



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES CHIMIQUE À FINALITÉ SPÉCIALISÉE EN CHIMIE EN ENTREPRISE

Etude de la chitinase chez Halyomorpha halys
vers l'élaboration d'un bioinsecticide

POUCET, Jean

Award date:
2023

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Université de Namur
Faculté des Sciences

Etude de la chitinase chez *Halyomorpha halys* : vers l'élaboration d'un bioinsecticide



Mémoire présenté pour l'obtention du grade académique de Master Chimie "Chimie du Vivant et des Nanomatériaux" : Finalité Spécialisée

Jean POU CET

Promoteur : Catherine MICHAUX

Co-Promoteur : Eric A. PERPETE

Superviseur : Virgile NEYMAN

Janvier 2023

UNIVERSITE DE NAMUR

FACULTE DES SCIENCES

Enseignement du Département de Chimie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone : + 32(0)81.72.54.44 - Téléfax : + 32(0)81.72.54.40

E-mail : enseignement.chimie@unamur.be - www.unamur.be/sciences

Etude de la chitinase chez *Halyomorpha halys* : vers l'élaboration d'un bioinsecticide

POUCET Jean

Résumé

De nos jours, l'utilisation intensive d'insecticides, nécessaire pour soutenir l'agriculture, pose plusieurs problèmes comme leur impact sur l'environnement, sur la santé humaine ainsi que l'acquisition de résistances par les espèces visées. Il est donc nécessaire de trouver des alternatives aux substances utilisées actuellement pour lutter contre les insectes ravageurs, qui sont pour la plupart des neurotoxines.

Dans le cadre de cette recherche, l'insecte ravageur étudié est *Halyomorpha halys*, nommé communément la punaise diabolique. Elle est originaire d'Asie mais étend ses zones de présence en Amérique et en Europe.

L'une des méthodes considérées pour lutter différemment contre les espèces ravageuses est de viser une des fonctions biologiques spécifiques à l'insecte et nécessaire à sa survie. La cible potentielle étudiée dans le cadre de ce mémoire est la chitinase, une enzyme hydrolysant la chitine, l'un des principaux constituant de la cuticule externe des insectes. Cette enzyme intervient notamment lors de la mue de l'insecte. Afin d'identifier un inhibiteur sélectif de la chitinase de chez *H. halys*, ce travail a pour but d'isoler et de purifier cette protéine pour pouvoir ensuite la caractériser. Une approche expérimentale et de modélisation moléculaire ont été envisagées.

Mémoire de Master en Sciences Chimique à Finalité Spécialisée

Janvier 2023

Promoteur : Prof. Catherine Michaux

Co-promoteur : Prof. Eric A. Perpète

Remerciements

En cette fin d'année de recherche, je souhaite remercier les personnes qui, de près ou de loin, ont permis à ce mémoire de naître.

Premièrement, je souhaite remercier nos collaborateurs de la faculté Agro-Biotech de Gembloux, sans qui je n'aurais pas pu disposer du matériel biologique nécessaire à la réalisation de cette recherche. Je remercie Frédéric Francis, directeur du laboratoire d'Entomologie, de m'avoir donné l'occasion de réaliser cette collaboration ainsi que pour m'avoir aidé au commencement de cette recherche. Je remercie également Lisa Ianello, Solène Trehiou et Jeannine Bortels pour s'être occupées de l'élevage de punaises lorsque je n'étais pas sur place.

Je souhaite ensuite également remercier nos collaborateurs de l'URBM et plus particulièrement Marc Dieu et Sophie Burteau sans qui je n'aurais pas de résultats de spectrométrie de masse.

Je remercie également le CBS pour m'avoir permis d'utiliser leur broyeur afin de me faciliter la tâche lors de mes manipulations.

Je tiens à remercier comme il se doit chacun des membres du CPB. Je vais donc pour cela commencer par mes compagnons de « galère », mes collègues co-mémorants :

Je remercie Ugo Alfano, collègue que je ne connaissais que de nom avant d'arriver au CPB. Je suis content de l'avoir rencontré, lui et son humour piquant mais toujours bien placé. Je le remercie pour avoir été à l'écoute lors de nos pauses cigarettes, qui m'ont permis parfois de trouver des solutions lorsque j'étais bloqué dans ma recherche. Je le remercie également pour les bons moments passés avec lui lors de nos soirées, que ce soit au Chapitre ou chez Julien.

Je remercie également Tanguy Leyder, collègue de longue date. Ne le connaissant pas plus que ça avant cette année, j'ai découvert un ami sur qui je pouvais compter. Je le remercie pour ces nombreuses chouettes soirées passées avec lui ainsi que pour son aide toujours la bienvenue car basée sur ses connaissances solides. Je le remercie également de nous avoir offert des moments d'anthologie avec son binôme Julien.

Je remercie aussi Hugo Bâlon, mon « BRO ». Ami depuis plus de 4 ans, il m'a accompagné depuis tout ce temps dans mon parcours universitaire. Je le remercie d'être encore là après tout ce temps, d'avoir été solidaire dans les chouettes moments comme dans les plus durs et de m'avoir souvent aidé lorsque j'avais des problèmes avec mon ordinateur (ce qui, disons-le, est arrivé plus que souvent). Je ne pouvais pas imaginer meilleure fin que de réaliser ce mémoire en sa compagnie.

Mes collègues co-mémorants étant remerciés, je peux maintenant passer aux remerciements des doctorants/anciens membres du CPB :

Je remercie Cyril Vandevyver, ancien mémorant. Celui-ci a été une présence plus que bienvenue durant les longues sessions de travail au bureau. Je suis également content d'avoir pu faire sa connaissance, j'ai passé de très bonnes soirées avec lui à avoir des débats sur tout et n'importe quoi. J'espère cependant qu'il s'entraîne à « Super Smash Bros Ultimate », car je compte bien encore y jouer avec lui dans le futur.

Je remercie Laurane Guillaume, ancienne mémorante. Je la remercie pour son aide tout au long de l'année, même quand celle-ci était sur le continent américain. Je retiendrai également nos conversations endiablées sur les épisodes de « House of the dragon », ses pâtisseries faites avec amour ainsi que sa non-résistance face aux boissons éthylysées.

Je remercie Maude Quicray, ancienne chercheuse du CPB. Je la remercie pour tous ces moments passés au Chapitre avec elle, pour toutes ces blagues idiotes qui ont le don de me faire rire ainsi que pour son expertise concernant l'entomologie. J'espère qu'on aura encore l'occasion de se voir régulièrement, histoire que je puisse encore rager avec elle sur des jeux de société.

Je remercie Blinera Juniku (alias « Mon petit loukoum »), doctorante. Je la remercie pour son aide lors de mes manipulations ainsi que pour tous les chouettes délires que j'ai pu avoir avec elle, malgré les discussions animées que nous pouvions avoir de temps en temps (que voulez-vous, nous sommes des passionnés avant tout).

Je remercie Laurelenn Hennaux (alias « Tata »), doctorante. Je la remercie pour son aide lors de mes manipulations ainsi que pour le fait qu'elle ait été comme une petite Maman pour moi (mention spéciale au jour où elle m'a offert une glace). J'espère que nous pourrons encore faire de nombreuses soirées barbecues chez elle.

Je remercie Julien Mignon (alias « Jumi »), doctorant. Je le remercie pour son aide ainsi que pour tous les bons moments qu'il nous a permis de vivre en mettant à disposition son appartement. J'espère que cela continuera à se faire dans le futur, je suis extrêmement curieux de voir l'avenir du duo « Tajumile ».

Je remercie Virgile Neyman, doctorant et encadrant. Je le remercie bien sûr pour son aide et soutien durant cette année de mémoire (les rageux diront qu'il était un demi-encadrant, mais au final il m'a quand même bien aidé). Mais je le remercie également pour les chouettes moments jeux de société qu'il nous a offert, même si ces moments étaient tout sauf reposants (je le remercie également de m'avoir fait découvrir le monde de la réalité virtuelle).

Pour terminer avec les membres du CPB, il est temps de remercier mes promoteurs et directeurs de laboratoire :

Je remercie Catherine Michaux (alias la « Crèèèèème »), promotrice et directrice du CPB. Je la remercie pour son investissement et sa précieuse aide durant cette année. Malgré toutes les difficultés auxquelles elle a dû faire face, elle a toujours dirigé le laboratoire avec soin et abnégation. Je suis extrêmement admiratif de cette personne pour ces raisons. Je la remercie également pour avoir fait de ce mémoire une aventure scientifique intéressante et une expérience humaine enrichissante que je garderai en mémoire toute ma vie.

Je remercie Eric Perpète, promoteur et directeur du CPB. Je le remercie également pour son investissement et sa précieuse aide durant cette année. Malgré le peu de temps que j'ai pu passer avec lui, il a été plus qu'important dans cette année de mémoire. Je le remercie pour ses blagues (qu'on ne comprenait pas toujours je l'avoue), pour sa bonne humeur contagieuse, pour ces moments où il nous partageait sa grande culture générale autour d'une « Batter » ainsi que pour ses petites tapes encourageantes dans le dos accompagnées d'un sourire et d'un mot encourageant et bienveillant.

Les remerciements pour les membres CPB étant faits, je vais terminer en remerciant mes proches :

Je remercie mon père pour m'avoir motivé à donner le meilleur de moi-même, pour l'intérêt qu'il a pu porter à mon sujet de mémoire et pour avoir souvent proposé son aide malgré sa non-connaissance de la chimie.

Je remercie ma maman pour son soutien sans faille, que ce soit pour ce mémoire ou pour les années précédentes. Je la remercie de m'avoir préparé des plats que je n'avais plus qu'à réchauffer en rentrant de ma journée de travail.

Je remercie ma sœur pour m'avoir remonté le moral lorsque j'avais des « coups de mou ».

Je remercie mes grands-parents pour leur soutien et leurs encouragements.

Je remercie tous mes amis qui, de près ou de loin, ont dû subir mes explications de sujet de mémoire et qui en ont eu mal à la tête. Je les également remercie pour leur soutien envers moi. J'ai une pensée particulière pour mes collègues et anciens collègues qui ont étudié la chimie avec moi, c'est-à-dire Maria, Julie, Romain, Charles et François.

Listes des abréviations

Ach : Acétylcholine

AChE : AcétylCholinEsterase

APS : *Ammonium PerSulfate*

CBD : *Chitin Binding Domain*

CID : *Chitinase Insertion Domain*

ESI : *Electrospray Ionisation*

FT : *Flowthrough*

GH : Glycosyl Hydrolase

GMQE : *Global Model Quality Estimate*

H. halys : *Halyomorpha halys*

INSERM : Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale

LC : *Liquid Chromatography*

M. persicae : *Myzus persicae*

NCBI : *National Center for Biotechnology Information*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

O. furnacalis : *Ostrinia furnacalis*

pI : Point Isoélectrique

PDB : *Protein Data Bank*

nAChR : Récepteurs nicotiniques de l'AcétylCholine

SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Dulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

TEMED : TEtraMethylEthyleneDiamine

TOF : *Time Of Flight*

Table des matières

I. Introduction	9
1. Contexte général.....	10
2. Les insecticides et les conséquences de leur utilisation	10
2.1. Insecticides.....	10
2.2. Impact sur la santé humaine.....	12
2.3. Acquisition de résistances	13
2.4. Impact sur l'environnement	13
3. <i>Halyomorpha halys</i>	14
4. Nouvelle cible potentielle.....	15
4.1. La chitine comme composant essentiel.....	15
4.2. Les chitinases	17
4.3. Inhibition des chitinases chez les insectes	22
II. Objectifs et stratégies	24
5. Objectifs et stratégie.....	25
III. Matériels et méthodes	26
6. Matériels et méthodes.....	27
6.1. Elevage d' <i>Halyomorpha halys</i>	27
6.2. Broyage du matériel biologique	27
6.3. Extraction des protéines solubles	27
6.4. Précipitation au sulfate d'ammonium	28
6.5. Dessalage de la solution protéique et changement de tampon.....	28
6.6. Techniques chromatographiques	28
6.7. Test d'activité de la chitinase.....	30
6.8. Electrophorèse SDS-PAGE	32
6.9. Spectrométrie de masse.....	33
6.10. Modélisation moléculaire	34

6.11. Docking	34
IV. Résultats et discussions	35
7. Test d'activité	36
8. Purifications	37
8.1. Chromatographies échangeuses d'ions	38
8.2. Chromatographie d'affinité.....	42
9. Prédiction des structures tertiaires des chitinases d' <i>H. halys</i>	44
9.1. Validation des modèles	44
9.2. Analyse structurale.....	45
10. Prédiction des interactions ligand-enzyme	52
10.1. Interactions avec le chitopentaose	53
10.2. Interactions avec Mol 1	56
V. Conclusions et perspectives	59
11. Conclusions	60
12. Perspectives	61
Références	62
Annexes	69

I. Introduction

1. Contexte général

Les espèces ravageuses de cultures posent de véritables problèmes à l'Homme. En effet, ces organismes réduisent, voire détruisent, la production agricole destinée à être vendue pour nourrir les populations¹. Cela impacte directement les agriculteurs qui subissent des milliards de dollars de pertes². Rien qu'en Europe, les dégâts occasionnés par ces espèces s'élèvent à plusieurs dizaines de milliards d'euros³. Les avancées technologiques associées à nos connaissances actuelles en biochimie permettent de contrôler les populations de ces nuisibles, en appliquant sur les cultures menacées des composés réunis sous le nom de « pesticides »⁴. Ce terme générique regroupe plusieurs catégories de composés conçus pour avoir un effet biocide sur différentes classes de ravageurs. Les insecticides, les fongicides ou encore les rodenticides sont utilisés pour lutter contre les insectes, les champignons et les rongeurs, respectivement⁵.

Cependant, l'emploi intensif des pesticides provoque également certains problèmes majeurs liés à la santé humaine, notamment chez les ouvriers et les agriculteurs régulièrement exposés à ces composés⁶. On peut également observer l'acquisition de résistances contre ces substances chez les espèces visées⁷ ainsi que des conséquences néfastes sur les insectes auxiliaires tels que les abeilles (*Apis mellifera*)⁸ ou encore les syrphes (*Episyrphus balteatus*)⁹. Les scientifiques doivent donc se pencher sur la question pour trouver des alternatives permettant de limiter l'impact négatif des pesticides, correspondant aux exigences de l'Union Européenne (règlement (CE) 1107/2009) et répondant aux besoins des usagers¹⁰.

2. Les insecticides et les conséquences de leur utilisation

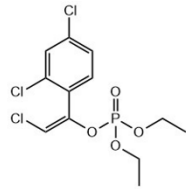
2.1. Insecticides

Les insecticides sont des substances ayant la propriété de tuer les insectes, leurs larves et/ou leurs œufs¹¹. Les plus efficaces et les plus utilisés actuellement sont des neurotoxines (toxines agissant sur le système nerveux central). Ils sont répartis en différentes catégories selon leur mode d'action¹² :

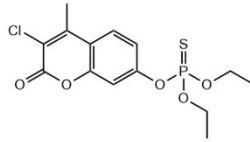
- Les organophosphorés et les carbamates sont des substances inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) (figure 1). Son rôle au niveau des synapses est de stopper l'influx nerveux en catalysant l'hydrolyse de l'acétylcholine (ACh), un neurotransmetteur. A l'inverse de la phosphorylation de l'AChE provoquant une inhibition irréversible, la carbamylation (fixation d'un acide isocyanique) de l'enzyme

va induire une inhibition réversible. Les symptômes liés à ces inhibiteurs sont essentiellement la convulsion et la crise d'épilepsie¹².

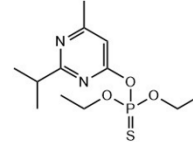
A



Chlorfenvinphos

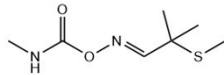


Coumaphos

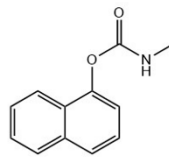


Diazinon

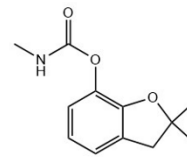
B



Aldicarb



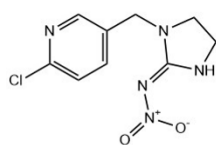
Carbaryl



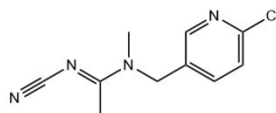
Carbofuran

Figure 1 - Structures d'organophosphorés (A) et de carbamates (B)

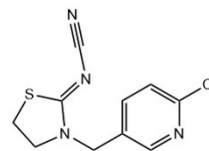
- Les néonicotinoïdes agissent comme des agonistes des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR) (figure 2). Leur toxicité est beaucoup plus importante chez les insectes que chez les mammifères. Cela est attribué en grande partie à la sensibilité différente des sous-types de nAChR des insectes et des vertébrés. Les néonicotinoïdes ont une action sur au moins trois sous-types de nAChRs et provoquent une réponse en deux phases : une augmentation de la fréquence de la décharge spontanée du neurone suivie d'un blocage complet de la propagation nerveuse¹². Chez les mammifères, leur toxicité est considérée comme étant principalement due à l'action sur α -4 β -2 nAChR dans le cerveau¹³. Les symptômes observés chez les organismes étant touchés par ces substances sont l'hypothermie, la démarche titubante, la salivation, les tremblements ou encore les spasmes¹².



Imidaclopride



Acetamipride



Thiaclopride

Figure 2 - Structures de néonicotinoïdes.

- Les pyréthrinoïdes sont des composés qui affectent les canaux sodiques, chlorures et calciques des cellules du système nerveux (figure 3). Ces substances prolongent l'ouverture de ces canaux provoquant ainsi une dépolarisation prolongée de la membrane plasmique, une hyperexcitabilité de la synapse et une paralysie de l'hôte¹².

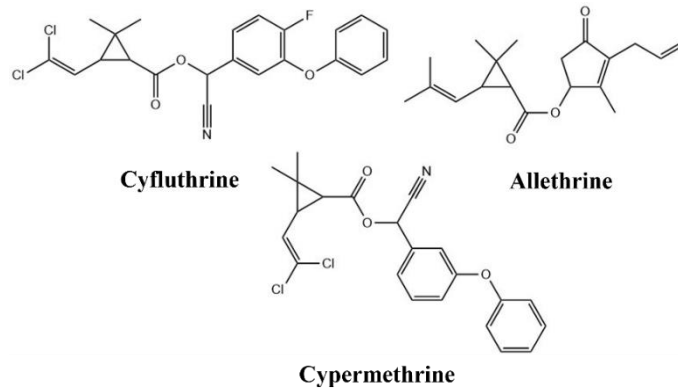


Figure 3 - Structure des pyréthrinoïdes.

La figure 4 résume l'effet des différents types d'insecticides mentionnés.

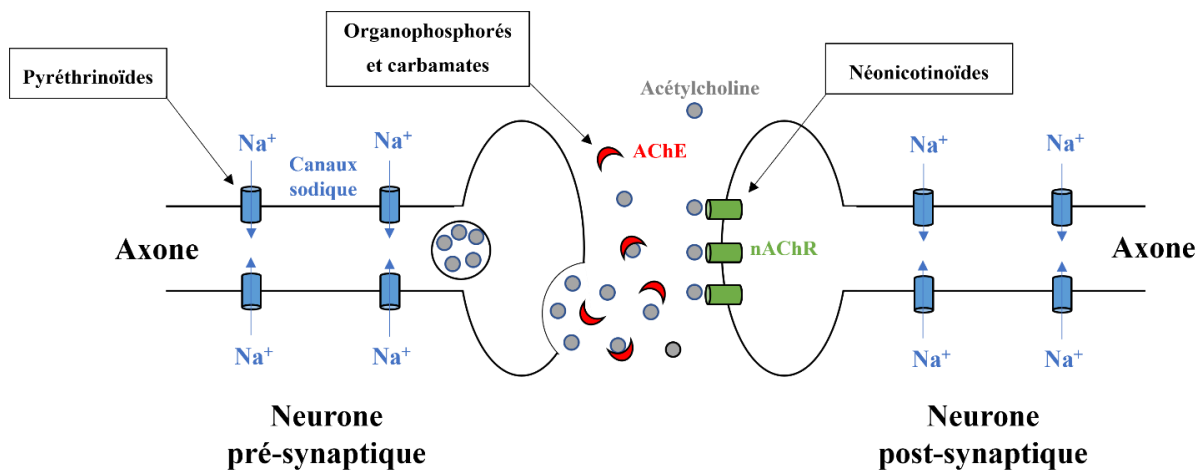


Figure 4 - Résumé de l'effet des différentes classes d'insecticides au niveau de la synapse.

2.2. Impact sur la santé humaine

Certains instituts, comme l'INSERM ou bien encore l'OMS, se penchent activement sur la mesure de l'impact de l'utilisation des pesticides sur la santé humaine¹⁴. Leur pénétration dans l'organisme peut se faire de plusieurs manières : par inhalation, par ingestion de nourriture ou d'eau contaminée ou encore par contact direct avec la peau⁶. Les effets de ces substances sur notre organisme sont multiples : une irritation de la peau, des malformations congénitales, un développement de tumeurs, des modifications génétiques, des troubles nerveux, des

perturbations endocriniennes⁶, ... Dans le cas des neurotoxines, les effets sur le système nerveux provoquent des pertes de coordination et de mémoire, une réduction de la capacité visuelle¹², ... Ces neurotoxines peuvent affecter de nombreux systèmes comme le système nerveux, digestif, cardiovasculaire⁶, ... Il est cependant important de préciser que ces différents effets dépendent de l'âge de l'individu, de la dose des pesticides présente dans l'organisme ainsi que du temps d'exposition à ces composés. Par exemple, chaque année dans les pays en développement, il y a 3 000 000 de cas d'empoisonnement aux pesticides et 220 000 décès liés à ces substances selon l'OMS⁶.

