

# La production de cellulose chez les plantes et les bactéries

Maud Delsaute

Séminaire de thèse CIP

03.05.2013

# Plan

- Introduction:  
« Cellulose: un biopolymère fascinant »
- Synthèse de cellulose: plantes
- Synthèse de cellulose: bactéries
- Régulation de la formation des biofilms cellulositiques

# Introduction

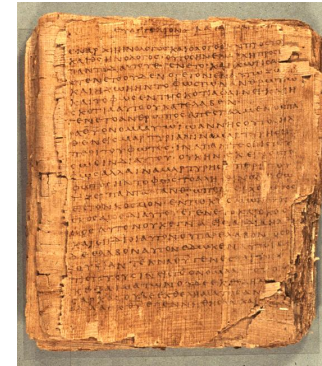
« Cellulose: un biopolymère fascinant »

# Cellulose: un biopolymère fascinant

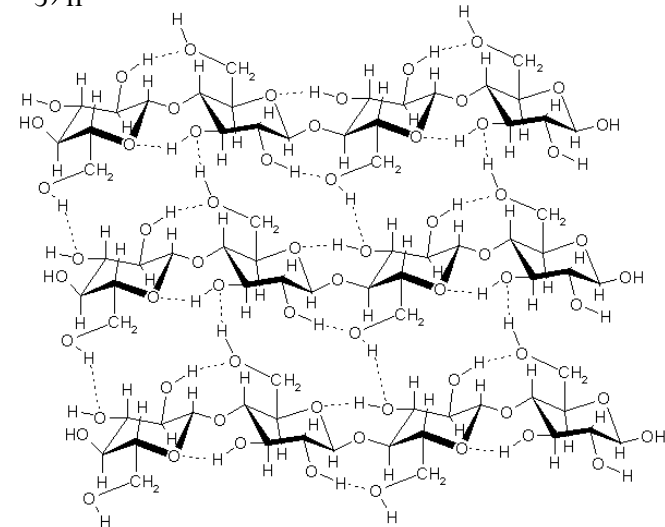
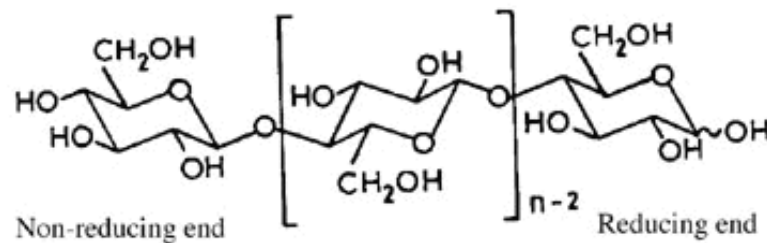
- Depuis des milliers d'années:

Papier, vêtements, énergie

*Cyperus papyrus*



- **Anselme Payen, 1838** : Découverte du « sucre de la paroi cellulaire végétale » et détermination de sa formule chimique  $(C_6H_{10}O_5)_n$



# Cellulose: un biopolymère fascinant

- **Depuis ~ 150 ans:** Utilisation de la cellulose comme matière première

- Fibres brutes: papier, carton
- Modifiées chimiquement

## Esters de cellulose:

- Celluloïd, 1870, Hyatt Manufacturing Company:  
nitrate de cellulose et camphre, toute première matière plastique artificielle
- Thermoplastiques:  
Adhésif (matériaux composites), films photographiques, membranes de séparation (eau, alimentation, médecine, recherche en biosciences,...)

## Ethers de cellulose: CMC, MHEC,...

- Colle et adhésif (construction), épaississant et stabilisateur (alimentaire, cosmétique, pharmaceutique)

## Fibres de cellulose régénérées: Viscose / Lyocell

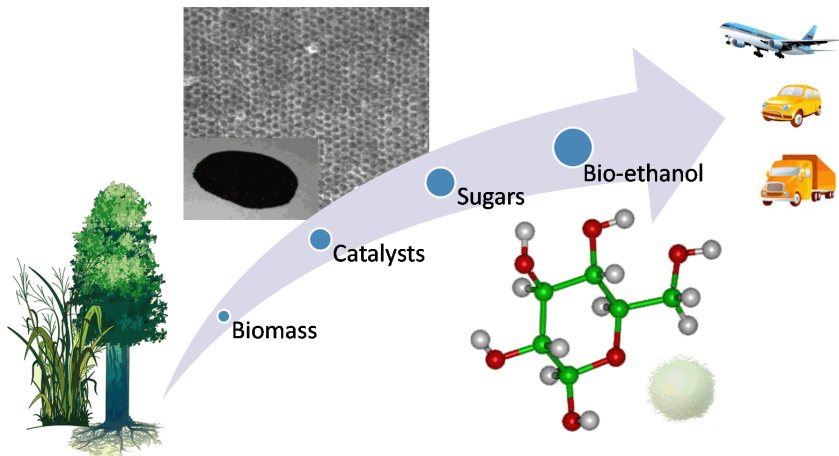
- Textile, éponges, films (cellophane), membranes
- Ouate de cellulose: isolant

# Cellulose: un biopolymère fascinant

- **Bioénergies**

Cellulose → Glucose → Ethanol

Lignocellulose: cellulose + hémicellulose + lignine



“From the current point of view, cellulose is the most common organic polymer, representing about  $1.5 \times 10^{12}$  tons of the total annual biomass production (50%), and is considered an almost inexhaustible source of raw material for the increasing demand for environmentally friendly and biocompatible products.”

Klemm D *et al* (2005) *Angewandte Chemie*, 44 (22):3358-3393

# Cellulose: un biopolymère fascinant

- **Producteurs de cellulose:**

- Plantes

- Bois : lignocellulose (DP: 300-1700)

- Coton: quasi pure (DP: 800-10000)

→ paroi cellulaire

- Algues

- Champignons

- Bactéries → extracellulaire

- DP très élevé (2000-8000)

- haute cristallinité (60-90%)

- haute teneur en eau (90%)

- forte résistance

- grande pureté

→ Production de cellulose pure en labo  
pansements internes (tissulaire),  
additifs alimentaires, membranes



# Cellulose: un biopolymère fascinant

- **Intérêts de comprendre la synthèse de cellulose et sa régulation :**

Matériaux biocompatibles:

- Créer des complexes de synthèse de cellulose *in vitro*
- Insérer ou modifier des gènes dans les organismes producteurs de cellulose → modifier les propriétés de la cellulose (DP, cristallinité,...)
- « Scaling-up » de la synthèse cellulose par les bactéries → production directe de cellulose pure

Bioénergies:

- Améliorer l'isolation du glucose
- Surproduire la cellulose

Secteur médical:

- Eradiquer les biofilms (*Enterobacteriaceae*: infections nosocomiales)



# Synthèse de cellulose: plantes

# Synthèse de cellulose : plantes

## Polymère de la paroi cellulaire

- Résistance à la pression de turgescence
- Maintient de la taille et de la forme
- Rôle dans la différenciation, la division cellulaire et la détermination de la direction de la croissance

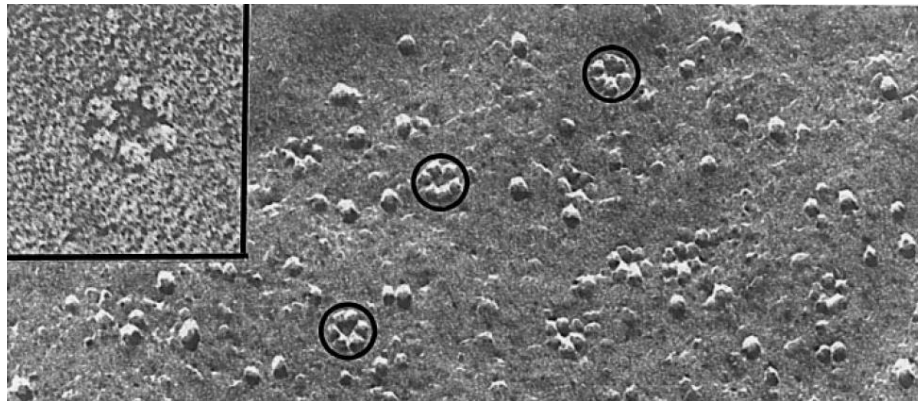
- **1838, A Payen** : découverte de la cellulose végétale

- **“Cellulose Synthase Complex” (CSC)**

**1980, RM Brown Jr**, plantes vasculaires (blé, soja,...)

Cryofracture + microscopie électronique

Complexe membranaire en forme de **rosette = TC (complexe terminal)**

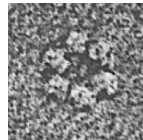


Delmer D (1999) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50:245-276

# Synthèse de cellulose : plantes

## CSC : “Cellulose Synthase Complex”

- ~ 3000 kD
- ~ 25 nm
- 6 sous-unités
  - 6 cellulose synthases (CesA)



