Dérégulation des activités chitinases : vers de nouvelles perspectives de lutte contre les aphides

Julien Saguez

▶ **To cite this version:**

Julien Saguez. Dérégulation des activités chitinases : vers de nouvelles perspectives de lutte contre les aphides. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Picardie Jules Verne, 2007. Français. NNT : . tel-00521546

HAL Id: tel-00521546
https://theses.hal.science/tel-00521546

Submitted on 27 Sep 2010

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

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

Université de Picardie Jules Verne
Faculté des Sciences – Ecole Doctorale Sciences et Santé

Thèse de Doctorat de l'Université de Picardie Jules Verne

Présentée par

Julien SAGUEZ

Pour l'obtention du grade de Docteur

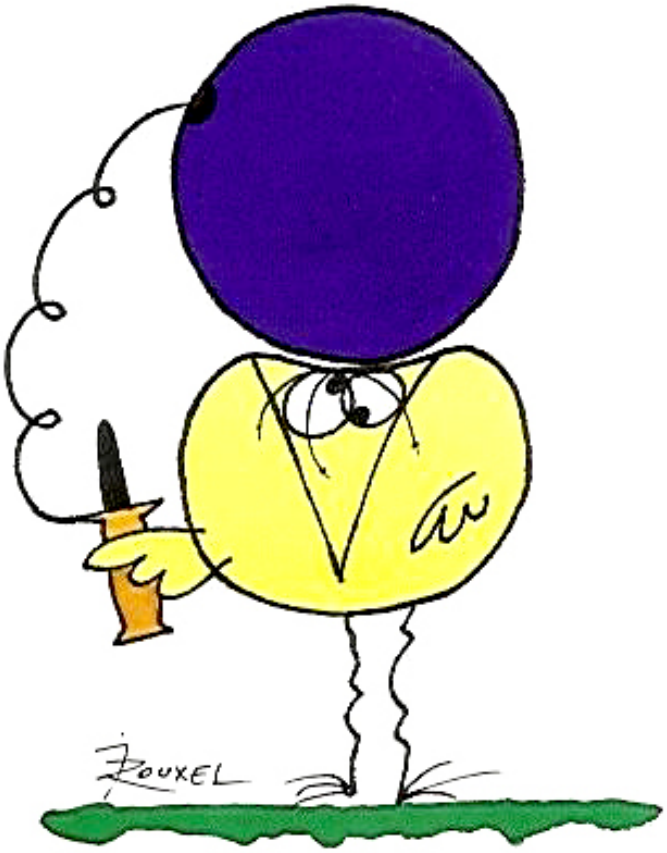
Dérégulation des activités chitinases : vers de nouvelles perspectives de lutte contre les aphides

le 16 Février 2007

Jury :

M. M NICOLE, Directeur de Recherche à l'IRD Montpellier	Rapporteur
M. Y RAHBE, Directeur de Recherche à l'INRA Lyon	Rapporteur
M. E HAUBRUGE, Professeur à la Faculté de Gembloux	Examinateur
M. J-C LABERCHE, Professeur à l'Université de Picardie	Co-directeur
M. C VINCENT, Chercheur à Agriculture et agroalimentaire Canada	Co-directeur
M. P GIORDANENGO, Maître de conférences à l'Université de Picardie	Directeur

Les devises Shadok



EN ESSAYANT CONTINUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

A ma famille

Remerciements

Le programme POMRAV (Pommes de terres résistantes aux Ravageurs), dans lequel s'inscrit ce travail de thèse, n'aurait pu voir le jour sans le soutien financier du Fonds Social Européen, de la Région Picardie et du Comité Nord des Producteurs de Plants de Pommes de Terre. Il est également le fruit d'un partenariat avec Alternatech, la FREDON Picardie, le Service de Protection de Végétaux et Agriculture et agro-alimentaire Canada.

J'adresse mes remerciements aux Professeures SANGWAN et PREVOST pour leur accueil au sein de l'UPRES EA 3900 Biologie des Plantes et Contrôle des Insectes Ravageurs et du Laboratoire de Biologie des Entomophages. Un grand merci à Philippe GIORDANENGO, Charles VINCENT et Jean-Claude LABERCHE qui ont été mes « fils conducteurs » au cours de ce travail, pour la confiance qu'ils m'ont accordée en me confiant ce sujet, pour leur engagement scientifique, pour leur soutien rédactionnel et moral, pour les réflexions que nous avons eues sur le sujet et pour m'avoir permis de participer à plusieurs colloques internationaux. Ce fut un plaisir d'apprendre et de travailler à leurs côtés. Merci aux membres du jury qui ont accepté d'effectuer la critique de ce travail.

Je tiens à remercier celles et ceux qui m'ont accueilli dans leurs laboratoires, notamment les collègues de l'Unité EA 3900 mais aussi les membres (liégeois et non liégeois…) du Laboratoire d'entomologie fonctionnelle et évolutive de l'Université de Gembloux (Belgique). Que Anas Cherqui, Olivier Van Wuytwinskel et Frédéric Francis soient particulièrement remerciés pour m'avoir aidé à faire mes premiers pas dans leur domaine de prédilection, pour leurs conseils et leur investissement personnel.

Par crainte d'oublier de nommer certaines personnes, j'adresse mes remerciements à celles et ceux qui m'ont accompagné de près ou de loin jusqu'à aujourd'hui. J'ai une pensée pour celles et ceux qui m'ont donné le goût de la Biologie et surtout pour les personnes qui m'ont accompagné durant ces trois ans de thèse et qui m'ont permis de mener à bien ce travail en me faisant vivre des moments inoubliables. Je pense bien sûr à mes collègues de bureau présents au quotidien ou de passage, mes collègues du Labo pour les bons moments passés ensemble mais aussi à mes stagiaires qui ont contribué à l'avancée de ces travaux. Je n'oublierai pas mes amis de l'ED3C les membres des Conseils de Gestion et de l'Ecole Doctorale et le Président de l'UPJV, Georges FAURE.

Je terminerai en adressant un très grand merci à ma famille pour son soutien sans faille et de tous les instants.

Sommaire

Sommaire ***3***

Introduction ***6***

Synthèse bibliographique ***9***

1. La chitine **10**

2. Les chitinases **11**
2.1 Généralités 12
2.2 Chitinases et microorganismes 12
2.3 Chitinases fongiques 13
2.4 Chitinases végétales 14
2.4.1 Chitinases végétales et développement 14
2.4.2 Chitinases végétales et défense 15
2.5 Chitinases animales 16
2.6 Insectes et chitinases 16
2.6.1 Cuticule, chitinases et croissance des insectes 16
2.6.2 Membrane péritrophique et chitinases 17
2.7 Chitinases et phytoprotection 19

3. Contrôle du métabolisme de la chitine **21**
3.1 Inhibition des chitine synthases 21
3.2. Inhibiteurs de chitinases 22
3.2.1 L'allosamidine 22
3.2.2 Les styloguanidines 24
3.2.3 Les cyclopentapeptides 24
3.2.4 Les dipeptides cycliques 25
3.2.5 La psammapline A 25
3.3 Importance de l'interaction entre inhibiteurs et site catalytique des chitinases 26

4. La Pomme de terre **27**
4.1 Taxonomie et botanique 27
4.2 Historique 27
4.3 Un légume d'importance économique 28
4.4 Maladies et ravageurs de la pomme de terre 29

5. Les pucerons, des ravageurs de cultures **31**
5.1 Présentation 31
5.2 Biologie 31
5.3 Dégâts causés par les pucerons 32
5.3.1 Dégâts directs 32
5.3.2 Dégâts indirects 32
5.4 Lutte contre les pucerons 33

Objectifs de l'étude ***34***

Chapitre 1 Impacts d'une stratégie « chitinase » sur le puceron Myzus persicae ***37***

Introduction **38**

Discussion **51**

Chapitre 2 Stratégie « anti-chitinase » contre les aphides ***54***

Première partie Pertinence de la stratégie « anti-chitinases »

Effet d'inhibiteurs de chitinases connus ***55***

Introduction **56**

Discussion **62**

Seconde partie Vers de nouveaux inhibiteurs de chitinases

Purification et caractérisation des chitinases de pucerons 64

1. Introduction 65

2. Matériel et méthodes 67
2.1 Plantes et insectes 67
2.2 Purification des chitinases 67
2.3 Dosages protéique et enzymatique 67
2.4 Tests d'activité sur gel 68
2.5 Inhibition des chitinases 68
2.6 Electrophorèses mono- et bi-dimensionnelles 68

3. Résultats 69
3.1 Purification des chitinases 69
3.2 Inhibition de l'activité chitinolytique 70
3.3 Analyse de la protéine purifiée 70

4. Discussion 71

Troisième partie

Identification de nouveaux oligosaccharides aux propriétés aphicides 74

1. Introduction 75

2. Matériel et Méthodes 76

3. Résultats 77

4. Discussion 78

Discussion générale 80

Conclusions et Perspectives Bibliographie 86

Annexes 111

Annexe 1 : Dispositif expérimental de suivi *in planta* 112

Annexe 2 : Milieu artificiel pour l'élevage des pucerons 113

Annexe 3 : Résultats de l'analyse en MALDI-TOF 114

Introduction

Dès leur apparition sur Terre, et bien avant que l'Homme ne les domestique et ne les exploite, les plantes étaient la base de l'alimentation de nombreux herbivores et constituaient aussi des sources alimentaires indispensables au développement d'insectes phytophages. Les plantes servaient de substrat pour le développement de nombreux microorganismes bactériens, fongiques et viraux. Les attaques causées par les insectes et pathogènes ont nécessité des plantes qu'elles développent des mécanismes de résistance endogènes impliquant diverses voies métaboliques qui permettent de maintenir les populations à des taux suffisamment bas pour pérenniser les espèces végétales.

Parallèlement, les agresseurs ayant besoin des plantes pour s'alimenter, se développer et se reproduire, ont été contraints d'élaborer à leur tour des stratégies d'évitement ou de détoxification, pour s'adapter et contourner ces mécanismes de défenses. La régulation des mécanismes de défenses des plantes et les stratégies de résistance développées par les agresseurs caractérisent la co-évolution des espèces végétales et des espèces qu'elles hébergent. Quand l'Homme a commencé à cultiver les plantes, il a souhaité tirer le meilleur profit de ses cultures et a dû développer des méthodes de lutte contre les microorganismes (bactéries, champignons) pathogènes et les insectes phytophages, devenus des compétiteurs considérés comme ravageurs. Pendant des siècles, pour lutter contre les agresseurs, les agriculteurs ont pratiqué des rotations de cultures et utilisé divers produits naturels. Ce n'est qu'après la seconde guerre mondiale, que le recours aux produits phytosanitaires chimiques s'est généralisé (Regnault Roger, 2005).

La pomme de terre n'a pas échappé à ce phénomène. Elle est en effet l'une des productions végétales les plus cultivées à travers le monde et participe à l'alimentation quotidienne pour plus de 2 milliards de personnes. Dans le contexte économique français et régional, la pomme de terre est l'une des cultures majeures. Cible de nombreux pathogènes de nature fongique, bactérienne ou virale, la pomme de terre héberge également de nombreux nématodes et insectes ravageurs qui déprécient la qualité des tubercules et causent des pertes en rendements. Pour limiter la propagation de ces pathogènes et parasites et afin de toujours accroître la qualité et la quantité de leurs productions agricoles, les agriculteurs ont recours à l'application massive et parfois incontrôlée de produits phytosanitaires. En France, plus de 400 produits sont homologués pour traiter la pomme de terre (Base e-phy du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche[1]). La prise de conscience des risques et méfaits de ces produits

[1] http://e-phy.agriculture.gouv.fr/

pour l'environnement (pollution des sols, de l'eau, …) et la santé humaine (cancers, maladies de peau, allergies, asthme, …) a conduit à la mise en place de directives et conventions visant à réduire l'utilisation de ces composés toxiques. Un réexamen de la Directive européenne 91/414 CE prévoit le retrait prochain de l'homologation de dizaines de pesticides. Les contraintes législatives se durcissent par de nouvelles règlementations relatives à l'homologation et à l'utilisation des substances chimiques en application des résolutions de la Convention de Stockholm de 2001 et de la Convention de Rotterdam entrée en vigueur en 2004. L'interdiction prochaine des traitements de désinfection des sols, le retrait du marché de plusieurs molécules actives, représentent certes des contraintes en phytoprotection, mais constituent également de réels enjeux technologiques, économiques et écologiques. Déjà plusieurs composés utilisés sur pommes de terre font l'objet d'une interdiction d'utilisation (Base e-phy). Les recherches actuelles doivent donc s'orienter vers l'élaboration de stratégies alternatives de lutte, basées sur l'utilisation des biotechnologies et/ou de biomolécules aux propriétés phytoprotectrices.

Parmi les composés impliqués dans les défenses des plantes en réponse à une attaque par un ravageur ou un pathogène, on trouve de nombreuses protéines dont beaucoup font parties des « pathogenesis-related proteins » (PR-P). Ce terme désigne « les protéines codées par la plante hôte mais induites lors de situations pathologiques ou associées » (Antoniw et al., 1980). Ainsi, toute protéine induite par la présence d'un organisme (parasite, nématode, insecte phytophage ou herbivore) ou par l'application de produits chimiques mimant l'effet d'une attaque, peut être considérée comme une PR-P. Décrites pour la première fois chez le tabac, puis généralisées à l'ensemble des végétaux, les PR-P sont classées en 11 familles multigéniques très variées (**Tableau 1**) dont quatre d'entre elles présentent des activités chitinases (Neuhaus, 1999; Schaefer et al., 2005). Les chitinases sont également produites par de nombreux organismes (bactéries, virus, champignons, animaux) et sont impliquées dans de nombreux processus nutritionnels et développementaux. Ces enzymes catalysent les réactions de dégradation des structures cuticulaires composées de chitine. L'absence de chitine dans le règne végétal et chez les vertébrés fait de cette molécule une cible d'intérêt dans le cadre du développement de nouveaux programmes de lutte contre les ravageurs et pathogènes des cultures. La dérégulation du métabolisme des chitinases par surexpression ou par inhibition des enzymes chitinolytiques constitue donc une voie d'intérêt pour développer de nouveaux programmes de lutte contre les ravageurs et pathogènes des cultures.

Tableau 1 : Classification des « pathogenesis-related proteins » (van Loon, 1999)

Famille de PR-P	Propriétés / Fonctions
PR-1	Inconnues
PR-2	β-1,3-glucanase
PR-3	Chitinases de types I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Chitinases de types I, II
PR-5	Thaumatin-like
PR-6	Inhibiteurs de protéases
PR-7	Endoprotéinases
PR-8	Chitinases de type III
PR-9	Péroxydase
PR-10	Ribonucléase-like
PR-11	Chitinases de type I

Synthèse bibliographique

1. La chitine

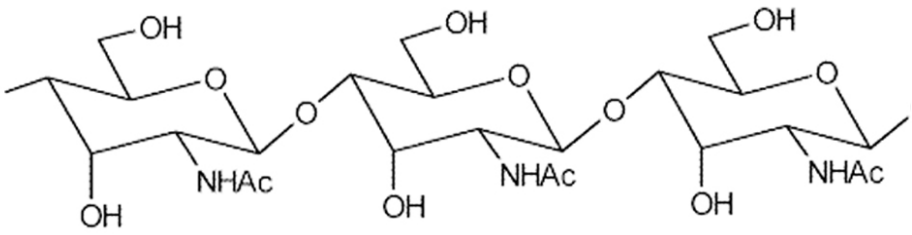
Avec au moins 10 gigatonnes synthétisées et dégradées chaque année dans la biosphère (Muzzarelli, 1999), la chitine est le second polysaccharide le plus représenté dans la nature après la cellulose. Elle fut isolée et décrite pour la première fois en 1823 par Odier à partir de cuticules d'insecte (Desbrières, 2002).

Absente du règne végétal, elle est une structure de soutien chez les champignons et les animaux. Chez les champignons où elle constitue 22 à 44% des parois cellulaires des hyphes mycéliens, la chitine est associée à des glycoprotéines (Muzzarelli, 1977; Ruiz-Herrera et Martinez-Espinoza, 1999). La synthèse de chitine est un processus ancestral de la cellule animale (Jeuniaux, 1963), c'est pourquoi le règne animal est le principal producteur de chitine. On la trouve chez les cnidaires, les brachiopodes, les pogonophores, les annélides. Elle est aussi présente à des teneurs variables (de quelques traces à 75%) dans les téguments de nombreux invertébrés tels les mollusques ou les nématodes. Ce polymère occupe une place majeure chez les arthropodes. Son association avec des protéines et des minéraux lui confère des propriétés de résistance et de flexibilité. Par sclérotisation ou minéralisation, ces complexes chitino-protéiques sont à l'origine de la mise en place des éléments exosquelettiques (cuticule, proctodeum, stomodeum, trachées) et de la membrane péritrophique des arthropodes. La coloration des cuticules provient en partie de la conjugaison de chitine avec des caroténoïdes (Muzzarelli, 1977).

La chitine est un homopolysaccharide composé d'unités *N*-acétyl-β-D-glucosamine liées entre elles par des liaisons glycosidiques (1→4). 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**). La synthèse de la chitine implique de nombreuses enzymes. La phosphorylation et l'action d'isomérases 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 chitine synthases à partir de l'uridine-diphosphate-*N*-acétylglucosamine.

Contrairement à la cellulose, dont une seule forme cristalline est décrite en conditions naturelles, la chitine est une substance polymorphe présentant trois formes cristallines. L'α chitine constituée de chaînes antiparallèles est la forme la plus stable et la plus abondante (Minke et Blackwell, 1978). On la trouve chez les arthropodes et les champignons. La

Figure 1 : Structure de la chitine



β chitine, constituée de chaînes parallèles (Blackwell, 1969), a été décrite chez certains céphalopodes, des annélides polychètes, des pogonophores et quelques protozoaires. Enfin la γ chitine, mal connue, qui serait constituée de l'assemblage de deux macromolécules parallèles et d'une antiparallèle, n'est rapportée que dans les téguments des nymphes d'un coléoptère (*Ptinus*) (Rudall et Kenchington, 1973) et dans l'estomac d'un calmar (*Loligo*) (Ruiz-Herrera et Martinez-Espinoza, 1999).

Les polymères de chitine forment des microfibrilles qui sont stabilisées par des liaisons hydrogènes formées entre les groupes amines et carboxyles. L'arrangement des microfibres d'α chitine confère des propriétés de rigidité et de résistance mécanique alors que les microfibrilles de chitine de type β confèrent des propriétés de flexibilité. Ces propriétés influencent la répartition des différentes formes de chitine dans les structures cuticulaires. Ainsi, la forme α est principalement présente au niveau des cuticules, alors que la forme β est davantage localisée au niveau des membranes péritrophiques des arthropodes (Kenchington, 1976; Peters, 1992). Enfin, des formes non cristallines et transitoires de la chitine ont été mises en évidence chez les champignons (Vermeulen and Wessels, 1986).

2. Les chitinases

2.1 Généralités

Les enzymes chitininolytiques impliquées dans les processus de dégradation de la chitine sont nombreuses. Parmi elles, les chitinases sont des glycosides hydrolases, qui assurent la rupture des liaisons β-1,4 glycosidiques qui lient les carbones C1 et C4 de deux résidus *N*-acétylglucosamine consécutifs. On distingue généralement deux catégories de chitinases : les endo et les exochitinases. Les premières, également nommées poly [1,4-(*N*-acétyl-β-D-glucosaminide)] glycanohydrolases (EC 3.2.1.14) hydrolysent les liaisons internes des microfibrilles de chitine pour libérer des fragments de chitobiose, chitotriose et chitotétraose composés respectivement de deux, trois ou quatre unités *N*-acétylglucosamine. Les secondes, nommées exochitinases ou β-*N*-acétylhexosaminidases (EC 3.2.1.52), participent à la dégradation complète des fragments de chitine. Parmi ces exochitinases, les chitobiosidases libèrent des di-acétylchitobioses à partir des extrémités non-réductrices de la chitine (Jeuniaux, 1963) et les β-D-acétylglucosaminidases hydrolysent ces di-acétylchitobioses en monomères de *N*-acétylglucosamine (Cohen-Kupiec et Chet, 1998).

Si la production de chitine est une propriété de certaines cellules animales et fongiques, les chitinases sont des enzymes que l'on retrouve chez l'ensemble des organismes vivants qu'ils soient procaryotes, eucaryotes ou de type viral. Les chitinases ont été regroupées en cinq classes qui constituent deux familles distinctes de glycosides hydrolases, en fonction de différents facteurs, parmi lesquels leur séquence *N*-terminale, leur localisation et leurs propriétés biochimiques (Henrissat et Davies, 2000; Patil et al., 2000). Les chitinases appartenant à la famille 18 rassemblent plus de 180 enzymes présentes chez les eucaryotes, les procaryotes et les virus, et réparties au sein des classes III et V. La famille 19 regroupe plus de 130 composés essentiellement d'origine végétale et formant les classes I, II et IV (Henrissat, 1999).

Le rôle des chitinases varie en fonction des organismes qui les produisent. Elles peuvent participer aux processus de nutrition, de croissance ou bien de défense. Les chitinases sont également impliquées dans certains mécanismes de pathogénicité.

2.2 Chitinases et microorganismes

Les chitinases sont présentes chez de nombreux microorganismes eux-mêmes dépourvus de chitine, mais pour lesquels la chitine constitue une source de nutriments. Ainsi, les bactéries chitinolytiques marines, d'eau douce ou du sol produisent des chitinases qui participent à la biodégradation et au recyclage des chitines produites annuellement dans leur écosystème respectif. Les chitinases bactériennes sont également impliquées dans des processus digestifs (Cohen-Kupiec et Chet, 1998; Patil et al., 2000). En effet, les bactéries du genre *Streptomyces* produisent des enzymes chitinolytiques qui, en modifiant la composition des structures chitineuses, favorisent leur adhésion au substrat et la pénétration de leur hôte (Charpentier et Percheron, 1983; Schrempf, 2001) au niveau des lésions formées sur l'exosquelette des Arthropodes. Certaines chitinases bactériennes facilitent également la dégradation de la chitine du puparium de certains insectes, favorisant ainsi l'émergence des adultes (Iverson et al., 1984). Les chitinases produites par les bactéries de la microflore intestinale de nombreux animaux (poissons, oiseaux, …) facilitent les processus de digestion des aliments composés de chitine.

Des gènes de chitinase ont également été identifiés dans le génome du baculovirus *Autographa californica,* inféodé aux arthropodes (Hawtin et al., 1995). Chez ce baculovirus, les chitinases jouent un rôle crucial dans les processus d'infection virale, plus particulièrement lors des phases de pénétration du virus dans l'organisme attaqué (Thomas et

al., 2000; Saville et al., 2002). Cette chitinase virale entraîne même une liquéfaction des tissus du lépidoptère *Trichoplusia ni* infecté (Hawtin et al., 1997).

De nombreux protozoaires et métazoaires parasites des tractus digestifs présentent la capacité de synthétiser des chitinases. Parmi ces parasites, on trouve des filaires, des amibes, des trypanosomes, des plasmodiums (Huber et al., 1991). Chacun de ces microorganismes utilise la chitine et les chitinases différemment et spécifiquement selon le stade de son développement (Shahabuddin et Vinetz, 1999). Les chitinases produites par les procaryotes facilitent les processus de colonisation de leurs insectes hôtes qui leur servent de vecteurs.

2.3 Chitinases fongiques

Les chitinases fongiques possèdent de multiples fonctions. Comme les chitinases bactériennes, elles participent largement au métabolisme trophique et sont également impliquées dans le développement, la morphogenèse et lors d'interactions symbiotiques et d'infestations parasitaires (Cohen-Kupiec et Chet, 1998). La chitine est un composé des parois cellulaires des champignons filamenteux. Les chitinases sont donc produites à différents stades de leur croissance. Ainsi, les chitinases sont impliquées dans la séparation et la germination des spores. Chez les levures, les chitinases sont impliquées dans le bourgeonnement des cellules filles et leur séparation d'avec les cellules mères (Passonneau et Williams, 1953; Elango et al., 1982; Kuranda et Robbins, 1991). Les hyphes mycéliens possédant une structure rigide, les chitinases permettent de remodeler la chitine des parois fongiques lors de la croissance et du développement, mais aussi lors de stress hydriques (Gooday et al., 1992).

Les champignons pathogènes utilisent leurs chitinases pour faciliter leur pénétration dans l'hôte ou pour en exploiter les sucres et acides aminés issus de la dégradation des cuticules. C'est notamment le cas de champignons pathogènes des œufs de nématodes (Dackman et al., 1989), mais aussi des champignons entomopathogènes des genres *Beauveria*, *Metarhizium* et *Verticillium* (El-Sayed et al., 1989; St. Léger et al., 1991).

2.4 Chitinases végétales.

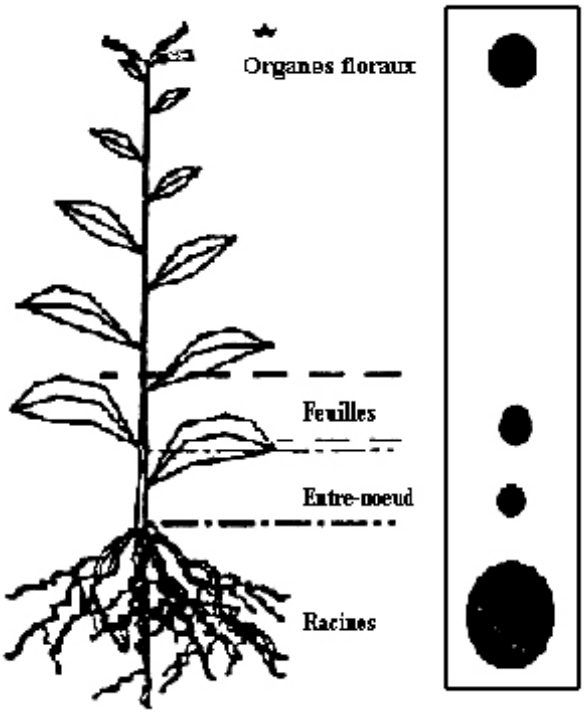
2.4.1 Chitinases végétales et développement

Bien que la présence de chitine n'ait jamais été mise en évidence chez les plantes, les chitinases végétales possèdent toutefois des substrats végétaux qui les impliquent dans de nombreux processus physiologiques (croissance, floraison, maturation des fruits). Les chitinases végétales peuvent être synthétisées dans certains organes ou durant différentes étapes des cycles végétatif ou reproductif de la plante (**Figure 2**). Ainsi, elles sont exprimées de façon constitutive dans de nombreux organes, tels que les feuilles (Ancillo et al., 1999), les fleurs (Wemmer et al., 1994; Takakura et al., 2000), les graines (van Hengel et al., 1998; Domon et al., 2000; Passarinho et al., 2001), les fruits (Peumans et al., 2002) et les racines (Passarinho et al., 2001; Showalter, 2001).

La découverte de glycoprotéines extracellulaires nommées arabinogalactanes a permis de mettre en évidence l'intervention des chitinases végétales dans la croissance des végétaux. Présents dans les racines, les feuilles, les tiges, les organes floraux et les graines (Fincher et al., 1983; Showalter, 2001), les arabinogalactanes contiennent des unités *N*-acétylglucosamine et des sites de liaison aux chitinases (Showalter, 2001). Les chitinases végétales interviendraient notamment dans les évènements précoces de l'embryogenèse et la germination des graines (De Jong et al., 1992; Jin-Zhuo et David, 1997; Krishnaveni et al., 1999; Helleboid et al., 2000; van Hengel et al., 2002), libérant des oligosaccharides à partir d'arabinogalactanes présents dans les tissus embryonnaires (Domon et al., 2000).

Au niveau racinaire, les chitinases végétales favorisent la pénétration des hyphes mycéliens et le développement des interactions symbiotiques avec des champignons mycorhiziens en hydrolysant la chitine fongique (Salzer et al., 2000). Plusieurs travaux rapportent la présence de résidus *N*-acétylglucosamine dans les parois secondaires de diverses espèces de plantes (Benhamou et Asselin, 1989). Ces composés seraient susceptibles d'agir en tant qu'éliciteurs dans des processus de reconnaissance entre végétaux et symbiotes. Ainsi, la dégradation de lipochitooligosaccharides (facteurs Nod) (Schmidt et al., 1993; Spaink et al., 1993) et de peptidoglycanes bactériens par les chitinases végétales favorisent les interactions entre des bactéries de type *Rhizobium* fixatrices d'azote et de nombreuses légumineuses (Staehelin et al., 1994; Goormachtig et al., 1998). Enfin, les plantes carnivores produisent des chitinases qui aident à la digestion de leurs proies (Gooday, 1990).

Figure 2 : Répartition des chitinases dans les plantes (Neale et al., 1990).



2.4.2 Chitinases végétales et défense

Si les chitinases sont synthétisées de façon constitutive, leur présence dans les tissus végétaux a longtemps été justifiée par leurs interventions dans les mécanismes de défenses induits. La synthèse des chitinases végétales peut être induite en cas de stress biotique ou abiotique. Suite à l'attaque d'une plante par des phytophages ou des pathogènes, plusieurs phytohormones sont synthétisées, telles que l'éthylène (Enyedi et al., 1992), l'acide jasmonique (Creelman et Mullet, 1997) et l'acide salicylique (Lee et al., 1995) produites pour activer des cascades de signalisation susceptibles d'induire la synthèse de phénylpropanoïdes (Hahlbrock et Scheel, 1988; Dixon et Paiva, 1995), de phytoalexines (Smith, 1996; Hammerschmidt, 1999) et de "*pathogenesis-related*" protéines (PR-P), dont des chitinases (Graham et Sticklen, 1994; Krishnaveni et al., 1999; Robert et al., 2002).

