

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب
Université D'ain Témouchent Belhadj Bouchaib
Faculté des Sciences et de Technologie
Département de Biologie



Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention du diplôme de Master en: Biochimie
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie
Thème

**Caractérisation *in silico* de 1,4- β -xylanase de *Clostridium*
*paraputrificum***

Présenté Par :

- 1) M. BOUZID DAHO Ilies
- 2) M. ANTAR Mohamed El Amine

Devant le jury composé de :

Dr. AMARA Mohamed	MCA	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Président
Dr. BENHABIB Ouassila	MCA	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Examinateur
Dr. BAKLI Mahfoud	MCA	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Encadrant

Année Universitaire 2022/2023

Remerciements

En premier lieu, nous exprimons notre gratitude envers ALLAH pour nous avoir accompagnées dans notre cheminement et pour nous avoir aidées à atteindre cette étape.

Nous profitons de cette occasion solennelle pour exprimer notre sincère reconnaissance à tous les enseignants et les enseignantes qui nous ont guidées, soutenues, accompagnées et qui ont suivi nos progrès jusqu'à cette étape. Nous leur sommes profondément redevables.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements à notre encadreur, M. BAKLI Mahfoud, pour sa patience, ses conseils éclairés et sa contribution à notre réflexion, malgré ses charges considérables et nombreuses.

Nous remercions les membres du jury, **M. AMARA Mohamed, Mme. BENHABIB Ouassila** et **M. BAKLI Mahfoud**, pour avoir accepté d'évaluer notre travail et nous avons été honorés par leur présence.

Enfin, nous souhaitons exprimer notre gratitude à toutes les personnes qui nous ont soutenues, conseillées et qui ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de notre modeste mémoire de fin d'études en Master de Biochimie. Que nos remerciements leur parviennent, qu'ils soient proches ou lointains.



Dédicace

Je tiens à remercier ALLAH, qui je sens toujours est à côté de moi

Je dédie ce travail à mes parents, à moi-même et à ma famille

et à toutes les personnes qui m'ont soutenu.

M. BOUZID DAHO Ilies





Dédicace

Je dédie ce modeste travail avec l'amour et le respect à :

*Mon cher père et ma chère mère, les parents les plus gentils de terre,
qui ont éclairé mon chemin, qui m'ont encouragé et soutenu tout au
long de mes études.*

Je remercie également M. Mahfoud Bakli

À Tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

M. ANTAR Mohamed El Amine



Tableau des matières

Liste des figures.....	9
Liste Des Tableaux.....	11
Liste des abréviations.....	12
Introduction.....	15

Revue bibliographique

1 Xylane.....	18
1.1 Définition du xylane.....	18
1.2 Synthèse du xylane.....	18
1.2.1 Glycosyltransférases et autres enzymes impliquées dans la synthèse du xylane	20
1.2.2 Glycosyl hydrolases impliquées dans la synthèse du xylane	21
1.3 Structure et distrubition du xylane	22
1.4 L'hydrolyse enzymatique du xylane	23
1.4.1 1,4- β -xylanases (EC 3.2.1.8)	24
1.4.2 β - Xylosidases (EC 3.2.1.37).....	25
1.4.3 á - Glucuronidases (EC 3.2.1.1)	25
1.4.4 á – L-Arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55)	25
1.4.5 Esterases (EC 3.1.1.6).....	25
2 1,4-β-Xylanase	26
2.1 Définition	26
2.2 Structure et mode action.....	26

2.3	La différence entre la xylanase et 1,4- β -xylanase	26
2.4	Classification de xylanase	27
2.4.1	Les familles GH10 et GH11	28
2.4.2	Les familles GH5, GH7, GH8 et GH43.....	29
2.5	production de xylanase.....	30
2.6	Utilisations industrielles des xylanases	32
2.6.1	Industrie des pulpes et papiers.....	32
2.6.2	Industrie alimentaire	32
2.6.3	Aliments pour animaux	33
2.6.4	Production de biocarburants	33
3	<i>Clostridium paraputrificum</i>.....	34
3.1	Définition.....	34
3.2	Historique.....	34
3.3	Cractéristiques.....	35
3.3.1	Morphologie	35
3.3.2	Écologie.....	36
3.3.3	Pathogénèse	36
3.4	Production de xylanase par <i>Clostridium paraputrificum</i>	36

Matériel et méthodes

1.	Récupération des séquences protéiques	39
2.	Analyse des propriétés physico-chimiques	39
3.	Prédiction de la solubilité protéique.....	40
4.	Analyse de la structure secondaire.....	40

5.	Analyse de la structure tertiaire	40
5.1	Prédiction de la structure tertiaire	40
5.2	Raffinement	41
5.3	Validation	41
6.	Analyse fonctionnelle	41
6.1	Interactions protéine-protéine.....	41
6.2	Recherche de motifs protéiques	41
6.3	Analyse du site actif	41

Résultats et discussion

1.	Analyse des structures primaires.....	43
2.	Analyse des propriétés physico-chimiques	43
3.	Prédiction de la solubilité protéique.....	44
4.	Prédiction de la structure secondaire	44
5.	Analyse de la structure tertiaire	46
5.1	Prédiction de la structure tertiaire	46
5.2	Raffinement	46
5.3	Validation	47
6.	Analyse fonctionnelle.....	48
6.1	Interactions protéine-protéine.....	48
6.2	Recherche de motifs protéiques	50
6.3	Analyse du site actif	51

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives.....	54
Références bibliographiques.....	56
Résumé.....	64

Liste des figures

Figure 1 : Mécanisme de biosynthèse et d'acétylation du xylane	20
Figure 2 : la synthèse du xylane dans l'appareil de golgi par des protéines membranaires de type II ancrées par un seul domaine transmembranaire N-terminal et avec leurs domaines catalytiques dans la lumière de Golgi.....	21
Figure 3 : a) Structure du xylane et sites de son attaque par des enzymes xylanolytiques. L'épine dorsale du substrat est composée de résidus de xylose liés au 1,4- β . Ac., groupe acétyle; α -araf. α -arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcUA, α -4-O-méthylglucuronic acide; pco / (b) Hydrolyse du xylo-oligosaccharide par la β -xylosidase. (Collins <i>et al.</i> , 2005).	22
Figure 4 : Structure du xylane montrant les liaisons qui sont attaquées par l'enzyme xylanolytique spécifique pour l'hydrolyse complète du xylane à ses constituants (Bhardwaj <i>et al.</i> , 2019).	23
Figure 5 : Démonstration de l'hydrolyse de xylane complexe en xylose par des xylanases (Richhariya <i>et al.</i> , 1992).	24
Figure 6 : Classification et caractéristiques des familles GH de β -xylosidases et selon la base de données CAZy (Saavedra-Bouza <i>et al.</i> , 2022) modifié.	28
Figure 7 : La xylanase comme outil écologique dans différentes industries (Bhardwaj <i>et al.</i> , 2019).	34
Figure 8 : Coloration de Gram de l'hémoculture montrant des bâtonnets Gram-positifs avec des spores. (Shinha and Hadi, 2015).	35
Figure 9: Prédiction de la structure secondaire de 1,4- β -xylanase de <i>C. parapatrificum</i> (A0A174B8H3) par le serveur PSIPRED 4.0 . (A) Représentation graphique. (B) Diagramme d'annotation de séquence.....	45
Figure 10: Structure 3D prédite de 1,4- β -xylanase de <i>C. parapatrificum</i> (A0A174B8H3) produite par SWISS-MODEL, raffinée par le serveur ModRefiner et visualisée par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.5.4.....	47
Figure 11 : Validation de la structure par le diagramme de Ramachandran du modèle de 1,4- β -xylanase de <i>C. parapatrificum</i> (A0A174B8H3) de PROCHECK (serveur SAVE v6.0)..	48
Figure 12: Analyse du réseau d'interaction protéine-protéine pour 1,4- β -xylanase de <i>C. parapatrificum</i> (A0A174B8H3) détectée via la base de données STRING	49
Figure 13: Résultat du MOTIF finder montrant le motif fonctionnel de 1,4- β -xylanase de <i>C. parapatrificum</i>	51

Figure 14: Sites de liaison des ligands de 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum* (A0A174B8H3) prédits par COFACTOR et visualisés par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.5.4..52

Liste des tableaux

Tableau 1: Montrant la xylanase produite par les bactéries à des paramètres optimisés (Richhariya <i>et al.</i> 1992).	30
Tableau 2: Montrant la xylanase produite par les champignons à des paramètres optimisés (Richhariya <i>et al.</i> 1992)	31
Tableau 3: Caractérisation de la séquence récupérée de 1,4- β -xylanase de <i>Clostridium paraputrificum</i>	43
Tableau 4: Caractérisation de la séquence récupérée de 1,4- β -xylanase de <i>Clostridium paraputrificum</i>	43
Tableau 5: Score hydrophobe et position de 1,4- β -xylanase de <i>Clostridium paraputrificum</i> à l'aide de l'outil ProtScale.	44
Tableau 6: Prédiction de la structure tertiaire de 1,4- β -xylanase de <i>C. paraputrificum</i> par SWISS-MODEL.	46
Tableau 7: La validation de la prédiction de la structure tertiaire originale et raffinée de 1,4- β -xylanase de <i>C. paraputrificum</i> par les diagrammes de Ramachandran.	48
Tableau 8: Partenaires protéiques fonctionnels prédits de xylanase de <i>C. paraputrificum</i> (A0A174B8H3).....	50

Liste des abréviations

C. paraputrificum: *Clostridium paraputrificum*

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

FASTA: FAST Alignment

UniProt : The Universal Protein resource

PDB: Protein Data Bank

PDB ID: Protein Data Bank Identifiant

Å: ångström

Per. identity: Percentage identity

Max, Min: Maximum, Minimum

ExpPASy: Expert Protein Analysis System

SOPMA: Self Optimized Prediction Method with Alignment

PSIPRED: PSI-BLAST-based secondary structure PREDiction

SWISS-MODEL: Le serveur de modélisation homologue de structures protéiques entièrement automatisé, accessible via le serveur web Expasy, ou à partir du programme DeepView (Swiss Pdb-Viewer).

STRING: Search Tool for the Retrieval of Inter-acting Genes/Proteins

GH: Glycosides hydrolases

GTs : Glycosyltransférases

XOATs : Oacétyltransférases du xylane

TBL : Trichome Birefringence Like

GlcA : Acide galactopyranoside

GXMT / GXM : Glucuronoxylane methyltransferase

UDP : L'uridine diphosphate

IRX10/9/14 : Xylème irrégulier 10/9/14

XYS1 : Xylane Synthase 1

RWA : Acétylation réduite du parois

GT43 : Glycosyltransférase Famille

GlcA : Acide glucoranique

GUX 1/GUX2 : Acide glucuronique du xylane1/2

UXE : UDP-Xyle

UXS : UDP-Xyle Synthase

UGE : UDP-Glc

RGP : Protéine mutase Réversiblement glycosylée

HMWLI : Poids moléculaire élevé avec un faible point isoélectrique

LMWHI : Faible poids moléculaire avec un point isoélectrique élevée

CAZy: Carbohydrate-Active Enzymes database

aa: Acide aminé

kDa: Kilo Dalton

GRAVY: Grand average of hydropathicity

pI: Isoelectric point

pH: Potentiel d'Hydrogène

EC: Extinction coefficient

II: Instability index

AI: Aliphatic index

-R: Nombre des résidus négatifs (acide aspartique et acide glutamique)

+R: Nombre des résidus positifs (arginine et lysine)

3D : Tridimensionnelle

Introduction

Les xylanases sont des enzymes hydrolytiques basées sur des propriétés physico-chimiques, structure, mode d'action et les spécificités du substrat et sont classées en diverses familles glycosides hydrolases (GH) (Mendonça *et al.*, 2023). 1,4- β -xylanase est une enzyme qui dégrade le xylane, un composant majeur des parois cellulaires végétales (Chaudhary *et al.*, 2023). Malgré les recherches approfondies sur les microorganismes producteurs de 1,4- β -xylanase, relativement peu d'études ont été menées sur la caractérisation de cette enzyme dans le genre *Clostridium* (Rogers *et al.*, 1992; Kosugi *et al.*, 2002; Zverlov *et al.*, 2005; Ng *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2021). Ainsi, la bactérie *Clostridium paraputrificum* a été choisie pour cette étude en raison de son potentiel biotechnologique lié à la production de l'enzyme, la 1,4- β -xylanase.

En effet, en raison de leur capacité à catalyser les réactions d'hydrolyse, d'estérification et de transestérification, les xylanases sont également des enzymes multifonctionnelles avec de nombreuses applications industrielles; dans le domaine de l'industrie des pulpe et papiers et l'industrie alimentaire, les aliments pour animaux, la production de biocarburants et bien d'autres (Laguna, 2019). Afin de faciliter l'intégration optimale des enzymes de xylanase dans les processus industriels à grande échelle, il est essentiel de comprendre en détail le mécanisme d'action enzymatique.

1,4- β -xylanase (E.C 3.2.1.8) appartient à la famille des glycosides hydrolases (GH10) qui contient aujourd'hui plus de 7626 entrées dans la base de données Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy, www.cazy.org). Il existe seulement 10 structures protéiques tridimensionnelles résolues de 1,4- β -xylanase et qui sont disponibles dans cette base de données dont 365 sont caractérisées (base de données de CAZy consultée le 15/05/2023).

En raison de l'importance de la structure et de la fonction des xylanases bactériennes et de la difficulté des techniques expérimentales telles que la cristallographie aux rayons X ou la résonance magnétique nucléaire (RMN) pour identifier la structure tertiaire des protéines, en raison de la longue durée et le cout élevé, ainsi que de leur inadéquation pour certaines protéines (Bakli *et al.*, 2020), durant les dernières décennies, la modélisation structurale par homologie et l'analyse *in silico* ont bénéficié de l'utilisation d'outils bioinformatiques qui offrent ainsi une approche alternative pour prédire la structure 3D des protéines et pour examiner les caractéristiques qui y sont liées, en termes de structure et de fonction, avec une validation améliorée (Dahlström, 2015; Mohamad Sobri *et al.*, 2020; Hoda *et al.*, 2021).

Dans cette étude, nous avons utilisé une approche *in silico* pour examiner les propriétés physicochimiques générales ainsi que la structure primaire, secondaire et tertiaire de 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum*. De plus, nous avons effectué une analyse

fonctionnelle qui comprenait l'étude des interactions protéine-protéine, la recherche de motifs et l'analyse du site actif de cette enzyme.

Revue
Bibliographique

1 Xylane

1.1 Définition du xylane

Le xylane est une structure majeure polysaccharide qui se trouve dans les cellules végétales, et aussi est le deuxième polysaccharide le plus abondant dans la nature (Bhardwaj *et al.*, 2019). Il est le composant le plus important pour l'hémicellulose qui est un complexe de glucides polymériques composé du xylane, xyloglucane, glucomannane, galactoglucomannane et d'arabinogalactane et représente environ un tiers du carbone organique renouvelable sur la terre (Shallom and Shoham, 2003). Ces derniers avec la cellulose (1,4- β -glucane) et la lignine (un polyphénol complexe composé) constituent les principaux constituants polymériques des parois cellulaires végétales qui sont en contact par des liaisons covalentes et non covalentes avec le xylane qui se trouve à l'interface entre la lignine et la cellulose, et assure la cohésion des fibres et l'intégrité de la paroi cellulaire (Beg *et al.*, 2001).

Le xylane est le polysaccharide hémicellulosique le plus abondant. Il constitue jusqu'à 30 % de la paroi cellulaire des plantes annuelles, 15 à 30 % des feuillus et 7 à 10 % des résineux (Singh *et al.*, 2003).

1.2 Synthèse du xylane

Le xylane est synthétisé dans l'appareil de Golgi grâce à l'activité concertée de plusieurs classes d'enzymes (Smith *et al.*, 2017). Les glycosyltransférases (GTs) catalysent la formation des liaisons glycosidiques du squelette et des substituants de sucre, les groupements acétyle sont ajoutés par les oacétyltransférases du xylane (XOATs) de Trichome Birefringence Like (TBL) et le GlcP4 est méthyléthérifié par le glucuronoxylane enzymes méthyltransférases (GXMT / GXM) (Laouana *et al.*, 2021). Chacun de ces processus dépend d'un apport de substrats donneurs et du transit requis dans la lumière de Golgi à partir du cytosol (Ebert *et al.*, 2015). En effet, de nombreuses lignées mutantes présentant des anomalies de la paroi cellulaire ont été trouvées défectueuses dans les transporteurs membranaires de Golgi ou des enzymes responsables du métabolisme du substrat, plutôt que les enzymes directement impliquées dans la synthèse. Les glycosyltransférases impliquées dans la synthèse du xylane utilisent des sucres liés à l'uridine diphosphate (sucres UDP) comme substrats donneurs (Curry *et al.*, 2023).

La biosynthèse du xylane parmi les hémicelluloses unique car le squelette est synthétisé dans la lumière de Golgi par des glycosyltransférases. Il a été confirmé

biochimiquement que le xylane irrégulier 10 (IRX10) ou la xylane synthase 1 (XYS1) ont une activité β -1,4 xylosyltransférase (Jensen *et al.*, 2014) (Figure 1).