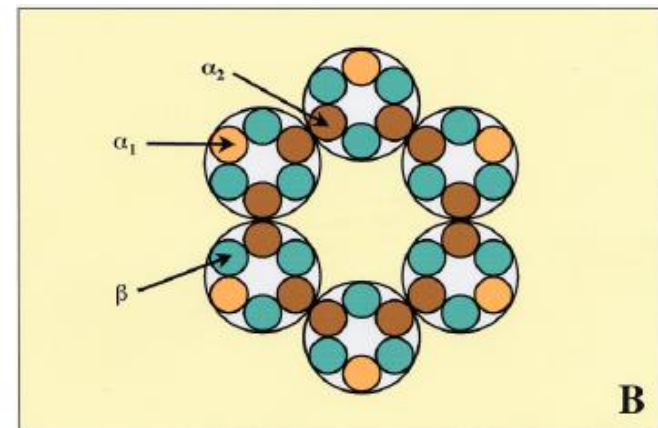
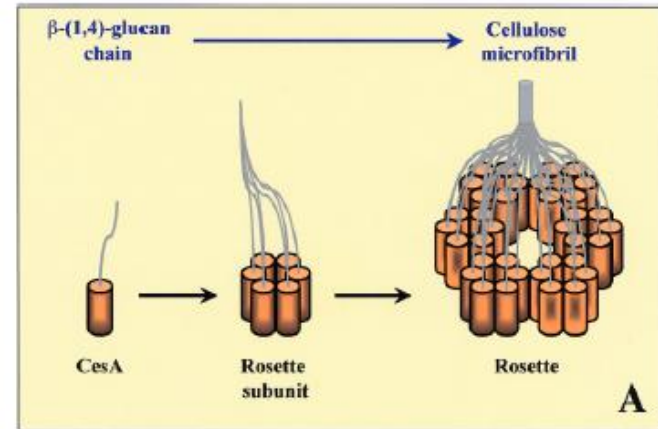
→ 1 microfibrille = 36 chaînes

- 3 cellulose synthases différentes

### *A thaliana*

Paroi 1<sup>ère</sup>: AtCesA1, AtCesA3, AtCesA6

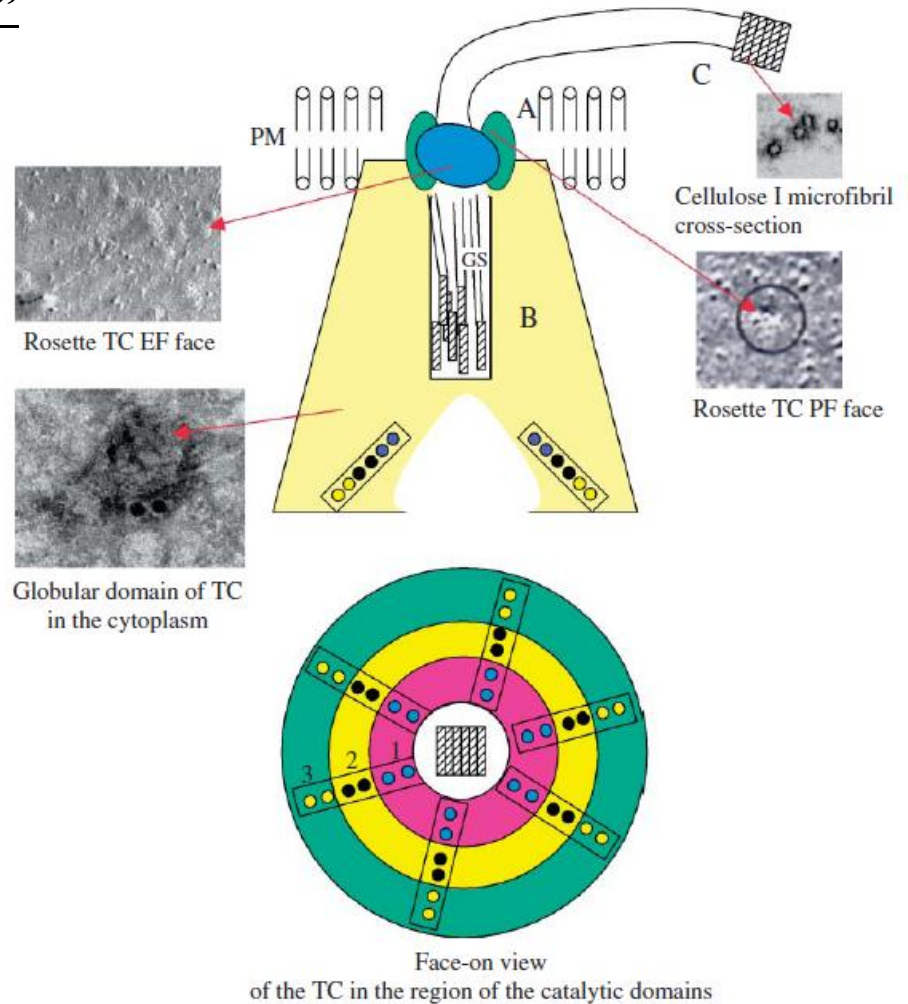
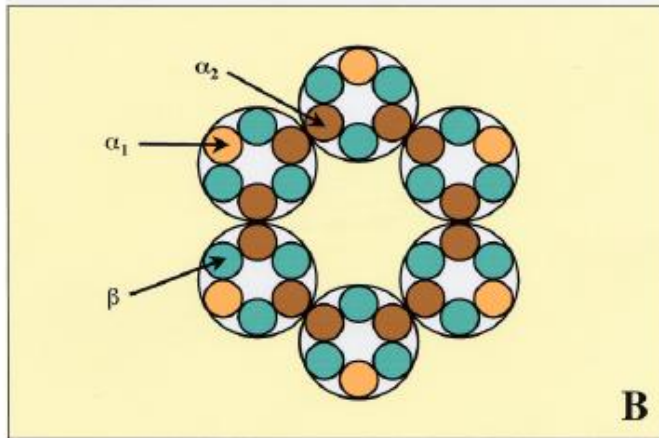
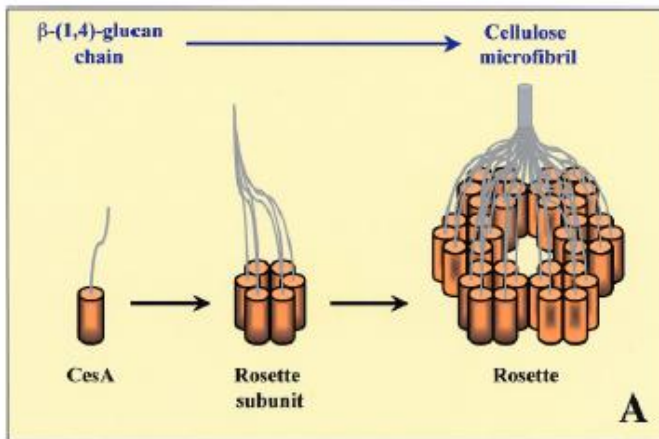
Paroi 2<sup>ème</sup>: AtCesA4, AtCesA7, AtCesA8



Doblin MS *et al* (2002) *Plant Cell Physiol*, 43(12):1407-1420

# Synthèse de cellulose : plantes

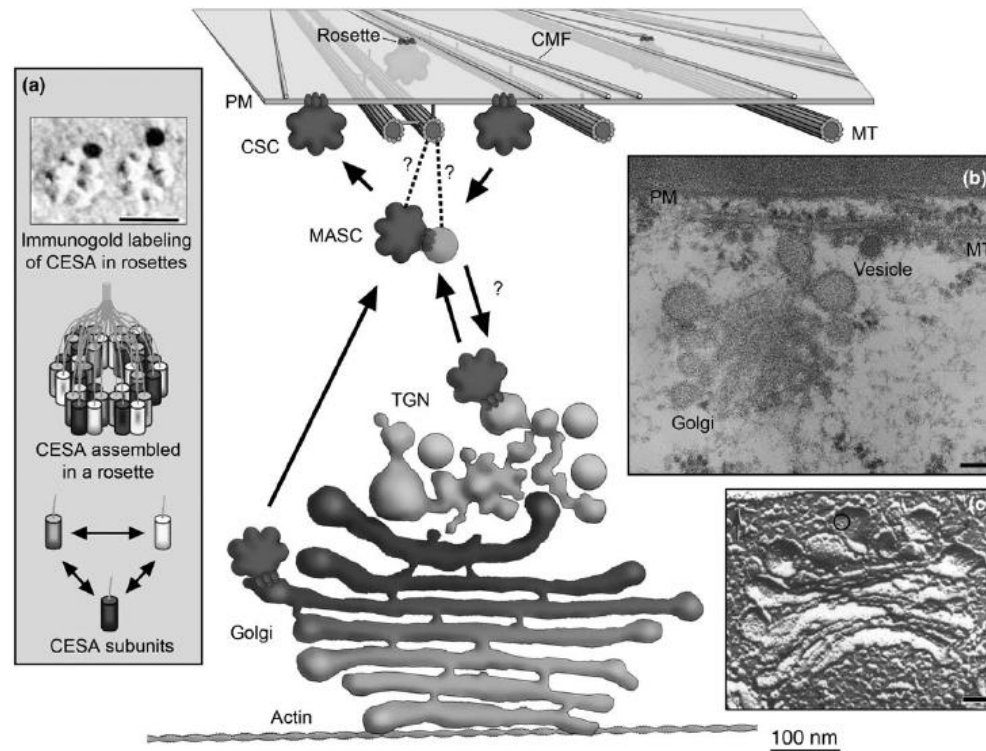
## CSC : “Cellulose Synthase Complex”