2.3. Acquisition de résistances

« *La résistance d'une population d'insectes donnée à un insecticide représente toute une augmentation, déterminée génétiquement, de sa tolérance à cet insecticide, en réponse à une pression de sélection.* » (Thierry Brévault)⁷. Que ce soit dans l'agriculture ou dans d'autres domaines, l'utilisation intensive des insecticides a provoqué une augmentation des espèces résistantes à ceux-ci. Outre le fait que ce phénomène diminue l'efficacité des plans de contrôle des espèces ravageuses, cela a également un impact sur le plan économique mais aussi *écologique* étant donné qu'il est nécessaire d'augmenter les doses d'insecticides utilisées. Par exemple, l'utilisation intensive de pyréthriinoïdes pour lutter contre la noctuelle (*Helicoverpa armigera*) dans les cultures de coton a provoqué progressivement des résistances chez cet insecte : d'abord en Australie (1983), ensuite en Turquie et en Thaïlande (1984-1985) où la culture du coton a fortement chuté. Les Etats-Unis ont détecté le problème en 1985-1986 et le processus a continué sa propagation avec les premiers cas de résistances repérés dans les champs en Chine, en Inde et au Pakistan, pour finalement également apparaître en Afrique⁷. Un autre exemple plus récent est celui de *Myzus persicae* (*M. persicae*, le puceron vert du pêcher), un insecte qui se répand à travers le monde et présentant une résistance élevée aux composés actifs utilisés contre lui^{15,16}.

2.4. Impact sur l'environnement

L'impact de l'usage des insecticides sur l'environnement est dû, comme mentionné plus tôt, à la toxicité de ces composés mais également à sa dispersion dans l'environnement. En effet, ces substances sont le plus souvent pulvérisées sous forme liquide dans les cultures, même si dans certains cas elles peuvent être incorporées dans le sol. Cela peut amener une dispersion

par volatilisation, par ruissellement ou encore lixiviation. Tous ces modes de dispersion font que les pesticides employés se retrouvent dans les sols, les cours d'eau, et les nappes phréatiques¹⁷ affectant ainsi les organismes qui rentrent en contact avec ces composés¹⁸ comme par exemple les espèces d'insectes auxiliaires^{8,9}.

3. *Halyomorpha halys*

Halyomorpha halys (*H. halys*), communément appelée punaise diabolique ou punaise marbrée, est un insecte faisant partie de l'ordre des hémiptères et ayant pour territoire d'origine l'Asie de l'Est (figure 5)¹⁹. Reconnue comme espèce invasive, *H. halys* s'étend désormais à travers le monde²⁰ avec des apparitions dans les cultures en Amérique depuis 1996²¹ et plus récemment en Europe, où elle a été aperçue en Bulgarie ou encore en Suisse²². Des populations de cet insecte ont même été observées en Belgique, dans la province du Hainaut²². En plus d'être invasive, il s'agit d'une espèce ravageuse se nourrissant sur plus de 120 plantes hôtes en Amérique du Nord et en Asie. *H. halys* est généralement considérée comme un insecte arboricole et ses plantes hôtes d'intérêt économique comprennent de nombreux arbres fruitiers²³. Celle-ci se nourrit donc essentiellement de fruits créant des défauts sur ceux-ci et les rendant impropres à la vente (figure 5)²⁴, mais affectant également leur production en perturbant la croissance de ces derniers²⁵. Les pertes liées à cet insecte s'élèvent actuellement à plusieurs millions de dollars²⁴. En 2010 aux Etats-Unis, rien que dans le *Mid-Atlantic*, les producteurs de pommes ont perdu au total 37 millions de dollars et les producteurs de pêches ont eu 100% de leur production invendue²⁰. En 2019, en Savoie, des pertes allant de 80 à 100 % de la récolte en poires ont été enregistrées dans certaines cultures infestées²⁶. De l'éclosion des œufs au passage au stade adulte, *H. halys* passera par 5 stades larvaires et mettra donc de 44 à 52 jours pour atteindre son stade adulte (fig 6)²⁷.

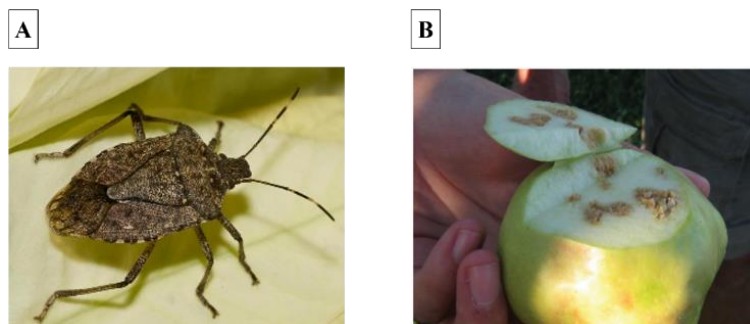


Figure 5 - *Halyomorpha halys* (A) et dégâts sur les fruits causés par cet insecte (B).

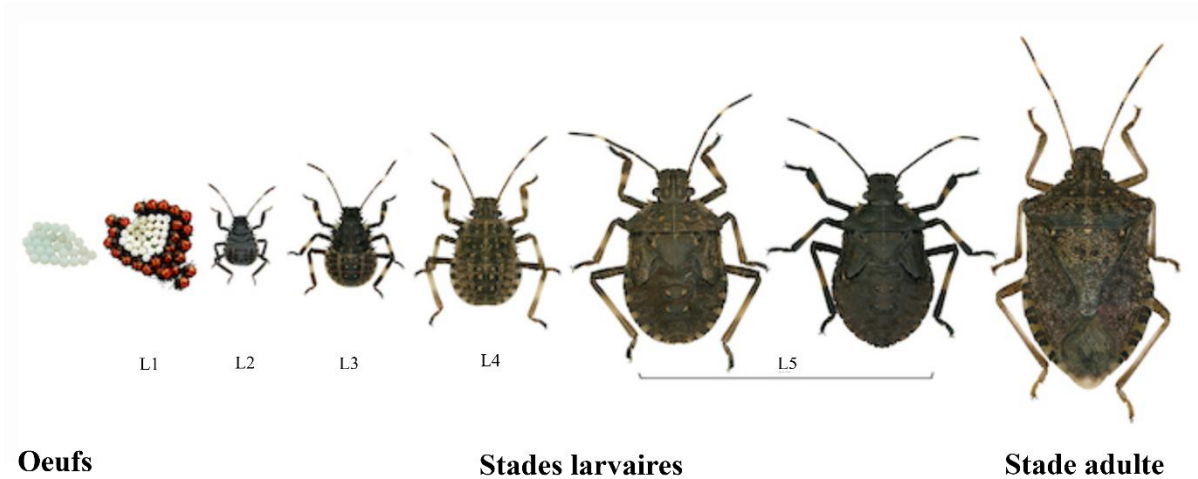


Figure 6 -Les différents stades de développement d'*Halyomorpha halys*²⁸.

4. Nouvelle cible potentielle

Pour trouver des alternatives aux insecticides actuels, les scientifiques étudient d'autres cibles potentielles que le système nerveux dans l'organisme de l'insecte¹⁰. Parmi les pistes possibles, on retrouve l'étude de différentes fonctions biochimiques essentielles chez une espèce et propre à celle-ci¹⁰. La cible qui nous intéresse, dans le cadre de ce mémoire, est le métabolisme de la chitine, polysaccharide essentiel au phénomène d'ecdysis chez les insectes²⁹.

4.1. La chitine comme composant essentiel

La chitine (figure 7) est un biopolymère linéaire de haute masse moléculaire (allant de 426 à 738 kDa chez l'abeille européenne, *Apis mellifera*, ou plus de 1000 kDa chez les crustacés) composé de monomères de N-acétyl-D-glucosamine³⁰. Les sous-unités sont liées par des liaisons covalentes β -1,4 au niveau des carbones anomères. Ce polysaccharide est insoluble dans l'eau³¹.

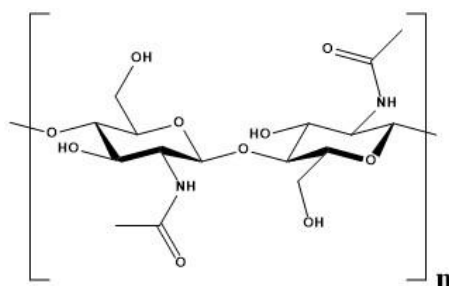


Figure 7 - Structure de la chitine.

Associée à d'autres molécules (protéines/lipoprotéines), la chitine est un constituant majeur de la cuticule de l'insecte afin de lui conférer des propriétés telles que la dureté, la rigidité et l'imperméabilité. Cette cuticule remplit plusieurs fonctions : i) la protection contre la dessiccation et les composants externes (tels que les insecticides), ii) la perception sensorielle du milieu, iii) un support mécanique pour le corps de l'insecte. La cuticule est composée de différentes couches : l'épicuticule, l'exocuticule et l'endocuticule (figure 8). La couche la plus externe, l'épicuticule, est en général recouverte d'un film de cire et de ciment. Elle est constituée d'une variété d'hydrocarbures (allant des n-alcanes à des alcanes à ramification méthylique en passant par des hydrocarbures insaturés), de protéines et de lipides dont la majorité sont des acides gras libres et des esters de cire. La composition en hydrocarbure de l'épicuticule est caractéristique de l'ordre de l'insecte, même si d'autres paramètres affectent celle-ci comme l'âge, le sexe ou encore l'environnement. En dessous de l'épicuticule se trouve la procuticule, constituée de l'exocuticule (plus dure) et de l'endocuticule (plus molle). Les principaux composants de la procuticule sont des fibres de chitines et des protéines. La plupart des protéines présentes dans la cuticule sont structurales et sont encore peu connues. La fixation de la chitine à celles-ci a été démontrée pour certaines d'entre elles, laissant entendre qu'elles ont un rôle dans l'interaction avec le polysaccharide pour former une structure hautement organisée³². Enfin, il y a également une couche de cellules épidermiques en dessous de la cuticule, qui sécrète notamment des composants de la cuticule.

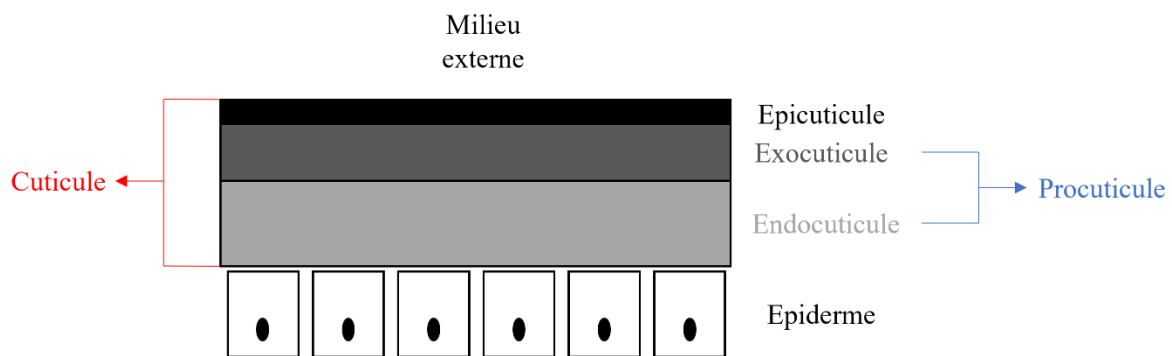


Figure 8 - Structure de la cuticule d'insecte.

Plusieurs étapes sont nécessaires à l'élaboration de la procuticule. Tout d'abord, la chitine est synthétisée par des protéines membranaires avant d'être remodelée pour être introduite dans des structures différentes. Ces étapes nécessitent des chitine synthases, synthétisant des chaînes de chitine, ainsi que des chitine désacétylases, désacétylant partiellement certains résidus de N-acétyl-glucosamine de manière aléatoire ou séquentielle pour donner des parties semblables au chitosan (figure 9). D'autres protéines sécrétées par la

procuticule supportent l'assemblage des polymères de chitine pour donner des agrégats cristallins mesurant plusieurs centaines de nanomètres. Ces agrégats sont ensuite intégrés dans une matrice de protéines contenant des domaines de liaison à la chitine ou CBDs (*chitin binding domain*) pour constituer la procuticule³³.

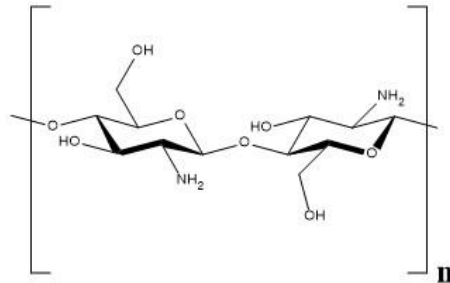


Figure 9 - Structure du chitosan.

La chitine est également, avec les péritrophines (protéines membranaires), l'un des principaux composants de la membrane péritrophique des insectes, une membrane entourant l'intestin moyen (figure 10)³⁴. Celle-ci possède plusieurs rôles comme une protection contre l'abrasion causée par les aliments ingérés et contre l'invasion de micro-organismes. Elle interviendrait également dans la compartimentation enzymatique ou le flux des fluides³⁴. Le mécanisme de formation de cette membrane est similaire à celui de la cuticule de l'insecte³⁵.

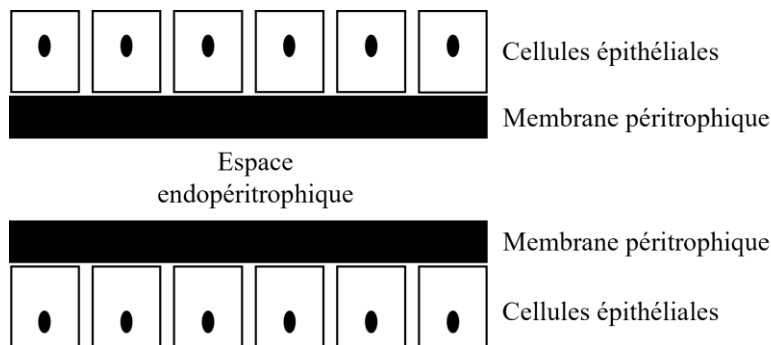


Figure 10 - Structure de l'intestin moyen de l'insecte.

4.2. Les chitinases

Le métabolisme de la chitine est sous le contrôle enzymatique de la chitinase, une enzyme de la famille des glycosyl hydrolases (GH). Les chitinases sont présentes dans de nombreux organismes, tels que les bactéries, les plantes, les champignons, les insectes et les mammifères. Leur fonction consiste à dégrader la chitine en catalysant son hydrolyse (figure 11)³⁶.

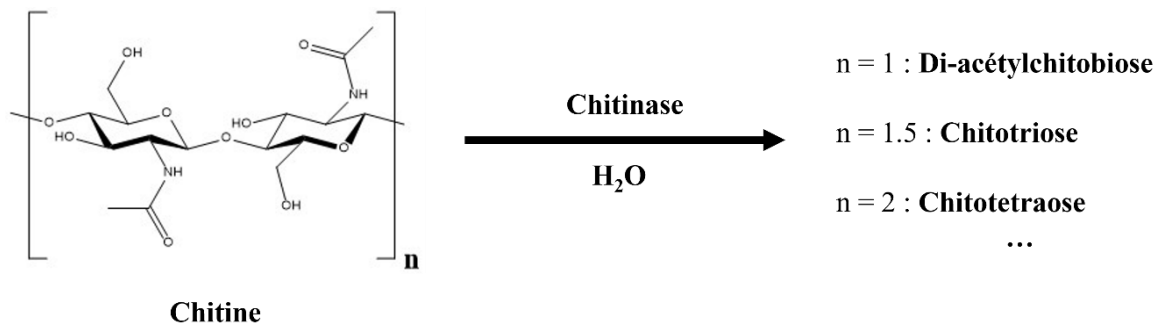


Figure 11 - Réaction d'hydrolyse de la chitine sous contrôle enzymatique de la chitinase.

Leurs rôles chez les différents organismes sont variés. Chez les bactéries et les champignons, il consiste à dégrader la barrière extérieure de l'organisme visé pour aller puiser les substances présente chez celui-ci. Les chitinases fongiques ont également un rôle dans la nutrition, la morphogenèse et dans le processus de développement du champignon, la chitine étant un composant essentiel de la paroi cellulaire fongique. Chez les plantes, elles ont essentiellement un rôle d'autodéfense contre les agents phytopathogènes comme les champignons ou les insectes³⁶. Chez les mammifères, elles auraient un rôle immunologique contre les parasites³⁷. Enfin, chez les insectes, ces enzymes ont un rôle important dans l'ecdysis en dégradant la chitine présente dans la cuticule pour permettre à l'insecte de muer³⁶ mais elles dégradent également la chitine se trouvant dans la membrane péritrophique dans le but de la renouveler³⁵.

Les chitinases appartiennent à deux familles de glycosyl hydrolases : la famille 18 (GH 18) et la famille 19 (GH 19), qui hydrolysent la liaison glycosidique par rétention ou inversion de la configuration anomérique du substrat, respectivement (figures 12 et 13). Ces familles présentent des différences importantes dans leurs séquences d'acides aminés³⁶. Les résidus présents dans le site catalytique semblent conservés d'une chitinase à une autre appartenant à la même famille. Ces acides aminés catalytiques sont des tyrosines, des glutamates ou des aspartates^{38,39}. Il est à noter qu'il existe des enzymes appelées hexosaminidases faisant parties de la famille GH20 et étant proche des chitinases car celles-ci savent également dégrader la chitine (mécanisme d'hydrolyse similaire à la famille GH18)⁴⁰. Elles ne sont cependant pas classées comme des chitinases car elles dégradent également d'autres polysaccharides (ex. : polymère de N-acétylgalactosamine)⁴¹.

GH18

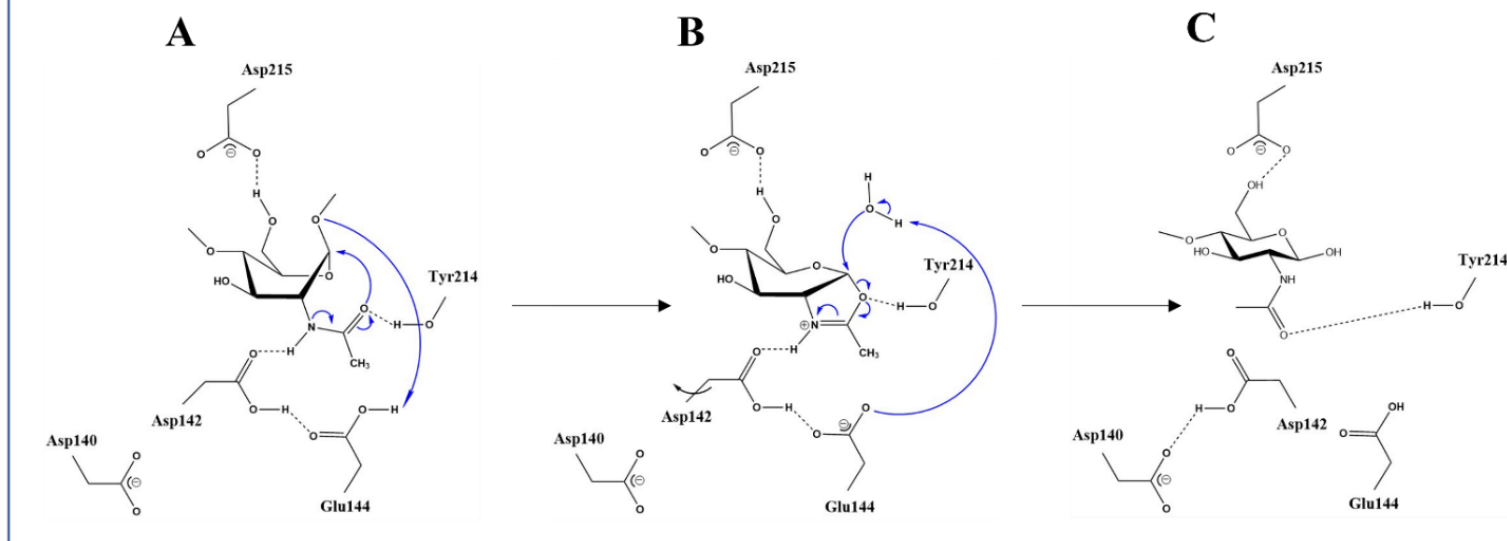


Figure 12 - Mécanisme d'hydrolyse de la chitine par les chitinases de la famille GH18⁴².

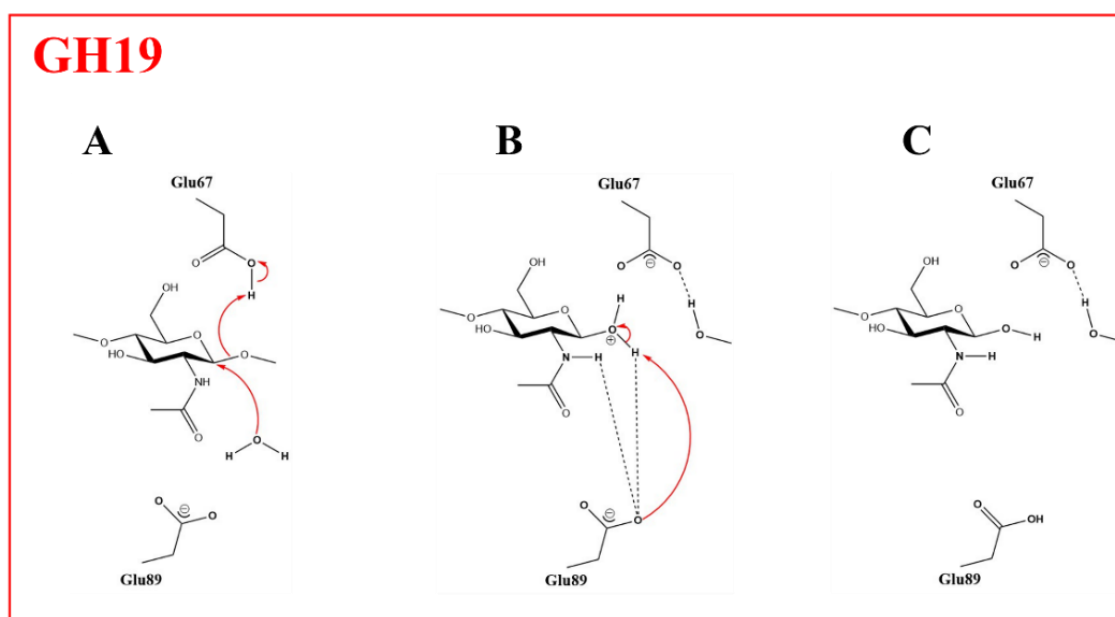


Figure 13 - Mécanisme d'hydrolyse de la chitine par les chitinases de la famille GH19⁴³.

