

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ECOLE NATIONALE POLYTEHNIQUE D'ALGER



DEPARTEMENT DE GENIE DE L'ENVIRONNEMENT
Laboratoire de Biotechnologies environnementales et Génie des procédés (BIOGEP)

THESE

Présentée

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

OPTION : BIOTECHNOLOGIE ET ENVIRONNEMENT

Par

LARIBI HASSIBA née HABCHI

Thème

Purification et caractérisation des chitines extraites de la biomasse marine et son application comme bio insecticide à l'égard de la bruche de pois chiche : *Callosobruchus maculatus* (F)

Soutenance a eu lieu le 09/06/2013 à 09h30

Président :	Pr BENYOUCEF	Professeur (ENP)
Rapporteur :	Pr N. MAMERI	Professeur (ENP)
CO-Rapporteur:	Pr M. BICHE	Professeur (ENSA)
Examinatrice :	Pr N. ABDI	Professeur (ENP)
Examinatrice :	Pr L. ADOUR	Professeur (UMMT)
Examineur :	Pr PAUSE	Professeur (UTC)
Examineur :	Pr M. BELLAL	Professeur (ENSA)
Invitée :	Dr S. CHAIB	Docteur (HCA)

Année 2012-2013

خلاصة

الهدف من هذه الدراسة هو استخلاص ، تصفية و تمييز الكيتيناز (*Chitinase*) من اجل استعماله في عملية تحليل مادة الماء هذه المادة التي هي عبارة عن قرنية تشكل جزءا من الجسم الخارجي للحشرات و القشريات .

إنتاج الكيتيناز الخام يكون انطلاقا من زوائد السمك (عقارب البحر) مثل العقرب الأحمر *scorpaena scrofa* . كما ان استعماله يكون في شروط عملية محكمة . تم ترسيب المستخلص الإنزيمي بترسيب سالفات الألمنيوم (10 % 85) ثم إجراء عملية الاثطار عن طريق التحليل الكروموتغرافي لأجزاء المركب و ذلك بالاستبعاد الجزيني (الزري) و مبدل الايونات .

هذه التقنيات الخاصة بالتصفية حتى التجانس سمحت ببلوغ نشاط ذري بحوالي ملغ/ 51U 6, بعامل تصفية يقدر بـ 162, 75 . عملية التحليل عن طريق عملية الاستشراد أي بتهجير الشوارد (الجزينات) باستعمل حقل مكهرب على هلام Polacrylamide و إخضاع الكتلة الى المنظار الطيفي (MALDI TOF/MS) بينت مايلي :

- إن مادة الكيتيناز هي بسيطة الجزينات بكتلة جزينية تقدر بـ 50,103 كيلو دالتون

- الس-25رواسب N-الطرفية من الإنزيم بينت تجانس مع العائلة 18 للكيتينازيات .

- المعيار المناسب لدرجة الحرارة و درجة الحموضة للكيتيناز المصفى هي على الترتيب 80°C و pH5 .

-الإنزيم يبقى مستقر على سلم درجة الحموضة من 3 حتى 7 في فترة احتضان تقدر بـ 4 ساعات.

-الإنزيم مستقر في سلم درجات الحرارة من 70°C إلى 90°C خلال 48 ساعة من الاحتضان ، بعد ذلك يفقد تقريبا كل نشاطه في درجة حرارة 100°C .

-نشاط الكيتيناز اقوي بواسطة COSO_4 و موقف كليا بواسطة Hg^{2+} و Hg^+ .

حسب النتائج المتوصل اليها نلاحظ أن :

- هذا الإنزيم يخضع إلى حركية ميكائيليس و القيم Km و Kcat و 0,412 ملغ و 5,335 ثان⁻¹ .

- في الجسم الحي ، اجري فحص بيولوجي لمبيد الحشرات لهذا الإنزيم على حشرة بالغة و يرقة *callosobruchus maculatus* المضررة بالمواد الغذائية المخزنة حيث بين الإنزيم بوضوح نشاط مضاد للحشرات تجاه هذه الحشرة مما يدل على إمكانية استعماله في الاستراتيجيات البيوتكنولوجية من اجل التحكم في اليرقات المضررة .

الكلمات الأساسية : كيتيناز - *Scorpaena scrofa* - نشاط بيولوجي مضاد للحشرات - حشرة مضررة .

Résumé

L'objectif visé dans cette étude est l'extraction, la purification et la caractérisation de la chitinase en vue de son utilisation pour hydrolyser la matière chitineuse. La production d'une chitinase brute à partir des abats de poissons : Rascasse rouge *Scorpaena scrofa* ainsi que son utilisation dans des conditions opératoires ont été atteintes. L'extrait enzymatique a été purifié par précipitation au sulfate d'ammonium (10%-85%) suivi d'un fractionnement par chromatographie d'exclusion moléculaire et échangeuse anionique. Ces techniques de purification jusqu'à l'homogénéité ont permis d'atteindre une activité spécifique d'environ 6.51U/mg avec un facteur de purification de 162.75. L'analyse par électrophorèse SDS-PAGE sur gel polacrylamide et spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS) a montré que cette chitinase est un monomère avec une masse moléculaire de 50.103 KDa. Les 25 résidus N-terminaux de l'enzyme montrent une homologie avec la famille 18 des chitinases. Les paramètres optimums de température et de pH de la chitinase purifiée sont respectivement de 80°C et pH 5. L'enzyme reste stable sur une gamme de pH allant de 3 à 7 pour un temps d'incubation de 4heures. L'enzyme est stable dans une gamme de température allant de 70 à 90°C pendant 48heures d'incubation. Au-delà, elle perd presque toute son activité à 100°C . L'activité de la chitinase est stimulée par COSO_4 et complètement inhibée par Hg^{2+} et Hg^+ . D'après nos résultats, nous constatons que notre enzyme obéit à une cinétique Michaelienne et les valeurs de Km et Kcat étaient de 0.412 mg et 5.33 S^{-1} . In vivo, le test de bio insecticide de cette enzyme a été effectué contre l'insecte adulte et larve *Callosobruchus maculatus* ravageur des denrées stockées. L'enzyme a montré significativement une activité insecticide à l'égard de cet insecte, indiquant la possibilité de l'utiliser dans les stratégies biotechnologiques pour la gestion de ces ravageurs.

Mots Clés : Chitinase, *Scorpaena scrofa*, bioinsecticide activité, insecte ravageur

Abstract

The goal of this study is the extraction, purification and characterization of chitinase for its use for hydrolysis of chitinase. The production of crude chitinase from wastes of fishes: Red scorpion *Scorpaena scrofa* and its use in operating conditions have been reached. The enzyme extract was purified by precipitation with ammonium sulfate (10% - 85%) followed by fractionation par molecular exclusion and anionic exchange chromatography. These purification techniques have achieved a specific activity of about 6.51 U/mg, with a purification factor of 162.75. Electrophoresis SDS-PAGE and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight/mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) analysis showed that our enzyme was monomer with a molecular mass of 50.103 KDa. The 25 N-terminal residues of chitinase displayed high homology with family- 18 chitinases. Optimal activity was obtained at 5 at 80°C , it was stable at pH and temperature range of 3 to 7 and 70 to 90°C , beyond this, it loses the totality at 100°C . The activity of chitinase is stimulated by COSO_4 and strongly inhibited by Hg^{2+} and Hg^+ . Our results show that chitinase obeyed Michaelis-Menten kinetics, the Km and Kcat values being 0.412mg, colloidal chitin ml^{-1} and 5.33S^{-1} respectively. An in vivo bioinsecticidal activity toward *Callosobruchus maculatus* adults and larvae. The enzyme showed bioinsecticidal activity toward this insect, indicating the possibility of using it in biotechnological strategies for insect management for stored compea seeds.

Key words: Chitinase, *Scorpaena scrofa*, bioinsecticide activity, insect pest.

DEDJECES

A la mémoire de mon père et de mon beau père

Mon cœur ne cesse de remercier Dieu,

Pour m'avoir guidé vers la voie de la science.

***Pour m'avoir donné un mari gentil et très Compréhensif et un
fils adorable qui m'ont accompagnée durant cette dure épreuve.***

Pour m'avoir donné des parents aussi formidables.

***Pour m'avoir bien entouré de sœur, frères,
Belles-sœurs et beaux-frères agréables***

D'avoir mis sur mon chemin des amis (es) sincères.

Pour m'avoir prodigué la force d'aimer et d'être aimée.

Je dédie ce travail à toute ma famille et tous ceux que j'aime.

Hassiba

Remerciements

Si la réalisation et l'achèvement de ce travail ont vu le jour, c'est grâce à Dieu et au concours d'un grand nombre de personnes qu'elles trouvent ici l'expression de mes sincères gratitudee.

Je tiens à remercier tout particulièrement

Monsieur, le Professeur MAMERI Nabil, qui m'a fait l'immense honneur en me proposant cet intéressant sujet. Je tiens à le remercier pour la confiance qu'il m'a accordée. Je le remercier pour ses orientations, sa rigueur scientifique, son esprit d'équipe, qu'il trouve ici, l'expression de mon profond respect et ma vive reconnaissance.

Monsieur, BICHE Mohamed, Professeur à l'institut Supérieur National d'Agronomie, co-directeur de la thèse pour avoir dirigé et corrigé la partie entomologique, pour sa patience lors de mes visites « juste pour une petite question », j'ai pu apprécier durant ces années son esprit critique, nos discussions m'ont permis de développer mon sens critique et ma capacité d'analyse, je vous remercie d'avoir cru en moi.

Madame LARABA Fatima, Professeur et responsable du laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Biologiques (USTHB), qui m'a encouragé et soutenu durant mon séjour dans son laboratoire, je suis reconnaissante pour son accueil chaleureux. Je la remercie sincèrement pour la partie purification réalisée dans cette thèse. Veuillez accepter Madame l'expression de mon profond respect.

Madame KAMEL Assia et Docteur CHERIFI Fateh qui m'ont fait bénéficier de la complémentarité de leurs compétences, mais surtout ils ont su me transmettre toute leur rigueur scientifique.

Madame CHAIB Samia, chef de service du laboratoire d'immunologie à l'Hôpital Central de l'Armée d'Ain Naadja pour m'avoir permise d'utiliser le matériel adéquat et nécessaire pour mes différentes manipulations ainsi que son accueil chaleureux et sa gentillesse lors de mes différents déplacements

Melle MOUHOUB Samia du même laboratoire pour son accueil et sa gentillesse lors des discussions concernant les manipulations d'une partie de purification de ce travail. Qu'elles trouvent ici toutes les deux l'expression de ma vive reconnaissance.

Docteur KACIMI, chef de service du laboratoire de l'ANAPAT de l'Hopital Central de l'Armée de Ain Naadja, pour son accueil très chaleureux et sa disponibilité, je le remercie pour toute la partie histologique réalisée dans cette thèse. Veuillez trouver Monsieur ici l'expression de mon profond respect.

Madame DJABRI Lydia, Professeur à l'université de Mouloud Maameri de Tizi ouzou, pour son encouragement et surtout pour la partie du Microscope électronique à balayage (MEB), qu'elle trouve ici mes sincères reconnaissances.

Monsieur TAIBI, Professeur responsable du laboratoire de microscope électronique à balayage de la Faculté d'électronique (USTHB) pour les micrographies du MEB utilisées dans ce travail, qu'il trouve ici mes vives reconnaissances.

Madame ZEROUALI Fatiha, Professeur à l'université des Sciences Technologique Houari Boumediene (USTHB), pour ses différents orientations et encouragements lors des différentes discussions.

Madame KHALFI Ouassila, Maitre de conférences à l'Institut Supérieur National d'Agronomie d'Alger pour le don de la souche de l'insecte (bruche de pois chiche).

J'adresse mes plus chaleureux remerciements à Mesdames ABDI Nadia, ADOUR Lydia et CHAIB Samia, à Messieurs BENYOUCEF El hadi , BELLAL Mohand mouloud, PAUSS Frederic Pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur GRIB Hocine, le Directeur de laboratoire de BIOGEP et toute l'équipe pour leur encouragements

Mes remerciements s'adressent à mes amies principalement Mme ARBIA Wassila, DEMIM Soraya, ALOUACHE Souhila, BOUDJEMAA Nouara, MOUZAR Lila et BOUHEZILA Farouk et BAAZIZ Bahia, pour leurs conseils mais également pour leur qualité de vie sociale.

Mes remerciements s'adressent également au service de Toxicologie du Groupe SAIDAL d'Alger

Mes remerciements ne sauraient être complets, une mention particulière s'adresse à mon mari Khaled, trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance pour son soutien sans plafond et pour ses encouragements sur le chemin de performance, merci !

Pour terminer, mes remerciements s'adressent à mes parents pour m'avoir soutenu et encouragé tout au long de mes études, qui ont su partager avec moi mes peines et mes moments de joie qui jalonnent invariablement le long parcours d'une thèse !

Liste des figures

Figure 1 : Chaîne linéaire de la chitine.....	6.
Figure 2 : Différentes structure de la chitine de l'insecte.....	7
Figure 3 : Représentation des sites d'action des endochitinases et des exochitinases.....	9
Figure 4 : Structure de l'allosamidine.....	16
Figure 5 : La nymphe de <i>Callosobruchus . maculatus</i>	18
Figure 6 : Adulte de <i>C. maculatus</i>	19
Figure 7 : Male et femelle de <i>C.maculatus</i>	19
Figure 8 : Cycle biologique de <i>C. maculatus</i>	21
Figure 9 : Structure de la cuticule.....	22
Figure 10 : Appareil digestif de <i>C. maculatus</i>	24
Figure 1 1 : Coupe transversale et longitudinale du tube digestif de l'insecte.....	26
Figure 12 : Dégâts causés par <i>C.s maculatus</i> sur grains de pois chiche.....	27
Figure 13 : Principe de la chromatographie d'exclusion des protéines.....	37
Figure 14 : Principe de la purification par chromatographie échangeuse d'ions.....	38
Figure 15 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse.....	43
Figure 1 6 : Dégradation chimique d'EDMAN automatisée sur micro séquenceur des Protéines.....	47
Figure 1 7 : Profil chromatographique sur gel filtration Sephadex G-75.....	59
Figure 1 8 : Profil chromatographique sur Mono Q-Sepharose	60
Figure 19 : courbe d'étalonnage sur gel filtration	62
Figure 20 : Profils électro phorétiques SDS-PAGE et Zymogramme.....	62
Figure 21 : Spectre de MALDI-TOF/MS.....	64
Figure 22 : Effet du pH sur l'activité chitinasique.....	72
Figure 23 : Activité chitinasique résiduelle en fonction du pH	71
Figure 24 : Effet de la température sur l'activité chitinasique.....	72
Figure 25 : La thermo stabilité de la chitinase purifiée en fonction du temps.....	73

Figure 26 : Activité résiduelle au cours de la conservation à 4°C.....	75
Figure 27 : Activité chitinasique résiduelle au cours de la conservation à -20°C.....	76
Figure 28 : Représentations graphiques de Michaelis-Menten V en fonction de $[S]$ et de Lineweaver-Burk ou doubles inverses : $1/V$ en fonction de $1/[S]$ des chitinases SsChi50 sur substrat naturel.....	80
Figure 29 : Représentations graphiques de Michaelis-Menten V en fonction de $[S]$ et de Lineweaver-Burk ou doubles inverses : $1/V$ en fonction de $1/[S]$ des chitinases SsChi50 sur substrat synthétique.....	81
Figure 30 : Comportement de <i>C. maculatus</i> après intoxication par les doses létales Des chitinases brutes (24%) et purifiées (3%) après 1 heure de traitement	84
Figure 31 : Effet des chitinases brutes par contact sur <i>C. maculatus</i>	85
Figure 32 : Effet des chitinases purifiées SsChi50 par contact sur <i>C. maculatus</i>	85
Figure 33 : Régression mortalité dose par effet contact des chitinases brutes sur <i>C</i> <i>maculatus</i>	86
Figure 34 : Régression mortalité dose par effet de contact des chitinases purifiées	87
SsChit50 sur l'insecte <i>C. maculatus</i>	
Figure 35 : Test de contact des graines traitées : comparaison des taux de mortalité de l'insecte <i>C. maculatus</i> en fonction des différentes doses des chitinases brutes.....	88
Figure 36 : Observation au microscope électronique à balayage d'un élytre de <i>C. maculatus</i> traité En absence de graines par contact avec des chitinases ,brutes X250.....	90
Figure 37 : Observation au microscope électronique à balayage (MEB) d'un élytre de <i>C. maculatus</i> traité en absence de graines par contact avec la dose létale (3%) des chitinases purifiées Grossissement : X250.....	90.
Figure 38 : Observation au microscope électronique à balayage d'un élytre de <i>C. maculatus</i> traité En présence de graines par contact avec des chitinases ,brutes X200.....	91
Figure 39 : : Observation au microscope électronique à balayage d'un élytre de <i>C. maculatus</i> traité En présence de graines par contact avec des chitinases ,brutes X230.....	91
Figure 40 : Observation au microscope électronique à balayage (MEB) d'un élytre de <i>C. maculatus</i> non traité (témoin) Grossissement : X250.....	92

Figure 41 : Taux de réduction de la ponte en fonction des doses après 24 et 48h de Traitement.....	93
Figure 42 : Effet de l'extrait brut sur la fécondité et la fertilité de <i>C.</i> <i>maculatu</i> femelle traité.....	94
Figure 43 : Influence de l'extrait brut sur la fécondité et la fertilité de <i>C.maculatus</i> (mâle traité).....	97
Figure 44 : Influence de l'extrait brut sur la fécondité et la fertilité de <i>C.maculatus</i> (couple traité).....	100
Figure 45 : Photo montrant l'appareil génital femelle traitée.....	103
Figure 46 : Taux de mortalité des larves traitées en fonction des chitinases brutes.....	105
Figure 47 : Taux de mortalité des larves traitées en fonction des chitinases purifiées...	106
Figure 48 : Photos (a) et (b) montrant la sortie des larves des graines traitées	107
Figure 49 : Coupes histologiques transversales au niveau de l'intestin antérieur.....	108
Figure 50 Coupes histologiques transversales au niveau l'intestin moyen (mésenteron	108
Figure 51 : Analyse en Composantes Principales (ACP).....	110

Liste des principales abréviations

BSA	: Bovine Serum Albumin ou Albumine serum Bovine C°
Da	: Dalton (Da, KDa)
C°	: Degré Celsius
DEP	: Diethylpyrocabonate
DMAB	: P- diméthylaminobenzaldéhyde
DNS	: Acide dinitrosalicylique reactif
DO	: Densité Optique
DTT	: Dithiothreitol
EC	: « Enzyme Comission »
EDC	: 1-ethyl-3- (3- diméthylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	: Acide éthylène- diamine- tétra-acétique
EGTA	: Acide éthylène glycol- bis- (β - amino ethy éther)- N, N, N,N tetra-acide
FAO	: Food and Agriculture Organization
FP	: Facteur de Purification
HEPES	: Acide 4 (2- hydroxyethyl)- 1 piperazineethane sulfonique
Km	: Constante de Michaelis
Maldi-Tof / MS	: Matrix assisted laser desorption ionization- time of flight / mass
MS	: Mass Spectrometry
2ME	: 2- mercaptoethanol
MES	: Acide 2- (N- morphino) Ethane Sulfonique
NAG	: N-Acétyle-Glucosamine
NAI	: N- acetylimidazole
NBS	: N- bromosuccinimide
NEM	: N- ethylmalimide
PAGE	: Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide
P- CMB	: P- chloromercuri benzoique
PM	: Poids Moléculaire
PMSF	: Phényle méthyl sulfonyl fluorure ou « Phenyl methyl sulfonyl fluoride »
P-NP	: P- nitrophenyl
Qsq	: Quantité suffisante pour
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
TN	: Acide 2, 4,6- trinitrobenzène
UI	: Unité enzymatique Internationale
V	: Vitesse
Vmax	: Vitesse maximale
V ₀	: Volume mort
V _e	: Volume d'élution

Liste des tableaux

Tableau 1 : Arrangement des chaînes dans les trois formes de chitine.....	7
Tableau 2 : Classification des chitinases.....	10
Tableau 3 : Solution tampons avec le pH correspondant.....	45
Tableau 4 : Concentration et nature du substrat.....	48
Tableau 5 : Etude comparative du poids moléculaire des chitinases.....	65
Tableau 6 : Etapes de purification de la SsChi50.....	66
Tableau 7 : Effet des ions métalliques sur l'activité de la chitinase.....	67
Tableau 8 : Effet des inhibiteurs sur l'activité de la chitinase.....	69
Tableau 9 : Séquencage de l'extrémité NH ₂ – terminale de la chitinase purifiée.....	77
Tableau 10 : Spécificité du substrat de la chitinase purifiée SsChi50.....	79
Tableau 11 : Paramètres cinétiques de la chitinase purifiée SsChi50.....	82
Tableau 12 : Analyse de variance sur l'efficacité de l'extrait brut chitinasique sur la fécondité et la fertilité des femelles traitées de <i>C.maculatus</i> pendant 24h.....	95
Tableau 13 : Analyse de variance sur l'efficacité de l'extrait brut chitinasique sur la fécondité et la fertilité des femelles traitées de <i>C.maculatus</i> pendant 48h.....	96
Tableau 14 : Analyse de variance sur l'efficacité de l'extrait brut chitinasique sur la fécondité et la fertilité du mâle traité de <i>C.maculatus</i> pendant 24h.....	98
Tableau 15 : Analyse de variance sur l'efficacité de l'extrait brut chitinasique sur la fécondité la fertilité des femelles traitées de <i>C.maculatus</i> pendant 48h.....	100
Tableau 16 : Analyse de variance sur l'efficacité de l'extrait brut chitinasique sur la fécondité et la fertilité du couple traité de <i>C.maculatus</i> pendant 24h.....	100
Tableau 17 : Analyse de variance sur l'efficacité de l'extrait brut chitinasique sur la fécondité et la fertilité du couple traité de <i>C.maculatus</i> pendant 48h.....	101
Tableau 18 : Quantité d'aliment ingérée par les larves de <i>C. maculatus</i> traité par les chitinases brutes.....	104
Tableau 19 : Quantité d'aliment ingérée par les larves de <i>C. maculatus</i> traité par les chitinases brutes.....	104

Sommaire

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Résumés	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1
1. Chitinase	5
1.1 Historique	5
1.2 Structure de la chitinase.....	5
1.3 Application des produits de dégradation de la chitine.....	7
2. Chitinases	8
2.1 Historique	8
2.2 Définition et différents types de chitinases	8
2.2.1 Les endochitinases	8
2.2.2 Les exochitinases	9
2.3 Classification des chitinases.....	9
2.4 Fonction et rôle des chitinases	10
2.5 Application des chitinases.....	11
2.6 Différentes origines des chitinases	12
2.6.1 Chitinases bactériennes	11
2.6.2 Chitinases fongiques	13
2.6.3 Chitinases parasitaires.....	13
2.6.4 Chitinases végétales	14
2.6.5 Chitinases animales.....	14
2.7 Inhibiteurs des chitinases.....	15
2.7.1 Allosamidine	15
3. Insectes.....	16
3.1 Caractères généraux de la bruche de pois chiche : <i>Callosobruchus maculatus</i>	16
3.2 La position systématique <i>Callosobruchus maculatus</i> (d'après Balaschowsky, 1962).....	17
3.3 Description de la bruche de pois chiche <i>Callosobruchus maculatus</i>	17
3.3.1 Les œufs.....	17
3.3.2 Les larves	17
3.3.3 Les nymphes.....	18
3.3.4 Les adultes	18
3.3.5 Distinction des sexes.....	19
3.3.6 Développement larvaire de <i>Callosobruchus maculatus</i>	20
3.4 Cuticule des insectes	22
3.5 Description anatomique du tube digestif de <i>C. maculatus</i>	22
3.5.1 Le stomodeum (Intestin antérieur)	23

2.1.2.2	Electrophorèse.....	40
a)	SDS-PAGE.....	40
b)	Zymogramme	41
2.1.2.3	MALDI-TOF/MS.....	41
2.2	Caractérisation de l'enzyme pure	44
2.2.1	Caractérisation physico-chimiques	44
2.2.1.1	Effet des inhibiteurs ioniques	44
2.2.1.2	Effet des agents chimiques.....	44
2.2.1.3	Effet de pH	44
2.2.1.4	Effet de la température	45
2.2.1.5	La thermo-stabilité	45
2.2.1.6	Effet de la conservation sur la stabilité	46
2.2.2	Caractérisation biochimique	46
2.2.2.1	Séquençage de l'extrémité N-terminal de l'enzyme.....	46
2.2.2.2	Spécificité du substrat.....	48
2.2.2.3	Cinétique enzymatique	49
2.3	Méthodes analytiques	49
2.3.1	Dosage des protéines.....	49
2.3.2	Test d'activité chitinasique.....	50
2.3.3	Dosage des acétylhexosamines	51
2.3.4	Dosage des sucres réducteurs par DNS	51
2.4	Etude de l'effet des chitinasés sur la bruche de pois chiche	52
2.4.1	Evaluation de la toxicité par effet contact.	52
2.4.1.1	Effet par contact en absence de graines	52
a)	Effet sur la cuticule	52
b)	Effet par contact sur l'appareil reproducteur	53
2.4.1.2	Effet par contact en présence de graines	54
2.4.2	Evaluation de la toxicité par ingestion.....	54
2.5	Microscopie électronique à balayage (MEB)	55
2.6	Etude histologique.....	55
2.6.1	Déshydratation et éclaircissement.....	56
2.6.2	Imprégnation et enrobage dans la paraffine	56
2.6.3	Coloration.....	56
2.6.4	Montage des lames.....	56
2.7	Toxicité anormale (test d'innocuité) par voie orale	56
3.	Analyse statistique	57

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Purification et identification de la chitinase	58
1.1 Purification de la chitinase.....	58
1.1.1 Précipitation de l'extrait enzymatique au sulfate d'ammonium ..	58
1.1.2 Gel filtration	59
1.1.3 Echangeuse anionique.....	60
1.2 Identification de la chitinase.....	61
1.2.1 Détermination du poids moléculaire	61
1.2.1.1 Gel filtration.....	61
1.2.1.2 Electrophorèse	62
1.2.1.3 MALDI-TOF/MS.....	63
1.3 Caractérisation de l'enzyme ScChi50	66
1.3.1 Caractérisation physico-chimique	66
1.3.1.1 Effet des ions métalliques	66
1.3.1.2 Effet des inhibiteurs protéiques	67
1.3.1.3 Effet du pH	69
1.3.1.4 Effet de la température	71
1.3.1.5 Thermo-stabilité de l'enzyme ScChi50.....	72
1.3.1.6 Effet de conservation sur la stabilité de l'enzyme ScChi5073	
1.3.2 Caractérisation biochimique	75
1.3.2.1 Séquençage de l'extrémité NH ₂ -terminale de ScChi50.....	75
1.3.2.2 Spécificité du substrat.....	76
1.3.2.3 Cinétiques de la SsChi50	77
2. Effet de la chitinase brute et Purifiée ScChi50 sur l'insecte :la bruche de pois chiche : <i>Callosobruchus maculatus</i>	81
2.1 Evaluation de la toxicité par effet contact	81
2.1.1 Effet de la toxicité sur les élytres en absence de graines	81
2.1.2 Effet de la toxicité sur les élytres en présence de graines	86
2.1.3 Observation des effets de toxicité des chitinase sur les élytres de <i>C. maculatus</i> en microscopie électronique à balayage (MEB).....	86
2.1.4 Effet de la toxicité sur l'appareil reproducteur.....	89
2.1.4.1 Cas du couple : femelles traitées / mâles non traités	90
2.4.1.2 Cas du couple femelles non traitées / mâles traités	92
2.4.1.3 Cas du couple femelles traitées / mâles traités.....	95
2.2 Evaluation de la toxicité par ingestion	100
2.2.1 Effet de la toxicité sur l'alimentation des larves	103
2.2.2 Effet sur l'appareil digestif.....	104
3. Toxicité anormale par voie orale.....	104
4. Etude Statistique	105
Conclusion générale.....	106
Référence bibliographiques	
Annexes	

La biotechnologie industrielle est l'ensemble de technologies qui adaptent et modifient des organismes, des processus, des produits et des systèmes biologiques que l'on retrouve dans la nature afin de produire des marchandises et des services. La biotechnologie a évolué au cours de ces dernières années et offre un ensemble d'outils puissant pour développer et optimiser l'efficacité des procédés biotechnologiques et les caractéristiques spécifiques des produits dérivés de la biotechnologie. Cette augmentation de l'efficacité et de la sélectivité offre des possibilités immenses pour une industrie durable. Une augmentation de l'efficacité permettra un plus grand usage des ressources renouvelables sans conduire à leur disparition, à la dégradation de l'environnement et à l'impact négatif sur la qualité de la vie.

Les biocatalyseurs demeurent les outils clés de la biotechnologie. Parmi ceux-ci, les enzymes, qui sont des protéines extraites à partir des animaux. Elles peuvent être utilisées pour catalyser biologiquement des réactions chimiques avec beaucoup d'efficacité et de spécificité. Ainsi, par rapport aux procédés chimiques conventionnels, les procédés biotechnologiques consomment moins d'énergie, produisent moins de perte et sont moins polluants puisqu'ils utilisent moins de solvants organiques. Leur propriété de « turnover », c'est-à-dire la capacité pour une même molécule enzymatique de catalyser un nombre considérable de fois la même réaction a fait des enzymes un outil de choix dans le secteur des biotechnologies.

Les biomasses marines et leur diversité constituent un ensemble de ressources exploitables et valorisables, utiles pour l'homme. Les secteurs de l'alimentation comme ceux de la santé sont concernés. Un vaste champ d'application biotechnologique est en cours d'ouverture.

Les océans, produisent une biomasse bien supérieure à celle provenant des terres émergées, mais seule une partie minime, issue des activités de pêche est directement exploitable. Cela représente tout de même, près de 85 millions de tonnes de produits divers (poissons, mollusques, crustacés, etc.) prélevé par an (FAO, 2007).

Environ 10% des captures globales des produits aquatiques sont des organismes riches en matière chitineuse (10 à 55% en poids sec). Plus de 80.000 tonnes/an de chitine sont obtenues à partir des rejets marins (Patil *et al.*, 2000).

La chitine est, après la cellulose, le bio polymère le plus répandu dans la nature, c'est un composant majeur de la paroi cellulaire de nombreux champignons et de l'exosquelette des arthropodes (Songsirithigul *et al.*, 2010).

La possibilité de dégrader la chitine par voie enzymatique est connue depuis longtemps chez les microorganismes, avant d'avoir été retrouvées chez de nombreux vertébrés (Brisou, 1971). Les poissons carnassiers, dont la nourriture est riche en proie chitineuse, possèdent un système digestif présentant une forte activité chitinasique, aussi l'extraction des chitinases à partir de ces poissons se révèle d'un grand intérêt. Les chitinases (EC. 3.2.1.14) font partie des enzymes qui hydrolysent la chitine au niveau de la liaison glucosidique β (1-4) N acétyl glucosamines (Cabib, 1987; Gooday, 1992; Takeshi, 2003 et Saguez, 2007). Elles sont très répandues dans la nature, on les trouve chez les bactéries, les champignons, les plantes, les invertébrés (Kondreddy *et al.*, 2007 et Shailesh *et al.*, 2010). Les chitinases sont aussi secrétées par la muqueuse digestive de quelques poissons (Mana *et al.*, 2009 ; Ikeda *et al.*, 2009 et 2012). Leur rôle est différent d'une espèce à l'autre. Certaines chitinases jouent un rôle dans la défense alors que d'autres ont un rôle nutritionnel (Neikel *et al.*, 2007) et aussi comme bioinsecticide contre les ravageurs qu'on retrouve dans les légumineuses.

Les légumineuses, source de protéines végétales, a été reconnue comme étant l'une des meilleures et des moins coûteuses des solutions pour l'alimentation des populations des pays en voie de développement. En effet, les protéines végétales coutent deux fois moins chères que les protéines animales. Les graines de légumineuses contiennent deux fois plus de protéines que les céréales (Soltner, 1990).

Les différents acteurs du développement agricole orientent leurs efforts vers l'accroissement de la productivité des principales cultures des légumineuses telles que le pois chiche. Cette légumineuse est cultivée sur tout le continent africain, en Amérique latine et dans quelques régions du sud –est asiatique. Le pois chiche est très intéressant tant sur le plan alimentaire que sur le plan agronomique. Ses graines sont riches en protéines (20 à 25% de leur poids sec) et contiennent la plupart des acides aminés nécessaires à l'alimentation humaine (Archana *et al.*, 2007).

En Algérie, le pois chiche figure parmi les légumineuses les plus nutritives par sa richesse en glucides et en protéines (ils constituent 80% du poids total de matière sèche de la graine), en vitamines et en sels minéraux. Il est l'une des bases traditionnelles de l'alimentation humaine et peut aussi servir de nourriture pour plusieurs espèces animales.

Il présente également un intérêt économique très important puisque sa culture constitue souvent un bon précédent à celle des céréales. La culture du pois chiche en Algérie, comme dans tous les pays du bassin méditerranéen, était connue bien avant 1830 (Laumont et Chevasus, 1956) et ce, du fait de son adaptation à différents sols et conditions de l'environnement. Il est cultivé dans les zones tempérées et chaudes et dans les zones semi-arides.

Les zones de culture du pois chiche se répartissent sur plusieurs villes du pays d'ouest (Mostaganem, Tiaret et Tlemcen) en Est (Guelma, Sétif et Constantine). La production n'a pas beaucoup évolué pendant ces dernières années malgré l'extension des superficies qui lui sont réservées (25.668 ha). En effet selon les données recueillies auprès du Ministère de l'agriculture en 2011, la production nationale en légumes secs n'a pas connu l'amélioration escomptée, tant sur le plan de la superficie que production des graines. Les rendements actuels sont insuffisants (238,900 q) pour la couverture nationale en nourriture. La sécurité alimentaire continue d'en pâtir. Le bilan de la recherche agricole en Algérie a énuméré les différentes contraintes quasi communes à toutes les cultures : sécheresse, déficits hydriques, maladie, mauvaises herbes, épuisement progressif des sols, qualité et performances des semences, etc... Le manque de ressources alimentaires est comblé depuis toujours par des importations massives des légumineuses (Annexe n°1). (Ministère de l'agriculture 2011).

La conservation des récoltes demeure l'un des facteurs clés de la sécurité alimentaire d'un pays. En effet, la production agricole est généralement saisonnière alors que les besoins des consommateurs s'étendent sur toute l'année. Il y'a une nécessité de la mise en place d'une politique phytosanitaire adéquate pour épargner les populations des risques de pénurie alimentaire pendant l'intersaison agricole. Dans cette perspective, un accent particulier devrait être mis sur le contrôle des déprédateurs dans les stocks. En effet les dommages causés par les insectes peuvent entraîner des pertes de production et la dépréciation de la valeur marchande des produits agricoles (Appleby *et al.*, 2001) et des risques d'intoxication liés à la consommation des produits traités avec des pesticides

(Xuoxin *et al.*, 2006). D'où la nécessité de parvenir à une protection à la fois efficace, d'un coût raisonnable, respectueuse de l'environnement et réalisable d'un point de vue socio-économique.

L'accroissement des rendements est difficile à obtenir en raison des contraintes liées aux attaques des insectes. Les bruches de pois chiches : *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae) compte parmi les ravageurs les plus dangereux des denrées stockées.

Les objectifs visés dans ce travail sont l'extraction, la purification et la caractérisation de la chitinase en vue de son utilisation comme bio insecticide à l'égard d'un bioagresseur des denrées stockées qu'est *Callosobruchus maculatus*.

Cette étude est articulée autour de trois parties précédées par une introduction générale.

- Dans la première partie nous rapportons des connaissances concernant la chitine qui constitue le substrat d'hydrolyse, les chitinases et leurs applications dans différents domaines
- Dans la deuxième partie nous exposons le matériel utilisé et la méthodologie de travail retenue pour l'étude à savoir :
 - L'extraction des chitinases à partir des abats de poisson, la rascasse, *Scorpeana scrofa* ainsi que les différentes méthodes utilisées pour la purification de ces dernières, à savoir la précipitation au sulfate d'ammonium, la chromatographie d'exclusion moléculaire, la chromatographie échangeuse anionique, l'électrophorèse SDS-PAGE suivie d'une électrophorèse zymogramme.
 - L'évaluation de l'activité insecticide des chitinases brutes et purifiées sur la mortalité, la reproduction et l'alimentation de *C. maculatus*.
- Dans la troisième et dernière partie nous regroupons les résultats et la discussion relatifs aux différentes expérimentations menées dans le cadre de ce travail. Enfin, nous clôturons notre étude par une conclusion générale suivie de quelques recommandations et perspectives.

1. Chitine

1.1 Historique

Avec au moins 10 gigatonnes synthétisées et dégradées chaque année dans la biosphère (Muzzarelli, 1999), la chitine ($(C_8H_{13}O_5N)_n$) est le second polysaccharide le plus représenté dans la nature après la cellulose (Guo *et al.*, 2008). Elle fut isolée et décrite pour la première fois en 1823 par Odier à partir de particules des coléoptères. Il la renomme « chitine », du grec « Kheiton » qui signifie enveloppe ou tunique (Desbrières, 2002 et Beaulieu, 2007).

Ce n'est qu'à partir des années 60 que ces polymères ont suscité un réel intérêt. En effet, la production industrielle et l'utilisation de ces bios polymères sont en constante augmentation puisqu'on les trouve abondamment dans la nature et que ce sont des ressources renouvelables (Khor, 2003).

1.2 Structure de la chitine

La chitine est un homopolysaccharide composé d'unités N-acétyl- β -D-glucosamine liées entre elles par des liaisons glycosidiques (1 \rightarrow 4). Les chaînes de polysaccharide s'associent par l'intermédiaire des liaisons hydrogènes pour créer la forme structurale du polysaccharide et donner naissance à des micro fibrilles qui confèrent le rôle squelettique de la chitine (Ruiz *et al.*, 2008). Sa structure est similaire à celle de la cellulose, mais diffère par la présence des groupements N-acétylés sur les carbones 2 des glucoses (Figure 1).

Sa synthèse implique de nombreuses enzymes. La phosphorylation et l'action d'isomérase permettent de transformer le D-glucose en D-fructose-6-phosphate qui, sous l'effet de transaminase, conduit à l'obtention de glucosamine. Cette molécule est ensuite transacétylée pour donner des unités N-acétyl-glucosamine phosphatées, dont l'association est réalisée par des chitines synthases à partir de l'irridine-diphosphate-N-acétylglucosamine (Saguez, 2007).

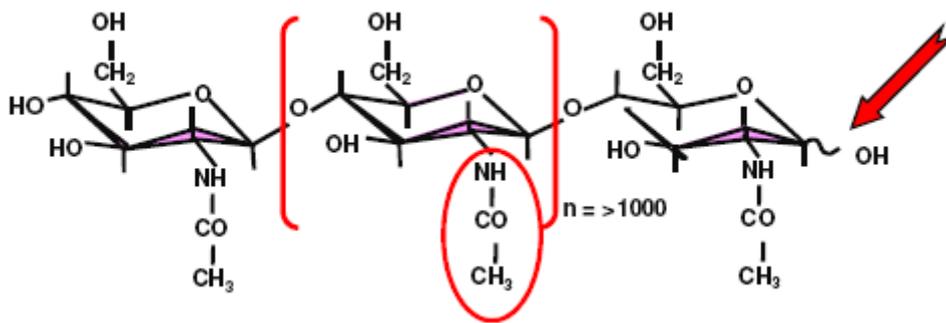


Figure 1 : Chaîne linéaire de la chitine d'après Ruiz et San. (2003).

L'unité N-acétylglucosamine, indiquée entre parenthèse, constitue l'unité répétitive du polymère de chitine. Le groupement acétylé est entouré en rouge. La flèche indique l'extrémité réductrice de la chaîne.

Contrairement à la cellulose, dont une seule forme cristalline est décrite en conditions naturelles, la chitine est une substance polymorphe présentant trois formes cristallines différentes : α , β et γ . (Hackman *et al.*, 1965 et Seidl, 2008) (Figure 2) et (Tableau 1).

Les trois formes se distinguent par le degré d'hydratation, la taille et le nombre de chaînes antiparallèles, ceci donne naissance à de nombreux ponts d'hydrogène et entraîne une rigidité importante ainsi qu'une faible sensibilité aux agents de déacétylation (Merzendorfer, 2006). La chitine α constitue la forme la plus stable et la plus abondante (Minke *et al.*, 1978 ; Muzzarelli, 2011). On la trouve chez les arthropodes et les champignons (Noishiki *et al.*, 2005).

La chitine β , constituée de chaînes parallèles (Blackwell, 1969), constitue la forme la moins abondante. Elle a été décrite chez certains Céphalopodes, des Annélides polychètes, des Pogonophores et chez quelques Protozoaires. Enfin la γ chitine, mal connue, qui serait constituée de l'assemblage de deux macromolécules parallèles et d'une antiparallèle, est essentiellement retrouvée dans les téguments des nymphes d'un coléoptère (*Ptinus*) (Rudall *et al.*, 1973 et Falini *et al.*, 2003) et dans l'estomac d'un calmar (*Loligo*) (Tan *et al.*, 2002).

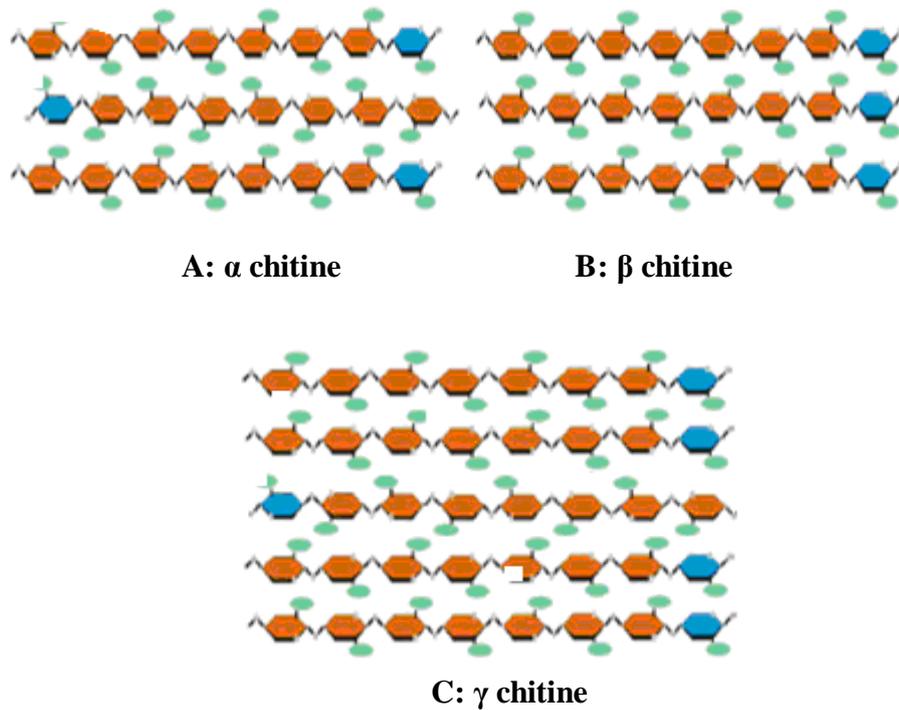


Figure 2 : Différentes structure de la chitine (d’après Seidl, 2008).

Tableau 1 : Arrangement des chaînes dans les trois formes de chitine (Einbu, 2007).

Forme	Arrangement des chaînes	Schématisation
Chitine- α	Antiparallèle	↓↑↓↑↓↑
Chitine- β	Parallèle	↑↑↑↑↑
Chitine- γ	Deux parallèles pour une antiparallèle	↑↑↓↑↑↓

1.3 Application des produits de dégradation de la chitine

La production de ces produits présente un intérêt pour les secteurs de l’alimentation, de l’agriculture et de la biotechnologie. Même si la chitine est reconnue comme une source potentielle de biomatériaux actifs, ce bio polymère montre des limites de par son manque de solubilité à pH neutre. En effet, le poids moléculaire très élevé de la chitine et sa viscosité très importante, l’a restreinte d’une utilisation dans diverses

applications aux secteurs alimentaire et biomédical. L'intérêt de les produire est donc justifié par leurs nombreuses activités biologiques (Einbu, 2007).

Les NAG produits par la voie enzymatique ont un prix de revient élevé comparé aux NAG produits par la voie chimique. Les NAG sont utilisés comme agents thérapeutiques pour traiter l'osteoarthrite (Rovetta *et al.*, 2004 ; Mao *et al.*, 2004 ; Owens *et al.*, 2005 et Derfoul *et al.*, 2007) et pour réparer le cartilage détérioré et soulager la douleur due à l'inflammation. C'est un élément qui agit comme une colle cellulaire pour réparer la muqueuse tissulaire (Braham *et al.*, 2003 ; Chan *et al.*, 2005 ; Homandberg *et al.*, 2006 et Terry *et al.*, 2007).