# Synthèse de cellulose : plantes

## CSC : “Cellulose Synthase Complex”

Système mobile



Crowell EF *et al* (2010) *Curr Opin in Plant Biol*, 13:700-705

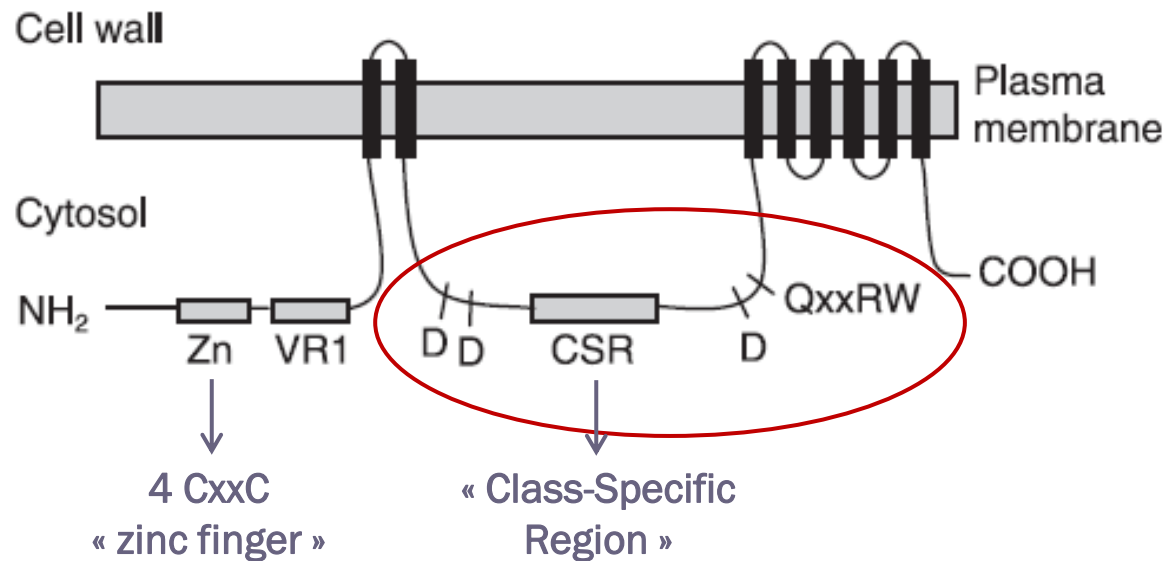
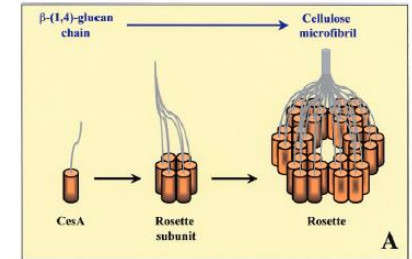
TGN: “*Trans*-Golgi Network”

MASC: “Microtubule-Associated cellulose Synthase Compartment”

# Synthèse de cellulose : plantes

## Cellulose synthase (CesA)

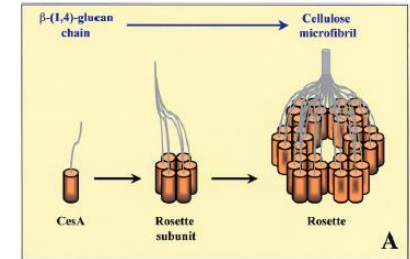
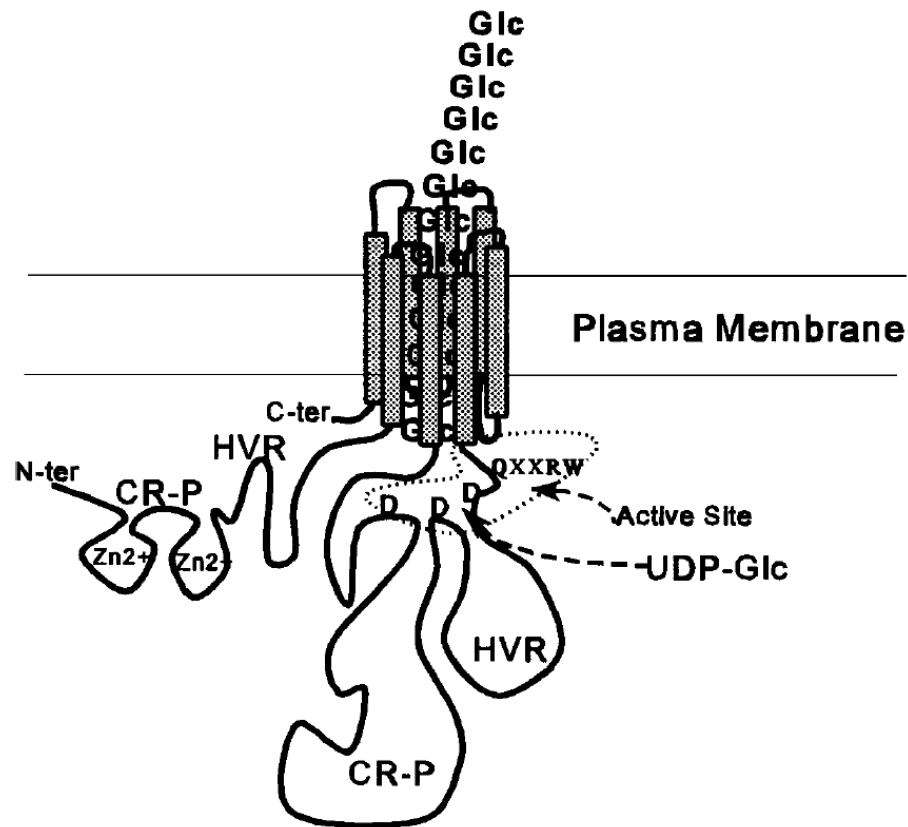
- $\beta$ -glycosyltransférase processive  $\rightarrow$  Polymérisation
- D,D,D,QXXRW
- UDP-glucose
- 985-1088 AA



# Synthèse de cellulose : plantes

## Cellulose synthase (CesA)

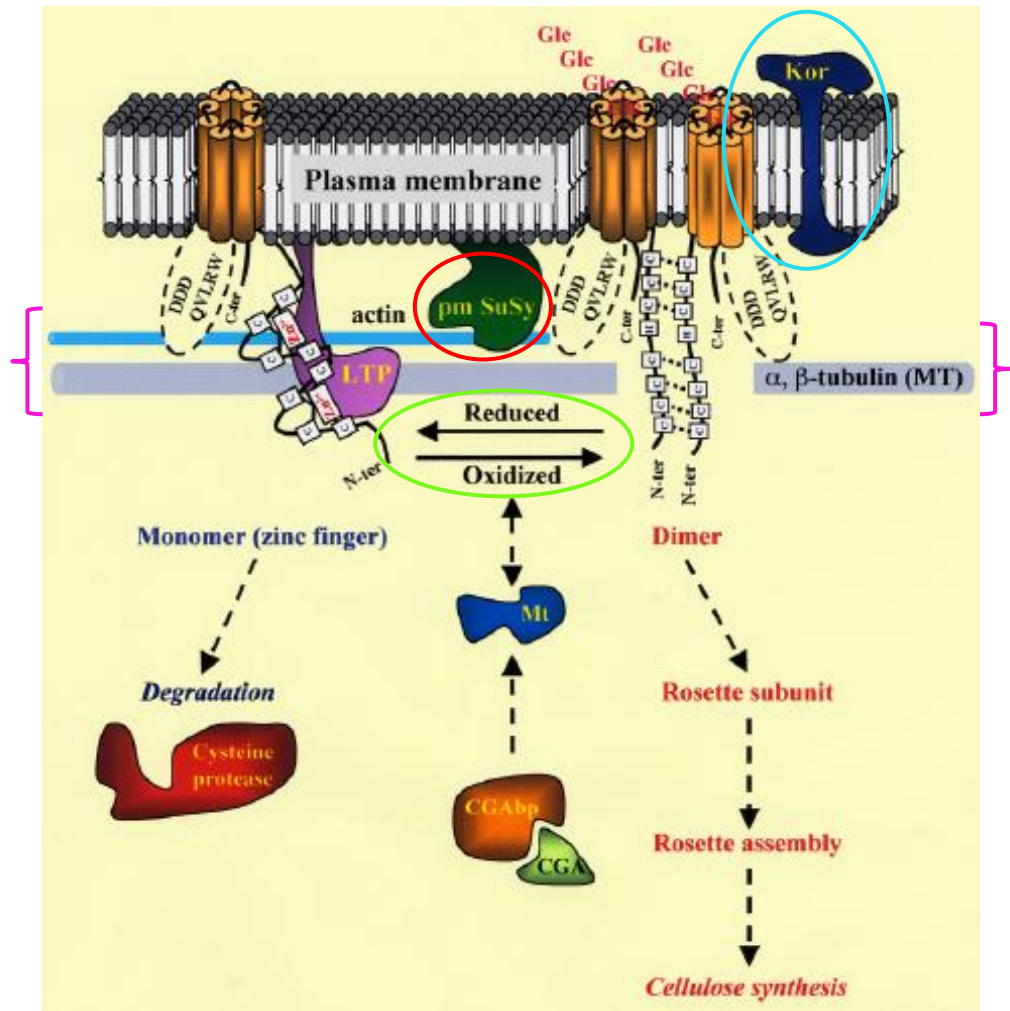
- $\beta$ -glycosyltransférase processive  $\rightarrow$  Polymérisation
- D,D,D,QXXRW
- UDP-glucose
- 985-1088 AA



# Synthèse de cellulose : plantes

## Autres composants

- Etat Redox
- SuSy
  - UDP + sucrose →
  - UDP-glucose + fructose
- $\beta$ -1,4-glucanase
- Korrigan
- Cytosquelette
  - MT
  - Actine
- Cobra / Kobito: ?