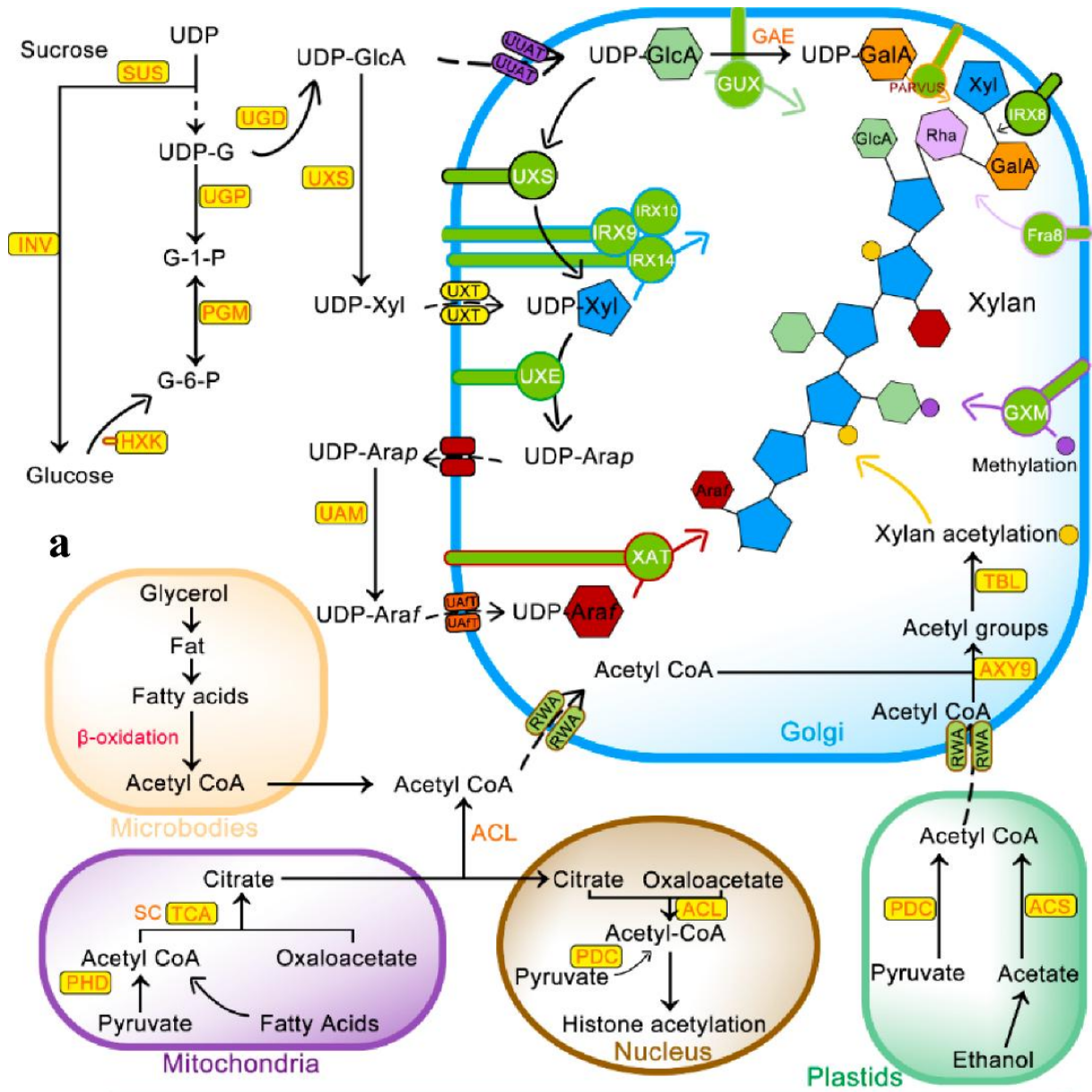


Figure 2 : la synthèse du xylane dans l'appareil de golgi par des protéines membranaires de type II ancrées par un seul domaine transmembranaire N-terminal et avec leurs domaines catalytiques dans la lumière de Golgi.

Certaines protéines, telles que IRX10, devraient manquer d'un domaine transmembranaire. Les substrats sont synthétisés à la fois dans le cytosol et dans la lumière. L'UDP-GlcA est transporté dans le Golgi par un transporteur inconnu et converti en UDP-Xyle par l'UDP-Xyl Synthase (UXS). Une autre isoforme d'UXS est présente dans le cytosol, et l'UDP-Xyle synthétisé là peut également être transporté dans le Golgi. Les flux relatifs à travers ces deux voies distinctes sont inconnus. L'UDP-Xyle est converti en UDP-Arap à l'intérieur du Golgi par l'épimérase UDP-Xyle (UXE) et l'UDP-Arap est converti en UDP-Araf par la protéine mutase réversiblement glycosylée (RGP), située sur la membrane externe de Golgi. Vraisemblablement, les transporteurs doivent déplacer UDP-Arap hors et UDP-Araf dans le Golgi, mais ces transporteurs n'ont pas encore été identifiés. Certaines isoformes de l'épimérase cytoplasmique UDP-Glc (UGE) peuvent également contribuer à la conversion de l'UDP-Xyle en UDP-Arap. Les acyltransférases BAHD dans le cytosol sont impliquées dans la synthèse du xylane et transfèrent vraisemblablement l'acide férulique à un intermédiaire, tel que l'UDP-Araf, qui est ensuite transporté dans le Golgi et transféré sur le xylane par des protéines inconnues. L'acétate est probablement ajouté au xylane par la protéine Trichome Birefringence-like 29 (TBL29). Les protéines d'acétylation de paroi réduite (RWA) sont également impliquées dans l'acétylation et peuvent servir de transporteurs d'acétyl-CoA. L'adénosylméthionine S, le substrat de la méthylation du xylane, est synthétisé dans le cytosol et doit également être transporté dans la lumière. Non représentés sont des transporteurs de coproduits tels que le CoA et la S - adénosyl homocystéine, qui doivent être éliminés du Golgi et recyclés dans le cytosol. L'UMP est éliminée du Golgi par les transporteurs de sucre nucléotidique, qui fonctionnent comme des antiporteurs (Rennie and Scheller, 2014).

1.2.2 Glycosyl hydrolases impliquées dans la synthèse du xylane

Le xylane d'herbe en général contient moins de branches dans le tissu plus âgé, on pourrait s'attendre à ce que les glycosyl hydrolases soient impliquées dans la modification des substitutions de xylane en tant que plante mature. Les extraits de plantes présentent des activités trans- β -xylanase, xylosidase et arabinosidase, indiquant que les plantes modifient leur xylane après synthèse (Franková and Fry, 2011). Les Glycosyl hydrolases sont également impliquées dans la formation de dicot xylane: xylanase, les xylosidases sont impliquées dans le remodelage du xylane, et une β -xylosidase a été proposé pour jouer un rôle dans la flexion

de la tige et la formation du bois de tension chez le peuplier en remodelant le xylane (David, 2017).

1.3 Structure et distribution de xylane

Un hétéropolysaccharide complexe et hautement ramifié, le xylane varie en structure entre différents espèces végétales, et la chaîne de squelette homopolymère des unités β -D-xylopyranosyle liées en 1,4 peut être substituée à des degrés divers par du glucuronopyranosyle, du 4-O-méthyl-D-glucuronopyranosyle, groupes α -L-arabinofuranosyle, acétyle, féruloyle ou p-coumaroyle à chaîne latérale (Kulkarni *et al.*, 1999) (Figure 3).

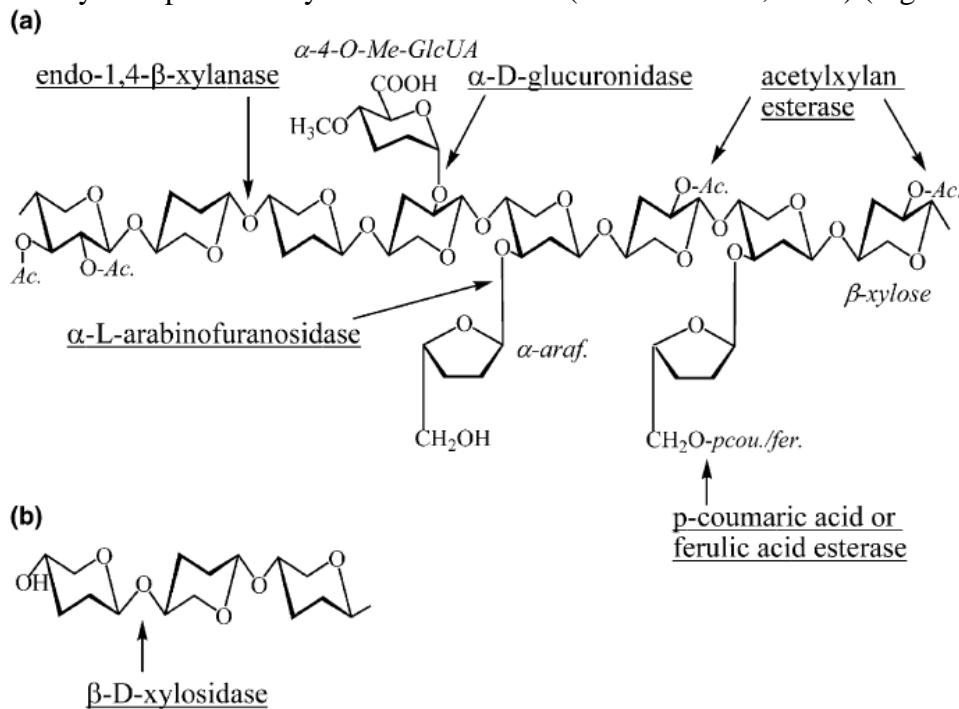


Figure 3 :a) Structure du xylane et sites de son attaque par des enzymes xylytiques. L'épine dorsale du substrat est composée de résidus de xylose liés au 1,4- β . Ac., groupe acétyle; α -araf. α -arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcUA, α -4-O-méthylglucuronic acide; pco / (b) Hydrolyse du xylo-oligosaccharide par la β -xylosidase (Collins *et al.*, 2005).

Le xylane est distribué dans plusieurs types de tissus et de cellules et est présent dans une variété d'espèces de plantes (Kulkarni *et al.*, 1999). Du xylane linéaire non substitué a également été souligné dans l'alfa herbe, tabac et certaines algues marines (Barry and Dillon, 1940). Ces dernières contenant du xylopyranosyle résidus liés par des liaisons 1,3- β et 1,4- β (Percival and Chanda, 1950). Similaire aux autres polysaccharides d'origine végétale, le xylane a une grande polydiversité et polymolécularité, le degré de polymérisation dans les xylanes est également variable (Sunna and Antranikian, 1997).

1.4 L'hydrolyse enzymatique du xylane

En raison de l'hétérogénéité et de la nature chimique complexe du xylane, sa dégradation complète nécessite l'action d'un complexe d'enzymes hydrolytiques aux spécificités et modes d'action divers. Ainsi, il est compréhensible que les cellules impliquées dans la dégradation du xylane produisent une variété de protéines spécialisées dans la dégradation des polymères (Auer, 2016).

Le système enzymatique xylanolytique qui réalise l'hydrolyse du xylane est normalement composé d'un complexe d'enzymes hydrolytiques, y compris l'endoxylanase (endo-1,4- β -xylanase, CE 3.2.1.8), β -xylosidase (xylane-1,4- β -xylosidase, CE 3.2.1.37), α -glucuronidase (α -glucosiduronase, CE 3.2.1.139), α -arabinofuranosidase (α -larabinofuranosidase CE 3.2.1.55), glucuronidase (α -glucosiduronase, CE 3.2.1.139), α -arabinofuranosidase (α -larabinofuranosidase, EC. 3. 2. 1. 55) et l'acétylxylane estérase (E. C. 3.1.1.72) (Ammarkhodja and Djafour, 2017; Beg *et al.*, 2001). Toutes ces enzymes agissent en coopération pour la conversion du xylane en ses sucres constitutifs (MERDOUD and MAKHLOUF, 2020). Les endoxylanases sont les xylanases les plus importantes en raison de leur implication directe dans le clivage des liaisons glycosidiques et en libérant des xylooligosaccharides courts (Ammarkhodja and Djafour, 2017) (Figure 4).

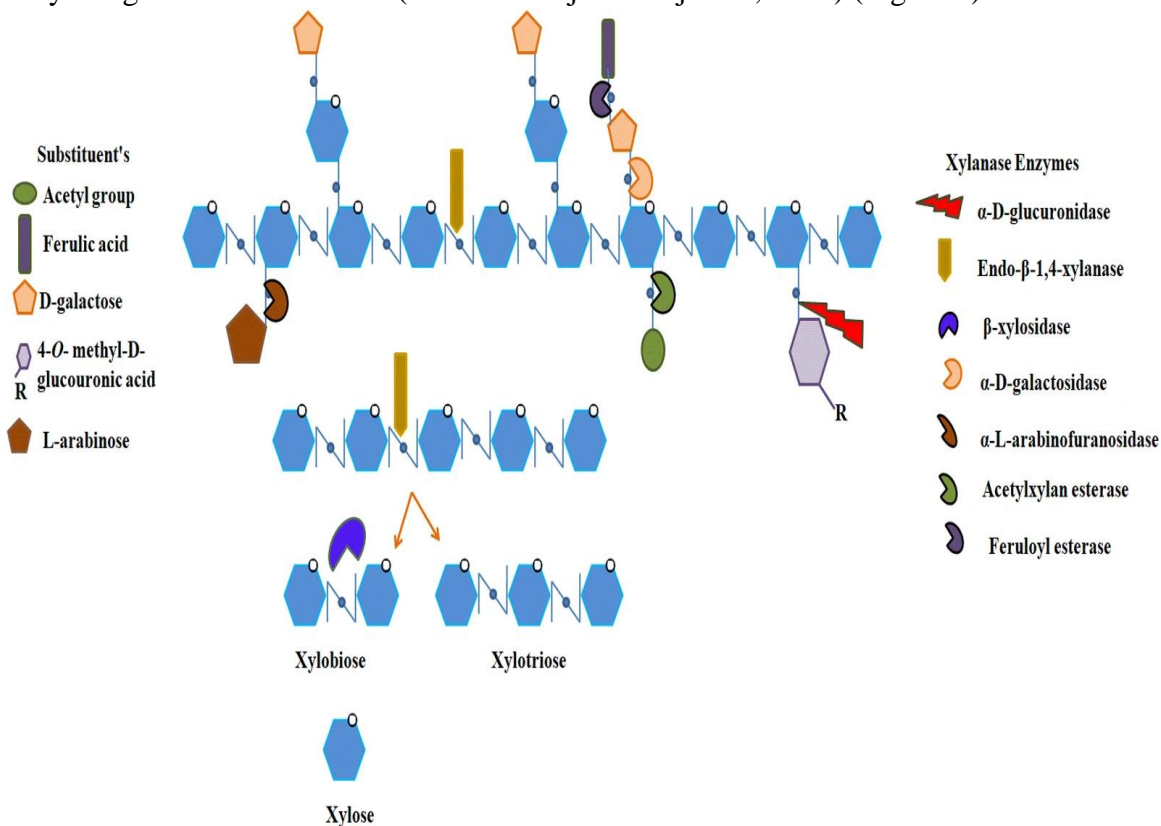


Figure 4 :Structure du xylane montrant les liaisons qui sont attaquées par l'enzyme xylanolytique spécifique pour l'hydrolyse complète du xylane à ses constituants (Bhardwaj *et al.*, 2019).

Le xylane, étant un polymère de masse moléculaire élevée, ne peut pas pénétrer dans la paroi cellulaire. Les fragments de faible masse moléculaire jouent un rôle clé dans la régulation de la biosynthèse des xylanases. Ces fragments comprennent le xylose, le xylobiose, les xylooligosaccharides, les hétérodisaccharides du xylose et glucose et leurs isomères positionnels (Beg *et al.*, 2001). Ces molécules sont libérées du xylane par l'action de petites quantités d'enzymes produites de manière constitutive (Czerwicz, 2020). La xylanase catalyse l'hydrolyse aléatoire du xylane en xylooligosaccharides, tandis que la β -xylosidase libère des résidus de xylose à partir des extrémités non réductrices des xylooligosaccharides. Cependant, une dégradation complète nécessite l'action synergique de l'acétyl estérase pour éliminer les substituants acétyliques de la squelette D-xylose lié au β -1,4 du xylane (Alio, 2020) (Figure 5).