2. Chitinases

2.1 Historique

La chitinase a été d'abord observé par Bernard en 1911, quant il a isolé une fraction chitinolytique thermostable de diffusible à partir de pulpe d'orchidée. Ce travail a été soutenu par Karrer et Hoffman en 1929 pour la présence de chitinase chez l'escargot (Flash *et al.*, 1992). Ces dernières années, plusieurs recherches ont été menées pour l'amélioration de la production des chitinases à partir de microorganismes. La technologie de l'ADN recombinant a beaucoup contribué à optimiser le production des chitinases d'origine microbienne et des applications commerciales sont apparues sur le marché vers le milieu des années 90 (Binod *et al.*, 2006).

2.2 Définition et différentes type des chitinase

Les chitinases sont un groupe d'enzymes hydrolytiques qui assurent la rupture des liaisons β -1,4glycosidiques qui lient les carbones C₁ et C₄ de deux résidus N-acétyl-glucosamine consécutifs. Selon le mode d'action sur la chitine, les chitinases peuvent être divisées en deux catégories : les endochitinases et les exochitinases (Figure 3) (Nopakarn *et al.*, 2007 et Setthakaset *et al.*, 2008).

2.2.1 Les endochitinases (EC 3.2.1.14)

Les endochitinases nommées également poly[1,4- (N- acétyl- β -D- glucosaminide)] glycanohydrolases hydrolysent les liaisons internes des microfibrilles de chitine pour les

libérer des fragments de chitobiose, chitotriose et chitotétraose composés respectivement de deux, trois ou quatre unités N-acétyl (Cabib, 1987 , Takeshi, 2003 et Saguez, 2007).

2.2.2 Les exochitinasés (EC 3.2.1.52)

Les exochitinasés agissent progressivement sur l'extrémité non réduite de la chaîne de chitine formant ainsi des monomères ou des dimères (Sampson et Gooday, 1998).

Les exochitinasés peuvent être divisés en deux catégories :

- **chitobiosidases (EC3.2.1.29)** : elles catalysent l'hydrolyse des extrémités non réductrices de la chitine et libèrent des di-acétylchitobioses (Jeuniaux, 1963, Okutani, 1966).
- **β - D- acétylglucosaminidases (EC 3.2.1.30)** : elles catalysent l'hydrolyse des oligomères libérés par les endochitinasés et les chitobiosidases en monomères N-acétyl-Glucosamine (Dahiya *et al.*, 2006)

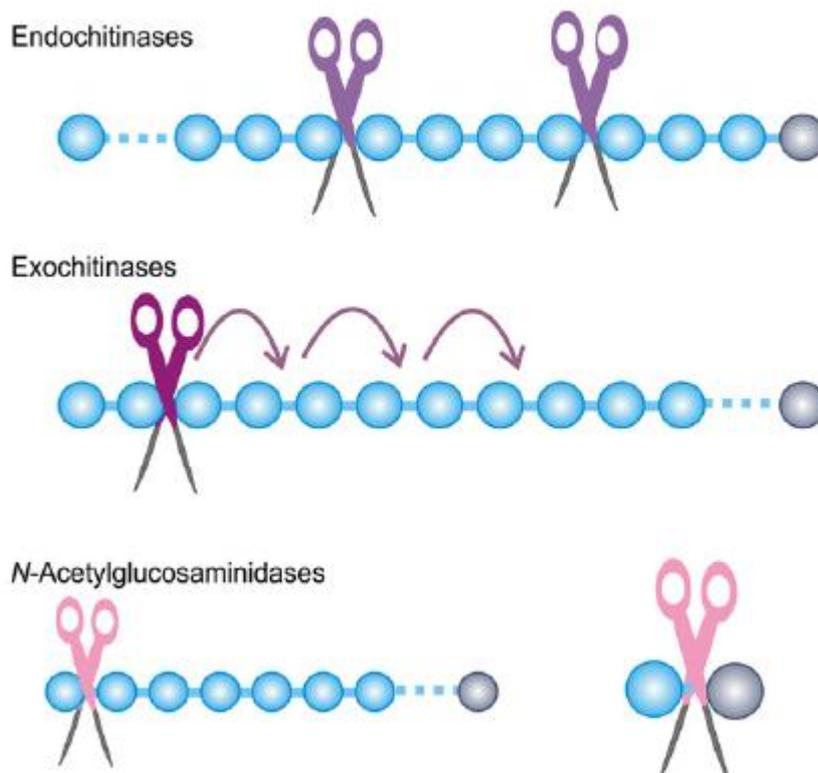


Figure 3 : Représentation des sites d'action des endochitinasés et des exochitinasés (d'après Seidl, 2008).

2.3 Classification des chitinases

Sur la base de leurs séquences en acides aminés, les chitinases ont été subdivisées en deux familles, famille 18 et famille 19 qui diffèrent également dans leurs structures tridimensionnelles et dans leur mécanismes catalytiques. D'importantes différences dans les propriétés biochimiques ont également été relevées (Brameld et Goddard, 1998).

- Famille 18 est ubiquitaire et comporte des chitinases de bactéries, de champignons, de virus, d'animaux et de plantes. Les chitinases de cette famille possèdent une structure en tonneau avec 8 hélices α et 8 brins de feuillet β . Elles possèdent un seul site catalytique et hydrolysent les ponts glycosidiques en conservant la configuration anomérique par un mécanisme catalytique assisté par le substrat (Henrissat, 1991).
- Famille 19 a été identifiée principalement chez les plantes et quelques bactéries. Ces chitinases possèdent dans leur structure deux sites actifs. La structure 3D est composée essentiellement d'hélices α . Les chitinases de la famille 19 hydrolysent les liaisons glycosidiques en inversant la configuration anomérique par un mécanisme catalytique acido-basique (Henrissat et Bairoch, 1993) (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification des chitinases

Famille 19			Famille 18	
			Bactéries (<i>Streptomyces Spp</i>)	
			Virus Bactéries Champignons Nématodes Invertébrés Vertébrés	
Classe I	Classe II	Classe IV	Classe III	Classe V
Plantes				

2.4 Fonctions et rôles des chitinases

Les chitinases jouent plusieurs rôles dans une multitude de systèmes biologiques différents (Gooday, 1999). Elles interviennent ainsi dans une grande variété de fonctions dans la nature incluant la morphogénèse, les défenses, la nutrition et la pathogénicité (Sampson *et al.*, 1998). Chez les plantes comme chez les animaux, elles ont pour rôle

principale la défense de l'organisme contre les attaques des pathogènes (Kasprzewska, 2003 et Seidl, 2008). En effet, chez les plantes, les chitinases jouent un rôle dans la résistance contre les pathogènes (Gupta *et al.*, 2010 et Sharma *et al.*, 2011). En effet des recherches ont montré qu'elles sont également impliquées dans un grand nombre d'événements physiologiques, lors du développement ou dans les processus de croissance. Les chitinases semblent être contrôlées par une variété de conditions de stress, aussi bien abiotique que biotique et par certaines phytohormones. Les chitinases de plantes sont appelées « protéines liées à la pathogénèse » (PR protéines) (Kramer *et al.*, 1997 et Sharma *et al.*, 2011). Chez les champignons, les chitinases possèdent un rôle autolytique, nutritionnel et morphogénétique (Reyes *et al.*, 1988 et Baldrian *et al.*, 2011). La chitinase des virus quand à elle est impliquée dans la pathogénèse (Dahiya *et al.*, 2005). Chez les insectes et les crustacés, les chitinases sont étroitement liées avec les mues et le besoin d'une dégradation partielle de l'ancienne cuticule (Xiaorong *et al.*, 1996 ; Kondredy *et al.*, 2007 et Yasuyuki *et al.*, 2010 ; Chitwan *et al.*, 2010). La présence des chitinases chez les vertébrés est ainsi principalement associée au système digestif. Ces enzymes sont également associées à un rôle de défense contre les attaques pathogènes des champignons (Singh *et al.*, 2007). Ces chitinases semblent également jouer un rôle dans la virulence de certains pathogènes qui infectent les insectes *via* la membrane péri trophique. En effet, le tube digestif de la plupart des vecteurs (insectes) est recouvert de matériel chitineux- membrane péri trophique – qui semble freiner voir même bloquer l'invasion des parasites. Certains parasites semblent donc avoir développé des mécanismes pour détruire les barrières chitineuses. Les chitinases leur permettent de franchir cet obstacle et semblent intervenir de manière cruciale dans la réussite de la propagation des parasites (Shahabuddin *et al.*, 1999).

2.5 Application des chitinases

Les chitinases peuvent avoir de larges applications dans plusieurs domaines. Dans les industries agro-alimentaires, les chitinases sont utilisées dans le développement du recyclage des déchets riches en chitine, particulièrement dans l'industrie pharmaceutique, les chitinases sont utilisées pour produire des chitooligosaccharides et des NAG (Henrissat *et al.*, 1993 et Wang *et al.*, 2007).

Dans le domaine de l'agriculture, l'injection des chitinases dans les graines des céréales fournit à la plante une résistance à l'attaque des agents pathogènes (champignons et

parasites) en dégradant leurs parois d'où l'augmentation de la perméabilité de ces parois d'une part, et l'inhibition de l'élongation des hyphes d'autre part (Ordnlich *et al.*, 1988 ; Kunz *et al.*, 1992 ; Liduo *et al.*, 2006 ; Gorii *et al.*, 2009 ; Shailes *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2010 ; Das *et al.*, 2010 et Velusamy *et al.*, 2011). Les chitinases appliquées sur les plantes, une fois ingérées par les insectes, vont hydrolyser la membrane intestinale de l'insecte formée de 12% de chitine. L'attaque enzymatique aurait comme conséquence de graves abrasions d'une partie de l'appareil digestif, conduisant à un effet létal (Di Maro *et al.*, 2010 et Fiandra *et al.*, 2010).

Dans le domaine de la santé, l'effet anti bactérien des chitinases a été testé sur plusieurs espèces bactériennes et il s'est montré positif (Vellard, 2003 et Mathur *et al.*, 2011). Ces chitinases ont été considérées et classées comme des antibiotiques à activité enzymatique (Renkema *et al.*, 1995).

2.6 Différentes origines des chitinases

Les chitinases sont très répandues dans la nature, on les trouve chez les bactéries, les champignons, les plantes, les invertébrés (principalement les nématodes) (Ferial, 2000), les insectes et les crustacés (Perrakis *et al.*, 1994, Dahiya *et al.*, 2006, Kondreddy *et al.*, 2007., Shailesh *et al.*, 2010 et Suresh et Anil, 2012). Les chitinases sont aussi présentes chez les vertébrés comme les poissons (Fange *et al.*, 1979, Dandrifoss, 1975, Benmouna *et al.*, 1986, Magdalena *et al.*, 2004 et Mana *et al.*, 2009), quelques oiseaux insectivores, amphibiens et des reptiles (Rebeka *et al.*, 2000). Enfin citons le cas des chitinases synthétisées chez les humains et les bovins (Neik *et al.*, 2007, Areshkov *et al.*, 2012 et Vega *et al.*, 2012).

2.6.1 Les chitinases bactériennes

Chez les bactéries, les chitinases sont produites généralement pour des raisons nutritionnelles et pour hydrolyser les diverses structures chitineuses trouvées dans la nature (Arnold *et al.*, 1996 ; Chae *et al.*, 2006 et Saguez, 2007).

Les bactéries produisent la chitinase pour digérer principalement la chitine qui sera utilisée comme source de carbone et d'énergie (Perrakis *et al.*, 1993 ; Frank *et al.*, 2005 et Shailesh *et al.*, 2010).

Les chitinases bactériennes de la microflore intestinale de nombreux animaux (poissons, oiseaux...) facilitent les processus de digestion des aliments composés de chitine (Goodrich *et al.*, 1977 ; Patil *et al.*, 2000 ; Itoi *et al.*, 2007 et Duskova *et al.*, 2011).

2.6.2 Chitinases fongiques

Les chitinases des champignons ont plusieurs fonctions similaires aux chitinases bactériennes. Elles jouent un rôle nutritionnel et possèdent une activité dans le processus de développement des champignons. Elles sont également impliquées dans la morphogénèse et lors de l'interaction symbiotique et d'infestation parasitaire car la chitine est la majeure composante des parois cellulaires des champignons filamenteux (Sahai *et al.*, 1993 et Cohen *et al.*, 1998). Les chitinases sont donc produites à différents stades de leur croissance. Ainsi, elles sont impliquées dans la séparation et la germination des spores. Chez les levures, elles interviennent dans le bourgeonnement des cellules filles et leur séparation des cellules mères (Passonneau *et al.*, 1953, Elango *et al.*, 1982 et Kuranda *et al.*, 1991). Les hyphes mycéliens possèdent une structure solide, les chitinases remodelent la chitine des parois fongiques lors de la croissance et du développement (Gooday *et al.*, 1992). Les champignons pathogènes utilisent leurs chitinases pour faciliter leur pénétration dans l'hôte ou pour en exploiter les sucres et les acides aminés issus de la dégradation des cuticules (Leah *et al.*, 1991).

2.6.3 Chitinases parasitaires

Les parasites responsables de la leishmaniose, de la malaria et de la maladie de Chagas ne contiennent pas de chitine. Cependant, ils sécrètent l'enzyme chitinase pour dégrader les structures internes de l'insecte vecteur qui contiennent de la chitine. La chitinase chez ces parasites est produite à un stade de développement particulier, ce qui suggère l'importance de la chitine ou de la chitinase dans le fonctionnement de ce parasite à ce stade-là (Shahabuddin *et al.*, 1995). Les coquilles d'œufs et les graines qui couvrent les surfaces extérieures des microfilaires contiennent de la chitine (Shahabuddin *et al.*, 1999). Cette dernière se trouve aussi dans la paroi des kystes des pathogènes intestinaux *Entamoeba* (une amibe pathogène) (Das *et al.*, 1991) et *Giardia* (protozoaire flagellé) (Ward *et al.*, 1985). Ces parasites utilisent les chitinases pour moduler leur structure chitineuse. Le paludisme est une maladie causée par les parasites du genre *Plasmodium*. Le parasite est transmis à l'homme par une piqûre de moustique. Chez ce vecteur, une membrane péritrophique (MP) enveloppe le repas sanguin, mais les

cokinettes arrivent à s'échapper à travers cette MP en secrétant la chitinase (Shahabuddin *et al.*, 1995).

2.6.4 Chitinases végétales

Ce sont les plus étudiées à l'heure actuelle. Bien que ne possédant pas de chitine, les plantes produisent des chitinases qui peuvent être constitutives ou induites.

Les chitinases végétales qui sont produites constitutivement, sont réparties différemment dans la plante, selon l'espèce, le stade de développement ou le type d'organe considéré (Chlan *et al.*, 2001, Izabela *et al.*, 2004 et Dinesh *et al.*, 2010).

Ainsi, de nombreux auteurs rapportent que les chitinases végétales sont synthétisées au cours de différentes phases du développement de la plante (Lin *et al.*, 1995). La présence constitutive de chitinases a été mise en évidence lors de l'embryogénèse mais aussi lors de formation des feuilles apicales (Trudel *et al.*, 1989 et Ancillo *et al.*, 1999), les fleurs (Neale *et al.*, 1990 et Passarinho *et al.*, 2001). Les chitinases sont également présentes au niveau des racines où elles permettent la dégradation des parois fongiques favorisant ainsi la mycohization c'est-à-dire l'interaction symbiotique entre le champignon et la plante (Showalter, 2001).

D'autre part, les chitinases végétales appartiennent à la famille des PR (protéines reliées à la pathogénèse) (Schlein *et al.*, 1991, Graham *et al.*, 1994, Akihiko *et al.*, 2003, Xluyun *et al.*, 2005, Isaac *et al.*, 2007 et Gonio *et al.*, 2010) jouent un rôle important dans le mécanisme de défense contre les organismes qui contiennent de la chitine tels que les champignons pathogènes et les insectes,. Enfin, les plantes carnivores produisent des chitinases qui aident à la dégradation de leurs proies (Gooday, 1990).

2.6.5 Chitinases animales

Les chitinases ont également été mises en évidence chez de nombreux animaux invertébrés et vertébrés, y compris chez les mammifères, où elles sont impliquées dans des processus digestifs (Fange *et al.*, 1979 ; Michiko *et al.*, 1987 ; Flach *et al.*, 1992 et Suzuki *et al.*, 2002). Les chitinases ont été décrites dans le tractus alimentaire des Poissons et des oiseaux (Lindsay, 1984 ; Kono *et al.*, 1990 ; Ikeda *et al.*, 2009 ; Huang *et al.*, 2010 ; Proespraiwong *et al.*, 2010 et Ikeda *et al.*, 2012)

2.7 Inhibiteurs de chitinases

Si de nombreux inhibiteurs de la synthèse de chitine sont commercialisés, aucun inhibiteur de la dégradation de la chitine n'a jusqu'alors été utilisé. Les effets attendus d'un inhibiteur de chitinases sont l'inhibition de l'apolyse (décollement de la cuticule) et la perturbation des processus d'exuviation (rejet de l'ancienne carapace). Toutefois, de nombreux inhibiteurs de chitinases ont été découverts, isolés et caractérisés au cours de ces deux dernières décennies. Différents types d'inhibiteurs de chitinases ont pu être mis en évidence, les uns mimant la structure de la chitine, les autres des intermédiaires de dégradation de la chitine par les chitinases de la famille 18.

2.7.1 L'allosamidine

L'inhibiteur le plus étudié est l'allosamidine (Figure.4), un pseudotrissaccharide découvert par (Sakuda *et al.* (1987) et isolé à partir de bactéries du genre *Streptomyces*. Une puissante activité inhibitrice est décrite contre les chitinases de la famille 18, dont celles des insectes et des champignons (Sakuda *et al.*, 1987 et Blattner *et al.*, 1997) mais l'allosamidine n'affecte pas les chitinases de la famille 19 (Sakuda et Sakurada, 1998). Ce composé, qui agit par inhibition compétitive des chitinases, présente de nombreux effets sur les insectes. Les effets insecticides (inhibition des mues) de l'allosamidine, mis en évidence dès 1987 chez *Bombix mori* (Lipidoptera : Bombycoïdæ) (Sakuda *et al.*, 1987), ont été retrouvés chez de nombreux autres insectes, notamment chez la mouche *Lucilia cuprina* chez laquelle le taux de mortalité est également significativement augmenté.

Les effets de l'allosamidine ne se limitent pas uniquement aux insectes. En effet, cet inhibiteur retarde l'enkystement de l'amibe *Entamoeba invadens* (Villagomez-Castro *et al.*, 1992) et affecte aussi les chitinases du nématode *Onchocerca gibsoni* et celles des bactéries du genre *Bacillus* (Sampson et Gooday, 1999). L'allosamidine possède enfin des propriétés antifongiques dirigées contre des champignons pathogènes tels que *Candida albicans* (Sami *et al.*, 2001).

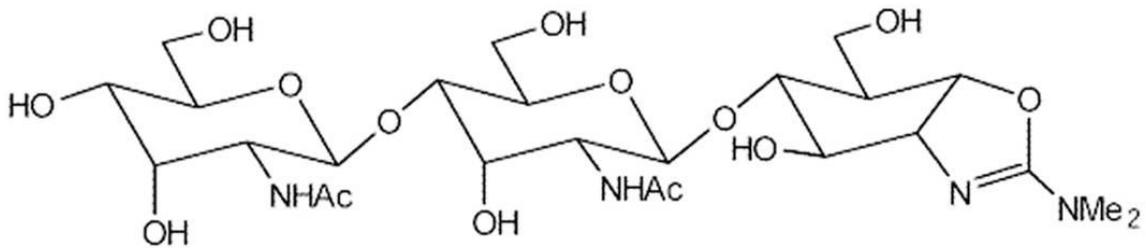


Figure. 4 : Structure le l'allosamidine (d'après Sakuda, 1987).

3. Insectes

3.1 Caractères généraux de la bruche de pois chiche : *Callosobruchus maculatus*

La bruche de pois chiche est un insecte de forme ovale, de quelques millimètres de longueur (1,5 à 5 cm). La tête prolongée en avant en un museau élargi muni de deux gros yeux, les antennes, insérées près des yeux. Les élytres ne recouvrent pas entièrement l'abdomen (Balochowky, 1962).

Les pattes postérieures sont toujours plus développées que les autres pattes avec des fémurs fréquemment dilatés ou renflés. Les ailes sont fonctionnelles chez presque toutes les espèces de cette famille (Labeyrie, 1981).

La famille des Bruchidae comprend deux groupes (Delobel *et al.*, 1993). Le premier renferme les bruches se développant dans les champs, dans les graines encore vertes et ont une seule génération annuelle (espèces univoltines) comme *Bruchus pisorum* (la bruche du pois), *B. rufimanus* (la bruche des fèves) et *B. lentis* (la bruche des lentilles).

Le deuxième groupe renferme les bruches qui se multiplient à l'intérieur des entrepôts, dans les graines sèches. Elles ont plusieurs générations annuelles (espèces polyvoltines) et c'est le cas de *Callosobruchus maculatus* (la bruche du pois chiche et du niébé), *C. chinensi* (La bruche chinoise), *Acanthoscelides obtectus* (la bruche d'haricot et *Caryedon serratus* (la bruche de l'arachide).

3.2 La position systématique *Callosobruchus maculatus*

- Embranchement : Arthropodes
- Sous embranchement : Antennates
- Classe : Insectes
- Sous classe : Ptérygotes ou Métaboles
- Section : Néoptères
- Sous section : Néoptères endoptérygogènes
- Ordre : Coléoptères
- Sous ordre : Phytophaga
- Super famille : Phytophagoidea
- Famille : Bruchidae
- Genre : *Callosobruchus*
- Espèce: *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775)
(d'après Balaschowsky, 1962).

3.3 Description de la bruche de pois chiche *Callosobruchus maculatus*

3.3.1 Les œufs

Les œufs de *C. maculatus* sont asymétriques, arrondis à une extrémité, pointus à l'autre, ils mesurent 0,4 à 0,75mm sur 0,3 à 0,45mm.

Fraichement pondus, ces œufs sont de couleur jaunâtres et translucides, ils deviennent ensuite blanc opaque à maturité. Ils sont fortement collés aux graines sur toute l'étendue de leur face plane, et cela grâce à un liquide adhésif qui se solidifie à l'air après la ponte (Hoffman, 1962).

3.3.2 Les larves

Les larves du premier stade (néonates) sont de type chrysomélien. Elles sont visibles par transparence à travers le chorion. Le développement larvaire se fait à l'intérieur de la graine (Fig. 7). Pour pénétrer dans la graine, la larve s'appuie sur la face interne du chorion puis creuse sa galerie. Au moment de la pénétration, elle rejette en arrière de la poudre de grains de l'œuf (Kellouche, 2005).

Une fois dans la graine, elles passent au deuxième stade en donnant naissance à une larve fortement incurvée de 4mm de long.

3.3.3 Les nymphes

La nymphe a lieu le plus souvent à l'intérieur même de la graine (Figure 5), dans une petite loge aménagée sous l'épiderme de la graine. Avant de se nymphoser, la larve découpe avec ses mandibules, d'une manière circulaire l'épiderme de la graine. L'adulte soulève cet opercule pour se libérer.



Figure. 5 : La nymphe de *Callosobruchus. maculatus* (original).

3.3.4 Les adultes

L'adulte de *C. maculatus* est un insecte mesurant 2,8 à 3,5 mm de long, ayant un corps trapu de coloration rougeâtre (Figure 6).

Les élytres présentent quatre taches foncées bordées de soie. Les antennes sont noires avec les quatre premiers articles roux, chez le mâle elles sont plus élargies à partir de septième article, mais les femelles ont les antennes entièrement rouge (Balashowsky, 1962).

Les pattes postérieures sont plus longues que les deux autres paires, elles portent des épines dont le nombre et la disposition permettent de différencier la bruche du pois chiche à celle de l'haricot (Utida, 1954). Quand au pygidium, il est de couleur blanche parsemé de deux grandes taches noires rouges plus ou moins brunâtre.



Figure. 6 : Adulte de *Callosobruchus. maculatus* (Original)

3.3.5 Distinction des sexes

La distinction des deux sexes (Figure 7) s'appuie sur les génitalia, mais il est possible de séparer les mâles des femelles à vue d'œil par la taille (les mâles sont plus petits que les femelles), et par la couleur (les mâles ont une couleur plus rougeâtre que les femelles (Lepesme, 1944).



Figure. 7 : mâle et femelle de *Callosobruchus maculatus*.

3.3.6 Développement larvaire de *Callosobruchus maculatus*

Afin de suivre, dans nos conditions, le développement des larves de *C. maculatus*, nous avons prélevé dans des graines humidifiées des larves à diverses périodes à partir du 6ème jour (juste après la pénétration des larves dans les graines) jusqu'au stade nymphal (Figure 8). Il est aussi possible, dans nos conditions expérimentales, de suivre en fonction du temps, la durée des différents stades larvaires :

- Stade 1 : 0 – 6 jours
- Stade 2 : 6 – 8 jours
- Stade 3 : 8 – 12 jours
- Stade 4 : 12 – 18 jours
- Stade nymphal : 18 -25 jours

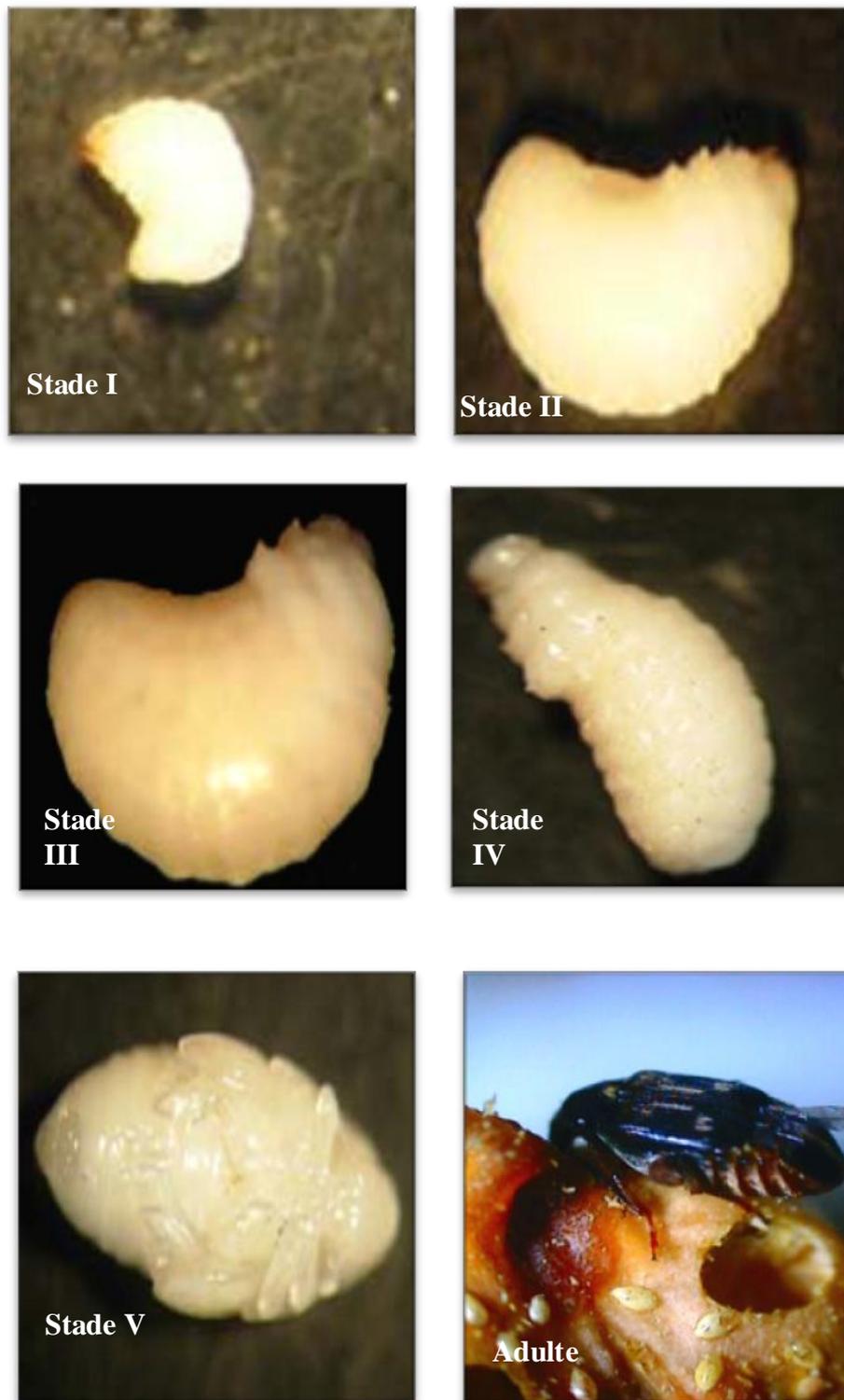


Figure 8: Cycle de développement de l'espèce *Callosobruchus maculatus* (F) à une température de 30°C et une hygrométrie de 70% \pm 5% (Original). Stade I, Stade II, Stade II, Stade IV, Stade V et l'émergence de l'adulte

3.4 Cuticule des insectes

Les cuticules d'insectes sont composées d'un empilement de plusieurs couches protéiques et chitineuses. L'épicuticule, la couche la plus externe de la cuticule, est une fine membrane multicouche et pigmentée. Elle est dépourvue de chitine, mais constituée d'une lipoprotéine, la cuticuline, et de cire. L'épicuticule recouvre une épaisse procuticule, elle-même composée d'une exocuticule rigide et d'une endocuticule principalement composées de chitine et de protéines (Adersen, 1979), laquelle repose sur les cellules tégumentaires (Figure 9).

La rigidité de la cuticule implique une croissance larvaire ponctuée de mues, nécessaires à l'abandon de l'ancienne cuticule devenue très étroite et à l'édification d'une nouvelle. Le processus de mue, de courte durée, est associée à de profondes modifications physiologiques et morphologiques (Saguez, 2007).

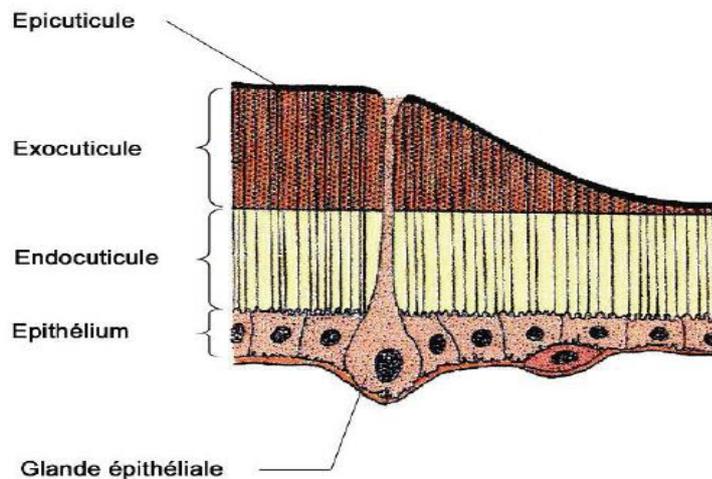


Figure 9 : Structure de la cuticule de l'insecte (d'après Andersen, 1979).

3.5 Description anatomique du tube digestif de *C. maculatus*

L'observation sous loupe binoculaire montre que le tube digestif de *C. maculatus* s'étend du fond de la cavité orale, en arrière des mandibules jusqu'à l'anus. Sa longueur et son diamètre varient respectivement de 7 à 10 mm et de 2 à 3 mm. Le tube digestif est constitué de trois parties (Figure.10) : stomodeum et proctodeum d'origine ectodermique et mesentéron d'origine endode

3.5.1 Le stomodeum (Intestin antérieur)

Le stomodeum mesure 3mm de long. Il parcourt la région du cou et le prothorax, il comporte trois parties : un pharynx, un œsophage et un jabot.

- a) Le pharynx court, prend naissance de la cavité buccale
- b) L'œsophage fait suite directement au pharynx, il est tubulaire étroit, puis dilaté postérieurement en un jabot qui constitue la partie la plus volumineuse du stomodeum.
- c) Le jabot aboutit à la partie dilatée du mésentéron par l'intermédiaire d'une portion étranglée, le sphincter cardiaque.

3.5.2 Le mésentéron (Intestin moyen)

L'intestin moyen représente la majeure partie du tube et mesure 6 mm de long. Il a une pigmentation marron clair, il est le plus volumineux, sa partie antérieure est pourvue de six caecums gastriques de couleur jaunâtre allongés parallèlement au tube digestif. Chaque caecum comprend un tube antérieur allongé qui se dirige vers le jabot et un tube postérieur court dirigé vers l'intestin moyen. La lumière postérieure du mésentéron est marquée par une constriction très évidente, le sphincter pylorique. C'est à ce niveau que viennent s'insérer, comme chez la majorité des coléoptères six tubes de Malpighi.

3.5.3 Le proctodeum (Intestin postérieur)

Le proctodeum mesure 3 mm de long, comportant trois segments différenciés par leur aspect : un segment proximal où débouchent les extrémités distales des tubes de Malpighi, un segment intermédiaire qui correspond au rectum et une ampoule rectale.

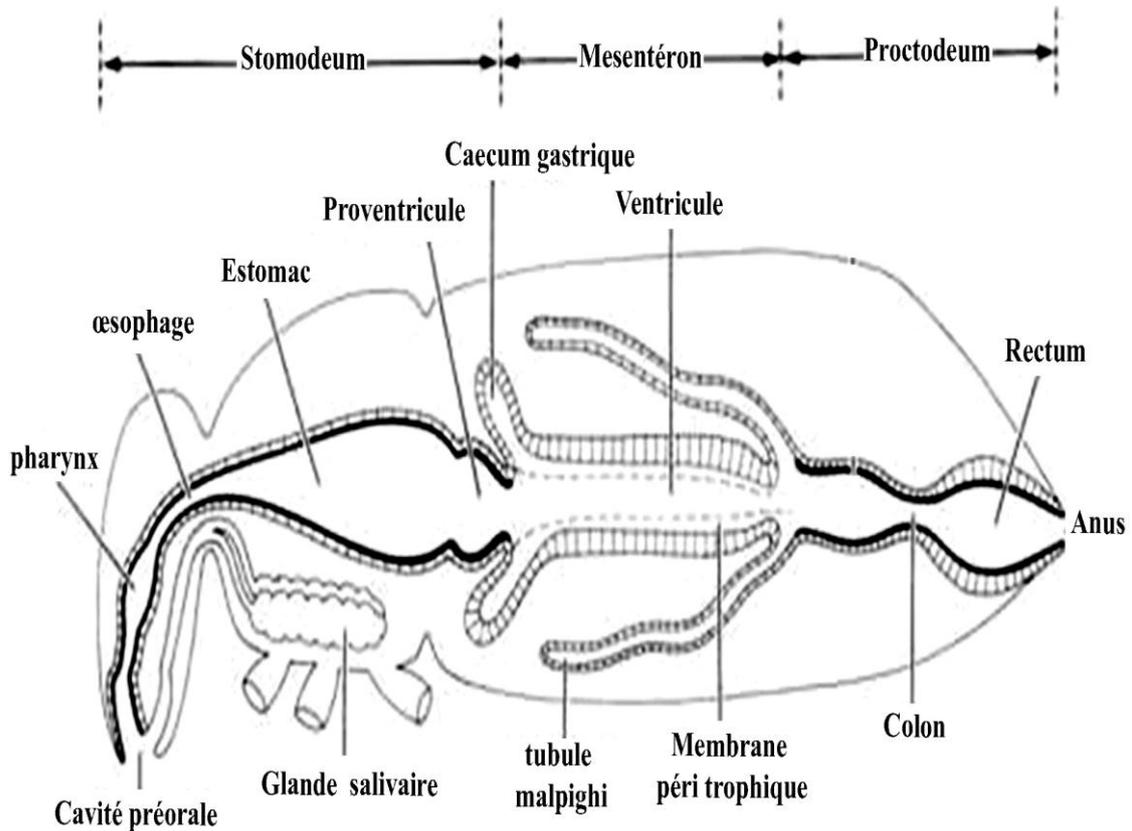


Figure. 10 : Schémas représente l'Appareil digestif de l'insecte *Callosobruchus maculatus* (Shahabuddin *et al.*, 1995).

3. 6 Structure histologique du tube digestif de *Callosobruchus maculatus*

Chez les insectes, la région du stomodeum est composée de trois parties : œsophage, jabot et le gésier. Au niveau du jabot (estomac), les villosités sont constituées d'un épithélium unistratifié et d'une musculature, muscles circulaires et longitudinaux, bien développée comme au niveau de l'œsophage.

La région du mésentéron est séparée du jabot par des caeca gastriques disposés radialement autour de la lumière centrale du tube digestif. La paroi du mésentéron, où a lieu la digestion, est faite d'un épithélium à cellules sécrétrices et absorbantes, isolé du bol alimentaire par une membrane péri-trophique protectrice et filtrante. L'épithélium est simple prismatique avec des cellules basales souvent regroupées en nids. Les cellules épithéliales portent à leur face apicale une bordure en brosse très régulière. Des cryptes de régénération sont fréquemment localisés à la base des replis de l'épithélium.

Enfin dans le proctodeum, s'insère le colon qui présente des replis épithéliaux développés emplissant presque toute la lumière de l'organe. Le revêtement chitineux est moins épais que l'intestin antérieur. La musculature est représentée par des couches longitudinales et circulaires.

3.7 Membrane péritrophique et chitinases

Le tube digestif des insectes est divisé en trois segments. Les portions antérieure et postérieure respectivement nommées stomodeum et proctodeum sont issues de l'invagination embryonnaire de cellules ectodermiques. Elles subissent donc les mêmes phénomènes de mues que endodermique, contrairement au stomodeum et proctodeum, n'est pas revêtu d'une cuticule. Une couche extracellulaire mince, produite après l'ingestion d'aliment est nommée membrane péritrophique (Figure 11), elle permet d'isoler le bol alimentaire des cellules épithéliales mésentériques en délimitant un espace péritrophique entre la membrane et l'épithélium mésentérique (Chatton, 1932). La membrane péritrophique est constituée de chitine, de protéoglycane et de nombreuses protéines (Kramer et Muthukrishnan, 1997, Tellam *et al.*, 1999, Saguez *et al.*, 2006 et Yutaka *et al.*, 2008). On distingue principalement deux types de membrane péritrophique (Peters, 1992).

La membrane péritrophique de type I qui est épaisse (2- 20 μm), constituée de chitine, protéoglycane et péritrophines sécrétés par de nombreuses cellules de l'épithélium du mésentéron (Shen *et al.*, 1999). Cette membrane est synthétisée entièrement par l'épithélium de l'intestin.

La membrane péritrophique de type II, plus fine (inférieure à 1 μm d'épaisseur), est synthétisée de façon continue par un organe spécialisé, le cardia, localisé à la jonction entre l'intestin antérieur et l'intestin moyen.

Les membranes péritrophiques se mettent en place dans les trente minutes suivant la prise de nourriture. Elles permettent de protéger les cellules épithéliales de l'intestin moyen contre les éventuelles abrasions causées par la nourriture, une infection virale et bactérienne (Shen *et al.*, 1999).

Dans la dégradation de la membrane péritrophique, les chitinases de l'insecte joueraient un rôle dans la mise en place de la matrice péritrophique, en participant à la réorganisation des fibres de chitine. Elles participeraient donc à la dégradation de la membrane péritrophique après la digestion (Merzendorfer *et al.*, 2006). En effet, l'ajout

des chitinases dans l'alimentation des insectes induit la dégradation rapide de la membrane péritrophique pendant la digestion

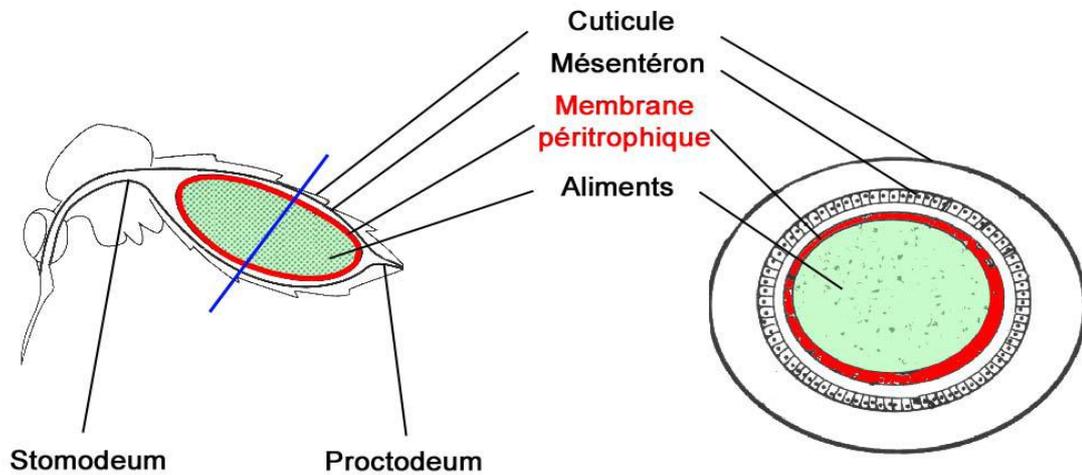


Figure. 11 : Coupe longitudinale et transversale du tube digestif de l'insecte : mise en évidence de la membrane péritrophique au niveau du mésentéron (d'après Chatton, 1932 et Shahabuddin *et al.*, 1995).

4. Dégâts causés par *C. maculatus*

Les graines mûres, bien que la dureté et l'épaisseur soient des barrières efficaces contre la pénétration des larves, sont fortement attaquées pendant le stockage par *C. maculatus* (Shih-Chieh *et al.*, 2002), affectant ainsi leur poids, leur faculté germinative et leur valeur marchande (Kumar *et al.*, 1993). Les pertes subies par les graines suite aux attaques de ce ravageur sont de l'ordre de 80% en quelques mois atteignant souvent 100%. Ces dégâts provoqués sont dus essentiellement aux larves qui dévorent les graines (Kellouche, 2005). Par ailleurs, on observe une modification de la composition en vitamines. D'autre part, la qualité des protéines subit une diminution de la composition en méthionine et une augmentation de l'acide urique et de l'azote non protéique, ce qui rend les graines impropres à la consommation humaine (Keita *et al.*, 2001). (Figure 12).

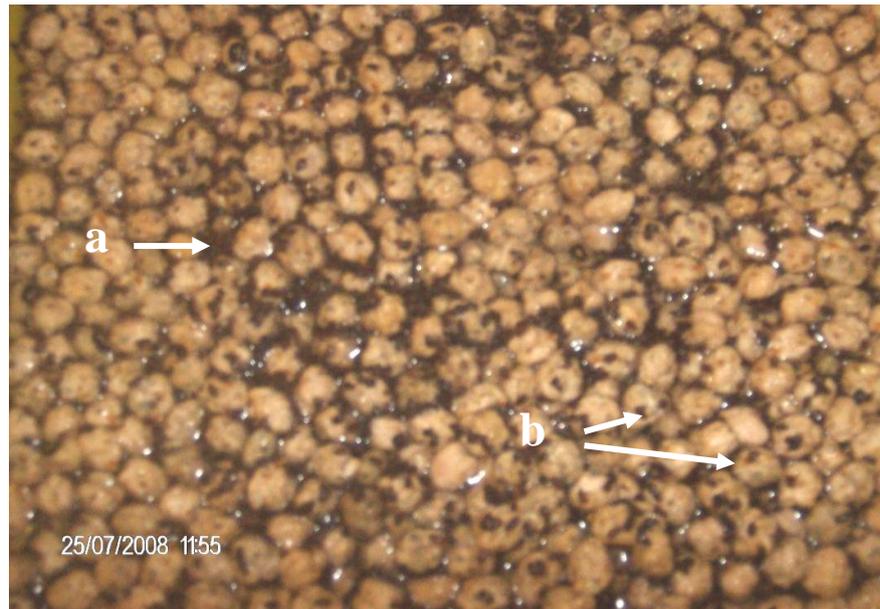


Figure. 12: Dégâts causés par *Callosobruchus maculatus* sur le pois chiche commercial (Original). (a) Insectes en masse, (b) Graines de pois chiche infestées

5. Méthodes de lutte contre *Callosobruchus maculatus*

La protection des graines stockées contre les infestations d'insectes soulève souvent des polémiques, puisqu'elles peuvent survenir quand les récoltes sont encore sur pied (Ali *et al.*, 1998). L'importance des pertes après la récolte, justifie une stratégie de lutte au niveau de chaque organisme de stockage. Pour lutter donc contre ces ravageurs deux méthodes sont préconisées : l'une est préventive qui consiste en une hygiène rigoureuse des différents moyens depuis la récolte des graines jusqu'à leur entreposage : elle se pratique avant l'installation du ravageur. La deuxième méthode est curative utilisée quand les entrepôts sont déjà infestés.