Les chitinases végétales présentent essentiellement des propriétés antifongiques. Les activités chitinolytiques peuvent être augmentées d'un facteur 600 (van Hengel et al., 1998) suite à une attaque par un champignon pathogène. Les chitinases lysent la paroi des hyphes mycéliens et inhibent la germination des spores chez divers champignons tels que *Alternaria*, *Fusarium*, *Trichoderma* et *Rhizoctonia* (Schlumbaum et al., 1986; Mauch et Staehelin, 1989; Sela-Buurlage et al., 1993; Schickler et Chet, 1997; Taira et al., 2002). Les activités chitinolytiques ont une double fonction dans la réponse aux champignons pathogènes. Lors de la pénétration des champignons phytopathogènes dans le végétal, les chitinases libèrent des oligosaccharides fongiques qui constituent des éliciteurs (Collinge et al., 1993; De A. Gerhardt et al., 1997; Ito et al., 2005), renforçant indirectement les défenses des plantes. Par la suite, les chitinases vacuolaires limitent la propagation des champignons dans le végétal (Taira et al., 2002). Les chitinases végétales et les PR-P sont également induites suite à l'attaque par un ravageur.

2.5 Chitinases animales

Les chitinases ont été mises en évidence chez de nombreux animaux invertébrés et vertébrés, y compris chez les mammifères. De nombreuses chitinases sont impliquées dans des processus digestifs (Suzuki et al., 2002). Les chitinases salivaires de poulpe mais aussi les chitinases d'hyménoptères parasitoïdes et d'araignées facilitent la pénétration des cuticules de leurs hôtes ou proies (Mommsen, 1980; Krishnan et al., 1994; Jones et al., 1996). Dans le tractus alimentaire des poissons (Flach et al., 1992) des oiseaux (Jackson et al., 1992) et des

mammifères insectivores, les chitinases dégradent la cuticule des proies ingérées. Les chitinases sont également impliquées dans des processus de défenses comme chez le turbot, où elles joueraient un rôle contre certains parasites tels que les microsporidies (Manson et al., 1992). Citons encore le cas de chitinases sériques et leucocytaires chez l'homme, sécrétées en grande quantité par les monocytes lors de leur différenciation en macrophages (Escott et Adams, 1995) chez des patients atteints de la maladie de Gaucher (Boot et al., 1995). Enfin, chez les animaux, les chitinases pourraient également jouer un rôle défensif contre certains champignons pathogènes (Leah et al., 1991; Boot et al., 1995; Gooday, 1999; Carlini et Grossi-de-Sa, 2002).

2.6 Insectes et chitinases

Chez les arthropodes et les insectes en particulier, la chitine est présente au niveau des cuticules et fréquemment dans la membrane péritrophique. Les enzymes chitinolytiques sont impliquées dans le déroulement de certaines fonctions vitales telles que les processus de morphogenèse, développementaux et digestifs et participent au remodelage de ces structures cuticulaires.

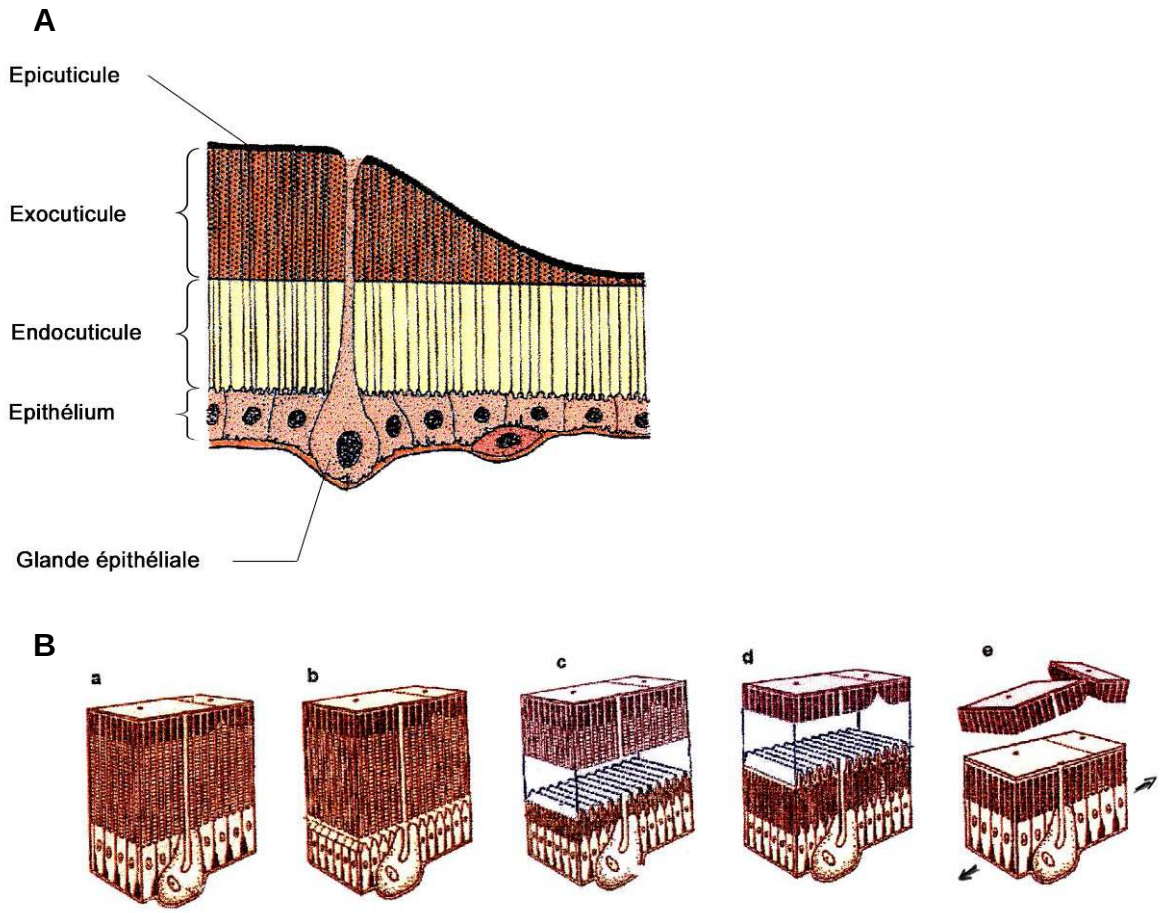
2.6.1 Cuticule, chitinases et croissance des insectes

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 multicouches et pigmentée. Elle est dépourvue de chitine, mais composée d'une lipoprotéine, la cuticuline, et de cire. L'épicuticule recouvre une épaisse procuticule, elle-même constituée d'une exocuticule rigide et d'une endocuticule principalement composées de chitine et de protéines (Andersen, 1979), laquelle repose sur les cellules tégumentaires (**Figure 3**).

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

Avant chaque mue, les cellules tégumentaires subissent de nombreuses mitoses qui permettent d'accroître la surface corporelle. Il se produit alors un processus de décollement de

Figure 3 : Structure de la cuticule (A) et processus de mue (B).



a: cuticule avant mue, b: mitose des cellules épithéliales, c: apolyse, d: digestion de l'endocuticule, e: exuviation

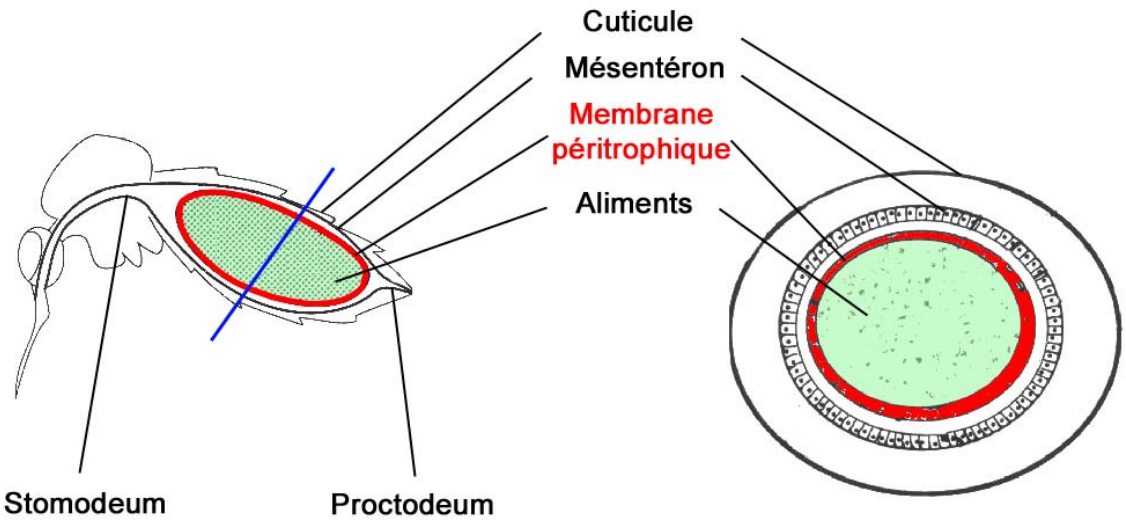
l'ancienne cuticule nommé apolyse. L'épiderme se plisse et se détache de la cuticule, laissant apparaître un espace exuvial (Jeuniaux, 1963) dans lequel sont sécrétées de l'eau et des enzymes protéasiques et chitinolytiques. Ces enzymes, accumulées dans les fluides exuviaux, permettent de dégrader l'ancienne endocuticule et libèrent alors des acides aminés et de l'acétylglucosamine (Dziadik-Turner et al., 1981; Samuels et Reynolds, 1993; Samuels et Paterson, 1995; Reynolds et Samuels, 1996) qui sont en grande partie réabsorbés par l'épiderme et recyclés pour produire la nouvelle cuticule (Surholt, 1975; Kaznowski et al., 1986; Reynolds et Samuels, 1996). L'hydrolyse partielle de l'endocuticule provoque un amincissement de l'ancienne cuticule, notamment au niveau de lignes de déchirure caractérisées par une exocuticule plus fine. Les phases d'exuviation et l'extirpation débutent lorsque ces lignes de déchirure se rompent. L'abandon de l'ancienne cuticule permet le déplissement de la nouvelle cuticule qui se rigidifie, s'opacifie, se sclérifie et se pigmente.

L'expression des chitinases joue aussi un rôle crucial dans le développement post-embryonnaire des insectes. Les processus de mues sont sous le contrôle d'un dispositif hormonal complexe, et dépendent notamment de deux hormones principales : les hormones juvéniles et l'ecdysone qui permettent de réguler la synthèse et la dégradation de la chitine. La balance de ces hormones influence la nature larvaire ou imaginale des mues (Tsuzuki et al., 2001; Malausa et al., 2006) mais aussi l'induction de l'expression des gènes de chitinases (Koga et al., 1991; Takahashi et al., 2002).

2.6.2 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 et subissent donc les mêmes phénomènes de mue que la cuticule. Le segment intermédiaire, l'intestin moyen ou mésentéron est d'origine endodermique et, contrairement au stomodeum et au proctodeum, n'est pas revêtu d'une cuticule. Toutefois, une couche extracellulaire mince, produite après l'ingestion d'aliments et nommée membrane péritrophique (**Figure 4**), 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 protéoglycanes et de nombreuses protéines, dont les péritrophines (Tellam, 1996; Tellam et al., 1999).

Figure 4 : Membrane péritrophique



Bien que différents types de membranes péritrophiques aient été décrits (Richards et Richards, 1977; Peters, 1992) on en distingue principalement deux types (Peters, 1992). La membrane péritrophique de type I est épaisse (entre 2 et 20 µm), constituée de chitine, protéoglycanes et péritrophines sécrétés par de nombreuses cellules de l'épithélium du mésentéron (Shen et Jacobs-Lorena, 1998) suite à la distension de l'épithélium intestinal qui se produit après une prise alimentaire (Richards et Richards, 1977). Cette membrane péritrophique de type I est synthétisée entièrement ou en partie par l'épithélium de l'intestin (Terra, 2001). Des précurseurs de la chitine seraient sécrétés par les cellules de l'épithélium, après quoi ils s'organiseraient en fibres liées les unes aux autres par l'intermédiaire de protéines (Tellam et al., 1999). Les processus de digestion ne sont pas affectés par la mise en place rapide de cette membrane (Terra, 2001). La membrane péritrophique de type II, plus fine (moins d'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 (Shen et Jacobs-Lorena, 1998). Présente chez de nombreux insectes indépendamment de la prise de nourriture, la membrane péritrophique serait incapable de se distendre suite à l'ingestion d'un repas (Terra, 2001).

Les membranes péritrophiques se mettent en place dans les trente minutes suivant la prise de nourriture (Shen et Jacobs-Lorena, 1998). Elles permettent de protéger les cellules épithéliales de l'intestin moyen contre les éventuelles abrasions causées par la nourriture. Les membranes péritrophiques faciliteraient également la digestion, en cloisonnant les enzymes digestives et la nourriture. En effet, le maillage créé par l'agencement des fibres de chitine et de péritrophines permet d'établir une sélectivité des éléments qui sont assimilés au niveau de l'épithélium digestif. Cette fonctionnalité permettrait également de jouer un rôle de barrière protectrice contre certaines toxines et macromolécules qui resteraient circonscrites dans le sac péritrophique sans endommager l'épithélium intestinal. Ce rôle préventif s'étendrait même jusqu'à une protection plus ou moins efficace contre une infection virale, bactérienne ou causée par tout autre pathogène (Lehane et al., 1997).

Outre leur intervention dans la dégradation de la membrane péritrophique, les chitinases joueraient un rôle dans la mise en place de la matrice péritrophique, en participant à la réorganisation des fibres de chitine (Merz et al., 1999). Les chitinases participeraient en outre à la dégradation de la membrane péritrophique après digestion. En effet, l'ajout d'un inhibiteur de chitinase dans l'alimentation des moustiques du genre *Aedes* induit la formation plus rapide et une dégradation plus tardive de la membrane péritrophique (Shahabuddin et al., 1993).

2.7 Chitinases et phytoprotection

Comme nous l'avons vu précédemment, les chitinases sont à la fois impliquées dans les réactions de défenses des plantes et les processus de croissance des champignons pathogènes et des insectes. C'est pourquoi de nombreux gènes codant pour des chitinases d'origines diverses ont été clonés. L'expression de nombre d'entre eux induit des effets délétères vis-à-vis de microorganismes pathogènes. Avec le développement de la transgenèse, ces gènes ont été introduits dans des plantes génétiquement modifiées sous le contrôle de promoteurs constitutifs ou inductibles dans le but d'accroître leur résistance vis-à-vis des pathogènes et des ravageurs (**Tableau 2**). Broglie et al. (1991) furent les premiers à obtenir des lignées de tabac et de colza, exprimant une chitinase vacuolaire de haricot et capables de se développer dans des sols contaminés par *Rhizoctonia solani* en ralentissant l'apparition des symptômes. Depuis, de nombreux travaux ont montré que l'expression de chitinases d'origine végétale dans des plantes permettait de leur conférer une protection contre les pathogènes d'origine fongique, qu'il s'agisse de chitinases de tabac (Vierheilig et al., 1993; Rohini et Sankara Rao, 2001), de riz (Yamamoto et al., 2000; Datta et al., 2001; Kalpana et al., 2006), d'orge (Bornhoff et al., 2005) ou de haricot (Vellicce et al., 2006). Des activités antifongiques ont également été rapportées chez des plantes exprimant des chitinases recombinantes d'origine bactérienne (Carstens et al., 2003; Itho et al., 2003) et fongique (Terakawa et al., 1997; Lorito et al., 1998; Emani et al., 2003).

La transformation de plantes avec des gènes de chitinases bactériennes, fongiques ou végétales a rarement permis de conférer des résistances significatives contre les insectes. Ainsi, une résistance aux insectes a été mise en évidence chez des plants de tomates exprimant une chitinase bactérienne de *Streptomyces albidoflavus* qui augmente la résistance vis-à-vis du lépidoptère *Trichoplusia ni* (Gongora et al., 2001). L'expression d'un gène de chitinase de haricot par des pommes de terre provoque également des effets délétères sur le lépidoptère *Lacanobia oleracea* (Gatehouse et al., 1997). Récemment exprimée chez la tomate, une chitinase de peuplier semble présenter des effets délétères pour le doryphore de la pomme de terre (*Leptinotarsa decemlineata*), mais avec des effets peu reproductibles d'une série expérimentale à une autre (Lawrence et Novak, 2006). Les effets insecticides les plus marqués qui ont été décrits sont basés sur l'utilisation de plantes transgéniques exprimant des chitinases d'insectes. Ainsi, la chitinase du lépidoptère *Manduca sexta* induit *in vitro* une mortalité totale du coléoptère *Oryzaephilis mercator* (Wang et al., 1996). Des plants de tabac

Tableau 2 : Exemples de plantes transformées avec des gènes de chitinase et leurs effets

Origines du gène	Plantes transformées	Organismes cibles	Effets	Références
Tabac (*Nicotiana tabacum*)	Tabac	*Cercospora nicotiana*	Pas d'effet	(Neuhaus et al., 1991)
Betterave (*Beta vulgaris*)	Tabac	*C. nicotiana*	Pas d'effet	(Nielsen et al., 1993)
Betterave	Bouleau	*Pyrenopeziza betulicola* *Melampsoridium betulinum*	Pas d'effet Antifongique	(Pappinen et al., 2002)
Haricot (*Phaseolus vulgaris*)	Fraise (cv Pajaro)	*Botrytis cinerea*	Antifongique	(Vellicce et al., 2006)
Cacao (*Theobroma cacao*)	Cacao	*Colletotrichum gloeosporioides*	Antifongique	(Maximova et al., 2006)
Colza (*Brassica napus*)	Colza	*Cylindrosprium concentricum* *Phoma lingam* *Sclerotinia sclerotiorum*	Antifongique	(Grison et al., 1996)
Streptomyces griseus	Riz	*Magnaporthe grisea*	Antifongique	(Itho et al., 2003)
Moutarde (*Brassica juncea*)	Tabac	*Trichoderma viride*	Antifongique	(Fung et al., 2002)
Tabac	Arachide	*C. arachidicola*	Antifongique	(Rohini et Sankara Rao, 2001)
Trichoderma harzianum	Broccoli	*Alternaria brassicicola*	Antifongique	(Mora et Earle, 2001)
Trichoderma atroviride	Pomme (Marshall McIntosh)	*Venturia inaequalis*	Antifongique	(Bolar et al., 2001)
Saccharomyces cerevisiae	Tabac	*B. cinerea*	Antifongique	(Carstens et al., 2003)
Riz (*Oryza sativa*)	Ryegrass	*Puccinia coronata*	Antifongique	(Takahashi et al., 2005)
Trichoderma atroviride	Riz	*R. solani* *M. grisea*	Antifongique	(Liu et al., 2004)
Rhizopus oligosporus	Tabac	*S. sclerotiorum* *B. cinerea*	Antifongique	(Terakawa et al., 1997)
Riz	Riz	*R. solani*	Antifongique	(Sridevi et al., 2003)
Trichoderma harzianum	Tabac Pomme de terre	*Alternaria alternata* *A. solani* *B. cinerea* *R. solani*	Antifongique	(Lorito et Scala, 1999)
Trichoderma virens	Coton	*A. alternata* *R. solani*	Antifongique	(Emani et al., 2003)
Riz	Ginseng		Antifongique	(Chen et Punja, 2003)
Haricot	Tabac Colza	*Rhizoctonia solani*	Antifongique	(Broglie et al., 1991)
Riz	Riz	*M. grisea*	Antifongique	(Nishizawa et al., 1999)
Peuplier (*Populus sp*.)	tomate	*Leptinotarsa decemlineata*	Insecticide	(Lawrence et Novak, 2006)
Manduca sexta	Colza	*Plutella maculipenis*	Insecticide	(Wang et al., 2005)
Streptomyces albidoflavus	Tomate	*Trichoplusia ni*	Insecticide	(Gongora et al., 2001)
Manduca sexta	Tabac	*Heliotis virescens*	Insecticide	(Ding et al., 1998)

surexprimant cette même chitinase induisent un ralentissement de la croissance du lépidoptère *Heliothis virescens* et une diminution des dégâts provoqués par leur prise de nourriture, mais aussi de fortes mortalités larvaires chez plusieurs lépidoptères (Ding et al., 1998). Enfin, la chitinase de la mouche de la tomate *Lacanobia oleracea* (Lépidoptère) possède des effets insecticides sur ce même insecte (Fitches et al., 2004).

L'augmentation de la protection antifongique conférée par la coexpression de chitinases recombinantes avec d'autres protéines de défense contre les pathogènes est rapportée dès 1994 lors de l'expression conjointe d'une chitinase de riz et d'une glucanase de luzerne dans des lignées de tabac (Zhu et al., 1994). Les "*ribosome inactivating*" protéines (Jach et al., 1995; Bornhoff et al., 2005) et les "*thaumatin-like*" protéines (Hejgaard et al., 1991; Kalpana et al., 2006) sont également susceptibles d'agir en synergie avec les chitinases. La coexpression de chitinases et de β-1,3-glucanase a permis d'accroître les résistances contre les champignons pathogènes (Leubner-Metzger et Meins, 1999). Malgré l'induction de résistance au laboratoire contre *Fusarium graminearum*, des lignées de blé transgénique coexprimant une chitinase et une β-1,3-glucanase ne présentent aucune protection en conditions de champ (Anand et al., 2003). Ces travaux constituent la première expérimentation au champ de plantes co-exprimant deux enzymes, dont une chitinase.

L'action synergique de chitinases associées à des δ-endotoxines de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) est rapportée dès 1972 par des travaux montrant une augmentation de la mortalité des larves du lépidoptère *Choristoneura fumiferana* (Smirnoff, 1974). Cette action synergique des chitinases et des toxines de *Bt* sera également mise en évidence sur les larves des lépidoptères *Spodoptera littoralis* (Regev et al., 1996), *Spodoptera exigua* (Tantimavanich et al., 1997) et *Plutella xylostella* (Wiwat et al., 2000). L'association d'une chitinase avec la toxine CryIC de *Bt*, induit une réduction significative de la prise de nourriture chez les larves d'*Heliothis virescens* (Regev et al., 1996; Ding et al., 1998). Plus récemment, l'expression d'une chitinase recombinante dans des lignées de *Bt* a permis d'augmenter les effets insecticides de ces bactéries sur des larves de *S. exigua* (Thamthiankul et al., 2001) et *Lymantria dispar* (Lertcanawanichakul et al., 2004). En revanche, Gatehouse *et al.*, (1996) ont mis en évidence que lorsqu'un gène de chitinase est coexprimé avec la lectine du perce-neige (GNA), les effets sur le puceron *M. persicae* sont moindres que lorsque les pommes de terre expriment uniquement la GNA.

3. Contrôle du métabolisme de la chitine

Le métabolisme de la chitine étant crucial pour le développement des champignons et des insectes, la dérégulation des enzymes clés impliquées dans ce métabolisme représente une cible majeure dans le développement de fongicides et d'insecticides, y compris des agents antimalariens puisque la chitine est absente chez les vertébrés (Cohen, 1993).

3.1 Inhibition des chitine synthases

Les inhibiteurs de chitine synthases ont été classés en trois groupes majeurs, les peptidyl nucléosides, les acylurées et les substances interférant avec le contrôle hormonal. Les premiers, isolés de diverses espèces de *Streptomyces*, agissent comme des analogues de substrats des chitine synthases et incluent les polyoxines et les nikkomycines (Zhang et Miller, 1999) qui inhibent de façon compétitive les chitine synthases fongiques et d'insectes, par liaison au site catalytique de l'enzyme (Ruiz-Herrera et San-Blas, 2003). Les polyoxines sont utilisées pour le contrôle de champignons phytopathogènes alors que les nikkomycines n'ont pas encore d'applications commerciales, bien que présentant des activités inhibitrices supérieures à celles des polyoxines (Gooday, 1972; Zhang et Miller, 1999; Tellam et al., 2000). La faible utilisation de ces composés repose sur le fait qu'ils présentent une forte labilité et une activité variable vis-à-vis des champignons et une multitude d'animaux (Zhang et Miller, 1999; Ruiz-Herrera et San-Blas, 2003).

Les acylurées et les benzoylphenylurées sont largement utilisés pour le contrôle intégré des ravageurs. Si ces composés, parmi lesquels le diflubenzuron, le triflumuron, le flufénoxuron, le chlorfluazuron et le teflubenzuron, affectent la synthèse de chitine (Post et al., 1974; van Eck, 1979; Londershausen et Turberg, 1997), leur mode d'action est encore inconnu. Cependant, il semblerait que ces inhibiteurs n'interagissent pas directement avec les chitine synthases (Mayer et al., 1981), mais plutôt sur le transport ou la translocation des fibrilles de chitine à travers la membrane plasmique (Nakagawa et Matsumura, 1994; Cohen, 2001) voire sur la production d'ecdystéroïdes impliqués dans la régulation hormonale de la synthèse de chitine (Fournet et al., 1995).

Le troisième groupe d'inhibiteurs de chitine synthases affecte la régulation hormonale de la croissance et du développement des insectes. Un des multiples effets de ces substances est la dérégulation de la synthèse de chitine en bloquant la synthèse ou l'activité des

hormones de mue. Ainsi, la biosynthèse d'ecdystéroïdes peut être inhibée par des dérivés d'imidazoles et de cholestérol (Kadano-Okuda et al., 1987; Roussel, 1994; Lorenz et al., 1995). La synthèse d'hormone juvénile est également bloquée par des composés hétérocycliques tels que la brévioxime et l'arborine alcaloïde (Moya et al., 1997; Muthukrishnan et al., 1999). L'application d'hormone de mue, de dérivés synthétiques agonistes ou antagonistes entraîne l'apparition de malformations dans le développement des insectes. Ainsi, le tébufénozide, un insecticide agoniste de l'ecdystéroïde, interagit avec les récepteurs de l'ecdysone, les fénoxycarbe, méthoprène et pyriproxyfène, et les précocène I et II (respectivement des agonistes et des antagonistes de l'hormone juvénile) agissent en mimant l'action des hormones (Hoffmann et Lorenz, 1998; Retnakaran et al., 2001).

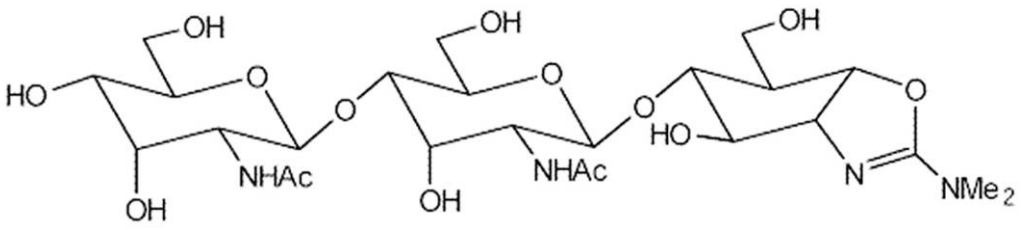
3.2. Inhibiteurs de chitinases

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 et la perturbation des processus d'exuviation. 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.

3.2.1 L'allosamidine

L'inhibiteur le plus étudié est l'allosamidine (**Figure 5**), un pseudotrisaccharide découvert par Sakuda et al. (1987) et isolé à partir de bactéries du genre *Steptomyces*. Une puissante activité inhibitrice est décrite contre les chitinases de la famille 18, dont celles des insectes et des champignons (Sakuda et al., 1987; 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 délétères sur les insectes. Les effets insecticides (inhibition des mues) de l'allosamidine, mis en évidence dès 1987 chez le lépidoptère *Bombyx mori* (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. Chez la mite du vêtement *Tineola bisselliella*, la forte mortalité larvaire s'accompagne de retards de croissance des insectes qui conduisent à

Figure 5 : Structure de l’allosamidine (Sakuda et al., 1987)



l'interruption des mues et au développement de larves anormales (Blattner et al., 1997). L'allosamidine possède également des effets multiples dans l'interaction entre le plasmodium responsable du paludisme et son hôte, le moustique *Aedes aegypti*. Après un apport d'allosamidine dans l'alimentation, les chitinases du plasmodium, nécessaires à la pénétration de la membrane péritrophique sont inhibées (Tsai et al., 2001), mais les activités chitinases de l'hôte sont également affectées induisant des modifications dans l'organisation et le maintien dans le temps de la membrane péritrophique : après ingestion d'allosamidine, la membrane péritrophique est plus épaisse et sa dégradation demande plus de temps (Shahabuddin et al., 1993; Filho et al., 2002).

