

LIGNOXYL  
STABOXAL

3BCAR

**UB**  
UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

**INRA**  
SCIENCE & IMPACT

**AGRO  
SUP** Institut  
national  
supérieur  
des sciences agronomiques  
de l'alimentation et de l'environnement  
D I J O N

## **Master 2 Recherche SASC**

**(Sciences des Aliments, Sensorialité et Comportement)**

**Cohabité Université de Bourgogne / AgroSup Dijon**

**UMR PAM AgroSup Dijon/Université de Bourgogne**

(Procédés Alimentaires et Microbiologiques), Dir. Patrick GERVAIS

**Laboratoire BCF UMR 1163 Inra**

(Biotechnologie des champignons filamenteux), Dir. Jean Claude Sigoillot

**Année 2013-2014**

**Mémoire de stage**

Modélisation du fonctionnement de la cellobiose déshydrogénase (CDH) de *Pycnoporus cinnabarinus* – Etude des mécanismes réactionnels et de l'influence des conditions dans la capacité de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Présenté par :

**Michel SANKA**

24 septembre 2014

**Sous la direction de**

Mr. Jean Claude Sigoillot

Le stage a été effectué du 03 mars au 31 aout 2014

## **Résumé**

La dégradation oxydative de la lignine et de la cellulose est une partie importante du processus de dégradation des matrices lignocellulosiques par les enzymes fongiques. La cellobiose déshydrogénase (CDH) est très impliquée dans ce processus oxydatif par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Dans ce document, la CDH du champignon de la pourriture blanche *Pycnoporus cinnabarinus* a été clonée et surexprimée dans la levure *Pichia pastoris*. Son implication dans la production de ROS a été étudiée, particulièrement les radicaux hydroxyles ( $\text{HO}^\circ$ ) via la réaction de Fenton en utilisant le téréphtalate comme sonde, les anions superoxydes ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ) en utilisant le Nitrobleu tétrazolium (NBT) et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dosé par le couple amplex red et Hersoradish peroxydase. La CDH est capable d'augmenter la vitesse initiale de génération des radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton et d'améliorer le niveau de production totale grâce à son affinité importante avec les ions  $\text{Fe}^{3+}$ . Elle est aussi capable de produire des radicaux hydroxyles en absence des deux réactifs de Fenton, le  $\text{Fe}^{2+}$  et le  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en réduisant successivement l'oxygène en peroxyde et le peroxyde en radicaux  $\text{HO}^\circ$ . Mais cette voie est faible à cause de l'affinité moindre de la CDH pour le peroxyde d'hydrogène.

**Mots clés** : cellobiose déshydrogénase ; matrices lignocellulosiques ; dégradation oxydative ; réaction de Fenton ; ions  $\text{Fe}^{2+}$  ; peroxyde d'hydrogène.

## **Summary**

The oxidative degradation of lignin and cellulose is an important part of the process of degradation of lignocellulosic matrices by fungal enzymes. Cellobiose dehydrogenase (CDH) is very involved in this oxidative process through the generation of reactive oxygen species (ROS). In this document, the CDH of white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* was cloned and overexpressed in yeast *Pichia pastoris*. Its involvement in the production of ROS has been investigated, particularly hydroxyl radicals ( $\text{HO}^\circ$ ) via the Fenton reaction using terephthalate as a probe, the superoxide anions ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ) with nitroblue tetrazolium (NBT) and the hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) assayed by the couple Amplex red and Hersoradish peroxidase. CDH is able to increase the initial rate of generation of hydroxyl radicals via the Fenton's reaction and improve the level of total production through its high affinity with the  $\text{Fe}^{3+}$  ions. It is also capable of producing hydroxyl radicals in the absence of the two radicals Fenton reagent,  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , successively by reducing the oxygen into peroxyde and the peroxyde into radical  $\text{HO}^\circ$ . But this way is low due to the lower affinity of the CDH for the hydrogen peroxide.

**Key words** : cellobiose deshydrogenase ; lignocellulosiques matrices ; oxydative degradation ; Fenton's reaction ;  $\text{Fe}^{2+}$  ions ; hydrogen peroxyde.

## **REMERCIEMENTS**

Je remercie d'abord le bon Dieu pour m'avoir donné la force de me réveiller tous les jours et la volonté de toujours aller de l'avant.

Je remercie Mr Jean Claude Sigoillot pour son enthousiasme, sa bonne volonté, sa gentillesse, sa compréhension, son soutien et pour m'avoir toujours mis dans les meilleurs dispositions pour bien mener ce projet.

Je remercie aussi Mr Jean François Cavin pour m'avoir soutenu et donné des bons conseils pendant toute la durée de ma formation de master 2 recherche.

Je remercie enfin toute l'équipe du laboratoire de Biotechnologie des Champignons Filamenteux (BCF UMR 1163), particulièrement David Navarro, Siemeng Zhou, Charlotte Champion, Sonia Garayova, Jean Guy Berrin et Sana Raouche pour m'avoir aidé dans mes manipulations et la rédaction de ce mémoire. Je vous souhaite à tous une bonne continuation.

# Table des matières

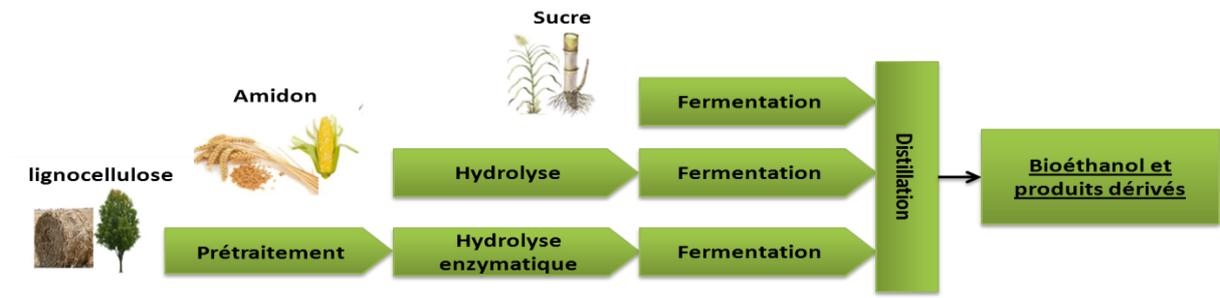
1	INTRODUCTION.....	2
1.1	Les Champignons de la pourriture du bois .....	2
1.2	Dépolymérisation enzymatique de la lignocellulose .....	3
1.3	La cellobiose déshydrogénase .....	3
1.3.1	Structure de la CDH .....	3
1.3.2	Fonction de la CDH .....	4
2	MATERIELS ET METHODES.....	7
2.1	Production de la CDH recombinante.....	7
2.1.1	Origine de la CDH recombinante.....	7
2.1.2	Expression hétérologue de la CDH .....	7
2.1.3	Purification de la CDH.....	8
2.1.4	Détermination des paramètres cinétiques de la CDH .....	8
2.2	Dosage des espèces réactives de l'oxygène et des ions ferreux.....	9
2.2.1	Dosage des radicaux hydroxyles (HO°) .....	9
2.2.2	Dosage des radicaux superoxydes (O <sub>2</sub> <sup>°</sup> ).....	9
2.2.3	Dosage du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	9
2.2.4	Réduction des ions Fe <sup>3+</sup> par la CDH .....	10
2.2.5	Réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène par la CDH .....	10
2.3	Plan d'expérience de Box Behnken .....	10
3	RESULTATS ET DISCUSSION .....	13
3.1	Purification détermination des paramètres cinétiques .....	13
3.1.1	Paramètres physico-chimiques .....	13
3.1.2	Constantes cinétiques.....	13
3.2	Production d'espèces réactives de l'oxygène.....	14
3.2.1	Production de radicaux superoxydes .....	14
3.3	Production de radicaux hydroxyles .....	15
3.3.1	Excès de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par rapport au Fe <sup>2+</sup> .....	16
3.3.2	Excès de Fe <sup>2+</sup> par rapport au H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	18
3.4	Réduction de l'oxygène et constantes de vitesses pour le Fe <sup>3+</sup> et le H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	19
3.5	Plan d'expérience de Box-Behnken .....	21
3.5.1	Impact sur la vitesse de production des radicaux hydroxyles .....	21
3.5.2	Impact sur le niveau de production des radicaux hydroxyles .....	22
4	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	25
5	BIBLIOGRAPHIE.....	26



# **Introduction**

# 1 INTRODUCTION

Le bioéthanol est présenté aujourd'hui comme une alternative franche en matière de biocarburants pour sa compatibilité avec l'essence. En 2003, la production de bioéthanol dans le monde était de 22 milliards de litres dont 602 millions en France. Le bioéthanol est obtenu à partir de n'importe quels végétaux contenant du saccharose, du glucose ou de l'amidon (Figure 1). Pour l'instant seulement la production de bioéthanol à partir de canne à sucre, de betterave sucrière et de grains de maïs et de blé a atteint un niveau d'exploitation industrielle. C'est la voie dite de 1<sup>ère</sup> génération (1G). Les Biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération utilisent la biomasse lignocellulosique.



**Figure 1** : Présentation du schéma générale de la production de bioéthanol 2G à partir des plantes vivrières et de la biomasse lignocellulosique.

L'une des techniques les plus utilisées est la dégradation de la lignocellulose par les enzymes produites par les champignons de la pourriture du bois. Cependant la complexité de la composition de la matrice lignocellulosique est un des facteurs importants limitant son hydrolyse enzymatique.

Aujourd'hui, c'est le secrétome du champignon filamenteux *T. reesei* qui est majoritairement utilisée pour procéder à l'attaque enzymatique des matrices lignocellulosiques du fait de sa forte capacité d'excrétion de ces enzymes d'hydrolyse. Cependant, Martinez et al (2008) ont montré que *T. reesei* ne possède que 7 gènes codant pour des cellulases (enzymes qui dégradent la cellulose) et 16 gènes codant pour des hémicellulases (enzymes qui hydrolysent l'hémicellulose). Ces propriétés en font l'organisme le moins équipé en enzymes d'hydrolyse des parois végétales par comparaison avec tous les autres génomes fongiques séquencés. Au vu de ce faible potentiel enzymatique, les recherches se sont beaucoup accentuées sur les possibilités de compléter ce secrétome par d'autres enzymes impliquées également dans l'hydrolyse de la lignocellulose.

## 1.1 Les Champignons de la pourriture du bois

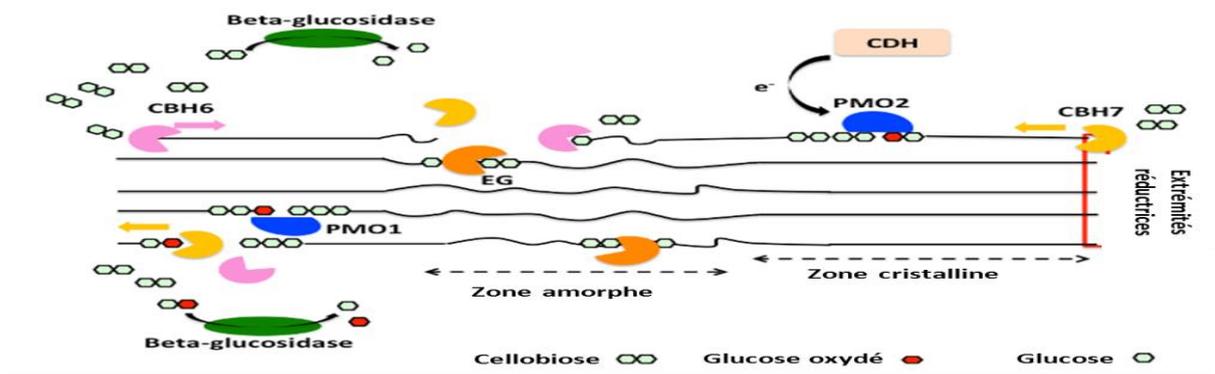
La paroi végétale des plantes est la source de biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol. Les principaux constituants des parois hydrolysés par les enzymes fongiques sont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Ces trois polymères forment un réseau très complexe qui constitue avec les pectines la paroi des cellules végétales.

Plusieurs espèces de champignons filamenteux (ascomycètes et basidiomycètes) possèdent les enzymes nécessaires à la dégradation de ces polymères (Eriksson et al, 1990). On distingue les champignons de la pourriture blanche du bois (*Ceriporiopsis subvermispora*, *Cyathus quercus*, *Dichomitus squalens* ...) qui dégradent aussi bien la lignine que la cellulose et l'hémicellulose (Keyser et al, 1978), les champignons de la pourriture brune (*Coniophora puteana*, *Fomitopsis pinicola*, *Laetiporus sulphurens* ...) , essentiellement des basidiomycètes, qui s'attaquent préférentiellement à la cellulose et à l'hémicellulose (Jin et al, 1990a).

Les champignons de la pourriture molle sont généralement des organismes cellulolytiques (ascomycètes et deutéromycètes) très peu spécialisés dans la dégradation du bois.

## 1.2 Dépolymérisation enzymatique de la lignocellulose

La dégradation de la lignine implique des peroxydases et des laccases ne montrant pas de spécificité de substrat et dégradant la lignine par génération de radicaux hydroxyles qui attaquent les liaisons carbone-carbone et les liaisons entre les unités de lignine. L'hydrolyse de la cellulose (Figure 2) est assurée par un complexe enzymatique formée par des endo-1,4- $\beta$ -glucanases (EC 3.2.1.4), des exo- $\beta$ -glucanases (EC 3.2.1.91) et des 1,4- $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21) (Deshpande et al, 1978). Quant à l'hémicellulose, elle dégradée par des endo-enzymes (xylanases, mannanases) qui produisent des chaînes plus courtes hydrolysées en sucres simples par des glycosidases (mannosidases, xylosidases, glucosidases) (Eriksson et al 1990).



