Dégradation des fibres pariétales et système xylanolytique de Bacteroides xylanisolvens XB1AT et Roseburia intestinalis XB6B4, espèces bactériennes du microbiote intestinal humain

Caroline Mirande

▶ **To cite this version:**

Caroline Mirande. Dégradation des fibres pariétales et système xylanolytique de Bacteroides xylanisolvens XB1AT et Roseburia intestinalis XB6B4, espèces bactériennes du microbiote intestinal humain. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2009. Français. NNT : 2009CLF22007 . tel-00845270

HAL Id: tel-00845270

https://theses.hal.science/tel-00845270

Submitted on 16 Jul 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL **Année 2009**
CLERMONT-FERRAND

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
ED SVS 516

N° d'ordre 2007

Thèse

Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur d'Université
- Spécialité Ecologie -

par **Caroline MIRANDE**

Dégradation des fibres pariétales et système xylanolytique de *Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T et *Roseburia intestinalis* XB6B4, espèces bactériennes du microbiote intestinal humain

Soutenue le 18 décembre 2009

Gérard Fonty – Université Blaise Pascal (Président)
Chantal Tardif – Université de Marseille I (Rapporteur)
Caroline Remond – Université de Reims (Rapporteur)
Michel Fons – Université de Marseille III (Rapporteur)
Marion Leclerc – INRA de Jouy en Josas (Examinateur)
Evelyne Forano – INRA de Clermont-Ferrand (Directrice de thèse)
Christel Maillet – INRA de Clermont-Ferrand (Co-encadrante)

Unité de Microbiologie (UR 454)
Centre de Recherche INRA de Clermont-Ferrand/Theix

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés dans l'Unité de Microbiologie du Centre INRA de Clermont-Ferrand-Theix. C'est en janvier 2006, que cette aventure scientifique et humaine a débuté, quand je suis arrivée au laboratoire pour effectuer mon stage de Master 2. L'aventure s'est alors poursuivie pendant trois années supplémentaires … pour le meilleur et pour « le pire » !!!

Ainsi, je remercie tout d'abord Evelyne Forano, directrice de l'Unité de Microbiologie et aussi ma directrice de thèse. Merci d'abord pour ton accueil au sein du laboratoire, merci aussi pour ta gentillesse, ton soutien, ta disponibilité et bien sûr pour tes précieux conseils, qu'ils soient scientifiques ou autres. Je te remercie aussi pour tout le temps que tu m'as accordé, en particulier à la fin de ma thèse, quand nous avons passé beaucoup de temps (même les weekends) à lire, relire, corriger et recorriger les publications et ce manuscrit !

Je tiens ensuite à remercier Gérard Fonty pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, ainsi que Chantal Tardif, Caroline Remond et Michel Fons, les rapporteurs de cette thèse, pour avoir accepté de juger mes travaux. Merci également à Marion Leclerc pour sa participation à ce jury.

Mes remerciements s'adressent aussi à Christel Maillet, qui a co-encadré mon travail. Merci pour tes nombreux conseils, pour m'avoir guidée dans mes recherches et fait confiance. Ta grande patience et ton optimisme m'ont ainsi permis de relativiser et de prendre du recul sur mon travail, tout ça malgré nos échecs de manip … Je garderai particulièrement en souvenir nos longs moments de discussion pour essayer de dénouer les problèmes techniques (parfois nombreux …) auxquels nous avons été confrontées!

Je remercie également Annick Bernalier-Donadille pour avoir initié ce travail, avec Christophe Chassard, en isolant les souches sur lesquelles j'ai travaillé. Merci aussi pour tes nombreux conseils, notamment lors des répétitions de mes oraux pour les congrès ou les séminaires … merci aussi pour ta bonne humeur et ton humour.

Un grand merci à Pascale Mosoni, ma voisine de bureau … et surtout ma confidente ! Merci pour ton soutien quand le moral était au plus bas et pour les nombreux conseils que tu m'as donnés. Merci aussi pour ton aide en protéomique en fin de thèse quand mes deux bras ne suffisaient plus pour finir ce travail!

Je remercie ensuite les personnes qui ont collaboré à ce travail : Maria Matulova et Peter Capek du Département de Chimie de l'Académie des Sciences Slovaque à Bratislava en Slovaquie ; Pierre Peyret et Sébastien Terrat de l'équipe GIIM du Laboratoire LMGE d'Aubière et Christophe Chambon et Jérémy Pinguet de la plateforme protéomique de l'INRA de Theix.

Je n'oublie pas non plus, les personnes de l'équipe « Eco dig» qui m'ont soutenue et aidée : Fred D., mon gégé, Pascale L. et bien sûr les copines … Gégé, merci pour ton aide pour la préparation des milieux, merci pour ta bonne humeur et pour tous les bons moments que nous avons partagés (RDV au CHU 1 fois par mois pour la guêpe !!!). Les filles : Coco des îles, Grande Bibiche, Fohet et ma petite Masmas : vous allez beaucoup me manquer ! Que de bons souvenirs : nos virées le jeudi midi avec Masmas (attention de ne rien casser en RMN !), nos soirées à danser la Salsa avec Mister Francis … saucisses, merguez et barbecues … les longues discussions dans le « coin des stagiaires » … nos envies de voyages et de grands moments de rigolade … merci les poulettes !

Merci à l'équipe « Patho » : Christine, Alain, Yolande, Maurice, Alex, Annie et Priscilla, pour vos conseils et votre soutien. Merci à Cathy, qui m'a beaucoup aidée pour la préparation des cinétiques … des litres et des litres de milieux à répartir dans des centaines des fioles … Merci à Steph, CDH, Christophe Chassard, Brigitte GM (pour mon initiation à la microscopie). Merci à l'équipe QUASA pour les nombreux conseils techniques et scientifiques que vous m'avez apportés. Et bien sûr merci à Alexandre, qui en 2 ans a passé pas mal de temps sur la petite chaise à côté de mon bureau … ah bravo Mr le gestionnaire ! Bonne chance et plein de bonheur dans ta nouvelle maison (que tu as enfin trouvée … il était temps !). Encore merci pour ces bons moments de complicité et de plaisanterie.

Merci aux stagiaires qui ont participé à ce travail, Anne-So, William et Eva. Merci aussi à Tibo et Marjo, anciens thésards partis vivre leur vie de post doc ! Et merci à tous les

stagiaires et CDD qui sont restés plus ou moins longtemps au labo et avec qui j'ai partagé de très bons moments.

Enfin merci à tous mes amis, JB, Sylvie, Nico, les Mich, les Jeff, les Fab, les Monjojo, Rose, Will, Fred, Johanne et les enfants … pour tous ces bons moments passés ensemble pour oublier les manip qui ne marchent pas … et pour votre soutien!

Pour terminer, je tiens à remercier ma famille mais surtout, de tout mon cœur, mes parents, Clélie et bien sûr Pierre-Antoine, pour votre soutien et pour vos encouragements qui ont été indispensables pour mener à bien ce travail.

Vis comme si tu devais mourir demain.
Apprends comme si tu devais vivre toujours (Gandhi).

Sommaire

Sommaire 1

Table des abréviations 11

Numéro EC des enzymes citées dans le manuscrit 15

Avant propos 19

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE A : Le côlon et les substrats disponibles pour le microbiote intestinal 25

I. LE COLON HUMAIN : ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE 25
II. LES SUBSTRATS DISPONIBLES POUR LE MICROBIOTE COLIQUE 26

PARTIE B : Les fibres végétales et les enzymes nécessaires pour les dégrader 29

I. LES FIBRES VEGETALES 29
1. Composition de la paroi végétale 29
2. Organisation de la paroi végétale 35
3. Les aliments riches en fibres végétales 37
4. Consommation des fibres alimentaires et principaux « effets santé » 39
5. Fibres alimentaires et prébiotiques 42

II. LES ENZYMES NECESSAIRES POUR DEGRADER LES PAROIS VEGETALES 43
1. Structure et mode d'action des enzymes 43
2. Les activités enzymatiques 50
3. Les xylanases 54
4. Autres enzymes impliquées dans la dégradation des xylanes 58
5. Régulation de l'expression des gènes des systèmes fibrolytiques 58

PARTIE C : Le microbiote et la fibrolyse dans le côlon 61

I. LE MICROBIOTE DU COLON HUMAIN 61
1. Structure du microbiote intestinal 61
2. Variations du microbiote intestinal 65

II. LA DEGRADATION DES POLYSACCHARIDES DANS LE COLON 67
1. Les voies métaboliques 67
2. Les produits de fermentation 68
3. Les gaz produits 69
4. Dégradation microbienne des fibres pariétales 70

III. LES BACTERIES FIBROLYTIQUES 71
1. Description des communautés fibrolytiques par méthodes culturales 71
2. Apports de la génomique 75
3. Les espèces bactériennes xylanolytiques étudiées 78

OBJECTIFS 67

RESULTATS

RESULTATS – CHAPITRE 1 89

Dégradation et fermentation des fibres végétales par *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4 89

1. INTRODUCTION 89

2. ARTICLE 1 91

3. RESULTATS ADDITIONNELS 118

3.1 Composition des substrats complexes utilisés dans cette étude ... *118*
3.2 Dégradation et fermentation des différents substrats par B. xylanisolvens et R. intestinalis. ... *120*
3.3 Produits de dégradation ... *123*
3.4 Activités xylanolytiques de B. xylanisolvens XB1A^T et R. intestinalis XB6B4. ... *124*

4. CONCLUSION ET DISCUSSION ... 126

RESULTATS – CHAPITRE 2 ... 135

Caratérisation moléculaire des systèmes enzymatiques de *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4 ... 135

1. INTRODUCTION ... 135

2. RESULTATS ... 138
2.1 Recherche des gènes de xylanases par amplification PCR à partir des ADNg ... *138*
2.2 Analyse du génome de B. xylanisolvens XB1A^T ... *146*
2.3 Utilisation d'amorces dégénérées spécifiques des familles de GH 10 et 43 ... *151*
2.4 Identification des protéines par spectrométrie de masse ... *153*
2.5 Expression de gènes codant des GH10 et GH43 chez les bactéries cultivées sur différents substrats. *155*

3. CONCLUSION ET DISCUSSION ... 157
3.1 Recherche des gènes de xylanases par PCR ... *157*
3.2 Diversité des gènes de GH identifiés chez B. xylanisolvens XB1A^T, Bacteroides sp. XB12B et de R. intestinalis XB6B4 ... *158*
3.3 Diversité des structures modulaires des enzymes prédites ... *160*
3.4 Localisation prédite des enzymes identifiées ... *161*
3.5 Expression des gènes de xylanases et xylosidases ... *162*
3.6 Organisation génique des clusters isolés chez B. xylanisolvens XB1A^T ... *162*

4. MATERIELS ET METHODES ... 165
4.1 Souches bactériennes et conditions de culture ... *165*
4.2 Préparation des échantillons protéiques et des protéines liées au xylane ... *165*
4.3 Analyse en gel SDS-PAGEet identification des protéines par MALDI-ToF ... *166*
4.4 Electrophorèse bidimensionnelle et identification des protéines par MALDI-ToF ... *167*
4.5 Extractions d'ADN ... *168*
4.6 Oligonucléotides utilisés ... *169*
4.7 Procédure d'amplification par PCR ... *171*
4.8 Séquençage de l'ADN et analyse des séquences ... *171*
4.9 Extraction d'ARN ... *171*
4.10 Reverse transcription et qPCR relative ... *172*

RESULTATS – CHAPITRE 3 ... 177

Caractérisation de la xylanase Xyn10A de *B. xylanisolvens* XB1A^T ... 177

1. INTRODUCTION ... 177

2. ARTICLE 2 ... 179

3. RESULTATS ADDITIONNELS ... 203

4. CONCLUSION ET DISCUSSION ... 205

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES ... 213

Annexe 1 : Tampons de solubilisation et d'IEF ... 247

Annexe 2 : Solutions d'équilibration ... 248

Annexe 3 : Protocole pour la révélation des gels au nitrate d'argent ... 249

Table
des abréviations

Table des abréviations

ADF	Acid Detergent Fiber
ADL	Acid Detergent lignine
ADNg	Acide DésoxyriboNucléique génomique
AGCC	Acide Gras à Chaîne Courte
AGX	ArabinoGlucuronoXylanes
AJR	Apport journalier recommandé
ANC	Apport nutritionnel conseillé
Araf	Arabinofuranosyl
ARX	ARabinoXylanes
AX	ArabinoXylanes
B.	*Bacteroides*
CAZY	Carbohydrate Active enZYmes
CBM	Cellulose Binding Domain
CCM	Chromatoghaphie sur Couche Mince
CE	Carbohydrate Estérase
Cel	Cellulase
Cip	Cellulosome integrating protein
CMC	CarboxyMéthylCellulose
CoA	Coenzyme A
DC	Domaine catalytique
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
fer	Feroyl
FOS	FructoOligoSaccharides
GAX	GlucuronoArabinoXylanes
GH	Glycoside Hydrolases
GOS	GalactoOligoSaccharides
GX	GlucuronoXylanes
HGA	HomoGAlacturonane
HMP	Human Microbiome Project
HX	HétéroXylane
kb	kilo paire de bases
IEF	Isoélectrofocalisation

Ig	Immunoglobuline
LDL	Low Density Lipoprotein
MALDI-Tof	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time-of-flight mass spectrometry
MetaHIT	Metagenome human intestine
MGX	MéthylGlucuronoXylane
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NDF	Neutral Detergent Fiber
NIH	National Institutes of Health
ORF	Open reading frame
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
pcoul	Acide p-coumarique
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne
pb	paire de bases
PL	Polysaccharide Lyase
qPCR	PCR quantitative
R.	*Roseburia*
RG	RhamnoGalacturonane
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SII	Syndrôme de l'Intestin Irritable
SLH	Surface-Layer Homology
SOS	OligoSaccharides de Soja
XOS	XylooligOSaccharides
Xos	Xylane Oat spelt
Xyl	Xylosidase
Xyn	Xylanase

Numéro EC des enzymes citées dans le manuscrit

(d'après CAZY http://www.cazy.org**)**

Dégradation de la cellulose

cellulase (EC 3.2.1.4)
carboxymethylcellulase (EC 3.2.1.4)
cellobiase (EC 3.2.1.21)
cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91)
cellodextrinases (EC 3.2.1.-)
endoglucanase (EC 3.2.1.4)

Dégradation des hémicelluloses

β-1,3-1,4-glucanase (EC 3.2.1.73)
lichénase (EC 3.2.1.73)
exo-β-1,4-glucanase (EC 3.2.1.74)
xylanase (EC 3.2.1.8)
endo-1,4-β-xylanase (EC 3.2.1.8)
endo-1,3-β-xylanase (EC 3.2.1.32)
β-xylosidase (EC 3.2.1.37)
α-L- arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)
acétyl xylane estérase (EC 3.1.16)
acide férulique estérase (EC 3.1.1.73)
coumaroyl estérase (EC 3.1.1.-)
arabinanase (EC 3.2.1.99)
galacturonase (EC 3.2.1.15)
glucan 1,4- ou 1,3-β-glucosidase (EC 3.2.1.74, EC 3.2.1.58)
α-galactosidase (EC 3.2.1.22)
β-galactosidase (EC 3.2.1.23)
α-glucosidase (EC 3.2.1.20)
β-glucosidase (EC 3.2.1.21)
β-glucuronidase (EC 3.2.1.31)
β-1,4-mannanase (EC 3.2.1.-78)
β-mannosidase (EC 3.2.1.25)
β-1,3-xylosidase (EC 3.2.1.-)
α-arabinosidase (EC 3.2.1.55)

Dégradation des pectines

pectine lyase (EC 4.2.2.10)
pectine méthyl estérase (EC 3.1.1.11)
polygalacturonase (EC 3.2.1.15)
polygalacturonate lyase (EC 4.2.2.2)

Dégradation de l'amidon

α-amylase (EC 3.2.1.1)
β-amylase (EC 3.2.1.2)
néopullulanase (EC 3.2.1.135)

Autres enzymes

fructose biphosphatase aldolase (EC 4.1.2.13)

Avant propos

Avant propos

Le côlon humain est un écosystème microbien complexe, composé d'une communauté bactérienne majoritairement anaérobie stricte très diversifiée. Une des principales fonctions du microbiote colique est de dégrader puis fermenter les fibres alimentaires que nous ingérons. Ces fibres correspondent à la fraction des aliments non digérée dans la partie haute du tube digestif. Essentiellement végétales, elles sont constituées de polysaccharides complexes (cellulose, hémicelluloses, amidon …) et sont retrouvées dans les fruits, les légumes ou les céréales que nous consommons. La fermentation des fibres végétales dans le côlon fait intervenir plusieurs groupes microbiens associés en une chaîne trophique. Ainsi, les polyosides sont hydrolysés par la communauté fibrolytique en plus petits fragments, et les oses libérés sont utilisés par d'autres bactéries, fibrolytiques ou non. La fermentation des parois végétales conduit à la formation d'acides gras à chaîne courte, l'acétate, le propionate et le butyrate majoritairement, et de gaz (H_2, CO_2 et CH_4 parfois).

L'apport de fibres dans l'alimentation a de nombreux effets bénéfiques sur la santé, comme la régulation du transit intestinal, l'apport de micronutriments et vitamines essentiels, la prévention de l'obésité par action sur la satiété… Outre ces effets, la fermentation par le microbiote colique joue aussi un rôle important sur la santé, puisque les métabolites fermentaires produits sont connus pour avoir de nombreux effets bénéfiques. Le butyrate par exemple, substrat oxydatif majeur des colonocytes, joue un rôle important sur leur prolifération et leur apoptose, et serait associé à la prévention de risque de cancer colorectal. La compréhension des mécanismes de la dégradation des fibres et de leur fermentation par les microorganismes du côlon présente donc un intérêt certain pour la nutrition et la santé humaine. Dans l'Unité UR454 de Microbiologie, les communautés fibrolytiques du côlon de l'homme sont étudiées depuis plusieurs années, et en particulier les bactéries cellulolytiques et xylanolytiques, ainsi que leurs interactions avec d'autres communautés fonctionnelles du microbiote.

Parmi les polysaccharides retrouvés dans les fibres alimentaires, le xylane présent dans les parois végétales est un substrat majeur. En effet, ce polyoside complexe est le constituant principal des hémicelluloses. Arrivant en quantité majeure dans le côlon, il est donc une source de carbone importante pour les microorganismes de cet écosystème. La communauté xylanolytique dans le côlon est dénombrée de 10^8 à 10^{11} bactéries par gramme de fèces et est

essentiellement composée des genres bactériens *Bacteroides* et *Roseburia*. Au laboratoire, plusieurs souches de *Bacteroides* et *Roseburia* ont été isolées et présentent de fortes activités xylanolytiques.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons sélectionné deux souches qui présentaient des activités de dégradation du xylane les plus importantes : *Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T et *Roseburia intestinalis* XB6B4, afin de caractériser leurs propriétés xylanolytiques. Ces souches présentent de plus, des caractéristiques morphologiques et physiologiques différentes. Une autre espèce de *Bacteroides* xylanolytique, *Bacteroides sp.* XB12B (qui est probablement une souche de l'espèce *B. intestinalis*) a également été intégrée à une partie de notre travail, pour comparaison. Dans les années 1980, Salyers a étudié de manière globale les systèmes enzymatiques de certains *Bacteroides* comme *B. fragilis* et *B. ovatus* mais aujourd'hui peu de données sont disponibles sur les systèmes xylanolytiques de ces bactéries. Par ailleurs, *Roseburia* est connu comme genre amylolytique et butyrogène, et a donc surtout été étudié pour ses capacités à dégrader l'amidon et à produire du butyrate, mais aucune donnée n'est disponible concernant ses propriétés de dégradation des xylanes.

Mon sujet de thèse a porté sur l'étude fonctionnelle et moléculaire des systèmes xylanolytiques des deux bactéries choisies. La revue bibliographique qui précède les parties expérimentales est composée de trois chapitres. Le premier chapitre traite de l'anatomie et physiologie du côlon, ainsi que des substrats disponibles pour le microbiote qu'il héberge. Le deuxième chapitre fait le point des connaissances actuelles sur la dégradation des fibres végétales par les microorganismes. Les différents composants des fibres végétales sont d'abord rappelés, ainsi que les aliments riches en fibres et leurs effets sur la santé. Les enzymes nécessaires à la dégradation des fibres végétales sont ensuite décrites. La régulation de l'expression des gènes codant pour les hydrolases est aussi rapidement abordée. Le troisième chapitre présente la diversité et la complexité du microbiote intestinal humain, étudiée par différentes méthodes, culturales et moléculaires, ainsi que nos connaissances actuelles de la dégradation des fibres végétales alimentaires dans cet écosystème. Enfin cette revue bibliographique se termine par un paragraphe sur l'apport de la génomique dans l'étude de la dégradation des fibres pariétales, et par la présentation des isolats étudiés dans le cadre de ma thèse.

L'introduction bibliographique est suivie de la présentation des principaux objectifs de mon travail de thèse, puis d'une partie « résultats » composée de trois chapitres distincts. Le premier chapitre concerne la caractérisation enzymatique des systèmes de dégradation des fibres végétales de *Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T et *Roseburia intestinalis* XB6B4 (Article 1). Le deuxième chapitre est focalisé sur la caractérisation moléculaire des systèmes xylanolytiques de ces deux bactéries et d'un troisième isolat *Bacteroides sp*. XB12, et enfin le dernier chapitre concerne la caractérisation d'une xylanase de la famille GH10 dont le gène a été isolé chez *B. xylanisolvens* XB1A^T (Article 2). Enfin, une discussion générale clôt ce manuscrit.

Introduction bibliographique

PARTIE A : Le côlon et les substrats disponibles pour le microbiote intestinal

I. LE COLON HUMAIN : ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE

Le côlon constitue la partie terminale de l'appareil digestif de l'Homme. Il fait suite à la partie iléale de l'intestin grêle et se termine au niveau du rectum. Il est anatomiquement divisé en trois parties : le caecum et le côlon ascendant (ou côlon droit), le côlon transverse et le côlon descendant (ou côlon gauche), (**Figure 1**). Il se dispose en cadre dans la cavité abdominale et mesure de 1 m à 1,5 m. Son volume total est de 500ml et le contenu colique moyen est de 220g dont 35g de matière sèches (Gibson, *et al.*, 1993), (Cummings & Macfarlane, 1991). Le côlon est un compartiment anaérobie, dont le potentiel d'oxydoréduction varie de -100 à -200 mV, sa température est constante à 37°C alors que le pH varie en fonction du site colique considéré de 5,5 à 7,0 (Wolin & Miller, 1983). Ces conditions sont propices au développement de microorganismes anaérobies dont l'une des fonctions est de dégrader les fibres ingérées par l'Homme.

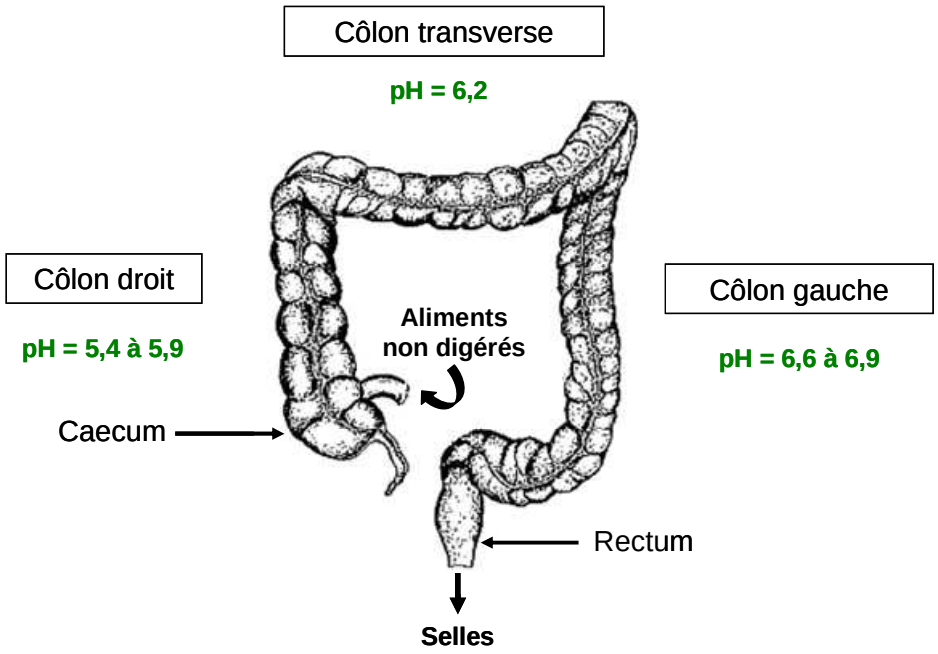


Figure 1. *Le côlon de l'Homme*

Chaque jour, environ 1,5 kg de matériel non digéré dans la partie haute du tube digestif (estomac, intestin grêle) parviennent au côlon droit, au niveau de la zone iléale. Une grande partie de ce contenu est constituée d'eau qui est rapidement absorbée. Le contenu digestif est retenu pendant 6 à 12h dans la partie proximale du côlon. Le bol alimentaire progresse ensuite vers le côlon transverse, grâce à des contractions péristaltiques irrégulières et lentes. Ces mouvements ont aussi pour effet de mélanger les résidus et favoriser l'absorption d'eau. Enfin le digesta atteint le côlon distal où le temps de rétention sera d'au moins 10 heures et les matières fécales sont stockées dans le sigmoïde. Le temps de transit d'un bol alimentaire au sein du tractus digestif est de l'ordre de 60 heures pour des individus ayant une alimentation de type occidentale (Macfarlane, *et al.*, 1992). L'excrétion fécale est en moyenne de 120g par jour (sur les 500g de résidus alimentaires arrivant dans le caecum) et la biomasse bactérienne constitue 40 à 55% du matériel excrété (Macfarlane & Macfarlane, 1997). Le côlon est le siège d'importantes fermentations dont l'intensité et les caractéristiques varient en fonction du segment colique considéré et des substrats présents. Le côlon droit peut être assimilé à un fermenteur semi-continu alors que le côlon gauche s'assimile à un système de culture de type batch dans lequel il n'y a pas d'apport ou d'élimination continue de substrats.

Le côlon a pour fonction principale d'absorber l'eau provenant des résidus alimentaires indigestibles et de les évacuer de l'organisme sous forme de fèces semi-solide. Il exerce également des fonctions essentielles pour la nutrition et la santé de l'Homme, comme l'absorption d'électrolytes provenant des aliments ingérés ou des sécrétions gastro-intestinales ou comme la fermentation des fibres alimentaires assurée par un microbiote très complexe. L'implantation et le maintien des bactéries dans le côlon sont favorisés par un bas potentiel d'oxydo-réduction et un ralentissement du temps de transit. Le côlon est donc considéré comme un écosystème microbien anaérobie hébergeant des populations bactériennes variées et complexes.

II. LES SUBSTRATS DISPONIBLES POUR LE MICROBIOTE COLIQUE

L'importante diversité des sources de carbone et d'énergie disponibles pour les microorganismes dans le côlon expliquerait, pour une large part, la grande diversité

microbienne rencontrée au sein de l'écosystème. Les substrats fermentés par le microbiote colique sont à la fois d'origine exogène (apportés par l'alimentation) et endogène (synthétisés par l'hôte) (**Figure 2**).

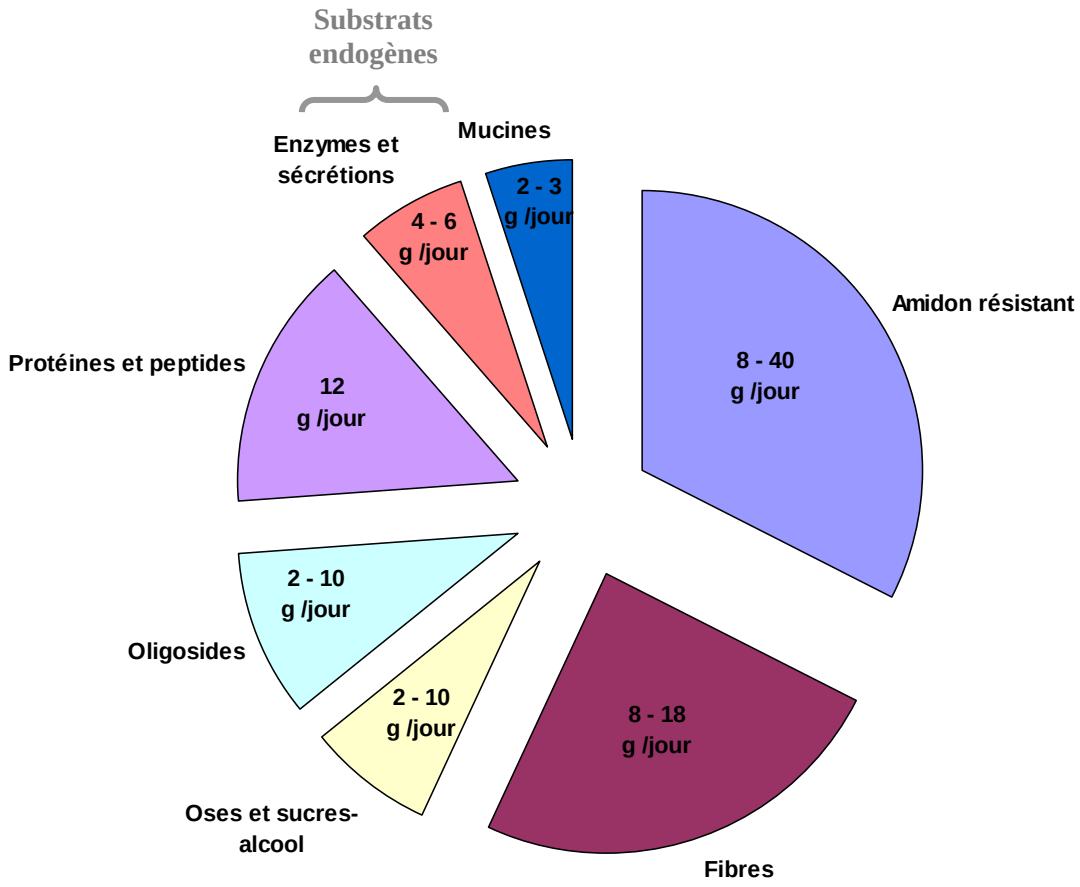


Figure 2. *Différents substrats exogènes et endogènes disponibles pour le microbiote intestinal (d'après Macfarlane et Cummings, 1991).*

Les substrats d'origine alimentaire sont essentiellement composés par les glucides non digérés dans la partie supérieure du tube digestif, les lipides et les protéines ingérés étant presque totalement absorbés dans l'intestin grêle. Ces glucides, appelés « **fibres alimentaires** » sont principalement représentés par l'amidon résistant, les polyosides des parois végétales et certains oligosides et oses. Environ 10% de l'amidon consommé échappent à la digestion dans l'intestin grêle et constituent le substrat exogène majeur parvenant au côlon (amidon résistant). Les polyosides de la paroi des végétaux, ou « **fibres pariétales** », sont principalement constitués par des glucides insolubles comme la cellulose ou les

hémicelluloses, ainsi que les pectines. Selon l'alimentation, les quantités de substrats exogènes arrivant au côlon sont différentes d'un individu à l'autre.

Dans la suite de ce manuscrit, nous appellerons « fibres pariétales» uniquement les fibres des parois végétales, en excluant donc l'amidon résistant de cette définition ; notons que pour les nutritionistes, les « fibres alimentaires », sont généralement l'ensemble des glucides qui arrivent au côlon, et comprennent donc les fibres pariétales, l'amidon résistant, des gommes et mucilages, des oligosaccharides et des sucres-alcools.

Les substrats endogènes proviennent de l'intestin grêle (enzymes pancréatiques, stérols biliaires, cellules épithéliales desquamées, mucines …) et de la paroi colique elle-même (mucopolysaccharides, mucines …). Les sécrétions pancréatiques, contenant une grande variété d'enzymes hydrolytiques, représentent une des sources importantes d'azote organique pour le microbiote colique.

PARTIE B : Les fibres végétales et les enzymes nécessaires pour les dégrader

I. LES FIBRES VEGETALES

Les végétaux comportent une proportion importante de polymères, composant leur paroi cellulaire, qui ne sont pas dégradés dans la partie supérieure du tube digestif et sont donc une source de fibres alimentaires disponibles pour les communautés bactériennes du côlon. Ces polymères sont soit de nature glucidique (cellulose, hémicelluloses et pectines) soit de nature non glucidique (lignine et tanins). Ces divers polymères sont étroitement imbriqués les uns dans les autres et de nombreuses liaisons non covalentes assurent la cohésion de l'ensemble (**Figure 3**). Ces fibres rencontrées dans notre alimentation (céréales, légumes ou fruits) sont classées en fibres insolubles (cellulose et certaines hémicelluloses) ou solubles (pectines et certaines hémicelluloses). La proportion de ces différents polymères varie selon l'espèce végétale, le tissu considéré et l'âge de la plante.

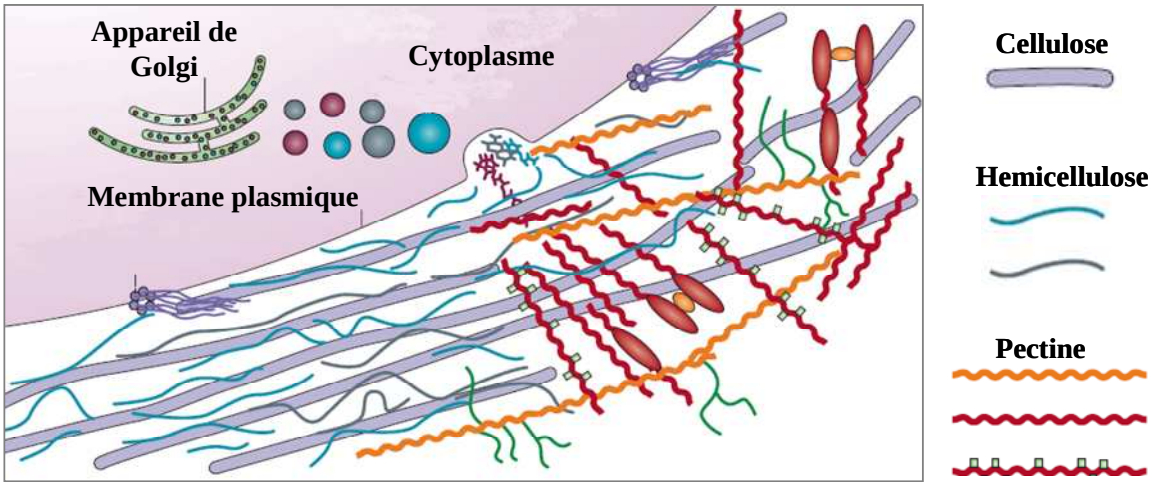


Figure 3. *Les différents composants de la paroi végétale (Cosgrove, 2005).*

1. Composition de la paroi végétale

1.1 La cellulose

La cellulose est le composé majeur des parois végétales (40% en moyenne) et constitue le biopolymère le plus abondant sur terre. La cellulose est retrouvée presque exclusivement chez les végétaux, mais certains animaux (tunicier, animal marin), bactéries

(*Acetobacter xylinum*) ou algues (*Valonia macrophysa*) sont capables de la synthétiser (Iguchi, *et al.*, 2000), (Schwarz, 2001). Le rôle de la cellulose est essentiellement structural en assurant une partie de la rigidité de la plante et en contribuant à la taille et à la forme des végétaux. La cellulose est un homopolymère insoluble relativement stable, composé d'unités glucose (D-glucopyranose) liées par des liaisons β,1-4 (Brown & Saxena, 2000). Chaque résidu subit une rotation de 180° par rapport à ses voisins, le cellobiose est donc l'unité structurale de base de la cellulose (**Figure 4A**). Grâce aux liaisons glycosidiques β,1-4, cet homopolymère possède une structure complètement linéaire dont le degré de polymérisation varie entre 200 et 25 000 résidus glucose (Brown & Saxena, 2000).

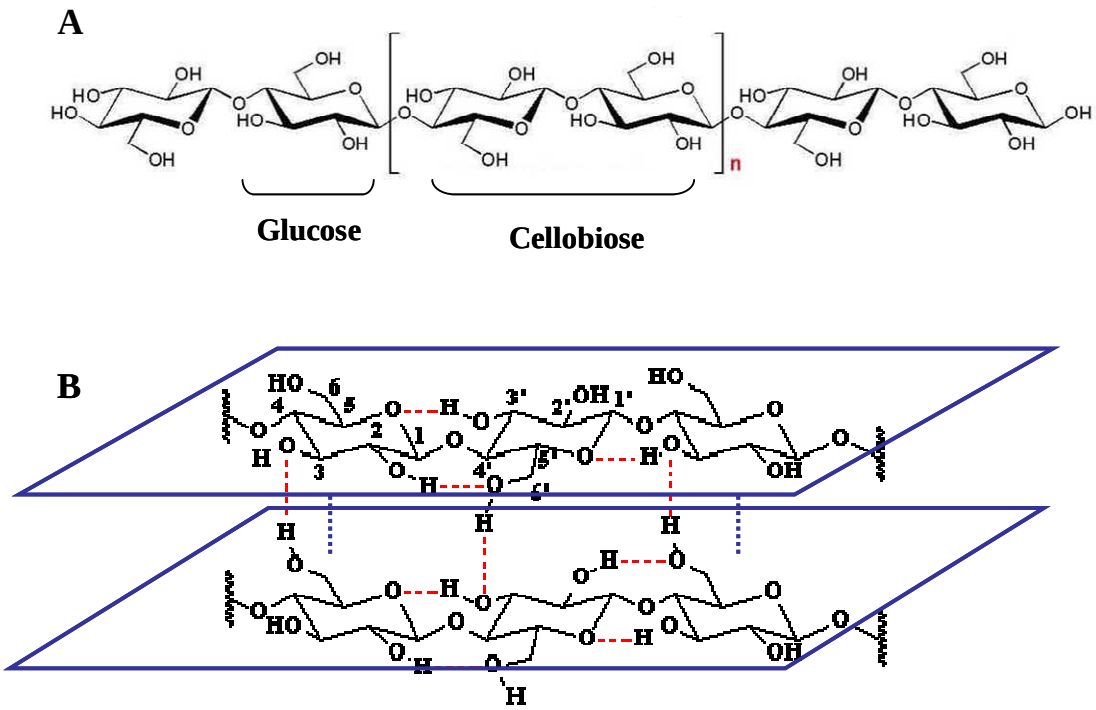


Figure 4. *Structure moléculaire de la cellulose (A) – Liaisons intra et inter-chaînes (B).*

Les chaînes de cellulose sont associées entre elles de façon parallèle, les une aux autres en réseaux cristallins. Des liaisons hydrogène intra et inter-chaînes, et des forces de Van der Waals assurant la cohésion de l'ensemble (**Figure 4B**). Cet ensemble forme des microfibrilles d'une épaisseur de 3 à 5 nm et plusieurs µm de longueur, contenant 15 à 45 molécules de cellulose (**Figure 5A**), (Ljungdahl & Eriksson, 1985). Au sein des microfibrilles, en plus de régions cristallines, il existe des régions moins structurées dites amorphes, situées notamment aux extrémités des microfibrilles ou dans des zones de torsion (**Figure 5B**). La proportion entre les régions cristallines et amorphes varie en fonction du

degré de polymérisation, des liaisons et de la source de la cellulose (47% pour la cellulose Avicel commerciale et 70% pour la fibre de coton par exemple).

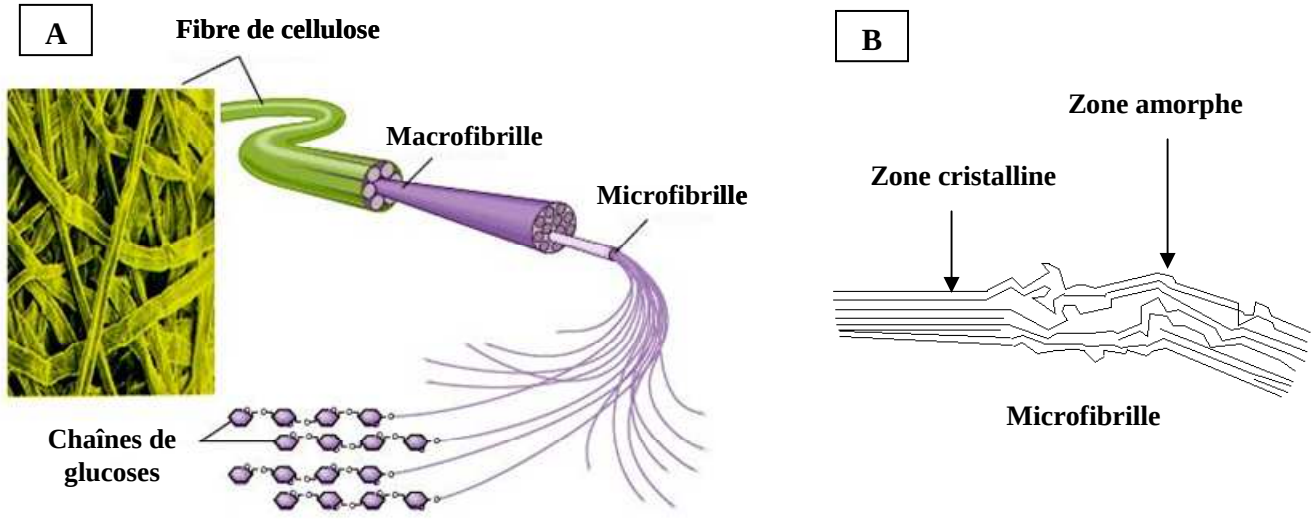


Figure 5. *Représentation schématique d'une chaîne de cellulose (A) – Microfibrille de cellulose (B)*

1.2 Les hemicelluloses

Les hémicelluloses ont un rôle structural dans la flexibilité et la plasticité des parois cellulaires. Leurs concentrations varient de 15 à 40% de la matière sèche chez les graminées et de 8 à 15% chez les légumineuses. Les « hémicelluloses» ont d'abord été définies comme le résidu soluble en milieu alcalin après élimination des pectines des parois végétales. Elles comprennent donc un ensemble de polyosides, le plus souvent hétérogène, formés par des résidus glucose, xylose, mannose, galactose, arabinose, fucose, acides glucuronique et galacturonique. Quatre groupes sont définis en fonction de leur structure primaire : les xyloglycanes (xylanes), les mannoglycanes (mannanes), les β-glucanes, et les xyloglucanes.

Les hémicelluloses peuvent avoir leur chaîne principale constituée par un seul type d'ose, comme les ***xylanes*** (constitués d'un enchaînement de xylose), les ***mannanes*** (constitués d'un enchaînement de mannose), ou les ***β-glucanes*** (enchainement de glucose) ; d'autres ont une chaîne principale constituée par plusieurs types d'oses, comme les ***arabinogalactanes*** (constitués d'un enchaînement de galactose et arabinose) par exemple ou les ***xyloglucanes***.

Des liaisons osidiques de types β,1-3, β,1-4 ou β,1-6 les relient entre eux pour former une chaîne principale où viennent se greffer des chaînes latérales. La solubilité des hémicelluloses varie considérablement avec le nombre de ramifications. On retrouve donc les hémicelluloses solubles comme l'arabinogalactane ou insolubles comme le xyloglucane et certains xylanes. Les xylanes sont les hémicelluloses les plus abondantes et sont considérés comme étant la seconde source de polysaccharides, après la cellulose, dans le règne végétal.

Les xylanes

Les xylanes sont les hémicelluloses majoritaires des céréales et des monocotylédones. Ils peuvent représenter de 15 à 40% de la matière sèche des céréales (Fry, 1988).

Les xylanes sont composés d'une chaîne principale de résidus β-D-xylopyranose reliés par des liaisons β,1-4. Sur ce squelette de base sont greffées des ramifications dont la proportion et la distribution sont variables selon l'espèce végétale. Certains de ces résidus xylose, portent des groupements acétyl, méthyl, méthylglucuronyl ou arabinofuranosyl qui forment alors des chaînes latérales (**Figure 6**).

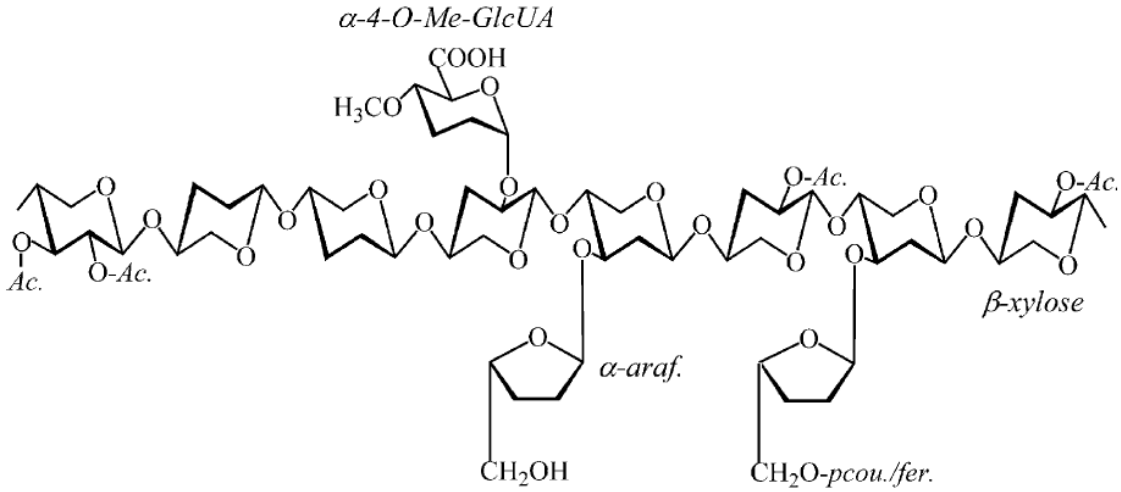


Figure 6. *Structure moléculaire du xylane*

L'arabinose (sous la forme α-L-arabinofuranose), qui est le substituant majeur au sein des arabinoxylanes (AX), est positionné en *O*-2 ou *O*-3 des résidus xylose. Les glucuronoxylanes (GX) sont caractérisés par la présence de substituants d'acide α-D-glucuronique (ou de son dérivé 4-O-méthyle) en position *O*-2 des résidus xylosyl. Lorsque ces deux types de substitution sont présentes, les xylanes sont appelés glucuronoarabinoxylanes (GAX) ou arabinoglucuronoxylanes (AGX) selon la prédominance de l'un ou de l'autre des substituants.

Lorsque les xylanes comportent une proportion non négligeable de ces divers substituants, on parle d'hétéroxylanes (HX). Dans la paroi des graminées, on retrouve des acides férulique ou *p*-coumarique, substituant les résidus arabinosyl des chaînes de xylanes. Sous forme libre ou de dimère, ils peuvent relier deux chaînes de xylanes ou êtres liés aux lignines en créant des liaisons covalentes : éthers ou esters (Jarrige, *et al.*, 1995). Le type et le degré de substitution du xylane dépendent du tissu végétal et des différentes espèces végétales (**Figure 7**).

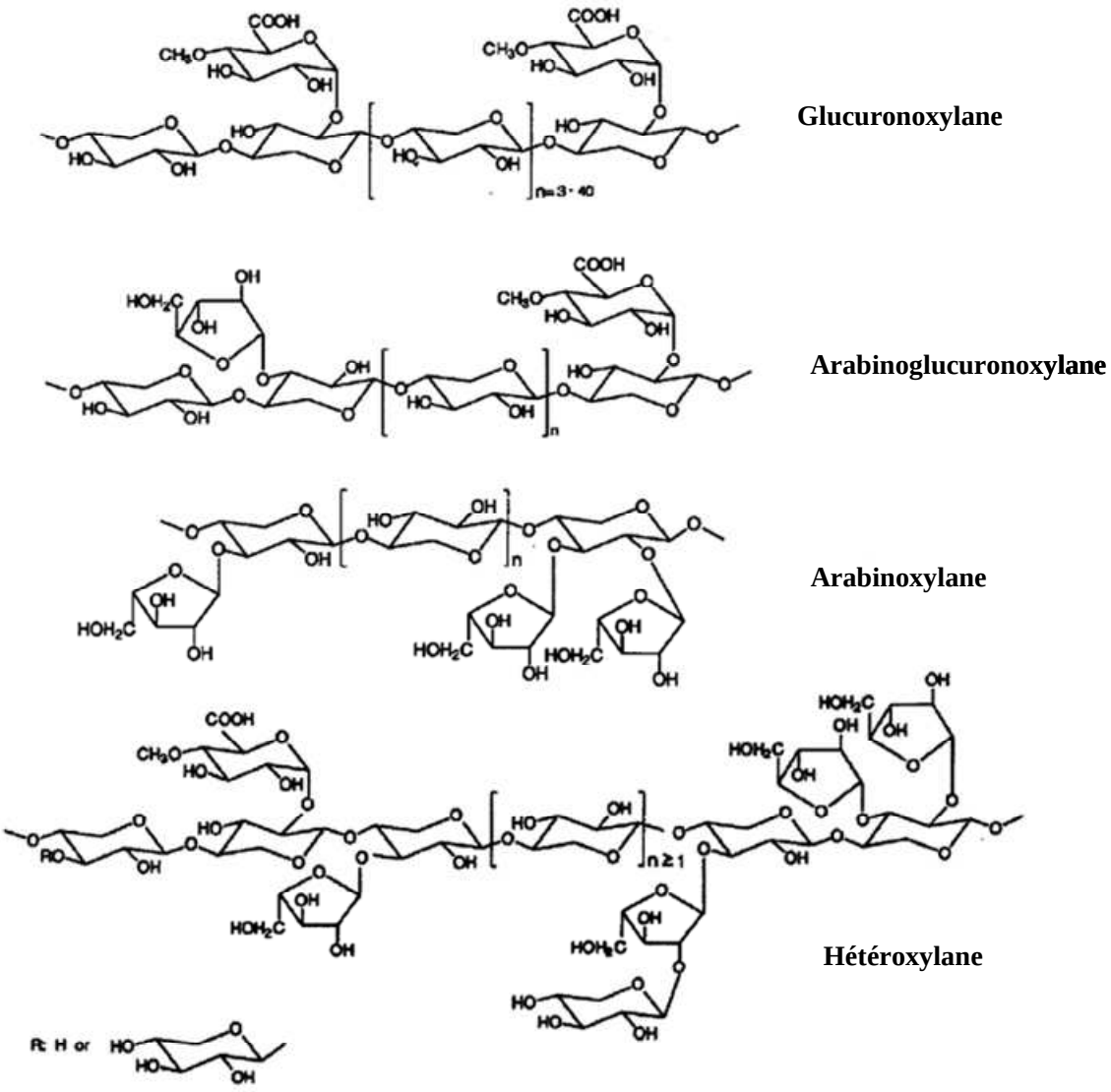


Figure 7. *Structures des différents types de xylanes (Ebringerova, et al., 2000)*

Les autres hémicelluloses

Les xyloglucanes sont constitués d'une chaîne de résidus D-glucopyranose reliés en β,1-4 portant des D-xylopyranoses branchés en position 6. Cette chaine latérale peut

comporter des agencements différents de résidus xylose et glucose (XXGG ou XXXG) D'autres substituants tels que des α-L-arabinofuranose peuvent également être présents.

Il existe deux types de mannanes : les galactomannanes formés de résidus mannose reliés en β,1-4, et les glucomannanes comprenant à la fois des résidus D-mannose et D-glucose reliés en β,1-4. Ces deux types de polyosides peuvent être plus ou moins substitués par des D-galactopyranose sur la position 6 des mannoses de la chaîne.

Les β-glucanes sont constitués d'une chaîne de D-glucoses reliés par des liaisons mixtes β,1-3 et β,1-4. Le rapport entre les deux types de liaison est variable selon le végétal considéré. Les β-glucanes peuvent former des gels très visqueux.

1.3 Les pectines

Les pectines constituent le troisième type de polysaccharides des parois végétales. Elles forment un gel qui joue un rôle dans la porosité et la densité des parois. La caractéristique majeure des pectines réside dans leur squelette principal formé d'acides galacturoniques liés en α1-4 présentant trois principaux types d'arrangements structuraux. La forme la plus simple consiste en une chaîne linéaire d'acides galacturoniques, appelée homogalacturonane (HGA). Il existe d'autres polysaccharides pectiques plus complexes comme le rhamnogalacturonane I et II (RG-I et RG-II) ou le xylogalacturonane (Cosgrove, 2005) (**Figure 8**). La teneur en pectines des végétaux varie beaucoup en fonction du tissu végétal concerné et de son âge.

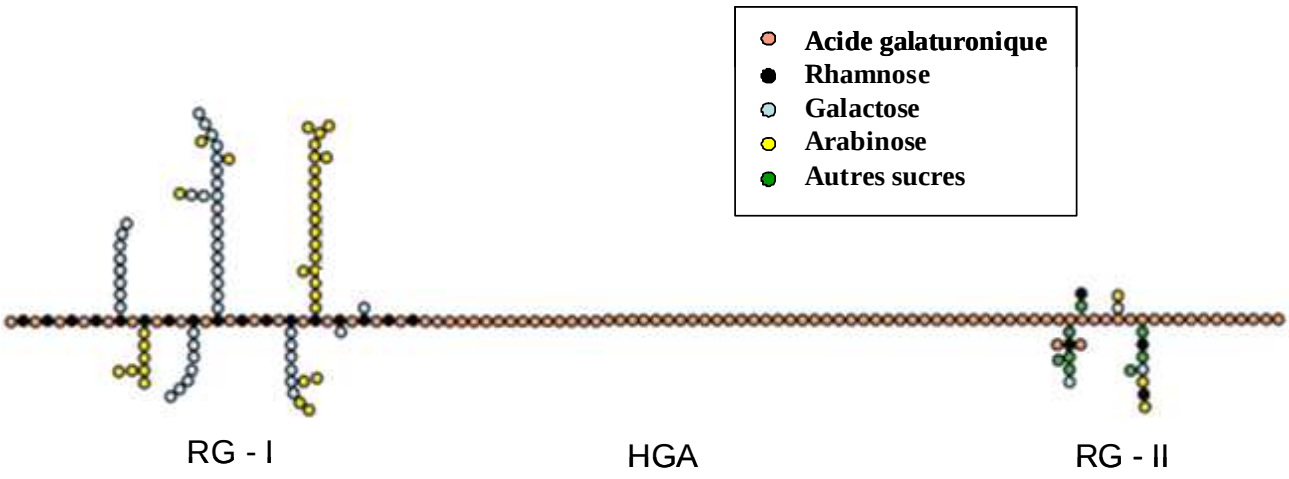


Figure 8. *Structure schématique des pectines (Willats, et al., 2001).*

1.4 La lignine

La lignine est un polymère phénolique ramifié et amorphe, de haut poids moléculaire. La structure de la lignine est très complexe et apparaît comme aléatoire et désorganisée. Elle est constituée essentiellement de trois alcools aromatiques : l'alcool conifé rylique, l'alcool coumarylique et l'alcool sinapylique (**Figure 9**). La lignine est un composé insoluble présent notamment dans les fibres de céréales. Sa difficile dégradation fait d'elle un puissant rempart contre l'attaque des microorganismes (Boerjan, *et al.*, 2003 ; Boudet, *et al.*, 2003).

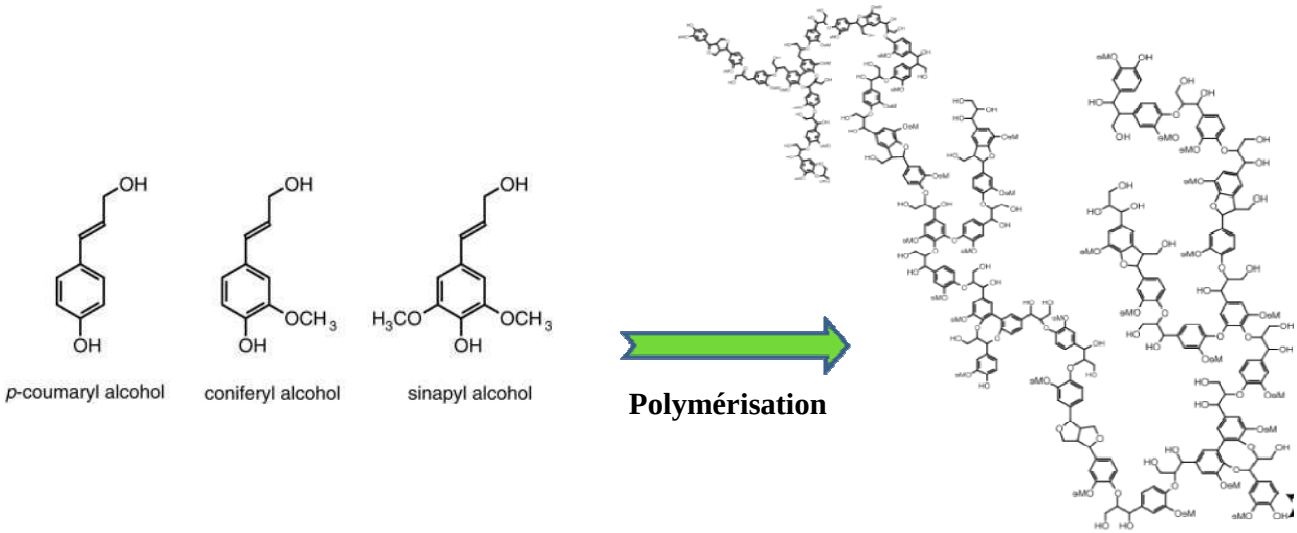


Figure 9. *La lignine (Hatfield & Vermerris, 2001).*

1.5 Autres constituants des parois végétales

Des protéines structurales appelées extensines sont souvent associées de façon covalente à la paroi des cellules de dicotylédones. Elles emprisonnent d'autres polymères à l'intérieur de la matrice végétale de sorte que les parois cellulaires forment des enchevêtrements de polymères. Les protéines sont un composant mineur des parois végétales. Des composants lipidiques (cires, cutine et subérine) sont aussi présents dans la paroi secondaire, assurant ainsi une protection à la surface des cellules.

2. Organisation de la paroi végétale

La paroi végétale est une enveloppe cellulaire qui contribue à la rigidité du végétal et supporte la croissance des cellules, elle est aussi une barrière protégeant la cellule contre la pression osmotique, les stress mécaniques ou chimiques et les infections virales, fongiques ou bactériennes (Carpita & Gibeaut, 1993). Elle joue également un rôle dans la différenciation et

la communication cellulaire (Cosgrove, 2005). La structure des parois végétales varie en fonction de l'âge, de l'espèce végétale et de la nature des tissus considérés. Cependant, il existe des caractéristiques structurales communes à toutes les parois végétales (Roland 1980). En fonction de la nature des tissus végétaux et de l'état de maturité de la cellule, trois niveaux d'organisation de la paroi peuvent être distingués en microscopie électronique **(Figure 10-gauche)**.

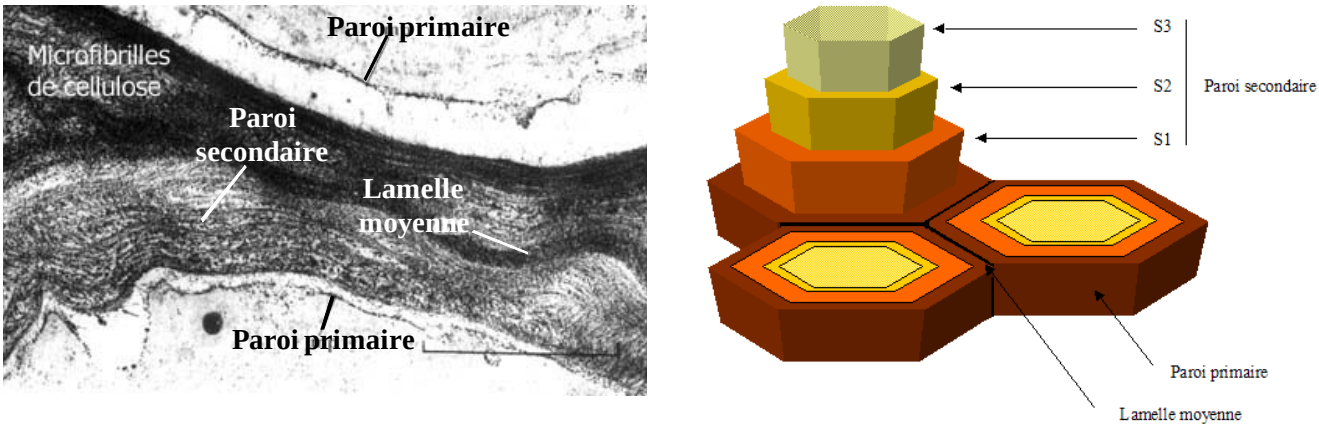


Figure 10. Gauche : *Paroi d'une cellule végétale observée en microscopie (X 45 000) - (Roland 2001).* **Droite :** *Schéma de la paroi végétale.*

- **La lamelle moyenne**

La lamelle moyenne ou mitoyenne est une fine couche de 0,5 à 2µm d'épaisseur, riche en substances pectiques. Elle sépare deux cellules voisines et assure la cohésion inter-cellulaire **(Figure 10-droite).**

- **La paroi primaire**

La paroi primaire caractérise des cellules jeunes non différenciées en phase de croissance. Cette paroi est fine (0,03 à 1µm d'épaisseur), souple, extensible, hydrophile et de faible résistance mécanique. Elle est composée de 60 à 80% d'eau et de microfibrilles de cellulose imbriquées dans une matrice amorphe riche en hémicelluloses, en pectines et en protéines de structure (Carpita & Gibeaut, 1993). Les ramifications de ces polymères apportent au microbiote colique des composés variés comme le xylose, le fucose, l'arabinose, le rhamnose et divers acides uroniques. Ces fibres sont dégradées à 80% dans le côlon humain (MacFarlane & Gibson, 1991).

- **La paroi secondaire**

La paroi secondaire est synthétisée par des cellules en fin de croissance, au cours de la différenciation cellulaire. Contrairement à la paroi primaire, elle est épaisse, compacte, rigide et très résistante et constituée de couches concentriques de cellulose cristalline. L'orientation des microfibrilles de celluloses perpendiculairement les unes aux autres permet de distinguer trois sous couches S1, S2 et S3.

Les parois végétales sont plus ou moins lignifiées. Les lignines surtout présentes au niveau de la lamelle moyenne et la paroi primaire, confèrent une rigidité aux parois. La composition de la paroi en cellulose, hémicelluloses, pectines et lignine est très variable selon l'origine végétale. La complexité de la structure de la paroi végétale ne permet pas de donner une description complète de l'arrangement de ces différentes molécules. Ce niveau d'organisation permet d'illustrer la complexité de ces parois et donc les difficultés rencontrées par les microorganismes du côlon humain pour hydrolyser cette biomasse végétale.

3. Les aliments riches en fibres végétales

Les méthodes analytiques servant à mesurer la quantité de fibres végétales sont moins bien normalisées que pour la plupart des autres composants alimentaires (Prosky, *et al.*, 1994 ; Schweizer, 1990 ; Mertens, 2003 ; Englyst, *et al.*, 1995). La méthode couramment utilisée pour quantifier le taux de fibres végétales dans les aliments est la méthode enzymo-gravimétrique. Cette méthode mesure la proportion de fibres pariétales totales en simulant la transformation des aliments dans le tube digestif (utilisation d'enzymes) de manière plus précise que ne le faisaient les anciennes méthodes rudimentaires à base de produits chimiques (Prosky, 2000). Les sources de fibres pariétales les plus importantes sont les enveloppes des céréales, plus communément appelées sons de céréales. Le son de blé, par exemple, contient 46 grammes de fibres pariétales pour 100g, dont plus de 90% sont des fibres insolubles. Dans les autres produits végétaux, la quantité de fibres est variable (**Tableau 1**).

Les fruits et les légumes contiennent approximativement 1 à 8 grammes de fibres pariétales pour 100 grammes, avec environ la moitié de fibres solubles. Les données relatives à la composition détaillée de ces différents composants sont rares. Les poireaux, choux et épinards sont très riches en cellulose et hémicelluloses alors que le haricot vert par exemple,

est constitué de cellulose, de pectines et de lignine. D'autres exemples sont présentés dans le **Tableau 2**.

Tableau 1. *Composition en fibres pariétales de différents produits végétaux (D'après le répertoire général des aliments, Favier, et al., 1995).*

Quantité de fibres pariétales (en g / 100g d'aliment)					
Légumes		***Fruits***		***Féculents / Noix***	
Salsifis	**4,0**	Groseille	**8,0**	Noix de pécan	**9,5**
Poireau	**3,5**	Goyave	**6,0**	Topinambour	**7,6**
Choux vert	**3,4**	Banane	**5,8**	Noisette	**6,5**
Carotte	**3,0**	Ananas	**1,4**	Petit pois	**6,0**
Haricot vert	**3,0**	Myrtille	**3,0**	Noix	**5,5**
Epinard	**2,7**	Datte fraiche	**2,7**	Châtaigne	**5,0**
Salade	**1,5**	Kiwi	**2,5**	Maïs	**4,0**
Courgette	**1,1**	Raisin	**0,7**	Pomme de terre	**2,1**

Tableau 2. *Composition détaillée des composants des fibres pariétales (valeurs en g/100g) D'après Schweizer 1992.*

	Cellulose	***Hémicellulose***	***Lignine***	***Pectine***
Pomme	**0,72**	**0,45**	**0,08**	**0,44**
Orange	**0,60**	**0,08**	**0,02**	**0,57**
Fraise	**0,50**	**0,21**	**0,23**	**0,36**
Tomate	**0,35**	**0,08**	**0,19**	**0,21**

La digestibilité de la cellulose, des hémicelluloses, des pectines et de la lignine a été suivie dans de nombreuses études (Rosado, *et al.*, 1991 ; Joshi & Agte, 1995). Les résultats suggèrent que la cellulose est dégradée à 65%, les hémicelluloses de 50 à 70%, la lignine à 8% et enfin la pectine, qui est la fibre pariétale la plus digestible, est dégradée à 99%. Toutefois, d'importantes variations inter-individuelles ont été observées dans toutes ces études (Cummings, *et al.*, 1979).