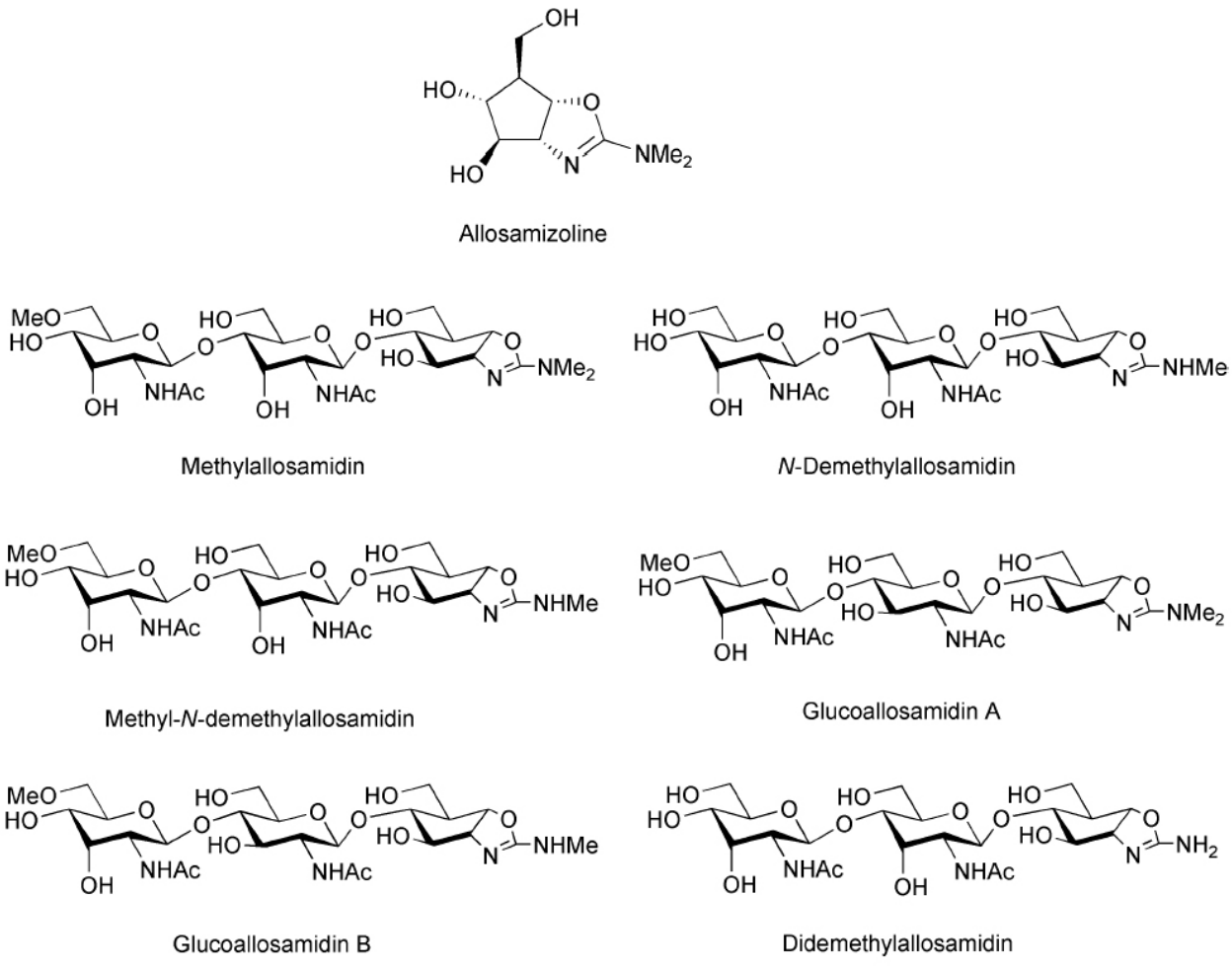
Les effets de l'allosamidine ne se limitent pas uniquement aux insectes. En effet, cet inhibiteur retarde l'enkystement de l'amibe *Entamoeba invadens* (Villagomez-Castro et al., 1992) et affecte aussi les chitinases du nématode *Onchocerca gibsoni* (Gooday et al., 1988) et celles des bactéries du genre *Bacillus* (Sampson et Gooday, 1998). L'allosamidine possède enfin des propriétés antifongiques dirigées contre des champignons pathogènes tels que *Candida albicans* et *Neurospora crassa* (Dickinson et al., 1991; McNab et Glover, 1991). L'allosamidine inhibe également la fragmentation des hyphes de *Acremonium chrysogenum* (Sandor et al., 1998) et de *Penicillium chrysogenum* (Sami et al., 2001).

Chez le crustacé *Artemia salina*, l'allosamidine est non seulement capable d'inhiber l'activité chitinolytique, mais aurait également un effet activateur sur les chitine synthases (Peter et Schweikart, 1990). Enfin, Suzuki et al. (2006) ont montré que l'allosamidine est capable d'induire la production de chitinase et de favoriser la croissance chez *Streptomyces* sp. AJ9463 en agissant comme molécule signal pour la production de chitinase.

Le mode d'interaction entre les chitinases de la famille 18 et cet inhibiteur a été mis en évidence par cristallographie ; l'allosamidine mime un état transitoire de la catalyse de la chitine (van Aalten et al., 2001). L'allosamidine est constituée de deux groupements *N*-acétylallosamine liés à une allosamizoline et présente une structure analogue à celle de la chitine mais qui n'est pas hydrolysable (Bortone et al., 2002; Fusetti et al., 2002; Rao et al., 2003).

De nombreux dérivés de l'allosamidine ont été synthétisés (**Figure 6**). Parmi ces dérivés, on peut citer les déméthylallosamidines, les méthylallosamidines, les glucoallosamidines A et B, les méthyl-*N*-déméthylallosamidines qui présentent des activités inhibitrices vis-à-vis des chitinases fongiques de *S. cerevisiae*, *C. albicans* et *Trichoderma sp.* (Nishimoto et al., 1991). La déméthylation de l'allosamidine réduit toutefois ses effets inhibiteurs sur les chitinases de *S. marcescens*, *Artemia salina* et de *Chironomus tentans*

Figure 6 : Structure des dérivés de l'allosamidine (Andersen et al., 2005)



(Spindler et al., 1997). En revanche, des pseudodisaccharides dérivés de l'allosamidine inhibent également les chitinases de *C. albicans* et de *Bombyx mori* (Nishimoto et al., 1991). Bien que de nombreuses études aient été menées sur l'allosamidine et ses dérivés, leur production est onéreuse en raison des difficultés de synthèse. C'est pourquoi de nombreuses recherches ont été développées pour cribler de nouvelles molécules aux pouvoirs inhibiteurs vis-à-vis des chitinases de la famille 18.

3.2.2 Les styloguanidines

Trois styloguanidines (**Figure 7**) ont été isolées à partir de l'éponge marine *Stylotella aurantium* (Kato et al., 1995). Ces composés de nature cyclique présentent une activité inhibitrice contre des chitinases de bactéries du genre *Shewanella* sp. La mue des larves de certains crustacés est également inhibée par ces styloguanidines (Kato et al., 1995). Les styloguanidines ont toutefois fait l'objet de très peu d'études.

3.2.3 Les cyclopentapeptides

L'argifine (**Figure 8**) est le premier inhibiteur d'origine fongique à avoir été isolé. Issu de la souche FTD-0668 de *Gliocladium sp*., il est classé dans la famille des cyclopentapeptides et est constitué d'arginine, de *N*-méthyphénylalanine, de deux acides aspartiques ou deux asparagines, d'alanine et de résidus *N*-méthylcarbamoyl. Bien que présentant de faibles propriétés inhibitrices contre les chitinases de la famille 18, l'argifine inhibe la croissance des larves de la blatte américaine *Periplaneta americana* (Arai et al., 2000a; Omura et al., 2000). Récemment synthétisé (Dixon et al., 2005), ce cyclopentapeptide inhibe la chitinase B1 d'*Aspergillus fumigatus* et des chitinases humaines (Rao et al., 2005b).

L'argadine (**Figure 8**), un autre cyclopentapeptide inhibiteur de chitinases isolé à partir de la souche FO-7314 du champignon du sol *Clonostachys sp*., est composé d'arginine, de proline, d'homosérine, d'histidine et d'acide 2-aminoadipique. Des résidus acétyl interviennent également dans la structure de cet inhibiteur. Si l'argadine ne possède pas d'effet inhibiteur sur de nombreux microorganismes, son activité inhibitrice est rapportée sur une chitinase du diptère *Lucilia cuprina*. De même, l'injection de cet inhibiteur dans des larves de blattes américaines induit une mortalité pouvant atteindre 60% (Arai et al., 2000b). Comme l'argifine, l'argadine exerce une activité inhibitrice sur les chitinases humaines et d'*A. fumigatus* (Rao et al., 2005b).

Figure 7 : Structure des styloguanidines (Kato et al., 1995)

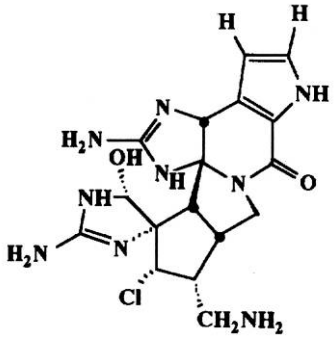
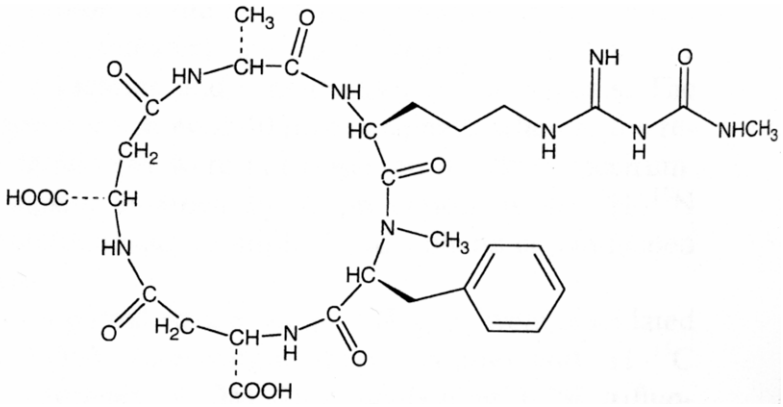
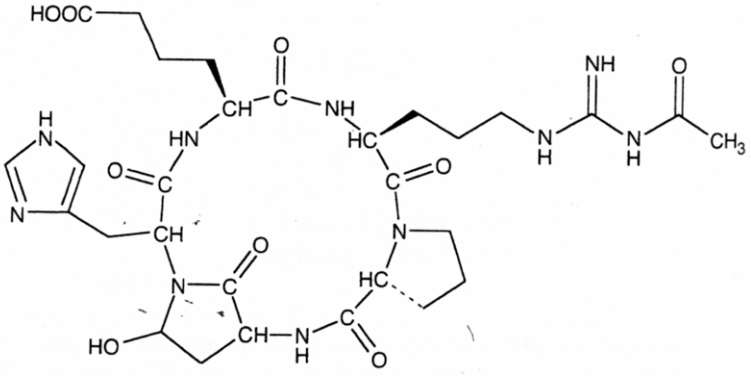


Figure 8 : Structure des cyclopentapeptides (Arai et al., 2000 ; Houston et al., 2002)

Argifine



Argadine



3.2.4 Les dipeptides cycliques

Le premier dipeptide cyclique à avoir été mis en évidence est le cyclo(L-Arg-D-Pro) également nommé CI-4 (**Figure 9**); il est issu de la bactérie marine *Pseudomonas sp*. IZ208. Bien qu'il présente une affinité modérée pour les chitinases (Houston et al., 2002a), le CI-4 possède des activités biologiques intéressantes puisqu'il induit *in vivo* l'inhibition de la séparation des cellules filles de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Izumida et al., 1996b). De plus, la croissance et l'élongation des hyphes du champignon filamentaire *C. albicans* sont perturbées en présence de CI-4 (Izumida et al., 1996a). Des études cristallographiques ont montré que le résidu Arg n'est pas essentiel pour la liaison au site actif des chitinases (Houston et al., 2004). C'est pourquoi d'autres dipeptides cycliques ont été étudiés parmi lesquels le cyclo(L-Arg-L-Pro), le cyclo(L-Gly-L-Pro), le cyclo(L-Tyr-L-Pro) et le cyclo(L-His-D-Pro). Parmi les quatre inhibiteurs supposés, ce dernier est celui qui possède la plus forte affinité pour la chitinase bactérienne ChiB de *Serratia marcescens*, l'histidine établissant de nombreux contacts avec le site actif. Ce composé inhibe également la séparation des cellules de *S. cerevisiae*, mais est un moins bon inhibiteur que le CI-4 (Houston et al., 2004).

3.2.5 La psammapline A

La psammapline A (**Figure 10**) est un produit naturel dérivé de tyrosine bromée, récemment extrait de l'éponge *Aplysinella rhax* (Tabudravu et al., 2002). Ce produit phénolique présente un pouvoir cytotoxique vis-à-vis de certaines cellules cancéreuses (tumeurs ovariennes et cellules leucémiques), inhibe certaines aminopeptidases (Shim et al., 2004) et topoisomérases humaines (Kim et al., 1999b) et présente des propriétés antibiotiques sur la bactérie *Staphyloccocus aureus* (Kim et al., 1999a). Outres ces effets thérapeutiques, la psammapline A présente des effets inhibiteurs modérés sur les chitinases bactériennes de *Bacillus sp., Streptomyces sp., Actinomyces sp.* et *S. marcescens* avec des activités inhibitrices variables d'une espèce à une autre. Cette molécule inhibe également la croissance du mildiou de la vigne *Plasmopora viticola*. En revanche, si elle ne présente pas d'effet sur *Drosophila melanogaster* ni sur *Heliotis virescens*, elle induit toutefois une mortalité de 55% sur le lépidoptère *Plutella xylostella* (Tabudravu et al., 2002).

Ces dernières années, plusieurs études ont été menées pour découvrir de nouveaux inhibiteurs de chitinases. Des oligo- et polysaccharides isolés à partir de filtrats de cultures de

Figure 9 : Structure des dipeptides cycliques (Houton et al., 2004)

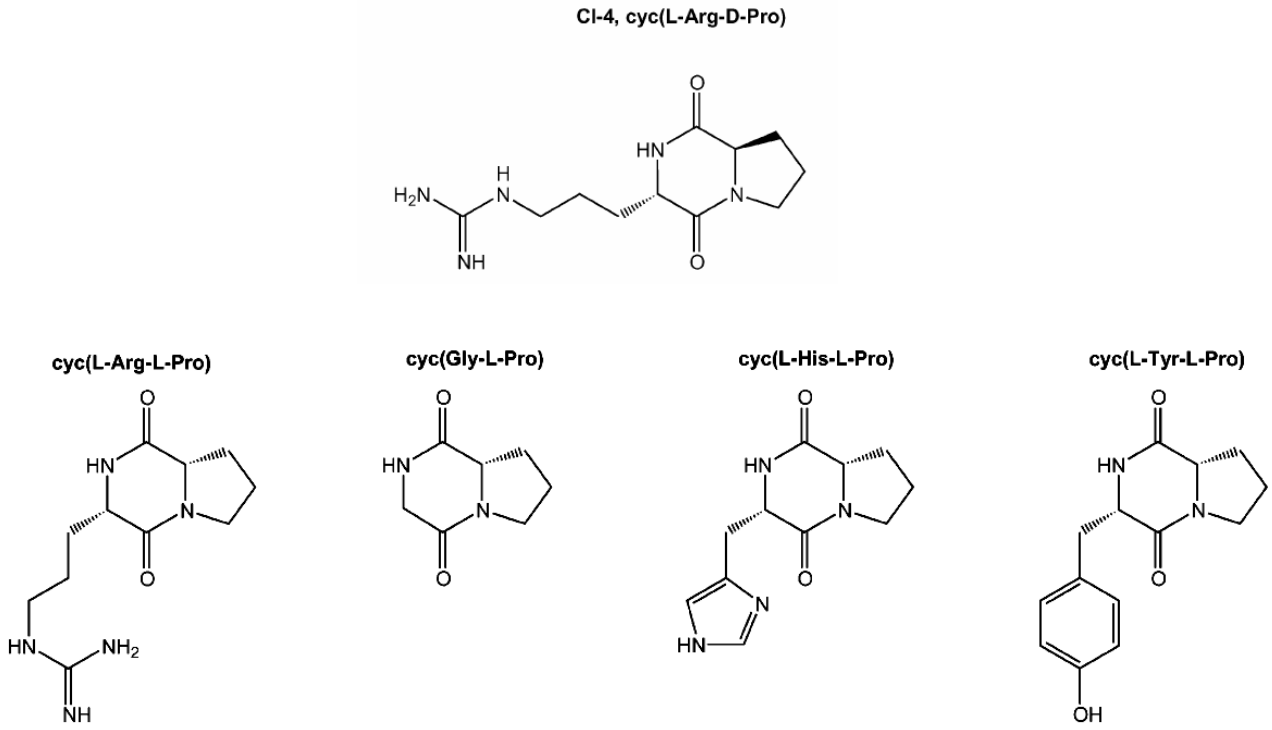
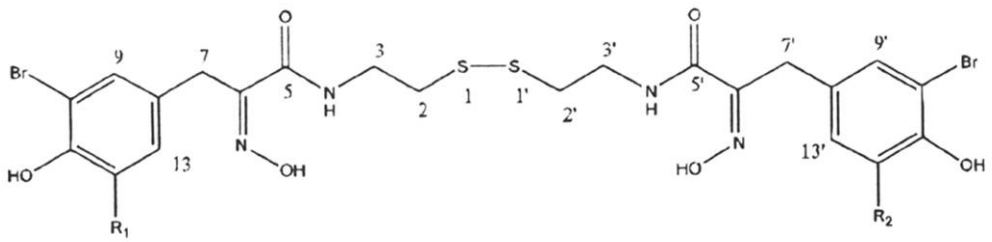


Figure 10 : Structure de la psammapline A (Tabudravu et al., 2002)



champignons mycéliens présentent des activités inhibitrices contre des chitinases de *Spodoptera litura* mais pas contre celles de *Streptomyces griseus* (Nitoda et al., 2003a). Parmi les polysaccharides isolés de ces cultures fongiques, l'un d'eux, a été isolé de la souche TNPT116-Cz de *Sphaeropsis sp.* Ce polysaccharide de faible poids moléculaire (16 kDa) et nommé FPS-1 serait composé de deux résidus *N*-acétylglucosamine, d'un glucose et d'un galactose. Le FPS-1 inhibe fortement la chitinase de *S. litura* avec un pouvoir inhibiteur comparable à celui de l'allosamidine (Nitoda et al., 2003b). D'autres sucres ont également été décrits comme des inhibiteurs de chitinases (Huang et al., 2006). Trois dérivés de la xanthine (la théophylline, la caféine, et la pentoxifylline) sont décrits comme étant des inhibiteurs de chitinases bactériennes, fongiques et humaines (Rao et al., 2005a; Schuttelkopf et al., 2006).

3.3 Importance de l'interaction entre inhibiteurs et site catalytique des chitinases

Les inhibiteurs de chitinases montrent qu'il existe de nombreuses disparités dans les effets observés. Ces différences peuvent être associées à la structure des inhibiteurs et à leurs modalités d'interactions avec les chitinases. Les études cristallographiques montrent que la force des liaisons établies entre les inhibiteurs et le site actif des chitinases détermine le niveau d'activité inhibitrice et les spécificités d'action. La nature de l'inhibiteur et la composition en acides aminés du site actif des chitinases sont des facteurs importants dans la mise en place de ces interactions. Ainsi, la structure de l'allosamidine mime le substrat naturel des chitinases et se lie très fortement aux chitinases. Chez les dérivés de l'allosamidine, des modifications plus ou moins importantes de la structure de cet inhibiteur peuvent affecter l'efficacité de l'inhibition (Terayama et al., 1993; Spindler-Barth, 1997; Spindler-Barth et al., 1998). Les inhibiteurs d'origine peptidique (argifine, argadine et dipeptides cycliques) se lient également au site actif des chitinases mais avec d'autres types d'interactions, induisant des activités inhibitrices variables (Houston et al., 2002b). La nature des acides aminés qui constituent le site actif des chitinases varie d'un organisme à l'autre et des modifications du site actif des chitinases peuvent significativement modifier les interactions entre l'inhibiteur et les chitinases. La mutation d'un résidu tryptophane ne modifie pas l'affinité des chitinases pour leur substrat, mais peut perturber les propriétés catalytiques de l'enzyme (Zhang et al., 2002). Le résidu Arg présent dans le site catalytique des chitinases de la famille 18 est également essentiel pour leur liaison avec les cyclopentapeptides (Dixon et al., 2005).

4. La Pomme de terre

4.1 Taxonomie et botanique

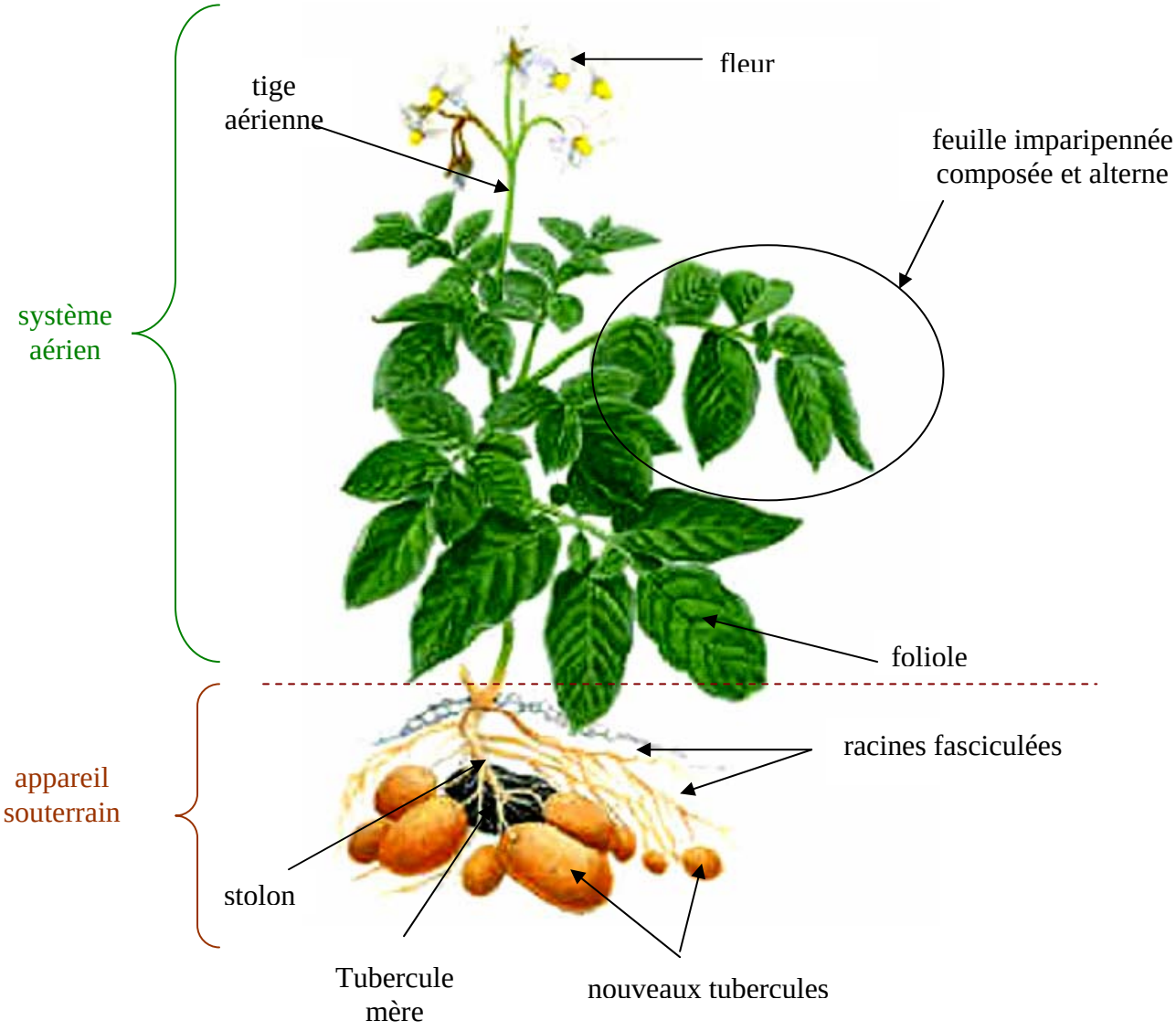
La pomme de terre (*Solanum tuberosum*) est une Solanacée au même titre que la tomate (*Lycopersicum esculentum*), l'aubergine (*Solanum esculentum*), le tabac (*Nicotiana tabacum*) ou le poivron (*Capsicum annuum*). Le genre *Solanum* est constitué d'environ 1000 espèces réparties à travers le monde, principalement en Amérique du Sud et en Amérique centrale. Environ 200 espèces de solanacées produisent des tubercules que l'on trouve de l'Argentine au Chili en passant par l'Uruguay, le Brésil, la Bolivie et le Pérou (Hawkes, 1990).

La pomme de terre est une plante herbacée, vivace et annuelle. La partie aérienne est constituée de tiges au port dressé pouvant atteindre un mètre de haut. Les feuilles sont composées de folioles ornées d'une pubescence et de trichomes glandulaires. Les inflorescences ombelliformes se développent à l'extrémité des tiges aériennes. Bien qu'étant autogames, les fleurs sont souvent stériles, rendant les croisements naturels et la fructification difficiles. La production de fruits est rare ; chaque baie peut contenir de nombreuses graines essentiellement utilisées pour les programmes de sélection variétale. Toutefois, la pomme de terre est rarement reproduite par voie sexuée et sa multiplication est principalement végétative au niveau de l'appareil souterrain. Celui-ci se met en place autour du tubercule mère qui possède des « yeux » à partir desquels se développent des germes, puis des tiges souterraines, les stolons, qui se ramifient. De nombreuses racines adventives naissent de ces stolons et assurent la croissance de la plante. Les tubercules sont des renflements des extrémités des stolons. Ils constituent des organes de réserve où est stocké l'amidon et permettent la multiplication végétative de la plante (**Figure 11**).

4.2 Historique

La domestication de la pomme de terre daterait d'au moins 9000 ans et a débuté en Amérique du Sud et en Amérique centrale où eurent lieu les premières sélections variétales. A partir de variétés tubéreuses diploïdes cultivées, sont apparues des plantes tétraploïdes aux propriétés qualitatives et quantitatives supérieures (Spire et Rouselle, 1996).

Figure 11 : Morphologie de la pomme de terre[1]



[1] http://www.prosea.nl

L'introduction de la pomme de terre en Europe remonte au XVI^{ème} siècle lorsque les conquistadors espagnols découvrirent l'Amérique et la "papa". En France, ce n'est qu'au cours du XVIII^{ème} siècle que va se développer la production de pommes de terre grâce à la ténacité du célèbre picard Antoine Augustin Parmentier qui l'introduit à la cour de Louis XVI et contribue à la diffusion de cette culture. Les années qui suivirent furent consacrées aux programmes de sélection qui permirent l'obtention de nouvelles variétés. La pomme de terre occupe aujourd'hui une place majeure dans l'agriculture européenne et mondiale.

4.3 Un légume d'importance économique

La production annuelle mondiale de pomme de terre est d'environ 311 millions de tonnes, pour un peu plus de 20 millions d'hectares cultivés (FAOSTAT, 2006[2]). En France, après avoir connu un fort développement au XIX^{ème} siècle, la culture de la pomme de terre a fortement chuté depuis le début du XX^{ème} siècle. La France est actuellement le quatrième producteur européen de pommes de terre avec 160 000 hectares cultivés en 2003 et une production totale d'environ 6 millions de tonnes (**Tableau 3**) , dont environ 4,8 millions de tonnes de pommes de terre de conservation. Environ 140 variétés sont cultivées, parmi lesquelles on compte la Désirée, la Franceline, la Charlotte, la Ratte ou encore la Bintje. Une partie de la production de pomme de terre est également destinée à la féculerie (**Figure 12**). Cette industrie requiert des variétés riches en amidon, la plus cultivée étant la Kaptah Vandel, d'origine danoise. La fécule de pomme de terre a de nombreux débouchés, à 80% industriels: papeterie, chimie, pharmacie, textile, couches pour bébés et plus récemment l'incorporation dans les emballages plastiques.

