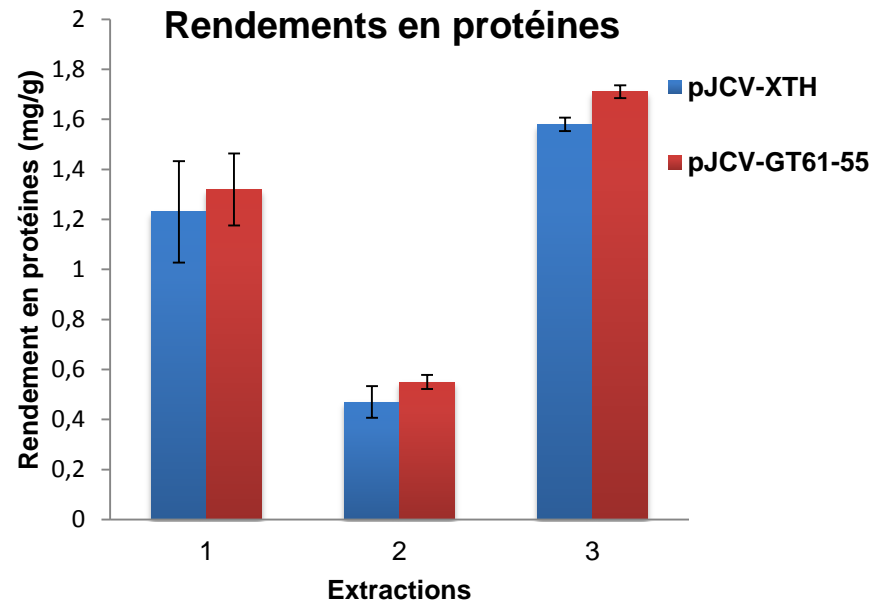
Vérification de la transformation

GT61

XTH

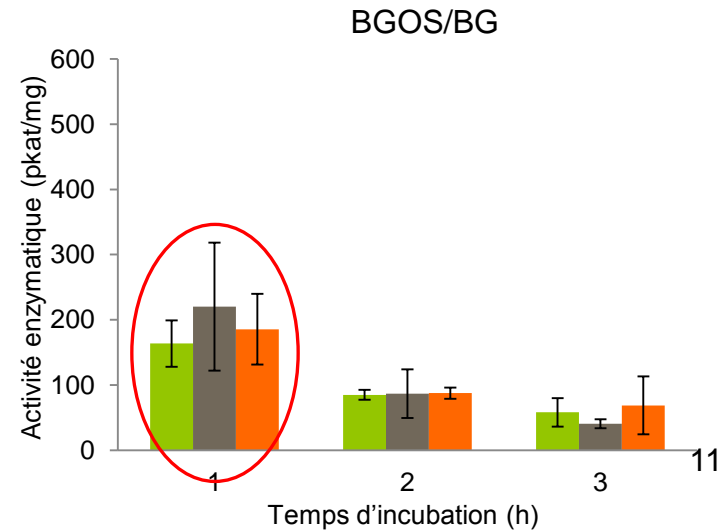