5.1 Lutte préventive

Parmi les moyens prophylactiques, élémentaires, la mise en application régulière des mesures d'hygiène constitue le moyen le plus important et le plus efficace pour contrôler le *C. maculatus* ; pour cela, Multon (1982) préconise plusieurs méthodes à savoir :

- Un nettoyage des locaux de stockage et du matériel destiné à l'emmagasinage, par une pulvérisation d'insecticides.

- Une incinération des déchets de nettoyage.
- Une vérification des locaux, des crevasses et des recoins qui peuvent abriter des insectes ou des grains inaccessibles aux insecticides de contact (Fields, 2001).

5.2 Lutte génétique

L'utilisation de variétés résistantes présente actuellement une méthode de contrôle efficace à l'égard de *C maculatus*. Certaines variétés de pois chiche cultivées présente une faible sensibilité vis-à-vis de cette bruche L'amélioration de la résistance des graines de légumineuses permet donc d'assurer une protection efficace sur champ et lors des entreposages (Boutin *et al.*, 2006).

5.3 Lutte curative

Elle a pour but de détruire les insectes présents dans les stocks quelque soit leurs stades de développement, et d'empêcher toute infestation ou réinfestation (Boutin *et al.*, 2006). De nombreuses méthodes sont préconisées :

5.3.1 Lutte chimique

Les dégâts les plus importants étant surtout occasionnés pendant la période de stockage. Plusieurs gammes de pesticides ont été utilisées contre les insectes ravageurs des denrées stockées. La première comprend les insecticides organochlorés (lindane, chlordane, dieldrine). Pour la seconde, il s'agit d'organophosphorés (le malathion, le pyrimiphos-méthyle). La troisième génération regroupe des pyréthrinoides de synthèse comme la deltaméthrine et la bioresméthrine (Kellouche, 2005). Le groupe d'insecticides polyvalents le plus utilisé contre les insectes des grains est celui des organophosphorés, la substance la plus employée et la plus efficace est le primiphos-méthyle (Labeyrie, 1954 ; Collin, 1990 ; Shakoori *et al.*, 1993). Fréquemment utilisés dans le passé (D.D.T, lindane...), ils ne sont plus employés aujourd'hui à cause de leur toxicité pour l'homme et les animaux domestiques. Dans le cas des grands lots de stockage, l'usage de fumigation est une technique efficace. Les fumigants donnent une protection totale liée à leur diffusion à l'intérieur des grains, pouvant atteindre les formes cachées des ravageurs.

L'intérêt majeur de la fumigation est la faculté du gaz insecticide de pénétrer à l'intérieur du grain et donc de détruire les œufs, les larves et nymphes qui s'y développent. Malheureusement ils présentent une incidence défavorable sur l'homme et les animaux domestiques et même la faculté germinative des grains.

La résistance aux fumigants (phosphine et bromure de méthyle) a été observée chez de nombreux insectes ravageurs des grains dans le monde, dans certains pays africains et asiatiques (Benhalima *et al.*, 2004).

Au cours de ces dernières années, l'emploi des fumigants a été de plus en plus remis en question. Ceci s'applique en particulier au bromure de méthyle mais également à la phosphine. Les problèmes sont principalement liés aux effets négatifs sur l'environnement, à un éventuel caractère cancérigène et au développement de résistance chez les ravageurs cibles. Le bromure de méthyle est un produit susceptible de détruire l'ozone (Kostyukovsky *et al.*, 2002). Il a été retiré et n'est plus commercialisé. L'utilisation de pesticides pendant plusieurs années a entraîné de nombreux problèmes, entre autre la présence de résidus sur les denrées stockées et le développement du phénomène de résistance chez les insectes.

5.3.2 Lutte physique

Les moyens de lutte physique utilisables, font appel au choc thermique, au froid, aux lits fluidifiés, aux radiations ionisantes et aux ondes électromagnétiques.

a. Modification de l'atmosphère du milieu

Il s'agit d'abaisser le taux d'oxygène de l'atmosphère inter-granulaire jusqu'à un taux létal pour les insectes. Plusieurs auteurs affirment qu'à une concentration en gaz carbonique supérieur à 60% et une concentration en nitrogène (97 à 99%) en raison de la raréfaction de l'oxygène inférieur à 1%, les insectes meurent par asphyxie (Gwinner *et al.*, 1996). Cependant, le dioxyde de carbone est plus efficace que le nitrogène dans la modification de l'atmosphère. Il provoque généralement la déshydratation des insectes

b. La lutte par le froid

Ce procédé consiste à faire passer un courant d'air frais dans la masse des grains. Le maintien des entrepôts à une température inférieure à 10°C entraîne des perturbations physiologiques des insectes suivies d'une mort certaine (Lee *et al.*, 1993).

Cette méthode est très coûteuse en énergie électrique, elle exige des cellules bien isolées est un puissant circuit de ventilation associé au générateur d'air frais.

c. La lutte par la chaleur

Toutes les formes des ravageurs des denrées stockées, se trouvant dans une masse de grains, sont éliminées après 10 minutes d'exposition à une température de 60°C sans aucune conséquence sur le pouvoir germinatif ni sur la qualité boulangère des grains (Fleurat Lessard, 1989 et 1998). D'après Shahein (1991), les individus de *Callosobruchus maculatus* sont éliminés après 3 minutes d'exposition à une température de 50°C.

d. Destruction par les ondes électromagnétiques non ionisantes

L'utilisation de rayonnement de type micro-onde est susceptible d'assurer la destruction totale des formes cachées des insectes après irradiation de courte durée sans laisser de résidus. Le traitement consiste à chauffer les produits à une température létale pour toutes les espèces de ravageurs et aux différents stades par l'infrarouge. De ce fait, les insectes sont tués par l'élévation de la température de leur corps (Fleurat Lessard, 1998).

e. Les radiations ionisantes

L'irradiation des denrées stockées par des rayons gamma est une technique utilisée dans de nombreux pays pour lutter contre les insectes ravageurs, les doses élevées tuent les insectes alors que les faibles doses les stérilisent (Dongre *et al.*, 1997). Des dangers certains pèsent cependant sur l'opération lors de la manipulation et même à long terme sur les consommateurs (Kellouche, 2005).

5.3.3 Lutte biologique

Comme les coûts des pesticides restent élevés et présentent un certain nombre d'inconvénients, il est préférable d'appliquer une lutte ou un contrôle biologique pour les ravageurs. Les avantages offerts par ces procédés biologiques résident dans l'absence totale de risques toxicologiques.

a. Utilisation des parasitoïdes

Les parasitoïdes sont des insectes qui se développent aux dépens des insectes nuisibles, ce sont des larves qui parasitent l'hôte (Mills, 1990).

b. Les prédateurs

Les prédateurs sont des organismes vivants qui tuent d'autres êtres vivants pour s'en nourrir, contrairement aux parasitoïdes ; les prédateurs dévorent plusieurs proies au cours de leur vie. Il existe des acariens prédateurs d'œufs, des larves et des adultes d'insectes ravageurs des grains stockés (Mills, 1990).

c. Les pathogènes

L'utilisation des agents pathogènes (bactéries, virus, champignons) sont réunis sous le concept de biopesticides. Plus de 100 espèces de bactéries entomopathogènes, seuls les genres *Bacillus* et *Seratia* peuvent être utilisés en lutte contre des insectes. L'agent pathogène *Bacillus thuringiensis* est commercialement disponible sous différentes formulations. Ce bio pesticide donne des résultats satisfaisants contre les insectes des denrées entreposées (Gwinner *et al.*, 1996 ; Regnault-Roger *et al.*, 2005 ; Dang –khanh, 2009 et Li Zhuang *et al.*, 2011).

5.3.4 Utilisation des produits minéraux

On peut mélanger aux grains de la cendre de bois ou de sable pour contrôler les infestations de bruche dont tous les stades peuvent être tués par asphyxie lorsque la poudre utilisée est très fine (Lienard *et al.*, 1994 ; Chin Wada *et al.*, 1997 et Renaugt-Roger *et al.*, 2002).

5.3.5 Méthodes alternatives avec des produits dérivés des plantes

De nos jours, de nouvelles perspectives à base d'insecticides biologiques ou naturels ayant une faible répercussion écologique sont ainsi, en train de se développer. Ces substances naturelles d'origine végétale sont constituées de molécules organiques biodégradables.

Ce sont des métabolites secondaires des plantes et leurs dérivés. De nombreuses stratégies de lutte contre les ravageurs sont donc élaborées à partir de ces substances naturelles. Ainsi, les bio pesticides photochimiques sont utilisés de diverses manières. Les organes entiers, généralement des rameaux feuillés sont disposés en couches alternes dans la masse des graines (Intekhab et Aslam, 2009). Les poudres de plantes entières ou d'organes végétaux sont utilisées pour l'enrobage des graines à traiter. Cette

formulation reste toutefois difficile à appliquer à grande échelle. La répartition de la poudre n'étant jamais uniforme dans la masse de graines.

6. Rascasse : *Scorpaena scrofa*

La rascasse en général est caractérisée par une structure cuirassée de la tête et des autres régions du corps, une bouche large munie de petites dents allongées, un corps comprimé, alourdi par des épines, des verrues et des lambeaux cutanés. Elle est sédimentaire et vit sur les fonds rocheux, sablonneux ou boueux. La rascasse se nourrit de poissons, de crustacés et de mollusques. Elle a une grande capacité à « se fondre dans le décor », appelée mimétisme, et mue régulièrement (Cadenat, 1943).

6.1 *Scorpaena scrofa*

La rascasse rouge (*Scorpaena scrofa*) est un poisson de taille environ relativement petite, 15 à 25 cm avec un maximum de 50 cm de long. Elle est de couleur rouge-orangé, avec des marbrures claires et foncées qui lui procurent un excellent camouflage. Son corps est trapu et sa tête massive est couverte de nombreux lambeaux de peau. Ses yeux sont gros et surmontés d'un tentacule court tandis que sa bouche est très large. Le chapon possède une nageoire dorsale échancrée allant de la tête à la queue. Elle a une tache noire et sa partie antérieure est dotée de rayons épineux durs contenant un venin virulent pouvant infliger des piqûres très douloureuses. La partie postérieure quant à elle est dotée de rayons épineux mous.

La période de reproduction de *Scorpaena scrofa* a lieu à la fin du printemps et en début d'été. La rascasse rouge vit généralement posée sur les roches, immobile à l'affût des poissons et des crustacés dont elle se nourrit (Djabali *et al.*, 1993). On la rencontre entre 10 m et 300 m de profondeur en Manche et en Atlantique depuis les Iles Britanniques jusqu'au Sénégal ainsi qu'en Méditerranée.

6.2 Systématique de *Scorpaena scrofa*

-Règne : Animalia

-Embranchement : Vertébrés

-Sous-embranchement : Gnathostomes

-Super-classe : Poisson

-Classe : Osteichtyens

-Sous-classe : Actinoptérygiens

-Ordre : Scorpaeniformes

-Sous-ordre : Scorpaenoides

-Famille : Scorpaenidae

-Genre : Scorpaena

-Espèce : *Scorpaena scrofa*

Nom FAO ; Petite rascasse

Nom commun en Algérie : Rascasse ; Rascassa

(d'après Djabali *et al.*, 1993)

Nous rappelons que dans ce chapitre notre étude s'est déroulée selon deux axes. Le premier axe de recherche s'est intéressé à la purification et l'identification de l'enzyme extraite d'une biomasse marine. Le second s'est orienté vers l'application potentiel bioinsecticide de cette enzyme sur la bruche de pois chiche.

1. Matériel

1.1 Matériel biologique

1.1.1 Biomasse marine

La biomasse marine utilisée pour notre étude est un poisson (rascasse), de la famille Scopaenidae et de l'espèce *Scorpaena srofa*. Les critères de choix reposent sur la disponibilité de ce poisson dans le littoral Algérien et sur une étude faite préalable par Laribi (2005). A partir des abats de ce poisson récupérés des restaurateurs du littoral l'enzyme a été extraite. Les abats ont été transportés dans une glacière au laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des procédés de l'Ecole Nationale Polytechnique d'El Harrach d'Alger (BIOGEP). Les abats ont été vidés, nettoyés, lavés à l'eau distillée, broyés et enfin conditionnés dans des piluliers en plastique et stockés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

1.1.2 Insecte

L'insecte retenu pour notre expérimentation est la bruche de pois chiche de la famille Bruchidae, de groupe Coléoptera et de l'espèce *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775). Cette espèce est cosmopolite, de reproduction rapide et infeste les denrées stockées d'importance économique (le pois chiche).

La souche de *C. maculatus* a été fournie par le laboratoire de Zoologie Agricole et Forestière de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'El Harrach (I.S.N.A). Depuis 2007, l'élevage de masse des insectes a été réalisé au laboratoire (BIOGEP). Cet élevage a été réalisé dans des bocaux en verre d'une capacité de 100 cm fermés par une moustiquaire permettant d'assurer les conditions d'oxygénation. Ces bocaux ont été maintenus à l'obscurité dans une étuve portée à une température de 28°C ±2 °C et une humidité relative de 75% ± 5%. Lors de notre expérimentation, nous avons travaillé sur

des adultes mâles et femelles âgés de 24h. Ces derniers ont été récupérés par la méthode de tamisage.

1.1.3 Pois chiche

La variété de pois chiche utilisée est *Cicer arietinum* a été fournie par l'Institut Technique de Grande Culture de Oued Smar El Harrach (I.T.G.C). Le choix de cette espèce repose sur sa disponibilité sur le marché Algérien. 500g de pois chiche sont mis dans chaque bocal dans lesquels sont rajoutés des adultes de sexe opposé.

2. Méthodes

2.1 Purification et Identification de la chitinase

2.1.1 Purification de la chitinase

La purification de la chitinase a été faite à partir d'un extrait brut d'abats de rascasse, suivie d'une succession d'étapes : Précipitation au sulfate d'ammonium, gel filtration et enfin une échangeuse ionique.

2.1.1.1 Préparation de l'extrait brut

La méthode d'extraction des chitinases brutes est inspirée du protocole expérimental de Gutowska *et al.* (2004) modifiée par Laribi (2005) et Laribi et Mameri (2008). Les échantillons sont préparés en respectant la proportion 1/6 en poids d'abats par volume de solution tampon citrate, pH 5 (acide citrique 0,15 M et phosphate dissodique 0,3 M). Le mélange réactionnel est ensuite incubé à 37°C pendant 3h à 120 tr/min. A la fin de l'incubation, l'échantillon macéré est filtré à travers un tissu de gaze. Le filtrat ainsi obtenu est centrifugé à 6000 g pendant 30 min. Le surnageant récupéré constitue l'extrait brut enzymatique.

2.1.1.2 Précipitation au sulfate d'ammonium

- **Principe**

La précipitation est une technique sélective utilisée pour purifier partiellement et concentrer les protéines solubles dans un surnageant. Le sulfate d'ammonium à forte

concentration entre en compétition avec les protéines pour réagir avec les molécules d'eau. Ceci entraîne une désolvatation suivie d'une précipitation (Kamoun, 1997). Le sulfate d'ammonium a été utilisé préférentiellement pour son pouvoir précipitant élevé, sa grande solubilité, son faible pouvoir dénaturant vis-à-vis des protéines et son faible coût.

- **Technique de précipitation**

La précipitation des protéines de l'extrait a été réalisée par addition lente de sulfate d'ammonium à différents pourcentage de saturation (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 et 85%) sous agitation douce et à froid pendant 2 heures. Les solutions protéiques saturées sont mises à décanter pendant 24 h à 4°C. Le culot est récupéré par centrifugation à 12.000 g pendant 30 mn à 4°C puis remis en suspension dans un volume minimal du tampon citrate. La solution obtenue est dialysée contre l'eau distillée à 4°C pendant toute la nuit.

2.1.1.3 Chromatographie d'exclusion moléculaire.

- **Principe**

Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. On utilise pour cela des granules de gel poreux. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières au niveau du volume mort (appelé V_0) (Figure 13). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires (Bollag, 1994; Wojtos *et al.*, 2012).

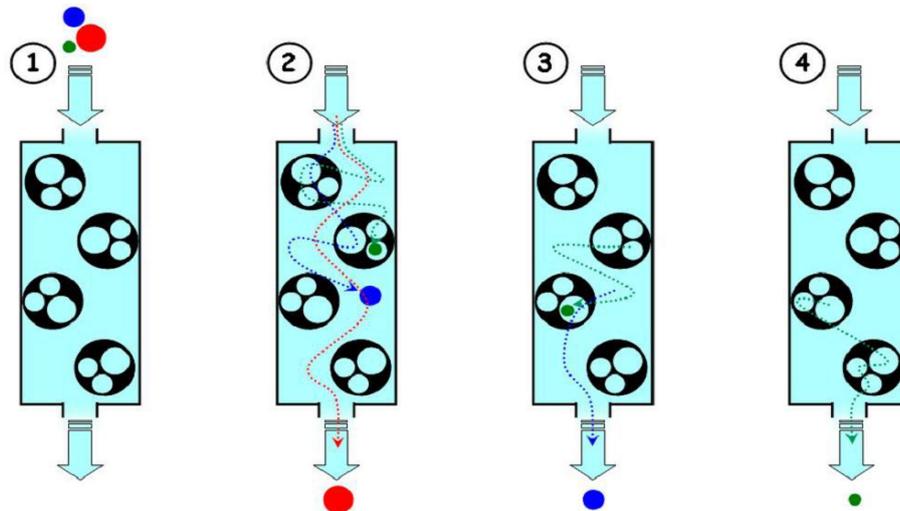


Figure 13 : Principe de la chromatographie d'exclusion d'après Boll0g, (1994); Wojtos et al., (2012). (1) Injection d'un mélange protéique, (2) Elution des protéines de grosse taille, (3) Elution des protéines de taille moyenne, (4) Elution des protéines de taille petite.

- **Protocole**

La colonne utilisée est d'une dimension de 3 cm de diamètre et d'une hauteur de 100 cm (Pharmacia). Le gel utilisé est un gel de séparation (Séphadex G-75) dont le domaine de fractionnement compris entre 10 et 100 KDa. Le gel (10g) est gonflé pendant 48h dans l'eau distillée. Après 72 h, le gel est dégazé afin d'éviter la formation de bulles d'air qui peuvent perturber la régularité du débit. Le gel ainsi préparé est délicatement coulé sur les parois de la colonne en verre jusqu'à une hauteur de 75 cm et équilibrée par le tampon B (HEPES) à pH 7,2. Un étalonnage de la colonne est réalisé par dépôt à la surface du gel de 3ml d'un mélange de cinq protéines standards (Sigma) : la Bovine Sérum Albumine (67 KDa), Ovalbumine (45 KDa), la Trypsine (20 KDa), β Lactoglobuline (18,4 KDa) et le bleu de Dextran (200 KDa) pour la détermination du volume mort V_0 . Le mélange est élué à un débit de 60 ml/h. Après étalonnage de la colonne, un volume de l'extrait enzymatique issu de la précipitation au sulfate d'ammonium est déposé délicatement à la surface du gel à l'aide d'une seringue. L'éluat a toujours été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales. Les éluat ont été recueilli dans un collecteur de fraction de type Pharmacia LKB FRAC-100 à raison de 5ml/ tube. Sur chaque fraction, l'activité chitinasique et l'absorbance à 280 nm déterminée. Les fractions les plus actives ont été « poolées » et concentrées pour la suite

de la purification avec un micro-concentrateur de type (Amicon, Beverly, MA) dont le cut-off de la membrane est de 30 KDa.

2.1.1.4 Chromatographie échangeuse anionique

- **Principe**

C'est une méthode de séparation des protéines en fonction de leurs propriétés ioniques. Les protéines sont séparées selon leur charge.

Un tampon d'éluion est versé sur une solution protéique contenue en haut d'une colonne avec résine. Cette résine est un polymère de silice griffé avec des macromolécules insolubles aux groupements ionisés, ces groupements vont pouvoir réversiblement échanger leurs ions mobiles contre les ions de même charge venant de la solution. Un gradient de NaCl se traduit par une augmentation des ions du tampon qui vont donc entrer en compétition avec les protéines pour s'accrocher à la résine et déterminer le décrochage des protéines. Il suffit alors de récupérer les fractions contenant notre protéine d'intérêt, débarrassée des contaminants ayant une charge différente (Figure 14) (Kamoun, 1997).

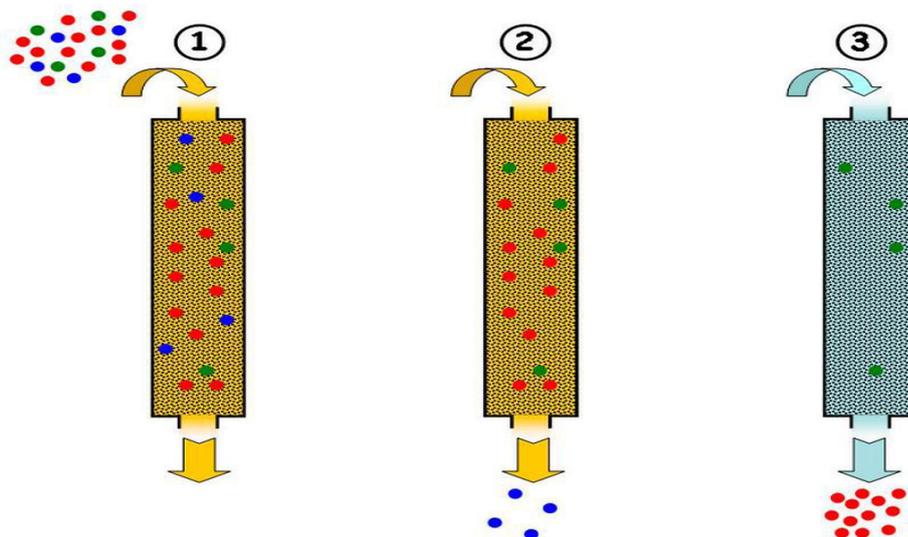


Figure 14 : Principe de la purification par chromatographie échangeuse d'ions d'après Wojtos et *al.* (2012). (1) Injection de l'échantillon sur colonne, (2) Elution des protéines de la même charge que la résine, (3) Dérochage et récupération des protéines des protéines d'intérêt.

- **Protocole**

La colonne utilisée est d'une dimension de 2,6 cm de diamètre et d'une hauteur de 40 cm (Pharmacia). Le gel utilisé est une échangeuse anionique (Mono Q-Sepharose). Ce type de gel permet la fixation des molécules chargées négativement. L'éluion des molécules chargées négativement est réalisé par application d'un gradient de 0 à 500 mM de NaCl .

Les fractions protéiques contenant les chitinases issue de la chromatographie gel filtration sont déposée sur colonne, préalablement équilibrée avec le tampon B. Les protéines adsorbées sont éluées avec application d'un gradient linéaire de NaCl à un débit de 45 ml/h. Les fractions de 5ml sont collectées à un débit de 30ml/h. L'activité chitinasique et les protéines sont analysées. Les fractions contenant la chitinase sont « poolées » et conservées à -20°C dans du glycérol à 20% (v/v) pour les prochaines analyses. Toutes les méthodes de séparations ont été réalisées aux températures comprises entre 0 et 4°C et tous les tampons contiennent de l'azide de sodium (NaN₃) à 0,02 (p/v) pour inhiber la croissance microbienne.

-Préparation du substrat naturel (la chitine colloïdale)

La chitine colloïdale a été préparée à partir de la chitine commerciale (Sigma) par la méthode de Roberts et Selitreni Koff modifiée par Chih et *al.* (2002). Dissoudre 5g de poudre de chitine dans 60 ml de HCL concentré à 4°C. Le mélange est agité et ensuite ajouté à deux litres d'éthanol (95%) avec une agitation rapide toute la nuit à -20°C.

Le précipité récupéré par centrifugation à 5000 g pendant 20 min à 4°C est lavé avec de l'eau distillée stérile jusqu'à neutralité (pH 7). La solution colloïdale est ainsi préparée et stockée à 4°C jusqu'à d'autres applications (dans notre cas la chitine colloïdale a été lyophilisée).

2.1.2 Identification de la chitinase

Pour l'identification de la chitinase, nous avons fait appel à trois techniques différentes : gel filtration, électrophorèse et enfin MALI-TOF.

2.1.2.1 Gel filtration

Pour la détermination de la masse moléculaire de chitinase, des protéines de références ont été utilisées. L'établissement de la courbe d'étalonnage $V_e/V_0 = f(\text{Log PM})$ a permis de déterminer la masse moléculaire de l'enzyme en question (cf 2.1.1.3).

2.1.2.2 Electrophorèse

Deux types d'électrophorèses ont été utilisées l'une en condition dénaturante (SDS-PAGE) et l'autre en condition non dénaturante (Zymogramme).

a) SDS-PAGE

- **Principe**

Cette méthode permet de séparer les protéines en solution en fonction de leur taille et d'évaluer le degré de pureté de l'enzyme. Cette technique est réalisée dans des conditions dénaturantes en présence de β - mercaptoéthanol selon la technique de Laemmli (1970).

Le sodium-dodecyl-sulfate (SDS) est un détergent très puissant, très hydrophobe, qui rompt les liaisons non covalentes. La protéine est dénaturée mais de façon réversible. Un complexe SDS-protéine dénaturé se forme et comporte une charge négative. La charge nette de la protéine devient donc négligeable et seul le poids moléculaire apparaît déterminant. Le mercapto-éthanol est ajouté pour rompre les ponts disulfures. Le gel polyacrylamide permet la migration des différentes protéines selon leur poids moléculaire (PM).

- **Protocole**

La pureté de l'enzyme est estimée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE de 10%. Les enzymes sont préparées dans une solution tampon Tris-HCl (125 mM), pH (6,8), contenant de SDS (10% m/v), du mercapto-éthanol (1% m/v), du glycérol (20% m/v) et du bleu du bromophénol (0,025% m/v). Ces enzymes ; échantillons et les protéines marqueurs : SM04301 (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Germany) sont dénaturées par un traitement thermique à l'eau bouillante pendant 5

minutes. Les protéines se dissocient en leurs sous unités en fixant de grande quantité de détergent (1,4 g de détergent/ g de protéines). Ce qui masque complètement la charge naturelle de la sous unité protéique et leur confère une charge nette négative. Les protéines marqueurs utilisées pour cette analyse sont les suivantes : β -galactosidase (116 KDa), BSA (66,2 KDa), Ovalbumine (45 KDa), Lactate deshydrogenase (35 KDa), Rease Bsp981 (25 KDa), β Lactoglobuline (18,4 KDa) et Lysosyme (14,4 KDa).

Après migration, la révélation des protéines est faite par coloration au bleu de Coomassie R-250 (Bio-Rad). Le gel est plongé dans une solution de coloration contenant 3g de bleu de Coomassie, 100 ml d'acide acétique, 400 ml d'éthanol, et compléter à 1 litre par l'eau distillée. Le gel est ensuite transféré dans une solution de décoloration contenant 100 ml d'acide acétique, 350 ml d'éthanol et compléter à 1 litre d'eau distillée, il est ensuite stocké dans de l'eau avec 20% d'éthanol, ce qui achève la décoloration et évite l'apparition de bactéries. Le gel par la suite est séché ou scanné.

b) Zymogramme

Cette technique est inespérée d'une technique électrophorétique en condition non dénaturante en absence de β -mercaptoéthanol. Après migration sur gel de polyacrylamide, 1mg/ml de la chitine azur a été incorporé dans le gel de séparation de 10 %. L'électrophorèse a été réalisée avec un courant constant de 25 mA. Le gel a été immergé pendant une nuit dans le tampon (tampon \bar{A} , 1% TritonX-100) puis lavé avec de l'eau distillée, et ensuite coloré avec 0,01 % (P/V) du blanc de Calcofluor M2R dans 50 mM Tris-Hcl (pH 8,0) pendant 5min. Après rinçage avec de l'eau distillée, la zone lytique a été visualisée sous UV (Trudel et *al.*, 1989).

2.1.1.3 MALDI-TOF

- **Principe**

La spectrométrie de masse, MS « mass spectrometry » permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse mono-isotopique et de caractériser leur structure chimique, en les fragmentant. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) : Sous l'impact du tir laser, l'échantillon est introduit dans un faisceau d'électron, est résorbé sous vide (environ 5.10^{-7} bar) et les molécules sont ionisées. Les

ions obtenus sont déviés par un aimant et se séparent donc selon leur rapport masse/charge. A charge identique, les ions trop légers ou trop lourds sont déviés et ne seront pas détectés. Les ions de masse attendue sont comptés par un détecteur (Figure 15).

- **Protocole**

La spectrométrie de masse permet non seulement de déterminer la masse des produits étudiés, en mélange ou purifiés, mais également de contrôler les modifications post-traductionnelles des molécules et de donner leur élément de structure extrêmement sensible. Dans le cas particulier des peptides, cette méthodologie permet dans certaines conditions d'obtenir des éléments de la séquence en acide aminés. Il existe deux méthodologies complémentaires en spectrométrie de masse pour l'étude des molécules biologiques : l'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) couplée à un analyseur de masse de type temps de vol (TOF), très efficace pour l'étude directe d'un mélange de produits et l'ionisation par électro nébulisation (ESI) couplée à des analyseurs de masse de type quadripolaire et temps de vol (Qq-TOF). Cette technique permet l'interfaçage entre la séparation chromatographique en phase liquide et le spectromètre de masse. La faible quantité de protéine (chitinase) considérée dans cette étude nous permet de fournir des échantillons sous deux formes :

1. En solution, ce qui permet de mesurer la masse totale de notre protéine.
2. Sur gel d'acrylamide, après migration, ce que permet de fournir une protéine pure avec moins de molécules parasitant le signal de spectrométrie (Tris notamment). Cette forme nécessite une digestion préalable à la trypsine, permettent de traiter des fragments de plus petite taille. Cette technique nécessite d'avoir un tampon pauvre en ion Cl et des concentrations de l'ordre de 5 pmol/μl. En solution ou emprisonnée dans un gel d'électrophorèse, la protéine sera diluée dans un tampon acétate d'ammonium et clivée enzymatiquement par la trypsine, puis l'hydrolysats final est déposé sur la plaque du MALDI- TOF et mélangé à une solution d'acide alpha cyano-4-hydroxycinnamique

Les différentes étapes peuvent être énumérées comme suit :

1. Après coloration au bleu de comassie G-250, la bande protéique d'intérêt est découpée du gel.

2. Laver la bande avec un mélange d'acétonitrile/50 Mm hydrogencarbonate d'ammonium (v/v).
3. Digérer avec la trypsine pendant 16h à 37°C.
4. Arrêter la digestion par addition de 2µl acide trifluoro-acétique (TFA).
5. Le produit de la digestion est par la suite analysé grâce à une matrice d'acide cyano-4-hydroxycinnamique (5 mg/ml) préparée dans 50% acétonitrile contenant 0,1% TFA.

La taille des fragments protéiques sera ainsi déterminée par rapport à un étalon interne en utilisant le spectromètre de masse (Voyager DE STR MALDI-TOF/Mass spectrometer, Applied Biosystems). Les valeurs expérimentales seront par la suite comparées avec celles contenues dans les banques de données pour identifier la protéine.

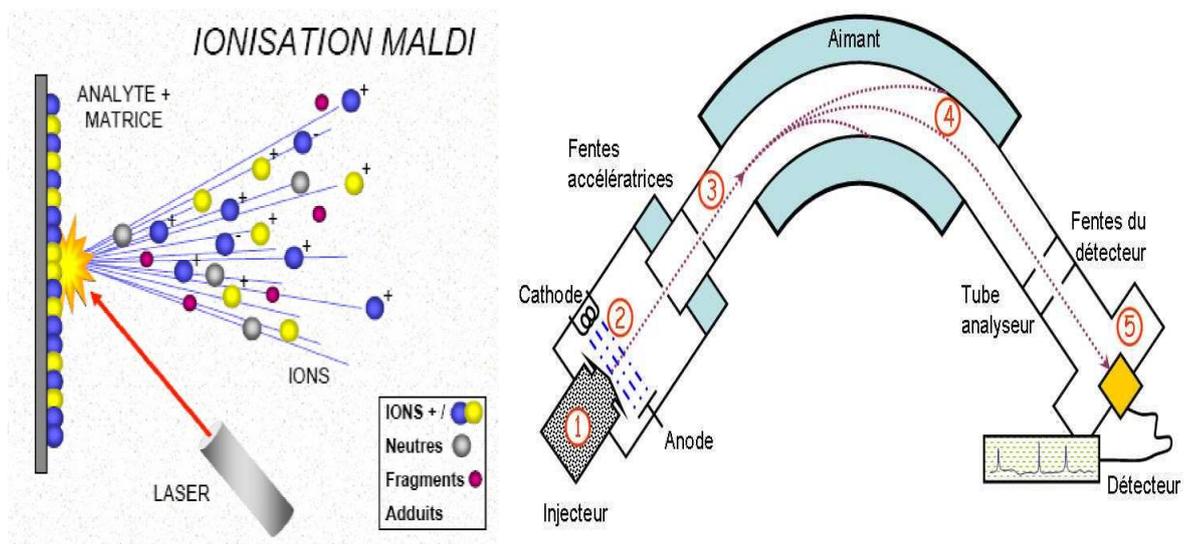


Figure 15: Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse d'après Kim *et al.*, (2012). (1) L'échantillon, (2) Le faisceau d'électron, (3) Les ions, (4) L'aimant, (5) Le détecteur.

2.2 Caractérisation de l'enzyme pure

Après la purification et l'identification de l'enzyme, cette dernière a été caractérisée sur deux plans : physico-chimiques et biochimiques.

2.2.1 Caractérisation physico-chimique

Cette caractérisation porte sur l'étude de l'effet de plusieurs facteurs environnementaux sur l'activité chitinasique (température, pH, stabilité thermique), inhibiteurs ioniques, agents chimiques, ...etc.

2.2.1.1 Effet des inhibiteurs ioniques

L'effet des différents ions métalliques à la concentration de 5Mm sur l'activité enzymatique est également étudié en ajoutant au mélange réactionnel les divalents [$\text{Co}^{2+}(\text{CoSO}_4)$, $\text{Mn}^{2+}(\text{MnSO}_4)$, $\text{Mg}^{2+}(\text{MgSO}_4)$, $\text{Ca}^{2+}(\text{CaCl}_2)$, $\text{Cd}^{2+}(\text{CdCl}_2)$, $\text{Hg}^{2+}(\text{HgCl}_2)$, $\text{K}^{2+}(\text{K}_2\text{SO}_4)$, $\text{Na}_2^{+}(\text{Na}^{2+}(\text{Na}_2\text{CO}_3))$, $\text{Cu}^{2+}(\text{CuSO}_4)$ et $\text{Zn}^{2+}(\text{ZnSO}_4)$] et les monovalents [$\text{Ag}^{+}(\text{AgNO}_3)$, $\text{k}^{+}(\text{KCl})$ et $\text{Li}^{+}(\text{LiSO}_4)$]. L'activité enzymatique résiduelle est mesurée après pré-incubation à 50°C pendant 30mn. L'activité chitinasique mesurée en utilisant la chitine colloïdale comme substrat en absence des réactifs et des ions métalliques est prise comme témoin (100%). L'activité résiduelle est mesurée dans les conditions standards.

2.2.1.2 Effet des agents chimiques

L'effet de certains réactifs chimiques à différentes concentrations a été étudié en utilisant l'Acide chloro-mercuri-benzoïque (*P*-CMB), le N-ethyl-malimide (NEM), dithiothreitol (DTT), le 2-mercaptoethanol (2-ME), l'Acide 2,4,6-trinitrobenzene sulfonique (TNBS), le phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), le 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC), le diethylpyrocarbonate (DEP), le N-bromosuccinimide (NBS) et le N-acetylimidazole (NAI).

2.2.1.3 Effet de pH

Les réactions d'hydrolyse de la chitine colloïdale comme substrat par la chitinase sont réalisées à des pH allant de 2 à 11 à 70°C. Tous les tampons sont utilisés à des concentrations de 50 mM et en présence de 2mM CoSO_4 .

En ce qui concerne la mesure de la stabilité à ce pH, l'enzyme est pré-incubée dans des tampons à différentes valeurs de pH variant de 2 à 9 pendant 48h à 70°C. Les aliquotes sont retirés dans les conditions d'essai standards. Les solutions tampons sont inscrites dans le tableau 3.

Tableau 3: Solutions tampons avec le pH correspondant

pH	Solution Tampon
(2,0 - 3,0)	Glycine-HCl
(3,0 - 5,0)	Citrate
(5,0 - 6,0)	MES [2-(N-morpholino)éthanesulfonique]
(6,0 - 8,0)	Acide4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazine ethane sulfonique (HEPES)
(8,0 - 9,0)	Tris-HCl
(9,0 - 10,0)	Glycine-NaOH
(10,0 - 11)	Bicarbonate-NaOH

2.2.1.4 Effet de la température

Les réactions de l'hydrolyse de la chitine colloïdale par la chitinase sont réalisées en maintenant le pH à 5 et en faisant varier la température de 40 à 100°C en absence et en présence de 2 mM CoSO₄.

Concernant l'étude de la stabilité thermique qui est un critère de sélection des enzymes destinées à la biotechnologie (Scriban, 1999), l'enzyme purifiée est incubée pendant 24h à différentes températures de 40 à 100°C. Un échantillon est prélevé à des intervalles de temps réguliers pour doser l'activité résiduelle dans les conditions standards. Le contrôle étant l'enzyme pure non pré-incubée (100%).

2.2.1.5 La thermo - stabilité

La thermo stabilité de la chitinase purifiée a également été examinée. L'enzyme est pré incubée en absence et en présence de CoSO₄ (0 et 2 mM) à différentes températures (70, 80, 90 et 100°C).

2.2.1.6 Effet de la conservation sur la stabilité

L'extrait enzymatique pur a été conservé à 4°C et à – 20°C dans un tampon citrate (pH 5) pendant 1 mois, 2 mois et 3 mois respectivement. L'activité chitinasique a été mesurée dans les conditions optimales ;

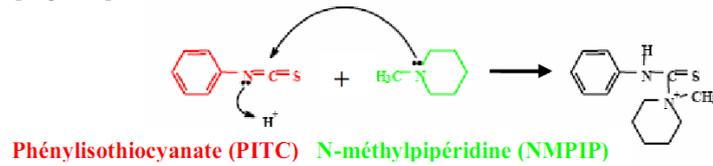
2.2.2 Caractérisation biochimique

La caractérisation biochimique de l'enzyme est basée sur la détermination de l'extrémité NH₂-terminal, étude de la cinétique et l'effet de la nature et de la concentration du substrat.

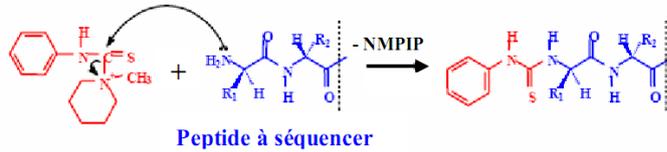
2.2.2.1 Séquençage de l'extrémité NH₂-terminal de l'enzyme

La séquence NH₂-terminale de la chitinase purifiée, produite par la rascasse, *Scorpeana scrofa*, a été déterminée par la méthode d'Edman automatisée sur microséquenceur des protéines (Hewick et *al.*, 1981). Elle comporte les trois étapes classiques de séquençage : le couplage, le clivage et la conversion (Figure 16).

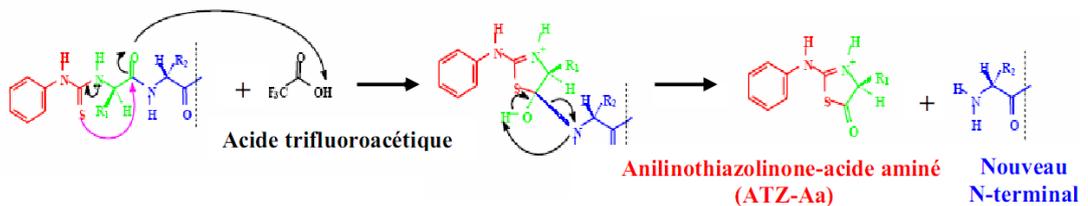
Etape 1 : Couplage du phénylthiocyanate (PITC) au N-méthylpiperidine (NMPIP : base)



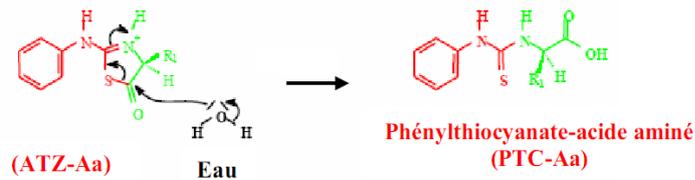
Etape 2 : Couplage du PITC-base au peptide



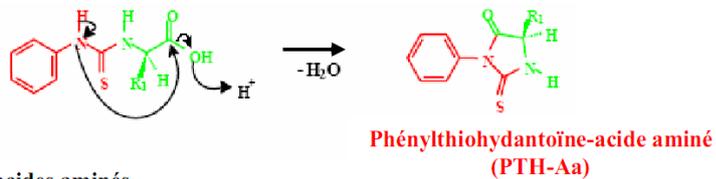
Etape 3 : Clivage de l'acide aminé N-terminal modifié par l'acide trifluoroacétique



Etape 4 : Conversion de l'ATZ-acide aminé en PTC-acide aminé



Etape 5 : Conversion du PTC-acide aminé en PTH-acide aminé



Etape 6 : Analyse des PTH-acides aminés

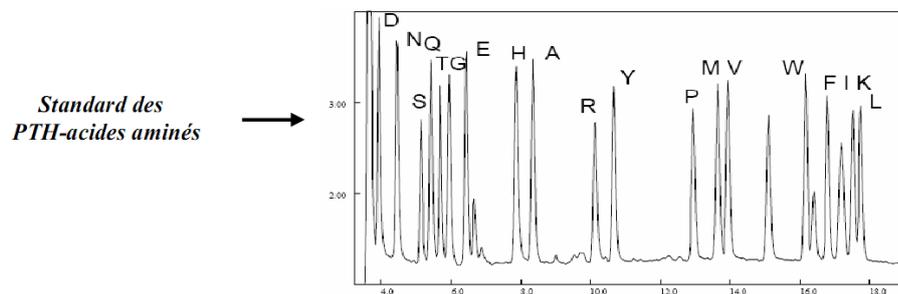


Figure 16 : Dégradation chimique d'EDMAN automatisée sur micro séquenceur des protéines d'après Hunkapiller et Hood (1978); Hewick, *et al.* (1981).

2.2.2.2 Spécificité du substrat

La spécificité du substrat de la chitinase purifiée a été déterminée en utilisant des substrats naturels et synthétiques à différentes concentrations dans des conditions d'essai standards. L'activité chitinasique a été déterminée à 50°C et à pH 5, la quantité des sucres réducteurs ont été quantifiés par la méthode colorimétrique de la DNS. La concentration et la nature du substrat testé sont figurées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Concentration et nature du substrat

Substrats	Concentration (mg/ml)
<u>Substrat naturel</u>	
Chitine colloïdale	20
Chitine glycol	20
Chitosane glycol	20
Chitobiose	30
Chitotriose	30
Chitooligosacchrides (mélange de chitotetraose, chitopentaose et chitohexaose)	30
Amylose	20
Carboxyméthyl-cellulose	20
Cellobiose	30
Laminarine	30
<u>Substrats synthétiques</u>	
<i>P</i> -NP(NAG)	2
<i>P</i> -NP(NAG) ₂	2
<i>P</i> -NP(NAG) ₃	2
<i>P</i> -NP(NAG) ₄	2

2.2.2.3 Cinétique enzymatique

L'activité enzymatique de notre chitinase purifiée ainsi que celles de (SGChi et SVChi) ont été réalisées en utilisant un substrat naturel (chitine colloïdale) et synthétique [*P*-NP-(NAG)₂] sur une gamme de concentration allant de 0,10 à 30 mg/ml à 60°C, pH 5 pendant 5mn (Annexe n° 2). Chaque essai a été répété trois fois. Les vitesses initiales ont été déterminées avec $V = d[p]/dt$. L'étude des variations des vitesses de la réaction enzymatique en fonction de la concentration du substrat permet de déduire le type de cinétique caractérisant l'enzyme. La détermination de l'équation de la vitesse d'hydrolyse enzymatique de la chitine est nécessaire pour prévoir les performances de l'enzyme.

Les valeurs théoriques de l'activité sont calculées à partir des vitesses initiales observées en appliquant la transformation de l'équation de Michaelis-Menten.

Les paramètres cinétiques ont été déterminés par les courbes de Line Weaver-Burk. Les valeurs des constantes cinétique K_m (constante de Michaelis-Menten) et la vitesse maximale V_{max} ont été calculées en utilisant Software package Hyper 32 développé à l'université de Liverpool (<http://homepage.ntlworld.com/john.easterby.32tml>).

La valeur de la constante catalytique a été calculée à partir de l'équation suivante :

$$K_{cat} = V_{max} / [E] \quad (1)$$

[E] : Concentration de l'enzyme active
 V_{max} : Vitesse maximale.