La première région française productrice de pommes de terre est le Nord-Pas-de-Calais avec 35% de la production française, suivie de la Picardie avec 25%. Ces deux régions occupent également une place importante dans les approvisionnements destinés à l'industrie féculière et de transformation. De nombreux groupes de transformations sont implantés en Nord Pas-de-Calais / Picardie, notamment Roquette, Vico, Flodor, Lunor et Touquet Savour. Les autres régions productrices alimentent principalement le marché du frais et participent à la production de pomme de terre primeur. La France est le leader mondial de l'exportation avec 25 à 30 % de sa production annuelle, notamment vers ses voisins européens (UNPT, 2006). Les principaux clients de la France sont l'Espagne et l'Italie, ainsi que le Portugal et l'Allemagne pour le marché du frais, la Belgique et les Pays-Bas pour l'industrie de

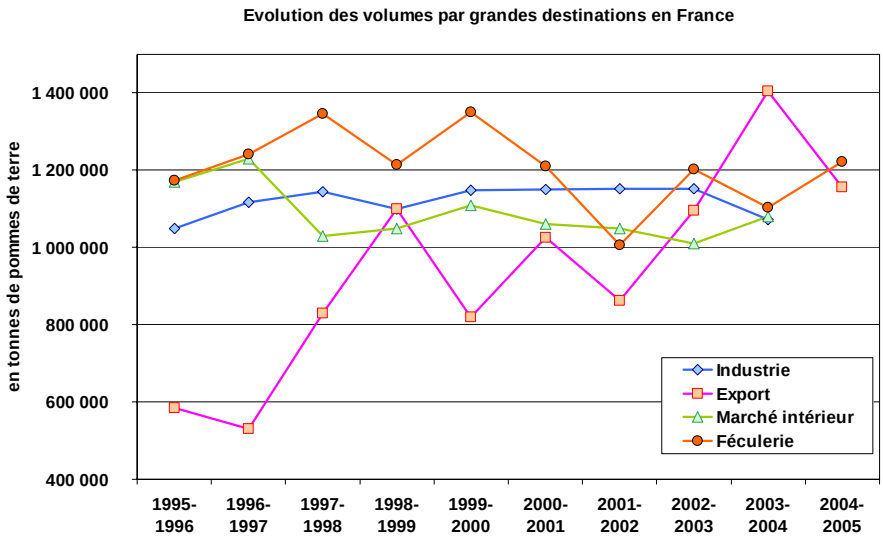
[2] http://faostat.fao.org

Tableau 3 : Production française de pomme de terre en 2003

	Surface	Tonnage
Pomme de terre de consommation et transformation	100 000 ha	4 000 000 t
Pomme de terre féculière	30 000 ha	1 200 000 t
Primeurs	15 000 ha	400 000 t
Plant de pomme de terre	15 000 ha	400 000 t
TOTAL	160 000 ha	6 000 000 t

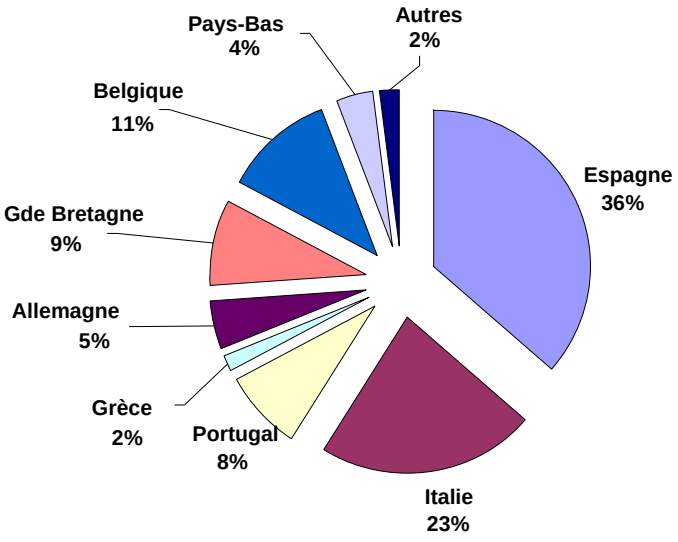
Source : Comité Nord des Producteurs de Plants de Pommes de Terre

Figure 12 : Destinations des volumes de pommes de terre



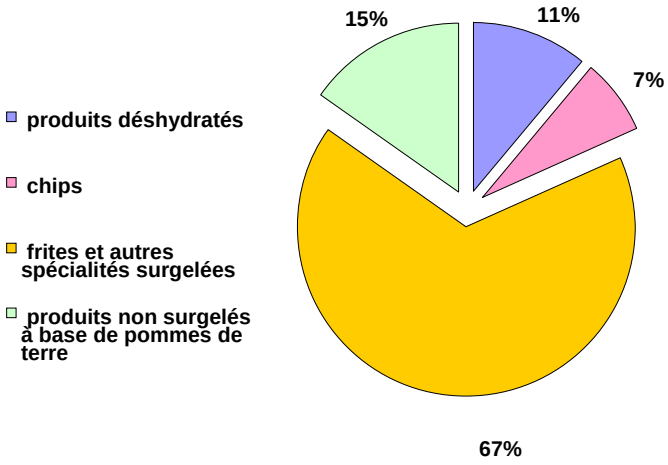
Source : UNPT, 2006

Figure 13 : Destinations des exportations en 2004-2005



Source : UNPT, 2006

Figure 14 : Valorisation de la pomme de terre en 2003-2004 (1 072 577 tonnes)



Source : UNPT, 2006

transformation (**Figure 13**). La pomme de terre tient une place importante dans l'alimentation des français, avec 35 à 40 kg consommés par habitant et par an, auxquels il faut ajouter 25 kg sous forme de produits transformés (**Figure 14**, CNIPT, 2006[3]).

4.4 Maladies et ravageurs de la pomme de terre

Les parties aériennes et souterraines subissent des dommages causés par des bactéries et champignons pathogènes, mais aussi par de nombreux invertébrés tels que les nématodes, les limaces, les myriapodes, les insectes, les acariens, voire par de petits mammifères. Outre les dégâts qu'ils causent sur les différentes parties de la plante, ces ravageurs sont susceptibles de véhiculer un grand nombre de maladies. Il en résulte des retards de croissance, un affaiblissement des plantes, une destruction des parties malades ou une mauvaise qualité des tubercules qui sont généralement associés à des pertes en rendement considérables (**Tableau 4** et **Tableau 5**).

Les champignons pathogènes et les pourritures bactériennes sont responsables de nombreux dégâts sur les cultures mais aussi lors du stockage des tubercules. Le mildiou (*Phytophthora infestans*), le rhizoctone brun (*Rhizoctonia solani*), la gangrène (*Phoma exigua*) ou les fusarioses provoquent d'importantes diminutions de récolte, allant jusqu'à la perte totale. Les bactéries *Pseudomonas solanacearum* et *Clavibacter michiganensis* occasionnent elles aussi des pertes notamment en cours de conservation. La gale commune (*Streptomyces scabies*), la gale argentée (*Helminthosporium solani*) et le rhizoctone déprécient la qualité marchande des tubercules, qui présentent des tâches plus ou moins disgracieuses à leur surface (FNPPPT, 2000).

Classés organismes de quarantaine, les nématodes *Globodera rostochiensis* et *G. pallida* parasitent les racines et affectent la croissance des plantes et la taille des tubercules (FNPPPT, 2000). En formant des kystes, les nématodes restent viables dans le sol pendant 15 à 20 ans (Stone et al., 1973) et peuvent être véhiculés de parcelle en parcelle par les machines agricoles. Les nématodes des genres *Trichodorus* et *Paratrichodorus* peuvent également transmettre des virus, notamment le virus du Rattle alors que ceux du genre *Meloidogyne* induisent la formation de galles sur les racines et tubercules (Mugniéry, 1996).

[3] http://www.cnipt.com

Tableau 4 : Principaux ravageurs de la pomme de terre (FNPPPT, 2000)

Ravageurs	Dégâts causés	Moyens de lutte
Nématodes à kyste	Kystes bruns racinaires	Respecter des rotations de culture longues
Nématodes à galle	Nanisme, galles racinaires, pustules sur tubercules	Nématicides
Nématodes libres	Réduction de croissance, lésions et momification des tubercules	Produits chimiques (désinfection du sol)
Doryhores	Défoliation, diminution des rendements	Traitement avec un insecticide chimique
Taupins	Galeries dans les tubercules	Traitement du sol avec un insecticide chimique
Teignes	Feuilles: Perforation et forage de mines, tubercules: galeries	Destruction des tubercules, insecticides sur plantes
Noctuelles	Attaque des feuilles	Insecticides
Altises		
Punaises		
Cicadelles		
Pucerons		
Hannetons	Morsures des tubercules	Insecticides
Petite limace grise	Morsures des tubercules	Molluscicides

Tableau 5 : Principales maladies de la pomme de terre (FNPPPT, 2000)

Maladies	Vecteurs / Agents	Symptômes	Moyens de lutte
Virus Y	Pucerons	Taches nécrotiques, mosaïque sur les feuilles	Défanage, traitement aux huiles minérales
Virus de l'enroulement	Pucerons	Enroulement et jaunissement des feuilles	Défanage, insecticides
Virus A	Pucerons	Mosaïque (décoloration) au niveau des feuilles	Défanage, traitement aux huiles minérales
Virus X	Pucerons et contacts	Mosaïque au niveau des feuilles	Epuration des plants virosés
Virus S	Pucerons et contacts	Réduction et éclaircissement du feuillage	Sélection des plants
Virus M	Pucerons	Enroulement et décoloration des feuilles	Sélection des plants
Virus du Rattle	Nématodes du sol	Taches sur les feuilles et tubercules, nécroses	Sélection des plants, Nématicides
Virus du MOP-TOP	Champignon du sol	Feuilles : taches ; tubercules:nécroses brunes	Sélection des parcelles, éviter l'excès d'eau
Virus du TSWV	Thrips	Feuilles: taches ; tubercules : éclatement, taches	Uutiliser plant certifié,
Mycoplasme	Cicadelles	Pourriture des tubercules, prolifération des tiges	Destruction des vecteurs (insecticides)
Gale commune	*Streptomyces sp.*	Gale en pustule ou en liège sur les tubercules	Irriguer, réduire les amendements calcaires
Jambe noire	*Erwinia sp.*	Pourriture noire des tubercules et des tiges	Epuration des plants
Pourriture brune	*Ralstonia sp.*	Feuilles: flétrissement; tubercules: brunissement	Utiliser un plant certifié
Pourriture annulaire	*Clavibacter sp.*	Feuilles: flétrissement; tubercules: brunissement	Utiliser un plant certifié
Alternariose	*Alternaria solani*	Feuilles : nécrose limitée ; tubercules : pourriture	Fongicides anti-mildiou
Dartrose	*Colletotrichum sp.*	Jaunissement des tiges, destruction des racines	Fongicides, utiliser un plant certifié
Fusariose	*Fusarium sp.*	Pourriture brune des tubercules	Fongicides, séchage des tubercules
Gale argentée	*Helminthosporium sp*	Plages claires et argentées sur les tubercules	Fongicides, séchage des tubercules
Gale poudreuse	*Spongospora sp.*	Chancre racinaire, pustules sur les tubercules	Fongicides, utiliser un plant certifié
Galle verruqueuse	*Synchytrium sp.*	Tumeurs	Interdiction de culture
Gangrène	*Phoma sp.*	Feuilles: jaunissement ; tubercules: pourriture	Limiter les blessures, fongicides
Mildiou	*Phytophtora sp.*	Feuilles: tâches ; tubercules: taches brunes	Destruction des déchets, fongicides,
Oosporiose	*Polyscystalum sp.*	Tubercules: pustules ; Racines: lésions brunes	Récolte précoce, utiliser un plant certifié
Pythiales	*Pythium sp.*	Pourriture, brunissement des tubercules	Séchage des récoltes, utiliser un plant sain
Rhizoctone brun	*Rhizoctonia sp.*	Tubercules aériens, sclérotes sur les tubercules	Fongicides, séchage des tubercules
Sclérotiniose	*Sclerotinia sp.*	Pourriture du collet et des tubercules (rare)	Eviter l'excès d'azote
Verticilliose	*Verticilium sp.*	Feuilles: flétrissement; tubercules: brunissement	Fongicides, utiliser un plant certifié

Parmi les ravageurs de la pomme de terre, les insectes occupent une très large place puisqu'ils peuvent attaquer les pommes de terre à différents stades de leur développement. La voracité des larves et adultes de doryphore (*Leptinotarsa decemlineata*) se traduit par une consommation partielle ou totale du feuillage qui peut conduire à des pertes majeures de pouvant atteindre 40% de la récolte (Perlak et al., 1993; Gianessi et al., 2002). Si le doryphore a quasiment disparu en France, les Services Français de Protection des Végétaux observent depuis quelques années le retour de cet insecte dans le bassin français de culture de la pomme de terre. Les tiges et feuilles sont également la cible des nombreux autres ravageurs, parmi lesquels ont peut citer les altises, les cicadelles, les punaises ou encore les larves mineuses de diptères. Les larves de noctuelles (*Agrotis segetum*) et de nombreuses teignes telles que *Phthorimaea operculella, Scrobipalpula absoluta, Scobipalpopsis solanivora* ou *Tecia solanivora,* minent les diverses parties de la plante notamment les tubercules, où les dégâts causés occasionnent des dépréciations marchandes importantes. Les larves de taupins (coléoptères du genre *Agriotes*) s'attaquent aux tubercules, se nourrissent de la chair en creusant des galeries. Les larves de Hanneton commun (*Melolontha melolontha*) causent également des dommages aux tubercules.

En France, les pucerons constituent certainement les ravageurs les plus importants de la pomme de terre. Cinq espèces sont principalement inféodées à cette culture (**Figure 15**). Les pucerons *Myzus persicae* et *Macrosiphum euphorbiae* établissent précocement leurs colonies sur les feuilles supérieures. Plus tard, trois autres espèces (*Aphis gossypii, Aphis nasturtii* et *Aulacorthum solani*) colonisent les plants et s'établissent sur les feuilles inférieures et médianes. Les aphides véhiculent de nombreux virus et sont susceptibles de causer jusqu'à 5 tonnes de pertes en rendement par hectare et par an (20%) dans le Nord de la France (Duvauchelle et Dubois, 1997). *M. persicae* est certainement le vecteur le plus important puisqu'il peut transmettre plus d'une centaine de virus alors que *M. euphorbiae* peut véhiculer une quarantaine de viroses. Les virus les plus connus sur pomme de terre et transmis par les pucerons sont le virus de l'enroulement, les virus Y, A, S, X et M (Kennedy et al., 1962; FNPPPT, 2000). Les dégâts causés sont localisés au niveau des feuilles, avec l'apparition de tâches nécrotiques, de mosaïques, d'enroulement ou de dépigmentations foliaires. Certains virus induisent également des nécroses tuberculaires qui déprécient leur valeur marchande et rendent les tubercules non commercialisables (FNPPPT, 2000). D'autres espèces de pucerons, non inféodées à la pomme de terre, sont également capables de véhiculer de nombreux virus sur cette culture.

Figure 15 : Les pucerons inféodés à la pomme de terre.

Myzus persicae

Macrosiphum euphorbiae

Aphis gossypii

Aulacorthum solani

Aphis nasturti

5. Les pucerons, des ravageurs de cultures

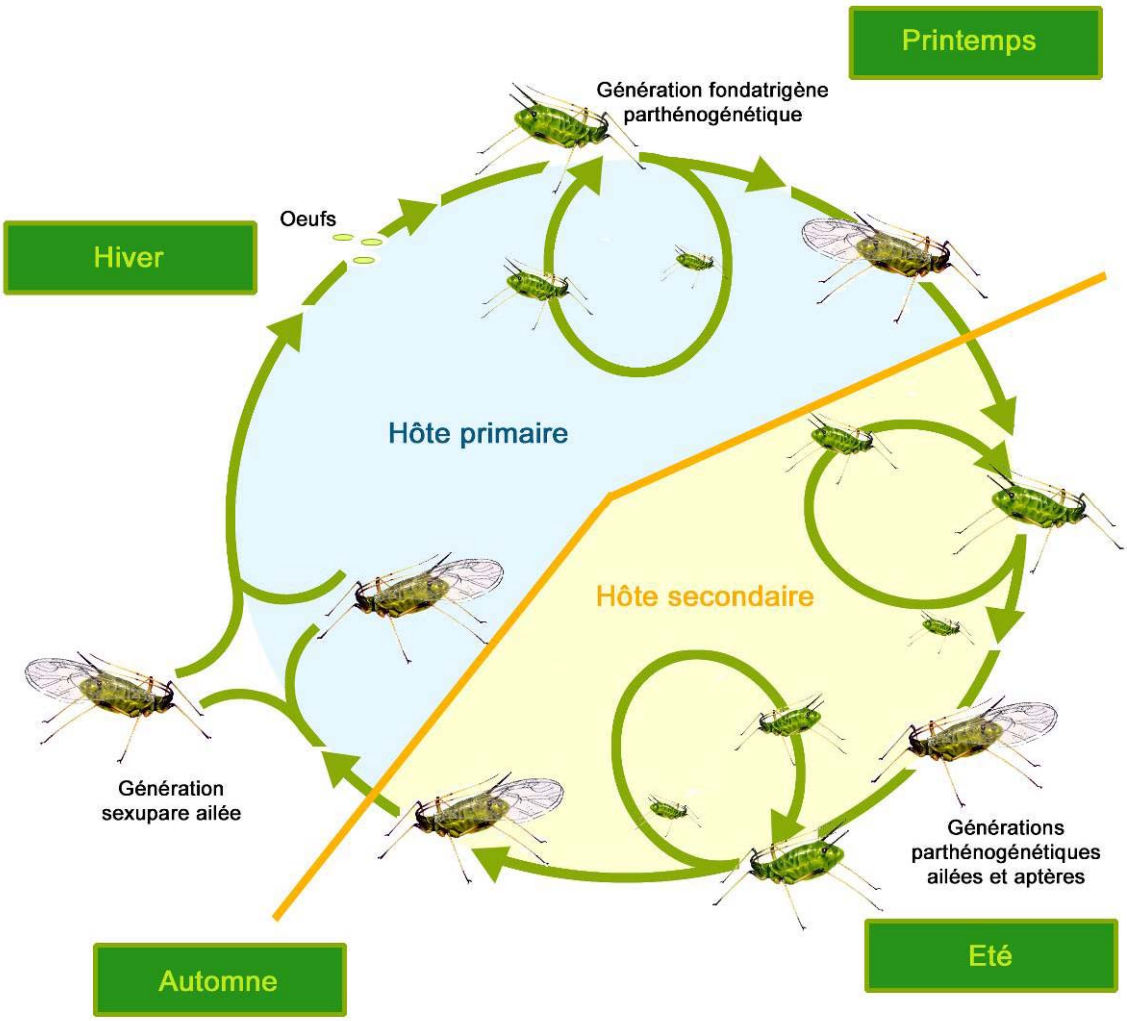
5.1 Présentation

Les pucerons appartiennent à l'ordre des Hémiptères, sous-ordre des Homoptères, au même titre que les Cicadelles, les Psylles, les Aleurodes et les Cochenilles (Blackman et Eastop, 2000). Si on dénombre environ 4000 à 5000 espèces de pucerons à travers le monde, la grande majorité se répartit essentiellement dans les régions tempérées du globe (Dixon, 1987). Au cours de leur cycle de développement les pucerons pouvant se développer sur un même type d'hôte sont dits monoéciques. Dans de nombreux cas, leur développement nécessite une alternance d'hôtes et les pucerons sont alors dits hétéroéciques. C'est notamment le cas les pucerons qui s'attaquent aux cultures annuelles (Blackman et Eastop, 2000).

5.2 Biologie

Les pucerons possèdent un cycle de développement holocyclique, caractérisé par une alternance entre une génération amphisexuelle et des générations parthénogénétiques (Dixon, 1987). La génération amphisexuelle qui apparaît à l'automne est caractérisée par des individus mâles et femelles. L'accouplement et la fécondation conduisent à la ponte d'œufs qui constituent des formes de résistance. A la fin de l'hiver, les œufs éclosent pour donner des larves. Le développement post-embryonnaire comporte quatre stades larvaires (Horsfall, 1924) séparés par des phases de mue. La première génération dite fondatrigène n'est composée que par des adultes aptères qui se reproduisent par parthénogenèse thélythoque. Les générations parthénogénétiques suivantes se succèdent et présentent des morphes adultes pouvant être ailés ou aptères. Les premiers assurent la dispersion de l'espèce d'une plante hôte à une autre et les seconds, la multiplication et le développement rapide des colonies sur les plantes (Miyazacki, 1987). Les générations parthénogénétiques se succèdent du printemps à l'automne (**Figure 16**). Toutefois, dans nos régions, avec le réchauffement climatique et des hivers moins rigoureux, on observe la disparition des cycles holocycliques qui laissent place à des développements anholocycliques où uniquement des générations parthénogénétiques se succèdent (Blackman et Eastop, 2000). Le mode de reproduction parthénogénétique et larvipare des pucerons leur confère un potentiel de multiplication très élevé, permettant une

Figure 16 : Cycle de développement holocyclique des pucerons



colonisation rapide des parcelles cultivées et une propagation rapide des virus. Les pucerons sont des insectes hémimétaboles et possèdent 4 stades larvaires. La longévité des adultes varie de 7 jours à trois mois, selon les conditions environnementales et leur période reproductive dure environ 15 jours pour une descendance d'une trentaine à une soixantaine d'individus par femelle.

5.3 Dégâts causés par les pucerons

Insectes de type piqueurs-suceurs, les pucerons s'alimentent exclusivement aux dépens de la sève élaborée. La sève est constituée en grande partie d'eau, de carbohydrates, de protéines et de divers acides aminés libres, dont les concentrations respectives sont extrêmement variables (Douglas, 1993; Douglas, 1998; Karley et al., 2002). Les produits non assimilés sont excrétés sous forme de gouttes de miellat.

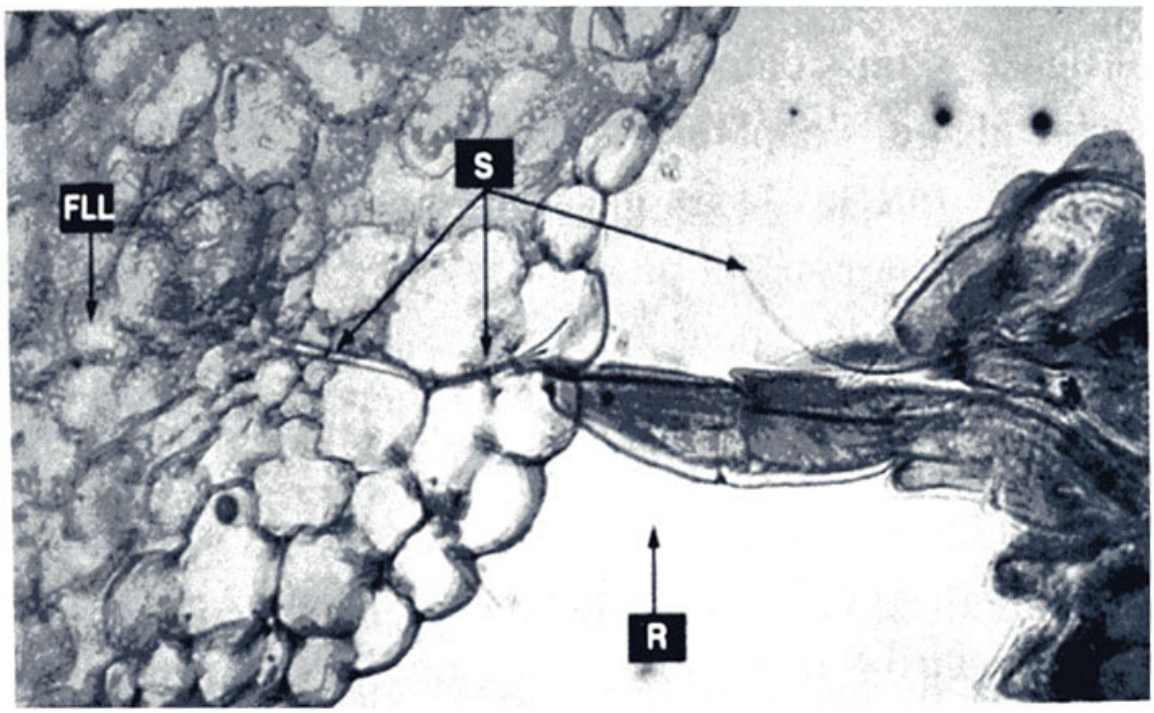
5.3.1 Dégâts directs

Les pièces buccales du puceron sont adaptées à la prise de nourriture liquide non disponible en surface. Elles forment des stylets percés d'un canal alimentaire et d'un canal salivaire qui permettent aux aphides d'effectuer des piqûres dans la plante pour atteindre les tubes criblés (**Figure 17**). La perforation des feuilles et l'injection d'une salive liquide dans les tissus végétaux lors de l'insertion des stylets peut avoir des effets toxiques (Comeau, 1992) qui occasionnent des désordres physiologiques se traduisant par des crispations, des dépigmentations des feuilles ou des fruits mais également la formation de galles (Forrest, 1987). Lors de la pénétration des stylets dans le végétal, la sécrétion d'une salive gélifiante permet la formation d'une gaine qui facilite la pénétration des stylets de l'insecte entre les diverses couches cellulaires. Lors de la prise alimentaire, les pucerons créent des puits de carbohydrates et prélèvent de grandes quantités de sève élaborée, afin de satisfaire leurs besoins nutritifs. Lorsqu'une plante est très fortement infestée, sa croissance peut être perturbée (Miles, 1968; Miles, 1989).

5.3.2 Dégâts indirects

Le miellat excrété par les pucerons, bien que non toxique, constitue un milieu favorable au développement de microorganismes notamment des champignons saprophytes

Figure 17 : Pièces buccales des pucerons lors de la prise alimentaire.
Légende : Microscopie Electronique à Transmission. FLL : faisceau libéro-ligneux ; S : stylets ; R : rostre
(Leclant et Deguine, 1994).



(*Alternaria sp.*, *Verticillium sp.*) responsables des fumagines (Huang et al., 1981). Le dépôt de miellat en grandes quantités peut également induire des phénomènes de dessiccation en obstruant les stomates ou par effet osmotique sur la surface des feuilles. Comme nous l'avons vu précédemment, les pucerons sont vecteurs de nombreux virus et la pénétration des stylets dans les tissus épidermiques est suffisante pour transmettre des particules virales.

5.4 Lutte contre les pucerons

Comme il n'existe pas de traitements antiviraux pour les plantes, le contrôle des viroses passe obligatoirement par une lutte contre les pucerons vecteurs. Si diverses stratégies peuvent être envisagées, la principale méthode de lutte actuelle s'appuie sur l'utilisation d'insecticides chimiques tels que des organophosphorés, des carbamates mais aussi des pyréthrinoïdes (Base e-phy, 2006). Toutefois, depuis plusieurs années, les pucerons ont développé des résistances contre ces pesticides et il convient de développer de nouvelles méthodes de lutte. Parmi les différentes méthodes, la lutte biologique avec l'utilisation d'insectes aphidiphages tels que des prédateurs (coccinelles, chrysopes, syrphes) ou des insectes hyménoptères parasitoïdes a été envisagée. Le recours à certains pathogènes des insectes tels que des virus, des bactéries ou des suspensions des champignons entomopathogènes (Dun et al., 2003; Ying et al., 2003) est également un moyen de lutte contre les pucerons.

Une stratégie pour lutter contre les aphides repose sur l'exploitation des résistances naturelles des plantes. Chez les espèces sauvages de *Solanum*, il existe des sources de résistances vis-à-vis de *M. persicae* et de *M. euphorbiae* (Radcliffe et Lauer, 1971; Radcliffe et al., 1981). Des études récentes (Le Roux et al., 2007) ont permis de caractériser la nature (antibiose ou antixénose) de la résistance chez certaines espèces et offrent de nouvelles opportunités pour la réalisation des croisements entre les espèces sauvages et *S. tuberosum*. Les recherches menées sur les interactions plantes-pucerons ont permis d'isoler chez de nombreuses plantes, des gènes de résistance aux pucerons, tel que le gène *Vat* (virus aphid transmission) qui confère une résistance contre *Aphis gossypii* en réduisant son taux de colonisation mais aussi contre les virus (Cucumber Mozaic Virus, Watermelon Mozaic Virus) qu'il transmet sur Cucurbitacées (Chen et al., 1997). De même, le gène *Mi* de la tomate induit une résistance contre les pucerons en réduisant leur capacité à s'alimenter (Kaloshian et al., 1995). L'utilisation de la transgenèse pour lutter contre les aphides a également été envisagée, mais il existe de nombreux facteurs limitants parmi lesquels le choix des gènes d'intérêt et l'acceptation des OGM par les consommateurs.

Objectifs de l'étude

Compte tenu de l'importance économique de la pomme de terre en France et en région Picardie, la présence de ravageurs et/ou de pathogènes constitue une menace sérieuse. Les pucerons, de par leur capacité à transmettre des virus, ont un impact négatif majeur sur la qualité et la quantité des tubercules. Ces dernières années, de nouvelles dynamiques de populations de pucerons sont observées et les taux de viroses au champ ne cessent de croître. En outre, l'apparition de nouvelles souches virales est notée, notamment chez le virus Y qui possède de nombreux variants responsables de dégâts sur la culture de pomme de terre et dont le taux de contamination des parcelles peut atteindre 40 à 80%. Comme il n'existe pas à ce jour de traitement antiviral, une vigilance accrue est nécessaire pour contrôler les populations de pucerons, car les sélectionneurs et producteurs de pomme de terre ont l'obligation de produire du plant certifié indemne de virus (le seuil de tolérance est fixé entre 1 et 10% de plants infestés entre la première année et la mise sur le marché des plants) et les transformateurs n'acceptent que des tubercules de qualité.

La création et l'obtention des variétés actuelles basées sur la sélection de caractères liés à la productivité, l'apparence ou la texture des tubercules, ont souvent conduit à un appauvrissement du génome dont la perte de certains caractères de résistance qui ont nécessité le recours à l'utilisation massive de pesticides. Afin de lutter contre les pucerons de la pomme de terre, les insecticides chimiques restent à l'heure actuelle la méthode la plus utilisée. La formulation la plus couramment employée est le Plenum®, composée de pyméthrozine qui a pour effet d'interrompre la prise alimentaire des aphides. Toutefois, l'utilisation intensive d'insecticides a conduit à une perte rapide d'efficacité des matières actives due à l'émergence d'individus résistants, rendant la lutte chimique difficile voire impossible à conduire à long terme et nécessitant l'élaboration de molécule de plus en plus toxiques. C'est pourquoi il est urgent de développer de nouvelles méthodes de lutte contre les insectes qui soient plus respectueuses de l'environnement (flore, faune, sols, …) et qui présentent aussi le moins de risques possibles pour la santé animale et humaine.