4. Consommation des fibres alimentaires et principaux « effets santé »

Les fibres alimentaires sont reconnues pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine. Il n'y a pas d'AJR officiel (apport journalier recommandé) pour la consommation de fibres alimentaires, cependant une valeur d'au moins 25g par jour est retenue en tant que recommandation. Les ANC (apports nutritionnels conseillés) sont donnés pour la population française, par tranche d'âge en g/jour (soit 25 à 30g/jour pour les adultes et 15g/jour pour un enfant de 10ans par exemple). De nos jours, l'apport en glucides pariétaux est de 15 à 22g par jour, ce qui est insuffisant, 50% de cette consommation proviennent des produits céréaliers, 32% des légumes, 16% des fruits et 3% des légumes secs.

Depuis quelques années, de nombreuses études concernant les effets de la consommation des fibres sont menées, et toutes s'accordent à dire qu'une alimentation riche en fibres assure le maintien en bonne santé. En effet, de nombreuses qualités sont attribuées aux fibres alimentaires : ces qualités sont dues, d'une part aux fibres en elles-mêmes et aux éléments qu'elles apportent à l'organisme, et d'autre part à leur fermentation par le microbiote intestinal.

4.1 Effets sur les fonctions intestinales

Les fibres alimentaires, et en particulier les fibres pariétales, agissent sur le transit digestif en augmentant le volume et réduisant la consistance des fèces grâce à leur capacité de rétention d'eau et d'échange d'ions. La capacité d'absorption de l'eau dépend du type de fibre (structure tridimensionnelle) et de la taille des particules, toutes les fibres n'ont donc pas le même effet sur le transit. Les fibres insolubles, comme la cellulose, régulariseraient la fonction intestinale (augmentation de l'excrétion de substrat) pour que le temps de transit soit d'environ 48 heures (Borel, 1990).

Les fibres pariétales solubles, hautement fermentescibles, ont également un effet laxatif. Ces fibres, qui permettent une croissance bactérienne importante, ne sont pas retrouvées dans les selles, dans ce cas l'augmentation du volume fécal est due à l'augmentation de la masse bactérienne (Stephen & Cummings, 1980 ; Kurasawa, *et al.*, 2000).

4.2 Effets sur les maladies cardiovasculaires

Les fibres alimentaires peuvent jouer un rôle important dans la prévention des maladies cardio-vasculaires. En effet, les fibres pariétales solubles ont un effet hypocholestérolémiant

significatif, puisqu'elles permettraient de faire diminuer le taux de cholestérol-LDL, considéré comme un facteur à risque des maladies cardio-vasculaires. D'après l'étude de Brown en 1999, une consommation de 12 à 24 grammes de pectines par jour permettrait de faire diminuer le taux de cholestérol-LDL de 13%, car leur fermentation permet d'insolubiliser les sels biliaires, ce qui diminue à la fois leur toxicité et leur possibilité de réabsorption (Brown, *et al.*, 1999). D'autres études ont aussi montré que des individus ayant une alimentation riche en fibres pariétales (notamment riche en céréales et en graines entières), présenteraient un risque de maladie cardio-vasculaires diminué de 29% par rapport à des individus qui en consomment peu (**Tableau 3**) (Anderson, *et al.*, 2009). Ainsi une consommation de psyllium ou de β-glucanes d'avoine permettrait de diminuer le taux de cholestérol-LDL de 5,5% en 8 semaines (Katan, *et al.*, 2003) ou 7% en 6 mois, soit un risque de maladies cardio-vasculaires diminué de 25% environ au bout d'une année (Tuomilehto, *et al.*, 1988).

Tableau 3. *Effet de la consommation de fibres pariétales sur la prévalence de différentes maladies (Anderson, et al., 2009).*

	Nombre de sujets	*Diminution du risque*	*Références*
Maladies cardio-vasculaires	158 327 (7 études)	29%	*Anderson et al, 2004*
Accidents vasculaires	134 787 (4 études)	26%	*Liu et al, 1999; Steffen et al, 2003 Burr et al, 1989; Ascerio et al, 1998*
Diabète	239 485 (5 études)	19%	*Anderson et al, 2007*
Obésité	115 789 (4 études)	30%	*Anderson et al, 2008*

4.3 Effets sur le diabète et l'obésité

Les fibres alimentaires peuvent aussi avoir un effet positif sur le diabète et l'obésité qui sont souvent deux maladies associées (**Tableau 3**). D'une part, les aliments riches en fibres pariétales doivent être mastiqués plus longtemps, ce qui a tendance à réduire la suralimentation car les fibres augmentent la satiété et l'estomac se vide plus lentement, ces phénomènes ont donc un effet sur la satiété et sont bénéfiques pour les individus souffrant d'obésité. En suivant un régime supplémenté en fibres insolubles, une perte de poids de 2 à 3,2% a été observée en 4 semaines et de 2,9 à 4,9% en 8 semaines (Anderson, *et al.*, 2008). D'autre part, les fibres solubles dites visqueuses, retrouvées dans le riz, les graines entières (Pereira, *et al.*, 2002) ou le psyllium (Ziai, *et al.*, 2005) permettent de réguler la glycémie et l'insulinémie après leur ingestion (Jang, *et al.*, 2001). De part leur structure, ce type de fibres

conduirait à la formation d'un gel, ralentissant la vidange de l'estomac et régulant ainsi l'absorption du glucose. En suivant un régime enrichi en fibres solubles visqueuses, les personnes souffrant d'un diabète de type I ou II peuvent donc limiter les prises d'insuline médicamenteuse (Anderson, *et al.*, 2009).

4.4 Effets associés à la fermentation colique des fibres

Les fibres alimentaires ont aussi des effets bénéfiques qui sont dus à leur fermentation par le microbiote colique. Cette fermentation va conduire à la production d'acides gras à chaine courte (AGCC) qui sont rapidement absorbés par le côlon et stimuleraient l'absorption d'eau et de sodium (Hebuterne 2002). De plus, ces AGCC sont une source d'énergie importante pour les bactéries et pour différents organes de l'Homme. L'effet bénéfique majeur de la fermentation colique des fibres sur la santé de l'homme serait lié à l'effet protecteur vis-à-vis du cancer colique (Key & Spencer, 2007). La majorité des études mettent en avant que les fibres pariétales les moins fermentescibles sont plus protectrices que les fibres pariétales hautement fermentescibles. En effet, par leur encombrement digestif, les fibres les moins fermentescibles diluent les agents potentiellement cancérigènes et diminuent leur agressivité vis-à-vis de la muqueuse colique. Le risque de cancer du côlon pourrait donc être réduit en consommant ces fibres moins fermentescibles (Lupton, 2000). Le butyrate produit lors de la fermentation des fibres, et en particulier de l'amidon et des xylanes, pourrait aussi avoir un rôle important pour lutter contre ce type de cancer (Spurling, *et al.*, 2008). Cet AGCC est capable d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses coliques et d'agir comme agent de différenciation (Siavoshian, *et al.*, 2000). Les AGCC peuvent également moduler la sécrétion de mucus dans le côlon assurant le maintien d'un pH constant au voisinage des cellules épithéliales. Enfin, les AGCC inhibent la prolifération et/ou l'adhésion de certains germes entéro-pathogènes. Dans une étude de May en 1994 par exemple, il a été montré que l'apport de fibres fermentescibles dans l'alimentation inhibe la croissance de *Clostridium difficile* ainsi que la production de toxine (May, *et al.*, 1994).

4.5 Autres effets physiologiques

Les fibres alimentaires sont aussi une source de micronutriments importante, tels que les vitamines (B et C), les minéraux (potassium et magnésium), les oligoéléments ou les antioxydants (flavonoïdes…) qui ont des effets bénéfiques pour la santé de l'Homme (Slavin, 2003 ; Anderson, *et al.*, 2009). Par exemple, les phyto-œstrogènes jouent un rôle important dans la prévention de certains cancers, notamment le cancer du sein mais aussi dans la

prévention des maladies métaboliques comme l'ostéoporose (Rowland, *et al.*, 1999). Ces phyto-œstrogènes sont métabolisés par le microbiote en métabolites souvent plus actifs, qui sont alors absorbés par la muqueuse. Enfin, le tube digestif ayant un rôle très important dans l'immunité (60% des lymphocytes du corps humain sont associés aux tissus intestinaux), la consommation de fibres alimentaires permet de stimuler le système immunitaire (Vos, *et al.*, 2007). Pour profiter de tous les effets intéressants des fibres, il est donc important d'en varier les sources, et/ou de compléter son alimentation par des compléments alimentaires riches en fibres, comme les prébiotiques.

5. Fibres alimentaires et prébiotiques

Les prébiotiques sont généralement des oligosaccharides, des sucres-alcools ou des polysaccharides à courte chaîne qui sont des substrats potentiels pour l'hydrolyse et la fermentation par le microbiote intestinal. Les prébiotiques agissent comme substrat sélectif d'une ou d'un nombre restreint de souches bactériennes bénéfiques qui résident dans le côlon, essentiellement les Bifidobactéries, et stimulent leur croissance (Gibson & Roberfroid, 1995). Il existe plusieurs familles de prébiotiques oligosaccharidiques qui peuvent être classés en deux groupes (Roberfroid, 2007). Le 1er groupe est constitué de trois familles: les fructooligosaccharides (FOS), les galactooligosaccharides (GOS) et le lactulose. Leur « statut de prébiotique » a été démontré scientifiquement. Dans le 2ème groupe, on retrouve des prébiotiques émergents comme les isomaltooligosaccharides (IMO), les oligosaccharides de soja (SOS) ou les xylooligosaccharides (XOS). L'inuline et les autres FOS sont les plus étudiés, et leur commercialisation est importante en Europe et aux Etats-Unis. Ils agissent sur la croissance des bifidobactéries : les bifidobactéries et les lactobacilles étant connus pour stimuler le système immunitaire (Roberfroid, 2007 ; Vos, *et al.*, 2007). Depuis quelques années, les XOS, notamment les arabinoxylanes, sont de plus en plus étudiés et montrent des effets très concluants vis-à-vis du métabolisme gastro-intestinal de volontaires sains (Cloetens, *et al.*, 2008). Une autre étude de 2008 (Van Craeyveld, *et al.*, 2008) a montré chez le rat, que l'ingestion de xylooligosaccharides augmenterait la concentration d'acétate et de butyrate dans les caeca, et stimulerait de manière très efficace la croissance des bifidobactéries. Ces résultats encourageants devraient permettre, prochainement, l'utilisation de ce nouveau type de substrat comme prébiotiques, à la fois chez l'Homme mais aussi dans les élevages animaux ou en aquaculture (Xu, *et al.*, 2008).

II. LES ENZYMES NECESSAIRES POUR DEGRADER LES PAROIS VEGETALES

La structure des parois végétales étant très hétérogène et complexe, leur dégradation nécessite une grande diversité d'enzymes. Les bactéries fibrolytiques sont donc capables de produire et de sécréter des enzymes et des systèmes enzymatiques très performants agissant en synergie pour dégrader les polysaccharides végétaux (**Figure 11**). La majeure partie de nos connaissances concernant les différentes enzymes impliquées dans la dégradation des fibres, provient des études menées sur les bactéries fibrolytiques du rumen ou du sol. La dégradation complète des parois végétales en sucres simples nécessite différents types d'enzymes. Dans la suite de cette revue bibliographique, nous nous focaliserons sur les glycosydes hydrolases, et en particulier sur les xylanases qui ont été particulièrement étudiées au cours de cette thèse.

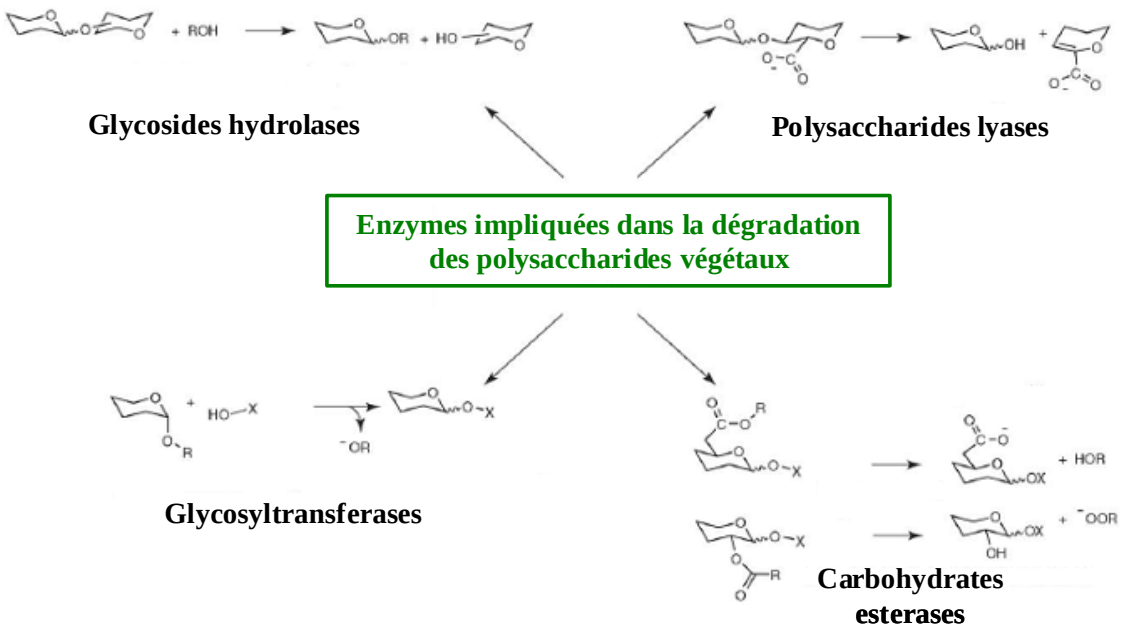


Figure 11. *Enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides végétaux (Davies, et al., 2005)*

1. Structure et mode d'action des enzymes

La plupart des enzymes impliquées dans la dégradation des parois végétales a une structure modulaire. Ces enzymes sont composées de plusieurs régions appelées domaines qui peuvent être combinées dans des ordres différents. Par exemple, toutes les glycoside-hydrolases possèdent au moins un domaine catalytique (DC) responsable de l'hydrolyse des polysaccharides et ont souvent un domaine de liaison au substrat (CBM Carbohydrate Binding Module) en position N ou C terminal (Shoseyov, *et al.*, 2006).

1.1 Le domaine catalytique

Parallèlement à la classification EC des glycoside-hydrolases (GH), réalisée en fonction de la spécificité du substrat et du type de réaction catalysée, les domaines catalytiques des glycoside-hydrolases sont classés en familles selon leur homologie de séquences en acides aminés (Henrissat & Bairoch, 1993). Un site internet CAZY, pour Carbohydrate Active enZYmes, (http://www.cazy.org/) propose un catalogue des différentes familles de glycoside-hydrolases (Henrissat, 1991). Il s'est avéré qu'au sein de chaque famille, les enzymes avaient des repliements et des mécanismes catalytiques similaires (Henrissat & Davies, 1997). Parmi les 115 familles de GH répertoriées (mise à jour du 16 septembre 2009), 3 repliements majoritaires sont observés : $(\alpha/\beta)_8$, $(\alpha/\alpha)_6$ ou en feuillets β (**Tableau 4**).

Tableau 4. *Repliements et familles de glycoside-hydrolases*

Repliement	**(β/α)8**	**(α/α)6**	**feuillets β**
Famille de GH	1, 2, 5, 10, 13, 17, 18, 20, 26, 27, 30, 31, 35, 36, 39, 42, 50, 51, 53, 59, 70, 72, 77, 79, 85, 86, 113	8, 9, 15, 37, 48, 63, 65	7, 11, 12, 16

Au sein de chaque famille, deux propriétés sont strictement conservées : les résidus catalytiques impliqués dans l'hydrolyse du substrat et la stéréochimie de la réaction (rétention ou inversion de configuration). Quant aux propriétés enzymatiques, aux spécificités et aux modes d'action des enzymes d'une même famille, ils peuvent être différents. Ces familles sont regroupées en « clan » ou en « super famille » (voir le site http://www.cazy.org/). Un clan réunit les familles ayant des similarités significatives dans leur structure tertiaire et un mécanisme d'action catalytique conservé (Henrissat & Bairoch, 1996) **Figure 12**.

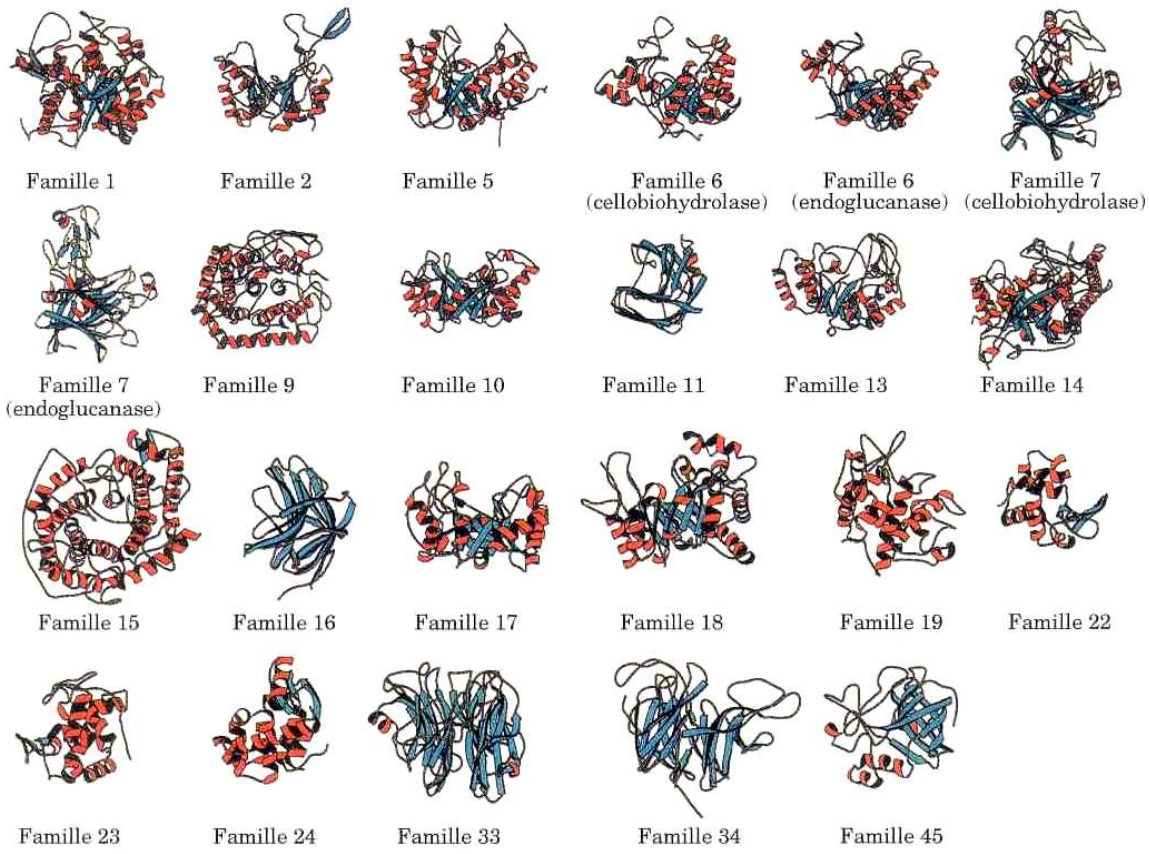


Figure 12. *Représentation des repliements tertiaires des domaines catalytiques de quelques glycoside-hydrolases. Brins β en vert, hélices α en rouge. (Davies & Henrissat, 1995)*

1.2 Les modes d'action

Les glycoside-hydrolases fonctionnent selon deux mécanismes de type acide/base, entraînant une rétention ou une inversion de la configuration du carbone anomérique du site d'hydrolyse. Le *mécanisme d'inversion* se déroule en une seule étape (substitution nucléophile) qui implique la participation d'un acide ou d'une base dans la catalyse avec l'attaque d'une molécule nucléophile, l'eau. Le *mécanisme de rétention* se déroule en 2 étapes selon un mécanisme de double-déplacement permettant la formation d'un intermédiaire glycoside-enzyme qui est ensuite hydrolysé par l'ion oxocarbonium. (**Figure 13)** (Davies & Henrissat, 2002). La réaction se poursuit par la formation d'un groupe hydroxyle à partir d'une molécule d'eau sur le carbonium et d'un proton sur le nucléophile. Ce 2ème mécanisme est majoritaire chez les xylanases et les cellulases (Tomme, *et al.*, 1995).

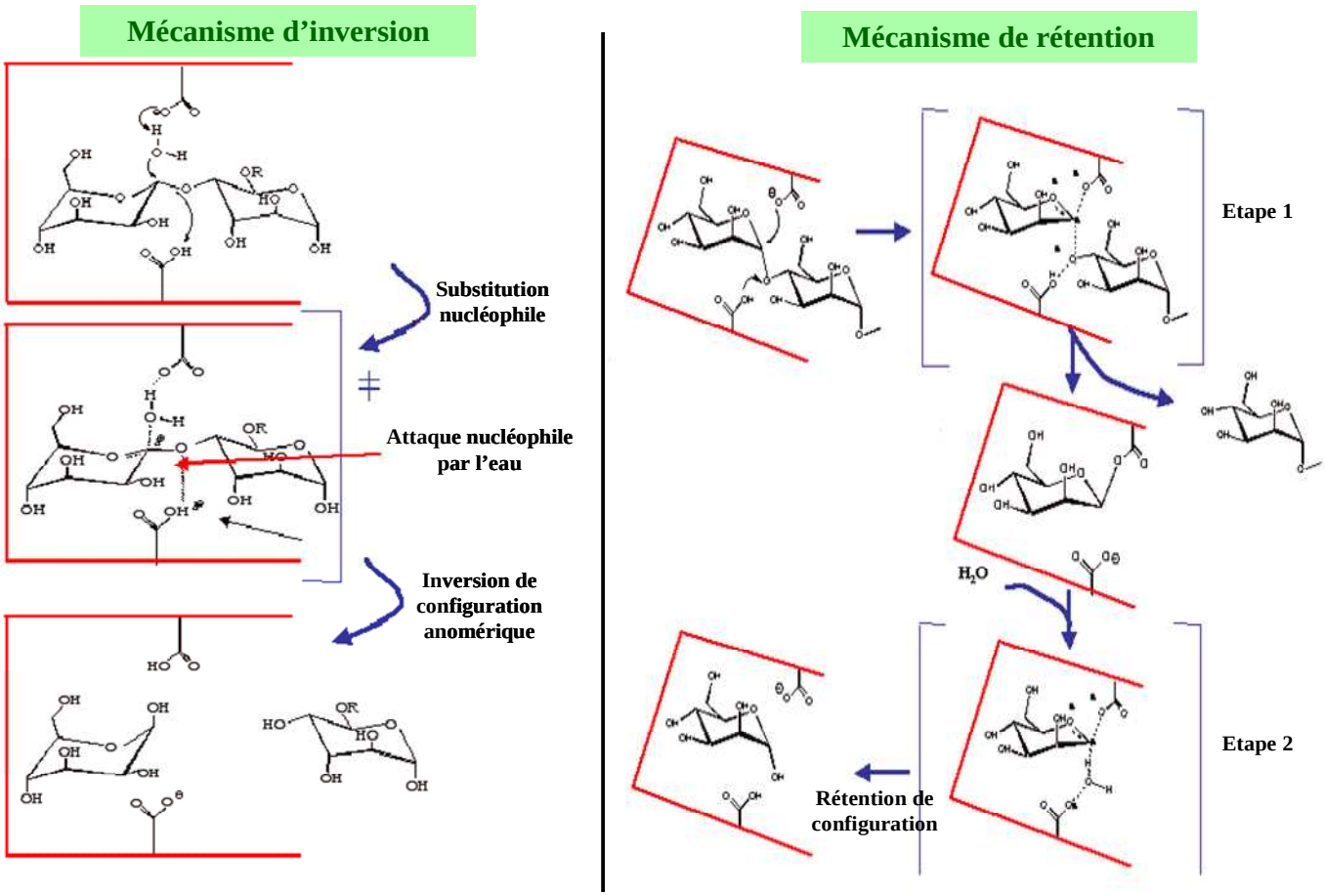


Figure 13. *Mécanismes d'inversion et de rétention de configuration obtenus lors de l'hydrolyse des polyosides par les GH*

Malgré la grande diversité des familles de GH, la topologie de leur site actif peut être classée en trois catégories selon leur forme (sillon, tunnel ou poche). La topologie du site actif reflète le mode d'action d'une enzyme. Au sein d'une même famille de GH, des enzymes peuvent avoir des sites actifs avec des géométries différentes et donc des modes d'action différents (Davies & Henrissat, 1995). La relation entre la topologie du site actif et le mode d'action des enzymes a été particulièrement étudiée dans le cas des cellulases :

- le type « endo »

Ces enzymes hydrolysent de façon aléatoire des liaisons à l'intérieur des chaînes polysaccharidiques, générant de nouvelles chaînes plus courtes et libérant ainsi de nouvelles extrémités. Le site actif de ces enzymes possède une topologie ouverte pouvant accueillir plusieurs résidus glucidiques. Une chaîne se positionne dans le sillon du site actif et la liaison glycosidique est ensuite clivée (**Figure 14**)

- le type « exo »

Cette topologie est destinée aux enzymes qui évoluent le long de la chaîne glucidique. Ces enzymes hydrolysent de façon progressive les chaînes à partir d'une extrémité, libérant ainsi des mono ou disaccharides (Davies & Henrissat, 1995). On parle alors de mode d'action de type « exo », ce mécanisme est dit processif. Enfin, certaines enzymes sont capables d'ouvrir leur site actif temporairement pour attaquer de façon « endo » une liaison glycosidique à l'intérieur d'une chaine, puis de dégrader cette dernière, à partir des extrémités qu'elle vient de générer. Ces enzymes sont appelées endoprocessives.

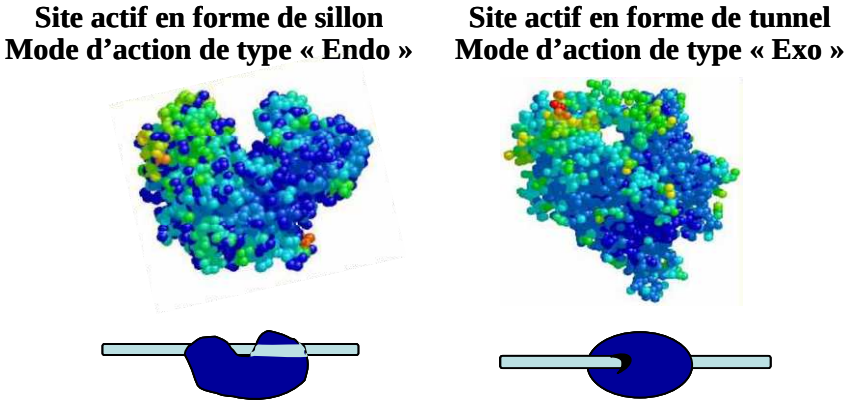


Figure 14. *Représentation de cellulases de type « endo » et « exo »*

1.3 Les domaines de liaison au substrat

Les domaines de liaison au substrat (CBM, Carbohydrate Binding Modules) ont été mis en évidence chez certaines cellulases avant d'être découverts chez d'autres enzymes, telles que les xylanases et les arabinofuranosidases. La fonction essentielle des CBM est d'augmenter la capacité de liaison des enzymes à leur substrat et de faciliter l'activité du domaine catalytique (Shoseyov, *et al.*, 2006). Néanmoins, certains CBM ont une spécificité de substrat différente de l'enzyme qui les porte. C'est le cas par exemple, de la xylanase Xyn10A de *Cellulomonas fimi*, qui possède un CBM de la famille 2a, qui se lie aux régions cristallines de la cellulose (McLean *et al.,* 2000). Ces modules sont dépourvus d'activité hydrolytique mais certains possèdent un effet déstructurant sur les polysaccharides et notamment la cellulose (Jervis 1997). Ils contiennent entre 20 et 300 acides aminés et peuvent être au nombre de 1, 2 ou 3 au sein d'une même protéine. A ce jour plusieurs centaines de séquences de CBM ont été identifiées dans plus de 50 espèces différentes. Ils sont classés dans 57 familles répertoriées dans CAZY (mise à jour du 16 septembre 2009) (http://www.cazy.org/),

(Cantarel, *et al.*, 2009). Les CBM sont classés en trois types différents (A, B et C) en fonction de la structure du site de reconnaissance et en fonction du substrat reconnu (Boraston, *et al.*, 2004).

Les CBM de type A regroupent les familles de CBM 1, 2a, 3, 5 et 10. Les CBM de type A se lient principalement aux substrats insolubles et notamment à la cellulose hautement cristalline ou à la chitine. Les sites de reconnaissance des CBM de type A ont une structure plane et riche en acides aminés aromatiques. Les CBM de type A ne se lient pas, ou peu, aux substrats solubles, mais ils peuvent être retrouvés dans des enzymes impliquées dans la dégradation des hémicelluloses ou de la pectine. La cellulose sert dans ces cas là, de support d'arrimage à ces enzymes qui vont dégrader les polymères réticulés autour de la cellulose.

Les CBM de type B possèdent des sites de reconnaissance de plus grande taille et peuvent se lier aux longues chaînes glycosidiques solubles. On retrouve les CBM 2b, 4, 6, 15, 17, 20, 22, 27, 28, 29, 34 et 36 dans le type B. Le site de reconnaissance des CBM de type B est caractérisé par une structure en forme de sillon et riche en acides aminés aromatiques.

Les CBM de type C regroupant les CBM 9, 13, 14, 18 et 32, se lient aux mono-, di- et tri-saccharides avec un nombre de liaisons hydrogène plus important que dans le type B. Le site de reconnaissance des CBM de type C est formé d'acides aminés aromatiques groupés en structure « sandwich » qui piège les substrats.

Selon leurs caractéristiques biochimiques, les CBM se fixent à de nombreux polymères présents dans les parois végétales. Dans la suite de ce paragraphe, nous nous focaliserons sur les CBM qui se lient spécifiquement aux xylanes. Ces CBM appartiennent aux familles 2b, 4, 6, 15, 22, 35 et 36 (McCartney *et al*, 2006). Les CBM9 de type C, liant les courtes chaînes osidiques, sont aussi retrouvés chez certaines xylanases, comme par exemple la xylanase Xyn10A de *Thermotoga maritima* qui porte deux CBM. Seul un des deux CBM, situé du côté C-terminal de cette protéine, présente une affinité pour les extrémités réductrices de chaînes de cellulose ou de xylane (Notenboom *et al*, 2001).

La spécificité de liaison de ces familles de CBM face à différents types de xylanes a été étudiée (McCartney *et al*, 2006). Les CBM6, 15 et 22 ne présentent pas de différence de spécificité vis-à-vis des substrats étudiés : xylane oat spelt (Xos), xylohexaose,

méthylglucuronoxylane (MGX) et arabinoxylanes (ARX). Au contraire, les CBM4 se lient très fortement aux xylohexoses et moins étroitement au Xos. Les CBM2 affichent une affinité au Xos identique à celle des CBM4, qui est 5 à 10 fois plus faible que l'affinité mesurée face aux ARX ou MGX. Enfin les CBM35 ne se lient pas aux ARX et MGX, mais affichent plutôt une préférence pour les formes non ramifiées du xylane.

Dans cette même étude, la reconnaissance des CBM face à la paroi végétale dans son ensemble a aussi été étudiée (McCartney *et al*, 2006). Les CBM des familles 2 et 15 montrent une grande capacité à se lier à la paroi secondaire des végétaux. Par contre, les CBM des familles 4, 6 et 22, affichent une capacité moins importante à se lier à la paroi secondaire. Enfin, les CBM 35 et 15 se comportent différemment et reconnaissent plutôt la paroi primaire des cellules végétales de certaines dicotylédones.

1.4 Les autres domaines

D'autres domaines peuvent être présents dans les glycoside-hydrolases :

- les modules dockérines

Ces domaines sont le plus souvent retrouvés à l'extrémité C-terminale des cellulases et permettent l'ancrage des enzymes sur des protéines d'échafaudage pour former des complexes multienzymatiques appelés « cellulosome ». Les cellulosomes s'associent et forment des protubérances à la surface des cellules bactériennes qui permettent une dégradation très efficace de la cellulose (Tomme, *et al.*, 1995 ; Bayer, *et al.*, 2004). Les cellulosomes sont retrouvés chez tous les clostridies cellulolytiques, mais aussi chez d'autres espèces bactériennes telles que les ruminocoques ou chez les champignons du rumen (Ding, *et al*., 2008). Jusqu'à présent, ces structures n'ont pas été décrites chez les bactéries fibrolytiques de l'écosystème digestif humain.

- les modules fibronectine

Les modules fibronectine de type 3 sont les plus répandus et ont des rôles divers, comme l'adhésion cellulaire, la morphologie ou la différenciation cellulaire. Ces modules sont présents dans de nombreuses GH extracellulaires bactériennes mais leur fonction est mal définie (Kataeva, *et al.*, 2002).

- les modules Ig-like

Les modules Ig-like sont présents dans certaines GH extracellulaires bactériennes, mais leur fonction est encore mal connue. Ils sont généralement impliqués dans des interactions protéines/protéines (Kataeva, *et al.*, 2004).

- les domaines SLH

Des domaines SLH, ou « Surface-layer homology » sont retrouvés en position N ou C terminale de certaines GH. Leur rôle serait d'ancrer la protéine à la surface bactérienne (Xu, *et al*., 2003 ; Xu, *et al*., 2004).

- les séquences de jonction

Des séquences appelées « séquences de jonction » séparent parfois différents domaines au sein d'un même polypeptide. Ces séquences comportent un pourcentage élevé de proline et thréonine (séquence PT) et parfois sérine (PTS), alanine et glycine (Tomme, *et al.*, 1995), (Xu, *et al*., 2003). La nature et l'arrangement des acides aminés confèrent à la protéine une flexibilité à leur niveau. Ces séquences pourraient jouer un rôle dans le maintien de l'orientation et de la séparation de chaque domaines des enzymes et donc de leur fonctionnalité.

Enfin d'autres modules sont parfois présents mais leur fonction reste totalement inconnue.

2. Les activités enzymatiques

Plusieurs types d'enzymes, spécifiques des nombreux substrats présents dans les fibres, interviennent donc dans la dégradation des parois végétales. L'ensemble de ces enzymes est résumé dans le **tableau 5**.

Tableau 5. *Principales enzymes impliquées dans l'hydrolyse des parois végétales (White, et al., 1993)*

	Enzymes	*Substrats*	*Liaisons clivées*	*Produits d'hydrolyse*
Cellulose	Endo-β-1,4-glucanase	Cellulose	β-1,4-glucose	Cellooligomères
	Exo-β-1,4-glucanase	Cellulose	β-1,4-glucose	Cellobiose
	Cellodextrinase	Cellulooligomères solubles	β-1,4-glucose	Cellobiose et cellotriose
	Cellobiase	Cellobiose	β-1,4-glucose	Glucose
Hemicelluloses	Endo-β-1,4-xylanases	Xylane	β-1,4-xylose	Xylooligomères
	Exo-β-1,4-xylanases	Xylane (extrémités)	β-1,4-xylose	Xylobiose
	β-1,4 xylosidase	Xylobiose	β-1,4-xylose	Xylose
	α-L-arabinofuranosidase	Arabinoxylane	α-1,3-xylose	Arabinoxylane et arabinose
	α-glucuronidase	Glucuronoxylane	α-1,3 ou 1,2 ac glucuronique	Glucuronoxylane et ac glucuronique
	O-acétyl xylane estérase	Acétyl xylane	Acétyl ester	Acétyl xylane et acétate
	Acide férulique estérase	Ac férulique lié aux résidus arabinose	Féruloyl ester	Acide férulique et xylane
	Acide p-coumarique estérase	Ac p-coumarique lié aux résidus arabinose	p-coumarique ester	Acide p-coumarique et xylane
	β-1,3-glucanase	Laminarine	β-1,3-hexose	Laminarine oligomères
	β-1,3-1,4-glucanase	Lichénine, β-glucanes	β-1,3 et 1,4 hexose	Lichénine oligomère, β-glucanes oligomères
	β-1,4-glucanase	Lichénine, β-glucanes	β-1,4-glucose	Lichénine oligomère, β-glucanes oligomères
Pectines	Polygalacturonase	Polygalacturane désestérifié	α–1,4 galacturonide	Acide polygalacturonique oligomères
	Polygalacturonate lyase	Méthylester de polygalacturane et pectines	α–1,4 galacturonide	Acide polygalacturonique oligomères
	Pectine méthyl estérase	Pectines	Méthyl ester	Méthanol et polygalacturane

2.1 Les cellulases

Les modules catalytiques des cellulases sont répartis dans 12 familles de GH (5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48, 51, 61 et 74). L'hydrolyse complète de la cellulose nécessite l'action synergique d'endoglucanases (hydrolysant à l'intérieur des chaînes), d'exoglucanases (hydrolysant aux extrémités des chaînes) et de cellobiases ou β-glucosidases (scindant le cellobiose en résidus glucose) (**Figure 15**). A ces trois types d'enzymes s'ajoutent les cellodextrinases qui, à partir de cellodextrines (oligosaccharides composés de 3 à 7 unités de glucose), génèrent du cellobiose ou cellotriose. Les cellodextrines sont aussi hydrolysés à partir de leurs extrémités par les β-glucosidases.

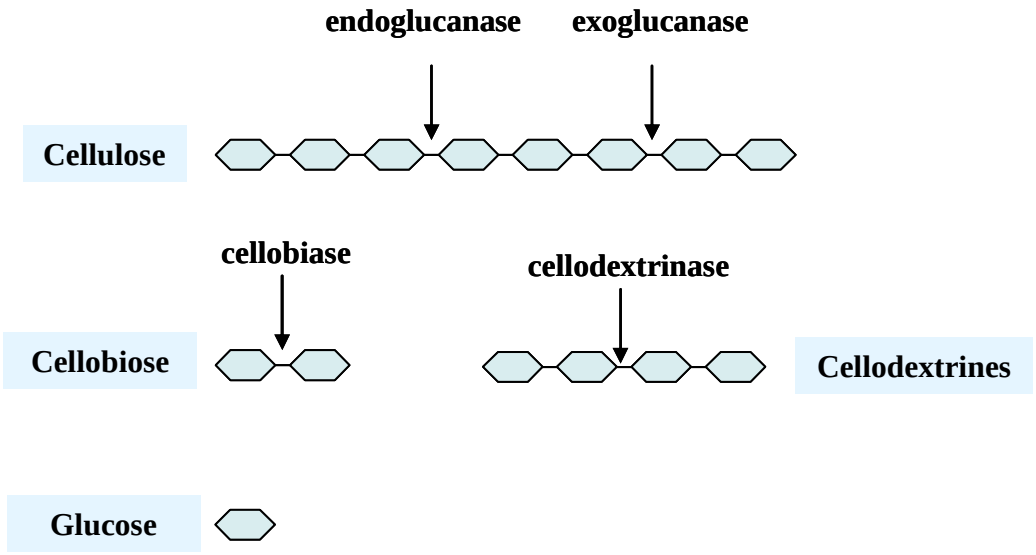


Figure 15. *Enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose*

2.2 Les pectinases

Les pectines étant très complexes, les enzymes qui les dégradent sont nombreuses et appartiennent aux glycoside-hydrolases, aux polysaccharides lyases et aux carbohydrates estérases (Hoondal, *et al.*, 2002). La dégradation des substances pectiques en composants monomériques nécessite l'action combinée de polygalacturonases (hydrolysant les chaînes principales), de pectine méthyle estérases (clivant les liaisons esters situées entre les chaînes principales et latérales) et de pectine lyases (hydrolysant la chaîne principale dé-estérifiée). Ces enzymes possèdent des intérêts biotechnologiques et sont souvent utilisées dans l'industrie (Kashyap, *et al.*, 2001).

2.3 Les hémicellulases

La diversité des hémicellulases reflète la diversité et la complexité de leur substrat.

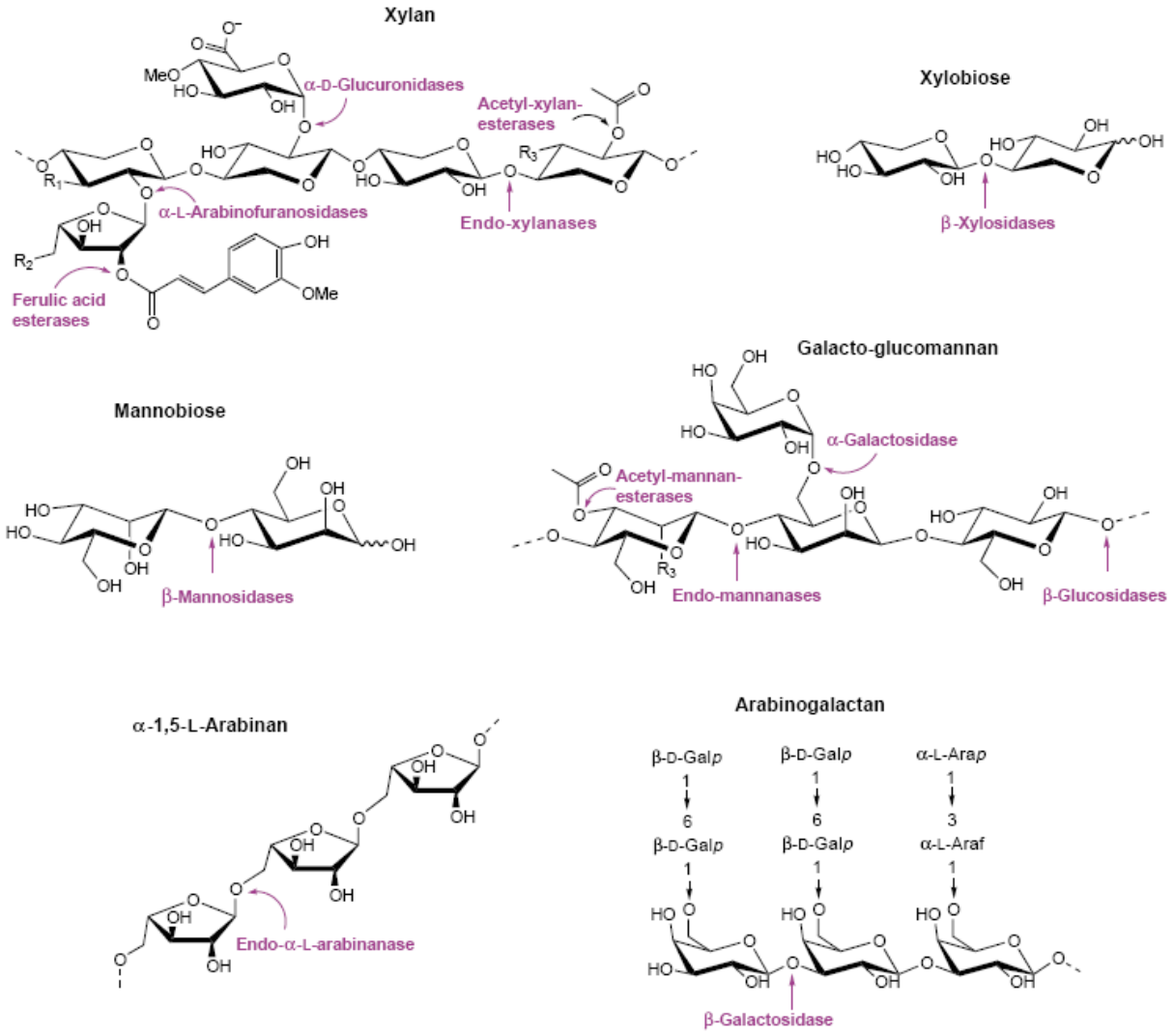


Figure 16. *Enzymes impliquées dans la dégradation des hémicelluloses d'après (Shallom & Shoham, 2003).*

Une association de différentes enzymes, appartenant à plusieurs familles de GH et de carbohydrate-estérases, est donc nécessaire pour l'hydrolyse d'un tel substrat **(Figure 16).** Deux grands types d'enzymes sont retrouvés : des enzymes qui hydrolysent à l'intérieur de la chaîne principale (comme les endoxylanases, les β-galactosidases ou les endo-mannanases) et d'autres enzymes dites « débranchantes » de type estérases (acétyle-mannane-estérase ou acétyle-xylane-estérase). Toutes ces enzymes ont elles aussi un grand intérêt industriel (Subramaniyan & Prema, 2002). Dans le paragraphe suivant, nous décrirons plus particulièrement les xylanases qui ont été plus particulièrement ciblées dans cette thèse.

3. Les xylanases

Une grande variété d'enzymes xylanolytiques sont produites par les microorganismes (**Figure 16**). Les endo et exo-xylanases permettent la coupure des liaisons glycosidiques β,1-4 liant les résidus xylose de la chaîne principale des xylanes, libérant ainsi des xylo-oligosaccharides. Les β-xylosidases hydrolysent les xylo-oligosaccharides de faible degré de polymérisation à partir de leur extrémité non réductrice. Les arabinofuranosidases et les glucuronidases libèrent les chaînes latérales de la chaîne principale en hydrolysant les liaisons entre le xylose et l'arabinose et le xylose et l'acide glucuronique, respectivement. Enfin les acides féruliques estérases et les xylane-acétyle estérases permettent de libérer les groupements acides féruliques et acétyl, respectivement (**figure 16**).

L'hétérogénéité et la complexité des xylanes exigent une abondante diversité d'enzymes, qui varient dans leurs spécificités, leurs structures ou leurs propriétés physico-chimiques (Collins, *et al.*, 2005). En plus de leur domaine catalytique xylanase, de nombreuses enzymes possèdent aussi des domaines supplémentaires, comme des CBM (paragraphe II.1.3), des domaines dockérines (Hayashi, *et al.*, 1997), des domaines thermostabilisants ou des domaines dont la fonction est encore inconnue.

Les xylanases ont d'abord été classées selon leurs propriétés physicochimiques et deux groupes ont été proposés : le 1er groupe rassemblait les enzymes de faible moléculaire (≤ 30 kDa) et de p*I* basique, et le 2ème groupe rassemblait les enzymes avec une masse moléculaire supérieure à 30 kDa et un p*I* acide (Wong *et al.*, 1988). La classification plus récente de Henrissat (Henrissat, 1991) basée sur la structure primaire des domaines catalytiques et l'homologie des séquences protéiques, est maintenant utilisée pour classer les xylanases. Les enzymes dont l'activité xylanase a été démontrée sont retrouvées dans les familles 5, 7, 8, 10, 11 et 43 des glycoside-hydrolases (Collins, *et al.*, 2005), (http://www.cazy.org/).

Des similarités existent entre certaines familles, par exemple les enzymes appartenant aux familles 5 et 10 des GH (clan GH-A) qui ont des structures tridimensionnelles proches. D'autres similarités sont aussi observées entre les familles 5, 7, 10 et 11. En effet les enzymes de ces familles ont le même mode d'action catalytique, puisqu'elles utilisent le mécanisme de rétention hydrolysé par l'ion oxocarbonium (**Tableau 6 et figure 16**).

Tableau 6. *Caractéristiques des familles de glycoside-hydrolases regroupant les xylanases (Collins, et al., 2005)*

Famille de GH	*Clan*	*Structure*	*Mécanisme catabolique*
GH 5	GH-A	(β/α)8	rétention
GH 7	GH-B	feuillet β	rétention
GH 8	GH-M	(α/α)6	inversion
GH 10	GH-A	(β/α)8	rétention
GH 11	GH-C	feuillet β	rétention
GH 43	GH-F	pale d'hélice β à 5 lames	inversion

3.1 Les xylanases de la famille GH10

Dans cette famille sont retrouvées des endo-xylanases-β,1-4, des endo-xylanases-β,1-3 et des cellobiohydrolases, mais la famille GH10 est majoritairement constituée d'endo-xylanases-β,1-4. Des études de spécificité de substrat ont montré que les xylanases de cette famille dégradent le xylane mais aussi les substrats cellulosiques de faible masse moléculaire comme les aryl-cellobiosides ou certains cello-oligosaccharides. Il a en effet été montré que le remplacement d'un ou deux résidus xylose par du glucose est toléré par cette famille, mais conduit à une activité spécifique plus faible (Biely, *et al.*, 1997). Ces enzymes hydrolysent plutôt les liaisons xylosidiques des extrémités non réductrices d'un résidu substitué ou une liaison β,1-3. Les xylanases de cette famille sont très actives sur les courts xylo-oligosaccharides, ce qui suggère la présence, au sein du domaine catalytique, d'une zone de liaison au substrat de petite taille (Biely, *et al.*, 1997). En effet, des analyses de structure ont montré que les xylanases de cette famille présentent de quatre à cinq sites de liaison au substrat (Biely, *et al.*, 1981). La majorité des membres de cette famille a des masses moléculaires élevées, un bas pIet une structure de type (β/α^8) mais on retrouve aussi dans cette famille un sous groupe de xylanases non modulaires de plus petite taille avec un seul domaine catalytique. Ces enzymes de petites tailles sont souvent intracellulaires (ou périplasmiques) et très actives sur les xylooligosaccharides, permettant à la bactérie d'internaliser directement les produits d'hydrolyse du xylane, comme suggéré pour les xylanases GH10 de *Prevotella bryantii* (Miyazaki, *et al.*, 1997) ou *Cellvibrio mixtus* (Fontes, *et al.*, 2000). Certaines de ces enzymes non modulaires ont aussi des propriétés particulières et originales comme la thermostabilité d'une xylanase périplasmique (Xyn10B) de *Thermotoga maritima* (Liebl, *et al.*, 2008).

3.2 Les xylanases de la famille GH11

A la différence de beaucoup d'autres familles de GH, cette famille monospécifique est composée de « vraies xylanases » qui dégradent exclusivement les substrats contenant du D-xylose. Les produits d'hydrolyse des xylanases GH11 sont de plus grande taille que ceux des xylanases GH10. En effet, contrairement aux xylanases de la famille GH10, les xylanases GH11 sont plus actives sur les longues chaînes de xylooligosaccharides. Il a aussi été montré que les zones de liaison au substrat sont grandes, comme par exemple les xylanases de *Schizophyllum commune* et *A. niger* qui présentent au moins sept sites de liaison au substrat dans leur domaine catalytique (Bray & Clarke, 1992 ; Vrsanska, *et al.*, 1982). Des études d'hydrolyse ont montré que les plus petits fragments libérés lors de l'hydrolyse des hétéroxylanes sont des acides aldopenturoniques portant un résidu xylose à leurs extrémités non réductrices (Biely, *et al.*, 1997). Enfin les xylanases GH11 sont caractérisées par un haut PI, une masse moléculaire faible et une structure en feuillet β.

3.3 Les xylanases de la famille GH 7

La famille GH7 comprend essentiellement des cellobiohydrolases, il n'y a pas de « vraie xylanase » dans cette famille. Cependant, une endoglucanase de *Penicillium funiculosum,* classée dans cette famille, montre également une activité sur xylanes. Elle est ainsi considérée comme une endoglucanase « à large spécificité » (Collins, 2005). Cette GH7 est active sur xylanes, mais aussi sur analogues solubles de la cellulose (hydroxyethylcellulose) ; elle hydrolyse les xylooligosaccharides, mais est beaucoup plus active sur cellodextrines. Ces différentes activités ont été largement démontrées et étoffées par des études structurales (Biely, *et al*., 1991 ; Kleyvegt, *et al*., 1997). Jusqu'à présent, c'est le seul exemple connu.

3.4 Les xylanases de la famille GH43

La majorité des enzymes regroupées dans la famille GH43 sont des β-xylosidases, qui coupent les résidus xylobiose libérés par les endoxylanases, ou des enzymes qui hydrolysent les différentes ramifications du xylane comme les arabinofuranosidases. Une seule enzyme de la famille 43 a été décrite comme ayant une activité endoxylanase (Gosalbes, *et al.*, 1991). Il s'agit de XynD de *Paenibacillus polymyxa* qui a une double activité xylanase et α-L-arabinofuranosidase. Cependant, l'interaction de XynD avec les xylanes n'a pas été confirmée par des données structurales, et les GH43 les plus proches en séquence ne présentent pas d'activité xylanase, mais sont des α-L-arabinofuranosidases (Bourgois, *et al*., 2007).

3.5 Les xylanases de la famille GH5

La famille GH5 regroupe de nombreuses enzymes qui sont essentiellement des glucanases à large spécificité (endoglucanases ou cellobiohydrolases, coupant les liaisons β (1,4), β(1,3) ou β(1,6)). Huit enzymes qui ont une activité xylanase démontrée expérimentalement ont été classées dans cette famille GH5, et d'autres xylanases potentielles ont été identifiées grâce aux analyses de séquence, chez *Clostridium acetobutylicum* (Nolling, *et al.*, 2001) ou chez *Bacteroides thetaiotaomicron* (Xu, *et al.*, 2003) par exemple. Au total, une vingtaine de xylanases sont classées dans cette famille (http://www.cazy.org/) mais les propriétés catalytiques de ces enzymes sont parfois différentes. En effet, les xylanases de *Prevotella ruminicola* 23 (Whitehead, 1993), *Clostridium cellulovorans* (Foong, *et al.*, 1991), *F. succinogenes* S85 (Cho, *et al.*, 2000) et *R. albus* SY3 (Poole, *et al.*, 1990) possèdent à la fois une activité xylanolytique et une activité carboxyméthyl-cellulase ; alors que celles de *Trichoderma reesei*, *Erwinia chrysanthemi* D1 (Hurlbert & Preston, 2001) et *E. chrysanthemi* SR120A (Braun & Rodrigues, 1993) possèdent seulement une activité xylanase.

Les analyses de séquences protéiques montrent que les quatre enzymes qui possèdent les activités carboxyméthylcellulase, possèdent uniquement des homologies de séquences avec la famille GH5. Les autres xylanases de cette famille montrent, quant à elles, des homologies de séquence avec la famille GH30, ce qui suggère que ces enzymes pourraient être classées dans une nouvelle famille ou une sous-famille située entre les familles GH 5 et GH30.

3.6 Les xylanases de la famille GH8

La famille GH8 est composée essentiellement de cellulases et de lichénases, mais elle regroupe aussi quatre endo β,1-4-xylanases. Les gènes de trois de ces xylanases GH8 ont été isolés chez *Bacillus sp*. (Takami & Horikoshi, 2000 ; (http://www.cazy.org/); Yoon, *et al.*, 1998).

La quatrième est une enzyme résistante au froid isolée de *Pseudoalteromonas haloplanktis* dans l'Antarctique (Van Petegem, *et al.*, 2003). Les informations sur les xylanases de cette famille 8 de GH sont peu nombreuses dans la littérature. Certaines propriétés enzymatiques de la xylanase de *B. spp*. KK-1 et la xylanase résistante au froid de *P. haloplanktis* ont été étudiées (Collins, *et al.*, 2002),(Yoon, *et al.*, 1998). Ces deux enzymes ont des masses moléculaires de 46 et 45 kDa respectivement et la xylanase résistante au froid à un haut pI (pH 9.5) et dégrade les xylanes en xylotrioses et xylotétraoses en étant plus active sur les longues chaînes de xylo-oligosaccharides.

4. Autres enzymes impliquées dans la dégradation des xylanes

Comme nous l'avons déjà évoqué, les xylanes nécessitent toute une panoplie d'enzymes de spécificité différente pour leur dégradation. En effet, les bactéries xylanolytiques produisent également des xylosidases, impliquées, comme les endoxylanases, dans l'hydrolyse de la chaîne polysaccharidique, ainsi que des enzymes « débranchantes », qui libèrent les substituants de cette chaîne principale : ce sont les α-L-arabinofuranosidases, les α-glucuronidases, les acétyl- et les feruloyl-esterases.

Xylosidases et α-L-arabinofuranosidases sont essentiellement retrouvées dans la famille GH43, qui affiche une spécificité pour les substrats contenant de l'arabinose, comme les arabinoxylanes. Les xylosidases sont aussi retrouvées dans les familles GH3, 30, 39, 51, 52 et 54, et les arabinofuranosidases dans les familles GH3, 51, 54 et 62 (http://www.cazy.org/). Des enzymes bifonctionnelles, affichant à la fois des activités β-D-xylosidase et α-L-arabinofuranosidase sont retrouvées chez de nombreuses espèces, et dans les familles GH3, GH43, GH51, et GH54. A titre d'exemple, XSA de *Selenomonas ruminantium,* appartenant à la famille GH 43, a ainsi révélé une forte activité d'hydolyse des xylooligosaccharides (Jordan et al, 2007).

Les α-glucuronidases appartiennent aux familles 4 et 67 des glycoside-hydrolases. Les acétyl-, et feruloyl-esterases sont classées dans les familles de carbohydrate-estérases, qui rassemblent actuellement 16 familles différentes (http://www.cazy.org/). Les acétyl-estérases sont retrouvées dans les familles CE2, 3, 4, 5, 6, 7 et 12. Les feruloyl-esterases n'ont été retrouvées que dans la famille CE1, qui regroupe également les coumaroyl-estérases, impliquées dans la rupture des liaisons entre xylanes et lignine.

5. Régulation de l'expression des gènes des systèmes fibrolytiques

Des régulations dans l'expression des gènes codant les systèmes fibrolytiques sont fréquemment retrouvées chez les microorganismes, qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes, aérobies ou anaérobies, et quelle que soit leur niche écologique. Cependant, les mécanismes de ces régulations ne sont pas encore très bien connus. Les mécanismes de régulation qui ont été explorés chez les microorganismes fibrolytiques font intervenir principalement la répression catabolique, mais d'autres mécanismes, post-transcriptionnels et traductionnels sont probablement également impliqués.

- Chez *Clostridium cellulovorans*

La régulation de l'expression des gènes codant pour les cellulases et les hémicellulases de *C. cellulovorans* a été beaucoup étudiée au niveau des ARNm de cultures bactériennes sur différentes sucres. Il a notamment été montré une régulation des systèmes cellulolytiques par un mécanisme d'induction par les sucres, variable en fonction de la phase de croissance bactérienne (Han, *et al.*, 2003). Les gènes codant pour des cellulases et hémicellulases sont exprimés de manière constitutive à un niveau bas d'expression mais sont induits à un niveau d'expression élevé en présence de certains polysaccharides comme la cellulose. Des variations d'expression des gènes sont aussi observées sur sucres solubles. La transcription des cellulases est très rapidement réprimée après ajout de glucose dans le milieu. *C. cellulovorans,* qui produit des cellulosomes, est capable de modifier leur composition en fonction du substrat présent (Kosugi, *et al*., 2001). Une régulation est aussi observée entre les protéines cellulosomales et non cellulosomales (Han, *et al.*, 2004). Toutes ces données indiquent une relation hiérarchique très efficace entre les systèmes de régulation des cellulases et des hémicellulases, ce qui confère à ces bactéries une capacité importante de dégradation des complexes lignocellulosiques dans la nature.

- Chez *Clostridium cellulolyticum*

C. cellulolyticum sécrète également des complexes multi-enzymatiques de type cellulosomes, lui permettant de dégrader efficacement les parois végétales. Les mécanismes de régulation des gènes codant pour ce système cellulolytique s'avère complexe. En effet, un grand cluster de 12 gènes *cip-cel* qui code pour 11 composants des cellulosomes a été identifié (Bagnara-Tardif, *et al.*, 1992), dont les protéines majoritaires sont la protéine d'assemblage CipC et les cellulases processives Cel48F et Cel9E. Il a été montré que l'ensemble des gènes du cluster étaient liés au niveau transcriptionnel et constituait un opéron sous le contrôle d'une région promotrice localisée en amont du premier gène *cipC* (Abdou, *et al.*, 2008). Les variations de transcription de l'opéron avec le substrat suggèrent, comme chez *C. cellulovorans*, un phénomène de répression catabolique. Un site CRE (catabolite responsive element) a été identifié et démontré comme fonctionnel dans la répression. L'analyse des séquences promotrices suggère également une régulation de la transcription par courbure de l'ADN (Abdou, *et al.*, 2008). La visualisation de nombreux messagers a aussi révélé que l'expression des gènes de cet opéron est régulé au niveau post-transcriptionnel par

des phénomènes de maturation du messager primaire et par la stabilité des messagers secondaires générés.

- Chez *Thermomonospora fusca*

La régulation de la transcription des cellulases chez les Actinomycetes, comme *T. fusca*, a été beaucoup étudiée. Chez *T. fusca*, CelR a été identifié comme étant un régulateur protéique qui se fixe spécifiquement sur une séquence de 14 bases sur les gènes codant pour les cellulases. Cette séquence palindromique est aussi retrouvée sur les gènes de cellulases et de xylanases (Blanco, *et al.*, 1997) de différentes espèces comme certaines souches de *Streptomyces* par exemple (Theberge, *et al.*, 1992). Les régions régulatrices 5' de tous les gènes de cellulases connus chez *T. fusca* contiennent une à trois copies de cette séquence (Weickert & Adhya, 1992) et son interacyion aves CelR est modulé par le cellobiose (Spiridonov, *et al.*, 2000). Un niveau bas de cellobiose dans le milieu extracellulaire conduit à la dissociation du complexe promoteur CelR-*cel*E, ce qui montre que le cellobiose est un inducteur des gènes *cel* et que le mécanisme d'induction implique l'interaction directe de CelR avec le cellobiose. En absence de cellobiose, CelR forme des complexes avec les séquences de 14 bases sur les gènes *cel* et bloque leur transcription. Au contraire, quand la cellulose est présente dans le milieu, le cellobiose libéré, entre dans les cellules et forme des complexes avec CelR, permettant ainsi la transcription des gènes codant pour les cellulases (Spiridonov & Wilson, 1999).

PARTIE C : Le microbiote et la fibrolyse dans le côlon

I. LE MICROBIOTE DU COLON HUMAIN

1. Structure du microbiote intestinal

1.1 Etude de la composition du microbiote par méthodes culturales et moléculaires

Notre connaissance du microbiote intestinal a évolué de façon importante avec le développement des méthodes d'études et notamment des outils moléculaires. Les premières approches utilisées pour décrire la flore colique de l'Homme ont été basées sur des méthodes culturales des microorganismes présents dans les selles. Des contraintes dues à l'anatomie du côlon et au caractère invasif des prélèvements rendent, en effet, très difficile l'étude des communautés bactériennes présentes dans le côlon proximal, qui reste une zone peu accessible. Dans les années 1970, la microbiologie digestive a connu un fort essor et quelques études portant sur un grand nombre d'échantillons, ont permis d'avoir une vue d'ensemble sur la composition globale du microbiote fécal humain, basée sur les méthodes culturales (Moore & Holdeman, 1974 ; Finegold *et al*, 1983).

La flore dominante est constituée de bactéries présentes à des niveaux de population allant de 10^8 à 10^{11} bactéries par gramme de fèces. Elles sont majoritairement anaérobies strictes. Plusieurs centaines d'espèces composent le microbiote fécal de l'Homme, faisant de l'intestin humain l'un des écosystèmes microbiens les plus diversifiés. Seules vingt-cinq à quarante espèces composeraient cependant la flore dominante d'un individu, parfois dite autochtone ou active. Les principaux genres bactériens ainsi répertoriés sont : *Bacteroides, Eubacterium, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Bifidobacterium, Fusobacterium et Clostridium.* Les espèces anaérobies cultivées prédominantes dans les selles sont des bacilles à Gram négatif appartenant au genre *Bacteroides*, qui sont retrouvés à des niveaux de population variant de 10^8 à 10^{11} bactéries par gramme de fèces (Finegold *et al*., 1983). Les bacilles à Gram positif appartenant aux genres *Eubacterium, Fusobacterium* et *Clostridium* sont rencontrés à des niveaux de population de 10^9 bactéries par gramme de fèces, tout comme les espèces correspondant aux coques à Gram positif *Peptostreptococcus* et *Clostridium.* Enfin, les bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* sont dénombrées à un niveau de population de 10^9 bactéries par gramme de fèces.

Cependant, seule une fraction des espèces bactériennes présentes dans les selles a été cultivée jusqu'à présent. Selon les auteurs cette proportion varie de 15 à 90%. Avec le développement des études moléculaires pour étudier la composition du microbiote, le nombre d'espèces bactériennes potentiellement présentes dans le côlon humain ne cesse d'augmenter et se situe entre 400 à 1000 selon les auteurs. Ceci concorde avec le fait qu'une centaine d'espèces bactériennes seraient isolées sur les 400 à 1000 supposées présentes dans le côlon (Moore & Holdeman, 1974; Rajilic-Stojanovic, *et al.*, 2007 ; Noverr & Huffnagle, 2004 ; Nicholson, *et al.*, 2005 ; Phillips, 2006).

1.2 Biodiversité et composition du microbiote

L'analyse des séquences d'ADNr 16S clonées à partir d'ADN fécal et amplifiées *in vitro* (Suau, *et al.*, 1999 ; Bonnet, *et al.*, 2002) a montré que cette communauté est essentiellement composée de trois lignées phylogénétiques majeures : le groupe *Bacteroides/Prevotella*, le groupe *Clostridium leptum* (cluster IV) et le groupe *Clostridium coccoides* (cluster XIVa) (**Figure 17**). Des résultats comparables ont été obtenus à partir d'échantillons issus de tissus coliques sains (Hold, *et al.*, 2002).