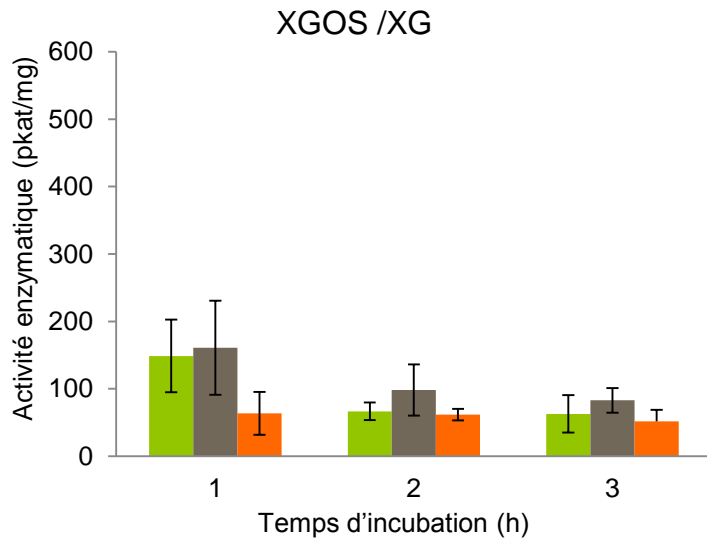
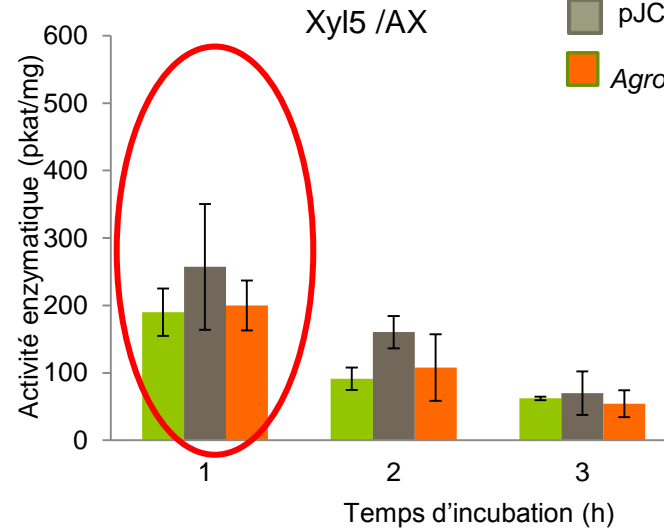
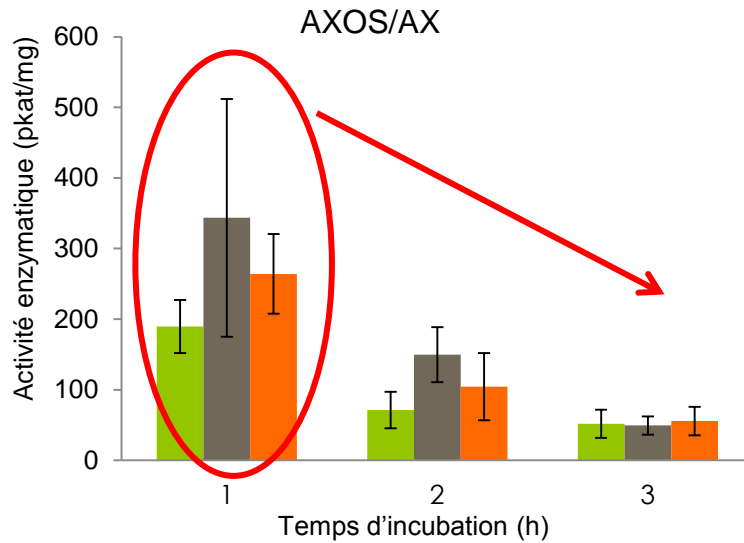