2.3. Méthodes analytiques

Les méthodes analytiques utilisées ont servi à détecter la présence ou l'absence des protéines dans les différentes fractions éluées suivi d'un test d'activité chitinasique et d'autres analyses.

2.3.1 Dosage des protéines

- **Principe**

La concentration protéique des échantillons est déterminée par la méthode de Bradford (1976). Cette technique de Bradford permet de doser les faibles concentrations de protéines. Elle utilise le bleu de coumassie G 250 dans la forme (brun orange) et convertie en forme bleue caractéristique du complexe formé entre les groupements NH_3^+ des protéines et le réactif.

- **Technique de dosage**

Nous avons utilisé le Kit « Bio-Red Protein Assay », en mélangeant à chaque fois 200 μl d'une solution à base de bleu de Coomassie G250, à 800 μl d'une solution diluée de la protéine. La densité optique est mesurée à 595nm contre un blanc qui ne contient pas d'extrait enzymatique. La droite d'étalonnage obtenue dans les mêmes conditions a permis de déterminer la concentration des protéines. Le sérum albumine bovine (BSA) a été utilisé comme protéine de référence (Annexe n°3).

2.3.2 Test d'activité chitinasique

- **Principe**

La méthode utilisée pour le dosage de l'activité chitinasique sur un substrat naturel est celle décrite par Fines et Holt, (2010). Pour le substrat synthétique *P-NP*-(NAG)_n (n=1- 4) est celle de Ohtakara, (1988).

- **Protocole pour un substrat naturel**

Le mélange réactionnel est constitué de 0,5ml de la solution d'enzyme mélangé avec 0,5ml du tampon de 50Mm d'acide 2-(N-morpholino) éthanesulfonique (MES) (tampon A) et supplémenté avec 2Mm CoSO_4 à pH 5 contenant 10mg/ml de la chitine colloïdale, incubée pendant 1heure à 37°C. Le mélange est bouilli pendant 10mn puis, refroidi et centrifugé (30mn à 13000g) pour éliminer la chitine non dégradée. La lecture est comparée avec une courbe étalon préparée avec une série de dilution de NAG (0 à 10 mg/ml).

Une unité d'activité chitinasique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour produire 1 μ mol de NAG/mn.

- **Protocole pour un substrat synthétique**

250 μ l de la solution d'enzyme et 250 μ l de 1mg/ml de *P*-NP-(NAG)_n sont ajoutés à 250 μ l du tampon A, puis incubés à 37°C pendant 30mn. Après incubation, 250 μ l de 200 mM de carbonate de sodium sont ajoutés et la *P*-nitrophenol libéré est mesuré à 420 nm.

Une unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme libérant 1 μ mol de *P*-nitrophenol/min à 37°C.

2.3.3 Dosage des acétylhexosamines

- **Principe**

La production totale de N-Acétyl-Glucosamine (NAG) a été déterminée par la méthode spécifique des sucres aminés (Reissig *et al.*, 1955). Les sucres aminés sont caractérisés par la réaction d'Elson et Morgan. A chaud et en milieu alcalin, ils se cyclisent sous forme furanique, par élimination d'une molécule d'eau, acquièrent une double liaison. Le produit formé se complexe en milieu acide avec le para-diméthylaminobenzaldehyde pour donner une coloration violacée.

- **Technique de dosage**

Cette technique de dosage fait appel à un réactif A constitué d'une solution de tétraborate de potassium (0,8M) dont le pH est ajusté à 9,1 avec KOH (1N) et un réactif B de p-Diméthylaminobenzaldehyde (DMAB) constitué de 1,5 g de DMAB dissous dans 100 ml d'acide acétique glacial pur contenant 1,25 % d'une solution HCl (12 N), 0,1ml du réactif A est ajouté à tous les échantillons à doser contenant 0,5 ml d'extrait enzymatique, ainsi qu'un témoin pour le blanc (0,5 ml d'eau distillée). Le mélange est chauffé à 100°C pendant 2 à 3 mn et refroidi ensuite dans un bain d'eau froide afin de ralentir la vitesse de la réaction. 3ml du réactif B sont ajoutés à chaque échantillon et après homogénéisation, les tubes sont incubés dans un bain-Marie à 37°C pendant 30mn. Les absorbances sont été lues au spectrophotomètre à 585 nm aussi vite que possible, car l'intensité de la couleur baisse d'environ 0,5 %, toutes les 5min. La concentration en NAG a été déterminée à l'aide d'une courbe étalon préalablement établie (Annexe n°3).

2.3.4 Dosage des sucres réducteurs par DNS

- **Principe**

Les sucres réducteurs sont des sucres contenant un groupement aldéhyde oxydable en groupement carboxylique par une réaction de réduction. Ils sont alors capables de réduire, sous des conditions spécifiques l'acide 3,5-dinitrosalicilique (DNS) (Miller, 1959).

- **Protocole**

A chaud et au milieu alcalin, 0,5 ml d'une solution à analyser sont additionné à 1ml d'eau distillée et 1 ml du réactif de DNS, le mélange est porté au bain marie à 100°C pendant 5 minutes, après refroidissement 7,5 ml d'eau distillée sont ajoutées, homogénéisés et laissés reposer pendant 15 minutes. L'absorbance est lue à 550 nm contre le blanc. Une courbe d'étalonnage est établie en utilisant une solution mère de glucose pour déterminer la concentration de ce dernier (Annexe n° 3).

2.4. Etude de l'effet des chitinases sur la bruche de pois chiche

La présente étude a pour objectif de déterminer l'effet des chitinases brutes et purifiées sur quelques propriétés biologique de l'insecte : cuticule (élytres), appareil reproducteur et appareil digestif.

2.4.1 Evaluation de la toxicité par effet contact

2.4.1.1 Effet par contact en absence de graines

L'étude a pour but d'évaluer l'action toxique de la chitinase brute et purifiée sur l'insecte. Cela nous permet de connaître l'impact de ces chitinases sur les élytres et l'appareil reproducteur du déprédateur.

a) Effet par contact sur la cuticule

Le principe est de mettre en contact les adultes de *C. maculatus* avec la chitinase brute et purifiée selon le mode de pénétration par contact direct ensuite de déterminer la

mortalité provoquée par le traitement. Pour cela, nous avons utilisé 8 doses de chitinase brute (3, 6, 9, 12,15, 18, 21, et 24%) et 5 doses de chitinase purifiée (1, 1.5, 2, 2.5 et 3%) et répétée 5 fois le test pour chaque dose de comportement des insectes a été noté lors des différents essais de toxicité en vue de déterminer les symptômes de l'intoxication.

Nous avons imprégné la surface interne des boîtes de Pétri (y compris le couvercle) avec 1 ml de l'extrait chitinasique brut et purifié et 1ml de la solution tampon (témoin). Après séchage des boîtes de Pétri, 10 couples d'adultes de bruche âgés de 0 à 24h sont déposés dans des boîtes qui sont ensuite fermées hermétiquement avec des bandes adhésives et déposées dans l'étuve. Après 1h, 24h, 48h et 72h de traitement, nous avons dénombré les insectes morts dans les boîtes traitées et les boîtes non traitées (témoin).

Le nombre d'individus dénombrés morts dans une population traitée par un toxique n'est pas le nombre réel d'individus tués par ce dernier. Il existe en fait dans toute population traitée une mortalité naturelle qui vient s'ajouter à la mortalité provoquée par le biocide, par ailleurs, les pourcentages de mortalité des individus sont corrigés au moyen de la formule d'Abbott, (1952) qui est la suivante : (Annexe n°4)

$$MC (\%) = \frac{M - Mt}{100 - Mt} \times 100 \quad (2)$$

MC (%) : Pourcentage de mortalité corrigée.

M (%) : Pourcentage de mortalité enregistrée dans la population traitée.

Mt (%) : Pourcentage de mortalité enregistrée dans la population témoin

Le pourcentage des mortalités corrigées est transformé en Probit (Annexe n°4) et représenté graphiquement en fonction des logarithmes des doses afin d'évaluer la dose létale (DL50) ou, des logarithmes de temps pour estimer le temps létal.

$$Y = a + \text{Log}(X) \quad (3)$$

Y : Valeur Probit correspondant à l'effet insecticide

X : Dose d'extrait test

b) Effet par contact sur l'appareil reproducteur

Cinq couples d'insectes de *C. maculatus* âgés de 0-15mn (femelles vierges) sont traités séparément avec des différentes doses de l'extrait brut (3%,6%,9%,12%,15% et

21%) et la solution tampon d'extraction (témoin) pendant 24h et 48h dans des boites de Pétri de 14,5cm de diamètre. Pour chaque dose les essais ont été répétés cinq fois. Les bruches adultes ayant survécu au traitement par l'extrait brut chitinasique sont maintenues sur les graines de pois chiche jusqu'à leur mort. Les œufs pondus sont comptés sous loupe binoculaire à partir du 5^{ème} jour. Les pois chiches sont ensuite placés dans l'étuve d'élevage jusqu'à l'émergence des adulte. Les insectes sont retirés des boites de Pétri au fur et à mesure qu'ils sortent des graines de pois chiches.

Le taux de réduction de la ponte est donné par la formule suivante :

$$\text{Tr (\%)} = \text{Nt} - \text{Ne} / \text{Nt} \times 100 \quad (5)$$

Tr : Taux de réduction par rapport au témoin.

Nt : Nombre d'œufs dans le témoin.

Ne : Nombre d'œufs dans l'essai.

2.4.1.2 Effet par contact en présence de graines

Pour chaque essai, 2 ml de chaque dose d'extrait brute chitinasique (3, 6, 9, 12,15, 18, 21, et 24%) et 2ml de chaque dose d'extrait purifié (1, 1.5, 2, 2.5 et 3%) sont pulvérisés de manière homogène dans 100 gr de graines. Cette opération est répétée 3 fois pour chaque dose. Ces lots de graines traitées sont infestés par 10 couples d'insectes âgés de 0 à 24 h. Les comptages des insectes morts sont réalisés après 1h, 24h, 48h et 72h. La mortalité enregistrée dans les lots de graines traitées est exprimée selon la formule d'Abott, en mortalité corrigée, en tenant compte de la mortalité naturelle observée chez les témoins.

2.4.2 Evaluation de la toxicité par ingestion

L'étude a pour but d'évaluer l'action toxique de la chitinase brute et la chitinase purifiée sur les larves de *C. maculatus* par ingestion. Cela nous permet de connaitre l'impact de ces chitinasés sur le tube digestif du déprédateur.

La méthode utilisée est celle de la graine reconstituée décrite par Xie et al. (1996). 50 gr de farine de pois chiche sont mélangés à 14 ml de l'extrait brut chitinasique à différentes doses 24% (dose létale) et de l'extrait chitinasique purifié à la dose létale de

3%. Les graines utilisées pour le témoin sont confectionnées avec de la farine de pois chiche et de la solution tampon citrate de la grosseur d'un pois chiche. Ces graines reconstituées sont séchées à l'étuve à 30°C et à une humidité relative de 70-80% pendant 24h. Cinq graines de pois chiche à raison de 10gr sont déposés dans des boîtes de Pétri de 14cm de diamètre avec 5 couples de bruches âgés de 0 à 24h. Les œufs pondus sont comptés journallement jusqu'à la mort des femelles et remplacés dans l'étuve pour évaluer la fertilité (les œufs blancs opaques indiquent que la larve a pénétré dans la graine).

Le taux de mortalité larvaire est donné par la formule suivante :

$$\mathbf{Tml\ (\%) = Noe - Nae / Noe \times 100} \quad \mathbf{(6)}$$

Tml : Taux de mortalité larvaire.

Noe : Nombre d'œufs éclos.

Nae : Nombre d'adultes émergeant.

2.5 Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage MEB (ou « Scanning Electron Microscopy » SEM) est une technique puissante d'observation de la topographie des surfaces. Elle est fondée principalement sur la détection des électrons secondaires émergents de la surface sous l'impact d'un très fin pinceau d'électrons primaires qui balaye la surface observée et permet d'obtenir des images avec un pouvoir séparateur souvent inférieur à 5 nm et une grande profondeur de champ (Eberhart, 1989).

2.6 Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées afin de déterminer l'action des chitinases sur les différentes parties de l'appareil digestif de la larve.

La technique utilisée afin de réaliser ces coupes histologiques est celle de Martoja et Martoja (1967). Nous avons récupéré au cours de notre expérimentation des larves qui ont quittées les graines reconstituées de pois chiche traitées à des doses létales de 24% et 3%. Les larves témoins et les larves traitées sont mises dans les piluliers étiquetés et rempli d'un liquide fixateur (formol 10%). Avant de passer à l'étape de déshydratation et

éclaircissement, les larves sont lavées à l'eau distillée pendant 24h afin d'éliminer l'excès de liquide fixateur

2.6.1 Déshydratation et éclaircissement

Les tubes digestif subissent une déshydratation par immersion dans des bains d'alcool d'éthanol de degré croissant (70°- 90°- 100°), suivis d'un éclaircissement avec deux bains de toluène, pendant 10 min chacun.

2.6.2 Imprégnation et enrobage dans la paraffine

Les tubes digestifs sont imprégnés de paraffine après une incubation de 2 heures à 60°C, ils sont ensuite transportés dans des moules de métal ajustés aux cassettes perforées de plastique. Les cassettes sont remplies de paraffine et refroidies, en les déposants sur une plaque métallique réfrigérée. L'enrobage des tubes digestifs dans les blocs de paraffine, permet de confectionner des coupes régulières de 3µm d'épaisseur, à l'aide d'un microtome; Les coupes sont étalées sur des lames de verre.

2.6.3 Coloration

Après déparaffinage des coupes par la chaleur et des bains de xylène pendant 3 à 5min chacun, celles-ci doivent subir une réhydratation par immersion dans 2 bains d'éthanol absolu de 3à 5 min chacun, suivis de 3 bains d'éthanol à 90°, 70°, 50° et un bain d'eau distillée. Les coupes sont colorées à l'hématoxyline éosine, qui colore respectivement les noyaux en violet et le cytoplasme en rose-rouge.

2.6.4 Montage de lames

Après les étapes de déshydratation et d'éclaircissement, les coupes sont montées entre lame et lamelle avec une résine « Eukit », pour l'observation au microscope photonique.

2.7 Toxicité anormale (test d'innocuité) par voie orale

Le but est de relever par méthode biologique la présence d'une ou plusieurs anomalies de nature variée chez l'animal testé.

- **Principe**

Le contrôle consiste en l'administration à des souris dans des conditions définies, une dose unique et adéquate des extraits chitinasique brutes et purifiés par voie orale. Aucune anomalie ni mortalité ne doivent être constatées après une période d'observation de 48 heures.

- **Méthode**

Selon l'Organisation de Cooperation et de Developpement Economique (ODCE) (1974). Les souris de type Albinos (souche SWISS NMRI) dont le poids varie de 17 à 22 Kg et élevées à SAIDAL Mohammadia, Alger sont mises à jeun la veille de l'essai. L'extrait chitinasique est administré par voie orale.

3. Analyses statistiques

Nous avons réalisé des tests paramétriques basés sur l'analyse des variances (ANOVA), réalisé par le logiciel version 5. Lorsque cette analyse révélait des différences significatives, nous avons complété notre analyse par le test de Newman et Keuls permettant une comparaison multiple des moyennes en fonction des conditions et du temps d'exposition.

Une autre analyse a été réalisée pour l'ensemble des facteurs étudiés, par l'outil statistique Analyse en Composantes Principales (ACP). Cette dernière fait l'étude de l'ensemble des corrélations entre les différentes variables du système, devrait constituer une approche plus complète de la notion de traitement bio insecticide. Il nous permettra dans une approche classique, d'étendre nos observations à l'ensemble des variables de ce système. Notre objectif est d'étudier la corrélation qui existe entre les différentes variables (temps et la dose) et leur efficacité sur les caractères biologiques (fertilité, fécondité et contact).

L'objectif de notre travail de thèse est d'étudier la purification et l'identification de l'enzyme extraite des abats de la rascasse. Une étude sur la caractérisation de cette enzyme a été effectuée à savoir les différents paramètres physico-chimiques et biochimiques. Enfin une évaluation de l'activité insecticide de cette enzyme a été étudiée.

1. Purification et identification de la chitinase

1.1 Purification de la chitinase

La stratégie de purification de la chitinase pure extraite de la rascasse a été réalisée sur l'extrait brut des abats de rascasse *Scorpeana scrofa* selon les étapes suivantes : précipitation au sulfate d'ammonium, suivie d'une chromatographie sur gel filtration et enfin une chromatographie échangeuse d'ions.

1.1.1 Précipitation de l'extrait enzymatique au sulfate d'ammonium

Dans le cas de notre étude, nous avons choisi le sulfate d'ammonium comme agent de précipitation pour son faible pouvoir dénaturant des protéines, son pouvoir précipitant élevé et sa grande solubilité.

Différents degrés de saturation en sulfate d'ammonium ont été testés (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 et 85%). Après chaque précipitation, l'activité enzymatique de la chitinase ainsi que la concentration en protéines totales ont été respectivement déterminés dans le surnageant et le culot. Au cours des différents essais réalisés, nous avons observé une augmentation des concentrations des protéines dans le culot proportionnellement aux taux de saturation étudiés, de même que l'activité chitinasique est proportionnelle aux concentrations des protéines. Un maximum d'activité chitinasique est observé à un taux de saturation de 85% avec un rendement de 72%..

Sandeep Varma *et al.* (2009) et Patel *et al.* (2010) ont observé des résultats similaires lors de la précipitation totale des chitinases pour une concentration au sulfate d'ammonium comprise entre 80 et 90%.

1.1.2 Gel filtration

La gel filtration fait suite à la précipitation au sulfate d'ammonium. Après élution, l'activité chitinasique et dosage des protéines totales ont été effectués.

Les résultats obtenus montrent l'apparition de deux pics de protéines. Cependant l'activité chitinasique correspond seulement au pic II (figure 17).

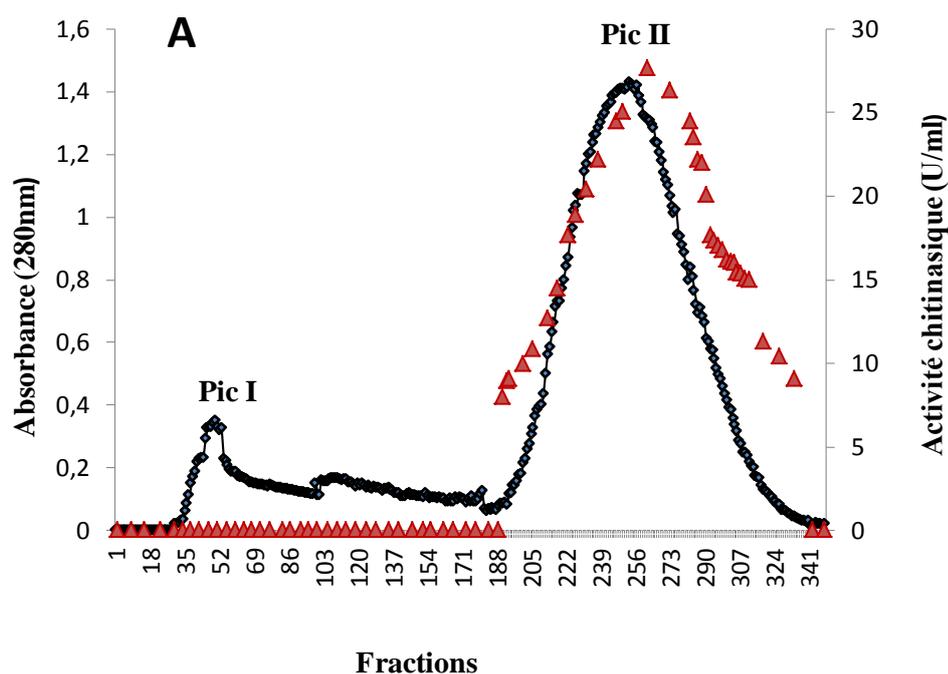


Figure 17: Profil chromatographique sur gel filtration (gel Sephadex G-75), Tampon B, pH 5, Débit 60 ml/h. Protéines (■), L'activité chitinasique (▲)

L'extrait enzymatique résultant de la précipitation au sulfate d'ammonium est un milieu riche en protéines et en activité chitinasique. La chromatographie sur gel filtration a permis d'éliminer aussi une partie de ces protéines. L'activité spécifique de cet extrait chitinasique a été de 5,04% avec un rendement et un facteur de purification ont été respectivement de 47% et 163%.

1.1.3 Echangeuse anionique

Après identification de la fraction qui contient la chitinase (pic II) issue de la gel filtration, celle-ci a été éluee par échangeuse d'anion. D'après la figure 18 deux pics de protéines ont été observés mais l'activité chitinasique a été observée uniquement dans le pic II.

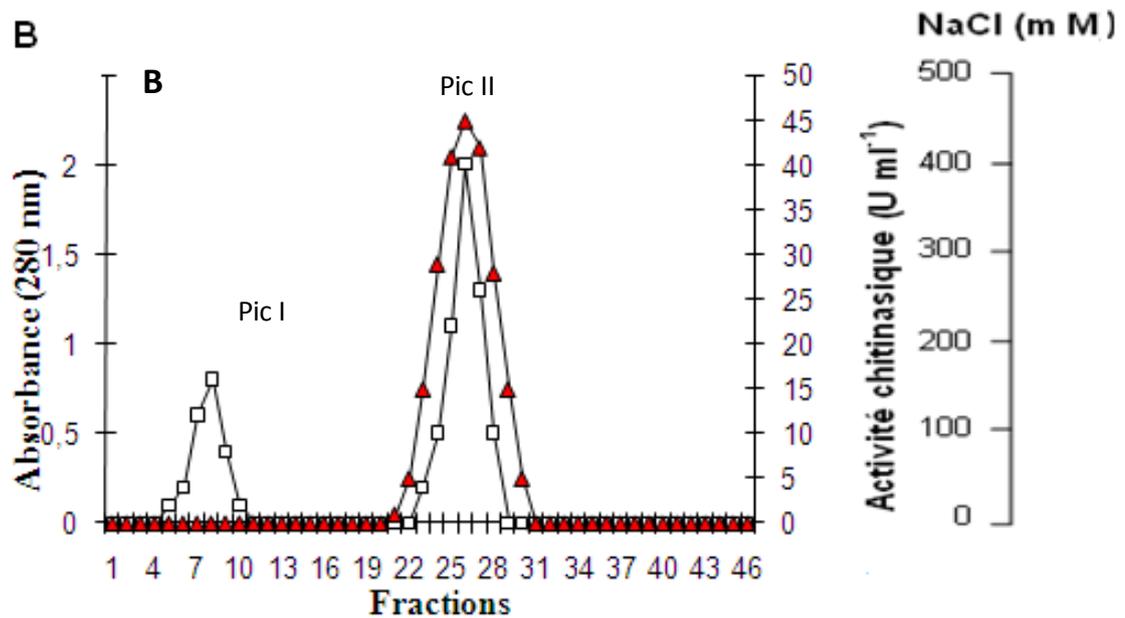


Figure 18: Profil Chromatographique sur Mono Q-Sepharose de la fraction II. Tampon B, pH 7, Débit 30ml/h. Protéines (□), L'activité chitinasique (▲)

La chitinase a été purifiée en utilisant des techniques de purification standards, sulfate d'ammonium (10 -85%), Sephadex G-75 et Mono Q-Sepharose échangeuse d'ions.

Les résultats illustrés par la figure 18, montrent que cette étape de purification a permis d'éliminer le reste des protéines contenant dans la solution enzymatique avec apparition d'un pic majoritaire (pic 2) élué avec un gradient de NaCl (0-500 mM). A ce niveau l'enzyme est purifiée 163 fois avec une diminution de l'activité totale de 33% par rapport à l'activité initiale (Tableau de purification). L'activité spécifique de l'extrait enzymatique brut passe de 0,04 U/mg à 504 U/mg. Notons aussi que des pertes de rendement d'activité ont été constatées après chaque étape de purification jusqu'à atteindre 33% avec une perte de protéines totales. Passant de 518 mg initialement à 1mg à la fin des étapes de purification. En effet chaque étape supplémentaire, qui permet d'augmenter la pureté, va entraîner des pertes de protéines et donc une diminution du rendement. En parallèle, il y a eu augmentation de l'activité spécifique par rapport à l'activité initiale ce qui reflète que l'enzyme a été purifiée.

Fines et Holt. (2010) ont purifié une chitinase issue du tractus digestif du juvénile cobia *Rachycentron canadum* et sont arrivés à un facteur de purification de 8,1 et un rendement en activité de 7,64%. Ces paramètres de purification ont été obtenus après précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation en chromatographie échangeuse d'ions.

1.2 Identification de la chitinase

1.2.1 Détermination du poids moléculaire

Pour déterminer le poids moléculaire de la chitinase avec certitude, nous avons utilisé trois techniques d'analyses différentes (Gel filtration, SDS-PAGE et MALDI-TOF/MS).

1.2.1.1 Gel filtration

Pour déterminer la masse moléculaire de la chitinase, des protéines de référence ont été utilisées. L'établissement de la courbe d'étalonnage $V_e/V_0 = f(\text{Log PM})$ a permis de calculer la masse moléculaire de l'enzyme par extrapolation (figure 19). Le poids moléculaire de l'enzyme déduit est approximatif de 50 KDa. Ce résultat se rapproche de ceux obtenus par d'autres auteurs, tels Proespraiwong *et al.* (2010).

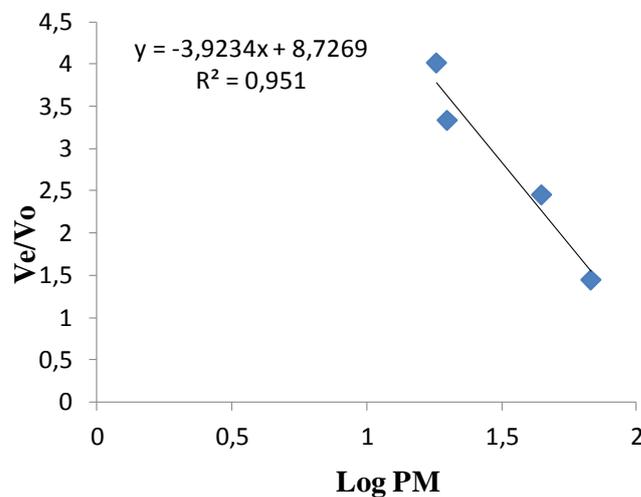


Figure 19 : Courbe d'étalonnage des standards sur gel Séphadex G-75.
Tampon B, pH 5, Débit 60ml/h.

1.2.1.2 Electrophorèse

Afin d'évaluer le degré de pureté de la chitinase et de déterminer sa taille, nous avons analysé des aliquotes issus de la précipitation au sulfate d'ammonium et aux deux

chromatographies (Séphadex G-75et Mono Q-Sepharose). Ces derniers sont analysés par électrophorèse de protéine sur gel de polyacrylamide (10%) dans des conditions non dénaturante (Zymogramme ou électrophorèse native) et dénaturante (SDS-PAGE) en absence et en présence de β -mercaptoéthanol.

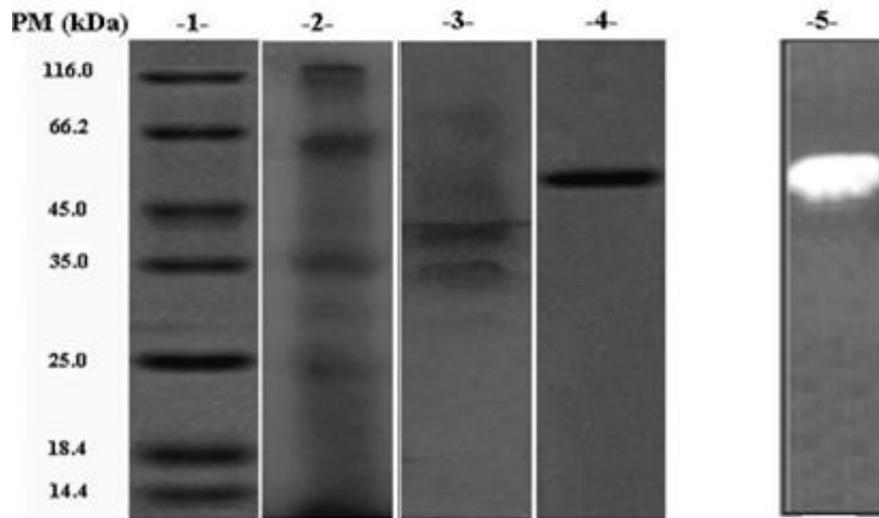


Figure 20: Profil électrophorétique SDS –PAGE et Zymogramme.
(1) Protéines standards, (2) Précipitation au sulfate d’ammonium, (3) Gel filtration,
(4) Echangeuse anionique, (5) Zymogramme

Le profil électrophorétique de SDS-PAGE a permis de révéler 5 colonnes. La première représente le poids moléculaire des protéines marqueurs utilisées comme référence, la deuxième révèle 6 bandes de protéines issues de la précipitation au sulfate d’ammonium. La troisième colonne trace deux bandes de protéines issues de la gel filtration. En fin nous observons une seule bande protéique monomère issue de l’échangeuse anionique au niveau de la quatrième colonne. Cette dernière correspond à notre enzyme chitinase de poids moléculaire apparent d’environ 50 KDa, son activité enzymatique a été confirmée par l’électrophorèse Zymogramme en condition non dénaturante (Figure 20).

Les travaux de Karasuda *et al.* (2004) et Matsumiya *et al.* (2006) concluent que les chitinases extraites respectivement à partir des poissons *Pagrus major* et l’*Hexagrammos otakii* sont monomériques.

1.2.1.3 MALDI-TOF/MS

L'analyse du spectre de la spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS permet de visualiser un pic de 25,019 KDa qui représente deux moitiés symétriques du deuxième pic montrant la masse moléculaire de la chitinase qui est de 50,18 KDa.

L'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS) montre que la masse moléculaire exacte de la chitinase est de 50,103 KDa (Figure 21). Cette similarité de masse moléculaire avec les techniques précédentes montre donc que l'enzyme est monomérique.

Après avoir purifié et déterminé le poids moléculaire exact de l'enzyme étudiée, nous avons suggéré de la nommée SsChi50.

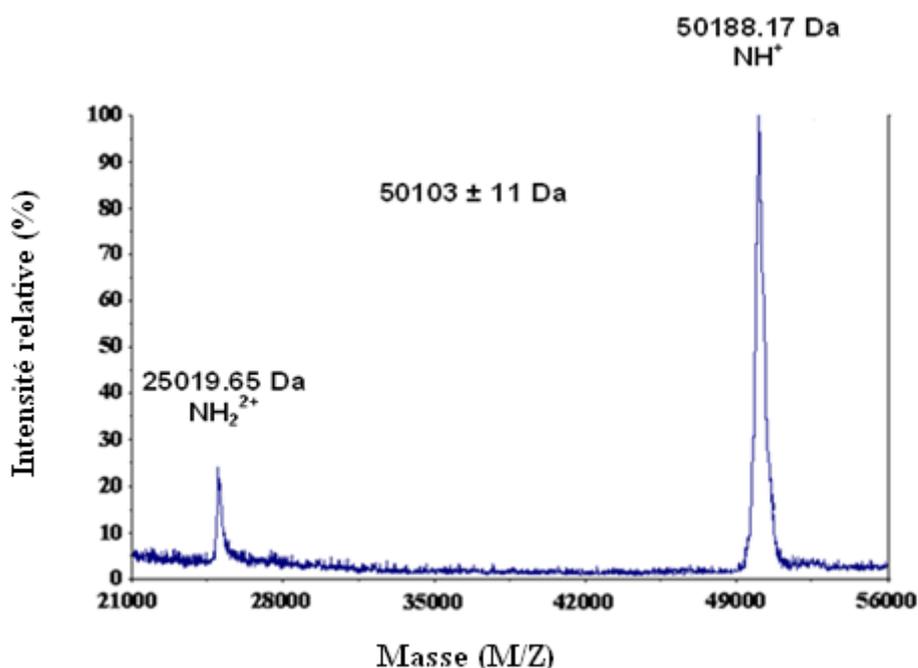


Figure 21: Spectre de la spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS

Une étude comparative concernant le poids moléculaire de l'enzyme étudiée a été réalisée avec d'autres chitinases de différentes espèces, afin de situer notre enzyme ScChi50. D'après le tableau 5, nous remarquons que le poids moléculaire de la chitinase

extraite de la rascasse est très proche de ceux trouvés chez la classe des poissons. Comme des poids moléculaires de mêmes valeurs ont été retrouvés chez quelque espèce du règne fongique.

Tableau 5: Etude comparative du poids moléculaire des chitinases

Règne	Origine de Chitinase	Poids moléculaire (KDa)	Auteurs /Année
Animal	- Rascasse (<i>Scorpeana scrofa</i>)	50	Laribi <i>et al.</i> (2012)
	- Daurade rouge (<i>Pagrus major</i>)	46	Karasuda <i>et al.</i> (2004).
	- Calamar (<i>Pennahia argentatus</i>)	42	Ikeda <i>et al.</i> (2009)
	- Calamar (<i>Calaminus theca</i>)	38 – 42	Matsumiya <i>et al.</i> (2002)
	- Crevette tigrée (<i>Penaenus monodon</i>)	51,9	Proespraiwong <i>et al.</i> (2010)
	- Araignée, Ctinedae (<i>Cupiennius salei</i>)	108	Mommsen (1980)
	- Piéride de chou (<i>Pieris brassicae</i>)	106	Shi <i>et al.</i> (2007)
Fongique	- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	130	Cabib <i>et al.</i> (2001)
	- <i>Aspergillus fumigatus</i>	46	Taib <i>et al.</i> (2005)
	- <i>Caccidioides immitis</i>	48	Taib <i>et al.</i> (2005)
Bactérie	- <i>Bacillus thuringiensis</i>	36	Liu <i>et al.</i> (2010)
	- <i>Sphingomonas sp.C.J-5</i>	230	Zhou <i>et al.</i> (2007)

L'efficacité de chaque étape de purification de l'enzyme SsChi50 a permis une nette amélioration de sa pureté. Selon le tableau 6 Nous avons noté que la quantité en protéines totales de l'extrait brut est de 518 mg, celle du précipité est de 48 mg, gel filtration est de 1,9 mg et enfin pour l'extrait enzymatique purifié par chromatographie échangeuse anionique, la concentration en protéine chute jusqu'à une valeur de 1mg. Une diminution de l'activité totale de 6,8 U par rapport à l'activité initiale qui est de 21U a été enregistrée. L'activité spécifique pour l'extrait enzymatique brut passe de 0,04 U/mg à 6,5U/mg pour l'extrait purifié. Des pertes en rendement d'activité ont été constatées après chaque étape jusqu'à atteindre 33%. En effet, chaque étape supplémentaire permet d'augmenter la pureté, va entraîner des pertes de protéines et donc une diminution

du rendement. Il est à noter que l'activité spécifique chitinasique est étroitement liée à la nature et à l'origine de la chitine (Woo *et al.*, 2003 et Kim *et al.*, 2007).

Nous concluons que les différentes étapes de purification ont permis de purifier l'enzyme de 163 fois (Tableau 6).

Tableau 6 : Etapes de purification de la SsChi50

Etapes de purification ^a	Activité totale (unités) ^{b,*}	Protéines totales (mg) ^{b,c}	Activité spécifique (U mg ⁻¹) ^b	Rapport d'activité (%)	Facteur de Purification
Extrait brut	21 ± 3	518 ± 10	0,04 ± 0.01	100	1.00
Precipitation (NH ₄) ₂ SO ₄ (10-85%)	15 ± 2	48 ± 0.25	0,31 ± 0.15	72	8
Sephadex G-75	10 ± 1	1.9 ± 0.2	5,04 ± 0.23	47	126
Mono Q-Sepharose	7 ± 0.4	1 ± 0.1	6.51 ± 0.32	33.00	163

a : Toutes les opérations ont été réalisées à +4°C

b : Les expériences ont été menées à trois reprises et ± d'erreur standard ont été signalisées

c : Les quantités de protéines ont été estimées en utilisant la méthode de Bradford.

* : Une unité (U) de l'activité de la chitinase est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour dégrader 1 μmole de NAG par minute en utilisant la chitine colloïdale comme substrat.

1.3 Caractérisation de l'enzyme SsChi50

1.3.1 Caractérisation physico-chimique

Pour mieux caractériser l'enzyme ScChi50, nous avons jugé utile d'examiner l'influence de certains paramètres physico-chimiques tels que quelques ions métalliques et inhibiteurs, pH, température, ...etc.

1.3.1.1 Effet des ions métalliques

L'étude de l'effet des ions métalliques (Co²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺, Fe²⁺, Ag²⁺, Al²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, Hg⁺, K⁺, Li⁺) à une concentration de 5 mM sur l'activité chitinasique a été faite par pré-incubation pendant 30 mn. Les résultats ont révélé que

l'activité chitinasique était plus importante en présence des ions Co^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Al^{2+} et Zn^{2+} avec 325%, 145%, 128%, 119% et 111% respectivement. Cependant, l'activité n'est pas fortement modifiée lorsque le milieu réactionnel contient des ions Zn^{2+} , Cu^{2+} , Li^+ . Par contre pour les autres cations tels que Ba^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} et Mg^{2+} , une perte d'activité de 10%, 15%, 34% et 39% respectivement constatée. Enfin l'activité est complètement inhibée par Hg^{2+} et Hg^+ (Tableau 7). L'influence des ions métalliques a donc révélée un important effet activateur de l'ion Co^{2+} , qui pourrait être un cofacteur essentiel pour la chitinase purifiée extraite de la Rascasse. Les travaux de Bharatt *et al.* (1998) ont montré que les chitinases de *Bacillus SP BGI* sont inhibées de 50% et ceux de Nopakarn *et al.* (2007) sont totalement inhibées par le Co^{2+} . D'autres auteurs ont rapporté que des chitinases sont totalement inactivées par Hg^{2+} (Sang-Lang Wang *et al.*, 2002 et 2006; Dahiya *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2007; Molinari *et al.*, 2007; Nopakarn *et al.*, 2007; Djair *et al.*, 2008 et Chen *et al.*, 2011).

Tableau 7 : Effet des ions métalliques sur l'activité de la chitinase Sschi50 en utilisant la chitine colloïdale comme substrat.

Ions métalliques ^a	Matériel concerné	Concentration (mM)	Activité relative (%) ^b
Co^{2+}	CoSO_4	5	325 ± 5.50
Mn^{2+}	MnSO_4	5	145 ± 3.15
Mg^{2+}	MgSO_4	5	61 ± 1.20
Ca^{2+}	CaCl_2	5	66 ± 1.32
Cu^{2+}	CuSO_4	5	103 ± 2.61
Zn^{2+}	ZnSO_4	5	111 ± 3.01
Ba^{2+}	BaSO_4	5	90 ± 2.00
Fe^{2+}	FeSO_4	5	85 ± 1.75
Ag^{2+}	AgNO_3	5	15 ± 0.60
Al^{2+}	AlSO_4	5	119 ± 3.06
Cd^{2+}	CdCl_2	5	18 ± 0.75
Hg^{2+}	HgCl_2	5	0
Hg^+	HgNO_3	5	0
K^+	KCl	5	128 ± 3.11
Li^+	LiSO_4	5	109 ± 2.95

a : Incubation avec 30µg de l'enzyme purifiée à 50°C et pH 5 pendant 30mn.

b : Les valeurs représentant la moyenne de trois répétitions et les erreurs standards sont signalées.

1.3.1.2 Effet des inhibiteurs protéiques

L'influence des inhibiteurs protéiques sur l'activité de la chitinase SsChi50 a été faite en présence des inhibiteurs dans le milieu réactionnel à des concentrations de 2 et 5 mM ; l'activité résiduelle a été exprimée en pourcentage de l'activité en absence d'inhibiteurs (Tableau 8). Nous avons observé que l'activité chitinasique de l'enzyme était plus importante en présence des agents 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) (EDC) et le phenylemethylsulfonylaminoethyl (PMSF) avec 8% et 3% d'activation respective par rapport au contrôle sans inhibiteurs. Cependant, l'activité n'est pas fortement modifiée lorsque le milieu réactionnel contient le TNBS. Par contre, les autres agents inhibiteurs tels que le 2- mercaptoethanol et le dithiothreitol (2-ME et DTT) exercent un effet inhibiteur avec une perte d'activité chitinasique respective de 83% et 89%. La présence de para chloromercuribenzoïque et le N-ethylmaleimide (*P*-CMB, NEM) à 5 et 2 Mm, révèle un important effet inhibiteur sur l'activité enzymatique. Cette constatation nous laisse à suggérer que la chitinase SsChi50 extraite des abats de rascasse est une enzyme à cystéine car ce dernier représente donc l'acide aminé clé du site actif de cette enzyme.

Tableau 8 : Effet des inhibiteurs protéiques sur l'activité de la chitinase Sschi50 en utilisant la chitine colloïdale comme substrat.

Inhibiteurs	Acides aminés concernés	Concentration (mM)	Activité relative (%)^b
Témoin	-	-	100 ± 2.50
<i>p</i> -CMB	Cystéine	2	0
NEM	Cystéine	2	0
DTT	Cystéine	1	11 ± 0.50
2-ME	Cystéine	5	17 ± 0.65
TNBS	Lysine	2	99 ± 2.20
PMSF	Sérine	5	103 ± 2.61
EDC	Carboxylique amino acides	2	108 ± 2.82
DEP	Histidine	1	97 ± 2.10
NBS	Tryptophane	2	102 ± 2.55
NAI	Tyrosine	5	96 ± 1.90

a : Incubation avec 30µg de l'enzyme purifiée à 50°C et pH 5 pendant 30mn.

b : Les valeurs représentant la moyenne de trois répétitions et les erreurs standards sont signalées.

1.3.1.3 Effet du pH

Les réactions enzymatiques sont sensibles au pH du milieu car ce facteur influence le degré d'ionisation, du substrat, et de la molécule enzymatique. L'effet du pH sur l'activité enzymatique de la SsChi50 est suivi sur une gamme de pH de 2-11 à 50°C comme le montre la figure 22. La SsChi50 montre une activité sur une large gamme étendue de pH 3-7, avec un pH optimum égal à 5. Nous remarquons que l'augmentation du pH au-delà de la valeur optimale s'accompagne d'une perte graduelle de l'activité chitinasique. En effet, à pH 9, la chitinase perd près de 50% en activité.

Ces résultats nous permettent de déduire que l'enzyme en question est une hydrolase très active en milieu acide, tandis qu'elle se dénature aux pH alcalins. Cette perte d'activité est due probablement à l'effet du pH sur l'ionisation des groupements des

chaînes latérales qui maintiennent la structure de l'enzyme ou bien de la dissociation des acides aminés du site actif. Nos résultats concordent avec ceux de Matsumiya (2004) et (2006) qui a obtenu des pH de 2, 4 et 4,5 pour une chitinase issue respectivement de la seiche, du calmar et de la morue. Hung *et al.* (2002), Santos *et al.* (2004) ainsi que Xiuyun *et al.* (2005) et Narasimka *et al.* (2011), les chitinases ont aussi activées à un pH 4 des chitinases d'origine végétales. Les travaux d'Ikeda *et al.* (2009), indiquent un optimum d'activité chitinasique à pH 4,5 pour des chitinases extraites de l'estomac du Maigre argenté, *Pennahia argentatus*.

Par contre, nos résultats diffèrent de ceux trouvés par Han *et al.* (2009) et Fines et Holt (2010) qui montrent un pH optimum de 8 pour des chitinases d'origine marine. Signalons que pour des chitinases bactériennes, des pH optimums basiques ont été rapportés pH 10 pour *Cellulomonas flavigena* NTOUI (Chen *et al.*, 1997), pH 7-pH 8 pour *Bacillus sp.* 13.26 (Yuli *et al.*, 2004) et pH 8 pour *Bacillus licheniformis* (Waghmare et Ghosh, 2010).

En ce qui concerne la stabilité du pH, l'enzyme purifiée a été incubée dans des tampons à des pH différents. Le profil de stabilité du pH montre que la SsChi50 est très stable sur une large gamme de pH. Le maintien de son activité initiale à 100% est à des pH compris entre 4 et 7 après 24 h d'incubation à 50°C (Figure 23). A pH 9, on observe une baisse de l'activité chitinasique de 35%. Dans une étude portant sur la chitinase de *Bacillus thuringiensis* (Liu *et al.*, 2010), il a été signalé une stabilité de l'enzyme dans l'intervalle de pH 4 - 6 pour une incubation de 1h à 4°C. En dehors des limites de cette gamme de pH, l'activité diminue rapidement. Dans des intervalles de pH plus larges, de nombreux auteurs ont noté une bonne stabilité de l'activité chitinasique soit (6 - 9) d'après Chang *et al.* (2003), (5 - 10) d'après Vega *et al.* (2012) et Kim *et al.* (2007), (5 - 8) pour Molinari *et al.* (2007), (4 - 9,5) d'après Patel *et al.* (2010). Cependant, pour des chitinases d'origine bactérienne, la stabilité a été constaté sur un intervalle plus large de pH : (4 - 10) par Songsirinithigul *et al.* (2010).