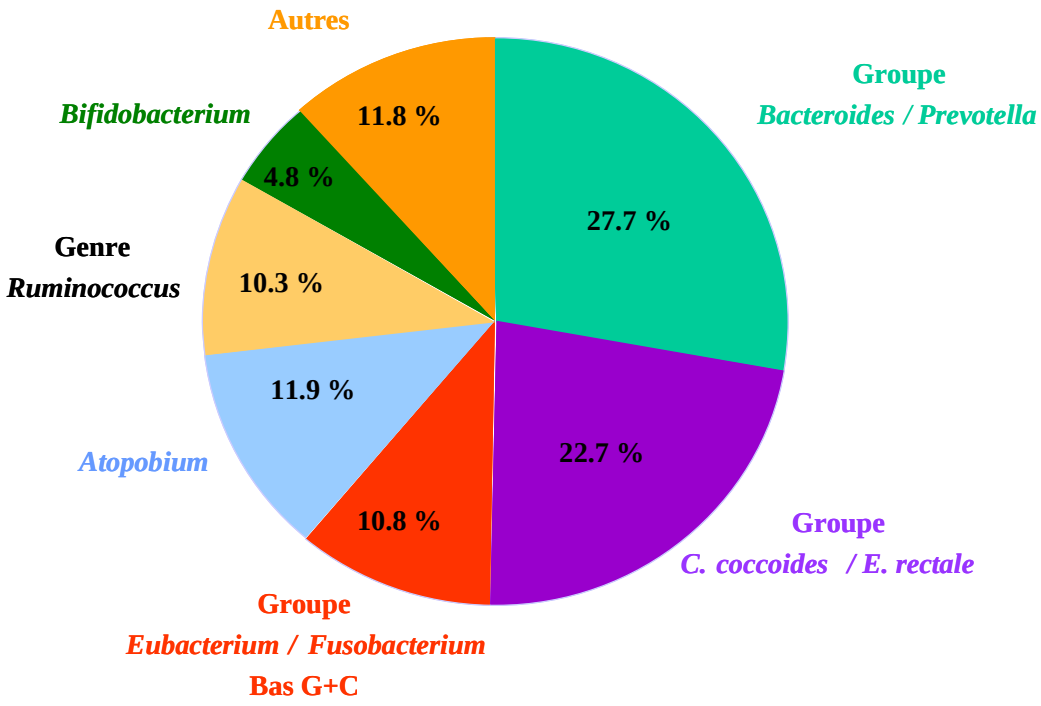


Figure 17. *Composition du microbiote colique (Harmsen, et al., 2002)*

L'utilisation de sondes spécifiques ciblant l'ARNr 16S des grands groupes microbiens (Stahl, *et al.*, 1988 ; Harmsen, *et al.*, 2002 ; Blaut, *et al.*, 2002 ; Matsuki, *et al.*, 2002) a permis de confirmer la présence des trois grands groupes dominants (Sghir, *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'utilisation de l'hybridation *in situ* (FISH) sur suspensions fécales fixées ou sur coupes de tissus digestifs (Rigottier-Gois, *et al.*, 2003) indique également que ces grands groupes dominants représentent 70 à 80% du microbiote colique avec toutefois des variations inter-individuelles. Les proportions des différents genres et groupes bactériens majeurs du microbiote fécal humain, retrouvées par ces différentes méthodes sont similaires (Zoetendal, *et al.*, 2004).

Ces résultats ont aussi été confirmés par l'étude de Eckburg (Eckburg, *et al.*, 2005) dans laquelle un très grand nombre de séquences (13 355 séquences) issues de trois sujets ont été analysées. Cette analyse a permis de confirmer une très grande diversité du microbiote, celui-ci étant constitué d'un très grand nombre d'espèces bactériennes dont la plupart est inconnue (62%). Très peu d'espèces apparaissent communes aux trois individus étudiés confirmant la grande variabilité inter-individuelle de la flore bactérienne colique au niveau de l'espèce. De récents travaux portent sur la mise en évidence d'un « noyau phylogénétique » du microbiote intestinal, constitué d'espèces microbiennes communes à plusieurs individus, et qui pourrait être responsable des fonctions majeures de l'écosystème colique (Tap et al. 2009).Turnbaugh et al. (2009) suggèrent que ce noyau commun pourrait se situer au niveau des gènes plutôt qu'au niveau des espèces et constituer, alors, un noyau « fonctionnel ».

1.3 Approche métagénomique

Le développement important des outils moléculaires au cours des 20 dernières années a permis d'apporter de nombreuses informations qualitatives et quantitatives concernant la structure du microbiote du côlon humain et, plus récemment, une approche globale a été développée : la métagénomique. Cette approche offre un potentiel unique d'analyser les génomes de tous les microorganismes d'une niche écologique, même de ceux, largement majoritaires, qui ne sont pas cultivés. Le répertoire complet de l'ensemble des gènes de tous les microorganismes dominants d'une niche peut ainsi être déduit, même de ceux qui ne sont pas cultivés.

La métagénomique est donc un moyen d'identifier d'une part les microorganismes présents dans un écosystème complexe, et, d'autre part de connaître leur fonction. Elle peut, par exemple, permettre d'analyser à grande échelle la diversité et les fonctions du microbiote intestinal en fonction de l'âge, de l'alimentation, d'une pathologie ou de l'environnement des individus et donc de mieux comprendre le rôle des communautés microbiennes qui le composent en matière de nutrition et de santé humaine. Les premiers développements de la métagénomique appliquée au microbiote intestinal humain, se sont limités à l'exploration de la diversité des communautés microbiennes et du répertoire de gènes de quelques individus.

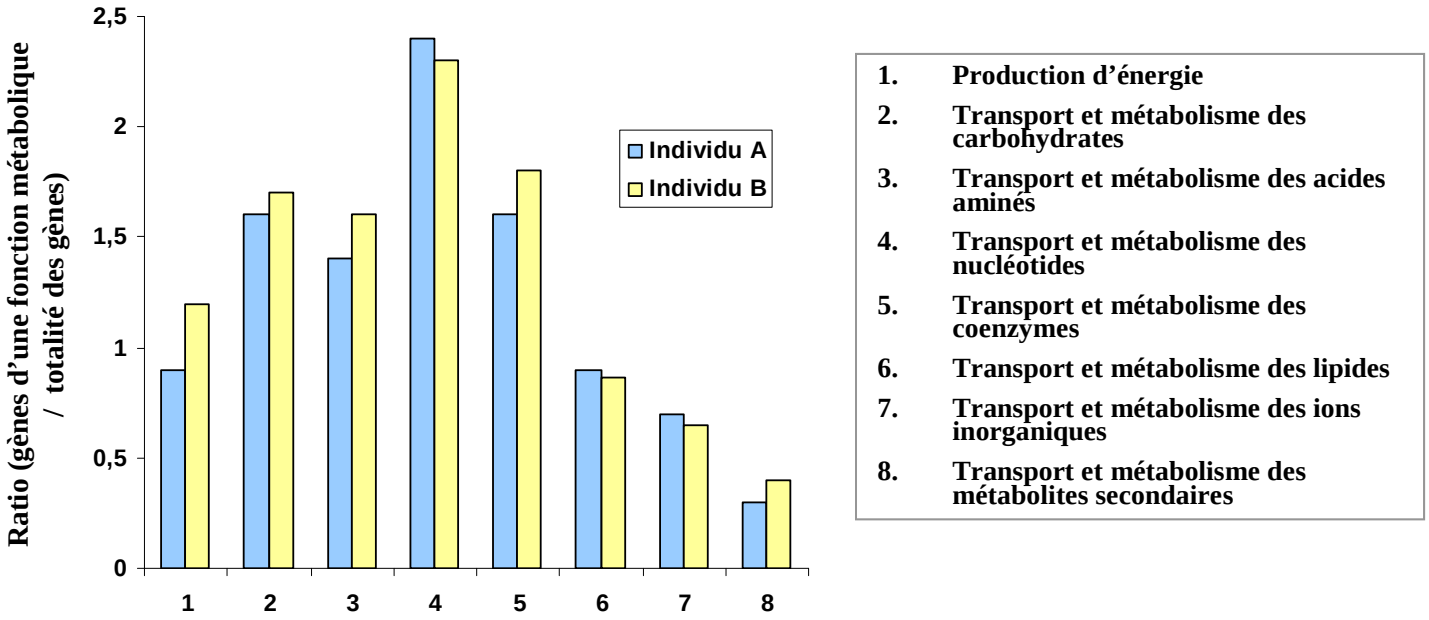


Figure 18. *Analyse des fonctions métaboliques présentes dans le microbiote intestinal humain d'après Gill, et al., (2006). Un ratio supérieur à 1 indique un enrichissement pour la fonction étudiée et un ratio inférieur à 1 indique une sous-représentation.*

Ainsi, les travaux de Gill *et al.*, en 2006, ont permis de décrire les gènes présents dans les populations dominantes et codant pour les principales fonctions biologiques sur deux sujets (**Figure 18**). Les résultats ont montrés que le microbiome était particulièrement riche en gènes codant pour le métabolisme des glycanes (dont leur hydrolyse), des acides aminés ou pour la méthanogénèse. Une étude récente du métaprotéome de quelques sujets a aussi montré une abondance de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et des carbohydrates (Verberkmoes, *et al.*, 2009).

En 2007, Kurokawa a effectué le même type d'analyse sur 14 individus, adultes et enfants, montrant ainsi que le microbiote des adultes possède un répertoire de gènes différent (plus complexe) de celui des enfants (Kurokawa, *et al.*, 2007). Il en déduit donc une caractéristique de chaque « type de microbiote » en fonction de l'alimentation, de l'environnement ou de l'âge des individus.

Récemment, des analyses métagénomiques ont été focalisées plus spécifiquement sur des fonctions du microbiote intestinal (Dinsdale et al., 2008 ; Jones et al., 2008).

L'étude du métagénome intestinal humain fait l'objet d'un Consortium international qui tente d'élucider l'organisation et le fonctionnement du microbiote intestinal. Au niveau européen, le projet MetaHIT (métagénome intestinal humain), coordonné par l'INRA, étudie le métagénome de 400 individus. En parallèle, le NIH (National Institutes of Health) aux USA conduit le « Human Microbiome Project » (HMP) qui a pour mission de générer des ressources permettant la caractérisation complète des microbiotes de l'homme et l'analyse de leurs rôles dans la santé et les maladies humaines.

L'analyse des séquences métagénomiques issues de ces programmes permettra de mieux appréhender les fonctions de l'écosystème colique, en essayant de corréler la structure et le fonctionnement des communautés microbiennes intestinales à l'état de santé d'un individu (Manichanh, *et al.*, 2006 ; Peterson, *et al.*, 2008). En outre, la métagénomique permettra de caractériser le dialogue hôte-microorganismes et son rôle, par exemple, dans le développement, la maturation et la sénescence du système immunitaire (Frank & Pace, 2008).

2. Variations du microbiote intestinal

L'implantation du microbiote intestinal se fait dès la naissance, lorsque l'enfant entre en contact avec l'environnement auquel il est exposé (Edwards & Parrett, 2002). La flore de l'enfant est considérée comme identique à celle de l'adulte vers l'âge de deux ans (Mackie, *et al.*, 1999). Chaque individu possède donc une microflore caractéristique dont la composition est stable au cours du temps. En revanche, d'un individu à l'autre, la flore est très diverse et cette diversité augmente avec l'âge de l'individu (Lay, *et al.*, 2005).

La composition du microbiote fécal est représentative de celle retrouvée dans le côlon. Cependant, la composition de la communauté varie avec le site colique considéré (**Figure 19**), (Peterson, *et al.*, 2008). Des variations de la composition du microbiote sont aussi observées entre les fractions solides (76,8% *Firmicutes* et 18,5% *Bacteroides*) et liquides (65,8% *Firmicutes* et 28,5% *Bacteroides*) des fèces (Walker, *et al.*, 2008).

Une modification importante et constante de la composition du microbiote d'un sujet adulte, semble assez difficile à obtenir par changements du régime alimentaire. Cependant, d'autres facteurs peuvent influencer la composition de la flore (probiotiques, prébiotiques, antibiotiques). Par ailleurs, plusieurs études montrent une variation importante de la composition du microbiote entre un individu sain et un patient souffrant du syndrome de l'intestin irritable (SII) (**Figure 19**).

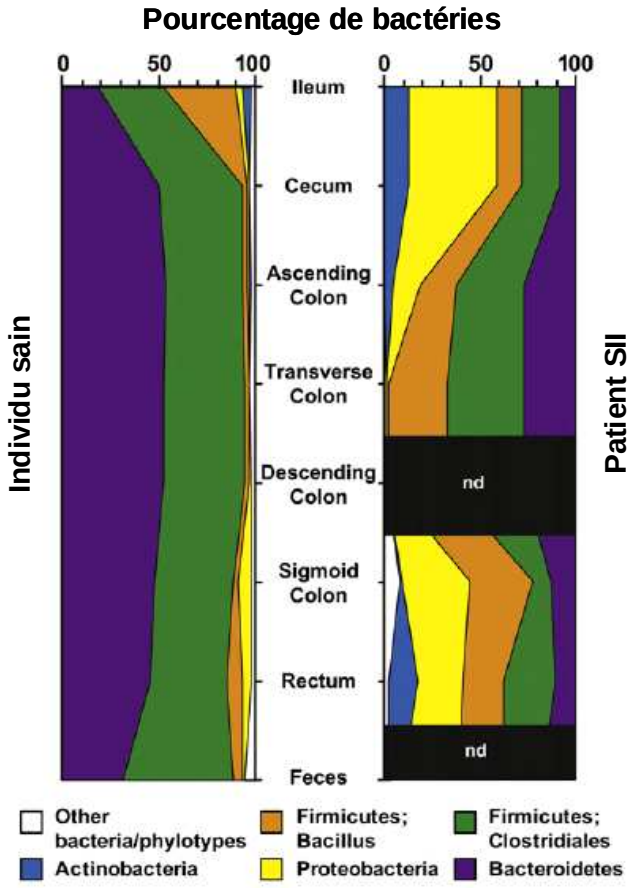


Figure 19. *Phylum bactériens identifiés dans le tube digestif humain d'un individu sain et d'un patient souffrant de SII. D'après (Eckburg, et al., 2005), (Frank, et al., 2007) et (Peterson, et al., 2008).*

II. LA DEGRADATION DES POLYSACCHARIDES DANS LE COLON

1. Les voies métaboliques

Le microbiote colique possède de nombreuses activités métaboliques dont les produits peuvent interagir de façon bénéfique ou néfaste avec l'hôte. Ainsi, la fermentation des glucides représente une activité majeure et malgré la grande diversité des substrats disponibles dans le côlon, les glucides sont métabolisés selon un nombre relativement restreint de voies métaboliques. Les grandes voies de fermentation sont représentées dans la **figure 20**.

La majorité des bactéries anaérobies emprunte la voie d'Embden-Meyeroff-Parnas (EMP ou voie de la glycolyse) pour convertir les glucides en pyruvate, à l'exception des bifidobactéries (Wollin & miller 1983). La voie des pentoses phosphate est également empruntée par certaines bactéries coliques, notamment lors du métabolisme des pentoses, et conduit aussi à la synthèse de pyruvate. Le pyruvate, métabolite central de ces processus fermentaires, est ensuite transformé selon différentes voies métaboliques en produits terminaux de fermentation (acétate, propionate et butyrate), représentant les accepteurs finaux d'électrons.

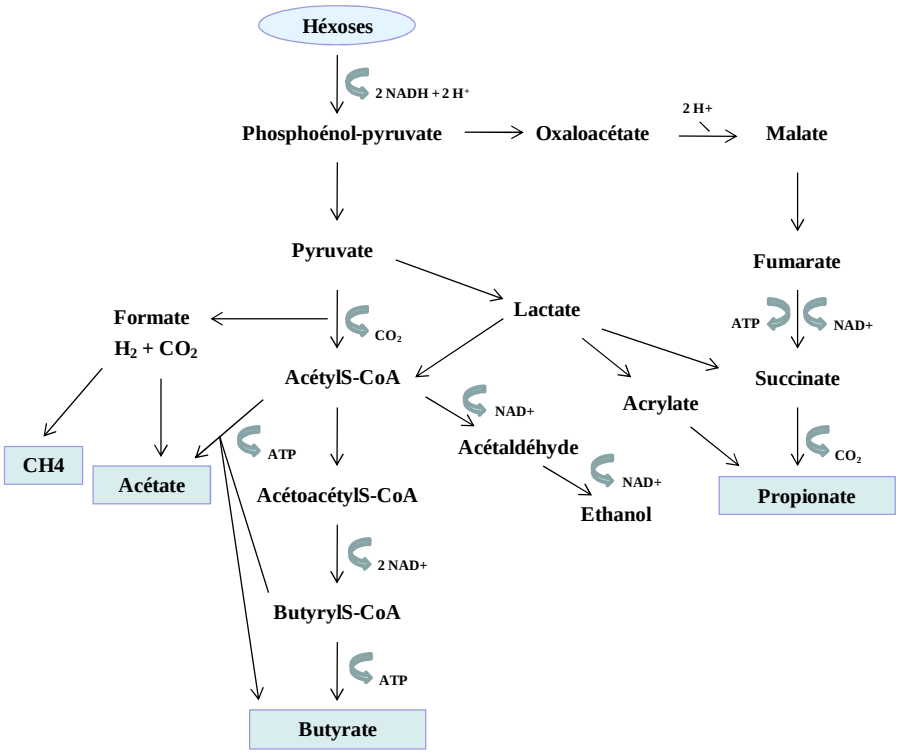


Figure 20. *Principales voies métaboliques de fermentation des glucides utilisées par les bactéries du côlon humain*

Un certain nombre d'espèces produisent également des métabolites intermédiaires comme le succinate, le lactate ou l'éthanol, afin d'assurer la réoxydation de cofacteurs réduits (NADPH, NADH et $FADH_2$) produits lors de la glycolyse.

La plupart des espèces dominantes de la flore colique humaine produisent de l'acétate lors de la fermentation des glucides. La voie principale de formation de l'acétate est la décarboxylation oxydative du pyruvate conduisant à la synthèse d'une molécule d'ATP. Le propionate est principalement synthétisé par les espèces du genre dominant *Bacteroides* ainsi que par les *Propionibacterium* et *Veillonella.* Dans le côlon humain, le propionate serait majoritairement produit par la voie de décarboxylation du succinate (Miller & Wolin, 1979), voie empruntée par les *Bacteroides*. Toutefois la voie de l'acrylate, correspondant à la synthèse de propionate via le lactate, pourrait également être importante, notamment dans le cas de régimes riches en oligosides non digestibles.

Les espèces appartenant aux genres *Clostridium, Eubacterium, Faecalibacterium, Roseburia* et *Butyrivibrio* s'avèrent capables, *in vitro*, de produire du butyrate par la condensation de deux molécules d'acétylS-CoA avec synthèse d'une molécule d'ATP. L'acétyl-SCoA est également le précurseur de la synthèse d'éthanol, produit *in vitro* par de nombreuses espèces comme celles des genres *Bacteroides, Lactobacillus* ou *Bifidobacterium.*

Enfin, le lactate est produit par réduction du pyruvate. Les espèces bactériennes transformant majoritairement les oses en lactate, ou bactéries lactiques, appartiennent principalement aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* ainsi que *Streptococcu*s et *Enterococcus*.

2. Les produits de fermentation

Dans le côlon la fermentation des glucides par les communautés bactériennes aboutit principalement à la formation d'acides gras à chaîne courte (AGCC) et de gaz. Les AGCC, sous forme d'anions dans le côlon, sont plus abondant dans le côlon proximal où les substrats sont en grande quantité, entraînant une acidification du milieu intracolique (pH < 6.0). Dans le côlon distal, la concentration d'AGCC est plus faible et le pH est donc plus élevé, de l'ordre de 6.6 (Cummings, *et al.*, 1987). De nombreux modèles animaux (comme le porc) utilisés pour étudier le métabolisme des AGCC chez l'Homme confirment ces données

(Topping & Clifton, 2001). Dans tous les sites coliques, l'acétate, le propionate et le butyrate représentent 85 à 95% des AGCC totaux et le rapport molaire de ces AGCC est égal à 57/22/21 (acétate/propionate/butyrate), (Cummings & Macfarlane, 1991 ; Topping & Clifton, 2001). La production d'AGCC totaux varie de 200 à 500 mmol/jour et ne représente qu'un apport d'énergie pour l'hôte de 5% de l'énergie totale ingérée.

Environ 95% des AGCC produits dans le côlon sont absorbés au niveau de l'épithélium colique et 5 à 10% sont excrétés par les fèces (Hijova & Chmelarova, 2007). Les AGCC majeurs : acétate, propionate et butyrate, sont absorbés à des niveaux équivalents quelle que soit la région colique. Une fois absorbés, les AGCC sont métabolisés et conduisent à un effet bénéfique pour la santé humaine (Roy, *et al.*, 2006). L'acétate est métabolisé par les cellules du foie (50 à 70%), par les muscles cardiaque et squelettique et par le cerveau, représentant ainsi une source importante d'énergie. Le propionate est lui aussi métabolisé par le foie (Cummings, *et al.*, 1987) et joue un rôle dans la nucléogénèse (Hijova & Chmelarova, 2007). Le butyrate est utilisé par les cellules du colonocyte à des fins énergétiques (Clausen & Mortensen, 1994). Ce métabolisme a lieu dans le compartiment mitochondrial du colonocyte où 70 à 90% du butyrate est métabolisé (Basson, *et al.*, 2000 ; Della Ragione, *et al.*, 2001).

3. Les gaz produits

La fermentation des substrats se traduit également par la production de gaz qui sont essentiellement l'hydrogène (H_2), le dioxyde de carbone (CO_2) et pour 40% de la population le méthane (CH_4). Le volume total de gaz formés par fermentation dans le côlon varie de 400ml à 2L par jour (Perez, *et al.*, 2007). Ces gaz sont en partie excrétés par le rectum ou par voie pulmonaire (environ 20% des gaz), (Bond, *et al.*, 1971). Contrairement au CH_4 et à l'H_2, d'origine fermentaire, le CO_2 peut avoir plusieurs origines : sanguine, fermentaire ou par dissociation du bicarbonate. Le CO_2 est rapidement éliminé après sa formation, sa concentration atteint 8 à 50% dans les flatulences. La production d'H_2 est d'environ 100 à 300ml par gramme de substrat fermenté. Son élimination a lieu en partie par dissolution dans le sang et par excrétion pulmonaire (10-15%) ou dans les flatulences (10-20%), mais le mécanisme majeur d'élimination de l'H_2 reste son utilisation par les microorganismes hydrogénotrophes (Christl, *et al.*, 1992). Le méthane produit par la moitié de la population environ, provient du métabolisme des archaea méthanogènes qui utilisent l'H_2 pour réduire le

CO_2 et former du CH_4. Ce gaz est totalement excrété dans les flatulences et par voie pulmonaire.

4. Dégradation microbienne des fibres pariétales

La dégradation des polymères glucidiques dans le côlon est un processus complexe qui requiert la contribution de différents groupes bactériens possédant des activités métaboliques variées, complémentaires et qui sont associées en une chaîne trophique (**Figure 21**).

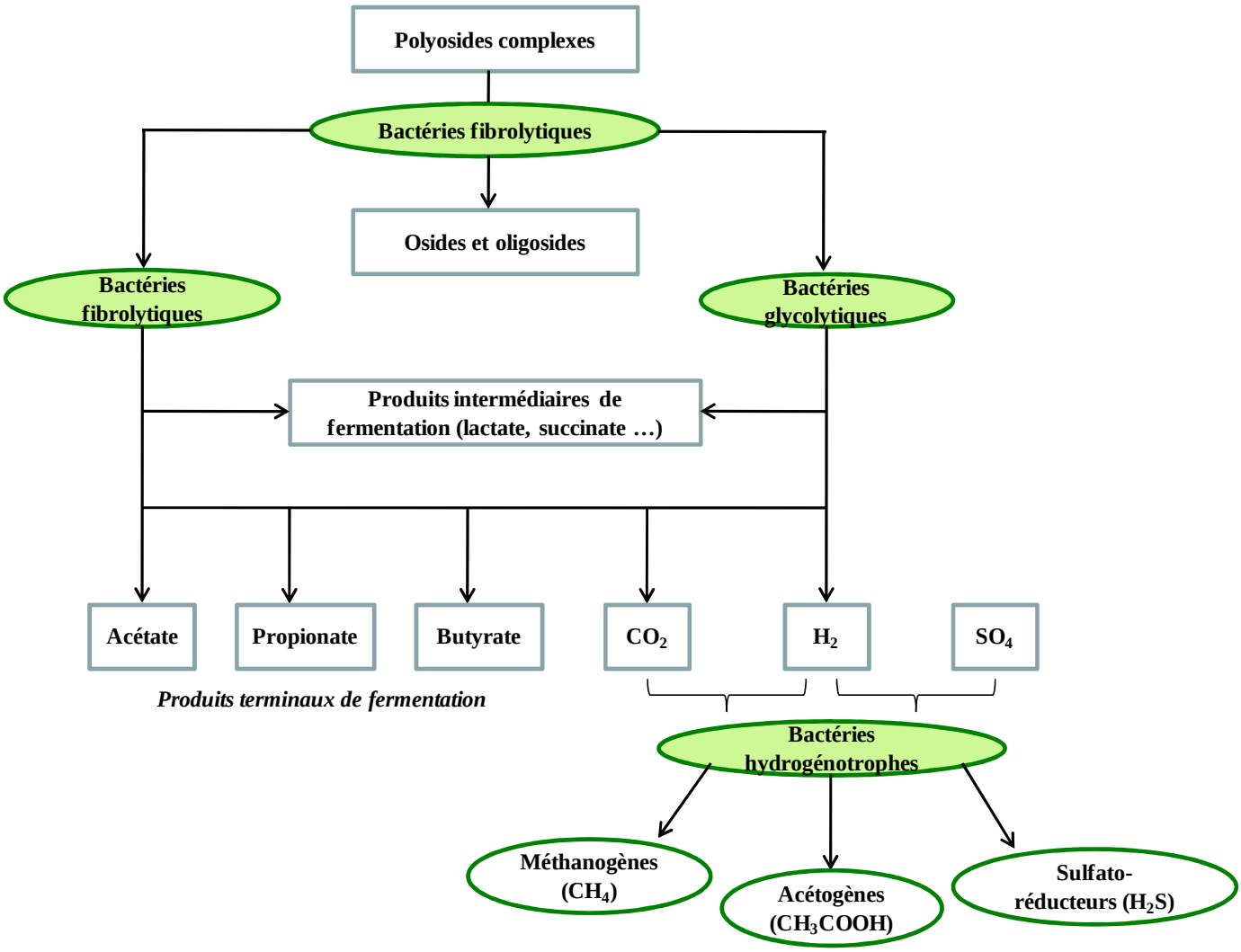


Figure 21. *Chaîne trophique de dégradation des glucides dans le côlon*

Les polyosides sont tout d'abord hydrolysés en fragments plus petits par les bactéries fibrolytiques intervenant lors de la première étape de la chaîne trophique. La communauté fibrolytique est composée d'espèces bactériennes capables de synthétiser des enzymes permettant d'hydrolyser les liaisons existant entre les différents polymères composant les parois végétales. Les oses libérés par cette hydrolyse sont ensuite fermentés d'une part par cette flore fibrolytique et d'autre part, par les espèces non-fibrolytiques (espèces glycolytiques), incapables d'utiliser les polymères, mais qui se maintiennent grâce à l'utilisation des produits d'hydrolyse. La croissance des espèces glycolytiques est donc en grande partie contrôlée par l'activité des espèces fibrolytiques, par la disponibilité en glucides libérés, ainsi que par la compétition pour le substrat entre ces différentes espèces.

La fermentation des oses libérés aboutit à la formation d'AGCC, d'hydrogène et de dioxyde de carbone. Des métabolites intermédiaires sont également formés comme le lactate, l'éthanol, le formiate ou le succinate, qui ne s'accumulent pas dans l'écosystème mais sont rapidement réutilisés par d'autres espèces (Wolin & Miler, 1983).

L'hydrogène est un métabolite intermédiaire majeur qui est, pour une grande part, réutilisé *in situ* par la communauté hydrogénotrophe. Trois mécanismes de réutilisation de l'H_2 fermentaire ont été mis en évidence dans le côlon : la méthanogénèse conduisant à la formation du méthane ; l'acétogénèse réductrice, conduisant à la production d'acétate, source d'énergie pour les cellules eucaryotes ; la sulfato-réduction conduisant à la formation de sulfure d'hydrogène potentiellement toxique pour les cellules eucaryotes.

III. LES BACTERIES FIBROLYTIQUES

1. Description des communautés fibrolytiques par méthodes culturales

La digestibilité de la cellulose (50 à 80%) ou des hémicelluloses (90 à 95%) étant importante dans le côlon, les communautés bactériennes cellulolytiques et hémicellulolytiques sont attendues à un niveau important dans cet écosystème. Un nombre restreint d'études a concerné le dénombrement des flores cellulolytiques du côlon humain. La plupart de celles-ci ont été réalisées à l'aide de celluloses de nature différente et sur un nombre limité de sujets (Betian, *et al.*, 1977 ; Montgomery, 1988 ; Wedekind, *et al.*, 1988). Les bactéries cellulolytiques dénombrées au cours de ces études pouvaient atteindre un niveau moyen de 10^8 par gramme de fèces. Seuls les individus méthano-excréteurs possédaient une

communauté cellulolytique capable d'hydrolyser la cellulose cristalline à un niveau de population de 10^7 à 10^8 bactéries par gramme de selles (Robert & Bernalier-Donadille, 2003). Plus récemment, la flore cellulolytique a été dénombrée sur différents types de substrats (**Tableau 7**) à des niveaux de populations de 10^7 à 10^9 bactéries par gramme de fèces soit environ 0,2% de la flore colique totale (Chassard, *et al.*, 2008).

Tableau 7. *Niveaux de population des communautés cellulolytiques et xylanolytiques dénombrés dans les fèces de 15 individus sains (Chassard, et al., 2008)*

Substrat de croissance	log_{10} N / gramme de fèces	Intervalle
	Bactéries cellulolytiques	
papier filtre de cellulose		
n=5	6,0 ± 1,0	4,9 - 7,2
n=10	3,6 ± 1,4	3,0 - 6,5
cellulose Sigmacell 101	8,9 ± 0,7	7,5 - 9,5
épinard	9,0 ± 0,6	7,9 - 9,9
poireau	9,2 ±0,7	7,5 - 9,9
chou	9,2 ± 0,6	7,5 - 9,9
blé	8,8 ±0,7	8,2 - 9,9
	Bactéries xylanolytiques	
xylane oat spelt	10,1 ± 0,4	9,5 - 10,9
épinard	8,5 ± 0,4	7,5 - 9,9
poireau	8,8 ± 0,7	7,2 - 9,9
chou	9,0 ± 0,7	7,9 - 9,9
blé	9,0 ± 0,7	6,9 - 9,9

Les espèces cellulolytiques isolées à partir des différents enrichissements obtenus à l'aide de cellulose purifiée ont été assignées aux genres *Bacteroides* (Betian, *et al.*, 1977), *Eubacterium* (Montgomery, 1988), *Enterococcus* (Robert & Bernalier-Donadille, 2003) et *Ruminococcus* (Robert & Bernalier-Donadille, 2003), (Montgomery, 1988). D'autres travaux utilisant différentes sources de cellulose ont aussi montré l'activité des genres *Ruminococcus, Clostridium* (Wedekind, *et al.*, 1988) et *Butyrivibrio* (Rumney, *et al.*, 1995).

La communauté bactérienne hémicellulolytique semble quantitativement plus importante que la communauté cellulolytique. Les bactéries xylanolytiques ont été dénombrées à des niveaux de population compris entre 10^9 et 10^{10} bactéries par gramme de

fèces (Wedekind, *et al.*, 1988), soit environ 2.6% de la flore colique totale et 5 à 7% de la flore anaérobie stricte (**Tableau 7),** (Chassard, *et al.*, 2007 ; 2008). Les espèces xylanolytiques isolées sont apparentées aux genres *Clostridium, Butyrivibrio, Roseburia* et *Bacteroides*. Les organismes xylanolytiques les plus abondants appartiennent aux genres *Bacteroides* et *Roseburia* (Chassard, *et al.,* 2007*)*. Les isolats de *Roseburia* sont assignés à l'espèce *Roseburia intestinalis. B. ovatus* et *B. fragilis* ont longtemps été considérées comme les espèces xylanolytiques majeures du côlon (Hespell & Whitehead, 1990) mais de nouvelles espèces de *Bacteroides* ont été isolées plus récemment, comme *Bacteroides xylanisolvens* (Chassard, *et al.,* 2007 ; 2008), qui présentent aussi des activités xylanolytiques importantes.

Rôle des *Bacteroides* dans la dégradation des xylanes

Les *Bacteroides* représentent une fraction importante de la flore colique (Salyers, 1984). Ce sont des bacilles Gram négatif anaérobie, non sporulant, dont de nombreuses espèces ont été isolées à partir de fèces humains comme : *B. thetaiotaomicron*, dont le génome a été séquencé (Xu, *et al.*, 2003), *B. finegoldii* (Bakir, *et al.*, 2006) ou *B. intestinalis* (Bakir, *et al.*, 2006) par exemple. Différentes espèces de *Bacteroides* ont la capacité de dégrader les polymères complexes et les sucres simples présents dans le côlon (Wexler, 2007). Dans le génome de *B. thetaiotaomicron* par exemple, on retrouve 172 gènes de glycoside-hydrolases, codant 23 fonctions enzymatiques différentes, dont de nombreuses hémicellulases (Comstock & Coyne, 2003), montrant l'importante capacité des *Bacteroides* à dégrader les polysaccharides présents dans l'écosystème côlon (Wexler, 2007).

En 1977 et 1979, deux études du groupe de Salyers ont montré que plusieurs espèces de *Bacteroides* étaient capables de dégrader différents polysaccharides, et notamment les xylanes. Ainsi, *B. ovatus, B. eggerthii, B. vulgatus* et *B. fragilis* présentaient des activités xylanolytiques importantes (Salyers, *et al.*, 1977, 1979). Cette équipe a ensuite étudié plus en détail la dégradation du xylane par *B. ovatus* et *B. eggerthii*. Les auteurs ont montré que ces deux espèces libéraient dans le milieu de culture de grandes quantités d'oligosaccharides solubles, utilisables ensuite par d'autres micro-organismes du microbiote intestinal (Salyers, *et al.,* 1981).

En 2007, la flore xylanolytique a été à nouveau caractérisée dans notre laboratoire (Chassard, *et al.*, 2007). Plusieurs souches de différentes espèces de *Bacteroides* ont été isolées dans cette étude, et il a été montré que *B. intestinalis* possèdait aussi une activité

xylanolytique importante, supérieure à celle de *B. ovatus*. Par contre, d'autres *Bacteroides* décrits récemment, comme *B. dorei* par exemple, ne sont pas capables de dégrader les xylanes.

Les seules études visant à décrire le système xylanolytique des *Bacteroides* ont été conduites chez *B. ovatus*, et ces travaux restent limités. Deux gènes codant pour des xylanases (*xylI* et *xsa*) ont été isolés chez *B. ovatus* par Whitehead en 1990 ; ces deux gènes appartiennent à un même opéron (Whitehead, *et al*., 1990 et Weaver, *et al.*, 1992). Les gènes *xylI* et *xsa* codent respectivement pour une xylanase de la famille GH10 et une xylosidase / arabinosidase de la famille GH43 (Whitehead, *et al.*, 1995), (Weaver, *et al*., 1992). Les gènes sont induits lorsque *B. ovatus* est cultivé sur xylane. La xylanase (XylI) et la protéine bifonctionnelle xylosidase / arabinosidase (Xsa) ont des tailles respectives de 43 et 37kDa.

Les capacités de *B. ovatus* à fermenter des substrats complexes ont été étudiées (Martin, *et al*., 1998). Des cinétiques de croissance de *B. ovatus* pendant 72 heures ont montré que cette bactérie dégrade efficacement différents sons de céréales (74% de son d'avoine dégradé en 72 heures) et utilise préférentiellement le glucose, le galactose et le mannose présent dans ces substrats. Par ailleurs, des cultures de *B. ovatus* sur 12 sources de carbone différentes (5 polysaccharides et 7 mono ou disaccharides) ont montré que le niveau de dépolymérisation des polysaccharides n'est pas un facteur limitant à la croissance de cette bactérie. De plus, les mesures des activités enzymatiques indiquent que *B. ovatus* synthétise un grand nombre d'enzymes qui sont réprimées en présence de sucres simples dans les cultures. *B. ovatus* est donc une bactérie capable de croître sur de nombreux polysaccharides, dont le xylane, et cette utilisation des substrats est en partie régulée par le niveau d'enzymes synthétisées (MacFarlane, *et al*., 1990).

Plus récemment, en 2005, plusieurs xylanases ont été isolées à partir d'ADNg de bactéries extraites d'un microbiote fécal de volontaires sains (Hayashi, *et al.*, 2005). Cinq xylanases de la famille GH10 ont été identifiées et leurs séquences sont très homologues aux xylanases des bactéries du groupe *Bacteroides / Prevotella.* Ces résultats confirment l'importance du rôle des *Bacteroides* dans la dégradation des xylanes.

Rôle des *Roseburia*

Roseburia représente un genre majeur du microbiote colique de l'homme. Les espèces de ce genre ont été essentiellement décrites comme amylolytiques, et jouent un rôle important dans la production du butyrate dans le côlon (Ramsay, *et al.*, 2006). Seuls des travaux récents dans notre laboratoire ont montré que certaines espèces comme *R. intestinalis* étaient xylanolytiques. Nos connaissances sur l'équipement enzymatique de ces bactéries et leur contribution réelle à la dégradation des fibres végétales dans le côlon sont donc encore très limitées.

2. Apports de la génomique

Ces dernières années, le séquençage du génome de différentes espèces majeures du côlon a été réalisé (Xu, *et al.*, 2003 ; Kuwahara, *et al.*, 2004). De plus, la séquence du génome complet de plusieurs centaines d'espèces est en cours [Human gut Microbiome Initiative, Genome Sequencing Center - Chicago ; « Human project Microbiome », NIH ; Projet MetaHit, Sanger], (Turnbaugh, *et al.*, 2007). Le développement de ces nouvelles approches a déjà permis de mieux comprendre l'écologie de certaines espèces dans le côlon (Mahowald, *et al.*, 2009). Des approches de génomique fonctionnelle ont permis de comprendre le fonctionnement des gènes, d'étudier leur régulation et leurs interactions avec l'environnement afin de prédire le fonctionnement des bactéries qui les expriment. En parallèle, la génomique comparative permet de compléter les connaissances sur le génome d'une espèce à partir des informations disponibles sur d'autres espèces, en bénéficiant de la conservation de certaines propriétés.

Le séquençage du génome de *B. thetaiotaomicron* par exemple (626 Mbases) a montré que la majorité du protéome de cette bactérie est dédiée à la dégradation des polysaccharides et au métabolisme des sucres libérés, avec 172 glycoside-hydrolases, 163 protéines de liaison au substrat, et plus de 20 transporteurs de sucres identifiés (Xu, *et al.*, 2003). Une grande partie des protéines est aussi consacrée au maintien de la bactérie en symbiose avec l'hôte dans un écosystème complexe et très diversifié. Le même type d'observation a été effectué chez *Bifidobacterium longum* qui est capable de dégrader un grand nombre de substrat, lui conférant ainsi un avantage écologique dans le côlon (Schell, *et al.*, 2002).

Une analyse comparative des génomes de *B. thetaiotaomicron* et *B. fragilis* (séquencé en 2004) a montré que ces deux *Bacteroides* présentent des caractéristiques génomiques différentes, puisque *B. thetaiotaomicron* retrouvé dans la lumière du côlon a développé une capacité d'assimilation des sucres importante alors que *B. fragilis* retrouvé sur la muqueuse colique, a privilégié un potentiel d'infection et de colonisation (Kuwahara, *et al.*, 2004).

Une autre étude a permis de comprendre comment l'environnement intestinal affecte l'évolution des génomes microbiens. Pour cela, les génomes de *Bacteroides* du microbiote intestinal (*B. vulgatus* et *B. distasonis*) et de *Bacteroidetes* « non-intestinal » (*P. gingiv*alis et *C. hutchinsonii*) ont été comparés pour analyser leur adaptation en fonction de leur niche et de leur habitat (Xu, *et al.*, 2007). Cette étude a montré que des transferts latéraux de gènes ou des éléments mobiles ont conduit à l'évolution des génomes des *Bacteroides*, qui ont alors modifié leur surface cellulaire, leur sensibilité à l'environnement et se sont adaptés à l'utilisation des nutriments présents dans le côlon (Xu, *et al.*, 2007).

Une étude récente utilisant quatre méthodes différentes de génomique comparative, a montré que les bactéries du côlon présentaient une convergence des gènes codant pour les glycoside-hydrolases et les glycosyl-transférases. La convergence de ces gènes montre l'importance de la fonction de dégradation des substrats glucidiques dans le côlon humain (Lozupone, *et al.*, 2008). A titre d'exemple, les gènes de glycoside-hydrolases retrouvés chez certaines bactéries du côlon dont le génome est déjà séquencé (http://www.cazy.org/) sont présentés dans le **tableau 8**.

Les séquençages de génome en cours devraient permettre d'avoir une vision plus globale des fonctions potentielles des bactéries coliques majeures, et en particulier de la fonction de dégradation des fibres pariétales.

Tableau 8. Nombre de glycoside-hydrolases présentes chez certaines espèces de Bacteroides et Bifidobactéries (D'après http://www.cazy.org/). En jaune, sont surlignées les familles de glycoside-hydrolases qui regroupent les endoxylanases et xylosidases.

Espèce bactérienne	Familles de glycosyl hydrolases																	
	1	**2**	**3**	**5**	**8**	**10**	**13**	**15**	**16**	**18**	**20**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**
Bacteroides fragilis YCH446	0	16	10	1	0	0	6	0	6	2	12	3	1	1	2	3	0	9
Bacteroides fragilis NCTC 9343	0	15	10	1	0	0	6	0	6	2	12	3	0	1	2	3	0	9
Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482	0	32	10	2	0	0	8	0	4	12	14	3	0	1	0	5	9	9
Bacteroides vulgatus ATCC 8482	0	25	5	2	0	1	4	1	1	2	8	3	1	1	0	1	13	8
Bifidobacterium adolescentis ATCC 15703	2	3	6	2	1	0	13	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
Bifidobacterium longum NCC2705	0	2	2	3	0	0	8	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
B. longum subsp. intantis ATCC 15697	1	2	2	2	0	0	8	0	0	1	3	0	0	4	0	0	0	3
	30	**31**	**32**	**33**	**35**	**36**	**38**	**42**	**43**	**51**	**53**	**57**	**63**	**65**	**66**	**67**	**73**	**76**
Bacteroides fragilis YCH446	0	4	2	3	4	3	1	0	9	2	0	1	1	1	1	0	2	3
Bacteroides fragilis NCTC 9343	0	4	2	3	4	3	1	0	9	2	0	1	0	1	1	0	1	3
Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482	1	6	4	2	3	3	2	1	32	4	1	1	0	0	0	1	1	10
Bacteroides vulgatus ATCC 8482	2	4	1	2	1	2	0	1	22	3	0	1	2	0	0	1	1	0
Bifidobacterium adolescentis ATCC 15703	1	1	2	0	1	2	1	4	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Bifidobacterium longum NCC2705	0	3	1	0	0	1	3	2	9	5	1	0	0	0	0	0	0	0
B. longum subsp. intantis ATCC 15697	0	0	2	2	0	1	2	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	77	**78**	**84**	**85**	**88**	**89**	**92**	**93**	**95**	**97**	**99**	**101**	**105**	**106**	**109**	**110**	**112**	**115**
Bacteroides fragilis YCH446	1	2	1	0	1	1	9	0	4	4	0	0	0	0	2	2	0	1
Bacteroides fragilis NCTC 9343	1	2	1	0	1	1	8	0	4	4	0	0	0	0	2	2	0	0
Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482	1	6	1	0	1	3	24	1	5	10	1	0	7	3	2	2	0	2
Bacteroides vulgatus ATCC 8482	1	5	1	0	3	1	9	0	4	7	0	0	7	3	5	2	0	3
Bifidobacterium adolescentis ATCC 15703	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bifidobacterium longum NCC2705	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
B. longum subsp. intantis ATCC 15697	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0

3. Les espèces bactériennes xylanolytiques étudiées

Comme signalé précédemment, des travaux au laboratoire ont permis d'isoler de nouvelles espèces bactériennes xylanolytiques de fèces de volontaire sains (Chassard, *et al.*, 2007). Ces recherches ont montré la présence, parmi ces nouveaux isolats, de 70% de souches appartenant au genre *Bacteroides* et de 30% de souches appartenant au genre *Roseburia*. Parmi ces isolats, deux souches de *Bacteroides* (Chassard, *et al.*, 2007) : ***Bacteroides sp.* XB12B** et ***Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T** (Chassard, *et al.*, 2008) présentent des activités xylanolytiques importantes, supérieures aux activités xylanolytiques mesurées chez *B. ovatus* par exemple. Le séquençage de l'ARN16s a montré que *B. xylanisolvens* XB1A^T est proche des souches types de *B. ovatus* (97.5%), *B. finegoldii* (96.5%) et de *B. thetaiotaomicron* (95.5%) (Chassard, *et al.*, 2008) alors que *Bacteroides* sp. XB12B est très proche de *B. intestinalis* et plus éloigné de la souche type de *B. thetaiotaomicron* (94%) (**Figure 22**).

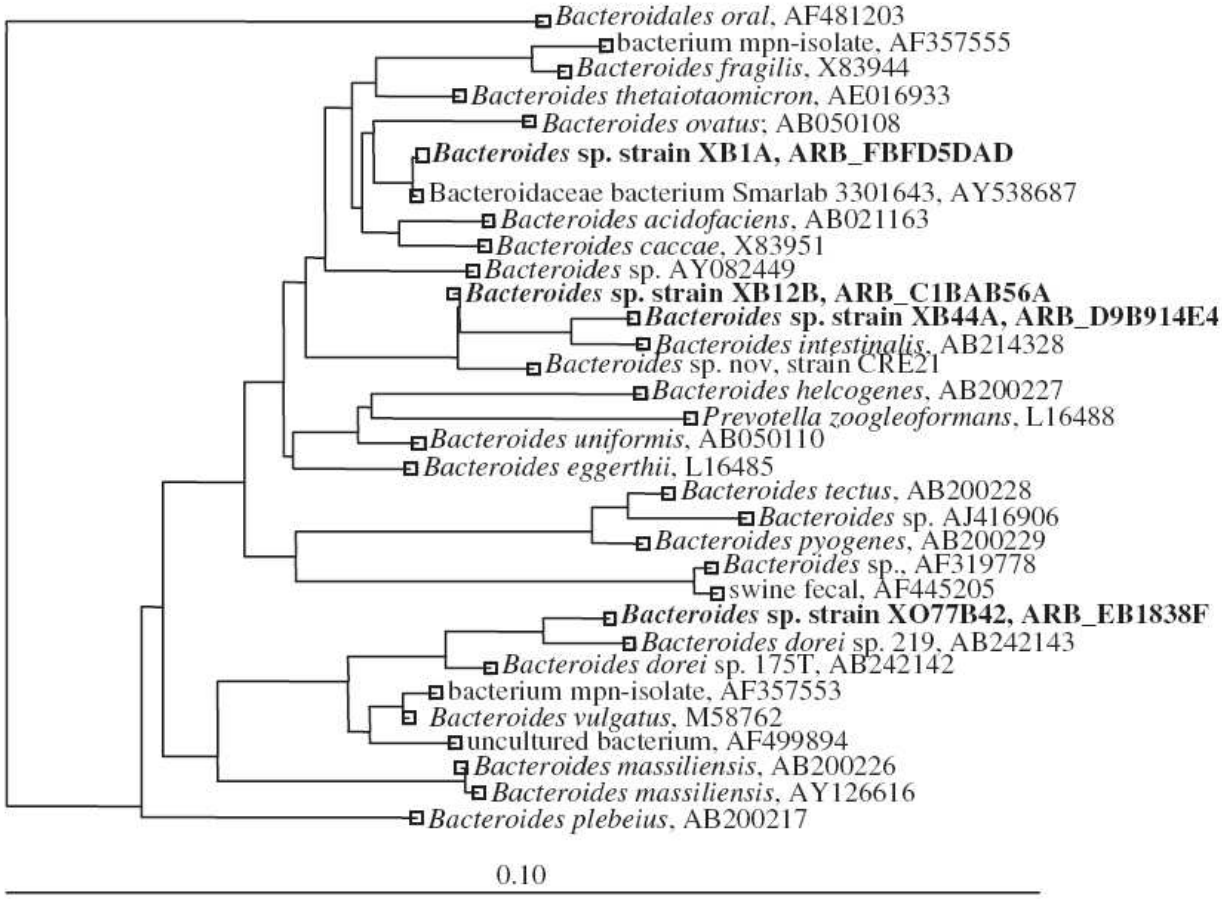


Figure 22. *Arbre phylogénétique des membres du genre Bacteroides (Chassard, et al., 2007)*

B. xylanisolvens XB1A^T est une espèce nouvellement décrite, qui présente un taux de GC de 42.8%, qui dégrade efficacement différents types de xylanes, se développe peu sur pectines ou acides galacturoniques et ne dégrade pas l'amidon (Chassard, *et al.*, 2008). Les acides gras à chaîne courte majoritairement produits par ces deux espèces de *Bacteroides* sont l'acétate, le propionate et le succinate.

Parmi les isolats de *Roseburia* obtenus au laboratoire, l'un d'entre eux présente une activité xylanolytique importante : ***Roseburia intestinalis* XB6B4**. La souche-type de *R. intestinalis* (L1-82^T) a été décrite en 2002 (Duncan, *et al.*, 2002), et la souche XB6B4 est très proche de la souche type L1-82^T. *R. intestinalis* est un bacille à Gram positif plus ou moins variable, à bas GC% (30%), mobile grâce à son flagelle polaire, phylogénétiquement proche de *R. cecicola* et appartenant au cluster XIVa des *Clostridium* (**Figure 23)**.

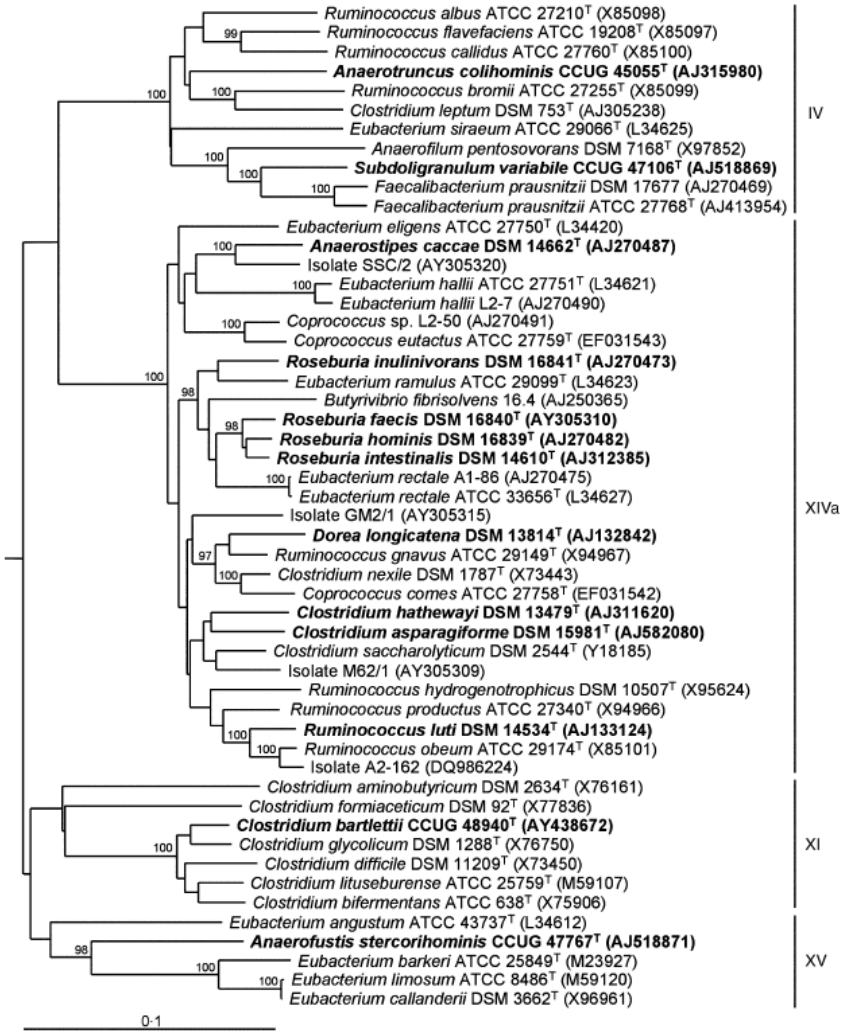


Figure 23. *Arbre phylogénétique des bactéries à Gram positif et à bas GC% (Duncan, et al., 2007)*

R. intestinalis a été identifié comme étant l'une des espèces bactériennes majeures du côlon humain et une des principales espèces productrices de butyrate (Louis & Flint, 2009). Lors de la fermentation des polysaccharides, et principalement de l'amidon, *R. intestinalis* produit majoritairement du butyrate et du lactate mais aussi de l'H_2 en quantité importante (Duncan, *et al.*, 2002). Du fait de son isolement récent, les connaissances concernant la structure de son système xylanolytique sont très réduites. *R. intestinalis* présente pourtant une activité xylanolytique plus importante que les autres souches de *Roseburia* jusqu'à présent étudiées (Chassard, *et al.*, 2007).

Tableau 9. *Croissance des trois souches xylanolytiques étudiées sur différents sucres (Chassard, et al., 2008)*

	***Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T**	***Bacteroides* sp. XB12B**	***Roseburia intestinalis* XB6B4**
glucose	+	+	+
xylose	+	+	+
arabinose	+	+	+
cellobiose	+	±	+
fructose	+	+	+
maltose	+	+	+
raffinose	±	+	+
sucrose	+	+	+
amidon	-	±	+
cellulose	-	-	-
mannitol	-	-	-
ribose	+	+	-

Ces trois souches xylanolytiques récemment isolées : ***Bacteroides* sp. XB12B, *Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T** et ***Roseburia intestinalis* XB6B4** sont capables de fermenter différents sucres solubles (**Tableau 9)** mais possèdent aussi une capacité importante à dégrader les xylanes.

Dans le cadre de ma thèse, ***Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T** et ***Roseburia intestinalis* XB6B4** ont été choisies afin d'étudier leurs activités xylanolytiques et *Bacteroides sp.* XB12B a également été intégrée à une partie de notre travail, pour comparaison.

Objectifs

Objectifs

Après avoir étudié pendant plusieurs années la dégradation des parois végétales par les microorganismes du rumen, l'équipe « Microbiologie des écosystèmes digestifs » dans laquelle j'ai effectué mes recherches de thèse s'est orientée vers un autre écosystème digestif complexe : le côlon. En effet, bien que la fermentation des fibres alimentaires dans le côlon ait été étudiée depuis de nombreuses années, la diversité des espèces bactériennes impliquées dans cette fonction n'est pas encore suffisamment décrite, et les mécanismes enzymatiques mis en jeu par ces microorganismes n'ont été que très peu caractérisés. Il semble pourtant essentiel de bien comprendre le fonctionnement et l'activité des bactéries fibrolytiques présentes dans le côlon de l'Homme, les fibres alimentaires étant un substrat majeur du microbiote intestinal.

A mon arrivée au laboratoire, nous avons choisi d'étudier de façon détaillée, les systèmes enzymatiques de deux bactéries xylanolytiques : *Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T, et *Roseburia intestinalis* XB6B4, précédemment isolées par l'équipe et qui présentaient des activités xylanolytiques importantes (Chassard et al, 2007). Ces deux isolats appartiennent à deux genres bactériens majeurs du microbiote intestinal : *Bacteroides* et *Roseburia*, dont les fonctions semblent diverses dans cet écosystème, et méritent d'être mieux précisées. Les deux bactéries choisies présentent des caractéristiques métaboliques différentes : *B. xylanisolvens* est un bacille à Gram négatif produisant acétate, propionate et succinate, et *R. intestinalis* est un bacille à Gram positif produisant butyrate, lactate et H_2.

Notre travail représente la première description détaillée des systèmes xylanolytiques d'espèces bactériennes du côlon humain, et a permis de progresser dans la compréhension des mécanismes de dégradation des xylanes par *Bacteroides* et *Roseburia*. Dans ce contexte, j'ai développé différentes approches complémentaires au cours de ma thèse :

Une première partie de mon travail a concerné la **caractérisation fonctionnelle** des systèmes enzymatiques de *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4. L'activité xylanolytique des deux isolats a été étudiée lors de la fermentation de plusieurs substrats complexes retrouvés dans l'alimentation humaine (légumes ou céréales). La structure et la complexité des systèmes enzymatiques développés par ces bactéries ont ainsi pu être analysées et comparées. Ce travail a aussi permis de mieux comprendre le rôle respectif de

chacune de ces deux espèces bactériennes dans leur niche écologique. Les objectifs fixés pour ce projet ont permis de répondre à plusieurs questions :

- Les deux bactéries dégradent et fermentent-elles de la même manière les différents substrats testés ?
- Les deux bactéries colonisent-elles ces substrats différemment ?
- Quels systèmes xylanolytiques développent-elles pour dégrader ces substrats, et sont-ils similaires pour les deux espèces bactériennes ?
- Quelle est la localisation des différentes xylanases produites ?

L'ensemble des résultats obtenus est regroupé dans l'article 1.

La suite de mon travail a été consacrée à la **caractérisation moléculaire** des systèmes xylanolytiques des deux bactéries étudiées, et d'un troisième isolat xylanolytique : *Bacteroides* sp. XB12B. Le premier objectif a été de rechercher et isoler les gènes codant pour les xylanases produites par les trois bactéries, afin de disposer d'une vision la plus complète possible des composantes des systèmes hémicellulolytiques des bactéries. Ces gènes de xylanases étaient-ils propres aux bactéries intestinales ou présentaient-ils des similarités avec ceux déjà connus d'autres microorganismes fibrolytiques d'écosystèmes complexes ? Pour répondre à cette question, différentes méthodes ont été mises en place pour rechercher, sur les souches d'intérêt, des gènes homologues à ceux déjà connus chez des espèces bactériennes proches phylogénétiquement. Le séquençage du génome de plusieurs souches de *Bacteroides* et de *Roseburia intestinalis* en 2008-2009 par différentes équipes, ainsi que celui de la souche sur laquelle j'ai travaillé, *B. xylanisolvens* XB1A^T, obtenu à la fin de ma thèse dans le cadre du projet de séquençage du métagénome intestinal humain (projet Européen MetaHit, coordonné par l'INRA), nous a ouvert de nouvelles perspectives. Plusieurs gènes codant pour des xylanases appartenant à différentes familles de glycoside-hydrolases ont ainsi été isolés et séquencés chez les trois bactéries étudiées. Une analyse préliminaire de l'ensemble des gènes d'hémicellulases présents dans le génome de *B. xylanisolvens* XB1A^T a été réalisée. Le second objectif a consisté à démontrer l'expression de certains des gènes identifiés chez les trois bactéries, par recherche des ARNm ou des protéines produites, puis à initier l'étude de la régulation de leur expression par comparaison des niveaux d'ARNm sur différents substrats.

Enfin, nous avons choisi d'étudier plus spécifiquement une xylanase de la famille GH10, dont le gène a été isolé chez *B. xylanisolvens* XB1A^T. Ce gène a été cloné et exprimé chez *E. coli*, puis les propriétés de la protéine recombinante ont été analysées. La

caractérisation enzymatique de cette xylanase suggère que cette enzyme joue un rôle particulier dans la dégradation du xylane par *B. xylanisolvens* XB1A^T. Ces travaux sont inclus dans l'article 2.

Résultats
- Chapitre 1 -

RESULTATS – CHAPITRE 1

Dégradation et fermentation des fibres végétales par *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4

1. INTRODUCTION

Les fibres alimentaires correspondant à la fraction des aliments non digérés dans la partie haute du tube digestif, parviennent au côlon où elles sont dégradées par la communauté bactérienne fibrolytique. Une part importante de ces fibres est représentée par les polyosides constituant les parois végétales, comme les hémicelluloses et la cellulose, qui sont principalement rencontrées dans les fruits, les légumes et les céréales, à des proportions variables selon le type végétal.

Le xylane, polysaccharide principal des hémicelluloses (Polizeli et al. 2005), est un composé arrivant en quantité majeure dans le côlon, qui constitue une source de carbone importante pour les microorganismes de cet écosystème. Le xylane est un polymère linéaire de résidus xylose, largement ramifié. Un système enzymatique complexe est donc nécessaire pour le dégrader et générer des produits de dégradation assimilables par les bactéries. Parmi les différentes souches de bactéries xylanolytiques isolées au laboratoire à partir de selles humaines, nous avons choisi d'étudier *Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T et *Roseburia intestinalis* XB6B4. En effet, *Bacteroides* et *Roseburia* représentent des genres majeurs du microbiote intestinal humain. De plus, les deux espèces bactériennes ont des caractéristiques morphologiques et physiologiques différentes. Nous avons voulu comparer leurs propriétés de colonisation, dégradation et fermentation de différentes sources de fibres, riches en xylane, provenant de l'alimentation humaine.

Pour cela, des substrats de composition variée en hémicelluloses, et plus particulièrement en xylane, ont été utilisés : son de blé et de maïs, fibre de pois, poireau et chou blanc. Du xylane purifié commercial a été également utilisé pour comparaison. La structure et la composition des parois des substrats choisis sont naturellement différentes (Ewing, 2002 ; Favier *et al.*, 1995 et Sauvant *et al.*, 2002). Nous avons caractérisé plus finement ces différences, en analysant la teneur des substrats en monomères osidiques. Puis, des cinétiques de croissance bactérienne ont été réalisées pour chaque substrat sur une durée

de 9 jours, afin de comparer la nature et l'efficacité des systèmes enzymatiques (notamment des xylanases) des souches bactériennes étudiées. Des mesures d'activité xylanase totale ou spécifique ont été effectuées à partir de chaque point de cinétique. La proportion de substrats dégradés a été mesurée pour chaque souche bactérienne, et les produits de fermentation quantifiés. Une analyse qualitative par zymogramme a permis de visualiser les enzymes produites par les bactéries au cours du temps, en fonction du substrat présent dans la culture. Enfin, la colonisation de ces substrats par les deux espèces bactériennes a été comparée.

Ce travail, présenté dans l'article n°1, a permis de caractériser et de comparer, pour la première fois, les systèmes enzymatiques de *Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T et *Roseburia intestinalis* XB6B4. Des résultats additionnels complémentaires sont présentés à la suite de cet article.

2. ARTICLE 1

Dietary fibre degradation and fermentation by two xylanolytic bacteria *Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T and *Roseburia intestinalis* XB6B4 from the human intestine

CAROLINE MIRANDE[1], EVA KADLECIKOVA[1], MARIA MATULOVA[2], PETER CAPEK[2], ANNICK BERNALIER-DONADILLE[1], EVELYNE FORANO[1], AND CHRISTEL BÉRA-MAILLET[1]

1, INRA, UR454 Unité de Microbiologie, Centre de Recherches de Clermont-Ferrand/Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

2, Institute of Chemistry, Centre for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovak Republic

Article accepté pour publication dans : JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY

ABSTRACT

Aims: to characterise fibre degradation, colonisation and fermentation, and xylanase activity of two xylanolytic bacteria *Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T and *Roseburia intestinalis* XB6B4 from the human colon.

Methods and Results: the bacteria grew well on all the substrates chosen to represent dietary fibres: wheat and corn bran, pea, cabbage and leek fibres, and also on purified xylans. *R. intestinalis* colonised the substrates more efficiently than *B. xylanisolvens*. For the two bacteria, 80 to 99% of the total xylanase activity was associated with the cells whatever the substrate and time of growth. Optimal specific activities of cells were obtained on oat spelt xylan; they were higher than those previously measured for xylanolytic bacteria from the human gut. *R. intestinalis* produced high molecular mass xylanases (100 to 170 kDa), while *B. xylanisolvens* produced lower molecular mass enzymes, including a cell-associated xylanase of 37 kDa.

Conclusions: the two bacteria display very high xylanolytic activity on the different substrates. Differences were observed on substrate attachment and enzyme systems suggesting that the two species occupy different niches within the gut microbiota.

Significance and impact of the study: this study characterizes xylan degradation by two major species of the human intestine.

Keywords: human gut microbiota, fibre, xylanase, *Bacteroides xylanisolvens*, *Roseburia intestinalis*

INTRODUCTION

In humans, dietary fibres are an important source of substrates for the resident gut microbiota. These fibres are composed of plant residues that escape digestion in the upper gastrointestinal tract. Their degradation and fermentation by the gut microorganisms is important for maintaining healthy gastrointestinal function; they affect digestive transit, lumen pH, mucosal morphology and lead to the production of short chain fatty acids that are an important energy source for the intestinal epithelium (Macfarlane and Cummings, 1991). Plant cell wall polysaccharides (celluloses, hemicelluloses and pectins), mainly found in cereals, fruits and vegetables, constitute 20–30% of the dietary fibres ingested daily. The gut microbiota degrades and ferments these polymers into short chain fatty acids (SCFA, mainly acetate, propionate and butyrate) and gases (H_2, CO_2 and, in some individuals, CH_4). The breakdown of plant polysaccharides is ensured by a fibrolytic bacterial community which includes cellulolytic and xylanolytic species (Bétian *et al.*, 1977; Salyers *et al.*, 1977; Salyers *et al.*, 1981). This community was re-investigated recently (Robert and Bernalier-Donadille, 2003; Chassard *et al.*, 2007; 2008a). Hemicelluloses are the main components of plant cell walls. They are composed of a mixture of homo- and hetero-polymers including xyloglucans, β-glucans, glucuronomanans, arabinoxylans and xylans, which are intimately associated in the plant cell walls. The digestibility of these substrates by the human gut microbiota is reported to be very high (60–90%), on the contrary to the digestibility of cellulosic substrates (Slavin *et al.*, 1981). Xylans represent the most abundant polysaccharides of the hemicelluloses. Xylans are composed of a backbone of β (1–4)-linked xylose residues with varying degrees of polymerization, to which side groups of 4-O-methyl-D-glucuronopyranosyl, α-L-arabinofuranosyl, acetyl, feruloyl, and *p*-coumaroyl can be coupled (Hespell and Whitehead, 1990). To degrade this heteropolysaccharide, xylanolytic bacteria must produce various enzymes able to cleave the backbone but also the different substituent groups. Recent studies

showed that the gut xylanolytic community is present at high levels in all individuals (~10^{10}, Chassard *et al.*, 2007, 2008b). *Bacteroides* genus was proposed to play a major role in the degradation of xylans (Hespell and Whitehead, 1990) and particularly of arabinoxylans (Hopkins *et al.*, 2003). The main xylan-degrading species isolated from human faeces belong to *Bacteroides* and *Roseburia* (Chassard *et al.*, 2007), which are two major genera of the human gut microbiota. In earlier work, Salyers et al isolated several *Bacteroides* strains from human faeces which were able to ferment xylans. *B. fragilis* and *B. ovatus* were the major xylanolytic bacteria among these isolates (Salyers *et al.*, 1977). None of these species was identified in the recent work of Chassard *et al.*, but several of the *Bacteroides* isolates represented the new species *B. xylanisolvens* (Chassard *et al.*, 2008a). Furthermore, among the *Bacteroides* from the human gut, *B. xylanisolvens* showed specific properties: this species is not able to use starch and appears thus as more specialised in xylan degradation and fermentation. The *Roseburia* isolates were assigned to *R. intestinalis* (Chassard *et al.*, 2007), which has been considered as mainly amylolytic (Duncan *et al.*, 2006). The *B. xylanisolvens* and *R. intestinalis* isolates were shown to display xylanase activity that exceeded that of *B. ovatus* and of *R. intestinalis* type strain (Weaver *et al.*, 1992; Chassard *et al.*, 2007). To date, the xylanase activity of the different human fibrolytic species has only been characterized scarcely and the enzyme systems responsible for xylans degradation in these bacteria are still unknown. The aim of the present study was to analyse and compare the xylanolytic properties of two representatives of the xylanolytic species isolated recently: *B. xylanisolvens* and *R. intestinalis*. They were chosen because of their different characteristics: *B. xylanisolvens* has a Gram-negative cell wall structure while *R. intestinalis* has a Gram-positive cell-wall, and they display different substrate and metabolic profiles. Thus, these two species should occupy different ecological niches in the human gut, and should have different impact on the SCFA molar ratio in the colon. The growth, the substrate colonisation and degradation, the

metabolites produced and the xylanase activity of *B. xylanisolvens* XB1A^T and *R. intestinalis* XB6B4 were monitored and compared on different substrates representing the dietary fibres (cereals and vegetables) consumed daily by humans.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains, substrates and culture conditions

Bacteroides xylanisolvens XB1A^T (DSM 18836T) and *Roseburia intestinalis* XB6B4 (isolated previously by Chassard *et al*., 2007) were cultivated under anaerobic conditions at 37°C in a complex medium containing clarified rumen fluid (described in Chassard *et al.*, 2007) and 0.5% of complex substrates (oat spelt xylan, wheat or corn bran, pea fibre, cabbage, leek) or 0.3% of sugar (xylose, glucose). The media were prepared, dispensed and inoculated by using strictly anaerobic techniques (Hungate, 1969). Cabbage and leek (fresh vegetables) were freeze-dried and ground into fine particles (<500µm diameter) with a blender (Waring laboratory blender, VWR international, Fontenay-sous-bois, France). Wheat or corn bran and pea fibres were kindly supplied by WestHove/Limagrain (Clermont-Ferrand, France). Oat spelt xylan was from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Complex substrates were washed twice with 50 mM NaH_2PO_4 buffer before inclusion in the culture medium. The bacteria were subcultured four times on the respective substrates.