**Figure 2** : Dégradation de la cellulose impliquant l'intervention des endoglucanases (EG) et des polysaccharides monoxygénases (PMO) qui hydrolysent à l'intérieur de la chaîne de cellulose pour libérer des fragments avec des extrémités réductrices. Ces fragments sont ensuite hydrolysés progressivement par les cellobiohydrolases (CBH) à partir des extrémités réductrices ou non réductrices pour libérer du cellobiose qui est hydrolysé par la  $\beta$ -glucosidase en glucose et par la cellobiose déshydrogénase (CDH) en cellobionolactone (Adaptée de Dimarogona et al, 2012)

Cependant plusieurs études ont montré que la dégradation oxydative de la cellulose et de la lignine représente une partie importante du processus de déstructuration des parois végétales par les champignons. L'enzyme la plus impliquée dans cette dégradation oxydative de la lignocellulose est la cellobiose déshydrogénase (CDH) qu'on trouve dans le génome de plusieurs champignons dégradant le bois.

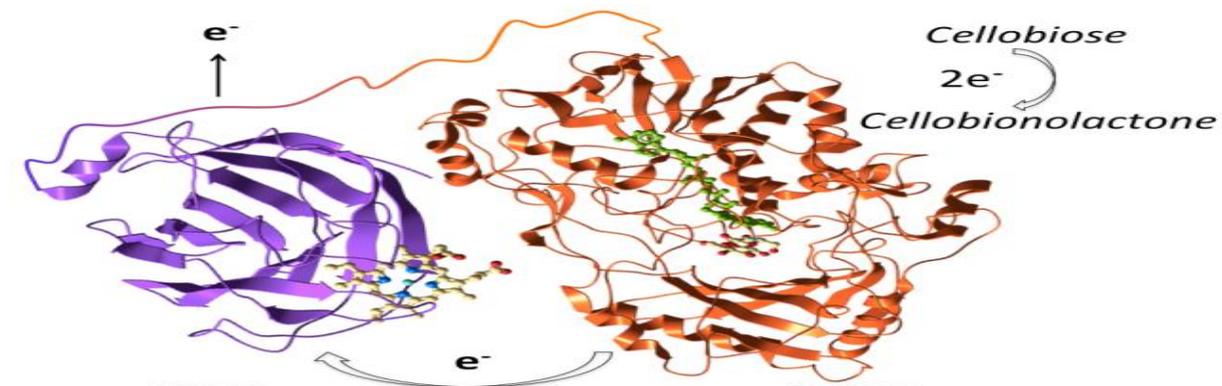
## 1.3 La cellobiose déshydrogénase

### 1.3.1 Structure de la CDH

La CDH a été décrite pour la première fois en 1974 chez les champignons de la pourriture blanche *Trametes versicolor* et *Phanerochaete chrysosporium* (Westermarck et Ericksson, 1974). C'est une hémoflavoenzyme dont le domaine flavoenzyme appartient à la famille des méthanol-choline oxydoréductases (Ludwig et al, 2010). Sa structure tertiaire présente une conformation du type cigar-shaped structure (Lehrner et al, 1996). C'est une protéine monomérique composée de deux groupements prosthétiques (Figure 3). En position C-terminale, se trouve le domaine flavinique qui contient un cofacteur flavine adénine dinucléotide (FAD) ou 6-hydroxy-FAD lié à l'apoprotéine de manière non covalente (Ludwig et al, 2010). En N-terminal se trouve le domaine hémique qui contient le groupement prosthétique de type hème b. La liaison entre le groupement prosthétique hémique et la protéine se fait via le cation ferreux de l'hème b et les résidus Méthionine 65 et Histidine 163 de la CDH (Hallberg et al, 2002). Ces deux parties sont séparées par une longue région «linker» riche en résidus thréonine et sérine même si la structure tertiaire de l'enzyme révèle un contact étroit entre les deux groupes prosthétiques ; ce qui permettrait de faciliter le transport direct d'électrons du FAD vers le fer de l'hème (Xia et al, 1987).

Il faut cependant noter que toutes les CDHs connues ne présentent pas les mêmes caractéristiques structurales mentionnées ci-dessus. Les CDHs de *Thielavia heterothallica* et de *Cenophora puteana* (Schmidhalter et

Canevascini, 1993) présentent une structure dimérique tandis que celle de *Heterobasidion annosum* révèle une conformation tétramérique (Hüttermann et Noelle, 1982).



**Figure 3 : Structure de la CDH. Représentation schématique de la structure de la CDH avec le domaine C-terminal (orange) contenant le cofacteur FAD et le domaine N-terminal contenant un hème de type b. Cette structure protéique a été visualisée avec le logiciel Molsoft. L'oxydation des oligosaccharides se fait sur le domaine flavinique puis les électrons sont transférés à l'hème (Dimarogona et al, 2012)**

La CDH catalyse le transfert d'électrons via ses deux centres d'oxydoréduction (le cellobiose est son substrat préféré) à deux types d'accepteurs d'électrons : des accepteurs de deux électrons comme les benzoquinones et les accepteurs d'un électron comme le fer, différentes espèces radicalaires et le cytochrome C (Zamocky et al, 2006). La réduction des accepteurs de deux électrons comme les quinones se fait directement par le cofacteur flavinique. Par contre pour les accepteurs à un électron, la réduction peut se faire directement par le cofacteur FAD ou via le sous-domaine héminique (Samajima et al, 1992). Dans ce dernier cas, l'oxydation du substrat est suivie par un transfert des électrons récupérés, du sous-domaine flavinique vers le sous-domaine héminique qui réduit l'accepteur d'un électron. Ce transfert d'électrons entre les deux sous-domaines de la CDH est possible parce-que ces deux groupements prosthétiques ont des potentiels oxydoréducteurs différents (Igarashi et al, 2002).

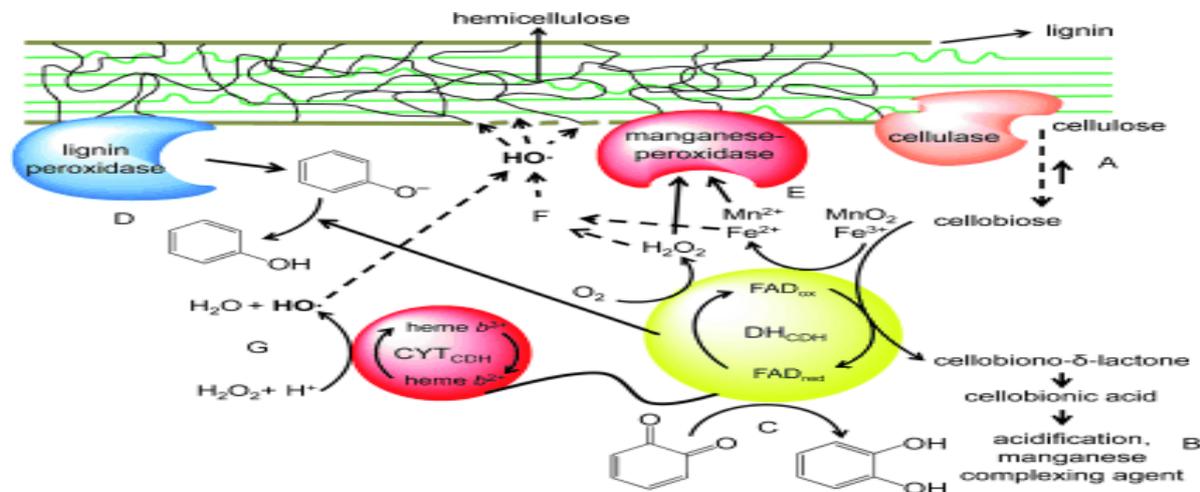
### 1.3.2 Fonction de la CDH

La fonction de la CDH dans le processus de dégradation de la lignocellulose n'est pas totalement élucidée. Plusieurs suggestions sont émises pour expliquer son rôle (Figure 4). Elle permet de diminuer l'inhibition des cellulases par le cellobiose en catalysant la transformation de ce dernier en cellobionolactone qui se décompose ensuite en acide cellobionique. D'après Westermarck et Eriksson (1974), l'enzyme serait également impliquée dans le mécanisme de défense contre les composés toxiques en réduisant les quinones. Elle serait aussi capable d'empêcher la polymérisation des zones amorphes de la cellulose en réduisant les radicaux phenoxy produits par l'action de la lignine peroxydase et de la laccase, et serait impliquée aussi dans le maintien de l'activité de la manganèse peroxydase via la chélation des Mn (III) par l'acide cellobionique (Ander et al, 1990).

Cependant, le rôle de la CDH le plus communément admis dans le processus de dégradation de la lignocellulose est sa capacité à produire des radicaux hydroxyles qui attaquent directement les polymères de lignine et de cellulose (Kremer et Wood, 1992). Il a été démontré que la CDH joue un rôle important dans la dégradation oxydative de la cellulose par un mécanisme coopératif faisant intervenir des enzymes de la famille des glycosyl hydrolases 61 (GH61) reclassées dans les familles des enzymes auxiliaires AA9 et AA11 (Levasseur et al, 2013).

L'évidence de la production des radicaux hydroxyles par la CDH a été fournie par Cameron et Aust (1999) et Mansfield et al, (1997) ont montré qu'en présence de peroxyde d'hydrogène et d'ions Fe(III), la CDH est capable de diminuer le degré de polymérisation de la lignocellulose et de réduire la viscosité de la carboxyméthylcellulose

(CMC). Ces résultats suggèrent le rôle important de la CDH dans l'attaque radicalaire des polymères de cellulose et de lignine. Ces radicaux hydroxyles sont générés via la réaction de Fenton qui met en jeu les ions Fe(II) et le peroxyde d'hydrogène.



**Figure 4** : Interactions suggérées pour la CDH dans la matrice lignocellulosique : conversion de la cellobiose en cellobionolactone (A), acidification et la solubilisation des ions métalliques (B), réduction des quinones toxiques (C), réduction des radicaux phénoxy produits par la lignine peroxydase ou la laccase (D), interaction avec la manganèse peroxydase (E), production de radicaux hydroxyles (OH°) par l'intermédiaire de la réaction de fenton (F) et à partir du peroxyde d'hydrogène (G) (Ludwig et al, 2010).

Après l'oxydation du cellobiose, la CDH transfère les électrons récupérés vers un accepteur d'électron qui, dans le contexte de dégradation de la lignocellulose, peut être l'oxygène qui est réduit en peroxyde d'hydrogène ou les complexes du fer(III), oxalate-Fe(III) par exemple, dans lesquels le Fe(III) est réduit en Fe(II). Ces deux réactions combinées créent les conditions de la réaction de Fenton.

Dans le travail exposé ici on s'est focalisé à comprendre le fonctionnement global de la cellobiose déshydrogénase, à déterminer l'importance de la composition du milieu et des concentrations de ces différents substrats dans sa capacité à produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Pour ce faire, on a utilisé la CDH de *Pycnoporus cinnabarinus* qui est champignon filamenteux basidiomycète de la pourriture blanche du bois. Cette CDH ne contient pas de module CBM appartient à la classe I. Elle a été clonée dans *Pichia Pastoris*, produite en fermenteur puis purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne nickel. Les paramètres cinétiques ont été déterminés en utilisant le cellobiose et le DCPIP comme donneur et accepteur d'électrons respectivement. La première étape de ce travail a consisté à mettre en place des protocoles de dosages rapides et précis du peroxyde d'hydrogène, des radicaux superoxydes et hydroxyles et des ions Fe(II). La deuxième partie a été consacrée à l'étude des conditions dans lesquelles la CDH produit toutes ces espèces réactives de l'oxygène, en particulier les radicaux hydroxyles, en fonction de la composition du milieu en molécules acceptrices d'électrons sachant que le donneur d'électron a été pour toutes les expériences réalisées le cellobiose. On a joué sur la présence ou l'absence des ions Fer, du peroxyde d'hydrogène et de l'enzyme pour répondre aux questions suivantes : quelle est l'importance de la CDH dans la réaction de Fenton? Quelle est l'effet de la concentration de la CDH, du Fer et du peroxyde d'hydrogène dans la production des radicaux hydroxyles? La CDH est-elle capable de produire des radicaux hydroxyles directement sans la présence des réactifs de Fenton ?