# Cellulose : plantes vs bactéries

	Plantes	Bactéries (Gram -)
<b>Cellulose</b>	Paroi cellulaire Lignocellulose	
<b>CSC</b>	Complexes en rosettes Complexes dynamiques Membrane plasmique Cellulose synthase	
<b>Cellulose synthase</b>	$\beta$ -glycosyltransférase processive / D,D,D,QXXRW / UDP- glucose 36 CesA $\rightarrow$ 36 chaînes	
<b>UDP-glucose</b>	SuSy (sucrose)	
<b>Régulation</b>	Transcriptionnelle (NAC / MYB) Post-transcriptionnelle	
<b>Autres composants</b>	Korrigan Cytosquelette / Cobra / Kobito	

# Synthèse de cellulose: bactéries

# Synthèse de cellulose : bactéries

## Polymère extracellulaire, biofilm






- Adhésion au substrat
- Interaction avec les cellules hôtes
- Accès aux nutriments
- Protection mécanique, chimique, biologique  
(pathogènes, substances toxiques, variations environnementales, UV,...)
- **1886, AJ Brown** : Observation d'un matériel extracellulaire gélatineux chez *Acetobacter xylinum*
- **1947, S Hestrin** : Début des études sur la synthèse de cellulose bactérienne (*A. xylinum*)
- **1989, RM Brown Jr, M Benziman**: Purification de la cellulose synthase
- **1990, HC Wong** : Isolation de l'opéron de synthèse BCS contenant 4 gènes (*bcsA-D*)

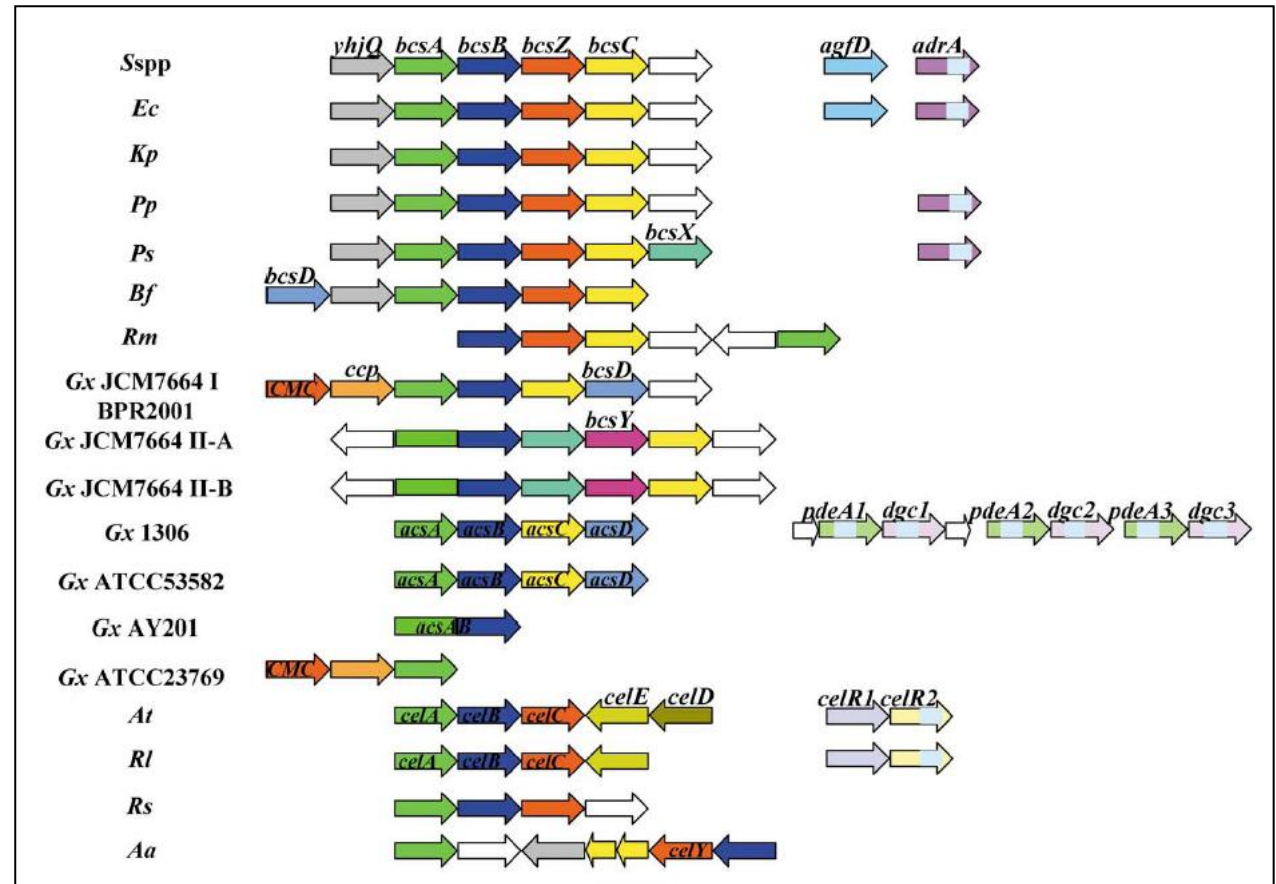
Gram - : *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, ...

Gram + : *Sarcina ventriculi*

# Synthèse de cellulose : bactéries

## Opéron *bcs*

-  BcsA: cellulose synthase
-  BcsB: protéine fixatrice du c-di-GMP ?
-  BcsC: ? (pore/cristallisation)
-  BcsD: ? (pore/cristallisation)
-  BcsZ: endocellulase



Römling U (2002) *Res Microbiol*, 153:205-212

# Synthèse de cellulose : bactéries

## BcsA

- D,D,D,QRXRWA →  $\beta$ -glycosyltransférase processive
- UDP-glucose
- ~ 800 AA
- Protéine membranaire (membrane cytoplasmique)
- Protéine la mieux conservée

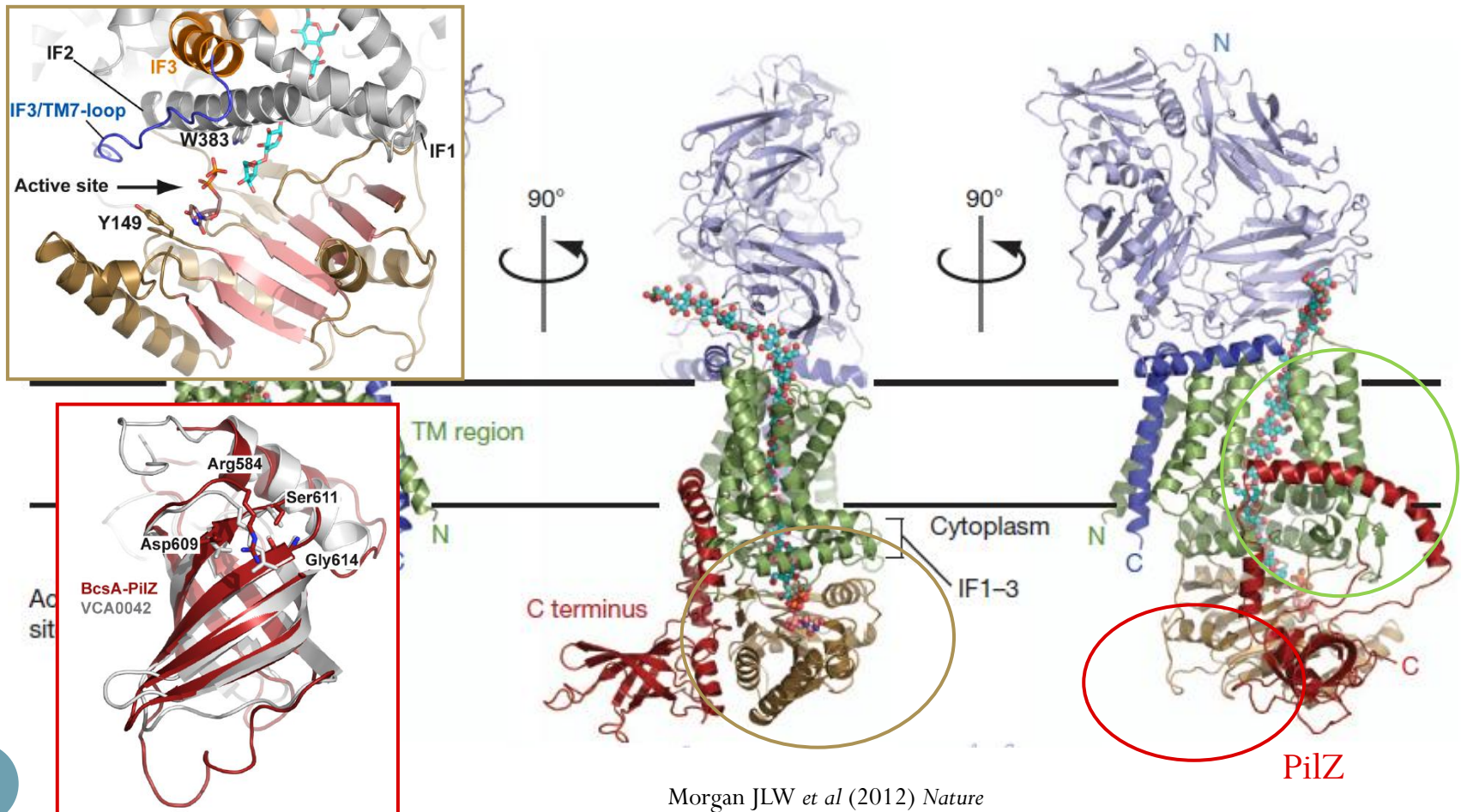
## BcsB

- Protéine fixatrice du c-di-GMP ?
- ~ 750 AA
- Protéine membranaire (membrane cytoplasmique)