Harvesting of cultures and preparation of cell extracts

B. xylanisolvens XB1A^T and *R. intestinalis* XB6B4 were cultivated for up to 9 days in triplicate with each complex substrate, and the three cultures were analysed separately for each time of growth. Bottles containing 40 ml of complex medium with carbon source were inoculated with 3% (vol/vol) of inocula containing 4.10^9 cells/ml, and cultures were harvested at 0.5, 1, 2, 3, 6 and 9 days. We checked that after 9 days of incubation, the cultures were still

viable. The cultures were centrifuged 20 min at 10,600 x g. The pellets containing the bacteria and the remaining complex substrates were washed twice in 50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 and suspended in 1/10 volume of the same buffer. The supernatant was concentrated tenfold with a Centricon Plus-20 centrifugal device (Millipore, Molsheim, France). Supernatants and cell suspensions were aliquoted and kept frozen at -20°C.

Measurement of dry matter loss

Degradation and/or solubilisation of the solid substrate were measured as the difference in dry weight of the substrate between time zero of the culture and nine days of fermentation (dry matter loss). After centrifugation of the cultures, the pellet containing the bacteria and the solid fibres was dried and weighed. Assays were performed in triplicate for each culture and substrate. Previous work (unpublished) indicated that bacterial cells attached to the substrates contribute less than 10% of the weight measured.

Determination of fibre and sugar composition of substrates

Analysis of cell wall composition of cereals (wheat and corn bran), legumes (pea fibre) and vegetables was done according to the method of Van Soest (Van Soest and Robertson, 1980). Neutral-detergent fibre (NDF), acid-detergent fibre (ADF) and acid-detergent lignin (ADL) contents were determined for each substrate. The hemicellulose fraction was determined as the difference between the NDF and ADF contents, whereas the cellulose fraction was the difference between the ADF and ADL contents.

The constituent monosaccharides of substrates were identified after prehydrolysis by 13M H_2SO_4 at room temperature for one hour, followed by hydrolysis with 1M H_2SO_4 at 100°C for three hours. The monosaccharides released were analysed by gas chromatography and uronic acids were analysed spectrophotometrically as described previously (Matulova *et al.*, 2005).

Analysis of fermentation products and sugars in the growth medium

The fermentation products were quantified by 1D ^{1}H NMR (Matulova *et al.*, 2005). After culture centrifugation, the pH of the extracellular culture fluid (ECCF) was corrected to 7.4. ECCF was then analysed directly for quantification of organic acids by 1D ^{1}H NMR. A 5-mm TXI inverse probe (^{1}H, ^{13}C and ^{15}N) was used in a Bruker Avance DSX spectrometer operating at 500 MHz with z-gradients at 27°C (Matulova *et al.*, 2005, 2008). 10mM sodium 3-(trimethylsilyl)propionate TSP-d_4 (δ 0.0) was used as standard. The SCFA concentrations measured in the bacterial cultures were corrected using the concentrations present in the culture medium before bacterial inoculation, to give net SCFA production.

Sugars present and/or released in the growth medium were determined and quantified by a colorimetric method (Dische, 1955) using xylose and glucose as standard, and also by NMR (Matulova *et al.*, 2005; 2008). The Dische assay was performed directly on ECCF samples. By this method, furfurals are produced from sugars after H_2SO_4 treatment, and then react with cysteine to lead to characteristic coloured products (Dische, 1955). For NMR analysis, ECCF was freeze-dried, suspended and washed twice in D_2O, and finally dissolved in 500 µl of 10mM TSP-d_4 in D_2O. Samples were then subjected to liquid state ^{1}H NMR measurements in a Varian 600 MHz UNITY INOVA 600 NB spectrometer in a 5 mm ^{1}H{^{13}C, ^{15}N}PFG Triple Res IDTG600-5 probe, with z-gradients (Nouaille *et al.*, 2009).

Scanning electron microscopy

B. xylanisolvens XB1A^{T} and *R. intestinalis* XB6B4 were grown in triplicate for three days on culture media containing 0.5% of complex substrates. Cultures were centrifuged (8000g, 10min) and pellets were suspended in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.4). Pellets were fixed for 1 hour with 3% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.4) and cells were then washed three times for 15 min each in the same buffer. Pellets were dehydrated using a

graded series of ethanol solutions. Cells were coated with gold in an EMSCOPE SC500 and examined with a Philips SEM 505 scanning electron microscope.

Protein and enzyme assays

Bacterial and extracellular proteins were determined by the method of Bradford with bovine serum albumin as standard. For each culture time, protein was assayed at least twice.
The enzyme preparations were incubated at 37°C for 30 to 60 min in 50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 with 0.5% oat spelt xylans. The amount of enzyme extract and the incubation time were chosen to give conditions in which the measured activity was proportional to these two parameters. Reducing sugars released from xylan hydrolysis were assayed as described previously (Devillard *et al.*, 1999; Béra-Maillet *et al.*, 2004) with xylose as standard.

Zymograms

Both pellets (cells) and concentrated supernatants (ECCF) were used to detect xylanase activity on zymogram. For zymogram, polyacrylamide gel electrophoresis (8%) was performed under denaturing conditions (SDS-PAGE) with 0.1% of substrate (oat spelt xylan). Proteins were heated at 100°C for 10 min in Laemmli buffer, separated by electrophoresis and then renatured by two 20min incubations of the gel in 2% Triton X100. The gel was further incubated at 37°C and then stained with 0.1% Congo red and destained with 1M NaCl as described previously (Devillard *et al.*, 1999; Béra-Maillet *et al.*, 2004).

Statistical analysis

Two-tailed Student's t-tests were used for statistical analysis (Graphpad Instat software).

Chemicals

TSP-d_4 was from Eurisotop (Saint-Aubin, France). All chemicals were from Sigma-Aldrich.

RESULTS

Substrate compositional analysis

The monosaccharide composition of the fibres used as carbon substrates is shown in Table 1. All the substrates contained a high proportion of glucose residues (from 42 to 77%), which should correspond to cellulose or other glucan polymers. NDF, ADF and ADL analysis of the substrates showed a high content in fibre for wheat bran, corn bran and pea (NDF of 43, 60 and 61%, respectively). It also suggested that pea has a high cellulose content (63% of the NDF), while wheat and corn bran had the highest hemicellulose content (79 and 85% of the NDF, respectively). Table 1 shows that corn and wheat bran had the highest xylose and arabinose content, and that pea had also a quite high content of these sugars. This indicates that these three substrates are rich in arabinoxylans. On the contrary, cabbage and leek had low xylose and thus xylan content. Commercial oat spelt xylans used in this study contained 83% of xylose residues (according to the supplier's data).

Substrate degradation and fermentation

B. xylanisolvens XB1A^T and *R. intestinalis* XB6B4 were grown for up to 9 days with 0.5% of the various complex substrates. A period of 9 days was chosen in order to obtain maximal degradation of the complex substrates by the bacteria. Monitoring of fermentations for such long periods of time was previously used for fibrolytic bacteria (Chassard *et al*, 2005; Chassard and Bernalier-Donadille, 2006). The two strains degraded the different substrates at rather similar extent (Table 2), only wheat bran and leek appeared solubilised at significantly different amounts. Oat spelt xylan was the most degraded substrate (about 60%). The dry

matter loss of all the other substrates was comprised between 22 and 39%. Growth of the bacteria was monitored by protein content estimation. Fermentation products were also quantified. Succinate, propionate and acetate were measured for *B. xylanisolvens* XB1A^T, whereas butyrate and lactate were quantified for *R. intestinalis* XB6B4. Results obtained with oat spelt xylan, wheat bran and cabbage are presented in Fig. 1 as an example. The two strains grew well on all the tested substrates, the highest growth rate and yield were obtained on wheat bran and oat spelt xylan (Fig. 1A and B). The bacterial growth measured on pea fibre, corn bran and leek was rather similar to that obtained on cabbage, shown in Fig1A and B, for the two species. For each substrate, cell biomass increased quickly during the first 24 hours of growth, and then the bacterial proteins increased more slowly (Fig. 1A and B). For *B. xylanisolvens* XB1A^T, propionate (shown in Fig. 1C) was the major metabolite whatever the substrate (about 8 mM produced) except wheat bran for which acetate was produced in slightly higher concentration (8 mM versus 7 mM of propionate). For *R. intestinalis* XB6B4, butyrate and lactate were produced on all the substrates, and butyrate (shown in Fig1D) was always the major metabolite (mean ratio butyrate/lactate of 3.6). The pHs of the media were monitored all along the cultures. The pH values decreased slowly with the production of SCFA, and were all comprised between 6.4 and 6.6 at the end of the cultures.

Substrate colonisation

The cells of *B. xylanisolvens* XB1A^T and *R. intestinalis* XB6B4 attached to wheat bran, cabbage and leek were monitored by scanning electron microscopy after three days of growth on these substrates. The pHs of the culture media were at 6.7 for all the substrates. The bacteria colonised the substrates to different extents: *B. xylanisolvens* XB1A^T cells were rather isolated when cultivated on cabbage and leek (Fig. 2A and 2C). On the contrary, *R.*

intestinalis XB6B4 were attached to cabbage and leek with a high density (Fig. 2B and 2D), forming a thick biofilm. The same results were observed with wheat bran (not shown).

Kinetics of sugar and oligosaccharide production

The substrate degradation was also monitored by analysing the sugars and oligosaccharides present in the extracellular culture fluid (ECCF). The sugars were analysed by both ^{1}H-NMR (Matulova *et al.* 2005; 2008) and a colorimetric method (Dische, 1955), which allowed also their quantification. NMR results obtained with oat spelt xylan are presented in Fig. 3 as an example. They showed first that soluble sugars were released in the ECCF from the substrate in the absence of bacteria. The ^{1}H NMR spectrum in Fig. 3A, registered before bacterial inoculation, showed the presence of soluble arabino-xylooligosaccharides in the ECCF. Indeed, signals corresponding to reducing end of α-xylose and β-xylose (αXyl_{red} and βXyl_{red}) and internal xylose units of oligosaccharide chains (Xyl_{int}) were identified. The ratio between the intensity of the signals of Xyl_{int} and of those of αXyl_{red} and βXyl_{red} suggested the presence of xylo-oligosaccharides of several xylose units. Signals corresponding to chemical shifts of α-arabinofuranose with different links in arabinoxylans were also observed (Ara*f*, Fig. 3) (Hoije *et al.*, 2006; Pastell *et al.*, 2008). The most intense signal belonged to terminal 1,3-linked arabinofuranoside (Hoije *et al.*, 2006). The colorimetric assay indicated that the pentose concentration was 6 mM. After 12h-growth of the bacteria on the substrates, signals characteristic of xylose units in xylooligosaccharides were hardly detected by NMR in the *B. xylanisolvens* culture (Fig. 3, C), while they were still visible in the *R. intestinalis* culture (Fig. 3, B) but disappeared after 24 h of growth. Moreover, the NMR signal due to terminal 1,3-linked Ara*f* disappeared in the spectrum of the *B. xylanisolvens* culture (Fig. 3, C). On all the substrates tested, the colorimetric assay showed also that *B. xylanisolvens* used the soluble sugars more rapidly than *R. intestinalis*. After 24h, the bacteria degraded the insoluble

polymeric substrates, but soluble sugars/oligosaccharides were only detected in very low concentration (1 mM or less) in the ECCF by NMR or sugar colorimetric assay, on all of the substrates tested.

Quantification and distribution of xylanase activity

To determine the distribution of xylanases between bacteria and ECCF during growth on the different substrates, the relative xylanase activities were measured at different culture time. The distribution of the xylanase activity between bacteria and ECCF after 72h of growth is shown in Table 3. It was similar for the two strains: 80 to 96% of the total xylanase activity was associated with the cells whatever the substrate. The same results were obtained at the different culture times (not shown), although a slight increase in the extracellular activity was observed at 6 and 9 days of culture.

The xylanase specific activities of bacteria grown on the different substrates were measured at the different time of culture. Optimal specific activity of bacteria was obtained on oat spelt xylan for both strains, *B. xylanisolvens* XB1A^T showing a specific activity twice that of *R. intestinalis* XB6B4 on this substrate. The specific activity was much lower (10 to 15 times) on the complex substrates. Results obtained for two days of growth are shown in Table 4 as an example. There was no major change of the specific activity during the 9 days of culture, except a small decrease after 6 days (not shown).

Zymogram analysis

Xylanase activity of cells and ECCF were analyzed by SDS-PAGE zymogram during the culture. The xylanase zymogram profiles of each strain revealed a high number of bands on all the substrates. Xylanase activity profiles of *B. xylanisolvens* XB1A^T were characterized by the presence of endoxylanase bands at lower molecular weight (37 to 170 kDa) compared to

those of *R. intestinalis* XB6B4 (100 to 170 kDa). Fig. 4 shows the zymograms obtained with *B. xylanisolvens* XB1A^T growing on oat spelt xylan (A) and *R. intestinalis* XB6B4 growing on wheat bran (B) for 9 days as examples. Whatever the substrate *B. xylanisolvens* XB1A^T presented two major xylanases at 37 and 80 kDa. The 37 kDa band was only observed in the bacteria while the 80 kDa band was also found in the ECCF. A band at 100kDa was mostly associated with the ECCF fraction. *R. intestinalis* produced on all the substrates a cell-associated 170 kDa xylanase, and several other bands of lower intensity both in the cells and the ECCF. For both bacteria, the xylanase banding pattern obtained for each substrate was similar during the kinetics, except that the intensity of some bacteria-associated bands decreased with time, while that of the ECCF increased (Fig. 4).

Discussion

The two bacteria studied *B. xylanisolvens* XB1A^T and *R. intestinalis* XB6B4 degraded and fermented all the substrates tested, chosen as representatives of dietary fibres consumed daily by humans. The substrates contained various proportions of xylans. The degradation of the complex substrates was lower than that of purified xylans, probably because of the presence of cellulose which is not degraded by the two isolates (Chassard *et al.*, 2007). In addition, differences in the extent of degradation of the various complex substrates may be explained by their structural and chemical composition.

Fibrolytic bacteria are considered as primary colonisers of the insoluble plant substrates they degrade, and they produce specific adhesion and enzyme systems to exploit them. These systems have been well studied in bacteria from different ecosystems like the rumen (Forsberg *et al.*, 2000) or the soil (Demain *et al.*, 2005), but very little is known on colonisation of plant fibres by human colonic bacteria. The present work shows that complex substrates were colonised differently by the two bacteria (Fig. 2). This may result from

different attachment sites for the two species. Indeed, the bacterial species composition of particulate and liquid fractions of faecal samples was studied recently (Walker *et al.*, 2008). The authors found *Firmicutes,* including *Roseburia,* in majority associated with particles, while *Bacteroidetes* were mostly associated with the liquid fraction. Colonisation of wheat bran by faecal bacteria was also monitored *in vitro* and sequences retrieved from bran were dominated by clostridial cluster XIVa bacteria, including *Roseburia* species (Leitch *et al.*, 2007). *Bacteroides* species were also detected, but to a lesser extent. Our results are in agreement with these findings that altogether suggest that *Roseburia* are attached more tightly to the insoluble substrates gaining an important competitive advantage compared with *Bacteroides* that form a looser association with the substrate and are found in majority as planktonic cells. *Bacteroides* may then be more specialised in the degradation of soluble polysaccharides.

B. xylanisolvens produced propionate, succinate and acetate as metabolites. Propionate was the major metabolite on most of the complex substrates. Succinate is likely to be rapidly converted into propionate by the gut microbiota, thus under physiological conditions of the gut, fermentation of xylans by *B. xylanisolvens* probably leads mainly to propionate and acetate. *R. intestinalis* produced butyrate and lactate on all the tested substrates. This species has been considered mainly as amylolytic (Ramsey et al, 2006). Our work suggests that *R. intestinalis* is also a major xylanolytic bacterium in the colon, producing butyrate upon fermentation of xylan-rich substrates. This is in agreement with recent work *in vitro* which showed that the fermentation of arabinoxylans led to a high proportion of butyric acid (Hughes *et al.*, 2007).

The xylanase activity of the two bacteria appeared to be mainly associated with the cells (80 to 96% of the total activity), the enzymes could be intracellular (see below), in the membranes or anchored at the cell surface as found for other xylanolytic species (Liebl *et al.*, 2008).

Previous work showed that xylanase activity of *B. ovatus* and *B. fragilis* is also cell-associated (Salyers *et al.*, 1982). In the competitive community of the gut microbiota, retaining enzymes on the bacterial surface should represent a clear ecological advantage for the bacteria. Amylase activity of bacteria from the human gut, including *Roseburia* and *B. thetaiotaomicron*, was also found largely cell-associated (Anderson and Salyers, 1989; Ramsey *et al.*, 2006).

During growth on xylans and on all the complex substrates, very low concentration of soluble sugars and oligosaccharides were released by the two bacteria. This suggests a very efficient utilisation of the polymer degradation products that could be explained by sequestration of xylans at the cell surface and utilisation of xylooligosaccharides in the periplasm or cytoplasm. In addition, *B. xylanisolvens* used the soluble substrates more rapidly than *R. intestinalis* and NMR results suggest also a higher arabinofuranosidase activity in *B. xylanisolvens* (Fig 3). Very efficient use of polysaccharide hydrolysis product was observed for cellulose and xylans in the rumen bacteria *Fibrobacter succinogenes* (Matulova *et al.*, 2005) and *Prevotella bryantii* (Miyazaki *et al.*, 1997), respectively. On the contrary, the two colonic bacteria *B. ovatus* and *B. eggerthii* released a variety of oligomers in the culture medium during growth on xylans (Salyers *et al.*, 1981).

SDS-PAGE zymogram analysis showed that the xylanolytic system of *R. intestinalis* was mainly composed of high molecular mass proteins, suggesting that these enzymes carry several modules (Bourne and Henrissat, 2001). On the contrary, *B. xylanisolvens* XB1A^T produced lower molecular mass enzymes, including a cell-associated xylanase of 37 kDa. For both bacteria, the intensity of some bacteria-associated bands decreased after three days, while that of the ECCF increased. This may be due to the release of surface-anchored xylanases with time and possibly also to bacterial cell lysis at 6 and 9 h of culture. However, cell lysis must be minor because the 37 kDa xylanase was not found in the ECCF. The only

other human gut bacterium whose xylanolytic system has been studied is *B. ovatus*. One xylanase gene (*xylI*) encoding a GH10 enzyme was cloned into *E. coli* (Whitehead and Hespell, 1990; Weaver *et al.*, 1992). It encoded a 38 kDa protein with a molecular mass close to that of the 37 kDa xylanase identified here in *B. xylanisolvens* XB1A^T.

The xylanase specific activities of *B. xylanisolvens* and *R. intestinalis* measured on the different substrates were high. The specific activity measured in cultures on purified xylans was much higher than that measured in cultures on the other complex substrates. This result suggests either an induction of xylanase-encoding genes on xylans, or a catabolite repression on the other substrates due to sugars generated by the degradation of non-xylan polysaccharides, or both. Indeed, the two bacteria were able to grow on non-xylan hemicelluloses such as β-glucan, a mixed linkage β(1,3) and (1,4) glucose polymer (unpublished results). Earlier work indicated that the xylanases from the human colonic *Bacteroides* species, including *B. ovatus*, were inducible rather than constitutive (Salyers *et al.*, 1978), and that their activity was optimal on xylans (Hespell and Whitehead, 1990). The xylanase specific activities measured on xylans for *B. xylanisolvens* and *R. intestinalis* were higher than that reported previously for other species from the human gut, including *B. ovatus* (Weaver *et al.*, 1992, Chassard *et al.*, 2007), and even higher than that quantified for major cellulolytic and xylanolytic rumen bacteria (Miyazaki *et al.*, 1997; Reveneau *et al.*, 2003; Béra-Maillet *et al.*, 2004) or protozoa (Béra-Maillet *et al.*, 2005). This result suggests that the two strains studied here are representatives of major xylanolytic species from the human gut microbiota.

Although the two bacteria studied in this work show some similarity in their xylanolytic activity on complex substrates: cell-associated activity, rather similar preferential substrate and similar extent of substrate degradation, they show very different activity profile on zymograms and were attached differently to the various substrates. *R. intestinalis* and *B.*

xylanisolvens, two of the main xylanolytic species isolated from human faeces, that have been found in most of the individuals tested (Chassard *et al.*, 2007), appear thus to have specific niches within the gut microbiota. In addition, as butyrate and propionate producers respectively, they may contribute differently to potential beneficial effects of SCFA on health, since butyrate has been implicated in the prevention of gut pathologies and propionate has been proposed to inhibit lipogenesis (Wong *et al.*, 2006).

Acknowledgments

CM was a recipient of an MESR fellowship. EK is grateful to the French Embassy in Slovakia for a fellowship. We thank Brigitte Gaillard-Martinie (plateau technique de microscopie du centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix) for performing scanning electron-microscopy and WestHove/Limagrain (Clermont-Ferrand, France) for the gift of wheat and corn bran and pea fibres. The contribution of MM and PC was supported by VEGA 2/0155/08.

References

Anderson, K.L. and Salyers, A.A. (1989) Biochemical evidence that starch breakdown by *Bacteroides thetaiotaomicron* involves outer membrane starch-binding sites and periplasmic starch-degrading enzymes. *J Bacteriol* **171**, 3192-3198.

Béra-Maillet, C., Ribot, Y. and Forano, E. (2004) Fiber-degrading systems of different strains of the genus *Fibrobacter*. *Appl Environ Microbiol.* **70,** 2172-2179.

Béra-Maillet, C., Devillard, E., Cezette, M., Jouany, J.-P. and Forano, E. (2005) Xylanases and CMCases of the rumen protozoa *Polyplastron multivesiculatum*, *Eudiplodinium maggii* and *Entodinium* sp. *FEMS Microbiol Lett* **244**, 149-56

Bétian, H.G., Linehan, R.A., Bryant, M.P. and Holdeman, L.V. (1977) Isolation of a cellulolytic *Bacteroides* sp. from human feces. *Appl Environ Microbiol.* **33**, 1009-1010.

Bourne, Y. and Henrissat, B. (2001) Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 593-600.

Chassard, C., Gaillard-Martinie, B. and Bernalier-Donadille, A. (2005) Interaction between H_2-producing and non-H_2 producing cellulolytic bacteria from the human colon. *FEMS Microbiol Lett* **242**, 339-344.

Chassard, C. and Bernalier-Donadille, A. (2006) H_2 and acetate transfers during xylan fermentation between a butyrate-producing xylanolytic species and hydrogenotrophic microorganisms from the human gut. *FEMS Microbiol Lett* **254**, 116-122.

Chassard, C., Goumy, V., Leclerc, M., Del'homme, C. and Bernalier-Donadille, A. (2007) Characterization of the xylan-degrading microbial community from human faeces. *FEMS Microbiol Ecol* **61**, 121-131.

Chassard, C., Delmas, E., Lawson, P.A. and Bernalier-Donadille, A. (2008a) *Bacteroides xylanisolvens* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1008-1013.

Chassard, C., Scott, K.P., Marquet, P., Martin, J.C., Del'homme, C., Dapoigny, M. Flint, H.J. and Bernalier-Donadille, A. (2008b) Assessment of metabolic diversity within the intestinal microbiota from healthy humans using combined molecular and cultural approaches. *FEMS Microbiol Ecol* **66**, 496-504.

Demain, A.L., Newcomb, M. and Wu, J.H.D. (2005) Cellulase, Clostridia, and Ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 124-154.

Devillard, E., Newbold, C.J., Scott, K.P., Forano, E., Wallace, R.J., Jouany, J.P. and Flint, H.J. (1999) A xylanase produced by the rumen anaerobic protozoan *Polyplastron multivesiculatum* shows close sequence similarity to family 11 xylanases from gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **181**, 145-52.

Dische, *Z.* (1955) New color reactions for determination of sugars in polysaccharides; in Methods *of* Biochemical Analysis (D. Glick, ed.), Vol. 2, p. 313-358. Interscience, New York London.

Duncan, S.H., Aminov, R.I., Scott, K.P., Louis, P., Stanton, T.B. and Flint, H.J. (2006) Proposal of *Roseburia faecis* sp. nov., *Roseburia hominis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov., based on isolates from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2437-2441.

Forsberg, C.W., Forano, E. and Chesson, A. (2000) Microbial adherence to the plant cell wall and enzymatic hydrolysis. p. 79-97. *In Ruminant physiology, Proc. IX International Symposium on Ruminant Physiology.* Casey N. et al Ed CABI Publishing.

Hespell, R.B. and Whitehead, T.R. (1990) Physiology and genetics of xylan degradation by gastrointestinal tract bacteria. *J Dairy Sci* **73**, 3013-3022.

Höije, A., Sandström, C., Roubroeks, J.P., Andersson, R., Gohil, S. and Gatenholm, P. (2006) Evidence of the presence of 2-O-beta-D-xylopyranosyl-alpha-l-arabinofuranose side chains in barley husk arabinoxylan. *Carbohydr Res* **341**, 2959-2966.

Hopkins, M.J., Englyst, H.N., Macfarlane, S., Furrie, E., Macfarlane, G.T. and McBain, A.J. (2003) Degradation of cross-linked and non-cross-linked arabinoxylans by the intestinal microbiota in children. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6354-6360.

Hughes, S.A., Shewry, P.R., Li, L., Gibson, G.R., Sanz, M.L. and Rastall, R.A. (2007) In vitro fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans. *J Agric Food Chem.* **55**, 4589-4595.

Hungate, R.E. (1969) A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes. *Methods in Microbiology*, Vol. 3B (Norris JR & Ribbons DW, eds), pp. 117–132. Academic Press, London, New York.

Leitch, E.C., Walker, A.W., Duncan, S.H., Holtrop, G. and Flint, H.J. (2007) Selective colonization of insoluble substrates by human faecal bacteria. *Environ Microbiol.* **9**, 667-679.

Liebl, W., Winterhalter, C., Baumeister, W., Armbrecht, M. and Valdez, M. (2008) Xylanase attachment to the cell wall of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J Bacteriol* **190**, 1350-1358.

Macfarlane, G.T. and Cummings, J.H. (1991) The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. In *The large Intestine: Physiology, pathophysiology and disease* (Philips SF, Pemberton JH and Shoeter RG, eds), pp51-92. Raven Press, New York.

Matulova, M., Nouaille, R., Capek, P., Péan, M., Forano, E. and Delort, A.M. (2005) Degradation of wheat straw by *Fibrobacter succinogenes* S85: a liquid- and solid-state nuclear magnetic resonance study. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1247-1253.

Matulova, M., Nouaille, R., Capek, P., Péan, M., Delort, A.-M. and Forano, E. (2008) NMR study of cellulose and wheat straw degradation by *Ruminococcus albus* 20. *FEBS Journal* **275**, 3503-3511.

Miyazaki, K., Martin, J.C., Marinsek-Logar, R. and Flint, H.J. (1997) Degradation and utilisation of xylans by the rumen anaerobe *Prevotella bryantii* (formerly *P. ruminicola* subsp. *brevis*). *Anaerobe* **3**, 373-381.

Nouaille, R., Matulova, M., Pätoprstý, V., Delort, A.-M. and Forano, E. (2009) Production of oligosaccharides and cellobionic acid by *Fibrobacter succinogenes* S85 growing on sugars, cellulose and wheat straw. *Appl Microbiol Biotechnol*. **83**, 425-433.

Pastell, H., Tuomainen, P., Virkki, L. and Tenkanen, M. (2008) Step-wise enzymatic preparation and structural characterization of singly and doubly substituted arabinoxylo-oligosaccharides with non-reducing end terminal branches. *Carbohydr Res*. **343**, 3049-3057.

Ramsey, A.G., Scott, K.P., Martin, J.C., Rincon, M.T. and Flint, H.J. (2006) Cell-associated α-amylases of butyrate-producing Firmicute bacteria from the human colon. *Microbiology* **152**, 3281-3290.

Reveneau, C., Adams, S.E., Cotta, M.A. and Morrison, M. (2003) Phenylacetic and phenylpropionic acids do not affect xylan degradation by *Ruminococcus albus*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6954-6958.

Robert, C. and Bernalier-Donadille, A. (2003) The cellulolytic microflora of the human colon: evidence of microcrystalline cellulose-degrading bacteria in methane-excreting subjects. *FEMS Microbiol Ecol* **46**, 81-89.

Salyers, A.A., Vercellotti, J.R., West, S.H.E. and Wilkins, T.D. (1977) Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from human colon. *Appl Environ Microbiol* **33**, 319-322.

Salyers, A.A., Palmer, J.K. and Wilkins, T.D. (1978) Degradation of polysaccharides by intestinal bacterial enzymes. *Am J Clin Nutr* **10**, S128-S130.

Salyers, A.A., Gherardini, F. and O'Brien, M. (1981) Utilization of xylans by two species of human colonic *Bacteroides*. *Appl Environ Microbiol* **41**, 1065-1068.

Salyers, A.A., Balascio, J.R. and Palmer, J.K. (1982) Breakdown of xylan by enzymes from human colonic bacteria. *J Food Chem* **6**, 39-55.

Slavin, J.L., Brauer, P.M. and Marlett, J.A. (1981) Neutral detergent fiber, hemicellulose and cellulose digestibility in human subjects. *J Nutr* **111**, 287-297.

Van Soest, P.J. and Robertson, J.B. (1980) System of analysis for evaluating fibrous feeds. In WJ Pigden, Balch CC, Graham M (Eds). Standardization of analytical methodology for feeds. Pp 49-60. International Development Research Center, Ottawa, Canada.

Walker, A.W., Duncan, S.H., Harmsen, H.J., Holtrop, G., Welling, G.W. and Flint, H.J. (2008) The species composition of the human intestinal microbiota differs between particle-associated and liquid phase communities. *Environ Microbiol* **10**, 3275-3283.

Weaver, J., Whitehead, T.R., Cotta, M.A., Valentine, P.C. and Salyers, A.A. (1992) Genetic analysis of a locus on the *Bacteroides ovatus* chromosome which contains xylan utilization genes. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2764-2770.

Whitehead, T.R. and Hespell, R.B. (1990) The genes for three xylan-degrading activities from *Bacteroides ovatus* are clustered in a 3.8-kilobase region. *J Bacteriol* **172**, 2408-2412.

Wong, J.M., de Souza, R., Kendall, C.W., Emam, A. and Jenkins, D.J. (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* **40**, 235-243.

Figure legends

Fig. 1. Bacterial proteins (A, B) and organic acids (C, D) produced by *B. xylanisolvens* XB1A^T (A, C) and *R. intestinalis* XB6B4 (B, D) grown for 6 days at 37°C. Substrates (0.5%) were oat spelt xylan (Δ), wheat bran (■), and cabbage (□). A, B: bacterial proteins (mg). C: production of propionate (mM) by *B. xylanisolvens* XB1A^T; D: production of butyrate (mM) by *R. intestinalis* XB6B4. Each value represents the mean of three different cultures ± SD.

Fig. 2. Scanning electron microscopy of residual substrate after 3 days of growth of *B. xylanisolvens* XB1A^T (A, C) and *R. intestinalis* XB6B4 (B, D) on cabbage (A, B) or leek (C, D). 5.10^9 bacteria were inoculated at time zero on each substrate. Grey or black bar: 10µm.

Fig. 3. ^{1}H NMR spectra of culture medium containing xylan before bacterial inoculation (A) and after 12 h of growth of *R. intestinalis* XB6B4 (B) or *B. xylanisolvens* XB1A^T (C). Peak at δ 4.7-4.75 ppm corresponds to signal of residual water (HOD). Ara*f*: arabinofuranoside linked to xylooligosaccharides (at δ 5.40, 5.35-5.28 and 5.25-5.21); αXyl_{red} and βXyl_{red}: α and β reducing end of xylooligosaccharides (at δ 5.2 and 4.60 ppm, respectively); Xyl_{int}: internal units of xylooligosaccharides (at δ 4.5 ppm).

Fig. 4. Xylanase zymogram analysis of bacterial (P) and extracellular (S) proteins of *B. xylanisolvens* XB1A^T (A) and *R. intestinalis* XB6B4 (B) grown on oat spelt xylan and wheat bran, respectively. Growth of bacteria was performed from 0.5 to 9 days. Protein migration was performed on 8% acrylamide gels. 16 µg and 30 µg of proteins were laid on the gels for xylan and wheat cultures, respectively. Lane M, broad range molecular mass standards (in kilodaltons, Biorad).

Table 1. Monomer composition (% w) of the substrates.

Sugars / **Substrates**	Rhamnose	Fucose	Ribose	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose	Inositol	Uronic acid
Wheat	1.5	0.2	0.1	11.9	20.9	1.0	2.6	58.5	tr	5.0
Pea	-	-	-	5.0	11.8	0.5	3.3	68.0	-	9.7
Corn	-	-	-	17.0	29.8	0.8	3.9	42.4	-	6.1
Cabbage	1.2	0.1	-	5.1	2.5	3.8	4.4	77.1	0.8	5.3
Leek	0.7	0.1	0.1	2.0	2.5	4.6	11.0	71.7	0.8	6.5

Table 2. Dry matter loss of the solid residue (% w) after growth of *B. xylanisolvens* XB1A^T and *R. intestinalis* XB6B4.

	Dry matter loss (%)	
Substrate	*B. xylanisolvens* XB1A^T	*R. intestinalis* XB6B4
oat spelt xylan	56.9 ± 1.2	58.2 ± 2.5
wheat	38.3 ± 0.8 *	32.7 ± 1.1 *
pea	30.7 ± 8.4	22.9 ± 2.4
corn	25.3 ± 2.0	22.5 ± 1.2
cabbage	39.1 ± 2.9	38.9 ± 2.9
leek	27.4 ± 1.4 *	37.9 ± 1.7 *

Each value represents the mean of three different cultures ± SD. Values marked (*) are found statistically different between the two strains ($P<0.05$) by the two-tailed Student's t-test.

Table 3. Distribution of total xylanase activity (%) after three days of growth of *B. xylanisolvens* XB1A^T and *R. intestinalis* XB6B4 on the substrates.

Substrate	***B. xylanisolvens* XB1A^T**		***R. intestinalis* XB6B4**	
	Cell-associated	*Extracellular*	*Cell-associated*	*Extracellular*
oat spelt xylan	88.9 ± 3.5	11.1 ± 3.5	87.0 ± 3.0	13.0 ± 3.0
wheat	88.9 ± 4.0	11.1 ± 4.0	88.8 ± 7.6	11.2 ± 7.6
pea	95.3 ± 1.5	4.7 ± 1.5	90.1 ± 4.6	9.9 ± 4.6
corn	81.6 ± 18.3	18.4 ± 12.7	86.0 ± 4.7	14.0 ± 4.7
cabbage	80.4 ± 3.3	19.6 ± 3.3	90.4 ± 4.7	9.6 ± 2.9
leek	95.6 ± 3.9	6.6 ± 1.4	95.3 ± 4.2	7.1 ± 1.7

Results are expressed as % of mean total activity of three different cultures ± SEM

Table 4. Xylanase specific activity measured after two days of growth of *B. xylanisolvens* XB1A^T and *R. intestinalis* XB6B4 on the different substrates.

	Xylanase activity	
Substrate	***B. xylanisolvens* XB1A**	***R. intestinalis* XB6B4**
oat spelt xylan	2357 ± 154	1201 ± 251
wheat	146 ± 15	90 ± 10
pea	176 ± 51	231 ± 11
corn	161 ± 31	101 ± 22
cabbage	40 ± 5	113 ± 13
leek	185 ± 30	109 ± 38

Specific activity is measured with oat spelt xylan as substrate and expressed in nmol of xylose equivalent.mg protein^{-1}.min^{-1}. Results are expressed as the mean of specific activities of three different cultures ± SEM.

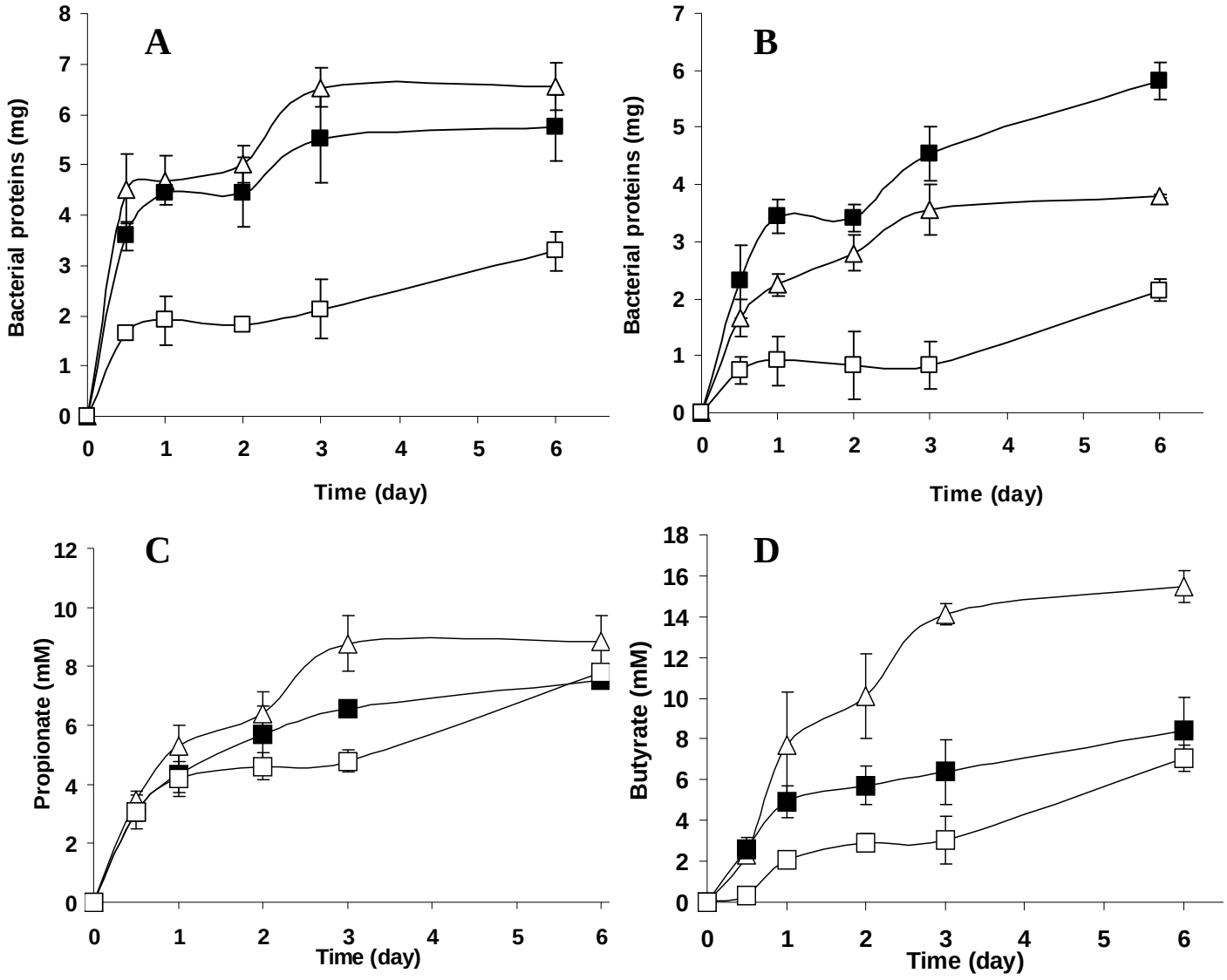

A
Bacterial proteins (mg)
Time (day)
B
Bacterial proteins (mg)
Time (day)
C
Propionate (mM)
Time (day)
D
Butyrate (mM)
Time (day)

Figure 1

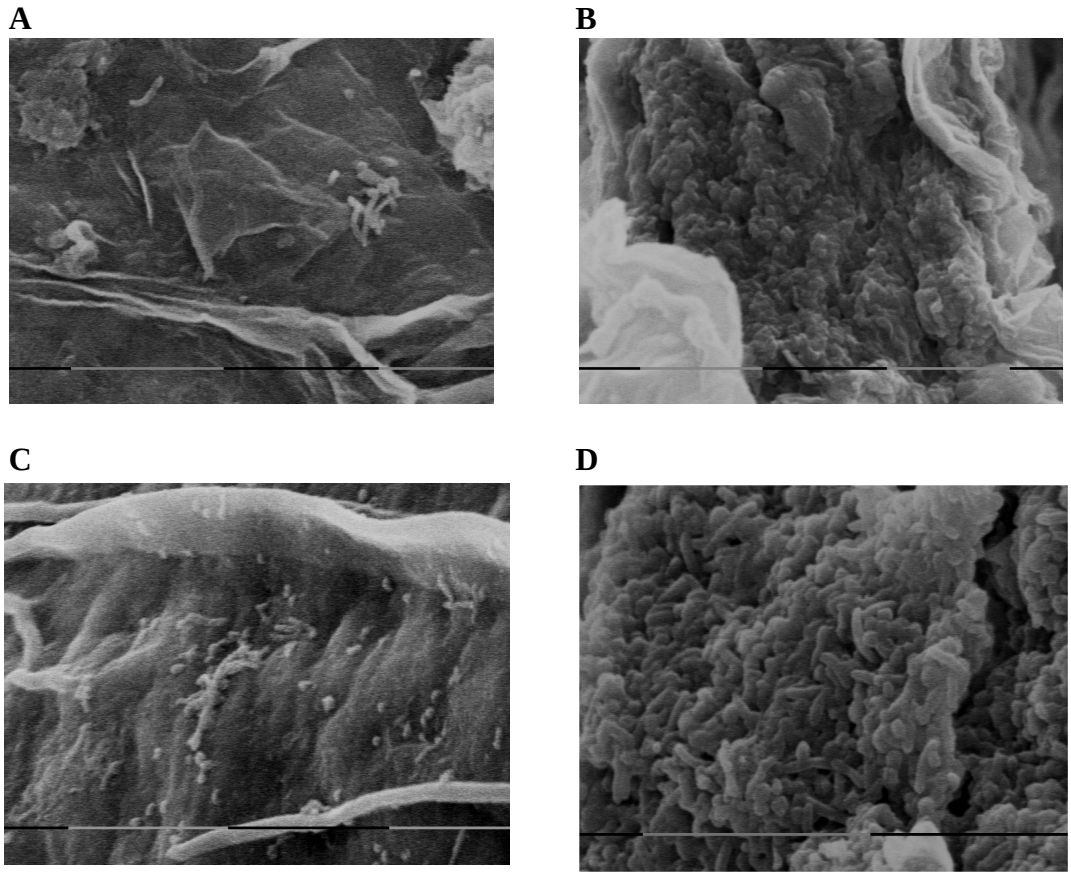
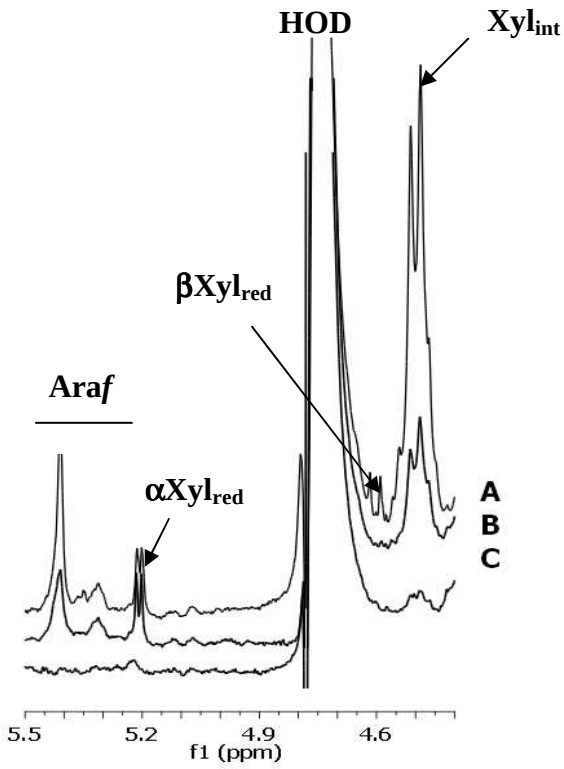


Figure 2.



Chemical shift (ppm)

Figure 3

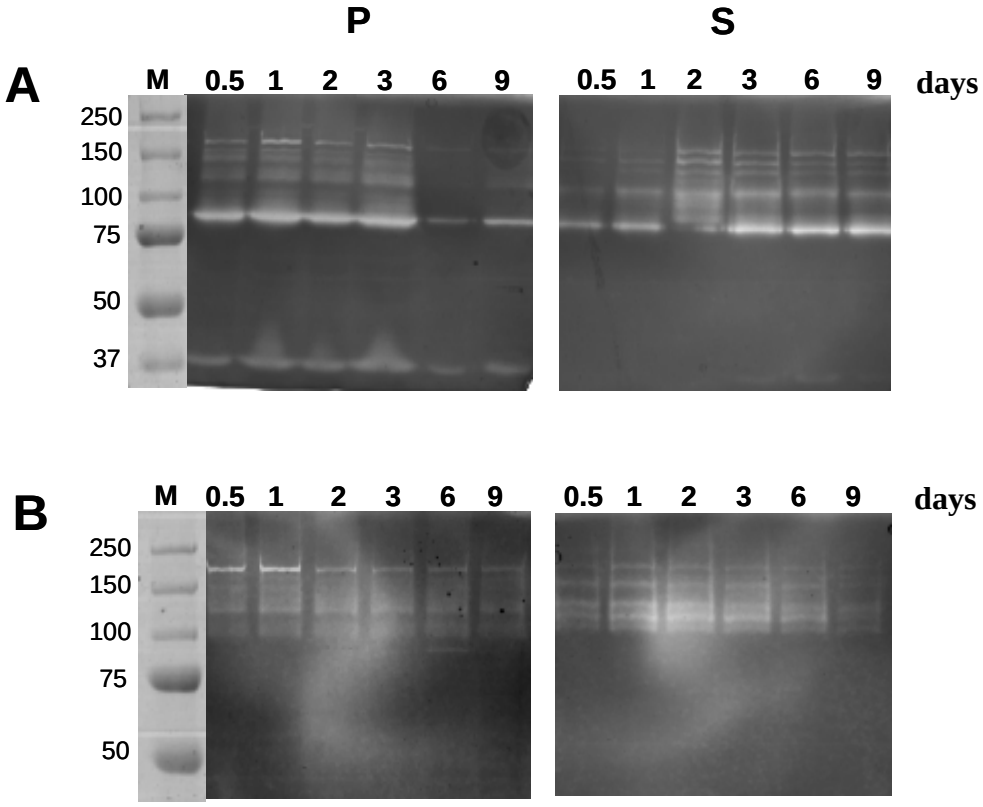

P
S
A
M
0.5
1
2
3
6
9
0.5
1
2
3
6
9
days
250
150
100
75
50
37
B
M
0.5
1
2
3
6
9
0.5
1
2
3
6
9
days
250
150
100
75
50

Figure 4.

3. RESULTATS ADDITIONNELS

3.1 Composition des substrats complexes utilisés dans cette étude

Les substrats testés ont été choisis afin d'être représentatifs de notre alimentation et diffèrent dans la composition de leurs parois végétales, plus ou moins riches en xylane. Le choix a été fait à partir de données bibliographiques (Ewing, 2002 ; Favier, *et al*., 1995, Sauvant, *et al*., 2002 et Weightman, *et al*., 1992), mais celles-ci étant très limitées, nous avons cherché à mieux caractériser ces substrats. Plusieurs dosages ont donc été réalisés pour connaître leur composition glucidique :

- d'une part, le dosage des monosaccharides après hydrolyse des parois végétales (résultats présentés dans l'article n°1)
- d'autre part, le dosage de Van Soest qui est une méthode de fractionnement des parois végétales, permettant de déterminer les fractions cellulosique et hémicellulosique des parois (Van Soest & Robertson, 1980), (**Tableau 10**).

Tableau 10. *Fractionnement des parois végétales d'après Van Soest et Robertson*

	% de matière sèche			% de NDF	
	NDF	**ADF**	**ADL**	**Cellulose**	**Hémicelluloses**
Son de blé	43.5	9.2	2.7	15	79
Son de maïs	60.7	8.9	0.6	14	85
Fibre de pois	61.6	40.9	2.2	63	34

NDF (Neutral Detergent Fiber) : parois végétales obtenues par action de dodécylsulfate en milieu neutre.

ADF (Acid Detergent Fiber) : ligno-cellulose obtenue par action de CTAB (céthyletriméthylammonium bromure) en milieu acidifié par H_2SO_4, à partir de résidu NDF.

ADL (Acid Detergent lignine) : lignine estimée après réduction de la cellulose vraie par H_2SO_4 72% à partir du résidu ADF.

NDF – ADF = hémicelluloses et ADF – ADL = cellulose

Tableau 10. Bis. *Ratios Arabinose/Xylane et GlcUA/Xylane des différents substrats*

	Arabinose/Xylane	GlcUA / Xylane
Poireau	0,8	2,6
Chou	2,0	2,2
Pois	0,4	0,8
Son de blé	0,6	0,2
Son de maïs	0,6	0,2

Le dosage de Van Soest a été effectué sur son de blé et de maïs, pois, poireau et chou blanc, mais les résultats obtenus pour les légumes (poireau et chou) n'ont pas été validés. Ce dosage, destiné à l'origine à analyser les plantes fourragères, ne semble pas adapté à ce type de substrat, dont la teneur en fibre est faible.

Les résultats du dosage de Van Soest montrent que la composition en fibres des parois végétales des substrats est différente (43.5 à 61.6%). L'analyse des teneurs en cellulose et hémicelluloses montre que les céréales (sons de blé et de maïs) sont très riches en hémicelluloses (79% et 85% respectivement), alors que la fibre de pois (légumineuse) contient plus de cellulose (63%) que d'hémicelluloses (34%). En parallèle, les résultats du dosage des monosaccharides présentés dans l'article n°1, ont suggéré des différences dans la nature des composés hémicellulosiques des substrats étudiés. En effet, les sons de blé et de maïs semblent riches en arabinoxylane (Article 1, Tableau 1), qui est un constituant majeur des parois végétales de céréales (Izydorczyk & Biliaderis, 1995). Au contraire, la proportion d'arabinose retrouvée dans la fibre de pois est plus faible (Article 1, Tableau 1) et corrobore les données de la littérature indiquant une présence importante de xyloglucanes dans les parois végétales de légumineuses (Buckeridge, *et al*., 2000, Powlowski, *et al*., 2009).

Ces substrats présentent également des ratios indicateurs des taux de substitutions très différents (Arabinose/Xylane et GlcUA/Xylane, **Tableau 10.Bis**).

3.2 Dégradation et fermentation des différents substrats par B. xylanisolvens XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4.

Pour évaluer la capacité de ces bactéries à dégrader les substrats complexes et à utiliser les produits de dégradation pour leur croissance, deux paramètres ont été mesurés tout au long des cinétiques bactériennes :

- la quantité de protéines bactériennes, représentative de la croissance des bactéries ;
- la concentration en acides gras à chaîne courte (AGCC) produits par les bactéries, représentative de leur activité métabolique.

Les cinétiques ont également été réalisées à partir des bactéries cultivées sur sucres simples (glucose ou xylose).

Dans les figures 24 et 25, l'ensemble des résultats obtenus sur les différents substrats, et non présentés dans l'article n°1, sont décrits. *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4 se développent bien sur tous les substrats et les croissances les plus importantes sont observées sur xylane oat spelt et sur son de blé pour chaque espèce (**Figure 24 A et C**).

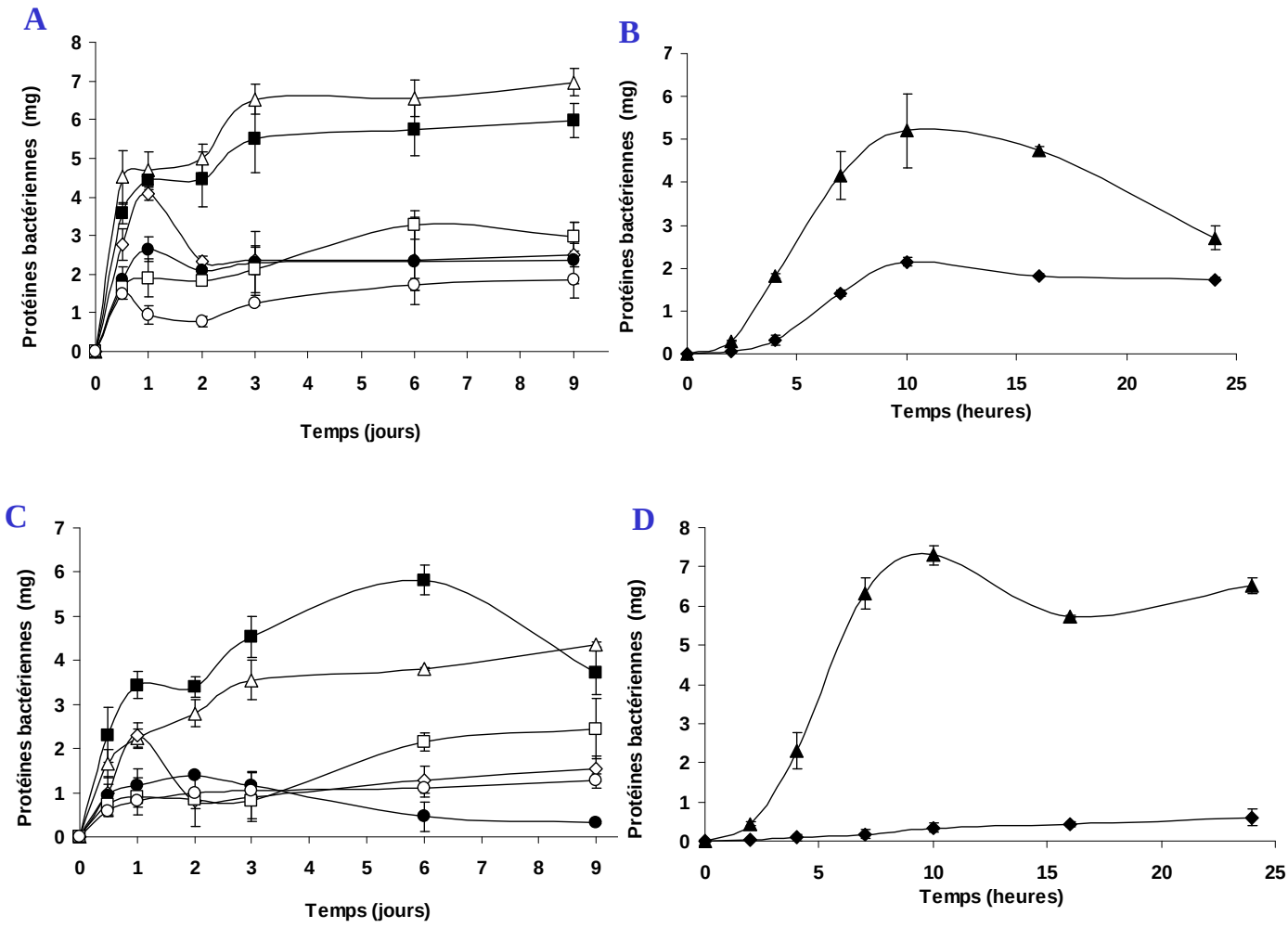


Figure 24. *Croissance de B. xylanisolvens XB1A^T (A, B) et de R. intestinalis XB6B4 (C, D) sur xylane oat spelt (Δ), son de blé (■), fibre de pois (◊), son de maïs (●), chou (□) et poireau (○) pendant 9 jours et sur xylose (◆) ou glucose(▲) pendant 24 heures. Les bactéries ont été cultivées, en triplicat, pendant neuf jours ou 24 heures à 37°C, dans 40ml de milieu de culture contenant 0.5% de substrat complexe ou 0.3% de sucre soluble. Les graphiques représentent, pour chaque point, la quantité moyenne de protéines bactériennes (en mg) obtenues à partir des trois cultures de 40ml.*

La croissance bactérienne est particulièrement importante pendant les 24 premières heures de cinétique, puis la biomasse évolue lentement pendant les 8 jours qui suivent. Le même profil est observé pour tous les substrats (sauf pour la fibre de pois) et pour les deux souches bactériennes. Ce phénomène, observé chez *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4, peut s'expliquer par le fait que pendant les premières 24 heures, les sucres solubles

sont d'abord utilisés, puis ensuite, les substrats complexes sont hydrolysés et métabolisés plus lentement. Les cultures sur fibres de pois diffèrent par la présence d'un pic de croissance à 24 heures, puis d'une chute des protéines bactériennes à 2 jours qui pourrait témoigner d'une lyse bactérienne partielle puisque la biomasse se stabilise ensuite et reste constante jusqu'au 9e jour de culture. Il faut noter que le pH mesuré dans le milieu extracellulaire des cultures varie très peu au cours des cinétiques, puisqu'il est de 6.9 en début de culture et proche de 6.5 au bout de 9 jours. Il a donc peu d'influence sur les croissances bactériennes.

En ce qui concerne les cultures sur sucres simples (**Figure 24 B et D**), les deux bactéries se développent très bien sur les milieux contenant du glucose. La phase exponentielle de croissance est observée entre 2 heures et 9 heures de culture, ensuite la croissance reste stationnaire, puis les bactéries commencent à lyser après 15 heures d'incubation. Par contre, en présence de xylose, la croissance de *B. xylanisolvens* XB1A^{T} est moins importante (environ 2 fois moins de biomasse que sur glucose) (**Figure 24 B**), et celle de. *R. intestinalis* XB6B4 est très faible (**Figure 24 D**).

La **figure 25** montre la quantité d'acides gras à chaîne courte (AGCC) produite par les bactéries au cours des neuf jours de croissance. Seul les AGCC majoritairement produits par *B. xylanisolvens* XB1A^{T} (propionate) et *R. intestinalis* XB6B4 (butyrate) sont présentés sur cette figure.

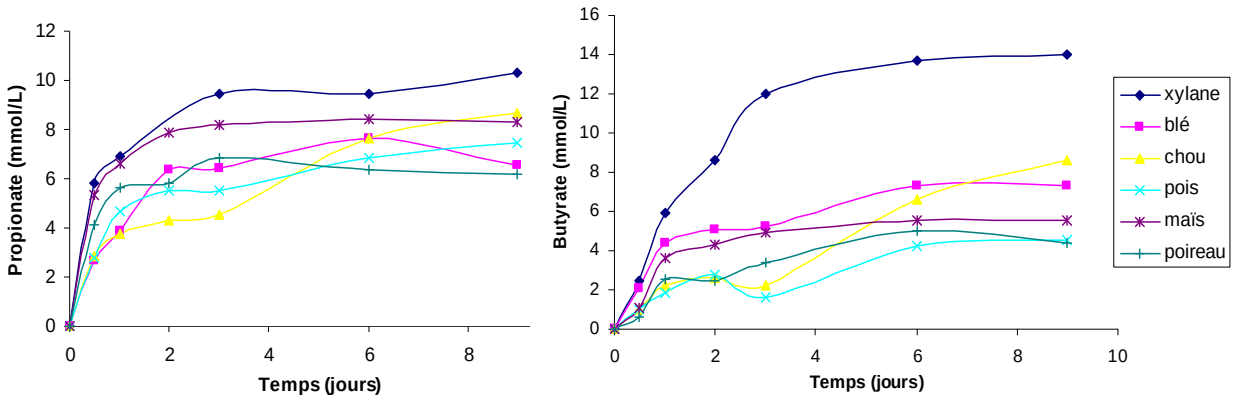


Figure 25. *Principaux acides gras à chaîne courte produits par B. xylanisolvens XB1A^{T} (propionate) et par R. intestinalis XB6B4 (butyrate) pendant 9 jours de culture sur les différents substrats.*

Des quantités importantes d'AGCC sont produites dès les premières heures de culture, ce qui correspond à la croissance importante des bactéries entre 0 et 24 heures. Ensuite, la production d'AGCC ralentit pour atteindre un plateau à 2 ou 3 jours. Puis le taux d'AGCC se maintient au même niveau jusqu'à la fin de la cinétique, indiquant une production faible ou nulle de ces AGCC par les bactéries. Le xylane est associé à la production la plus élevée d'AGCC par les deux espèces, notamment pour *R. intestinalis* XB6B4. Les trois AGCC majoritairement produits par *B. xylanisolvens* XB1A^T sont le propionate, l'acétate et le succinate. Des traces d'isovalérate ont aussi été quantifiées (inférieur à 1,5mM), aucun autre AGCC n'a été mesuré à des concentrations significatives. *R. intestinalis* XB6B4 produit deux principaux AGCC : le butyrate et le lactate (voir article 1), les autres AGCC ont aussi été quantifiés pendant la croissance de cette bactérie et seul le formate a été détecté à de faibles valeurs comprises entre 0,5 et 2,5 mM.

3.3 Produits de dégradation

La dégradation des substrats par les bactéries étudiées a conduit à la libération de différents oses et d'oligosaccharides dans le milieu extracellulaire. Comme décrit dans l'article 1, le dosage des sucres libérés a été réalisé par RMN-H^1 et par dosage colorimétrique (Dische 1955). Le dosage colorimétrique de Dische a montré que des pentoses ou des hexoses étaient présents dans le milieu de culture avant inoculation bactérienne à des concentrations variant de 2 à 8mM. Ces sucres ont pu être en partie identifiés grâce à la RMN-H^1, et les résultats ont été présentés dans l'article 1. Les sucres présents au temps « T0 » sont rapidement utilisés par les bactéries en tout début de croissance (**Figure 26**). La figure **26A** représente les pentoses dosés dans les cultures sur xylane « oat spelt ». Des pentoses sont présents à T0 dans les milieux de culture contenant fibre de pois et son de blé, alors que des hexoses sont plutôt présents dans les milieux de cultures contenant chou (**Figure 26B**), poireau et maïs. *B. xylanisolvens* XB1A^T utilise très rapidement ces sucres puisque après 12 heures de croissance, la quantité de pentoses ou d'hexoses est très diminuée. Par contre, *R. intestinalis* XB6B4 utilise plus lentement les sucres disponibles dans le milieu extracellulaire. Lors de la dégradation des différents substrats, d'autres sucres sont libérés mais sont rapidement réutilisés pour la croissance bactérienne et ne sont donc pas (ou très peu) accumulés dans le milieu extracellulaire. Ces résultats ont été confirmés par RMN-H^1 mais aussi par chromatographie des sucres sur couche mince (CCM, non montré). Les CCM montrent que les sucres présents au temps zéro sont essentiellement des monomères (xylose

ou glucose). Les trois techniques sont donc complémentaires et permettent à la fois de détecter, quantifier et identifier les sucres présents dans le milieu de culture ou libérés par les bactéries lors de la dégradation des différents substrats.