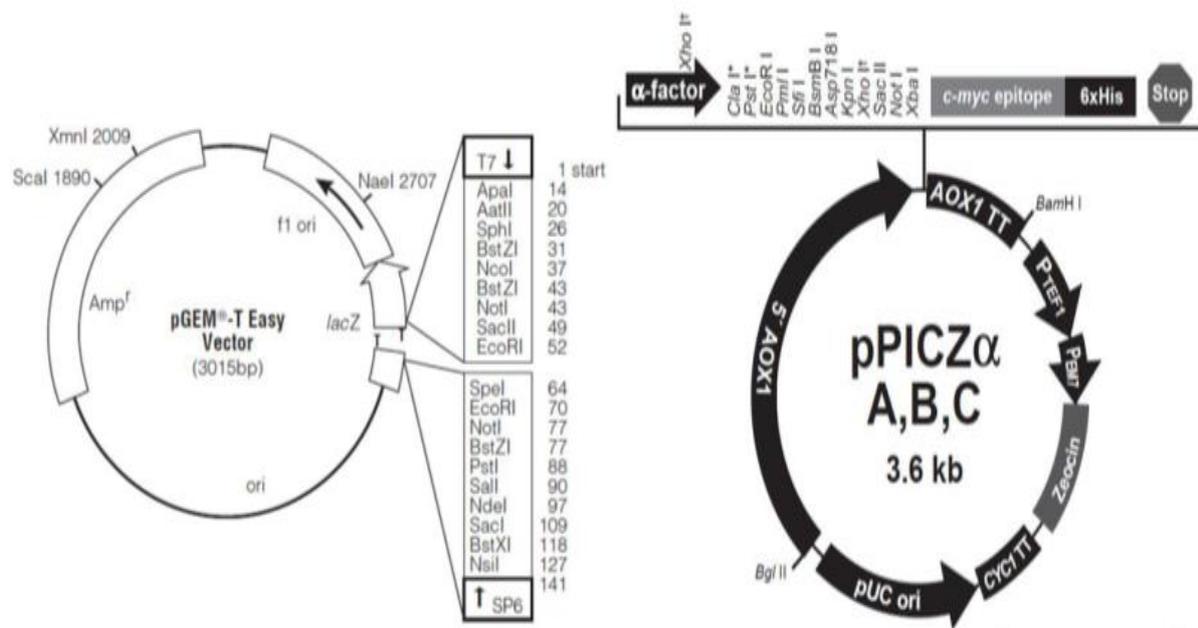
# **Matériels et méthodes**

## 2 MATERIELS ET METHODES

### 2.1 Production de la CDH recombinante

#### 2.1.1 Origine de la CDH recombinante

Des travaux antérieurs effectués dans le cadre d'une thèse soutenue en décembre 2012 au sein du laboratoire d'accueil avaient, entre autres objectifs, de déterminer l'impact que la CDH pouvait avoir sur la dégradation de la lignocellulose en complément du cocktail standard de *T. reesei* utilisé en biotechnologie. Pour ce faire, le champignon *P. cinnabarinus* a été cultivé en conditions cellulolytiques (la cellulose est la seule source de carbone) et son transcriptome, après quatre jours, a été extrait et purifié grâce au kit Total RNA Purification from Plant (Macherey-Nagel, Düren, Germany). L'activité de la CDH, mesurée au bout du même temps, était de 0,53 unités par mg de protéines totales. La synthèse d'ADN simple brin a été effectuée en utilisant une reverse transcriptase Superscript (Invitrogen) et des oligo (dT18). L'ADNc de la CDH a été amplifié à l'aide d'amorces spécifiques dessinées à partir de la séquence du gène *cdh* de *P. cinnabarinus* I-937 (NCBI id : AF081574). Cette ADNc a ensuite été sous-cloné dans le vecteur pGEM-T Easy dans *E. coli* TOP 10 puis inséré dans le vecteur pPICZαA entre la séquence codant pour le facteur de sécrétion ( $\alpha$ -factor de *S. cerevisiae*) et une séquence codant à une étiquette poly-(His)<sub>6</sub> (carte du vecteur Figure 5). Le vecteur pPICZαA a ensuite été transformé dans des cellules compétentes de la levure *Pichia pastoris*.



**Figure 5 :** Cartes des vecteurs utilisés pour les expressions hétérologues de la CDH de *P. cinnabarinus*. A gauche, la 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. Cette version ne contient pas les sites de restriction pour Cla I (version C) et Pst I (version B)

Pour ces travaux, on a utilisé cette même souche de *P. pastoris* dans laquelle est déjà cloné le gène *cdh* pour produire l'enzyme en quantité suffisamment importante et mener à bien le reste du projet. La culture a été réalisée dans un fermenteur 1L et on a utilisé le méthanol pour induire la biosynthèse de la CDH. La présence de l'étiquette histidine a permis d'envisager une purification par chromatographie d'affinité. Les paramètres cinétiques de l'enzyme ont ensuite été déterminés par spectrométrie d'absorbance

#### 2.1.2 Expression hétérologue de la CDH

La culture des cellules transformées de *P. pastoris* contenant le vecteur pPICZαA a été réalisée en deux étapes.

- ➔ Une pré-culture de 100 mL a d'abord été lancée sous agitation à 130 rpm, dans un milieu BMGY (*Buffered complex medium containing glycerol*). Cette pré-culture a été arrêtée au bout de 60 h quand la D.O à 600 nm atteignait 1.
- ➔ La pré-culture a ensuite été utilisée pour ensemercer le fermenteur qui contenait 900 mL d'un milieu de culture composé de 40 g/L de glycérol, 26,7 ml/L de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%), 14,9 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,93 g/L de CaCl<sub>2</sub>, 7,7 g/L de KCl, 4,13 g/L de KOH et 4,35 ml/L de solution saline PTM1 (*Pichia trace metals* 1). Après 24h de culture, une pré-induction a été réalisée en ajoutant dans le milieu 5 mL de méthanol 5%. Cette phase a duré environ 5 h, temps estimé suffisant pour l'adaptation du métabolisme des microorganismes. L'induction a ensuite été réalisée en injectant, avec un débit constant de 5 mL/L de culture et pendant 72 h, une solution de méthanol 5% contenant 12 mL/L de solution saline de PTM1. La température a été maintenue pendant toute la durée de la culture à 30°C et le débit d'oxygène a été gardé stable à 0.3 vvm (volume de gaz par volume de culture et par minute). Le pH du milieu de culture a été constamment ajusté à 5 pour permettre un développement optimal des microorganismes.

### 2.1.3 Purification de la CDH

A la fin de la production, le milieu de culture a été récupéré, ultra-centrifugé et filtré pour éliminer le maximum de cellule de *P. pastoris*. Pour récupérer la protéine, un système FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) a été utilisé. Il est connecté à un logiciel Akta (GE Healthcare) et équipé d'une colonne de séparation nickel (0.7 × 5 cm) composée d'une résine chélatant les résidus histidine (GE Healthcare, Buc, France). Dans ce système, un tampon A constitué de Tris-HCl 50 mM pH 7,8, de NaCl 150 mM et d'imidazole 10 mM est utilisé dans un premier temps pour dialyser l'échantillon qui passe ensuite dans la colonne nickel où les protéines sont retenues grâce à l'étiquette histidine incorporée. L'élution se fait avec un tampon B constitué de Tris-HCl 50 mM pH 7,7, d'imidazole 500 mM et de NaCl 150 mM. La fraction qui contenait la CDH, facilement repérable par sa couleur rouge due à la présence du fer de l'hème. dans l'enzyme, a été récupérée, dialysée contre un tampon acétate de sodium pH 4,8 pour éliminer l'imidazole des tampons A et B avant d'être analysée pour déterminer la concentration en protéines par un dosage de Bradford classique et les paramètres cinétiques par spectrométrie.

### 2.1.4 Détermination des paramètres cinétiques de la CDH

Pour déterminer le K<sub>m</sub> et la V<sub>max</sub> de la rCDH, des tests cinétiques ont été réalisés, basés sur une méthode spectrophotométrique. Le principe de ce dosage est de suivre la diminution de l'absorbance du dichlorophénol-indo-phénol (DCPIP) lorsque sa réduction est couplée à l'oxydation du cellobiose. Dans ce cas, la concentration du DCPIP a été fixée à 0.2 mM et les concentrations de cellobiose variaient de 50 à 500 μM. Les paramètres cinétiques k<sub>m</sub>, V<sub>max</sub>, K<sub>cat</sub> et l'activité spécifique de la fraction protéique obtenue ont été déterminés graphiquement à l'aide de la représentation de Hanes-woolf. La concentration en protéine a été au préalable déterminée par un dosage de Bradford au 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 (BSA) comme standard (Bradford, 1976).

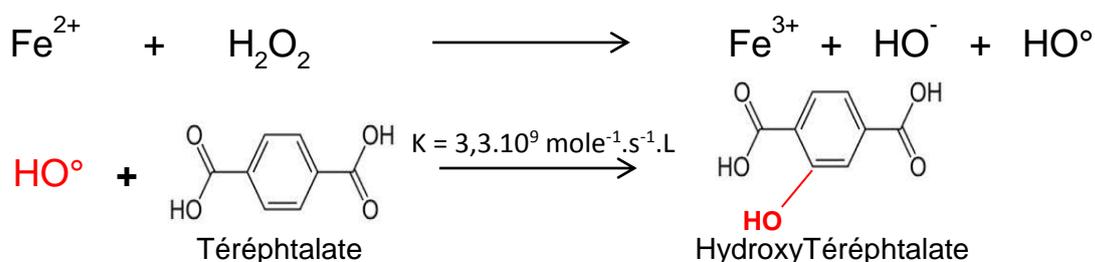
Pour atteindre les objectifs fixés, des méthodes de dosage rapides et efficaces ont été mises au point afin de suivre qualitativement et quantitativement, en fonction des expériences :

- ➔ les radicaux hydroxyles grâce au téréphtalate par fluorescence, les radicaux superoxydes avec le Nitrobleu tétrazolium (NBT) par absorbance.
- ➔ le peroxyde d'hydrogène en utilisant comme sonde l'ampex red.
- ➔ Les ions Fe<sup>2+</sup> formés de la réduction du Fe<sup>3+</sup> en présence de CDH sont dosés avec la phénanthroline.

## 2.2 Dosage des espèces réactives de l'oxygène et des ions ferreux

### 2.2.1 Dosage des radicaux hydroxyles (HO°)

Pour suivre les cinétiques de génération de radicaux hydroxyles lors des différents tests réalisés, le téréphtalate a été utilisé. Les radicaux hydroxyles formés oxydent le téréphtalate qui se transforme en hydroxytéréphtalate. Ce dernier composé fluoresce à 400 nm lorsqu'il est excité à 320 nm (**Figure 6**). La constante de vitesse de la réaction entre le téréphtalate et les radicaux hydroxyles est de  $3,3 \cdot 10^9 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}$ . Ce qui permet de capter très rapidement les radicaux HO°. (Philippe Gatelier, com personnelle).

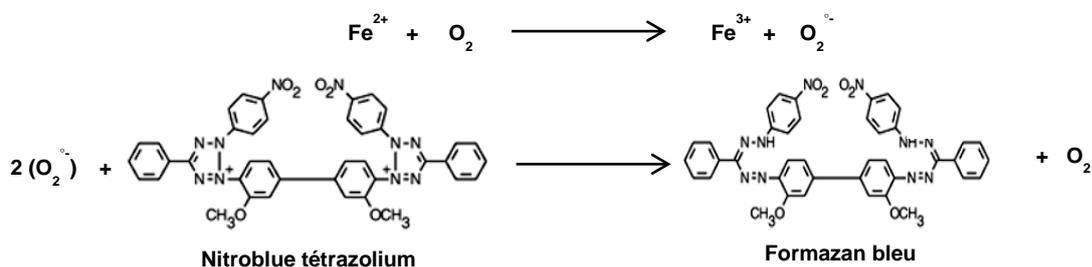


**Figure 6 : Dosage des radicaux hydroxyles générés lors de la réaction de Fenton par le téréphtalate**

Toutes les expériences ont été réalisées à 30°C dans des plaques 96 puits noirs en utilisant une solution mix stock constituée de cellobiose 5 mM, de téréphtalate 0.3 mM dans du tampon acétate de sodium pH 3 ou 4,8 à 100 mM. Les autres réactifs, fer, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et CDH sont ajoutés séparément dans les puits en fonction des concentrations souhaitées et pour un volume final de 200 µL. Le Spectrofluorimètre Tecan infinite 200 PRO (Tecan Group Ltd, Männedorf, Suisse) permet d'effectuer les mesures de fluorescence pendant deux heures à des intervalles de temps réguliers et avec un gain d'amplification du signal fixé à 95. Une gamme étalon d'hydroxytéréphtalate permet de calculer la vitesse de production et la concentration en radicaux hydroxyles à la fin de chaque expérience.

### 2.2.2 Dosage des radicaux superoxydes (O<sub>2</sub>°)

L'oxydation du NBT par les radicaux superoxydes entraîne la formation de formazan de couleur bleu qui absorbe à 530 nm (**Figure 7**). Les cinétiques sont réalisées dans des plaques 96 puits transparents à 30° C dans un tampon acétate de sodium à pH 4,8.

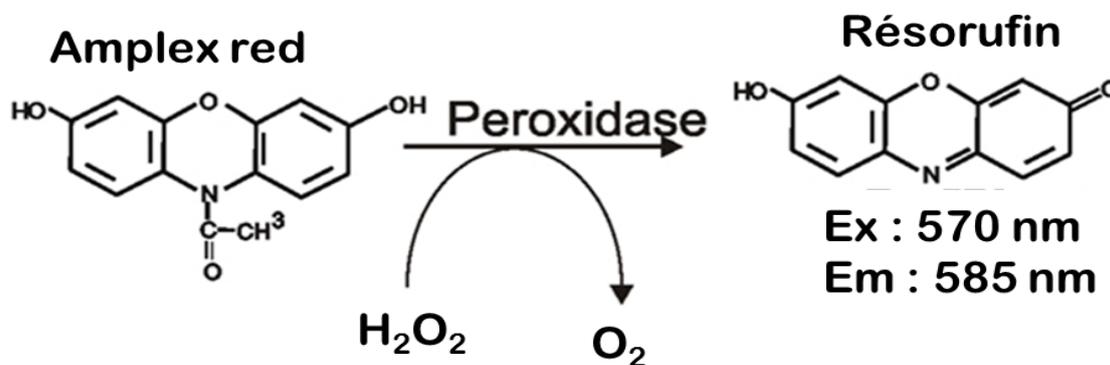


**Figure 7 : dosage des radicaux superoxydes en utilisant le NBT. Les radicaux formés lors de l'oxydation de Fe<sup>2+</sup> sont captés par le NBT qui se transforme en formazan bleu.**

### 2.2.3 Dosage du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Le peroxyde d'hydrogène est capable d'oxyder l'amplex red en présence de peroxidase de Raiford (Horseradish peroxidase, HRP) qui catalyse la réaction. Il se forme la résorufin qui est fluorescente quand elle est excitée à 560 nm. L'émission est suivie à 595 nm (Zhou et al, 1997) (**Figure 8**). Les expériences ont été réalisées dans des plaques 96 puits noirs pour des volumes finaux de 100 µL. Pour toutes les cinétiques réalisées, une solution

mix stock composée de cellobiose à 0.5 mM, d'amplex red à 0.05 mM et de HRP à 7,1 U/mL dans du tampon acétate de sodium pH 4,8 à 30 mM a été utilisée. La CDH est rajoutée séparément de sorte à obtenir la quantité souhaitée pour chaque condition. Les mesures ont été faites avec le même appareil que pour le dosage des radicaux hydroxyles et avec un gain d'amplification de 75. Les cinétiques duraient 40 min et les lectures de fluorescence étaient faites toutes les minutes et, à chaque fois, précédées d'une agitation de 57 rpm pendant 10 s. Une gamme étalon de peroxyde d'hydrogène a été réalisée afin de calculer les vitesses de production et les concentrations finales.