Pour l'élaboration de nouveaux programmes de lutte contre les insectes ravageurs, différentes stratégies peuvent être envisagées, visant à perturber les comportements de colonisation de la plante-hôte, la prise alimentaire, la digestion, la croissance ou la reproduction. Les pucerons constituent des modèles d'étude intéressants puisqu'ils présentent des caractéristiques que ne possèdent pas les coléoptères ou les lépidoptères. Ce sont en effet des insectes de type piqueur-suceur strictement phloémophages. De plus, ces insectes sont dépourvus de membrane péritrophique. Enfin, les pucerons sont des insectes parthénogénétiques et larvipares dont le développement embryonnaire et la mise en place des

tissus larvaires a lieu dans les organes génitaux maternels. Ces caractéristiques peuvent être considérées dans la recherche de nouveaux moyens de lutte contre les aphides.

La présence de chitine est une propriété commune à la fois aux insectes, incluant les trois principaux ordres ravageurs des cultures (homoptères, coléoptères et lépidoptères), mais aussi aux champignons et aux nématodes, dont nous avons vu l'importance en tant que ravageurs. En outre, les chitinases sont impliquées dans les processus de croissance des insectes, et dans les mécanismes de défense chez les végétaux pour répondre à une attaque. La dérégulation du métabolisme des chitinases par surexpression ou par inhibition des enzymes chitinolytiques constitue donc une voie d'intérêt pour développer de nouveaux programmes de lutte contre les ravageurs et pathogènes des cultures.

Dans ce contexte, l'évaluation de la pertinence d'une stratégie chitinase a donc été envisagée dans le cadre du programme régional POMRAV (Pommes de terre résistantes aux ravageurs, CPER Picardie 2000-2006) basé sur le modèle pomme de terre / puceron.

Afin de mesurer les effets de la surexpression des activités chitinases sur les structures chitineuses, nous avons fait appel à l'outil transgenèse afin de faire exprimer un gène codant pour une chitinase d'insecte (*Phaedon cochleariae*, Chrysomèle) dans des lignées de pommes de terre. Les résultats inattendus acquis lors de ces travaux ont été confirmés par incorporation d'une chitinase bactérienne dans un milieu artificiel. Cela nous a conduit à étudier une stratégie antagoniste, basée sur l'utilisation d'inhibiteurs de chitinases d'origines diverses délivrés via un milieu artificiel et sensés réprimer les activités chitinases. Compte tenu des effets délétères obtenus à l'issue de l'évaluation de la pertinence de cette seconde stratégie, nous avons initié la caractérisation des enzymes chitinolytiques chez le puceron dans le but de rechercher de nouvelles biomolécules aux propriétés insecticides. Parallèlement, nous avons sélectionné divers oligo-saccharides afin d'évaluer leurs propriétés aphicides dans le but d'élaborer de nouveaux moyens de lutte alternatifs contre les ravageurs et pathogènes des cultures.

Chapitre 1

Impacts d'une stratégie « chitinase » sur le puceron Myzus persicae

Introduction

L'apport des biotechnologies permet d'envisager de nouvelles stratégies de lutte contre les ravageurs et pathogènes des cultures. La transgenèse offre ainsi la possibilité de faire exprimer des gènes d'intérêt, dont des entomotoxines, dans une plante hôte. Suivant la nature du promoteur utilisé, la synthèse des protéines *in planta* permet une expression constitutive dans tous les tissus de la plante ou un confinement dans certains compartiments. L'expression des gènes peut également être induite uniquement après une attaque en utilisant des promoteurs inductibles.

Les premières transformations génétiques de pommes de terre ont été effectuées en 1986 (An et al., 1986; Shahin et Simpson, 1986) afin de produire des molécules thérapeutiques et de modifier les propriétés fonctionnelles de l'amidon pour le développement de nouveaux plastiques biodégradables. La durée de dormance des germes a également pu être modifiée par transgenèse. La transformation des plants de pommes de terre a également été envisagée pour améliorer la résistance contre les pathogènes et ravageurs de cette culture. Ainsi, la variété NewLeaf^{TM} de pommes de terre *Bt* a été commercialisée pour lutter contre les doryphores.

L'expression de chitinases bactériennes, fongiques ou virales chez les plantes leur confère essentiellement une résistance contre les champignons pathogènes. De rares exemples rapportent que certaines chitinases recombinantes d'insectes et surexprimées dans des plantes présentent des effets insecticides sur coléoptères et lépidoptères, ce qui permet de considérer les chitinases en tant que biopesticides potentiels.

Bien que les pucerons représentent des ravageurs majeurs des cultures, l'effet des chitinases sur ces insectes n'a jusqu'alors jamais été décrit. C'est pourquoi nous avons étudié l'impact de la chitinase de la chrysomèle *Phaedon cochleariae* (Coléoptère), dont le gène isolé par Girard & Jouanin (1999) a été exprimé de façon constitutive dans des plants de pommes de terre, sous le contrôle du promoteur CaMV35S. Un suivi quotidien des pucerons a été effectué *in planta* (**Annexe 1**) Ne disposant pas de la chitinase de *Phaedon* purifiée et afin de nous affranchir de « l'effet plante », nous avons parallèlement testé l'effet d'une chitinase bactérienne (*Serratia marcescens*) délivrée *in vitro* via un milieu artificiel (**Annexe 2**) afin de confirmer les résultats obtenus sur plantes transformées. Nos travaux rapportent pour la première fois des effets inattendus de ces chitinases sur le puceron *M. persicae*, dont les paramètres démographiques sont modifiés dans un sens favorable au développement des populations de pucerons. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication scientifique.

Article 1 : **Unexpected effects of chitinases on the peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer) when delivered both via transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* Linné) and *in vitro*** **J. Saguez**, R. Hainez, A. Cherqui, O. Van Wuytswinkel, H. Jeanpierre, G. Lebon, N. Noiraud, A. Beaujean, L. Jouanin, J-C. Laberche, C. Vincent, P. Giordanengo. *Transgenic Research* **14 (1):** 57-67 (2005).

Transgenic Research **14:** 57–67, 2005. © *Springer* 2005

Unexpected effects of chitinases on the peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer) when delivered via transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* Linné) and *in vitro*

Julien Saguez[1,2,5], Romaric Hainez[1,2], Anas Cherqui[1], Olivier Van Wuytswinkel[3], Haude Jeanpierre[2,**], Gaël Lebon[1,2,***], Nathalie Noiraud[2,****], Antony Beaujean[2], Lise Jouanin[4], Jean-Claude Laberche[2], Charles Vincent[5] & Philippe Giordanengo[1,*]

[1]*Biologie des Entomophages (UPRES EA 3900), Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex, France*

[2]*Androgenèse et Biotechnologie (UPRES EA 3900), Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex, France*

[3]*Génétique Moléculaire des Plantes (UPRES EA 3900), Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex, France*

[4]*Biologie cellulaire, Institut National de la Recherche Agronomique, 78026 Versailles Cedex, France*

[5]*Centre de Recherche et de Développement en Horticulture, Agriculture et Agro-alimentaire Canada, 430, Boul. Gouin, Saint-Jean-sur-Richelieu, Québec, Canada J3B 3E6*

Received 16 March, 2004; revised 14 June 2004; accepted 18 June 2004

Key words: aphididae, artificial diet, chitinase, *Myzus persicae, Solanum tuberosum,* transgenic potato

Abstract

With the aim of producing insect-resistant potato plants, internode explants of *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée were transformed with an *Agrobacterium* strain C58pMP90 containing an insect (*Phaedon cochleariae*: Coleoptera, Chrysomelidae) chitinase gene and the neomycin phosphotransferase (*nptII*) gene as selectable marker, both under the control of the viral CaMV 35S promoter. Three transformed potato lines (CH3, CH5 and CH25) exhibiting the highest chitinolytic activities were selected for feeding experiments with the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), under controlled photoperiod and temperature conditions. Aphids fed on transgenic potato plants showed a reduced pre-reproductive period and an enhanced daily fecundity. Transgenic potato lines did not affect nymphal mortality, but improved several biological parameters related to aphid population's growth. Artificial diets were used to provide active (1, 10, 100 and 500 μg ml^{-1}) and inactive (500 μg ml^{-1}) bacterial (*Serratia marcescens*) chitinase to *M. persicae*. These compounds increased nymph survival at all active chitinase doses when compared to the control diet, while inactive chitinase did not. Although the pre-reproductive period was slightly shortened and the daily fecundity slightly higher, active and inactive chitinase provided as food led a reduction from 1 to 1.5 day population's doubling time. Therefore chitinase activity was responsible for the probiotic effects on aphids. Our results question the relevance of a chitinase-based strategy in the context of potato culture protection.

*Author for correspondance
E-mail: philippe.giordanengo@u-picardie.fr
**Present address: IBMP CNRS, 12 rue du général Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex, France.
***Present address: Stress, Défenses et Reproduction des Plantes (UPRES EA 2069), Université de Reims Champagne Ardenne, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France.
****Present address: UMR INRA/UCBN 950 Physiologie et Biochimie Végétales, IRBA, esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France.

Introduction

Plants have evolved sophisticated defense mechanisms that confer resistance against infection by viruses, bacteria, fungi and phytophagous pests. The components of these defense mechanisms are either constitutive or induced. Among response-related proteins, chitinases (EC 3.2.1.14) accumulate in a wide variety of plants after viral (Bol et al., 1990), bacterial (Robert et al., 2002), fungal (Krishnaveni et al., 1999; Robert et al., 2002) or insect (Krishnaveni et al., 1999) attack.

Chitin, the substrate of these enzymes, is a linear homopolymer of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranoside (*N*-acetylglucosamine) residues connected by β-1,4 linkages. It is a major component of the cell walls of fungi and some algae, and also occurs in the integuments of arthropods, nematodes and molluscs, and in the peritrophic matrix of insects. Chitinases selectively degrade chitin in the exoskeleton during insect moulting, and in the peritrophic matrix (Krishnaveni et al., 1999; Cohen, 2001). The latter is a non-cellular structure that ensures mechanical protection of epithelial cells and compartmentalizes digestive enzymes in the gut (Lehane & Billingsley, 1996; Lehane et al., 1997). Absent from plants and vertebrates, chitin thus appears to be a selective target for pest control agents.

Chitinolytic enzyme encoding genes from various origins have been introduced in plant genomes for enhancement of crop resistance against phytophagous insects and other pests (Kramer & Muthukrishnan, 1997). Antifungal activities are reported in transgenic plants expressing recombinant bacterial (Carstens et al., 2003; Itho et al., 2003) and fungal chitinases (Terakawa et al., 1997; Lorito et al., 1998; Emani et al., 2003) and a chitinolytic hen egg white lysozyme (Trudel et al., 1995). Overexpression of plant chitinases has also shown antifungal properties (Broglie et al., 1991; Nishizawa et al., 1999; Rohini & Sankara Rao, 2001; Chen & Punja, 2002). In contrast, except for a *Streptomyces albidoflavus* chitinase expressed in tomato (Gongora et al., 2001), bacterial and plant chitinases perform poorly or are inactive against insects such as lepidoptera (Gatehouse et al., 1996, 1997; Kramer & Muthukrishnan, 1997) or aphids (Gatehouse et al., 1996, 1997; Kramer & Muthukrishnan, 1997; Gatehouse & Gatehouse, 1998). More significant insecticidal properties are reported for lepidopteran (Ding et al., 1998) and coleopteran (Wang et al., 1996) pests in transgenic tobacco plants expressing an insect (*Manduca sexta*) chitinase.

Recently, a gut-specific chitinase from the beetle *Phaedon cochleariae* was cloned (Girard & Jouanin, 1999). The cDNA of this chitinase was expressed constitutively in potato plants (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée). The chitinolytic activity of the transgenic lines was determined and selected transformed plant lines were used in feeding experiments with the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae), a pest that causes serious yield losses on potatoes worldwide. In order to evaluate direct chitinase involvement in the physiological effects observed on aphid feedings, a bacterial (*Serratia marcescens*) chitinase was provided as food intake via artificial diet.

So far, all published work pointed out that, owing to its insecticidial properties, insect chitinase could be used as a tool to control insect pests. Here, we document unexpected effects of *P. cochleariae* chitinase on a major pest, *M. persicae*, an insect deprived of peritrophic matrix.

Materials and methods

Vector construction

Cloning was performed according to standard protocols (Sambrook et al., 1989). The fragment containing the *P. cochleariae* chitinase cDNA isolated and characterized by Girard and Jouanin (Girard & Jouanin, 1999) was cloned into the *SmaI* restriction site of pLBR19 (Michael, unpublished). This vector contains the CaMV 35S promoter with a double enhancer sequence and the CaMV 35S terminator. The chimeric gene including the CaMV 35S promoter, the *P. cochleariae chitinase* cDNA, and the CaMV 35S terminator, was cloned as a *Kpn*I/*Xba*I fragment in the pCAMBIA 2301 vector (Cambia, Canberra, Australia) digested with the same enzymes. This binary vector was introduced into the *Agrobacterium* strain C58pMP90

(Koncz & Schell, 1986) by electroporation. It has a kanamycin resistance gene (*nptII*) for selection of the transformed plant cells (Figure 1).

Plant material and transformation

Plants of *S. tuberosum* cv. Désirée were grown axenically under a 16 h light: 8 h dark photoperiod under 100 μE m^{-2} s^{-1} light intensity at 20 ± 1°C on a basal medium according to Murashige and Skoog (1962) supplemented with 20 g l^{-1} sucrose and 8 g l^{-1} Danagel™ (FMC BioPolymer). Micropropagations were performed every fourth week by subculturing nodal explants to new medium (pH adjusted to 5.7 with NaOH). This medium (hereafter referred to as BM) was used to perform transformations according to Beaujean et al. (1998) with slight modifications. Briefly, internode explants were immersed in 19 ml BM without Danagel™ with 1 ml *Agrobacterium tumefasciens* C58 pMP90 inoculum for 45 min. Explants were then dried on sterile filter paper and placed on a regeneration medium (BM with 1 mg.l^{-1} 6-benzylaminopurine, 0.1 mg l^{-1} α-naphtaleneacetic acid and 0.1 mg l^{-1} gibberellic acid 3). After three days of co-cultivation at 22°C, the explants were rinsed in 1 g l^{-1} Claforan® BM without Danagel™ solution, dried on filter paper, and transferred onto regeneration medium supplemented with 125 mg l^{-1} kanamycin and 200 mg l^{-1} Claforan®. Three to four weeks later, the calli were transferred onto a budding medium (BM with 1 mg l^{-1} 6-benzylaminopurine, 0.1 mg l^{-1} gibberellic acid, 3.75 mg l^{-1} kanamycin and 200 mg l^{-1} Claforan®). The first shoots could be isolated after three weeks and then placed on a rooting medium (BM with 0.1 mg l^{-1} 3-indolacetic acid, 10 g l^{-1} sucrose, 75 mg l^{-1} kanamycin and 200 mg l^{-1} Claforan®). After micropropagation the putative transgenic lines and a non-transformed line (control) of the same cultivar obtained by callus regeneration were acclimatized in a greenhouse at 20 ± 1°C and under 16 h light: 8 h dark photoperiod.

Plant characterization

Genomic characterization

The presence of the transgenes in the potato genome of the different lines was determined by polymerase chain reaction (PCR). DNA was extracted from putative transgenic and non-transformed lines according to Dellaporta et al. (1983). The extracts were purified by RNAse treatment, protein extraction in phenol/chloroform/isoamylic alcohol (25:24:1), and then precipitated with isopropanol and sodium acetate (3 M, pH 5) and centrifuged at 12 000 g for 20 min. PCR amplifications were realized using 2 *nptII* primers (forward: 5′-ATC-GGG-AGG-GGC-GAT-ACC-GTA-3′ and reverse: 5′-GAG-GCT-ATT-CGG-CTA-TGA-CTG-3′) and 2 *chitinase* primers (forward: 5′-GAG-GGC-ACC-AAG-AAT-TTC-TC-3′ and reverse: 5′-CAC-TGT-CAT-TGT-GGC-GTT-CG-3′). PCR (20 μl) samples contained 1 × PCR buffer, 4 mM $MgCl_2$, 200 μM of dNTP, 2 U *Taq* polymerase (Eurogentec®), 1 μM of each primer and 1 μg of DNA. For *nptII* gene detection, PCR was performed using the thermocycler program: 3 min preincubation at 94°C followed by 40 cycles of 1 min at 94°C, 1.5 min at 58°C and 2 min at 72°C. For *chitinase* gene detection, PCR was performed using the thermocycler program: 3 min preincubation at 94°C followed by 40 cycles of 1 min at 94°C, 1.5 min at 55°C and 2 min at 72°C. Each PCR was followed by a terminal extension of 10 min at 72°C. After completion of the PCR, the samples were analyzed by gel agarose electrophoresis to verify amplification.

RNA isolation and blot hybridation

Total RNA was isolated from the third and fourth leaves from the apex of the non-transformed and transformed (i.e. CH3, CH5 and

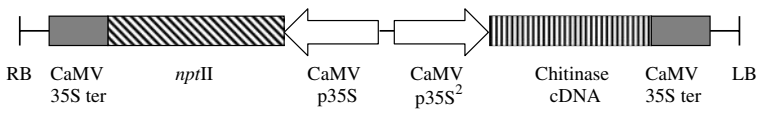


Figure 1. Schematic representation of the T-DNA containing the *P. cochleariae* chitinase expression cassette. RB and LB: right and left borders, respectively. 35S ter and p35S: terminator and promoter of CaMV 35S. $p35S^2$ CaMV 35S promoter with a double enhancer sequence. *npt*II: neomycin phosphotransferase II coding sequence.

CH25) potato lines. Extraction was performed as described in Bachem et al. (1998). RNA was denatured and separated on 1.2% agarose-formaldehyde gel and transferred overnight to a nylon membrane (Nytran SuperCharge, Schleicher & Schuell, BioScience). The membrane was washed with 2 × SSC and cross-linked with UV light. To obtain a DNA probe for the identification of the *P. cochleariae* chitinase gene, we designed a pair of primers (forward: 5′-GCGAGCTCATAGTT TCAGGTAGAAACATAG-3′ and reverse: 3′-GCAAGCTTCTAGGCCAAATGGTTCTTC-5′). These primers were used to amplify an approximatively 1100 bp PCR product which was cloned into a pGEM-T vector. This plasmid was digested by a *Pst* I enzyme. The DNA fragment was labeled with 32P-dCTP (Kit Ready-ToGo DNA Labelling Beads(-dCTP), Amersham Pharmacia Biotech). The membrane was hybridized with the ^{32}P-labeled probe at 65°C overnight in hybridization buffer (7% SDS , 0.5 M Phosphate buffer pH 7.2, 1 mM EDTA). The membrane was washed at 65°C for 15 min with 2 × SSC/0.1% SDS and at 55°C for 15 min with 0.1 × SSC/0.1% SDS, and analyzed with a phosphoimager scanner (STORM840, Molecular Dynamics). The image obtained was then analyzed using the Image Quant^{TM} software (Molecular Dynamics).

Enzymatic activity

The expression of the inserted exogenous chitinase gene was estimated by comparing chitinolytic activities among the 25 different transformed potato lines and wild type. For protein extraction 5 g of fresh material originating from the third and fourth leaves from the apex of the plants were frozen in liquid nitrogen, finely ground and homogenized in 10 ml phosphate buffer (0.1 M NaH_2PO_4, 0.1 M Na_2HPO_4) adjusted to pH 6 using NaOH (Boller et al., 1983). After 15 min of centrifugation at 15,000 g at 4°C, supernatants were recovered and stored at −20°C. Bradford's procedure (1976) was used to determine protein concentration. For each potato line, six different plants were used and two independent protein extractions were carried out.

Because enzymatic activity of chitinases from various origins was evaluated on different substrates (Molano et al., 1977; O'Brien & Colwell, 1987; Trudel et al., 1989; Hood, 1991), a procedure was developed to measure an insect chitinolytic activity expressed in a plant. That procedure showed that chitinase activity was optimal at 37°C at pH 6, which is the pH of potato tissues and aphid gut (Deraison et al., 2004). The Michaelis–Menten constant (K_M) and the maximum velocity (V_M) of the chitinolytic reaction were respectively 179 μM and 0.147 μmol substrate hydrolysed min^{-1} mg^{-1} protein. These kinetic parameters were calculated using Linweaver-Burk. Then 450 μM 4-methylumbellirefyl β-D-glucoside as substrate was added to 15 μg protein extracts into a 96-well microplate. The chitinase activity was spectrofluorometrically recorded at 455 nm by measuring the amount of β-D-methylumbelliferone produced from the conversion of 4-methylumbellirefyl β-D-glucoside. Assays on each extract were independantly performed three times.

Artificial diets

The *S. marcescens* chitinase, amino-acids, vitamins and mineral compounds were purchased from Sigma–Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). A standard diet adapted for *M. persicae* was used as a control and as a basis for the protein dilution. The concentration of the proteins added to the control diet were chosen according to Cherqui et al. (2003) and Couty et al. (2002). The diet was prepared as described by Febvay et al. (1988) and modified by Down et al. (1996). The bacterial chitinase was incorporated to the standard diet to obtain diets C1, C10, C100 and C500, containing respectively 1, 10, 100 and 500 $\mu g\ ml^{-1}$ of chitinase. A diet containing 500 $\mu g\ ml^{-1}$ of heated inactivated chitinase (HC500) was performed in the same conditions except that the sucrose was added after heating the solution at 95°C for 10 min. The diet pouches were prepared under aseptic conditions, and sterilized after dilutions by filtration through 0.45 μm filters (Millipore Corp., Bedford, Massachussett, USA).

Insects and feeding assays

The colony of *M. persicae* (Sulzer) was maintained in a greenhouse on leaves of non-transformed potato plants (*S. tuberosum*) (cv. Désirée) propagated from tubers, under parthenogenesis-

inducing conditions as described previously in the section Plant material and transformation. The aphid clone was established in 1999 from a single apterous female collected on a potato field near Loos-en-Gohelle in Northern France (50°27′27″N, 2°47′30″E). Nymphs younger than 24 h and obtained from a population previously raised synchronously for three days on the control diet were used for experiments.

For *in planta* experiments, seven plants of each transgenic (i.e. CH3, CH5 and CH25) and the non-transformed potato lines were used for insect feeding. Five nymphs were transferred in a microcage (Ø16 × 8 mm) clipped on the abaxial face of the third or fourth leaves from the apex. At least 11 replicates were carried out for each line.

For *in vitro* experiments, ten nymphs were transferred to a new pouch of each diet (control, C1, C10, C100, C500 and HC500) and maintained under the same rearing conditions as described in the section Plant material and transformation. Diet pouches were changed every second day. At least five replicates were carried out for each diet.

Aphids were checked daily to determine post-embryonic survival and pre-reproductive period, adult emergence and reproduction. Offspring produced in each replicate were recorded and removed daily. Recorded values were divided by the number of living adults in the corresponding replicate to evaluate daily fecundity. Adults were checked during a period equal to their pre-reproductive period. This procedure was reported to reliably explain 95% of the final r_m value (DeLoach, 1974). A recent study on *M. persicae* reared on potato plants showed more than 95% identity between the r_m calculated on population allowed to reproduce until death and adults checked only during a period equal to their pre-reproductive period (Le Roux et al., in press).

For each diet and potato line the intrinsic rate of natural increase (r_m) defined by Birch (1948) with the Lotka equation: $\sum e^{-r_m x} l_x m_x = 1$, where l_x is the age-specific survival and m_x the age-specific fecundity, was calculated. The variance of the r_m was evaluated by the Jackknife method (Meyer et al., 1986) with the "Petitr" program (Pierre, unpublished). The finite ratio of increase ($\lambda = e^{-r_m}$) i.e. the number of aphids added to the population per adult and which will produce adults, and the time necessary for the population to double was estimated ($DT = \ln 2 / r_m$).

Statistical analysis

The effect of food intake via chitinase-diets or via transformed potato lines on survival of nymphs was analyzed with the Pearson's χ^2 test. One-way analysis of variance (ANOVA) was carried out with Statistica 5.5 software (StatSoft®, Tulsa, Oklahoma, USA) to test the effect of the food intake on the physiology of the aphids. Before ANOVA, the data was normalized with the arc-sine function according to Rao (1951). Significant effects detected by one-way ANOVA were further tested with the positive least significant difference test (PLSD) of Fisher at $P < 0.05$.

Results

Plant characterization

PCR analysis

Micropropagation of internode explants from the putative transgenic lines performed on selective kanamycin (75 mg l^{-1}) containing medium gave 25 transformed lines showing no phenotypic alteration. Electrophoresis of the PCR products of the 25 transformed lines showed a unique band at approximately 700 bp, demonstrating that the *nptII* T-DNA was present in each of the 25 lines (results not shown). Except for the CH9 transgenic line, a band of approximately 400 bp revealed in each lane of electrophoresed PCR products confirmed the *P. cochleariae* chitinase T-DNA presence in all transformed potato lines. As expected no hydridization was observed between the *nptII* nor the *chitinase* primers and the DNA extracted from the non-transformed line (result not shown).

Enzymatic activity

The total protein content detected was statistically equivalent among all leaves of non-transformed or transgenic lines. Chitinolytic activities expressed in the transgenic potato lines were calculated during the linear part of the curve which occurred from 10 to 25 min after the initiation of the enzymatic reaction (Table 1). As expected a basal endogenous chitinase activity

Table 1. Average (±SD) chitinase activity of leaf extracts from non-transformed (control) and *chitinase* transformed (CH1–CH25) potato plants

Line	Average chitinase activity (pmol min^{-1} mg^{-1})
Non-transformed (control)	1.57 ± 0.30
CH1	0.75 ± 0.15
CH2	1.87 ± 0.33
CH3	2.26 ± 0.33
CH4	1.90 ± 0.39
CH5	5.65 ± 0.64
CH6	1.88 ± 0.40
CH7	1.43 ± 0.25
CH8	1.85 ± 0.32
CH9	1.22 ± 0.13
CH10	1.67 ± 0.29
CH11	1.67 ± 0.23
CH12	1.51 ± 0.27
CH13	1.60 ± 0.28
CH14	1.98 ± 0.35
CH15	1.53 ± 0.27
CH16	2.05 ± 0.36
CH17	1.66 ± 0.29
CH18	1.32 ± 0.23
CH19	1.90 ± 0.34
CH20	1.76 ± 0.31
CH21	1.54 ± 0.27
CH22	1.58 ± 0.28
CH23	1.42 ± 0.25
CH24	1.28 ± 0.22
CH25	3.83 ± 0.57

was detected in the non-transformed potato plant (1.57 ± 0.30 pmol min^{-1} mg^{-1}). The CH3 (2.26 ± 0.33 pmol min^{-1} mg^{-1}), CH5 (5.65 ± 0.65 pmol min^{-1} mg^{-1}) and CH25 (3.83 ± 0.57 pmol min^{-1} mg^{-1}) transformed potato lines expressing the highest chitinase activities were selected for insect bioassays.

Northern analysis

The *P. cochleariae* chitinase probe hybridized with mRNA of the selected three transgenic potato lines (CH3, CH5, CH25) (Figure 2). No hybridization was observed in the extract of the non-transformed potato line. This result confirmed that the increase of chitinase activity measured in the three selected transgenic lines was due to the expression of the *P. cochleariae* chitinase.

Insect bioassays

In planta

Survival of *M. persicae* during its post-embryonic development (Figure 3) showed no significant difference among the chitinase-transformed lines (CH3, CH5 and CH25) compared to insects fed with the non-transformed potato lines ($\chi^2 = 3.17$; $\chi^2 = 0.89$ and $\chi^2 = 17.91$ with df = 12, respectively).

The mean duration of the pre-reproductive period (i.e. the period of time from birth until onset of reproduction) was significantly reduced for aphids reared on transgenic lines compared

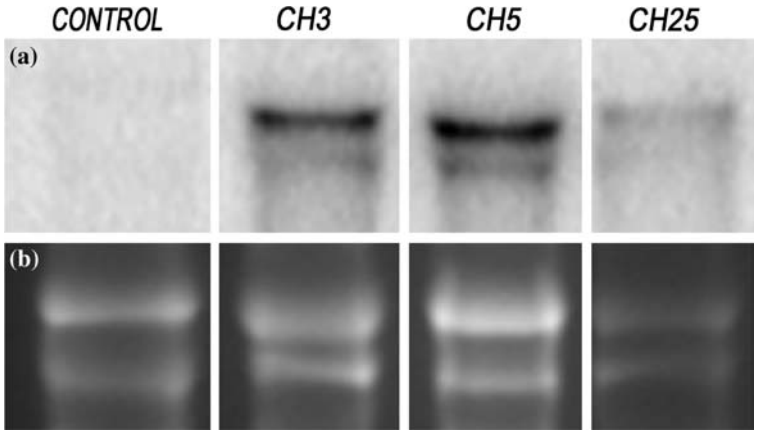


Figure 2. Expression of *P. cochleariae* chitinase in transformed potato lines. Total RNA of non-transformed (control) and *chitinase*-transformed (CH3, CH5 and CH25) potato lines was separated on 1.2% agarose-formaldehyde gel before transfered to a nylon membrane. The membrane was hybridized with a ^{32}P-labeled *P. cochleariae* chitinase probe (a). Ribosomic RNAs were observed under UV light for equal loading control (b).