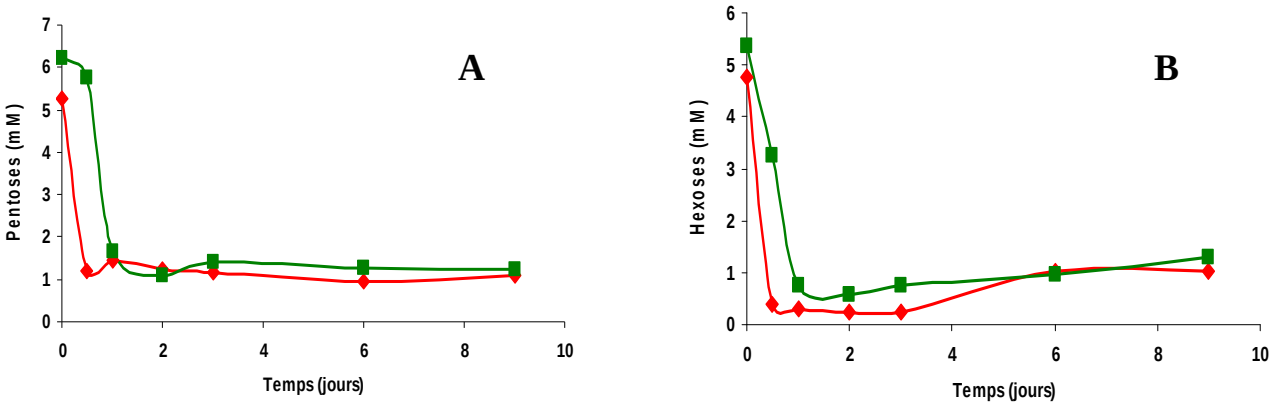
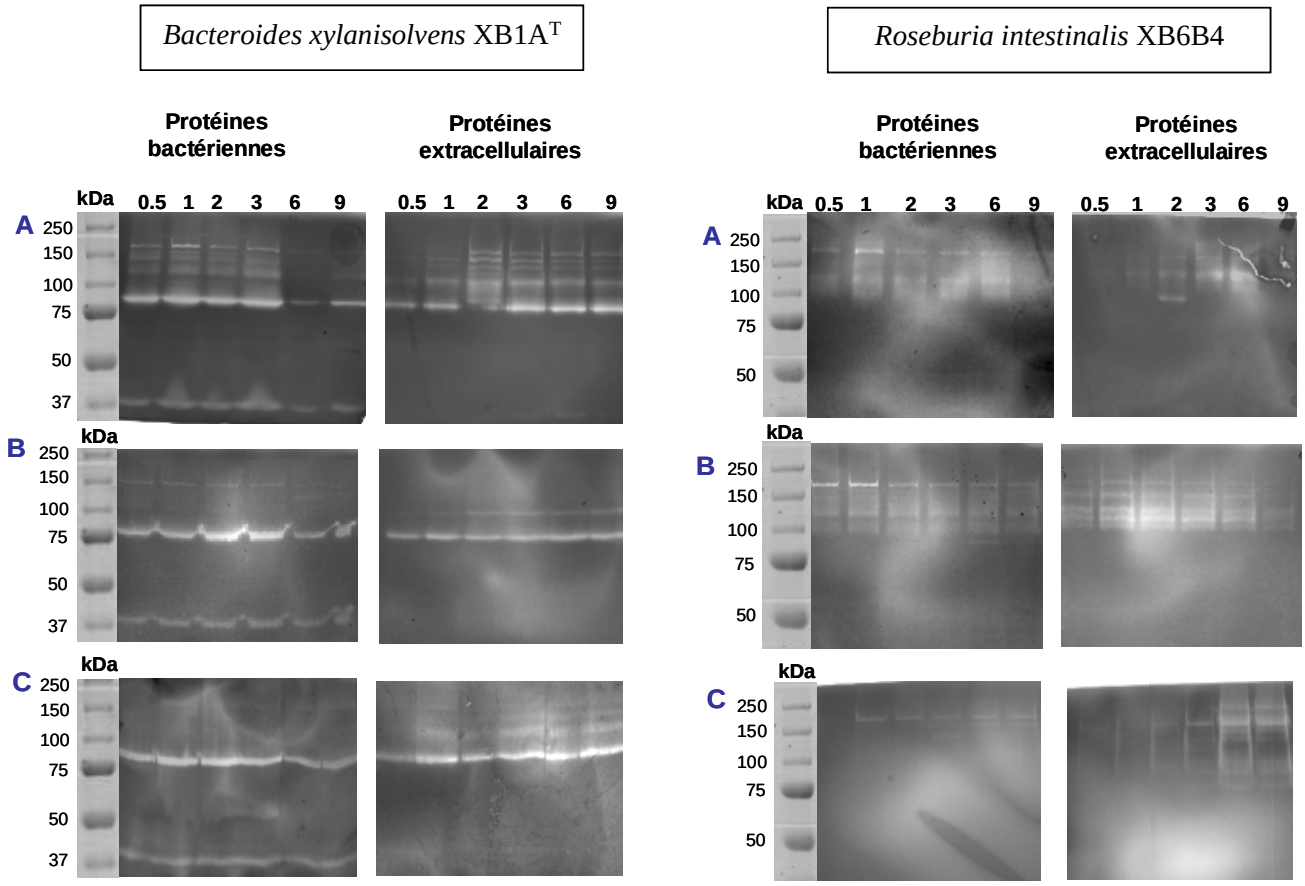


Figure 26. *Pentoses (A) ou hexoses (B) présents dans le milieu extracellulaire lors de la croissance de B. xylanisolvens XB1A^T (courbe rouge) et de R. intestinalis XB6B4 (courbe verte) sur xylane oat spelt (A) ou chou (B).*

3.4 Activités xylanolytiques de B. xylanisolvens XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4.

L'activité xylanolytique des deux espèces a été analysée qualitativement par zymogrammes et quantitativement par dosage des activités spécifiques et totales durant les 9 jours de croissance bactérienne. L'article 1 présente les résultats obtenus à partir des cultures sur xylane, et nous présentons ici également ceux obtenus à partir des autres substrats (**Figure 27**).

Comme indiqué dans l'article n°1, les profils enzymatiques de *B. xylanisolvens* XB1A^T et de *R. intestinalis* XB6B4 sont différents. En effet, les xylanases produites par *B. xylanisolvens* XB1A^T ont des masses molaires comprises entre 38 et 170 kDa alors que celles produites par *R. intestinalis* XB6B4 ont des masses molaires comprises entre 100 et 170 kDa. Pour une espèce donnée, quel que soit le substrat dégradé, les profils enzymatiques obtenus en zymogramme sont semblables, notamment pour les bandes protéiques majeures.



A : xylane oat spelt

B : Sons de blé ou de maïs

C : Chou, poireau ou fibres de pois

Figure 27. *Analyse de l'activité xylanolytique de B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4*, par zymogrammes, durant 9 jours de cinétique de croissance sur les différents substrats.*

En effet, l'intensité des bandes observées sur les zymogrammes, suggère que certaines xylanases sont majoritaires, comme les xylanases à 38 et 80 kDa produites par *B. xylanisolvens* XB1A^T et la xylanase à 160 kDa produite par *R. intestinalis* XB6B4. Ces xylanases sont produites lors de la dégradation de chacun des substrats étudiés et sont présentes tout au long de la cinétique. *B. xylanisolvens* XB1A^T semble produire plus de xylanases lorsqu'elle est cultivée en présence de xylane, puisqu'un nombre plus important de bandes est visible sur les zymogrammes des cultures sur ce substrat. Pour *R. intestinalis*

XB6B4, les profils des cultures sur xylanes et sur les sons de céréales sont assez similaires alors que les zymogrammes des cultures sur légumes montrent un nombre moins important d'enzymes produites.

4. CONCLUSION ET DISCUSSION

L'ensemble de cette étude concernant la dégradation et la fermentation de différents substrats végétaux nous a permis de mieux comprendre la structure et le fonctionnement des systèmes enzymatiques de *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4, espèces xylanolytiques majeures du côlon humain.

Ces deux bactéries sont capables de dégrader et de fermenter de manière efficace des substrats de nature différente et plus ou moins complexes : céréales, légumineuse, légumes ou polysaccharide pariétal purifié. La composition en éléments glucidiques qui structurent les fibres végétales est variable pour les légumes, légumineuse et céréales, en particulier les contenus en xylanes et glucanes, mais finalement peu de différences ont été observées dans la dégradation de ces substrats complexes par les bactéries. En effet, seul le blé et le poireau présentent des taux de dégradation significativement différents entre *B. xylanisolvens* et *R. intestinalis*. Par contre, une différence majeure a été observée pour la dégradation du xylane oat spelt commercial, deux fois plus importante que celle des autres substrats. La composition en hémicelluloses et cellulose des parois végétales influence grandement leur dégradation par les microorganismes. Rappelons que les deux espèces étudiées ici ne sont pas capables de dégrader la cellulose (Chassard *et al*., 2007), ce qui constitue un frein à l'hydrolyse des substrats complexes riches en cellulose. Par ailleurs, la structure et l'enchevêtrement des polyosides au sein même de la paroi jouent également un rôle important dans la dégradation des substrats par les bactéries. Le xylane commercial qui est composé de 83% de résidus xylose est plus facilement accessible que les hémicelluloses imbriquées dans la matrice polysaccharidique complexe qui constitue les parois végétales, et où s'entremêlent cellulose, hémicelluloses, lignine et autres composants.

Le choix des substrats pour cette étude n'a pas été aisé puisque peu de données sur la composition des parois des légumes, fruits ou céréales sont disponibles dans la bibliographie. Il existe des données sur les teneurs en parois des fourrages et des aliments pour animaux,

mais très peu concernant la composition précise des parois végétales consommées par l'Homme. Il aurait été intéressant d'inclure dans notre étude un plus grand nombre de fibres pariétales, comme celles de fruits par exemple. Quelques essais de cultures de *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4 sur des milieux contenant de l'ananas ou de la pomme ont été effectués. Les deux souches se développaient sur ces substrats mais les quantités de fibres dans ces fruits étant très faibles, nous avons privilégié d'autres aliments. Nous avions également pré-sélectionné deux autres substrats, le son d'avoine et la fibre de pomme de terre, mais nous avons dû les éliminer à cause d'une croissance trop faible des bactéries sur ces substrats.

Les principales différences liées à l'activité fibrolytique des deux espèces bactériennes concernent la nature des systèmes enzymatiques produits et la colonisation des substrats. Le mode de colonisation des parois végétales semble en effet très différent, puisque *R. intestinalis* XB6B4 forme un biofilm sur les fragments végétaux (Figure 2 de l'article n°1) et semble donc plus étroitement associée aux particules végétales que *B. xylanisolvens* XB1A^T qui adhère de façon plus sporadique au substrat. Contrairement aux microorganismes de l'écosystème rumen, peu de données sont disponibles sur les processus d'adhésion au substrat et de colonisation des particules végétales par les bactéries du côlon humain. Des travaux *in vitro* récents sur des fermenteurs inoculés par des suspensions fécales humaines ont montré par FISH que le son de blé était principalement colonisé par des espèces appartenant au cluster IVa des clostridies, incluant les espèces *Clostridium hathewayi*, *Eubacterium rectale* et *Roseburia sp*, ainsi que quelques espèces de *Bacteroides* (Leitch *et al*., 2007). Ces travaux ont été étendus *in vivo* par une analyse moléculaire des populations microbiennes associées aux fractions luminales ou particulaires de fèces de volontaires sains. Cette étude a montré que, bien que les séquences ribosomales de *Firmicutes* dominent celles des *Bacteroidetes* aussi bien dans la phase luminale que dans les particules solides contenant les fibres, la proportion de *Firmicutes* (y compris *Roseburia*) est plus importante dans les particules que dans la phase liquide (77% versus 66%). Au contraire, les *Bacteroidetes* sont significativement plus nombreux dans la phase liquide que dans la phase solide (29% versus 19%) (Walker *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que les *Bacteroides* utiliseraient préférentiellement les substrats solubles ou solubilisés par d'autres espèces, alors que *Roseburia* et certaines espèces de *Ruminococcus*, dont les espèces cellulolytiques (Robert et Bernalier-Donadille, 2003), dégraderaient plutôt les substrats solides. Notre étude de la colonisation des substrats par les deux espèces, bien que préliminaire, va dans le même sens. En conclusion, il semblerait donc

que, dans le côlon, *Roseburia,* et les *Firmicutes* en général, seraient plutôt associés à la fraction solide, leur conférant ainsi un avantage par rapport aux *Bacteroides* qui sont plutôt retrouvés dans la phase liquide, ou bien en cellules isolées sur les fibres et donc moins étroitement associées au substrat. Cependant, ces conclusions vont à l'encontre des travaux de Macfarlane et Macfarlane (2006) qui ont également suivi la colonisation de particules alimentaires résiduelles par les bactéries fécales. Ces auteurs n'ont pas trouvé de différence de diversité, par méthodes culturales, entre les populations adhérentes aux particules alimentaires et les non-adhérentes, les genres *Bacteroides* et *Bifidobacterium* étant les plus représentés dans les deux communautés. Cependant, ces communautés semblent métaboliquement différentes puisque les populations adhérentes dégradent préférentiellement les polysaccharides et produisent de l'acétate, alors que les populations non-adhérentes seraient plutôt fermentatives et produisent du butyrate. Les divergences observées entre les résultats de ces études et celles citées précédemment peuvent provenir de différences dans la composition du microbiote des volontaires ou de leur régime alimentaire, ou encore des approches expérimentales utilisées par les auteurs. Ces divergences démontrent que des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre la colonisation des aliments et les mécanismes d'adhésion mis en place par les principales espèces bactériennes du côlon, avant de tirer des conclusions plus générales.

Quant aux systèmes xylanolytiques des deux espèces bactériennes étudiées, ils confèrent à ces bactéries d'autres avantages écologiques. En effet, les mesures d'activité effectuées ont montré que les xylanases sont associées à plus de 80% aux cellules bactériennes. Ceci suggère que ces enzymes sont majoritairement localisées à la surface de la bactérie, et actives dès que la bactérie entre en contact avec son substrat. Ce processus accélère certainement l'internalisation et l'utilisation des sucres libérés lors de l'hydrolyse des fragments végétaux par les bactéries. Dans un écosystème comme le côlon, nul doute que ces bactéries possèdent un avantage compétitif par rapport aux autres microorganismes présents. Cette hypothèse est également soutenue par les faibles concentrations en sucres mesurées dans les milieux extracellulaires des cultures de *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4. Les bactéries internalisent rapidement les oligosaccharides produits lors de la dégradation des polymères et optimisent ainsi l'utilisation des sucres. Bien que *R. intestinalis* XB6B4 soit capable d'adhérer plus massivement (biofilm) aux parois végétales que *B. xylanisolvens* XB1A^T, l'utilisation des sucres solubles issus de l'hydrolyse des parois reste plus rapide par *B. xylanisolvens* XB1A^T, comme cela a pu été démontré à la fois par RMN et

dosage des sucres totaux. Ceci pourrait être expliqué par un système de transport des sucres plus efficace chez *B. xylanisolvens* XB1A^T, ou une meilleure affinité pour ces oligosaccharides. Notons, par ailleurs, que *R. intestinalis* XB6B4 a une croissance très faible en présence de xylose, qui pourrait être expliquée par une inefficacité du transport de ce sucre.

La nature des systèmes enzymatiques de *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4 diffère sur plusieurs points. *B. xylanisolvens* XB1A^T produit des xylanases dont la taille est comprise entre 38 et 170kDa alors que *R. intestinalis* XB6B4 possède un système plus caractéristique de celui des bactéries Gram+ d'autres écosystèmes fibrolytiques, par la présence de xylanases de masses moléculaires élevées, comprises entre 100 et 170kDa. Certaines enzymes possède une localisation intra ou extracellulaire spécifique, comme c'est le cas pour la xylanase de 38kDa de *B. xylanisolvens* XB1A^T qui est uniquement retrouvée dans la fraction bactérienne (**Figure 27**). Cette xylanase associée aux cellules paraît très intéressante puisque d'autres xylanases semblables sont décrites dans la bibliographie. Ces enzymes de petite taille sont souvent composées d'un seul module (catalytique), et sont périplasmiques chez les bactéries à Gram négatif, ou cytoplasmiques chez les bactéries à Gram positif, ce qui confère aux bactéries un avantage supplémentaire pour dégrader efficacement les substrats, en « séquestrant » les produits d'hydrolyse du xylane par exemple (Miyazaki *et al.*, 1997). D'autres xylanases paraissent importantes chez *B. xylanisolvens* XB1A^T (xylanase à 80kDa) et chez *R. intestinalis* XB6B4 (xylanases de 140 à 160 kDa), une forte activité xylanolytique de ces protéines ayant été mise en évidence sur zymogramme. Ces xylanases, qui semblent majoritaires, sont produites par les bactéries lors de la dégradation de l'ensemble des substrats étudiés (xylane et substrats complexes).

Les activités enzymatiques mesurées dans les extraits bactériens de *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4 cultivées sur les différents substrats sont très élevées, notamment dans les cultures sur xylane. Ceci suggère une induction de l'expression des gènes de xylanase en présence de xylane, ou au contraire une répression catabolique par les sucres libérés lors de l'hydrolyse d'autres substrats, tels que par exemple le glucose libéré par hydrolyse de glucanes (voire une association des deux mécanismes). Cette hypothèse a été en partie vérifiée au cours de mon travail de thèse et est présentée dans le chapitre « résultats-partie 2 » de ce manuscrit. Le niveau élevé de leur activité xylanase suggère que les deux espèces bactériennes étudiées jouent un rôle important dans la dégradation des hémicelluloses, et en particulier du xylane, dans le côlon. Ces deux bactéries ont en effet des

activités xylanases plus élevées que celles mesurées chez les bactéries xylanolytiques du rumen qui est pourtant un écosystème digestif dont la principale fonction est la fibrolyse (Béra-Maillet *et al.*, 2004, 2005; Reveneau *et al.*, 2003; Miyazaki *et al.*, 1997). *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4 représentent donc des espèces xylanolytiques importantes dans le côlon humain, et jouent un rôle certainement majeur dans la dégradation des fibres alimentaires par le microbiote intestinal. Afin de le confirmer, la prévalence de ces deux espèces devra être mesurée chez un nombre important d'individus. De récents travaux au laboratoire ont d'ores et déjà montré que le genre *Bacteroides* était retrouvé dans les selles de 5 sujets sur 6 (et comportait plusieurs espèces différentes), et que *R. intestinalis* était présente chez 3 des 6 sujets (Chassard *et al.*, 2007).

Le travail réalisé dans cette première partie permet de dégager différentes perspectives :

- Tout d'abord, une étude moléculaire complète des systèmes xylanolytiques des deux bactéries modèles devra être réalisée. En effet, comme nous l'avons souligné dans notre étude bibliographique, la composition et l'organisation des systèmes fibrolytiques des bactéries du côlon humain sont totalement méconnues. Quelques données récentes, telles que le nombre de gènes de glycoside-hydrolases présents, sont issues des programmes de séquençage du génome de certaines espèces du côlon de l'homme telles que *B. thetaiotaomicron* ou *B. ovatus*, comme nous l'avons évoqué dans notre revue bibliographique (Partie C, paragraphe I.1.3). La première partie de mon travail de thèse a permis de mettre en évidence plusieurs composantes des systèmes hydrolytiques des bactéries modèles et de mesurer leur efficacité pour dégrader les substrats pariétaux. Afin de compléter ce travail, un inventaire moléculaire des gènes de glycoside-hydrolases impliqués dans la dégradation des xylanes chez *B. xylanisolvens* et *R. intestinalis* a été entrepris, et est rapporté dans la deuxième partie de ce manuscrit.

- Une deuxième perspective de ce travail concerne le mode d'adhésion des deux bactéries à différents substrats polysaccharidiques. Afin de confirmer nos premiers résultats obtenus par microscopie électronique à balayage, les bactéries adhérentes et/ou non-adhérentes pourraient être quantifiées, par exemple par marquage fluorescent des cellules. Par ailleurs, les systèmes d'adhésion de ces deux espèces bactériennes pourront également être

étudiés. L'analyse génomique des systèmes fibrolytiques pourra donner tout d'abord quelques indications comme la présence de CBM (par exemple) qui, lorsqu'ils sont associés à des enzymes ancrées à la surface bactérienne, peuvent permettre la liaison des enzymes au substrat. Cela a été proposé pour d'autres bactéries (Miron, *et al*., 2001 ; Rakotoarivonina, *et al.*, 2009). Des structures spécialisées telles que des Pili pourraient aussi être recherchées (Rakotoarivonina, *et al*., 2005), ainsi que la présence de séquences « signature » des cellulosomes, structures qui permettent en général également l'adhésion bactérienne au substrat. En effet, jusqu'à présent aucune structure cellulosomale n'a encore été décrite chez des espèces bactériennes d'origine humaine.

- Enfin, les interactions existant entre les deux bactéries modèles devront être étudiées, afin de mieux comprendre leur rôle respectif dans l'écosystème colique. Ces interactions pourront être étudiées en co-culture *in vitro*, afin de voir s'il existe une compétition, ou au contraire une synergie pour la dégradation de différents substrats hémicellulosiques entre les deux espèces. De plus, la colonisation des végétaux par une association de ces deux bactéries pourrait être suivie grâce à un marquage spécifique et une visualisation en microscopie confocale (Pamp *et al*., 2009 ; Macfarlane et Macfarlane, 2006). Cette méthode permettrait en effet de mettre en évidence la répartition spatiale et la distribution relative de ces deux espèces sur différents substrats. Enfin, l'interaction entre ces deux espèces bactériennes pourrait également être étudiée *in vivo*, dans des modèles de rats mono- ou di-associés. En effet, nous disposons au laboratoire de modèles de rats axéniques (sans microorganismes) auxquels nous pouvons inoculer une ou plusieurs souches bactériennes afin de suivre leur devenir *in vivo*. Nous pourrions ainsi étudier la compétition entre ces deux bactéries dans le tube digestif animal, et identifier une éventuelle prépondérance d'une espèce par rapport à une autre, en fonction du régime alimentaire et de leur localisation dans l'intestin (Mahowald, *et al.*, 2009).

Résultats
- Chapitre 2 -

RESULTATS – CHAPITRE 2

Caratérisation moléculaire des systèmes enzymatiques de *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4

1. INTRODUCTION

Pour dégrader les xylanes, les bactéries produisent une large variété d'enzymes qui agissent de manière complémentaire. Comme nous l'avons rappelé dans notre introduction bibliographique, les xylanases (endoxylanases) sont majoritairement retrouvées dans les familles 10 et 11 des glycoside-hydrolases (GH) mais des enzymes ayant des activités xylanases/xylosidases sont aussi retrouvées dans les familles de GH 5, 7, 8, 30 et 43 (Collins, *et al*., 2005). Les enzymes de la famille GH43 affichent une spécificité pour les substrats contenant de l'arabinose, comme les arabinoxylanes, et ce sont en grande majorité des xylosidases ou arabinofuranosidases. Les xylosidases sont aussi retrouvées dans les familles GH3, 30, 39, 51, 52 et 54, et les arabinofuranosidases dans les familles GH3, 51, 54 et 62 (http://www.cazy.org/). D'autres enzymes interviennent également pour dégrader les xylanes, comme les enzymes débranchantes feruloyl esterases ou acétyl-xylane estérases et les α-glucuronidases.

Nous avons choisi, dans le cadre de ce travail, de nous limiter à la recherche des enzymes impliquées dans l'hydrolyse de la chaîne principale des xylanes. Parmis ces glycoside-hydrolases, nous nous sommes limités aux enzymes les plus fréquentes, c'est à dire les endoxylanases des familles GH10 et GH11, et également des xylosidases de la famille GH43.

Les systèmes enzymatiques mis en place par les bactéries xylanolytiques du côlon sont encore peu connus aujourd'hui. Les espèces du genre *Bacteroides*, qui constituent une large proportion du microbiote intestinal (Suau, *et al*., 1999 ; Chassard, *et al*., 2008) ont été décrites comme capables de fermenter les xylanes (Salyers, *et al*., 1977; Hespell & Whitehead, 1990; Hopkins, *et al.*, 2003). Le séquençage des génomes de *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* et *B. fragilis*, a montré la présence de gènes codants pour des xylanases de la famille GH10 (Xu, *et al*., 2003; http://www.cazy.org/), et de nombreux gènes susceptibles de coder pour des

enzymes de la famille GH43 (**Tableau 8**), mais aucune caractérisation complète des systèmes enzymatiques d'espèces xylanolytiques, comme *Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T et *Roseburia intestinalis* XB6B4, n'a encore été réalisée. Grâce à la caractérisation fonctionnelle des systèmes enzymatiques de ces espèces bactériennes, qui a fait l'objet de la première partie de mon travail de thèse, nous avons montré que ces deux bactéries possèdent des systèmes enzymatiques diversifiés qui leur permettent de dégrader efficacement les parois végétales.

Pour entreprendre la caractérisation moléculaire du système de dégradation des xylanes de *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4, nous avons cherché à identifier les gènes codant pour les xylanases produites par ces deux bactéries. Une autre espèce bactérienne, *Bacteroides* sp. XB12B, a également été associée à cette étude. Cette souche, isolée précédemment au laboratoire (Chassard, *et al.,* 2007), semble proche de *Bacteroides cellulosilyticus,* une espèce cellulolytique récemment isolée de selles humaines et présentant de fortes activités endoglucanase (Chassard, *et al.,* 2005 ; Robert, *et al*., 2007). La souche XB12B de *Bacteroides* sp. présente également une activité endoglucanase, dégrade la cellulose Sigmacell et possède une activité xylanase supérieure à la souche type de *B. cellulosilyticus* (Chassard, *et al.*, 2007). L'espèce *Bacteroides* sp., à laquelle appartient la souche XB12B, pourrait alors représenter un groupe fonctionnel important dans le microbiote intestinal humain, puisqu'elle produit à la fois des cellulases et des xylanases. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de caractériser également le système fibrolytique de cette espèce, en prenant XB12B comme modèle.

Différentes méthodes ont été utilisées afin de rechercher les gènes codant pour les xylanases de ces bactéries. Tout d'abord, des PCR ont été effectuées en utilisant des amorces spécifiques de séquences de gènes codant pour des xylanases d'espèces bactériennes phylogénétiquement proches de *B. xylanisolvens* XB1A^T, *Bacteroides* sp. XB12B et de *R. intestinalis* XB6B4. Cette approche a été facilitée par la disponibilité, fin 2008, des données de séquençage de génomes d'espèces ou de souches proches de celles que nous étudions, telles que *Roseburia intestinalis* L1-82 ou *Bacteroides intestinalis* DSM17393. De plus, des PCR ont été réalisées en utilisant des amorces dégénérées spécifiques des familles de glycoside-hydrolases 10, 11 et 43. Le niveau d'expression de certains des gènes identifiés grâce à ces différentes méthodes a ensuite été quantifié dans des cultures bactériennes réalisées sur différents substrats carbonés. Des analyses en électrophorèse mono et bidimensionnelle de protéines nous ont aussi permis d'identifier certaines enzymes par

MALDI-ToF et ainsi de confronter les profils enzymatiques obtenus en zymogramme avec l'identification précise des xylanases présentes.

Enfin, en avril 2009, le séquençage du génome de *B. xylanisolvens* XB1A^T a été réalisé dans le cadre du projet de séquençage du métagénome intestinal humain (projet METAHIT coordonné par l'INRA). Bien que l'annotation du génome n'ait pas encore été effectuée, nous avons pu, grâce à un travail de bioinformatique sur la séquence brute du génome, identifier d'autres gènes de xylanases et glycoside-hydrolases présents chez cette espèce bactérienne.

2. RESULTATS

2.1 Recherche des gènes de xylanases par amplification PCR à partir des ADNg

Pour rechercher les gènes codant pour les xylanases de *B. xylanisolvens* XB1A^T, *Bacteroides* sp. XB12B et *R. intestinalis* XB6B4, nous avons employé la technique de PCR en utilisant plusieurs couples d'amorces spécifiques de gènes de xylanases d'espèces bactériennes phylogénétiquement proches. Bien que les xylanases soient aussi retrouvées dans les familles de GH 5, 7, 8 et 30, nous nous sommes focalisées sur les enzymes appartenant aux familles GH10, 11 et 43, familles qui regroupent la majorité des xylanases et xylosidases identifiées chez les bactéries du côlon ou d'autres écosystèmes digestifs (voir introduction bibliographique).

2.1.1 Gènes amplifiés par PCR chez R. intestinalis XB6B4

Sur le génome de la souche *R. intestinalis* L1-82, qui est la souche type de l'espèce et dont le génome a été annoté en octobre 2008, les gènes codant une xylanase GH10 (ZP_04743263) et 7 xylosidases GH43 (ZP_04742694, ZP_04742695, ZP_047431316, ZP_04744774, ZP_04744846, ZP_04744873, ZP_04746123) ont été identifiés. Pour rechercher ces gènes de xylanases chez *R. intestinalis* XB6B4, des amorces ont été dessinées à partir de la séquence de ces gènes et ont permis d'isoler *xyn10A, xylA, B, C, D, E, F et G* (**Tableau 11**).

Le séquençage des fragments d'ADN amplifiés chez *R. intestinalis* XB6B4 a montré une grande homologie des séquences nucléotidiques (supérieure à 98% pour *xyn10A*) des gènes de ces deux souches bactériennes. Aucun gène codant pour des xylanases de la famille GH11 n'a été identifié dans le génome de *R. intestinalis* L1-82.

Tableau 11. *Amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier les gènes de xylanases ou xylosidases à partir de l'ADNg de R. intestinalis XB6B4 (température d'hybridation : 55°C)*

Gène	Famille de GH	Amorces	Séquence (5'-3')	Bactérie d'origine*
R. intestinalis **XB6B4**				
xyn10A	GH10	6B4.GH10.6330-F	GGGTTTGAAACGAAATTGGA	*R. intestinalis* LI-82
		6B4.GH10.6331-R	TCAAGGCACTTTTTGCCATT	*R. intestinalis* LI-82
xyl43A	GH43	6B4.GH43.2694-F	TTAGATGGTGTGATCCGTGAA	*R. intestinalis* LI-82
		6B4.GH43.2694-R	GGCAACCGCATAAATACCTG	*R. intestinalis* LI-82
xyl43B	GH43	6B4.GH43.2695-F	CACTTGGAACCTGGGAAAA	*R. intestinalis* LI-82
		6B4.GH43.2695-R	GGCAGTACCAAAAGCTGCTC	*R. intestinalis* LI-82
xyl43C	GH43	6B4.GH43.3116-F	CGAACACTTTCCTGCTCTCC	*R. intestinalis* LI-82
		6B4.GH43.3116-R	AATATTTGCGCCAACGATTC	*R. intestinalis* LI-82
xyl43D	GH43	6B4.GH43.4774-F	ACGTGATCCGCGTAGAAGAC	*R. intestinalis* LI-82
		6B4.GH43.4774-R	CAGGCACTTCCTCCTGTTTC	*R. intestinalis* LI-82
xyl43E	GH43	6B4.GH43.4846-F	CTGTAGGGTGGGGAAGATT	*R. intestinalis* LI-82
		6B4.GH43.4846-R	CCGGTATTCCCTCATACGAA	*R. intestinalis* LI-82
xyl43F	GH43	6B4.GH43.4873-F	TCCAGTTGTCCGTGGTTTTT	*R. intestinalis* LI-82
		6B4.GH43.4873-R	CTGTTTTCCCCTGTTTCCA	*R. intestinalis* LI-82
xyl43G	GH43	6B4.GH43.6123-F	CGGGATTTAATGCAGATCCA	*R. intestinalis* LI-82
		6B4.GH43.6123-R	TTCTTTATAGTCAAAACTGCGGAA	*R. intestinalis* LI-82

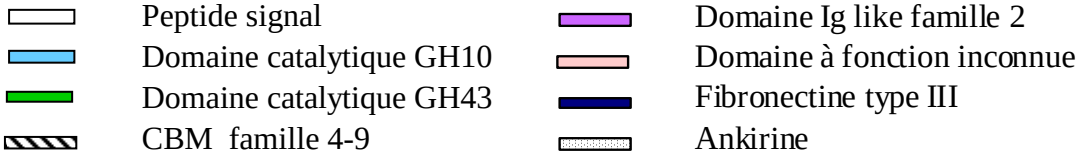
* Bactérie d'origine utilisée pour le design des amorces

Les structures modulaires des produits de ces gènes sont représentées dans le **tableau 12**. Les enzymes dont les gènes ont été identifiés chez *R. intestinalis* XB6B4 ont des masses moléculaires élevées, comprises entre 60 et 160 kDa. Les tailles des endoxylanases produites par la bactérie et observées en zymogramme étaient comprises entre 100 et 170 kDa (voir « Résultats-Chapitre 1 »). L'enzyme de *R. intestinalis* XB6B4 qui possède la plus haute masse molaire, parmi les enzymes nouvellement identifiées, est la xylanase Xyn10A, seule représentante de la famille 10 des glycoside-hydrolases. Xyn10A possède une structure modulaire complexe qui comprend un module reconnu par PFam comme un module de liaison au substrat (CBM 4-9), un domaine catalytique GH10, et trois autres domaines plus courts en région C-terminale, dont un domaine de fonction inconnue, un domaine Ig-like et un domaine fibronectine (Fn3). Sept autres glycoside-hydrolases ont été identifiées, elles appartiennent toutes à la famille GH43 et sont donc probablement des xylosidases. Cinq d'entre elles, Xyl43B, C, E, F et G, possèdent seulement un domaine catalytique GH43. Les deux autres enzymes, Xyl43A et Xyl43D, sont bi-modulaires, et sont constituées d'un domaine catalytique, et d'un autre domaine : respectivement une ankirine (ayant un rôle dans les interactions entre protéines) et un domaine de fonction inconnue.

Les xylanases et xylosidases qui composent le système xylanolytique de *R. intestinalis* XB6B4 ont donc des structures protéiques originales et variées. De manière surprenante, aucune des enzymes prédites chez cette espèce ne possède de séquence clairement reconnue par analyse bioinformatique comme séquence signal (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ et http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosuisignal/sosuisignal_submit.html).

Tableau 12. *Structure modulaire des enzymes correspondant aux gènes isolés chez R. intestinalis XB6B4*

Nom	Famille de GH	Masse	Structure
Xyn10A	GH10	160 kDa	
Xyl43A	GH43	60 kDa	
Xyl43B	GH43	61 kDa	
Xyl43C	GH43	57 kDa	
Xyl43D	GH43	57 kDa	
Xyl43E	GH43	59 kDa	
Xyl43F	GH43	57 kDa	
Xyl43G	GH43	61 kDa	



2.1.2 Gènes amplifiés par PCR chez Bacteroides sp. XB12B

Pour rechercher les gènes de xylanases à partir de l'ADNg de *Bacteroides sp*. XB12B, nous avons utilisé des amorces spécifiques des xylanases identifiées chez *B. intestinalis* DSM17393 dont le génome a été annoté en juin 2008. En effet, *B. intestinalis* est phylogénétiquement proche de *Bacteroides sp.* XB12B (Chassard, *et al*., 2007 ; voir **figure 22** de l'introduction bibliographique), ce qui laisse supposer une assez bonne conservation des

séquences nucléotidiques entre les 2 espèces. Trois gènes codant pour des xylanases GH10 (ZP_03016608, ZP_03016590 et ZP_03016604) et une xylanase bi-fonctionnelle GH10-43 (ZP 03016595) sont répertoriés chez *B. intestinalis*; les gènes correspondants ont alors été recherchés dans le génome de *Bacteroides sp*. XB12B. Trois des quatre gènes recherchés ont été amplifiés à partir de l'ADNg de XB12B et seul le gène de la xylanase GH10 ZP_03016608 n'a pas été détecté dans cette souche (**Tableau 13**). Les homologies de séquences des gènes *xyn10A, xyn10B* et *xyn10+43A* avec les gènes de la souche de *B. intestinalis* sont respectivement de 92, 87 et 93%. *B. intestinalis* est susceptible de produire aussi plusieurs enzymes de la famille GH43 (27 gènes de xylosidases répertoriés dans le génome), mais les gènes susceptibles de coder celles-ci n'ont pas encore été recherchés par PCR dans le génome de la souche *Bacteroides sp*. XB12B. *Bacteroides sp*. XB12B et *B. intestinalis* étant très proches (voir ci-dessus), il est très probable que la souche que nous étudions (XB12B) produise elle aussi, un nombre important de xylosidases de la famille GH43.

Tableau 13. *Amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier les gènes de xylanases ou xylosidases sur l'ADNg de Bacteroides sp. XB12B (Température d'hybridation : 55°C)*

Gène	Famille de GH	Amorces	Séquence (5'-3')	Bactérie d'origine*
Bacteroides sp. **XB12B**				
xyn10A	GH10	GH10-Amd-12B-F	GCAACCGTTTCCAATAGCA	*B. intestinalis DSM 17393*
		GH10-Amd-12B-R	AAAAGCAACTGTGTCCATGTG	*B. intestinalis DSM 17393*
xyn10B	GH10	GH10-Bactint-F	CCGAAGATGCCAAGAACAAT	*B. intestinalis DSM 17393*
		GH10-Bactint-R	CCAATCCATCAGCAAAACCT	*B. intestinalis DSM 17393*
xyn10-43A	GH10+43	Xyn12B-GH10+43-F	GCCGAAAACTGCATGAAGAG	*B. intestinalis DSM 17393*
		Xyn12B-GH10+43-R	TTCACCTTTCATGGGGTCAT	*B. intestinalis DSM 17393*
xyl43A	GH43	Bthe-75476-ECM-F	CGAACACGTTTGCAGTTTAT	*B. thetaiotaomicron* VPI-5482
		Bthe-75476-ECM-R	CAGAAGCCCGAAAGTATATG	*B. thetaiotaomicron* VPI-5482

* Bactérie d'origine utilisée pour le design des amorces

Néanmoins, un gène codant pour une xylosidase GH43 a été amplifié à partir de l'ADNg de *Bacteroides sp*. XB12B (**Tableau 13**), à l'aide d'amorces qui avaient été dessinées à partir d'un gène de xylosidase de *B. thetaiotaomicron* VPI-5482 (AAO75476). Le gène amplifié chez *Bacteroides* sp. XB12B (*xyl43A*), présente 79% d'identité avec celui de *B. thetaiotaomicron* VPI-5482.

La structure modulaire des xylanases dont les gènes ont été identifiés chez *Bacteroides sp*. XB12B est présentée dans le **tableau 14**.

Tableau 14. *Structure modulaire des enzymes correspondant aux gènes isolés chez Bacteroides sp. XB12B*

Nom	Famille de GH	Masse	Structure
Xyn10A	GH10	83 kDa	
Xyn10B	GH10	80 kDa	
Xyn10-43A	GH10 et 43	100 kDa	
Xyl43A	GH43	37 kDa	

Les masses molaires des enzymes GH10 et GH10-43A sont comprises entre 80 à 100kDa. Ces masses molaires sont comparables à celles de xylanases produites par *Bacteroides sp*. XB12B cultivé sur milieu contenant du xylane et observées en zymogrammes : en effet, la taille de ces enzymes est comprise entre 45 et 100 kDa, et deux bandes de forte intensité sont observées à 80 et 100 kDa (**Figure 28)**. Notons que pour *Bacteroides* sp. XB12B, les xylanases sont essentiellement associées aux bactéries, puisque seules des bandes très faibles d'activité sont observées en zymogramme dans la fraction extracellulaire. La seule GH43 identifiée, Xyl43A, a une masse molaire plus petite, de 37 kDa.

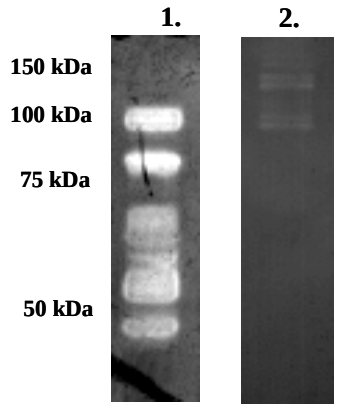


Figure 28. *Analyse en zymogramme des xylanases bactériennes (1) et extracellulaires (2) de Bacteroides sp. XB12B cultivé 48 heures sur un milieu contenant du xylane.*

Les enzymes prédites à partir des gènes identifiés chez *Bacteroides sp*. XB12B présentent elles aussi des structures modulaires originales, notamment les GH10. Deux enzymes, Xyn10A et Xyn10-43A, pourraient être bi-fonctionnelles. En effet, Xyn10A possède un domaine catalytique GH10 et un domaine catalytique estérase de la famille CE1 (coumaroyl- ou feruloyl-estérase), reliés entre eux par un module Ig-like, souvent impliqué dans les liaisons inter-protéines. Par ailleurs, Xyn10-43A possède à la fois un domaine catalytique GH10 et un domaine GH43, lui conférant ainsi une double activité xylanase/xylosidase. La structure de Xyn10B est elle aussi peu commune, car elle est constituée d'un domaine GH10 entrecoupé par deux modules. Ces modules sont reconnus par PFam comme des modules de liaison au substrat de la super-famille 4-9, mais seraient plutôt des modules X dont la fonction reste à établir (Bernard Henrissat, communication personnelle). Enfin, Xyl43A présente une structure simple, composée d'un seul domaine catalytique GH43 (**Tableau 14**).

Exceptée Xyn10A, les trois autres xylanases ou xylosidases de *Bacteroides sp*. XB12B possèdent une séquence signal.

2.1.3 Gènes amplifiés par PCR chez B. xylanisolvens XB1A^T

Pour *B. xylanisolvens* XB1A^T, nous avons d'abord testé plusieurs couples d'amorces dessinés à partir des gènes de xylanases et xylosidases identifiés chez des espèces du genre *Bacteroides*. Sur la banque de données Cazy, sont répertoriés 6 gènes de xylosidases GH43 de

B. thetaiotaomicron VPI-5482 (AAO78767, AAO75476, AAO78780, AAO78001, AAO78004 et AAO78149), un gène de xylanase GH10 de *B. ovatus* V975 (XylI) et trois gènes de xylosidases GH43 (BAD47104, BAD51105 et CAH06329) de deux souches de *B. fragilis* (YCH446 et NCTC 9343). Plusieurs couples d'amorces, ciblant le gène entier ou une région plus conservée du gène correspondant au domaine catalytique de l'enzyme codée, ont alors été utilisés pour rechercher ces gènes chez *B. xylanisolvens* XB1A^T. Après de nombreux essais de PCR et plusieurs modifications de divers paramètres afin d'optimiser l'efficacité d'amplification, seulement un gène de la famille GH43 (*xyl43A*) a été amplifié par cette stratégie (**Tableau 15**). Le gène *xyl43A* a été amplifié avec les amorces spécifiques du gène AAO75476 de *B. thetaiotaomicron* et les séquences nucléotidiques de ces deux gènes présentent 84% d'identité.

Tableau 15. *Amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier les gènes de xylanases ou xylosidases à partir de l'ADNg de B. xylanisolvens XB1A^T (température d'hybridation : 55°C)*

Gène	Famille de GH	Amorces	Séquence (5'-3')	Bactérie d'origine*
***B. xylanisolvens* XB1A^T**				
xyn10A	GH10	xyn10A-1A-F	AGCATATTCAGGACGATTGG	*B. xylanisolvens* XB1A^T
		xyn10A-1A-R	AAGGTCATTTCGGCATAGC	*B. xylanisolvens* XB1A^T
xyn10B	GH10	1A-80kDa-F	TTGCTCCATCACTACCGACA	*B. xylanisolvens* XB1A^T
		1A-80kDa-R	ATTTACCAGCCAATCCGTCA	*B. xylanisolvens* XB1A^T
xyl43A	GH43	Bthe-75476-ECM-F	CGAACACGTTTGCAGTTTAT	*B. thetaiotaomicron* VPI 5482
		Bthe-75476-ECM-R	CAGAAGCCCGAAAGTATATG	*B. thetaiotaomicron* VPI 5482
xyl43B	GH43	78767-1AgenomF	GCTCCTCTTTTTGTCGGTGA	*B. xylanisolvens* XB1A^T
		78767-1AgenomR	CCTCCGTTCCTTCATCGTAG	*B. xylanisolvens* XB1A^T
xyl43C	GH43	51105-1AgenomF	TATCCGCTTCCTTTCGATCA	*B. xylanisolvens* XB1A^T
		51105-1AgenomR	TTTCACGACTTTCGACAACG	*B. xylanisolvens* XB1A^T
xyl43D	GH43	GH43-1AgenomF	CGGAGGTCGGAGGTATTGAT	*B. xylanisolvens* XB1A^T
		GH43-1AgenomR	GTAAATCCACCAGCCGTTGT	*B. xylanisolvens* XB1A^T

* Bactérie d'origine utilisée pour le design des amorces

Les amorces précédemment utilisées pour amplifier les gènes de xylanases chez *Bacteroides sp.* XB12B ont aussi été testées sur l'ADNg de *B. xylanisolvens* XB1A^T, et réciproquement. Aucun gène n'a été amplifié de cette manière.

Au cours de la dernière année de ma thèse, le génome partiel (10% manquant) et non annoté de *B. xylanisolvens* XB1A^T a été disponible en avril 2009. Malgré un découpage en

petits contigs, qui augmente la difficulté pour isoler des gènes entiers, nous avons repéré sur le génome de XB1A, des séquences nucléotidiques codant pour des xylanases ou xylosidases sur lesquelles ont été dessinées de nouveaux couples d'amorces (**Tableau 15**). Ces zones ont été repérées sur le génome grâce à des recherches par homologie de séquence avec les gènes précédemment décrits de *B. thetaiotaomicron, B. ovatus* ou *B. fragilis*. Plusieurs couples d'amorces dessinés sur ces séquences d'intérêt ont alors permis d'amplifier cinq gènes supplémentaires : *xyn10A, xyn10B, xyl43B, xyl43C* et *xyl43D* **(Tableau 15)**.

Les enzymes prédites à partir des gènes amplifiés sur l'ADNg de *B. xylanisolvens* XB1A^T sont présentées dans le **tableau 16.** Les masses molaires de ces protéines putatives sont comprises entre 36 à 92kDa. Les deux enzymes de la famille GH10, Xyn10A et Xyn10B, possèdent des structures différentes : l'une est composée d'un seul domaine catalytique et l'autre d'un domaine catalytique entrecoupé par deux domaines (CBM4-9 ou X). Les enzymes de la famille GH43 prédites chez *B. xylanisolvens* XB1A^T présentent des structures variables. Deux d'entre elles comprennent un seul domaine catalytique (Xyl43A et Xyl43D) et les deux autres possèdent, en plus du domaine catalytique, un domaine discoïdine qui pourrait être impliqué dans la liaison au substrat (Xyl43B et Xyl43C) ainsi qu'un domaine fibronectine pour Xyl43C.

Tableau 16. *Structure modulaire des enzymes prédites à partir des gènes isolés chez B. xylanisolvens XB1A^T*

Nom	Famille de GH	Masse	Structure
Xyn10A	GH10	40 kDa	
Xyn10B	GH10	80 kDa	
Xyl43A	GH43	36 kDa	
Xyl43B	GH43	92 kDa	
Xyl43C	GH43	80 kDa	
Xyl43D	GH43	56 kDa	

Séquence signal
Domaine catalytique GH10
Domaine catalytique GH43
CBM 4-9 (PFam) ou X
Discoïdine F5-F8 type C
Fibronectine type 3

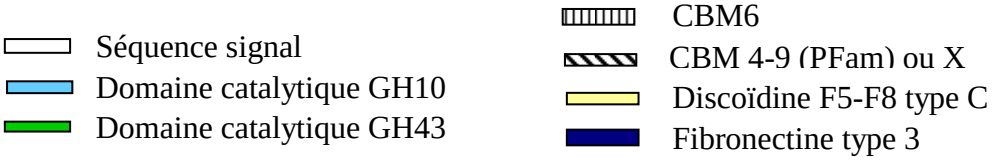
2.2 Analyse du génome de *B. xylanisolvens* XB1A^T

En juillet 2009, une deuxième version de la séquence du génome de *B. xylanisolvens* XB1A^T, non annotée, mais avec des contigs de plus grande taille a été disponible. Afin de rechercher les gènes codant pour les xylanases et xylosidases de cette espèce, des recherches par homologie de séquence ont été effectuées. Ces recherches ont été réalisées avec toutes les séquences de xylanases ou xylosidases des familles GH10 et GH43, répertoriées dans la littérature via le site NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez), de *Bacteroides ovatus* V975 et *Bacteroides sp.* D1, nouvelle espèce du côlon de l'homme dont le génome avait également été récemment séquencé (Refseq : NZ_ACAB00000000). Ces deux espèces bactériennes ont été choisies car ce sont les espèces les plus proches phylogénétiquement de *B. xylanisolvens* XB1A^T.

Grâce à cette approche, d'autres gènes, susceptibles de coder des enzymes impliquées dans la dégradation des xylanes, ont pu être repérés sur le génome de *B. xylanisolvens* XB1A^T (**Tableau 17**). Aucun autre gène de xylanase de la famille GH10 n'a été identifié. Par contre, 17 gènes supplémentaires de xylosidases de la famille GH43 ont été repérés sur le génome. La masse molaire de ces enzymes varie de 31 à 73 kDa. La majorité de ces enzymes a une structure modulaire simple avec un domaine catalytique GH43. Deux d'entre elles, Xyl43G et Xyl43H, possèdent, en plus du domaine catalytique, un domaine de liaison au substrat de la famille CBM6.

Tableau 17. *Structure modulaire des xylanases et xylosidases prédites à partir des gènes identifiés. Les enzymes marquées* sont prédites à partir de gènes amplifiés par PCR sur l'ADNg de B. xylanisolvens XB1A^T. Les autres enzymes sont prédites à partir de gènes identifiés sur le génome de B. xylanisolvens XB1A^T par homologie de séquence.*

Nom	Famille de GH	Masse	Structure	Position
Xyn10A*	GH10	40 kDa		
Xyn10B*	GH10	80 kDa		*Dans le cluster 1*
Xyl43A*	GH43	36 kDa		
Xyl43B*	GH43	92 kDa		*Dans le cluster 2*
Xyl43C*	GH43	80 kDa		
Xyl43D*	GH43	56 kDa		*Dans le cluster 1*
Xyl43E	GH43	60 kDa		*Avant le cluster 1*
Xyl43F	GH43	65 kDa		*Dans le cluster 1*
Xyl43G	GH43	51 kDa		*Dans le cluster 1*
Xyl43H	GH43	52 kDa		*Dans le cluster 1*
Xyl43I	GH43	38 kDa		
Xyl43J	GH43	73 kDa		
Xyl43K	GH43	60 kDa		
Xyl43L	GH43	42 kDa		*Dans le cluster 3*
Xyl43M	GH43	36 kDa		*Dans le cluster 3*
Xyl43N	GH43	40 kDa		*Dans le cluster 4*
Xyl43O	GH43	41 kDa		
Xyl43P	GH43	31 kDa		
Xyl43Q	GH43	43 kDa		*Dans le cluster 5*
Xyl43R	GH43	37 kDa		*Dans le cluster 5*
Xyl43S	GH43	37 kDa		
Xyl43T	GH43	63 kDa		
Xyl43U	GH43	62 kDa		



Un alignement des séquences protéiques des domaines catalytiques de toutes les xylosidases de la famille GH43 prédites chez *B. xylanisolvens* XB1A^T a été réalisé afin d'analyser les homologies existant entre ces différentes enzymes (**Figure 29**).

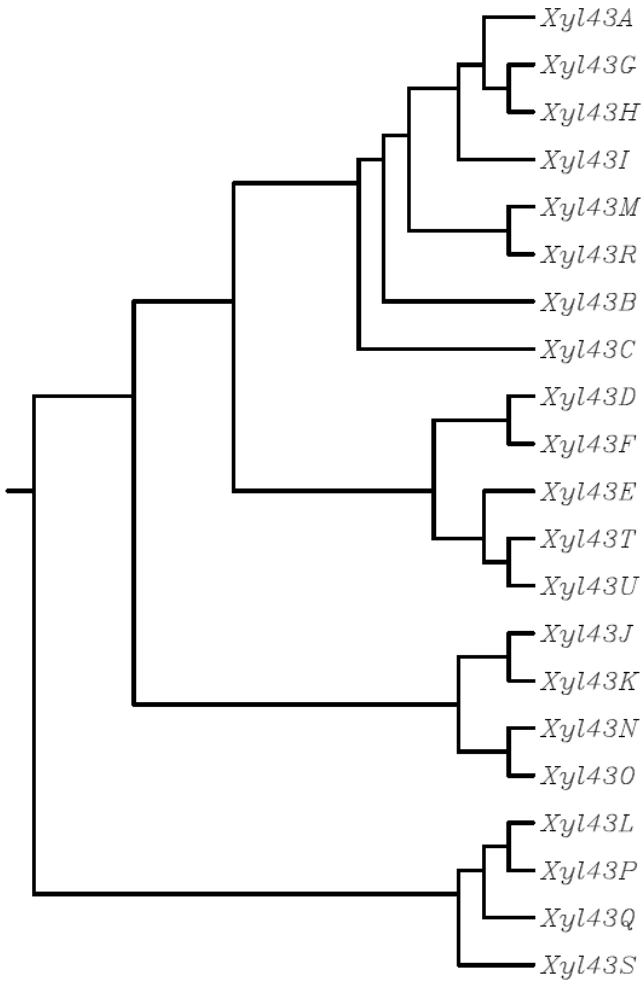


Figure 29. *Dendrogramme représentant l'alignement des séquences protéiques des domaines catalytiques des xylosidases de la famille GH43 identifiées chez B. xylanisolvens XB1A^T (effectué avec le logiciel ClustalW accessible en ligne sur http://align.genome.jp/)*

Le dendrogramme présenté dans la **figure 29** permet de définir quatre clusters. Un premier cluster regroupe des enzymes dont la masse molaire est comprise entre 30 et 45 kDa (Xyl43L, Xyl43P, Xyl43Q et Xyl43S). Dans un second cluster, sont retrouvées des xylosidases de plus grande masse molaire, comprise entre 55 et 65 kDa (Xyl43D, Xyl43F, Xyl43E, Xyl43T et Xyl43U). Un troisième cluster plus hétérogène, regroupe des enzymes à

simple domaine, de masse molaire peu élevée (XylA, XylI, XylM et XylR), et deux enzymes qui semblent relativement proches l'une de l'autre et dont la structure modulaire est semblable (Xyl43H et Xyl43G). Les deux xylosidases Xyl43B et Xyl43C peuvent également être classées dans ce cluster. Enfin, un dernier cluster regroupe Xyl43J, Xyl43K, Xyl43N et Xyl43O. Les homologies de séquence entre ces différentes GH43 sont très variables, comprises entre 20 et 80% d'identité. Les xylosidases présentant les plus grandes homologies de séquence sont Xyl43M et Xyl43R (80% d'identité) et Xyl43L et Xyl43P (72% d'identité).

Une analyse des séquences voisines des gènes de xylanases et xylosidases repérés dans le génome de *B. xylanisolvens* XB1A^T, nous a permis d'identifier plusieurs regroupements de gènes, et ainsi de mettre en évidence l'organisation des gènes de glycoside-hydrolases chez cette bactérie. Cinq clusters ont pu être identifiés, regroupant plusieurs gènes de glycoside-hydrolases de différentes familles, ainsi que des gènes codant pour d'autres protéines impliquées dans le transport, la fixation ou la dégradation des polysaccharides. Ces cinq clusters sont représentés dans la **figure 30**.

Le cluster 1 est le plus grand des cinq regroupements de gènes identifiés. Il regroupe 19 gènes codant des enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides, dont de nombreuses GH. Dans ce cluster, on retrouve plusieurs gènes précédemment décrits (*xyn10B*, *xyl43F*, *xyl43G*, *xyl43D* et *xyl43H*), ainsi que des gènes codant des GH3, 5, 31, 95 et 97 ou des protéines dont la fonction est encore inconnue, et un groupe de gènes codant des protéines (un transporteur d'ion, les protéines RagB-SusD et un récepteur TonB) qui ont un rôle dans la fixation des polysaccharides et l'internalisation des produits de dégradation. De telles protéines ont déjà été décrites chez *B. thetaiotaomicron* ou *Flavobacterium johnsoniae* (Schürmann, *et al.*, 1995, Gilbert, *et al.*, 2008, McBride, *et al.*, 2009). Des séquences pouvant correspondre à des terminateurs de transcription ainsi qu'à des promoteurs sont identifiées pour les gènes présents aux extrémités du cluster. Par contre seulement deux séquences promotrices sont reconnues en amont des autres ORF et aucun terminateur n'a été identifié par bioinformatique (http://nbc11.biologie.uni-kl.de/framed/left/menu/auto/right/transterm/) ou(http://www.softberry.ru/berry.phtml?group=programs&subgroup=gfindb&topic=findterm) De plus, les distances intergéniques sont faibles pour de nombreux gènes, suggérant qu'ils pourraient être co-transcrits.

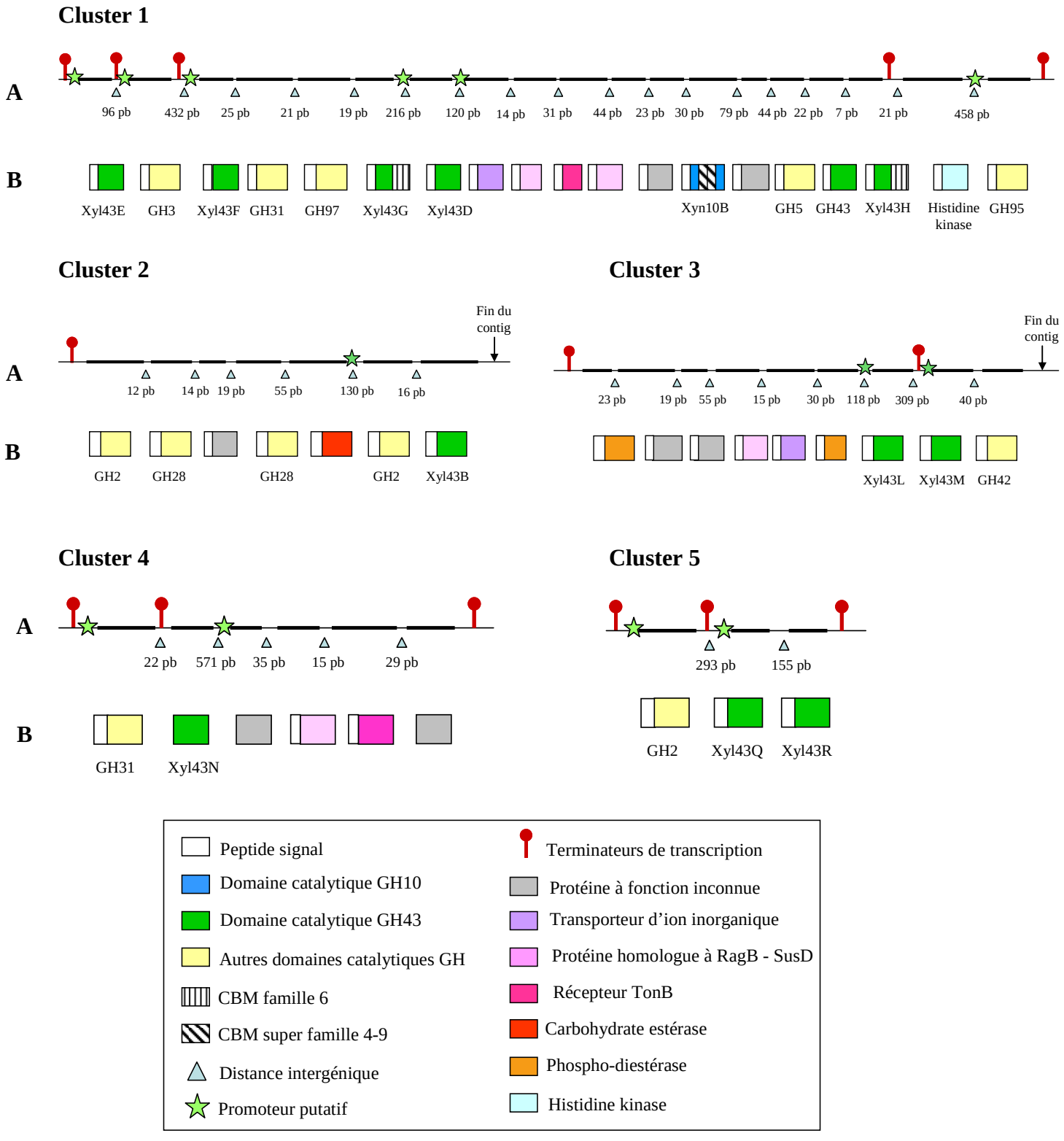


Figure 30. *Représentation de cinq clusters repérés sur la séquence du génome de B. xylanisolvens XB1A^T, regroupant des gènes codant des enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides.* ***A.*** *Organisation génétique des clusters,* ***B.*** *Organisation et structure modulaire des produits des gènes.*

Dans les autres clusters, qui sont de plus petite taille (3 à 9 gènes), on retrouve aussi plusieurs gènes codant des enzymes précédemment décrites dans le **tableau 17** ainsi que d'autres glycoside-hydrolases. En effet, le cluster 2 comprend sept gènes, dont cinq codent des GH des familles 2, 28 et 43. Le cluster 3 regroupe des gènes codant deux diestérases, des GH des familles 43 et 42, et des protéines dont la fonction est inconnue. Le cluster 4 comprend des gènes codant des GH des familles 43 et 31, et des protéines dont la fonction est inconnue. Dans ces deux clusters, sont aussi retrouvés des gènes prédits pour coder des protéines RagB-SusD, un récepteur TonB et un transporteur d'ion, impliqués dans l'utilisation des polyosides. Enfin, le cluster 5, qui est le plus petit des cinq clusters identifiés, regroupe 3 gènes : un gène codant une GH2 ainsi que les gènes de Xyl43Q et Xyl43R.

Ces clusters pourraient également correspondre en partie à des unités de transcription car peu de séquences terminatrices et de promoteurs sont prédits, et les séquences intergéniques sont également faibles (**Figure 30**).

2.3 Utilisation d'amorces dégénérées spécifiques des familles de GH 10 et 43

Afin d'amplifier les gènes de xylanases sur les trois souches étudiées, une approche utilisant la PCR et des amorces dégénérées spécifiques des gènes codant les enzymes des familles de GH 10, 11 et 43 a été mise en place. Ces amorces ont été déterminées avec le logiciel Metabolic Design, grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr Pierre Peyret (LMGE, UBP - Aubière). Le principe de fonctionnement de ce logiciel est donné brièvement dans la partie « Matériel et Méthodes » (paragraphe **4**).

Pour les amorces spécifiques des gènes codant les enzymes de la famille GH10, une protéine de référence, XynA de *Bacteroides ovatus* V975 (P49942), a été choisie afin que le logiciel extraie des bases de données toutes les séquences proches de Xyn10A. A partir de l'alignement des protéines obtenues, deux couples de séquences ont été choisies, puis des couples d'amorces correspondants ont été déterminés : un couple d'amorces ciblant seulement les gènes des genres *Bacteroides* et *Clostridium*, et un autre couple, ciblant un plus grand nombre de genres bactériens, appelé « couple large spectre ».

Pour déterminer le couple d'amorce spécifique des gènes de la famille GH43, la protéine de référence Xyn43A de *Paenibacillus polymyxa* (P45796) a été sélectionnée. A

partir du consensus de l'alignement des protéines obtenu par le logiciel, un couple d'amorces ciblant plusieurs genres bactériens a été choisi.

Des amorces dégénérées spécifiques des gènes de la famille GH11 (protéine de référence : XlnC de *Streptomyces lividans* - P26220) ont aussi été dessinées. Deux couples ont également été testés : un couple « large spectre » et un couple ciblant plutôt les séquences retrouvées chez *Bacteroides* et *Clostridium.* L'ensemble des couples d'amorces choisis est présenté dans le **Tableau 20-A** (paragraphe **4**, Matériel et Méthodes)

Les protéines de référence choisies ne possédaient qu'un domaine catalytique GH10, GH11 ou GH43, et leur activité avait été démontrée biochimiquement.

Pour valider les couples d'amorces sélectionnés pour cette étude, des gènes « témoins » connus ont été amplifiés (**Tableau 20-B**). Les gènes *xyn10E* de *Fibrobacter succinogenes* et *xylI* de *B. ovatus* ont été utilisés comme gènes témoins codant des GH10, le gène BT2895 de *B. thetaiotaomicron* comme gène témoin codant une xylanase de la famille GH43, et les gènes *xynA* de *Ruminococcus albus* et *xynD* de *R. flavefaciens* comme gènes témoins codant des xylanases GH11. Ces gènes ont été amplifiés, purifiés, puis utilisés comme matrice pour les PCR effectuées avec les différents couples d'amorces dégénérées ciblant les gènes des trois familles. Nous avons ainsi pu vérifier l'amplification, par les couples d'amorces dégénérées, des gènes témoins codant les xylanases des familles GH10, GH11 et GH43 (résultats non montrés).

Les amorces ont ensuite été utilisées pour amplifier l'ADNg de *B. xylanisolvens* XB1A^T, *Bacteroides* sp. XB12B et de *R. intestinalis* XB6B4.

Le couple ciblant les gènes de GH10 « *Bacteroides*/*Clostridium* » a permis d'amplifier un produit de PCR à la taille attendue sur l'ADNg de chaque *Bacteroides* (résultats non montrés). Après séquençage, il s'est avéré que les deux produits de PCR amplifiés correspondaient aux gènes *xyn10A* de *B. xylanisolvens* XB1A^T et *xyn10A* de *Bacteroides* sp. XB12B déjà isolés précédemment. Les différents couples d'amorces ciblant les gènes de GH43 et de GH11 n'ont, par contre, pas permis d'obtenir d'amplification à partir de l'ADN génomique des trois souches étudiées.

2.4 Identification des protéines par spectrométrie de masse

Afin d'identifier les enzymes actives en zymogramme, des gels d'électrophorèse mono et bidimensionnelle ont été réalisés, les spots d'intérêt ont été prélevés et analysés en MALDI-ToF (plateforme protéomique du Centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix).

B. xylanisolvens XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4 ont été cultivées sur xylane oat spelt et les protéines liées au xylane ont été récupérées. Cette fraction protéique a été analysée en SDS-PAGE (**Figure 31)**. Les spots protéiques dont les tailles correspondent aux xylanases majeures identifiées en zymogramme ont été extraits du gel et analysés en MALDI-ToF. Deux protéines ont pu être ainsi identifiées et ont permis de confirmer la présence de Xyn10B à 80 kDa dans les extraits protéiques de *B. xylanisolvens* XB1A^T et de Xyn10A à 160 kDa dans ceux de *R. intestinalis* XB6B4. Par contre, le spot protéique à 38 kDa n'a pas pu être identifié.