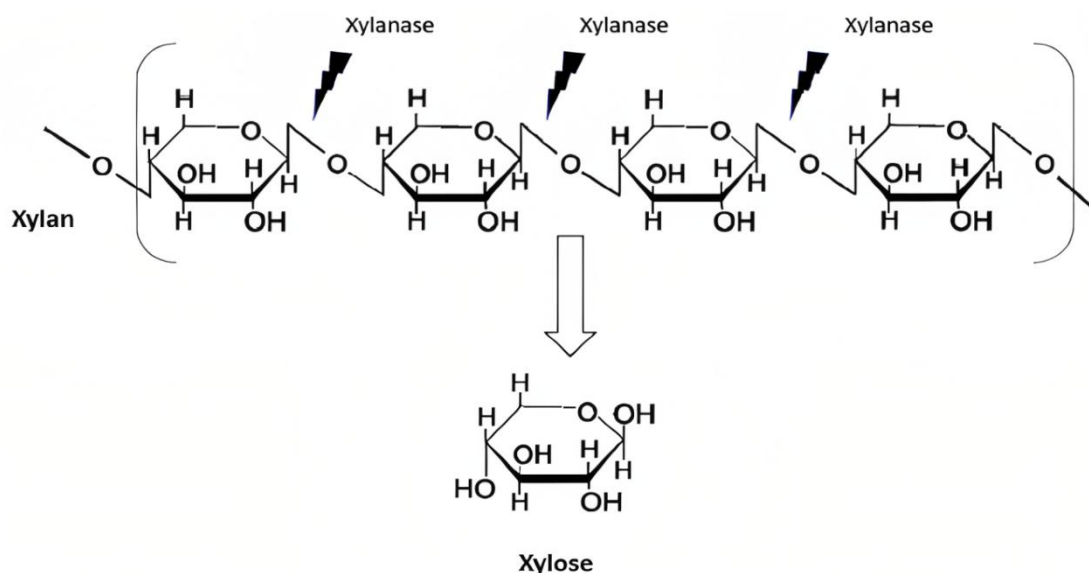


Figure 5 :Démonstration de l'hydrolyse du xylane complexe en xylose par des xylanases (Richhariya *et al.*, 1992).

1.4.1 1,4- β -xylanases (EC 3.2.1.8)

Des Différentes enzymes avec leurs fonctions respectives participent à l'hydrolyse du xylane qui le transforme en unités monomères, dont l'enzyme principale est les endo-ester-1, 4-xylanases (Richhariya *et al.*1992). Elles peuvent cliver les liaisons glycosidiques du xylane. Les endo-xylanases sont regroupées en deux catégories : débranchant (arabinose libérant) et non débranchant (arabinose non libérant) (Bastien-Uluis, 2012).

Ces enzymes peuvent être différenciées en fonction de leurs produits finaux qui sont libérés après dépolymérisation du xylane, par ex. xylose, arabinose, xylobiose et xylotriose. Ils peuvent être regroupés en deux familles GH10 et GH11. Les enzymes relèvent de la famille GH10 tandis que la famille G11 comprend uniquement des enzymes fongiques et

bactériennes (Lafond *et al.*, 2014). La famille GH10 est composée d'ester-1,4-endoxylanase en majorité avec peu de céram-1,3-endoxylanase. L'Endoxylanases de champignons et les bactéries sont exclusivement des protéines de sous-unités uniques qui varient largement en poids moléculaire de 8,5 à 85 kDa (Polizeli *et al.*, 2005).

1.4.2 β - Xylosidases (EC 3.2.1.37)

Une autre enzyme de débranchage du xylane qui appartient à la famille des hydrolases, on peut citer les exo-1,4-D-enménosidases qui hydrolysent les 1,4-D-seméno-xylooligosaccharides et xylobiose de l'extrémité non réductrice. Endoxylanases libèrent du xylose lors de la dégradation du xylane, mais ils ont aucune activité contre le xylobiose qui peut être facilement hydrolysé par les céramo-xylosidases. Ce sont des enzymes plus volumineuses ayant un poids moléculaire allant de 60 à 360 kDa et peut être des protéines monomères, dimères ou tétramères (Dar and Dar, 2021).

1.4.3 α - Glucuronidases (EC 3.2.1.1)

Les glucuronidases sont nécessaires pour cliver la liaison 1,2-glycosidique entre le xylose et l'acide D-glucuronique ou son éther 4-O-méthylque (Chellappan *et al.*, 2023). Leur poids moléculaire est moins de 100 kDa.

1.4.4 α – L-Arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55)

Les arabinofuranosidases ont la capacité de cliver la partie terminale non réductrice des arabinanes, arabinogalactanes et arabinoxyanes. Ces enzymes sont classées en deux groupes avec leur mode spécifique d'action: exo-enanthate-L-arabinofuranoside (EC 3.2.1.55) qui est actif contre les p-nitrophényl- α -L-arabinofuranosidases et sur les arabinans ramifiés où comme arabinans linéaires sont dégradés par l'endo-1,5-intérne-L-arabinase (EC 3.2.1.99) (Bouchat, 2022). La taille de cette enzyme peut atteindre jusqu'à 495 kDa et est également trouvée dans monomère, dimère, tétramère, hexamère et les formes octamériques (Richhariya *et al.*1992).

1.4.5 Esterases (EC 3.1.1.6)

Les estérases acétylxylanes rompent la liaison ester entre le xylose dans le xylane et l'acide acétique. Ils peuvent aussi débarrasser des acides phénoliques comme l'acide férulique (féruloyle estérase) et l'acide p-coumarique (p-coumaryl estérase). Panne d'acétylxylane, élimination du féruloyle et du p-coumaryle les groupes du xylane sont favorables à l'élimination de la lignine (Sharma and Sharma, 2017). Ils peuvent contribuer à la solubilisation de la lignine par hydrolyse les liaisons ester entre la lignine et les hémicelluloses (Richhariya *et al.*1992).

2 1,4- β -Xylanase

2.1 Définition

1,4- β -xylanase est une enzyme hydrolytique qui clive de manière aléatoire le squelette β 1,4 du polysaccharide de paroi cellulaire végétale complexe xylane (Bouchat, 2022). Il existe diverses formes des xylanases, présentant des repliements, des mécanismes d'action, des spécificités de substrat, des activités hydrolytiques (rendements, taux et produits) et des caractéristiques physico-chimiques variables (Bousmia and Maba, 2021).

Des microorganismes tels que les bactéries, actinomycètes, levures et les champignons produisent des enzymes, comme 1,4- β -xylanase qui est une enzyme de débranchement, capable d'hydrolyser les hémicelluloses. En effet, pour obtenir une compréhension complète des mécanismes de dégradation du xylane par les xylanases produites par ces microorganismes, ainsi que de leur potentiel pour être utilisées dans le bioblanchiment de la pulpe et la pâte, des études supplémentaires sont nécessaires. Les xylanases sont une alternative importante à l'utilisation de composés chlorés toxiques, qui présentent des risques environnementaux et de santé liés à la libération de halogènes organiques adsorbables (Walia *et al.*, 2017).

2.2 Structure et mode action

1,4- β -xylanase est une enzyme essentielle qui permet de décomposer le xylane, un composant majeur de l'hémicellulose, en sucres monomères. Cette dépolymérisation enzymatique nécessite l'action combinée de plusieurs enzymes, notamment 1,4- β -xylanase, la -xylosidase, la -glucuronidase, la -arabinofuranosidase et l'acétylxylane estérase. 1,4- β -xylanase et les -xylosidases jouent un rôle crucial dans la dégradation du xylane en coupant au hasard le squelette du xylane et en hydrolysant les xylo-oligosaccharides pour former des monomères de xylose (Basit *et al.*, 2020). Les autres enzymes sont responsables de l'élimination des groupes latéraux, tels que les groupes de glucuronide et d'arabinofuranose, ainsi que les groupes acétyle et ester de l'acide férulique et p-coumarique. Ces enzymes ont de nombreuses applications biotechnologiques dans la conversion de la biomasse en produits tels que les biocarburants et les produits chimiques renouvelables (Basit *et al.*, 2020).

2.3 La différence entre la xylanase et 1,4- β -xylanase

La principale différence structurale entre la 1,4-bêta-xylanase et la xylanase est l'emplacement du site catalytique. Dans la 1,4-bêta-xylanase, le site catalytique est situé au fond d'une fente profonde à l'extrémité C-terminale du repliement sous forme de tonneau (β/α)₈, alors que dans la xylanase, le site catalytique est situé à la surface de l'enzyme.

2.4 Classification de xylanase

Les xylanases, comme des glycosides hydrolases, sont capables de catalyser l'hydrolyse des glycosides liaison (β -1,4) des xylosides, conduisant à la formation d'un hémiacétal de sucre et à la correspondance aglycone libre (composé non sucré restant après le remplacement du glycoside par un atome d'hydrogène) (Brusa, 2015).

Les xylanases ont été classées d'au moins trois manières (Liu and Kokare, 2023) :

- à base du poids moléculaire, point isoélectrique (pI).
- à base de structure cristalline.
- à base des propriétés cinétiques ou la spécificité du substrat et le profil du produit.

La xylanase a été classée en deux groupes en fonction de sa masse moléculaire et de son point isoélectrique : HMWLI (poids moléculaire élevé, point isoélectrique bas) et LMWHI (poids moléculaire faible, point isoélectrique élevé). Cependant, certaines exceptions à cette classification ont été observées. Un système plus approprié incluant la structure primaire et la comparaison du domaine catalytique avec des caractéristiques mécanistiques a été introduit pour mieux comprendre la xylanase (Kennely and Rodwell, 2017).

En effet, les informations génomiques, la structure cristalline 3D et les informations fonctionnelles concernant la xylanase dans les familles GH sont disponibles dans la base de données CAZy dédiée aux enzymes glucidiques actives.

CAZy est une base de données hautement organisée et basée sur la connaissance des enzymes qui jouent un rôle clé dans la dégradation, la modification, et assemblage de liaisons glycosidiques dans les glucides et des glycoconjugués. Elle se compose de la génomique, l'annotation des séquences, les classifications familiales, des informations structurales (structures tridimensionnelles) et fonctionnelles sur enzymes actives sur les glucides, provenant de ressources accessibles au public, comme le Centre National d'Information sur la Biotechnologie (NCBI), UniProt, PDB et Brenda etc (Lombard *et al.*, 2014). En effet, les principales familles de GH associées à la xylanase sont 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51, et 62 (Figure 6).

Classification and characteristics of the GH families, according to the CAZy database						
	GH-1	GH-2	GH-3	GH-5	GH-10	GH-30
β-xylosidases	GH-A Retaining (β/α) ₈ 98% Bacteria 0,9% Archaea 0,8% Eukaryota	GH-A Retaining (β/α) ₈ 98% Bacteria 0,5% Archaea 1% Eukaryota	- Retaining (β/α) ₈ 99% Bacteria 0,5% Archaea 0,8% Eukaryota	GH-A Retaining (β/α) ₈ 95% Bacteria 0,9% Archaea 4% Eukaryota	GH-A Retaining (β/α) ₈ 96% Bacteria 0,6% Archaea 4% Eukaryota	GH-A Retaining (β/α) ₈ 97% Bacteria 0% Archaea 3% Eukaryota
	GH-39	GH-43	GH-51	GH-52	GH-54	GH-120
	GH-A Retaining (β/α) ₈ 98% Bacteria 0,5% Archaea 1% Eukaryota	GH-F Inverting 5-fold β-propeller 98% Bacteria 0,2% Archaea 1% Eukaryota	GH-A Retaining (β/α) ₈ 97% Bacteria 0,9% Archaea 2% Eukaryota	GH-O Retaining (α/α) ₆ 100% Bacteria 0% Archaea 0% Eukaryota	GH-B Retaining β-jelly roll 74% Bacteria 0% Archaea 26% Eukaryota	- Retaining Parallel β-helix 100% Bacteria 0% Archaea 0% Eukaryota
	GH-5	GH-6	GH-8	GH-10	GH-11	GH-26
	GH-A Retaining (β/α) ₈ 95% Bacteria 0,9% Archaea 4% Eukaryota	- Inverting (β/α) ₈ 9% Bacteria 0% Archaea 3% Eukaryota	GH-M Inverting (α/α) ₆ 100% Bacteria 0% Archaea 0% Eukaryota	GH-A Retaining (β/α) ₈ 96% Bacteria 0,6% Archaea 4% Eukaryota	GH-C Retaining β-jelly-roll 93% Bacteria 0,9% Archaea 6% Eukaryota	GH-A Retaining (β/α) ₈ 98% Bacteria 0,7% Archaea 1% Eukaryota
	GH-30	GH-43	GH-98			
GH-A Retaining (β/α) ₈ 97% Bacteria 0% Archaea 3% Eukaryota	GH-F Inverting 5-fold β-propeller 98% Bacteria 0,2% Archaea 1% Eukaryota	- Inverting (α/β) ₈ 100% Bacteria 0% Archaea 0% Eukaryota				
Endo-xylanases						

Figure 6 :Classification et caractéristiques des familles GH de β-xylosidases et selon la base de données CAZy (Saavedra-Bouza *et al.*, 2022) modifié.

2.4.1 Les familles GH10 et GH11

Les xylanases de la famille GH10 (ou famille G) ont une masse moléculaire faible avec un pI compris entre 8- 9. 5, tandis que ceux de la famille GH11 (ou famille F) ont une masse moléculaire élevée et plus faible valeurs pI (Bouchat, 2022). La famille des glycosides hydrolases 10 est composée d'endo-1,4-β-xylanases et d'endo-1,3-β-xylanases (CE 3.2.1.32). Les membres de cette famille sont également capables d'hydrolyser les β-glycosides d'aryle de xylobiose et de xylotriiose au niveau de la liaison aglyconique. De plus, ces enzymes sont hautement actives sur les xylooligosaccharides courts, indiquant ainsi de petits sites de liaison au substrat. Les analyses cristallines de structure, les analyses cinétiques de l'activité sur des xylooligosaccharides de différentes tailles et les analyses du produit final ont indiquées que les xylanases de la famille 10 ont généralement quatre à cinq sites de liaison au substrat (Soumaya, 2014). Les membres de cette famille ont généralement une masse moléculaire élevée et un faible pI (Belghait and Nedjhioui, 2019).

Les membres de la famille GH11 présentent plusieurs propriétés intéressantes, telles que la sélectivité élevée du substrat et l'efficacité catalytique élevée, la petite taille et la variété d'optimum des valeurs de pH et de température, ce qui les rend adaptés à diverses conditions et à de nombreuses applications (Paës *et al.*, 2012). La famille GH11 est composée uniquement des xylanases (EC 3.2.1.8), ce qui conduit à leur prise en compte en tant que "vraies xylanases", car elles sont exclusivement actives sur des substrats contenant du D-xylose. Les GH11 sont généralement caractérisées par un pI élevé, un faible poids moléculaire, un double déplacement mécanisme catalytique, deux résidus de glutamates qui agissent comme des résidus catalytiques et une structure de repliement *jelly rol*. (huit brins β arrangés en deux feuillets de quatre brins). En outre, les produits de leur action peuvent être hydrolysés par les enzymes de la famille GH 10 (Guyez, 2016).

Comme pour la famille GH10 de xylanase, ces enzymes peuvent hydrolyser l'aryle β -glycosides de xylobiose et de xylotriose au niveau de la liaison aglyconique, mais elles sont inactives sur l'aryle cellobiosides, ces enzymes similaires à la famille GH8 sont les plus actives sur les xylooligosaccharides (Collins *et al.*, 2005).

2.4.2 Les familles GH5, GH7, GH8 et GH43

La famille GH5 appartient au clan GH-A, qui regroupe actuellement 19 familles GH pour former le plus grand ensemble de familles GH apparentées sur le plan évolutif décrites dans CAZy jusqu'à présent (Aspeborg *et al.*, 2012). Les alignements structuraux entre les membres des familles GH5 et GH10 ont montré que ces enzymes sont aussi structurellement différentes au sein de la famille GH5 comme elles appartiennent à la famille GH10 des enzymes, les deux familles sont donc classées en clan GH-A. Le concept de clan ou de superfamille démontre une relation plus large entre familles de GHs, suggérant un ancêtre évolutif commun plus éloigné (Larson *et al.*, 2003). L'activité de ces enzymes est affectée par des substituants sur la chaîne principale du xylane, et il est incapable de cliver les liaisons adjacentes aux résidus substitués. Les études d'hydrolyse ont montré que les fragments substitués les plus courts formés à partir de glucuronoxylane et les arabinoxylanes sont des xylotrioses substituées, la substitution se trouve sur la partie interne du résidu de xylose. Par conséquent, les produits générés par la famille GH5 sont plus courts que ceux produit par la famille GH7 (Collins *et al.*, 2005).

La famille GH8 (ou famille D) est composée de cellulases (EC 3.2.1.4) et contient également des chitosanases (EC 3.2.1.132), des lichénases (EC 3.2.1.73) et des endo-1,4- β -xylanases (EC 3.2.1.8). Cette famille de xylanase hydrolyse le xylane en xylotriose et

xylotétraose et est la plus active sur les oligosaccharides xyloïques à longue chaîne comme les xylanases de la famille GH11, une grande fente de liaison au substrat contenant au moins six résidus de liaison au xylose, avec le site catalytique au milieu, a été proposée (Collins *et al.*, 2002). Cependant, contrairement aux xylanases des familles GH10 et GH11, les enzymes de la famille 8 se sont avérées catalyser l'hydrolyse avec l'inversion de la configuration anomérique et dans les conditions utilisées (Collins *et al.*, 2005).