**Figure 8 : Dosage du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'amplex red**

### **2.2.4 Réduction des ions Fe<sup>3+</sup> par la CDH**

Pour suivre la capacité de réduction des ions Fe<sup>3+</sup> par la CDH, un protocole de dosage utilisant la phénanthroline pour capter les ions Fe<sup>2+</sup> et former un complexe rouge suivi par absorbance à 560 nm a été mis en place. Les expériences sont réalisées dans des plaques 96 puits transparents pour des volumes finaux de 200 µL. Toutes les expériences ont été réalisées à 30°C dans du tampon acétate de sodium 100 mM à pH 3 en présence de phénanthroline 275 µM, de cellobiose 500 µM et de Fluorure de sodium (NaF) à 2 mM. La CDH et le Chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>) sont ajoutés dans les milieux réactionnels en fonction des concentrations souhaitées. Une quantité de NaF environ 20 fois supérieure à celle du FeCl<sub>3</sub> est nécessaire pour chélater tous les ions Fe<sup>3+</sup> et empêcher la formation de complexes Fe<sup>3+</sup>-phénanthroline. Ces complexes se décomposent en Fe<sup>2+</sup>-phénanthroline plus stables dont l'absorbance entraîne un biais dans la mesure (Tamura et al, 1974). Une grande quantité de NaF ne gêne pas le dosage. Une gamme étalon de sulfate de fer en présence de Phénanthroline, de NaF et de FeCl<sub>3</sub> a été réalisée dans les mêmes conditions afin de déterminer des vitesses et des concentrations finales en ions Fe<sup>2+</sup>. Toutes les solutions utilisées pour cette partie sont dégazées pour éviter la compétition entre les ions Fe<sup>3+</sup> et l'oxygène pour la récupération des électrons du cofacteur FAD réduit de la CDH.

### **2.2.5 Réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène par la CDH**

Des cinétiques de production de radicaux hydroxyles ont été réalisées en présence de CDH et de cellobiose pour des quantités différentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les expériences ont été menées dans un tampon à pH 3 à 30°C avec des solutions dégazées. Les paramètres cinétiques ont été déterminés graphiquement à l'aide d'une représentation de Lineweaver-Burk des vitesses initiales des cinétiques déterminées à l'aide de la gamme étalon d'hydroxytéréphtalate (Voir Dosage des radicaux hydroxyles).

### **2.3 Plan d'expérience de Box Behnken**

Un plan d'expérience a été réalisé sur le modèle Box-Behnken (Box et Behnken, 1960) afin de déterminer l'impact des trois facteurs qui étaient les concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de Fe<sup>2+</sup> et de CDH sur la vitesse et le niveau de production de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton. Chaque facteur était représenté par trois niveaux : la concentration limite supérieure (+1), la concentration extrême minimum (-1) et la concentration moyennes entre les deux ou point central (0) (Tableau 1). Pour ce modèle, le nombre d'expériences à réaliser est calculé

selon la formule suivante :  $2k(k-1) + C_0$  ou  $k$  représente le nombre de facteurs et  $C_0$  le nombre de points centraux. De ce fait 15 cinétiques différentes ont été réalisées en duplicat et les vitesses et niveaux de productions de radicaux  $HO^\circ$  ont été analysées statistiquement grâce au logiciel Disgn expert. Les expériences ont été menées à 30°C dans du tampon acétate à ph 3 et avec des concentrations de cellobiose et de téréphthalate respectivement de 5 mM et 0,3 mM.

**Tableau 1** : Récapitulatifs des niveaux choisis pour chaque facteur du plan d'expérience.

N° essai	Coordonnées des points expérimentaux $X_1 ; X_2 ; X_3$			$X_1 : Fe^{2+} (\mu M)$	$X_2 : CDH (\mu M)$	$X_3 : H_2O_2 (\mu M)$
1	0	0	0	50	1	600
2	0	0	0	50	1	600
3	0	0	0	50	0	600
4	-1	-1	0	0	0	600
5	1	-1	0	100	0	600
6	-1	1	0	0	2	600
7	1	1	0	100	2	600
8	-1	0	-1	0	1	200
9	1	0	-1	100	1	200
10	-1	0	1	0	1	1000
11	1	0	1	100	1	1000
12	0	-1	-1	50	0	200
13	0	1	-1	50	2	200
14	0	-1	1	50	0	1000
15	0	1	1	50	2	1000

# **Résultats et discussion**

### 3 RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Purification détermination des paramètres cinétiques

##### 3.1.1 Paramètres physico-chimiques

La CDH recombinante de *P. cinnabarinus* a déjà été caractérisée lors d'une étude précédente (Bey et al, 2011). C'est une protéine monomérique et glycosylée dont le profil SDS-page révèle avant et après déglycosylation des fragments de tailles estimées respectivement à 110 et 100 KDa avec une étiquette polyhistidine révélée par western blot. Les tests de stabilité lors de cette étude ont montré que le pH optimal de la protéine est d'environ 4,8 et que sa température optimale se situe autour de 60°C (Bey et al, 2011).

##### 3.1.2 Constantes cinétiques

Après culture, production de la CDH en fermenteur, récupération du surnageant de culture, purification par FPLC et dialyse dans un tampon acétate de sodium à pH 4,8, l'activité spécifique de la protéine et ces paramètres cinétiques ont été déterminés pour le cellobiose qui est le seul substrat donneur d'électrons utilisé lors de ces travaux et avec le DCPIP comme accepteur d'électrons. La concentration de la CDH dans la fraction purifiée, déterminée par la méthode de Bradford, était de 892 µg.mL<sup>-1</sup>, ce qui correspond à 8 µmoles de CDH par litre de solution purifiée. Elle présente une activité spécifique de 163 U.mg<sup>-1</sup> (soit environ 145.000 U/L) pour le cellobiose, un Km de 40 µM, une Vmax de 6,54 mole.min<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> et une Kcat de 13,6 s<sup>-1</sup> (Tableau 4).

**Tableau 4** : quelques constantes cinétiques des CDH de différents organismes pour le cellobiose. La ligne coloriée en bleu représente les valeurs pour la CDH purifiée.

Organismes	Accepteurs d'électrons	Km (µM)	Kcat (s <sup>-1</sup> )	pH	Références
<i>P. Cinnabarinus</i>	DCPIP	40,57	13,6	4,8	
<i>T. versicolor</i>	DCPIP	120	6,1	4,5	Roy et al, 1996
<i>S. Rolfzii</i>	DCPIP	120	27	4,0	Baminger et al, 2001
<i>S. Thermophile</i>	DCPIP	3,4	6,1	4,5	Subramaniam et al, 1999
<i>H. Isolensis</i>	DCPIP	11	14	7,5	Schou et al, 1998

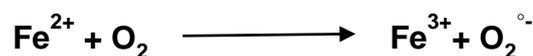
La production de la CDH clonée dans *P. pastoris* fournit un rendement de production satisfaisant après 5 jours de culture en fermenteur avec une activité spécifique vis-à-vis du cellobiose importante. *P. pastoris* a tendance à hyperglycosyler. Par exemple la protéine native à une masse d'environ 90 KDa, la recombinante est à 110 KDa, 20% en plus. Mais cette hyperglycosylation ne gêne pas l'activité de l'enzyme qui a des paramètres cinétiques très proches de la protéine native. Elle a un Kcat pour le cellobiose intéressant comparé aux CDHs de *T. versicolor* et *S. thermophile* même si le km de ce dernier est environ 13 fois plus faible.

Après la caractérisation complète de la CDH, l'étude a porté sur son rôle dans la production de radicaux superoxydes à partir des ions Fe<sup>2+</sup> et sur la génération de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton.

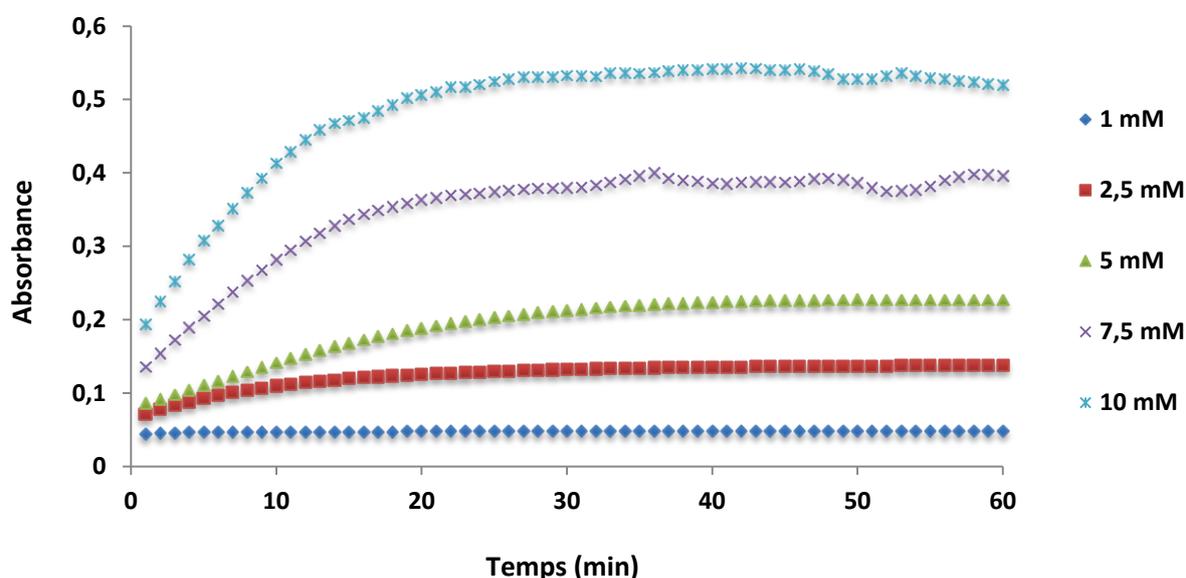
## 3.2 Production d'espèces réactives de l'oxygène

### 3.2.1 Production de radicaux superoxydes

L'effet de la CDH sur la capacité de production de radicaux superoxydes a été étudié par rapport à la réaction d'oxydation des ions  $\text{Fe}^{2+}$  en présence d'oxygène moléculaire (Figure 9). Plusieurs cinétiques ont été réalisées en utilisant le NBT comme capteurs des radicaux avec différentes concentrations de  $\text{FeSO}_4$ . On a joué sur la présence ou pas du couple CDH/cellobiose pour mieux voir l'effet éventuel qu'aurait l'enzyme sur le niveau et/ou la rapidité d'apparition des radicaux  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .



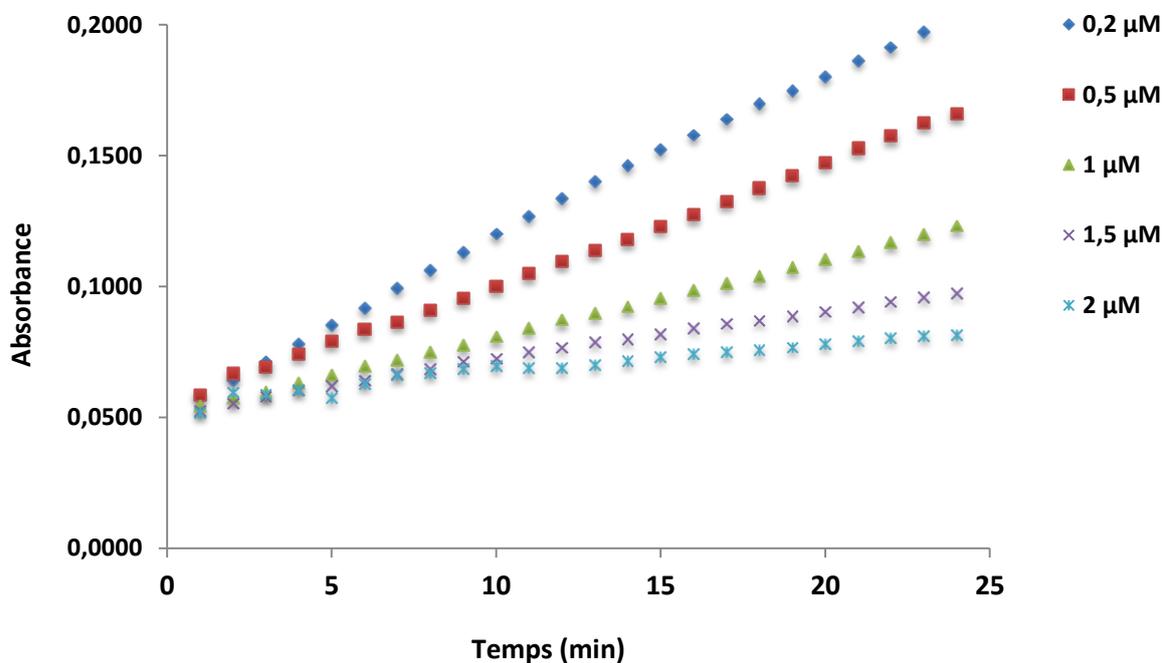
**Figure 9** : Réaction d'oxydation des ions  $\text{Fe}^{2+}$  par l'oxygène moléculaire.



**Figure 10** : Production des radicaux hydroxyles pour différentes concentrations de  $\text{FeSO}_4$  en absence de CDH. Les cinétiques ont été réalisées dans du tampon acétate à pH 4,8 et à 30°C pour plusieurs concentrations initiales en ions  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{FeSO}_4$ ).

