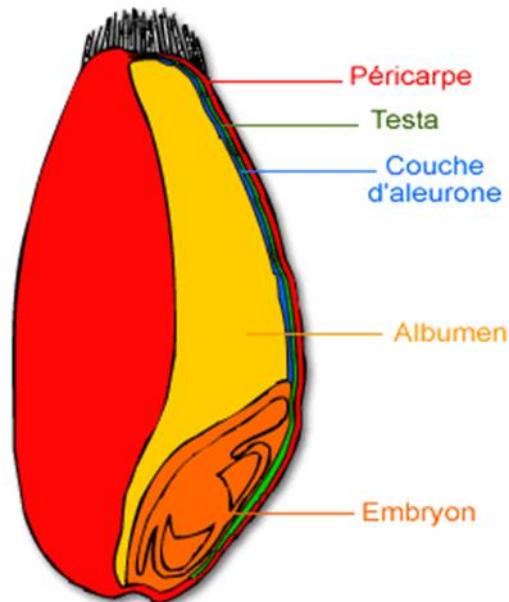


Caractérisation d'une Xyloglucane Endotransglucosylase/Hydrolase (XTH) dans les grains de *Brachypodium distachyon*



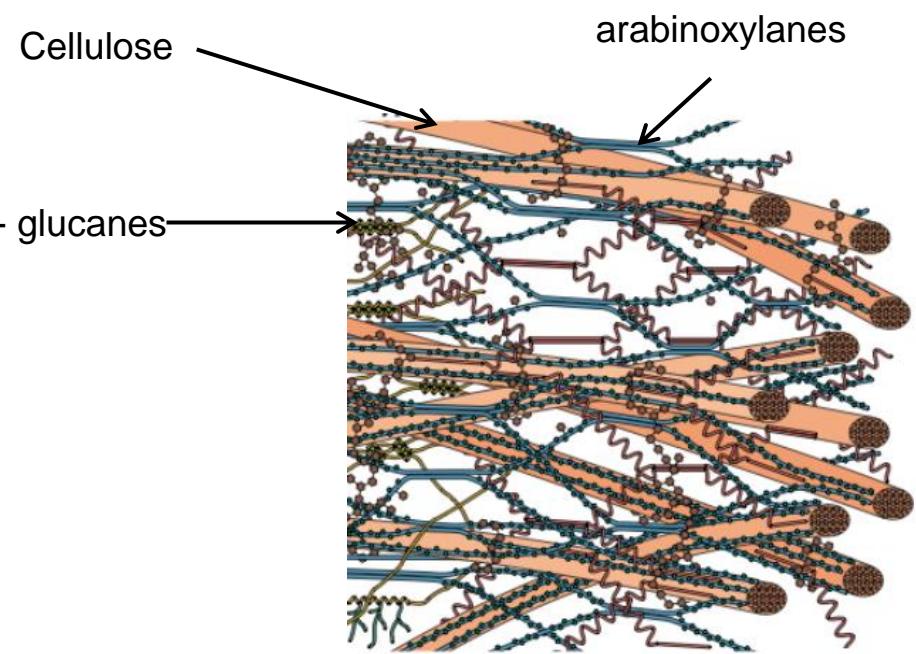
Alexandra Burghela M1 BTV sous la direction de
Dr. Francin-Allami Mathilde et Dr. Bonnin Estelle