Les chitinases sont également classées en deux sous-catégories : les endochitinases (E.C 3.2.1.14) et les exochitinases (figures 14 et 15). Les premières hydrolysent la chitine de façon aléatoire sur des sites internes, formant du di-acétylchitobiose (le dimère) ainsi que d'autres oligosaccharides N-acétylglucosamine tels que le chitotriose et le chitotétraose³⁶. Les secondes ont été divisées en deux classes : i) les chitobiosidases (E.C 3.2.1.29) dégradant les oligosaccharides N-acétyl-glucosamine à partir de l'extrémité non réductrice et ii) les 1-4- β -glucosaminidases (E.C 3.2.1.30) dégradant les oligomères créés par les endochitinases et les chitobiosidases, formant de la N-acétyl-glucosamine³⁶.

Endochitinases (E.C 3.2.1.14)

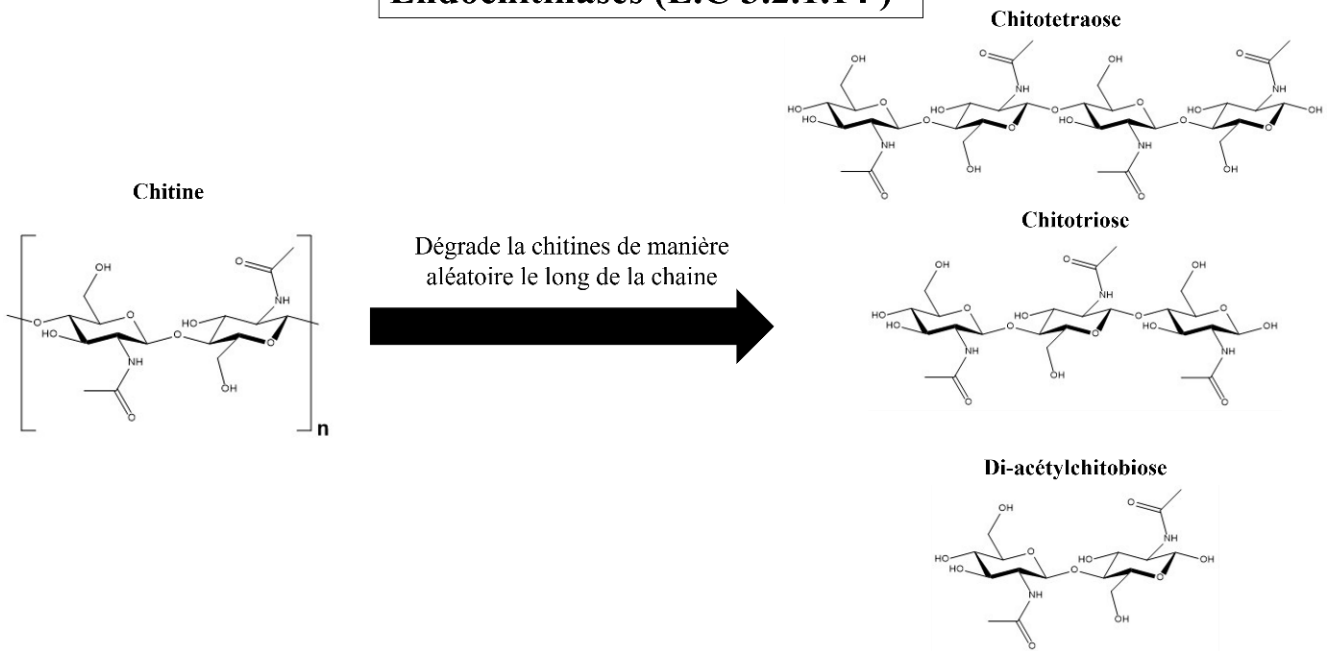


Figure 14 – Mécanisme d'action des endochitinases.

Exochitinases

Chitobiosidases (E.C 3.2.1.29)

Dégrade la chitine à l'extrémité du polymère en libérant des dimères les uns après les autres

1-4- β-glucosaminidases (E.C 3.2.1.30)

Dégrade les dimères en N-acétylglucosamine

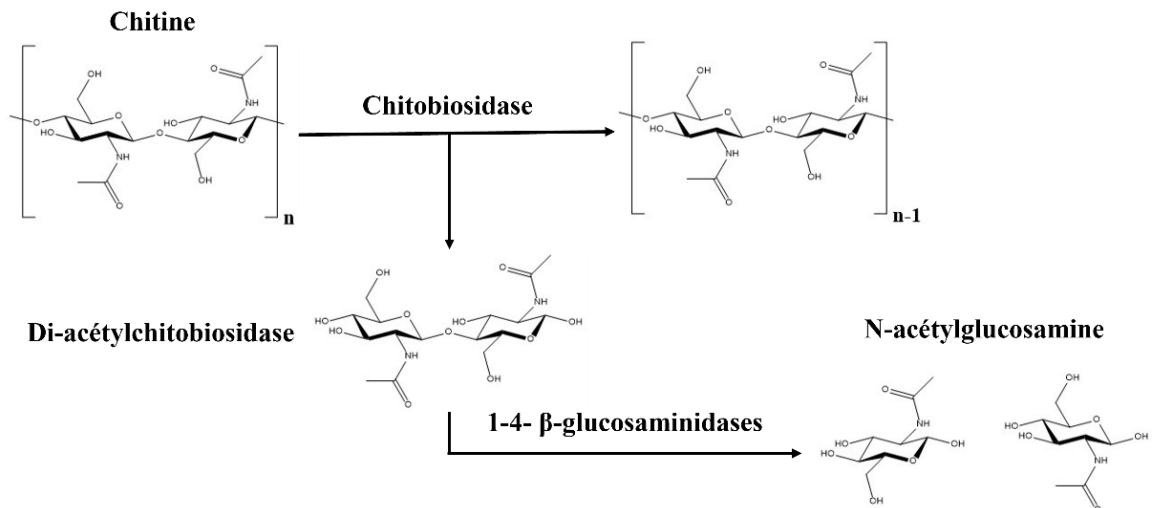


Figure 15 - Mécanisme d'action des exochitinases.

Généralement, les chitinases d'insectes sont des endochitinases qui clivent la chitine par rétention de la configuration anomérique β -(1 \rightarrow 4) (GH18)⁴⁴, même si une chitinase de la

famille GH19 a déjà été retrouvée chez *Ostrinia furnacalis*, la pyrale du maïs asiatique (*O. furnacalis*, un lépidoptère)⁴⁵.

Actuellement, la purification et la caractérisation biochimique, cinétique et structurale des chitinases sont principalement étudiées chez les bactéries⁴⁶⁻⁴⁸ et les champignons⁴⁹⁻⁵¹. Les études sur les chitinases d'insectes sont nettement moins nombreuses et se portent principalement sur les chitinases de lépidoptères. Globalement, la littérature indique que ces dernières seraient principalement des endochitinases de la famille GH18⁵² avec des points isoélectriques compris entre 4.7 et 9.3⁵³ et des masses moléculaires comprises entre 40 et 90 kDa⁵³. Cependant, des chitinases différentes ont déjà été identifiées comme celle du puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*, un hémiptère), qui possède une masse moléculaire de 31 kDa⁵⁴, ce qui prouve que les connaissances sur les chitinases d'insectes doivent encore être approfondies. Si on s'intéresse à la disponibilité des données structurales dans la *Protein Data Bank* (PDB), on y trouve plusieurs structures de chitinases provenant de différents champignons (ex. : *Coccidioides immitis* ; *Aspergillus fumigatus*) ou de plusieurs bactéries (ex. : *Serratia marcescens* ; *Vibrio harveyi*). Concernant les insectes, on ne retrouve que des structures de chitinases d'*O. furnacalis* (figure 16).

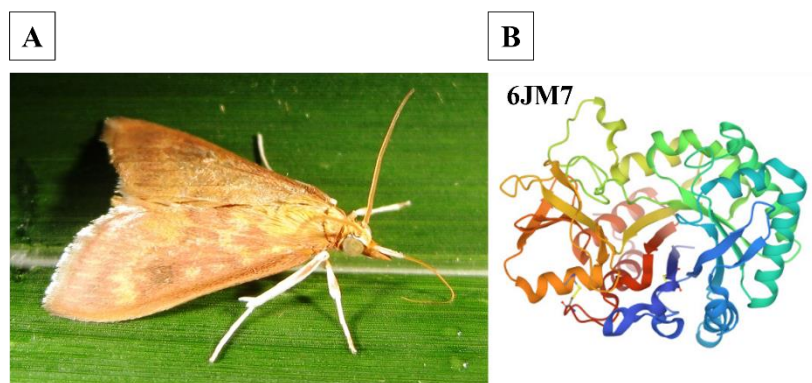


Figure 16 – *O. furnacalis* (A) ainsi que la structure cristallographique d'une chitinase d'*O. furnacalis* (B).

En fonction de la présence ou de l'absence de certains domaines chez les chitinases d'insectes et de leurs similarités de séquences, celles-ci peuvent être classées selon huit groupes principaux⁴⁴ :

- Groupe I : elles possèdent un peptide signal, un domaine catalytique, un domaine de liaison riche en sérine/thréonine et un CBD possédant six cystéines et étant à l'extrémité C-terminal de la protéine.
- Groupe II : elles possèdent quatre à cinq domaines catalytiques et quatre à sept CBD dont les localisations dans les différentes protéines sont similaires. Elles ont également

un motif hautement conservé dans les domaines catalytiques (FXGLD où X est un résidu non défini) sauf dans un de leurs domaines catalytiques où ce motif est légèrement différent (FXGL(H/S)), indiquant que ce domaine catalytique joue peut-être un autre rôle que l'hydrolyse de la chitine.

- Groupe III : elles possèdent deux domaines catalytiques et un CBD. Le premier domaine catalytique partage plus de similarité avec les autres domaines catalytiques de chitinases d'insectes, ce qui indiquera que les deux domaines ont des fonctions différentes. Ces chitinases, contrairement aux autres groupes, possèdent un domaine transmembranaire.
- Groupe IV : elles possèdent un peptide signal et un domaine catalytique mais pas de CBD. Elles représentent le groupe le plus important et le plus divergent.
- Groupe V : elles ne possèdent pas d'activité de chitinase ni de CBD et sont appelées *chitinase-like proteins*. Elles ont cependant des domaines ayant des similarités avec les domaines catalytiques des autres chitinases.
- Groupe VI : elles possèdent des similarités avec le groupe I dans la structure de leurs domaines, même si celles-ci ont une masse moléculaire plus importante. En effet, elles possèdent un long domaine à l'extrémité C-terminale (1000 à 2500 résidus) contenant 25 à 30% de résidus S/T. Elles sont présumées fortement glycosylées, ce qui indique qu'elles sont peut-être résistantes aux protéases.
- Groupe VII : elles possèdent une architecture de domaine proche de celles du groupe IV mais sont placées dans un groupe distinct car les analyses phylogénétiques montrent que ces chitinases forment un groupe proche du groupe II.
- Groupe VIII : elles possèdent un domaine catalytique et un domaine transmembranaire mais pas de CBD.

Il est à noter qu'il existe trois groupes supplémentaires de chitinases : les groupe IX, X et h. Les groupes IX et X ont été créés récemment en analysant des chitinase provenant du sphinx du tabac (*Manduca sexta*) et ces groupes seraient spécifiques aux lépidoptères tout comme le groupe h⁵⁵.

4.3. Inhibition des chitinases chez les insectes

Etant donné le rôle prépondérant des chitinase dans la mue de l'insecte et dans le renouvellement de la membrane péritrophique³⁴, celles-ci sont des cibles potentielles

intéressantes dans le contrôle de la population des insectes ravageurs⁵⁶. En effet, l'inhibition des chitinases chez les insectes provoque des perturbations dans l'ecdysis, une inhibition de la croissance, une augmentation de la mortalité et une réduction de la fécondité. Une série d'inhibiteurs de chitinases de la famille GH18 ont été isolés, dont la plupart proviennent de sources naturelles (plantes et champignons), et se classent principalement en deux catégories : les composés basés sur des carbohydrates et des peptides cycliques⁴⁵, dont certains sont représentés à la figure 17. Le dérivé de 1,5-dihydro-2H-dipyridopyrimidine ne possède pas de nom générique et est donc nommé Mol 1 dans le cadre de ce travail. Le chitosan, cité au point 4.1, est un inhibiteur général de chitinases ayant déjà fait ses preuves sur *O. furnacalis*. En effet, une étude montre un taux de mortalité de 85 % chez ce papillon lorsque du chitosan est injecté dans les larves, contre un taux de 0 % en injectant de l'eau comme contrôle négatif. L'IC₅₀ du chitosan pour une des chitinases du papillon est de 11.42 μM et la constante de dissociation entre l'inhibiteur et l'enzyme est de 5.0 μM ⁵⁶. Il a également été démontré que la phlegmacine B1 (inhibiteur provenant de champignons, les *Talaromyces*), utilisée pour trois chitinases de ce même papillon, avait des constantes de dissociation très différentes selon la chitinase de l'insecte considérée (respectivement 5.5, 26.0 et 79.3 μM)⁴⁵. L'inhibition de chitinases d'insectes est donc une voie prometteuse dans l'élaboration d'insecticides plus sélectifs.

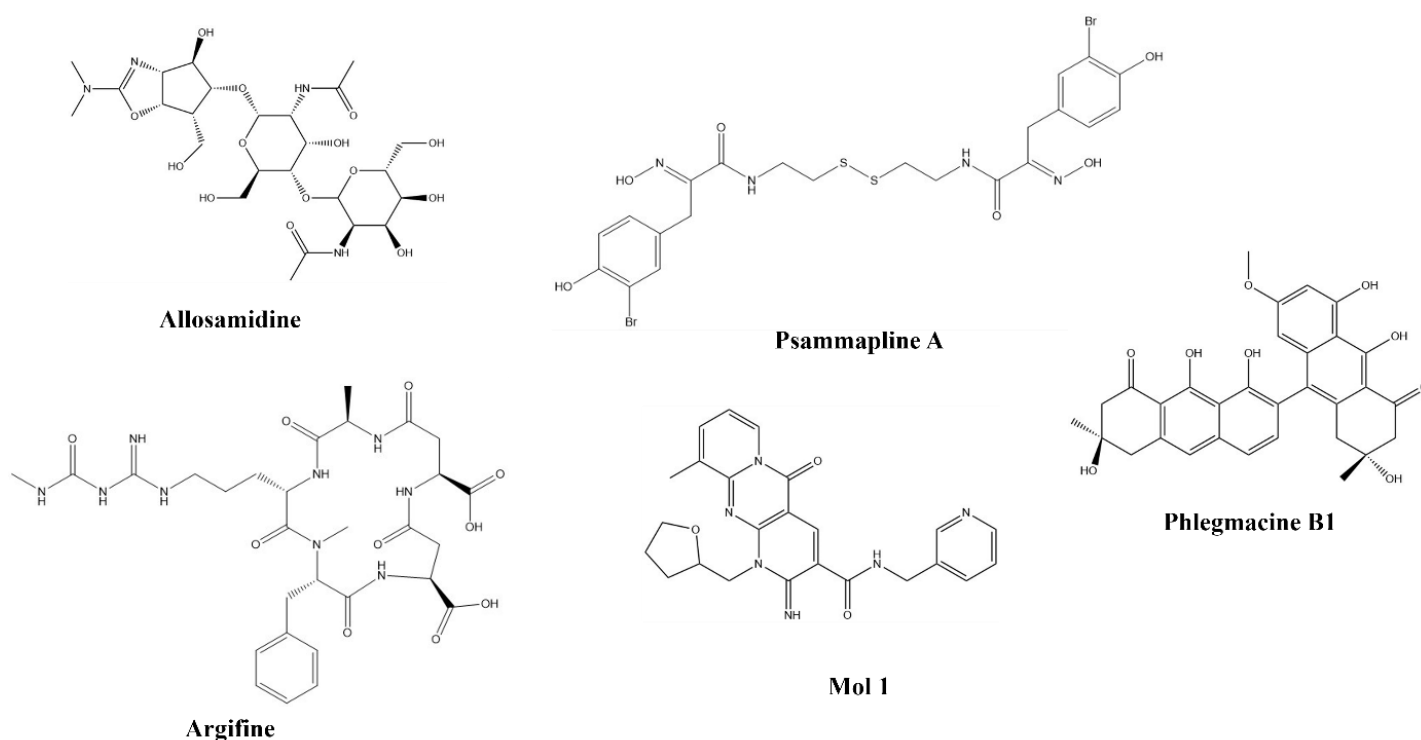


Figure 17 - Structures de composés inhibiteurs de chitinases d'insectes.

II. Objectifs et stratégies

5. Objectifs et stratégie

Les objectifs de ce mémoire sont de purifier et caractériser la chitinase d'*H. halys* dans le but d'élaborer un inhibiteur sélectif à cette dernière. La stratégie pour parvenir à ces objectifs est résumée à la figure 18. La première étape est l'élevage d'*H. halys* dans des conditions contrôlées. Les punaises sont ensuite prélevées et broyées dans le but d'extraire les protéines solubles présentes chez cet insecte. Après cette étape, une précipitation au sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) est réalisée dans le but d'effectuer une première séparation des protéines en fonction de leur solubilité. Différentes techniques chromatographiques sont par la suite appliquées. L'activité chitinase est suivie à chaque étape par spectroscopie d'absorption. Enfin, plusieurs analyses telles que l'électrophorèse, la spectrométrie de masse ou encore la modélisation moléculaire sont utilisées pour caractériser la chitinase.

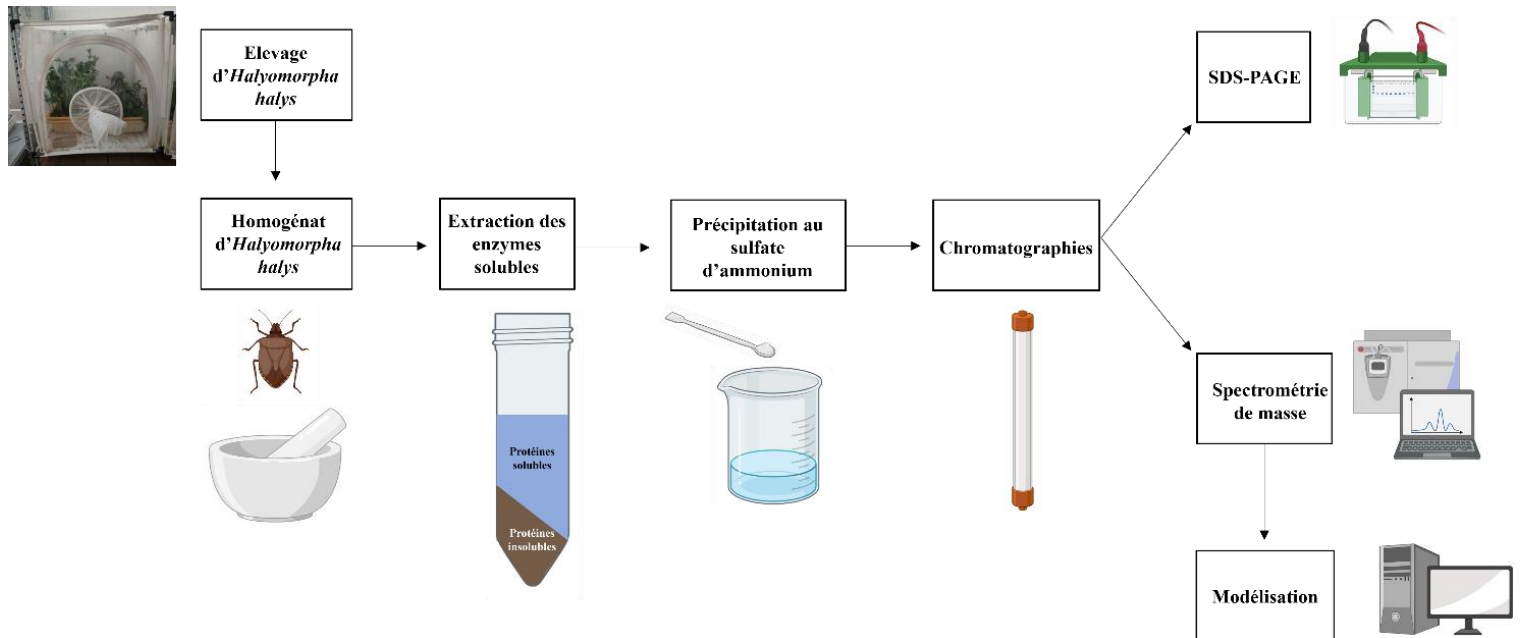


Figure 18 - Résumé de la stratégie employée pour purifier et caractériser la chitinase d'*Halyomorpha halys*.

III. Matériels et méthodes

6. Matériels et méthodes

6.1. Elevage d'*Halyomorpha halys*

Les punaises diaboliques sont élevées à la faculté Agro-Bio Tech de Gembloux dans des conditions contrôlées. La température est maintenue à 25 °C avec un taux d'humidité de 55 % et une photopériode de 16 heures. Celles-ci se nourrissent de fèves des marais (*Vicia faba*), remplacées toutes les deux semaines, et de graines de tournesol (*Helianthus annuus*), remplacées toutes les semaines. Lorsque l'élevage doit être stimulé, les œufs sont récupérés et transférés dans une boîte à part dans les mêmes conditions contrôlées jusqu'à leur éclosion. En effet, si les punaises considèrent que la population commence à être trop importante dans la cage, celles-ci adoptent un comportement oophages (qui mange les œufs)⁵⁷.