Les familles de GH7 et GH43 ne contiennent que quelques enzymes présentant une activité xylanase qui ont été identifiées et étudiées. La famille GH7 a des caractéristiques communes avec les xylanases des familles GH10 et la famille GH11 qui ressemble à la famille précédente, la famille GH7 ont un poids moléculaire élevé et un faible pI, ainsi qu'un petit site de liaison au substrat, contenant environ quatre sous-sites, avec le site catalytique au milieu (Collins *et al.*, 2005).

2.5 production de xylanase

Pour répondre à des besoins industriels spécifiques, une xylanase optimale devrait avoir des propriétés spécifiques, telles que la stabilité sur une large gamme de valeurs de pH et de températures, une activité spécifique élevée et une forte résistance aux cations métalliques et aux produits chimiques (Qiu *et al.*, 2010). Certains champignons et bactéries ont la capacité de produire la xylanase en optimisant leurs paramètres. (Tableau1 et 2). (Richhariya *et al.*1992).

Tableau 1: la xylanase produite par les bactéries à des paramètres optimisés (Richhariya *et al.*1992).

Microorganisms	Substrate	Incubation period	Temperature	pH
Bacteria				
<i>Bacillus badius</i> ⁶⁰	Corn cobs	48 hrs	50°C	9.0
<i>Bacillus pumilus</i> MTCC 8964 ³⁷	Maltose	48 hrs	40°C	6.0
<i>Bcillus arseniciselenatis</i> DSM-15340 ³¹	Wheat bran	72 hrs	45°C	8.0
<i>Bacillus subtilis</i> ⁴⁷	Xylose	48 hrs	40°C	9.0
<i>Bacillus subtilis</i> (BS7) ³³	Wheat bran	48 hrs	50°C	8.0

Tableau 2: la xylanase produite par les champignons à des paramètres optimisés (Richhariya *et al.* 1992).

Microorganisms	Substrate	Incubation period	Temperature	pH
Fungi				
<i>Penicillium sclerotiorum</i> ³⁴	Wheat bran	120 hrs	30°C	6.5
<i>Penicillium sp.</i> ZH30 ⁴³	Wheat bran	72 hrs	30°C	5.3
<i>Aspergillus niger</i> ³²	Wheat straw	120 hrs	30°C	6.0
<i>Aspergillus niger</i> ⁵⁷	Rice bran	144 hrs	35°C	6.5
<i>Aspergillus niger</i> ⁶⁸	Wheat bran	96 hrs	35°C	5.6

La plupart des xylanases répertoriées ne possèdent pas toutes les caractéristiques requises par l'industrie (Verma and Satyanarayana, 2012). Les enzymes natives ne sont pas suffisantes pour répondre à la demande, en raison des faibles rendements et de l'incompatibilité des procédés de fermentation industriels standard (Ahmed *et al.*, 2009). Par conséquent, des approches moléculaires doivent être mises en œuvre pour concevoir des xylanases avec les caractéristiques requises (Verma and Satyanarayana, 2012). L'expression hétérologue est le principal outil de production de xylanases au niveau industriel (Ahmed *et al.*, 2009). L'ingénierie des protéines par la technologie de l'ADN recombinant pourrait être utile pour améliorer les caractéristiques spécifiques des xylanases existantes (Verma and Satyanarayana, 2012). La génie génétique et la technologie de l'ADN recombinant permettent l'expression à grande échelle des xylanases dans des systèmes hôtes d'expression de protéines homologues ou hétérologues. Comme les applications industrielles nécessitent des enzymes moins chères, l'élévation des niveaux d'expression et la sécrétion efficace des xylanases sont vitales pour assurer la viabilité du procédé (Beg *et al.*, 2001).

Les données disponibles sur les séquences d'acides aminés, les données cristallographiques aux rayons X, la dynamique moléculaire et la conception informatique des xylanases fournissent des informations qui authentifient la relation entre la structure et la fonction des xylanases (Motta *et al.*, 2013).

Toutes ces méthodes aident à la conception des xylanases nécessaires dans les processus industriels, telles que l'amélioration de la stabilité des xylanases à des températures plus élevées et à des pH alcalins (Verma and Satyanarayana, 2012). Pour tenter ces processus à des fins commerciales, des gènes codant pour plusieurs xylanases ont été clonés chez des

systèmes hôtes homologues et hétérologues (Pérez *et al.*, 2002). Les xylanases recombinantes ont montré des propriétés équivalentes ou meilleures que les enzymes natives, et les gènes de la xylanase des microorganismes anaérobies ont également été exprimés avec succès dans des hôtes qui peuvent être utilisés dans l'industrie de la fermentation (Ahmed *et al.*, 2009).

2.6 Utilisations industrielles des xylanases

Les xylanases sont considérées comme un outil important dans de nombreux secteurs industriels tels que la fabrication de pâtes et papiers, transformation des aliments pour animaux, clarification des boissons et production de biocarburants à partir d'agro-résidus. Les principales applications des xylanases sont discutées ci-dessous la (figure 7).

2.6.1 Industrie des pulpes et papiers

L'industrie des pâtes et papiers a recherché nouvelles méthodes biotechnologiques utilisées pour le remplacement des produits chimiques utilisés dans le processus de fabrication du papier. En papier industrie, le blanchiment du papier nécessite l'élimination de la lignine à partir de pulpes Pour obtenir éclairci et complètement fini livre blanc, le processus le plus important est la suppression de lignine. Le blanchiment est le traitement des fibres celluloseuses avec des produits chimiques en éliminant la faible quantité de résidus lignine présente après la cuisson sans décliner le poids moléculaire de la cellulose. Le blanchiment est de deux types – Chimique et biologique. Le blanchiment chimique implique l'utilisation d'agents chlorés Cl_2 , ClO_2 et hypochlorite à température plus élevée ($170^\circ C$) avec des conditions alcalines qui provoque des problèmes environnementaux ainsi que des rejets mutants cancérigènes et puissants (Ferrandin-Schoffel, 2021).

2.6.2 Industrie alimentaire

En raison de leur utilité potentielle dans la production de pain, l'utilisation des xylanases dans l'industrie alimentaire comme dans les produits laitiers, les jus, le lait de soja, la production de bière et de pain est bien documentée (Helal, 2017). Les xylanases hydrolysent les hémicelluloses présentes dans le blé, aidant à la redistribution de la teneur en eau et laisser la pâte moelleuse et facilitez le pétrissage (Passicousset, 2019). Les Xylanases améliorent la qualité du pain, augmenter le volume du pain, augmentent la quantité d'absorption d'eau et améliorent également la résistance à la fermentation (Hatanaka, 2012). Les xylanases sont des enzymes qui transforment l'eau insoluble hémicelluloses sous une forme soluble qui se lie de l'eau dans la pâte. En conséquence, la rigidité de la pâte est réduite alors que le volume est augmenté (Collins *et al.*, 2005). Pendant la fabrication de la bière, les xylanases hydrolysent la longue chaîne des arabinoxylanes en oligosaccharides inférieurs qui

diminuent la viscosité de la bière et par conséquent élimine sa texture boueuse (Castonguay, 2005).

2.6.3 Aliments pour animaux

Les xylanases sont appliquées pour améliorer la digestibilité et la valeur nutritionnelle des aliments pour animaux (Dickner-Ouellet, 2018). Pour améliorer la digestibilité des aliments pour ruminants et pour faciliter le compostage, les xylanases sont utilisées dans le prétraitement des cultures fourragères (Shah and Vishwa, 2019). Les enzymes de xylanase associées à d'autres enzymes telles que cellulases, pectinases, protéases, amylases, phytases, lipases, glucanases et les galactosidases sont utilisées pour améliorer l'alimentation animale digestibilité. Elles peuvent hydrolyser les arabinoxylanes chez les animaux ingrédients alimentaires, abaissant la viscosité des matières premières (Akpınar *et al.*, 2009).

2.6.4 Production de biocarburants

Les xylanases associées aux autres enzymes hydrolysantes telles que les ligninases, les xylosidases, les glucosidases, les mannanases et les glucanases sont utilisées dans la production de biocarburants comme éthanol et xylitol lignocellulosiques à l'aide de microbes et leurs enzymes (Bouchat, 2022). La Production d'éthanol à partir des ressources renouvelables ont suscité un grand intérêt ces dernières années comme carburant de remplacement (Velut, 2021). La méthode biologique de la génération d'éthanol nécessite tout d'abord une délignification, c'est-à-dire élimination de la lignine et libération des celluloses et hémicelluloses. Les prochaines étapes comprennent la dépolymérisation de polymère glucidique (Celluloses et hémicelluloses) en sucres libres et enfin formation de pentoses et d'hexoses mixtes qui produisent de l'éthanol ou bioéthanol (Paës *et al.*, 2012).

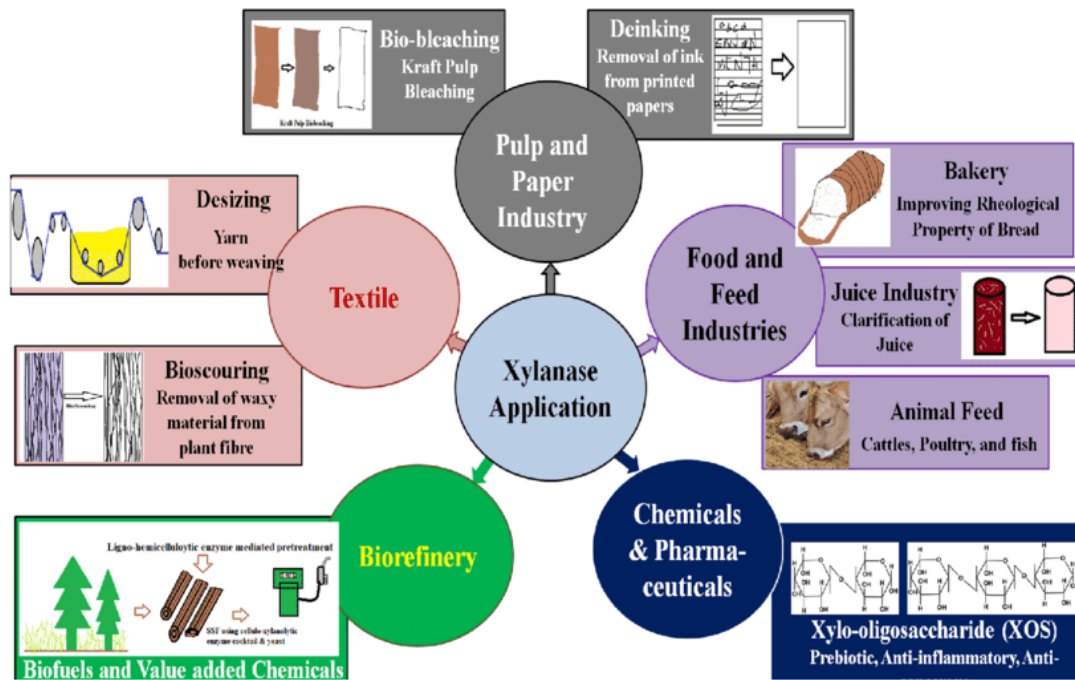


Figure 7 : La xylanase comme outil écologique dans différentes industries (Bhardwaj *et al.*, 2019).

3 *Clostridium paraputrificum*

3.1 Définition

Clostridium paraputrificum est une bactérie à Gram positif en forme de bâtonnet appartenant au genre *Clostridium*. C'est une bactérie anaérobie, ce qui signifie qu'elle ne peut survivre qu'en l'absence d'oxygène (Allen, 2021). *C. paraputrificum* se trouve dans le sol, l'eau et les voies intestinales des humains et des animaux. Cette bactérie est opportuniste et peut provoquer des infections telles que la gangrène gazeuse, les infections des plaies et la bactériémie (Allen, 2021).

3.2 Historique

Clostridium paraputrificum a été découvert pour la première fois par un microbiologiste allemand, Heinrich Blaschko, en 1895, et était initialement connu sous différents noms, notamment *Bacillus putrificus*, *Clostridium putrificum* et *Clostridium septicum*. La bactérie a ensuite été identifiée comme un organisme commun dans les voies intestinales des prisonniers du sud de la Californie, lors d'une étude menée par John H. Litchfield et KJ Carpenter au début des années 1900 (Markel, 2020). Par la suite, il s'est également avéré présent dans les matières fécales des vaches et des porcs (Laurence *et al.*, 2018). *C. paraputrificum* a été associé à diverses maladies, notamment la septicémie, les abcès et les infections intestinales. Il est également connu pour produire une toxine pouvant

provoquer une intoxication alimentaire (Baron, 1996). En 2009, une étude a été menée au Japon pour étudier la prévalence de *Clostridium paraputrificum* chez les patients atteints d'une maladie inflammatoire de l'intestin. Les chercheurs ont découvert que la bactérie était présente chez une proportion plus élevée de patients atteints de colite ulcéreuse que chez ceux atteints de la maladie de Crohn (Berg *et al.*, 2012). La recherche sur *C. paraputrificum* a contribué à la reconnaissance de son rôle dans diverses maladies et au développement de stratégies pour détecter et contrôler sa transmission chez les animaux et les humains. La bactérie a également servi d'organisme modèle pour étudier divers aspects de la physiologie et de la pathogénèse bactériennes (Kwon *et al.*, 2018).

3.3 Caractéristiques

3.3.1 Morphologie

C. paraputrificum est une bactérie en forme de bâtonnet dont la taille varie de 0,5 à 2,5 micromètres de longueur et de 0,5 à 1,0 micromètre de largeur. C'est une bactérie à Gram positif, ce qui signifie qu'elle retient la tache violette cristalline pendant le processus de coloration de Gram (Shinha and Hadi, 2015). Les spores de *C. paraputrificum* sont ovales et situées de manière centrale ou subterminale et aussi sont très résistantes aux facteurs de stress environnementaux tels que la chaleur, les produits chimiques et les radiations (Le Bourhis *et al.*, 2005) (Figure 8).

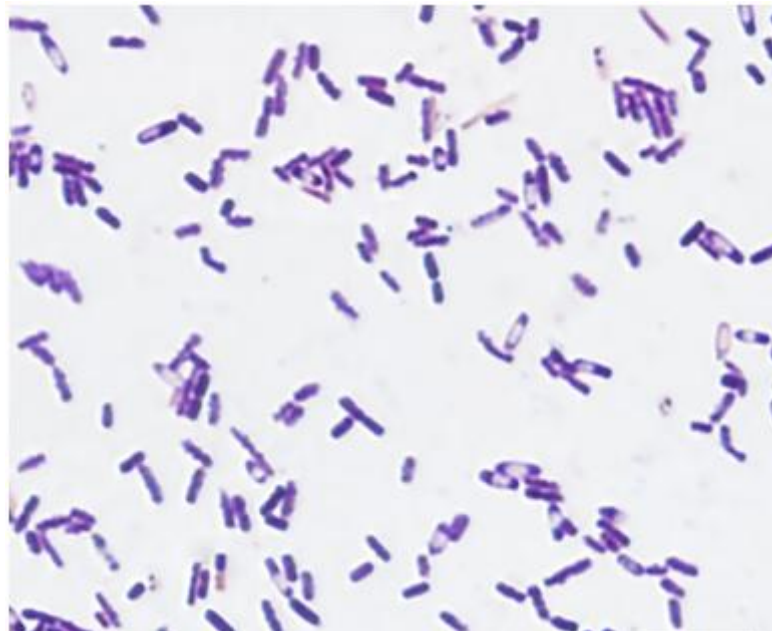


Figure 8 : Coloration de Gram de l'hémoculture montrant des bâtonnets Gram-positifs avec des spores. (Shinha and Hadi, 2015).

3.3.2 Écologie

C. paraputrificum est largement répandu dans l'environnement, y compris le sol, l'eau et les excréments d'animaux. Il peut également être trouvé dans le microbiome intestinal humain (Allen, 2021). *C. paraputrificum* est capable de fermenter une grande variété de glucides, y compris le glucose, le fructose, le maltose et le lactose. Il produit plusieurs produits métaboliques, y compris l'acide acétique, l'acide butyrique et l'hydrogène gazeux (Guellout, 2019).

3.3.3 Pathogenèse

C. paraputrificum est un pathogène opportuniste, ce qui signifie qu'il peut provoquer des infections chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli ou chez celles qui ont subi des interventions chirurgicales (Alhosny, 2018). Il peut provoquer des infections telles que la gangrène gazeuse, les infections des plaies et la bactériémie. Le potentiel pathogène de *C. paraputrificum* est largement attribué à sa capacité à produire plusieurs toxines puissantes, y compris la toxine alpha, la toxine bêta et la collagénase (Kemdji and Meftahi, 2021).

Le diagnostic des infections à *C. paraputrificum* repose sur des techniques de culture microbiologique. Les infections à *C. paraputrificum* sont traitées à l'aide d'agents antimicrobiens et, dans les cas graves, une intervention chirurgicale peut également être nécessaire (Wiley, 2016).