Le grain de céréales



www.museum.agropolis.fr

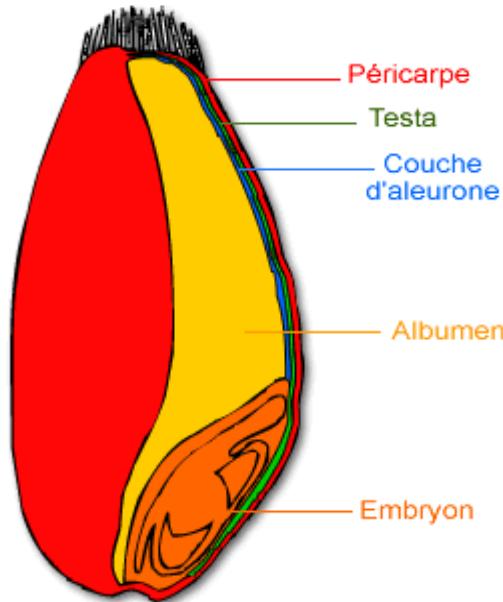
La paroi cellulaire des monocotylédones



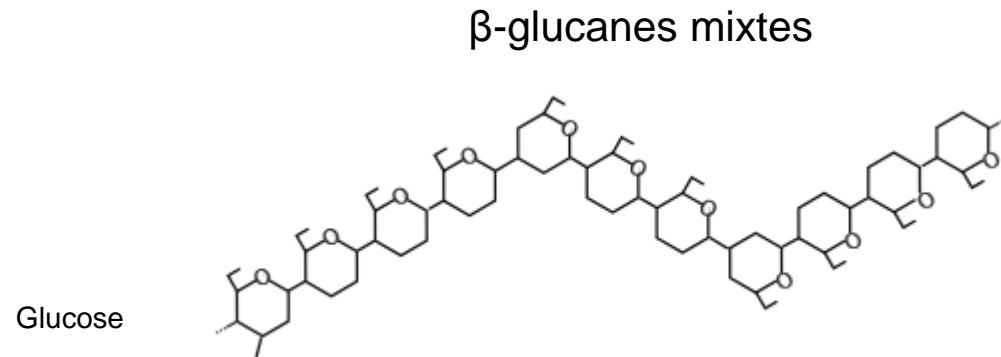
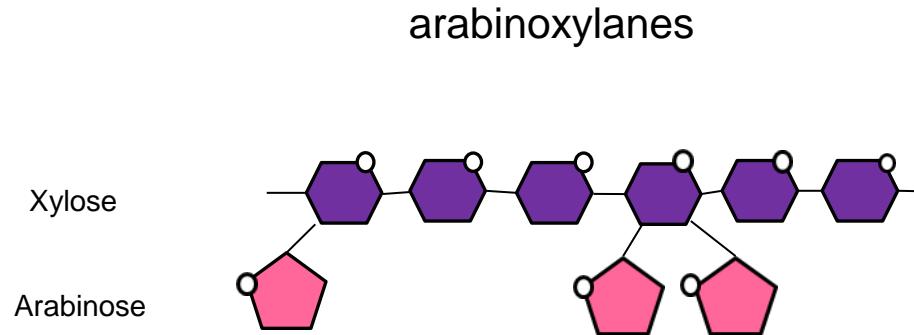
Carpita, N., & McCann, M. C., 2000