6.2. Broyage du matériel biologique

10 g de punaises sont broyées à l'aide d'un vibro-broyeur Retsch® Mixer Mill MM400. Pour se faire, trois punaises sont placées dans des Eppendorf™ de 1.5 mL avec 100 µL de PMSF (*phenylmethanesulfonyl fluoride*, un inhibiteur de protéase à sérine) et des billes en acier de 5 mm de diamètre. Ces Eppendorf™ sont ensuite placés dans le vibro-broyeur pendant 6 minutes à 30 Hz. Les broyats sont ensuite récupérés et rassemblés dans un Falcon™ de 50 mL et les Eppendorf™ sont rincés avec 500 µL de tampon acétate (0.2 M, pH 5.0) afin de récupérer le plus d'homogénat possible.

6.3. Extraction des protéines solubles

Les échantillons broyés sont placés dans 10 mL de tampon acétate (0.2 M, pH 5.0) auquel sont ajouté 300 µL de PMSF. L'homogénat est placé sous agitation pendant 1 heure à 4 °C puis centrifugé à 12 000 g pendant 30 minutes. Le surnageant est récolté et stocké à 4 °C. Le culot est solubilisé dans 10 mL du même tampon auquel sont ajoutés 300 µL de PMSF. L'homogénat est placé sous agitation pendant 1 heure à 4 °C puis centrifugé à 12 000 g pendant 30 minutes. Le surnageant est séparé du culot. Les deux surnageants sont rassemblés et un aliquot de 200 µL est récolté pour de futurs tests.

6.4. Précipitation au sulfate d'ammonium

L'échantillon protéique est placé sous agitation et sur glace. Une première précipitation est réalisée en ajoutant lentement du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ finement broyé de sorte à atteindre une concentration finale de 35 % en sel. Le mélange est centrifugé à 12 000 g pendant 30 minutes. Ensuite, le surnageant est séparé du culot et du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est lentement ajouté au surnageant afin d'atteindre une concentration finale de 65 %. La solution est centrifugée à 12 000 g à 4 °C pendant 30 minutes. Le culot, contenant la chitinase, est solubilisé dans 2.5 mL de tampon acétate (0.2 M, pH 5.0). Un aliquot de 200 μL est récolté pour de futurs tests.

6.5. Dessalage de la solution protéique et changement de tampon

Pour dessaler l'échantillon, une colonne d'exclusion de taille, la PD-10 SephadexTM G-25 de 8.3 mL de milieu (GE Healthcare), est utilisée. La colonne est d'abord équilibrée avec le tampon employé pour la suite de la purification (voir points 6.6). Ensuite, un volume de 2.5 mL d'échantillon protéique est placé sur la colonne. Le *flowthrough* (FT) est laissé passer pour que l'échantillon soit dans la colonne. Les protéines sont éluées grâce à 3.5 mL du tampon d'équilibration et l'éluat est récolté.

6.6. Techniques chromatographiques

6.6.1. Chromatographie échangeuse de cations

Une colonne HiTrapTM CM FF de 5 mL (Cytivia) est utilisée pour effectuer cette étape. Cette colonne est composée d'une matrice d'agarose fonctionnalisée avec un groupement carboxyméthyle (figure 19). La colonne est préalablement équilibrée avec 60 mL de tampon acétate (0.2 M, pH 5.0). Une fois la colonne équilibrée, l'échantillon protéique est injecté dans une boucle d'échantillonnage puis chargée sur la colonne par le passage du tampon d'équilibration à un débit de 1 mL/min jusqu'à stabilisation des signaux, indiquant la fin du passage du FT. Les protéines fixées sur la colonne sont ensuite éluées en appliquant un gradient de NaCl (0 à 1 M) pendant 30 minutes à un débit de 1 mL/min. Des fractions de 1 mL sont recueillies.

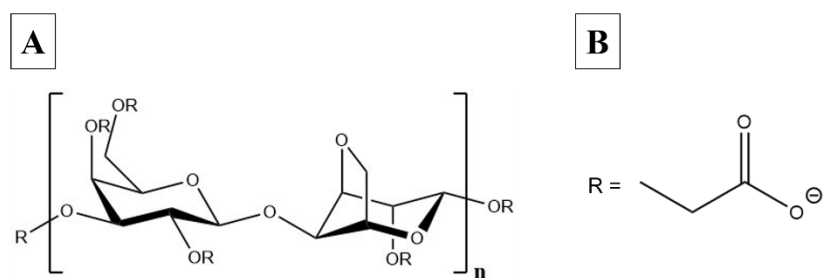


Figure 19 - Structure de l'agarose (A) et du groupement carboxyméthyl (B) fonctionnalisant la matrice.

6.6.2. Chromatographie échangeuse d'anions

Une colonne HiTrap™ DEAE FF de 5 mL (Cytivia) est utilisée pour effectuer cette étape. Cette colonne est composée d'une matrice d'agarose fonctionnalisée avec un groupement amine tertiaire (figure 20). La colonne est préalablement équilibrée avec 60 mL de tampon Tris-HCl (20 mM, pH 8.0). Une fois la colonne équilibrée, l'échantillon protéique est injecté dans une boucle d'échantillonnage puis chargée sur la colonne par le passage du tampon d'équilibration à un débit de 1 mL/min jusqu'à stabilisation des signaux, indiquant la fin du passage du FT. Les protéines fixées sur la colonne sont ensuite éluées en appliquant un gradient de NaCl (0 à 1 M) pendant 30 minutes à un débit de 1 mL/min. Des fractions de 1 mL sont recueillies.

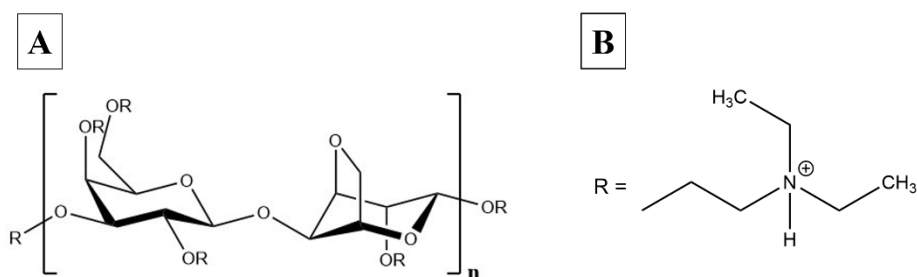


Figure 20 – Structure de l'agarose (A) et du groupement amine tertiaire (B) fonctionnalisant la matrice.

6.6.3. Chromatographie d'affinité

Cette chromatographie se fait par *batch*, l'échantillon étant mélangé directement avec la matrice au lieu d'être injectée sur une colonne préalablement conditionnée avec la matrice. La phase stationnaire est du chitosan possédant une masse moléculaire comprise entre 100 000 et 300 000 g/mol (Thermo Scientific).

Une solution est préparée en dissolvant 1 g de chitosan dans 30 mL d'acide acétique 1 % et en précipitant le soluté en augmentant le pH de la solution jusqu'à 8.0 par l'addition d'une

solution d'hydroxyde de sodium 3 M. Le chitosan précipité est lavé à trois reprises de ses impuretés avec du tampon Tris-HCl (20 mM, pH 8.0). Cette étape permet d'avoir du chitosan le plus pur possible pour la chromatographie. Il est ensuite resolubilisé dans 50 mL de tampon acétate (0.2 M, pH 5.0) pour obtenir une concentration en chitosan de 2 % en masse.

La purification peut ensuite être effectuée. Pour cela, un mélange est réalisé en respectant les proportions suivantes : 1 mL d'échantillon protéique, 1.25 mL de solution en chitosan 2 % en masse et 2.75 mL de tampon acétate (0.2 M, pH 5.0). Le tout est incubé sous agitation durant 30 min à 8 °C pour que la chitinase se lie au chitosan. Après incubation, le pH du mélange est augmenté jusqu'à 7.0 pour faire précipiter le chitosan qui est récupéré après centrifugation à 12 000 g pendant 30 minutes. Le chitosan est lavé à trois reprises avec du tampon Tris-HCl (20 mM, pH 8.0). Il est ensuite resolubilisé dans du tampon acétate (0.2 M, pH 5.0) contenant du MgCl₂ à une concentration de 2 M en respectant les proportions suivantes : pour chaque mL d'échantillon protéique incorporé initialement, il faut ajouter 3 mL de tampon. Le tout est incubé sous agitation durant 30 minutes à 8 °C. Une étape de dessalage est ensuite nécessaire pour enlever le MgCl₂, décrite au point 6.5.

6.6.4. Chromatographie d'exclusion de taille

Une colonne HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200 pg de 120 mL (Cytivia) est utilisée pour effectuer cette étape. Elle est composée d'une matrice de dextran lié à des particules d'agarose (matrice de polysaccharides). La colonne est préalablement équilibrée avec 240 mL de tampon acétate (0.2 M, pH 5.0). Une fois la colonne équilibrée, l'échantillon protéique est injecté dans une boucle d'échantillonnage et des fractions protéiques de 1 mL sont récoltées à un débit de 1 mL/min.

6.7. Test d'activité de la chitinase

Une solution mère de chitine azure (chitine liée de façon covalente à un colorant « Remazol Brilliant Violet 5R ») est réalisée en plaçant 10 mg de chitine azure dans un Falcon™ de 15 mL et en ajoutant 10 mL d'HCl concentré. La solution est conservée à 4 °C durant 15 heures à l'abri de la lumière. Différentes solutions ont ensuite été réalisées selon la tableau 1.

Tableau 1 - Tableau récapitulatif de la préparation des différentes solutions de chitine azure pour l'élaboration de la droite de calibration.

Volume de solution mère (µL)	Volume d'eau (µL)	Concentration en chitine azure dégradée (mg/mL)
0	1000	0
100	900	0.1
200	800	0.2
300	700	0.3
400	600	0.4
500	500	0.5
600	400	0.6
700	300	0.7
800	200	0.8

Ensuite, 300 µL de chacun des échantillons est dilué avec 675 µL d'HCl 2M. Enfin, l'absorbance à 545 nm a été mesurée pour chaque échantillon.

6.7.1. Détection de l'activité de la chitinase

La détection de l'activité de la chitinase est réalisée en plaçant dans un EppendorfTM de 1.5 mL : 75 µL d'échantillon protéique, 300 µL de tampon acétate (0.2 M, pH 5.0) et 300 µL de solution de chitine azure (2 mg/mL). Le mélange hétérogène de chitine azure a été réalisé en plaçant de la chitine azure dans un mélange de tampon hydrogénophosphate de sodium (50 mM, pH 6.0) et de tampon hydrogénophosphate de potassium (2.4 M, pH 9.0) en proportion 1 : 1. Le mélange contenant l'échantillon protéique est ensuite incubé à 37 °C pendant 5 heures sous agitation. Pour stopper la réaction enzymatique, 300 µL d'HCl sont ajoutés dans chaque EppendorfTM et ceux-ci sont placés sur de la glace pendant 15 minutes. L'absorbance à 545 nm est ensuite mesurée pour chaque échantillon à l'aide d'un spectrophotomètre.

6.8. Electrophorèse SDS-PAGE

6.8.1. Fabrication du gel

Le gel est composé de deux parties : un gel d'empilement (*stacking gel*) et un gel de séparation (*running gel*). Le pourcentage de réticulation du gel est de 12 %. Le tableau 2 reprend la composition détaillée des gels préparés. Les différents composants doivent être ajoutés dans l'ordre du tableau. L'APS (*ammonium persulfate*) et le TEMED (*tetramethylethylenediamine*) doivent être ajoutés en dernier lieu car ils catalysent la polymérisation des gels.

Tableau 2 - Composition des gels 12% utilisés pour faire des analyses SDS-PAGE.

Gel d'empilement		Gel de séparation	
Composés	Volume (mL)	Composés	Volume (mL)
Eau distillée	5.08	Eau distillée	3.00
Mélange d'acrylamide	5.94	Mélange d'acrylamide	0.66
Tampon Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8)	3.75	Tampon Tris-HCl (0.5 M, pH 6.8)	1.26
SDS (10 %)	0.150	SDS (10 %)	0.050
APS (10 %)	0.075	APS (10 %)	0.025
TEMED	0.0075	TEMED	0.005

6.8.2. Electrophorèse

Les échantillons à analyser sont préparés en mélangeant 10 µL d'échantillon protéique et 10 µL de tampon de charge (62 mM Tris-HCl pH 6.8, 25 % glycérol, 2 % SDS, 0.01 g/mL bleu de bromophénol, 5 % β-mercaptoéthanol) dans un tube EppendorfTM.

Le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse, dans laquelle sont versés 500 mL de tampon de migration (25 mM Tris-HCl, 200 mM glycine, 0.1 % SDS, pH 8.3). Un volume de 15 µL d'échantillons protéiques préparés précédemment et 8 µL de marqueur de masse

moléculaire (*Precision Plus ProteinTM All Blue Standards*) sont déposés dans les puits. Le générateur est ensuite réglé sur 200 V, pour une intensité de 40 mA et une durée de migration de 1 heure.

6.8.3. Coloration des gels

Deux techniques différentes de coloration sont employées : la coloration négative à l'imidazole-zinc et celle au bleu de Coomassie (*Quick Coomassie Stain method*).

Pour la coloration à l'imidazole-zinc, le gel est placé dans une solution d'imidazole 0.2 M – 0.1 % SDS durant 15 minutes. Le gel est ensuite immergé dans une solution de chlorure de zinc 0.3 M jusqu'à apparition des bandes protéiques (30 secondes). Le gel est enfin retiré de la solution de chlorure de zinc et est rincé à l'eau distillée. Une photo du gel est prise sur un fond noir afin d'observer les bandes.

Pour la coloration par la méthode rapide de coloration de Coomassie, le gel est placé durant 15 heures dans une solution de *Quick Coomassie Stain* (NeoBiotech). Le gel est ensuite retiré de la solution et est rincé à l'eau distillé. Une photo du gel est prise sur un fond blanc afin d'observer les bandes.

6.9. Spectrométrie de masse

Pour les échantillons liquides, la trypsine, une protéase à sérine, est utilisée dans un premier temps pour que les protéines contenues dans l'échantillon soient digérées en plus petits peptides. Ceux-ci sont ensuite séparés par LC (*Liquid Chromatography*). Les différents peptides sont par après sélectionnés pour correspondre à la gamme d'analyse du spectromètre de masse. Ils sont par la suite ionisés par ESI (*Electrospray Ionisation*) et analysés par un analyseur quadripôle et par TOF (*Time Of Flight*) pour en déterminer leur structure primaire. Une fois les structures primaires des peptides déterminées, celles-ci sont confrontées à des bases de données contenant des séquences primaires de protéines prédites sur base du génome d'*H. halys*.

Pour les bandes découpées d'un gel, les étapes sont similaires à l'exception que l'on commence par laver les bandes de gel de leur coloration et que l'on effectue après le lavage une réduction et une alkylation des échantillons à analyser.

6.10. Modélisation moléculaire

La prédiction de structure est réalisée par homologie grâce au logiciel SWISS-MODEL qui compare la structure primaire de la protéine avec des structures primaires de protéines dont les structures tridimensionnelles sont présentes dans la banque de données PDB. SWISS-MODEL fournit : i) un score permettant de connaître la qualité du modèle, le GMQE (*Global Model Quality Estimate*), une estimation de la qualité qui combine les propriétés de l'alignement cible-template et de la structure du modèle et qui, plus il est proche de 1, plus le modèle est considéré comme fiable, ii) un pourcentage d'identité de séquence entre la protéine modélisée et la protéine sur laquelle le modèle est basé, iii) ainsi qu'un diagramme de Ramachandran⁵⁸. Un alignement de séquence est également effectué grâce à CLUSTLAW. Les structures sont visualisées via le logiciel PyMOL. Il est à noter qu'une évaluation du pI (point isoélectrique) peut être faite par le logiciel EXPASY.

6.11. Docking

L'algorithme génétique GOLD est utilisé pour prédire les interactions ligand-protéine. Un algorithme génétique est : « *un algorithme d'optimisation s'appuyant sur des techniques dérivées de la génétique et de l'évolution naturelle : croisements, mutations, sélection, ...* » (Jean-Marc Alliot, Nicolas Durand)⁵⁹.

Au préalable, un atome de la protéine est fixé comme étant le centre de la zone de recherche dont le rayon est fixé. L'algorithme recherchera dans cette région les positions les plus probables du ligand par rapport à la protéine, basées sur une fonction de score. Celle choisie dans cette étude est la fonction empirique ChemPLP. Elle prend en compte les ponts H, les forces répulsives ainsi que les interactions de van der Waals. Elle fournit un score qui estime l'affinité de liaison ligand-protéine (plus sa valeur absolue est élevée et plus cette affinité est élevée). Elle possède l'avantage de calculer les différentes positions du ligand de façon plus fiable que les autres fonctions tout en étant plus rapide pour les calculer⁶⁰. Les différents résultats sont visualisés à l'aide du logiciel PyMOL.

IV. Résultats et discussions

Afin de pouvoir élaborer un inhibiteur sélectif à une chitinase d'*H. halys*, il est d'abord essentiel de l'isoler et de la caractériser. Dans ce contexte, un test d'activité de chitinase est d'abord mis au point afin de vérifier sa présence au cours des étapes de purification. Ensuite, un protocole de purification est testé afin d'isoler l'enzyme d'intérêt. Enfin, à partir de la structure primaire de chitinases, un modèle de leur structure tertiaire est déterminé afin de pouvoir étudier leurs interactions avec différents ligands.

7. Test d'activité

Afin de suivre la présence de l'enzyme d'intérêt lors de la purification, un test d'activité a été élaboré. Un premier test utilisant de la chitine colloïdale⁶¹ comme substrat a été effectué mais sans succès (testé avec une chitinase commerciale de *Streptomyces griseus*). En effet, il semble qu'il y ait eu un problème dans la préparation de cette chitine colloïdale car celle-ci ne fut pas dégradée par l'enzyme commerciale. Un autre substrat a donc été envisagé, comme la chitine azure⁶², une chitine issue de carapace de crabe liée à un colorant de manière covalente ($\lambda_{\max} = 545 \text{ nm}$).

La détection de l'activité de la chitinase se base donc sur la dégradation de la chitine azure. La chitinase, en dégradant ce substrat insoluble, va libérer de plus petits polymères solubles. La quantité de chitine azure dégradée par l'enzyme peut alors être déterminée sur base d'une mesure de l'absorbance à 545 nm et d'une droite de calibration préalablement élaborée.

Afin de pouvoir étudier la cinétique de la chitinase quantitativement dans le futur, une droite de calibration a été élaborée pour le test enzymatique à la chitine azure (voir point 6.7). Cette droite est représentée à la figure 21.

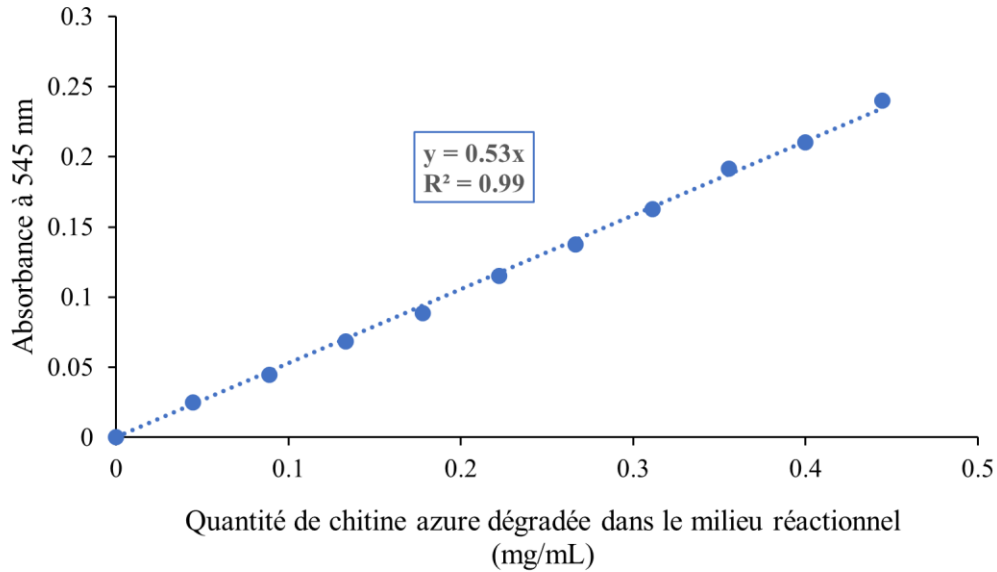


Figure 21 - Droite de calibration du test enzymatique à la chitine azure.

On peut observer que l'absorbance à 545 nm évolue linéairement avec la quantité de chitine azure dégradée (R^2 proche de 1). Ce résultat était attendu car cette évolution doit respecter la loi de Lambert-Beer, représentée à la relation (1)⁶³.

$$A = \varepsilon.l.C \quad (1)$$

Avec A l'absorbance, ε le coefficient d'absorption massique ($\text{mL.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), l la longueur du chemin optique (cm) et C la concentration (mg.ml^{-1}).

Sur base de cette loi et de la droite de calibration, il est possible de déterminer le coefficient d'absorption massique de la chitine azure dégradée. Le chemin optique étant de 1 cm, le coefficient d'absorption massique est égal à $0.53 \text{ mL.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

8. Purifications

La purification et la caractérisation d'une enzyme sont essentielles pour prédire les inhibiteurs qui lui seront les plus spécifiques. Par conséquent, l'optimisation du protocole de purification de la protéine cible est essentielle pour commencer l'étude sur les insecticides, dont l'objectif est d'inhiber la chitinase de la punaise diabolique. Dans ce but, différentes techniques chromatographiques sont appliquées dans le cadre de ce mémoire.