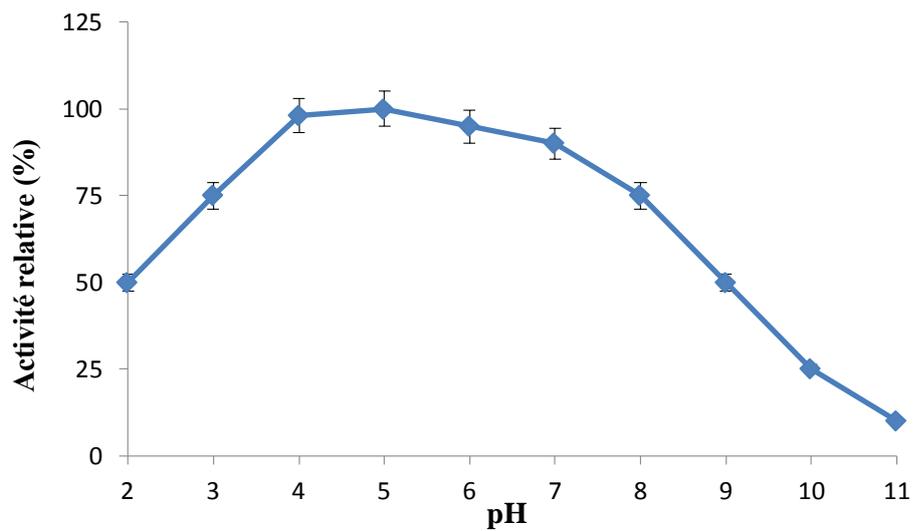


Figure 22: Effet du pH sur l'activité chitinasique

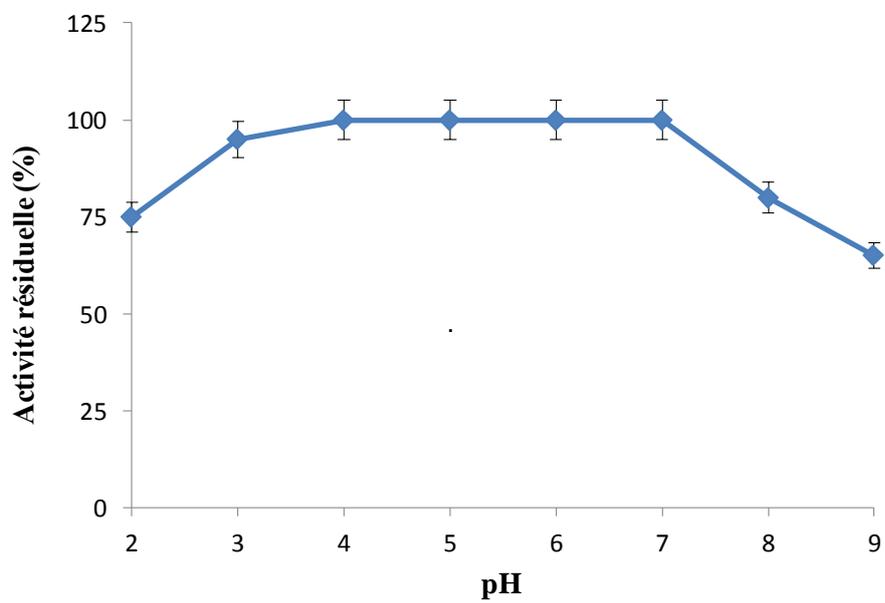


Figure 23 : Activité chitinasique résiduelle en fonction du pH

1.3.1.4 Effet de la température

La température optimale est un compromis entre l'effet de la température sur l'activité catalytique et la stabilité de la protéine enzymatique. L'influence de la température a été étudiée dans l'intervalle de 40 à 100°C pendant 1h à pH 5. La température optimale était de 70°C en absence de CoSO₄ et elle s'est déplacée à 80°C en présence de Co²⁺ (à 2 mM) en utilisant la chitine colloïdale comme substrat (Figure 24).

On remarque que pour des températures inférieures à 50°C, les activités relatives sont comparables en absence ou en présence de CoSO₄ (à 2mM). Cependant, pour des températures supérieures à 50°C, le cobalt améliore l'activité chitinasique. Au-delà de 80°C, l'activité décroît jusqu'à s'annuler. Cependant, la diminution est plus importante en absence de CoSO₄. Ceci suggère fortement que le Co²⁺ à 2 mM est nécessaire pour la stabilité de l'enzyme. Nos résultats sont proches de ceux rapportés par Choi *et al.* (2009) pour les chitinase des bactéries thermophile et anaérobie telles que *Thermotoga maritima* et *Thermotoga neapolitana* présentent un optimum à 65°C et 75°C respectivement. Toujours en ce qui concerne la température optimale, Matsumiya *et al.* (2006) ont déterminé une température de 70°C pour les chitinases (HochiB et HochiC) extraites de la morue.

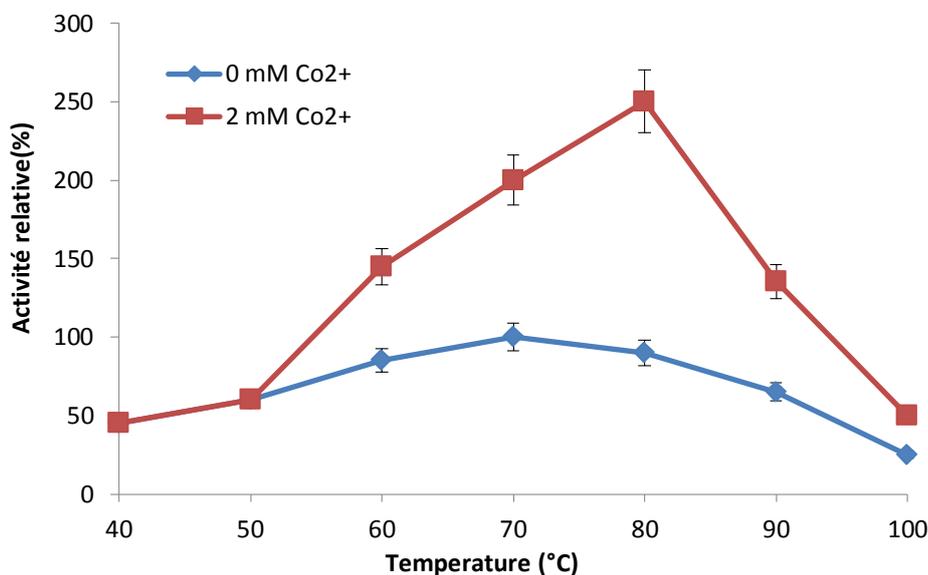


Figure 24: Effet de la température sur l'activité chitinasique

1.3.1.5 Thermo-stabilité de l'enzyme ScChi50

L'ajout de différentes concentrations de CoSO_4 a amélioré considérablement la thermo stabilité de l'enzyme comme le montre la figure 25. La thermo-stabilité maximale a été atteinte avec seulement 2 mM. L'enzyme a pu conserver 100% de son activité initiale après 8h d'incubation à 70°C en présence de 2 mM de CoSO_4 et 30% de son activité après 10 h d'incubation en présence de Co^{2+} à 90°C.

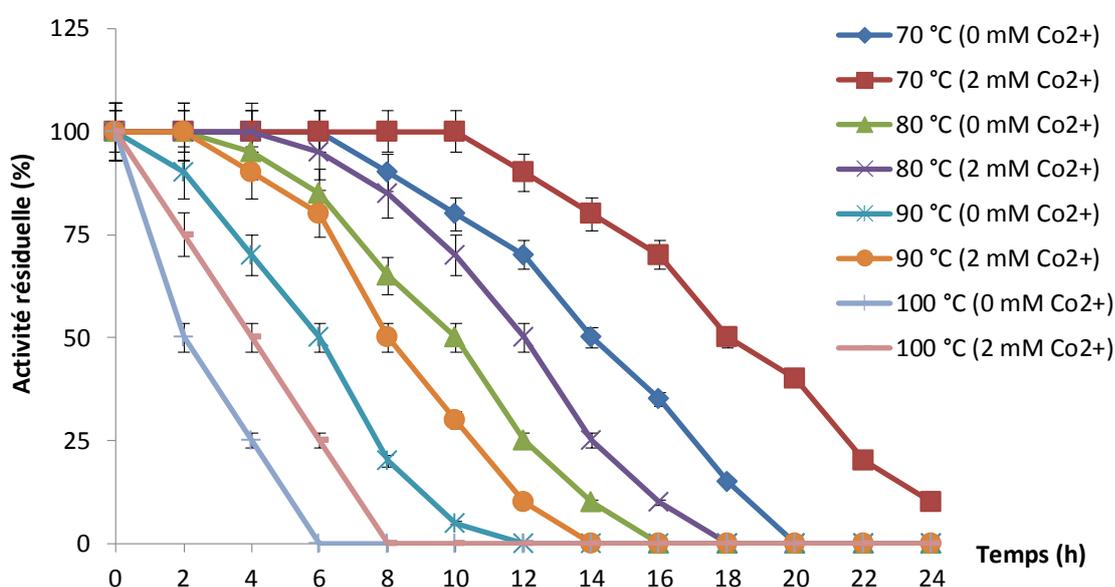


Figure 25 : Thermo-stabilité de la chitinase purifiée en fonction du temps

L'étude de la thermo-stabilité en absence de Co^{2+} a montré que la SsChi50 possède des temps de demi-vie qui diminuent avec l'augmentation de la température. Ces valeurs se voient clairement augmenter avec l'ajout de 2 mM de Co^{2+} , c'est ce qui prouve l'implication de ces ions divalents dans également l'amélioration de la thermo stabilité de la SsChi50. A titre d'exemple, les temps de demi-vie de la chitinase à 70, 80, 90 et 100°C sont respectivement de 14, 10, 6 et 2 h en absence de Co^{2+} . Alors qu'en présence de 2 mM Co^{2+} , ces temps de demi-vie sont respectivement de l'ordre de 18, 12, 8 et 4 h (Figure 25).

Selon Kono *et al.* (1987) et Lee *et al.* (2007), un grand nombre de chitinases sont stables aux températures élevées par l'ajout de Co^{2+} . L'amélioration de la

thermo-stabilité de la chitinase purifiée en présence de CoSO_4 pourrait être attribuée au renforcement des interactions à l'intérieur des molécules de protéines et à la liaison de Co^{2+} sur le site actif. L'activité thermique toujours en présence de Co^{2+} (température optimale de 80°C) et la thermo-stabilité (une demi de vie de 8h à 90°C) sont très élevées en les comparant à celles d'autres chitinases citées par différents auteurs (Matsumiya et al, 2004 ; Oshima *et al.*, 2002 ; Karasuda *et al.*, 2004 ; Matsumiya *et al.*, 2006 ; Guo *et al.*, 2008 ; Songsrinithigul *et al.*, 2010 et Liu *et al.*, 2010).

Cette caractérisation pourrait s'avérer d'une grande importance pour l'industrie de la biotechnologie car les enzymes thermostables pourraient remplacer les catalyseurs chimiques dans différents domaines de l'industrie textile, pharmaceutique et agroalimentaire (Scriban, 1999). Donc les chitinases extraites des abats de la rascasse, seront particulièrement avantageées pour leur application dans le recyclage de la chitine.

1.3.1.6 Effet de conservation sur la stabilité de l'enzyme ScChi50

Cette étude a été réalisée en conservant l'extrait chitinasique purifié à des températures de $+4^\circ\text{C}$ et -20°C pendant une période déterminée 80 jours. L'activité résiduelle a été déterminée selon les conditions expérimentales (pH 5, $T^\circ = 80^\circ\text{C}$ et 2 mM de Co^{2+}). Les résultats mentionnés dans la figure 26, montrent que l'activité chitinasique de l'enzyme purifiée stockée à $+4^\circ\text{C}$ baisse progressivement au cours du temps. Lors de cette conservation au bout de 20 jours, nous avons noté une perte de l'activité qui atteint 47% de l'activité chitinasique initiale. Après 30 jours, on remarque que l'enzyme perd jusqu'à 54% de son activité initiale et 87% après 60 jours.

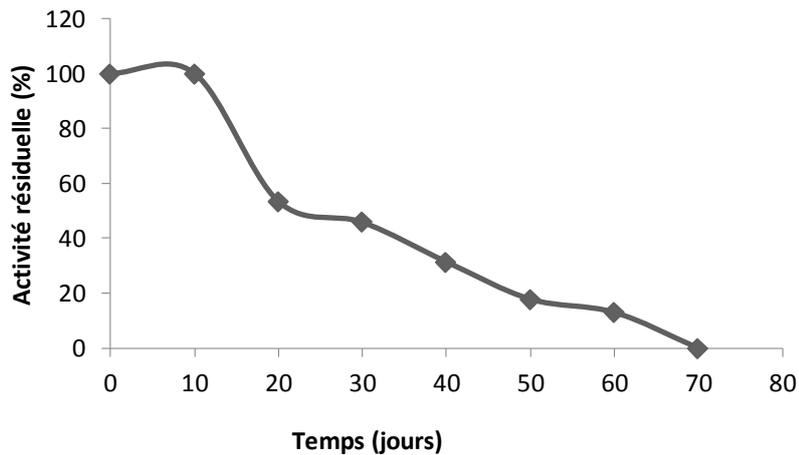


Figure 26: Activité chitinasique résiduelle au cours de la conservation à 4°C

La figure 27 montre l'évolution de l'activité chitinasique de l'enzyme purifiée. Au cours de la conservation à -20°C , les résultats montrent que la congélation n'a pas altéré l'activité de notre chitinase sur une durée de 50 jours. Au-delà, nous avons noté une diminution de l'activité chitinasique. L'enzyme a cependant maintenu jusqu'à 40% de son activité sur une période de 80 jours lors de sa conservation à -20°C . En concluant qu'à des températures inférieures à -20°C , l'activité enzymatique est mieux conservée que à 4°C en vu d'absence de contamination bactérienne.

En général, les enzymes conservées à 4°C gardent une activité résiduelle qui dépend de l'origine et de la pureté de l'extrait utilisé. Elles se conservent encore mieux et sur une longue durée à des températures négatives (Adoui, 2007).

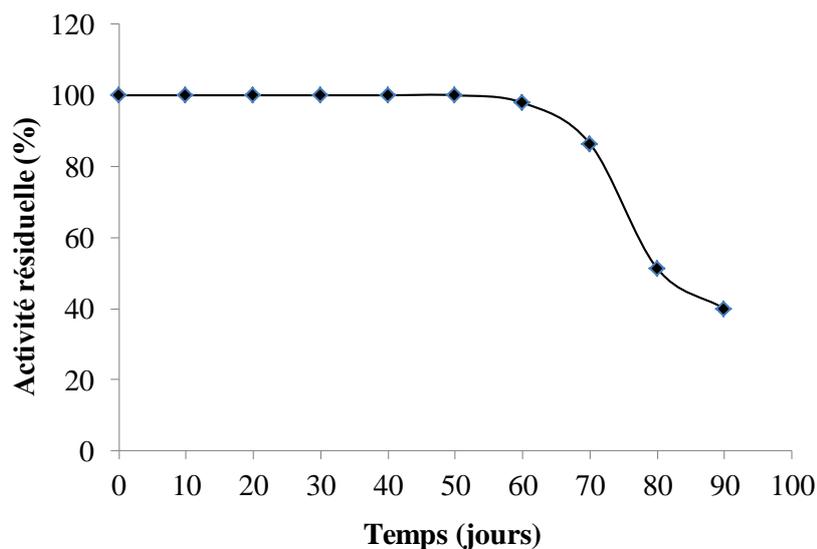


Figure 27: Activité chitinase résiduelle au cours de la conservation à -20°C

Afin de caractériser biochimiquement la chitinase purifiée, nous nous sommes proposé d'étudier l'influence de certains paramètres physico-chimiques, à savoir l'effet du pH, de la température, les inhibiteurs et les ions métalliques sur l'activité et la stabilité de cette chitinase.

1.3.2 Caractérisation biochimique

1.3.2.1 Séquençage de l'extrémité NH₂-terminale de ScChi50

Le séquençage de la partie NH₂-terminale a été réalisé par la méthode analytique d'Edman. Cette analyse a permis d'identifier les 25 premiers acides aminés suivants : **YILTCYFTNWGQYRPGLTIYFPTNI.**

La comparaison de cette séquence protéique de la SsChi50 montre des identités significatives avec d'autres séquences NH₂-terminale répertoriées des chitinases de la classe des poissons. Cette homologie a été constatée avec des chitinases en particulier celles des espèces suivantes : *Pagrus major* (PmChi) (87% d'identité), *Hexagrammos otakii* B (HoChiB) (82% d'identité) et *Todarodes pacificus* (TpChi) (78% d'identité) (Tableau 9). L'étude comparative suggère que la chitinase SsChi50 appartient à la famille 18 des glucohydrolases.

Tableau 9: Séquençage de l'extrémité NH₂-terminale de la chitinase purifiée

Chitinase	Origine	Séquence N-terminale aminoacides	Identité (%)
SsChi50	<i>Scorpaena scrofa</i>	YILTCYFTNWGQYRPGLTIYFPTNI (cette étude)	
PmChi	<i>Pagrus major</i>	YIL SX YFTN W GQYR P (Karasuda <i>et al.</i> , 2004)	87
HoChiB	<i>Hexagrammos otakii</i>	YIL T X Y FTN W GQYR P G AGKYFP (Matsumiya <i>et al.</i> , 2006)	82
HoChiC	<i>Hexagrammos otakii</i>	YIL T X Y FTN W GQYR P G AGKYFP (Matsumiya <i>et al.</i> , 2006)	82
TpChi	<i>Todarodes pacificus</i>	EYRKVXYY TN W SQYRE VPAKFFPEN (Matsumiya <i>et al.</i> , 2002)	78
SjChi	<i>Scomber japonicus</i>	YIL SX YFTN W AQYR P G AGKY L P TNID P XLX (Oshima <i>et al.</i> , 2002)	72
TpChi	<i>Todarodes pacificus</i>	YIL SX YFTN W SQYR P G AGKYFPQNI (Matsumiya <i>et al.</i> , 2002)	68
HoChiA	<i>Hexagrammos otakii</i>	EIL SX Y FTN W AQYR PPP TIY M PNDID P XLX (Matsumiya <i>et al.</i> , 2006)	64

1.3.2.2 Spécificité du substrat

La capacité d'hydrolyser plusieurs substrats carbohydrates est un important critère de la chitinase. Chacun des types de substrat naturel (chitine colloïdale, chitine glycol, chitosane glycol, chitobiose, chitotriose, chitooligosaccharides, amylose, cellobiose et laminarine) et synthétiques (*P-NP* (NAG) n (n=1-4) a été réparti en aliquotes qui ont été mis à incuber avec l'extrait chitinasique purifié avec une durée maximale de 12h sous les conditions standards (pH 5, T° 50°C).

D'après les résultats présentés dans le tableau 10, nous remarquons que l'activité relative de l'enzyme SsChi50 sur chaque substrat naturel est de 100% (chitine colloïdale), 98% (chitine glycol), 96% (chitosane glycol), 95% (chitotriose) et

90% (chitoooligosaccharides) par contre aucune activité n'a été détectée avec l'amylose, chitobiose, cellobiose et laminarine.

Concernant le substrat synthétique avec le groupe *P-NP(NAG)* n (n=1-4), les résultats montrent clairement que la SsChi50 hydrolyse la liaison β -glucosidique. Cependant, l'enzyme libère le *P-PN* à partir de *P-NP(NAG)* n car cette dernière ne manifeste aucune activité avec le *P-NP(NAG)*. Nos résultats sont similaires avec ceux obtenus par Matsumiya *et al.* (2006) sur la chitinase du poisson : *Hexagrammos otakii*.

Tableau 10: Spécificité du substrat de la chitinase purifiée SsChi50

Substrats naturels	Concentration (mg ml ⁻¹)	DO (nm)	Activité spécifique (Umg ⁻¹ de protéine)	Activité relative (%)
Chitine colloïdale	20	550	6,5±0,3	100±3
Chitine glycol	20	550	6,4±0,3	98±2
Chitosane glycol	20	550	6,2±0,3	96±2
Chitotriose	30	550	6,2±0,3	95±2
Chitoooligasscharide*	30	550	5,9±0,2	90±2
Chitobiose	30	550	0	0
Amylose	20	550	0	0
Cellobiose	30	550	0	0
Laminarine	30	550	0	0
Substrats Synthétiques				
<i>P-NP-(NAG)</i>	2	420	0	0
<i>P-NP-(NAG)₂</i>	2	420	12,4±0,5	100±3
<i>P-NP-(NAG)₃</i>	2	420	8,6±0,4	70±2
<i>P-NP-(NAG)₄</i>	2	420	6,0±0,3	93±2

(*) Un mélange de Chitotertase, Chitopentaose, et Chitohexaose

1.3.2.3 Cinétiques de la SsChi50

Une étude comparative des cinétiques enzymatiques de la SsChi50 et de deux enzymes de références (SGChi et TVChi) a été étudiée à différentes concentrations initiales en chitine colloïdale (substrat naturel) et en *P-NP-(NAG)₂* (substrat

synthétique) variant de 0,1 à 30 mg/ml. La représentation de l'évolution des vitesses initiales des réactions d'hydrolyse en fonction de la concentration des substrats fait apparaître des courbes hyperboliques indiquant que les trois enzymes adoptent une cinétique classique Michaelienne (Figure 28). La représentation graphique linéaires de Line Weaver et Burk (doubles inverses : $1/V$ en fonction de $1/[S]$) correspondante à chaque enzyme (Figure 29) nous a permis de déduire les valeurs des paramètres cinétiques : constante de dissociation ou de Michaelis-Menten (K_m), vitesse maximale (V_{max}), constante catalytique (K_{cat}) et l'efficacité catalytique (K_{cat}/K_m) selon le programme Hyper32 .

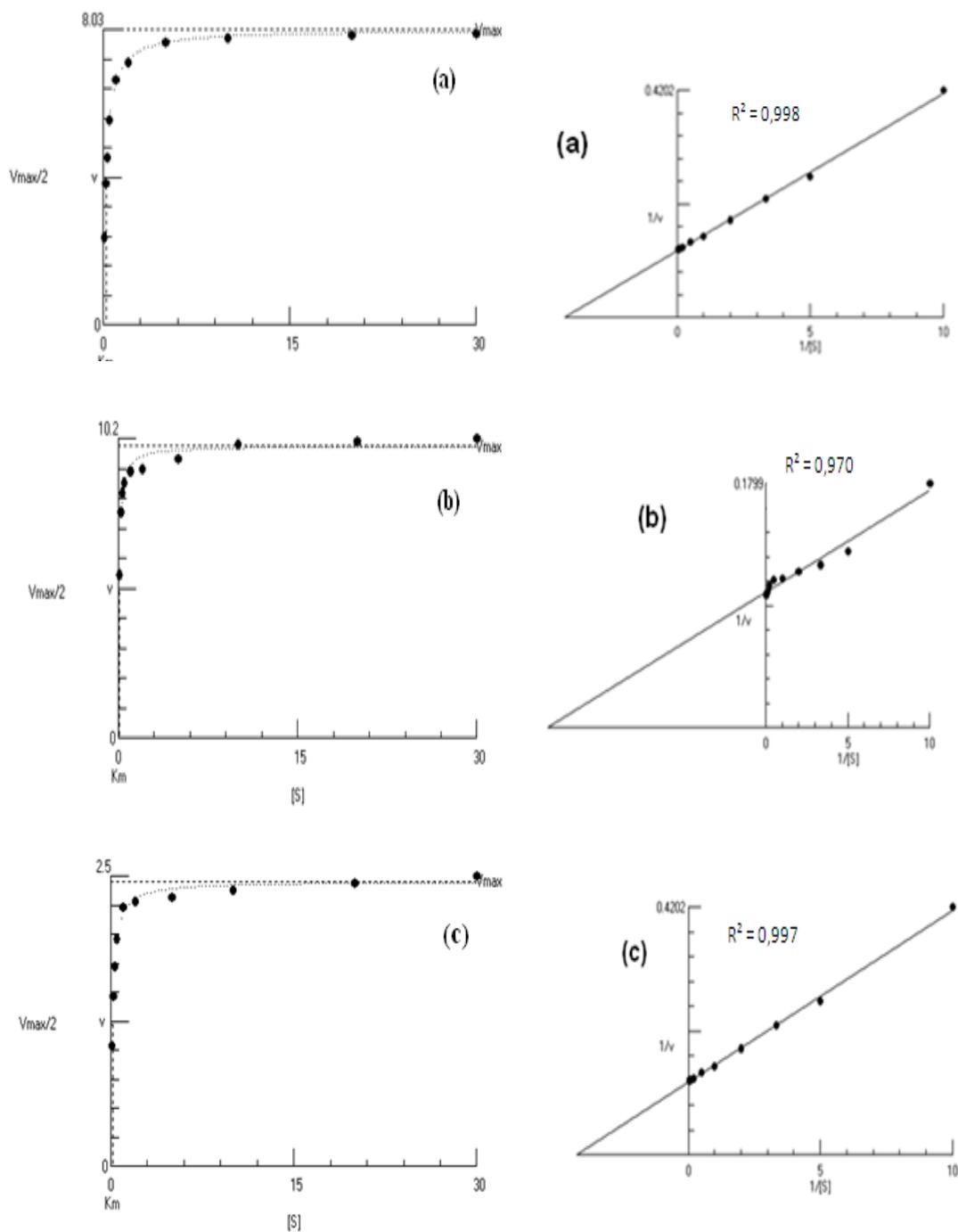


Figure 28: Représentations graphiques de Michaelis-Menten V en fonction de $[S]$ (gauche) et de Lineweaver-Burk ou doubles inverses : $1/V$ en fonction de $1/[S]$ (droite) des chitinases SsChi50 (a), SGChi (b), TVChi (c), sur la chitine colloïdale (substrat naturel)

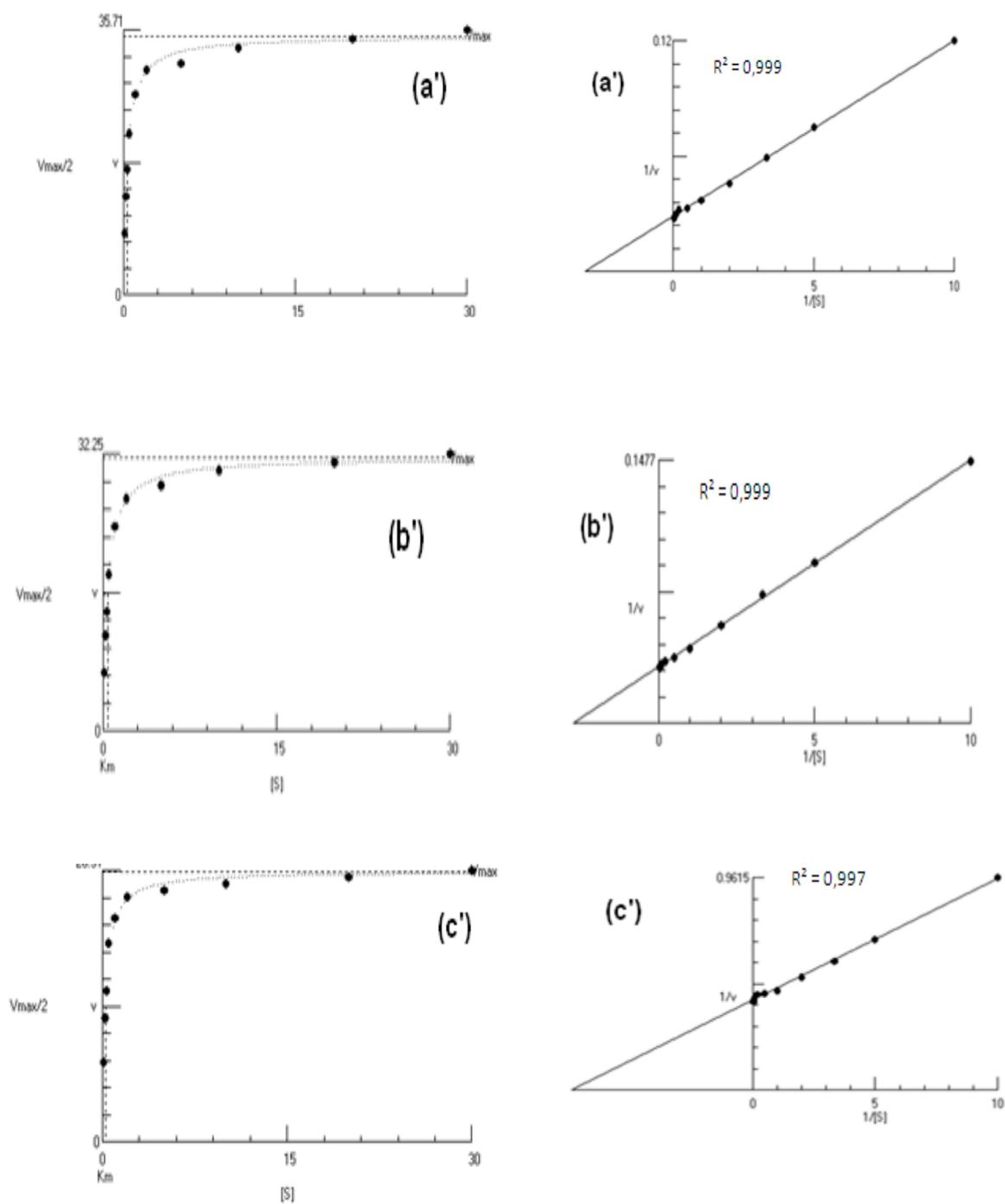


Figure 29: Représentations graphiques de Michaelis-Menten V en fonction de $[S]$ (gauche) et de Lineweaver-Burk ou doubles inverses : $1/V$ en fonction de $1/[S]$ (droite) des chitinases SsChi50 (a), SGChi (b), TVChi (c), sur P -NP-(NAG)₂ (substrat synthétique).

L'analyse des résultats obtenus sur chitine colloïdale montrent que la valeur du paramètre cinétique calculé (K_m) pour la SsChi50 est de 0,41 mg/ml, valeur plus élevée que celles de SGChi et (*Tricoderma viride* (TVChi)). Cela signifie que la chitinase SsChi50 a une grande affinité pour la chitine colloïdale comme substrat naturel par rapport aux deux autres enzymes. Concernant le substrat synthétique P-NP (NAG)₂, la valeur de K_m de SsChi50 est de 6,75 mg/ml qui représente une valeur intermédiaire entre celle de SGChi et TVsChi.

L'efficacité catalytique déduite de notre enzyme est de 12,9 ml mg S⁻¹ qui est de 2,2 et 1,8 fois plus élevée que celle de SGchi et TVchi respectivement en utilisant la chitine colloïdale. Pour un substrat synthétique (*P-NP* (NAG)₂), nous avons remarqué aussi que l'efficacité catalytique de la Sschi50 est de (36 ml mg S⁻¹) est de 1,2 et 3,4 fois plus élevée que celles de SGchi et TVchi respectivement (Tableau 11).

Tableau 11 : Paramètres cinétiques de la chitinase purifiée SsChi50, SGChi et TVChi vis-à vis du substrat naturel et synthétique

Substrat	Enzyme	K_m (mg mls ⁻¹)	$K_{cat}(s^{-1})$	K_{cat}/K_m (ml mg s ⁻¹)	Efficacité catalytique relative de Sschi50
Chitine colloïdale	SsChi50	0,412	5,33	12,9±0,6	1,00
	SGChi	0,209	1,43	6,82±0,4	0,52
	TVCh	0,286	1,67	5,8±0,2	0,45
<i>P-NP</i> (NAG) ₂	SsChi50	0,675	24,12	36±1	1,00
	SGChi	0,784	21,76	27,75±0,9	0,77
	TVChi	0,579	18,18	31,39±1	0,58

2. Effet de la chitinase brute et Purifiée ScChi50 sur l'insecte

la bruche de pois chiche : *Callosobruchus maculatus*

Sur la base de la présence de la chitine chez les insectes, cette dernière représente un composé majeur de la cuticule et de la matrice péritrophique du tube digestif et joue un rôle d'un composé structural dynamique et protecteur chez ces invertébrés. Nous considérons que le métabolisme de la chitine est une cible potentielle de molécules insecticides. Cette partie a pour but d'étudier l'effet de l'enzyme brute et purifiée ScChi50 sur les paramètres biologiques de l'insecte, Nous nous sommes intéressés à tester l'état de la cuticule (élytres), le tube digestif de la larve et l'appareil génital de l'insecte.

2.1 Evaluation de la toxicité par effet contact

2.1.1 Effet de la toxicité sur les Elytres en absence de graines

Les insectes exposés à différentes doses létales 24% et 3% respectivement des chitinases brutes et purifiées ont présenté des signes d'intoxications dans la première heure du début de l'expérience. Contrairement aux témoins, nous avons remarqué des arrêts de nettoyage des antennes et des élytres. Les insectes ont présenté des signes de faiblesse et de perte d'équilibre. Malgré tous les signes observés, nous avons remarqué un comportement de fuite : ils se sont dirigés dans tous les sens, se heurtant violemment contre la paroi latérale de la boîte de Pétri sur laquelle ils appuyaient leur tête, ils ont fini par se renverser sur leur dos (Figure 30).

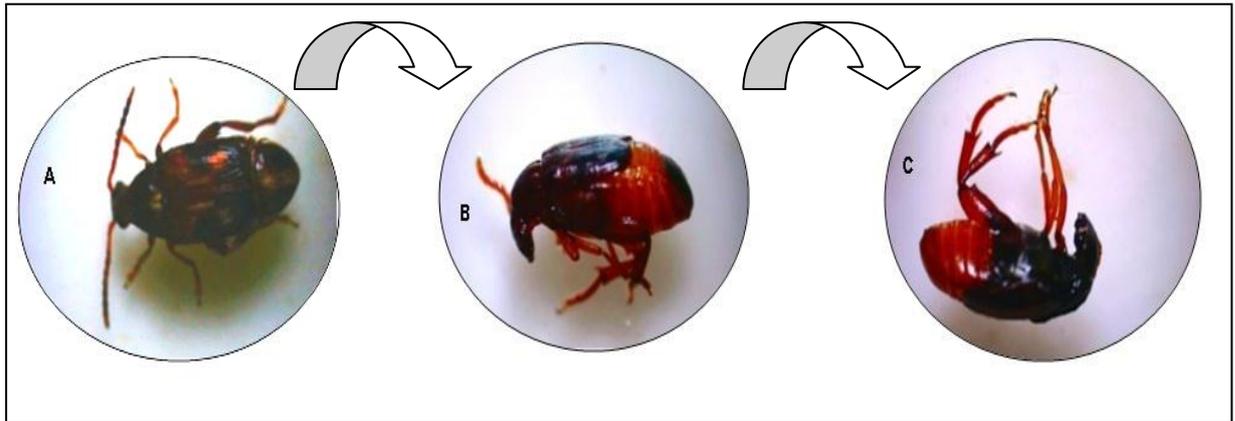


Figure 30 : Le comportement observés chez les insectes traités pendant une heure par les doses létales des chitinases brutes (24%) et purifiées (3%). (A) premier contact ; (B) l'insecte qui se nettoie, (C) renversement de l'insecte.

Le test biologique concernant l'effet toxique de l'enzyme brute et purifiée SsChi50 est mesuré par le taux de mortalité des adultes *C. maculatus* exposés aux différentes doses testées. Les résultats obtenus, montrent que ces chitinases brutes et purifiées manifestent une activité insecticide par contact. Les pourcentages de mortalité varient entre 10 à 100% pour les chitinases brutes (Figure 31) et entre 8 à 100% pour les chitinases purifiées après seulement 1h de contact par rapport au témoin qui est de 0% (Figure 32). Ceci résulte des différences de concentration en chitinase dans l'extrait enzymatique. D'où une activité insecticide très élevée avec une petite dose (1%) des chitinases purifiées sur la bruche a été observée. Nous suggérons une hydrolyse de la cuticule des élytres de l'insecte composés de la chitine par l'action des chitinases a été achevées. Nous remarquons par la présente étude, que les chitinases extraites des abats de rascasse, qu'elles soient brutes ou purifiées sont hautement efficaces pour protéger les graines de pois chiches stockées des attaques de *Callosobruchus maculatus*. Dans ce cas, le facteur temps n'influe pas sur la toxicité, par contre la dose représente un facteur important

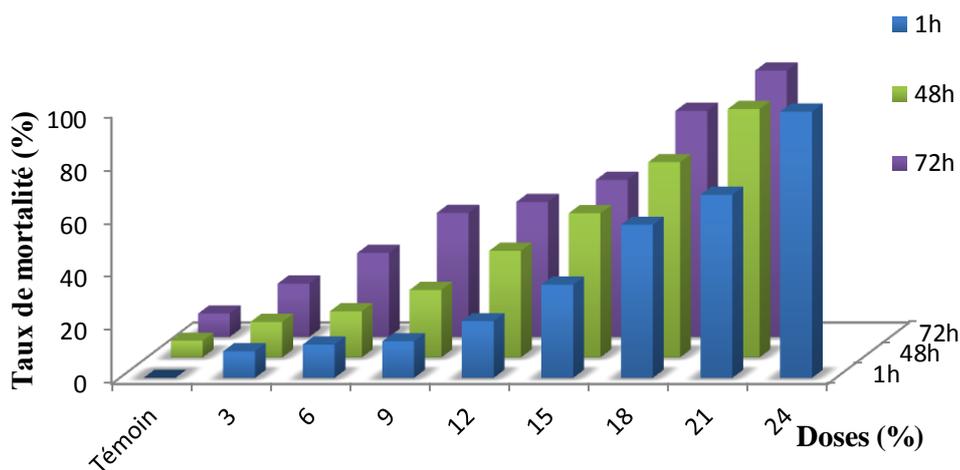


Figure 31 : Effet des chitinases brutes par contact sur *C. maculatus*

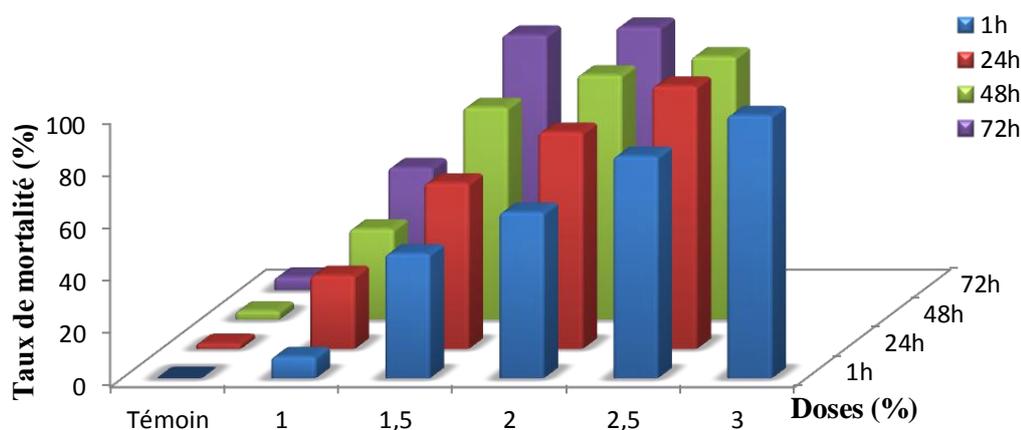


Figure 32 : Effet des chitinases purifiées (SsChi50) par contact sur *C. maculatus*

L'effet comparatif des doses des chitinases brutes et purifiées en fonction du temps d'exposition est basé sur la comparaison des doses létales 50 (DL50). La dose létale 50 enregistrée pour les chitinases brutes après 1 h de contact est égale à 15%, alors que celles obtenues après 24h, 48h et 72h est de 15,3%, 14% et 13% respectivement (Figure 33, a, b, c et d). Nous constatons que pour les différents temps de contact les chitinases brutes occasionnent une toxicité assez proche par rapport aux DL50.

Les doses létale 50 des chitinases purifiés obtenues après 1h, 24h, 48h et 72h sont respectivement de 0,21%, 1,61%, 1,28% et 1,14%. Une toxicité assez proche est aussi enregistrée pour la chitinase purifiée (Figure 34, a', b', c' et d').

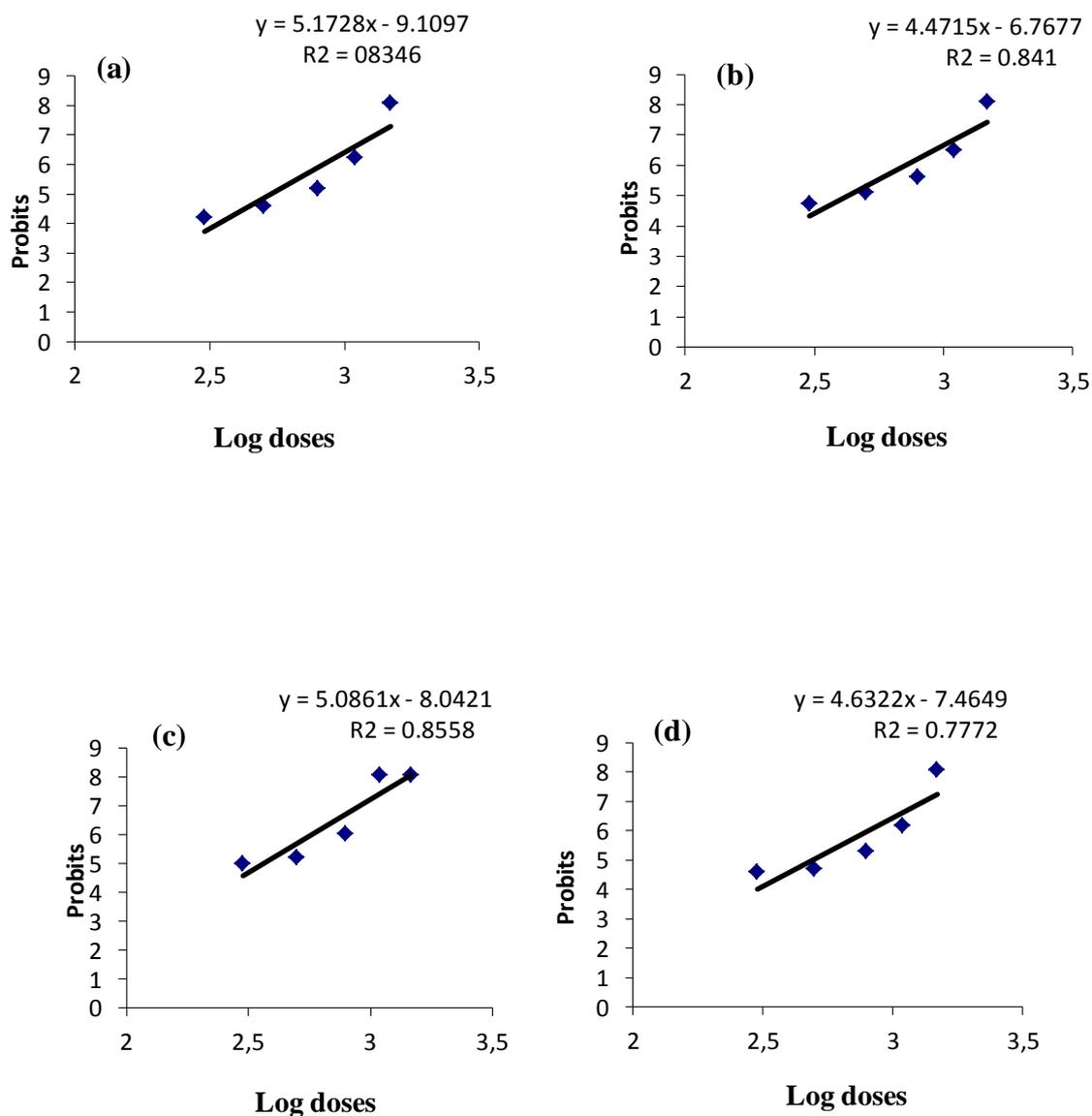


Figure 33 : Régression mortalité dose par effet contact des chitinases brutes sur l'insecte *C. maculatus*. (a) 1 heure, (b) 24 heures, (c) 48 heures, (d) 72 heures.