# Synthèse de cellulose : bactéries

**BcsA-BcsB** : *Rhodobacter sphaeroides* Morgan (décembre 2012) *Nature*

Co-cristallisation avec de l'UDP-glucose → 18 glucoses

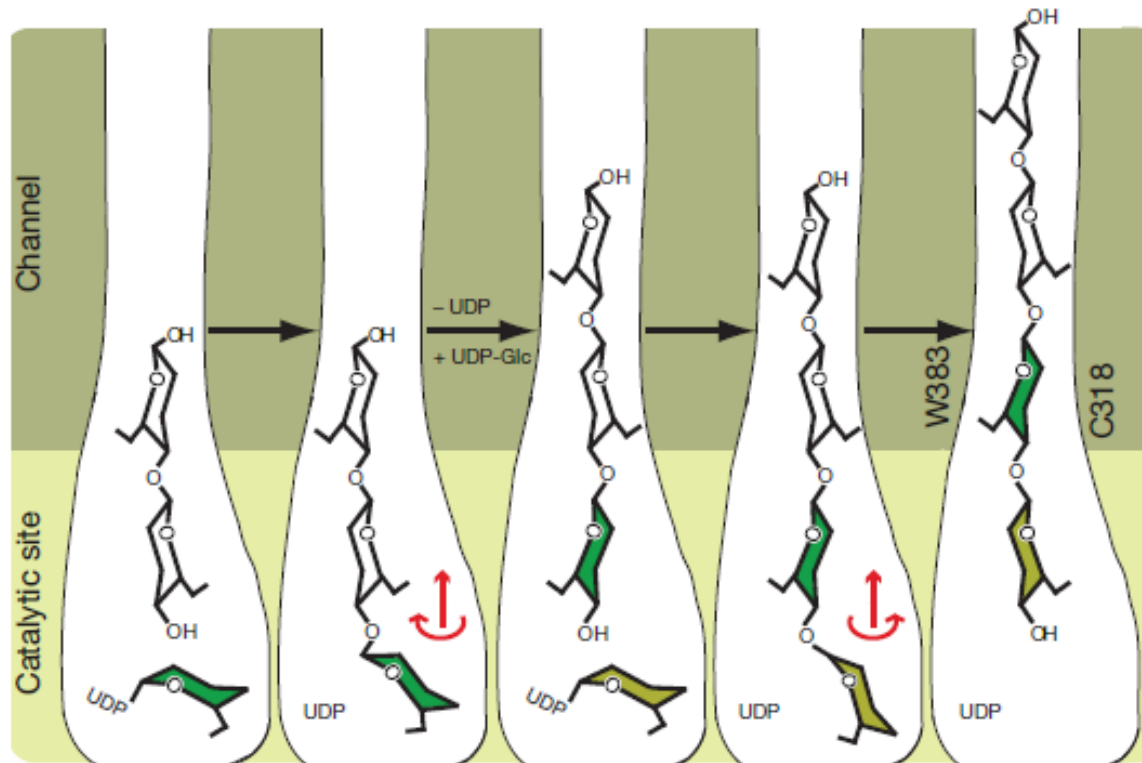


Morgan JLW et al (2012) *Nature*

# Synthèse de cellulose : bactéries

**BcsA-BcsB** : *Rhodobacter sphaeroides* Morgan (2012) *Nature*

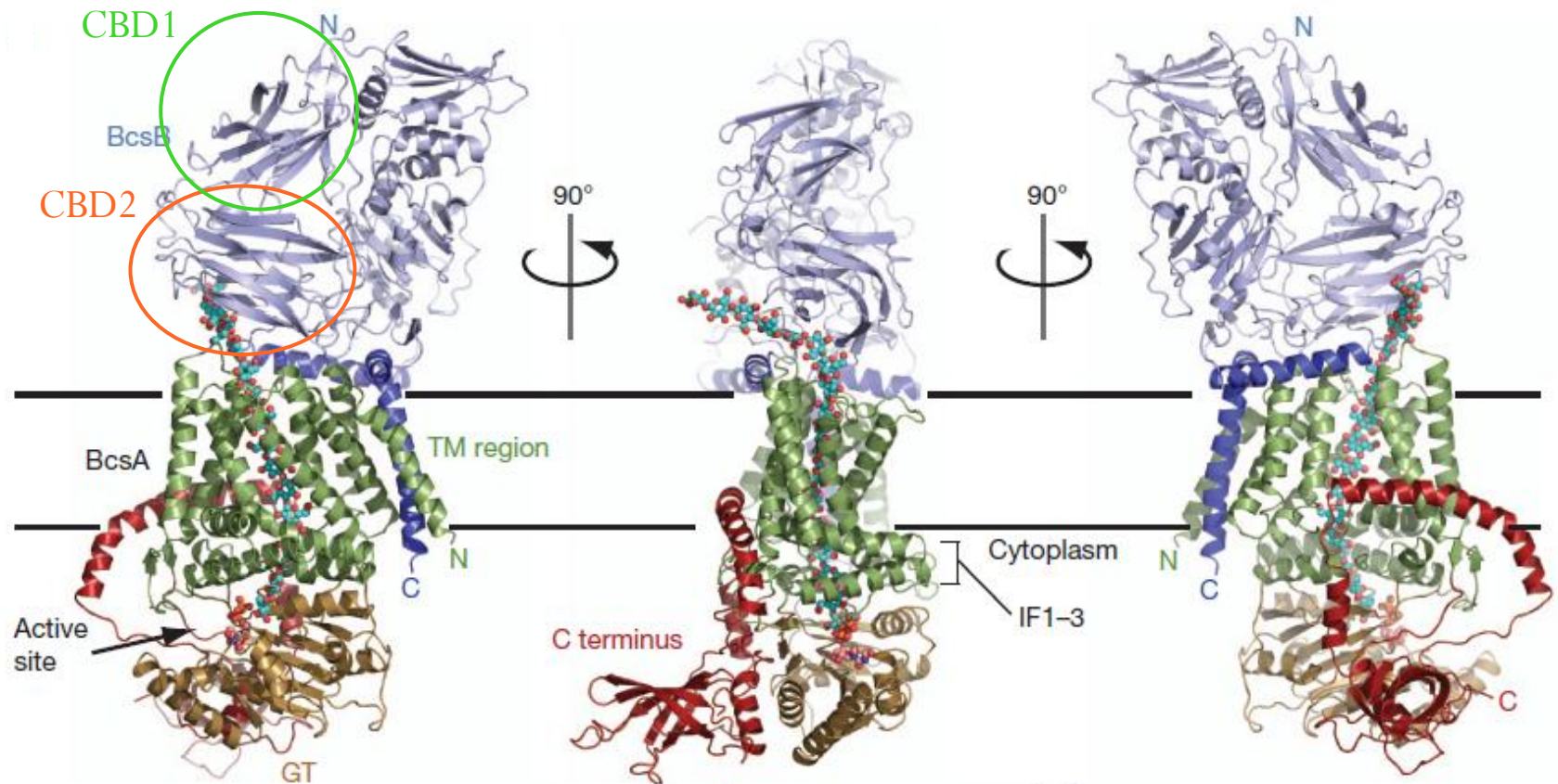
Co-cristallisation avec de l'UDP-glucose → 18 glucoses



# Synthèse de cellulose : bactéries

**BcsA-BcsB** : *Rhodobacter sphaeroides* Morgan (2012) *Nature*

Co-cristallisation avec de l'UDP-glucose → 18 glucoses





# Synthèse de cellulose : bactéries

## BcsA






- D,D,D,QRXRWA →  $\beta$ -glycosyltransférase processive
- Domaine PilZ → fixation du c-di-GMP
- UDP-glucose
- ~ 800 AA
- Protéine membranaire (membrane cytoplasmique) + domaine cytoplasmique
- Protéine la mieux conservée