Les niveaux de production des radicaux hydroxyles ainsi que leurs vitesses de formation sont directement proportionnels à la concentration des ions  $\text{Fe}^{2+}$  dans le milieu (Figure 10). La concentration en oxygène étant fixée à saturation par rapport à l'air à 30°C en milieu aqueux (0,23 mM). On observe d'abord une apparition des radicaux  $\text{O}_2^{\cdot-}$  très rapide qui est suivie d'une deuxième phase pendant laquelle le niveau de production des radicaux n'évolue pas. L'arrêt de la production de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  est probablement dû à la consommation d'une quantité importante des deux réactifs dans le milieu, notamment la concentration en  $\text{Fe}^{2+}$ , ce qui conduit à une diminution de la production de radicaux. De ces résultats, on peut déduire que le NBT est une sonde efficace pour le suivi de la production des radicaux hydroxyles au cours du temps. Cependant, ces expériences ne nous permettent pas de conclure de manière satisfaisante sur l'effet de la CDH dans la réaction d'oxydation des ions  $\text{Fe}^{2+}$  par l'oxygène. En effet, en présence de NBT, de cellobiose et de CDH comme seuls réactifs dans le milieu, l'absorbance de la sonde évolue très rapidement (Données non présentées). Ce qui prouve que l'enzyme est capable de réduire la sonde directement avec les électrons issus de l'oxydation du cellobiose. Ceci rend impossible l'établissement d'une cinétique de production de radicaux superoxydes en présence de CDH. Cependant, il est intéressant de noter l'effet de la présence des ions  $\text{Fe}^{2+}$  sur ce transfert d'électrons entre la CDH et le NBT. Plus la concentration en ions  $\text{Fe}^{2+}$  est importante, moins le transfert électronique est rapide

(Figure 11). Ce résultat suggère qu'il y a un effet inhibiteur des ions  $Fe^{2+}$  vis-à-vis du transfert d'électrons entre l'enzyme et le NBT. Cet effet est probablement dû à une compétition entre les ions  $Fe^{3+}$  produits de l'oxydation du  $Fe^{2+}$  et le NBT. Plusieurs études ont montré que les ions  $Fe^{3+}$  sont des très bons accepteurs d'électrons pour la CDH (Hyde et Wood, 1997 ; Henricksson et al 2000).



**Figure 11** : Evolution de l'absorbance du NBT en présence de CDH à 0.446 µg/mL et de cellobiose à 5 mM pour différentes concentrations de  $FeCl_3$ . Les cinétiques ont été réalisées dans du tampon acétate à pH 3 et à 30°C.

Pour valider cette hypothèse, l'effet de la présence du couple CDH/cellobiose sur la production de radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton qui met en jeu le peroxyde d'hydrogène et les ions  $Fe^{2+}$  a été évalué. Une réduction des ions  $Fe^{3+}$  en présence de CDH devrait avoir un effet accélérateur de la génération des  $OH^\circ$ .

### 3.3 Production de radicaux hydroxyles

Dans le processus de dégradation de la lignocellulose, la CDH est impliquée à plusieurs niveaux, la réduction des quinones et des radicaux phénoxy produits de l'activité des laccases, l'oxydation du cellobiose pour empêcher l'inhibition des cellulases et surtout, la fonction la plus communément admise, la production de radicaux hydroxyles qui attaquent aléatoirement les polymères du bois. Ces radicaux sont produits via la réaction de Fenton qui met en jeu les ions  $Fe^{2+}$  et le peroxyde d'hydrogène qui sont tous les deux directement produits de son activité respectivement par la réduction des ions  $Fe^{3+}$  et de l'oxygène. En milieu aqueux, à pH acide dilué et en absence de substrat à oxyder, le peroxyde d'hydrogène, les ions  $Fe^{2+}$  et les radicaux  $OH^\circ$  formés sont impliqués dans une série de réaction radicalaires complexes dont les principales se produisant dans ces conditions sont décrites dans le tableau 2.

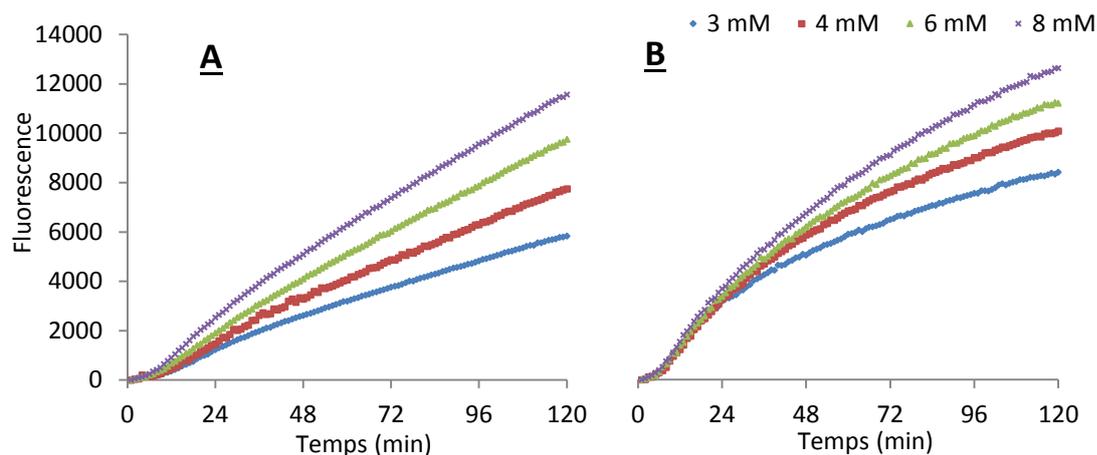
De ce fait, il est intéressant d'étudier l'implication de la CDH sur la cinétique de la réaction de Fenton. Pour ce faire, deux conditions dans lesquelles l'un ou l'autre des substrats, fer et  $H_2O_2$ , est présent en excès dans le milieu réactionnel ont été testées.

**Tableau 2 : Récapitulatifs des principales réactions radicalaires qui se produisent en milieu aqueux et à pH acide dilué.**

N°	Equation	Constante de vitesse	pH	Références
	<b>Réactifs</b>	<b>Produits</b>	<b>(mole<sup>1</sup>.L.s<sup>-1</sup>)</b>	
F1	Fe <sup>2+</sup> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fe <sup>3+</sup> + HO <sup>-</sup> + HO <sup>°</sup>	55-76	Nd De laet et al, 2004
F2	Fe <sup>3+</sup> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fe <sup>2+</sup> + HO <sub>2</sub> <sup>°</sup> + H <sup>+</sup>	0.01	Nd Walling et Goosen, 1973
F3	HO <sub>2</sub> <sup>°</sup>	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup>	1,58.10 <sup>5</sup>	Nd Bielski et al, 1985
F4	Fe <sup>2+</sup> + O <sub>2</sub> <sup>-</sup> + 2H <sup>+</sup>	Fe <sup>3+</sup> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.10 <sup>7</sup>	Nd Rush et Bielski, 1985
F5	Fe <sup>2+</sup> + HO <sup>°</sup>	Fe <sup>3+</sup> + HO <sup>-</sup>	4,3.10 <sup>8</sup>	3 Buxton et al, 1988
F6	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + HO <sup>°</sup>	HO <sub>2</sub> <sup>°</sup> + H <sub>2</sub> O	(2 – 3,8).10 <sup>7</sup>	7-11 Buxton et al, 1988
F7	Fe <sup>2+</sup> + HO <sub>2</sub> <sup>°</sup> + H <sup>+</sup>	Fe <sup>3+</sup> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,2.10 <sup>6</sup>	1 Bielski et al, 1985
F8	Fe <sup>3+</sup> + HO <sub>2</sub> <sup>°</sup>	Fe <sup>2+</sup> + H <sup>+</sup> + O <sub>2</sub>	3,6.10 <sup>5</sup>	2,7 Bielski et al, 1985
F9	HO <sup>°</sup> + HO <sup>°</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5,3.10 <sup>9</sup>	Nd Walling, 1975

### 3.3.1 Excès de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par rapport au Fe<sup>2+</sup>

Les cinétiques de production de radicaux OH<sup>°</sup> sont suivies grâce au téréphtalate. Pour cette condition, la concentration de Fe<sup>2+</sup> (FeSO<sub>4</sub>) était fixée à 3 mM et celle de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variait de sorte à se retrouver avec des rapports de concentrations (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>) qui allaient de 1 à 3,33. Les cinétiques ont été réalisées en présence et en absence du couple cellobiose/CDH pour bien évaluer l'effet de l'enzyme.

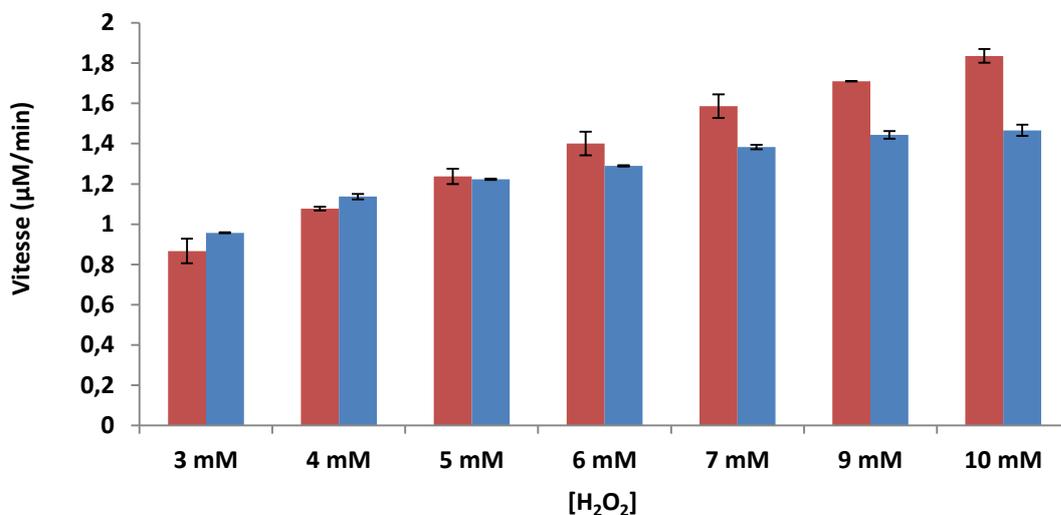


**Figure 12 :** Cinétique de production de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton en fonction de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et en présence (A) et absence (B) du couple CDH/Cellobiose. Les cinétiques ont été réalisées dans du tampon acétate à pH 4,8 avec une concentration fixe de Fe<sup>2+</sup> égale à 3 mM. La concentration de la CDH était de 0.446 µg/mL, le cellobiose était à 5 mM et le téréphtalate dans les deux cas à 0.3 mM.

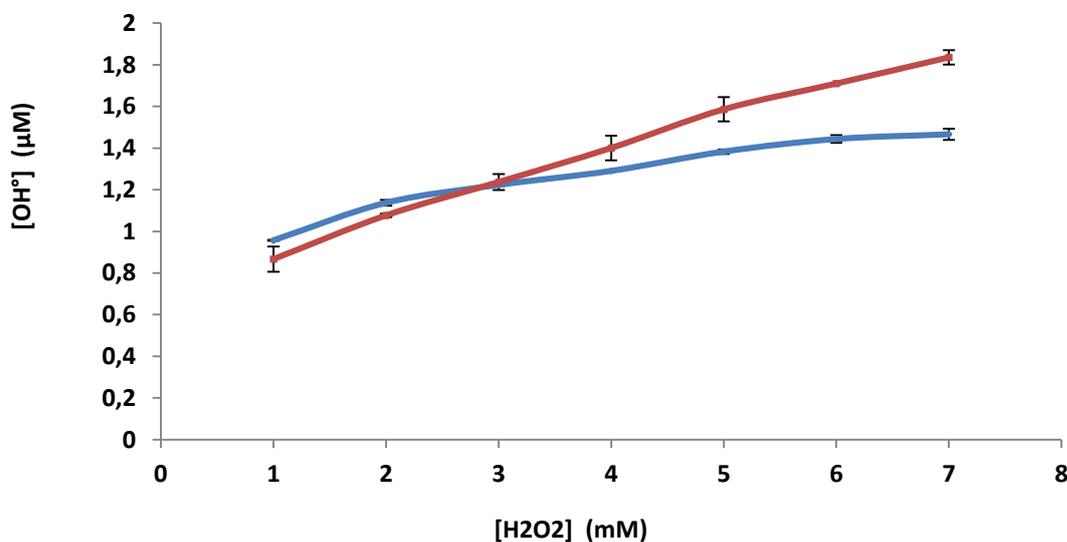
On constate que la cinétique de la réaction est composée de deux étapes (Figure 12 A et B). Au début, la vitesse de production des radicaux hydroxyles est relativement importante puis elle diminue au cours du temps. La présence du couple CDH/cellobiose ne change pas la cinétique. On remarque aussi que la vitesse initiale de la réaction, en absence de CDH, augmente quand le rapport H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> augmente. En revanche, en présence de l'enzyme, celle-ci semble légèrement plus élevée et ceci indépendamment de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 13).

Il est intéressant également de retenir que le niveau de production des radicaux hydroxyles est plus élevé en présence de l'enzyme (Figure 14). Les concentrations en OH<sup>°</sup> calculées pour chaque cinétique en présence et

en absence de CDH montrent que plus la concentration de  $H_2O_2$  est grande par rapport au  $Fe^{2+}$ , plus la production finale en radicaux est importante en présence de l'enzyme.



**Figure 13** : vitesses initiales de génération des radicaux hydroxyles et fonction de la concentration de  $H_2O_2$  et en présence (rouge) ou absence (bleu) de CDH. Les cinétiques ont été réalisées dans du tampon acétate pH 4,8 avec une concentration fixe de  $Fe^{2+}$  de 3 mM. La CDH est à 0.446  $\mu\text{g/mL}$ , le cellobiose à 5 mM et le téréphthalate dans les deux cas à 0.3 mM. Les vitesses ont été calculées entre 10 et 20 minutes après le début de la réaction. Les tests ont été réalisés en triplicat.



**Figure 14** : Production totale de radicaux  $OH^\bullet$  au bout de 2h de cinétique en présence (rouge) et en absence (bleu) de CDH. Les cinétiques ont été réalisées dans du tampon acétate pH 4,8 avec une concentration fixe de  $Fe^{2+}$  de 3 mM. La CDH est à 0.446  $\mu\text{g/mL}$ , le cellobiose à 5 mM et le téréphthalate dans les deux cas à 0.3 mM. Les tests ont été réalisés en triplicat.