8.1. Chromatographies échangeuses d'ions

Le protocole de purification a été élaboré en s'inspirant des modes opératoires de purification de la tréhalase du puceron vert du pois (*Acyrtosiphon pisum*)⁶⁴ et de la chitinase du puceron vert du pêcher (*Myzus Persicae*)⁵⁴.

La première étape est l'extraction de la chitinase soluble de l'homogénat d'insecte avec un tampon d'acétate de sodium (0.2 M, pH 5.0). La deuxième étape est la précipitation au sulfate d'ammonium, qui élimine une partie des protéines de l'échantillon tout en conservant l'enzyme sous sa forme active. La solubilité d'une protéine varie selon divers facteurs comme la température, le pH ou encore la concentration en sels. Le principe de la précipitation au sulfate d'ammonium est d'utiliser une variation de la concentration en sel pour faire précipiter sélectivement des protéines. Lorsque la concentration en sel est faible, la solubilité des protéines augmente avec la force ionique de la solution (« salting-in ») (figure 22). A l'inverse, lorsque la concentration en sel est plus importante, la solubilité des protéines diminue avec une augmentation de la force ionique de la solution et celles-ci précipitent (« salting-out »). Ces deux effets peuvent être utilisés afin de séparer les protéines selon leur solubilité.

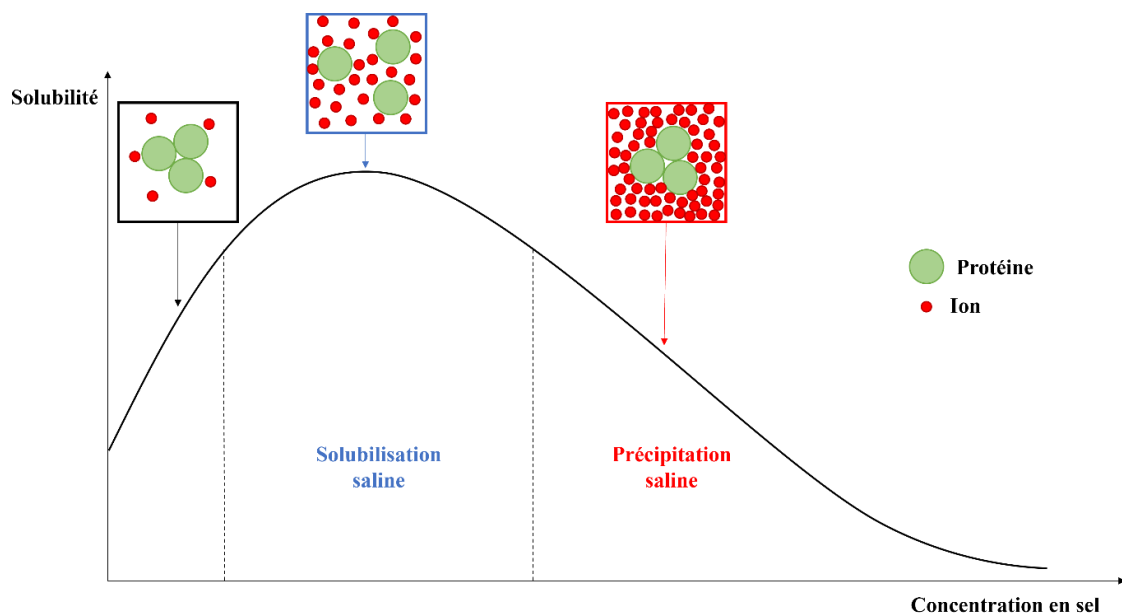


Figure 22 - Illustration du principe du "salting-in" et "salting-out".

Avant de passer aux étapes chromatographiques, il est nécessaire d'enlever le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de la solution contenant la chitinase à l'aide d'une colonne PD-10 SephadexTM. En effet, le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ risque d'une part de perturber l'interaction que les protéines pourraient avoir avec les colonnes employées, mais il inhibe également l'activité de la chitinase⁶⁵.

Comme le point isoélectrique de la protéine d'intérêt est inconnu, deux types de chromatographie par échange d'ions ont été appliquées : une échangeuse d'anions et de cations.

8.1.1. Chromatographie échangeuse de cations

La figure 23 montre le chromatogramme obtenu pour l'étape de chromatographie par échange de cations (pH = 5.0). Une bande d'éluat est observée lorsque le gradient de NaCl a atteint 100 %.

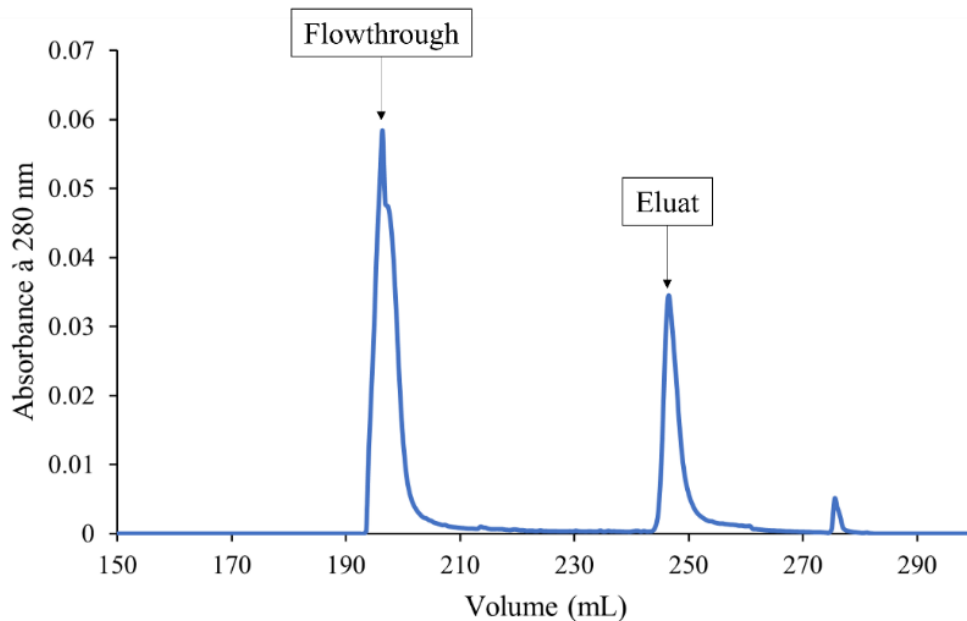


Figure 23 - Chromatogramme obtenu pour la purification avec la colonne échangeuse de cations.

Les résultats du test enzymatique ont montré que de l'activité de chitinase était présente uniquement dans le flowthrough (fractions de protéines qui ne se lient pas à la colonne). La colonne étant légèrement chargée négativement, cela signifie que la chitinase, à pH 5.0, est soit neutre soit chargée négativement. Ceci donne déjà une indication sur le point isoélectrique de la chitinase d'*H. halys* qui serait inférieur ou égal à 5. En effet, si son point isoélectrique était supérieur à 5, la chitinase aurait été chargée positivement au pH de purification et elle se serait liée à la colonne (chargée négativement). La protéine aurait alors été libérée au moment de l'application du gradient de NaCl, et de l'activité de chitinase aurait été retrouvée dans l'éluat et non dans le flowthrough.

8.1.2. Chromatographie échangeuse d'anions

Le flowthrough de la purification par chromatographie échangeuse de cations a été récupéré et utilisé pour cette étape. La figure 24 montre le chromatogramme obtenu pour l'étape de chromatographie par échange d'anions (pH = 8.0). Une bande d'éluat est observée lorsque le gradient de NaCl a atteint 100 %.

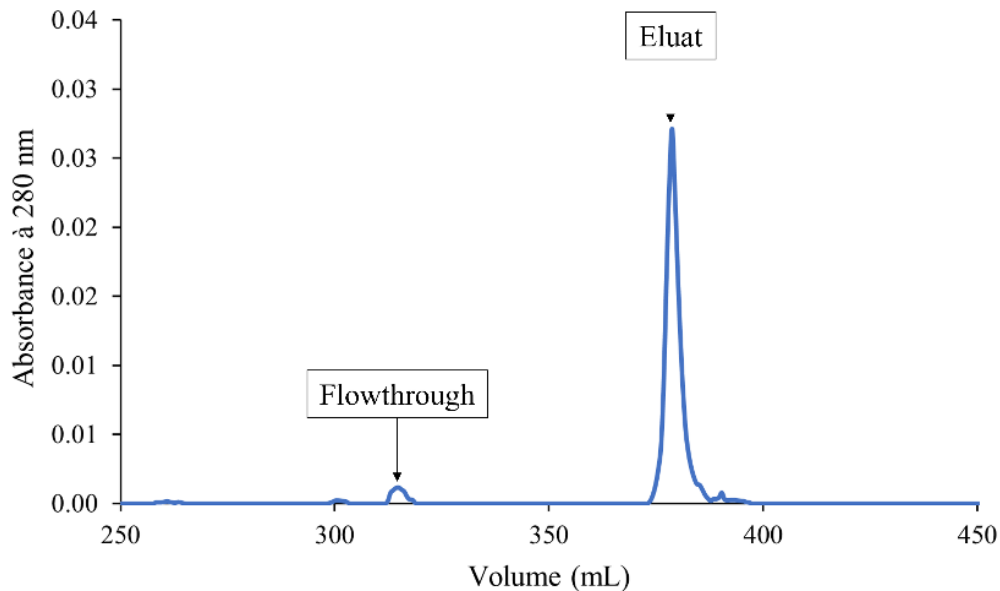


Figure 24 - Chromatogramme obtenu par la purification avec la colonne échangeuse d'anions.

Comme attendu après les résultats obtenus pour la chromatographie échangeuse de cations, une activité de chitinase n'a été détectée que dans l'éluat, ce qui suggère que la protéine s'est liée à la colonne chargée positivement à pH 8.0. Ces résultats indiquent que le point isoélectrique de la chitinase est inférieur à 8.0 et soutiennent l'observation faite avec la colonne échangeuse de cations. Ceci est en accord avec la gamme de points isoélectriques de chitinases d'insectes rapportés dans la littérature (entre 4.7 et 9.3)⁵³.

Une électrophorèse SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) permet d'évaluer la pureté d'un échantillon protéique ainsi que des informations sur sa composition. Les protéines sont dénaturées et chargées globalement négativement par le SDS. Elles sont séparées sur le gel en fonction du taux de réticulation du gel et de leur taille, par migration sous l'effet d'une différence de potentiel. Des gels SDS-PAGE ont été réalisés avec les échantillons protéiques provenant des différentes étapes de la purification (figure 25).

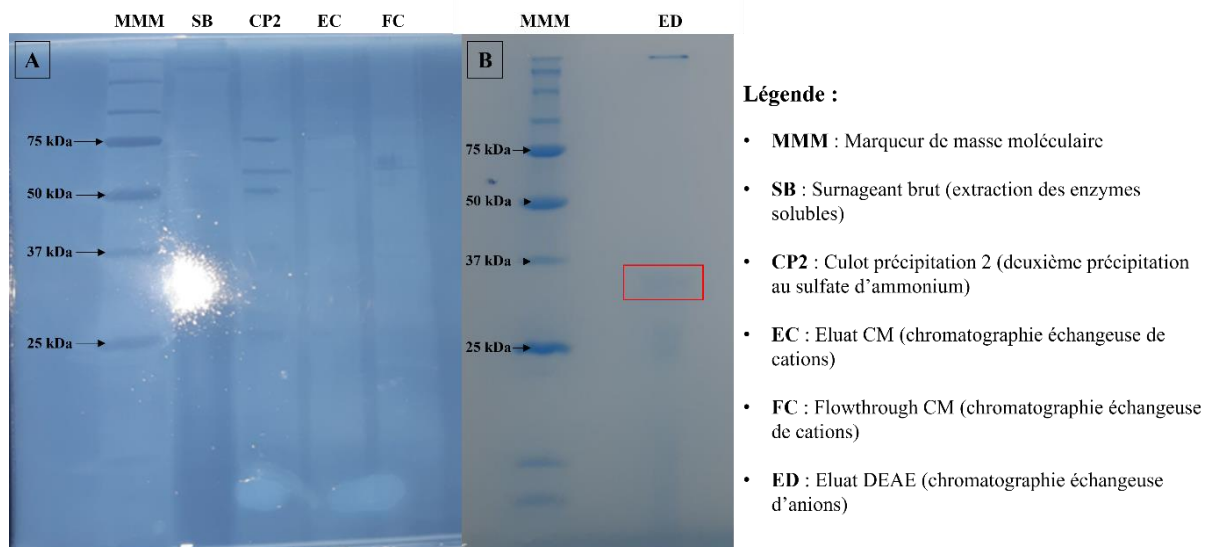


Figure 25 - Gels SDS-PAGE pour les échantillons protéiques provenant des différentes étapes de la purification par chromatographies échangeuses d'ions et colorés avec la méthode imidazole-zinc (A) et la méthode rapide de coloration de Coomassie (B).

Nous pouvons remarquer qu'il ne reste plus que quelques bandes principales pour la fraction ED. L'une d'entre elle est une bande comprise entre 25 et 37 kDa. Celle-ci pourrait correspondre à la chitinase d'intérêt. En effet, comme renseigné dans l'introduction, même si la littérature renseigne que les chitinases d'insectes sont censées posséder des masses moléculaires comprises entre 40 et 90 kDa⁵³ (comme celle d'*O. furnacalis*⁶⁶), il existe des chitinases de plus faibles masses moléculaires (comme celle de *M. persicae*⁵⁴, un hémiptère). Or, on remarque qu'il y a une possibilité qu'*H. halys* possède une chitinase qui a plus de points communs à celle de *M. persicae* qu'à celle d'*O. furnacalis* car ceux-ci font du même ordre.

Afin de vérifier cette hypothèse, une analyse en spectrométrie de masse a été effectuée sur l'échantillon liquide ED. Celle-ci nous a permis de détecter des peptides correspondant à la structure primaire d'une des chitinases chez *H. halys* prédites dans la banque de données NCBI (National Center for Biotechnology Information). Cette chitinase possède une masse moléculaire de 48 kDa (436 résidus) et ne correspond donc pas à la bande majoritaire observée sur gel SDS-PAGE. La chitinase est donc en faible concentration après purification et n'a donc pas pu être isolée. Les protéines qui ressortent le plus dans l'analyse par spectrométrie de masse et qui possèdent une masse moléculaire entre 25 et 37 kDa sont des protéines de la cuticule. La chitinase identifiée possède par ailleurs un pI calculé de 5.6, ce qui n'est pas aberrant compte tenu des résultats de la purification par les chromatographies échangeuses d'ions. En effet, pour que ce type de purification soit efficace, il faut fixer le pH de travail à au moins une unité de différence par rapport au pI de la protéine d'intérêt. A pH 5.0, la protéine n'était pas assez

chargée positivement pour se fixer à la colonne échangeuse de cations tandis qu'à pH 8.0, elle était chargée négativement et a pu se fixer à la colonne échangeuse d'anions.

8.2. Chromatographie d'affinité

Une nouvelle stratégie de purification a été testée pour tenter d'améliorer la purification de notre chitinase. Celle-ci a été appliquée avec succès pour la purification de chitinases de champignons (*Lycoperdon perlatum* et *Neurospora crassa*) et de choux (*Brassica oleracea*)⁶⁵.

Les premières étapes sont semblables à la première stratégie : une première étape d'extraction de la chitinase de l'homogénat d'insectes avec un tampon d'acétate de sodium (0.2 M, pH 5.0) et une deuxième étape appliquant la précipitation au sulfate d'ammonium.

Une purification par précipitation au chitosan a ensuite été effectuée. Contrairement à la chitine qui est un polymère insoluble, le chitosan, un polymère inhibiteur de chitinase, est soluble à des pH acides⁶⁷. Le principe est de mettre la solution protéique en contact du chitosan pour que la chitinase s'y lie. Il suffit ensuite de faire précipiter le chitosan lié à la chitinase en augmentant le pH. Cette chromatographie d'affinité est suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille pour séparer le chitosan (masse moléculaire comprise entre 100 000 et 300 000 g.mol⁻¹) de la chitinase. Le chromatogramme correspondant à la bande d'élution est représenté à la figure 25.

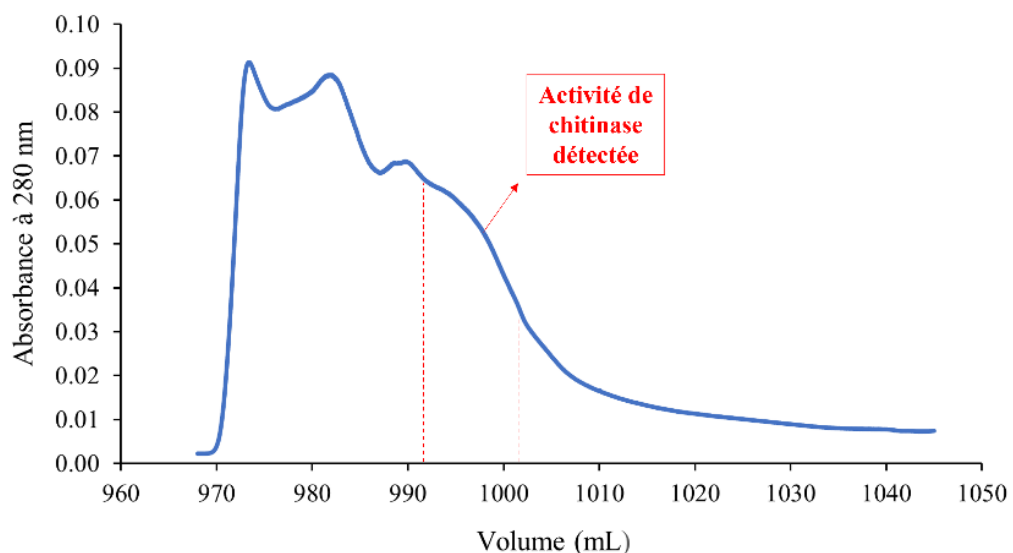


Figure 26 - Chromatogramme obtenu pour l'un des pics d'élution par la purification avec une colonne d'exclusion de taille.

Un test enzymatique a été réalisé pour différentes fractions correspondant à ces bandes d'élution et de l'activité de chitinase a été détectée pour la fraction délimitée par les lignes pointillées rouges (figure 26). Un SDS-PAGE a été réalisée sur les différentes étapes de purification où de l'activité a été détectée (figure 26).

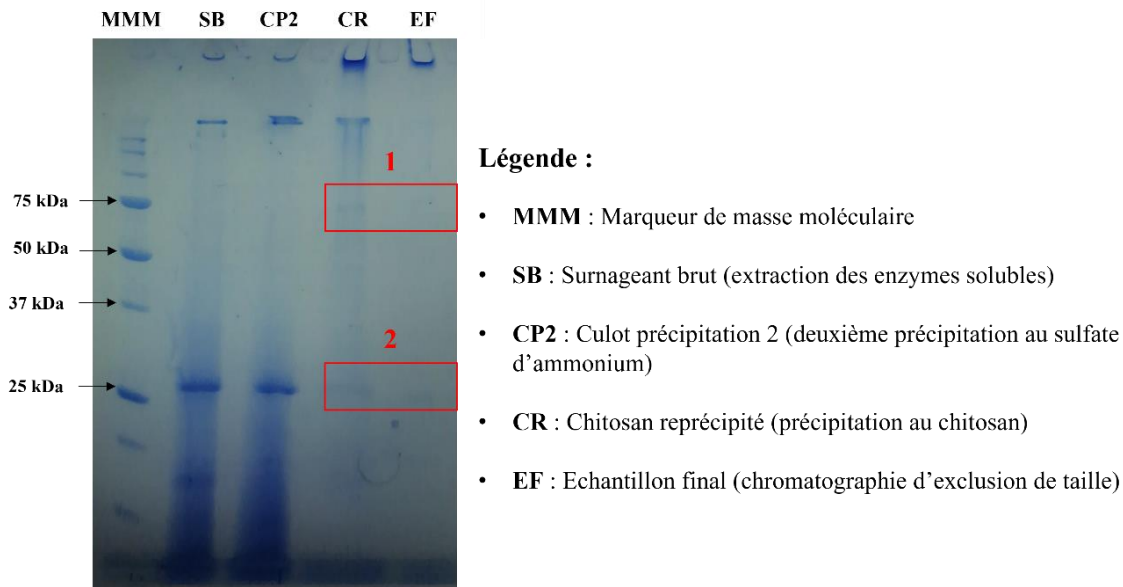


Figure 27 - Gel SDS-PAGE pour les échantillons protéiques où de l'activité de chitinase a été détectée et provenant des différentes étapes de la purification par chromatographie d'affinité.

Nous pouvons remarquer qu'il ne reste plus que deux bandes principales pour la fraction EF : une correspondant à une masse moléculaire d'approximativement 25 kDa et une autre correspondant à une masse moléculaire d'environ 75 kDa. Cependant, une analyse par spectrométrie de masse indique qu'aucune de ces bandes ne correspond à des chitinases. Par contre, des peptides pour une *chitinase like protein* de masse moléculaire proche de 80 kDa ont été détectés. Cette famille de protéines n'a pas d'activité de chitinase mais a des similarités de séquence avec les chitinases, d'où l'hypothèse qu'elle se soit liée au chitosan. Par ailleurs, plusieurs protéines dites « hypothétiques » ou « non caractérisées » ont été identifiées à des masses moléculaires proche de 25 kDa. Enfin, cette analyse révèle des peptides d'une autre chitinase d'*H. halys* possédant une masse moléculaire de 48 kDa (432 résidus). Une évaluation du pI a été effectuée et celui-ci serait de 4.9. Elle aurait donc dû se retrouver dans les mêmes échantillons que la première chitinase identifiée durant la purification par chromatographies échangeuses d'ions. Elle était probablement en trop faible quantité pour être détectée.