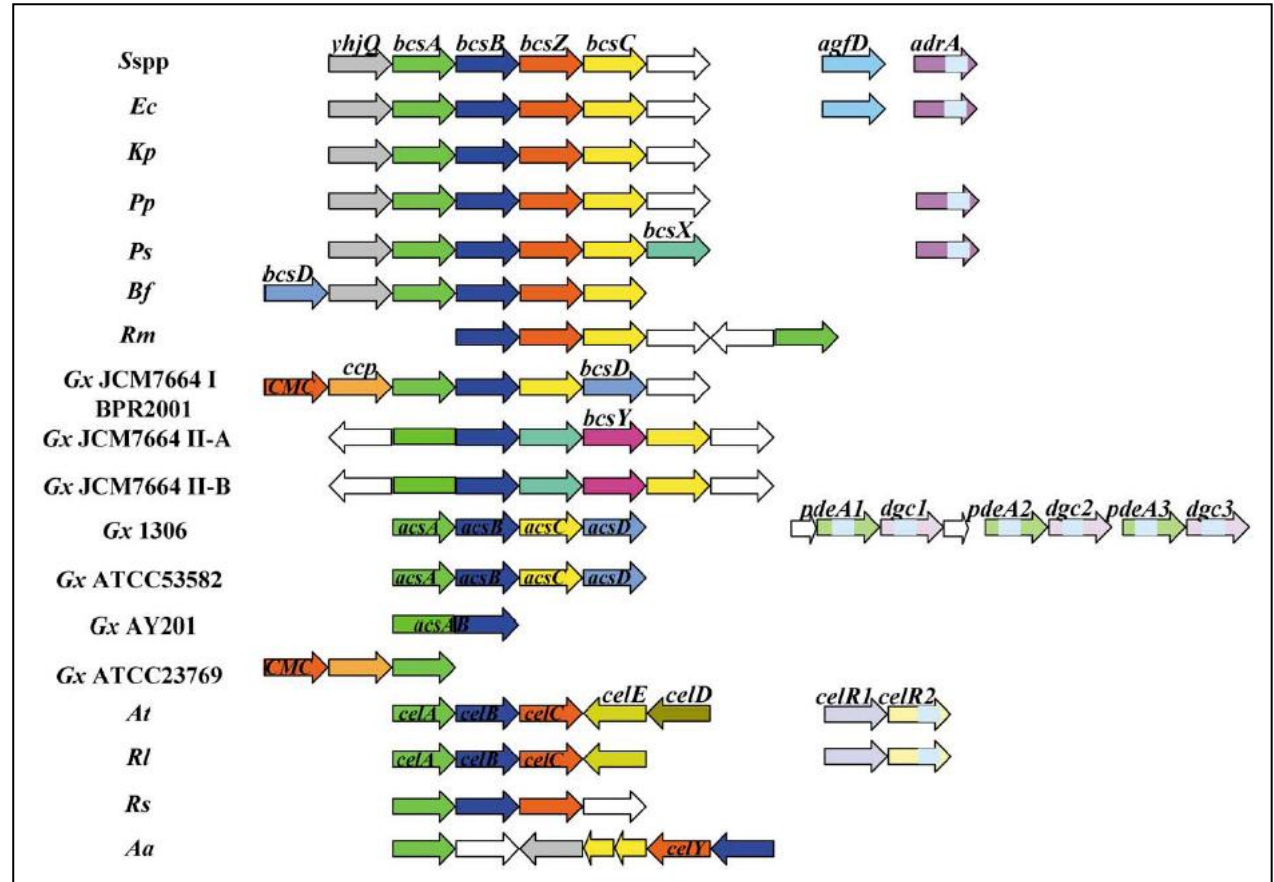
## BcsB

- ~~Protéine fixatrice du c-di-GMP ?~~
- 2 CBDs: dirigent la chaîne en élongation dans le périplasme
- ~ 750 AA
- Protéine membranaire (membrane cytoplasmique) + domaine périplasmique

# Synthèse de cellulose : bactéries

## Opéron *bcs*

-  BcsA: cellulose synthase
-  BcsB: protéine fixatrice du c-di-GMP ?
-  BcsC: ? (pore/cristallisation)
-  BcsD: ? (pore/cristallisation)
-  BcsZ: endocellulase



# Synthèse de cellulose : bactéries

## BcsC

- Homologie de séquences avec des protéines formant des pores
- Protéine membranaire (membrane externe)
- Export / Cristallisation
- ~ 1300 AA

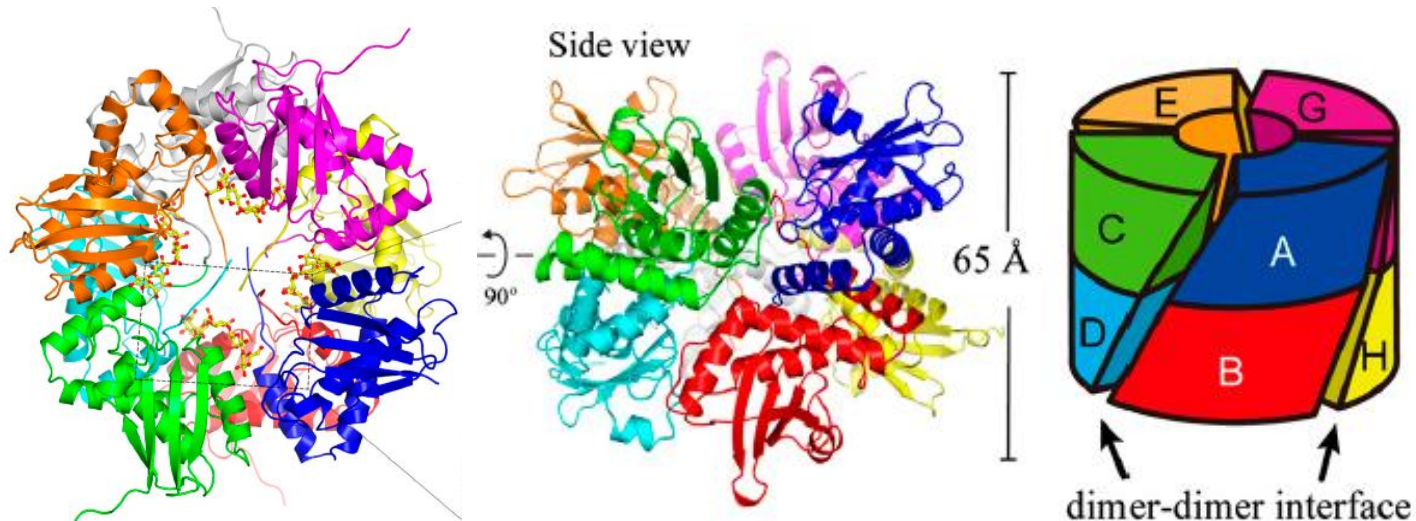
## BcsD

- Présente chez certaines espèces (*A. xylinum*)
- Export / Cristallisation
- ~ 160 AA

# Synthèse de cellulose : bactéries

## BcsD






- Présente chez certaines espèces (*A. xylinum*)
- Export / Cristallisation
- ~ 160 AA
- Hu (2010) PNAS: AxCeSD *A. xylinum* ATCC23769
  - Co-cristallisation avec du cellopentaose
  - Octamer → 8 x 160 AA
  - Transport de 4 chaînes → association de 4 cellulose synthases BcsA

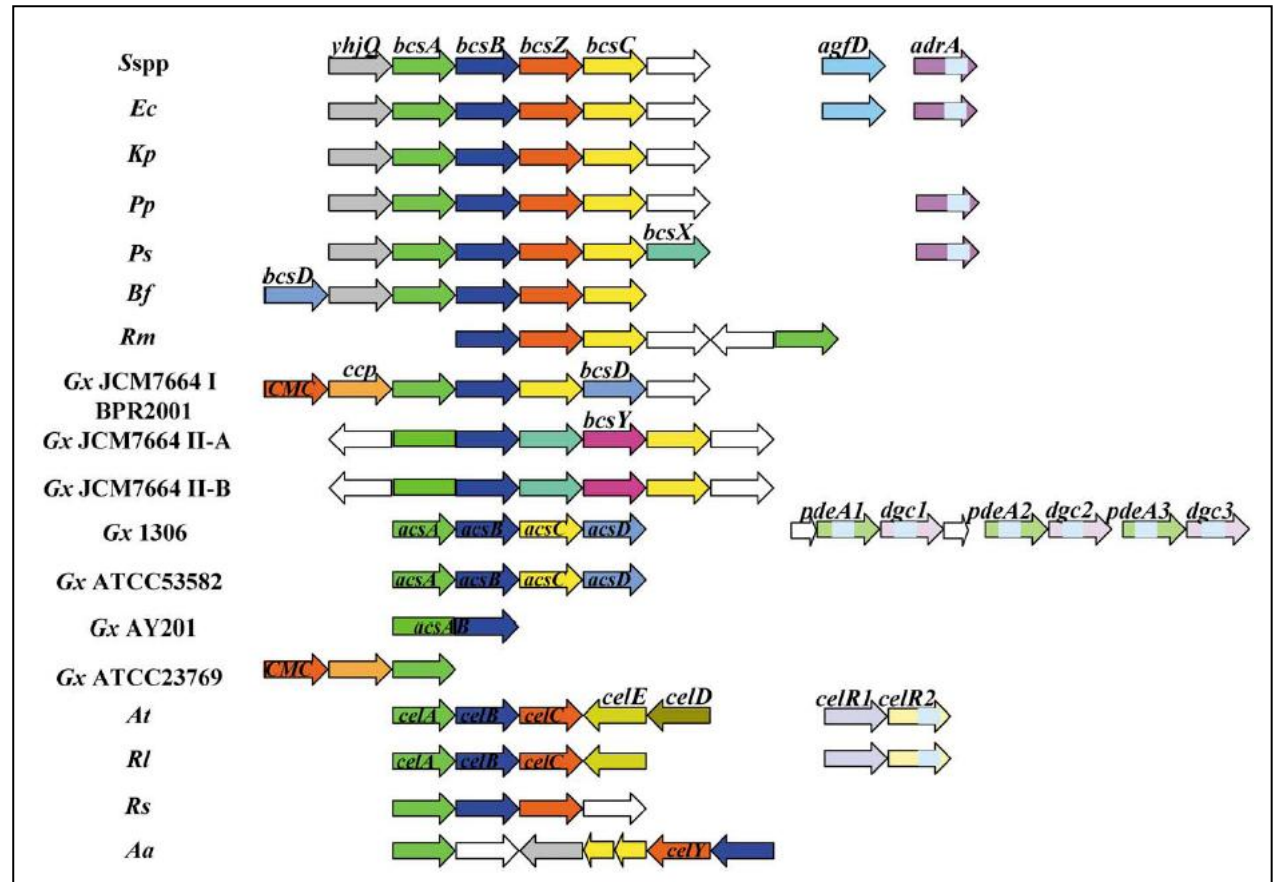


Hu SQ *et al* (2010) PNAS, 107(42):17957-17961

# Synthèse de cellulose : bactéries

## Opéron *bcs*

-  BcsA: cellulose synthase
-  BcsB: protéine fixatrice du c-di-GMP ?
-  BcsC: ? (pore/cristallisation)
-  BcsD: ? (pore/cristallisation)
-  BcsZ: endocellulase