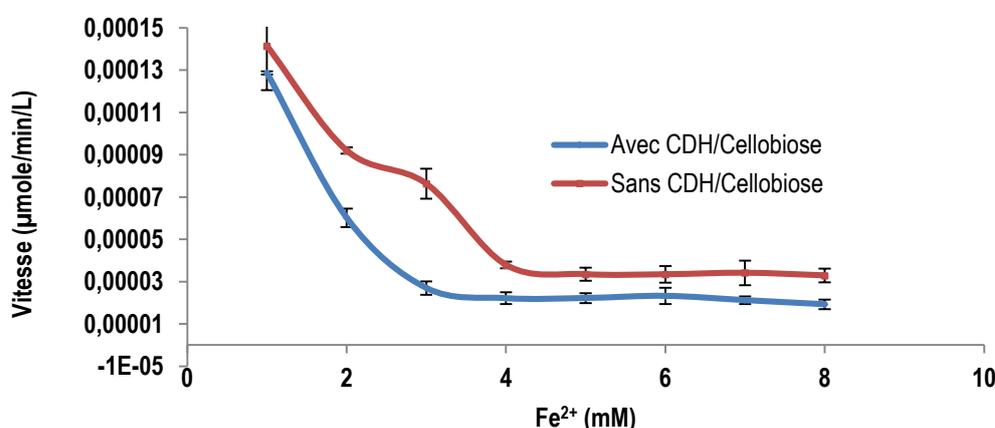
Dans le cas d'une faible quantité de fer par rapport au peroxyde d'hydrogène, ce dernier est consommé de deux façons. Au début de la réaction, on a une production de radicaux hydroxyles relativement importante via la réaction de Fenton ( $Fe^{2+}/H_2O_2$ ) qui a une constante de vitesse de 55  $\text{mole}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ . Dans ce cas, les ions  $Fe^{2+}$  sont rapidement oxydés en  $Fe^{3+}$  qui à son tour réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour redonner du  $Fe^{2+}$  mais avec

une constante vitesse très faible, égale à  $0.01 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ . C'est ce qui explique que la production des radicaux hydroxyles diminue au cours du temps. L'augmentation du niveau de production en présence de CDH, dans ces conditions, pourrait s'expliquer de deux manières différentes :

- ➔ la première est que la réduction des ions ferriques serait beaucoup plus rapide due à l'action de l'enzyme. Ce qui favoriserait le maintien d'un niveau de  $\text{Fe}^{2+}$  plus important et par conséquent une production de radicaux  $\text{OH}^\circ$  plus importante par la réaction entre  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  (F1).
- ➔ D'autre part, il est connu que l'enzyme est capable de réduire l'oxygène en peroxyde d'hydrogène (Nutt et al, 1997). Ce qui permettrait d'augmenter la concentration en peroxyde et de ce fait la production de radicaux hydroxyles serait plus importante parce qu'une augmentation de la concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  est corrélée avec une augmentation de la vitesse initiale (Figure 13) et de la production globale de  $\text{HO}^\circ$  (Figure 14).

### 3.3.2 Excès de $\text{Fe}^{2+}$ par rapport au $\text{H}_2\text{O}_2$

Le même protocole expérimental que précédemment a été utilisé en fixant la concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et en faisant varier celle du  $\text{Fe}^{2+}$  de sorte à être dans les mêmes proportions: le rapport de concentrations  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  varie entre 1 et 3,33.



**Figure 15** : vitesses initiales de génération des radicaux hydroxyles en fonction de la concentration de  $\text{Fe}^{2+}$  et en présence ou absence de CDH. Les cinétiques ont été réalisées dans du tampon acétate pH 4,8 avec une concentration fixe de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 3 mM. La CDH est à  $0.446 \mu\text{g}/\text{mL}$ , le cellobiose à 5 mM et le téréphtalate dans les deux cas à 0.3 mM. Les vitesses ont été calculées entre 10 et 20 minutes après le début de la réaction. Les tests ont été réalisés en triplicat.

Contrairement aux cinétiques obtenues en excès de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , une quantité importante de  $\text{Fe}^{2+}$  par rapport au peroxyde à un effet négatif sur la production de radicaux hydroxyles. La vitesse initiale de la réaction en présence et en absence de CDH diminue rapidement quand la concentration de  $\text{Fe}^{2+}$  passe de 3 Mm à 5 mM, puis elle devient presque constante quand on augmente la quantité de  $\text{Fe}^{2+}$  jusqu'à 10 mM (Figure 15).

Quand le milieu réactionnel est riche en ions  $\text{Fe}^{2+}$ , comme avec le mécanisme décrit ci-dessus, le  $\text{H}_2\text{O}_2$  est très rapidement consommé et la diminution de la vitesse de production des  $\text{OH}^\circ$  est probablement due au fait que ces derniers sont rapidement consommés par le  $\text{Fe}^{2+}$  selon la réaction (F5). Ceci implique qu'il y ait une compétition entre le téréphtalate et les ions  $\text{Fe}^{2+}$ . En condition acide diluée, la constante de vitesse de la réaction (F5) entre les radicaux  $\text{OH}^\circ$  et les ions  $\text{Fe}^{2+}$  est de  $4,8 \cdot 10^8 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$  contre  $3,3 \cdot 10^9 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$  pour le téréphtalate. Si, on se base sur les hypothèses émises précédemment, la CDH n'aurait éventuellement que très peu d'effet dans ces conditions. La réduction des ions  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  entrainerait une accentuation de la compétition parce qu'elle maintiendrait une concentration plus élevée en ions  $\text{Fe}^{2+}$ .

Pour mieux comprendre ces résultats, la capacité de production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à partir de l'oxygène par la CDH a été évaluée. Puis les constantes cinétiques de la réduction des ions  $\text{Fe}^{3+}$  et du  $\text{H}_2\text{O}_2$  ont été déterminées.

### 3.4 Réduction de l'oxygène et constantes de vitesses pour le $\text{Fe}^{3+}$ et le $\text{H}_2\text{O}_2$

Il a déjà été démontré que la CDH est capable de produire du  $\text{H}_2\text{O}_2$  en réduisant l'oxygène moléculaire (Pricelius et al, 2009 ; Nutt et al, 1997). La présence des deux centres oxydoréducteurs dans la CDH, les cofacteurs flavinique et hémique et le transfert d'électrons fait que la réduction de l'oxygène, qui est un accepteur d'un électron, peut se faire directement par le cofacteur FAD ou par l'intermédiaire du fer de l'hème. Ces deux processus n'impliquant pas les mêmes mécanismes de production de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dans cette étude, la production de peroxyde au cours du temps par la CDH en présence seulement de cellobiose et d'oxygène et du couple amplex red/HRP qui permet de capter le  $\text{H}_2\text{O}_2$  a été suivie pour différentes concentrations en enzyme.

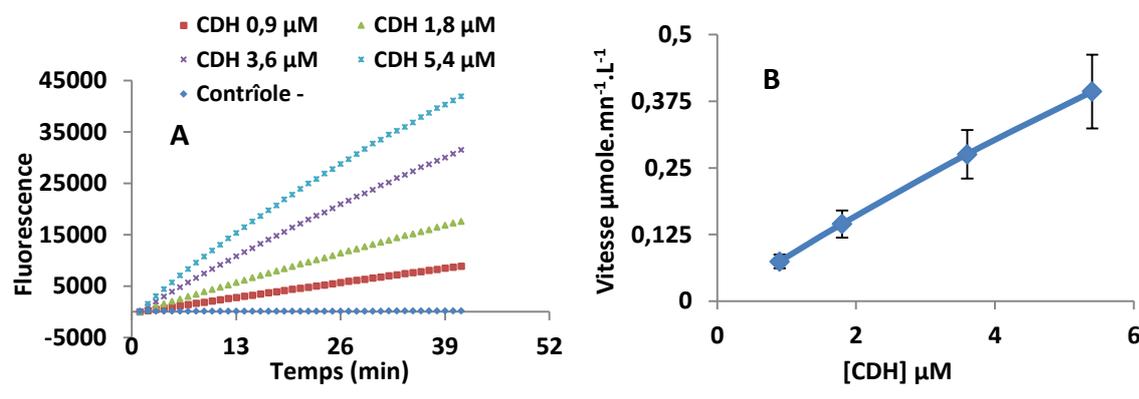


Figure 16 : (A) cinétique de production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour différentes concentrations de CDH. (B) vitesses initiales de production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en fonction de la concentration de CDH. Le milieu réactionnel était à pH 4,8 en présence de cellobiose à 0,5 mM, d'amplex red à 50  $\mu\text{M}$  et de HRP à 7,1 U/mL. Les mesures ont été réalisées en triplicat.

On remarque clairement que la production du peroxyde ne diminue pas beaucoup au cours du temps comme avec les radicaux hydroxyles pour la réaction de Fenton. Ceci est probablement dû au fait que la concentration en  $\text{O}_2$  ne varie pas de manière importante, la HRP libère l'oxygène consommée au fur et à mesure (Figure dans Matériels et méthodes). La production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  est d'autant plus importante que la concentration de CDH est élevée. La vitesse initiale de la réaction dépend aussi de la quantité de protéine et on observe une relation linéaire entre les deux, du moins pour l'intervalle de concentration considérée.

Les cinétiques de réduction des ions  $\text{Fe}^{3+}$  et du peroxyde d'hydrogène montrent un profil de Michaelis-Menten (Figure 17). Cependant, les constantes cinétiques déterminées pour ces deux substrats sont très différents. Le  $\text{H}_2\text{O}_2$  présente des paramètres cinétiques très faibles pour la CDH.

Le  $K_M$  mesuré est de 1,423 mM. Ce qui démontre une faible affinité de la CDH pour le peroxyde comparé aux autres accepteurs d'électrons notamment les ions  $\text{Fe}^{3+}$  dont le  $K_M$  ici n'est que 0.075 mM (tableau 6). Les ions  $\text{Fe}^{3+}$  sont donc de très bons accepteurs d'électrons pour la CDH. Ces résultats suggèrent que la première hypothèse émise concernant le rôle de la CDH dans l'augmentation de la production de radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton est la plus probable, il y a réduction des ions  $\text{Fe}^{3+}$  et maintien d'un certain niveau de  $\text{Fe}^{2+}$  pour la production de radicaux hydroxyles. Cependant, on ne peut pas affirmer avec certitude que la réduction des ions  $\text{Fe}^{2+}$  soit le mécanisme expliquant ce profil puisque la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par la CDH en réduisant l'oxygène ne semble pas être un phénomène négligeable et pourrait très bien être à l'origine d'une augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène, d'autant plus qu'il n'a pas été possible de déterminer les constantes cinétiques de la réduction de l'oxygène en peroxyde. Au vu de ces résultats, on peut penser que la réduction des ions  $\text{Fe}^{3+}$  représente un mécanisme important dans la réaction de Fenton. De plus la CDH est

capable de produire des radicaux hydroxyles directement en présence de peroxyde et en absence d'oxygène mais ce phénomène semble être très faible au vu du Kcat et du km du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour l'enzyme (Kremer et Wood, 1992 ; Jones et Wilson, 1988) (Tableau 6).

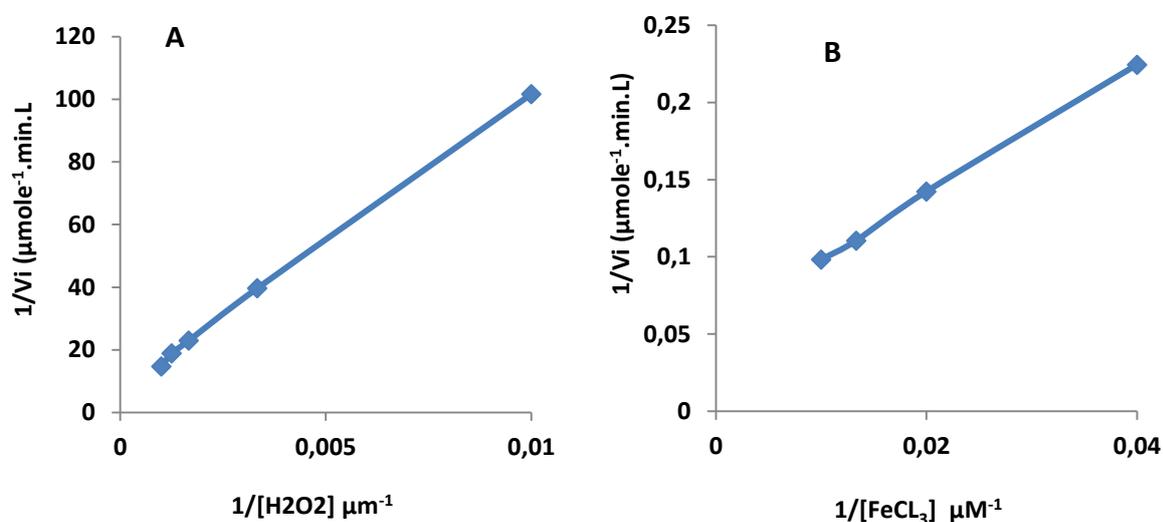


Figure 17 : Représentation de Michaelis-Menten des cinétiques de réduction du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A) et des ions Fe<sup>3+</sup> (B). Pour (A), la CDH était à 2.025 μM, le cellobiose à 1 mM, le téréphthalate à 0,3 mM et les concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont varié de 25 à 100 μM. Pour (B), la CDH était à 2.351 nM, le cellobiose à 500 μM, le NaF à 2 Mm, le Phénanthroline à 375 mM et les concentrations de FeCl<sub>3</sub> ont varié de 10 à 100 μM. les cinétiques ont été réalisées à ph 3 et en triplicat.