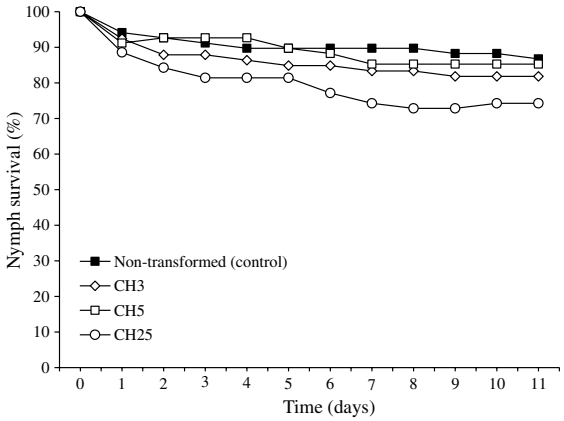


Figure 3. Survival (expressed in %) of *Myzus persicae* nymphs reared on non-transformed (control) or on *chitinase*-transformed (CH3, CH5 and CH25) potato plants.

to nymphs fed on non-transformed lines (Table 2). The number of offspring per female per day (i.e. daily fecundity) monitored on insects reared on the transgenic potato lines showed a significant ($P < 0.00$) increase. As a consequence of a shortened pre-reproductive period and an enhanced daily fecundity, the intrinsic rate of natural increase (r_m) and the finite rate of increase (λ) of the populations were significantly higher for aphids fed on transformed potato leaves of the CH3, CH5 and CH25 lines. Directly linked to the above parameters, the doubling time of the population was reduced for the aphids fed on transgenic lines.

In vitro

Compared to the insects fed on the control diet the nymphal viability of *M. persicae* was significantly enhanced when the aphids were reared on chitinase concentrations C1 ($\chi^2 = 35.0$), C10 ($\chi^2 = 24.7$), C100 ($\chi^2 = 51.1$) and C500 ($\chi^2 = 264.4$) diets (df = 14) (Figure 4). It is noteworthy that aphids fed with the 500 μg ml^{-1} chitinase diet showed no nymphal mortality. In contrast, no statistically significant difference in survival could be detected between the nymphs reared on the HC500 diet ($\chi^2 = 5.5$; df = 14) and those fed on the control diet. Survival of aphids fed with HC500 food intake was significantly lower when compared to insects fed on C100 and C500 diets ($\chi^2 = 24.8$; $\chi^2 = 201.1$; df = 14, respectively).

Except for aphids fed with the C10 diet, which exhibited a significantly extended pre-reproductive period (Table 3), this parameter was not altered when compared with that on the control diet. In contrast, daily fecundity was increased for the females fed on C1, C100, C500 and HC500 diets, while 10 μg ml^{-1} chitinase used as food intake did not change this parameter.

The intrinsic rate of natural increase (r_m), and therefore the finite ratio of increase (λ) and the doubling time were significantly higher for *M. persicae* reared on active or inactive chitinase diets at all enzyme doses tested. It should be mentioned that these r_m values were overestimates, as only the individuals surviving until the adult stage were used for their calculation.

Discussion

Our work reports the impact of an insect chitinase ingested by an aphid pest. Both the insect chitinase expressed in transformed lines and the

Table 2. Average (±SD) demographic parameters of *M. persicae* reared on non-transformed (control) or *chitinase* transformed potato lines (CH3, CH5 and CH25)

Demographic parameters	Non-transformed Control $n = 56$	Chitinase transformed lines			F	P
		CH3 ($n = 53$)	CH5 ($n = 57$)	CH25 ($n = 52$)		
Pre-reproductive period (days)	10.3 ± 0.6^{a}	7.6 ± 1.1^{bc}	7.3 ± 1.3^{b}	7.8 ± 1.2^{c}	88.8	<0.00
Daily fecundity (nymphs per female per day)	1.1 ± 0.2^{a}	2.3 ± 0.7^{b}	2.3 ± 0.7^{b}	2.4 ± 0.7^{b}	56.5	<0.00
r_m (females per female per day)	0.15 ± 0.02^{a}	0.23 ± 0.04^{b}	0.24 ± 0.06^{b}	0.23 ± 0.04^{b}	55.0	<0.00
λ (female per female per day)	1.16 ± 0.02^{a}	1.26 ± 0.05^{b}	1.28 ± 0.09^{b}	1.26 ± 0.05^{b}	43.3	<0.00
Doubling time (days)	4.6 ± 0.6^{a}	3.1 ± 0.4^{b}	3.0 ± 0.5^{b}	3.1 ± 0.5^{b}	143.4	<0.00

n: number of aphids tested; *F*: Fisher's test value of one–way ANOVA analysis; *P*: *P* value of the Fisher's test. Values in the same row followed by the same letter indicate no significant difference according to the PLSD test of Fisher ($P < 0.05$).

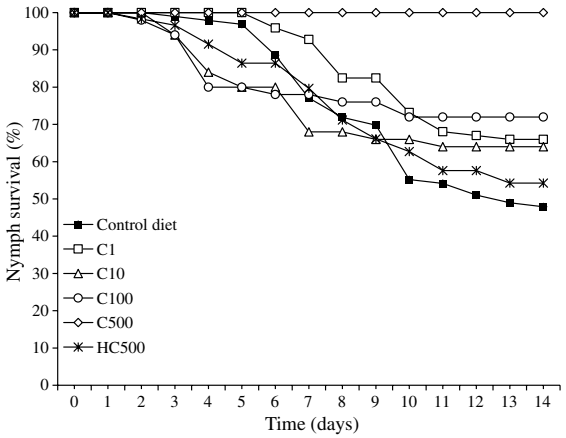


Figure 4. Survival (expressed in %) of *Myzus persicae* nymphs reared on control diet or on diets containing 1, 10, 100 or 500 μg ml^{-1} chitinase (C1, C10, C100 and C500, respectively) or 500 μg ml^{-1} heated inactivated chitinase (HC500).

bacterial chitinase of *S. marcescens* induced unexpected effects on the non-target aphid *M. persicae*. Three clones (CH3, CH5 and CH25) exhibiting high chitinase activity were selected following determination of the chitinolytic activity of the transgenic potato lines expressing constitutively the chitinase. When reared on leaves of these transgenic lines, significant disturbances of *M. persicae* biological parameters were found, i.e. a reduction of pre-reproductive period and an enhancement of fertility. Thus, our results clearly demonstrate that under these conditions, *M. persicae* population's would expand. They also show that a bacterial (*S. marcescens*) chitinase provided via an artificial diet affected the physiology of the peach-potato aphid. Aphids fed with chitinase-supplemented diets exhibited reduced nymphal mortality and enhanced natural intrinsic rate of population increase (r_m). Nymphal mortality of aphids reared on diet containing 500 μg ml^{-1} inactive chitinase averaged 46%, which was statistically identical to that of nymphs fed with the control diet (52%). In contrast, survival rate was closely related with the chitinase dose in the synthetic diets, and reached 100% when insects were reared on a 500 μg ml^{-1} chitinase containing diet. Although no difference could be detected between the respective r_m values of aphids reared with inactive or active chitinase at any dose, chitinase ingestion was highly probiotic for *M. persicae*. Moreover, comparing nymphal survival between aphids fed with 500 μg ml^{-1} inactive or active chitinase clearly showed that the enzyme activity itself is responsible for the reported probiotic effects for aphids feeding on chitinase-expressing potato lines.

To date, significant insecticidal properties of some plants expressing insect chitinase have been reported. Transgenic tobacco plants expressing the cDNA encoding the tobacco hornworm (*M. sexta*) chitinase cause larval mortality of the merchant grain beetle (*Oryzaephilis mercator*) (Wang et al., 1996). These transformed tobacco plants also exhibit reduced plant damage and growth of budworm larvae (*Heliothis virescens*) (Ding et al., 1998). These insect species possess a peritrophic matrix isolating the mesenteric epithelium from raw food. On the contrary, *M. persicae*, as all homopterans, is deprived of a such structure

Table 3. Average (±SD) demographic parameters of *M. persicae* reared on control diet or on diets containing 1, 10, 100 or 500 μg ml^{-1} chitinase (C1, C10, C100 and C500, respectively) or 500 μg ml^{-1} heated inactivated chitinase (HC500)

Demographic parameters	Control diet (n = 46)	C1 (n = 64)	C10 (n = 42)	C100 (n = 36)	C500 (n = 42)	HC500 (n = 58)	F	P
Pre-reproductive period (days)	11.2 ± 0.9^{ab}	11.0 ± 0.9^{a}	11.9 ± 1.2^{c}	11.2 ± 1.2^{ad}	11.5 ± 1.4^{bd}	11.0 ± 1.0^{a}	4.5	<0.00
Daily fecundity (nymphs per female per day)	1.0 ± 0.3^{a}	1.1 ± 0.3^{b}	1.0 ± 0.2^{a}	1.1 ± 0.2^{b}	1.1 ± 0.1^{b}	1.1 ± 0.2^{b}	4.5	<0.00
r_m (females per female per day)	0.14 ± 0.03^{a}	0.16 ± 0.02^{b}	0.15 ± 0.02^{a}	0.17 ± 0.02^{b}	0.16 ± 0.02^{b}	0.16 ± 0.02^{b}	8.3	<0.00
λ (female per female per day)	1.15 ± 0.04^{a}	1.18 ± 0.03^{b}	1.16 ± 0.02^{a}	1.18 ± 0.02^{b}	1.17 ± 0.02^{b}	1.17 ± 0.03^{b}	8.1	<0.00
Doubling time (days)	5.2 ± 1.4^{a}	4.4 ± 0.7^{b}	4.8 ± 0.6^{c}	4.2 ± 0.5^{b}	4.4 ± 0.4^{b}	4.4 ± 0.4^{b}	11.6	<0.00

n: number of aphids tested; F: Fisher's test value of one–way ANOVA analysis; P: P value of the Fisher's test. Values in the same row followed by the same letter indicate no significant difference according to the PLSD test of Fisher ($P < 0.05$).

and could therefore be considered as a non-target insect in the context of a chitinase-based strategy. However, previous work described the toxic effects of bacterial chitinase intakes on aphids. When provided to *M. persicae* at the concentration of 100 μg ml^{-1} in an artificial diet, a *Streptomyces griseus* chitinase induced significant growth inhibition and mortality (Rahbé & Febvay, 1993). An intake of 600 μg ml^{-1} *S. albidoflavus* chitinase was reported to dramatically enhance mortality of feeding adult *M. persicae* (Broadway et al., 1998).

A small insecticidal effect of a pea chitinase co-expressed with the *Galanthus nivalis* agglutinin (*gna*) in transgenic potato plants has been reported against *M. persicae* (Gatehouse et al., 1996). It is noteworthy that this agglutinin was reported to be highly toxic to *M. persicae* (Hilder et al., 1995; Sauvion et al., 1996) and other homopterans (Down et al., 1996; Nagadhara et al., 2003) when delivered both via transgenic plants and synthetic diets. In this case of *gna-chitinase* co-expression in a transgenic plant, the interaction between the two enzymes induced only slight insecticidial effects while chitinase is mainly reported to potentiate the toxicity of various compounds. *S. marcescens* chitinase combined with *Bt* δ-endotoxin exhibit significant toxic effects when provided to lepidopteran pests both *in vitro* (Regev et al., 1996; Sampson & Gooday, 1998) and via transgenic plants (Downing et al., 2000). Synergistic insecticidal effects against lepidopterans also occurred when a *Bt* endotoxin was applied on the foliage of a chitinase-expressing transgenic tobacco plant (Ding et al., 1998). Co-expressing chitinase and other response-related proteins in plants led also to enhanced antifungal activity (Jach et al., 1995; Kim et al., 2003).

As our results showed that chitinase may favor *M. persicae* population growth, it could be hypothesized that such probiotic effects of pea chitinase on the peach-potato aphid could be the cause of reduced toxicity observed in the *gna-chitinase* transformed potato plants.

Comparing the influence on *M. persicae* physiology of the different modes of chitinase intake showed that breeding aphids on transgenic potato plants leads to a 30% reduction of the population doubling time while feeding on synthetic diet significantly reduced nymphal mortality. Arabinogalactan proteins (AGP) are extracellular proteoglycans involved in plant growth and development and are found in leaves, stems, roots, floral parts and seeds (Fincher et al., 1983; Showalter, 2001). Some AGP contain *N*-acetyl-glucosamine (GlcNAc) units and are therefore potential substrates for chitinase. Although no AGP containing GlcNAc residues have been reported in foliar tissues, oligosaccharides released by such hydrolysis could be an additional source of dietary carbohydrates constituting the main energy source for aphids in the sap. Thus, the probiotic effects of the recombinant plant-expressed chitinase could be the consequence of both direct effects of the enzyme on the insect physiology and indirect effects via the plant metabolism.

The exact mode of action of insect and bacterial chitinases on *M. persicae* populations remains unknown. However, our work highlights unexpected effects of this enzyme and underlines the need to further study the potential risks in using a chitinase strategy in the context of potato protection. This implies that a chitinase-based strategy to manage potato pests and particularly the Colorado potato beetle, would fail because it could favor the abundance of aphids. Investigations are carried out to evaluate the effects of this enzyme on another non-target pest, the potato aphid *Macrosiphum euphorbiae*, responsible for severe yield losses in potato fields.

Acknowledgements

We would like to thank the "French Service Régional de la Protection des Végétaux du Nord Pas-de-Calais" for providing aphids and the "Comité Nord Plants de Pommes de Terre" for providing potato tubers. This work was supported by the Ministère Français de la Recherche, the Conseil Régional de Picardie and the Fonds Social Européen.

References

Bachem CWB, Oomen RJFJ and Visier RGF (1998) Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. *Plant Mol Biol Rep* **16**: 157–173.

Beaujean A, Sangwan RS, Lecardonnel A and Sangwann-Norreel BS (1998) *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. *J Exp Bot* **49**: 1589–1595.

Birch LC (1948) The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *J Anim Ecol* **17**: 15–26.

Bol JF, Linthorst HJ and Cornelissen BJ (1990) Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu Rev Phytopathol* **28**: 113–138.

Boller T, Gehri A, Mauch F and Vögeli U (1983) Chitinases in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta* **157**: 22–31.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.

Broadway RM, Gongora C, Kain WC, Sanderson JP, Monroy JA, Bennett KC, Warner JB and Hoffmann MP (1998) Novel chitinolytic enzymes with biological activity against herbivorous insects. *J Chem Ecol* **24**: 985–998.

Broglie K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ and Broglie R (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* **254**: 1194–1197.

Carstens M, Vivier MA and Pretorius IS (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the *CTS1*-2 gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. *Transgenic Res* **12**: 497–508.

Chen WP and Punja ZK (2002) *Agrobacterium*-mediated transformation of American ginseng with a rice chitinase gene. *Plant Cell Rep* **20**: 1039–1045.

Cherqui A, Alla S, Saguez J, Doury G, Sangwan-Norreel B and Giordanengo P (2003) Probiotic effects of beta-glucuronidase on the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Aphididae). *J Insect Physiol* **49**: 1199–1209.

Cohen E (2001) Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag Sci* **57**: 946–950.

Couty A, Jouanin L and Pham-Delègue MH (2002) Impact de protéines végétales exprimées dans des plantes transgéniques, sur des insectes pollinisateurs auxiliaires In: Regnault-Roger C, Philogène BJR and Vincent C (eds), Biopesticides d'origine végétale Vol. 243–264) Lavoisier, Paris.

Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol Biol Rep* **1**: 19–21.

DeLoach CJ (1974) Rate of increase of populations of cabbage, green peach and turnip aphids at constant temperatures. *Ann Entomol Soc Am* **67**: 332–339.

Ding X, Gopalakrishnan B, Johnson LB, White FF, Wang X, Morgan TD, Kramer KJ and Muthukrishnan S (1998) Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. *Transgenic Res* **7**: 77–84.

Down RE, Gatehouse AMR, Hamilton WDO and Gatehouse JA (1996) Snowdrop lectin inhibits development and decreases fecundity of the glasshouse potato aphid (*Aulacorthum solani*) when administered in vitro and via transgenic plants both in laboratory and glasshouse trials. *J Insect Physiol* **42**: 1035–1045.

Downing KJ, Leslie G and Thomson JA (2000) Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac7* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2804–2810.

Emani C, Garcia J, Lopata-Finch E, Pozo MJ, Uribe P, Kim D-J, Sunilkumar G, Cook DR, Kenerley CM and Rathore KS (2003) Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Curr Top Microbiol* **1**: 321–336.

Febvay G, Delobel B and Rahbé Y (1988) Influence of amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrthosiphon pisum* (Homoptera, Aphididae). *Can J Zoolog* **66**: 2449–2453.

Fincher GB, Stone BA and Clarke AE (1983) Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. *Ann Rev Plant Physio* **34**: 47–70.

Gatehouse AMR and Gatehouse JA (1998) Identifying proteins with insecticidal activity: Use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pestic Sci* **52**: 165–175.

Gatehouse AMR, Davison GM, Newell CA, Merryweather A, Hamilton WDO, Burgess EPJ, Gilbert RJC and Gatehouse JA (1997) Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: growth room trials. *Mol Breeding* **3**: 49–63.

Gatehouse AMR, Down RE, Powell KS, Sauvion N, Rahbé Y, Newell CA, Merryweather A, Hamilton WDO and Gatehouse JA (1996) Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol Exp Appl* **79**: 295–307.

Girard C and Jouanin L (1999) Molecular cloning of a gut-specific chitinase cDNA from the beetle *Phaedon cochleariae*. *Insect Biochem Mol* **29**: 549–56.

Gongora CE, Wang S, Barbehenn RV and Broadway RM (2001) Chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus* expressed in tomato plants: effects on *Trichoplusia ni*. *Entomol Exp Appl* **99**: 193–204.

Hilder VA, Powell KS, Gatehouse AMR, Gatehouse JA, Shi Y, Hamilton WDO, Merryweather A, Newell CA, Timans JC, Peumans WJ, van Damme EJM and Boulter D (1995) Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Res* **4**: 18–25.

Hood MA (1991) Comparison of four methods for measuring chitinase activity and the application of the 4-MUG assay in aquatic environments. *J Microbiol Meth* **13**: 151–160.

Itho Y, Takahashi S, Takizawa H, Nikaidou N, Tanaka H, Nishihashi H, Watanabe T and Nishizawa Y (2003) Family 19 chitinase of *Streptomyces griseus* HUT6037 increases plant resistance to the fungal disease. *Biosci Biotech Bioch* **67**: 847–855.

Jach G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J and Maas C (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J* **8**: 97–109.

Kim JK, Jang IC, Wu R, Zuo WN, Boston RS, Lee YH, Ahn IP and Nahm BH (2003) Co-expression of a modified maize ribosome-inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight. *Transgenic Res* **12**: 475–484.

Koncz C and Schell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Genet Genomics* **204**: 383–396.

Kramer KJ and Muthukrishnan S (1997) Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem Molec* **27**: 887–900.

Krishnaveni S, Mutukrishnan S, Liang GH, Wilde G and Manickam A (1999) Induction of chitinases and β-1,3-glucanases in resistant and susceptible cultivars of sorghum in response to insect attack, fungal infection and wounding. *Plant Sci* **144**: 9–16.

Lehane MJ and Billingsley PA (1996) The Biology of the Insect Midgut. Chapman and Hall, London.

Lehane MJ, Wu D and Lehane SM (1997) Peritrophic matrix structure and function. *Ann Rev Entomol* **42**: 525–550.

Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Collucci G, Harman GE, Pintor-Toros JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun S and Scala F (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7860–7865.

Meyer JS, Ingersoll CG, McDonald LL and Boyce MS (1986) Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs Bootstrap techniques. *Ecology* **67**: 1156–1166.

Molano J, Duran A and Cabib E (1977) A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Anal Biochem* **83**: 648–656.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum* **15**: 473–479.

Nagadhara D, Ramesh S, Pasalu IC, Rao YK, Krishnaiah NV, Sarma NP, Bown DP, Gatehouse JA, Reddy VD and Rao KV (2003) Transgenic indica rice resistant to sap-sucking insects. *Plant Biotechnol J* **1**: 231–240.

Nishizawa Y, Nishio Z, Nakazono K, Soma M, Nakajima E, Ugaki M and Hibi T (1999) Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theor Appl Genet* **99**: 383–390.

O'Brien R and Colwell RR (1987) A rapid test for chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide. *Appl Environ Microbiol* **7**: 1718–1720.

Rahbé Y and Febvay G (1993) Protein toxicity to aphids: an *in vitro* test on *Acyrthosiphon pisum*. *Entomol Exp Appl* **67**: 149–60.

Rao CR (1951) Advanced Statistical Methods in Biometrical Research. Wiley Inc., New York.

Regev A, Keller M, Strizhov N, Sneh B, Prudovsky E, Chet I, Ginzberg I, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Schell J and Zilberstein A (1996) Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3581–3586.

Robert N, Roche K, Lebeau Y, Breda C, Boulay M, Esnault R and Buffard D (2002) Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Sci* **162**: 389–400.

Rohini VK and Sankara Rao K (2001) Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. *Plant Sci* **160**: 889–898.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sampson M and Gooday G (1998) Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology* **144**: 2189–2194.

Sauvion N, Rahbé Y, Peumans WJ, van Damme EJM, Gatehouse JA and Gatehouse AMR (1996) Effects of GNA and other mannose bindings lectins on development and fecundity of the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol Exp Appl* **79**: 285–293.

Showalter AM (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci* **58**: 1399–1417.

Terakawa T, Takaya N, Horiuchi H, Koike M and Takagi M (1997) A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* **16**: 439–443.

Trudel J, Audy P and Asselin A (1989) Electrophoresis forms of chitinase activity in xanthine tobacco, healthy and infected with TMV. *Mol Plant Microbe In* **2**: 315–324.

Trudel J, Potvin C and Asselin A (1995) Secreted hen lysozyme in transgenic tobacco: recovery of bound enzyme and in vitro growth inhibition of plant pathogens. *Plant Sci* **106**: 55–62.

Wang X, Ding X, Gopalakrishnan B, Morgan TD, Johnson LB, White FF, Muthukrishnan S and Kramer KJ (1996) Characterization of a 46 kDa insect chitinase from transgenic tobacco. *Insect Biochem Mol* **26**: 1055–1064.

Discussion

Bien que le mode d'action des chitinases testées sur *M. persicae* demeure inconnu, nos travaux soulignent pour la première fois des effets inattendus et montrent la nécessité de développer des travaux complémentaires afin de définir les risques potentiels de l'utilisation des chitinases dans la protection de la culture de la pomme de terre. Bien que l'utilisation de chitinases en tant qu'agent bioinsecticide ait été envisagée (Kramer et Muthukrishnan, 1997), nous avons montré ici la limite d'une stratégie « chitinase » dans des programmes de lutte contre les insectes ravageurs des cultures.

Puisque les pucerons ne possèdent pas de membrane péritrophique, une cible digestive peut être exclue dans cette stratégie et nous avons donc émis l'hypothèse que les chitinases ingérées pourraient traverser la barrière digestive pour interagir avec divers métabolismes. En effet, bien qu'il existe des activités protéasiques dans le tube digestif des pucerons, celles-ci sont faibles (Cristofoletti et al., 2003; Rahbé et al., 2003a; Deraison et al., 2004). Les protéines ingérées seraient très peu hydrolysées et diverses observations montrent que les protéines sont capables de traverser l'épithélium digestif (Allingham et al., 1992; Azzouz et al., 2005a; Azzouz et al., 2005b). Ainsi, Rahbé et al. (2003b) décrivent le passage d'inhibiteurs de protéases dans l'hémolymphe des pucerons. De même, Cherqui et al. (2003) ont également détecté la présence de β-glucuronidase dans différents tissus après des tests de prises alimentaires avec cette protéine.

Dans ce cas, les différences d'effets observées entre les chitinases délivrées *in planta* ou *in vitro* pourraient être dues à des effets directs ou indirects. La chitinase recombinante exprimée par les pommes de terre et la chitinase bactérienne constituent un apport d'enzymes chitinolytiques. L'utilisation de ces chitinases par les pucerons permettrait un gain d'énergie qui pourrait être ainsi dévolue à la synthèse de ses propres chitinases et réorientée vers d'autres métabolismes. Les différents effets observés entre les tests *in planta* et *in vitro* pourraient être dus à la nature même des chitinases. En effet, bien qu'appartenant toutes deux à la famille 18, les chitinases d'insectes et les chitinases bactériennes ne possèdent pas les mêmes sites catalytiques ni les mêmes conformations (Spindler et Spindler-Barth, 1999), ce qui peut influencer les interactions avec leur substrat naturel, la chitine.

Les aphides étant phloémophages, l'ingestion de sève élaborée riche en carbohydrates (notamment en saccharose) induit des variations de pressions osmotiques importantes entre l'hémolymphe et le tube digestif des pucerons. Afin de réduire ces différences de pressions osmotiques, les aphides convertissent le saccharose en glucose et fructose et produisent des

oligosaccharides composés de résidus glucoses (Karley et al., 2005). Nous avons observé que l'infestation par les pucerons induit une augmentation très importante de l'activité chitinolytique dans les plantes transformées ou non (données non montrées). Or, les chitinases végétales possèdent des substrats végétaux dont la dégradation libère des oligosaccharides. On peut donc émettre l'hypothèse que l'induction de chitinases végétales par les pucerons permet la libération d'oligosaccharides et facilite la régulation de la pression osmotique dans leur tube digestif.

Au delà de la non pertinence d'une stratégie « chitinase » contre les pucerons, nos résultats soulignent également la nécessité d'effectuer des tests préliminaires sur ces plantes, puisque les risques encourus si l'on devait les utiliser en champs, seraient de voir se multiplier les populations de pucerons indésirables. Cela montre aussi les limites de l'utilisation de l'emploi de plantes transgéniques en tant qu'alternatives aux pesticides. Si la transgenèse offre la possibilité d'accroître la résistance des plantes, elle ne reste, dans la majorité des cas, qu'un outil d'études pour tester et comprendre les effets des toxines sur les ravageurs. En effet, malgré le très grand nombre de travaux développés par transformation de plantes avec des gènes de défenses, leurs effets insecticides et plusieurs essais aux champs, très peu de ces plantes ont trouvé des applications à grande échelle. On peut toutefois citer l'exemple de plantes *Bt* (coton, maïs, pomme de terre) résistantes aux lépidoptères commercialisées et cultivées aux Etats Unis (Estruch et al., 1997).

Outre certaines réglementations sanitaires et/ou pressions politiques et socio-économiques, de nombreuses causes peuvent être avancées pour expliquer le faible nombre de plantes transgéniques disponibles sur le marché. L'une d'elles est sans doute liée à la technique elle-même. Si la technique permet d'introduire des gènes d'intérêt pour en étudier leurs effets, de nombreuses inquiétudes reposent entre autres sur les risques de transferts de gènes et l'utilisation de gènes conférant une résistance à certains antibiotiques pour la sélection des plants transformés. Nous possédons également très peu de recul pour évaluer les effets à moyen et long termes à la fois sur les écosystèmes mais aussi sur la santé humaine. L'utilisation de plantes transgéniques nécessite également que l'on détermine la toxicité des composés utilisés, sur des organismes non-cibles tels que les insectes auxiliaires, les animaux et l'homme. Un autre inconvénient des plantes transgéniques réside dans le fait que bien qu'il soit possible de cibler le lieu de synthèse des transgènes via l'utilisation de promoteurs spécifiques, il est jusqu'alors impossible de maîtriser le nombre d'insertions des transgènes, leur localisation et leur niveau d'expression dans les plantes. Ces insertions aléatoires

incontrôlées dans le génome des plantes peuvent activer ou réprimer certains gènes et métabolismes, induisant ainsi des effets pléiotropiques. De plus, il ne faut pas sous-estimer leurs effets sur les insectes auxiliaires qui peuvent ingérer ou être en contact avec les toxines recombinantes (Schuler et al., 1999).

Les chitinases sont des enzymes clés dans le développement des insectes et elles sont souvent considérées comme de bons candidats pour l'élaboration de nouveaux bio-insecticides. Or, l'apport de chitinases induisant des effets probiotiques chez les aphides, une stratégie de lutte basée sur l'utilisation de chitinases semble donc inappropriée dans la mise au point de nouveaux programmes de lutte contre les insectes. Si la dérégulation des chitinases par amplification est remise ici en cause, ces enzymes représentent toutefois une cible d'intérêt dont la dérégulation doit être reconsidérée en privilégiant une approche anti-chitinase.

Chapitre 2

Stratégie « anti-chitinase » contre les aphides

Première partie

Pertinence de la stratégie « anti-chitinases »
Effet d'inhibiteurs de chitinases connus

Introduction

Si une stratégie chitinase doit être envisagée avec précaution afin de limiter le risque de pullulations de pucerons et la propagation des virus, l'inhibition de la dégradation de la chitine peut être perturbée par l'inhibition des chitinases. Pourtant, jusqu'à la fin des années 1980, aucune molécule responsable de l'inhibition de ces enzymes n'avait été décrite. Suite à la découverte de l'allosamidine (Sakuda et al., 1987), les recherches de composés au pouvoir inhibiteur ont été incessantes. De nombreux bio-insecticides dont les dipeptides (Houston et al., 2002a; Houston et al., 2004), les pentapeptides cycliques (Arai et al., 2000a; Arai et al., 2000b) et la psammapline A (Tabudravu et al., 2002), ont été isolés à partir de bactéries, de champignons et d'éponges et présentent des effets inhibiteurs contre des chitinases de différents organismes, y compris certaines chitinases d'insectes.