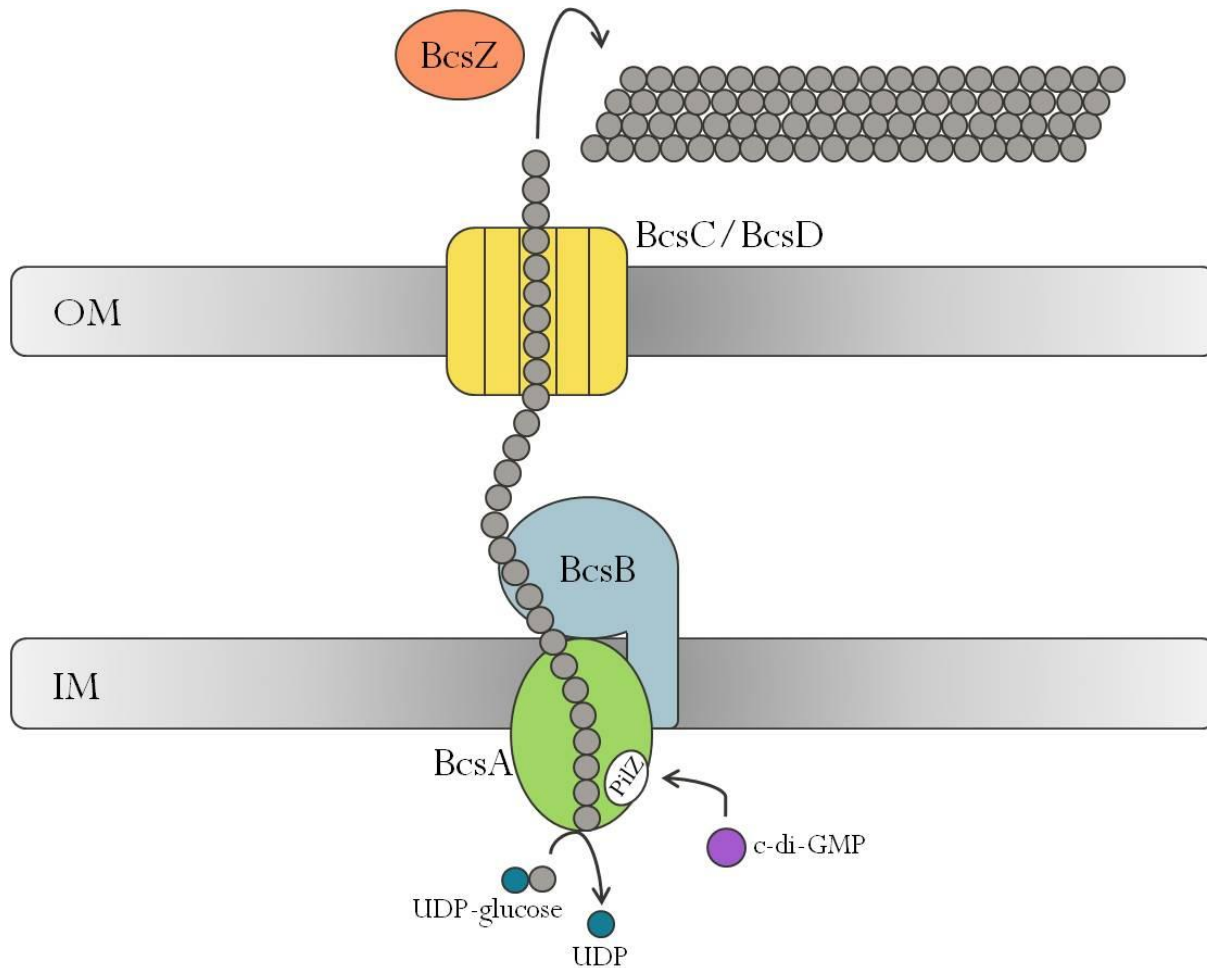
# Synthèse de cellulose : bactéries

## BcsZ

- Endocellulase → glycoside hydrolase
- Cello-oligosaccharides
- Protéine extracellulaire
- Rôle:
  - Edition/termination de polymérisation → taille
  - Arrangement des microfibrilles (cristallisation)  
→ hydrolyse
  - Transfert des cello-oligosaccharides sur la cellulose existante  
→ transglycosylation

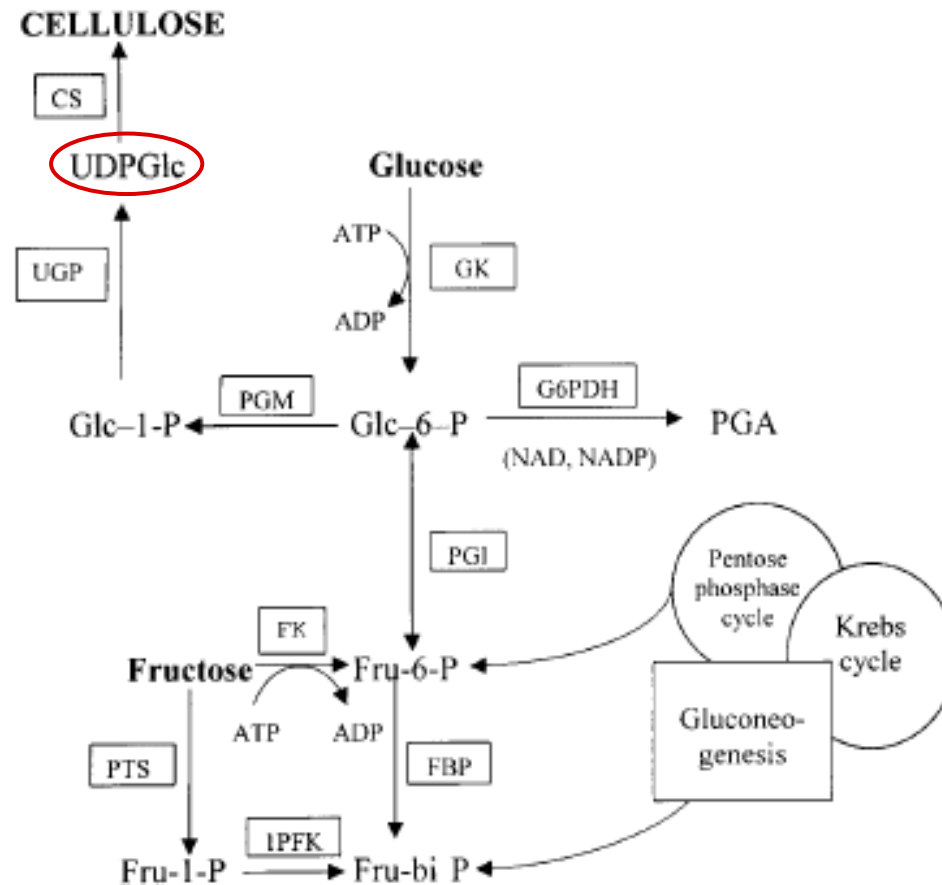
# Synthèse de cellulose : bactéries

## Opéron *bcs*



# Synthèse de cellulose : bactéries

## Métabolisme du carbone





# Cellulose : plantes vs bactéries

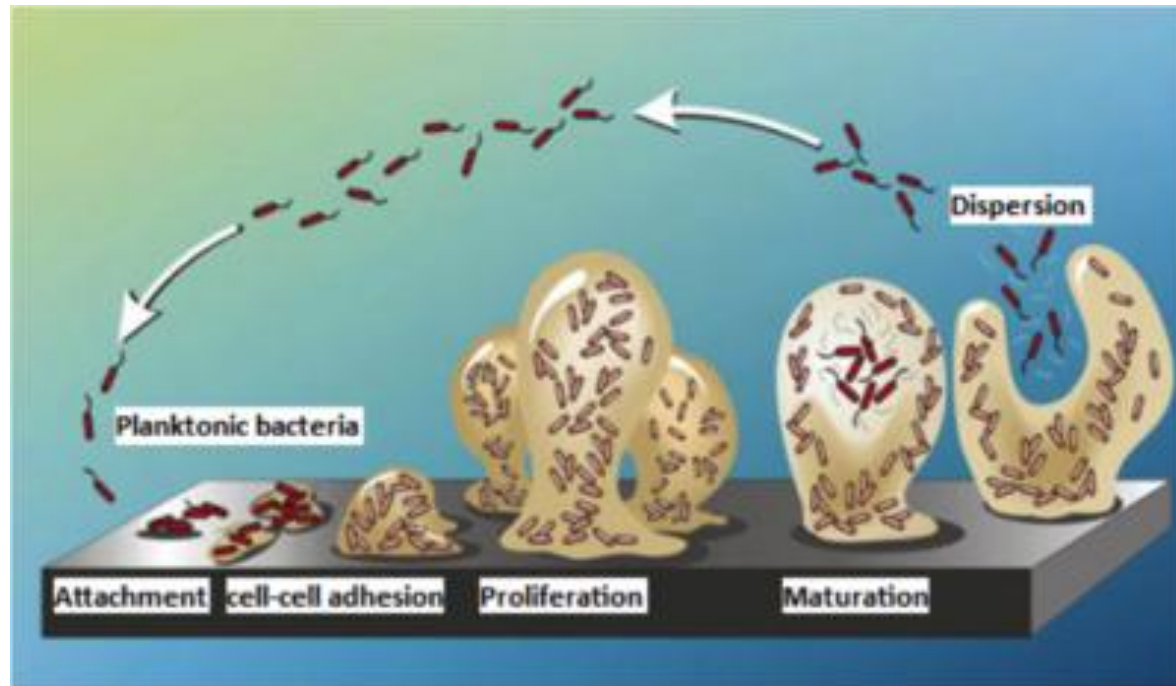
	Plantes	Bactéries (Gram -)
<b>Cellulose</b>	Paroi cellulaire Lignocellulose	Extracellulaire Pure
<b>CSC</b>	Complexes en rosettes Complexes dynamiques Membrane plasmique Cellulose synthase	Complexes alignés en 1 rang Complexes statiques Membranes interne - externe Opéron BCS (BcsB/C(/D))
<b>Cellulose synthase</b>	$\beta$ -glycosyltransférase processive / D,D,D,QXXRW / UDP- glucose 36 Cesa → 36 chaines	1 BcsA → 1 chaine
<b>UDP-glucose</b>	SuSy (sucrose)	Métabolisme du carbone (fructose-6-P)
<b>Régulation</b>	Transcriptionnelle (NAC / MYB) Post-transcriptionnelle	Post-transcriptionnelle c-di-GMP (PilZ)
<b>Autres composants</b>	Korrigan Cytosquelette / Cobra / Kobito	BcsZ (Opéron <i>bcsEFG</i> )