Tableau 6 : constantes cinétiques de quelques accepteurs d'un électron pour des CDH produites par différents organismes en utilisant le cellobiose comme donneur d'électron. Les valeurs pour le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les ions Fe<sup>3+</sup> sont celles déterminées pendant ces travaux pour le CDH de *P.cinnabarinus* (Zamocki et al, 2006).

Accepteurs d'électrons	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			Fe <sup>3+</sup>			Ferricyanide			Cyt c			Benzoquinone		
	Km	Kcat	pH	km	kcat	pH	km	kcat	pH	km	kcat	pH	km	Kcat	pH
Unités	μM	s <sup>-1</sup>		μM	s <sup>-1</sup>		μM	s <sup>-1</sup>		μM	s <sup>-1</sup>		μM	s <sup>-1</sup>	
<i>P. cinnabarinus</i>	1423	4.42	3	75	127	3	210		4,5	31		4,5	nd	nd	Nd
<i>P. chrysosporium</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5,2	22	4,5	1,2	20,5	4,5	130	21,4	6
<i>S. rolfsii</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	20	37	3	0,3	34	3,5	25	30	4
<i>P. pubescens</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8,6	27,8	4	0,69	29,4	3,5	19	27,5	4,5

Pour mieux comprendre la relation entre la CDH et les deux réactifs de Fenton, un plan d'expérience a été réalisé sur le modèle Box-Behnken en ne faisant varier que les concentrations de ces trois composés.

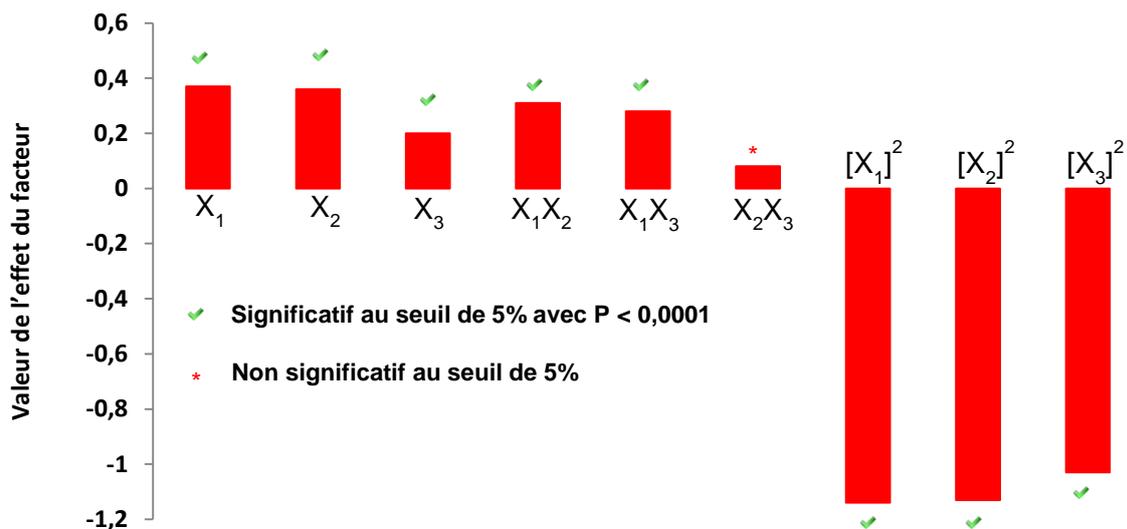
### 3.5 Plan d'expérience de Box-Behnken

Les résultats présentés précédemment suggèrent que la CDH a un impact positif sur la vitesse et le niveau de production totale de radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton grâce à sa capacité à réduire rapidement les ions  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  traduite par les constantes cinétiques mesurées (Tableau 6). Le couplage de l'oxydation du cellobiose avec la réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène semble être rapide. Par contre la constante de Michaelis-Menten entre le peroxyde et la CDH est très élevée. Ce résultat suggère que la production de radicaux hydroxyles directement à partir de l'oxygène est une voie relativement faible. Pour mieux vérifier ces hypothèses, un plan d'expériences a été réalisé sur le modèle de Box-Behnken. L'analyse statistique de cette série d'expériences permettra de connaître les impacts isolés et les interactions entre les trois facteurs qui sont les concentrations de  $\text{Fe}^{2+}$ , de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de CDH sur :

- La vitesse de production des radicaux hydroxyles
- Le niveau de production totale des radicaux hydroxyles

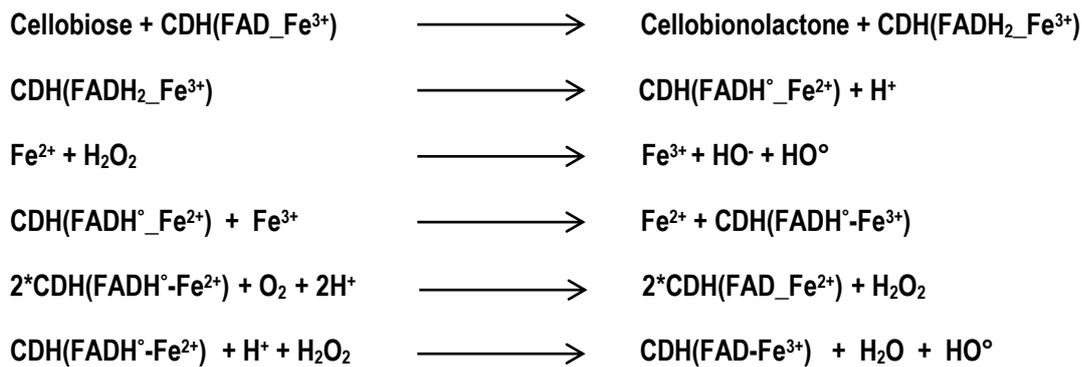
#### 3.5.1 Impact sur la vitesse de production des radicaux hydroxyles

Sur la figure 18 on constate que la vitesse initiale de production des radicaux hydroxyles dépend de la concentration des trois facteurs et des interactions entre  $\text{Fe}^{2+}$ -CDH et  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$ . Néanmoins ces impacts sont relativement différents. La CDH et les ions  $\text{Fe}^{2+}$  ont des effets plus significatifs en comparaison de celui du peroxyde d'hydrogène.



**Figure 18** : Représentation des effets de chaque facteur et des interactions sur la vitesse initiale de production des radicaux hydroxyles. Ces valeurs sont arbitraires et ont été déterminées par la modélisation statistique des effets de chaque facteur en fonction des codes -1, 0 et +1 par le logiciel design expert.

L'impact important de la CDH et du  $\text{Fe}^{2+}$  est probablement dû à la capacité de réduction rapide des ions  $\text{Fe}^{3+}$  par l'enzyme. Le milieu réactionnel contient toujours au minimum 200  $\mu\text{M}$  de peroxyde d'hydrogène qui est susceptible de réagir avec le  $\text{Fe}^{2+}$ . Dans ce cas, l'oxydation des ions ferreux en  $\text{Fe}^{3+}$  se fait via la réaction de Fenton et est suivie rapidement par la réduction des ions ferriques couplée à l'oxydation du cellobiose par la CDH. C'est ce qui explique qu'en présence d'une quantité relativement élevée de  $\text{Fe}^{2+}$ , la vitesse de production des radicaux est très rapide. Ces résultats permettent de proposer le mécanisme de production des radicaux hydroxyles suivant :



Ce mécanisme explique que la CDH ait l'impact le plus important sur la vitesse. L'enzyme est impliquée dans toutes les réactions qui produisent les radicaux hydroxyles que ce soit indirectement en réduisant le  $\text{Fe}^{3+}$  ou directement à partir de l'oxygène.

### 3.5.2 Impact sur le niveau de production des radicaux hydroxyles

Comme pour la vitesse initiale de la réaction, l'impact important de la CDH sur la concentration finale de  $\text{HO}^\circ$  est probablement dû à son implication dans toutes les réactions mentionnées ci-dessus. Cependant, ce qu'il est important de retenir dans ce cas, c'est qu'à part l'enzyme, c'est la concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  qui a le plus d'impact sur le niveau de production des radicaux (Figure 19).

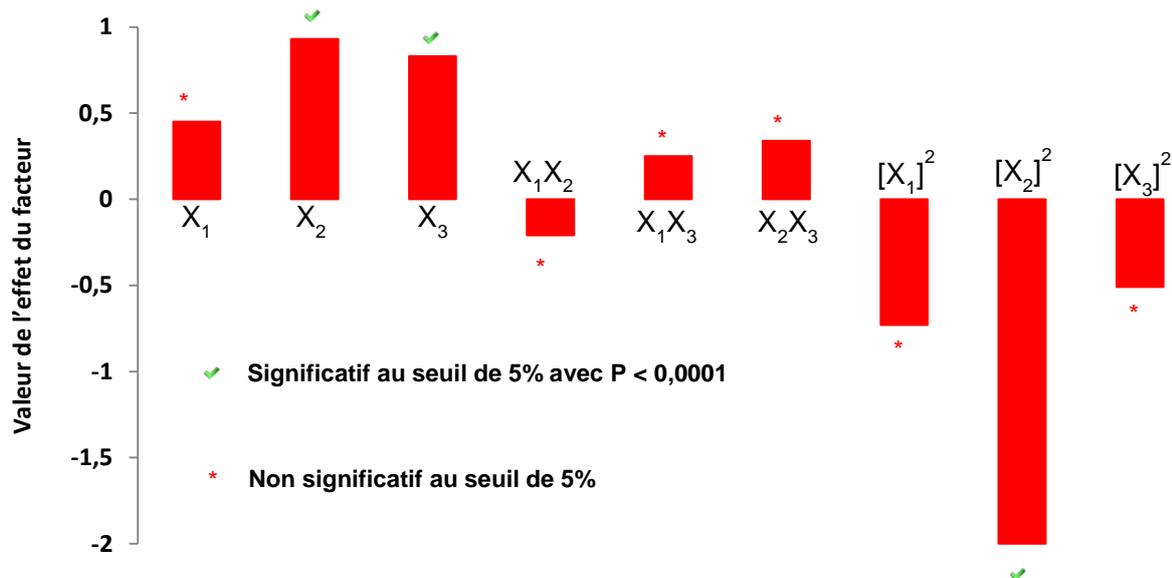
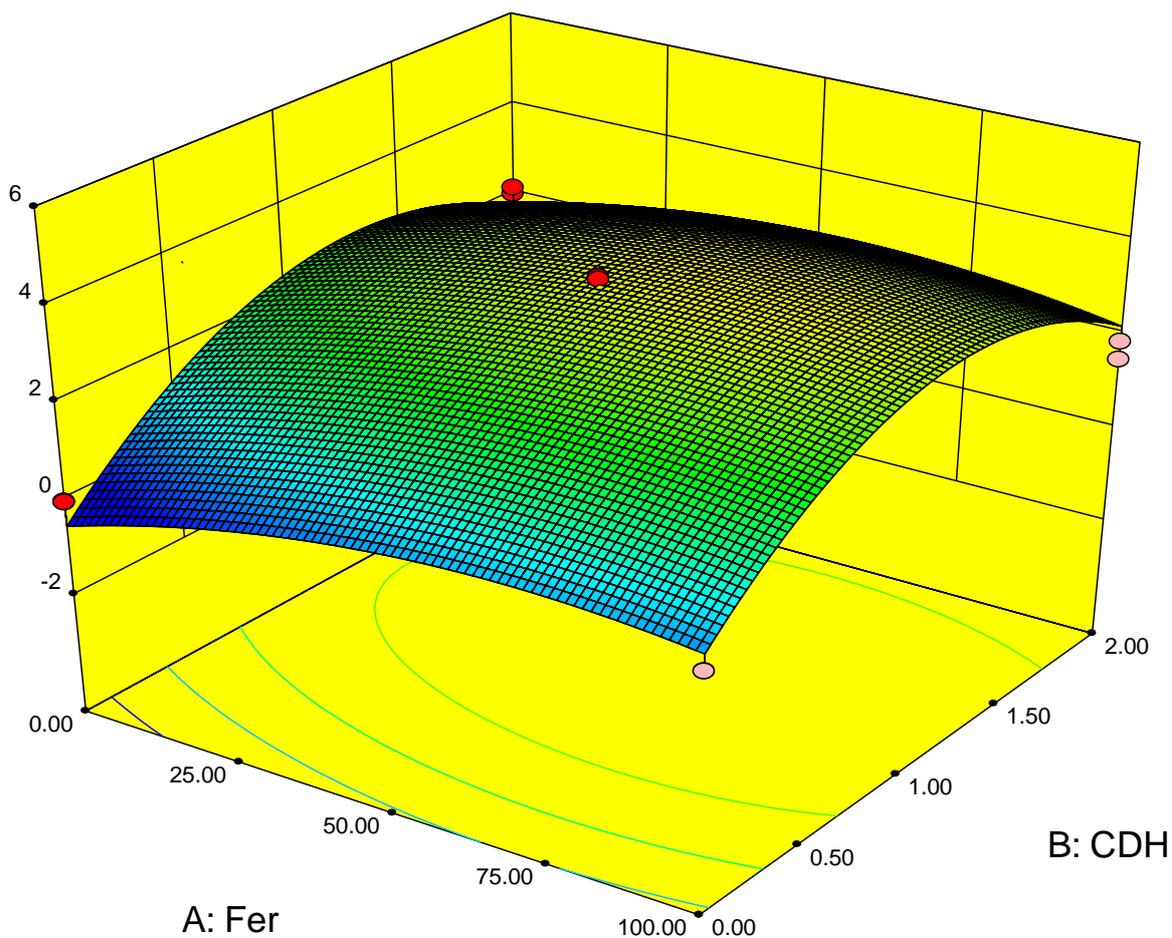


Figure 19 : Représentation des effets de chaque facteur et des interactions sur la concentration en radicaux hydroxyles au bout de 2h de cinétique. Ces valeurs sont arbitraires et ont été déterminées par la modélisation statistique des effets de chaque facteur en fonction des codes -1, 0 et +1 par le logiciel design expert.