Les séquences des deux chitinases détectées en spectrométrie de masse sont reprises en annexe 1. La chitinase détectée après les étapes de chromatographies échangeuses d'ions est

nommée « Chi_ion » tandis que celle détectée après les étapes de chromatographie d'affinité est nommée « Chi_aff ».

9. Prédiction des structures tertiaires des chitinases d'*H. halys*

Afin d'analyser les structure tertiaire des deux chitinases identifiées d'*H. halys*, chacune d'entre elle a été prédite par homologie à partir de leur séquence primaire respective. Le modèle de « Chi_ion » a été construit par homologie avec la structure cristallographique de la chitinase du groupe IV d'*O. furnacalis* (code PDB : 6JM7⁵²) tandis que le modèle de « Chi_aff » l'a été par homologie avec la structure cristallographique d'un domaine catalytique de la chitinase du groupe II d'*O. furnacalis* (code PDB : 6JAX⁶⁸). Les pourcentages d'identité de séquences entre les protéines d'intérêt et leurs homologues sont de plus de 30% (Tableau 3). Le modèle de « Chi_ion » reprend les résidus 23 à 397 et celui de « Chi_aff » reprend ceux allant de 52 à 427.

Tableau 3 - Données permettant de déterminer la validité des modèles de chitinases construits par homologie.

Chitinase	Pourcentage d'identité de séquence avec la structure cristallographique utilisée pour construire le modèle	Pourcentage de résidus se trouvant dans les zones favorables du diagramme de Ramachandran
« Chi_ion »	42.5	94.64
« Chi_aff »	59.2	96.74

9.1. Validation des modèles

Un diagramme de Ramachandran pour chaque structure prédite a été réalisé, permettant de déterminer si les angles dièdres présents dans les modèles des protéines étudiées respectent les angles dièdres autorisés énergétiquement (figure 28).

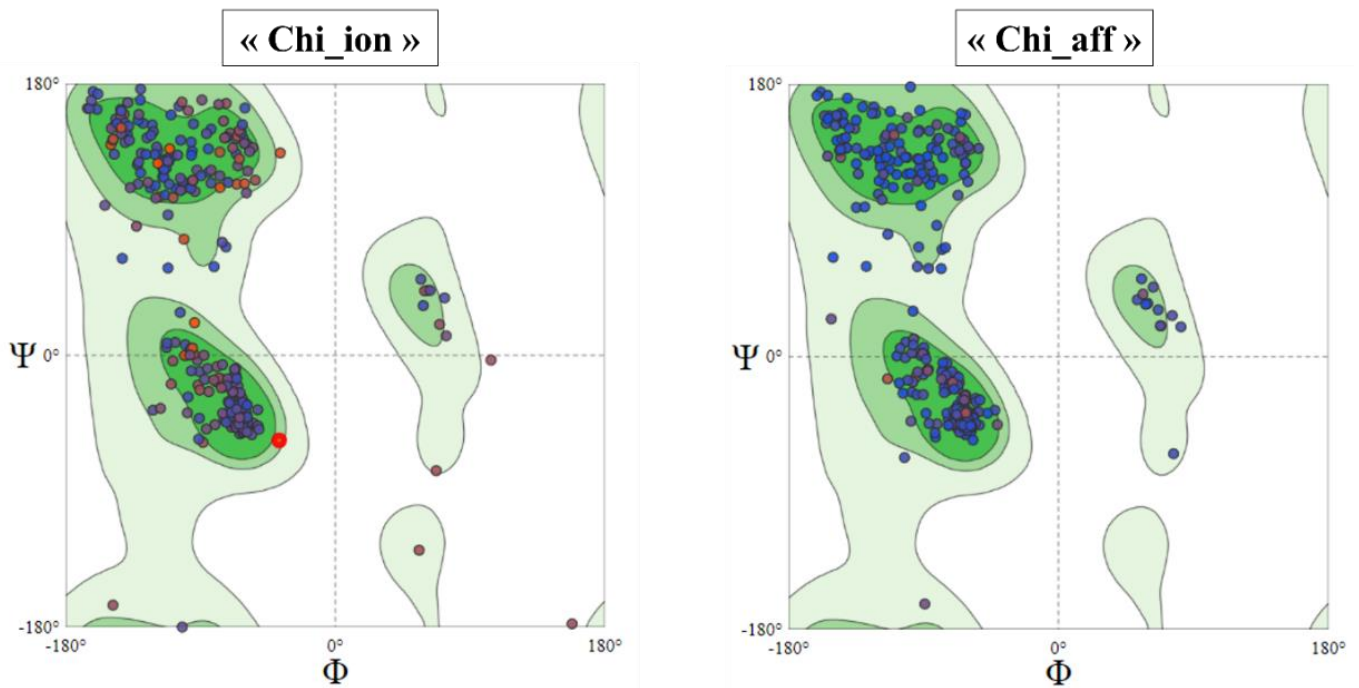


Figure 28 – Diagramme de Ramachandran des structures des chitinases modélisées par homologie.

Pour les deux chitinases, plus de 90 % des résidus se trouvent dans les zones favorables du diagramme de Ramachandran. Nous pouvons donc considérer les modèles construits par homologie comme valables.

9.2. Analyse structurale

Nous remarquons que ces deux chitinases possèdent des motifs structuraux propres aux chitinases de la famille GH18, c'est-à-dire un domaine principal et un *chitinase insertion domain* (CID) (figure 29). Le domaine principal est composé d'un barillet (β/α)₈ avec huit feuillets β (β_1 - β_8) et de huit hélices α (α_1 - α_8). Le CID est lui composé de cinq feuillets β anti-parallèles et d'une hélice α . Le rôle exact du CID n'est pas encore très bien connu. Cependant, une étude réalisée sur une chitinase chez *Serratia marcescens* (une espèce de bactérie) a démontré que si on enlevait ce CID, i) la stabilité thermique et l'activité spécifique de l'enzyme diminuait, ii) son pH optimum de fonctionnement était plus faible, et iii) elle perdait son activité catalytique pour de longues chaînes de chitine⁶⁹. Ce domaine aurait donc un rôle essentiel dans l'interaction entre le substrat et la protéine. Il est à noter qu'aucune de ces deux chitinases ne possèdent de CBD, des domaines présents chez certaines chitinases (voir point 4.2) et ayant comme rôle d'augmenter l'affinité de l'enzyme avec le substrat.

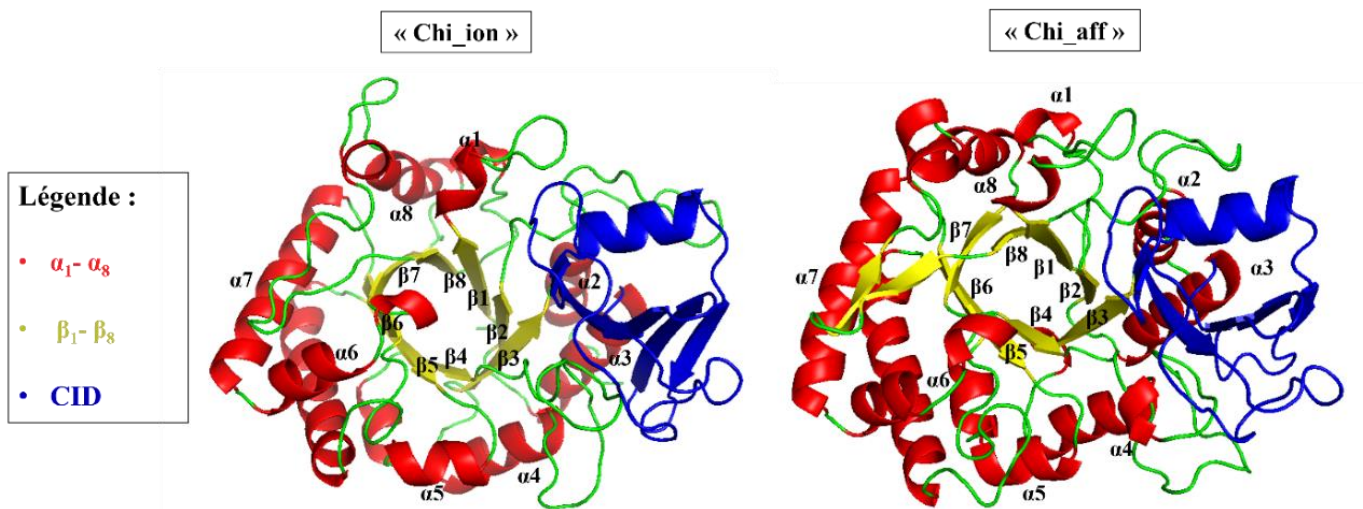


Figure 29 – Structure de « Chi_ion » et « Chi_aff ».

Le tableau 4 reprend les motifs conservés chez les chitinases de la famille GH18⁷⁰ et celles d'*H. halys*. Les résidus soulignés sont les acides aminés correspondant au motif catalytique (dont les résidus catalytiques sont les deux aspartates et le glutamate) et ceux en rouge sont les acides aminés différents du motif conservé chez les chitinases de la famille GH18. Les « X » correspondent à des résidus non-définis.

Tableau 4 - Motifs conservés chez les chitinases de la famille GH18 ainsi que ces motifs retrouvés chez les chitinases d'*H. halys*.

Motif conservé chez les chitinases de la famille GH18 ⁷⁰	Motif présent chez « Chi_ion »	Motif présent chez « Chi_aff »
KXXXXXGGW	KVTLAIGGW 102 110	KVLLGLGGW 127 135
FDGX <u>DL</u> DWEYP	FDGL <u>DL</u> DWE <u>FP</u> 143 153	FQGL <u>DL</u> DWEYP 169 179
MXDYXXG	MAYDYHG 214 220	MAYDYHG 245 251
GXXXWXXDXDD	GIMTWSVDTDD 356 366	GGMVWALDLDD 391 401

Notons qu'il y a juste un résidu par chitinase qui est différent du motif conservé chez les chitinases de la famille GH18 : une tyrosine (Y) a été remplacée par une phénylalanine (F) chez « Chi_ion » et un aspartate (D) a été remplacé par une glutamine (Q) chez « Chi_aff ». Cette analyse des structures et des motifs permet de confirmer que ces deux chitinases sont des chitinases de la famille GH18.

Il est intéressant d'analyser plus en profondeur le domaine CID où un seul motif est conservé parmi la plupart des chitinases (exceptée chez les chitinases de plantes), le motif YXR (Tableau 5, souligné)⁷¹. Les résidus indiqués en bleu sont identiques chez les deux chitinases, ceux en vert sont des résidus très similaires (la leucine (L) et l'isoleucine (I) sont par exemple des acides aminés ayant des structures similaires) et ceux indiqués en orange possèdent moins de similarités (la valine (V) et la phénylalanine (F) sont, par exemple, des acides aminés dont la chaîne latérale est apolaire mais structurellement très différentes).

Tableau 5 - Comparaison des séquences des CID de « Chi_ion » et « Chi_aff ».

Domaine	Séquence
CID de « Chi_ion »	<u>YGRTFVLES</u> PSRGVLGETSLTQGFQGPFFTRTDGFLGYHEICNELRTGNWTVHWDNTSLTPFATTGNRLITYDN 265
CID de « Chi_aff »	YGQSF ^{OR} TLRNESDTELQAPISGPGMAGQFTRAAGFLAYYEICD ^{OR} TVSGGNWVVKRHETGAIGPIAYKGNQWISYDD 300

On remarque que les deux domaines partagent beaucoup de similarités de séquence (40 % d'identité de séquence ; toutes les deux ont un CID de 74 résidus). Par ailleurs, seul le CID de « Chi_ion » possède exactement le motif conservé des chitinases GH18, l'arginine (R) étant remplacée par une glutamine (Q) chez « Chi_aff » (acides aminés similaires).

Afin de comprendre le rôle du CID, il est intéressant de le comparer avec des structures de CBD qui auraient à priori un rôle similaire. Les CBD considérés sont des structures déterminées par RMN et proviennent de chitinases de bactérie (*Bacillus circulans*)⁷² et de champignons (*Streptomyces griseus*)⁷³. En effet, aucun CBD de chitinase d'insecte n'est

recensé dans la PDB. Il est connu que dans les CBD, les résidus aromatiques sont exposés au solvant et participent à l'interaction entre la chitinase et le substrat en « s'empilant » sur un cycle sur deux du substrat. Les thréonines (T) et les prolines (P) participeraient également à cette interaction en étant aussi exposés au solvant^{72,73}.

Premièrement, on remarque que les structures tertiaires de ces domaines sont différentes : là où le CID des chitinases étudiées sont constitués de quatre feuillets β et d'une hélice α (voir figure 29), les deux CBD étudiés possèdent uniquement des feuillets β (cinq pour le CBD de bactérie et trois pour le CBD de champignon, figure 30).

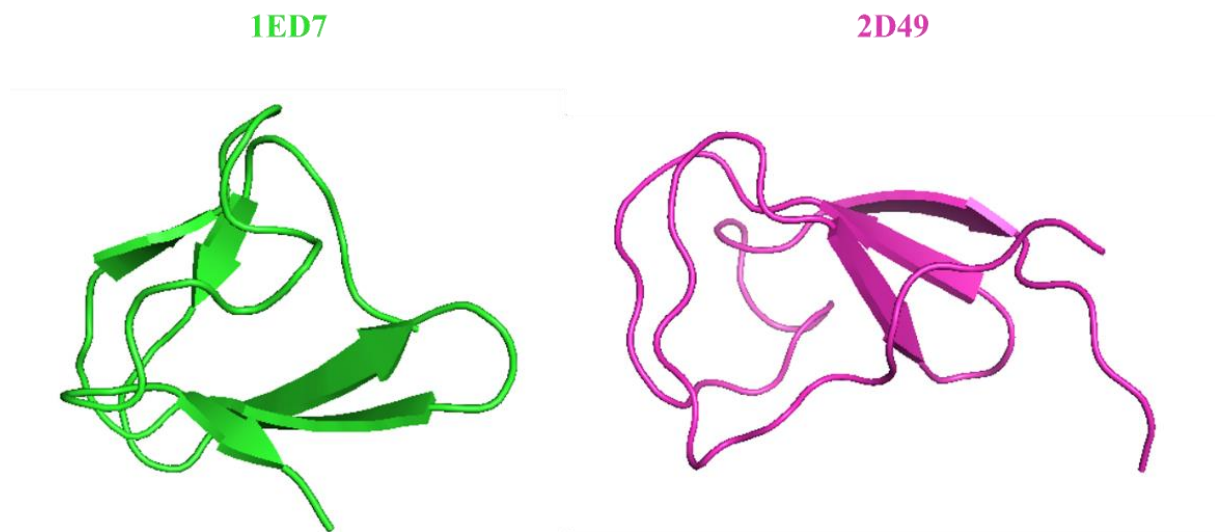


Figure 30 - Structure des CBD chez une bactérie (1ED7) et chez un champignon (2D49).

Le tableau 6 reprend les résultats de l'alignement de séquence entre le CID de « Chi_ion » et les deux CBD (« Chi_aff »). Le code couleur est le même que pour le Tableau 5.

Tableau 6 – Comparaison de la séquence CID de « Chi_ion » avec les séquences des CBD d'une chitinases bactériennes et d'une chitinase fongique.

Domaine	Séquence
CID de « Chi_ion »	SRGVLGETSLTTQGFQGPFFRTDGFLGYHEICNELRTGNWTVHWDNT 275 321
CBD de <i>Bacillus circulans</i>	AWQVN—TAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEP SNVPALWQLQ 655 699
CID de « Chi_ion »	ESPSRGLVGETSLTTQGFQGPFFRTDGFLGYHEICNELRTGNWTVHWDNTSLT 272 325
CBD de <i>Streptomyces griseus</i>	ATCATAWSSSVYINGGTVSYNGRNYTAKWWTQNERPGTSDVWADK GACGTGS 30 82

On peut remarquer que le motif conservé chez les CID n'est pas conservé dans les différents CBD (YXR). Le CID de « Chi_ion » possède 15 % d'identité de séquence avec le CBD de la bactérie et 7 % d'identité de séquence avec celui du champignon. Les structures primaires d'un CID et d'un CBD sont donc assez différentes. On remarque cependant qu'il y a systématiquement un alignement entre deux thréonines (T) en début de séquence et entre deux tryptophanes (W) en fin de séquence (soulignés dans le tableau 6), des résidus étant impliqués dans les interactions avec le substrat chez les CBD^{72,73}. Il est donc intéressant de déterminer la proportion d'acides aminés (résidus aromatiques, thréonine et proline^{72,73}) chez les CID étant impliqués dans l'interaction avec le substrat chez les CBD. Celui-ci est de 32.4 % chez le CID de « Chi_ion » et de 24.3 % chez celui de « Chi_aff ». A titre de comparaison, ces résidus représentent 31.1 % de la structure primaire chez le CBD de la bactérie tandis qu'ils composent 30.1 % du CBD du champignon.

Pour clôturer cette partie, il est intéressant de déterminer à quel groupe appartiennent ces deux chitinases. Il est évident que « Chi_ion » est une chitinase du groupe IV. En effet, celle-ci ne possède qu'un domaine catalytique, un CID et ne possède pas de CBD (voir point 4.2). De plus, la séquence de « Chi_ion » possède 42.5% d'identité avec la séquence de son homologue qui est une chitinase du groupe IV. Il est à noter que les chitinases du groupe IV sont hautement exprimées dans l'intestin moyen de l'insecte, celles-ci auraient donc un rôle lié au renouvellement de la membrane péritrophique. Ces enzymes sont grandement glycosylées, leur permettant de ne pas se faire dégrader par les protéases contenues dans l'intestin, celui-ci étant riche en protéases à sérine telles que la trypsine et la chymotrypsine⁵².

En ce qui concerne le groupe de « Chi_aff », celui-ci est moins évident à déterminer. L'hypothèse avancée dans le cadre de cette étude est que cette chitinase serait du groupe VII (voir point 4.2). En effet, alors que la séquence de « Chi_aff » partage 59.2% d'identité de séquence avec son homologue qui est du groupe II, « Chi_aff » ne peut pas être du groupe II. Les chitinases de ce groupe sont en effet composées de plusieurs domaines catalytiques, de plusieurs CID et CBD. Or, « Chi_aff » ne possède qu'un domaine catalytique et un CID. Les chitinases du groupe VII sont encore peu connues mais celles-ci ont des similarités structurales avec les chitinases du groupe IV mais sont phylogénétiquement plus proches du groupe II⁴⁴. Dans le but d'appuyer cette hypothèse, le tableau 7 reprend les pourcentages d'identité et de similarité de séquences entre « Chi_aff » et d'autres chitinases, tandis que le tableau 8 reprend les données concernant le modèle de « Chi_aff » construit à partir de la chitinase du groupe IV de *O. furnacalis*.

Tableau 7 - Résultats d'alignement de séquence entre "Chi_aff" et d'autres chitinases.

Chitinase/domaine de chitinase	Pourcentage de résidus identiques chez « Chi_aff »	Pourcentage de résidus similaires chez « Chi_aff »	Pourcentage de résidus moins similaires chez « Chi_aff »
« Chi_ion »	34.03	18.29	12.04
Domaine d'une chitinase du groupe II d' <i>O. furnacalis</i>	51.39	13.89	8.56
Chitinase du groupe IV d' <i>O. furnacalis</i>	33.56	19.68	10.65
Chitinase du groupe VII de <i>Musca domestica</i>	34.03	20.14	13.19

Tableau 8 – Informations du modèle de « Chi_aff » construit par homologie sur une chitinase du groupe IV (l'identité de séquence ne prend en compte que la partie de séquence modélisée).

Critère	Modélisation de « Chi_aff » sur base de la chitinase du groupe IV (6JM7)
GMQE	0.69
Identité de séquence	39.73 %
Pourcentage d'acides aminés ayant un angle dièdre autorisé énergétiquement	91.60 %

On remarque que « Chi_aff » possède plus de similarités dans sa structure primaire avec les chitinases du groupe IV et VII qu'avec la chitinase du groupe II, même si elle ne partage que 33.5% et 34 % de sa séquence avec ces dernières, respectivement. Par ailleurs, la qualité du modèle de la structure de « Chi_aff » utilisant comme homologue une chitinase du groupe IV est correcte et tout à fait valide. Aucune structure de chitinase du groupe VII n'étant présente dans la PDB, cet exercice n'a pas pu être réalisé avec ce type de chitinase. De plus, « Chi_aff » partage plus de similarités avec la chitinase du groupe VII de *Musca domestica* qu'avec « Chi_ion », déterminée comme étant de type IV, qui provient pourtant du même organisme. Tout cela soutient l'hypothèse que cette chitinase est sûrement une chitinase du groupe VII. Il est à noter que les chitinases du groupe VII sont encore méconnues et que leur fonction exacte reste incertaine, mais elles seraient impliquées dans le processus d'ecdysis de l'insecte⁷⁴.

10. Prédiction des interactions ligand-enzyme

Afin d'obtenir une première idée des interactions mises en jeu entre différents ligands et les chitinases d'*H. halys*, des études de *docking* sont réalisées. Celui-ci est effectué sur « Chi_ion » car c'est la chitinase qui fait partie du groupe le mieux connu entre les deux chitinases identifiées d'*H. halys*. De plus, c'est pour cette chitinase qu'il y a eu le plus de peptides détectés en spectrométrie de masse, ce qui laisse à penser qu'elle serait présente en plus grande quantité dans l'organisme de l'insecte. L'étude est également réalisée sur la chitinase du groupe IV d'*O. furnacalis* (6JM7) afin de pouvoir étudier les différences d'interactions entre les deux chitinases provenant d'insectes d'ordres différents. Les ligands utilisés sont un pentamère du substrat (chitopentaose) et un inhibiteur prometteur de chitinase (Mol 1, voir point 4.3) (figure 31).