- Soutien structural
- Protection
- Contrôle des échanges

La paroi des grains de céréales

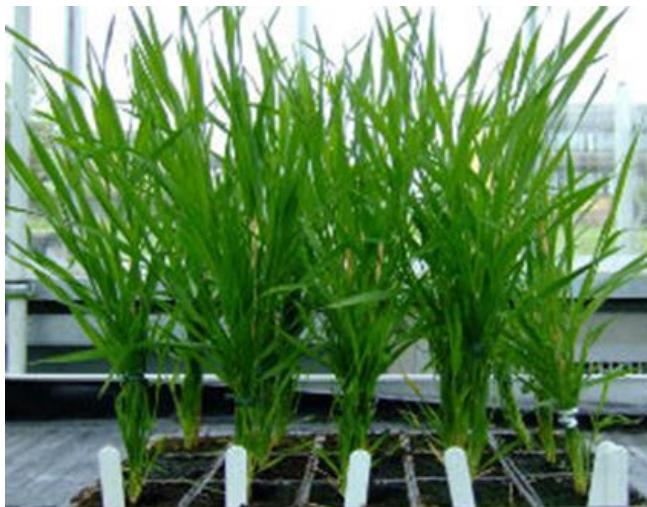


www.museum.agropolis.fr



Scheller et Ulskov, 2010

Brachypodium distachyon comme plante modèle



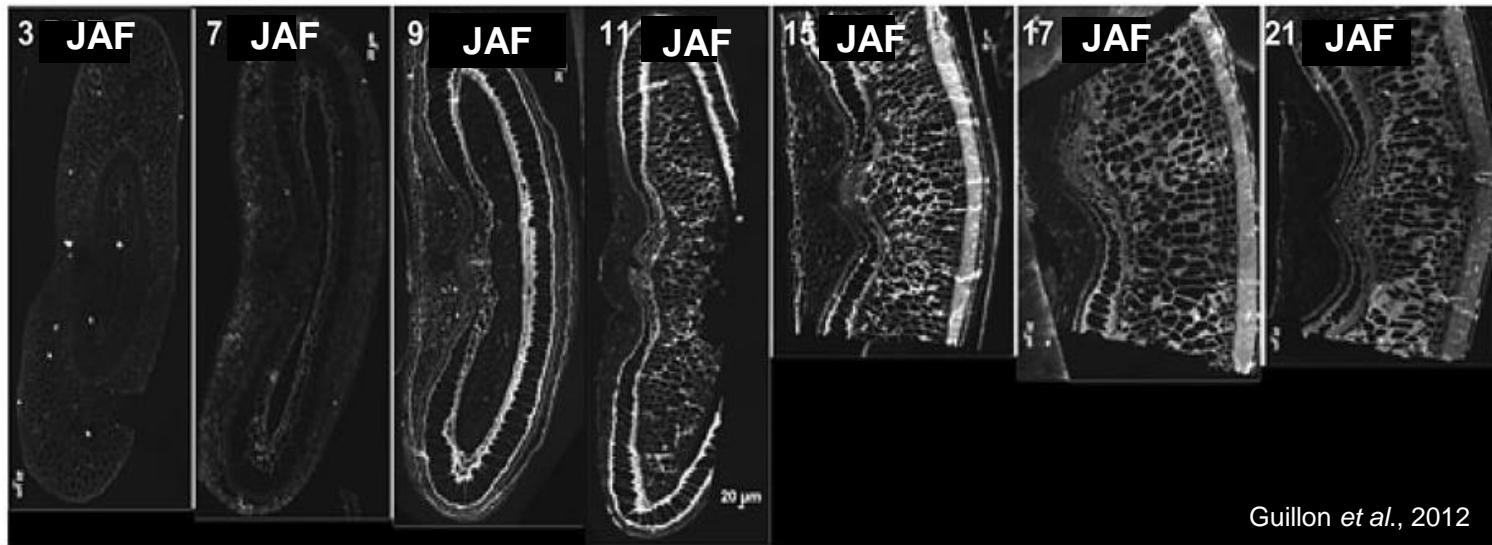
www.york.ac.uk

- ✓ 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 β -glucanes,

JAF: Jour après floraison

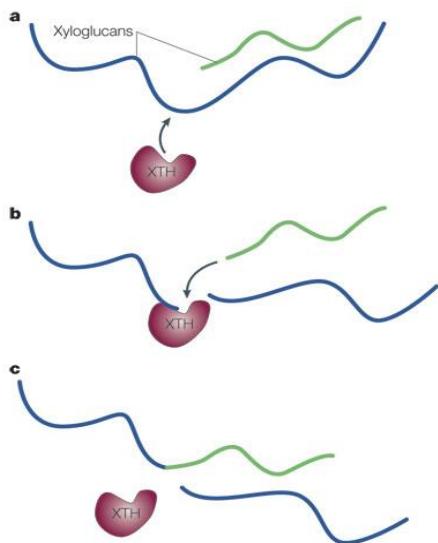