Cet impact significatif du  $\text{H}_2\text{O}_2$  s'explique par le fait que les radicaux  $\text{OH}^\circ$  ne peuvent être produits qu'à partir de l'oxygène moléculaire ou du peroxyde ajouté dans le milieu réactionnel. Les ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  ne participent à la production de ROS que quand ils réagissent avec l'oxygène ou un de ses dérivées. Ainsi, une quantité supplémentaire de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le milieu réactionnel entraîne une augmentation de la quantité de matière susceptible de se transformer en radicaux hydroxyles. On a ainsi potentiellement une concentration en  $\text{HO}^\circ$  finale plus élevée. Par contre, une augmentation de la quantité de  $\text{Fe}^{2+}$  ne peut pas augmenter le potentiel de matière constitué d'oxygène et de peroxyde mais peut avoir, comme présenter ci-dessus, un effet important sur la vitesse des réactions qui produisent les ROS.

Une modélisation des deux réponses, vitesse initiale et niveau de production des radicaux hydroxyles, a été faite en fixant les valeurs de deux paramètres entre -1 et +1 et en faisant varier le troisième dans ce même intervalle. On obtient des réponses en cloche dont les maxima se situent autour des valeurs centrales pour chaque paramètre c'est-à-dire 600  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1  $\mu\text{M}$  de CDH et 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{3+}$ . Les réponses en cloche sont dus au fait que, pour les deux paramètres vitesse et niveau de production, l'impact des facteurs quadratiques,  $X_1^2$ ,  $X_2^2$  et  $X_3^2$  (Figure 18 et 22), est négatif et significatif, ce qui entraîne une diminution de la réponse aux niveaux des extrémités, 0 et 2  $\mu\text{M}$  pour la CDH et 0 et 100  $\mu\text{M}$  pour le  $\text{Fe}^{2+}$  (Figure 20).



**Figure 20** : Représentation tridimensionnelle de l'effet de la concentration en CDH et  $\text{Fe}^{3+}$  sur la production totale de radicaux hydroxyles. Dans cet exemple, la valeur de la concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  est fixée à 600  $\mu\text{M}$  qui représente le maximum de production de  $\text{OH}^\bullet$ . Cette modélisation a été réalisée avec le logiciel Design expert sur la base du modèle statistique défini avec le plan d'expérience de Box-Behnken.

# **Conclusion et perspectives**

## **4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

L'hydrolyse enzymatique est l'une des étapes les plus délicates du processus de conversion de la lignocellulose en bioéthanol. C'est une étape qui fait intervenir plusieurs familles d'enzymes (des cellulases, des lignases et des hémicelluloses) dont les actions conjuguées conduisent à l'hydrolyse totale ou partielle des polymères du bois. La CDH dans ce processus intervient à plusieurs niveaux décrits en introduction. Dans ce document, il a été question de l'implication de la CDH dans la production de ROS lors de la dégradation oxydative de la lignocellulose. Plusieurs protocoles de dosages avec des sondes différentes ont permis de suivre les radicaux hydroxyles, les radicaux superoxydes et le peroxyde d'hydrogène.

Le téréphtalate et une sonde très efficace pour le suivi de la production des radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton en présence de CDH. Cependant, la complexité et la diversité des réactions sensées se produire en présence des réactifs de Fenton font que la concentration du téréphtalate et le pH du milieu réactionnel sont des paramètres importants pour la mise en place du dosage. L'optimisation des conditions a permis d'obtenir une bonne proportionnalité des réponses en fonction de la composition du milieu réactionnel et de proposer ainsi une méthode fiable de dosage des radicaux hydroxyles.

Le couple Amplex red et HRP permet aussi de suivre efficacement la production de peroxyde d'hydrogène au cours du temps. Par contre le NBT ne permet pas de suivre la production des radicaux superoxydes, car le transfert électronique s'effectue directement du FAD de l'enzyme vers le NBT. Ceci rend impossible le suivi en temps réel de la production de radicaux superoxydes en présence de l'enzyme dont la diversité des accepteurs d'électrons peut rendre difficile la recherche de nouvelles sondes pour les ROS. Les résultats montrent cependant que le transfert d'électrons est très dépendant de la concentration en fer dans le milieu.

La présence de la CDH dans la réaction de Fenton est très importante. L'enzyme est capable de réduire les ions  $Fe^{3+}$  par l'intermédiaire de l'hème et l'affinité pour cet accepteur d'électrons est particulièrement élevée. Elle est aussi capable de produire des radicaux hydroxyles directement à partir de l'oxygène moléculaire en passant probablement par le peroxyde d'hydrogène, également produit par réduction de l'oxygène par le  $FADH_2$ , soit par la production d'anion superoxyde au niveau de l'hème. Ces résultats montrent l'importance de la CDH dans le processus de dégradation oxydative des matrices lignocellulosiques. Son impact positif sur la réaction de Fenton est surtout dû à son interaction avec les ions ferreux.

Dans le processus de bioconversion de la cellulose, la CDH est capable de plusieurs interactions avec des enzymes et d'autres composés quinoniques ou des radicaux phénoxy. Il serait ainsi intéressant de compléter cette étude en introduisant plusieurs autres facteurs, également liés à l'activité du champignon sur ces substrats, en particulier les produits dérivés de la dégradation de la lignine, les radicaux phénoxy et les quinones qui doivent intervenir également au niveau des transferts d'électrons par la CDH. En fonction des concentrations de tous ces accepteurs et donneurs d'électrons dans les matrices lignocellulosiques, une modélisation de la production de radicaux hydroxyles pourra être faite, notamment avec le logiciel SIMULOX développé pour décrire les réactions de Fenton et l'oxydation des denrées alimentaires, et étudier ainsi de façon plus détaillée les séquences enzymatiques nécessaires à la déconstruction de la matière végétale.

## 5 BIBLIOGRAPHIE

- Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman J, Chertov O, Coutinho PM, Cullen D, Danchin EGJ, Grigoriev IV, Harris P, Jackcon M, Kubicek CP, Han CS, Ho I, Larrondo LF, De Leon AL, Magnuson JK, Mérimo S, Misra M, Nelson B, Putnam N, Robbertse B, Salamov AA, Schmoll M, Terry A, Thayer N, Westerholm-Parvinen A, Schoch CL, Yao J, Barbote R, Nelson MA, Detter C, Bruce D, Kuske CR, Xie G, Richardson P, Rokhsar DS, Lucas SM, Rubin EM, Dunn-Coleman N, Ward M, Brettin TS (2008) : **Genom sequencing and analysis of the biomass degrading fungus *Trichoderma reesei* (Syn. *Hypocrea jecorina*)**. *Nature Biotechnology* 26(5) : 553-60.
- Ander P, Mishra C, Farrell RL, Eriksson KE (1990) : **Redox reactions in lignin degradation: interactions between laccase, different peroxidases and cellobiose: quinone oxidoreductase**. *Journal of Biotechnology* 13: 189–198.
- Baminger U, Subramaniam SS, Renganatham V, Haltrich D (2001) : **Purification and Characterization of Cellobiose Dehydrogenase from the Plant Pathogen *Sclerotium(Athelia) rolfsii***. *Applied and environmental microbiology* 67 : 1766-1774
- Bey M, Berrin JG, Poidevin L, Sigoillot JC (2011) : **Heterologous expression of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase in *Pichia pastoris* and involvement in saccharification processes**. *Microbial Cell Factories* 10 : 1113.
- Bielski BH, Cabelli DE, Aruda RL, Ross AB (1985) : **Reactivity of HO 2•/O 2•- radicals in aqueous solution**. *J. Phys. Chem.* 14 : 1041-1077.
- Bradford MM (1974) : **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Analytical biochemistry* 72 : 248\_258.
- Buxton G.V., Grennstock C.L., Helman W.P., et Ross A.B. (1988) : **Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals (OH •/O •-) in aqueous solution**. *J. Phys. Chem. Reference Data* , 17 , 513-886.
- Cameron MD, Aust SD (1999) : **Degradation of Chemicals by Reactive Radicals Produced by Cellobiose Dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium***. *Archives of biochemistry and biophysics* 367 : 115-121.
- De Laat J, Truong Le G, Legube B (2004) : **A comparative study of the effects of chloride, sulfate, and nitrate ions on the rates of decomposition of H 2O 2 and organic compounds by Fe(II)/H 2O 2 and Fe(III)/H 2O 2** . *Chemosphere , sous presse*.
- Deshpande V, Eriksson K-E, Pettersson B (1978) : **Production, purification and partial characterization of 1,4-β-glucosidases enzymes from *Sporotrichum pulverulentum***. *European Journal of Biochemistry* 90: 191–198.
- Dimarogona M, Topakas E, Christakopoulos P (2012) : **Cellulose degradation by oxidative enzymes**. *Computational and biotechnology journal* 3 : 201-209
- Eriksson KE, Blanchette RA, Ander P (1990) : **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. In **Springer Series in Wood**. *Science Springer-Verlag, Heidelberg, Germany* 407 pp.
- Hallberg BM, Henriksson G, Pettersson G, Divne C (2002) : **Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase**. *Journal of Molecular Biology* 315: 421-434.
- Hüttermann A, and Noelle A (1982) : **Characterization and regulation of cellobiose dehydrogenase in *Fomes annosus***. *Holzforschung* : 36, 283.
- Igarashi K, Momohara I, Nishino T, Samejima M (2002) : **Kinetics of inter-domain electron transfer in flavocytochrome cellobiose dehydrogenase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium***. *Biochem* 365: 521–5261.
- Jin L, Schultz TP, Nicholas DD (1990a) : **Structural characterization of brown-rotted lignin**. *Holzforschung* 44: 133–138
- Keyser P, Kirk TK, Zeikus JG (1978) : **Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation**. *Journal of Bacteriology* 135: 790–797
- Kremer SM, et Wood PM (1992): **Production of Fenton's reagent by cellobiose oxidase from cellulolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium***. *European Journal of Biochemistry* 208: 807–814.

- Lehrner D, Zipper P, Henriksson G, Pettersson G (1996) : **Small-angle X-ray scattering studies on cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium***. *Biochem Biophys Acta* 1293 : 161-169.
- Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho P, Henrissat B (2013) : **Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZY database to integrate auxiliary redox enzymes**. *Biotechnology for Biofuels* 6 : 41
- Ludwig R, Wolfgang H, Tasca F, et Gorton L (2010) : **Cellobiose Dehydrogenase: A versatile catalyst for electrochemical applications**. *ChemPhysChem* 11: 2674 – 2697
- Mansfield SD, de Jong E, Saddler JN (1997) : **Cellobiose dehydrogenase, an active agent in cellulose depolymerization**. *Appl Environ Microbiol* 63 : 3804-3809.
- Nutt A, Salumets A, Henriksson G, Sild V, Johansson G (1997) : **Conversion of O<sub>2</sub> species by cellobiose déshydrogénase (cellobiooase oxidase) and glucose oxidase – a comparison**. *Biotechnology letters* 19 : 379 – 383
- Precelius S, Murkovic M, Souter P, Guebitz GM (2009): **substrate specificities og glucosydases from *Aspergillus* sp. Pectinase preparations on elderberry anthocyanins**. *J Agric Food Chem* 57 : 1006-1012.
- Roy BP, Dumonceaux T, Koukoumas AA, Archibald FS (1996): **Purification and Characterization of Cellobiose Dehydrogenases from the White Rot Fungus *Trametes versicolor***. *Applied and environmental microbiology* 62: 4417-4427.
- Rush JD, Bielski HJ (1985) : **Pulse radiolytic studies of the reactions of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> with Fe(II)/Fe(III) ions. The reactivity of HO<sub>2</sub><sup>-</sup>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> with Ferric ions and its implication on the occurrence of the Haber-Weiss reaction**. *J. Phys. Chem* 89: 5062-5066.
- Samejima M, Eriksson KEL (1992) : **A comparison of the catalytic properties of cellobiose: quinone oxidoreductase and cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium***. *Eur. J. Biochem* 207 : 103-107
- Schmidhalter DR, Canevascini G (1993) : **Isolation and Characterization of the Cellobiose Dehydrogenase from the Brown-Rot Fungus *Coniophora puteana* (Schum ex Fr.) Karst**. *Arch. Biochem.Biophys.* 300, 559-563.
- Schou C, Christensen MH, Schulein M (1998) : **Characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Humicola insolens***. *Biochem. Journal* 330 : 565-57.1.
- Subramaniam SS, Nagalla SR, Renganathan V (1999) : **Cloning and Characterization of a Thermostable Cellobiose Dehydrogenase from *Sporotrichum thermophile***. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 365 : 223–230.
- Tamura H, Goto K, Yotsuyanagi T, Nagayama M (1974) : **Spectrophotometric determination of iron (II) with 1, 10-phenanthroline in the presence of large amounts of iron (III)**. *Talanta* 21 : 314-318.
- Walling C, Goosen A (1973): **Mechanism of the ferric ion catalyzed decomposition of hydrogen peroxide. Effect of organic substrates**. *J. Am. Chem. Soc* 95: 2987- 2991.
- Westermark U, et Eriksson KE (1974) : **Cellobiose:Quinone Oxidoreductase, a New Wood-degrading Enzyme from White-rot Fungi**. *Acta Chemica Scandinavica* 28: 209-214.
- Xia ZX, Shamala N, Bethge PH, Lim LW, Bellamy HD, Xuong NH, Lederer F et Mathews FS (1987) : **Three-dimensional structure of flavocytochrome b<sub>2</sub> from baker's yeast at 3.0-Å resolution**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 2629-2633.
- Zamocky M, Ludwig R, Peterbauer C, Hallberg BM, Divne C, Nicholls P, Haltrich D (2006) : **Cellobiose Dehydrogenase – A Flavocytochrome from Wood-Degrading, Phytopathogenic and Saprotropic Fungi**. *Current protein and peptide science* 7: 255-280.
- Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina, Haugland R (1997) : **A stable nonfluorescence of resorufin for the fluorescence determination of trace hydrogen peroxide; Applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxydase and other oxydases**. *Analytical biochemistry* 253 : 162-168.