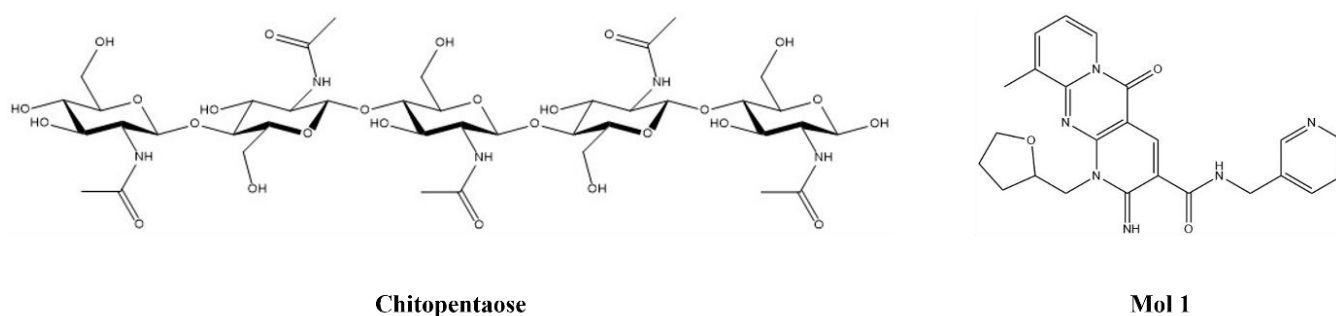


Figure 31 - Structure des ligands étudiés lors du docking.

Le rayon de la sphère de recherche a été fixé à 8 Å et il a été demandé au logiciel de fournir 20 positions différentes pour chaque ligand. Le centre de la sphère de recherche pour les deux chitinases ainsi que les scores pour la meilleure position de chaque ligand sont repris dans le tableau 9 (voir point 6.11).

Tableau 9 – Informations relatives au docking pour « Chi_ion » et 6JM7 avec les deux ligands.

Chitinase	Centre de la sphère de recherche	Ligand	Score fournit par ChemPLP
« Chi_ion »	C _δ du E ₁₅₁	Chitopentaose	-101.7
		Mol 1	-89.6
6JM7	C _δ du E ₁₄₆	Chitopentaose	-89.4
		Mol 1	-91.6

10.1. Interactions avec le chitopentaose

Dans un premier temps, il est intéressant d’observer les interactions entre le substrat et les deux chitinases. La superposition des deux chitinases ainsi que de leur substrat est représentée à la figure 32. Les acides aminés numérotés de 1 à 5 sont les motifs catalytiques des deux chitinases (respectivement DVDWE pour 6JM7 et DLDWE pour « Chi_ion »), tandis que la liaison entourée en noire correspond à celle qui serait brisée lors de la réaction d’hydrolyse⁵².

- Légende :**
- « Chi_ion »
 - 6JM7
 - Chitopentaose chez « Chi_ion »
 - Chitopentaose chez 6JM7
 - Motif catalytique de « Chi_ion »
 - Motif catalytique de 6JM7

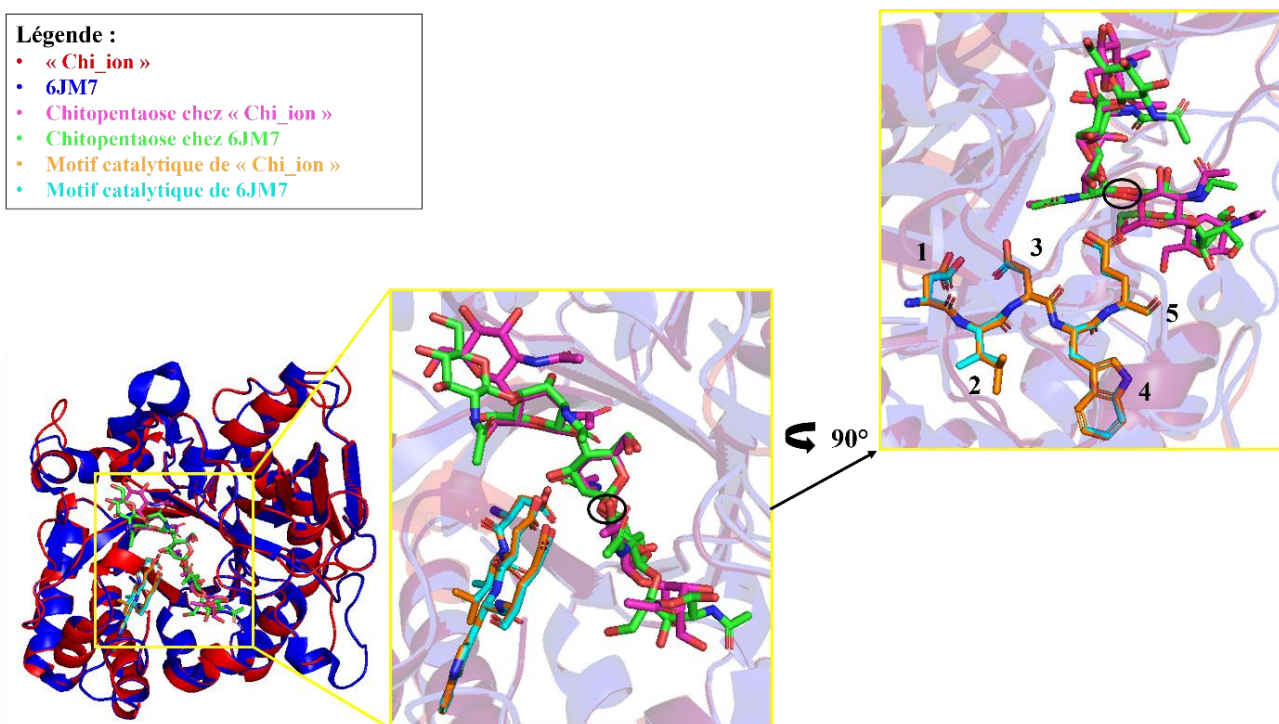


Figure 32 - Superposition de « Chi_ion » et 6JM7 ainsi que leur substrat.

Nous observons que le substrat se place à proximité du motif catalytique et que la conformation des cycles proches des résidus catalytiques est identique chez les deux chitinases. Cependant, les conformations des cycles aux extrémités du substrat sont différentes selon la chitinase considérée. Afin de comprendre ces différences, les résidus à 5 Å autour du substrat chez les deux chitinases ont été mis en évidence (figure 33).

- Légende :**
- Chitopentaose chez « Chi_ion »
 - Chitopentaose chez 6JM7
 - Résidus chez « Chi_ion »
 - Résidus chez 6JM7

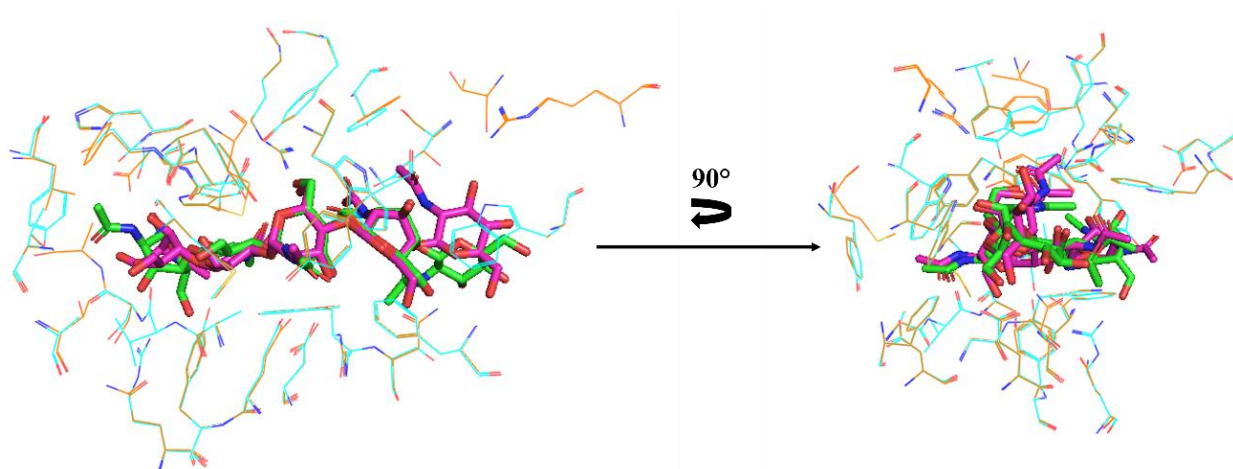


Figure 33 - Résidus à 5 Å autour du substrat chez « Chi_ion » et 6JM7.

Nous remarquons que de nombreux résidus aromatiques sont présents. Ceux-ci peuvent être impliqués dans des interactions H- π (ex : CH- π , NH- π et OH- π)⁷⁵ entre les chitinases et le substrat. Les autres acides aminés sont principalement impliqués dans des ponts H. La figure 34 pointe par ailleurs les résidus impliqués dans l'interaction avec le chitopentaose et qui sont différents entre les deux chitinases.

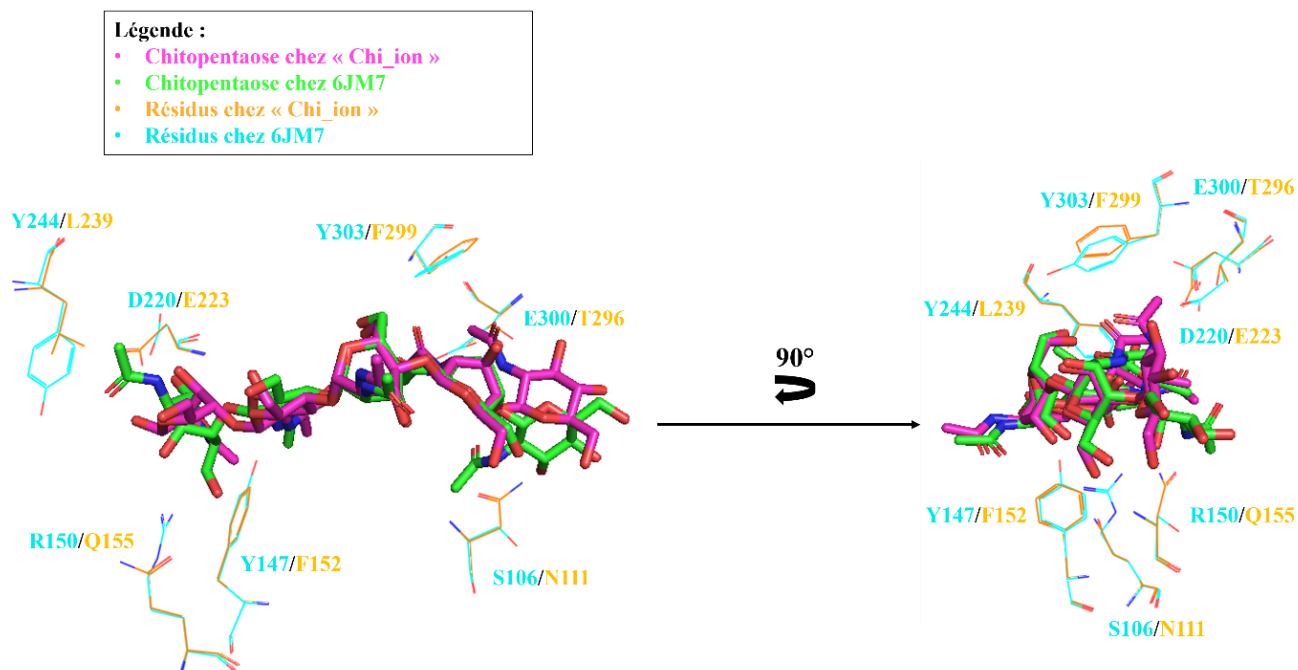


Figure 34 - Acides aminés ayant une grande importance dans la différence d'interaction avec le substrat chez « Chi_ion » et 6JM7.

Plusieurs différences intéressantes sont à souligner. Par exemple, la tyrosine 147 (Y147) et l'arginine 150 (R150) chez 6JM7 sont respectivement remplacées par une phénylalanine (F) et une glutamine (Q) chez « Chi_ion », ce qui fait que des ponts H sont présents chez 6JM7 et ne le sont pas chez « Chi_ion ». Il y a également la sérine 106 (S106), la tyrosine 244 (Y244) et le glutamate 300 (E300) chez 6JM7 qui sont remplacés respectivement par une asparagine (N), une leucine (L) et une thréonine (T) chez « Chi_ion ». Cela a surtout un impact d'un point de vue de l'encombrement stérique, ce qui expliquerait le positionnement différent du substrat. D'autres différences existent comme l'aspartate 220 (D220) chez 6JM7 qui est un glutamate chez « Chi_ion » (glutamate plus proche du substrat, engendrant un pont H plus fort) ou encore la tyrosine 303 (Y303) chez 6JM7 qui est remplacée par une phénylalanine (F) chez « Chi_ion » (interactions π -CH différentes). Ces différences, se trouvant essentiellement aux niveaux des extrémités du substrat, expliquent les changements de conformation du substrat au sein des deux sites actifs. Ces résultats montrent que, pour des insectes d'ordre différent, il y a des différences en acides aminés au sein d'un même groupe de chitinase (groupe IV). Ces

différences pourraient être exploitées afin de concevoir des inhibiteurs sélectifs au(x) chitinase(s) d'*H. halys*.

10.2. Interactions avec Mol 1

Maintenant que les différences d'interactions entre le substrat et l'enzyme chez les deux chitinases ont été mises en évidence, il est intéressant d'étudier les interactions avec un inhibiteur connu de chitinase. La superposition des deux chitinases ainsi que l'inhibiteur est représentée à la figure 35.

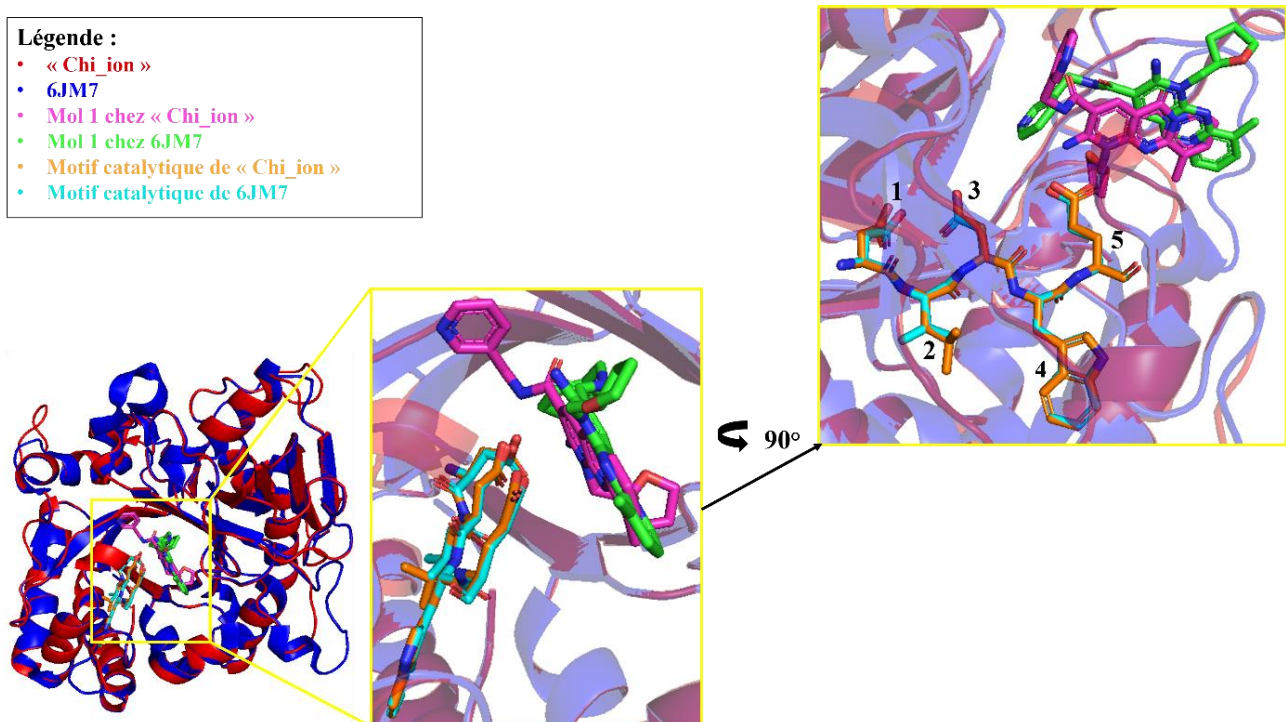


Figure 35 - Superposition de « Chi_ion » et 6JM7 ainsi que leur inhibiteur.

Comme pour le substrat, nous observons que l'inhibiteur se place à proximité du motif catalytique chez les deux chitinases. Cependant, l'orientation de l'inhibiteur est très différent selon la chitinase considérée. Afin de comprendre ces différences, les résidus à 5 Å autour du substrat chez les deux chitinases ont été mis en évidence (figure 36).

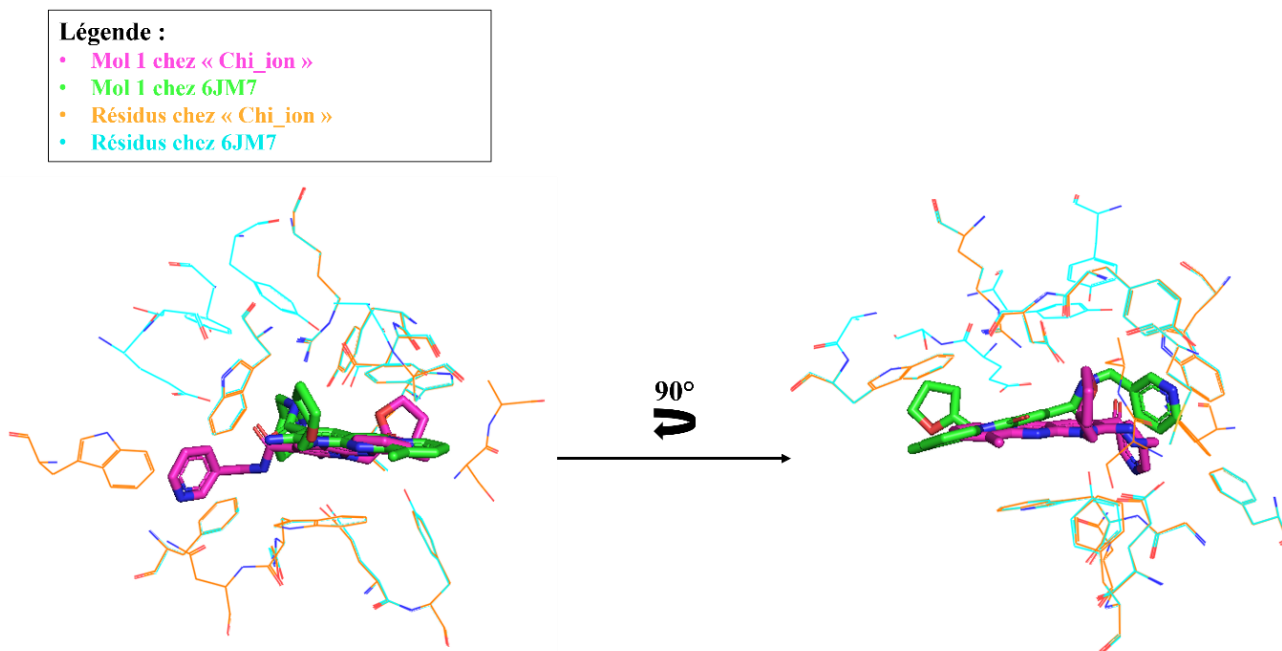


Figure 36 - Résidus à 5 Å autour de l'inhibiteur chez « Chi_ion » et 6JM7.

Nous remarquons la présence de nombreux résidus aromatiques, ce qui indique qu'il y a de nombreuses interactions π - π ou π -H entre les chitinases et l'inhibiteur. On peut également remarquer certains résidus pouvant former des ponts H avec l'inhibiteur. La figure 37 représente les différences importantes dans les résidus impliqués dans l'interaction avec Mol 1.

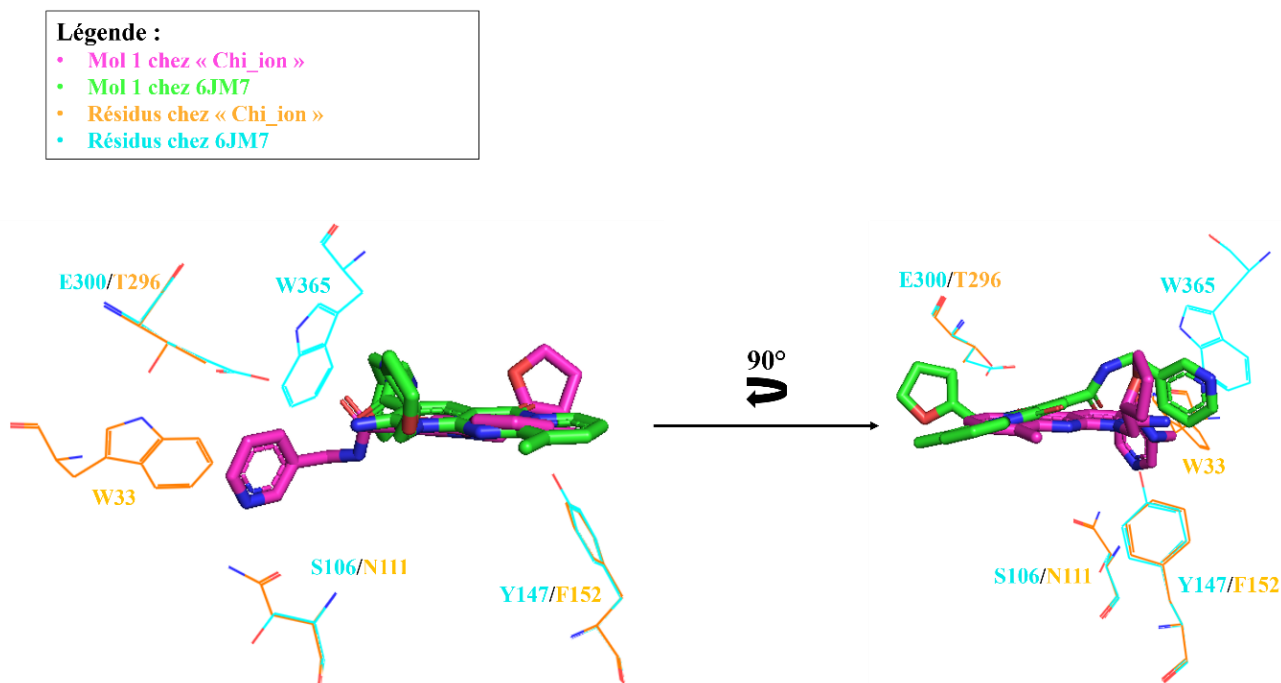


Figure 37 - Acides aminés ayant une grande importance dans la différence d'interaction avec l'inhibiteur chez « Chi_ion » et 6JM7.