3.4 Production de xylanase par *Clostridium paraputrificum*

Il a été démontré que la bactérie de *Clostridium paraputrificum* produit des diverses enzymes utiles dans la biotechnologie et les applications industrielles. L'une de ces enzymes est la xylanase, une enzyme importante dégradant les glucides qui clive les liaisons bêta-1,4 entre les résidus de xylose dans le xylane, un composant majeur des parois cellulaires végétales (Iram *et al.*, 2020). La production de xylanase par *C. paraputrificum* a été étudiée dans diverses conditions. Dans une étude de (Cunha *et al.*, 2018) il a été constaté que la production maximale de xylanase se produisait lorsque la bactérie était cultivée dans un milieu contenant du son de blé comme seule source de carbone. L'ajout de sources d'azote telles que la peptone et l'extrait de levure a également augmenté l'activité de xylanase et le pH et la température optimaux pour l'activité de xylanase se sont avérés être respectivement de 6 et 50 °C (Mayeur and Moulin, 2017).

Il a été démontré que la xylanase produite par *C. paraputrificum* a diverses applications industrielles. Il a été utilisé dans l'industrie des pâtes et papiers pour améliorer le

processus de blanchiment de la pâte de bois (Giridhar et Reddy, 2019). La xylanase a également été utilisée dans l'industrie de l'alimentation animale pour améliorer la digestibilité des aliments à base de plantes pour le bétail (Quesada-Salas *et al.*, 2022).

En plus de ses applications industrielles, la xylanase produite par *C. paraputrificum* a également été étudiée pour ses avantages potentiels pour la santé. Une étude de ont découvert que la xylanase produite par cette bactérie peut dégrader les glucides complexes présents dans le lait maternel humain, entraînant la libération d'oligosaccharides qui peuvent favoriser la croissance de bactéries bénéfiques dans l'intestin, la xylanase produite par *C. paraputrificum* a des diverses applications industrielles et sanitaires (Tank *et al.*2018).

*Matériel
et méthodes*

1. Récupération des séquences protéiques

La séquence FASTA de 1,4- β -xylanase de *Clostridium paraputrificum*, identifiée sous le numéro d'accès A0A174B8H3, a été obtenue depuis la base de données Uniprot (the Universal Protein resource) (<https://www.uniprot.org>) (Consortium, 2022). Cette séquence a été utilisée comme séquence requête pour toutes les analyses bioinformatiques.

2. Analyse des propriétés physico-chimiques

À l'aide du serveur ExPASy ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) (Gasteiger *et al.*, 2005), une analyse a été réalisée sur diverses propriétés physicochimiques de la séquence protéique de 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum*. Cette analyse a permis d'évaluer, entre autres, la composition en acides aminés, la composition d'indice aliphatique (AI), le point isoélectrique (pI), l'indice d'instabilité (II), le nombre de résidus chargés positivement et négativement, l'hydrophilie moyenne globale (GRAVY) et le coefficient d'extinction (CE).

Le taux d'occupation des chaînes latérales aliphatiques d'une protéine est mesuré par l'indice aliphatique (AI), qui est connu pour influencer la stabilité thermique de la protéine (Panda and Chandra, 2012).

Le point isoélectrique (pI) est le pH auquel la charge nette d'une protéine/peptide est égale à zéro, ce qui signifie qu'elle ne migrera pas dans un champ électrique (Smoluch *et al.*, 2016).

L'indice GRAVY, abréviation de Grand average of hydrophobicity, quantifie l'hydrophilie ou l'hydrophobicité d'une protéine, autrement dit son affinité pour l'eau, à l'aide de l'échelle de (Kyte and Doolittle, 1982).

De son côté, l'indice d'instabilité (II) procure une estimation de la stabilité d'une protéine en calculant une somme pondérée des dipeptides qui sont plus souvent observés dans les protéines instables que dans les protéines stables, selon une méthode de prédiction d'instabilité régionale mise au point par (Guruprasad *et al.*, 1990).

Le coefficient d'extinction (CE) permet d'évaluer la concentration molaire d'une solution à partir de la mesure de son absorbance (Scientific, 2012).

Pour évaluer l'hydrophobicité de la séquence d'acides aminés de la protéine cible de *C. paraputrificum*, l'outil ExPASy ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) a été utilisé, en s'appuyant sur l'échelle d'hydrophobie de Kyte et Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982).

3. Prédiction de la solubilité protéique

La prédiction des hélices transmembranaires dans les protéines et dans 1,4- β -xylanase est souvent réalisée à l'aide de l'outil en ligne SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>) (Mitaku *et al.*, 2002).

4. Analyse de la structure secondaire

Les deux logiciels bioinformatiques; le logiciel en ligne de prédiction de la structure secondaire protéique basé sur PSI-BLAST, PSIPRED 4.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (Buchan and Jones, 2019) et le logiciel en ligne, Self-Optimized prédiction Method with Alignment, qui est hébergé dans le serveur Network Protein Sequence Analysis (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) (Combet *et al.*, 2000) ont été déployés pour la prédiction de la structure secondaire de la protéine, y compris les hélices α , les brins β , les brins étendus, les coudes β et les boucles de la séquence d'acides aminés de 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum*. De plus, l'analyse de prédiction de la structure secondaire de cette protéine a été effectuée en utilisant des paramètres par défaut (largeur de fenêtre 17 ; seuil de similarité 8 ; numéro d'état 4) a été soumise via le programme en ligne SOPMA.

5. Analyse de la structure tertiaire

5.1 Prédiction de la structure tertiaire

Nous avons utilisé le logiciel en ligne SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (Waterhouse *et al.*, 2018) pour effectuer une modélisation afin de prédire la structure tridimensionnelle de la séquence de 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum*. Il s'agit d'une modélisation par homologie qui est une technique de modélisation moléculaire.

En effet, selon la disponibilité de modèles structuraux pour une séquence protéique donnée, la modélisation peut être effectuée par modélisation comparative ou d'homologie, ou par threading qui implique l'identification de l'adéquation structurale entre un repliement protéique et une séquence spécifique.(Singh *et al.*, 2016).

La modélisation moléculaire par homologie est une méthode qui permet de prédire la structure tridimensionnelle d'une protéine en utilisant une séquence similaire à celle d'une protéine dont la structure a déjà été déterminée expérimentalement par cristallographie aux rayons X ou par résonance magnétique nucléaire (RMN) et qui est répertoriée dans la base de données Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>) (Pellequer, 1999).

La modélisation par homologie est une méthode hautement précise qui a pour but de produire des modèles structuraux fiables de protéines et elle est largement utilisée dans de nombreuses applications biologiques. (Bordoli *et al.*, 2009).

5.2 Raffinement

Le raffineur de structure protéique à haute résolution, ModRefiner (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>) a été utilisé pour améliorer la qualité physique de la structure tridimensionnelle prédite de la protéine 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum* (Xu and Zhang, 2011).

5.3 Validation

Le serveur d'analyse et de vérification structurelle, SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu>) de l'outil d'analyse PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) a aidé à évaluer la qualité stéréo-chimique des modèles structuraux tridimensionnels, prédits et raffinés, de 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum* par le diagramme de Ramachandran.

Après le raffinement et la validation, le logiciel graphique moléculaire PyMOL, version 2.5.4 (DeLano, 2019), a été employé pour visualiser et optimiser le modèle structurel tridimensionnel de la protéine 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum*.

6. Analyse fonctionnelle

6.1 Interactions protéine-protéine

La base de données STRING (Search Tool for the Retrieval of Inter-acting Genes/Proteins) version 11.5 (<http://string-db.org/>) (Szklarczyk *et al.*, 2023) a été utilisée pour construire un réseau d'interaction protéine-protéine, en incluant différentes interactions protéiques connues et prédites. Cela nous a permis d'étudier les interactions fonctionnelles de protéine 1,4- β -xylanase de la bactérie *C. paraputrificum* avec d'autres protéines potentielles.

6.2 Recherche de motifs protéiques

Une requête de la séquence de la protéine d'intérêt a été soumise à l'outil de recherche MOTIF finder (<http://www.genome.jp/tools/motif/>), en sélectionnant la base de données d'annotation Pfam, pour analyser les motifs fonctionnels communs et déterminer les familles auxquelles appartient la protéine 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum*.

6.3 Analyse du site actif

La prédiction des sites de liaison des ligands (sites actifs) de l'enzyme 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum* a été réalisée à l'aide du serveur COFACTOR (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COFACTOR/>), qui est basé sur l'analyse des structures des modèles générés, les séquences protéiques et les interactions protéine-protéine (Zhang *et al.*, 2017).

Résultats
et
discussion

1. Analyse des structures primaires

En effectuant une recherche avec les mots-clés "xylanase *Clostridium paraputrificum*", nous avons extrait la séquence d'acides aminés de l'enzyme 1,4-β-xylanase de *Clostridium paraputrificum* au format FASTA à partir de la base de données Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), qui est une ressource universelle de protéines. Les principales caractéristiques de cette protéine sont récapitulées dans le tableau 3.

Tableau 3: Caractérisation de la séquence récupérée de 1,4-β-xylanase de *Clostridium paraputrificum*.

Numéro d'accension	Nombre d'aa	Poids moléculaire (Da)
A0A174B8H3	284	32053.37

2. Analyse des propriétés physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques telles que le point isoélectrique (pI), le nombre de résidus chargés négativement "Asp (-R)", le nombre de résidus chargés positivement "Arg (+R)", le coefficient d'extinction (EC), l'indice d'instabilité (II), la demi-vie, l'indice aliphatique (AI) et la grande moyenne d'hydrophatie (GRAVY) ont été évaluées pour l'enzyme 1,4-β-xylanase de *C. paraputrificum* et sont données dans le tableau 4.

Tableau 4: Caractérisation de la séquence récupérée de 1,4-β-xylanase de *Clostridium paraputrificum*.

Numéro d'accension	PI	- R	+ R	EC	II	Demi-vie	AI	GRAVY
A0A174B8H3	5.23	41	29	41285	33.15	30 heures	88.52	-0.254

La protéine cible présente une valeur théorique de point isoélectrique (pI) de 5,23, ce qui suggère qu'elle est de nature acide. Son indice d'instabilité (II) est de 33,15 (<40), ce qui la classe comme étant une protéine stable. Le coefficient d'extinction molaire ou coefficient d'absorption molaire (EC) mesure la capacité d'une protéine à absorber la lumière (McNaught and Wilkinson, 1997). Sa valeur était de 41285. La valeur élevée de l'indice aliphatique (AI), qui s'élève à 88,52, indique que cette protéine est thermostable, c'est-à-dire qu'elle présente une stabilité à des températures élevées. Ce résultat est cohérent avec une étude expérimentale menée sur la bactérie thermophile *Clostridium thermocellum*, où une endo-1,4-β-xylanase (Xyn10D) thermostable a été caractérisée. Cette enzyme a montré une activité maximale à une température optimale de 80 ° C (Zverlov *et al.*, 2005) . De plus, la thermostabilité de 1,4-

β -xylanase a été démontrée chez une bactérie thermophile, *Thermotoga petrophila*, qui maintient son activité enzymatique à des températures allant de 80 à 95 C° (ul Haq *et al.*, 2012). Le paramètre de la grande moyenne d'hydropathie (GRAVY) évalue les interactions de la protéine cible avec l'eau. Une valeur négative de GRAVY suggère que cette protéine est hydrophile, c'est-à-dire qu'elle a une affinité pour les molécules d'eau. Par ailleurs, en utilisant l'algorithme de Kyte et Doolittle, l'outil bioinformatique en ligne ExPASy ProtScale a permis de prédire les positions minimales et maximales des résidus hydrophobes dans la séquence protéique de 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum*, ainsi que les scores hydrophobes correspondants Tableau 5.

Tableau 5: Score hydrophobe et position de 1,4- β -xylanase de *Clostridium paraputrificum* à l'aide de l'outil ProtScale.

Numéro d'accension	Position		Score	
	Min	Max	Min	Max
A0A174B8H3	263	221	-2.589	2.300

3. Prédiction de la solubilité protéique

Le serveur SOSUI permet la prédiction de la solubilité par le calcul de l'hydrophobicité moyenne et détermine si la protéine est soluble ou transmembranaire. Ainsi, toute partie hydrophobe de la protéine est marquée comme région transmembranaire. Par conséquent, SOSUI a prédit que la séquence de la protéine cible était soluble non transmembranaire.

4. Prédiction de la structure secondaire

Selon l'analyse du serveur par la méthode SOPMA en utilisant ses paramètres par défaut (largeur de la fenêtre, 17; seuil de similarité, 8; et nombre d'états, 4), l'hélice α était la plus prédominante (111), suivie par les boucles (Random coils) (105), brins β (Extended strand) (53) puis les coudes β (β -turn) (15) dans notre séquence protéique d'intérêt.

Tableau: Prédiction de la structure secondaire de 1,4- β -xylanase de *Clostridium paraputrificum* par SOPMA

α -helix	Extended strand	β -turn	Random coils
39.08%	18.66%	5.28%	36.97%

En outre, la structure secondaire de la protéine 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum* a été prédite par le serveur PSIPRED 4.0. Les résultats de ce serveur étaient en accord avec les résultats obtenus par SOPMA avec une confiance élevée (Figure 9).

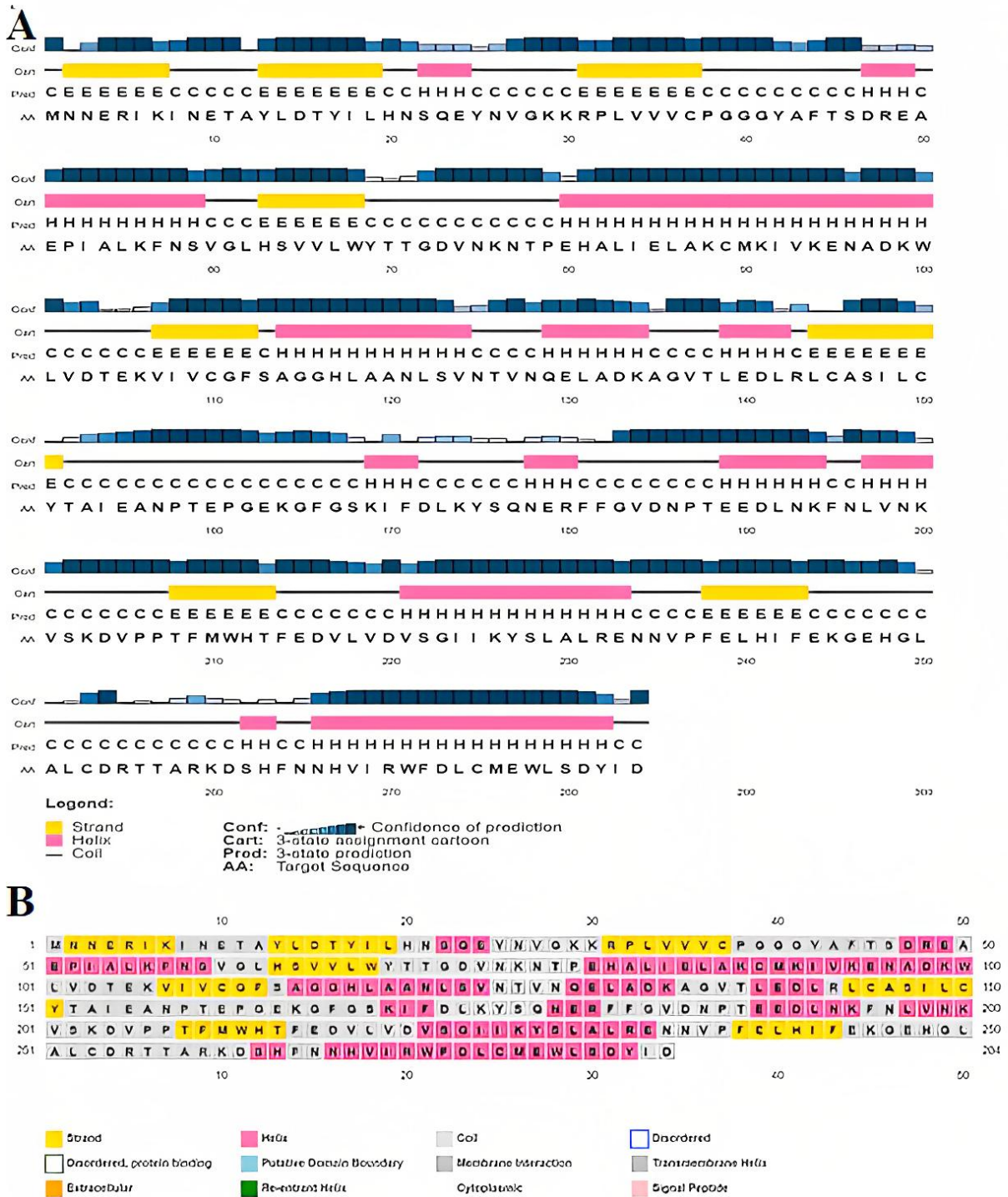


Figure 9: Prédiction de la structure secondaire de 1,4-β-xylanase de *C. paraputrificum* (A0A174B8H3) par le serveur PSIPRED 4.0.(A) Représentation graphique. (B) Diagramme d'annotation de séquence. Les couleurs représentent les éléments de structure secondaire des protéines (jaune pour les brins β, rose pour les hélices α et gris pour les boucles). La confiance de la prédiction observée dans toute la structure secondaire prédite était élevée, indiquant une grande fiabilité de cette prédiction.