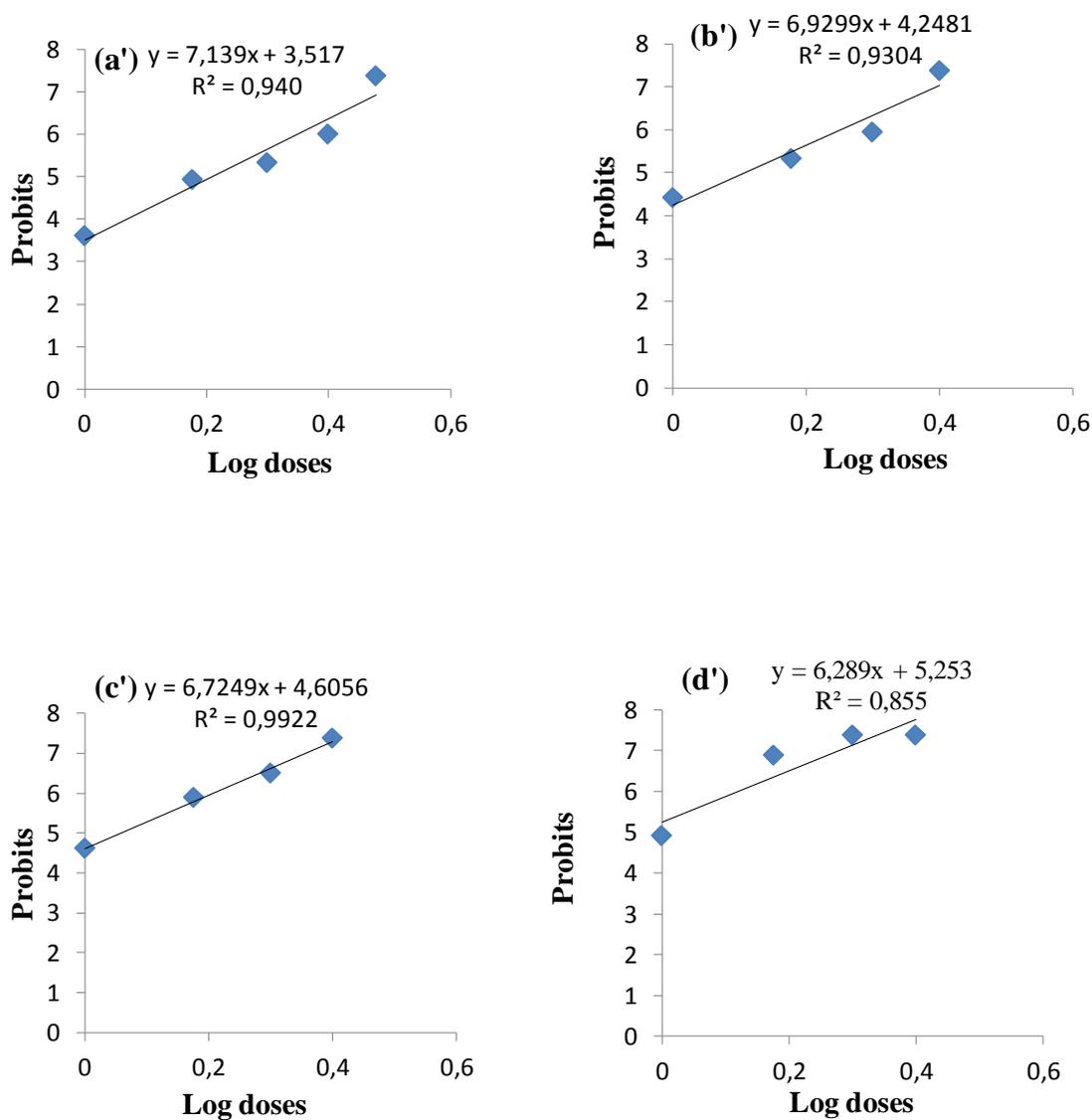


Figure 34: Régression mortalité dose par effet de contact des chitinases purifiées SsChit50 sur l'insecte *C. maculatus*. (a') 1 heure, (b') 24 heures, (c') 48 heures, (d') 72 heures.

2.1.2 Effet de la toxicité des élytres en présence de graines

Comparativement à l'essai de toxicité des chitinases par contact sur l'insecte *C. maculatus* en absence de graines précédemment étudié, le test de toxicité chitinases en présence de graines montre également que ces enzymes brutes extraites des abats de rascasse sont très toxiques contre le *C. maculatus* avec 100% de mortalité après 24 h d'exposition à la dose de 24% (Figure 35). Notons que les autres doses ont aussi un effet insecticide mais très peu actives.

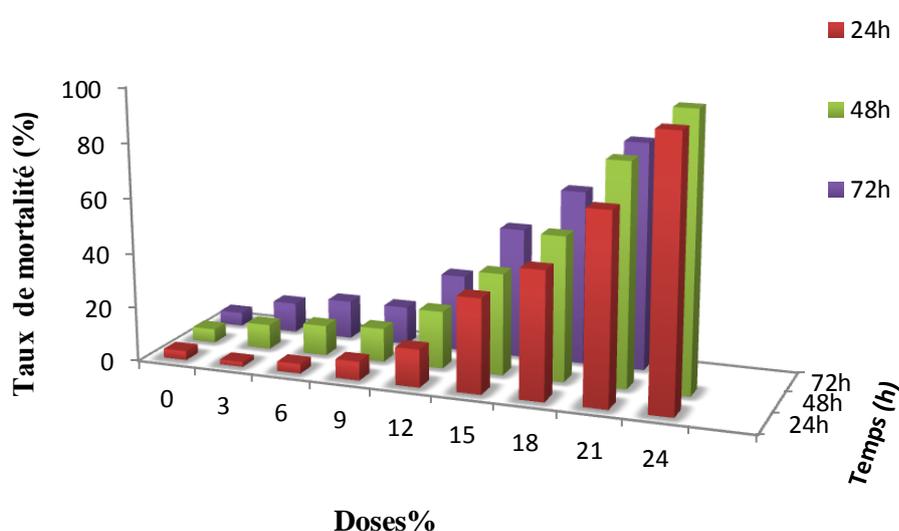


Figure 35 : Test de contact des graines traitées : comparaison des taux de mortalité de l'insecte *C. maculatus* en fonction des différentes doses des chitinases brutes.

2.1.3 Observation des effets de toxicité des chitinase sur les élytres de *C. maculatus* en microscopie électronique à balayage (MEB)

L'utilisation de la microscopie électronique à balayage a servi à la démonstration de l'effet toxique sur la cuticule de la bruche de pois chiche. A cet effet, les élytres des individus morts ont été enlevés délicatement, posés sur les grilles en cuivre pour une observation au MEB.

Les micrographies obtenues montrent que l'application des chitinases brutes avec une dose létale de 24% en absence de graines (Figure 36 et 37), a montré des perturbations au niveau de la structure de l'épicuticule après 1h d'exposition.

Par contre l'application des chitinases pures à une dose létale de 3% en présence et en absence de graines a permis une disparition complète de l'épicuticule et une nette régression de l'exocuticule (Figure 38 et 39) et ce, comparativement à la cuticule des individus témoins (sans traitement) (Figure 40). Nos résultats ont montré que ces chitinases ont engendré des altérations réelles au niveau de la structure de la cuticule donc la destruction des couches cuticulaires. Cela révèle un aspect froissé et desséché chez les individus traités par contact qui est du à la dégradation par les chitinases. Ces signes sont similaires à ceux observés avec certains inhibiteurs de synthèse de la chitine comme le Chlorofluazuron chez divers insectes tel que (*Choristoneura fumiferana*) exposés à différents traitements (Cunnigham *et al.*, 1987). Les travaux de Weiguo *et al.* (2009) montrent l'utilisation *in vitro* d'un mixage de protéases et de chitinases provoque la destruction de la cuticule des insectes.

Selon Coudron *et al.* (1989), et St-Leger *et al.* (1991), les chitinases entomopathogènes hydrolysent la cuticule des insectes. De même les travaux de St-Leger *et al.* (1986) et El-Sayed *et al.* (1989), les chitinases secrétées par certains champignons pathogènes : *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Verticilium lecanii* et *Nomuraea ileyi* utilisent la cuticule des insectes comme source de carbone. Par contre d'après les résultats de Powell *et al.* (1993), montrent que les chitinases d'origine bactérienne et végétales ne présentent que de très faibles effets où sont inactives contre les insectes tels que les lépidoptères et les pucerons. Par contre Wiwat *et al.* (2000) montrent la toxicité des chitinases du *Bacillus thuringiensis* contre les larves de la teigne du Choux *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Plutellidae). Récemment obtenue de la tomate, une chitinase semble présenter des effets délétères pour le doryphore de la pomme de terre *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera : Chrysomelidae) (Lawrence et Novak, 2006). Les effets insecticides des chitinases les plus importants mis en évidence l'ont été avec l'utilisation de chitinases d'insectes. Ainsi, la chitinase du lépidoptère *Manduca sexta* (Lepidoptera : Sphingidae) affecte *in vitro* la survie du coléoptère de *Oryzaephilus mercator* (Coleoptera : Silvanidae) (Wang *et al.*, 1996). Cette même chitinase, obtenue dans les plants de tabac induit également de fortes mortalités larvaires chez plusieurs lépidoptères (Dinz *et al.*, 1998). Fitches *et al.* (2004) ont démontré également que la chitinase de la noctuelle potagère *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera : Noctuidae) possède des effets insecticides sur ce même insecte.

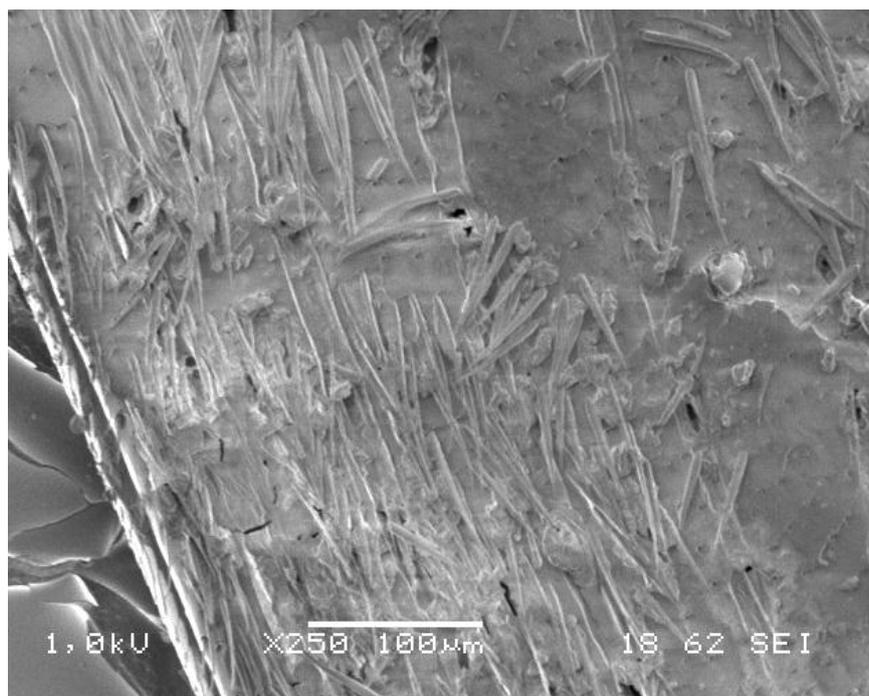


Figure 36 : Observation au microscope électronique à balayage d'un élytre de *Callosobruchus maculatus* traité par les chitinases brutes en absence de graines à la dose létale (24%) des chitinases brutes Grossissement : X250



Figure 37: Observation au microscope électronique à balayage (MEB) d'un élytre de *C. maculatus* traité par contact en absence de graines avec la dose létale (3%) des chitinases purifiées Grossissement : X250

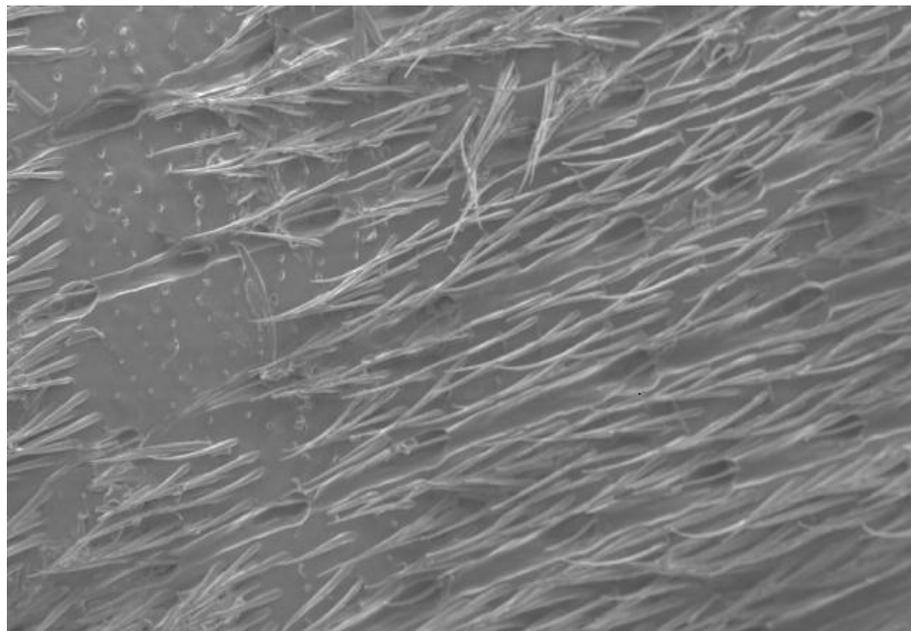


Figure 38 : Observation au microscope électronique à balayage d'un élytre de *Callosobruchus maculatus* traité par les chitinases brutes en présence de graines à la dose létale (24%) des chitinases brutes Grossissement : X200 :

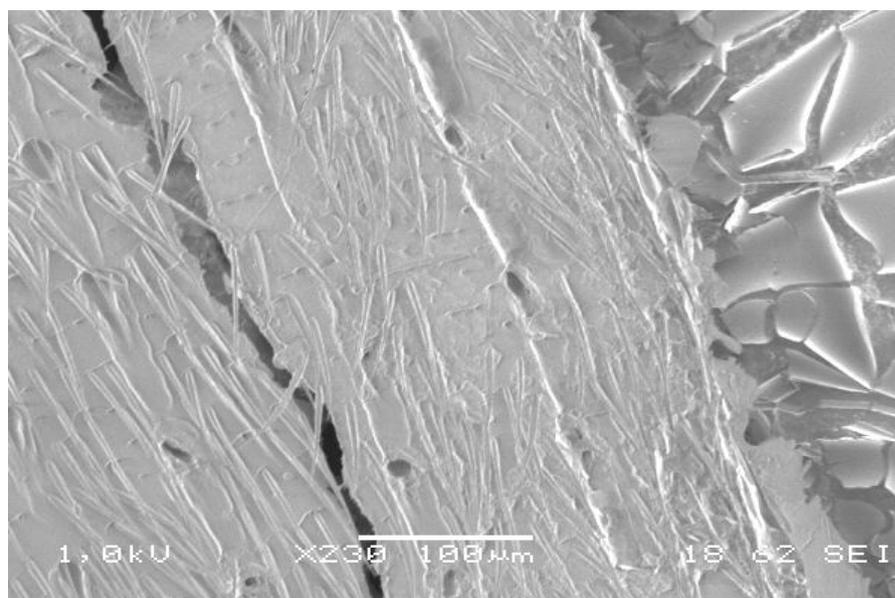


Figure 39 : Observation au microscope électronique à balayage d'un élytre de *Callosobruchus maculatus* traité par les chitinases purifiées en présence de graines à la dose létale (3%) des chitinases purifiées Grossissement : X230 :

:

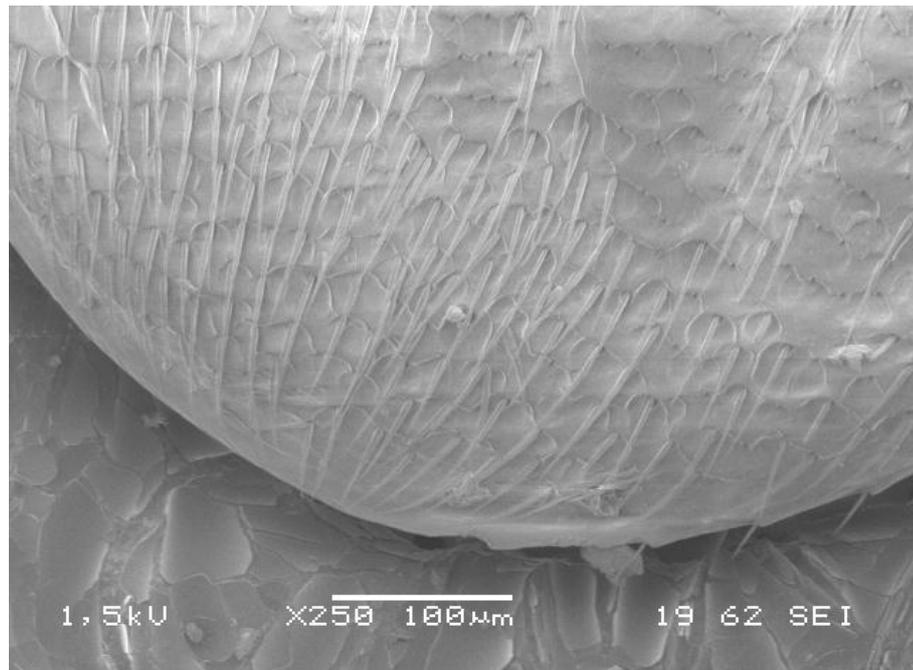


Figure 40 : Observation au microscope électronique à balayage (MEB) d'un élytre de *C.maculatus* non traité (témoin) Grossissement : X250

2.1.4 Effet de la toxicité sur l'appareil reproducteur

L'effet insecticide des chitinases brutes sur l'appareil reproducteur des adultes mâles et femelles de la bruche de pois chiche à des doses différentes (3, 9, 15 et 21%), a été étudié. Plusieurs cas d'essais ont été effectués sur l'appareil reproducteur mâle et femelle. Cette étude montre l'action inhibitrice des chitinases brutes sur le potentiel reproducteur de la bruche : diminution du nombre d'œufs pondus par les femelles en fonction de l'augmentation des doses jusqu'à l'annulation dès la 4^{ème} dose après un traitement de 48h. Cette constatation est due probablement à une perturbation de l'ovogenèse de l'insecte. L'expérience réalisée chez les mâles montre le même effet (réduction de ponte) (Figure 41) après un accouplement. Ce test nous semble intéressant du fait qu'il n'ait pas été utilisé dans cet axe par d'autres auteurs. L'effet biocide de ces chitinases brutes se répercute aussi sur la fertilité de l'insecte. Les traitements ont réduit le nombre d'individus émergés comparativement au témoin (Figure 42, 43 et 44) Les résultats obtenus

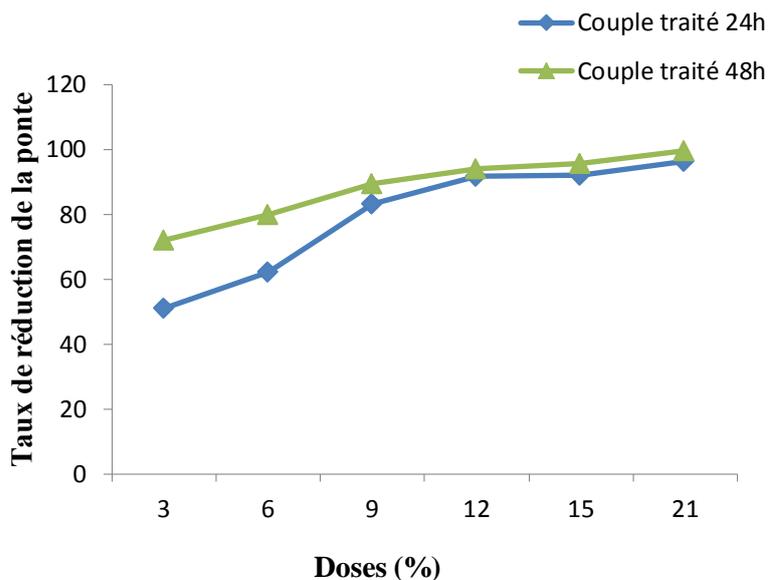
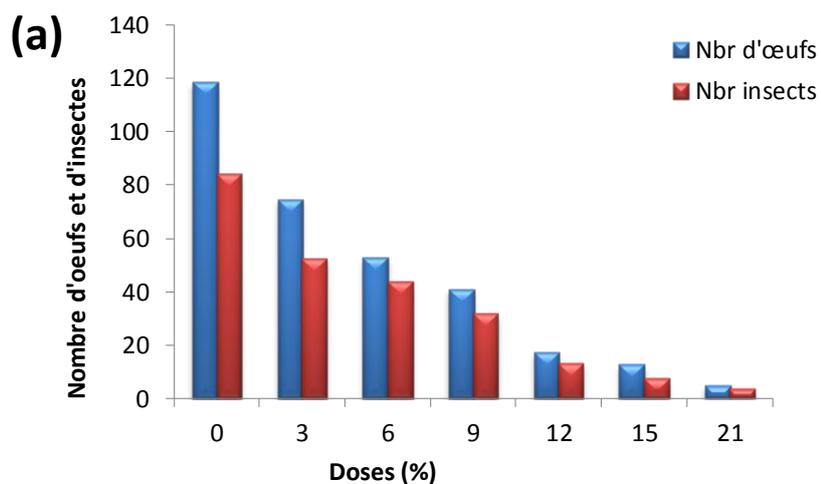


Figure 41 : Taux de réduction de la ponte en fonction des doses après 24 et 48h de traitement

2.1.4.1 Cas du couple : femelles traitées / mâles non traités

Les résultats de l'effet de l'extrait brute chitinasique sur les femelles de *C.maculatus* traitées sont reportés sur la figure 42.



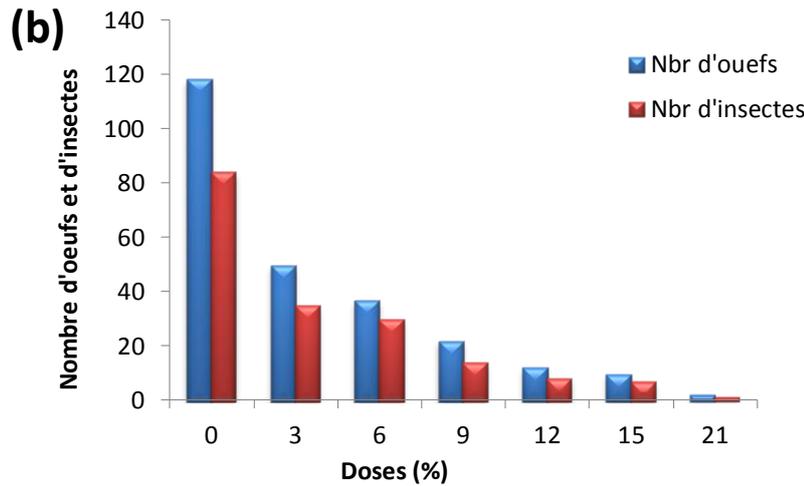


Figure 42 : Effet de l'extrait brut sur la fécondité et la fertilité de *C. maculatus*.
(a) après 24h, (b) après 48h

L'analyse de variance sur la fécondité et la fertilité dans le cas du couple, femelles exposées et mâles non exposés pendant 24h, montre que la différence est hautement significative au seuil de 5% ($p < 0,0000$) par rapport au témoin. La dose influe énormément sur ces deux paramètres biologiques. Le test de Newman & Keuls met en évidence quatre groupes homogènes bien distincts pour la fécondité et la fertilité (Tableau 12). Le groupe A comprend uniquement le témoin avec une fécondité moyenne de 118.20 et une fertilité moyenne de 104. Le groupe B par contre regroupe les doses D₃ et D₆ où la fécondité et la fertilité présentent des moyennes de 74,80, 52,40 et 52,00, 44.40, respectivement. Le groupe C est représenté uniquement par la dose D₉. Enfin, le groupe D regroupe les doses D₁₂, D₁₅, D₂₁ où la fécondité et la fertilité sont les plus faibles.

Tableau 12 : Analyse de variance sur l'efficacité de l'extrait brut chitinasique sur la fécondité et la fertilité des femelles traitées de *C.maculatus* pendant 24h.

Essai	Doses%	Fécondité			Fertilité			
		Moyenne	F	P	Moyenne	F	P	GH
1	Témoin	118,20	26.91	0.0000	104,00	39.29	0.0000	A
2	3	74,80			52,00			B
3	6	52,40			44,40			B C
4	9	40,60			31,00			C
5	12	17,20			13,20			D
6	15	12,60			7,60			D
7	21	4,60			3,40			D

Pour le temps de 48h, l'analyse de variance montre également que la différence est hautement significative (p.0.0000). Le temps d'exposition influe beaucoup sur la fécondité et la fertilité. Le test de Newman & Keuls met en évidence trois groupes homogènes pour la fécondité (Tableau 13) et quatre groupes homogènes bien distincts pour la fertilité.

Pour la fécondité, le groupe A comprend également le témoin avec 113 œufs. Le groupe B et C par contre regroupent les doses D₃, D₆, D₉, D₁₂, D₁₅ où la fécondité varie entre 49,80, et 9,80. La dose D₂₁ représente la plus faible fécondité (2,20 œufs).

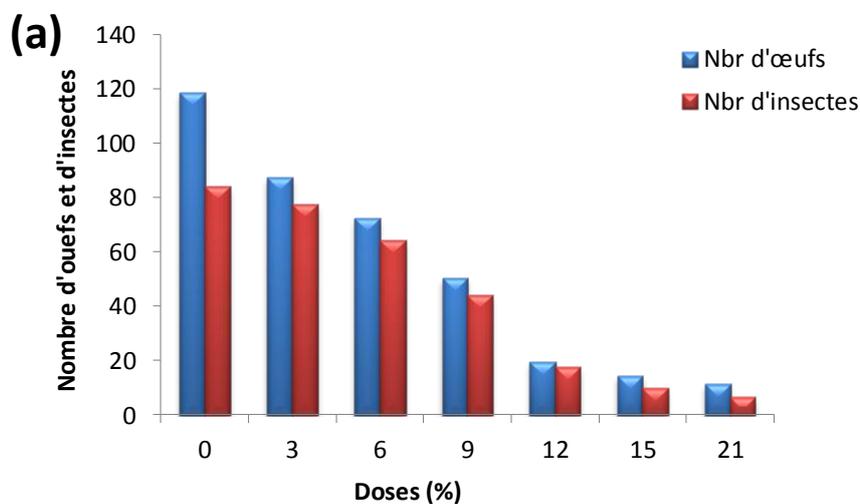
En ce qui concerne la fertilité, le groupe A comprend le témoin avec 113,60 individus émergés. Le groupe B regroupe les doses D₃ et D₆ où la fertilité varie entre 34,60 et 29,80. La D₉ représente le groupe C avec une moyenne de 15,80. Enfin, les plus faibles émergences sont notées pour les doses D₁₂, D₁₅ et D₂₁.

Tableau 13 : Analyse de variance sur l'efficacité de l'extrait brute chitinasique sur la fécondité et la fertilité des femelles traitées de *C.maculatus* pendant 48h.

Essai	Doses%	Fécondité				Fertilité			
		Moyenne	F	P	GH	Moyenne	F	P	GH
1	Témoin	113,40	15.10	0.0000	A	113,60	249.75	0.0000	A
2	3	49,80			B	34,60			B
3	6	36,80			B C	29,80			B
4	9	21,60			B C	15,80			C
5	12	12,00			B C	8,20			D
6	15	9,80			B C	7,00			D
7	21	2,20			D	1,40			D

2.1.4.2 Cas du couple femelles non traitées / mâles traités

La figure 43, montre l'effet de l'extrait brute chitinasique sur les mâles de *C.maculatus* exposés au traitement pendant 24h (a) et 48h (b).



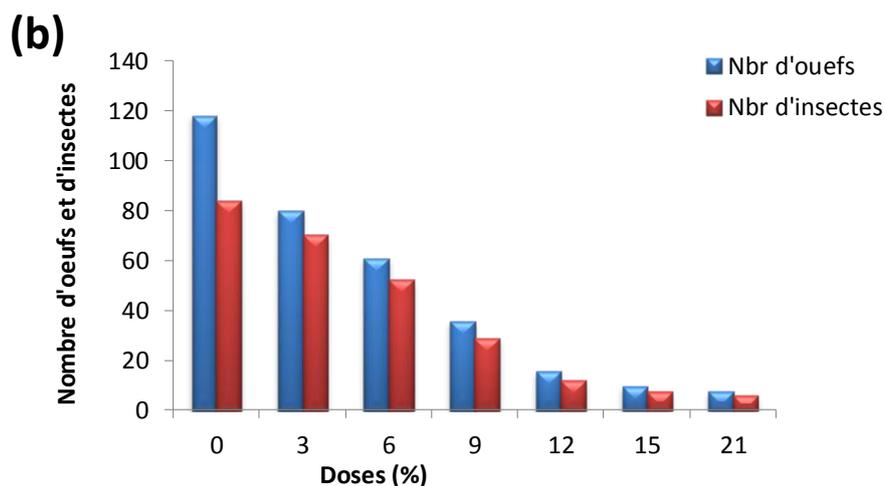


Figure 43 : Influence de l'extrait brut sur la fécondité et la fertilité de *C.maculatus*.

(a) Mâles exposés pendant 24h, (b) Mâles exposés pendant 48h

Dans le cas des mâles exposés au traitement pendant 24h en contact avec les femelles saines. L'analyse de variance sur la fécondité et la fertilité montre que la différence est hautement significative ($p < 0,0000$) par rapport au témoin. Les doses de l'extrait brute chitinasique influent significativement sur les mêmes paramètres biologiques. Le test de Newman et Keuls met en évidence quatre groupes homogènes bien distincts pour la fécondité et la fertilité (Tableau 14).

Pour la fécondité, le groupe A comprend le témoin avec une moyenne de 118,20 œufs pour la fécondité.

Le groupe B et C représentent les doses D_3 et D_6 où la fécondité est de 87,00 et 72,20 œufs respectivement. Le groupe D regroupe les doses D_{12} , D_{15} , D_{21} où l'on note la plus faible fécondité. Pour la fertilité, le groupe A représente le témoin (104 individus). Le groupe B regroupe les doses D_3 et D_6 où l'émergence d'individus affiche une moyenne de 77,20 et 63,80. La dose D_9 représente le groupe C avec une moyenne de 15,60. Par contre, le groupe D regroupe les doses D_{12} à D_{21} où l'on enregistre les plus faibles émergences.

Tableau 14 : Analyse de variance sur l'efficacité de l'extrait brute chitinasique sur la fécondité et la fertilité des mâles traités de *C.maculatus* pendant 24h

		Fécondité				Fertilité			
Essai	Doses%	Moyenne	F	P	GH	Moyenne	F	P	HG
1	Témoin	118,20	28.93	0.0000	B	104,00	45.92	0.0000	A
2	3	87,00			B C	77,20			B
3	6	72,20			C	63,80			B
4	9	51,80			D	44,00			C
5	12	20,20			D	15,60			D
6	15	14,20			D	9,80			D
7	21	11,20			D	6,60			D

Pour un temps de 48h, l'analyse de variance montre que la différence est également hautement significative (p.0, 0000). Le temps d'exposition aux chitinases influe considérablement sur la fécondité et la fertilité. Le test de Newman et Keuls met en évidence l'apparition de trois groupes homogènes bien distincts pour la fécondité (Tableau 13) et cinq groupes homogènes bien distincts pour la fertilité.

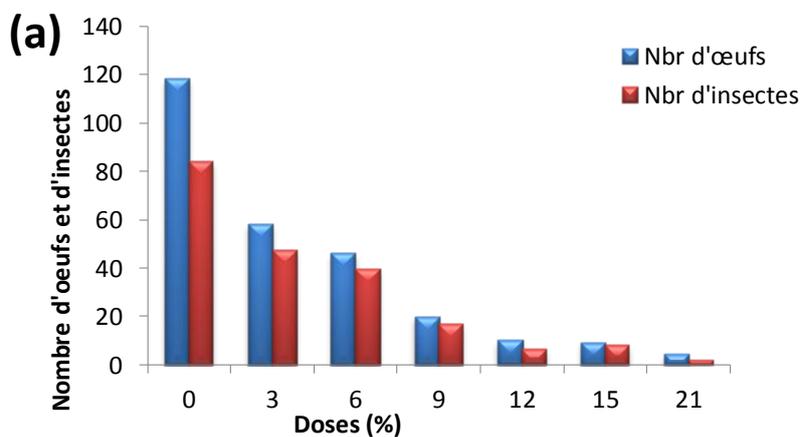
Pour la fécondité, le groupe A représente le témoin avec une moyenne de 113,40 œufs (Tableau 12). Le groupe B regroupe les doses D₃ et D₆ où la fécondité varie entre 80,00 et 61,00 œufs, respectivement. En outre, la D₉ est noté aussi bien dans le groupe C que dans le groupe D. Le groupe D comprend toujours les doses les plus élevées (D₁₂, D₁₅ et D₂₁) où la fécondité reste la plus faible. Concernant la fertilité (Tableau 15). Le test de Newman et Keuls fait ressortir cinq groupes homogènes. Le groupe A comprend le témoin avec une moyenne de 113,60 individus. Le groupe B représente la dose D₃ où la fertilité affiche une moyenne de 70,20 individus. La D₆ qui représente le groupe C affiche une moyenne de 52,40. Le groupe D comprend la dose D₉ avec une moyenne d'individus de 29,00. Enfin, le groupe E comprend les doses D₁₂, D₁₅ et D₂₁ où la fertilité reste là aussi la plus faible.

Tableau 15 : Analyse de la variance des résultats de l'efficacité de l'extrait brute chitinasique sur la fécondité et la fertilité des mâles traités de *C.maculatus* pendant 48h

Essai	Doses	Fécondité				Fertilité			
		Moyenn e	F	P	groupe	Moyenne	F	P	Groupe
1	Témoin	113,40	16.60	0.000	A	113,60	244.65	0.0000	A
2	3	80,00		0	B	70,20			B
3	6	61,00			B C	52,40			C
4	9	35,80			C D	29,00			D
5	12	15,80			D	12,00			E
6	15	9,60			D	7,20			E
7	21	9,40			D	6,00			E

2.1.4.3 Cas du couple femelles traitées / mâles traités

La figure 43, montre l'effet de l'extrait brute chitinasique sur les couples de *C.maculatus* exposés pendant 24h (a) et 48h (b).



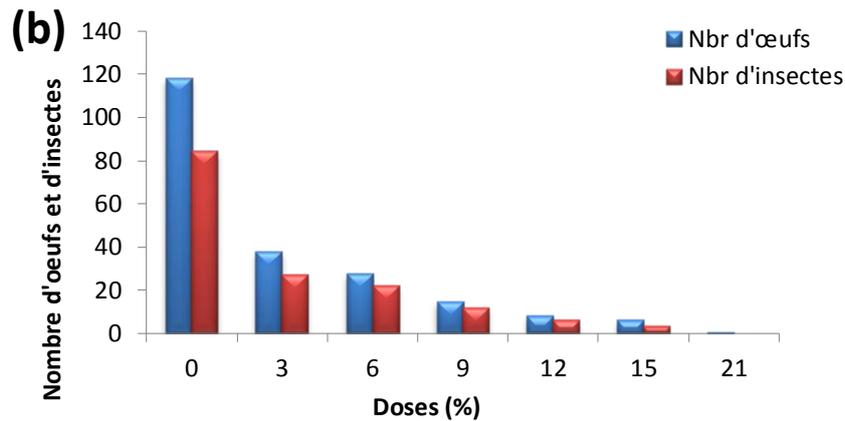


Figure 44 : Influence de l'extrait brut sur la fécondité et la fertilité de *C. maculatus* (a) mâles et femelle exposés pendant 24h, (b) mâles et femelle exposés pendant 48h

L'analyse de variance du couple exposé aux chitinases pendant 24h, montre une différence hautement significative ($P < 0,0000$). Le test de Newman et Keuls met en évidence l'apparition de trois groupes homogènes bien distincts pour la fécondité et la fertilité (Tableau 16).

Pour la fécondité, le groupe A comprend le témoin avec une moyenne de 118,20 œufs. Le groupe B représenté par les doses D₃ et D₆ qui affichent des moyennes d'œufs de 38,40 et 28,00, respectivement. A partir de la dose D₉, D₁₂, D₁₅ et D₂₁ la fécondité diminue considérablement (Tableau 16). Concernant la fertilité, le groupe A comprend toujours le témoin. Par contre, le groupe B regroupe les doses D₃ et D₆. La D₉ appartient au groupe C avec une moyenne de 40,60. Le groupe D représente les doses D₁₂, D₁₅, D₂₁ ou la fertilité est la plus faible.

Tableau 16 : Analyse de variance de l'efficacité de l'extrait brute chitinasique sur la fécondité et la fertilité du couple traité de *C.maculatus* pendant 24h

		Fécondité				Fertilité			
Essai	Doses %	Moyenne	F	P	HG	Moyenne	F	P	HG
1	Témoin	118,20	32.03	0.0000	A	118,20	32.03	0.0000	A
2	3	58,40			B	74,80			B
3	6	46,00			B	52,40			BC
4	9	20,00			C	40,60			C
5	12	10,00			C	17,20			D
6	15	9,40			C	12,60			D
7	21	4,60			C	4,60			D

L'analyse de variance du couple traité pendant 48h est mentionnée dans le tableau 14. Les résultats obtenus montrent une différence hautement significative (p 0,0000). Le test de Newman et Keuls met en évidence l'apparition de trois groupes homogènes bien distincts pour la fécondité et deux groupes homogènes pour la fertilité (Tableau 17).

Pour la fécondité, le groupe A comprend le témoin. Le groupe B représente les doses D₃ et D₆ ou la fécondité affiche 47,20 et 39,60 œufs respectivement. La plus faible fécondité est enregistrée pour la dose D₉, D₁₂, D₁₅ et D₂₁.

Concernant la fertilité, le groupe A comprend le témoin. Par contre, on enregistre les plus faibles fertilités à partir de la dose D₃ (Tableau 17).

Tableau 17 : Analyse de variance de l'efficacité de l'extrait brute chitinasique sur la fécondité et la fertilité des mâles du couple traité pendant 48h

		Fécondité				Fertilité			
Essai	Doses%	Moyenne	F	P	HG	Moyenne	F	P	HG
1	Témoin	104,00	52.53	0.0000	A	113,40	15.68	0.0000	A
2	3	47,20			B	37,80			B
3	6	39,60			B	27,20			B
4	9	14,80			C	14,60			B
5	12	8,20			C	8,00			B
6	15	6,40			C	6,00			B
7	21	2,20			C	0,60			B

L'observation sous loupe binoculaire de l'appareil génital des femelles ayant survécu à l'intoxication à la dose de (21%) de notre extrait brut chitinasique montre des aspects différents par rapport à celui des femelles témoins (Figure 45, A) : détérioration de l'appareil génital avec une atrophie et un aspect atrésique des ovocytes, visibles par transparence (Figure 45, B). Avec une dose des chitinases purifiées (2,5 %), semble avoir aussi un effet de dégradation plus significatif puisque les ovocytes, détectables par leur charge vitelline de couleur jaunâtre ne sont plus visibles dans les ovarioles ; de plus l'appareil reproducteur dans son ensemble est plus déformé (Figure 45, C). En effet, la structure ovarienne comprend une cuticule protectrice à base de chitine sclérifiée donc durcie par de nouvelles liaisons des fibres chitino-protéiques (Nordon, 2006). Ce qui conforte nos résultats sur la fécondité et la fertilité qui sont marqués par une réduction de ponte.

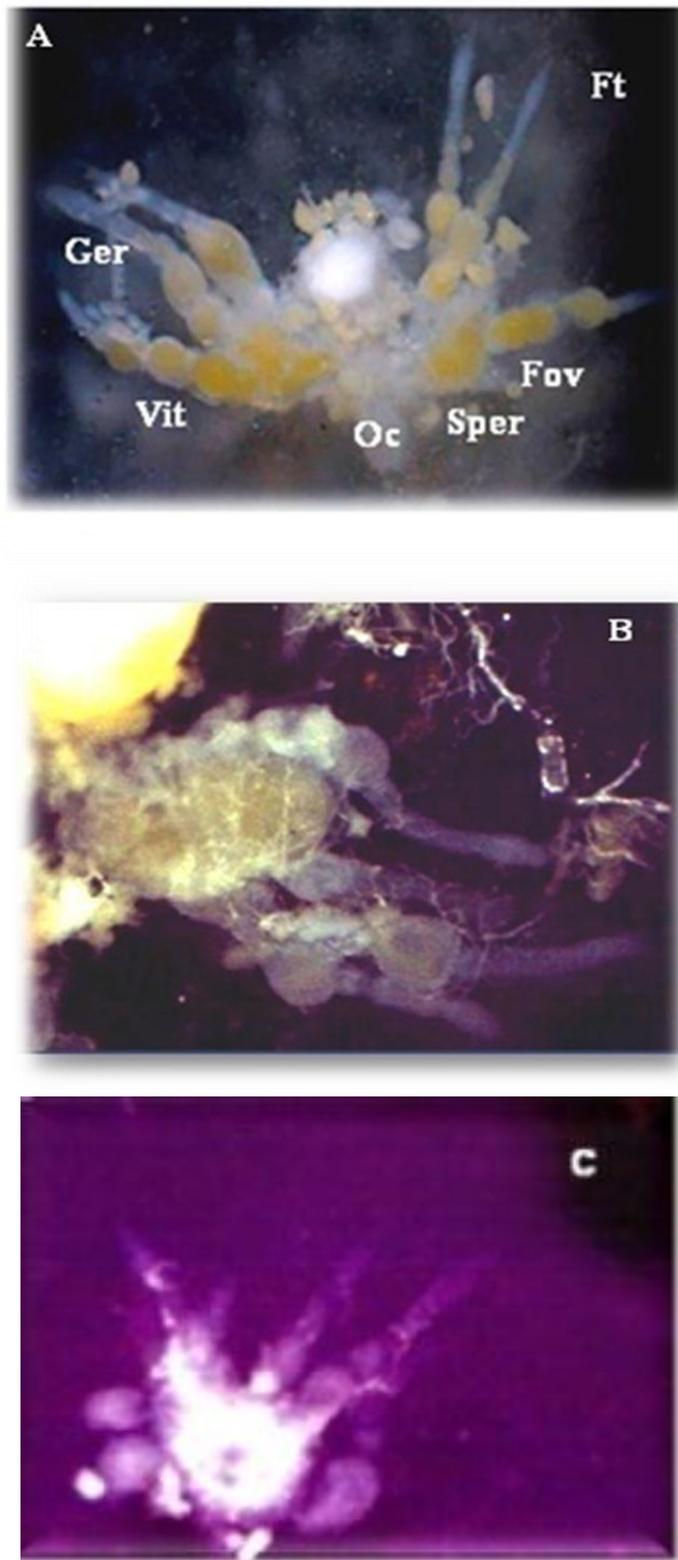


Figure 45: Photos montrant l'appareil génital femelle traitée. (A) Appareil génital de la femelle non traitée (Témoin). (B) Appareil génital de la femelle traitée avec l'extrait brut chitinasique à la dose (24%). (C) Appareil génital femelle traitée avec la chitinase purifiée à la dose (3%) (Fov: Follicules ovariens, Ft: Filament terminal, Ger: Germarium, Oc: Oviducte commun Sper: Spermathèque, Vit : Vitellarium) GRX10

2.2 Evaluation de la toxicité par ingestion

2.2.1 Effet de la toxicité sur l'alimentation des larves

Pour évaluer l'effet des chitinases sur l'alimentation des larves, nous nous sommes assurés cinq jours après traitement que tous les œufs pondus ont pénétré dans les graines reconstituées (l'aspect opaque des œufs nous indique que ces derniers ont éclos et que les larves ont pénétré dans les graines traitées. Les résultats obtenus sont présentés sur les tableaux 18 et 19.

Tableau 18 : Quantité d'aliment ingérée par les larves de *C. maculatus* traité par les chitinases brutes (**PI**= poids initial ; **S**= poids final).

Doses (%)	R1		R2		R3		R4		Moyenne		Quantité ingérée (g)
	PI	PF	PI	PF	Répétition		PI	PF	PI	PF	
Témoin	9,6	6,24	9,7	5,89	9,1	5,85	9,2	4,75	9,4	5,7	3,70± 0,7
3	5,35	2,10	4,46	1,80	4,64	2,3	5,30	1,5	4,94	1,92	3,02± 0,6
12	9	8,1	9	8,2	8,9	7,75	9,3	8,95	9,05	8,15	0,9± 0,33
21	5,75	5,55	5,65	5,35	5,62	5,02	5,80	5,50	5,70	5,36	0,34±0,17

Tableau 19 : Quantité d'aliment ingérée par les larves de *C. maculatus* traité par les chitinases purifiées SsChi50 (**PI**= poids initial ; **PF**= poids final).