Extraction des protéines totales  
(Boudart *et al.*, 2003)



## 4. Mesure de l'activité enzymatique de la XTH

■ pJCV-GT61-55  
■ pJCV-XTH  
■ *Agrobacterium*



- Les rendements en protéines sont variables
- Les extraits protéiques ne sont pas stables
- Les **Arabinoxylanes** et les  $\beta$ -glucanes peuvent être les substrats de la XTH

Expression de la XTH dans les feuilles de tabac et dosage l'activité enzymatique

Expression de la XTH dans la levure *P. pastoris*



[www.pichia.com](http://www.pichia.com)

Purification de la XTH exprimée dans *P. pastoris* (His-tag)

Mesure de l'activité enzymatique sur les différents substrats

=> Substrats préférentiels de la XTH de *Brachypodium*

## Equipe PVPP

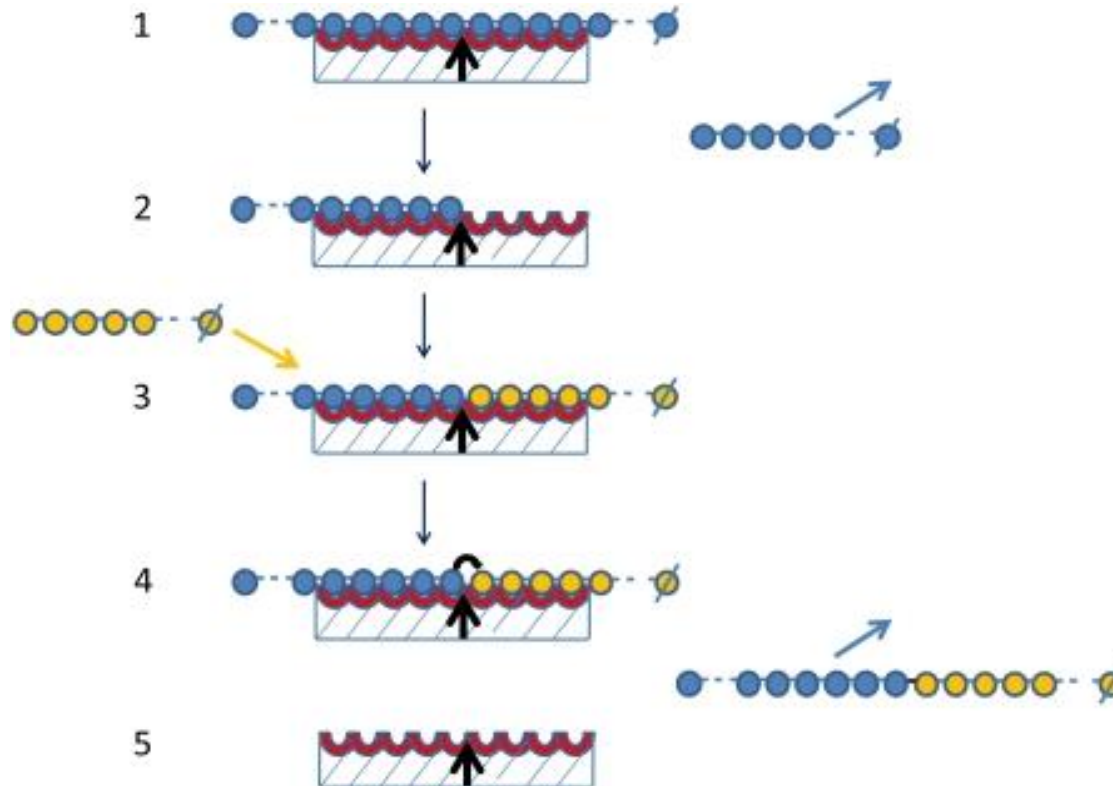
- ☐ Dr. Francin- Allami Mathilde, Dr. Bonnin Estelle et Dr.Chateigner- Boutin Anne-Laure
- ☐ Axelle Boudier, Marie-Jeanne Crepeau et Sylviane Daniel
- ☐ Toute l'équipe PVPP



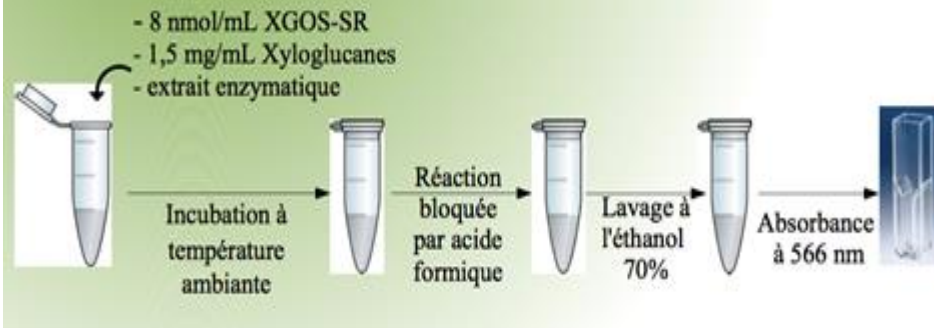


Extractions	Constructions	Masse fraiche (g)	Volume de l'extraite (µL)	Concentration en protéines (mg/mL)	Rendement en protéines (mg protéine/g masse fraise)
1	pJCV-XTH	0,477	150	3,93	1,23
	pJCV-GT61-55	0,229	150	2,03	1,32
2	pJCV-XTH	1,356	350	1,84	0,47
	pJCV-GT61-55	1,195	350	1,89	0,55
3	pJCV-XTH	0,753	600	1,98	1,58
	pJCV-GT61-55	0,799	600	2,28	1,71

## XTH transférase (XET action)



## Méthode de mesure de l'activité



## Calcule d'activité enzymatique

{ Concentration d'oligosaccharides marquée (C)=  $\text{DO}_{570 \text{ nm}} / 1768$  ( coefficient d'extinction) \* 0,5mm (longueur optique)

Activité enzymatique (nkat/ml)=  $C * (50/32\mu\text{l}) * 10^6 * (1/\text{temps en sec})$

Activité enzymatique (nkat/mg)=Activité enzymatique (nkat/ml)/concentration de protéine en mg

Activité enzymatique (pkat/mg)=Activité enzymatique (nkat/mg)\*1000