5. Analyse de la structure tertiaire

5.1 Prédiction de la structure tertiaire

La prédiction de la structure tridimensionnelle de 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum* a été réalisée en utilisant la modélisation par homologie, car la structure de cette protéine n'était pas disponible dans la base de données PDB. Dans ce cadre, le serveur SWISS-MODEL a été utilisé pour générer un modèle tridimensionnel de la protéine. Les résultats de cette prédiction structurale sont indiqués dans le tableau 6. SWISS-MODEL a suggéré le modèle 3hvk.1.A (Crystal Structure of a sugar hydrolase (YeeB) from *Lactococcus lactis*, Target KR108). Ainsi, le modèle structural de la protéine 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum* avait une identité de 35.20 % et de couverture de 88%.

Tableau 6: Prédiction de la structure tertiaire de 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum* par SWISS-MODEL.

Numéro d'accension	Modèle	Identity (%)	Coverage (%)
A0A174B8H3	3hvk.1.A	35.20	88

5.2 Raffinement

Le raffinement des modèles est une étape importante pour améliorer la qualité des modèles structuraux prédits, afin de se rapprocher de la précision expérimentale pour les études informatiques ultérieures. Dans le cas de la protéine 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum*, le modèle 3D prédit par SWISS-MODEL a été raffiné en utilisant le programme en ligne ModRefiner (Adiyaman and McGuffin, 2019). Après le raffinement, la structure tridimensionnelle prédite est a été visualisée et optimisée en utilisant le logiciel de visualisation moléculaire PyMOL (Figure 10). Il s'agit d'une étape cruciale pour la validation et l'interprétation des résultats de l'analyse structurale et fonctionnelle de la protéine.

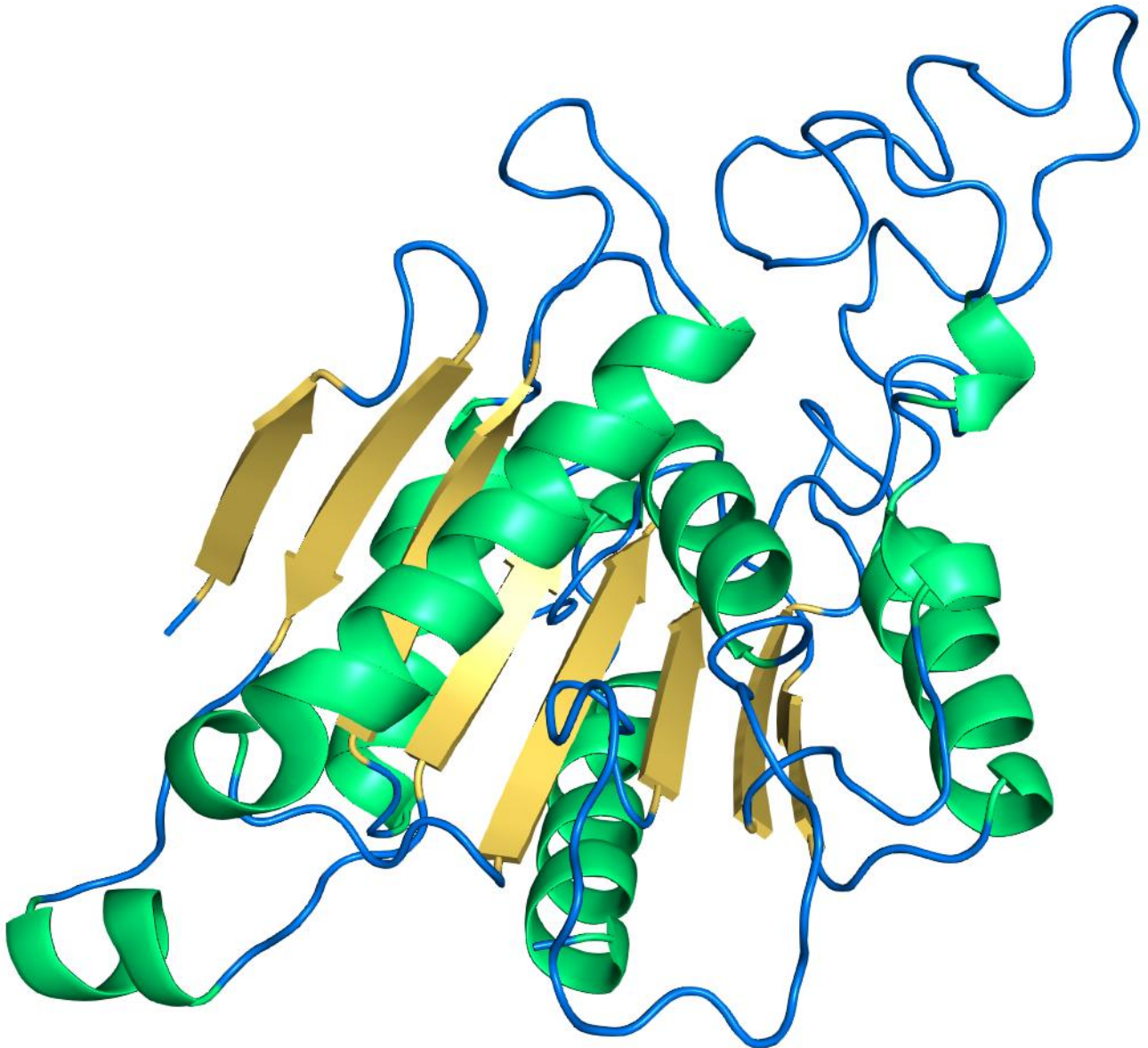


Figure 10: Structure 3D prédite de 1,4- β -xylanase de *C. parapatrificum* (A0A174B8H3) produite par SWISS-MODEL, raffinée par le serveur ModRefiner et visualisée par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.5.4. Prédiction de la structure secondaire de la protéine cible montrant l'hélice α (rubans vert), les feuilletts β (flèches jaunes) et les boucles (bleu).

5.3 Validation

Après le processus de raffinement structural, la qualité stéréochimique du modèle initial et du modèle raffiné de 1,4- β -xylanase de *C. parapatrificum* a été évaluée à l'aide du diagramme de Ramachandran. Cette évaluation a été effectuée en utilisant le programme PROCHECK sur le serveur SAVES v6.0, qui permet d'analyser et de vérifier la qualité structurale des modèles protéiques (Figure 11).

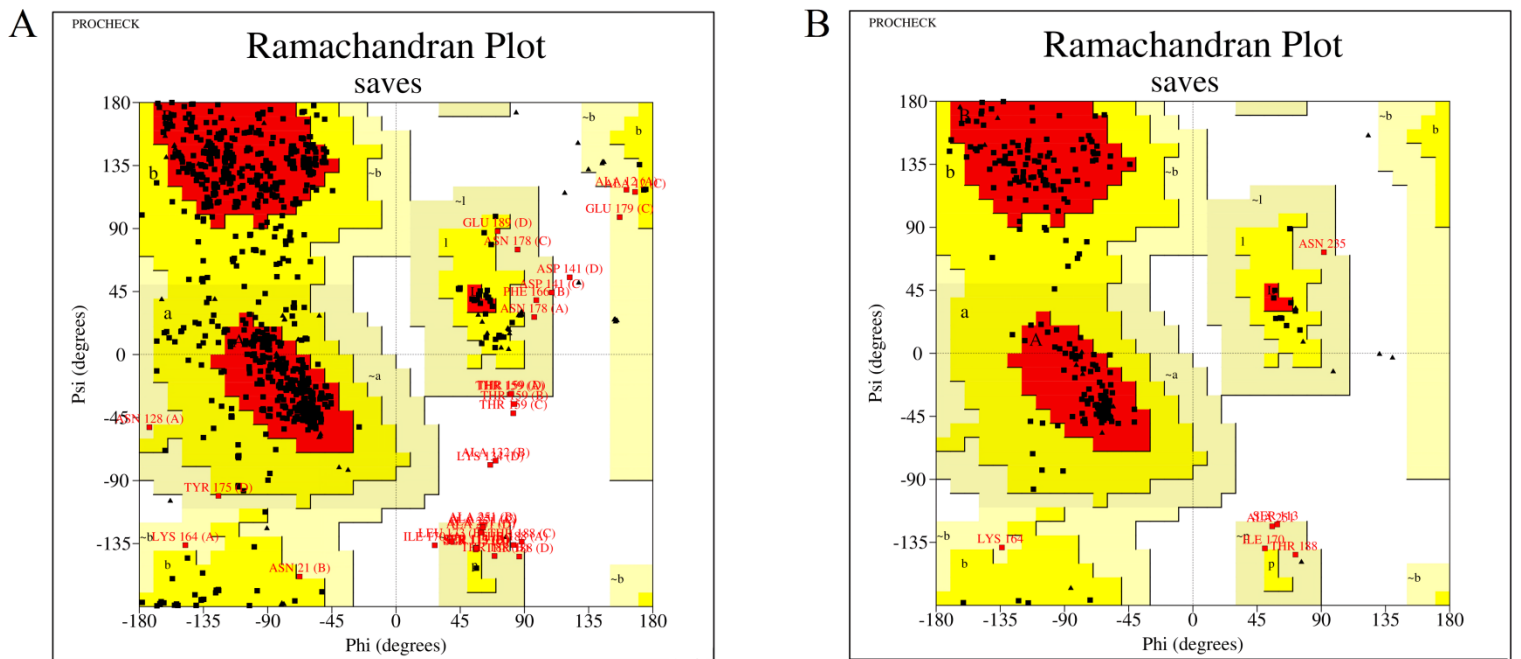


Figure 11 : Validation de la structure par le diagramme de Ramachandran du modèle de 1,4-β-xylanase de *C. parapatrificum* (A0A174B8H3) de PROCHECK (serveur SAVE v6.0) . A. modèle initial. B. Modèle raffiné. Les régions les plus favorisées sont marquées comme A, B et L (rouge). Les régions supplémentaires autorisées sont marquées comme a, b, l et p (jaune), les régions généreusement autorisées sont marquées comme ~a, ~b, ~l et ~p (jaune clair) et les régions non autorisées (blanc). Tous les résidus non glycine et non proline sont représentés par des carrés noirs pleins, tandis que les glycines (non terminales) sont représentées par des triangles noirs pleins.

Le diagramme de Ramachandran présente les pourcentages de résidus présents dans les différentes régions pour les deux modèles protéiques prédits (initiaux et raffinés) de 1,4-β-xylanase de *C. parapatrificum*. Ces valeurs ont été rapportées dans le tableau 7.

Tableau 7: La validation de la prédiction de la structure tertiaire originale et raffinée de 1,4-β-xylanase de *C. parapatrificum* par les diagrammes de Ramachandran.

Identifiant de la protéine (UniProt)	Type du modèle	Region favorisée (%)	Region autorisée supplémentaire (%)	Region généreusement autorisée (%)	Region non autorisée (%)
A0A174B8H3	Initial	79.7	17.0	2.5	0.8
	Raffiné	85.0	12.6	2.4	0.0

6. Analyse fonctionnelle

6.1 Interactions protéine-protéine

L'analyse de la fonction biologique de la protéine cible a identifié dix partenaires potentiels dans le réseau d'interaction protéique en utilisant la base de données STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) v11.5. Les résultats ont montré que la protéine

de requête (représentée par le nœud rouge, AUJC01000003) avait dix protéines partenaires avec des scores de confiance allant de 0,588 à 0,732. Cela indique l'existence d'un réseau fonctionnel parmi l'ensemble des protéines de la bactérie *C. parapatrificum*. L'analyse a également identifié la protéine d'interaction la plus proche, NadE (Nad (+) synthétase dépendante de la glutamine), qui catalyse l'amidation dépendante de l'ATP de la deamido-NAD pour former du NAD, et utilise la L-glutamine comme source d'azote. Cette protéine avait un score de 0,732. D'autre part, la protéine d'interaction la plus éloignée, AUJC01000003_gene1398 (dont l'annotation n'est pas disponible), avait un score de 0,609. L'analyse des interactions protéine-protéine de 1,4- β -xylanase de *C. parapatrificum* (A0A174B8H3) générée par STRING est présentée à la (figure 12) et au (tableau 8).

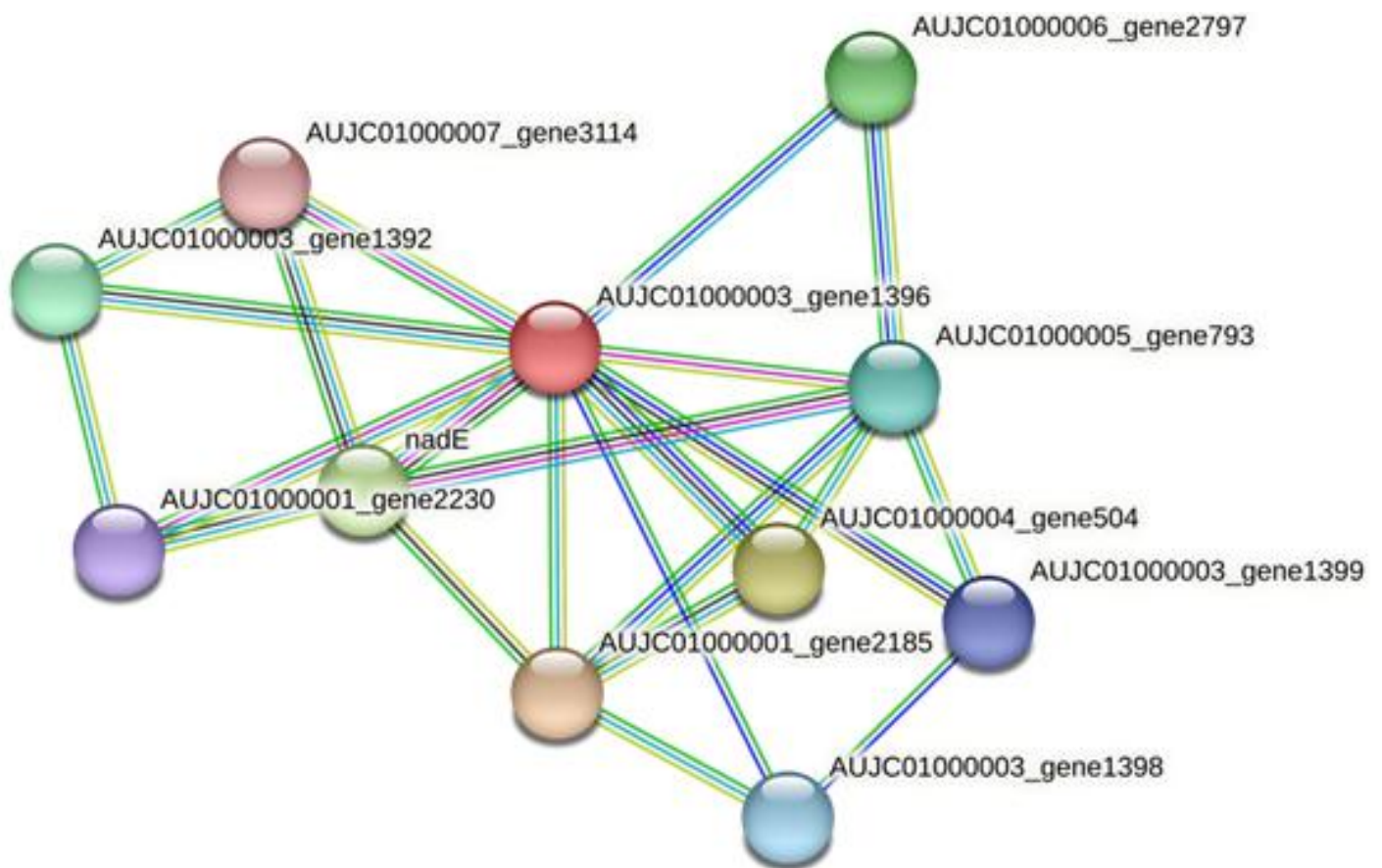


Figure 12: Analyse du réseau d'interaction protéine-protéine pour la 1,4- β -xylanase de *C. parapatrificum* (A0A174B8H3) détectée via la base de données STRING . Le nœud rouge (de *C. parapatrificum*) et d'autres nœuds représentaient ses partenaires fonctionnels prédits de *C. parapatrificum* (tableau 8).


Tableau 8: Partenaires protéiques fonctionnels prédits de la xylanase de *C. parapatrificum* (A0A174B8H3).