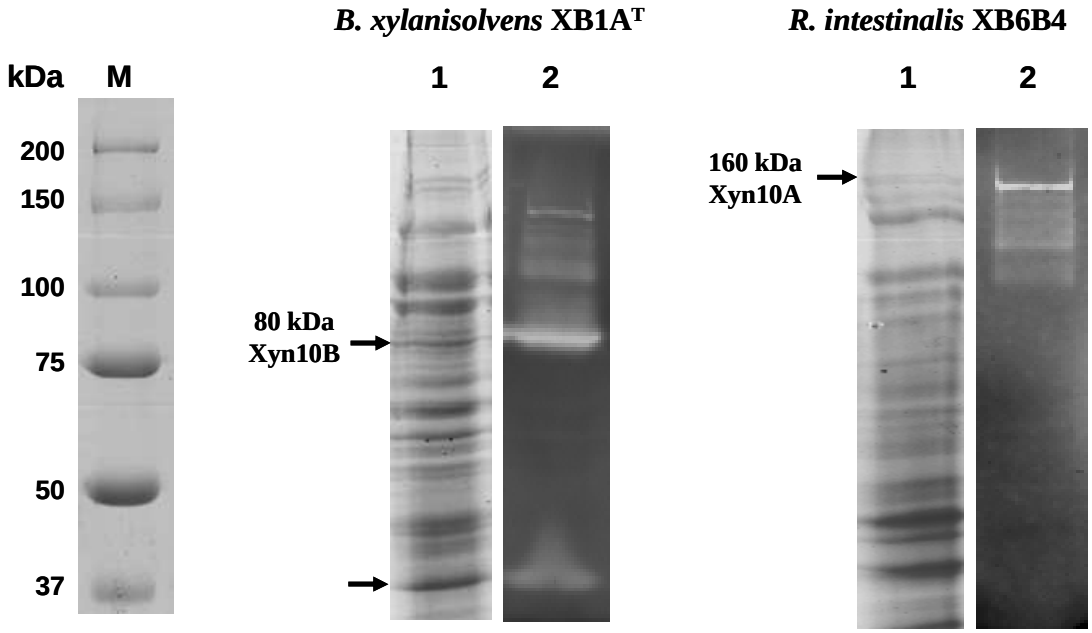


Figure 31. *Analyse par SDS-PAGE de la fraction des protéines liées au xylane (1) et zymogramme des protéines bactériennes (2) de B. xylanisolvens XB1A^T et R. intestinalis XB6B4, cultivées sur xylane oat spelt. La migration a été effectuée sur gel de polyacrylamide à 8%. La piste M représente l'échelle de masse moléculaire en kilodaltons (Bio-rad). Les flèches noires indiquent les protéines extraites du gel d'acrylamide et analysées par MALDI-ToF.*

Des électrophorèses bidimensionnelles ont ensuite été réalisées afin de tenter d'identifier par spectrométrie de masse les autres protéines actives en zymogramme, et en particulier la protéine supposée être Xyn10A de *B. xylanisolvens* XB1A^T (à ~38kDa). Des zymogrammes bidimensionnels ont également été réalisés avec les extraits de protéines solubles de *B. xylanisolvens* XB1A^T cultivé avec du xylane oat spelt.

Les zymogrammes montrent des protéines actives avec des masses molaires d'environ 40 kDa (pI 6,5 à 7,5) et 80 kDa (pI 5 à 5,2) (**Figure 32 B**). Ces deux protéines ont des masses molaires et pI proches des valeurs théoriques calculées pour Xyn10A (pI 7,6, 40 kDa) et Xyn10B (pI 5,0, 80 kDa). De nombreux spots correspondants à ces zones ont été prélevés et analysés **(Figure 32 A)**. L'analyse MALDI-ToF a confirmé que Xyn10B est bien la protéine active en zymogramme, mais Xyn10A n'a pas pu être identifiée. Parmi les spots prélevés dans la zone des masses molaires ~40 kDa et des pI de 5,5 à 7,5, les spots 5 à 11, 16, 18 à 22 et 24 n'ont pas été identifiés, et les spots identifiés correspondent à des protéines homologues à des séquences de *Bacteroides* sp. (porines, une fructose biphosphate aldolase.., **Tableau 18**). De nouvelles expériences de protéomique seront réalisées afin d'identifier Xyn10A de *B. xylanisolvens* XB1A^T.

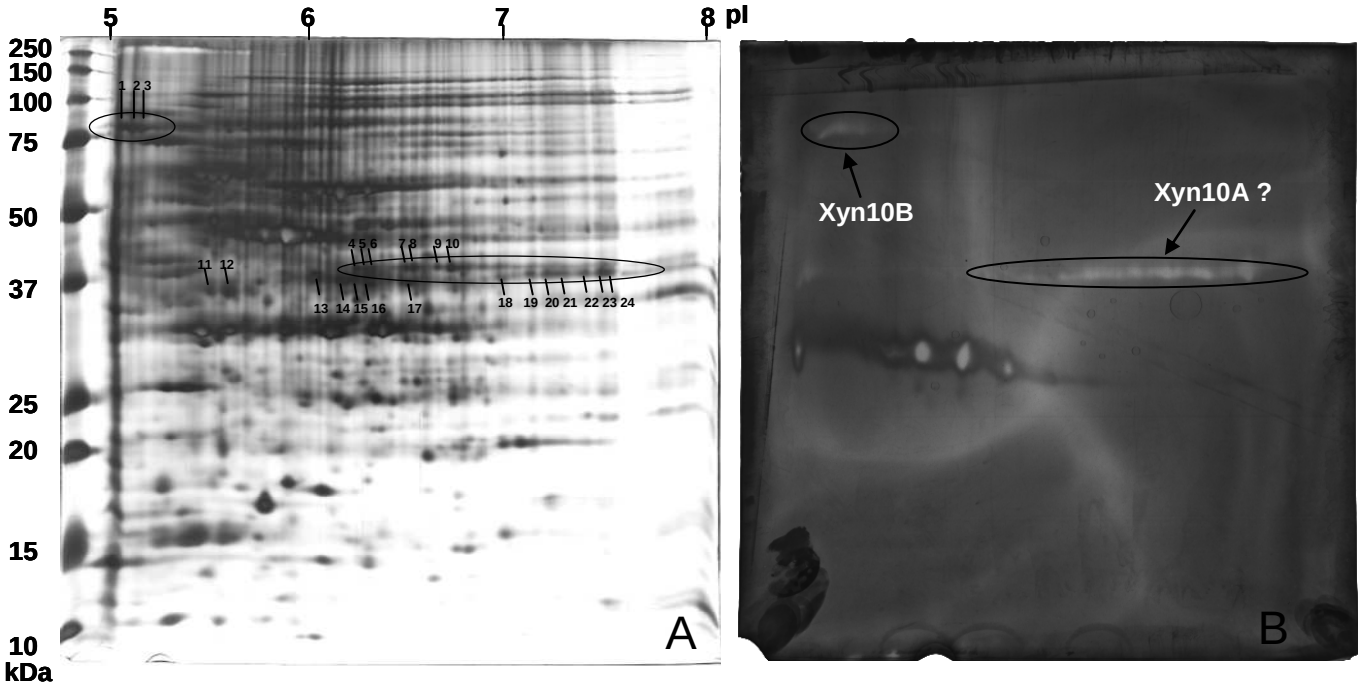


Figure 32. *Analyse par électrophorèse bidimensionnelle d'extraits de protéines solubles de B. xylanisolvens XB1A^T. **A**. Gel d'électrophorèse bidimensionnelle révélé au nitrate d'argent, **B.** Zymogramme bidimensionnel xylane.*

Tableau 18. *Identification par MALDI-ToF des spots prélevés à partir du gel d'électrophorèse bidimensionnelle*

Spot	MM exp (kDa)	pI exp	Protéine homologue	Espèce	Mascot score	% Recou-vrement
1	83	5.0	Xyn10B Mr = 83000 pI = 4.84	*B. xylanisolvens* XB1A^T	100	23
2	83	5.05			158	22
3	83	5.1			50	7
4	41	6.2	Phosphate-selective porin O and P Mr = 45203 pI = 6.16	*Bacteroides sp*. D1	120	34
12	39	5.6	Elongation factor Ts Mr = 35867 pI = 5.20	*Bacteroides sp*. D1	87	27
13	39	6.0	Fructose biphosphate aldolase	*Bacteroides sp.* D1	72	12
14	39	6.2	Mr = 36419 pI 5.37		105	20
15	39	6.4			126	28
17	39	6.5	Conserved Hypothetical protein Mr = 37912 pI = 6.27	*Bacteroides* 2.2.4	79	18
23	41	7.4	Outer membrane porin F Mr = 41399	*Bacteroides sp*. D1	63	

2.5 Expression de gènes codant des GH10 et GH43 chez les bactéries cultivées sur différents substrats.

De nombreux gènes de xylanase GH10 et xylosidase GH43 ont été identifiés dans les génomes des trois bactéries étudiées. Cependant, il est important de confirmer que ces gènes sont bien fonctionnels et donc exprimés par chacune des bactéries. Dans un premier temps, nous avons extrait les ARN totaux des trois bactéries cultivées sur xylanes, ces ARN ont été rétro-transcrits en cDNA, et des PCR ont été réalisées avec des amorces spécifiques des gènes ciblés. Les gènes ciblés étaient, pour *B. xylanisolvens* XB1A^T : *xyn10A, xyn10B, xyl43A, xyl43B* et *xyl43C ;* pour *Bacteroides sp.* XB12B : *xyn10-43A, xyn10A, xyn10B* et *xyl43A* ; et pour *R. intestinalis* XB6B4 : *xyn10A.* Tous ces gènes correspondent à des gènes que nous avions séquencés dans le génome de la bactérie. Les transcrits de tous les gènes ciblés ont été détectés par PCR, indiquant que ces gènes sont bien exprimés par la bactérie en croissance sur xylanes (non montré).

Afin d'étudier les conditions d'expression de ces gènes de xylanases et xylosidases, les ARNm ont été quantifiés par qPCR relative dans des cultures des trois espèces bactériennes sur différents substrats : xylane, xylose et glucose. Tous les gènes sont exprimés sur les trois substrats. Les taux d'induction déduits sont présentés dans la **figure 33**, ils sont exprimés en valeur relative par rapport à la condition de culture sur glucose. Tous les gènes ont des niveaux d'expression équivalents en présence de glucose et xylose. Par contre, trois des 9 gènes étudiés par qPCR relative sont induits en présence de xylane. En effet, *xyn10A* et *xyn10B* de *B. xylanisolvens* XB1A^T sont très fortement induits, avec des taux de sur-expression mesurés de 95 et 400, respectivement. Le gène *Xyn10A* de *Bacteroides* sp. XB12B est sur-exprimé d'un facteur 20 en présence de xylane.

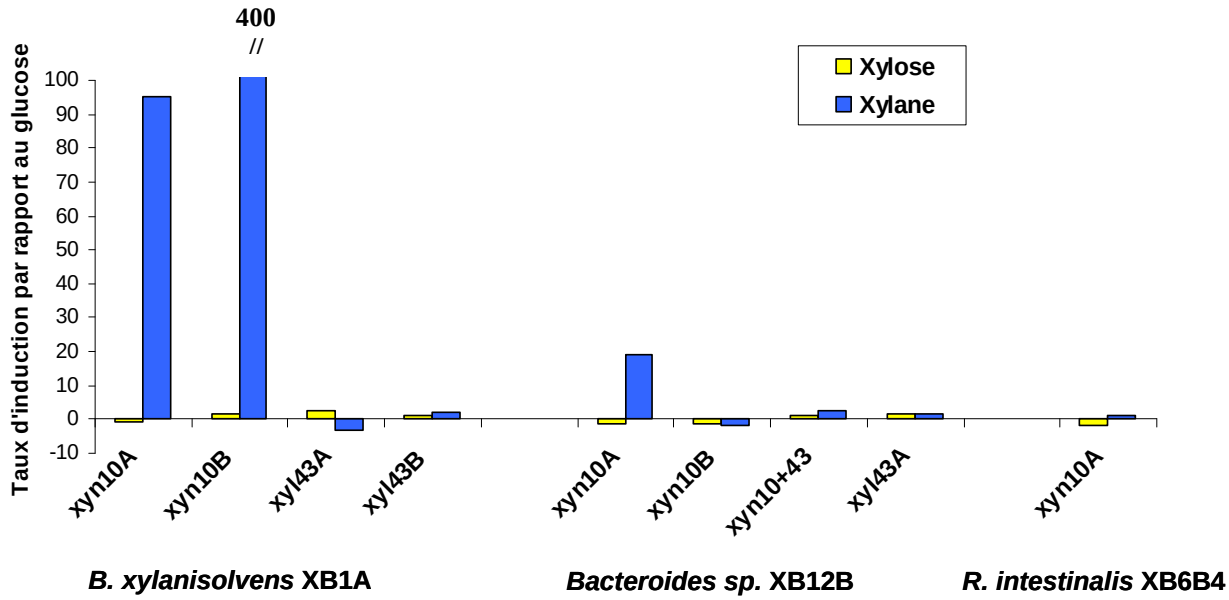


Figure 33. *Quantification par qPCR relative des niveaux d'expression de différents gènes de B. xylanisolvens XB1A^T, Bacteroides sp. XB12B et de R. intestinalis XB6B4, en présence de différents substrats.*

3. CONCLUSION ET DISCUSSION

Afin de réaliser cette première caractérisation moléculaire des systèmes xylanolytiques de *B. xylanisolvens* XB1A^T, *Bacteroides* sp. XB12B et de *R. intestinalis* XB6B4, nous avons choisi de rechercher en priorité, même si les xylanases sont retrouvées dans d'autres familles de GH, les gènes codant les xylanases des familles GH10 et GH11, et les xylosidases de la famille 43 (Collins, *et al.*, 2005). En effet, dans les familles GH5 et GH8 par exemple, des xylanases sont présentes, mais la majorité des enzymes retrouvées sont plutôt des mannosidases et glucanases (GH5), ou des lichénases et cellulases (GH8) (http://www.cazy.org), ce qui rend l'identification de xylanases dans ces familles très difficile, voire impossible, sans confirmation expérimentale de l'activité.

3.1 Recherche des gènes de xylanases par PCR

L'approche mise en place pour la recherche des gènes de xylanases chez les trois bactéries choisies, a d'abord consisté à déterminer des amorces sur des séquences de gènes codant des GH10, 11 ou 43 chez des espèces bactériennes proches. Or, de nombreuses difficultés ont été rencontrées. En effet, au début de notre travail, peu de séquences de xylanases d'espèces bactériennes du côlon humain étaient disponibles dans les banques de données (seules des séquences de *B. ovatus*, *B. fragilis* et *B. thetaiotaomicron* étaient connues). Par ailleurs, les homologies de séquence des gènes de glycoside-hydrolases ne sont pas très élevées, donc, même en plaçant les amorces dans les régions les plus conservées du domaine catalytique, nous n'avons identifié qu'un nombre limité de gènes dans les trois espèces modèles.

L'approche utilisant les amorces dégénérées spécifiques des familles GH10, 11 et 43 ne nous a pas permis d'identifier de nouveaux gènes. Nous avons choisi des amorces dégénérées ciblant d'une part les genres *Bacteroides/Clostridium* et d'autre part un plus grand nombre de genres bactériens, visant à obtenir des amorces « universelles » de ces familles. Cette approche n'a pas été très fructueuse, peut être du fait de la faible homologie entre les protéines de référence choisies et les séquences des protéines ciblées dans les bactéries du microbiote intestinal humain.

La mise en ligne de la séquence des génomes de *B. xylanisolvens* XB1A^T et de *R. intestinalis* L1-82 nous a permis par contre d'avancer grandement dans l'identification des gènes de xylanases dans ces deux bactéries.

3.2 Diversité des gènes de GH identifiés chez *B. xylanisolvens* XB1A^T, *Bacteroides* sp. XB12B et de *R. intestinalis* XB6B4

Des gènes des familles GH10 et GH43 ont été mis en évidence dans le génome des trois bactéries ciblées, mais aucun gène codant pour des xylanases de la famille GH11 n'a été identifié chez ces espèces. Des gènes de GH11 n'ont pas été non plus retrouvés dans les génomes disponibles des bactéries du côlon (**Tableau 8** de l'introduction bibliographique). L'analyse du génome de *B. xylanisolvens* XB1A^T a confirmé l'absence de gènes de xylanases GH11 chez cette bactérie, et l'utilisation d'amorces dégénérées spécifiques de cette famille, n'a pas non plus permis de mettre en évidence de gènes codant des xylanases GH11 chez *Bacteroides* sp. XB12B et *R. intestinalis* XB6B4. De même, de tels gènes ne sont pas présents dans le génome de la souche type L1-82 de *R. intestinalis*. Il semblerait donc que cette famille de xylanase ne soit pas produite dans l'écosystème côlon. Par contre les GH11 sont présentes dans d'autres écosystèmes comme le sol (Millward-Sadler, *et al.*, 1995), ou le rumen, où elles sont produites à la fois par les bactéries et les champignons (Paradis, *et al.*, 1995). L'absence de xylanases GH11 dans le côlon, si elle est confirmée, pourrait être expliquée par la nature des xylanes qui arrivent dans cet écosystème. En effet, Les GH des familles 10 et 11 diffèrent par leur action sur la chaîne polyosidique : les GH11 sont plutôt actives sur des longues chaînes de xylane, peu substituées, et produisent des fragments de plus grande taille que ceux générés par les GH10. Les GH10 semblent plus actives sur les courts xylo-oligosaccharides.

Par les approches mises en place, nous avons identifié de nombreux gènes codant des enzymes GH43 (21 chez *B. xylanisolvens*), alors que les gènes codant des GH10 sont en nombre beaucoup plus faible : seulement un gène codant une GH10 est identifié chez *R. intestinalis* XB6B4, deux gènes de xylanases GH10 chez *B. xylanisolvens* XB1A^T, et trois gènes de GH10 chez *Bacteroides* sp. XB12B. De même, chez les autres bactéries xylanolytiques du côlon, les gènes de xylanases GH10 ne sont détectés qu'en petit nombre dans les génomes : trois gènes de xylanases GH10 chez *B. intestinalis*, un chez *B. vulgatus*, ou jamais retrouvés, comme chez B. *thetaiotaomicron* ou *B. fragilis* par exemple (http://www.cazy.org/ voir aussi **Tableau 8**). Au contraire, les enzymes de la famille GH43

seraient très largement représentées dans les souches étudiées, et plus généralement dans les bactéries xylanolytiques du côlon (**Tableau 8**). Les enzymes GH43 n'ont pas une très grande spécificité de substrat : elles peuvent hydrolyser le xylobiose, les arabinoxylanes ou encore les arabino-rhamnogalacturonanes. La majorité des GH43 prédites chez les trois souches étudiées ont des séquences homologues à des xylosidases, d'après les analyses de séquences que nous avons effectuées (Prodom, PFam ou InterproScan), mais l'activité et la spécificité de ces enzymes reste à démontrer biochimiquement. Les beta-xylosidases sont classées dans plusieurs familles (GH3, 39, 43, 52 et 54). Les β-xylosidases des familles GH3, 39, 52 et 54 sont des enzymes qui fonctionnent selon le mécanisme de rétention, qui leur permet d'effectuer des réactions d'hydrolyse et de transglycosylation. Au contraire, les β-xylosidases de la famille GH43, fonctionnent par le mécanisme d'inversion qui leur permet seulement l'hydrolyse des substrats (Smaali, *et al.*, 2006). Les autres espèces de *Bacteroides* du microbiote intestinal, possèdent un nombre élevé de GH43. En effet, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus, B. fragilis et B. distasonis* en possèdent respectivement 32, 22, 9 et 7 (Xu, *et al.*, 2007). Ces enzymes jouent donc probablement un rôle important dans l'écosystème colique, et leur présence en grand nombre chez ces espèces est peut être expliquée par une diversité de spécificité de substrats.

Les systèmes xylanolytiques de *B. xylanisolvens* XB1A^T, *Bacteroides* sp. XB12B et *R. intestinalis* XB6B4, semblent donc composés d'un petit nombre de xylanases de la famille GH10. Ces enzymes pourraient cependant jouer un rôle important dans la dégradation des xylanes, si elles sont produites en grande quantité, comme le laissent supposer les niveaux d'expression des gènes de GH10 que nous avons quantifiés, et si elles ont des activités spécifiques élevées. Les profils enzymatiques observés en zymogramme, où seules les endo-xylanases sont visualisables, montrent un grand nombre de bandes d'activité xylanases, supérieur au nombre de GH10 prédites chez les trois bactéries. Xyn10A et Xyn10B de *B. xylanisolvens* XB1A^T correspondent aux bandes majeures à 38 et 80 kDa, respectivement ; Xyn10A de *R. intestinalis* XB6B4 a été identifiée comme la protéine active à 160 kDa, et pour *Bacteroides sp.*, il est probable que Xyn10A et Xyn10B correspondent à la bande majeure autour de 80 kDa, et Xyn10-43A à la bande majeure à 100 kDa. Les bandes d'activité supplémentaires observées en zymogramme, pourraient correspondre, soit à des produits de protéolyse des enzymes citées ci-dessus, dans le cas de *R. intestinalis* XB6B4 et *Bacteroides sp.*, soit à des agrégations de protéines, formées entre les xylanases et d'autres protéines, dans le cas de *B. xylanisolvens* XB1A^T.

3.3 Diversité des structures modulaires des enzymes prédites

Les protéines dont les gènes ont été identifiés chez *B. xylanisolvens* XB1A^T, *Bacteroides* sp. XB12B et *R. intestinalis* XB6B4 présentent des structures non-modulaires, ou des structures modulaires qui sont parfois très originales. En effet, plusieurs d'entre elles possèdent, en plus du domaine catalytique, des modules supplémentaires, comme par exemple des modules de liaison au substrat des familles 6 et des modules CBM 4-9 (ou X). Les CBM qui se lient au xylane appartiennent aux familles 2b, 4, 6, 9 15, 22, 35 et 36 (McCartney, *et al.*, 2006 et http://www.cazy.org/). Les domaines de liaison aux xylanes jouent un rôle essentiel dans l'hydrolyse des parois végétales, à la fois en permettant les interactions entre les enzymes et les substrats, mais peut-être aussi en contribuant à la dégradation du substrat (Fernandes, *et al*., 1999). Sur les protéines prédites à partir des gènes identifiés, les CBM sont situés du côté C- ou N-terminal, mais pour les protéines Xyn10B, de *B. xylanisolvens* XB1A^T et *Bacteroides* sp. XB12B, deux domaines consécutifs sont présents et interrompent le domaine catalytique GH10. La protéine est produite et active chez *B. xylanisolvens* XB1A^T, comme le montrent le zymogramme et l'analyse MALDI. Une telle structure est aussi prédite à partir des gènes homologues retrouvés chez *B. intestinalis, B. cellulolysiticus, B. plebius* et *B. eggerthii.* Des domaines interrompant un domaine catalytique GH10 ont déjà été rencontrés dans des enzymes produites par d'autres bactéries, comme par exemple, une xylanase active de 80 kDa chez *Prevotella ruminicola* (Flint, *et al.*, 1997), qui possède une séquence de 280 acides aminés insérée dans le domaine catalytique. Cette séquence, dont la fonction est encore inconnue, est cependant reconnue comme un CBM 4-9 (PFam) ou X (Cazy). Les GH10 semblent donc présenter, dans leur séquence, une zone permissive pour l'insertion de domaines, et cette insertion n'empêche pas l'activité catalytique. L'insertion de deux modules consécutifs, qui pourraient être des CBM, dans le domaine catalytique GH10 semble être une caractéristique commune et unique aux xylanases du groupe des *Bacteroidetes*, peut-être adoptée par ces bactéries au cours de l'évolution afin d'être plus efficaces dans la dégradation des polysaccharides. Il serait particulièrement pertinent d'étudier les propriétés de ces modules qui interrompent les GH10, par exemple en les faisant produire chez *E. coli*.

D'autres protéines prédites possèdent des modules dont la fonction reste encore mal définie (Ig Like, discoïdine ou fibronectine) mais qui pourraient être impliqués dans des interactions protéine-protéine, interactions qui restent cependant à démontrer.

Les protéines Xyn10A et Xyn10-43A, prédites chez *Bacteroides sp*. XB12B, sont bi-fonctionnelles (xylanase/estérase et xylanase/xylosidase). Des protéines bi-fonctionnelles xylanase/estérase ayant des pourcentages d'identité élevés avec Xyn10A sont aussi prédites à partir des génomes d'autres *Bacteroides* : *B. intestinalis* (97%), *B. cellulolysiticus* (96%) et *B. eggerthii* (92%). Une protéine homologue à Xyn10A, Xyn10D-fae1A de *P. ruminicola* (64% identique à Xyn10A), a été clonée chez *E. coli* et caractérisée (Dodd, *et al.*, 2009). Dans cette étude, il a été montré que les deux domaines expriment séparément leur activité respective et que le peptide formé par ces deux hémicellulases conduit à une synergie des activités, offrant ainsi un avantage à la bactérie pour la dégradation des xylanes.

Bien qu'une organisation modulaire soit fréquemment rencontrée chez les cellulases et hémicellulases bactériennes et fongiques, des enzymes à simple domaine sont aussi retrouvées chez les microorganismes, suggérant que ces enzymes jouent aussi un rôle important dans l'hydrolyse des polyosides. Les nombreuses enzymes à simple domaine prédites chez les trois bactéries étudiées, pourraient plutôt être impliquées dans la dégradation des oligo et polysaccharides solubles, initialement libérés par des enzymes modulaires directement liées aux substrats grâce à leur CBM. Ainsi, les bactéries produisent plusieurs types d'enzymes modulaires et non-modulaires afin d'élaborer une stratégie efficace pour hydrolyser les parois végétales. Il serait maintenant intéressant de caractériser biochimiquement les différentes protéines identifiées, afin d'analyser leur mode d'action, leur spécificité de substrat, leur capacité et spécificité d'adhésion lorsqu'elles possèdent des CBM, et le rôle des différents modules dont les fonctions restent mal connues.

3.4 Localisation prédite des enzymes identifiées

Un certain nombre de séquences protéiques prédites à partir des gènes identifiés chez les trois bactéries étudiées ne présentent pas de peptide signal, d'après les analyses réalisées *in silico.* En effet, cinq GH43 chez *B. xylanisolvens* XB1A^{T}, Xyn10A chez *Bacteroides* sp. XB12B et toutes les enzymes prédites chez *R. intestinalis* XB6B4, ne présentent pas de séquence signal en N-terminal (**Tableaux 12, 14, 16 et 17**). Une première hypothèse est que, si elles sont effectivement produites par la bactérie, ces enzymes seraient cytoplasmiques, et joueraient un rôle particulier, sans doute en hydrolysant de petits oligosaccharides, tels que le xylobiose (pour les GH43) ou des xylotrioses ou tetraoses (pour la GH10), dans le

cytoplasme. Une deuxième hypothèse est que, ces protéines seraient exportées par des mécanismes particuliers qui ne necessitent pas la présence de peptide signal.

3.5 Expression des gènes de xylanases et xylosidases

L'analyse de l'expression des gènes de xylanases et xylosidases choisis chez les trois bactéries étudiées, a montré que seule l'expression des gènes de xylanases GH10 est fortement induite en présence de xylane (sauf *xyn10A* de *R. intestinalis* XB6B4). Ce résultat est en accord avec nos résultats présentés dans l'article 1, qui montraient que l'activité spécifique xylanase la plus élevée était obtenue avec des cultures bactériennes sur xylane pour *B. xylanisolvens* XB1A et *R. intestinalis* XB6B4. Aucun des gènes de xylosidase GH43 dont l'expression a été quantifiée en qPCR ne semble être induit en présence de xylane. Leur niveau d'expression est déjà élevé dans les cultures sur sucres. Cette étude, conduite sur seulement un petit nombre de gènes, devra être étendue à tous les gènes de GH10 et GH43 identifiés, afin de mieux comprendre la régulation des gènes de xylanases et du catabolisme des sucres chez ces espèces bactériennes.

3.6 Organisation génique des clusters isolés chez *B. xylanisolvens* XB1A^T

L'analyse de la séquence du génome de *B. xylanisolvens* XB1A^T nous a permis d'identifier cinq clusters composés de trois à quinze gènes codant des enzymes impliquées dans l'hydrolyse des polysaccharides. Dans ces clusters, sont retrouvés des gènes susceptibles de coder des glycoside-hydrolases de différentes familles, offrant à la bactérie un panel d'enzymes variées et efficaces dans l'hydrolyse de composants des hémicelluloses. Outre les gènes de GH10 et GH43, nous avons identifié, dans le cluster 1, des gènes de GH3, 5, 31, 95 et 97. Notons que la GH5 identifiée pourrait être soit une endoglucanase, soit une xylanase, mais que sa masse molaire théorique (73 kDa) ne correspond à aucune bande d'activité xylanase observée en zymogramme. Les clusters 3 et 4 comprennent des gènes identifiés comme codant des GH31, 42, 43, et des estérases. Par contre, le cluster 2 apparaitrait comme un regroupement de gènes des familles GH2 et 28, susceptibles de coder des galacturonases et des β-galactosidases, β-mannosidases ou β-glucuronidases.

Des terminateurs de transcription ont été repérés de part et d'autre de ces clusters, et quelques promoteurs sont prédits pour certains des gènes (**Figure 30**), mais une analyse plus poussée sera nécessaire. Une recherche de promoteur et opérateur commun par exemple

pourra être réalisée, ainsi que la recherche des transcrits, par RT-PCR ou expériences de Northern, afin de définir si ces groupes de gènes sont co-transcrits et forment un opéron.

Plusieurs gènes codant des protéines de type Rag et Sus ont été retrouvés dans ces groupes de gènes. Ces protéines, produites par différents *Bacteroidetes*, ont un rôle dans la liaison au substrat et dans l'internalisation des oligosaccharides dans les cellules (Hall, *et al.*, 2005). Le système Sus, impliqué dans la dégradation de l'amidon, a été largement étudié chez *B. thetaiotaomicron*. Il forme un complexe de huit protéines situé sur la membrane externe de la bactérie (Cho, *et al.*, 2001). Le système Sus est codé par un locus de huit gènes : *susRABCDEFG* (**Figure 34-A)**. SusR est un activateur transcriptionnel du locus, qui répond en présence de maltose. SusA, B et G ont des activités néopullulanase, α-glycosidase et α-amylase respectivement (Reeves, *et al.*, 1996 et Shipman, *et al.*, 2000).

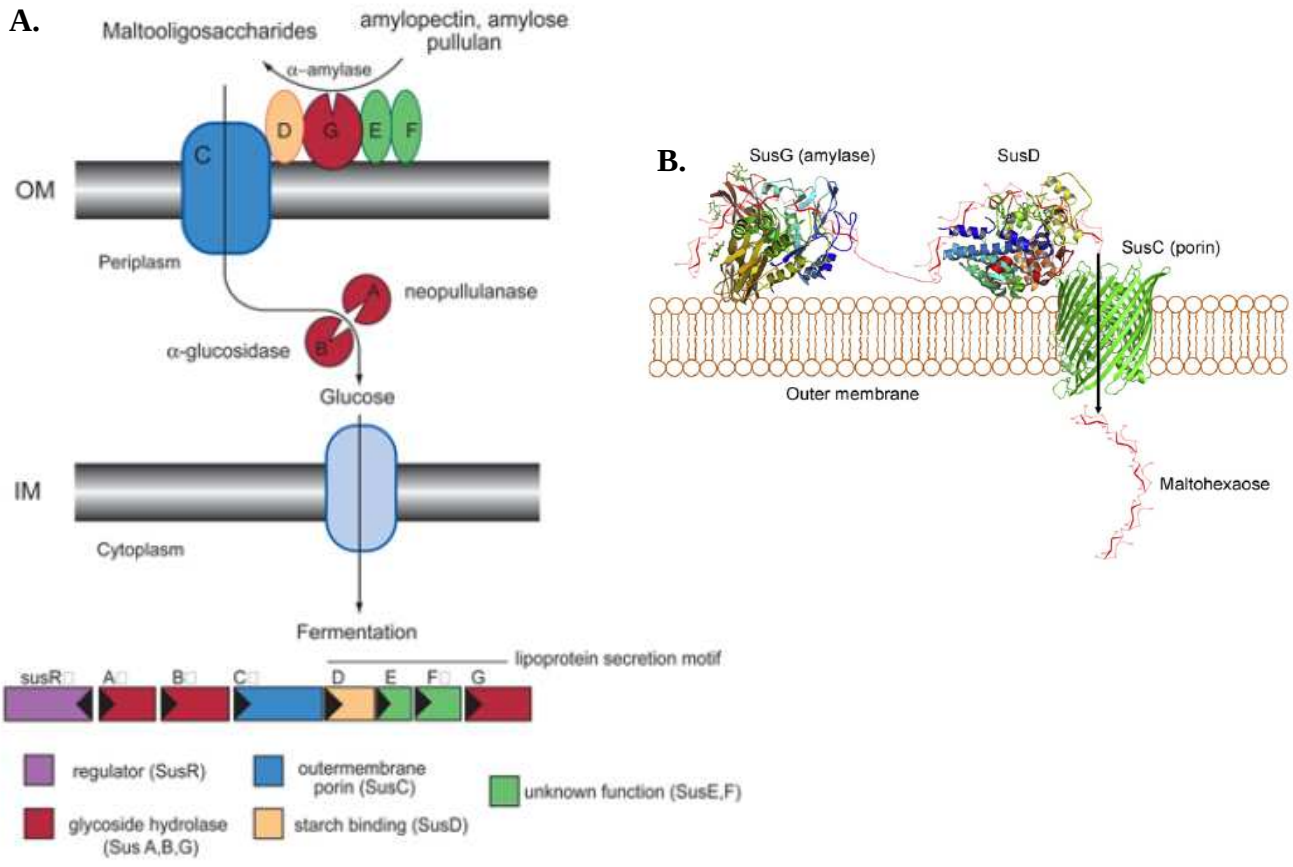


Figure 34. A. *Système Sus d'utilisation de l'amidon chez B. thetaiotaomicron. Schéma représentant le locus sus et les protéines produites. (D'après Koropatkin, et al., 2008).*
B. *Structure 3D des protéines SusG, D et C impliquées dans le complexe Sus (D'après Gilbert, et a.l, 2008).*

Les lipoprotéines SusDEFG sont les composants du complexe ancrés à la membrane externe qui, ensemble, fixent et dégradent les longues molécules de maltodextrines. SusG est une glycoside-hydrolase qui ne semble pas avoir de rôle dans la fixation de l'amidon (Shipman, *et al.*, 1999). SusD fixe les longues chaînes de maltooligosaccharides. SusE et F n'ont pas d'activité hydrolytique et pourraient également fixer l'amidon et les maltodextrines (Cho, *et al.*, 2001 ; Shipman, *et al.*, 2000 ; Martens, *et al.*, 2009). Les maltodextrines produites sont ensuite importées dans le périplasme via SusC, une porine de structure en tonneau β appartenant à la famille des récepteurs TonB (Cho, *et al.*, 2001, **Figure 34-B**), puis sont hydrolysées en glucose dans ce compartiment par SusA et SusB (**Figure 34-A**).

Ces systèmes Sus semblent être présents en très grande quantité chez *B. thetaiotaomicron*, puisque 208 homologues de *susC* et *susD* sont retrouvés dans le génome de cette espèce, où ils sont souvent insérés dans des clusters (Martens, *et al.*, 2009). La présence de complexes Sus chez d'autres bactéries dans différents écosystèmes (du sol, marins…) (Xie, *et al.*, 2007), suggère que le système Sus est une caractéristique commune acquise par les bactéries à Gram négatif dégradant les polysaccharides (Gilbert, *et al.*, 2008). Les protéines RagA et B (GTP binding protein) présentent également des similarités avec les protéines SusC et SusD. Tout comme les protéines Sus, elles auraient un rôle dans la fixation et l'internalisation des oligosaccharides dans les cellules (Schürman, *et al.*, 1995 et Hall, *et al.*, 2004).

Chez *B. thetaiotaomicron*, le système Sus est impliqué dans la dégradation de l'amidon, mais cette stratégie pourrait aussi être employée par les micro-organismes pour la dégradation d'autres substrats. C'est l'hypothèse évoquée pour *Flavobacterium johnsoniae* et *Cytophaga hutchinsonii* qui possèdent des protéines homologues à SusC et SusD, qui pourraient être impliquées respectivement dans la dégradation et l'internalisation, des hémicelluloses et de la cellulose (McBride, *et al.*, 2009 et Xie, *et al.*, 2007). De même, les protéines homologues à RagB et SusD, ou encore les récepteurs TonB qui pourraient en fait correspondre à SusC, identifiées sur le génome de *B. xylanisolvens* XB1A^T, suggèrent un complexe, similaire au système Sus. Chez *B. xylanisolvens* XB1A^T, ce système pourrait intervenir dans la fixation, au niveau de la membrane externe, et l'internalisation des produits de dégradation des hémicelluloses. De nombreuses perspectives de travail découlent de cette analyse du génome, afin de mieux comprendre le fonctionnement du système enzymatique

mis en place par *B. xylanisolvens* XB1A^T et notamment le rôle de ces protéines de type Sus ou Rag.

4. MATERIELS ET METHODES

4.1 Souches bactériennes et conditions de culture

Bacteroides xylanisolvens XB1A^T (DSM 18836T), *Bacteroides* sp. XB12B et *Roseburia intestinalis* XB6B4 (précédemment isolés par Chassard, *et al*., 2007) ont été cultivés à 37°C sur milieu complexe contenant 20% de jus de rumen clarifié (Chassard, *et al.*, 2007) et 0.5% de xylane oat spelt ou 0.3% de sucre simple (xylose, glucose ou cellobiose). Les bactéries ont été repiquées plusieurs fois sur le même substrat, avant que les cultures ne soient arrêtées. Les cultures sur xylane ont été utilisées pour préparer les échantillons protéiques analysées en SDS-PAGE, électrophorèse 2D, et zymogrammes 1D et 2D. Les cultures sur cellobiose ont été utilisées afin d'extraire l'ADNg des trois bactéries. Les cultures sur xylane, xylose et glucose ont été utilisées pour extraire l'ARN et étudier l'expression des différents gènes codant pour les xylanases ou xylosidases.

D'autres bactéries ont été cultivées afin d'utiliser leur ADNg pour la validation des différents couples d'amorces dégénérées utilisés en PCR. *B. thetaiotaomicron* VPI 5482 et *B. ovatus* V975 ont été cultivés sur milieu complexe (Chassard, *et al.*, 2007) contenant 20% de jus de rumen clarifié et 0.3% de cellobiose. *F. succinogenes* S85 (ATCC 19169) a été cultivé sur un milieu contenant 40% de jus de rumen et 0.3% de cellobiose comme décrit précédemment (Béra-Maillet, *et al*., 2000). Le xylane oat spelt, le cellobiose, le xylose et le glucose ont été commandés chez Sigma-Aldrich (Lyon, France).

4.2 Préparation des échantillons protéiques et des protéines liées au xylane

Bacteroides sp. XB12B a été cultivé 48 heures sur milieu complexe contenant 0.5% de xylane oat spelt. Les échantillons de protéines bactériennes et extracellulaires, utilisés pour l'analyse en zymogrammes, ont été préparés comme décrit précédemment dans l'article 1.

B. xylanisolvens XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4 ont aussi été cultivés 48 heures sur milieu complexe contenant 0.5% de xylane oat spelt. Les échantillons protéiques ont été préparés à partir des culots cellulaires obtenus par centrifugation des cultures bactériennes (20min – 10 600g). Les culots ont été lavés quatre fois avec de l'eau distillée contenant un

cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche) puis re-suspendus dans cette même solution dans 1/25ème du volume initial. Les cellules ont ensuite été lysées au Cell Disrupter (One Shot cell Disrupter – CellD) par trois passages à 2200 bars. Les cellules non lysées et les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à 10000g pendant 40 minutes. Le surnageant obtenu a été traité avec 4U d'endonucléases (Dnase + RNase, Sigma) pendant 20 minutes dans la glace. Enfin, une ultracentrifugation (100000g, 1h, 4°C) a permis de séparer la fraction des protéines solubles (protéines du cytoplasme ou protéines faiblement liées à la paroi ou à la membrane de la bactérie) des protéines membranaires qui sédimentent. Les surnageants (protéines solubles) et culots (protéines membranaires hydrophobes) obtenus ont été aliquotés et congelés à –20°C. Les quantités de protéines obtenues ont été dosées par la méthode de Bradford.

Des extraits de protéines liées au xylane (« xylan-binding proteins » ou XBPs) ont ensuite été préparés à partir des échantillons de protéines bactériennes précédemment obtenus, dans le but d'enrichir l'échantillon en xylanases. Les protéines bactériennes (0,25 mg protéines/0,5 ml tampon) ont été lentement agitées avec 2% de xylane oat spelt pendant 3 heures à 4°C. Au bout de 3 heures, les protéines non fixées au substrat ont été éliminées par centrifugation à 2000g pendant 5 minutes. Après trois lavages en tampon phosphate (0,5ml), le culot contenant les protéines liées au xylane (XBP) a été mélangé avec du tampon Laemmli 2X puis analysé en gel SDS-Page.

4.3 Analyse en gel SDS-PAGEet identification des protéines par MALDI-ToF

Les extraits de protéines membranaires liées au xylane (XBP) de *B. xylanisolvens* XB1A^{T} et *R. intestinalis* XB6B4 ont été analysés par SDS-Page. Les profils protéiques SDS-PAGE ont été obtenus en suivant la méthode de Laemmli (1970). Les bandes protéiques ont été visualisées par coloration (bleu de Coomassie, méthanol, acide acétique et eau : 0.1 : 40 : 10 : 50; v/v/v/v) puis décoloration (méthanol, acide acétique et eau : 40 : 10 : 50; v/v/v) des gels. Les spots protéiques d'intérêt ont été prélevés sur gel SDS-PAGE en utilisant un cône de pipette. La décoloration, la digestion par la trypsine et l'analyse MALDI-ToF des protéines présentes dans le gel ont été effectuées comme décrit précédemment (Hamelin, *et al.*, 2006).

4.4 Electrophorèse bidimensionnelle et identification des protéines par MALDI-ToF

- Précipitation des protéines

Les échantillons de protéines solubles ont été précipités avant d'être analysés en électrophorèse bidimensionnelle. La précipitation est effectuée en mélangeant 1 volume de fraction protéique soluble à 3 volumes d'acétone glacial. Après incubation à -20°C pendant 1 heure, le culot a été récupéré par centrifugation 13000g pendant 30min, puis séché sous vide pendant 10min (conservé à -20°C).

- Première dimension

L'isoélectrofocalisation (IEF) a été réalisée sur des bandelettes plastiques (3x170mm) ou strips recouvertes d'un gel de polyacrylamide permettant une répartition linéaire du pH (Readystrip IPG Bio-rad pH pH 5-8). Les échantillons (100µg de fraction protéique soluble précipitée à l'acétone) ont été solubilisés dans 300µl de tampon IEF (tampon de solubilisation auquel on ajoute extemporanément une solution d'ampholytes (Ampholytes pH 5-8, Bio-rad, molécules synthétiques de 300 à 700 Da présentant des fonctions acides ou basiques), du Dithiothréitol et du bleu de bromophénol) (**Annexe 1**).

- Programmation de l'IEF

La programmation de l'IEF est décrite dans le **tableau 19**, elle a été effectuée à 20°C. (Ampérage limité à 50µA par strip).

Tableau 19. ***Programmation de l'IEF***

		voltage	durée	Volt x heures**
Rehydratation passive		**0V**	**9h**	
Rehydratation active		**50V**	**6h**	*300Vh*
Ajouter 2 languettes humides sous chaque strip au niveau du filament				
Etape 1	**R**	**200V**	**30min**	*100Vh*
Etape 2	**G**	**200-1000V**	**1h**	*600Vh*
Etape 3	**G**	**1000-10000V**	**6h**	*33000Vh*
Etape 4*	**R**	**10000V**	~2.5*h*	**20000Vh**
Etape 5	**R**	**500V**	**20h**	
Si possible, arrêter l'IEF dès que l'étape 4 est terminée et noter les Vh reçus				
Vh totale théorique **				**54000Vh**

R= montée rapide du voltage
G= montée du voltage en gradient
*L'étape 4 est l'étape de focalisation des protéines. Elle dépend des strips (longueur et pH) et doit être entrée en volt-heure pas en durée comme les autres étapes
**Calcul théorique des Vh reçues lors d'une montée en gradient : $[(V_i+V_f)/2]xt$

- Deuxième dimension

Avant de procéder à la deuxième dimension, les bandelettes sont rééquilibrées deux fois 30 minutes dans deux tampons d'équilibration (solutions I et II, **Annexe 2**). La deuxième dimension est effectuée par SDS-PAGE sur un gel à 12% de polyacrylamide (180x180mm, épaisseur 1mm) après avoir déposé la strip sur le gel. Un marqueur de taille a également été déposé (Precision blue, Bio-Rad). La strip est ensuite immobilisée sur le gel en ajoutant de l'agarose (Low Melting Point) à 0.1% en solution dans du tampon de migration (Tris 25mM, Glycine 192mM, SDS 0.1%, thiosulfate de sodium 5mM, pH 8.3). La migration se fait en deux étapes: la première à voltage constant (25V, 1 heure) et la deuxième à ampérage constant (25 mA, une nuit) dans la cuve de migration (Protean XL Cell Bio-rad).

- Révélation et identification protéique par MALDI-ToF

Les protéines ont été révélées au nitrate d'argent (Yan, *et al*., 2000) (**Annexe 3**). Cette coloration est compatible avec l'analyse des protéines en spectrométrie de masse. Les spots protéiques d'intérêt ont ensuite été prélevés sur gel SDS-PAGE en utilisant un cône de pipette et analysés comme précédemment décrit dans le paragraphe **4.3**.

- Zymogrammes 2D

Pour les zymogrammes 2D, l'IEF des protéines (100µg de fraction protéique soluble précipitée à l'acétone) a été effectuée comme décrit ci-dessus. Avant la 2ème dimension, les strips ont subit uniquement l'équilibration dans la solution I et ont été déposées sur un gel d'acrylamide à 12% contenant 0.1% de xylane oat spelt. La révélation des zymogrammes 2D a été effectuée comme décrit dans l'**article 1** pour les zymogrammes monodimensionnels.

4.5 Extractions d'ADN

L'ADN génomique de *B. xylanisolvens* XB1A^T, *Bacteroides* sp. XB12B, *R. intestinalis* XB6B4, *F. succinogenes* S85, *B. thetaiotaomicron* VPI 5482, *B. ovatus* V975, a été isolé à partir de cultures bactériennes d'une nuit sur milieu contenant du cellobiose. Les cellules (10ml de culture) ont été récupérées par centrifugation (10000g, 20min) et lavées 3 fois dans 1ml de tampon phosphate (50mM, pH 7). L'extraction d'ADN a été effectuée en utilisant le kit « Easy DNA » (Invitrogen, Groningen, Netherlands) selon les recommandations du fournisseur. La concentration et la qualité des ADNg obtenus ont été

contrôlées au spectrophotomètre ND-1000 (Nanodrop Technologies). Les ADNg de *R. albus* 7 et *R. flavefasciens* 17 ont été fournis par P. Mosoni (Mosoni, *et al*., 2007).

4.6 Oligonucléotides utilisés

- Amorces oligonucléotidiques simples

Les oligonucléotides utilisés pour amplifier les gènes de xylanases sur l'ADNg de *B. xylanisolvens* XB1A^T, *Bacteroides* sp. XB12B et *R. intestinalis* XB6B4 sont présentés dans les **tableaux 11, 13 et 15** de ce chapitre, ils ont été commandés chez le fournisseur MWG Biotech (Ebersberg, Germany). Ces amorces ont été choisies à partir des séquences des gènes de xylanases déjà identifiées chez des espèces bactériennes phylogénétiquement proches ou sur le génome partiel non annoté de *B. xylanisolvens* XB1A^T dont la première version a été obtenue en avril 2009.

- Amorces oligonucléotidiques dégénérées et autres amorces nécessaires à leur validation

Des amorces oligonucléotidiques dégénérées spécifiques des xylanases des familles GH10, 11 et 43 ont été testées. Ces amorces ont été dessinées avec le logiciel Metabolic Design développé par le l'équipe GIIM (Génomique intégrée des interactions microbiennes) du Laboratoire Micro-organismes Génome et Environnement (LMGE UMR6023 – Aubière), (**Tableau 20-A**). Ce programme automatise toutes les étapes de choix des amorces selon le processus suivant : 1) il effectue un alignement multiple de type CLUSTALW entre les séquences nucléotidiques sélectionnées afin de générer une séquence consensus dégénérée, 2) il teste des séquences de 18 à 22 pb issues de ce consensus par une analyse de type BLASTN afin de tester leur spécificité, 3) il considère les amorces spécifiques du groupe ciblé et les conserve seulement si aucune réaction croisée n'est identifiée (Kane, *et al.*, 2000).

Afin de valider la spécificité de ces amorces, des gènes « témoin » ont été utilisés. Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour amplifier ces gènes « témoin » sont présentées dans le **tableau 20-B**. Après amplification des gènes « témoin » et purification des produits de PCR obtenus, les produits purifiés ont été utilisés comme matrice pour une amplification avec les amorces dégénérées. Cette amplification a été effectuée afin de valider la spécificité des amorces dégénérées envers des gènes codant pour des xylanases connues des familles GH10, 11 et 43.

Tableau 20. *Amorces oligonucléotidiques dégénérées (A). Autres amorces utilisées pour amplifier les gènes « témoin » nécessaires à la validation des amorces dégénérées (B).*

A. Amorces dégénérées spécifiques des xylanases GH10

Couple "Large spectre"	**Séquence (5'-3')**	**T° d'hybridation**
amorce forward	KSIGRIAAYKVIATGAAR	45°C
amorce reverse	IVCYTCRTTIRCIACRTC	45°C
Couple "Bacteroides/Clostridium"		
amorce forward	CAYWSIYTIRTITGGCAY	45°C
amorce reverse	IRCYTCRTTIAYIACRTC	45°C

Amorces dégénérées spécifiques des xylanases GH11

Couple "Large spectre"		
amorce forward	RTIGARTAYTAYRTIRTI	45°C
amorce reverse	ISWYTGRTAICCYTCIRY	45°C
Couple "Bacteroides/Clostridium"		
amorce forward	RTIGARTAYTAYRTIGTI	45°C
amorce reverse	CCAIGCIYBIAMRTGRTT	45°C

Amorces dégénérées spécifiques des xylosidases GH43

Couple "Large spectre"		
amorce forward	TTYYTITAYTTYGSIAAY	45°C
amorce reverse	RTGRTGRTTRTTICCICC	45°C

B. Amorces utilisées pour amplifier les gènes "témoin"

Gène (espèce bactérienne)	**Séquence (5'-3')**	**T° d'hybridation**
xyn10E (*F. succinogenes* S85)		
amorce forward	GACTTTTTGGGGCGATTTTT'	55°C
amorce reverse	GAGACTGCCATCGAGAGAGA	55°C
xyl I (*B. ovatus* V975)		
amorce forward	AGGAGATAGAATCGCGCTGT	55°C
amorce reverse	GCCATATAATCACCGGGAAC	55°C
xynA (R. albus 7)		
amorce forward	AAAACTGTGCGGGAAAGAGA	55°C
amorce reverse	CAGAATATATCAGGAAAGCTTGGA	55°C
xynD (R. flavefasciens 17)		
amorce forward	CACGGTCACGGAATGAGAG	55°C
amorce reverse	TTCTGTCCCTGACTGCTGTG	55°C
xynC (F. succinogenes)		55°C
amorce forward	CTTTGCTGTTGGCGGATAAT	55°C
amorce reverse	ACGGGGAGCGTTTTTACAGT	
BT2895 (B. theaiotaomicron VPI5482*)*		
amorce forward	GGCGTATTCGGGTAATCAAA	55°C
amorce reverse	CAAGCACACCAAAAGGACAA	55°C

Tableau 20. Bis. *Nomenclature des bases dites "dégénérées" attribuée par l'IUB (International Union of Biochemistry)*

Code IUB	Bases	Code IUB	Bases
N	A,C,G,T	S	G,C
V	G,A,C	W	A,T
B	G,T,C	M	A,C
H	A,T,C	Y	C,T
D	G,A,T	R	A,G
K	G,T		

4.7 Procédure d'amplification par PCR

Les réactions de PCR ont été réalisées en utilisant 1U de Taq DNA polymerase (QBiogene). Les paramètres de PCR ont été adaptés aux amorces oligonucléotidiques utilisées. Le programme de PCR comprend une étape de dénaturation (2 minutes à 94°C), 30 cycles d'amplification (30 secondes à 94°C, hybridation pendant 2 minutes à la température donnée et 2 minutes à 72°C), et une étape d'élongation finale de 10 minutes à 72°C.

4.8 Séquençage de l'ADN et analyse des séquences

Les produits de PCR des différents gènes, codant pour les xylanases et xylosidases amplifiés sur les trois souches bactériennes étudiées, ont été séquencés. Les produits purifiés ont été séquencés entièrement et dans les deux directions, avec le kit « ABI Prism BigDye Terminator cycle» (Applera). Les séquences d'ADN obtenues ont ensuite été analysées avec le logiciel « Chromas Lite » disponible en libre accès sur le site Internet http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html. La structure protéique et les différents domaines composant les protéines traduites à partir de ces gènes ont été analysés en utilisant les bases de données Prodom, PFam et InterproScan.

4.9 Extraction d'ARN

L'ARN a été isolé à partir de cultures (10 ml) de *B. xylanisolvens* XB1A^T, *Bacteroides* sp. XB12B et *R. intestinalis* XB6B4, sur des milieux contenant respectivement du glucose, du xylose (16 heures de croissance) ou du xylane oat spelt (48 heures de croissance). Pour chaque bactérie, l'ARN a été extrait à partir de trois cultures différentes sur chacun des trois

substrats, permettant ainsi d'obtenir trois réplicats biologiques par substrat et par espèce bactérienne. L'extraction d'ARN a été effectuée en utilisant le kit «Hight Pure RNA» (Roche, Mannhein, Germany) selon les recommandations du fournisseur. Pour les extractions d'ARN à partir du milieu contenant du xylane, le protocole du fournisseur a été légèrement modifié. En effet, une étape supplémentaire (une 2ème étape de lyse des bactéries du culot avec 400µl de tampon de lyse puis centrifugation 5 minutes à 8000g pour récupérer les acides nucléiques présents dans le surnageant) a été réalisée afin d'éliminer le xylane insoluble présent dans le milieu. L'ADN génomique contaminant a ensuite été éliminé des extraits par traitement DNase (Eurogentec) selon les recommandations du fournisseur. La concentration et la qualité des extraits d'ARN obtenus ont été contrôlées au spectrophotomètre ND-1000 (Nanodrop Technologies) et sur gel d'agarose à 0,7%.

4.10 Reverse transcription et qPCR relative

Pour chacun des extraits d'ARN obtenu comme décrit ci-dessus, un microgramme d'ARN total a été rétro-transcrit. Cette étape de rétro-transcription a été effectuée en utilisant des amorces aléatoires (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et 200U de reverse transcriptase SuperscriptII Rnase H$^-$ (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur.

Afin de mieux comprendre la régulation de l'expression des gènes codant pour les xylanases de *B. xylanisolvens* XB1A^T, *Bacteroides* sp. XB12B et *R. intestinalis* XB6B4, nous avons quantifié les ARNm de certains gènes cibles (**Tableau 21**) à partir des cultures bactériennes obtenues sur différents substrats (xylane, xylose ou glucose). Pour cela, nous avons mesuré par qPCR relative, les variations d'expression du gène cible dans la condition « xylane » ou « xylose » par rapport à la condition « glucose ». L'ADNr 16S a été utilisé comme gène de référence.

Tableau 21. *Amorces utilisées en qPCR relative pour quantifier les taux d'induction de différents gènes isolés des bactéries étudiées.*

Bactérie	Famille de GH	Gène	Amorces	Séquence (5'-3')	Taille du produit
B. xylanisolvens XB1A^T	/	*ADNr16s*	XB1A-16s-F	TCCACGTGTGGGATTTTGTA	
			XB1A-16s-R	AGCCGCAAACTTTCACAACT	156bp
	GH 10	*xyn10A*	XB1A-xyn10A-F	GGAAGTCTCGGCATCTTTTG	
			XB1A-xyn10A-R	ATCCGTACGTCCTCTCATCG	211bp
	GH 10	*xyn10B*	XB1A-xyn10B-F	CGGTGTGACAAAGATTGACG	
			XB1A-xyn10B-R	CCGCTTTCATCCACATATCC	174bp
	GH 43	*xyl43A*	XB1A-xyn43A-F	CTGCTATGCAATGAGCCGTA	
			XB1A-xyn43A-R	AAACAGAACGGCGGAAACTA	179bp
	GH 43	*xyl43B*	XB1A-xyn43B-F	CGACTGGTCGAAGGGATATG	
			XB1A-xyn43B-R	ACGATCTGCAACAAGCACAT	172bp
Bacteroides sp. XB12B	/	*ADNr16s*	XB12B-16s-F	TAACGAGCGCAACCCTTATC	
			XB12B-16s-R	GGCTTTTGGGATTAGCATCA	195bp
	GH 10+43	*xyn10+43A*	XB12B-xyn10-43A-F	GCGTAGACAAAACCCAGCAT	
			XB12B-xyn10-43A-R	ATGGCACAAGGTTTGAAAGG	163bp
	GH 10	*xyn10A*	XB12B-xyn10A-F	CATGGATGAGGGATTCCATT	
			XB12B-xyn10A-R	CACGACGATGGGTATCTGTG	212bp
	GH 10	*xyn10B*	XB12B-xyn10B-F	ATGCACGTGAGTTGCTATGC	
			XB12B-xyn10B-R	TGGGCAGCAGGAATTATCTC	245bp
	GH 43	*xyl43A*	XB12B-xyn43A-F	GGGACGATATAGACCCGACA	
			XB12B-xyn43A-R	TCCGTAAAACGAGGCAAATC	151bp
R. intestinalis XB6B4	/	*ADNr16s*	XB6B4-16s-F	CACATTGGGACTGAGACACG	
			XB6B4-16s-R	CACGTATTTAGCCGGTGCTT	184bp
	GH 10	*xyn10A*	XB6B4-xyn10A-F	TGAGCGTGACCTTTGAACTG	
			XB6B4-xyn10A-R	GGGTGGCAGTTTCCtGATTA	216bp

L'optimisation des conditions de qPCR (choix des amorces, programme PCR) a tout d'abord été effectuée en utilisant l'ADN génomique des trois espèces comme matrice. Pour chacun des gènes étudiés, trois couples d'amorces ont été dessinés et testés en qPCR avec différentes concentrations d'ADNg de la souche bactérienne correspondante. Les différents couples d'amorces ont été choisis en fonction de 2 critères : une température d'hybridation de 60°C et un amplifia d'environ 200pb. L'analyse des résultats (non montrés) nous a alors permis de sélectionner un couple d'amorce par gène cible (**Tableau 21**). Le couple d'amorce sélectionné est celui qui présentait la meilleure efficacité de qPCR (supérieure à 95%) et qui amplifiait un produit à la taille attendue.

La qPCR est réalisée avec l'appareil Mastercycler® ep realplex 2S (Eppendorf) dans des plaque de 96 puits (Twintec skirted plates, Eppendorf) dans un volume réactionnel de

20µl par puit. Le kit IQ Sybr Green Supermix (Bio-Rad) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Les couples d'amorces sont utilisés à la concentration de 0.3µM. Deux quantités d'ADNc ont été testées (0,1 et 1 ng par puit) et la quantité de 1 ng d'ADNc a été retenue pour l'analyse des résultats d'expression car les Ct de sortie des gènes d'intérêt étaient trop tardifs (Ct > 30) avec 0.1 ng de cDNA. Le programme utilisé commence par une étape de dénaturation initiale (30sec à 98°C), puis 40 cycles d'amplification où chaque cycle est composé d'une dénaturation (15sec à 95°C), et d'une hybridation / élongation en une étape (30sec à 60°C) avec mesure de la fluorescence en fin d'élongation. En fin de qPCR, la courbe de fusion (melting curve) est programmée avec une étape de 15sec à 95°C, une étape de 15sec à 65°C, et une dernière étape où la température passe progressivement de 65 à 95°C en 20 minutes, avec acquisition continue de la fluorescence. L'expression relative des gènes étudiés a ensuite été analysée selon la méthode décrite par Livak et Schmittgen (2001) qui estime le « Fold increase » c'est-à-dire le facteur d'induction ou de repression d'un gène donné dans une condition traitée (xylane ou xylose) par rapport à une condition témoin (glucose) par la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Résultats
- Chapitre 3 -

RESULTATS – CHAPITRE 3

Caractérisation de la xylanase Xyn10A de *B. xylanisolvens* XB1A^T

1. INTRODUCTION

La caractérisation moléculaire des systèmes enzymatiques des trois souches étudiées, a montré que ces bactéries xylanolytiques du côlon possèdent de nombreux gènes susceptibles de coder pour des enzymes impliquées dans la dégradation de la chaîne polyosidique des xylanes. Ces enzymes appartiennent aux familles GH10 et GH43 des glycoside-hydrolases. Les gènes codant pour des GH43 sont retrouvés en grand nombre dans les trois génomes, alors que les gènes codant les GH10 ne sont présents qu'en nombre très restreint, comme nous l'avons déjà signalé dans la discussion de la partie « Résultats-Chapitre 2 » de ce mémoire. Par exemple, seules deux GH10 sont produites par *B. xylanisolvens* XB1A^T. Or, les xylanases de la famille 10 sont considérées comme de « vraies » xylanases, on retrouve dans cette famille essentiellement des endo-xylanases-β,1-4 et des endo-xylanases-β,1-3, capables de cliver les chaînes principales de xylane, alors que les enzymes de la famille GH43 sont essentiellement des xylosidases et des arabinosidases, destinées à hydrolyser les ramifications osidiques des chaînes de xylanes. Les xylanases de la famille 10 jouent certainement un rôle important dans la dégradation des xylanes par les bactéries modèles étudiées, mais compte-tenu de leur faible nombre, elles sont soit fortement synthétisées par ces bactéries, soit dotées d'une activité spécifique élevée. Nous avons effectivement pu vérifier dans le chapitre 2 des résultats que les gènes codant Xyn10A et Xyn10B de *B. xylanisolvens* XB1A^T étaient fortement sur-exprimés en présence de xylane.

Les enzymes GH10 que nous avons identifiées dans les bactéries étudiées sont soit modulaires et de masse moléculaire élevée (car elles comportent un ou plusieurs domaines catalytiques ou des modules de liaison au substrat), soit non modulaires (seulement un domaine catalytique) et de petite taille. Les xylanases modulaires de la famille GH10, qui possèdent un ou plusieurs modules de liaison au substrat, sont probablement localisées à la surface bactérienne pour permettre à ces enzymes de s'attacher aux polysaccharides disponibles pour les bactéries et de le dégrader. Parmi les enzymes GH10 de faible masse molaire composées d'un seul module catalytique, des enzymes intracellulaires (périplasmiques ou cytoplasmiques) ont été décrites dans différentes espèces bactériennes

(Connerton, *et al.*, 1999 ; Fontes, *et al.*, 2000 ; Gallardo, *et al*., 2003 ; Liebl, *et al*., 2008). Les résultats obtenus dans les deux chapitres précédents nous ont permis de mettre en évidence une xylanase de petite taille (certainement non modulaire) uniquement associée à la fraction protéique intracellulaire de *B. xylanisolvens*, et qui pourrait être Xyn10A. Le rôle des enzymes intracellulaires est probablement important pour une utilisation plus efficace par la bactérie des produits de dégradation des polysaccharides pariétaux.

Afin de caractériser cette xylanase, nous avons cloné le gène *xyn10A* dans un vecteur d'expression pASK IBA33, et transformé des bactéries *E. coli* TOP10 avec cette construction. La protéine produite à partir du plasmide recombinant a ensuite été étudiée, afin de déterminer la spécificité de substrat de la xylanase, de quantifier son activité et de déterminer les conditions optimales (pH et température) de son activité. En parallèle, une analyse phylogénétique a permis d'analyser les homologies de structure de Xyn10A avec d'autres xylanases GH10 provenant de divers microorganismes et environnements.

2. ARTICLE 2

Characterization of Xyn10A, the first xylanase identified from the human gut bacterium *Bacteroides xylanisolvens* XB1A^{T}.

CAROLINE MIRANDE, PASCALE MOSONI, CHRISTEL BERA-MAILLET, ANNICK BERNALIER-DONADILLE AND EVELYNE FORANO

INRA, UR454 Unité de Microbiologie, Centre de Recherches de Clermont-Ferrand/Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Keywords: GH10, xylanase, *Bacteroides xylanisolvens* , human gut

Corresponding author: Dr E. Forano
Mailing address: INRA, UR454 Unité de Microbiologie, CR de Clermont-Ferrand/Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France.
Phone: 33-473-62-42-48.
Fax: 33-473-62-45-81.
E-mail: evelyne.forano@clermont.inra.fr

ABSTRACT

A xylanase gene *xyn10A* was isolated from the human gut bacterium *Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T and the gene product was characterised. This xylanase Xyn10A is a non modular enzyme of 38kDa composed of one glycoside hydrolase family 10 catalytic domain with a signal peptide sequence. The recombinant Xyn10A produced by *E. coli* was active on oat spelt and birchwood xylan and on wheat arabinoxylans. It cleaved xylotetraose, xylopentaose and xylohexaose but it did not hydrolyse xylobiose, clearly indicating that Xyn10A is a xylanase. Surprisingly, it showed low activity against CMC but no activity at all against aryl-cellobioside and cellooligosaccharides. Its optimal temperature and pH for activity were 37°C and pH 6.0, respectively. Phylogenetic analyses showed that Xyn10A was closely related to other GH10 xylanases from human *Bacteroides*. *xyn10A* gene was expressed in *B. xylanisolvens* XB1A^T cultured with glucose, xylose or xylans. The protein appeared to be closely associated with the bacterial cells. Xyn10A is the first family 10 xylanase characterised from *B. xylanisolvens* XB1A^T.