Puisque les chitinases présentent des effets probiotiques chez les pucerons (Saguez et al., 2005), une stratégie antagoniste basée sur l'inhibition des activités chitinases semble donc être une méthode intéressante contre les pucerons. Bien que connus pour présenter des propriétés antibactériennes, antifongiques mais aussi et surtout insecticides, les inhibiteurs de chitinases n'avaient jamais été testés contre les homoptères, pourtant considérés comme d'importants ravageurs. Nos travaux ont donc porté sur l'étude de quatre inhibiteurs de chitinases : le cyclo-(histidine-proline), le cyclo-(tyrosine-proline) l'allosamidine et la psammapline A, sélectionnés en raison de leurs différentes structures et de leur disponibilité. Ces inhibiteurs, délivrés à des concentrations variant de 0 à 100 $\mu g.mL^{-1}$ aux pucerons via un milieu alimentaire artificiel, montrent des effets délétères variables.

Outre une mortalité larvaire qui peut atteindre 100% de l'effectif dans certains cas, la plupart des inhibiteurs de chitinases induisent également une altération de divers paramètres physiologiques des aphides. Les effets marqués observés sur ces homoptères mettent en évidence, pour la première fois, la pertinence d'une stratégie basée sur l'inhibition des activités chitinases. Ces résultats offrent de nouvelles perspectives dans un contexte de développement de méthodes alternatives de lutte contre les ravageurs et ont fait l'objet d'une publication scientifique.

Article 2: **Differential aphicidal effects of chitinase inhibitors on the polyphagous homoptera *Myzus persicae* (Sulzer) reared on artificial diet J. Saguez**, F. Dubois, C. Vincent, J-C. Laberche, B. S Sangwan-Norreel, P. Giordanengo. *Pest Management Science* **62 (12):** 1150-1154 (2006).

sci
where science meets business
www.soci.org

Differential aphicidal effects of chitinase inhibitors on the polyphagous homopteran *Myzus persicae* (Sulzer)

Julien Saguez,[1,2,3]* Françoise Dubois,[1] Charles Vincent,[3] Jean-Claude Laberche,[2] Brigitte S Sangwan-Norreel[2] and Philippe Giordanengo[1]

[1]*Biologie des Entomophages (UPRES EA 3900 Biologie des Plantes et Contrôle des Insectes Ravageurs), Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex, France*
[2]*Androgenèse et Biotechnologie (UPRES EA 3900 Biologie des Plantes et Contrôle des Insectes Ravageurs), Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex, France*
[3]*Centre de Recherche et de Développement en Horticulture, Agriculture et Agro-alimentaire Canada, 430, Boul. Gouin, Saint-Jean-sur-Richelieu, Québec J3B 3E6, Canada*

Abstract: Four chitinase inhibitors, cyclo-(Proline-Tyrosine), cyclo-(Histidine-Proline), allosamidin and psammaplin A, were selected for *in vitro* feeding experiments with the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), under controlled photoperiod and temperature conditions. Artificial diets were used to provide chitinase inhibitors at 10, 50 and 100 μg mL^{-1} to *M. persicae*. Except for cyclo-(Proline-Tyrosine), which did not modify aphid demographic parameters, chitinase inhibitors induced differential aphicidal effects on *M. persicae*. At all doses, cyclo-(Histidine-Proline) induced significant effects affecting daily fecundity, intrinsic rate of natural increase (r_m) and doubling time of population. When compared with the control diet, allosamidin decreased nymph survival and daily fecundity, increasing the doubling time of population from 1 to 1.5 days. Psammaplin A was the most toxic inhibitor when delivered *via* artificial diet, as it induced the death of all aphids reared at 50 and 100 μg mL^{-1}. The results demonstrate the potential use of chitinase inhibitors as aphid management tools.
© 2006 Society of Chemical Industry

Keywords: allosamidin; artificial diet; cyclic dipeptide; insect; psammaplin A; *Myzus persicae*

1 INTRODUCTION

Chitin is a β-1,4 linked homopolymer of *N*-acetyl-glucosamine residues that occurs in the cell wall of fungi and in various structural components of arthropods, such as the exoskeleton and peritrophic membrane of insects. Because chitin does not occur in plants and vertebrates, interference with its metabolism could be considered as a suitable target for new insecticides with low vertebrate toxicity.[1] Chitin degradation has been considered as a possible strategy for pest management by either enhancement or inhibition of the hydrolytic enzymes involved. Chitinases (EC 3.2.1.14) are key enzymes in the turnover of chitinous structures and are widely distributed among plants, microorganisms, invertebrates and insects. With the aim of producing insect-resistant plants, chitinase genes from various origins (bacteria, fungi, plants and insects) have been introduced in plant genomes. Only two studies concerning lepidopteran chitinases, from *Manduca sexta* Joh[2] and *Lacanobia oleracea* L.,[3] have reported insecticidal effects when expressed in transgenic plants. However, the present authors recently demonstrated probiotic effects with a chrysomelid (*Phaedon cochleariae* F.) and a bacterial (*Serratia marcescens* Bizio) chitinase on the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae).[4] As chitinases exert undesirable effects on this insect pest, a chitinase-based strategy would fail in agroecosystems where aphids cause serious threats to crops. Thus, chitinase inhibition is a strategy that is of increasing interest.

Several chitinase inhibitors isolated from various origins have been reported in the last 20 years. Insect, fungal and some bacterial chitinases included in chitinase family 18 act through different mechanisms and have been shown to exert different types of interaction with chitinase inhibitors that have competitive or non-competitive inhibitory activities. A pseudotrisaccharide named allosamidin is known competitively to inhibit chitinases[5,6] and to enhance chitin biosynthesis[7–9] by mimicking chitin. Two cyclic dipeptides, cyclo-(Tyrosine-Proline) and cyclo-(Histidine-Proline), inhibit chitinases by mimicking a catalytic intermediate of allosamidin.[10] Psammaplin A, a brominated tyrosine-derived compound, moderately inhibits chitinase by binding near the active site of chitinases, but not as tightly as allosamidin.[11] Owing to their different chemical

* Correspondence to: Julien Saguez, Biologie des Entomophages (UPRES EA 3900 Biologie des Plantes et Contrôle des Insectes Ravageurs), Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex, France
E-mail: julien.saguez@u-picardie.fr
(*Received 2 September 2005; revised version received 18 March 2006; accepted 5 May 2006*)
Published online 4 September 2006; DOI: 10.1002/ps.1289

© 2006 Society of Chemical Industry. *Pest Manag Sci* 1526–498X/2006/$30.00

WILEY InterScience® DISCOVER SOMETHING GREAT

structures and functions in nature, chitinase inhibitors were expected to have differential effects on insects. Although chitinase inhibitors have been reported to present larvicidal effects and disturb the moulting process in lepidopteran and dipteran species, they have never been assayed in Homoptera.

The homopteran *M. persicae* is one of the most polyphagous insects worldwide, as it successfully develops on hundreds of plant species. In several insect species, chitin is a major component of the peritrophic membrane,[12,13] a non-cellular barrier formed by the digestive epithelium to compartmentalize digestive enzymes and protect epithelial cells from disruption and penetration of parasites.[14,15] Turnover of peritrophic membrane involves chitinases, which represent a digestive target in a chitinase inhibitors strategy. *Myzus persicae* is deprived of peritrophic membrane, and no chitinase activity has so far been described in aphid midgut. Thus, aphids could be considered as non-digestive target pests in the context of chitinase inhibitor use. Aphids are hemimetabolous and larviparous insects: offspring develop in the genital tracts of adults. During their embryonic development, growth of larvae is influenced by the physiology of the fundatrix, and their integument chitinases, involved in cuticule remodelling, are possible targets. All these characteristics make *M. persicae* an interesting model to study chitinase inhibitor effects.

With the aim of managing aphid populations, we have evaluated the aphicidal effects of four chitinase inhibitors, cyclo-(Histidine-Proline), cyclo-(Proline-Tyrosine), allosamidin and psammaplin A, on *M. persicae*.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Artificial diets

Cyclo-(Histidine-Proline), cyclo-(Proline-Tyrosine), amino acids, vitamins and mineral compounds were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Allosamidin and psammaplin A were respectively provided by Dr Sakuda (University of Tokyo, Japan) and Dr Tabudravu (University of Aberdeen, Scotland, UK). A standard diet adapted for *M. persicae* was used as a carrier for chitinase inhibitor dilution and as a control. The concentrations of chitinase inhibitors (10, 50 and $100\,\mu g\,mL^{-1}$) incorporated into the standard diet were chosen according to Cherqui *et al.*[16] The diet was prepared as described by Febvay *et al.*[17] and modified by Down *et al.*[18] After preparation, the artificial diet was passed through a 0.45 µm filter (Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, USA), and diet pouches were prepared under aseptic conditions.

2.2 Insects and feeding assays

The aphid clone was established in 1999 from a single apterous female collected on a potato field near Loosen-Gohelle (50° 27′ 27″ N, 2° 47′ 30″ E) in Northern France. The colony of *M. persicae* was maintained on potato plants (*Solanum tuberosum* L. cv Désirée) propagated from tubers in a greenhouse under parthenogenesis-inducing conditions, i.e. $20 \pm 1\,^{\circ}C$ and a 16:8 h light:dark photoperiod.

Pouches of each diet (0 = control, 10, 50 and $100\,\mu g\,mL^{-1}$ inhibitor) with 10–12 nymphs younger than 24 h were maintained under parthenogenesis-inducing conditions as described above. At least five replicates were carried out for each diet, and pouches were changed every second day.

Nymphal survival, prereproductive period (i.e. the period of time from birth until onset of reproduction), adult emergence and reproduction were recorded daily according to a procedure described by Saguez *et al.*[4] These parameters were used to calculate the intrinsic rate of natural increase (r_m) of the *M. persicae* population according to Le Roux *et al.*[19] The variance of r_m value was estimated with the 'Petitr' program (Pierre JS, private communication). The time necessary to double the population was estimated as $DT = \ln 2/r_m$.

2.3 Statistical analysis

The effects of chitinase inhibitors on nymphal survival were analysed with Pearson's χ^2 test. One-way analysis of variance (ANOVA) was carried out with Statistica 5.5 software (StatSoft®, Tulsa, Oklahoma, USA) to test the effects of the diets on aphid demographic parameters. Significantly altered demographic parameters were further analysed with Fisher's positive least significant difference test (PLSD) at $P < 0.05$.

3 RESULTS

Among demographic parameters, prereproductive period duration was not affected by any chitinase inhibitor (Table 1, A, B, C and D). The cyclic dipeptide cyclo-(Proline-Tyrosine) did not affect *M. persicae* development when compared with the control diet (Fig. 1(A) and Table 1, A). In contrast, growth parameters were slightly modified by cyclo-(Histidine-Proline). No difference was observed in nymphal mortality at all doses compared with the control diet (Fig. 1(B)). However, this inhibitor significantly reduced the daily fecundity of *M. persicae* by 25–40% and also reduced r_m values. As a consequence, the doubling time of population was only enhanced at 10 and $50\,\mu g\,mL^{-1}$ (Table 1, B).

Although allosamidin did not affect nymphal mortality at $10\,\mu g\,mL^{-1}$, nymphal survival of *M. persicae* was reduced at 50 and $100\,\mu g\,mL^{-1}$ (Fig. 1(C)), by 40 and 60% respectively ($\chi^2 = 17.26$; DF = 9; $P < 0.04$ and $\chi^2 = 39.72$; DF = 9; $P < 0.00$). Aphids fed on all allosamidin concentrations presented a significant decrease in their r_m values that was directly linked with a reduction in offspring production. As a consequence, the duration of the doubling time of aphid population was increased from 1 to 1.5 days (Table 1, C).

Table 1. Mean (±SD) demographic parameters of *Myzus persicae* reared on diets containing chitinase inhibitors[ab]

Demographic parameter	Chitinase inhibitor concentration ($\mu g\,mL^{-1}$)				F^c	P^c
	0 (Control)	10	50	100		
(A) Cyclo-(Proline-Tyrosine)						
Number of aphids assayed	29	30	32	29		
Prereproductive period (days)	9.9 (±1.2)	9.9 (±1.3)	9.7 (±1.1)	10.0 (±1.1)	0.3	0.80
Daily fecundity (nymphs female^{-1} day^{-1})	1.2 (±0.4)	1.1 (±0.4)	1.1 (±0.4)	1.1 (±0.4)	0.8	0.51
r_m (females female^{-1} day^{-1})	0.18 (±0.04)	0.18 (±0.04)	0.17 (±0.02)	0.18 (±0.04)	0.8	0.49
Doubling time (days)	3.9 (±0.8)	4.0 (±0.9)	4.1 (±0.5)	4.0 (±1.0)	0.3	0.84
(B) Cyclo-(Histidine-Proline)						
Number of aphids assayed	32	31	28	28		
Prereproductive period (days)	10.1 (±1.3)	10.1 (±1.2)	9.9 (±0.9)	9.9 (±0.9)	0.3	0.82
Daily fecundity (nymphs female^{-1} day^{-1})	1.7 (±0.4) a	1.2 (±0.5) bd	1.0 (±0.2) c	1.3 (±0.3) d	17.9	<0.00
r_m (females female^{-1} day^{-1})	0.20 (±0.03) a	0.18 (±0.03) b	0.16 (±0.02) c	0.18 (±0.02) bc	7.0	<0.00
Doubling time (days)	3.6 (±0.6) a	4.0 (±0.8) bc	4.3 (±0.7) c	3.9 (±0.5) ab	5.5	<0.00
(C) Allosamidin						
Number of aphids assayed	35	31	24	15		
Prereproductive period (days)	9.3 (±0.9)	9.7 (±0.7)	9.8 (±0.8)	9.5 (±0.6)	2.2	0.10
Daily fecundity (nymphs female^{-1} day^{-1})	1.6 (±0.4) a	0.9 (±0.2) b	1.2 (±0.4) c	1.0 (±0.4) bc	18.5	<0.00
r_m (females female^{-1} day^{-1})	0.20 (±0.02) a	0.16 (±0.02) b	0.16 (±0.02) b	0.15 (±0.04) b	21.3	<0.00
Doubling time (days)	3.4 (±0.4) a	4.4 (±0.9) b	4.4 (±0.7) b	5.0 (±1.5) c	14.4	<0.00
(D) Psammaplin A						
Number of aphids assayed	52	47	0	0		
Prereproductive period (days)	9.3 (±0.7)	9.5 (±0.8)	NA	NA	2.9	0.09
Daily fecundity (nymphs female^{-1} day^{-1})	1.4 (±0.4)	1.4 (±0.3)	NA	NA	0.0	0.84
r_m (females female^{-1} day^{-1})	0.20 (±0.03)	0.20 (±0.02)	NA	NA	0.2	0.68
Doubling time (days)	3.6 (±0.7)	3.5 (±0.5)	NA	NA	0.8	0.38

[a] Values in the same row followed by the same letter indicate that they do not differ significantly according to Fisher's PLSD test ($P < 0.05$).
[b] NA = not available, as a result of nymphal mortality.
[c] F, Fisher's test value of one-way ANOVA analysis; P, value of Fisher's test.

Psammaplin A induced important toxic effects on *M. persicae* larvae. At 50 and $100\,\mu g\,mL^{-1}$, all aphids died before adulthood (Fig. 1(D)). As a consequence, death of aphids at the nymphal stage precluded the determination of adult parameters. At $10\,\mu g\,mL^{-1}$, *M. persicae* developed normally, and no difference was determined when compared with control diet either on the larval or the adult stage (Table 1, D).

4 DISCUSSION

The present results showed differential effects of chitinase inhibitors. Although cyclic dipeptides induced little or no insecticidal effects, allosamidin and psammaplin A were potent developmental inhibitors against *M. persicae*. These results could be associated with the nature of interaction between chitinases and their inhibitors; the higher the affinity between chitinases and their inhibitors, the higher the inhibitory activity. Crystallographic studies associated with *in vivo* bioassays have shown that inhibitory activity is correlated with the affinity of the inhibitor for the active site of chitinase. Thus, the cyclic dipeptide cyclo-(Histidine-Proline) is better linked to the active site of *Saccharomyces cerevisiae* Meyer ex Hansen and is more potent than cyclo-(Tyrosine-Proline).[10,20] However, these interactions are weaker than those of allosamidin which tightly binds chitinases. Psammaplin A binds near the active site of chitinases, but its inhibitory activity is less than that of allosamidin.[11]

At 10 and $50\,\mu g\,mL^{-1}$, cyclo-(Histidine-Proline) is more toxic than at $100\,\mu g\,mL^{-1}$. Amino acids are important sources of nitrogen for aphids, and aminopeptidases have been found in their digestive tract.[21] As cyclic dipeptides are formed by two linked amino acids, the possibility of their hydrolysis by aminopeptidases during digestion to provide a supply of amino acids to aphids could not be ruled out. In this case, cyclo-(Histidine-Proline) would induce chitinase inhibition at the lower concentrations, but this inhibitory effect could be confounded by the supply of amino acids at the highest concentration. In contrast, psammaplin A (a derivative of tyrosine) is not a target of peptidases because tyrosine residues are linked by a disulfur bond.

Until now, published information relevant to chitinase inhibitor treatments in insects concerned only lepidoptera or diptera. Chitinase inhibitors affect the peritrophic membrane turnover, midgut chitinolytic activities and development of insects. Homoptera, including aphids, do not possess peritrophic membrane. Moreover, no chitinase and chitinolytic activity have been described yet in aphid midgut (Rahbé Y, private communication). As a consequence, a digestive target of chitinase inhibitors is excluded. However,

Pest Manag Sci **62**:1150–1154 (2006)
DOI: 10.1002/ps

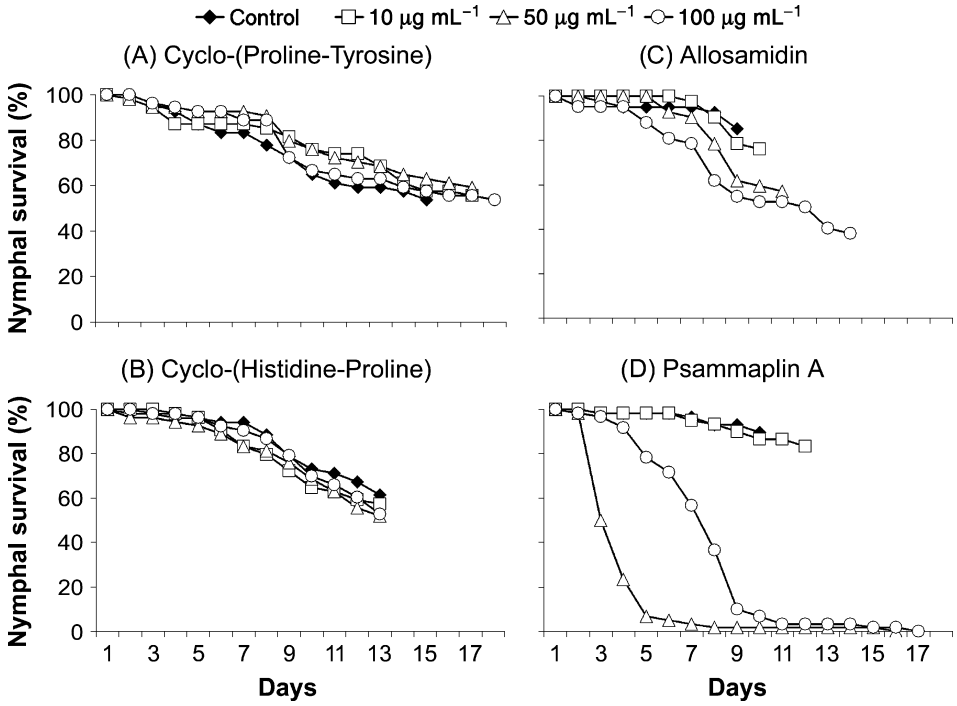


Figure 1. Nymphal survival of *Myzus persicae* reared on diets containing 0 (control), 10, 50 or 100 µg mL^{-1} of (A) Cyclo-(Proline-Tyrosine), (B) Cyclo-(Histidine-Proline), (C) allosamidin and (D) psammaplin A.

several compounds have been reported to cross mesenteron cells in insects.[16,22,23] If chitinase inhibitors could cross the digestive epithelium, then epithelial chitinases involved in cuticle degradation and remodelling during moulting would be potential action sites for chitinase inhibitors.

Chitinase inhibitors are reported to inhibit post-embryonic development of diptera and lepidoptera. For example, consumption of allosamidin and its derivatives by larvae of *Lucilia cuprina* (Wiedemann) resulted in high (85–90%) larval mortality and a reduction in body length.[24] Allosamidin also induces an increase in larval mortality with 50% of abnormal, delayed or interrupted moulting in *Tineola bisselliella* (Hummel).[24] Allosamidin injection in larvae of *Bombyx mori* L. and *Leucania separata* Walker strongly inhibits moulting and induces death.[5] Likewise, larvicidal effects have been shown on *Plutella xylostella* L. reared on leaf discs treated with 500 mg kg^{-1} of psammaplin A, whereas *M. persicae* was not affected under these conditions.[11] For the first time, the present results have highlighted an increase in homopteran larval mortality when reared on allosamidin and exposed to diets containing added psammaplin A. The present authors also observed that cuticle shedding was disturbed or larval moult failed when insects were reared on chitinase inhibitors (data not shown). Their results also showed for the first time larvicidal effects of allosamidin and psammaplin A on immature aphids.

Remodelling of chitinous structures not only involves chitin synthases but also chitinases during insect development. Allosamidin is responsible for chitinase inhibition but also enhances chitin biosynthesis.[7–9] As the present authors demonstrated a reduction in fecundity in aphids, the hypothesis that chitinase inhibitors cross the mesenteron cells becomes relevant. The decrease in fecundity observed in aphids reared on allosamidin could be due to the impact of this compound on cuticle formation during larval development in the genital tract of females.

Chitinase inhibitors have shown effects against bacteria, phytopathogenic fungi and insect pests. The present results demonstrated for the first time differential aphicidal effects of chitinase inhibitors of different nature on the polyphagous aphid *M. persicae*. Thus, chitinase inhibitors are a promising lead for the development of a new strategy to protect crops. As many of these chitinase inhibitors are not presently available commercially owing to their high production cost and their chemical instability when applied on crops, it is appropriate to find new chitinase inhibitors with biopesticidal properties amenable to the commercial context.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr S Sakuda (Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo, Japan) and Dr JN Tabudravu (Marine Natural Products Laboratory, Department of Chemistry, University of Aberdeen, Scotland, UK) for providing allosamidin and psammaplin A respectively. They thank the French Service Régional de la Protection des Végétaux du Nord Pas-de-Calais for providing aphids and the Comité Nord Plants de Pommes de Terre for providing potato tubers. This work was supported by the Ministère Français de la Recherche, the Conseil

Régional de Picardie, the Fonds Social Européen and the Comité Nord Plants de Pommes de Terre.

REFERENCES

1 Spindler K and Spindler-Barth M, *Chitin in Life Sciences*, ed. by Giraud-Guille MM. J André Publisher, Lyon, France, pp. 41–52 (1996).

2 Ding X, Gopalakrishnan B, Johnson LB, White FF, Wang X, Morgan TD, *et al*, Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. *Transgenic Res* 7:77–84 (1998).

3 Fitches E, Wilkinson H, Bell H, Bown DP, Gatehouse JA and Edwards JP, Cloning, expression and functional characterisation of chitinase from larvae of tomato moth (*Lacanobia oleracea*): a demonstration of the insecticidal activity of insect chitinase. *Insect Biochem Mol Biol* **34**:1037–1050 (2004).

4 Saguez J, Hainez R, Cherqui A, Van Wuytswinkel O, Jeanpierre H, Lebon G, *et al*, Unexpected effects of chitinases on the peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer) when delivered via transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* Linné) and *in vitro*. *Transgenic Res* **14**:57–67 (2005).

5 Sakuda S, Isogai A, Matsumoto S and Suzuki A, Search for microbial insect growth regulators. II. Allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor. *J Antibiot* **40**:296–300 (1987).

6 Londershausen M, Turberg A, Bieseler B, Lennertz M and Peter MG, Characterization and inhibitor studies of chitinases from a parasitic blowfly (*Lucilia cuprina*), a tick (*Boophilus microplus*), an intestinal nematode (*Haemonchus contortus*) and a bean (*Phaseolus vulgaris*). *Pestic Sci* **48**:305–314 (1996).

7 Peter MG and Schweikart F, Chitin biosynthesis enhancement by the endochitinase inhibitor allosamidin. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **371**:471–473 (1990).

8 Shahabuddin M, Toyoshima T, Aikawa M and Kaslow DC, Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc Nat Acad Sci USA* **90**:4266–4270 (1993).

9 Filho BPD, Lemos FJA, Secundino NFC, Páscoa V, Pereira ST and Pimenta PFP, Presence of chitinase and beta-*N*-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti*: a chitinolytic system involving peritrophic matrix formation and degradation. *Ins Biochem Mol Biol* **32**:1723–1729 (2002).

10 Houston DR, Shiomi K, Arai N, Omura S, Peter MG, Turberg A, *et al*, High-resolution structures of a chitinase complexed with natural product cyclopentapeptide inhibitors: mimicry of carbohydrate substrate. *Proc Nat Acad Sci USA* **99**:9127–9132 (2002).

11 Tabudravu JN, Eijsink VG, Gooday GW, Jaspars M, Komander D, Legg M, *et al*, Psammaplin A, a chitinase inhibitor isolated from the Fijian marine sponge *Aplysinella rhax*. *Bioorg Med Chem* **10**:1123–1128 (2002).

12 Krishnaveni S, Mutukrishnan S, Liang GH, Wilde G and Manickam A, Induction of chitinases and β-1,3-glucanases in resistant and susceptible cultivars of sorghum in response to insect attack, fungal infection and wounding. *Plant Sci* **144**:9–16 (1999).

13 Cohen E, Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag Sci* **57**:946–950 (2001).

14 Lehane MJ and Billingsley PA, *The Biology of the Insect Midgut*. Chapman and Hall, London (1996).

15 Lehane MJ, Wu D and Lehane SM, Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol* **42**:525–550 (1997).

16 Cherqui A, Alla S, Saguez J, Doury G, Sangwan-Norreel BS and Giordanengo P, Probiotic effects of beta-glucuronidase on the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Aphididae). *J Ins Physiol* **49**:1199–1209 (2003).

17 Febvay G, Delobel B and Rahbé Y, Influence of amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrthosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). *Can J Zool* **66**:2449–2453 (1988).

18 Down RE, Gatehouse AMR, Hamilton WDO and Gatehouse JA, Snowdrop lectin inhibits development and decreases fecundity of the glasshouse potato aphid (*Aulacorthum solani*) when administered *in vitro* and via transgenic plants both in laboratory and glasshouse trials. *J Insect Physiol* **42**:1035–1045 (1996).

19 Le Roux V, Saguez J, Vincent C and Giordanengo P, Rapid method to screen resistance of potato plants against *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) in the laboratory. *J Econ Entomol* **97**:2079–2082 (2004).

20 Houston DR, Synstad B, Eijsink VGH, Stark MJR, Eggleston I and van Aalten DMF, Structure-based exploration of cyclic dipeptide chitinase inhibitors. *J Med Chem* **47**:5713–5720 (2004).

21 Cristofoletti PT, Ribeiro AF, Deraison C, Rahbé Y and Terra WR, Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *J Ins Physiol* **49**:11–24 (2003).

22 Allingham PG, Kerlin RL, Tellam RL, Briscoe SJ and Standfast HA, Passage of host immunoglobulin across the mid-gut epithelium into the haemolymph of blood-fed buffalo flies *Haematobia irritans exigua*. *J Ins Physiol* **38**:9–13 (1992).

23 Rahbé Y, Ferrasson E, Rabesona H and Quillien L, Toxicity to the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* of anti-chymotrypsin isoforms and fragments of Bowman-Birk protease inhibitors from pea seeds. *Ins Biochem Mol Biol* **33**:299–306 (2003).

24 Blattner R, Gerard P and Spindler-Barth M, Synthesis and biological activity of allosamidin and allosamidin derivatives. *Pestic Sci* **50**:312–318 (1997).