Analyse protéomique du grain de *B. distachyon*, Francin-Allami et al., 2015



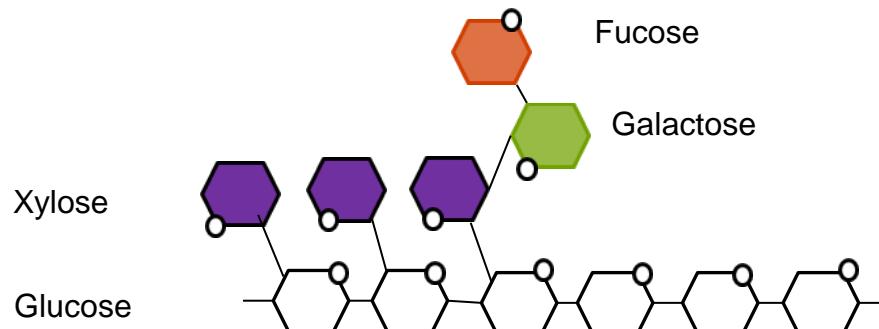
Xyloglucane Endotransglucosylase/Hydrolase (XTH) en forte quantité

Xyloglucane endotransglucosylase/hydrolase (XTH)



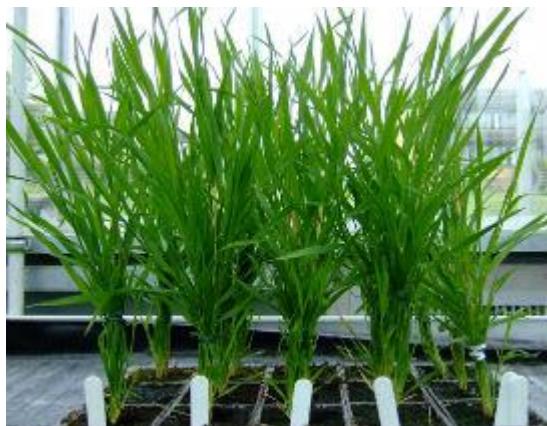
Cosgrove, 2005

Substrat connu: Xyloglucanes

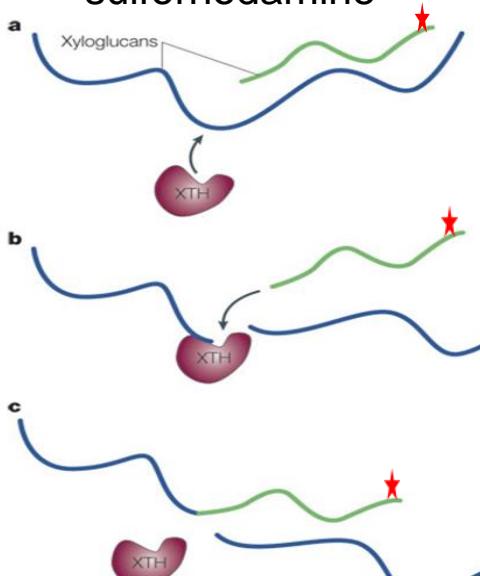


Grain de céréales ?

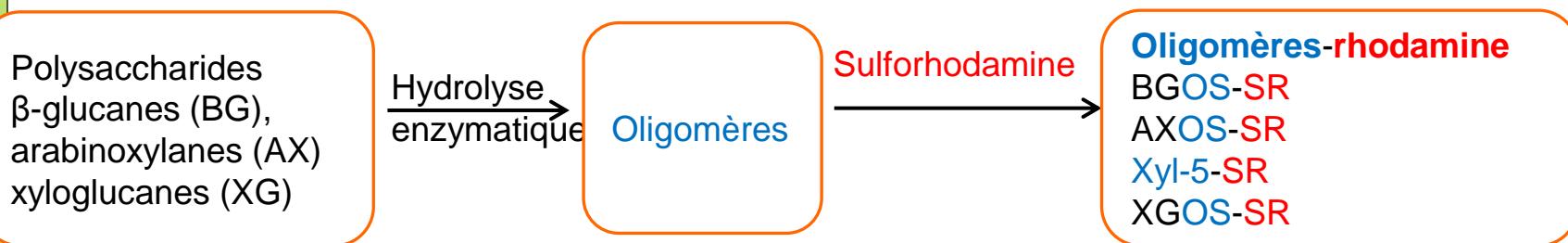
Recherche des substrats de la XTH dans les grains de *B. distachyon*