INTRODUCTION

The plant cell wall consists of a complex network of polysaccharides including cellulose, hemicelluloses, pectin and lignin. Xylans are major components of hemicelluloses (Polizeli et al. 2005). They are composed of a homopolymeric backbone of β-1,4-linked D-xylopyranose units and short side chains, including O-acetyl, α-L-arabinofuranosyl, and α-D-glucuronyl residues. The extent and nature of these side chains varies among plant species. Xylans are major polysaccharides in the cell wall of cereal, fruit and vegetable consumed daily by humans. Accordingly, the xylanolytic community appears as an important component of the human gut microbiota, as shown by cultural methods (Wedekind et al, 1988; Chassard et al, 2007; Chassard et al, 2008a). The predominant xylan-degrading species that have been identified up to now belong to the *Bacteroides* genus (Hespell and Whitehead, 1990 ; Chassard et al., 2007). Salyers et al identified several xylanolytic *Bacteroides* isolates belonging to *B. eggerthii, B. fragilis, B. ovatus* and *B. vulgatus* species (Salyers et al, 1977a, 1977b). *B. ovatus* and *B. fragilis* were the most active of these isolates. However, there is a lack of knowledge about the xylanolytic system of these *Bacteroides* species. *B. ovatus* is the sole human gut bacterium whose xylanolytic system has been partly characterized using molecular techniques. Genes encoding a xylanase and a bifunctional xylosidase-arabinosidase were cloned and expressed in *E. coli* (Whitehead and Hespell, 1990; Weaver et al, 1992; Whitehead 1995). These two genes were shown to be part of an operon under the control of a xylan-inducible promoter (Weaver et al, 1992). *B. xylanisolvens* is another species of the human xylanolytic *Bacteroides* which was recently isolated from human faeces (Chassard et al, 2008b). The type strain XB1A^T showed a xylanolytic activity higher than that measured in the other colonic bacteria such as *B. ovatus* (Chassard et al, 2007). It was able to degrade pure xylans of diverse origin efficiently, but did not degrade starch and grew hardly on pectins or galacturonic acid, suggesting that it is specialised in xylan degradation. Preliminary

characterization of the xylanolytic system of *B. xylanisolvens* XB1A^T showed that the bacterium produces two xylanases of approximately 70kDa and 35kDa when cultured with xylans (Chassard et al, 2007). A gene encoding a family 10 glycoside hydrolase (http://www.cazy.org/) was identified from the draft genome of *B. xylanisolvens* XB1A^T (http://www.sanger.ac.uk/pathogens/metahit). The encoded protein corresponds probably to the lowest molecular mass xylanase (at 35 kDa) previously identified in this species. Our objective was to carry out a complete characterization of this newly identified xylanase from a human gut bacterium.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

Bacteroides xylanisolvens XB1A^T (DSM 18836T) was cultivated at 37°C anaerobically, in a complex medium containing clarified rumen fluid (Chassard *et al.*, 2007) and 0.3% of cellobiose, xylose or glucose, or 0.5% oat spelt xylan (all from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cells were harvested at late log phase after overnight culture on sugars or 48 hour-culture on oat spelt xylan. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was routinely grown on Luria-Bertani (LB) medium with appropriate antibiotic selection at 37°C.

Preparation of *E. coli* and *B. xylanisolvens* protein samples

Bacterial proteins of *E. coli* producing or not Xyn10A were obtained after culture centrifugation at 8000g for 10 min at 4°C. Cell pellets were re-suspended in 50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0, providing bacterial suspensions concentrated ten times (10X). Soluble proteins were obtained after sonication of the 10X bacterial suspensions (Branson 250D Digital 200W). Cells were submitted to five pulses of 10 sec at 50% intensity with 10

sec pauses between each pulse. After centrifugation at 13000 g for 20 min at 4°C, the supernatant containing bacterial soluble proteins was aliquoted and frozen at -20°C.

B. xylanisolvens XB1A^T cultured with oat spelt xylans or with sugars were centrifuged 20 min at 10,600g, at 4°C. The pellets containing cell-associated proteins were washed twice in 50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 and suspended in 1/10 volume of the same buffer. The supernatant containing extracellular proteins was concentrated about tenfold with a Centricon Plus-20 centrifugal device (Millipore, Molsheim, France). Extracellular and cell-associated protein samples were aliquoted and kept frozen at -20°C. Protein amount was determined by the method of Bradford with bovine serum albumin as standard.

SDS-PAGE, Western blotting and Zymogram

SDS-PAGE and Western-blotting were performed as described previously (Esbelin et al, 2009; Rakotoarivonina et al, 2009).

Zymograms were performed under denaturing conditions (SDS-PAGE) with 8% polyacrylamide gels containing 0.1% of oat spelt xylan. After electrophoresis, proteins were renatured by incubating the gels for 2 × 20 min in 50 mM sodium phosphate buffer at pH 7 containing 2% Triton X100. After 3 incubations of 15 min in the same buffer without Triton X100, the gel was incubated overnight at 37°C. It was finally stained with 0.1% Congo red and destained with 1M NaCl.

DNA isolation

Genomic DNA was isolated from cultures of *B. xylanisolvens* XB1A^T after overnight growth in cellobiose rumen fluid medium. Cells (20 ml culture) were harvested by centrifugation (10000g, 20min at 4°C) and washed three times in 2 ml sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7). DNA isolation was performed using the easy DNA Kit (Invitrogen) according to the

manufacturer's recommendations. DNA concentration was estimated by the absorbance at 260 nm. DNA integrity was verified by electrophoresis on an ethidium bromide-stained 0.7% (w/v) agarose gel.

Plasmid-DNA isolation from recombinant *E. coli* was performed with the Qiafilter Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the supplier's instructions.

RNA isolation and reverse transcription

RNA was isolated from *B. xylanisolvens* XB1A^T following an overnight culture with xylose or glucose medium and 48 h culture with oat spelt xylan. RNA isolation was performed using the "High Pure RNA" kit (Roche, Meylan, France). Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed using random hexamer primers (Invitrogen) and 200 U SuperscriptII Rnase H$^-$ reverse transcriptase (Invitrogen), according to the procedure supplied with the enzyme. For each RNA sample, a negative RT (no addition of reverse transcriptase) was performed and used as a negative control in subsequent PCRs. Oligonucleotide primers used to amplify the whole *xyn10A* gene from *B. xylanisolvens* XB1A^T cDNA were 5'-AGCATATTCAGGACGATTGG-3' (forward) and 5'-AAGGTCATTTCGGCATAGC-3' (reverse), and were purchased from MWG Biotech (Ebersberg, Germany).

Cloning and expression of xyn10A gene

The whole *xyn10A* gene was amplified by PCR from *B. xylanisolvens* XB1A^T genomic DNA using the AccuTaq LA DNA polymerase (Sigma-Aldrich) following the instructions given for the enzyme. Forward and reverse primers were designed to clone *xyn10A* gene encoding the predicted protein including the signal sequence. The following primers were used for PCR amplification: 5'-

ATA<u>*CTCGAG*</u>***TAATAA****AA****GAAGGAGA****TATACAA***__ATG__AAGACTTCGATAAGAACAACC

GTAGTTTC-3' (forward) and 5'-*CTAA*<u>*CCATGG*</u>TTTTTCTGCATAGCCTCTTTTATAATCAAATCAAC (reverse). The forward and reverse primers contained cloning sites (in italics) with their respective *XhoI* and *NcoI* sites (underlined). In the forward primer, downstream the cleavage site, two successive stop codons (in bold) and a ribosome binding site (in bold) were added to stop the translation starting from the vector and to start translation at the start codon (in bold) of the xylanase gene, respectively. The resulting PCR product was cloned into *XhoI / NcoI*-digested pASK-IBA33 vector (IBA, Göttingen, Germany) such that a His_6 tag was fused with the C-terminus of the recombinant protein. Recombinant plasmids were expressed in *E. coli* TOP10 as follows: single colonies were transferred into 5ml LB medium with 50 µg ampicillin. ml^{-1}. Two hundred microliters of these precultures were then used to inoculate 10 ml volume of the same medium and were grown at 37°C with agitation to an OD_{600} of 0.5 then 2mg/ml of anhydrotetracyclin (AHT, from IBA) was added and the culture was incubated for a further 3 hours at 37°C.

DNA sequencing and sequence analysis.

The recombinant plasmid-DNA was sequenced in both directions using an ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin Elmer) with the following primers: 5'-CCCGAATTCGAGCTCGG-3' (forward) and 5'-GATGGTGATGCGATCCT-3' (reverse).

DNA and protein sequences were analyzed using the NCBI or EBI servers. Multiple alignment was performed using the T-coffee program (Notredame et al, 2000) available at http://www.phylogeny.fr (Dereeper et al, 2008). The phylogenetic tree was constructed using the BIONJ program (Gascuel, 1997).

Enzymatic assays

The enzymatic assays were carried out by incubating the soluble protein extracts from recombinant *E. coli* with 0.5% (w/v) polysaccharides [oat spelt and Birchwood xylans, medium-viscosity carboxymethylcellulose, lichenan, laminarin, β-glucan (Sigma), cellulose (Avicel PH-101, Sigma Aldrich) and wheat arabinoxylans (Megazyme, Wicklow, Ireland)] in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, at 37°C for 20 min. The amount of soluble proteins and the incubation time were chosen to provide assay conditions in which the measured activity was proportional to these two parameters. Reducing sugars released from polysaccharide hydrolysis were assayed as already described by Béra-Maillet *et al* (2004) with xylose as standard. The optimal temperature of the xylanase was determined by incubating the soluble protein extracts at different temperatures (10–60 °C) for 30 min with 0.5% (w/v) oat spelt xylan in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0. The optimal pH was determined by incubating the enzyme preparation in 0.5% oat spelt xylan in 0.2 M sodium phosphate/0.1 M citric acid buffer (pH 4–9) at 37 °C for 30 min.

Soluble proteins were incubated with *p*NP-α-L arabinofuranoside, *p*NP-β-D xylopyranoside, *p*NP-β-D cellobioside (all from Sigma and at 0.5% final concentration) for 30 min, in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 1ml of 1M Na_2CO_3 and color development was measured at 400nm. Enzymatic activity was measured as *p*-nitrophenol released per minute and mg of protein.

Thin-layer-chromatography

TLC was carried out using xylooligosaccharides (X1 to X6, Megazyme) or cellooligosaccharides (G1, G2, G3 and G5, Sigma Aldrich) as standards. Enzyme extracts in 50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 were incubated with the xylo- or cello-oligosaccharides at 37°C for 30 min, 1 or 2h. Samples were analyses onto thin-layer silica gel

60 F254 plates (Merck, VWR International SAS, Strasbourg, France) as described in Nouaille *et al* (2004).

RESULTS

Isolation of *xyn10A*, sequence and gene product analysis

Using the XylI sequence (SwissProt P49942) from *Bacteroides ovatus* (Whitehead et al, 1995) as query, genes encoding xylanases from glycoside hydrolase family 10 (GH10) were searched for in the genome of *B. xylanisolvens* XB1A^T. The draft genome sequence of this strain was produced by the Wellcome Trust Sanger Institute (http://www.sanger.ac.uk/pathogens/metahit). One open reading frame (ORF) predicted to encode a GH10 catalytic domain without any other ancillary module was selected for further examination. It was named *xyn10A*. The complete *xyn10A* gene sequence is 1137 bases with an ORF starting with an ATG initiation codon and ending with a TGA stop codon. The GC content of the sequence is 42.7%. The upstream non-coding portion of the sequence was AT rich and contained sequences similar to *E. coli*-like promoters. A sequence that could be assimilated to a RBS was found 5 nucleotides upstream the putative start codon. The ORF encodes a protein of 378 amino acids with a predicted molecular mass and pI of 42,123 Da and 7,6 respectively. A typical signal sequence is present at the N-terminus of Xyn10A, with a predicted cleavage site between amino acids 27 and 28. The predicted molecular mass of the mature protein is 40,390 Da.

Phylogeny

A phylogenetic tree was constructed for the GH10 catalytic domain of Xyn10A from *B. xylanisolvens*. The deduced amino acid sequence of Xyn10A was aligned with xylanase sequences contained in the NCBI database. The phylogenetic tree presented in Fig. 1 includes

25 sequences of GH10 xylanase catalytic domains from microorganisms isolated from various ecosystems (rumen, human gut, soil, marine sediments or water). A high homology was found with xylanases from other *Bacteroides* species from the human intestine: *Bacteroides* sp. D1, *Bacteroides* sp. 2-2-4, *B. ovatus*, *B. cellulosilyticus*, *B. Intestinalis*, *B. eggerthii* and *B. vulgatus*, which showed 98, 84, 84, 62, 60, 61 and 60% identity with Xyn10A, respectively. The highest percentage of identity was found with the xylanase from *Bacteroides* sp. D1 (98%). The multiple alignments indicated that the similarity was especially high in regions that are known to be conserved among proteins belonging to GH10 xylanases (Baba et al, 1994; Kim et al. 2009). For instance, the sequences corresponding to ^{158}WDVVNEA^{164}, ^{203}YNDY^{206} and ^{267}TELD^{270} in Xyn10A were strictly conserved in the 25 GH10 xylanase sequences (not shown). The tree (Fig. 1) shows that the *Bacteroides* sequences are grouped into one cluster which is close to *Prevotella* sequences, with *Prevotella* also originating from the human gut. The other sequences, from soil or marine environments are more distantly related. The GH10 xylanases produced by the ruminal bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Butyrivibrio fibrisolvens* showed the lowest percentage of identity (26%).

Cloning and expression of XYN10A in *E. coli*

The gene *xyn10A* from *B. xylanisolvens* XB1A^T, was cloned and expressed in *E. coli* TOP10 using a pASK-IBA33 vector and the protein was produced as a C-terminal His_6-fusion protein. Protein extract from *E. coli* cultures, induced or not by AHT, were used for SDS-PAGE and Western-Blot analysis (Fig. 2). A protein band at approximately 42 kDa was only present in induced cultures of *E. coli* (Fig. 2A and B). In addition, this protein was recognized by the anti-His antibodies (Fig 2B). Its molecular mass was in agreement with the predicted molecular mass of the recombinant polypeptide Xyn10A. Zymogram analysis indicated that the recombinant Xyn10A produced in *E. coli* is an active xylanase (EC 3.2.1.8) (Fig. 2C).

Expression of *xyn10A* in *B. Xylanisolvens* XB1A^T

The expression of *xyn10A* in growing cells of *B. xylanisolvens* XB1A^T was first checked by analysing the *xyn10A* transcripts. Total RNA was extracted from bacteria cultivated with glucose, xylose and oat spelt xylans. RNA was randomly reverse-transcribed and the resulting cDNA was used for *xyn10A* specific PCR. The results showed that the *xyn10A* gene was expressed under the three culture conditions (Fig. 3A). In addition, cell-associated and extracellular fractions of the same cultures were analysed by zymogram to detect xylanolytic protein bands. Fig. 3B shows the presence of an endoxylanase band at 38kDa, assumed to be Xyn10A, which was cell-associated and produced on the three substrates. This band was not found in the extracellular fraction, whatever the substrate (not shown). Both *xyn10A* transcripts and xylanase activity on zymogram appeared more abundant in bacteria cultured with xylans compared to soluble sugars.

Substrate specificity and enzymatic properties of Xyn10A

Enzymatic activities of soluble proteins prepared from *E. coli* producing Xyn10A were measured by quantifying reducing sugars released after enzyme-substrate incubations. Specificity was evaluated on various substrates (Table 1). Specific activities on oat spelt xylan, birchwood xylan and arabinoxylan were evaluated at 13.9, 13.6 and 13.4 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$, respectively. Low but perceptible activity was quantified on CMC (11% of activity relative to xylans), and poor activity was measured on other glycan substrates, including crystalline cellulose. No activity was detected on aryl-substrates (Table 1).

TLC analysis showed that Xyn10A was active on xylotetraose, xylopentaose and xylohexaose as these sugars were entirely degraded in smaller units during the incubations with XYN10A (Figure 4). Xylotetraose was cleaved into xylobiose (lane 7), while xylopentaose and xylohexaose were cleaved into xylotriose and xylobiose (Lane 8 and 9). The enzyme did not

hydrolyse xylobiose, and no activity was found against cellobiose, cellotriose or cellopentaose (not shown). Incubation of enzyme extracts with wheat arabinoxylans and oat spelt xylans released xylooligosaccharides of various sizes (TLC analysis, not shown).

The optimal temperature and pH for Xyn10A activity were measured with oat spelt xylans as substrate and were found at 37°C and pH 6.0, respectively (Fig. 5). The enzyme retained more than 80% of its original activity over a wide temperature range from 32 to 42°C while 80% of its activity was lost above 48°C (Fig.5A). With pH ranging from 5.5 to 7.5, Xyn10A retained 80% of its optimal activity, but at pH 9.0 and below pH 5.0, it lost more than 50% of its activity (Fig. 5B). Variation of the activity with temperature and pH was also measured on Birchwood xylans and arabinoxylans, and same optima were obtained (not shown).

DISCUSSION

The majority of the xylanases characterized today are clustered into families 10 and 11 of the sequenced-based classification of glycoside hydrolases (Cantarel et al, 2009). The present paper reports for the first time the presence of a family10 glycoside hydrolase in the human gut xylanolytic bacterium *B. xylanisolvens* XB1A^T with the full characterization of the enzyme. Xyn10A is a non modular xylanase constituted by a GH10 catalytic domain and a signal peptide at its N-terminus. Xyn10A displayed similar specific activity against arabinoxylans, oat spelts or birchwood xylans, like other GH10 xylanases (Gallardo et al, 2003 ; Devillard et al, 2003). It was active on xylotetraose, xylopentaose and xylohexaose but did not hydrolyse xylobiose, clearly indicating that it is an endo-β1,4- xylanase. The hydrolysis of xylotetraose into xylobiose exclusively is similar to what was observed for other xylanases from GH10 such as Xyn10B from *Cellvibrio mixtus* (Pell et al, 2004). Xyn10A released xylooligosaccharides of various sizes from arabinoxylans and oat spelt xylans, including low molecular mass oligosaccharides, suggesting that, like the other xylanases from

GH10 and unlike GH11 xylanases, Xyn10A does not require a long stretch of unsubstituted xylose backbone for the cleavage of xylans (Biely et al 1997). The enzyme did not cleave PNP-β-D-xylopyranosyl and PNP-α-L-arabinofuranoside. However, a low activity was found against CMC, and other glycan polymers, including cellulose, while PNP-β-D-cellobiose, cellobiose, cellotriose and cellopentaose were not cleaved. This is surprising because many characterized GH10 enzymes were shown to be active against aryl-β-cellobiosides but not against CMC or cellulosic substrates (Collins et al 2005; Gallardo et al, 2003; Devillard et al, 2003 ; Ducros et al, 2000; Gilkes et al, 1991). Hydrolysis of CMC, although very low in comparison to that of xylans, appears thus to be a specific property of Xyn10A. The mechanisms by which GH family members discriminate between substrates is not yet fully understood (Ducros et al, 2000).

Xyn10A from *B. xylanisolvens* $XB1A^T$ presents strong homology with xylanases from other *Bacteroides* species and also from human gut *Prevotella*. In particular, Xyn10A sequence showed a high percentage of identity (98%) with a xylanase from the strain D1 of *Bacteroides sp*., a strain with unknown function from the human microbiota (Refseq : NZ_ACAB00000000). Xyn10A displays 84% of amino acid identity with XylI from *B. ovatus*, which represents the only other xylanase characterized today from a human gut bacterium (Weaver et al, 1992). Xyn10A appeared more distant from xylanases present in bacteria from other ecosystems, including the rumen. This suggests that, due to different nature and composition of substrates arriving in these ecosystems, bacteria have probably adapted their xylanase structure in order to degrade efficiently the polysaccharides available in their environment. Xyn10A showed an optimal xylanolytic activity at pH 6.0 and 37°C on xylans, close to the optimal growth conditions of the strain (pH 6.8 and 38°C, Chassard et al, 2008b) and to the physiological conditions of the human colon.

Xyn10A-encoding gene was shown to be expressed in *B. xylanisolvens* XB1A^T cultured with glucose, xylose or xylans. Both RT-PCR and zymogram results (Fig 3) suggest an over-expression of *xyn10A* in cells growing on xylans compared to soluble sugars, but this should be further confirmed by quantitative analysis. The expression of the xylanase operon in *B. ovatus* was shown to be upregulated by xylan and reduced by the addition of glucose (Hamady et al, 2008), suggesting that xylanase gene expression is regulated in human gut *Bacteroides.*

Xyn10A is the sole GH10 enzyme of about 40 kDa found in the translated draft genome of *B. xylanisolvens* XB1A^T (http://www.sanger.ac.uk/pathogens/metahit). The second major active protein band of appromimately 80 kDa observed in the zymogram might correspond to a multi-domain family 10 GH we also retrieved from the draft genome (not shown). The characterization of this second putative xylanase is under progress. ORFs encoding putative GH43 of molecular masses close to that of Xyn10A were also identified from the genome sequence, but GH43 are xylosidases that do not possess endoxylanase activity (Bourgois et al, 2007). Consequently, the genome-identified Xyn10A characterized in this study is most probably the cell-associated endoxylanase (~38kDa) detected on zymograms realized with proteins of *B. xylanisolvens* XB1A^T. Because Xyn10A bears a signal sequence, its location should be either periplasmic or at the cell surface. If located at the cell surface, Xyn10A should be particularly well-anchored since it was not detected in the extracellular medium of strain XB1A^T after growth with xylans. However, outer membrane anchoring-sequences usually found in Gram-negative bacteria were not found in the Xyn10A sequence using *in silico* analysis (http://www.expasy.org/tools/scanprosite/ ; http://bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/). Other GH10 xylanases composed of a sole GH10 catalytic domain have been shown to be periplasmic or cytoplasmic. Indeed, Xyn10B from *Cellvibrio mixtus* (Fontes et al, 2000) or Xyl10B from *Thermotoga maritima* (Liebl et al,

2008), were shown to bear a 20 to 30 residues signal peptide and were detected in the periplasm. XylI from *B. ovatus* also had a signal peptide and was shown to be a soluble enzyme, probably periplasmic (Weaver et al, 1992). Other GH10, such as XynB from *Paenibacillus* sp. BP-23 (Gallardo et al, 2003), Xyn2 from *Bacillus stearothermophilus* 21 (Baba et, 1994) or XynA from *Thermobacillus xylanilyticus* (Connerton et al, 1999) do not have any signal peptide and have been shown to be cytoplasmic. Such intracellular or periplasmic xylanases are thought to hydrolyse short xylooligosaccharides entering the cytoplasm or the periplasm and resulting from extracellular xylan hydrolysis by external xylanases. Such intake of xylooligosaccharides and their internal cellular utilization would allow a very efficient utilization of the polymer degradation products and would provide an energy source exclusively beneficial to the bacterium (Miyazaki et al., 1997; Fontes et al., 2000).

In conclusion, we characterized for the first time a GH10 xylanase from the human gut bacterium *B. xylanisolvens*. This enzyme is highly active against xylans and xylooligosaccharides, and presents the particularity to possess a CMCase activity. In addition its cell-associated localization, presumably periplasmic, certainly provides an ecological advantage to the bacterium in the gut microbial ecosystem. This study provides new insights on the fibrolytic function of a human gut bacterium, *B. xylanisolvens*. Further investigations are needed to better comprehend the role and importance of this species in the human gut microbiota.

Acknowledgments

The *B. xylanisolvens* XB1A^T genome data were provided by the Wellcome Trust Sanger Institute and can be obtained from http://www.sanger.ac.uk/pathogens/metahit.

References

Baba T, Shinke R & Nanmori T (1994) Identification and characterization of clustered genes for thermostable xylan-degrading enzymes, beta-xylosidase and xylanase, of *Bacillus stearothermophilus* 21. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2252-2258.

Béra-Maillet C, Ribot, Y & Forano E (2004) Fiber-degrading systems of different strains of the genus *Fibrobacter*. *Appl Environ Microbiol* **70:** 2172-2179.

Biely P, Vrsanská M, Tenkanen M & Kluepfel D (1997) Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J Biotechnol* **57:** 151-166.

Bourgois TM, Van Craeyveld V, Van Campenhout S, Courtin CM, Delcour JA, Robben J, Volckaert G. (2007). Recombinant expression and characterization of XynD from *Bacillus subtillis* subsp. subtilis ATCC 6051: a GH43 arabinoxylan arabinofuranohydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**:1309-1317.

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

Chassard C, Goumy V, Leclerc M, Del'homme C & Bernalier-Donadille A (2007) Characterization of the xylan-degrading microbial community from human faeces. *FEMS Microbiol Ecol* **61**: 121-131.

Chassard C, Scott KP, Marquet P, Martin JC, Del'homme C, Dapoigny M, Flint HJ & Bernalier-Donadille A (2008a) Assessment of metabolic diversity within the intestinal microbiota from healthy humans using combined molecular and cultural approaches. *FEMS Microbiol Ecol* **66**: 496-504.

Chassard C, Delmas E, Lawson PA & Bernalier-Donadille A (2008b) *Bacteroides xylanisolvens* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* **58:** 1008-1013.

Collins T, Gerday C, Feller G (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 3-23.

Connerton I, Cummings N, Harris GW, Debeire P & Breton C (1999) A single domain thermophilic xylanase can bind insoluble xylan: evidence for surface aromatic clusters. *Biochim Biophys Acta* **1433**: 110-121.

Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J.-F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J.-M., Gascuel O. (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist *Nucleic Acids Research*. **36**:W465-469.

Devillard E., Bera-Maillet C, Flint H.J, Scott K.P., Newbold C.J., Wallace R.J., Jouany J-P, Forano E. 2003. Characterisation of XYN10B, a modular xylanase from the ruminal protozoan *Polyplastron multivesiculatum*, with a family 22 carbohydrate-binding module that binds to cellulose. *Biochem. J.* **373**: 495-503.

Ducros V, Charnock SJ, Derewenda U, Derewenda ZS, Dauter Z, Dupont C, Shareck F, Morosoli R, Kluepfel D & Davies G (2000) Substrate specificity in glycoside hydrolase family 10. Structural and kinetic analysis of the *Streptomyces lividans* xylanase 10A. *J Biol Chem* **275**:23020-23026.

Esbelin J, Martin C, Forano E, Mosoni P. 2009. Differential translocation of green fluorescent protein fused to signal sequences of *Ruminococcus albus* cellulases by the Tat and Sec pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* **294**: 239-244.

Fontes CMG, Gilbert HJ, Hazlewood GP, Clarke JH, Prates JAM, McKie VA, Nagy T, Fernandes TH & Ferreira LMA (2000) A novel *Cellvibrio mixtus* family 10 xylanase that is both intracellular and expressed under non-inducing conditions. *Microbiology* **146**: 1959-1967.

Gallardo O, Diaz P & Pastor FI (2003) Characterization of a *Paenibacillus* cell-associated xylanase with high activity on aryl-xylosides: a new subclass of family 10 xylanases. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 226-233.

Gascuel O. (1997) BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol*. **14**:685-695.

Hamady ZZ, Farrar MD, Whitehead TR, Holland KT, Lodge JP, Carding SR (2008) Identification and use of the putative *Bacteroides ovatus* xylanase promoter for the inducible production of recombinant human proteins. *Microbiology*. **154**:3165-3174

Hespell RB & Whitehead TR (1990) Physiology and genetics of xylan degradation by gastrointestinal tract bacteria. *J Dairy Sci* **73**, 3013-3022.

Kim DY, Han MK, Park DS, Lee JS, Oh HW, Shin DH, Jeong TS, Kim SU, Bae KS, Son KH, Park HY. 2009. Identification and characterization of a novel GH10 xylanase with a fibronectin type 3 domain from a gut bacterium of *Eisenia fetida*, *Cellulosimicrobium* sp. HY-13. Appl Environ Microbiol, in press.

Liebl W, Winterhalter C, Baumeister W, Armbrecht M & Valdez M (2008) Xylanase attachment to the cell wall of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J Bacteriol* **190**: 1350-1358.

Miyazaki K, Martin JC, Marinsek-Logar R & Flint HJ (1997) Degradation and utilisation of xylans by the rumen anaerobe *Prevotella bryantii* (formerly *P. ruminicola* subsp. *brevis*). *Anaerobe* **3:** 373-381.

Nouaille R, Matulova M, Delort AM, Forano E (2004). Production of maltodextrin 1-phosphate by *Fibrobacter succinogenes* S85. *FEBS Lett*. **576**:226-30.

Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol.* **302**:205-217.

Pell G, Taylor EJ, Gloster TM, Turkenburg JP, Fontes CMG, Ferreira LMA, Nagy T, Clark SJ, Davies GJ & Gilbert HJ (2004) The mechanism by which family 10 glycoside hydrolase bind decorated substrates. *J Biol Chem* **279**: 9597-9605.

Polizeli ML, Rizzatti AC, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. **67**:577-91.

Rakotoarivonina H, Terrie C, Chambon C, Forano E, Mosoni P. 2009. Proteomic identification of CBM37-containing cellulases produced by the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus albus* 20 and their putative involvement in bacterial adhesion to cellulose. *Archiv Microbiol.* **191**: 379-388.

Salyers AA, Vercellotti JR, West SHE & Wilkins TD (1977a) Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from human colon. *Appl Environ Microbiol* **33**: 319-322.

Salyers AA, West SHE, Vercellotti JR, & Wilkins TD (1977b) Fermentation of mucin and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from human colon. *Appl Environ Microbiol* **34**: 529-533.

Wedekind KJ, Mansfield HR, Montgomery L (1988) Enumeration and isolation of cellulolytic and hemicellulolytic bacteria from human feces. *Appl Environ Microbiol.* **54**:1530-1535.

Whitehead TR (1995) Nucleotide sequences of xylan-inducible xylanase and xylosidase/arabinosidase genes from *Bacteroides ovatus* V975. *Biochim. Biophys. Acta.* **1244:** 239-241.

Figure legends

Fig. 1: **Phylogenetic tree showing the relationship between XYN10A from *B. xylanisolvens* XB1A^T and other GH10 xylanases.**

Phylogenetic relationships (BIONJ) are based on T-coffee alignments of GH10 xylanase catalytic domains. Protein sequences are named by the bacterial species, gene names and/or GenPept accession numbers. Scale bar indicates amino acid substitutions per position.

Fig. 2: Expression of *xyn10A* from *B. xylanisolvens* XB1A^T in *E. coli*

SDS-PAGE (A), Western-blot (B) and zymogram (C) analysis of total bacterial proteins (A) or soluble protein extracts (B, C) from *E. coli* producing Xyn10A after induction with AHT (Lane 1) or without induction (Lane 2).

SDS-PAGE was performed under denaturing conditions using 10% acrylamide gel. The positions of molecular mass markers are indicated.

Fig. 3: Expression of *xyn10A* in *B. xylanisolvens* XB1A^T

A: RT-PCR products obtained from *B. xylanisolvens* XB1A^T following growth with xylose (Lane 1), glucose (Lane 2) or xylan (Lane 3) using primer pairs specific to *xyn10A*. Molecular size DNA markers (MM, Smart Ladder, Eurogentec, Angers, France) and negative control (NC) performed with RNA not reverse transcribed as template are also shown. Arrow indicates *xyn10A* cDNA.

B: Xylanase zymogram analysis of bacterial proteins from *B. xylanisolvens* XB1A^T following growth with xylose (Lane 1), glucose (Lane 2) or xylan (Lane 3). Protein migration was performed on 8% acrylamide gel. The positions of molecular mass markers are indicated (Precision Plus, Bio-Rad) . Arrow indicates putative Xyn10A.

Fig. 4: TLC analysis of xylooligosaccharide degradation by XYN10A

Thin layer chromatography of sugars produced during the incubation of soluble proteins of *E.coli* containing XYN10A with xylotetraose (lane 7), xylopentaose (lane 8) and xylohexaose (lane 9) during 2h at 37°C. Xylooligosaccharides (X1 to X6) were used as standards.

Fig. 5: Enzymatic properties of recombinant Xyn10A

A: Temperature effect on xylanase activity of Xyn10A in 50mM Na_2PO_4 buffer at pH 7.0.

B: pH effect on xylanase activity of Xyn10A in Na_2PO_4/citric acid buffer at various pHs and at 37°C.

Enzyme extracts were incubated with oat spelt xylans (0.5%). Enzyme activity was mesured as µg of reducing sugars released in 30 min per µg of soluble proteins. Relative activity is expressed as a percentage of maximum activity ± S.D.

Table 1. Substrate specificity of recombinant Xyn10A.

Substrate	Specific activity µmol. min^{-1}. mg^{-1}	Activity relative to oat spelt xylan (%)
Oat spelt xylan	13.9 ± 0.5	100
Birchwood xylan	13.6 ± 0.6	98
Wheat arabinoxylan	13.4 ± 0.2	96
Carboxymethylcellulose	1.6 ± 0.1	11
Barley β-glucan	0.4 ± 0.1	3
Lichenan	0.2 ± 0.1	1
Laminarin	0.2 ± 0.1	1
Avicel cellulose	0.2 ± 0.1	1
PNP α-L-arabinofuranoside	ND	-
PNP β-D-xylopyranoside	ND	-
PNP β-D-cellobioside	ND	-

Specific activities are given as µmoles of xylose or glucose equivalent produced per minute and per mg of protein, after enzyme incubations with xylan or glycan substrates, respectively. ND: not detected.

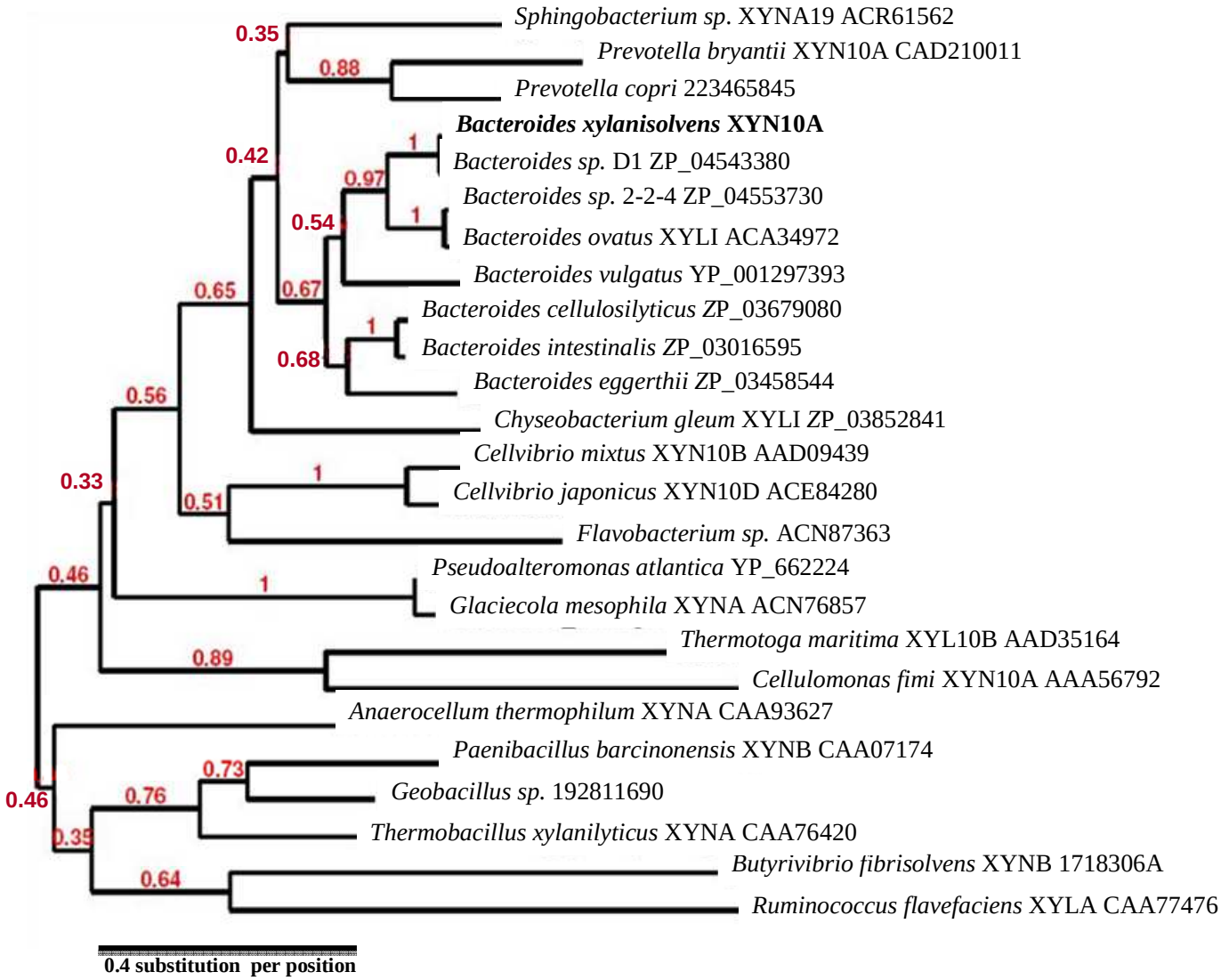

Sphingobacterium sp. XYNA19 ACR61562
Prevotella bryantii XYN10A CAD210011
Prevotella copri 223465845
Bacteroides xylanisolvens XYN10A
Bacteroides sp. D1 ZP_04543380
Bacteroides sp. 2-2-4 ZP_04553730
Bacteroides ovatus XYLI ACA34972
Bacteroides vulgatus YP_001297393
Bacteroides cellulosilyticus ZP_03679080
Bacteroides intestinalis ZP_03016595
Bacteroides eggerthii ZP_03458544
Chyseobacterium gleum XYLI ZP_03852841
Cellvibrio mixtus XYN10B AAD09439
Cellvibrio japonicus XYN10D ACE84280
Flavobacterium sp. ACN87363
Pseudoalteromonas atlantica YP_662224
Glaciecola mesophila XYNA ACN76857
Thermotoga maritima XYL10B AAD35164
Cellulomonas fimi XYN10A AAA56792
Anaerocellum thermophilum XYNA CAA93627
Paenibacillus barcinonensis XYNB CAA07174
Geobacillus sp. 192811690
Thermobacillus xylanilyticus XYNA CAA76420
Butyrivibrio fibrisolvens XYNB 1718306A
Ruminococcus flavefaciens XYLA CAA77476
0.35
0.88
0.42
1
0.97
1
0.54
0.65
0.67
1
0.68
0.56
0.33
1
0.51
0.46
1
0.89
0.46
0.73
0.76
0.39
0.64
0.4 substitution per position

Figure 1.

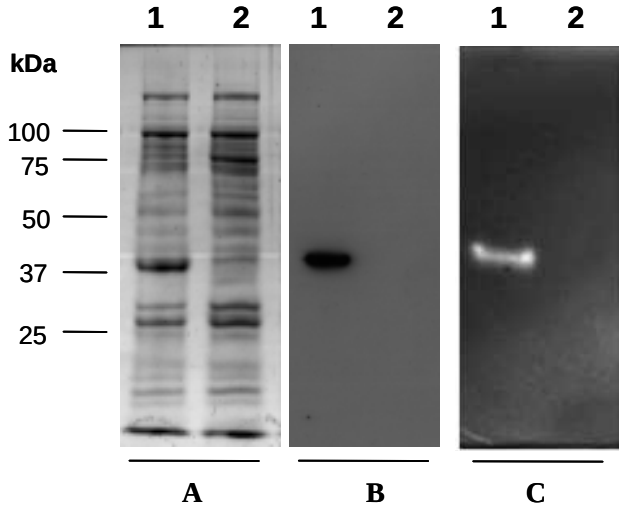


Figure 2.

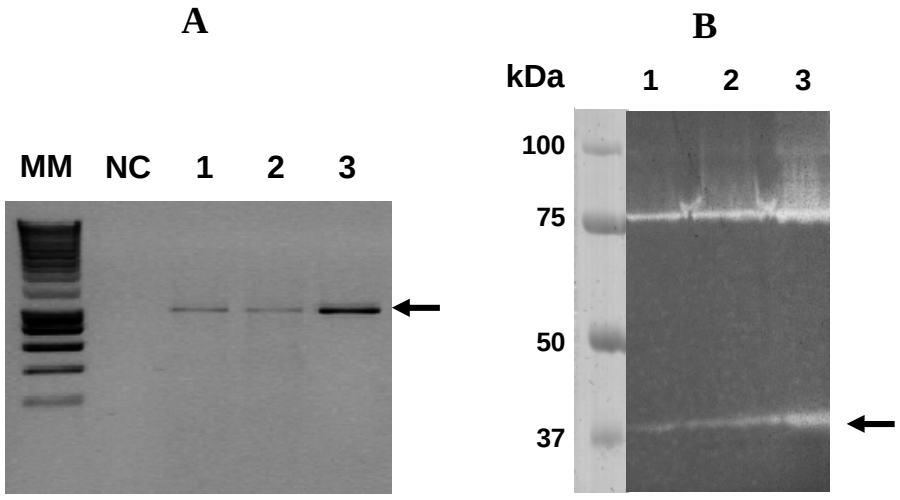


Figure 3.

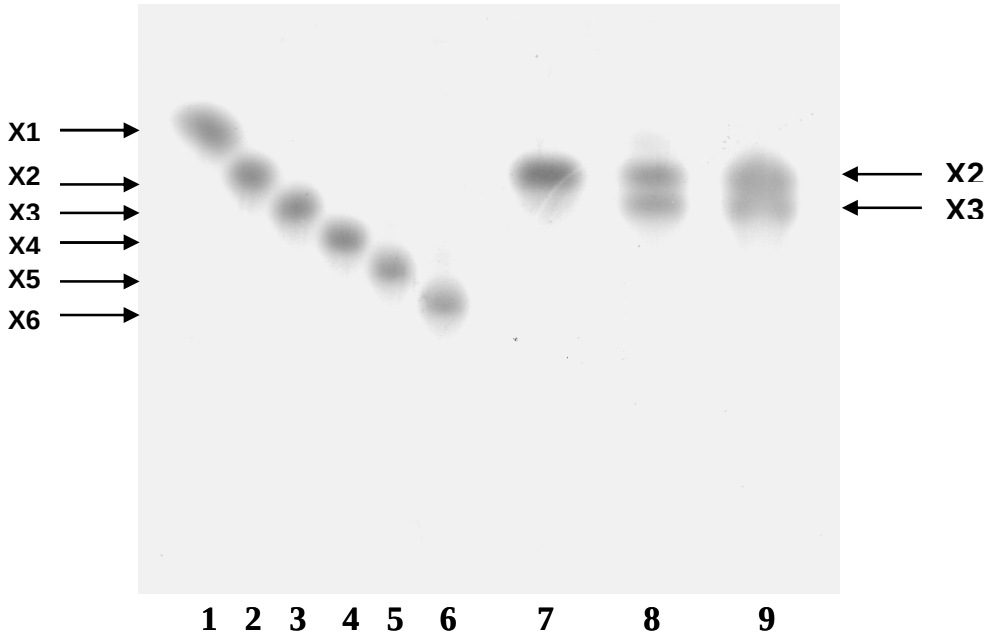


Figure 4.

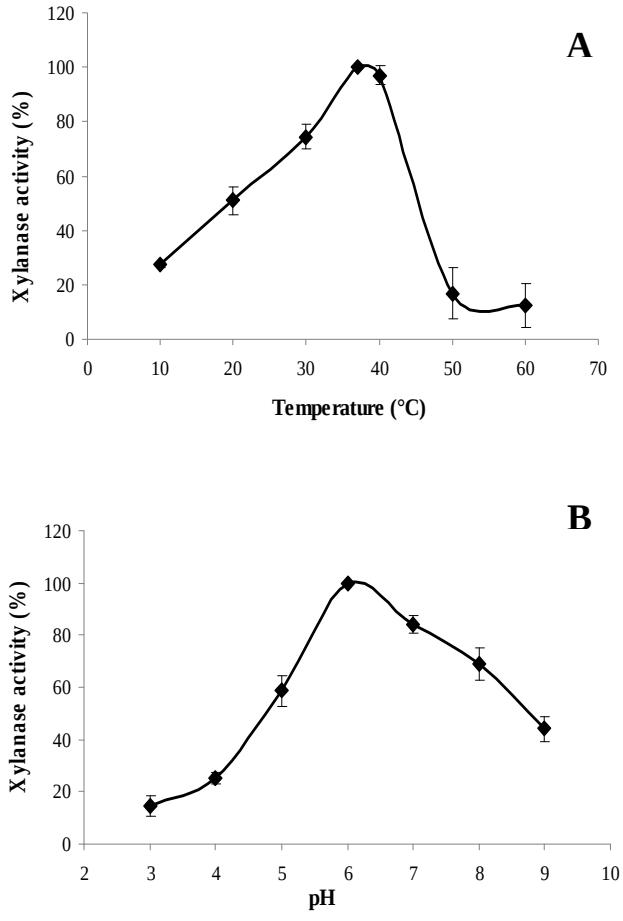


Figure 5.

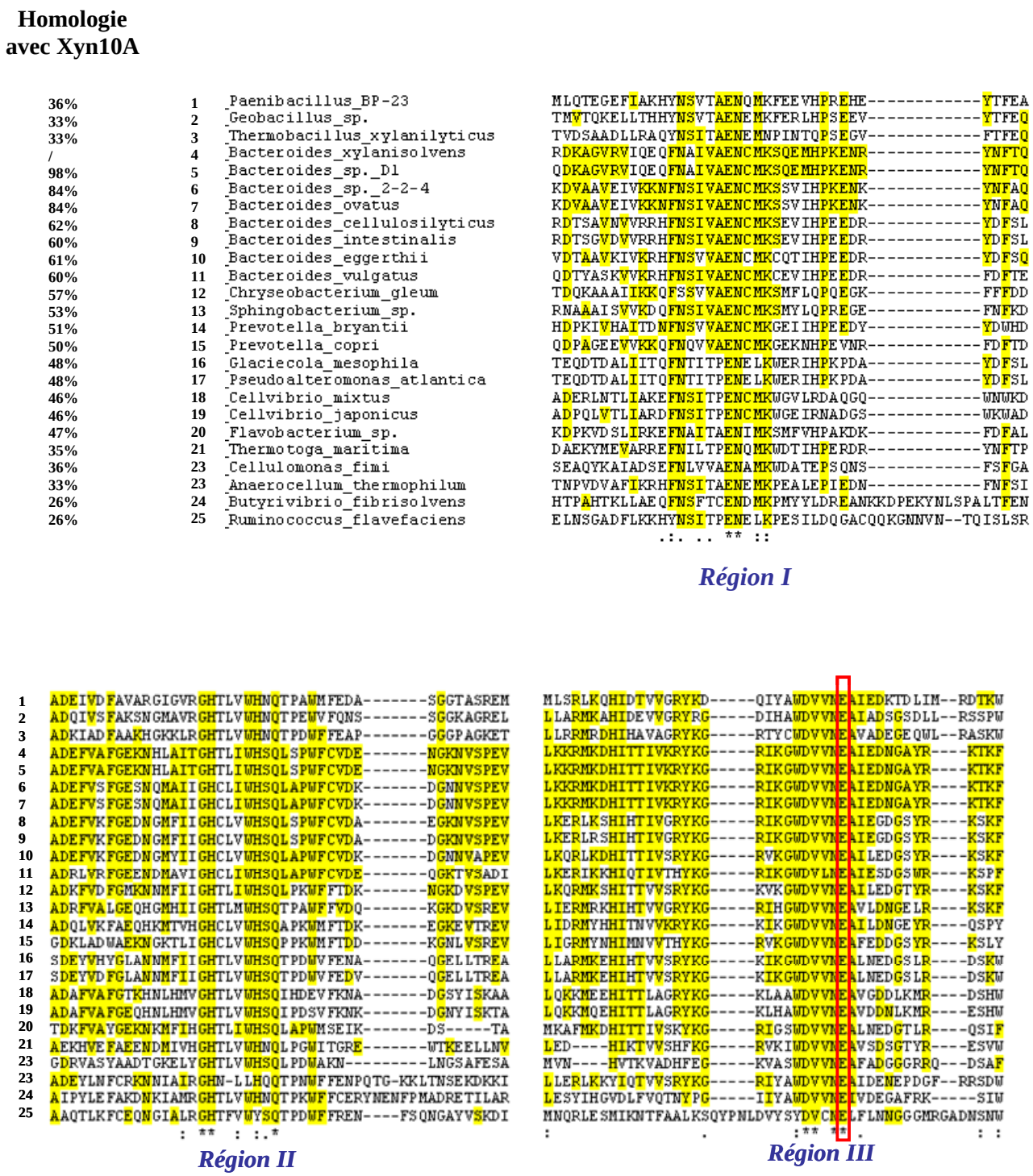
3. RESULTATS ADDITIONNELS

Homologie de séquence entre Xyn10A et d'autres xylanases de la famille 10

Une analyse phylogénétique a permis de positioner la xylanase Xyn10A de *B. xylanisolvens* XB1A^T par rapport à d'autres xylanases de la famille GH10 disponibles dans les bases de données. Un arbre phylogénétique obtenu à partir de l'alignement de séquences des domaines catalytiques de 25 GH10, a été présenté dans l'article 2. Les domaines catalytiques GH10 de plusieurs xylanases ont été analysés par alignement avec ClustalW.

L'alignement montre que les régions I, II, III, IV, V et VI, qui sont les régions conservées au sein des xylanases GH10, sont plus ou moins semblables selon le genre bactérien considéré (Baba, *et al.*, 1994). Les xylanases GH10 des *Bacteroides* sp. présentent de grandes homologies de séquence entre-elles, notamment dans les régions conservées III, IV, V et VI (**Figure 35**). On retrouve plusieurs motifs identiques sur les séquences de *Bacteroides* sp. qui semblent donc caractéristiques des xylanases de ce genre bactérien. Par exemple, le motif YEIGEEYIPLAFQYAHEAPDAE… dans la région IV, est un long motif de plus de 30pb très conservé dans les xylanases de *Bacteroides* sp. Quatre xylanases montrent des homologies importantes : les xylanases de *B. xylanisolvens, Bacteroides sp*. D1, *Bacteroides sp*. 2_2_4 et *B. ovatus*.

Figure 35. ***Homologies de séquence entre différentes xylanases de la famille 10 des glycoside-hydrolases. Alignement effectué avec ClustalW, les probables acides aminés catalytiques (glutamate ou E) sont encadrés en rouge :***



4. CONCLUSION ET DISCUSSION

La première partie de mon travail de thèse, a permis de mettre en évidence un système enzymatique diversifié chez *B. xylanisolvens* XB1A^T. L'analyse du génôme de la bactérie (Résultats-Chapitre 2) n'a permis de recenser que deux xylanases de la famille 10 des glycoside-hydrolases, contrairement à un nombre plus important de GH43. Il est probable que chaque hémicellulase produite par *B. xylanisolvens* XB1A^T ait un rôle particulier dans la dégradation du xylane, les GH10 dégradant plutôt les chaînes principales de xylose et les GH43 les chaînes latérales ramifiées. *B. xylanisolvens* XB1A^T présente une forte activité xylanolytique, ce qui nous a conduit à nous intéresser plus particulièrement aux deux xylanases GH10 produites par la bactérie. Nous avons choisi d'étudier plus précisément Xyn10A de *B. xylanisolvens* XB1A^T composée d'un seul domaine catalytique GH10.

Comme décrit précédemment dans l'étude bibliographique, la majorité des glycoside-hydrolases sont organisées en domaines. Au contraire, Xyn10A composée d'un seul domaine,

est une xylanase originale qui semble jouer un rôle particulier dans la dégradation du xylane par *B. xylanisolvens* XB1A^T, puisque sa localisation est très probablement intracellulaire.

Peu de xylanases produites par les bactéries du côlon ont été caractérisées à l'heure actuelle. *B. ovatus* est la seule bactérie intestinale humaine dont les gènes codant pour des xylanases ont été analysés et caractérisés (Whitehead and Hespell, 1990 ; Weaver, *et al.*, 1992 ; Whitehead, *et al*., 1995). Le gène codant pour une xylanase à simple domaine GH10 de *B. ovatus* a été identifié et les enzymes correspondantes caractérisées (Whitehead, *et al*., 1990). Ce gène appartient à un opéron qui comprend également un gène codant une xylosidase-arabinosidase bifonctionnelle, ainsi qu'un gène d'estérase et un gène susceptible de coder un transporteur membranaire sodium-sucre (Hamady, *et al*., 2008). Le gène x*yn10A* de *B. xylanisolvens* XB1A^T ne semble pas appartenir à un regroupement de gènes, nous l'avons identifié comme isolé dans le génome dans la partie « Résultats-Chapitre 2 » de ce mémoire. Une autre étude récente à permis d'identifier de nouveaux gènes de xylanases à partir d'ADN métagénomique de bactéries fécales humaines (Hayashi, *et al*., 2005). Cinq xylanases de la famille GH10 ont été recensées. Une analyse bioinformatique a montré la présence d'une xylanase à simple domaine (Xyn10A) qui de par son homologie de séquence, a été classée dans le groupe des xylanases de *Bacteroidetes* (Hayashi, *et al*., 2005). L'ensemble de ces résultats montre donc la présence de xylanases GH10 composées d'un seul domaine catalytique dans différents souches du genre *Bacteroides*. Notre travail de caractérisation des propriétés de Xyn10A représente une des rares études qui permettent aujourd'hui de mieux comprendre le fonctionnement et le rôle de ces xylanases GH10 à simple domaine produites par les bactéries du côlon.

Il a souvent été montré que les xylanases de divers écosystèmes digestifs sont majoritairement associées aux cellules bactériennes plutôt qu'extracellulaires (Salyers, *et al*., 1982 ; Selinger, *et al.*, 1996 ; Miyazaki, *et al*., 1997 ; Fontes, *et al*., 2000). C'est aussi le cas pour *B. xylanisolvens* XB1A^T, dont plus de 80% de l'activité xylanolytique est associée aux bactéries (cf **Article 1**). Nous avons montré que Xyn10A, produite par *B. xylanisolvens* XB1A^T, est une enzyme exclusivement associée aux cellules bactériennes. Sa localisation est supposée périplasmique, ce qui lui confère ainsi une caractéristique originale jamais étudiée chez les xylanases des bactéries du côlon humain. La localisation périplasmique de Xyn10A devra cependant être confirmée, par exemple en produisant des anticorps polyclonaux dirigés contre Xyn10A. La production d'anticorps nécessitera dans un premier temps la purification

de Xyn10A, facilitée par le motif 6His que nous avons introduit dans la protéine recombinante produite chez *E. coli.* Ces anticorps pourraient alors être utilisés pour localiser l'enzyme à l'aide de la microscopie électronique, comme cela a été fait pour d'autres xylanases (Liebl, *et al*., 2008). Un fractionnement cellulaire de *B. xylanisolvens*, suivi d'une analyse en zymogramme des différentes fractions, permettrait également de confirmer la localisation de Xyn10A. Cependant, une méthode de fractionnement cellulaire devrait d'abord être mise au point chez *B. xylanisolvens*. Une localisation périplasmique de Xyn10A permettrait à *B. xylanisolvens* XB1A^T de séquestrer les produits d'hydrolyse des polysaccharides, limitant ainsi les apports d'énergie aux autres bactéries environnantes. Cette stratégie est très efficace pour la bactérie et lui permet d'être plus compétitive face aux autres espèces bactériennes présentes dans le côlon. De telles enzymes périplasmiques ont été mises en évidence chez *Paenibacillus sp.* (Gallardo, *et al*., 2003), *Cellvibrio mixtus* (Fontes, *et al*., 2000) ou *Thermotoga maritima* (Liebl, *et al*., 2008).

Les conditions optimales d'activité ont été déterminées pour Xyn10A. Elles ont été évaluées à 37°C et pH 6.0, sachant que l'activité de Xyn10A reste stable entre les pH 5.5 et 7.5. Ces paramètres optimaux sont en accord avec les paramètres mesurés pour d'autres enzymes du côlon humain comme par exemple la xylanase Xyn10A, produite à partir d'un gène isolé d'ADN total extrait de flore fécale (Hayashi, *et al*., 2005).

Les spécificités de substrat mesurées chez Xyn10A de *B. xylanisolvens* XB1A^T ont montré que l'enzyme est essentiellement active sur substrats xylanosiques et sur xylooligosaccharides, mais présente aussi une légère activité sur CMC, bien que non active sur PNP-cellobioside ou cellodextrines, ce qui est très original pour des enzymes de la famille GH10. La détermination de la structure tridimensionnelle de Xyn10A serait nécessaire pour comprendre comment la structure du site actif explique cette spécificité.

Il faut noter par ailleurs que les activités mesurées pour Xyn10A sont élevées (13µmol/min.mg prot). Ces valeurs sont proches de celles quantifiées, par exemple, pour XynA (non purifiée), une xylanase de *Neocallimastix patriciarum* (16µmol/min.mg prot), champignon du rumen très efficace dans la dégradation des hémicelluloses (Gilbert, *et al.*, 1992). La caractérisation des propriétés enzymatiques de Xyn10A pourrait être poursuivie par la détermination de ses constantes cinétiques. Cela nécessiterait au préalable, la purification de l'enzyme.

Outre les expérimentations complémentaires concernant la caractérisation de Xyn10A proposées ci-dessus, **différentes perspectives peuvent être envisagées** pour poursuivre ce travail :

Etant donné l'importante activité spécifique xylanase mesurée pour Xyn10A de *B. xylanisolvens* XB1A^T, il serait intéressant d'évaluer les applications biotechnologiques possibles pour cette enzyme. En effet, des xylanases microbiennes, d'origine fongique ou bactérienne, sont utilisées pour différentes applications industrielles (Beg, *et al.*, 2001). Des xylanases produites par des champignons comme *Trichoderma reesei* (Tenkanen, *et al.*, 1992) ou *Thermomyces lanuginosus* (Bajpai, 1999) sont utilisées dans l'industrie papetière. D'autres, produites par des bactéries, comme *Bacillus subtilis* ou *Clostridium papyrosolvens* (Khandeparker and Numan, 2008), ont été proposées pour des applications biotechnologiques. L'utilisation la plus courante des xylanases concerne les processus de blanchiment de la pâte à papier, comme agent biochimique de remplacement du chlore (Bajpai, 1999). Les xylanases sont aussi utilisées en nutrition animale, pour améliorer la digestibilité de certains aliments à teneur élevée en fibres et à grande valeur nutritionnelle (Gilbert et Hazlewood, 1993). L'efficacité des xylanases a aussi été prouvée dans la fabrication de produits de boulangerie pour son action sur les propriétés de la pâte et la qualité des pains (Romanowska, *et al*., 1992). Enfin, l'hydrolyse totale de la paille de blé par des complexes enzymatiques contenant des xylanases est utilisée pour la synthèse de biocarburants (Damaso, *et al*., 2004).

Cependant, pour certaines de ces applications, la résistance à haute température ou à des pH acides est nécessaire, et les propriétés de Xyn10A concernant l'influence du pH et de la température sur l'activité, restreignent de façon importante les applications possibles pour cette enzyme. Certaines enzymes possèdent des domaines de thermostabilité, leur permettant de maintenir une activité élevée dans des conditions plus extrêmes. C'est le cas par exemple de la xylanase Xyn2 de *Trichoderma reesei* (Jun, *et al*, 2009), qui possède un domaine thermostable qui augmente d'une part la thermostabilité de l'enzyme mais aussi son attachement au substrat.

Par ailleurs, une seconde xylanase de la famille 10, Xyn10B, a été identifiée chez *B. xylanisolvens* XB1A^T, et il serait intéressant de cloner le gène codant pour cette enzyme chez *E. coli* afin de caractériser les propriétés de la xylanase produite. En effet, Xyn10B possède une structure originale, avec un domaine catalytique et deux domaines de liaison au substrat

CBM9. Par ailleurs, le gène codant pour Xyn10B est retrouvé sur le génôme de *B. xylanisolvens* XB1A^T, dans un gros regroupement de gènes comportant également plusieurs GH43. Nous avons de plus mesuré une sur-expression du gène *xyn10B* d'un facteur 400 lorsque *B. xylanisolvens* était cultivée sur xylane par rapport à des cultures sur sucres simples. L'ensemble de ces observations nous conduit à proposer, comme perspective de travail, la caractérisation enzymatique de Xyn10B, l'étude de ces capacités de liaison au xylane, ainsi que l'étude de la régulation de l'expression des gènes du cluster dans lequel elle se trouve.

Enfin, de nombreuses enzymes de la famille GH43 dont les gènes ont été identifiés à partir du génome de *B. xylanisolvens* XB1A^T, pourraient également être caractérisées sur le plan enzymatique (paramètres optimaux d'activité, spécificité de substrat…), afin de mieux comprendre la grande diversité de gènes de GH43 retrouvée chez cette bactérie.

La caractérisation de l'ensemble des xylanases et xylosidases de *B. xylanisolvens* XB1A^T permettrait une avancée significative vers une meilleure compréhension de la structure et du fonctionnement du système xylanolytique de cette bactérie. Elle représenterait également un pas important dans l'analyse de la fonction fibrolytique d'un genre bactérien majeur du côlon humain.

Discussion générale et perspectives

Discussion générale et perspectives

Rôle de *B. xylanisolvens* XB1A^T, *Bacteroides sp.* XB12B et *R. intestinalis* XB6B4 au sein du microbiote intestinal humain

Ce manuscrit rapporte la première caractérisation des systèmes xylanolytiques de *B. xylanisolvens* XB1A^T, *Bacteroides sp.* XB12B et *R. intestinalis* XB6B4. Nos résultats montrent que ces espèces possèdent un équipement enzymatique différent, mais composé de protéines dont les activités sont suffisamment complémentaires pour permettre à ces bactéries de dégrader efficacement le composant majoritaire des fibres pariétales consommées par l'Homme, et donc de jouer un rôle important dans la dégradation des xylanes au niveau du côlon humain. Ces espèces bactériennes appartiennent à deux phyla majeurs du microbiote intestinal humain : les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*, puisque respectivement 80% et 17% des séquences ADNr16S identifiées de microbiotes fécaux appartiennent à ces deux phyla (Tap, *et al*., 2009). Au sein de ces phyla, *Bacteroides* et *Roseburia* représentent deux genres dominants, avec une prévalence importante chez les individus. Des études moléculaires récentes ont montré par ailleurs une grande variabilité inter-individuelle dans les espèces du genre *Bacteroides* présentes dans les microbiotes (Tap, *et al.*, 2009) ou les métagénomes fécaux (Kurokawa, *et al.*, 2007). Il est nécessaire de bien connaître l'activité métabolique des espèces dominantes et fortement prévalentes dans le côlon humain, si l'on souhaite parvenir à identifier dans un avenir proche des marqueurs bactériens de « bonne santé » ou de « risque pathologique ». La plupart des espèces de *Bacteroides* caractérisées est soit amylolytique, soit xylanolytique (Salyers, 1984 ; Hespell et Whitehead, 1990 ; Chassard, *et al*., 2007). Les espèces du genre *Roseburia* ont surtout été étudiées pour leurs propriétés amylolytiques (Ramsay, *et al*. 2006), et notre étude représente la première description du système xylanolytique d'une souche de *Roseburia intestinalis*. Les activités amylolytiques et xylanolytiques sont souvent retrouvées au sein d'une même bactérie, comme c'est le cas chez *Bacteroides sp.* XB12B et *R. intestinalis* XB6B4. Par contre, *B. xylanisolvens* XB1A^T n'est pas capable de dégrader l'amidon, et semble donc plus spécialisée dans l'hydrolyse des xylanes. Amidon et xylanes sont les composés majeurs des fibres alimentaires consommées par l'Homme, et arrivent donc en quantité importante dans le côlon. Les bactéries qui présentent une double fonction hydrolytique pour dégrader, par exemple, ces deux types de polysaccharides possèdent probablement un avantage compétitif dans l'écosystème.

Une première approche de ce travail de thèse nous a permis de décrire, de façon globale, les systèmes enzymatiques de *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4. Nous avons ainsi pu constater que ces bactéries ont développé des systèmes xylanolytiques diversifiés. En effet, plusieurs enzymes, xylanases et xylosidases, appartenant à différentes familles de GH (GH10 et 43 essentiellement) et ayant des structures variées et originales sont produites par ces deux espèces bactériennes. Les deux bactéries semblent, de plus, coloniser les parois végétales différemment. En effet, *B. xylanisolvens* XB1A^T se lie aux parois végétales de façon moins étroite que *R. intestinalis* XB6B4 qui forme un biofilm sur les surfaces végétales. Ainsi, ces espèces bactériennes pourraient avoir développé deux stratégies opposées : *R. intestinalis* XB6B4 est très fortement liée aux parois végétales qu'elle dégrade, et produit de nombreuses enzymes; *B. xylanisolvens* XB1A^T privilégie plutôt la dégradation des sucres ou des polymères solubles, produit des systèmes « Sus-like » qui lui permettent de fixer ces polysaccharides solubles à la surface membranaire, et a développé une machinerie enzymatique et de transport efficace dans la séquestration des sucres. Ces deux bactéries ne sont donc pas en compétition, et colonisent une niche écologique différente. Il est probable que la durée importante du temps de transit du bol alimentaire dans le côlon (Cummings & Mac Farlane 1991), permette aux premières bactéries colonisatrices des substrats insolubles (comme *Roseburia*) de développer une association étroite avec le substrat, et de constituer un biofilm avant de dégrader ces polymères. Les nombreuses autres bactéries, qui sont associées de façon moins intime aux parois végétales (comme *Bacteroides*), bénéficieraient alors des interactions de « cross-feeding », par la consommation des sucres solubles et des fragments de parois libérés lors de l'hydrolyse partielle par les bactéries fortement colonisatrices (Belenguer, *et al*., 2006 ; Flint, *et al*., 2007). Les perspectives évoquées au chapitre 1 de la partie « Resultats » de ce manuscrit permettront de confirmer ces hypothèses. En effet, l'étude de l'interaction de ces espèces, entre elles et avec les autres membres du microbiote intestinal, permettra de mieux comprendre leur rôle respectif dans la colonisation des végétaux. De plus, les études d'adhésion à différents substrats, ainsi que l'analyse des systèmes d'adhésion mis en place par *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4 permettront, d'une part, d'expliquer le mode de colonisation des deux bactéries, et d'autre part, de mieux identifier la niche écologique qu'elles occupent dans l'écosystème côlon.

Il est aujourd'hui proposé que le microbiote intestinal humain joue un rôle important dans la santé humaine. En effet, des dysbioses (déséquilibres entre espèces bactériennes) dans cet écosystème ont été corrélées à des pathologies comme certaines inflammations de

l'intestin ou l'obésité (Swidsinski, *et al*., 2005 ; Ley, *et al*., 2006). L'équipe de Gordon a en effet montré que la proportion de *Bacteroidetes* est diminuée chez les personnes souffrant d'obésité par rapport aux personnes minces, alors que la proportion de *Firmicutes* est augmentée chez les personnes obèses, le régime alimentaire n'influant pas sur cette répartition (Ley, *et al*., 2006 ; Turnbaugh, *et al*., 2006 et 2009). L'explication mécanistique serait que le microbiote, chez les sujets obèses, serait plus efficace dans l'utilisation de l'énergie de la ration alimentaire, et en particulier dans l'utilisation des sucres et des polysaccharides. Ces résultats sont cependant controversés, puisqu'une autre équipe ne montre pas de différence dans les proportions de *Bacteroidetes* des individus sains et obèses (Duncan, *et al.,* 2008), et observe que la réduction du nombre de *Firmicutes* producteurs de butyrate détectée dans les fèces d'individus obèses ayant perdu du poids, est significativement dépendante du régime alimentaire. Ces travaux, bien que faisant appel à des méthodologies différentes (FISH versus ARNr16S), sont contradictoires et démontrent l'intérêt de connaître le rôle des espèces bactériennes composant ces deux phyla majeurs, en particulier dans la dégradation des polysaccharides et le métabolisme des sucres. Notre travail constitue une première contribution à la compréhension du rôle de deux espèces, *B. xylanisolvens*, et *R. intestinalis* dans la dégradation des hémicelluloses.