Nous remarquons des différences notables dans les interactions entre l'inhibiteur et l'enzyme selon la chitinase considérée. Comme pour le chitopentaose, la tyrosine 147 (Y147) et le glutamate 300 (E300) de chez 6JM7 permettent de faire des ponts H avec l'inhibiteur qui ne sont pas présent chez « Chi_ion » car ces acides aminés sont respectivement remplacés par une phénylalanine (F) et une thréonine (T). A l'inverse, il existe un pont H formé grâce à l'asparagine 111 (N111) présent chez « Chi_ion » et n'existant pas chez 6JM7 car il y a une sérine (S) à la place. Une différence importante concerne le groupement pyridine de l'inhibiteur : chez 6JM7, celui-ci fait une interaction π - π avec le tryptophane 365 (W365) tandis que chez « Chi_ion », cette interaction se fait avec le tryptophane 33 (W33). Pourtant, chez les deux chitinases, ces deux tryptophanes sont conservés. Malgré le peu de différence d'interactions qu'il existe entre les deux chitinases, l'inhibiteur se positionne de façon assez différente d'une chitinase à l'autre. Cela confirme à nouveau qu'en modulant un inhibiteur, il est possible de rendre celui-ci sélectif à une chitinase donnée.

V. Conclusions et perspectives

11. Conclusions

L'importante utilisation des pesticides pour soutenir l'agriculture cause des impacts importants comme des dégâts sur la santé humaine et sur l'environnement ou encore l'acquisition de résistances à ces pesticides par les espèces ciblées. Afin de régler ces problèmes, des alternatives sont en cours de recherche pour contrôler les populations d'espèces ravageuses. L'une de dernières est de cibler une fonction biochimique essentielle pour l'insecte.

Dans le cadre de ce mémoire, l'insecte que l'on vise est *Halyomorpha halys*, une espèce invasive et ravageuse de productions de fruits. La cible biochimique étudiée chez cet insecte est la chitinase, une enzyme responsable de la dégradation de la chitine, un biopolymère constituant sa cuticule externe ainsi que la paroi de son intestin moyen. Cette protéine a donc un rôle dans le processus d'ecdysis ou encore dans le remplacement de la paroi de son intestin. En effet, en inhibant la chitinase chez les insectes, on observe une mortalité beaucoup plus élevée qu'en temps normal chez ceux-ci.

L'objectif de ce mémoire était de purifier cette enzyme chez *H. halys* afin de pouvoir la caractériser d'un point de vue structurel et fonctionnel en vue d'en élaborer un inhibiteur sélectif.

Dans un premier temps, un test enzymatique est mis au point afin de suivre l'activité chitinase tout au long du procédé de purification. Ensuite, deux séquences de purification ont été élaborées : i) une première utilisant des chromatographies échangeuses d'ions basées sur la charge de la protéine à un pH donné, et ii) une seconde appliquant une chromatographie d'affinité basée sur la liaison du chitosan à la chitinase. Bien que les stratégies de purification ne soient pas encore optimales, elles ont permis d'identifier, par spectrométrie de masse, deux types de chitinases chez *H. halys*. Ces dernières possèdent toutes deux une masse moléculaire de 48 kDa. Sur base des peptides isolés en masse, la séquence en acides aminés des deux protéines a ainsi pu être mise en évidence.

Dans un second temps, les structures tertiaires des deux chitinases ont été prédites par homologie, à partir de leurs séquences primaires et de leurs homologues présents dans la banque de données PDB. Après validation des structures modélisées, une analyse structurale a permis de mettre en avant des propriétés spécifiques de ces deux chitinases. Ainsi la chitinase provenant de la purification par chromatographie échangeuse d'ions (« Chi_ion ») est une chitinase du groupe IV et est sûrement impliquée dans le remplacement de la paroi de l'intestin moyen d'*H. halys*. « Chi_aff », la chitinase provenant de la purification par chromatographie

d'affinité, serait une chitinase du groupe VII impliquée dans le processus d'ecdisys. Elles partagent par ailleurs toutes les deux les caractéristiques structurales de la famille GH18 des chitinases.

Enfin, une étude de *docking* (simulation des interactions ligand-enzyme) a été réalisée sur « Chi_ion » ainsi que sur son homologue la chitinase du groupe IV d'*O. furnacalis*. Seule la chitinase du groupe IV d'*H. halys* a été étudiée car c'est celle dont le groupe est le mieux connu et c'est aussi celle dont le plus de peptides ont été détectés en spectrométrie de masse. Deux ligands ont été sélectionnés : le chitopentaose, un pentamère du substrat et Mol 1, un inhibiteur prometteur de chitinases d'insectes. Cette analyse a permis d'identifier les acides aminés spécifiques à l'une et l'autre chitinase, qui seraient impliqués dans l'interaction avec le substrat et un inhibiteur. Les résultats nous montrent que, malgré l'appartenance au même groupe de chitinase, les deux enzymes étudiées possèdent des différences importantes dans leurs interactions avec les différents ligands. Cela soutient le fait qu'il est possible de concevoir un inhibiteur plus sélectif à une chitinase particulière en « jouant » sur ces différences.

12. Perspectives

Les perspectives liées à cette étude sont multiples. Dans un premier temps, il serait intéressant de continuer à optimiser la purification des différentes chitinases chez *H. halys*. Il est également envisageable dans un futur proche qu'une étude des paramètres enzymatiques (température et pH optimaux, cinétique de réaction, ...) sur ces protéines soit effectuée afin de pouvoir, par la suite, étudier quantitativement leur inhibition. Une étude de *docking* comprenant plusieurs inhibiteurs connus de chitinases d'insectes, ou de nouvelles molécules identifiées par criblage virtuel, pourrait également être effectuée afin de déterminer quel type de molécules pourrait être plus sélective aux différentes chitinases de la punaise diabolique. Cette sélectivité d'inhibition pourrait être ensuite confirmée dans des conditions *in vitro* sur les chitinases d'*H. halys* et celles d'insectes auxiliaires. Enfin, ces inhibiteurs pourraient être étudiés *in vivo* sur des populations d'insectes afin de comparer la mortalité que provoquent les composés en fonction de l'espèce considérée.

Références

1. Guessan N. *et al.*, Inventaire des insectes ravageurs du verger anacardier dans les régions de Bounkani, Gontougo et Indénie-Djablun au Nord-Est en Côte d'Ivoire, *Afrique SCIENCE*, **13**, 333-343 (2017).
2. Bradshaw C. J. A. *et al.*, Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects, *Nature Communications*, **7**, 1-8 (2016).
3. Branquart E., Les espèces invasives : un nouvel enjeu pour la gestion de l'environnement dans les communes, *Plate-forme belge de la Biodiversité*, 1-10 (2010).
4. Sarigiannis D. A. *et al.*, Inventory of pesticide emissions into the air in Europe, *Atmospheric Environment*, **75**, 6–14 (2013).
5. Pesticides-Généralités, *Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail*, <https://www.cchst.ca/oshanswers/chemicals/pesticides/general.html>, site internet consulté dernièrement le 16 décembre 2022 (dernière mise à jour le 3 avril 2017).
6. Poudel S. *et al.*, Pesticide Use And Its Impacts On Human Health And Environment, *Environment & Ecosystem Science*, **4**, 47–51 (2020).
7. Brévault T. *et al.*, La résistance des insectes aux insecticides : problématique et enjeux en Afrique centrale, *Savanes africaines : des espaces en mutation, des acteurs face à de nouveaux défis : Acte du colloque*, 1-6 (2002).
8. Alaux C. *et al.*, Interaction toxicopathologique entre les microsporidies *Nosema* et l'imidaclopride chez l'abeille (*Apis mellifera*), *Bulletin Technique Apicole*, **36**, 138-143 (2009).
9. Colignon P. *et al.*, Effects of reducing recommended doses of insecticides and fungicides on the non-target insect *Episyrphus balteatus* [Diptera: Syrphidae], *Phytoprotection*, **84**, 141–148 (2003).
10. Gupta S. et Dikshit A. K., Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control, *Journal of Biopesticides*, **3**, 186-188 (2010).
11. Insecticides : définition et alternatives naturelles, *GEO*, <https://www.geo.fr/environnement/insecticides-definition-et-alternatives-naturelles->

- 193809, site internet consulté dernièrement le 16 décembre 2022 (dernière mise à jour le 11 décembre 2018).
12. Gupta R. C. *et al.*, Insecticides, *Biomarkers in Toxicology*, **Second edition**, 455–475 (2019).
 13. Tomizawa M. et Casida J. E., Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors, *Annual Review of Entomology*, **48**, 339-364 (2003).
 14. Genet R., Note d'appui scientifique et technique de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à « la caractérisation du risque non alimentaire pour la santé humaine lié aux VrTH» (2022).
 15. Silva A. X. *et al.*, Insecticide resistance mechanisms in the green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: A transcriptomic survey, *PLoS One*, **7**, (2012).
 16. Bass C. *et al.*, The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **51**, 41–51 (2014).
 17. Djagni K. K. et Fok M., Hazards of insecticide use in cotton cropping in Togo from 1990 to 2010, *Cahiers Agricultures*, **28**, (2019).
 18. van der Werf H. M. G., Assessing the impact of pesticides on the environment, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **60**, 81-96 (1996).
 19. Hoebeke E. R. et Carter, M. E., *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae): A polyphagous plant pest from Asia newly detected in North America, *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, **105**, 225-237 (2003).
 20. Valentin R. E., *et al.*, Global invasion network of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*, *Scientific Reports*, **7**, (2017).
 21. Cianferoni F., *et al.*, Review of the occurrence of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) in Italy, with an update of its European and World distribution, *Biologia*, **73**, 599–607 (2018).
 22. First reports of *Halyomorpha halys* in Belgium, Bulgaria and in Malta and update for other European countries, *European and Mediterranean Plant Protection Organization*

- (EPPO), <https://gd.eppo.int/reporting/article-6547>, site internet consulté dernièrement le 2 juin 2022 (dernière mise à jour en 2019).
23. Anses, Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à «la réalisation d'une analyse de risque phytosanitaire express portant sur *Halyomorpha halys* (la punaise diabolique)» (2014).
 24. Rice K. B. *et al.*, Biology, ecology, and management of brown marmorated stink bug (Hemiptera: Pentatomidae), *Journal of Integrated Pest Management*, **5** (2014).
 25. Musolin D. L. *et al.*, Invasive brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae) in Russia, Abkhazia, and Serbia: history of invasion, range expansion, early stages of establishment, and first records of damage to local crops, *Arthropod Plant Interact*, **12**, 517–529 (2018).
 26. Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, La Punaise diabolique *Halyomorpha halys*, *Sud Arbo* (2021).
 27. Lee D. H. *et al.*, Review of the biology, ecology, and management of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) in China, Japan, and the Republic of Korea, *Environmental Entomology*, **42**, 627–641 (2013).
 28. Streito J. et Chartois M., Les différents stades de développement, *Ephytia*, <http://ephytia.inra.fr/fr/C/20551/Agir-Connaitre-son-cycle>, site internet consulté dernièrement le 16 décembre 2022 (dernière mise à jour le 19 octobre 2022).
 29. Kramer K. J. et Muthukrishnan S, Insect chitinases: Molecular biology and potential use as biopesticides, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **27**, 887–900 (1997).
 30. Hahn, T *et al.* Current state of chitin purification and chitosan production from insects, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **95**, 2775–2795 (2020).
 31. Kumar M. N. V. R., A review of chitin and chitosan applications, *Reactive & Functional Polymers*, **46**, (2000).
 32. Balabanidou V. *et al.*, Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance, *Current Opinion in Insect Science*, **27**, 68–74 (2018).

33. Muthukrishnan S. *et al.*, Q. Chitin organizing and modifying enzymes and proteins involved in remodeling of the insect cuticle, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1142**, 83–114 (2019).
34. Terra W. R., The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **47**, 47–61 (2001).
35. Hegedus D., New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function, *Annual Review of Entomology*, **54**, 285–302 (2009).
36. Hamid R. *et al.*, Chitinases: An update, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, **5**, 21–29 (2013).
37. Elias J. A. *et al.*, Chitinases and chitinase-like proteins in TH2 inflammation and asthma, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **116**, 497–500 (2005).
38. Martinez E. A. *et al.*, Engineering chitinases for the synthesis of chitin oligosaccharides: Catalytic amino acid mutations convert the GH-18 family glycoside hydrolases into transglycosylases, *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic*, **74**, 89–96 (2012).
39. Orlando M. *et al.*, The GH19 Engineering Database: Sequence diversity, substrate scope, and evolution in glycoside hydrolase family 19, *PLoS One*, **16**, (2021).
40. Chen L. *et al.*, Microbial Secondary Metabolite, Phlegmacin B1, as a Novel Inhibitor of Insect Chitinolytic Enzymes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65**, 3851–3857 (2017).
41. Wendeler M. et Sandhoff K., Hexosaminidase assays, *Glycoconjugate Journal*, **26**, 945–952 (2009).
42. van Aalten D. M. F. *et al.*, Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 8979–8994 (2001).
43. Brault G., Caractérisation d’une nouvelle activité glycosidique de l’acétyl-xylane estérase A de *Streptomyces lividans*, *Mémoire présenté pour l’obtention du grade de Maitre des sciences en microbiologie appliquée* (2009).
44. Arakane Y. et Muthukrishnan S., Insect chitinase and chitinase-like proteins, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**, 201–2016 (2010).

45. Chen W. et Yang Q., Development of Novel Pesticides Targeting Insect Chitinases: A Minireview and Perspective, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **68**, 4559–4565 (2020).
46. Veliz E. A. *et al.*, Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol, *AIMS Microbiology*, **3**, 689–705 (2017).
47. Tamadoni Jahromi S. et Barzkar N., Marine bacterial chitinase as sources of energy, eco-friendly agent, and industrial biocatalyst, *International Journal of Biological Macromolecules*, **120**, 2147–2154 (2018).
48. Rathore A. S. et Gupta R. D., Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives, *Enzyme Research*, **2015**, 1-8 (2015).
49. Rodriguez-kabana R. *et al.*, The determination of soil chitinase activity: Conditions for assay and ecological studies, *Plant and Soil*, **75**, 95-106 (1983).
50. Herrera-Estrella A. et Chet I., Chitinases in biological control, *EXS*, **87**, (1999).
51. Duo-Chuan L., Review of fungal chitinases, *Mycopathologia*, **161**, 345–360 (2006).
52. Liu T. *et al.*, Structural and biochemical insights into an insect gut-specific chitinase with antifungal activity, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **119**, 1-7 (2020).
53. Saoudi R. *et al.*, Les applications technologiques des chitinases microbiennes, *Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maitre des sciences en microbiologie appliquée*, (2009).
54. Francis F. *et al.*, Purification and characterisation of a 31-kDa chitinase from the *Myzus Persicae* aphid: A target for hemiptera biocontrol, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **166**, 1291–1300 (2012).
55. Tetreau, G. *et al.* Overview of chitin metabolism enzymes in *Manduca sexta*: Identification, domain organization, phylogenetic analysis and gene expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **62**, 114–126 (2015).
56. Chen L. *et al.*, Fully deacetylated chitooligosaccharides act as efficient glycoside hydrolase family 18 chitinase inhibitors, *Journal of Biological Chemistry*, **289**, 17932–19740 (2014).

57. Iverson J. M. *et al.*, Cannibalistic oophagy in *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) laboratory colonies, *Journal of Entomological Science*, **51**, 122–128 (2016).
58. Waterhouse A. *et al.*, SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Research*, **46**, 296–303 (2018).
59. Alliot J.-M. et Durand N., Algorithmes génétiques (2005).
60. What is the difference between the GoldScore, ChemScore, ASP and ChemPLP scoring functions provided with GOLD?, *CCDC*, site internet consulté dernièrement le 16 décembre 2022.
61. Asif T. *et al.*, Bioconversion of Colloidal Chitin Using Novel Chitinase from *Glutamicibacter uratoxydans* Exhibiting Anti-fungal Potential by Hydrolyzing Chitin Within Fungal Cell Wall, *Waste Biomass Valorization*, **11**, 4129–4143 (2020).
62. Ferreri N. A. *et al.*, Mycobiota on exoskeleton debris of *Neohelice granulata* in an alkaline-sodic salt marsh: *in vitro* enzyme ability at different temperatures and pH, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **93**, (2021).
63. Măntele W et Deniz E., UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **173**, 965–968 (2017).
64. Neyman V. *et al.*, Purification and Characterization of Trehalase From *Acyrtosiphon pisum*, a Target for Pest Control, *Protein Journal*, **41**, 189–200 (2022).
65. Teotia S. *et al.*, Chitosan as a macroaffinity ligand: Purification of chitinases by affinity precipitation and aqueous two-phase extractions, *Journal of Chromatography A*, **1052**, 85–91 (2004).
66. Liu T. *et al.*, Expression, purification and characterization of the chitinolytic β -N-acetyl-d-hexosaminidase from the insect *Ostrinia furnacalis*, *Protein Expression and Purification*, **68**, 99–103 (2009).
67. Sogias I. A. *et al.*, Exploring the factors affecting the solubility of chitosan in water, *Macromolecul ar Chemistry Physics*, **211**, 426–433 (2010).

68. Chen W. *et al.*, Structural analysis of group II chitinase (ChtII) catalysis completes the puzzle of chitin hydrolysis in insects, *Journal of Biological Chemistry*, **293**, 2652–2660 (2018).
69. Zees A. C. *et al.*, Insights into the role of the ($\alpha + \beta$) insertion in the TIM-barrel catalytic domain, regarding the stability and the enzymatic activity of Chitinase A from *Serratia marcescens*, *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, **1794**, 23–31 (2009).
70. Zhu Q. *et al.*, Domain organization and phylogenetic analysis of the chitinase-like family of proteins in three species of insects, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **38**, 452–466 (2008).
71. Li H. et Greene L. H., Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding, *PLoS One*, **5**, (2010).
72. Ikegami T. *et al.*, Solution Structure of the Chitin-binding Domain of *Bacillus circulans* WL-12 Chitinase A1*, *The Journal of Biochemical Chemistry* (2000).
73. Akagi K. I. *et al.*, Identification of the substrate interaction region of the chitin-binding domain of *Streptomyces griseus* chitinase C, *The Journal of Biochemistry*, **139**, 483–493 (2006).
74. Jiao Z. *et al.*, Identification and function analysis of chitinase 2 gene in housefly, *Musca domestica*, *Comparative Biochemistry and Physiology B*, **259**, (2022).
75. Tsuzuki S., CH/ π interactions, *Annual Reports on the Progress of Chemistry C*, **108**, 69–95 (2012).

Annexes

« Chi_ion »

MSWICFLASLVVLVSAAPKNNRGRVVVVCYVGTWAAAYRPMRGQFSVEDLRPDLCTHIVYSFAGLNATSWTIKS
1
LDPHLDLEENYGKGWYKKVTGLKKEYPDLKVTLAIGGWNEGSGNYSALAADPEKRRPFIASVLRFLKDYDF
DGLDLDFEFTQRGGAPEDKENFIIKELRSALTVGGYILTAASIDTLASGYDLPRVSDNLDLVHMMAYD
YHGSWEKFTAPNAPLFPSPDKLTLASLEYVLRNGIKAEKLVGVPMYGRFTVLESPSRGVLGETSLTTQGFQ
GPFTRTDGFLGYHEICNELRTGNWTVHWDNTSLTPFATTGNRLITYDNPESIMHKVKYAMGQGVAGIMTWSV
DTDDFRGDCALPGQTSRDPDLLQAIMIAIEESLYKKPTTPPKQPEKPEPSSAVQHCLYPSLYIVLALISYIFY
436

« Chi_aff »

MCDWPENAKCGSNEIPEENNENEQEMVLPPSLQETTSTTTAVSIEKPADTGEFKVVCYFTNWAWYRQGK GK
1
YLPEDIDTSLCTHVIYAFVLDSEKLEIKPHDPWADIDNSFFTKVSSLVEKGIKVLLGLGGWNSLGDKYSRLVN
NPAARRNFVRQAVEFVDKYNFQGLDLDFEYPCWQVDCNKGPASDKEGFAALVTELSEEFTRRGWLLSAAV
SPSKTVINEAYDVPVLARYLDWIALMAYDYHGQWEGKTGHVAPLYYNEGDEFPHFNGNFSVNYWLDEGVPR
KKLVLGMPYQSFTRLRNSDELQAPISGPGMAGQFTRAAGFLAYYEICDTVSGGNWVVKRHETGAIGPIAY
KGNQWISYDDVADIRRKSYVKEHGLGGGMVWALDLDDFRNICGCGKNPLLSTINQELRGHSGNTNNCT
432

Annexe 1 – Séquences des chitinases « Chi_ion » et « Chi_aff ».