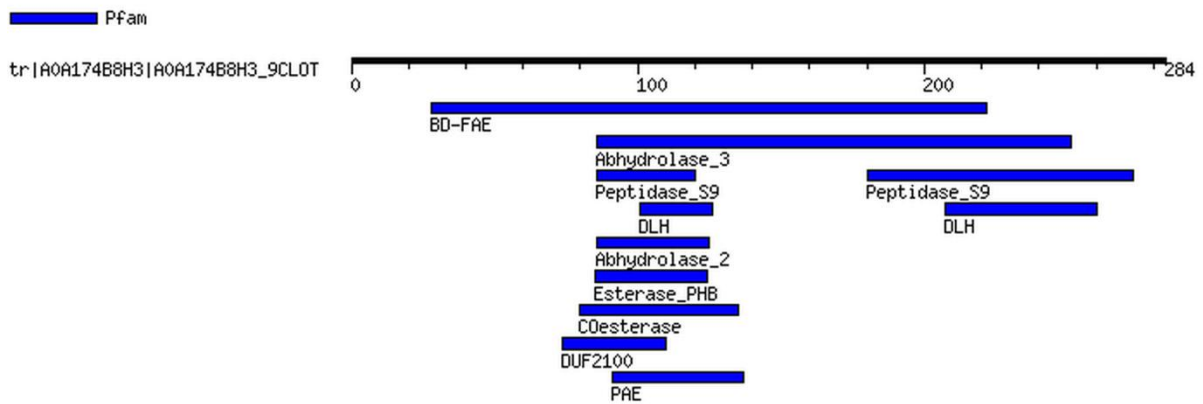
Node	Annotation	Score
AUJC01000003_gene1396	Annotation non disponible	0.732
AUJC01000001_gene2185	Annotation non disponible	0.726
AUJC01000004_gene504	Annotation non disponible	0.703
nadE	Nad (+) synthétase dépendante de la glutamine; catalyse l'amidation dépendante de l'ATP de la deamido-NAD pour former du NAD. Utilise la L-glutamine comme source d'azote	0.700
AUJC01000006_gene2797	Annotation non disponible	0.661
AUJC01000003_gene1392	Annotation non disponible	0.639
AUJC01000005_gene793	Annotation non disponible	0.611
AUJC01000003_gene1398	Annotation non disponible	0.609
AUJC01000003_gene1399	Annotation non disponible	0.588
AUJC01000001_gene2230	Annotation non disponible	0.588

6.2 Recherche de motifs protéiques

L'étude fonctionnelle de 1,4- β -xylanase de *C. parapatrificum* sur le serveur MOTIF finder a détecté 9 motifs fonctionnels (Figure 12).

Result of MotifFinder

Number of found motifs: 9 



Pfam (9 motifs)

Pfam	Position(Independent E-value)		Description
BD-FAE	28..222(2.4e-13)	Detail	PF20434, BD-FAE
Abhydrolase_3	86..251(5.4e-10)	Detail	PF07859, alpha/beta hydrolase fold
Peptidase_S9	86..120(0.068) 180..273(0.00013)	Detail	PF00326, Prolyl oligopeptidase family
DLH	101..126(0.63) 207..260(0.54)	Detail	PF01738, Dienelactone hydrolase family
Abhydrolase_2	86..125(0.19)	Detail	PF02230, Phospholipase/Carboxylesterase
Esterase_PHB	85..124(0.07)	Detail	PF10503, Esterase PHB depolymerase
COesterase	80..135(0.19)	Detail	PF00135, Carboxylesterase family
DUF2100	74..110(0.11)	Detail	PF09873, Uncharacterized protein conserved in archaea (DUF2100)
PAE	91..137(0.15)	Detail	PF03283, Pectinacylesterase

Figure 13: Résultat du MOTIF finder montrant le motif fonctionnel de 1,4- β -xylanase de *C. parapatrificum*.

6.3 Analyse du site actif

Le serveur COFACTOR a permis de déterminer les résidus d'acides aminés du site actif de l'enzyme cible de *C. parapatrificum*. Selon cette analyse, les résidus impliqués dans le site actif sont la tyrosine 42, l'alanine 114, l'alanine 153, la phénylalanine 182 et la valine 219 (Figure 13).

Le score "BS-score" est une mesure de la similarité locale entre le site de liaison prédit dans la structure de la requête et le site de liaison du modèle, en termes de séquence et de structure. Pour 1,4- β -xylanase de *C. parapatrificum*, le score BS-score était de 1,11, ce qui est supérieur à 0,5. Cela indique une correspondance locale significative entre le site de liaison prédit et le site de liaison du modèle.

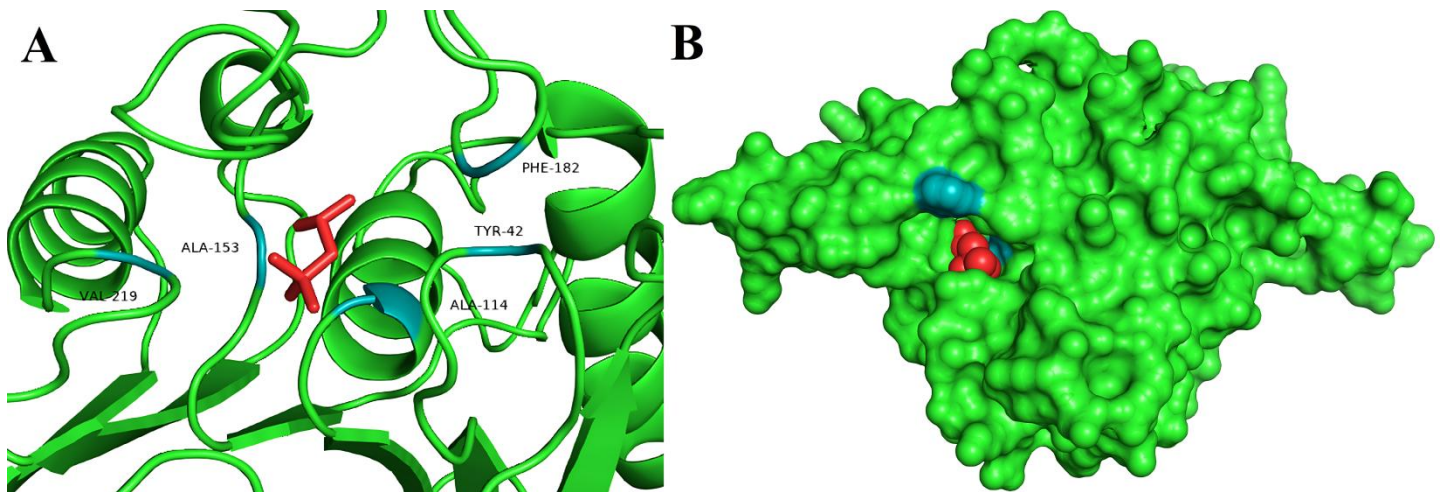


Figure 14: Sites de liaison des ligands de 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum* (A0A174B8H3) prédits par COFACTOR et visualisés par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.5.4. (A) montrant les sites de liaison de ligand (tyr 42, ala 114, ala 153, phe 182, val 219). (B) Vue de surface de la protéine avec son ligand dans le site actif. Le sphère et stick représentent le ligand (rouge). Sites de liaison du ligand (bleu) avec la structure du modèle (vert).

Les résultats obtenus pour la recherche de motif protéique et l'analyse du site actif de 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum* sont comparables à l'étude *in silico* de xylanase de *Pseudomonas putida* (Bakli *et al.*, 2022) dans les acides aminés tyrosine et alanine. Par ailleurs, nos résultats sont en accord avec travaux sur 1,4- β -xylanase de *Clostridium thermocellum* (Ji *et al.*, 2023) montrant les acides aminés de site actif qui sont l'alanine et la phénylalanine.

La recherche sur la 1,4- β -xylanase d'*Aspergillus niger* (Krengel and Dijkstra, 1996) indique que les acides aminés du site actif diffèrent de notre étude, et la validation de la structure par le diagramme de Ramachandran via le serveur PROCHECK (SAVEv6.0) montre des différences également.

De plus, les résultats de l'étude sur la structure tridimensionnelle de 1,4- β -xylanase d'*Aspergillus niger* a révélé que le résidu de Tyrosine était, entre autres, impliqué dans les interactions du site actif de cette enzyme avec son substrat (Krengel and Dijkstra, 1996).

Conclusion
et
perspectives

L'étude présentée ici porte sur l'analyse structurale et fonctionnelle de 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum*, une enzyme complexe impliquée dans la dégradation du xylane et produite par de nombreux micro-organismes tels que les champignons et les bactéries. Les xylanases ont des applications dans divers domaines industriels, notamment l'industrie des pâtes et papiers, l'industrie alimentaire, la production d'aliments pour animaux et la production de biocarburants. L'analyse *in silico* des caractéristiques physico-chimiques d'une protéine est donc importante pour avoir une meilleure compréhension théorique de l'enzyme d'intérêt. Cette étude est la première analyse des propriétés physico-chimiques, de la structure et de la fonction de 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum*, permettant ainsi d'acquérir des connaissances précieuses sur cette enzyme et contribuant dans sa future utilisation dans diverses applications industrielles.

La caractérisation *in silico* de l'enzyme 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum* a révélé plusieurs propriétés essentielles. Cette enzyme présente une nature acide, une grande thermostabilité et une forte hydrophilie. La structure secondaire de la protéine est principalement composée d'hélices α , de brins β étendus, de boucles (random coils) et de coudes β (β -turns). En outre, la modélisation structurale par homologie et des analyses fonctionnelles ont été réalisées pour approfondir notre compréhension de cette enzyme.

Par ailleurs, notre étude démontre l'avantage de l'utilisation des outils bioinformatiques pour la sélection d'enzyme répondant aux propriétés physico-chimiques, à l'hydrophobicité, la structure et la fonction recherchées. Cette approche est particulièrement utile pour les protéines dont les structures cristallines tridimensionnelles ne sont pas encore disponibles.

En somme, cette étude de caractérisation bioinformatique fournit une méthode prometteuse pour la sélection et la conception d'une xylanase possédant les propriétés physico-chimiques, hydrophobiques, structurales et fonctionnelles souhaitables pour répondre aux besoins des secteurs industriels.

De plus, notre étude permet d'identifier théoriquement les caractéristiques de l'enzyme 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum*, qui pourraient être testées expérimentalement dans différentes conditions industrielles telles que des pHs, des températures, des niveaux de salinité, de pression osmotique, d'agents réducteurs, de la présence d'ions, de solvants organiques, de métaux lourds, etc.

Ces outils bioinformatiques suggérés pour identifier l'enzyme 1,4- β -xylanase de *C. paraputrificum* sont nécessaires pour prédire les caractéristiques structurales et fonctionnelles, ce qui facilite l'analyse expérimentale des protéines, y compris leur expression et purification, étude fonctionnelle, cinétique enzymatique et étude structurale.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adiyaman, R., and McGuffin, L.J. (2019). Methods for the refinement of protein structure 3D models. *International journal of molecular sciences* 20, 2301.
- Ahmed, S., Riaz, S., and Jamil, A. (2009). Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Applied microbiology and biotechnology* 84, 19-35.
- Akpinar, O., Erdogan, K., and Bostanci, S. (2009). Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. *Food and Bioproducts Processing* 87, 145-151.
- Alhosny, M. (2018). Les maladies associées à la dysbiose explorées par analyse génomique (Aix-Marseille).
- Alio, M.A. (2020). Production de bioéthanol à partir d'une biomasse lignocellulosique multi-ressources locale par prétraitement Organosolv et hydrolyse enzymatique (Université Clermont Auvergne [2017-2020]).
- Allen, M.-M. (2021). Isolement et caractérisation de quatre phages de *Clostridium perfringens* pour des applications vétérinaires dans l'industrie aviaire au Québec.
- Ammarkhodja, L., and Djafour, I. (2017). Mise en évidence des activités cellulolytiques issues de deux souches fongiques: *Aspergillus Niger* et *Penicillium* sp cultivées sur des sous produits agricoles (Université Mouloud Mammeri).
- Aspeborg, H., Coutinho, P.M., Wang, Y., Brumer, H., and Henrissat, B. (2012). Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC evolutionary biology* 12, 1-16.
- Auer, L. (2016). Vers la maîtrise des communautés microbiennes lignocellulolytiques: impact de la source d'inoculum et du prétraitement du substrat sur le fonctionnement des communautés (INSA de Toulouse).
- Bakli, M., Bouras, N., Pascalau, R., and Şmuleac, L. (2022). A a Bioinformatics analysis and homology modeling of xylanase from *Pseudomonas putida*. *Research Journal of Agricultural Science* 54.
- Bakli, M., Karim, L., Mokhtari-Soulmane, N., Merzouk, H., and Vincent, F. (2020). Biochemical characterization of a glycosyltransferase Gtf3 from *Mycobacterium smegmatis*: a case study of improved protein solubilization. *3 Biotech* 10, 1-13.
- Baron, S. (1996). *Medical microbiology*.
- Barry, V.C., and Dillon, T. (1940). Occurrence of xylans in marine algae. *Nature* 146, 620-620.
- Basit, A., Jiang, W., and Rahim, K. (2020). Xylanase and its industrial applications. In *Biotechnological Applications of Biomass* (IntechOpen).

Références bibliographiques

Bastien-Uluis, G. (2012). Découverte de nouvelles enzymes de dégradation des polysaccharides végétaux par métagénomique fonctionnelle (Toulouse, INSA).

Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoondal, G. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology* 56, 326-338.

Belghait, F.Z., and Nedjhoui, M. (2019). Valorisation et caractérisation de biomatériaux: Le laurier et le pin sylvestre en vue de l'application à l'élimination d'effluents organiques

Berg, A.M., Kelly, C.P., and Farraye, F.A. (2012). *Clostridium difficile* infection in the inflammatory bowel disease patient. *Inflammatory bowel diseases*.

Bhardwaj, N., Kumar, B., and Verma, P. (2019). A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing* 6, 1-36.

Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J., and Schwede, T. (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature protocols* 4, 1-13.

Bouchat, R. (2022). XYLANFACTORY-Optimisation de la culture d'une bactérie thermophile en bioréacteurs pour la production d'hémicellulases et la valorisation des xylandes des biomasses lignocellulosiques.

Bousmia, L., and Maba, F. (2021). Les protéases microbiennes: intérêts biotechnologiques (Université Mouloud Mammeri).

Bromley, J.R., Busse-Wicher, M., Tryfona, T., Mortimer, J.C., Zhang, Z., Brown, D.M., and Dupree, P. (2013). GUX 1 and GUX 2 glucuronyltransferases decorate distinct domains of glucuronoxylan with different substitution patterns. *The Plant Journal* 74, 423-434.

Brusa, C. (2015). Xylosides à aglycones aromatiques ou fonctionnalisés: synthèse enzymatique ou chimio-enzymatique et évaluation de leurs propriétés d'activation de la biosynthèse des glycosaminoglycanes (Reims).

Buchan, D.W., and Jones, D.T. (2019). The PSIPRED protein analysis workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Research* 47, W402-W407.

Castonguay, H. (2005). Étude des microorganismes aérobies thermophiles isolés d'un bioréacteur traitant le lisier de porc (Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).

Chaudhary, A., Hussain, A., Shehzadi, A., Manzoor, M., Shahbaz, M., and Deepanraj, B. (2023). Production of ethanol from xylan by indigenous xylanolytic and ethanologenic

Références bibliographiques

bacteria isolated from fruit wastes. *Sustainable Energy Technologies and Assessments* 57, 103216.

Chellappan, B.V., El-Ganainy, S.M., Alrajeh, H.S., and Al-Sheikh, H. (2023). *In Silico* Characterization of the Secretome of the Fungal Pathogen *Thielaviopsis punctulata*, the Causal Agent of Date Palm Black Scorch Disease. *Journal of Fungi* 9, 303.

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

Collins, T., Meuwis, M.-A., Stals, I., Claeysens, M., Feller, G., and Gerday, C. (2002). A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. *Journal of Biological Chemistry* 277, 35133-35139.

Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deleage, G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends in biochemical sciences* 25, 147-150.

Consortium, T.U. (2022). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research* 51, D523-D531.

Cunha, L., Martarello, R., Souza, P.M.d., Freitas, M.M.d., Barros, K.V.G., Ferreira Filho, E.X., Homem-de-Mello, M., and Magalhães, P.O. (2018). Optimization of xylanase production from *Aspergillus foetidus* in soybean residue. *Enzyme research* 2018.

Curry, T.M., Peña, M.J., and Urbanowicz, B.R. (2023). An update on xylan structure, biosynthesis, and potential commercial applications. *The Cell Surface*, 100101.

Czerwiec, Q. (2020). LIGNOFRAC-Evaluation du potentiel ligninolytique bactérien pour la production de molécules aromatiques (Reims).

Dahlström, K.M. (2015). From protein structure to function with bioinformatics. In *Faculty of Science and Engineering* (Turku, Finland: Åbo Akademi University), pp. 119.

Dar, F.M., and Dar, P.M. (2021). Fungal xylanases for different industrial applications. *Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 2: Bioprospecting for Biomolecules*, 515-539.

David, B.t. (2017). Conception rationnelle d'enzyme: conversion de glycoside hydrolases en transglycosidases, Thèse de Doctorat (Nantes).

DeLano, W. (2019). The PyMOL Molecular Graphics System, version 2.3. 1. Schrodinger LLC: New York, NY, USA.

Dickner-Ouellet, L. (2018). Optimisation de l'usage des coproduits dans l'alimentation des porcs en croissance: impact du type de fibre et de la xylanase sur la digestion des nutriments (Université Laval).