Les systèmes fibrolytiques de *B. xylanisolvens* XB1A^T, *Bacteroides sp.* XB12B et *R. intestinalis* XB6B4

Les deuxième et troisième parties du travail présenté dans ce manuscrit s'intéressent aux systèmes xylanolytiques mis en place par *B. xylanisolvens* XB1A^T, *Bacteroides* sp. XB12B et *R. intestinalis* XB6B4 pour dégrader les fibres pariétales. L'analyse en zymogramme et la recherche des gènes codant les xylanases dans les génomes montrent que les systèmes enzymatiques produits par les trois bactéries étudiées sont différents.

En effet, les xylanases produites diffèrent d'abord par leur nombre : nous avons identifié, selon les souches bactériennes, de 1 à 3 gènes codant pour des xylanases de la famille GH10, et un nombre important de gènes de xylosidases de la famille GH43. Les GH10 diffèrent dans leur structure modulaire: seules deux protéines, Xyn10B de *B. xylanisolvens* XB1A^T et Xyn10B de *Bacteroides* sp. XB12B, présentent la même structure modulaire originale, alors que leurs séquences protéiques ne sont identiques qu'à 68%. La majorité des xylosidases GH43 ne possède qu'un seul module. Enfin, plusieurs enzymes identifiées chez

les trois espèces bactériennes étudiées possèdent des structures modulaires originales, qui n'ont encore jamais été décrites chez les bactéries du microbiote intestinal humain. En effet, certaines sont bi-fonctionnelles, et d'autres possèdent des modules de liaison aux substrats (CBM) localisés en N- ou C-terminal, ou entrecoupant le domaine catalytique. Le clonage des gènes codant pour ces xylanases et la caractérisation fonctionnelle des produits de ces gènes permettrait de mieux comprendre le rôle de chacune de ces enzymes au sein des systèmes enzymatiques des trois bactéries étudiées.

Les enzymes identifiées chez les trois espèces bactériennes diffèrent également dans leur localisation : *R. intestinalis* XB6B4, qui se développe peu sur xylose, produit un nombre important de xylosidases GH43. Ces enzymes, ainsi que la seule GH10 identifiée chez *R. intestinalis* XB6B4, sont dépourvues de séquence signal et pourraient donc être intra-cellulaires. Si c'est le cas, il est probable que la bactérie internalise les xylo-oligosaccharides et les dégrade dans le cytoplasme, stratégie efficace pour l'utilisation optimale des glucides pour sa croissance. Une autre possibilité est l'exportation des enzymes dépourvues de séquence signal à la surface cellulaire, ou leur excrétion par des mécanismes différents des systèmes Sec et Tat (Desvaux, *et al.*, 2009). En effet, des enzymes extracellulaires sont indispensables pour la dégradation préalable des xylanes en xylooligosaccharides. *B. xylanisolvens* XB1A^T produit également une xylanase GH10 cellulaire (Xyn10A), probablement périplasmique, qui lui permet de dégrader les xylo-oligosaccharides internalisés. Il serait intéressant de confirmer la localisation périplasmique de Xyn10A, et de déterminer la localisation des autres enzymes produites par *B. xylanisolvens* XB1A (cytoplasmique, périplasmique, à la surface bactérienne ou extracellulaire), afin de comprendre l'organisation cellulaire du système hémicellulolytique de cette bactérie. Par ailleurs, les protéines Sus-Like (et Rag-Like), dont les gènes ont été identifiés dans les clusters de *B. xylanisolvens* XB1A^T, pourraient aussi intervenir dans la capture et l'internalisation des produits d'hydrolyse des hémicelluloses, et des xylanes en particulier. De nombreuses perspectives découlent de cette découverte originale, comme l'étude du rôle et du fonctionnement des systèmes Sus-Like dans la dégradation des hémicelluloses chez *B. xylanisolvens*, et l'étude de la régulation de l'expression des gènes impliqués.

L'organisation en cluster des gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport ou la dégradation des polysaccharides (GH, CE …), que nous avons mise en évidence chez *B. xylanisolvens* XB1A^T, est très originale, et la régulation de l'expression des

gènes de ces clusters devra être étudiée. En effet, à notre connaissance, une organisation en opéron des gènes codant pour des systèmes fibrolytiques n'a été mise en évidence jusqu'à présent que chez des clostridies (Maamar, *et al*., 2006) ; néanmoins, des structures opéroniques semblent également présentes chez *Bacteroides* (Hamady, *et al*., 2008 ; Chatzidaki-Livanis, *et al.*, 2009).

Analyse des génomes des bactéries fibrolytiques du côlon et outils génétiques

La séquence du génome de *B. xylanisolvens* XB1A^T a permis une avancée significative de nos recherches dans l'identification des gènes de xylanase de cette bactérie, mais aussi d'un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme des substrats carbonés.

L'une des perspectives de ce travail est de poursuivre l'analyse de ce génome à l'aide d'outils bioinformatiques plus puissants. Dans ce cadre, une collaboration pourra être mise en place avec l'équipe de Bernard Henrissat (AFMB UMR 6098 CNRS - Marseille) qui a développé le logiciel CazyModO (Coutinho et Henrissat, 1999) permettant de rechercher, sur la séquence d'un génome, les ORF codant pour toutes les protéines impliquées dans la dégradation des parois végétales (glycoside-hydrolases, glycosyl-transférases, estérases, polysaccharide-lyases, et modules de liaison au substrat). Les génomes de différentes espèces bactériennes qui dégradent les polysaccharides ont ainsi été analysés récemment. Le logiciel CAZyModO a permis d'identifier sur le génome d'une bactérie marine, *Saccharophagus degradans* 2-40^T (Taylor, *et al.*, 2006), 180 ORF codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation des sucres et polysaccharides. Des analyses génomiques et protéomiques plus poussées ont ensuite confirmé la présence de 77 ORF codant pour des xylanases, glucanases, mannanases et pectinases. Parmi ces 77 enzymes, 35 possèdent un domaine de liaison au substrat. Plus récemment, les génomes de *Ruminococcus flavefaciens* (Berg Miller, *et al.*, 2009) et *Clostridium cellulolyticum* (Bouzard, *et al*., 2009) ont également été analysés par cette approche. Ces analyses montrent, chez *R. flavefaciens*, un nombre encore jamais égalé d'ORF codant des enzymes à dockerines (225), et, pour les deux bactéries, la présence d'ORF codant pour de nombreuses enzymes cellulosomales ou non, qui n'avaient encore jamais été identifiées par méthodes biochimiques.

Cette approche pourrait être élargie à l'analyse du génome de *R. intestinalis* XB6B4, actuellement en cours de séquençage dans le cadre du projet METAHIT, et dont la séquence

sera disponible dans les mois qui viennent. Ces analyses permettraient de décrire de façon exhaustive le nombre et la diversité des enzymes dégradant les parois végétales produites par *B. xylanisolvens* XB1A^T et *R. intestinalis* XB6B4. Il sera évidemment nécessaire de confirmer par la suite l'expression des gènes identifiés, soit par RT-PCR, soit par approche protéomique.

Pour comprendre le rôle des différents gènes qui composent un génome bactérien, les outils génétiques moléculaires sont indispensables. En effet, chez les bactéries, de nombreuses approches visant à créer des mutants par mutagénèse dirigée ou aléatoire, ou inactivation de gènes, sont utilisées afin de décrypter les données fournies par le séquençage des génomes. De tels outils seraient particulièrement utiles pour étudier le rôle des différents gènes identifiés dans les génomes des bactéries que nous avons étudiées, et en particulier des souches pour lesquelles le génome a été ou sera séquencé.

Des outils génétiques ont été utilisés chez les espèces du genre *Bacteroides* depuis plusieurs années. Compte-tenu des applications médicales possibles, de nombreuses études sont menées sur les espèces pathogènes de *Bacteroides*, afin d'étudier leur résistance aux antibiotiques, ainsi que les mécanismes de transfert de ces gènes de résistance. Des transposons conjugatifs ont été mis en évidence chez plusieurs espèces de *Bacteroides*, et sont très largement étudiés (Salyers et Shoemaker, 1992 ; Jeters, *et al*., 2009). Grâce à ces transposons conjugatifs, les transferts de gènes semblent très actifs dans le côlon humain, à la fois au sein du genre *Bacteroides*, mais aussi entre des espèces de *Bacteroides* et des bactéries à Gram positif (Shoemaker, *et al*., 2001). Le transfert de gènes par conjugaison a donc largement été utilisé chez *Bacteroides* comme outil génétique, y compris dans le cadre de l'étude des systèmes fibrolytiques. En 1992, Weaver et al. ont créé des mutants d'insertion afin d'étudier l'organisation de l'opéron des gènes de xylanases (*xsa* et *xylI*) de *B. ovatus*. *B. ovatus* a également été modifié génétiquement par conjugaison dans le but de produire des molécules biologiquement actives, comme le facteur en feuille de trèfle TFF-3 (Hamady, *et al.*, 2008). Ce facteur TFF-3, initialement produit par les cellules caliciformes de l'épithélium intestinal, permet de stabiliser le mucus en se liant aux mucines et de renforcer sa viscosité et ses propriétés de barrière. Le promoteur de l'opéron *xsa-xylI* de *B. ovatus* a été utilisé afin de contrôler la production de TFF-3 par le xylane. Chez *B. thetaiotaomicron*, le cluster de gènes *sus*, impliqué dans la dégradation de l'amidon, a aussi été étudié grâce à des outils génétiques. En effet, la création de mutants déficients dans l'utilisation de maltose et de maltotriose a

permis de montrer que l'expression de ces gènes est régulée au niveau transcriptionnel, par les régulateurs SusR et MalR (Cho, *et al*., 2001).

Contrairement à *Bacteroides* sp., peu d'outils génétiques sont connus chez les espèces du genre *Roseburia*. En 2008, la première manipulation génétique a été menée sur l'espèce *Roseburia inulinivorans* A2-194 avec deux transposons conjugatifs : Tn1545 de *Eubacterium cellulosolvens* et TnK10 de *Clostridium saccharolyticum* K10 (Scott, *et al*., 2008). Ce travail a permis de montrer que le transfert artificiel de gènes était possible in vitro entre deux espèces bactériennes appartenant au phylum des *Firmicutes*.

Il est donc raisonnable de penser que des outils génétiques pourront être très prochainement utilisés pour produire des mutants de *B. xylanisolvens* ou *R. intestinalis* et ainsi identifier les gènes dont l'expression est essentielle pour la dégradation des hémicelluloses par ces deux bactéries.

A plus long terme, ces études génomiques pourraient être élargies à d'autres espèces de *Bacteroides* du côlon humain, afin de réaliser des études comparatives de leur équipement enzymatique, et ainsi mieux comprendre le rôle de chaque espèce au sein du microbiote intestinal. Elles pourraient également être conduites sur des espèces cellulolytiques du côlon humain, telle que *Ruminococcus* sp. (Robert et Bernalier-Donadille, 2003), dont le génome est également en cours de séquençage dans le cadre du projet MetaHit. En effet, il serait intéressant d'étudier le système enzymatique de cette bactérie et de le comparer à celui des ruminocoques du rumen par exemple, afin de voir si tous produisent des cellulosomes (Berg Miller, *et al*. 2009). Les *Ruminocoques* appartiennent également au groupe des *Firmicutes*, phylum dominant du microbiote intestinal humain. L'étude du fonctionnement et de l'organisation des systèmes fibrolytiques des *Ruminocoques* du côlon permettrait aussi de comprendre leur rôle dans la fibrolyse intestinale, et donc, plus généralement, au sein de l'écosystème côlon.

Comme décrit dans la partie « bibliographie » de ce manuscrit (partie C. I.1.3), ces dernières années, l'analyse de divers métagénomes génère une accumulation de données importantes sur les microbiotes intestinaux (Hattori, *et al*., 2009). L'analyse de ces données a montré un nombre important de glycoside-hydrolases, et, en particulier, de polysaccharidases,

dans le métagénome intestinal humain et suggère donc un rôle essentiel de la fonction de dégradation des polymères végétaux dans cet écosystème (Gill, *et al*., 2006). Il serait intéressant d'étudier la représentativité des gènes codant pour des xylanases et des xylosidases, que nous avons identifiés sur les trois souches bactériennes étudiées, dans les différentes banques métagénomiques disponibles. Plus globalement, l'approche métagénomique permettra de mieux appréhender les fonctions essentielles de l'écosystème colique, comme la fibrolyse, et ses variations en fonction de l'âge, de l'alimentation ou de l'état de santé des individus. En parallèle, l'étude génomique des souches isolées et l'analyse de leur fonction métabolique et physiologique, restent indispensables pour mieux comprendre le fonctionnement d'un écosystème aussi complexe que le côlon humain.

Références bibliographiques

Abdou L, Boileau C, de Philip P, Pages S, Fierobe HP & Tardif C (2008) Transcriptional regulation of the *Clostridium cellulolyticum* cip-cel operon: a complex mechanism involving a catabolite-responsive element. *J Bacteriol* **190**: 1499-1506.

Ali MK, Rudolph FB, Bennett GN (2004). Thermostable xylanase10B from *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **31**:229-34.

Anderson JW. (2004) Whole grains and coronary heart disease: the whole kernel of truth. *Am J Clin Nutr*. **80** (6):1459-60.

Anderson JW, Conley SB. Whole grains and diabetes (2007). In: Marquart L, Jacobs DR Jr, McIntosh GH, Poutanen K, Reicks M, eds. Whole Grains and Health. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Professional; 2007:29–45.

Anderson JW, Pasupuleti VK (2008). Nutraceuticals and diabetes prevention and management. In: Pasupuleti VK, Anderson JW, eds. Nutraceuticals, Glycemic Health and Type 2 Diabetes. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Professional; 2008:1–10

Anderson JW, Baird P, Davis RH, Jr., *et al.* (2009) Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev* **67**: 188-205.

Ascherio A, Rimm EB, Hernán MA, Giovannucci EL, Kawachi I, Stampfer MJ, Willett WC. (1998). Intake of potassium, magnesium, calcium, and fiber and risk of stroke among US men. *Circulation*. **98**(12):1198-204.

Baba T, Shinke R & Nanmori T (1994) Identification and characterization of clustered genes for thermostable xylan-degrading enzymes, beta-xylosidase and xylanase, of *Bacillus stearothermophilus* 21. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2252-2258.

Bagnara-Tardif C, Gaudin C, Belaich A, Hoest P, Citard T & Belaich JP (1992) Sequence analysis of a gene cluster encoding cellulases from *Clostridium cellulolyticum*. *Gene* **119**: 17-28.

Bakir MA, Kitahara M, Sakamoto M, Matsumoto M & Benno Y (2006) *Bacteroides intestinalis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 151-154.

Bakir MA, Kitahara M, Sakamoto M, Matsumoto M & Benno Y (2006) *Bacteroides finegoldii* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 931-935.

Bajpai P (1999). Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol Prog.* **15**:147-57.

Basson MD, Liu YW, Hanly AM, Emenaker NJ, Shenoy SG & Gould Rothberg BE (2000) Identification and comparative analysis of human colonocyte short-chain fatty acid response genes. *J Gastrointest Surg* **4**: 501-512.

Bayer EA, Belaich JP, Shoham Y & Lamed R (2004) The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol* **58**: 521-554.

Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. **56**:326-38. Review.

Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, Holtrop G, Louis P, Lobley GE, Flint HJ (2006). Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl Environ Microbiol* **5**:3593-9.

Béra-Maillet C, Gaudet G, Forano E. (2000) Endoglucanase activity and relative expression of glycoside hydrolase genes of *Fibrobacter succinogenes* S85 grown on different substrates. *Biochim Biophys Acta.* **1543**:77-85.

Béra-Maillet, C., Ribot, Y. and Forano, E. (2004) Fiber-degrading systems of different strains of the genus *Fibrobacter*. *Appl Environ Microbiol.* **70,** 2172-2179.

Béra-Maillet, C., Devillard, E., Cezette, M., Jouany, J.-P. and Forano, E. (2005) Xylanases and CMCases of the rumen protozoa *Polyplastron multivesiculatum, Eudiplodinium maggii* and *Entodinium* sp. *FEMS Microbiol Lett* **244**, 149-56

Berg Miller ME, Antonopoulos DA, Rincon MT, Band M, Bari A, Akraiko T, Hernandez A, Thimmapuram J, Henrissat B, Coutinho PM, Borovok I, Jindou S, Lamed R, Flint HJ, Bayer EA, White BA (2009). Diversity and strain specificity of plant cell wall degrading enzymes revealed by the draft genome of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *PLoS One*. **4**(8):e6650.

Betian HG, Linehan BA, Bryant MP & Holdeman LV (1977) Isolation of a cellulotytic *Bacteroides sp*. from human feces. *Appl Environ Microbiol* **33**: 1009-1010.

Biely P, Kratky Z & Vrsanska M (1981) Substrate-binding site of endo-1,4-beta-xylanase of the yeast *Cryptococcus albidus*. *Eur J Biochem* **119**: 559-564.

Biely P, Vrsanská M, Claeyssens M (1991). The endo-1,4-beta-glucanase I from *Trichoderma reesei*. Action on beta-1,4-oligomers and polymers derived from D-glucose and D-xylose. *Eur J Biochem*. **200**: 157-63.

Biely P, Vrsanska M, Tenkanen M & Kluepfel D (1997) Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J Biotechnol* **57**: 151-166.

Blanco J, Coque JJ, Velasco J & Martin JF (1997) Cloning, expression in *Streptomyces lividans* and biochemical characterization of a thermostable endo-beta-1,4-xylanase of *Thermomonospora alba* ULJB1 with cellulose-binding ability. *Appl Microbiol Biotechnol* **48**: 208-217.

Blaut M, Collins MD, Welling GW, Dore J, van Loo J & de Vos W (2002) Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *British Journal of Nutrition* **87**: S203-S211.

Blouzard JC, Bourgeois C, de Philip P, Valette O, Bélaïch A, Tardif C, Bélaïch JP, Pagès S (2009). Enzyme diversity of the cellulolytic system produced by *Clostridium cellulolyticum* explored by two-dimensional analysis: identification of seven genes encoding new dockerin-containing proteins. *J Bacteriol*. **189**:2300-9.

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

Bond JH, Jr., Engel RR & Levitt MD (1971) Factors influencing pulmonary methane excretion in man. An indirect method of studying the in situ metabolism of the methane-producing colonic bacteria. *J Exp Med* **133**: 572-588.

Bonnet R, Suau A, Dore J, Gibson GR & Collins MD (2002) Differences in rDNA libraries of faecal bacteria derived from 10- and 25-cycle PCRs. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 757-763.

Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J.* **382** (Pt 3):769-81. Review.

Borel P, Lairon D, Senft M, Garzino P, Lafont H (1990). Lack of effect of purified cellulose and hemicellulose on the digestion and the intestinal absorption of dietary lipids in the rat. *Ann Nutr Metab*. **33**(5):237-45.

Boudet AM, Kajita S, Grima-Pettenati J & Goffner D (2003) Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends Plant Sci* **8**: 576-581.

Bourgois TM, Van Craeyveld V, Van Campenhout S, Courtin CM, Delcour JA, Robben J, Volckaert G. (2007) Recombinant expression and characterization of XynD from *Bacillus subtilis subsp. subtilis* ATCC 6051: a GH 43 arabinoxylan arabinofuranohydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol.* **75**:1309-17.

Braun EJ & Rodrigues CA (1993) Purification and Properties of an Endoxylanase from a Corn Stalk Rot Strain of *Erwinia-Chrysanthemi*. *Phytopathology* **83**: 332-338.

Bray MR & Clarke AJ (1992) Action pattern of xylo-oligosaccharide hydrolysis by *Schizophyllum* commune xylanase A. *Eur J Biochem* **204**: 191-196.

Brown L, Rosner B, Willett WW & Sacks FM (1999) Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* **69**: 30-42.

Brown RM & Saxena IM (2000) Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 57-67.

Buckeridge MS, Pessoa dos Santos H, Tiné MAS. 2000. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiol Biochem*. **38**, 141-156.

Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, Elwood PC, Deadman NM (1989). Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet.* **2**(8666):757-61.

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

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

Chassard C, Goumy V, Leclerc M, Del'homme C & Bernalier-Donadille A (2007) Characterization of the xylan-degrading microbial community from human faeces. *FEMS Microbiol Ecol* **61**:121-31.

Chassard C, Delmas E, Lawson PA & Bernalier-Donadille A (2008) *Bacteroides xylanisolvens sp.* nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 1008-1013.

Chassard C, Scott KP, Marquet P, *et al.* (2008) Assessment of metabolic diversity within the intestinal microbiota from healthy humans using combined molecular and cultural approaches. *FEMS Microbiol Ecol* **66**: 496-504.

Chatzidaki-Livanis M, Coyne MJ, Comstock LE (2009). A family of transcriptional antitermination factors necessary for synthesis of the capsular polysaccharides of Bacteroides fragilis. *J Bacteriol*. 2009 Oct 2. [Epub ahead of print]

Cho KK, Kim SC, Woo JH, Bok JD & Choi YJ (2000) Molecular cloning and expression of a novel family A endoglucanase gene from *Fibrobacter succinogenes* S85 in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* **27**: 475-481.

Cho KH, Salyers AA (2001). Biochemical analysis of interactions between outer membrane proteins that contribute to starch utilization by *Bacteroides thetaiotaomicron. J Bacteriol.* **183**:7224-30.

Christl SU, Murgatroyd PR, Gibson GR & Cummings JH (1992) Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine. *Gastroenterology* **102**: 1269-1277.

Clausen MR & Mortensen PB (1994) Kinetic studies on the metabolism of short-chain fatty acids and glucose by isolated rat colonocytes. *Gastroenterology* **106**: 423-432.

Cloetens L, De Preter V, Swennen K, *et al.* (2008). Dose-response effect of arabinoxylooligosaccharides on gastrointestinal motility and on colonic bacterial metabolism in healthy volunteers. *J Am Coll Nutr* **27**: 512-518.

Collins T, Meuwis MA, Stals I, Claeyssens M, Feller G & Gerday C (2002) A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. *J Biol Chem* **277**: 35133-35139.

Collins T, Gerday C & Feller G (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 3-23.

Comstock LE & Coyne MJ (2003) *Bacteroides thetaiotaomicron*: a dynamic, niche-adapted human symbiont. *Bioessays* **25**: 926-929.

Connerton I, Cummings N, Harris GW, Debeire P & Breton C (1999) A single domain thermophilic xylanase can bind insoluble xylan: evidence for surface aromatic clusters. *Biochim Biophys Acta.* **1433**: 110-121.

Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 850-861.

Cummings JH, Southgate DA, Branch WJ, *et al.* (1979) The digestion of pectin in the human gut and its effect on calcium absorption and large bowel function. *Br J Nutr* **41**: 477-485.

Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP & Macfarlane GT (1987) Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* **28**: 1221-1227.

Cummings JH & Macfarlane GT (1991) The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* **70**: 443-459.

Damaso, M.C., de Castro, A.M., Castro, R.M., Andrade, C.M., Pereira, N., Jr., (2004). Application of xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145 for enzymatic hydrolysis of corncob and sugarcane bagasse. *Appl Biochem Biotechnol.* 113-116, 1003-1012.

Davies G & Henrissat B (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**: 853-859.

Davies GJ & Henrissat B (2002) Structural enzymology of carbohydrate-active enzymes: implications for the post-genomic era. *Biochem Soc Trans* **30**: 291-297.

Davies GJ, Gloster TM & Henrissat B (2005) Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Curr Opin Struct Biol* **15**: 637-645.

Della Ragione F, Criniti V, Della Pietra V, *et al.* (2001) Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Lett* **499**: 199-204.

Desvaux M, Hébraud M, Talon R, Henderson IR (2009). Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.* **17**(4):139-45.

Ding SY, Rincon MT, Lamed R, Martin JC, McCrae SI, Aurilia V, Shoham Y, Bayer EA, Flint HJ (2008). Cellulosomal scaffoldin-like proteins from *Ruminococcus flavefaciens. J Bacteriol.* **183**(6):1945-53.

Dinsdale EA, Edwards RA, Hall D, *et al.* (2008) Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature* **452**: 629-U628.

Dische, Z. (1955) New color reactions for determination of sugars in polysaccharides; in *Methods* of *Biochemical Analysis (D. Glick, ed.), Vol. 2, p. 313-358. Interscience, New* York London.

Dodd D, Kocherginskaya SA, Spies MA, Beery KE, Abbas CA, Mackie RI, Cann IK. (2009). Biochemical analysis of a beta-D-xylosidase and a bifunctional xylanase-ferulic acid esterase from a xylanolytic gene cluster in *Prevotella ruminicola* 23. *J Bacteriol*. **191**:3328-38

Duncan SH, Hold GL, Barcenilla A, Stewart CS & Flint HJ (2002) *Roseburia intestinalis* sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1615-1620.

Duncan SH, Louis P & Flint HJ (2007) Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Lett Appl Microbiol* **44**: 343-350.

Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, Flint HJ (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond).* **32**:1720-4.

Ebringerová A, Hromádková Z (1999). Xylans of industrial and biomedical importance. *Biotechnol Genet Eng Rev*. **16**:325-46.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, *et al.* (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**: 1635-1638.

Edwards CA & Parrett AM (2002) Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br J Nutr* **88 Suppl 1**: S11-18.

Englyst HN, Quigley ME & Hudson GJ (1995) Definition and measurement of dietary fibre. *Eur J Clin Nutr* **49 Suppl 3**: S48-62.

Ewing WN (2002). Feeds Directory: Branded Products. Context Edition.

Favier JC, Ireland-Ripert J, Toque C, Feinberg M (1995). Répertoire général des aliments. Table de composition. Coéd. INRA-AFSSA-CIQUAL-TEC & DOC.

Fernandes AC, Fontes CM, Gilbert HJ, Hazlewood GP, Fernandes TH, Ferreira LM (1999). Homologous xylanases from *Clostridium thermocellum*: evidence for bi-functional activity, synergism between xylanase catalytic modules and the presence of xylan-binding domains in enzyme complexes. *Biochem J*. **342** :105-10.

Finegold SM & Rolfe RD (1983) Susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* **1**: 33-40.

Flint HJ, Whitehead TR, Martin JC, Gasparic A (1997). Interrupted catalytic domain structures in xylanases from two distantly related strains of *Prevotella ruminicola*. *Biochim Biophys Acta*. **1337:**161-5.

Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P (2007). Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environ Microbiol.* **5**:1101-11. Review.

Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA (2008). Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol*. **6**:121-31. Review.

Fontes CM, Gilbert HJ, Hazlewood GP, *et al.* (2000) A novel *Cellvibrio mixtus* family 10 xylanase that is both intracellular and expressed under non-inducing conditions. *Microbiology* **146**: 1959-1967.

Foong F, Hamamoto T, Shoseyov O & Doi RH (1991) Nucleotide sequence and characteristics of endoglucanase gene engB from *Clostridium cellulovorans*. *J Gen Microbiol* **137**: 1729-1736.

Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N & Pace NR (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13780-13785.

Frank DN & Pace NR (2008) Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr Opin Gastroenterol* **24**: 4-10.

Fry SC (1988). The growing plant cell wall. Longman, Harlow, 333pp.

Gallardo O, Diaz P & Pastor FI (2003). Characterization of a *Paenibacillus* cell-associated xylanase with high activity on aryl-xylosides: a new subclass of family 10 xylanases. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 226-233.

Gibson GR, Macfarlane S & Macfarlane GT (1993) Degradative activities of gut anaerobes studied in a three-stage continuous culture model of the colon. *Clin Infect Dis* **16 Suppl 4**: S420-421.

Gibson GR & Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* **125**: 1401-1412.

Gilbert HJ, Hazlewood GP, Laurie JI, Orpin CG, Xue GP (1992). Homologous catalytic domains in a rumen fungal xylanase: evidence for gene duplication and prokaryotic origin. *Mol Microbiol*. **6**:2065-72.

Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P. (1993). Bacterial Cellulases and Xylanases. *Journal of General Microbiology*. **139**: 187-194.

Gilbert HJ (2008). Sus out sugars in. *Structure.* **16**:987-9.

Gill SR, Pop M, DeBoy RT, *et al.* (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* **312**: 1355-1359.

Gosalbes MJ, Pérez-González JA, González R, Navarro A (1991). Two beta-glycanase genes are clustered in *Bacillus polymyxa*: molecular cloning, expression, and sequence analysis of genes encoding a xylanase and an endo-beta-(1,3)-(1,4)-glucanase. *J Bacteriol.* **173**:7705-10.

Hall LM, Fawell SC, Shi X, Faray-Kele MC, Aduse-Opoku J, Whiley RA, Curtis MA -2005). Sequence diversity and antigenic variation at the rag locus of *Porphyromonas gingivalis.* *Infect Immun*. **73**:4253-62.

Hamady ZZ, Farrar MD, Whitehead TR, Holland KT, Lodge JP, Carding SR (2008). Identification and use of the putative *Bacteroides ovatus* xylanase promoter for the inducible production of recombinant human proteins. Microbiology. **154** : 3165-74.

Hamelin M, Sayd T, Chambon C, Bouix J, Bibé B, Milenkovic D, Leveziel H, Georges M, Clop A, Marinova P, Laville E (2006). Proteomic analysis of ovine muscle hypertrophy. *J Anim Sci*. **84**:3266-76.

Han SO, Yukawa H, Inui M & Doi RH (2003) Regulation of expression of cellulosomal cellulase and hemicellulase genes in *Clostridium cellulovorans*. *J Bacteriol* **185**: 6067-6075.

Han SO, Cho HY, Yukawa H, Inui M & Doi RH (2004) Regulation of expression of cellulosomes and noncellulosomal (hemi)cellulolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans* during growth on different carbon sources. *J Bacteriol* **186**: 4218-4227.

Harmsen HJ, Raangs GC, He T, Degener JE & Welling GW (2002) Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2982-2990.

Hatfield R & Vermerris W (2001) Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiol* **126**: 1351-1357.

Hatti-Kaul R, Mattiasson B, Martinez A, Delgado O, Mamo G (2006). Cloning, sequence analysis, and expression of a gene encoding an endoxylanase from *Bacillus halodurans* S7. *Mol Biotechnol*. **33**:149-60.

Hattori M, Taylor TD (2009). The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res* **16** :1-12.

Hayashi H, Takagi KI, Fukumura M, Kimura T, Karita S, Sakka K & Ohmiya K (1997) Sequence of xynC and properties of XynC, a major component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *J Bacteriol* **179**: 4246-4253.

Hayashi H, Abe T, Sakamoto M, Ohara H, Ikemura T, Sakka K, Benno Y (2005). Direct cloning of genes encoding novel xylanases from the human gut. *Can J Microbiol*. **51**(3):251-259.

Hébuterne X (2002). Gut changes attributed to ageing: effects on intestinal microflora. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. **6(1**):49-54. Review.

Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **280 (Pt 2)**: 309-316.

Henrissat B & Bairoch A (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **293 (Pt 3)**: 781-788.

Henrissat B & Bairoch A (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J* **316 (Pt 2)**: 695-696.

Henrissat B & Davies G (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol* **7**: 637-644.

Hespell RB & Whitehead TR (1990) Physiology and genetics of xylan degradation by gastrointestinal tract bacteria. *J Dairy Sci* **73**: 3013-3022.

Hijova E & Chmelarova A (2007) Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl Lek Listy* **108**: 354-358.

Hold GL, Pryde SE, Russell VJ, Furrie E & Flint HJ (2002) Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *Fems Microbiology Ecology* **39**: 33-39.

Hoondal GS, Tiwari RP, Tewari R, Dahiya N & Beg QK (2002) Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 409-418.

Hopkins MJ Englyst HN, Macfarlane S, Furrie E, Macfarlane GT & McBain AJ (2003) Degradation of cross-linked and non-cross-linked arabinoxylans by the intestinal microbiota in children. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6354-6360.

Hurlbert JC & Preston JF, 3rd (2001) Functional characterization of a novel xylanase from a corn strain of *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol* **183**: 2093-2100.

Iguchi M, Yamanaka S & Budhiono A (2000) Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science* **35**: 261-270.

Izydorczyk MS, Biliaderis CG. (1995). Cereal arabinoxylans: advances in structure and physiochemical properties. *Carbohydr. Polym*. **28**, 33-48.

Jang Y, Lee JH, Kim OY, Park HY & Lee SY (2001) Consumption of whole grain and legume powder reduces insulin demand, lipid peroxidation, and plasma homocysteine concentrations in patients with coronary artery disease: randomized controlled clinical trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**: 2065-2071.

Jarrige R, Grenet E, Demarquilly C, Besle JM (1995). Les constituants de l'appareil végétal des plantes fourragères. In : "Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion". Eds. Jarrige R *et al*, INRA, Paris. 25-81.

Jervis EJ, Haynes CA, Kilburn DG (1997). Surface diffusion of cellulases and their isolated binding domains on cellulose. *J Biol Chem*. **272**(38):24016-23.

Jeters RT, Wang GR, Moon K, Shoemaker NB, Salyers AA (2009). Tetracycline-associated transcriptional regulation of transfer genes of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *J Bacteriol*. **191**:6374-82.

Jones BV, Begley M, Hill C, Gahan CGM & Marchesi JR (2008) Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 13580-13585.

Jordan DB, Li XL, Dunlap CA, Whitehead TR and Cotta MA (2007). Structure–function relationships of a catalytically efficient β-d-xylosidase, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **141**: 51-76

Joshi S & Agte V (1995) Digestibility of dietary fiber components in vegetarian men. *Plant Foods Hum Nutr* **48**: 39-44.

Jun H, Bing Y, Keying Z, Xuemei D, Daiwen C (2009). Thermostable carbohydrate binding module increases the thermostability and substrate-binding capacity of *Trichoderma reesei* xylanase 2. *N Biotechnol*. **26**:53-9.

Kane MD, Jatkoe TA, Stumpf CR, Lu J, Thomas JD, Madore SJ (2000). Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res*. **28**:4552-7.

Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S & Tewari R (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol* **77**: 215-227.

Kataeva IA, Seidel RD, 3rd, Shah A, West LT, Li XL & Ljungdahl LG (2002) The fibronectin type 3-like repeat from the *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase CbhA promotes hydrolysis of cellulose by modifying its surface. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4292-4300.

Kataeva IA, Uversky VN, Brewer JM, Schubot F, Rose JP, Wang BC & Ljungdahl LG (2004) Interactions between immunoglobulin-like and catalytic modules in *Clostridium thermocellum* cellulosomal cellobiohydrolase CbhA. *Protein Eng Des Sel* **17**: 759-769.

Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T & Paoletti R (2003) Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc* **78**: 965-978.

Key TJ & Spencer EA (2007) Carbohydrates and cancer: an overview of the epidemiological evidence. *Eur J Clin Nutr* **61 Suppl 1**: S112-121.

Khandeparker R, Numan MT (2008). Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. *J Ind Microbiol Biotechnol*. **35**:635-44.

Kleywegt GJ, Zou JY, Divne C, Davies GJ, Sinning I, Ståhlberg J, Reinikainen T, Srisodsuk M, Teeri TT, Jones TA (1997). The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 A resolution, and a comparison with related enzymes. *J Mol Biol*. **272**(3):383-97.

Koropatkin NM, Martens EC, Gordon JI, Smith TJ (2008). Starch catabolism by a prominent human gut symbiont is directed by the recognition of amylose helices. *Structure*. **16**:1105-15.

Kosugi A, Murashima K, Doi RH (2001). Characterization of xylanolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans*: expression of xylanase activity dependent on growth substrates. *J Bacteriol.* **183**(24):7037-43.

Kurasawa S, Haack VS & Marlett JA (2000) Plant residue and bacteria as bases for increased stool weight accompanying consumption of higher dietary fiber diets. *J Am Coll Nutr* **19**: 426-433.

Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, *et al.* (2007) Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Research* **14**: 169-181.

Kuwahara T, Yamashita A, Hirakawa H, *et al.* (2004) Genomic analysis of *Bacteroides fragilis* reveals extensive DNA inversions regulating cell surface adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14919-14924.

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

Lay C, Rigottier-Gois L, Holmstrom K, *et al.* (2005) Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4153-4155.

Leitch, E.C., Walker, A.W., Duncan, S.H., Holtrop, G. and Flint, H.J. (2007) Selective colonization of insoluble substrates by human faecal bacteria. *Environ Microbiol.* 9, 667-679.

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature; **444**:1022-3.

Liebl W, Winterhalter C, Baumeister W, Armbrecht M & Valdez M (2008) Xylanase attachment to the cell wall of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J Bacteriol* **190**: 1350-1358.

Liu S, Stampfer MJ, Hu FB, Giovannucci E, Rimm E, Manson JE, Hennekens CH, Willett WC (1999). Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurses' Health Study. *Am J Clin Nutr.* **70**(3):412-9.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. **25**:402-8.

Ljungdahl LG & Eriksson KE (1985) Ecology of Microbial Cellulose Degradation. *Advances in Microbial Ecology* **8**: 237-299.

Louis P & Flint HJ (2009) Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* **294**: 1-8.

Lozupone CA, Hamady M, Cantarel BL, Coutinho PM, Henrissat B, Gordon JI & Knight R (2008) The convergence of carbohydrate active gene repertoires in human gut microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15076-15081.

Lupton JR (2000) Is fiber protective against colon cancer? Where the research is leading us. *Nutrition* **16**: 558-561.

McBride MJ, Xie G, Martens EC, Lapidus A, Henrissat B, Rhodes RG, Goltsman E, Wang W, Xu J, Hunnicutt DW, Staroscik AM, Hoover TR, Cheng YQ, Stein JL (2009). Novel features of the polysaccharide-digesting gliding bacterium *Flavobacterium johnsoniae* revealed by genome sequence analysis. *Appl Environ Microbiol*. Epub ahead of print.

McCartney L, Blake AW, Flint J, Bolam DN, Boraston AB, Gilbert HJ, Knox JP (2006). Differential recognition of plant cell walls by microbial xylan-specific carbohydrate-binding modules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(12):4765-70.

McLean BW, Bray MR, Boraston AB, Gilkes NR, Haynes CA, Kilburn DG. (2000) Analysis of binding of the family 2a carbohydrate-binding module from *Cellulomonas fimi* xylanase 10A to cellulose: specificity and identification of functionally important amino acid residues. *Protein Eng.* **13**(11):801-9.

Maamar H, Abdou L, Boileau C, Valette O, Tardif C (2006). Transcriptional analysis of the cip-cel gene cluster from *Clostridium cellulolyticum*. *J Bacteriol.* **188**:2614-24.

Macfarlane GT, Hay S, Macfarlane S, Gibson GR (1990). Effect of different carbohydrates on growth, polysaccharidase and glycosidase production by *Bacteroides ovatus*, in batch and continuous culture. *J Appl Bacteriol.* **68**:179-87.

Macfarlane GT & Gibson GR (1991) Co-utilization of polymerized carbon sources by *Bacteroides ovatus* grown in a two-stage continuous culture system. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1-6.

Macfarlane GT, Gibson GR & Cummings JH (1992) Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol* **72**: 57-64.

Macfarlane GT & Macfarlane S (1997) Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand J Gastroenterol Suppl* **222**: 3-9.

Macfarlane S, Macfarlane GT (2006). Composition and metabolic activities of bacterial biofilms colonizing food residues in the human gut. *Appl Environ Microbiol*. **72**:6204-11.

Mackie RI, Sghir A & Gaskins HR (1999) Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* **69**: 1035S-1045S.

Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, Wollam A, Shah N, Wang C, Magrini V, Wilson RK, Cantarel BL, Coutinho PM, Henrissat B, Crock LW, Russell A, Verberkmoes NC, Hettich RL, Gordon JI (2009). Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc Natl Acad Sci* U S A. **106**: 5859-64.

Mannarelli BM, Evans S, Lee D (1990). Cloning, sequencing, and expression of a xylanase gene from the anaerobic ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Bacteriol.* **172**:4247-54.

Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, *et al.* (2006) Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **55**: 205-211.

Martens EC, Koropatkin NM, Smith TJ, Gordon JI (2009). Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: the *Bacteroidetes* Sus-like paradigm. *J Biol Chem.* **284**:24673-7. Epub 2009 Jun 24. Review.

Martin SA, Morrison WH 3rd, Akin DE (1998). Fermentation of maize bran, oat bran, and wheat bran by *Bacteroides ovatus* V975. *Curr Microbiol.* **36**:90-5.

Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, *et al.* (2002) Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5445-5451.

May T, Mackie RI, Fahey GC, Cremin JC & Garleb KA (1994) Effect of Fiber Source on Short-Chain Fatty-Acid Production and on the Growth and Toxin Production by *Clostridium-Difficile. Scandinavian Journal of Gastroenterology* **29**: 916-922.

Millward-Sadler S.J., Davidson K., Hazlewood G.P., Black G.W., Gilbert H.J., Clarke J.H (1995). Novel cellulose-binding domains, NodB homologues and conserved modular architecture in xylanases from the aerobic soil bacteria *Pseudomonas fluorescens* subsp. cellulosa and Cellvibrio mixtus. *Biochem. J.* **312:**39-48

Miyazaki K, Martin JC, Marinsek-Logar R & Flint HJ (1997) Degradation and utilisation of xylans by the rumen anaerobe *Prevotella bryantii* (formerly *P. ruminicola subsp. brevis*). *Anaerobe* **3**: 373-381.

Mertens DR (2003) Challenges in measuring insoluble dietary fiber. *J Anim Sci* **81**: 3233-3249.

Miller TL & Wolin MJ (1979) Fermentations by saccharolytic intestinal bacteria. *Am J Clin Nutr* **32**: 164-172.

Miron J, Jacobovitch J, Bayer EA, Lamed R, Morrison M, Ben-Ghedalia D (2001). Subcellular distribution of glycanases and related components in *Ruminococcus albus* SY3 and their role in cell adhesion to cellulose. *J Appl Microbiol*. **91**:677-85.

Miyazaki, K., Martin, J.C., Marinsek-Logar, R. and Flint, H.J. (1997) Degradation and utilisation of xylans by the rumen anaerobe *Prevotella bryantii* (formerly *P. ruminicola* subsp. *brevis*). *Anaerobe* **3**, 373-381.

Montgomery L (1988) Isolation of Human Colonic Fibrolytic Bacteria. *Letters in Applied Microbiology* **6**: 55-57.

Moore WE & Holdeman LV (1974) Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* **27**: 961-979.

Mosoni P, Chaucheyras-Durand F, Béra-Maillet C, Forano E (2007). Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *J Appl Microbiol*. **103**:2676-85.

Nicholson JK, Holmes E & Wilson ID (2005) Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Microbiol* **3**: 431-438.

Nolling J, Breton G, Omelchenko MV, *et al.* (2001) Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **183**: 4823-4838.

Notenboom V, Boraston AB, Kilburn DG, Rose DR (2001). Crystal structures of the family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A in native and ligand-bound forms. *Biochemistry*. **40**(21):6248-56.

Noverr MC & Huffnagle GB (2004) Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol* **12**: 562-568.

Pamp SJ, Sternberg C, Tolker-Nielsen T (2009). Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. Cytometry A. **75**:90-103. Review.

Paradis,F.W., Zhu,H., Krell,P.J., Phillips,J.P. and Forsberg,C.W (1993). The xynC gene from *Fibrobacter succinogenes* S85 codes for a xylanase with two similar catalytic domains. *J. Bacteriol.* **175** , 7666-7672.

Pereira MA, Jacobs DR, Jr., Pins JJ, Raatz SK, Gross MD, Slavin JL & Seaquist ER (2002) Effect of whole grains on insulin sensitivity in overweight hyperinsulinemic adults. *Am J Clin Nutr* **75**: 848-855.

Perez F, Accarino A, Azpiroz F, Quiroga S & Malagelada JR (2007) Gas distribution within the human gut: effect of meals. *Am J Gastroenterol* **102**: 842-849.

Peterson DA, Frank DN, Pace NR & Gordon JI (2008) Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe* **3**: 417-427.

Phillips ML (2006) Interdomain interactions: Dissecting animal bacterial Symbioses. *Bioscience* **56**: 376-381.

Polizeli ML, Rizzatti AC, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. **67**:577-91.

Powlowski J, Mahajan S, Schapira M, Master ER. (2009). Substrate recognition and hydrolysis by a fungal xyloglucan-specific family 12 hydrolase. *Carbohydr Res.* **344**, 1175-79.

Poole DM, Hazlewood GP, Laurie JI, Barker PJ & Gilbert HJ (1990) Nucleotide sequence of the *Ruminococcus albus* SY3 endoglucanase genes celA and celB. *Mol Gen Genet* **223**: 217-223.

Prosky L, Asp NG, Schweizer TF, DeVries JW, Furda I & Lee SC (1994) Determination of soluble dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *J AOAC Int* **77**: 690-694.

Prosky L (2000) What is dietary fiber? *J AOAC Int* **83**: 985-987.

Rajilic-Stojanovic M, Smidt H & de Vos WM (2007) Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental Microbiology* **9**: 2125-2136.

Rakotoarivonina H, Larson MA, Morrison M, Girardeau JP, Gaillard-Martinie B, Forano E, Mosoni P (2005). The *Ruminococcus albus* pilA1-pilA2 locus: expression and putative role of two adjacent pil genes in pilus formation and bacterial adhesion to cellulose. *Microbiology.* **151**(Pt 4):1291-9.

Rakotoarivonina H, Terrie C, Chambon C, Forano E, Mosoni P (2009). Proteomic identification of CBM37-containing cellulases produced by the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus albus* 20 and their putative involvement in bacterial adhesion to cellulose. *Arch Microbiol.* **191**:379-88.

Ramsay AG, Scott KP, Martin JC, Rincon MT, Flint HJ (2006). Cell-associated alpha-amylases of butyrate-producing Firmicute bacteria from the human colon. *Microbiology*. 2006 **152** :3281-90.

Reeves AR, D'Elia JN, Frias J, Salyers AA. (1996). A *Bacteroides thetaiotaomicron* outer membrane protein that is essential for utilization of maltooligosaccharides and starch. *J Bacteriol.* **178**:823-30.

Reveneau, C., Adams, S.E., Cotta, M.A. and Morrison, M. (2003) Phenylacetic and phenylpropionic acids do not affect xylan degradation by *Ruminococcus albus*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6954-6958.

Rigottier-Gois L, Le Bourhis AG, Gramet G, Rochet V & Dore J (2003) Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *Fems Microbiology Ecology* **43**: 237-245.

Roberfroid M (2007) Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* **137**: 830S-837S.

Roberfroid MB (2007) Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr* **137**: 2493S-2502S.

Robert C & Bernalier-Donadille A (2003) The cellulolytic microflora of the human colon: evidence of microcrystalline cellulose-degrading bacteria in methane-excreting subjects. *Fems Microbiology Ecology* **46**: 81-89.

Roland J.C. (1980) Les polymères végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés, pp. 46-65. Gauthiers-Villars

Roland JC et Callen JC (2001) Atlas de biologie cellulaire. Ed.Dunod.

Romanowska I, Polak J, Janowska K, Bielecki S (2003). The application of fungal endoxylanase in bread-making. *Commun Agric Appl Biol Sci.* **68**:317-20.

Rosado JL, Lopez P, Morales M & Allen LH (1991) Fiber digestibility and breath-hydrogen excretion in subjects consuming rural and urban Mexican diets. *Am J Clin Nutr* **53**: 55-60.

Rowland I, Wiseman H, Sanders T, Adlercreutz H & Bowey E (1999) Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: role of the gut microflora. *Biochem Soc Trans* **27**: 304-308.

Roy CC, Kien CL, Bouthillier L & Levy E (2006) Short-chain fatty acids: ready for prime time? *Nutr Clin Pract* **21**: 351-366.

Rumney CJ, Duncan SH, Henderson C & Stewart CS (1995) Isolation and characteristics of a wheatbran-degrading *Butyrivibrio* from human faeces. *Lett Appl Microbiol* **20**: 232-236.

Salyers AA, Vercellotti JR, West SE & Wilkins TD (1977) Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. *Appl Environ Microbiol* **33**: 319-322.

Salyers AA (1979). Energy sources of major intestinal fermentative anaerobes. *Am J Clin Nutr*. **32**(1):158-63.

Salyers AA, Gherardini F & O'Brien M (1981) Utilization of xylan by two species of human colonic *Bacteroides*. *Appl Environ Microbiol* **41**: 1065-1068.

Salyers AA (1984) *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Annu Rev Microbiol* **38**: 293-313.

Salyers AA, Shoemaker NB (1992). Chromosomal gene transfer elements of the Bacteroides group. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 11:1032-8

Sauvant D, Perez JM, Tran G (2002). Table de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage : porcs, volailles, bovins, caprins, lapins, chevaux, poissons. INRA Editions (Paris - FRA)

Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, *et al.* (2002) The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14422-14427.

Schürmann A, Brauers A, Massmann S, Becker W, Joost HG (1995). Cloning of a novel family of mammalian GTP-binding proteins (RagA, RagBs, RagB1) with remote similarity to the Ras-related GTPases. *J Biol Chem.* **270**:28982-8.

Schwarz WH (2001) The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: 634-649.

Schweizer TF (1990) Dietary fiber analysis and nutrition labelling. *Adv Exp Med Biol* **270**: 265-272.

Schweizer TF (1992). A component of food : Nutritional function in health and disease.

Schweizer TF (Ed). *ILSI Human Nutrition Reviews Series*.

Scott KP, Martin JC, Mrazek J, Flint HJ (2008). Transfer of conjugative elements from rumen and human *Firmicutes* bacteria to *Roseburia inulinivorans*. *Appl Environ Microbiol*. **74**:3915-3917.

Selinger LB, Forsberg CW, Cheng KJ (1996).The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe*. **2:**263-84.

Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P & Dore J (2000) Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2263-2266.

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

Shoseyov O, Shani Z & Levy I (2006) Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 283-295.

Shipman JA, Cho KH, Siegel HA, Salyers AA (1999). Physiological characterization of SusG, an outer membrane protein essential for starch utilization by *Bacteroides thetaiotaomicron. J Bacteriol.* **181**:7206-11.

Shipman JA, Berleman JE, Salyers AA (2000). Characterization of four outer membrane proteins involved in binding starch to the cell surface of *Bacteroides thetaiotaomicron. J Bacteriol*. **182**:5365-72.

Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, and Salyers AA (2001)**.** Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Applied and Environmental Microbiology.* p. 561-568, Vol. 67.

Shoseyov O, Shani Z, Levy I (2006). Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications. *Microbiol Mol Biol Rev*. **70**:283-95.

Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M, Bonnet C, Cherbut C, Galmiche JP & Blottiere HM (2000) Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* **46**: 507-514.

Slavin J (2003) Why whole grains are protective: biological mechanisms. *Proc Nutr Soc* **62**: 129-134.

Smaali I, Rémond C, O'Donohue MJ (2006). Expression in *Escherichia coli* and characterization of beta-xylosidases GH39 and GH-43 from *Bacillus halodurans* C-125. *Appl Microbiol Biotechnol*. **73**:582-90.

Spiridonov NA & Wilson DB (1998) Regulation of biosynthesis of individual cellulases in *Thermomonospora fusca*. *J Bacteriol* **180**: 3529-3532.

Spiridonov NA & Wilson DB (1999) Characterization and cloning of celR, a transcriptional regulator of cellulase genes from *Thermomonospora fusca*. *J Biol Chem* **274**: 13127-13132.

Spurling CC, Suhl JA, Boucher N, Nelson CE, Rosenberg DW & Giardina C (2008) The short chain fatty acid butyrate induces promoter demethylation and reactivation of RARbeta2 in colon cancer cells. *Nutr Cancer* **60**: 692-702.

Stahl DA, Flesher B, Mansfield HR & Montgomery L (1988) Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* **54**: 1079-1084.

Stephen AM & Cummings JH (1980) Mechanism of action of dietary fibre in the human colon. *Nature* **284**: 283-284.

Steffen LM, Jacobs DR Jr, Stevens J, Shahar E, Carithers T, Folsom AR (2003). Associations of whole-grain, refined-grain, and fruit and vegetable consumption with risks of all-cause mortality and incident coronary artery disease and ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr*. **78**:383-90.

Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD & Dore J (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4799-4807.

Subramaniyan S & Prema P (2002) Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit Rev Biotechnol* **22**: 33-64.

Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H (2005). Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol*. **43**(7):3380-9.

Takami H & Horikoshi K (2000) Analysis of the genome of an alkaliphilic *Bacillus* strain from an industrial point of view. *Extremophiles* **4**: 99-108.

Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, Ugarte E, Muñoz-Tamayo R, Paslier DL, Nalin R, Dore J, Leclerc M (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol*.**11**:2574-84.

Taylor LE 2nd, Henrissat B, Coutinho PM, Ekborg NA, Hutcheson SW, Weiner RM J Complete cellulase system in the marine bacterium *Saccharophagus degradans* strain 2-40^{T}.. *Bacteriol.* **188**:3849-61.

Tenkanen, M., Puls, J., Poutanen, K., (1992). Two major Xylanases of *Trichoderma-Reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*. **14**, 566-574.

Theberge M, Lacaze P, Shareck F, Morosoli R & Kluepfel D (1992) Purification and characterization of an endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene. *Appl Environ Microbiol* **58**: 815-820.

Tomme P, Warren RA & Gilkes NR (1995) Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv Microb Physiol* **37**: 1-81.

Topping DL & Clifton PM (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* **81**: 1031-1064.

Tuomilehto J, Silvasti M, Aro A, *et al.* (1988) Long-Term Treatment of Severe Hypercholesterolemia with Guar Gum. *Atherosclerosis* **72**: 157-162.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature **444**:1027-31.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R & Gordon JI (2007) The Human Microbiome Project. *Nature* **449**: 804-810.

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. **457** :480-4.

Van Craeyveld V, Swennen K, Dornez E, *et al.* (2008) Structurally different wheat-derived arabinoxylooligosaccharides have different prebiotic and fermentation properties in rats. *J Nutr* **138**: 2348-2355.

Van Petegem F, Collins T, Meuwis MA, Gerday C, Feller G & Van Beeumen J (2003) The structure of a cold-adapted family 8 xylanase at 1.3 A resolution. Structural adaptations to cold and investgation of the active site. *J Biol Chem* **278**: 7531-7539.

Van Soest PJ and Robertson JB (1980). System of analysis for evaluating fibrous feeds. In WJ Pigden, Balch CC, Graham M (Eds). Standardization of analytical methodology for feeds. Pp 49-60. International Development Research Center, Ottawa, Canada.

Verberkmoes NC, Russell AL, Shah M, *et al.* (2009) Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. *ISME J* **3**: 179-189.

Vos AP, M'Rabet L, Stahl B, Boehm G & Garssen J (2007) Immune-modulatory effects and potential working mechanisms of orally applied nondigestible carbohydrates. *Crit Rev Immunol* **27**: 97-140.

Vrsanska M, Gorbacheva IV, Kratky Z & Biely P (1982) Reaction pathways of substrate degradation by an acidic endo-1,4-beta-xylanase of *Aspergillus niger*. *Biochim Biophys Acta* **704**: 114-122.

Walker AW, Duncan SH, Harmsen HJ, Holtrop G, Welling GW & Flint HJ (2008) The species composition of the human intestinal microbiota differs between particle-associated and liquid phase communities. *Environ Microbiol* **10**: 3275-3283.

Weaver J, Whitehead TR, Cotta MA, Valentine PC, Salyers AA (1992). Genetic analysis of a locus on the *Bacteroides ovatus* chromosome which contains xylan utilization genes. *Appl Environ Microbiol.* **58**(9):2764-70.

Wedekind KJ, Mansfield HR & Montgomery L (1988) Enumeration and isolation of cellulolytic and hemicellulolytic bacteria from human feces. *Appl Environ Microbiol* **54**: 1530-1535.

Weickert MJ & Adhya S (1992) A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J Biol Chem* **267**: 15869-15874.

Weightman RM, Renard CMGC, Thibault J-F. (1994). Structure and properties of the polysaccharides from pea hulls. Part 1: chemical extraction and fractionation of the polysaccharides. *Carbohydr Polym* **24**, 139-148.

Wexler HM (2007) *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev* **20**: 593-621.

White BA, Mackie RI, Doerner KC (1993). Enzymatic hydrolysis of forage cell walls, In : Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD, J Ralph (ed). Forage cell wall structure and digestibility. American Society of America. Soil science society of America, Madison, Wis, 455-484.

Whitehead TR, Hespell RB (1990). The genes for three xylan-degrading activities from *Bacteroides ovatus* are clustered in a 3.8-kilobase region. *J Bacteriol*.**172**: 2408-12.

Whitehead TR (1993) Analyses of the gene and amino acid sequence of the *Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola* 23 xylanase reveals unexpected homology with endoglucanases from other genera of bacteria. *Curr Microbiol* **27**: 27-33.

Whitehead TR (1995). Nucleotide sequences of xylan-inducible xylanase and xylosidase/arabinosidase genes from *Bacteroides ovatus* V975. *Biochim Biophys Acta*. **1244**: 239-41.

Willats WG, McCartney L, Mackie W & Knox JP (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* **47**: 9-27.

Wolin MJ, Miller TL (1983). Interactions of microbial populations in cellulose fermentation. *Fed Proc.* **42**(1):109-13.

Wong KK, Tan LU, Saddler JN (1988). Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Rev.* **52**(3):305-17.

Xie G, Bruce DC, Challacombe JF, Chertkov O, Detter JC, Gilna P, Han CS, Lucas S, Misra M, Myers GL, Richardson P, Tapia R, Thayer N, Thompson LS, Brettin TS, Henrissat B, Wilson DB, McBride MJ. Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. *Appl Environ Microbiol*. **73**:3536-46.

Xu B, Wang Y, Li J & Lin Q (2008) Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Physiol Biochem*.

Xu J, Bjursell MK, Himrod J, *et al.* (2003) A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science* **299**: 2074-2076.

Xu J, Mahowald MA, Ley RE, *et al.* (2007) Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine. *PLoS Biol* **5**: e156.

Xu Q, Gao W, Ding SY, Kenig R, Shoham Y, Bayer EA, Lamed R (2003). The cellulosome system of *Acetivibrio cellulolyticus* includes a novel type of adaptor protein and a cell surface anchoring protein. *J Bacteriol*. **185**(15):4548-57.

Xu Q, Bayer EA, Goldman M, Kenig R, Shoham Y, Lamed R (2004). Architecture of the *Bacteroides cellulosolvens* cellulosome: description of a cell surface-anchoring scaffoldin and a family 48 cellulase. *J Bacteriol*. **186**(4):968-77.

Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, Dunn MJ (2000). A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*. **21**:3666-72.

Yoon KH, Yun HN & Jung KH (1998) Molecular cloning of a Bacillus sp. KK-1 xylanase gene and characterization of the gene product. *Biochem Mol Biol Int* **45**: 337-347.

Ziai SA, Larijani B, Akhoondzadeh S, *et al.* (2005) Psyllium decreased serum glucose and glycosylated hemoglobin significantly in diabetic outpatients. *J Ethnopharmacol* **102**: 202-207.

Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI & Gaskins HR (2004) Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr* **134**: 465-472.

Annexes

Annexe 1 : Tampons de solubilisation et d'IEF

Tampon de solubilisation :

Solution stock
Préparer ces solutions en utilisant des gants et un masque

Dans une fiole jaugée de 25 ml

Urée (7M) (PM=60.6)	10,5g
Thiourée (2M) (PM=76.12)	3.8g
CHAPS (4%)	1g
Triton X100 (0.24%)	60µl
DdH_2O qsp	25ml

Dissoudre sous agitation
Filtrer à 0.2µm
Aliquoter par 1ml et conserver à –20°C

Tampon IEF
Base = 1ml Tampon de solubilisation

Ajouter extemporanément :

+ 3mg DTT (0.3% ou 20mM final, PM= 154.2)
+ 2.5µl Ampholytes 4-6 à 40% (0.1% final)
+ 2.5µl Ampholytes 5-7 à 40% (0.1% final)
+ 2µl solution mère de bleu de bromophénol à 0.1% (10mg bleu/10ml H2O)

Annexe 2 : Solutions d'équilibration

Solution mère de Tris 10X : Tris 500mM pH 8.8

Tris base	1.25g
DdH_2O qsp	20ml

BASE des Solutions d'équilibration (pour 2 strip :40ml)

Base :

Solution mère de tris	4ml (C_f 50mM pH 8.8)
Urée	14.4g (C_f 6M)
Glycérol	12ml (C_f 30%)
SDS	800mg (C_f 2%)
DdH_2O	13.4ml

Solution d'équilibration 1 :

Base	20 ml
DTT	400 mg (Cf 130 mM)

Solution d'équilibration 2 :

Base	20 ml
Iodoacétamide	500 mg (Cf 135 mM)
Bleu de bromophénol	400 µl à 0.1%

(C_f = concentration finale)

Annexe 3 : Protocole pour la révélation des gels au nitrate d'argent

Incuber le gel dans 250 ml de solution sous agitation :

1) 2 x 15 minutes dans la solution de fixation
2) 30 minutes dans la solution de sensibilisation
3) 3 x 5 minutes à l'eau distillée
4) 20 minutes dans la solution d'argent
5) 2 x 10 minutes dans de l'eau distillée
6) 7 minutes dans la solution de développement
7) 10 minutes dans la solution STOP
8) 3 x 5 minutes à l'eau distillée

A) Solution de fixation

500ml H_2O dist
100ml Acide acétique
400ml Méthanol

B) Solution de sensibilisation

Peser :
2g de thiosulfate de Na
68g d'acétate de Na
qsp 700ml H_2O dist
Ajouter 300ml Méthanol

C) Solution d'argent

Mettre des gants
Peser :
2.5g de nitrate d'argent
qsp 1l

D) Solution de développement

Peser :
25g de Na_2CO_3 (Carbonate de sodium)
qsp 1l
(ajouter extemporanément 100µl de formadéhyde pour 250ml de cette solution)

E) Solution STOP

Peser :
14.6g d'EDTA
qsp 1l

Faire toutes ces solutions dans une éprouvette de 1 litre + barreau aimanté
Puis transvaser dans bouteilles de 1l (bouchons bleus)
Stocker à 4°C

Chez l'Homme, les parois végétales contenues dans les fibres alimentaires sont dégradées puis fermentées par les bactéries fibrolytiques du côlon. Le xylane étant l'un des principaux polysaccharides constituant ces parois végétales, deux bactéries possédant de fortes activités xylanolytiques, *Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T et *Roseburia intestinalis* XB6B4, ont été caractérisées. Les activités xylanolytiques de ces espèces vis-à-vis de différents substrats riches en xylanes ont été analysées quantitativement et qualitativement. Ces deux espèces dégradent et fermentent très efficacement ces substrats, mais les colonisent différemment. L'équipement enzymatique de ces souches, comparé par zymogramme, révèle un grand nombre de xylanases dont la masse molaire varie de 37 kDa à 170 kDa. Les activités spécifiques des extraits protéiques des deux bactéries sont très élevées et sont majoritairement associées aux cellules. Les gènes codant pour les xylanases de ces deux espèces bactériennes et d'une troisième bactérie xylanolytique du côlon, *Bacteroides* sp. XB12B, ont été identifiés. Ils codent pour des xylanases appartenant aux familles 10 et 43 des glycosyl-hydrolases, et sont modulaires. Certaines xylanases ont aussi été identifiées par protéomique. Les conditions d'expression de certains de ces gènes ont été étudiées par PCR quantitative, et montrent une régulation par le xylane. Des regroupements de gènes pouvant être impliqués dans la dégradation des hémicelluloses ont été trouvés dans le génome de *B. xylanisolvens* XB1A. Enfin, une xylanase de 38 kDa, de la famille 10 des glycosyl hydrolases, produite par *B. xylanisolvens* XB1A^T, a été caractérisée : le gène codant cette enzyme a été cloné et la xylanase, nommée Xyn10A, produite chez *E. coli*. Cette enzyme, qui pourrait être périplasmique chez *B. xylanisolvens* XB1A^T, dégrade *in vitro* les xylanes et les xylooligosaccharides, mais aussi très faiblement la CMC. Ces travaux permettent de mieux comprendre les mécanismes de dégradation des xylanes par deux espèces appartenant aux genres majeurs du côlon humain *Bacteroides* et *Roseburia*, et représentent une avancée significative dans la connaissance de leurs rôles respectifs dans cet écosystème.

Dietary fibres of plant cell walls are degraded and fermented by fibrolytic bacteria in the human gut. Xylan being one of the major polysaccharides constituting the plant cell walls, we have characterised two bacteria presenting important xylanolytic activities: *Bacteroides xylanisolvens* XB1A^T and *Roseburia intestinalis* XB6B4. The xylanolytic activities of these species grown on various substrates rich in xylan were analysed qualitatively and quantitatively. The two bacteria degraded and fermented all the substrates tested very efficiently, but they colonised them differently. The enzymatic system of these strains, studied by zymogram, revealed a large number of xylanases of molecular mass comprised between 37 and 170kDa. Specific activities of protein extracts were very high, and were mainly associated with the bacteria. The xylanase-encoding genes of the two bacteria studied, and of another xylanolytic bacterium, *Bacteroides* sp. XB12B, were identified. They encode xylanases from glycoside-hydrolase families 10 and 43, and are modular. Some xylanases were also identified by proteomics. The conditions for expression of some of the genes were studied by quantitative PCR, and showed a regulation by xylan. Several clusters of genes predicted to code for hemicellulases were found in the genome of *B. xylanisolvens* XB1A^T. Finally, a 38kDa GH10 xylanase produced by *B. xylanisolvens* XB1A^T, named Xyn10A, was characterized. The *xyn10A* gene was cloned and expressed in *E. coli*. The recombinant Xyn10A was very active against xylan and xylooligosaccharides, and also showed a weak CMC activity. Xyn10A may be periplasmic in *B. xylanisolvens* XB1A^T. This work represents a major contribution to our knowledge of the mechanisms of xylan degradation by representatives of the *Bacteroides* and *Roseburia* genera, and also a progress in assessing their respective roles in the human colon ecosystem.