Stratégie

- 1. Marquage d'oligosaccharides avec sulforhodamine
 - 2. Expr
 - 3. Ext
 - 4. Do
- diffé
- 

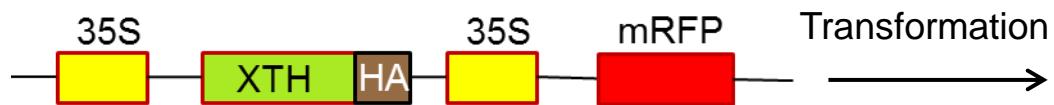
1. Marquage et caractérisation d'oligosaccharides



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

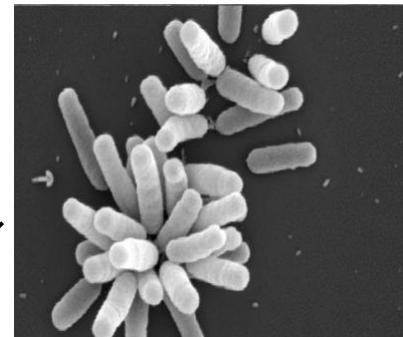


Insert = XTH

Contrôle= insert GT61-55

Contrôle=*Agrobacterium* non transformé

Agrobacterium



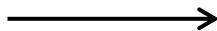
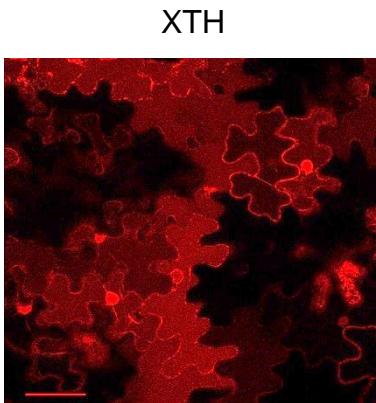
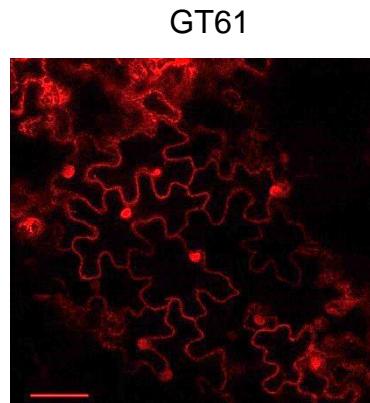
Infiltration