Références bibliographiques

Ebert, B., Rautengarten, C., Guo, X., Xiong, G., Stonebloom, S., Smith-Moritz, A.M., Herter, T., Chan, L.J.G., Adams, P.D., and Petzold, C.J. (2015). Identification and characterization of a Golgi-localized UDP-xylose transporter family from *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 27, 1218-1227.

Ferrandin-Schoffel, N. (2021). Renforcement et désacidification de papiers patrimoniaux par des réseaux de copolymères de polyaminoalkylalcoxysilanes. Mécanismes, stabilité et optimisation (CY Cergy Paris Université).

Franková, L., and Fry, S.C. (2011). Phylogenetic variation in glycosidases and glycanases acting on plant cell wall polysaccharides, and the detection of transglycosidase and trans- β -xylanase activities. *The Plant Journal* 67, 662-681.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S.e., Wilkins, M.R., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server (Springer).

Guellout, Z. (2019). Développement de modèles cinétiques et optimisation paramétrique pour la bioproduction d'hydrogène par fermentation obscure (Strasbourg).

Guruprasad, K., Reddy, B.B., and Pandit, M.W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection* 4, 155-161.

Guyez, B. (2016). Exploration du microbiote d'invertébrés par métagénomique fonctionnelle et caractérisation structure-fonction d'une nouvelle xylanase (Université Paul Sabatier-Toulouse III).

Hatanaka, K. (2012). Incorporation of fluorous glycosides to cell membrane and saccharide chain elongation by cellular enzymes. *Fluorous Chemistry*, 291-306.

Helal, I. (2017). Traduction de la xylanase a chez streptomyces lividans: influence de séquences complémentaires à l'ARNr 16s (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).

Hernández, V.E.B., Salas-Montantes, C.J., Barba-De la Rosa, A.P., and De Leon-Rodriguez, A. (2021). Autodisplay of an endo-1, 4- β -xylanase from *Clostridium cellulovorans* in *Escherichia coli* for xylans degradation. *Enzyme and microbial technology* 149, 109834.

Hoda, A., Tafaj, M., and Sallaku, E. (2021). *In silico* Structural, Functional and Phylogenetic Analyses of cellulase from *Ruminococcus albus*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19, 1-15.

Références bibliographiques

Iram, A., Cekmecelioglu, D., and Demirci, A. (2020). Ideal Feedstock and Fermentation Process Improvements for the Production of Lignocellulolytic Enzymes. *Processes* 9, 38.

Jensen, J.K., Johnson, N.R., and Wilkerson, C.G. (2014). *Arabidopsis thaliana* IRX 10 and two related proteins from psyllium and *Phycomitrella patens* are xylan xylosyltransferases. *The Plant Journal* 80, 207-215.

Ji, S., Gavande, P.V., Choudhury, B., and Goyal, A. (2023). Computational design and structure dynamics analysis of bifunctional chimera of endoxylanase from *Clostridium thermocellum* and xylosidase from *Bacteroides ovatus*. *3 Biotech* 13, 59.

Kemdji, A., and Meftahi, N. (2021). Activités biologiques de quelques plantes du genre allium. In.

Kennely, P.J., and Rodwell, V.W. (2017). Les protéines: structures. *Biochimie de Harper*, 36.

Kosugi, A., Murashima, K., and Doi, R.H. (2002). Xylanase and acetyl xylan esterase activities of XynA, a key subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome for xylan degradation. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 6399-6402.

Krengel, U., and Dijkstra, B.W. (1996). Three-dimensional Structure of Endo-1, 4- β -xylanase I from *Aspergillus niger*: Molecular Basis for its Low pH Optimum. *Journal of molecular biology* 263, 70-78.

Kulkarni, N., Shendye, A., and Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS microbiology reviews* 23, 411-456.

Kwon, Y.K., Cheema, F.A., Maneckshana, B.T., Rochon, C., and Sheiner, P.A. (2018). *Clostridium paraputrificum* septicemia and liver abscess. *World Journal of Hepatology* 10, 388.

Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology* 157, 105-132.

Lafond, M., Guais, O., Maestracci, M., Bonnin, E., and Giardina, T. (2014). Four GH11 xylanases from the xylanolytic fungus *Talaromyces versatilis* act differently on (arabino) xylans. *Applied microbiology and biotechnology* 98, 6339-6352.

Laguna, O. (2019). Valorisation des composés phénoliques des tourteaux de colza et tournesol: du fractionnement des matières premières vers la synthèse de molécules multifonctionnelles (Université Montpellier).

Références bibliographiques

Laouana, N.E.H., Dikes, N.E.H., Djellit, Z., and Khenouf, T.E. (2021). Exopolysaccharides microbiens: diversités et applications alimentaires et médicales (Université de jijel).

Larson, S.B., Day, J., Barba de la Rosa, A.P., Keen, N.T., and McPherson, A. (2003). First crystallographic structure of a xylanase from glycoside hydrolase family 5: implications for catalysis. *Biochemistry* 42, 8411-8422.

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography* 26, 283-291.

Laurence, M., Asquith, M., and Rosenbaum, J.T. (2018). Spondyloarthritis, acute anterior uveitis, and fungi: updating the Catterall–King hypothesis. *Frontiers in Medicine*, 80.

Le Bourhis, A.-G., Saunier, K., Doré, J., Carlier, J.-P., Chamba, J.-F., Popoff, M.-R., and Tholozan, J.-L. (2005). Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium spp.* in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 29-38.

Liu, X., and Kokare, C. (2023). Microbial enzymes of use in industry. In *Biotechnology of microbial enzymes* (Elsevier), pp. 405-444.

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., and Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research* 42, D490-D495.

Markel, H. (2020). *Literatim: Essays at the Intersections of Medicine and Culture* (Oxford University Press, USA).

Mayeur, J., and Moulin, L. (2017). *Synthèse d'alcool furfurylique par voie blanche* (Université de lorraine).

McNaught, A.D., and Wilkinson, A. (1997). *Compendium of chemical terminology*, Vol 1669 (Blackwell Science Oxford).

Mendonça, M., Barroca, M., and Collins, T. (2023). Endo-1, 4- β -xylanase-containing glycoside hydrolase families: Characteristics, singularities and similarities. *Biotechnology Advances*, 108148.

Merdoud, R., and Makhlof, S. (2020). *La biomasse lignocellulosique comme source potentielle d'ethanol et etude technico-economique de la fi liere* (université akli mohand oulhadj-bouira).

Références bibliographiques

Mitaku, S., Hirokawa, T., and Tsuji, T. (2002). Amphiphilicity index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane–water interfaces. *Bioinformatics* 18, 608-616.

Mohamad Sobri, M.F., Abd-Aziz, S., Abu Bakar, F.D., and Ramli, N. (2020). *In-Silico* Characterization of Glycosyl Hydrolase Family 1 β -Glucosidase from *Trichoderma asperellum* UPM1. *International journal of molecular sciences* 21, 4035.

Mortimer, J.C., Miles, G.P., Brown, D.M., Zhang, Z., Segura, M.P., Weimar, T., Yu, X., Seffen, K.A., Stephens, E., and Turner, S.R. (2010). Absence of branches from xylan in *Arabidopsis* gux mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 17409-17414.

Motta, F., Andrade, C., and Santana, M. (2013). A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization 1, 251-276.

Ng, C.H., He, J., and Yang, K.-L. (2015). Purification and characterization of a GH11 xylanase from biobutanol-producing *Clostridium beijerinckii* G117. *Applied biochemistry and biotechnology* 175, 2832-2844.

Paës, G., Berrin, J.-G., and Beaugrand, J. (2012). GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology advances* 30, 564-592.

Panda, S., and Chandra, G. (2012). Physicochemical characterization and functional analysis of some snake venom toxin proteins and related non-toxin proteins of other chordates. *Bioinformation* 8, 891.

Passicousset, J.I. (2019). Descripteurs physico-chimiques de la biomasse lignocellulosique en hydrolyse enzymatique: vers une caractérisation *in-situ* (Paris, Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France).

Pellequer, J.-L. (1999). Modélisation moléculaire par homologie des protéines: ses applications en Biologie et en Bioinformatique (Faculté des sciences de Luminy).

Percival, E., and Chanda, S. (1950). The xylan of *Rhododymenia palmata*. *Nature* 166, 787-788.

Pérez, J., Munoz-Dorado, J., De la Rubia, T., and Martinez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International microbiology* 5, 53-63.

Références bibliographiques

Polizeli, M.d.L.T.d.M., Rizzatti, A., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., and Amorim, D.d.S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology* 67, 577-591.

Qiu, Z., Shi, P., Luo, H., Bai, Y., Yuan, T., Yang, P., Liu, S., and Yao, B. (2010). A xylanase with broad pH and temperature adaptability from *Streptomyces megasporus* DSM 41476, and its potential application in brewing industry. *Enzyme and Microbial Technology* 46, 506-512.

Quesada-Salas, M.C., Vuillemin, M.E., Sarazin, C., and Husson, E. (2022). Ionic liquids for biomass biotransformation. In *Biocatalysis in Green Solvents* (Elsevier), pp. 257-297.

Rennie, E.A., and Scheller, H.V. (2014). Xylan biosynthesis. *Current opinion in biotechnology* 26, 100-107.

Richhariya, J., Sharma, T.K., and Dassani, S. (1992). Microbial Xylanases: A Review.

Rogers, G., Jackson, S., Shelver, G., and Baecker, A. (1992). Anaerobic degradation of lignocellulosic substrates by a 1, 4- β -xylanolytic *Clostridium* species novum. *International Biodeterioration & Biodegradation* 29, 3-17.

Scientific, T. (2012). Extinction coefficients: A guide to understanding extinction coefficients with emphasis on spectrophotometric determination of protein concentration. *Tech Tip* 6.

Shah, K., and Vishwa, A.P. (2019). Microbial Xylanase Production And Their Industrial Application In Industry: A Review. *Microbiology and Biotechnology in Human Life*, 112-132.

Shallom, D., and Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current opinion in microbiology* 6, 219-228.

Sharma, N., and Sharma, N. (2017). Microbial xylanases and their industrial applications as well as future perspectives: a review. *Global J Biol Agric Health Sci* 6.

Shinha, T., and Hadi, C. (2015). *Clostridium paraputrificum* bacteremia associated with colonic necrosis in a patient with AIDS. *Case Reports in Infectious Diseases* 2015.

Singh, N., Upadhyay, S., Jaiswar, A., and Mishra, N. (2016). *In silico* analysis of protein. *J Bioinform Genomics Proteomics* 1, 1007.

Singh, S., Madlala, A.M., and Prior, B.A. (2003). *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS microbiology reviews* 27, 3-16.

Références bibliographiques

Smith, P.J., Wang, H.-T., York, W.S., Peña, M.J., and Urbanowicz, B.R. (2017). Designer biomass for next-generation biorefineries: leveraging recent insights into xylan structure and biosynthesis. *Biotechnology for biofuels* *10*, 1-14.

Smoluch, M., Mielczarek, P., Drabik, A., and Silberring, J. (2016). Online and offline sample fractionation. In *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry* (Elsevier), pp. 63-99.

Soumaya, H. (2014). Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet (Université Badji Mokhtar-Annaba).

Sunna, A., and Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical reviews in biotechnology* *17*, 39-67.

Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A.L., Fang, T., Doncheva, N.T., and Pyysalo, S. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research* *51*, D638-D646.

ul Haq, I., Hussain, Z., Khan, M.A., Muneer, B., Afzal, S., Majeed, S., and Akram, F. (2012). Kinetic and thermodynamic study of cloned thermostable endo-1, 4- β -xylanase from *Thermotoga petrophila* in mesophilic host. *Molecular biology reports* *39*, 7251-7261.

Velut, S. (2021). Une approche géographique des transitions énergétiques en Amérique latine. *L'Information géographique* *85*, 29-49.

Verma, D., and Satyanarayana, T. (2012). Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases. *Bioresource technology* *117*, 360-367.

Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., Chauhan, A., and Parkash, J. (2017). Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech* *7*, 1-12.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., and Bordoli, L. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* *46*, W296-W303.

Wiley, J. (2016). *Obstetrics and Gynaecology. Essential Practical Prescribing* *404*, 402.

Xu, D., and Zhang, Y. (2011). Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophysical journal* *101*, 2525-2534.

Références bibliographiques

Zhang, C., Freddolino, P.L., and Zhang, Y. (2017). COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein–protein interaction information. *Nucleic Acids Research* 45, W291-W299.

Zverlov, V.V., Schantz, N., Schmitt-Kopplin, P., and Schwarz, W.H. (2005). Two new major subunits in the cellulosome of *Clostridium thermocellum*: xyloglucanase Xgh74A and endoxylanase Xyn10D. *Microbiology* 151, 3395-3401.

Résumé

1.4- β -xylanase (EC 3.2.1.8) est une enzyme qui clive de manière aléatoire le squelette 1,4- β du polysaccharide de paroi cellulaire végétale complexe xylane. Cette enzyme est utilisée dans divers secteurs industriels tels que l'industrie des pulpes et papiers, l'industrie alimentaire, des aliments pour les animaux et la Production de biocarburants. Cette enzyme, produite par des champignons et des bactéries, clive le squelette β 1,4 du polysaccharide de la paroi cellulaire végétale complexe xylane. Cependant, peu de connaissances existent sur 1.4- β -xylanase bactérienne. La bactérie *Clostridium paraputrificum* présente plusieurs caractéristiques prometteuses pour l'industrie et la valorisation de la biomasse végétale.

Cette étude a utilisé différentes méthodes de bioinformatique pour effectuer des analyses physico-chimiques, analyser la structure secondaire, étudier les propriétés structurales telles que la modélisation par homologie, le raffinement et la validation du modèle, ainsi que réaliser des analyses fonctionnelles de 1.4- β -xylanase de *C. paraputrificum*. Cette enzyme a démontré sa stabilité thermique et son caractère acide.

La présente étude est la première analyse *in silico* contribuant à la compréhension des propriétés structurales et fonctionnelles de cette enzyme, ce qui pourrait favoriser sa production et son utilisation dans divers secteurs industriels.

Mots clés : 1.4- β -xylanase, xylane, *Clodtridium paraputrificum*, analyse *in silico*, modélisation par homologie

Abstract

1.4- β -xylanase (EC 3.2.1.8) is an enzyme cleaving randomly the β 1,4 backbone of the complex plant cell wall polysaccharide xylan. This enzyme is used in various industrial sectors such as the pulp and paper industry, the food industry, animal feed and biofuel production. This enzyme, produced by fungi and bacteria, cleaves the β 1,4 backbone of the complex plant cell wall polysaccharide xylan. However, little is known about bacterial 1.4- β -xylanase. The bacterium *Clostridium paraputrificum* has several promising characteristics for plant biomass industry and valorization, including versatile metabolism and adaptability to harsh environmental conditions.

This study utilized various bioinformatics methods to conduct physicochemical analyses, analyze the secondary structure, investigate structural properties such as homology modeling, model refinement, and validation, as well as perform functional analyses of the 1.4- β -xylanase from *C. paraputrificum*. This enzyme has demonstrated its thermal stability and acidic nature.

The present study is the first *in silico* analysis contributing to the understanding of the structural and functional properties of this enzyme, which could promote its production and use in various industrial sectors.

Keywords : 1.4- β -xylanase, xylan, *Clodtridium paraputrificum*, *in silico* analysis, homology modeling

ملخص:

يعد 1.4- β -زيلاناز (EC 3.2.1.8) إنزيمًا يقوم بتقسيم ظهر البيتا 4.1 للبوليساكاريد النباتي المعقد الموجود في جدران الخلايا النباتية الجذعية. يستخدم هذا الإنزيم في عدة قطاعات صناعية مثل صناعة الورق واللبن، وصناعة الأغذية، وتغذية الحيوانات، وإنتاج الوقود الحيوي. يعمل هذا الإنزيم، الذي يتم إنتاجه من قبل الفطريات والبكتيريا، على تقسيم ظهر البيتا 4.1 للبوليساكاريد النباتي المعقد زيلان ومع ذلك، يعرف القليل عن 1.4- β -زيلاناز البكتيرية.

تتمتع بكتيريا *Clostridium paraputrificum* بعدة خصائص واعدة لصناعة وتأمين كتلة النباتات، بما في ذلك استقلاب متعدد الاستعمالات وقابلية التكيف لظروف بيئية قاسية.

استخدمت هذه الدراسة طرق حيوية مختلفة لإجراء تحاليل فيزيوكيميائية، وتحليل الهيكل الثانوي، واستكشاف الخصائص الهيكلية مثل نمذجة التشابه، وتنقيح النموذج، والتحقق من صحته، بالإضافة إلى إجراء تحاليل وظيفية لـ 1.4- β -زيلاناز من *C. paraputrificum*. لقد أظهر هذا الإنزيم استقراره الحراري وطبيعته الحمضية.

تعتبر هذه الدراسة التحليلية في الحاسوب الأولى المساهمة في فهم الخصائص الهيكلية والوظيفية لهذا الإنزيم، مما يمكن أن يعزز إنتاجه واستخدامه في مختلف القطاعات الصناعية.

الكلمات المفتاحية: 1.4- β -زيلاناز، زيلان، *Clostridium paraputrificum*، تحليل *in silico*، نمذجة التشابه