Doses (%)	R1		R2		R3		R4		Moyenne		Quantité ingérée (g)
	PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF	
Témoin	9,6	6,24	9,7	5,89	9,1	5,85	9,2	4,75	9,4	5,69	3,70± 0,7
1	5,45	4,35	5,54	4,23	5,64	3,85	5,51	3,40	5,53	3,95	1,58± 0,5
2	5,33	5,02	4,95	4,27	5,25	5,20	5,35	5,30	5,22	4,95	0,27± 0,3
3	6,1	5,80	5,85	5,56	5,75	5,45	5,66	5,60	5,84	5,60	0,24± 0,12

Les résultats montrent que les chitinases brutes et purifiées influencent l'alimentation des jeunes larves de *C. maculatus*, puisque les larves qui se développent dans les graines traitées par les chitinases s'alimentent moins que les larves évoluant dans les graines non traitées (témoin). Les quantités ingérées dans les graines traitées par les chitinases brutes et purifiées sont très faibles par rapport à celles ingérées dans les graines témoin. Ces quantités varient de 3,02 et 0,34 (chitinases brutes) et de 1,58 et 0,24 (chitinases purifiées). Le taux de mortalité des larves dans les graines traitées par les chitinases brutes varie de 30 à 77% (Figure 46), et celui des larves évoluant dans les graines traitées avec des chitinases purifiées est entre 65 à 100% (Figure 47). Ces taux de mortalité sont très élevés par rapport à celui du témoin qui est de 3%.

L'étude réalisée par Fitches *et al.* (2004) a montré que la chitinase synthétique de *Lacanobia oleracae* la noctuelle de la tomate administrée par voie orale est toxique pour cet insecte. De récentes études ont aussi montré que la chitinase de l'insecte *Phaedon cocheanae* (coléoptère) et celle chitinase de la bactérie *Serratia marcescens*, respectivement utilisées dans l'alimentation artificielle du puceron de pomme de terre *Myzus persicae*, conduisent à une augmentation de la mortalité larvaire (Saguez *et al.*, 2005).

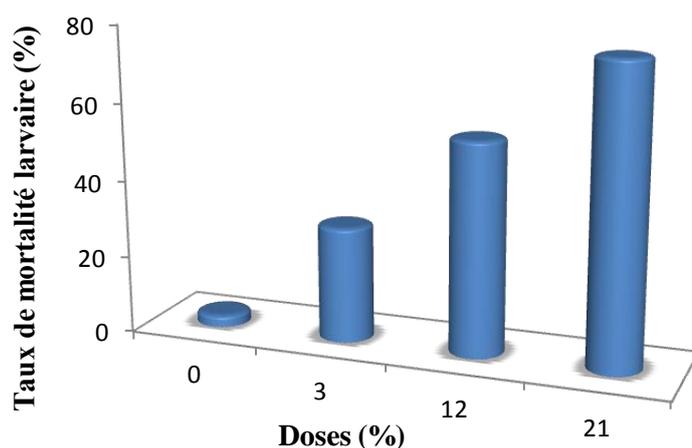


Figure 46: Taux de mortalité des larves traitées en fonction des chitinases brutes

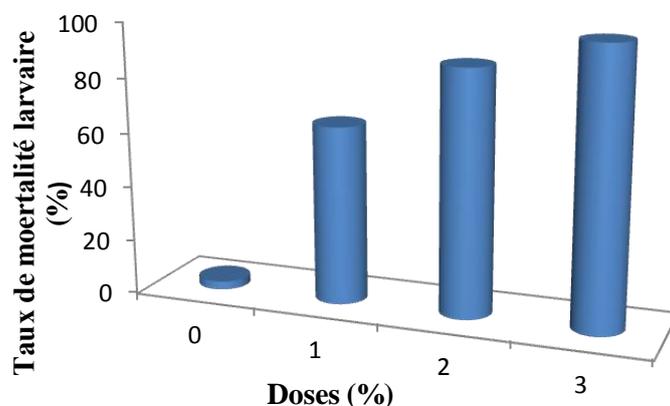


Figure 47 : Taux de mortalité des larves traitées en fonction des chitinases purifiées.

En absence des chitinases dans les graines reconstituées, 97% des larves ont donné naissance à des adultes. Par contre en présence des chitinases brutes et purifiées à des doses létales respectives de 24 et 3%, la mortalité des larves au stade 1 est très élevée (100%). Il semble donc que la présence de ces enzymes chitinolytiques tout au moins à une dose importante soient toxiques pour les larves ; ces dernières quittent les graines au premier stade de développement et se retrouvent mortes dans les boîtes de Pétri (Figure 48).

Par conséquent, on peut supposer que la mortalité des larves n'a pas lieu dès leur pénétration dans la graine mais un peu plus tardivement (4 jours après) ; cela est dû probablement à la consommation des graines traitées par ces enzymes hydrolytiques et qui doivent certainement agir au niveau de l'intestin moyen en dégradant la membrane péritrophique riche en chitine.

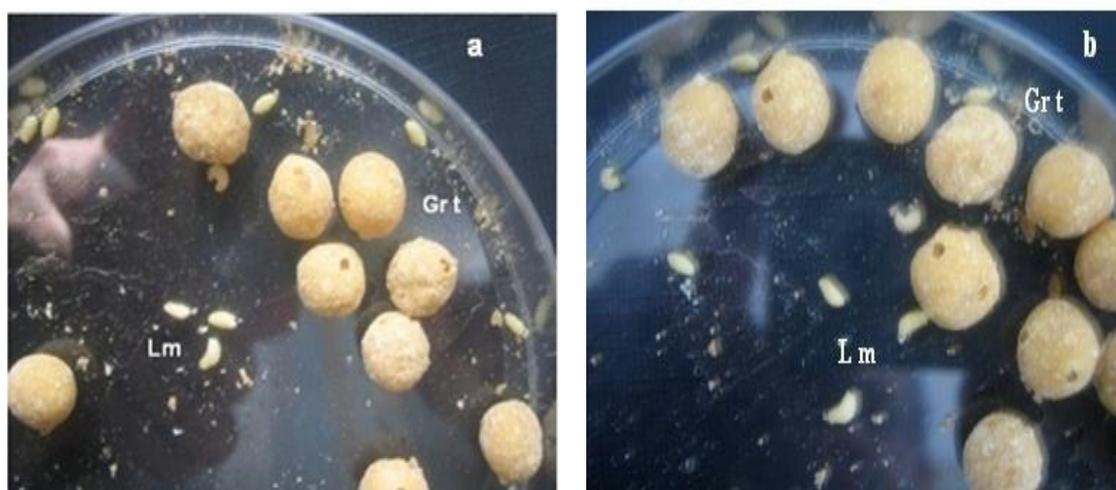


Figure 48: Photos (a) et (b) montrant la sortie des larves des graines traitées et arrêt du développement larvaire suivi d'une mort au stade 1 après consommation (Gr t : Graines traitées, Lm : Larves mortes), (a) Graines traitées à l'extrait brut chitinasique et (b) Graines traitées à l'extrait brut chitinasique purifié.

2.2.2 Effet sur l'appareil digestif

L'observation de coupes histologiques des différentes parties du tube digestif des larves, difficilement distinctes en raison de leur fragilité par rapport au très jeune âge (stade 1), a mis en évidence l'absence totale des débris alimentaires. Chez les larves témoins, dans la lumière du tube digestif sont observés quelques débris du bol alimentaire réduit à ce stade. Ceci s'explique par le fait probable que les chitinases aient engendré une lésion soit au niveau de la membrane péritrophique de l'intestin moyen (mésenteron) soit au niveau de la cuticule du stomodeum, partie stomacale. Celles-ci semblent être détruites contrairement à celles du témoin où elles semblent être présentes puisque des restes alimentaires, bien que très réduits sont observés (Figure 49 et 50). Ces altérations sont dues au pH acide du tube digestif de l'insecte favorisant l'activité hydrolytique des chitinases (pH 4) sur la membrane péritrophique du mésenteron et de la cuticule du stomodeum constituées de chitine d'où un effet immédiat qui provoque la mort des larves par absence de protection du bol alimentaire.

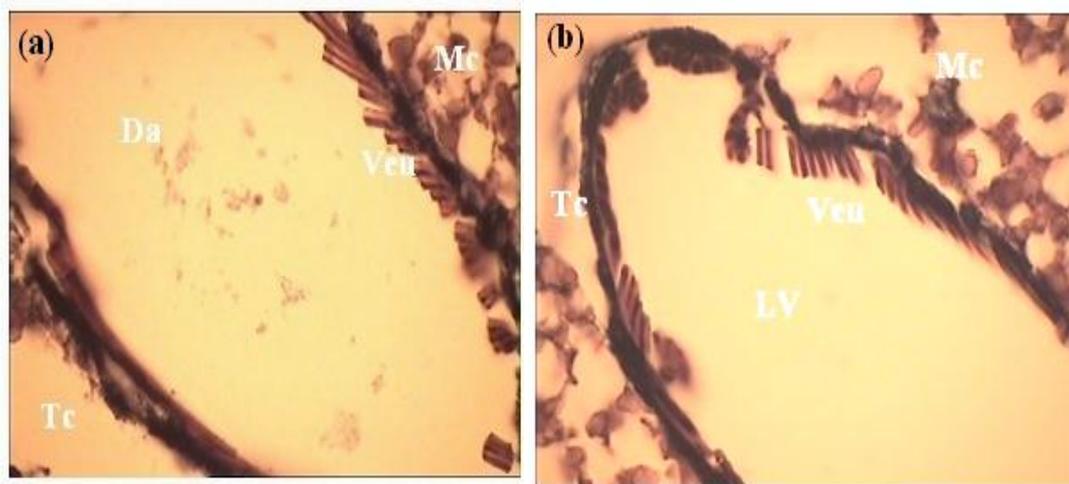


Figure 49 : Coupes histologiques transversales au niveau de l'intestin Antérieur (stomodaeum) du tube digestif des larves de stade 1 non traitées (a) et traitées (b) observées au microscope photonique GRX100. Da : débris alimentaire, Lv : lumière vide, Mc : musculature circulaire, Tc: tissu conjonctif, Veu: villosité épithélium unistratifié.

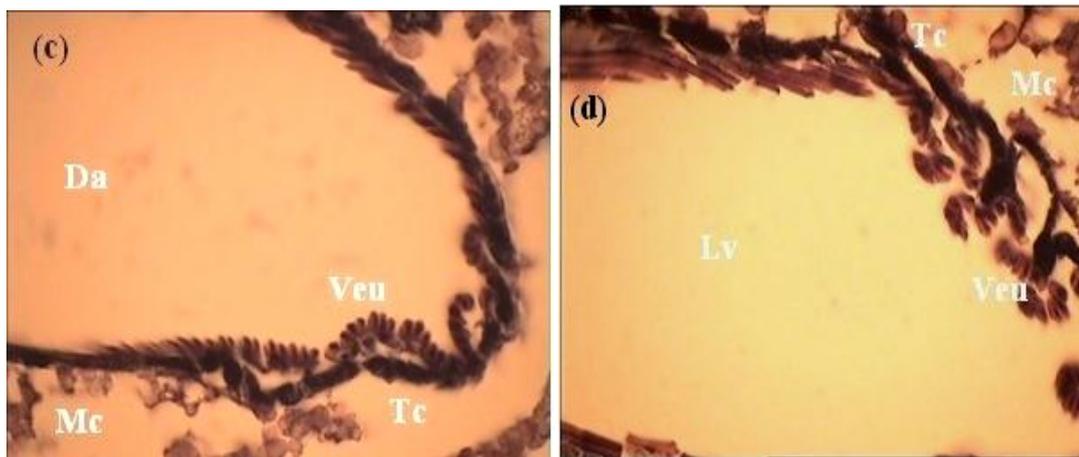


Figure 50 : Coupes histologiques transversales au niveau l'intestin moyen (mésenteron) du tube digestif des larves traitées (d) et non traitées (c) observées au microscope photonique GRX100. Da : débris alimentaire, Lv : lumière vide, Mc : musculature circulaire, Tc : tissu conjonctif, Veu : villosité épithélium unistratifié.

3. Toxicité anormale par voie orale (test d'innocuité)

Après avoir évalué la toxicité des chitinases brutes et purifiées par voie orale chez les souris, aucune anomalie n'a été observée, ni mortalité pour ces doses testées. Nous pouvons conclure que les extraits chitinasiques brutes et purifiés testés à des doses de 24% et 3% respectivement sont conformes. Si nous envisageons l'utilisation des chitinases à l'état brute ou purifié dans la lutte contre cet insecte dans les lieux de stockage, les graines traitées peuvent être destinées à la consommation.

4. Etude Statistique

L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode de la statistique multivariée qui consiste à transformer des variables liées entre elles (dites « corrélée » en statistique) en nouvelles variables décorrelées les unes des autres. Ces nouvelles variables sont nommées « composantes principales », ou axes principaux. Elle permet au praticien de réduire le nombre de variables et de rendre l'information moins redondante.

Cette analyse statistique a été utilisée pour visualiser aisément l'influence des deux paramètres abiotiques ; le temps d'exposition et la dose des chitinases brutes sur la fécondité, la fertilité et le taux de mortalité des insectes (Figure 51).

L'axe F1 (pourcentage d'inertie 82,50%) décrit essentiellement la dose, le taux de mortalité, le nombre d'œufs et d'individus émergés. L'axe F2 (pourcentage d'inertie 11,63%) décrit le paramètre abiotique qui est le temps de contact.

L'analyse fait ressortir une corrélation positive entre la dose et le taux de mortalité. Une augmentation de la dose fait augmenter le taux de mortalité.

Par ailleurs, nous remarquons que le nombre d'œufs est positivement corrélé avec le nombre d'individus émergés par contre cette corrélation est négative avec la dose. En effet quand les insectes sont traités séparément ou en couple, le nombre d'œufs pondus et le nombre d'insectes émergés diminuent en augmentant la dose.

Concernant le facteur temps, dans notre étude, il ne présente aucune corrélation ni sur le taux de mortalité ni sur la fécondité et la fertilité. D'après cette étude, nous pouvons

déduire que la dose est un facteur important influant sur les paramètres biologiques de notre insecte étudié par rapport au facteur temps

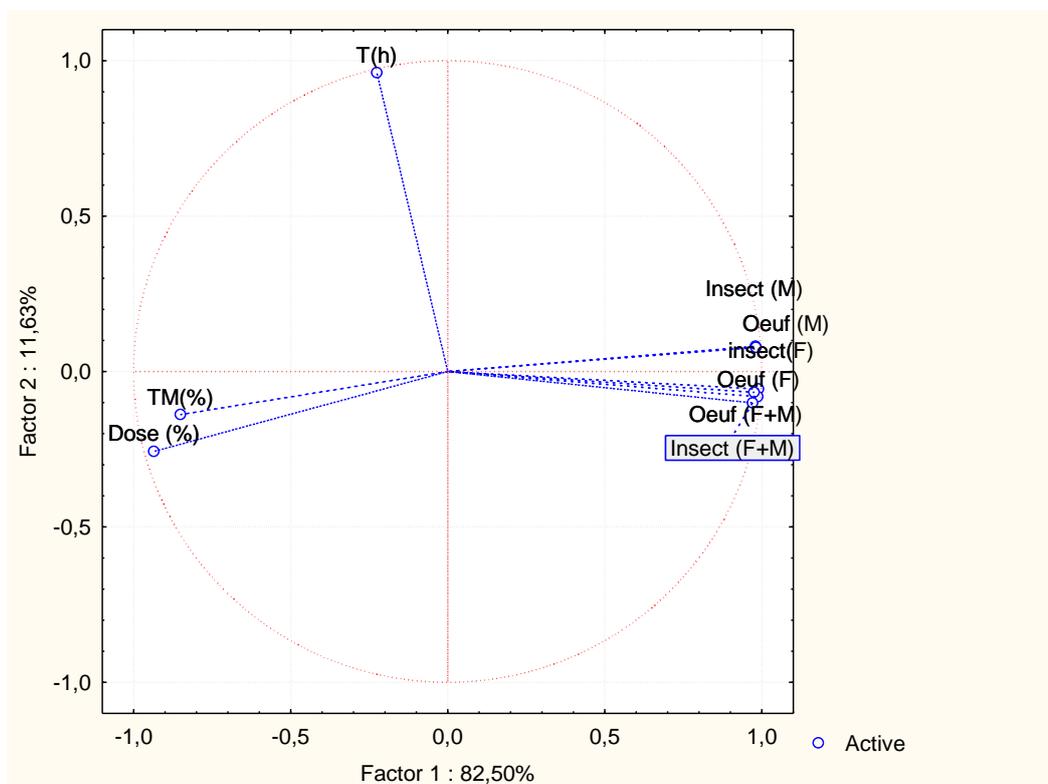


Figure 51: Analyse en Composantes Principales (ACP) montrant la corrélation entre des variables biologiques (nombre d'œufs, nombre d'insectes émergents et le Taux de mortalité) en fonction de la dose et le temps de traitement

Le thème de notre étude a porté sur la valorisation des déchets halieutiques marins. Le but était d'arriver à extraire une chitinase à partir d'abats de poisson carnassiers (Rascasse) et de tester son potentiel d'insecticide à l'égard d'un ravageur des denrées stockées, la bruche de pois chiche : *Callosobruchus maculatus*.

Afin d'améliorer le taux d'hydrolyse enzymatique des chitinases qui permet la production de chitino-oligomères grâce à leur propriétés d'hydrolyser les ponts glucosidiques reliant les carbones β 1-4 de deux groupements N-Acétyl-Glucosamine. Une purification totale a été effectuée par précipitation au sulfate d'ammonium, suivie d'un fractionnement par chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel Séphadex G-75, d'une chromatographie échangeuse anionique et enfin une électrophorèse sur SDS-PAGE suivie d'une zymogramme et d'une spectrométrie de masse ont été réalisées. Ces techniques de purification ont permis d'arriver à une activité d'environ 651U/mg, avec un facteur de purification de 163. La masse moléculaire est estimée à 50KDa.

Les résultats de l'étude des paramètres physico-chimiques en vue de la caractérisation de l'extrait enzymatique purifié montrent que l'activité chitinasique est maximale à pH 5 et une température de 80°C en présence de Co^{2+} . Par ailleurs, notre enzyme a maintenue son activité sur une gamme de pH allant de 4 à 7 pour un temps d'incubation de 24h. L'enzyme a pu maintenir son activité de 100% après 8h d'incubation de température 70 à 80°C durant 10h d'incubation en présence de Co^{2+} . L'activité de la chitinase a été stimulée par le CoSO_4 et fortement inhibée par Hg^{2+} et Hg^+ .

L'étude de la cinétique enzymatique a permis de constater que la réaction d'hydrolyse de la chitinase obéit à une cinétique michaelienne. La représentation selon Lineweaver et Burk a permis de calculer la constante cinétique de Michaelis $K_m = 0,4\text{mg/ml}$ et la vitesse maximale $V_{\text{max}} = 8 \text{ U/mg}$ avec la chitine colloïdale comme substrat.

Les 25 premiers aminoacides de l'extrémité NH_2 terminale de la chitinase ont été identifiés. Cette séquence a été comparée à d'autres séquences d'enzymes étroitement liées une grande homologie avec celle de la famille 18 a été constaté.

A ce stade de l'étude, les résultats ont mis en évidence la possibilité d'obtenir une chitinase à partir des abats de rascasse. Celle-ci présente un grand potentiel pour de nombreuses applications, en particulier dans la lutte biologique comme bio insecticide.

L'activité insecticide des chitinases brutes et purifiées sur la bruche de pois chiche : *C. maculatus* a été évaluée dans des conditions de laboratoire. Les chitinases expérimentées manifestent une activité insecticide par contact et le taux de mortalité des insectes en fonction des différentes doses révèlent que les chitinases brutes et purifiées sont efficaces vis-à-vis de *C. maculatus* avec des taux de mortalité qui varient de 10 à 100% et de 8 à 100% respectivement. Les DL50 calculées 1h après traitement montrent que les chitinases purifiées sont plus efficaces (DL50 = 1,61%) que celle des chitinases brutes (DL50= 16%).

En plus de la forte mortalité enregistrée dans les populations traitées, les chitinases réduisent significativement le potentiel reproducteur de la bruche du pois chiche. Nous constatons que le nombre d'œufs pondus par l'insecte diminue quand la dose augmente et que la fécondité est pratiquement nulle à la dose de 15%. La dose d'inhibition totale de la ponte est de l'ordre de 21%.

Concernant la fertilité des insectes, les mêmes observations sont enregistrées. Le taux d'émergence des insectes adultes s'annule à 21%.

Par ailleurs, nous notons que les chitinases testées dans nos conditions expérimentales influencent l'alimentation des jeunes larves de *C. maculatus* et provoquent un effet larvicide très significatif. L'inhibition de l'alimentation se traduit par un taux d'émergence très faible par rapport au témoin et s'explique par une toxicité par ingestion des chitinases par leurs propriétés d'hydrolyse de la matière chitineuse du tube digestif, ce qui empêche les larves d'atteindre le stade adulte.

Ces enzymes peuvent donc être considérées, dans les limites de nos conditions expérimentales, comme le meilleur agent de contrôle de l'ensemble des stades de développement de *C. maculatus*, espèce déprédatrice du pois chiche.

Les résultats des travaux de recherche obtenus dans cette thèse contribuent à la présentation de nouvelles connaissances sur le mode d'action d'une enzyme chitinolytique, la chitinase. La discussion précédente propose par ailleurs de nouvelles hypothèses et laisse envisager plusieurs avenues pour poursuivre la recherche par exemple obtenir une compréhension plus fine de la relation entre la structure et la fonction de cette enzyme.

- Abbot, S. W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide *J Econ Entomol* 18, 265-267
- Adersen S O. 1979. Biochemistry of the insect cuticle, *Annu Rev Entomol*, Vol 24, pp 29-61.
- Adrangi S, Faramazi M.A, Shahverdi A.R and Sepehrizadeh Z. 2010. Purification and characterization of two extracellular endochitinases from *Massilia timonae*, *Carbohydrate Research*, Vol 345, n°3, pp 402-407.
- Akihiko Ano, Tsutomu Takayanag, Takayuki Uchibor, Tohru Okuda and Koki Yokotsuka. 2003. Characterization of a class III chitinase from *Vitis vinifera* cv Koshu, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol 95, n°6, pp 645-647.
- Ali R et Muzquiz M. 198. ANFs in tropical legume seeds for human nutrition, in Jansman A J M, Hill G D, Huisman J, Vander poell A F B. Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and repeseed, pp 207-213.
- Ancillo G, Witte B, Schmelzer E and Kombrink E. 1999. A distinct member of basic (class I) chitinases gene family in potato is specifically expressed in epidermal cells, *Plant Mol Biol*, Vol 39, pp 1137-1151.
- Appleby J H and Credland P F. 2001. Bionomics and polymorphism in *Callosobruchus subinnotatus* (Coleoptera: Bruchidae), *Bull Entomol Res*, Vol 91, pp 235-244.
- Archana Y and Jawali N. 2007. Genitic variation and relatedness in *Vigna unguiculata* revealed by microsatellites, *foundet's day*, Special Issue, n°285, pp 190-197.
- Areshkov P.O, Avdieiv S.S, Balynska O.V, Leroith D and Kavsan V.M. 2012. Two closely related human members of chitinase-like family, CHI3L1 and CHI3L2, activate ERK1/2 in 293 and U373 cells but have the different influence on cell proliferation, *Int J Biol Scie*, Vol 8, n°1, pp 39-48.
- Arnold K, Venegras A, Houseweart C, Fuheman J.A. 1996. Discrete transcripts encode multiple chitinase isoforms in Brudian microfilariae. *Mol Biochem Parasitol*, Vol 80, pp 149-158.
- Balachovsky A. S. 1962. *Entomologie appliqué à l'agriculture, les coléoptères*, Ed Masson et Cie, Paris, T I, Vol 1, 564p.
- Baldrian. Petr, Viriskova. Jana, Dobiasova. Petra, Merhautova . Vera, Lisa. Ludmila and Valaskova. Vendula. 2011. Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant and Sol*, Vol 338, n° 1-2, pp 111-125.

- Beaulieu C. 2007. Les effets multiples du chitosane, phytothérapie, Numéro hors série, HS38 –HS45.
- Benhalima. H, Chaudhry.M.Q, Mills.K.A and Price.N.R.2004. Phosphine resistance in stored – product insects collected from various grain storage- facilities. Journal of Stored Products Research, vol 40, n°3, pp 241- 249.
- Benmouna H, Jaspard-Versali M.F, Toussaint C and Jeuniaux ch. 1986. A comparative study of chitinase activity in digestive tract of *Serranus cabrilla* and *Serranus sriba*. Biochemical Systematic and Ecology, Vol 14, n°4, pp 436-437.
- Bharat Bhushan & Hoondal.G.S. 1998. Isolation, purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11, Biotechnology Letters, Vol 20, n°2, pp 157-159.
- Binod P, Sandhya C, Pandey A. 2006. Chitinases, Chapitre 22, in « Enzyme Technologie » Pandey A, Webb C, Soccol C.R and Larroche C Ed Springer, New York, pp 433-448.
- Blackwell J. 1969. Structure of beta-chitin on parallel chain systems of poly- β (1-4)-N-acetyl- D-glucosamine. Biopolymers, Vol 7, n°3, pp 281-298.
- Blattner R., Gerard P and Spindlen-Barth M. 1997. Synthesis and biological activity of allosamidin and allosamidin derivatives, Pestic Sci, Vol 50, pp 312-318.
- Bollog D.M. 1994. Gel-filtration chromatography, Methods in Molecular Biology, Vol 96, pp 1-9.
- Boutin, J.P ; Dronne, Y ; Ducournau, S ; Gueguen, J ; Munier- Jolain, N ; Seve, B et
- Bradford KA. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, Vol 72, n° 1-2, pp 248-254.
- Braham R., Dawson B and Goodman C. 2003. The effect of glucosamine supplementation on people experiencing regular knee pain, Br J Sports Med, Vol 37, n°1, pp 45-49.
- Brameld KA and Goddard WA. 1998. The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases, Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol 95, n° 8, pp 4276-4281.
- Brisou J.1971. Techniques d'enzymologie bactérienne, Ed Masson, Paris, 286p.
- Cabib E. 1987. Adv. Enzymol, Vol 56, pp. 59-101.
- Cadenat J. 1943. Le genre *Scorpaena*, Revue des Travaux de l'Institut des pêches Maritimes (ISTPM), Vol 13, n°1-4, [http:// archimer. Ifremer. Fr/doc/1943/publication-3420. Pdf](http://archimer. Ifremer. Fr/doc/1943/publication-3420. Pdf).

- Chae DH., Jin RD., Hwangbo H., Kim YW., Park RD., Krishnan HB and Kim KY. 2006. Control of late blight (*Phytophthora capsici*) in pepper plant with a compost containing multitude of chitinase-producing bacteria, *Biocontrol*, Vol 51, pp 339-351.
- Chan PS., Caron JP and Orth MW. 2005. Effect of glucosamine and chondroitin sulphates on regulation of gene expression of proteolytic enzymes and their inhibitors in IL1 challenged bovine articular cartilage explants, *Am J Vet Res*, Vol 66, n° 11 pp 1870-1876.
- Chang W. T, Chen C. S and Wang S.L. 2003. An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source, *Current Microbiology*, Vol 47, n°2, 102-108.
- Chatton E. 1932. A-propos du rôle de la membrane péri trophique des glossines dans l'évolution du Trypanosome du crocodile *T. grayi* (*T. kochi*), *Bull Soc Path Exot*, Vol 25, pp, 275-277.
- Chen H.C, Hsu M.F & Jiang S.T. 1997. Purification and characterization of an exo-N-N-diacetylchitobiohydrolase like enzyme from *cellulomonas flavigena* NT001, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol 20, n°3, pp 191-197.
- Chen L.C, Chen Y.C, Chung Y.M & Chang C.T. 2011. Characterization of a b-N-acetylhexosaminidase from a commercial papaya latex preparation, *Food Chemistry*, Vol 124, n°4, pp 1404-1410.
- Chitvan.K, Lawrent L.B, Ming S.C, Subbaratnam M & Kun Y.Z.2010. A gut-specific chitinase gene essential for growth of *Ostinia nubilalis* larvae, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol 40, pp 621-629.
- Chlan C A and Bourgeois P B. 2001. Class I chitinases in cotton (*Gossypium hirsutum*): Characterization, expression and purification, *Plant Science*, Vol 161, n°1, pp 143-154.
- Choi K.H, Seo J.Y, Park K.M, Park C.S. 2009. Characterization of glycosyl hydrolase family 3 β -N-acetylglucosaminidases from *Thermotoga maritime* and *Thermotoga neapolitana*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol 78, n° 6, pp 455-459.
- Cohen-Kupiec R et Chet I. 1998. The molecular biology of chitin digestion, *Cure Opinion Biotech*, Vol 9, pp 270-277.
- Collins P.J. 1990. A new resistance to *pyrethroids* in *Tribolium castaneum* (Herbst), *Pest Sci (United- Kingdom)*, n° 1, Vol 28, pp 101-115.
- Coudron T.A, Kroba M.J & Ignoffo C.M. 1989. Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi, *Comp Biochem Physiol*, Vol 79B, pp 339-348.

- Cunnigham P, Nicholson D and Retnakaran A. 1987. The effect of ingested benzoylphenylurea on the ultrastructure of the cuticule deposited during the last larval instar of *Choristoneura fumiferana* clem (Lepidoptera: Tortricidae), Can J Zool, Vol 65, pp 2715-2723.
- Dahiya N, Tewari R, et Hoondal G.S. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes : a review, Applied Microbiology et Biotechnology, Vol 71, n°6, pp 773-782.
- Dahiya,N, Tewari, R, and Hoondal, C.S. 2005. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. Applied. Microbiology and Biotechnology. Vol 71, pp 773-782.
- Dandrifosse G. 1975. Purification of chitinase contained in pancreas of gastric mucosa of frag. Biochimie, Vol 75, pp 829-831.
- Das S. N, Gilliin F.D. 1991. Chitin synthase in encysting Entamoeba invadans, Biochem J, Vol 280, pp 641-647.
- Das S.N., Sarma P.V., Neeraja C., Malati N and Podile A.R. 2010. Members of *Gammaproteobacteria* and *Bacilli* represent the culturable diversity of chitinolytic bacteria in chitin-enriched soils, Word J Microbiol Biotechnol, Vol 26, pp 1875-1881.
- Delobel A et Tran M. 1993. Coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes, Orstom Publ, Paris, 424.
- Derfoul A., Miyoshi A.D., Freeman D.E and Tvan R.S. 2007. Glucosamine promotes chondrogenic phenotype in both chondrocytes and mesenchymal stem cells and inhibits MMP13 expression and matrix degradation, Osteoarthritis Cartilage, Vol 15, n°6, pp 646-655.
- Desbrières J. 2002. Chitin et chitosane. L'actualité chimique 11-12: 39-44.
- Dinesh K P, Santaram A and Shivanna. 2010. Studies on the chitinase activity in coffee (*Coffea Arabica* L). Genetic Resources in India, Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, Vol 6, n°4, pp 449-452.
- Djabali F, Brahmi B et Mamasse M. 1993. Catalogue des poissons des côtes algériennes, Pelagos, n° spécial, Bulletin de l'Institut des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral (ISMAL), 191p.
- Djair S.L,Souza, Maria.F. Grossi-de-Sa, LucianoP.Silva, Octavio L.Franco, José E.Gomes-Junior, Gustavo R.Oliveira, Thales L.Rocha, Claudio P.Magalhaes, Brener M Marra, Maria Grossi-de-Sa, Eduard Romano, Cesar Martins de-Sa, Erich Kombrink, Arrubio V.Jimenez and Luiz R.D.Abreu. 2008. Identification of a novel β -N-acetylhexosaminidase (Pcb-NAHA1) from marine Zoanthid *Palythoa caribalorum* (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthidea), Protein Expression and Purification, Vol 58, pp 61- 68.

- Di Maro A, Terracciano I, Sticco L, Ruocco M, Corrado G, Parente A and Rao R. 2010. Purification and characterization of a viral chitinase active against plant pathogens and herbivores from transgenic tobacco. *Journal of Biotechnology*, Vol 147, n° 1, pp 1-6.
- Ding X, Gopalakrishnan B, Jonhson L. B, White F.F, Wang X, Morgan D.T , Kramer K.J and Muthukrishnan S. 1998. Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene , *Transgenic Res* , Vol 7, pp77-84.
- Dong Liu, Jun Cai, Chi-Chuxie, Chuan Liu and Yue-Huachen. 2010. Purification and partial characterization of a 36-KDa chitinase from *Bacillus thuringiensis Subsp Colmeri*, and its biocontrol potential. *Enzyme and Microbiol. Technology*, Vol 46, pp 252-256.
- Dongre T K, Harwalkar M R, Nene S P, Padwa L et Desai S R. 1997. Radisensitivity of different developmental stage of pulse beetle (*Callosobruchus maculates*), *India Journal of Food Science and Technology (MYSORE)*, Vol 34, n°5, pp413-415.
- Duskova Djamila., Tishchenko Galina., Ponomareva Evgenia., Simurek Jiri., Koppova Ingrid., Skalova Tereza., Stepankova Andrea., Hasek Jindrich and Dohnalek Jan. 2011. Chitinolytic enzymes from bacterium inhabiting human gastrointestinal tract-critical parameters of protein isolation from anaerobic culture, *Acta Biochimica Polonica (ABP)*, Vol 58, pp 261-263.
- Eberhart J.P. 1989. *Analyse structural et chimique des matériaux*, Ed Dunod, 53p.
- Einbu A, Grasdaden H and Varum K.M. 2007. Kinetic of hydrolysis of chitinchitosanogomers in concentrated hydrochloric acid, *carbohydrate Research*, Vol 342, n°8, pp 1055- 1062..
- Elango N, Correa J V and Cabib E. 1982. Secretory character of yeast chitinase, *J Biol Chem*, Vol 257, pp 1398-1400.
- El-Sayed G.N, Coudron T.A & Ignoffo C.M. 1989. Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea ileyi*, *J Invertr Pathol*, Vol 54, pp 394-403.
- FAO Fisheries and Aquaculture Department. 2007; *The state of World fisheries and aquaculture: 2006*, Food and Aquaculture Organization of the United Nation, Rome,3-4;
- Falini G, Weinner Sand Addadi L. 2003. Chitin-Silk Fibrain interaction relevance to calcium carbonate formation in invertebrates, *Calcified Tissue International*, Vol 75, n°5, pp 548-554.

- Fange R, Lundblad G, Lind J and Slettingen K. 1979. Chitinolytic enzymes in the digestive system of marine fishes. *Marine Biology*, Vol 53, pp 317-321.
- Ferial Alaeddine; 2000. Etudes moléculaires de la surface des nematodes. These de Doctorat en Biologie, Université de Neuchatel, 98p.
- Fiandra L, Terracciano I, Fanti P, Garonna A, Ferracane L, Fogliano V, Casertelli M, Giordana B, Rao R and Pennacchio F. 2010. A viral chitinase enhances oral activity of TMOF. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 40, n°7, pp 533-540.
- Fields P.G. 2001. Ravageurs des entrepôts de grains et des produits alimentaires, Ed Centre de recherche sur les céréales, Canada, pp 698-699.
- Fines , B.C; and Holt, G.J. 2010. Chitinase and apparent digestibility of chitin in the digestive tract of Juvenile *Cobia* *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* , Vol 303, n°1-4, pp 34-39.
- Finney,D. J. 1971. Probit analysis, 3rd Edition, Cambridge University Press.
- Fitches E, Wilkinson H and Bell H. 2004. Cloning expression and functional characterization of chitinase from larvae of tomato moth (*Lacanobia oleracea*: a demonstration of the insecticidal activity of insect chitinase, *Insect Biochem Molec*, Vol 1037-1050.
- Flash J, Pilet P.E et Jolles P. 1992. What's new in chitinase research? *Experientia*, Vol 48, pp, 701-716.
- Fleurat Lessard F. 1989. Autre méthodes de lutte, Ed AFNOR et ITCF, Paris, pp 165-168.
- Fleurat Lessard F. 1998 Entomologie des céréales et des dérivés et autres contamination d'origine animal in Godon B, Wllam C. 1998. Les industries des premières transformations des céréales, Ed Techniques et Documentation Lavoisier, pp 174-202.
- Frangé R., Lundblad G., Lind J and Slettingren K. 1979. Chitinolytic enzymes in the digestive system of marine fishes, *Marine Biology*, Vol 53, pp, 317-321.
- Frank Hoster, Jessica E and Ralf Daniel. 2005. Enrichment of chitinolytic microorganisms: Isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol 66, pp 434-442.
- Gohel V et Naseby D.C. 2007. Thermal stabilization of chitinolytic enzymes of *Pantoea dispersa*. *Journal of Biochemical Engineering*, Vol 35, pp 150-157.
- Gonio, Sanchez-Ballesta M T, Merodio C and Escribano M I. 2010. Ripening, related defense proteins in *Annona* fruit, *Postharvest Biology and Technology*, Vol 55, n°3, pp 169-173.

- Gooday G. W, Zhu W. Y and O'Donnel R W. 1992. What are the roles of chitinases in the growing fungus? FEMS Microbiol Lett 100: pp 387-392.
- Gooday G.W. 1990. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan, Bioegradation, Vol 1, pp 177-190.
- Gooday G.W. 1990. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan, Bioegradation, Vol 1, pp 177-190.
- Gooday, G.W. 1999. Aggressive and defensive role for chitinases, in chitin and chitinases, P.J.a.R. A.A. Muzzarelli, Editor. 1999. Birkhauser Verlag Basel (Switzerland). pp, 157-169.
- Goodrich T. D and Morita R. .Y. 1977. Bacterial chitinase in the stomachs of marine fishes from Yaquina Bay, Oregon , USA, Marine Biology, Vol 41, pp 355-360.
- Gorii O., Sanchez- Ballesta M T., Merodio C and Escribano M .I. 2009. Regulation of defense and cryoprotective proteins by high levels of CO₂ in Annona fruits stored at chilling temperature, J Plant Physiol, Vol 166, pp 246-258.
- Graham L. S and Sticklen M. B. 1994. Plant chitinases, Can, J, Bot, Vol 72, pp, 1057-1083.
- Guo R.F., Shi B.S., Li D.C., Ma W and Wei Q. 2008. Purification and characterization of a novel thermostable chitinase from *Thermomyces lanuginosis* SY2 and cloning of its encoding gene, Agric Sci in China, Vol 7, pp 1458- 1465.
- Gupta, V.K, Gupta, A, Misra, A.K, Claur, R.K, and Pandey, B.K. 2010 b. RAPD- PCR of *Trichoderma* isolates and in vitro antagonism against *Fusarium wi* and pathogens of *Psidium guajava* L.J. Plant Protection Res, Vol 50,pp 256-262.
- Gustowska, M.A, Drazen, J.C and Robison, B.H. 2004. Digestive chitinolytic activity in marine fishes of Monterey Bay, California, Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Vol 139, pp 351-358.
- Gwinner J, Harnisch R and Muck O.1996. Manuel sur la manudention et la conservation des graines après récolte , progrès de protection des stocks et des récoltes, Echborn R.F.A, 388p.
- Hackman R.H et Goldberg M. 1965. Studies on chitin, VI, nature of alpha and beta chitin, Australian Journal of Biological Science, Vol 18, n°4, pp 35-941.
- Haki G.D and Rakshit S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, Bioresource and Technology, Vol 89, pp 17- 34.

- Han Y, Yang B. J, Zhang F. I, Miao X. L and Li Z. Y. 2009. Characterization investigation of antifungal marine chitinase from *Streptomyces* sp. DA11 associated with south china sea sponge *Craniella australiensis*, *Marine Biotechnology*, Vol 11, n°1, pp
- Henrissat B and Bairach A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequences similarities , *Biochemical Journal*, Vol 293, pp, 781-788.
- Henrissat B and Bairoch A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based an amino acid sequence similarities, *Biomchmical Journal*, Vol 59, pp 311-313.
- Henrissat B. 1991. Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochemical, Journal*, Vol 280, pp 309-316.
- Hewick R.M, Hunkapiller M.W, Hood L.E and Dreyer W.J. 1981. A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator, *J Biol Chem*, Vol 256, pp 7990-7997.
- Hoffman A and Labeyrie. 1962. *Entomologie appliqué à l'agriculture*, Ed Masson et Cie, Paris, T.I, 564p.
- Homandberg GA., Guo D and Ray LM. 2006. Mixtures of glucosamine and chondroitin sulphate reverse fibronectin fragment mediated damage to cartilage more effectively than either agent alone, *Osteoarthritis Cartilage*, Vol 14, n°8, pp 793-806.
- Hung T.H, Chang Y.M, Sung H.Y & Chang C.T. 2002. Purification and characterization of hydrolase with chitinase and chitosanase activity from commercial stem bromelain, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 50, n° 16, pp 4666-4673.
- Hunkapiller M.W and Hood L.E. 1978. Direct microsequence analysis of polypeptides using an improved sequenator, a nanoprotein carrier (polybrene) and high pressure liquid chromatography, *Biochemistry*, Vol 17, pp 2124-2133.
- Hynes R.K., Boytchko S.M. 2006. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations, *Soil, Biol, Biochem*, Vol 38, pp 845-849.
- Ikeda, M, Miyauchi, K, Mochizuki, A and Matsumiya, M. 2009. Purification and characterization of chitinase from the stomach of silver croaker *Pennahia argentatus*, *Protein. Expression and Purification*, Vol 65, n°2, pp 214-222.
- Ikeda, M, Miyauchi, K, Mochizuki, A and Matsumiya, M. 2010. Purification and characterization of chitinase from the stomach of silver croaker *Pennahia argentatus*, *Protein. Expression and Purification*, Vol 65, n°2, pp 214-222.
- Ikeda M., Miyauchi and Matsumiya M. 2012. Purification and characterization of a 56KDa chitinase Izozyme (PaChiB) from the stomach of the Silver Croaker, *Pennahia argentatus*, *Biosci Biotehnol Biochem*, Vol 76, n°5, pp 971-979.

- Intekhab J and Aslam M. 2009. Isolation of a flavonoid from the roots of *Citrus sinensis*, Malaysian Journal of Pharmaceutical Science, Vol 7, pp 1-8.
- Isaac Kirubakaran S and Sakthivel N. 2007. Cloning and over expression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli*, Protein Expression and Purification, Vol 52, pp 159-166.
- Itoi S, Kanomata Y, Koyama Y, Kadokura K, Uchida S, Nishio T, Oku T and Sugita H. 2007. Identification of a novel endochitinase from a marine bacterium *Vibrio proteolyticus* strain N° 442, Biochimica and Biophysica Acta (BBA), Proteins and Proteomics, Vol 1774, n°9, PP 1099-1107.
- Izabella S, Santos, Maura Da Cunha, Olga L T, Machado and Valderene M. Gomes. 2004. A chitinase from *Adenanthera pavonina* L. Seeds : purification, characterization and immunolocalisation, Plant Science, Vol 167, pp 1203-1210.
- Jeuniaux C. 1963. Chitine et chitinolyse, Masson et Cie, Paris.
- Ji-Ping Zhang, Qing-Xi Chen, Qin Wang & Jin-Jin Xie. 2006. Purification and some properties of β -N-Acetyl-D-glucoaminidase from Viscera of green crab (*Scylla serrata*), Biochemistry, Vol 71, n°1, pp 55-59.
- Kabir, K.E, Hirowatari, D, Watanabe, K, and Koga, K. 2006. Purification and characterization of a novel isozyme of chitinase from *Bombix mori*. Biosci. Biotechnol. Biochem, Vol 70, pp 252-262.
- Kamoun P. 1997. Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire, Flammarion Médecine Science, Paris, 411p.
- Karasuda S, Yamamoto K, Kono M, Sakuda S, and Koga D. 2004. Kinetic analysis of chitinase from red sea bream, *Pagrus major*, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, Vol 68, n°6, pp 1338-1344.
- Kasprzwska A .2003. Plant chitinases-Regulation and function, Cellular and Molecular Biology Letters, Vol 68, n°6, pp 1338-1344.
- Keita S. M, Vincent C, Schmidt J.P, Amason J.T and Belanger A. 2001 Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab)(Coleoptera: Bruchidae), J Stored Prod Res, Vol 37, pp 339-3349.
- Kellouche A. 2005. Etude de la bruche du pois chiche *Callosobruchus maculatus* F (Coléoptera Bruchidae), physiologie, reproduction et lute, Thèse Doctorat d'état en Science Naturel, Univ T.O.Z, Spécialité : Entomologie, 216P.
- Khor E and Lim L.Y. 2003. Implantable applications of chitin and chitosan, Biomaterial, Vol 24, n°13, pp 2339-2349.