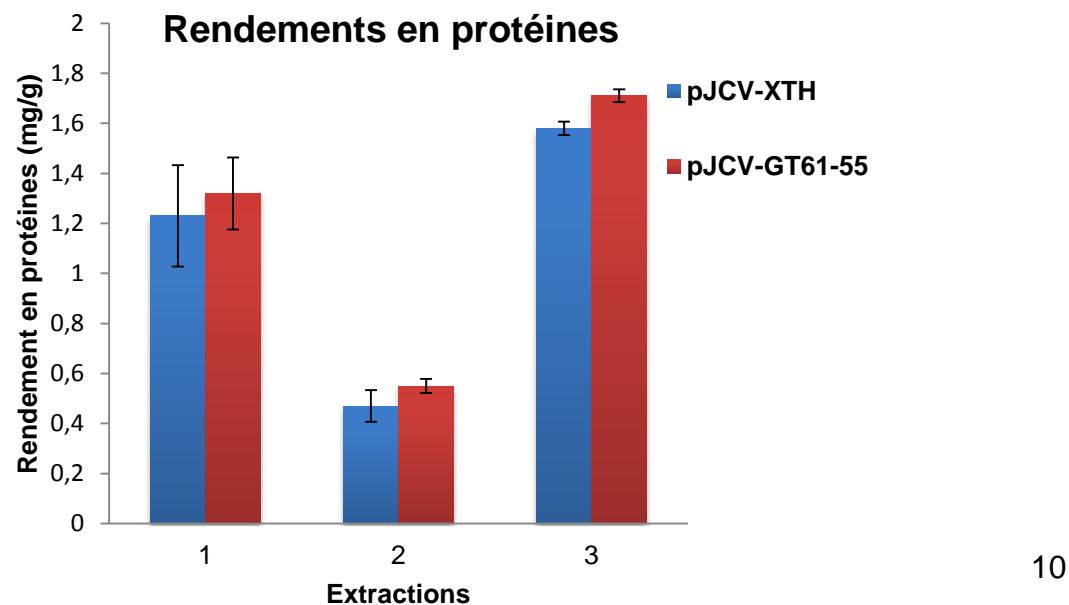
Imogen et al., 2006

3. Extraction de protéines issues du tabac infiltré

Vérification de la transformation

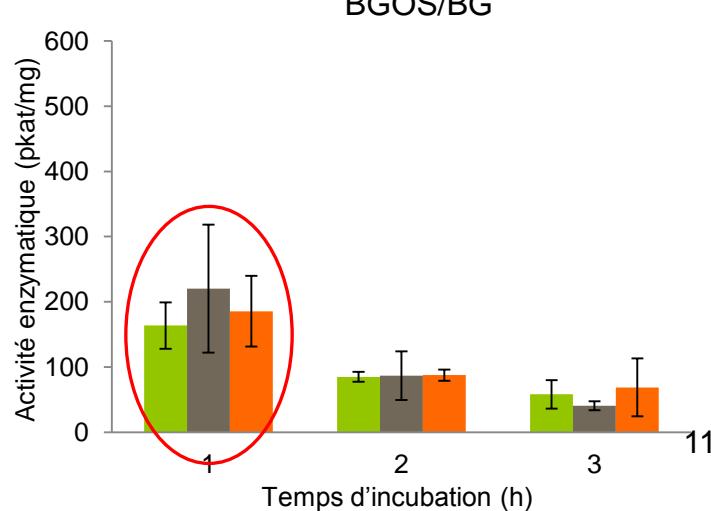
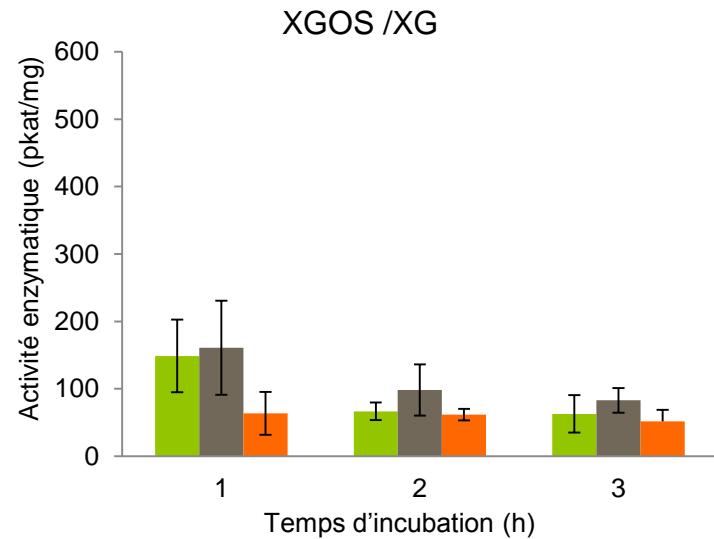
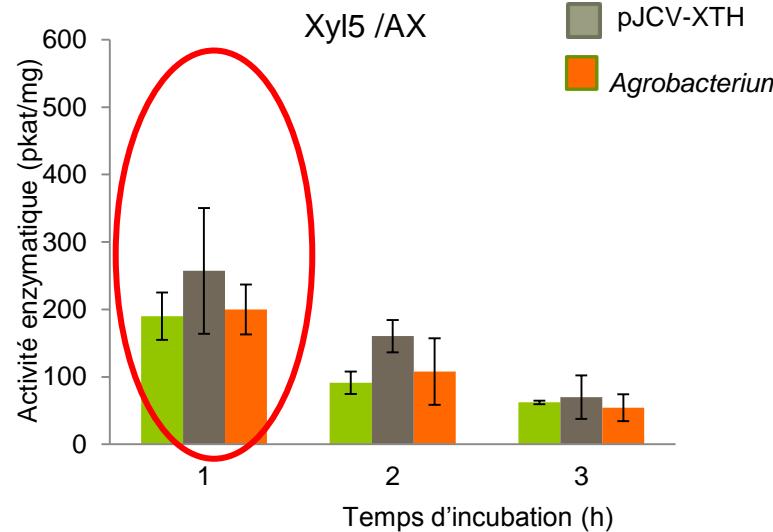
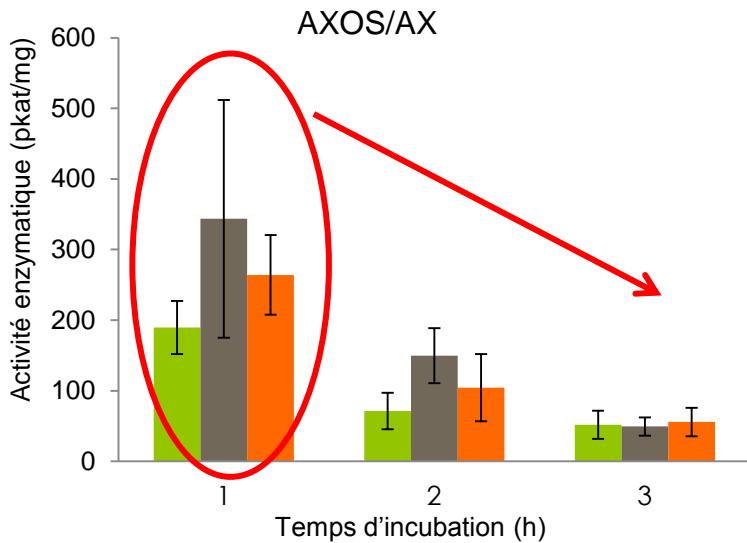


Extraction des protéines totales
(Boudart *et al.*, 2003)



10

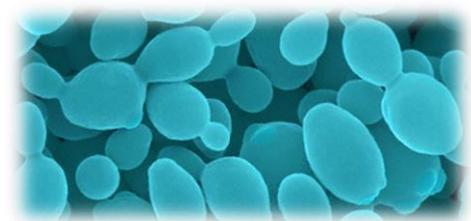
4. Mesure de l'activité enzymatique de la XTH



- Les rendements en protéines sont variables
- Les extraits protéiques ne sont pas stables
- Les **Arabinoxylanes** et les β -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