# Régulation de la formation des biofilms celluloseux

# Biofilms cellulosiques : régulation

- **Biofilm:**

protéines (*fimbriae*) + exopolysaccharides (*cellulose*) + acides nucléiques + lipides



# Biofilms cellulosiques : régulation

- c-di-GMP

Messenger secondaire général

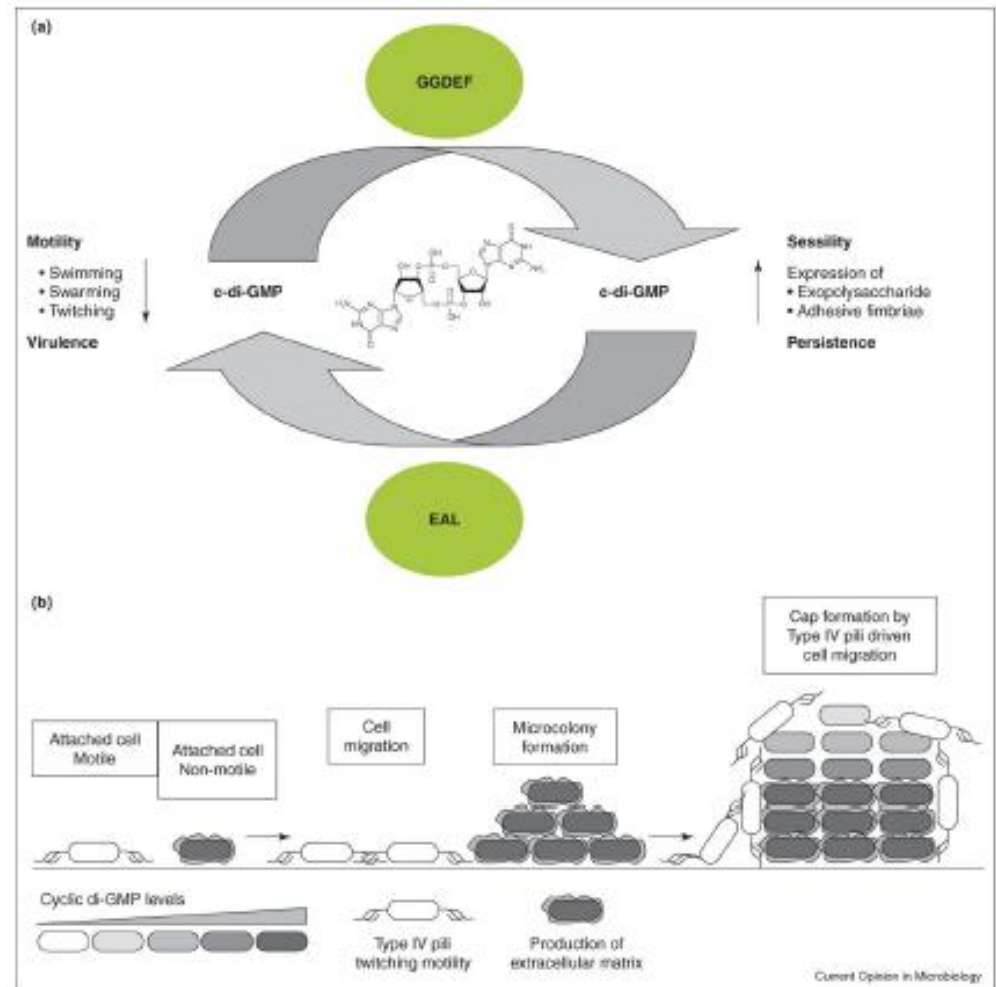
Régulation des biofilms

Cellule:

Mobilité → Sessilité

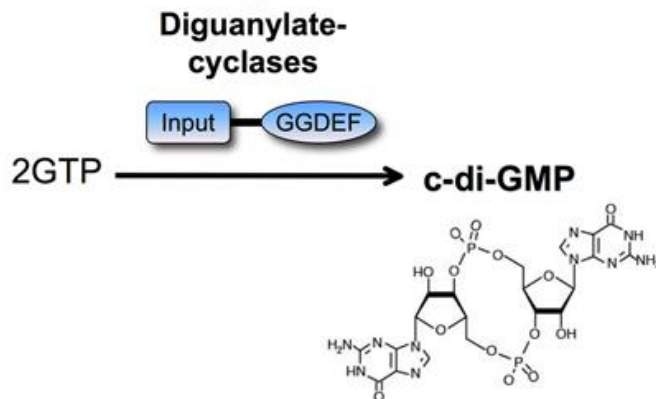
Communauté:

Planctonic (cellule) → Biofilm



# Biofilms cellulosiques : régulation

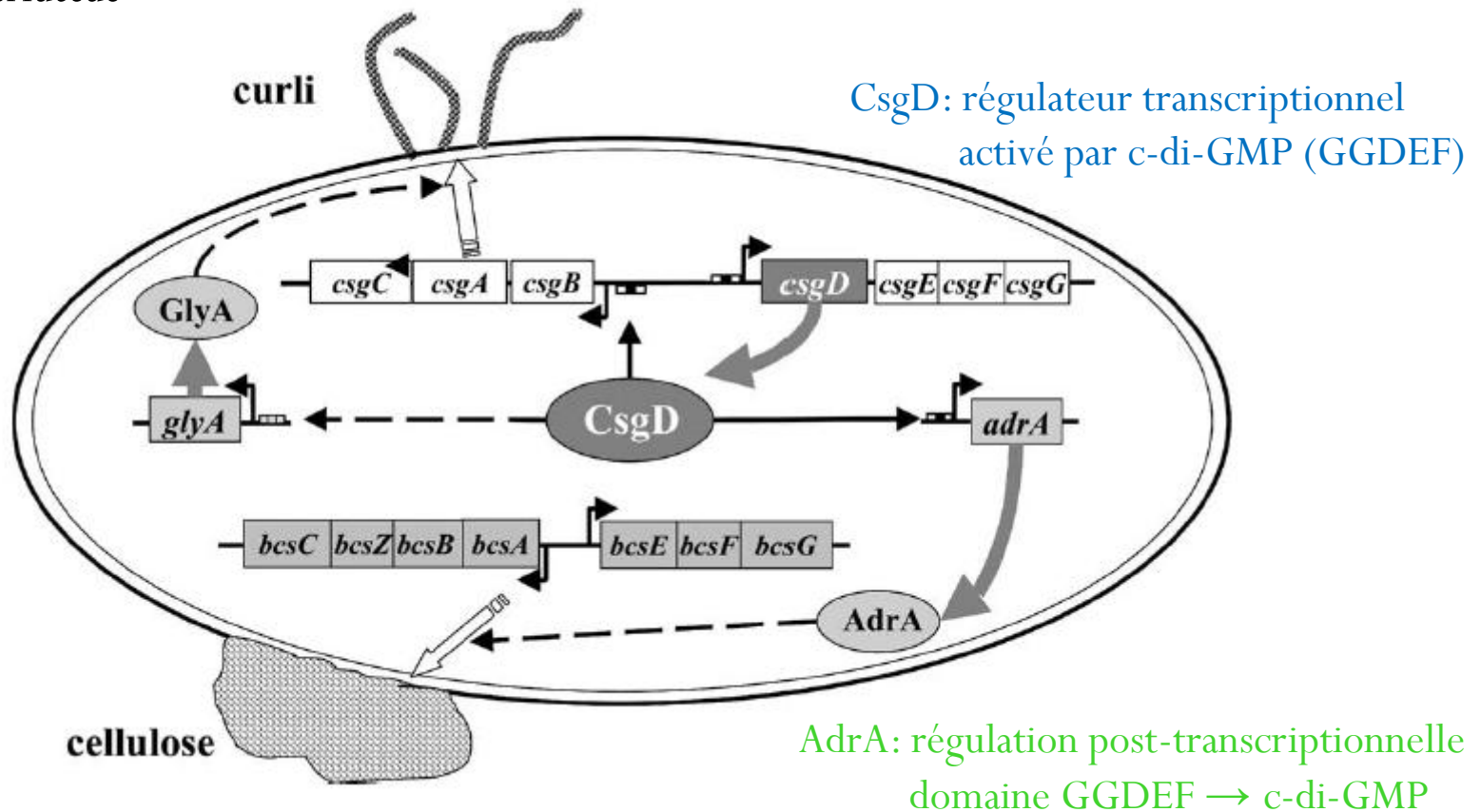
- **c-di-GMP** : messenger secondaire général
  - Domaine GGDEF : activité di-guanylate cyclase (DGC) → Production
  - Domaine EAL : activité phosphodiesterase (PDEA) → Dégradation
  - DGC/PDEA :  
domaines GGDEF/EAL  
domaines sensoriels aux signaux environnementaux



# Biofilms cellulosiques : régulation

- **Biofilm:** protéines (fimbriae) + exopolysaccharides (cellulose)

*Enterobacteriaceae*



Merci ...