- Kim H.S, Timmis K.N & Golyshin P.N. 2007. Characteriation of chitinolytic enzyme from *Serratia sp* KCK islated from kimchi juice, Applied Microbiology & Biotechnology, Vol 75, n°6, pp 1275-1283.
- Kim Y.E, Yi S.Y, Lee C.S, Jung Y and Chung B.H. 2012. Gold patterned biochips for on-chip immune- MALDI/TOF MS: SPR imaging coupled multi-protein MS analysis, Analyst, Vol 37, n°2, pp 386-392.
- Kondreddy. Anil, Kottapalli. Seshagirirao, Appa, and Rao. Podile. 2007. A simple, rapid and yet less expensive method to detect chitinase in agarose plates. J. Biochem. Biophys. Methods. Vol 70, pp 683-684.
- Kono M., Matsui T., Shimizu C and Koga D. 1990. Purification and some properties of chitinase from the stomach of japenese eel, *Anguilla japonica*, Agric Biol Chem, Vol 54, pp 973-978.
- Kostukovsky M, Ravid U and Shaaya E. 2002. The potential use of plant volatils for the control of stored product insects and quarantine pests in cut flowers, Proc And Conf on MAP, Ed J Bernath et al, PP 347-353.
- Kramer Karl J and Muthukrishnan Subbaratnam. 1997. Insect chitinases: Molecular Biology and potential use as biopesticides, Insect Biochem Molec Biol, Vol 27, pp 887-900.
- Kumar M. A, Timm D.E, Neet K.E, Owen W.G, Peumans W J and Rao A. G. 1993. Caracterization of the lectin from the bulbs of *Eranthis hyemalis* (Winter aconite) as an inhibitor of protein synthesis, J Biol Chem, n° 33, Vol 268, pp 25176-25183.
- Kunz C., Ludwig A., Bertheau Y and Boller T. 1992. Evaluation of the antifungal activity of the purified chitinase I from the filamentous fungus *Aphanocladium album*, FEMS Microbiol Lett, Vol 90, pp 105-109.
- Kuranda M J and Robbins P W. 1981. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*, J Biol Chem, Vol 266, pp 19758-19767.
- Labeyrie V. 1981. Variance de carence proteique par le developpement des légumineuses alimentaires et la prttection de leurs récoltes contre les bruches, Food Natr Bull, n°1, Vol3, pp 24-38.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, Vol 227, pp 680-685.
- Laribi, H et Mameri, N.2008. Localisation and characterization of crude chitinases extracted from marine biomass. Proceedings of the International Seminar on Biotechnology in Food Service Sector (Ed. K.Feliachi), Jun 17-18, Tipaza, Algeria, I, 142-145.

- Laribi, H. 2005. Etude de l'hydrolyse enzymatique de la chitine par des chitinases extraites de la biomasse marine, Thèse de Magister, E.N.P, 86p.
- Laumont P et Chevassus A. 1956. Note sur l'amélioration du pois chiche en Algérie, Annales de l'institut des services de recherches de l'expérimentation en Algérie, Fascicule 2, pp 1-16.
- Lawrence S and Novak N. 2006. Expression of poplar chitinase in tomato leads to inhibition of development in Colorado potato beetle, *Biotechnol Lett* Vol 28, pp 593-599.
- Leah R, Tommerup H, Svendsen I and Mundy J. 1991. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties, *J Biol Chem*, Vol 266, pp 1564-1573.
- Lee R E, Lee M R, Strong G and Gunderson J M. 1993. Insect cold Hardiness and ice nucleating active microorganisms including their potential use for biological control, *J Insect Physiol*, n° 1, Vol 39, pp1-2.
- Lepesme P, 1944. Les coléoptères des denrées alimentaires et des produits industrielles entreposés, Ed Paul Le Chevalier, Paris, 335P.
- Li Duo-Chuan. 2006. Review of fungal chitinase. *Mycopathologia*, Vol 161, pp 345-360.
- Lienard V, and Seck D. 1994. Revue des methods de lutte contre *Callosobruchus maculatus* (F) (Coleoptera : Bruchidae), 21 p.
- Linn M. C, Lora J. M, Gardia I, Cruz J, Iobell L, Bentez T, Pintor-Tero J.A. 1995. Primary structure and expression pattern of the 33-KDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*, *Curr Genet*, Vol 28, pp478-483.
- Liu D, Cai J, Xie C and Chen Y 2010. Purification and characterization of a 36 KDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* Subsp, *colmeri*, and its biocontrol potential, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol 46, n°3-4, pp 252-256.
- Magdalena A, Guowska, Jeffrey C, Drazen, Bruce H, Robinson. 2004. Digestive chitinolytic activity in marine fishes of Monterey Bay, California. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*, Vol 139, pp 351-358.
- Mao S, Shuai X, Unger F, Simon M, Bi D and Thomas Kissel T. 2004. The depolymerisation of chitosan: Effects on physicochemical and biological properties, *International Journal of Pharmaceutics*, Vol 281, n°1-2, pp 45-54.
- Masako Suzuki, Masami Morimatsu, Tetsuro Yamashita, Toshihiko Iwanaga and Bunei Syuto. 2001. A novel serum chitinase that is expressed in bovine liver, *FEBS Letters*, Vol 506, pp 127-130.

- Mathur A., Rawat A., Bhatt G., Baweja-Ahmad F., Grover A., Madhav K., Dhand M., Mathur D., Verma SK., Singh KS and Dua VK. 2011. Isolation of *Bacillus* producing chitinase from soil: production and purification of chito-oligosaccharides from chitin extracted from fresh water crustaceans and anti microbial activity of chitinase, *Recent Research in Science and Technology*, Vol 3, n°11, pp 1-6.
- Martoja M et Martoja R. 1967. Initiation histologique aux techniques de l'histologie animales Masson et Cie, 345 p.
- Matsumiya Masahiro. 2004. Enzymatic production of N- acetyl- D- glucosamine using crude enzyme from the liver of squids. *Food. Sci. Technol. Res*, Vol 10 n°3, pp 296-299.
- Matsumiya, M, Arakane, Y, Haga, A, Muthukrishnan, S, and Kramer, K.J. 2006. Substrate specificity of chitinases from two species of fish, greenling, *Hexagrammos otakii*, and common mackerel, *Scomber japonicus*, and the insect, tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *Bioscience. Biotechnology, and Biochemistry*, Vol 70, n°4, pp 971-979.
- Merz R.A, Horsh M, Nyhlen L. Eand Rats D.M. 1999. *Biochemistry of chitin synthase in Chitin and chitinases* Birkhauser Verlag, Berlin
- Merzendorfer H. 2006. Insect chitin synthases: a review. *Journal of Comparative Physiology- Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, Vol176, N°1, pp.1-15.
- Michiko Kono., Takashi Matsui and Chiaki Shimizu. 1987. Purification and some properties of chitinase from the stomach of red sea bream *Pagrus major*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, Vol 34, n°1, pp 131-136.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal Chem*, Vol 31, pp 426-428.
- Mills J .T. 1990. Protection des grains et des graines oléagineuses stockées à la ferme contre les insectes les acariens et les moisissures, *Minist Approv Serv, Canada, Agrican Public*, n° 1851 ? 49p.
- Minke R and Blackwell J. 1978. The structure of alpha-chitin. *J Mol Biol*, Vol120, pp.167-181.
- Molinari, L.M, Bocchi-Pedroso, R, Oliveira- Scoaris, D, Ueda-Nakamura, T, Vataru-Nakamura, C, and Prado Dias Filho, B. 2007. Identification and partial characterization of a chitinase from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Comparative. Biochemistry and Physiology, Part B*, Vol 146, n°1, pp 81-87.
- Multon J.I. 1982. Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux, Ed Lavoisier, Tec et Doc APRIA T.I, Paris, pp 394-412.

- Muzzarelli R A A. 2011. Chitin nanostructures in living organisms. *Earth and Environmental Science*, Vol 34, pp 1-34.
- Muzzarelli R. A. A, Mattioli- Belmonte M, Pugnaroni A et Biagini G. 1999. *Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing in, chitin and chitinases* Birkhauser verlag, Berlin.
- Muzzarelli RAA. 1977. Chitin Pergamon Press, Oxford cité dans: Saguez. Julier. 2007. Dérégulation des activités chitinases : vers de nouvelles perspectives de lutte contre les aphides. Thèse de Doctorat de l'Université de Picardie Jules Verne.
- Narasimha.K.K, Zhuqing L, Fan F, Qiao J .Y and Zhengqiang J. 2011. Purification and characterization of a chitinase (SAMC) with antifungal activity from seeds of *Astragalus membranaceus*, *Process Biochemistry*, Vol 46, n°6, pp 1370-1374.
- Neale A D, Wahleithner J A, Lund M, Bonnett H T, Kelly A, Meeks-Wagner D R, Peacock W J and Dennis E S. 1990. Chitinase, beta-1,3- Glucanase, osmotin, are expressed in tobacco explants during flower formation, *Plant Cell*, Vol 2, pp 673-684.
- Niek N. Sanders, Vincent G. H. Eijsink, Petra S. Vanden Pangaart, R. J. Joost Van Neerven, Peter J. Simons, Stefaanc De Smedtand Joseph Demeester. 2007. Mucolytic activity of bacterial and human chitinases, *Biochimica and Biophysica Acta* , Vol 1770, pp 839-846.
- Noishki Y, Nishiyama Y, Wada M and Kuga S. 2005. Complexation of α chitin with aliphatic amines, *Biomacromolecules*, Vol 6, n°4, pp.2362-2364.
- Nopakam .R, Shigekazu.Y and Abhinya.P. 2007. Purification of *Aspergillus sp.S1-13* chitinases and their role in Saccharification of chitin in Mash of solid-stae culture with shellfish waste, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol103, n°6, pp 535-541.
- Nordon P.2006. Ovogénèse et transmission des bactéries symbiotiques chez le charançon *Sitophilus oryzae* L (Coleoptera : Curculionioidea), *Ann Soc Entomol*, Vol 42, n°2, pp 129-164.
- Ohtakara A.1988. Chitinas and β -N-acetylglucosaminidase from *Pycnopus cinnabarinus*. W.A.Wood, S.T. Kellogg (Eds), *Method in Enzymology* Academic Press, New York, Vol 161, pp, 462-470.
- Okutani K. 1966. Studies of chitinolytic systems in the digestive tracts of *Lateolabrax japonicus*. *Bull, Masaki Mar, Biol, Inst, Kyoto Univ*, Vol 10, pp 1- 47.
- Ordenlich A., Elad Y and Chet I. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*, *Phytopathol*, Vol 78, pp 84-88.
- Oshima H, Miyazak R, Yoshihi O, Hiroaki H, Kosuka K and Kikuyama S. 2002. Molecular cloning of a purative gastric in the Toad *Bufo japonicas*, *Zoological Society of Japan*, Vol 19, n°3, pp 293-297.

- Owens S., Wagner P., Vangsness CT. 2005. Recent advances in glucosamine and chondrotin supplementation, *J Knee Surg*, Vol 17, n°4, pp 185-193.
- Passarinho P A, Van Henzel A J, Framsz P F and Vries S C. 2001. Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* AtEP3/ Atchit IV endochitinase gene, *Planta*, Vol 212, pp 556-567.
- Passonneau J V and Williams C M. 1953. The moulting fluid of the *Cecropia silkworm*, *J exp Biol*, Vol 30, pp 545-560.
- Patel A. K, Singh V. K., Vadar R.R, Moir A. J. G and Jagannadham M. V. 2010. Purification and characterization of a new chitinase from latex of *Ipomoea carnea*, *Process Biochemistry*, Vol 45, n° 5, pp 675-681.
- Patil RS; Ghormade V and Deshpande MV. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration, *Enz Microbiol TRechn*, Vol 26, pp 473-483.
- Perrakis A, Tews I, Dauter Z, Oppenheim A. B, Chet I, Wilson K.S and Vorgias E.C. 1994. Crystal structures of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure*, Vol 2, n°12, pp 1169-1180.
- Perrakis A, Wilson K.S, Chet I, Oppenheim A.B and Vorgias C.E. 1993. Phylogenetic relationships of chitinases. R.A.A. Muzzarelli. Ed. *Chitin Enzymology*. Eur. Chitin. Soc Ancora
- Peters W. 1992 *Peritrophic membranes* Springer-Verlag, Berlin
- Pichyangkura A., Kudan S., Kultiyawong K., Sukwattanasinitt M and Alta S. 2002. Quantitative production of 2-acetamido-D-glucose from crystalline chitin by bacterial chitinase, *Carbohydr, Res*, Vol 337, pp 557-559.
- Powell K.S, Gatehouse A.M.R, Hilder V.A & Gatehouse J.A. 1993. Antimetabolic effects of plant lectins and plant and fungal enzymes on the nymphal stages of two important rice pests *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix cincteps*, *Entomol Exp Appl*, Vol 66, pp 119-126.
- Proespraiwong P, Tassanakajon A and Rimphanitchayakit V. 2010. Chitinase from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: Phylogenetic expression and activities, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, Vol 156, n°2, pp 86-96.
- Rebeka S Marsh, Cassandra Moe, Richard B Lomneth, James D Fawcett and Allen Place. 2000. Characterization of gastro intestinal chitinase in the lizard *Sceloporus undulatus garmani* (Reptila: Phrynosomatidae), *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, Vol 128, pp 675-682.
- Reissig J.L, Strminger J.L and Leloir L.F. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J Biol Chem*, Vol 217, pp 959-967.

- Renkema G.H., Boot R.G., Muijsers A.O., Donker- Koopman WE and Aerts JMFG. 1995. Purification and characterization of human chitobiosidase: a novel member of the chitinase family of proteins, *Journal of Biological Chemistry*, Vol 270, n°5, pp 2198- 2202.
- .Regnault-Roger C. 2005. Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, Lavoisier, Paris
- Reyes F., Calatayud J and Martinez MJ. 1988. Chitinolytic activity in the autolysis of *Aspergillus nidulans*, *FEMS (Fed Eur Microbiol Soc) Microbiol Lett*, Vol 49, pp 239-243..
- Rovetta G., Monteforte P., Molfetta G and Balestra VA. 2004. Two year study of chondrotin sulfate in erosive osteoarthritis of the hands : behaviour of erosions osteophytes, pain and hand dysfunction, *Drugs exp, Clin Res*, Vol 30, n°1, pp 11-6.
- Rudall KM et Kenchington W. 1973. The chitin system. *Biological Review*, Vol 48, pp 597-636.
- Ruiz-Harrera J et Martinez- Espinoza AD. 1999. Chitin biosynthesis and structural organization in vivo in: Jolles P et Muzzarelli RAA. *Chitin and chitinases* Birkhauser Verlag. Basel.
- Ruiz -Herrera J and San-Blas G. 2003. Chitin synthesis as target for antifungal drugs, *Curr Drug Targets Infect Disord*, Vol 3, pp77-91.
- Saguez J, Hainez R, Cherqui A. 2005. Unexpected effects of chitinases on the peach potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer) when delivered via transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* Linné) an in vitro, *Transgenic Res* Vol 14, pp57-67.
- Saguez J. 2007. Deregulation des activités chitinases: vers de nouvelles perspectives de lutte contre les aphides. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur. Faculté des Sciences- Ecole Doctorale Science et Santé, Université de Picardie Jules Verne, 119p
- Sahai A. S and Manocha M.S. 1993. Chitinases of fungi and plant: their involvement in morphogenesis and host parasite interaction, *FEMS Microbiol Rev*, Vol 11, pp 317-338.
- Shailesh R., Waghmare J and Ghosh S. 2010. Study of the thermostable chitinases from *Oerskovia xanthineolytica* NCIM 2839, *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol 86, pp 1849-1856.
- Sakuda S and Sakurada M. 1998. Preparation of biotinylated allosamidin with strong chitinase inhibitory activities, *Bioorg Med Chem Lett*, Vol 8, pp 2987-2990.
- Sakuda S., Isogai A., Matsumoto S and Suzuki A. 1987. Search for microbial insect growth regulators II. Allosamidin, a novel chitinase inhibitor, *J Antibiot*, Vol 40, pp 296-300.

- Sami L., Pusztahelyi T., Emri T., Varecza Z., Fekete A., Kiss L and Pocsib I. 2001. Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: chitinase production and antifungal effect of allosamidin, *J Gen Appl Microbiol*, Vol 47, pp 201-211.
- Sampson M. N et Gooday G. W. 1998. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* During pathogenesis in insects, *Microbiology*, Vol 144, n°10, pp 2189-2194.
- Sandeep Varma R, Jonhson George K, Balaji S, and Parthasarathy V. A. 2009. Differential induction of chitinase in *Piper colubrinum* in response to inoculation with *phytophthora capsici*, the cause of foot rot in black pepper, *Saudi Journal of Biological Sciences*, Vol 16, n°1, pp11-16.
- San-Lang Wang, Ing-Lung Shih, Tze-Wun Liang & Chi-Hau Wang. 2002. Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in shrimp and crab shell powder medium, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 50, pp 2241-2248.
- San-Lang Wang, Tzu Yin Lin, Yue-Horng Yen, Hui-Fen Liao and Yu-Jen Chen. 2006. Bioconversion of shell fish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase, *Carbohydrate Research*, Vol 341, pp 2507-2515.
- Santos S.I, Cunba M.D, Machado O.L.T & Gomes V.M. 2004. A chitinase from *Adenanthera pavonina* L seeds: purification, characterization and immunolocalisation, *Plant Science*, Vol 167, n° 6, pp 1203-1210.
- Schlein Y, Jacobson R L and Shlomai J. 1991. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in sand fly vector, *Proc R Soc London Ser B. Biol Sci*, Vol 254, pp 121-126.
- Scriban R. 1999. *Enzymologie*, 5^{ème} édition, Tec et Doc Lavoisier, 1042 p.
- Setthakaset P, Pichyangkura R, Ajavakom A and Sukwattanasinitt M. 2008. Preparation of N-acetyl-D—Glucosamine using enzyme from *Aspergillus* sp, *Journal of Metals, Materials and Minerals*, Vol 18, n°2, pp. 53-56.
- Shahabuddin M., Kaidoh T., Aikawa M and Kaslow DC. 1995. *Plasmodium gallinaceum*: mosquito peritrophic matrix and the parasite- vector compatibility, *Exp Parasitol*, Vol 81, pp 386-393.
- Shahaduddin M and Vinetz JM. 1999. Chitinases of human parasites and their implication as antiparasitic target, *Chitin and Chitinases*, Vol 87, pp 223-234.
- Shailes, R, Waghmare and Jai, S. Ghosh. 2010. Study of thermostable chitinases from *Oereskovia xanthineolytica* NCIM 2839, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol 86, n° 6, pp 1849-1856.

- Shakoori A.R, Malik M.Z and Salem M.A. 1993. Toxicity of Karate to Malathion resistant Pakistan strain strain of *Tribolium castaneum* (Herbst) adults, Pakistan, J Zool, Vol 25, pp261-271.
- Sharma N., Sharma K P., Gaur R K and Gupta V K. 2011. Role of chitinase in plant defense, Asian Journal of Biochemistry, Vol 6, pp 29-37.
- Shen Z and Jacobs-Lorena M. 1999. Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates, J Mol Evol, Vol 48, pp 341-347.
- Shih C, Gepts P. L and Whittaker J.R. 2002. Protein structures of common bean, *Phaseolus vulgaris*, J Agrc Food Chem, Vol 50, pp 6618-6627.
- Showalter A M. 2001. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function, Cell Mol Life Sci, Vol 58, pp 1399-1417.
- Siedl V. 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions, Fungal Biology Reviews, Vol 22, n°1, pp 36-42
- Singh A., Isaac Kirubakaran S and Sakthivel N. 2007. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat, Protein Expression and Purification, Vol 56, pp 100-105.
- Soltner D. 1990. Les bases de la reproduction végétale, sol, climat, plante, Ed Lavoisier, 464p.
- Songsiririthigul C., Lapboonrueng S., Pechsrichuang P., Pesatcha P. and Yamabhai M. 2010. Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA); suitable for bioconversion of chitin waste, Bioresource Technology, Vol 101, n° 11, pp 4096-4103.
- St-Leger R.J, Cooper R.M & Charnley A.K. 1991a. Characterization of chitinase and chitinase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, J Invertebr Pathol, Vol 58, pp 415-426.
- St-Leger R.J, Staples R.C & Roberts D.W. 1991. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isoenzymes, J Invertebr Pathol, Vol 61, pp 81-84.
- St-Leger R.L, Cooper R/M and Charnley. 1986. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes, J Gen Microbiol, Vol 132, pp 1509-1517.
- Suresh PV and Anil Kumar PK. 2012. Enhanced degradation of alpha-chitin materials prepared from shrimp processing by product and production of *N*-acetyl-D glucosamine by thermoactive chitinases from soil mesophilic fungi, Biodegradation, Vol 23, pp 597-607.

- Suzuki M, Fujimoto W, Goto M, Morimatsu M, Syuto B and Lwanaga T. 2002. Cellular expression of gut chitinase mRNA in the gastro intestinal tract of mice and chickens, *J Histochem Cytochem*, Vol 50, pp 1081-1089.
- Takeshi T, Toshiaki F, Haruyuki A and Tadayuki I. 2003. Characterization of an Exo β -D- glucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyper thermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KODI, *Journal of Bacteriology*, Vol 185, n°17, pp. 5175-5181.
- Tan E W Y and Lee V R. 2002. Enzymatic hydrolysis of prawn shell waste for the purification of chitin, Final Year Research and Development Project. Department of Chemical Engineering, Loughborough University.
- Tellam R L, Wijffels G, and Willadsen P. 1999. Peritrophic matrix proteins, *Insect Biochem Molec*, Vol,29, pp 87-101.
- Terry D E., Rees-Milton K., Pruss C., Hopwood J., Carran J and Anastassinades TP. 2007. Modulation of articular chondrocyte proliferation and anionic glucoconjugate synthesis by glucosamine, N-acetylglucosamine, glucosamine sulphate salt and covalent glucosamine sulfates, *Osteoarthritis Cartilage*, Vol 15, n°8, pp 946-956.
- Tivoli.B. 2006. Les protéoglycanes Ed INRA, 102p.
- Trudel J et Asselen A. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal Biochem*, Vol 178, n°2, pp 362-366.
- Utida S. 1954. Phase dimorphism observed in the laboratory population of the compea weevil *Callosobruchus maculatus* Jap, *J App Zool*, Vol 18, pp161-168.
- Vega K and Kalkum M. 2012. Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections, *International Journal of Microbiology*, Vol 2012, Article ID 920459, 10 p
- Vellard M. 2003. The enzymes as drug: Application of enzymes as pharmaceuticals, *Current Opinion in Biotechnology*, Vol 14, n°4, pp 444-450.
- Velusamy.P & Kim.K.Y.2011. Chitinolytic activity of *Enterobacter* SP. KB3 antagonistic to *Rhizoctonia solani* and its role in the degradation of living fungal hyphae, *International Research Journal of Microbiology*, Vol 2,n°6,pp 206-214.
- Villagomez-Castro JC., Calvo-Mendez C and Lopez-Romero E. 1992. Chitinase activity in encysting *Entamoeba invadens* and its inhibition by allosamidin, *Mol Biochem Parasitol*, Vol 52, pp 53-62.
- Waghmare S.R & Ghosh J.S. 2010. Chitobiose production by using a novel thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* strain JS isolated from a mushroom bed, *Carbohydrate Research*, in Press, Corrected Proof, and Available online 29 April 2010.

- Wang Z., Zheng L., Yang S., Niu R., Chu E and Lin X. 2007. N-Acetylchitooligossacharide is a potent angiogenic inhibitor both in vivo and in vitro, *Biocheml Biophys Res Commun*, Vol 357, pp 26-31.
- Ward H D., Alroy J., Lev B I., Keusch G T and Pereira M E. 1985. Identification of chitin as a structural component of *Giardica cysts*, *Infect Immin*, Vol 49, pp 629-634.
- Weiguo F, Jin F, Yanhua F, Yongjun Z, Bidochka M J, Raymond J, Leger S T and Yan P. 2009. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauvia bassiana*, *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol 102, pp 155-159.
- Wiwat C, Thaithanum P. S and Bhumitara A. 2000. Toxicity of chitinas-producing *Bacillus thuringiensis ssp. Kurstaki HD- (G)* toward *Plutella xylostella*, *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol 102, pp 270-277.,
- Wojtas M, Kapton T.M, Dobrzycki P and Ozylar A. 2012. The effect of counter ions on the conformation of intrinsically disordered proteins studied by size- exclusion chromatography, *Methods in Molecular Biology*, Vol 896, pp 319- 330.
- Woo C.J & Park H.D.2003. An extracellular *Bacillus sp* chitinase for the production of chitobiose as a major chitinolytic product, *Biotechnology Letters*, Vol 25, n°5, pp 409-412.
- Xiaorong Wang., Xiong Fei Ding., Bhuvana Goálakrishnan., Thomas D Morgan., Lowell Johnson., Frank F White., Subbaratran Muthukrishnan and Karl J Kramer. 1996. Characterization of a 46 KDa insect chitinase from transgenic tobacco, *Insect Biochem Molec Biol*, Vol 26, pp 1055-1064.
- Xie, Y. S., Bodnaryk, R.P., 1996. A rapid and simple flour disk bioassay for testing natural substance active against stored product insect. *Canadian entomologist*, Vol 128, pp, 865-875.
- Xluyum Ye and Tzi Bun N G. 2005. A chitinase with antifungal activity from the mung bean. *Protein Expression and Purification*, Vol 40, pp 230-236.
- Zuoxin L., Junxia G and Jiujiang Y. 2006. Aflatoxins in stored maize and rice grains in *Liaoning province*, *China Journal of Stored Product Research*, Vol 42, pp 468-479.
- Yasuyuki Arakane and Subbaratnam Muthukishnan. 2010. Insect chitinase and chitinase-like proteins, *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol 67 n° 2, pp 201-216.
- Yuli P.E, Suhartono M.T, Rukayadi Y.H & Pyun Y.R. 2004. Characterization of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus sp.13.26*, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol 35, n° 2-3, pp 147-153.
- Yutaka T, Watern M, Ritsuko M, Hirosato K, and Kazulisa M, 2008. The N-terminal region of an Entomopxvirus fusolinis essential for the enhancement of peroral

infection, Whereas the C-terminal region is eliminated in digestif juice, Journal of Virology, Vol 82? n° 24, pp12406-12415.

Zhang L., Wang Z, Yang S., Niu R., Chu E and Lin X. 2007. N-Acetylchitooligossacharide is a potent angiogenic inhibitor both in vivo and in vitro, Biocheml Biophys Res Commun, Vol 357, pp 26-31.

Annexe 1

Tableau 1 : Evolution des superficies des légumes secs :

U= ha

Campagnes	Pois chiches	lentilles	haricots	Fèves	Pois secs	Total
2003	22.057	839	1.486	35.048	8.504	67.934
2004	21.794	728	1.918	35.363	8.315	68.118
2005	22.116	848	1.194	33.439	8.343	65.940
2006	18.382	1.187	1.420	31.722	7.493	60.204
2007	19.344	733	1.199	30.244	8.023	59.543
2008	17.601	1.336	906	28.402	5.605	53.850
2009	22.452	2.651	1.426	31.727	8.890	67.146
2010	25.668	4.204	1.226	33.716	9.484	74.298

Tableau 2 : Evolution de la production des légumes secs

U= q

Campagnes	Pois chiches	lentilles	haricots	Fèves	Pois secs	Total
2003	183.234	4.840	10.807	328.465	64.493	591.839
2004	153.555	5.230	14.970	289.524	60.032	523.311
2005	132.225	4.157	6.569	249.895	49.473	442.319
2006	110.800	6.381	8.850	254.234	49.887	430.152
2007	138.098	4.745	7.767	278.304	61.445	490.359
2008	106.221	10.732	4.738	232.036	35.138	388.865
2009	183.716	28.045	9.522	364.595	66.217	652.095
2010	238.900	45.824	8.509	356.519	74.460	724.212

Tableau 3 : Evolution des importations

(U=q)

Campagnes	Pois chiches	lentilles	haricots	Total
2005	474.319	861.730	478.716	1.814.765
2006	555.366	557.994	425.560	1.538.920
2007	571.394	666.610	542.473	1.780.477
2008	462.513	608.194	641.856	1.712.563
2009	531.638	605.551	512.921	1.650.110
2010	445.488	589.434	315.826	1.350.748

Annexe 2

Tableau4 : Investigation des paramètres cinétiques de la SsChi50 avec des enzymes de références (SGChi, TVChi) en Chitine colloïdale.

Chitine colloïdale											
SsChi50				SGChi				TVChi			
Représentation de Michaelis-Menten		Représentation de Lineweaver-Burk		Représentation de Michaelis-Menten		Représentation de Lineweaver-Burk		Représentation de Michaelis-Menten		Représentation de Lineweaver-Burk	
S	Vi	1/S	1/Vi	S	Vi	1/S	1/Vi	S	Vi	1/S	1/Vi
0.1	2.38	10	0.42	0.1	5.56	10	0.18	0.1	1.04	10	0.96
0.2	3.84	5	0.26	0.2	7.69	5	0.13	0.2	1.47	5	0.68
0.3	4.54	3.34	0.22	0.3	8.34	3.34	0.12	0.3	1.72	3.34	0.58
0.5	5.56	2	0.18	0.5	8.69	2	0.115	0.5	1.96	2	0.51
1	6.67	1	0.15	1	9.09	1	0.110	1	2.23	1	0.45
2	7.14	0.5	0.14	2	9.17	0.5	0.109	2	2.28	0.5	0.44
5	7.69	0.2	0.13	5	9.52	0.2	0.105	5	2.32	0.2	0.43
10	7.81	0.1	0.128	10	10	0.1	0.1	10	2.38	0.1	0.42
20	7.87	0.05	0.127	20	10.10	0.05	0.099	20	2.44	0.05	0.41
30	7.93	0.034	0.126	30	10.20	0.034	0.098	30	2.5	0.034	0.4
$1/V_{\max} = 0.125$ donc $V_{\max} = 7.995$ U/mg				$1/V_{\max} = 0.097$ donc $V_{\max} = 10.230$ U/mg				$1/V_{\max} = 0.399$ donc $V_{\max} = 2.505$ U/mg			
$-1/K_m = -2.427$ donc $K_m = 0.412$ mg/ml				$-1/K_m = -4.784$ donc $K_m = 0.209$ mg/ml				$-1/K_m = -3.496$ donc $K_m = 0.286$ mg/ml			
Ou bien $k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E]$ avec $[E] = 1.5$ mg				Ou bien $k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E]$ avec $[E] = 1.5$ mg				Ou bien $k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E]$ avec $[E] = 1.5$ mg			
Donc $V_{\max} = k_{\text{cat}} \times [E] = 5.33 \times 1.5 = 7.995$ U/mg				Donc $V_{\max} = k_{\text{cat}} \times [E] = 1.43 \times 1.5 = 10.230$ U/mg				Donc $V_{\max} = k_{\text{cat}} \times [E] = 1.67 \times 1.5 = 2.505$ U/mg			

Tableau 5: Investigation des paramètres cinétiques de la SsChi50 avec des enzymes de références (SGChi, TVChi) en P-NP-(NAG)₂

P-NP-(NAG)₂											
SsChi50				SGChi				TVChi			
Représentation de Michaelis-Menten		Représentation de Lineweaver-Burk		Représentation de Michaelis-Menten		Représentation de Lineweaver-Burk		Représentation de Michaelis-Menten		Représentation de Lineweaver-Burk	
S	Vi	1/S	1/Vi	S	Vi	1/S	1/Vi	S	Vi	1/S	1/Vi
0.1	8.34	10	0.12	0.1	6.80	10	0.147	0.1	7.69	10	0.13
0.2	13.34	5	0.075	0.2	11.12	5	0.09	0.2	12.04	5	0.083
0.3	16.94	3.34	0.059	0.3	13.89	3.34	0.072	0.3	14.70	3.34	0.068
0.5	21.74	2	0.046	0.5	18.18	2	0.055	0.5	19.23	2	0.052
1	27.02	1	0.037	1	23.80	1	0.042	1	21.73	1	0.046
2	30.30	0.5	0.033	2	27.02	0.5	0.037	2	23.80	0.5	0.042
5	31.25	0.2	0.032	5	28.57	0.2	0.035	5	24.39	0.2	0.041
10	33.34	0.1	0.030	10	30.30	0.1	0.033	10	25	0.1	0.040
20	34.48	0.05	0.029	20	31.25	0.05	0.032	20	25.64	0.05	0.039
30	35.71	0.034	0.028	30	32.25	0.034	0.031	30	26.31	0.034	0.038
$1/V_{\max} = 0.027$ donc $V_{\max} = 36.180$ U/mg				$1/V_{\max} = 0.030$ donc $V_{\max} = 32.64$ U/mg				$1/V_{\max} = 0.036$ donc $V_{\max} = 27.27$ U/mg			
$-1/K_m = -1.481$ donc $K_m = 0.675$ mg/ml				$-1/K_m = -1.275$ donc $K_m = 0.784$ mg/ml				$-1/K_m = -1.757$ donc $K_m = 0.579$ mg/ml			
Ou bien $k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E]$ avec $[E] = 1.5$ mg				Ou bien $k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E]$ avec $[E] = 1.5$ mg				Ou bien $k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E]$ avec $[E] = 1.5$ mg			
Donc $V_{\max} = k_{\text{cat}} \times [E] = 24.12 \times 1.5 = 36.180$ U/mg				Donc $V_{\max} = k_{\text{cat}} \times [E] = 21.76 \times 1.5 = 32.64$ U/mg				Donc $V_{\max} = k_{\text{cat}} \times [E] = 31.39 \times 1.5 = 27.27$ U/mg			

Annexe 3

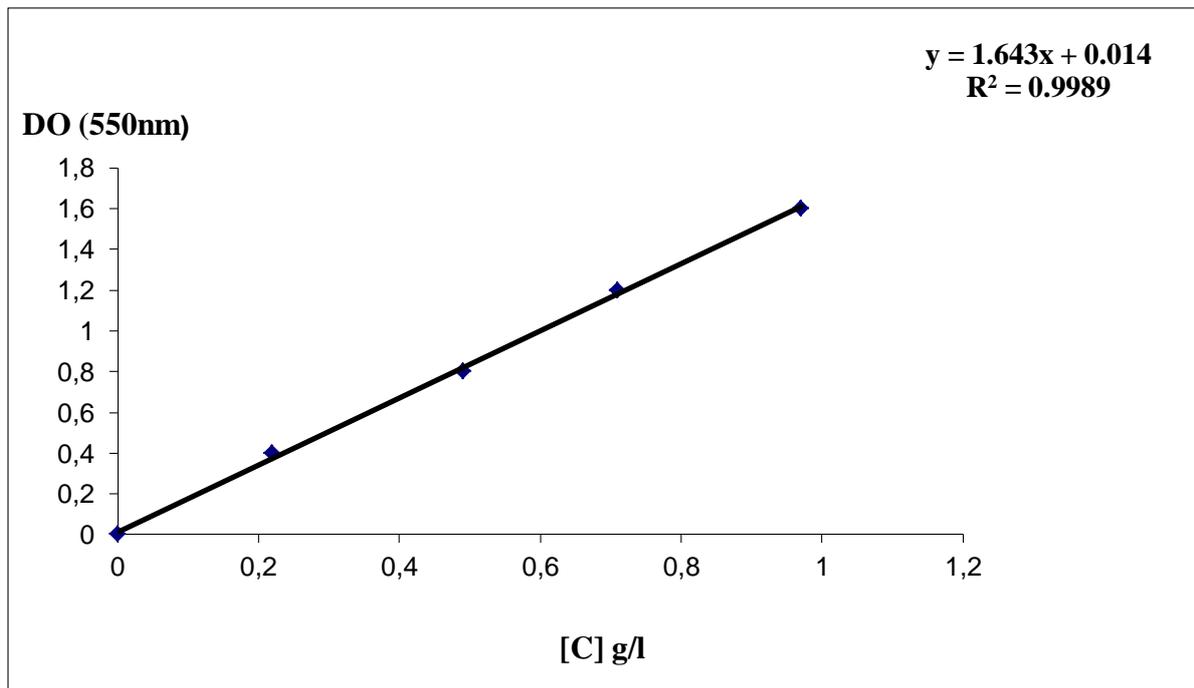


Figure 1 : courbe étalon des sucres réducteurs

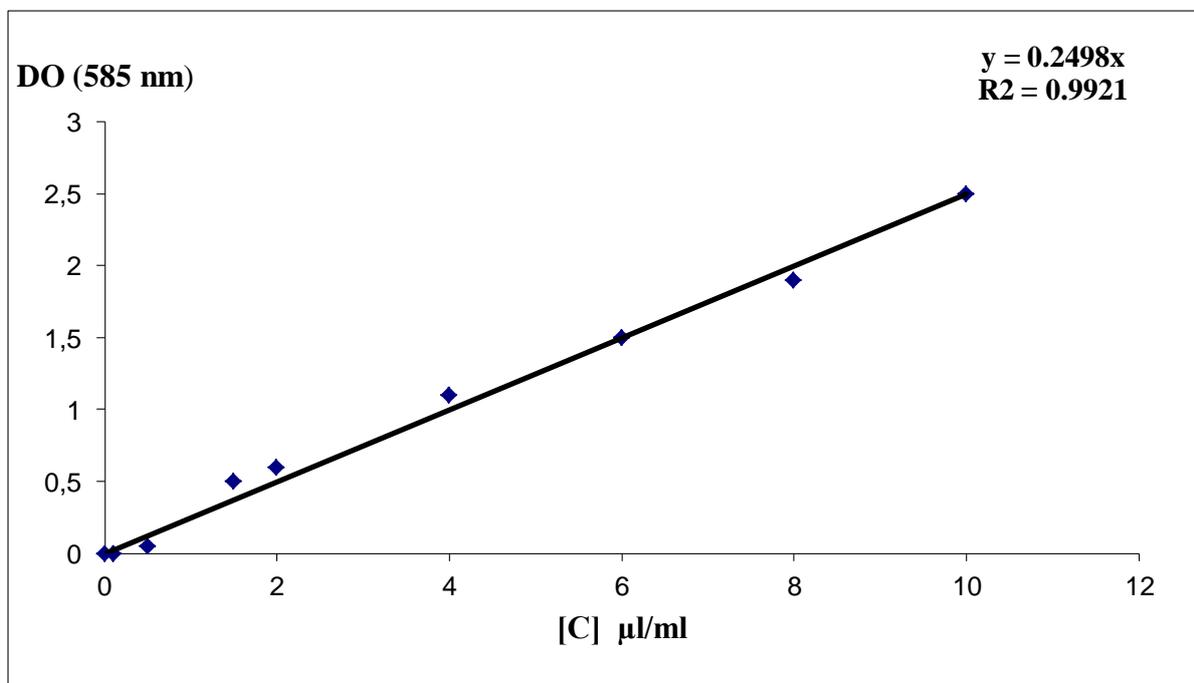


Figure 2 : Courbe étalon des NAG

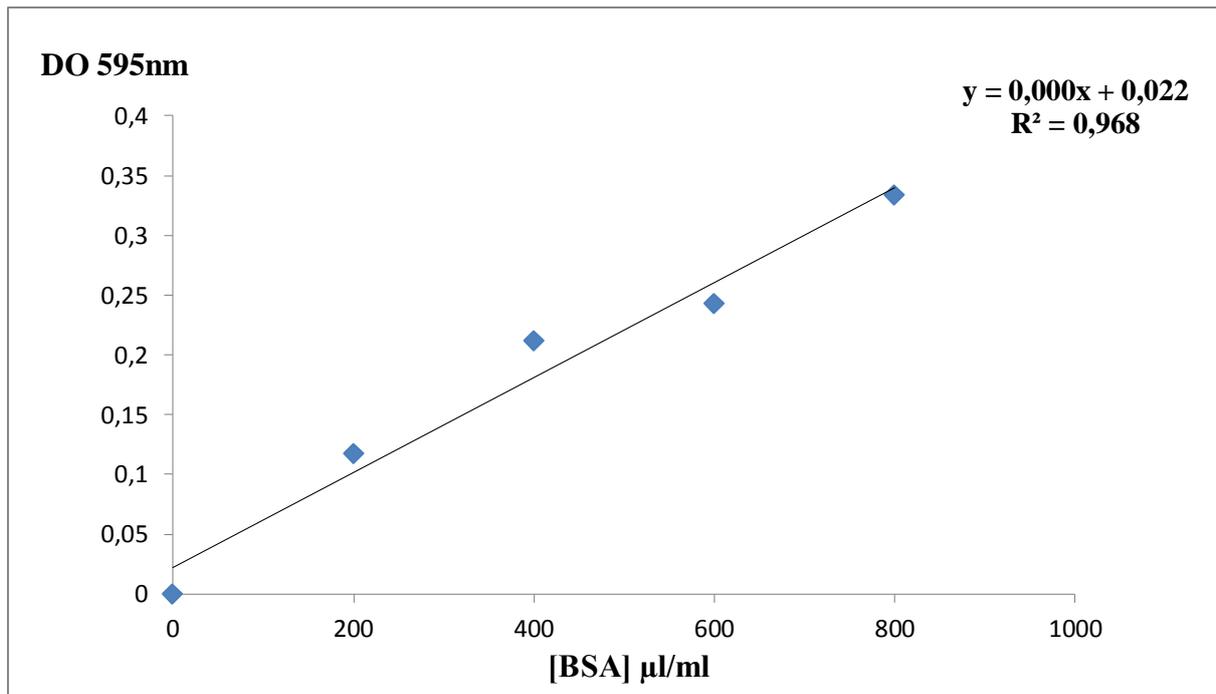


Figure 3 : Courbe étalon des protéines

Annexe 4

Tableau 6 : Taux de mortalité après 1h de contact

<i>Répétition</i> <i>Doses</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Taux de mortalité %</i>	<i>Mortalité corrigée</i>
3%	3	2	2	1	2	10	10
6%	4	3	2	1	2,5	12,5	12,5
9%	3	3	1	4	2,75	13,75	13,75
12%	4	4	4	5	4,25	21,25	21,25
15%	7	5	8	8	7	35	35
18%	10	14	12	12	11,5	57,5	57,5
21%	14	12	14	14	13,75	68,75	68,75
24%	20	20	20	20	20	100	100
Témoin	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 7 : Taux de mortalité après 24h de contact

<i>Répétition</i> <i>Doses</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Taux de mortalité %</i>	<i>Mortalité Corrigée</i>
3%	3	1	3	5	3	15	10,52
6%	4	4	4	3	3,75	18,75	14,5
9%	3	4	5	4	4	20	15,8
12 %	7	6	8	9	7,5	37,5	34,21
15%	8	6	8	10	8	40	36,84
18%	14	12	11	14	12,75	63,75	61,84
21%	17	18	16	20	17,75	88,75	88,15
Témoin	2	1	1	0	1	5	

Tableau 8 : Taux de mortalité après 48h de contact

<i>Répétition</i> <i>Doses</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Taux de mortalité %</i>	<i>Mortalité C %</i>
3%	3	4	4	4	3,75	18,75	13,33
6%	4	3	5	6	4,5	22,5	17,33
9%	7	8	5	4	6	30	25,33
12%	9	7	9	5	8,75	43,75	40
15%	10	14	10	12	11,5	57,5	54,13
18	17	16	13	14	15	75	73,33
21	20	20	17	18	18,75	93,75	93,33
Témoin	1	1	2	1	1,25	6,25	

Tableau 9 : Taux de mortalité après 72h de contact

<i>Répétitions</i> <i>Doses</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Taux de mortalité %</i>	<i>Mortalité C%</i>
3%	4	5	3	4	4	20	12,33
6%	9	6	5	10	7,5	37,5	31,50
9%	11	10	9	11	10,25	51,25	46,57
12%	10	11	13	10	11	55	50,68
15%	11	11	15	13	12,5	62,5	59
18%	19	18	16	18	17,25	86,25	84,93
21%	20	20	20	20	20	100	100
Témoin	2	1	2	2	1,75	8,75	

Annexe 5

Produits chimiques

Les produits chimiques, de meilleure qualité analytique sont fournis par les firmes suivantes :

Chitine de crabe, glycol chitine, glycol, chitosane, le P-nitrophenyl-N-acetyl-chitooligosaccharides (PNP-(GLcNac)_n, (n=1-4), Albumine sérum bovine, l'acide 5 dinitrosalicylique (DNS), blanc de calcofluor M2R, chitinase de Streptomyces griseus (SG-chi), chitinase de Trichoderma viride (TV-chi), N-Acétyleglucosamine C₆H₁₅O₆, marqueurs de poids moléculaire (Sigma), gel séphadex G75, Q-Sepharose (Pharmacia), Acrylamide, N.N'méthylène-bisacrylamide, Dodécyl sulfate de sodium, N.N.N'. tetraméthylène diamine (T.E.M.E.D), Mécraptoéthanol, Glycérol, Bromophénol, Glycine, Bleu de coumassie R-250, Persulfate d'ammonium, Sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ (Sigma) , Kit de dosage des protéines (Laboratoire Bio-Red), Phosphate dissodique, Sulfate de cuivre (Sigma), Sulfate de potassium (K₂SO₄) (Sigma), Sulfate de magnésium (MgSO₄), Chlorure d'aluminium (AlCl₃), Chlorure de baryum (BaCl₂), Carbonate de sodium (Na₂CO₃), Sulfate de cadmium (CdSO₄), Ethanol, Méthanol, Acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA), Acide citrique (Sigma).