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

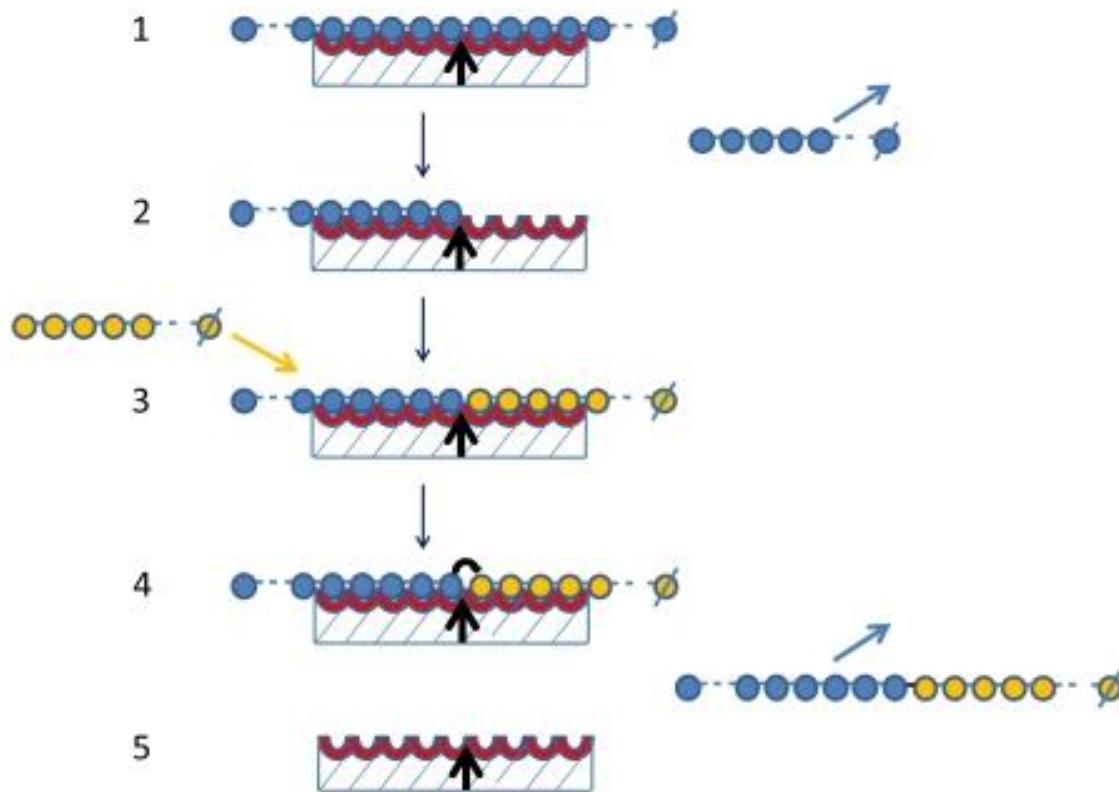
- Dr. Francin- Allami Mathilde, Dr. Bonnin Estelle et Dr.Chateigner- Boutin Anne-Laure
- Axelle Bouder, Marie-Jeanne Crepeau et Sylviane Daniel
- Toute l'équipe PVPP



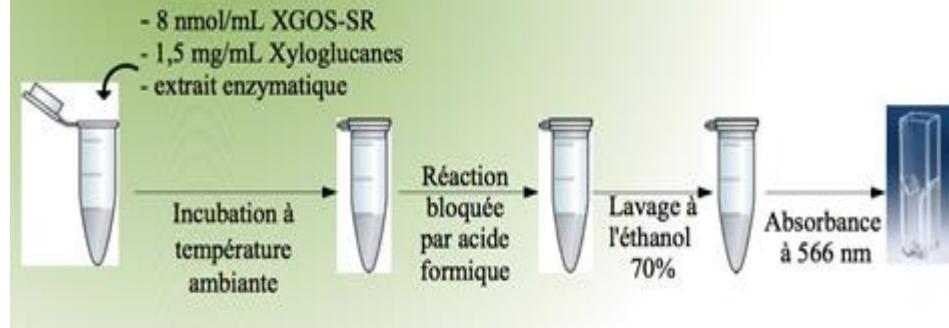
Annexe

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)= $\text{DO570 nm}/1768$ (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