Discussion

Nos résultats montrent des effets délétères des inhibiteurs de chitinases sur le puceron *M. persicae*. Si le cyclo-(Proline-Tyrosine) n'induit aucune modification majeure des paramètres démographiques du puceron, en revanche, le cyclo-(Histidine-Proline) est toxique pour *M. persicae*. Les effets les plus marqués ont été observés avec l'allosamidine et la psammapline A qui induisent une augmentation de la mortalité larvaire, des réductions de fécondité et augmentent le temps de doublement des populations de pucerons. Pour la première fois, nous avons mis en évidence que ces molécules permettent de contrôler le développement des populations de pucerons, élargissant ainsi le spectre d'action des inhibiteurs de chitinases aux homoptères. Chez ces insectes, nous avons émis l'hypothèse que les cibles sont cuticulaires. En effet, en supposant que les inhibiteurs de chitinases traversent l'épithélium digestif, ils pourraient agir directement sur le métabolisme des glucosamines mais aussi sur les chitinases tégumentaires produites lors des mues ou sur le remodelage des structures cuticulaires maternelles et larvaires. Nous avons vu que les inhibiteurs de chitinases présentent de nombreuses propriétés antibiotiques, antifongiques, insecticides qui en font de très bons candidats pour le développement de nouvelles stratégies dans des programmes de phytoprotection mais également pour l'élaboration de nouvelles molécules thérapeutiques aux applications vétérinaires et médicales.

Bien que les inhibiteurs de chitinases aient des propriétés très prometteuses dans un contexte de phytoprotection, aucun d'eux n'a jusqu'alors été commercialisé. Malgré leur origine naturelle, qui permet de les classer parmi les biopesticides, la complexité structurale de ces molécules et la difficulté de synthèse sont des freins à leur mise sur le marché. Ainsi, l'allosamidine, qui est pourtant l'inhibiteur le plus étudié et qui inhibe une grande majorité des chitinases, n'est pas commercialisable car sa structure est trop complexe pour permettre une synthèse à grande échelle et le composé est instable lors de tests en champs. Il en est de même pour les styloguanidines (Spindler et Spindler-Barth, 1999).

Concernant les autres types d'inhibiteurs, même si l'inhibition de diverses chitinases a été décrite, dans de nombreux cas, leur activité inhibitrice est souvent inférieure à celle de l'allosamidine et de ses dérivés. Ces différences d'activités peuvent être associées aux affinités variables entre les chitinases et leurs inhibiteurs. En effet, si la plupart des inhibiteurs se lient directement aux sites catalytiques des chitinases, la présence de sites de liaisons spécifiques peut modifier l'affinité et les propriétés d'hydrolyse. Cela est non seulement valable pour l'allosamidine qui se lie différemment avec les chitinases bactériennes, de

plantes ou d'insectes, mais aussi pour les peptides cycliques. Ainsi, en formant des liaisons plus étroites avec les chitinases, l'argadine exerce une inhibition jusqu'à 1500 fois supérieure à celle observée avec l'argifine (Houston et al., 2002b). Pour les dipeptides cycliques, la configuration optique (L ou D) des isomères peut également modifier les propriétés inhibitrices (Houston et al., 2004). De plus, la nature des acides aminés qui constituent le site actif des enzymes varie d'une chitinase à une autre, d'une espèce à une autre, y compris au sein de la famille 18 des chitinases (Spindler et Spindler-Barth, 1999; Houston et al., 2004). L'architecture des sites catalytiques et des inhibiteurs constitue donc l'un des facteurs clés dans les interactions entre les chitinases et leurs inhibiteurs. Si cette variabilité constitue un obstacle à la synthèse d'inhibiteurs de chitinases « généralistes », elle offre la possibilité de cibler spécifiquement certains types de chitinases.

Dans le cadre du développement de stratégies alternatives de régulation des populations de pathogènes et de ravageurs, les inhibiteurs de chitinases ouvrent de nouvelles perspectives de valorisation des métabolites secondaires produits par les microorganismes, les végétaux ou les animaux. La nature et les difficultés rencontrées pour produire ces inhibiteurs constituent toutefois des limites d'utilisation d'une telle stratégie puisqu'à ce jour aucun inhibiteur n'est commercialisé. Compte tenu des difficulté rencontrées pour identifier de nouveaux inhibiteurs, des connaissances approfondies à la fois des chitinases mais aussi de la nature des interactions qu'elles peuvent développer avec des inhibiteurs, sont donc nécessaires afin d'effectuer des criblages ciblés.

Seconde partie

Vers de nouveaux inhibiteurs de chitinases

Purification et caractérisation des chitinases de pucerons

1. Introduction

L'activité des inhibiteurs repose en grande partie sur les interactions qu'ils établissent avec les chitinases. Malgré les effets très significatifs que nous avons obtenus sur les pucerons, l'absence d'anticorps dirigé contre les inhibiteurs de chitinases testés et contre les chitinases de *M. persicae* ne nous a pas permis de localiser les cibles des inhibiteurs dans les aphides ni de vérifier l'interaction directe entre les inhibiteurs et les chitinases. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des inhibiteurs sur les chitinases de *M. persicae* et dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs, il convenait dans un premier temps d'isoler et de caractériser les chitinases de cet aphide.

Les chitinases d'insectes font partie de la famille 18 de la superfamille des glycohydrolases. Elles possèdent un fort degré d'homologie au niveau de leurs séquences d'acides aminés. Ces chitinases possèdent des masses moléculaires théoriques comprises entre 40 et 85 kDa pour des pH optimum d'activité compris entre pH 4 et 8 (Kramer et Muthukrishnan, 1997). Les chitinases ont été clonées chez les lépidoptères *Manduca sexta* (Kramer et al., 1993), *Hyphantria cunea* (Kim et al., 1998), *Bombyx mori* (Kim et al., 1998), *Spodoptera litura* (Shinoda et al., 2001), *Choristoneura fumiferana* (Zheng et al., 2002) et les coléoptères *Phaedon cochleariae* (Girard et Jouanin, 1999) et *Tenebrio molitor* (Royer et al., 2002). Ces chitinases sont caractérisées par une structure primaire en multidomaines, déduite des séquences nucléotidiques.

Bien que l'activité chitinase dépende uniquement du domaine catalytique localisé en région *N*-terminale (Wang et al., 1996; Zhu et al., 2001), de nombreux autres domaines sont impliqués dans l'interaction des chitinases avec la chitine, au niveau des cuticules et de la membrane péritrophique et favorisent la chitinolyse :

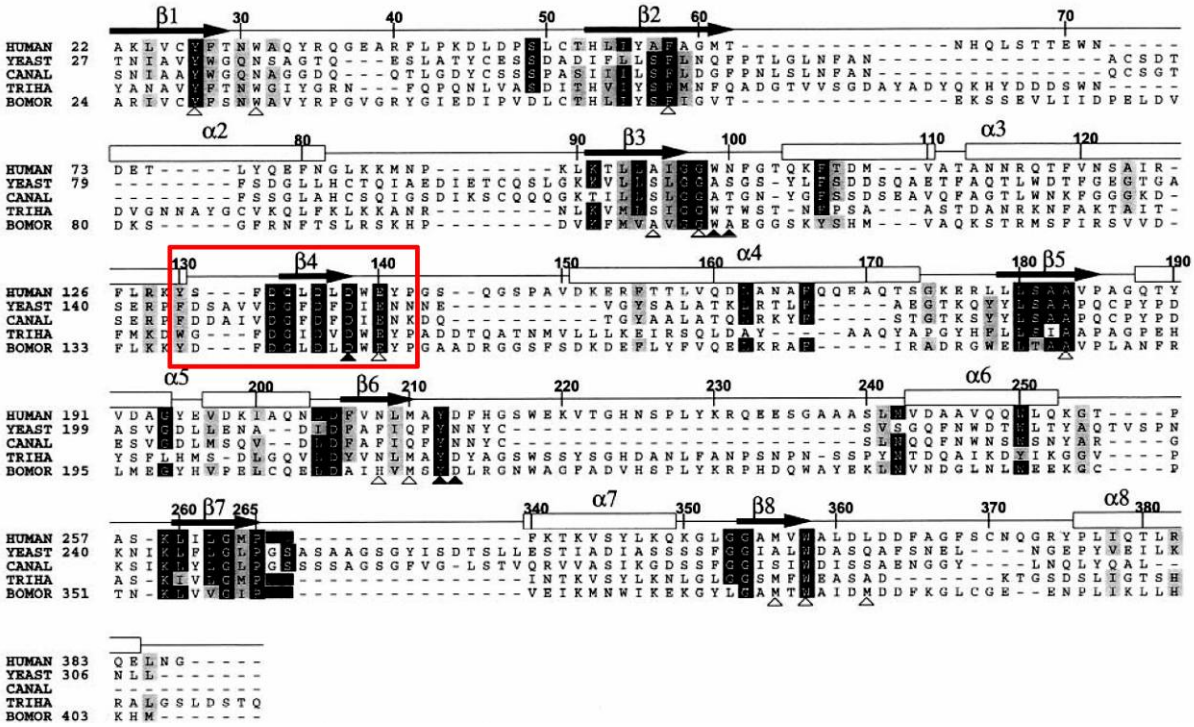
- Les chitinases d'insectes possèdent un peptide signal qui participerait à la sécrétion de l'enzyme dans le réticulum endoplasmique et la partie *N*-terminale est impliquée dans la liaison au substrat et dans son hydrolyse (Perrakis et al., 1996).
- Le domaine PEST (riche en proline, glutamate, sérine et thréonine) qui serait nécessaire à la protéolyse des chitinases (Rogers et al., 1986; Rechsteiner et Rogers, 1996), se trouve dans un domaine peu conservé (Kuranda et Robbins, 1991; Kramer et al., 1993; Kim et al., 1998; Royer et al., 2002) et plusieurs travaux rapportent même l'absence de ce domaine (Girard et Jouanin, 1999; Feix et al., 2000; Yan et al., 2002).

- Les chitinases d'insectes adhèrent à leur substrat par l'intermédiaire d'un domaine de liaison à la chitine, situé en région *C*-terminale. Ce domaine est caractérisé par six motifs cystéine également présents chez d'autres types de chitinases comme celles des nématodes (Venegas et al., 1996). Il est également retrouvé dans plusieurs protéines de la membrane péritrophique, des récepteurs et d'autres protéines impliquées dans les adhésions cellulaires (Tellam, 1996; Kramer et Muthukrishnan, 1997; Shen et Jacobs-Lorena, 1999).
- Les chitinases d'insectes possèdent plusieurs sites de *N*-glycosylation, assurant leur stabilité (Gopalakrishnan et al., 1995; Kramer et Muthukrishnan, 1997; Kim et al., 1998). De plus, la région PEST-like, riche en sérine et thréonine, contient des sites de *O*-glycosylation (Arakane et al., 2003).

Les alignements de séquences de plusieurs chitinases (**Figure 18**) montrent qu'il existe des régions hautement conservées, notamment à l'intérieur du site catalytique (Henrissat, 1990). La structure tertiaire des chitinases de la famille 18 est similaire à d'autres glycohydrolases puisqu'elles utilisent des mécanismes d'hydrolyse similaires faisant intervenir certains acides aminés spécifiques (Henrissat et Bairoch, 1993). Le domaine catalytique des chitinases de la famille 18 possède une structure qui forme un sillon à la surface de l'enzyme (Lasters et al., 1988). Ce sillon est considéré comme le centre actif qui se lie aux unités osidiques de la chitine, qui sont ensuite clivées (Armand et al., 1994; Houston et al., 2004). La séquence la plus commune des acides aminés qui constituent le site actif des chitinases de la famille 18 est **FD**xx**D**x**D**x**E.** Chez les insectes, cette zone est très conservée et forme dans la plupart des cas, la séquence YD**FD**GL**D**L**D**W**E**YP (Choi et al., 1997; de la Vega et al., 1998) où le résidu glutamate est essentiel pour la catalyse et dont la mutation provoque une perte d'activité chitinolytique (Lu et al., 2002; Royer et al., 2002). Chaque résidu du site catalytique confère des propriétés physicochimiques aux chitinases telles que la stabilité électrostatique, les valeurs de pH pour lesquelles l'enzyme est active, la valeur de pKa des autres résidus, … (Lu et al., 2002). Les produits d'hydrolyse de la chitine sont le chitotétraose, le chitotriose et le chitobiose, ce dernier étant majoritaire (Kramer et Muthukrishnan, 1997; Brameld et al., 1998; Abdel-Banat et al., 2002). A notre connaissance, aucune chitinase de puceron n'a à ce jour été isolée, purifiée et caractérisée. La purification des chitinases de *M. persicae* a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire d'Entomologie Fonctionnelle de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).

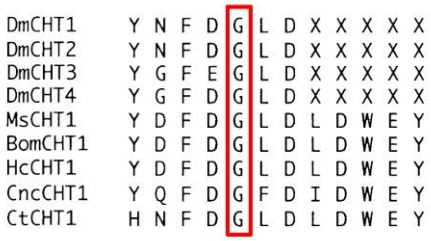
Figure 18 : Comparaison de séquences peptidiques de chitinases

A. Alignement de chitinases de la famille 18 des glycohyrolases



Légende : Comparaison des séquences de chitinases de *Homo sapiens* (*HUMAN*), *Saccharomyces cerevisiae* (*YEAST*), *Candida albicans* (*CANAL*), *Trichoderma harzianum* (*TRIHA*), et *Bombyx mori* (*BOMOR*). La zone entourée correspond à la séquence conservée du site catalytique des chitinases de la famille 18 (d'après Rao et al., 2003).

B. Alignement de séquences des sites catalytiques de chitinases d'insectes



Légende : Les séquences de chitinases comparées sont celles de *Drosophila melanogaster* (DmCHT), *Manduca sexta* (MsCHT), *Bombyx mori* (BomCHT) de *Chelonus sp. nr. curvimaculatus* (CncCHT) et de *Chironomus tentans* (CtCHT). Les lettres « X » signifie que la séquence en acides aminés est incertaine. Le résidu glutamate (entouré) est essentiel à la catalyse (d'après de la Vega et al., 1998).

2. Matériel et méthodes

2.1 Plantes et insectes

Des plants de pommes de terre (*Solanum tuberosum* cultivar Désirée) ont été cultivés en salle de culture en conditions contrôlées (20 ± 1°C ; 16 h jour : 8 h nuit). Ces conditions permettent également de maintenir depuis plusieurs années notre clone de puceron *Myzus persicae* selon un mode de reproduction parthénogénétique.

2.2 Purification des chitinases

Les aphides sont collectés à partir de notre élevage de masse, broyés sur glace dans un tampon Tris 20 mM à pH 7,4. L'homogénat est filtré (Filtre Millipore filter 45µm) et centrifugé 15 min à 15 000 rpm et à 4°C. Un fractionnement protéique du surnageant est effectué au sulfate d'ammonium. Une première précipitation est effectuée à 35% de saturation en sulfate d'ammonium et les protéines précipitées sont éliminées. Les protéines précipitées à 65% de saturation sont isolées, centrifugées 15 min à 15 000 rpm à 4°C et le surnageant est éliminé. La fraction précipitée est suspendue dans un tampon Tris 20 mM à pH 8,8 puis dialysée pendant 1 nuit contre 1500 volumes de tampon Tris20 mM à pH 8,8 pour éliminer le sulfate d'ammonium. Après dialyse, les protéines sont déposées sur une colonne C10/20 (Amersham) remplie de Fractogel DEAE-650 (Merck) et équilibrée avec un tampon Tris 20 mM à pH 8,8. Après un fractionnement réalisé en utilisant un gradient de NaCl 0-0,4 M dans un tampon Tris 20 mM à pH 8,8, les fractions présentant une activité chitinase sont déposées sur une colonne de concanavaline A.

2.3 Dosages protéique et enzymatique

La concentration protéique des échantillons est déterminée grâce à la méthode de Bradford (1976) en utilisant la BSA comme témoin. Le dosage de l'activité chitinase est adapté de la méthode de Zhang et al. (2002), en suivant l'hydrolyse du CM-Chitin-RBV (2 $mg.mL^{-1}$; LOEWE Biochemica GmbH, Allemagne). Chaque dosage est réalisé en utilisant 50 µL d'échantillon, 200 µL de tampon citrate phosphate (0,2 M, pH 4,5) et 200 µL de CM-Chitin-RBV. Après incubation (2 h à 37°C), l'hydrolyse est stoppée par ajout de 200 µL de HCl (2 M) pour précipiter le substrat non dégradé. Les échantillons sont conservés 15 min sur

la glace avant d'être centrifugés (5 min à 12 000 rpm et 4°C). L'absorbance du surnageant est mesurée à 550 nm (Shimadzu UV-160A spectrophotometer).

2.4 Tests d'activité sur gel

Des tests d'activités chitinolytiques ont été réalisés sur gel d'électrophorèse en utilisant la méthode de Cottrelle et al. (1999) légèrement modifiée. Les protéines sont déposées sur un gel SDS-PAGE 12% (acrylamide-bisacrylamide) contenant 0,01% de glycol chitosan. Après migration, les gels sont incubés 2 h à 37°C dans un tampon acétate 50 mM pH 5 pour activer les chitinases. La coloration des gels est effectuée par incubation (5 min) dans un tampon Tris HCl 50 mM pH 8,8 contenant 0,01% de Fluorescent Brightener 28. Après un rinçage d'une nuit dans l'eau distillée, les gels sont observés sous un rayonnement UV. Les activités chitinases sont détectées par la présence de bandes non colorées sur les gels.

2.5 Inhibition des chitinases

L'allosamidine et la psammapline A respectivement fournies par D. Sakuda (University of Tokyo, Japon) et J. Tabudravu (University of Aberdeen, Ecosse, GB) sont utilisées pour évaluer leur activité inhibitrice sur les chitinases purifiées de *M. persicae*. Cinq µg d'échantillon purifié sont mis en présence de différentes concentrations d'inhibiteur (1, 10 et 50 $\mu g.mL^{-1}$) correspondant à celles testées précédemment lors des tests de prise alimentaire sur aphides. L'activité chitinase résiduelle est déterminée comme décrit précédemment 1, 2 et 3 heures après ajout de l'inhibiteur.

2.6 Electrophorèses mono- et bi-dimensionnelles

Les analyses par SDS-PAGE sont réalisées en utilisant des gels à 12% d'acrylamide-bis-acrylamide, selon la méthode décrite par Laemmli (1970). Les marqueurs de poids moléculaires (Bio-Rad molecular weight standards) sont utilisés comme standards. Après électrophorèse, les gels sont colorés au nitrate d'argent. Les protéines purifiées de *M. persicae* ont également été soumises à une séparation par électrophorèse bi-dimensionnelle pour déterminer le nombre d'isoformes et le point isoélectrique des protéines isolées. Pour la première dimension, 5 µg de protéines sont dissouts dans un tampon de réhydratation (8 M Urée; 4% CHAPS; 20 mM DTT; 0,1% ampholytes Bio-lytes; 0,001% bleu de bromophénol)

et chargés sur des strips IPG (7 cm pH 4-7 ReadyStrip™, Bio-Rad). Après une réhydratation active (une nuit à 50V), les strips sont soumis à une iso-électrofocalisation (Protean IEF Cell, Bio-Rad) à 20°C avec variation de voltages (conditioning step 15 min à 250V; rapid voltage ramping step: 2h à 4000 V et 50 µA/strip; final focusing step: 2 h 45 à 10 000V/h et 50 µA/strip; hold step: 500 V). Les strips sont ensuite incubés 15 min dans un tampon d'équilibration I (Urée 6 M; SDS 2%; Tris-HCl 0,375 M pH 8,8; Glycérol 20% et DTT 130 mM) puis 15 min dans un tampon d'équilibration II (Urée 6 M; SDS 2%; Tris-HCl 0,375 M pH 8.8; Glycérol 20% et iodoacétamide 135 mM). La migration de seconde dimension est réalisée par SDS-PAGE comme décrit précédemment. Les protéines sont colorées au nitrate d'argent (ProteoSilver™ Plus Silver Stain Kit, Sigma). Les spots obtenus sont découpés et soumis à une analyse par MALDI-TOF (réalisée par C. Henry de l'INRA Jouy en Josas). Chaque spot a subi une trypsinolyse et les peptides qui en sont issus ont été analysés directement à l'aide d'un MALDI-TOF (0,02 µg de trypsine avec un volume de reprise de 10 µL) par spectrométrie de masse (Voyager DE super STR, Applied Biosystems) équipé d'un laser à azote (337 nm, laser de 20 Hz). Le spectre de masse a été acquis en mode réflectron (mode positif) avec un délai d'extraction de 130 ns. La matrice utilisée était du CHCA (5 $mg.mL^{-1}$). Une calibration, interne a été obtenue à l'aide des masses des peptides de la trypsine. La gamme de masses étudiées s'étend de 500 Da à 4000 Da (Céline Henry, communications personnelles). Les peptides obtenus ont été comparés avec les séquences peptidiques des chitinases d'insectes et par interrogation des bases de données SwissProt avec le logiciel Protein Prospector (MS-FIT).

3. Résultats

3.1 Purification des chitinases

Une protéine a été purifiée en quatre étapes à partir des extraits de *M. persicae*, comme résumé dans le **Tableau 6**.

Suite à une séparation sur un gel d'activité des protéines contenues dans l'échantillon brut, plusieurs protéines présentent une activité chitinolytique, parmi lesquelles deux protéines majoritaires dont les poids moléculaires respectifs sont d'environ 30 kDa et 65 kDa (**Figure 19**). Les différentes étapes de purifications ont été suivies par des mesures d'activité chitinase et par une analyse des échantillons par électrophorèse monodimensionnelle. Une

Tableau 6 : Purification des chitinases de *M. persicae*

Etape de purification	Protéine (µg/µL)	Activité *	Activité spécifique **	% Récupération	Niveau de purification
Echantillon brut	2,73	0,027	0,010	100,0	1,00
Après sulphate d'ammonium et dialyse	3,59	0,109	0,030	110,8	3,07
DEAE	0,90	0,091	0,095	20,4	9,63
Concanavaline A	0,08	0,029	0,361	15,3	36,53

* Activité chitinolytique calculée comme la variation d'absorbance à 550 nm et par minute ($\Delta 550.min^{-1}.mL^{-1}$).

** Activité spécifique calculée comme $\Delta 550.min^{-1}.mg^{-1}$

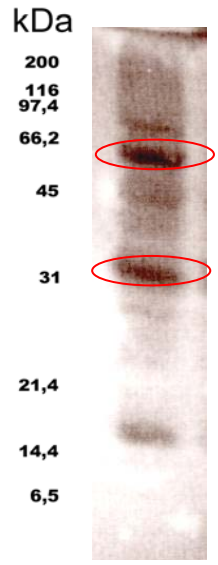


Figure 19 : Gel d'activité effectué sur l'échantillon brut

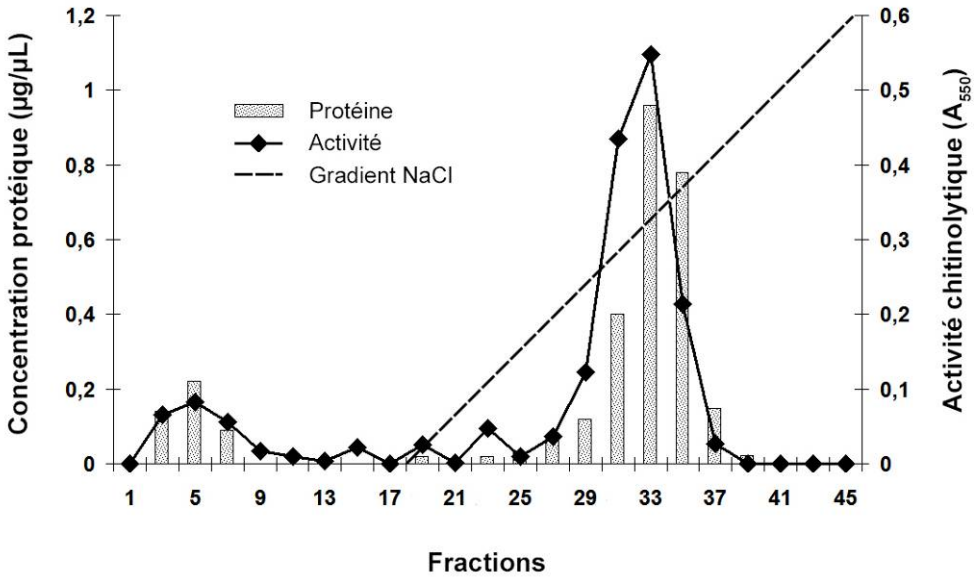


Figure 20 : Fractionnement protéique sur colonne de DEAE – Fractogel 650 par gradient de NaCl et activité chitinolytique des fractions

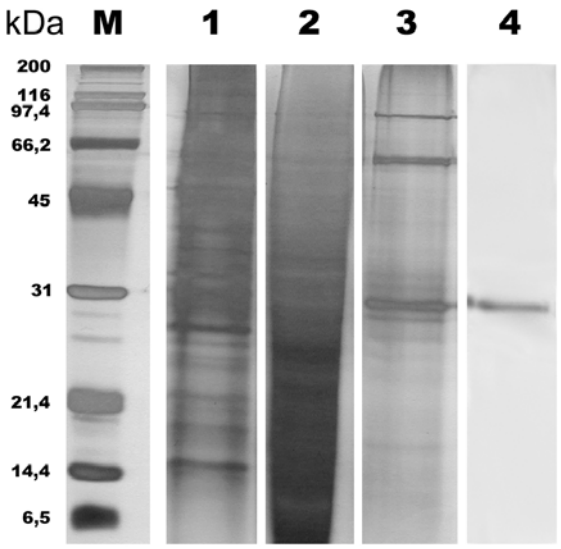


Figure 21 : Electrophorèse monodimensionnelle
1: extrait brut
2: Après sulfate d'ammonium
3: Après colonne de DEAE
4: Après colonne de Concanavaline A

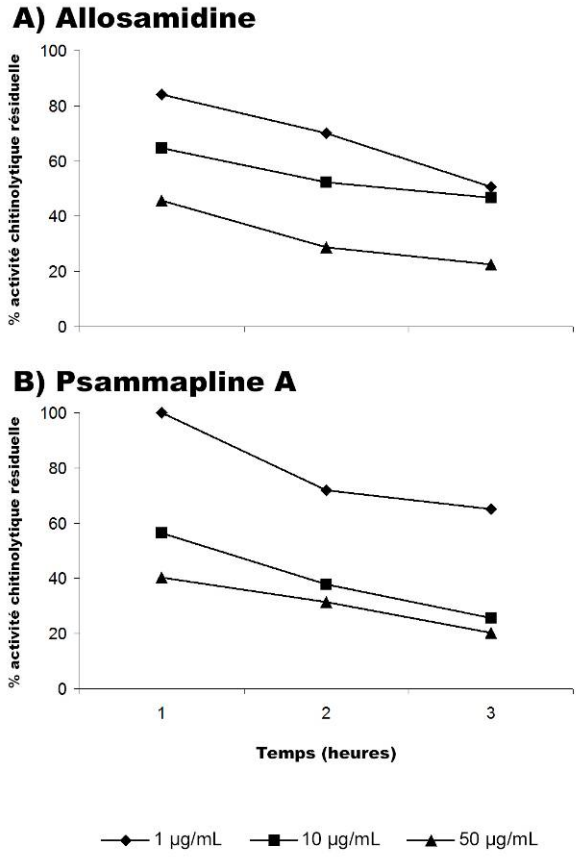


Figure 22 : Activités chitinolytiques des échantillons purifiés en présence d'allosamidine et de psammapline A

activité chitinolytique a été retrouvée à l'issue de chaque étape de purification par dosage spectrophotométrique. La première étape de purification par précipitation des protéines au sulfate d'ammonium a permis d'éliminer une grande partie des protéines et la totalité de l'activité chitinolytique de départ a été retrouvée dans cet échantillon. Au cours de la seconde étape de purification effectuée sur une colonne échangeuse d'anions (DEAE), les protéines ont été fractionnées afin d'isoler les protéines présentant une activité chitinase (**Figure 20**). A l'issue de cette étape de purification, les fractions 31 à 35 ont été collectées et regroupées, nous permettant de récupérer 20,4% de l'activité chitinolytique initiale (**Tableau 6**). Les fractions regroupées, ont été concentrées et déposées sur une colonne de concanavaline A qui a permis d'isoler une protéine unique (**Figure 21**) possédant 15% de l'activité chitinolytique présente dans l'échantillon brut.

3.2 Inhibition de l'activité chitinolytique

L'allosamidine et la psammapline A inhibent significativement l'activité chitinase de l'échantillon purifié. L'inhibition est d'autant plus importante que les concentrations en allosamidine et psammapline sont élevées. C'est au cours des deux premières heures que l'inhibition est la plus importante. Après seulement une heure d'inhibition par l'allosamidine et en fonction de la concentration en inhibiteur, on ne retrouve que de 43 à 85% de l'activité chitinolytique et pour la psammapline A, l'activité résiduelle varie de 40 à 100%. L'inhibition se prolonge dans le temps puisque après trois heures d'inhibition, l'activité résiduelle n'est plus que de 20% avec les plus fortes concentrations d'allosamidine et de psammapline A (**Figure 22**).

3.3 Analyse de la protéine purifiée

Les différentes étapes de purification ont permis d'isoler une protéine présentant un poids moléculaire d'environ 31 kDa à l'issue de la dernière étape de purification sur colonne de concanavaline A. La protéine éluée a été soumise à une séparation sur gel d'électrophorèse bidimensionnel et a mis évidence trois isoformes majeures (spot 1 à 3, **figure 23**), soumises à une analyse par MALDI-TOF. La trysinolyse a permis de libérer de nombreuses séquences peptidiques dont certaines sont identiques dans les échantillons 2 et 3 et d'autres, spécifiques à chaque échantillon (**Tableau 7**). La comparaison de ces fragments peptidiques avec différentes séquences protéiques connues de chitinases d'insectes n'a pas permis d'établir

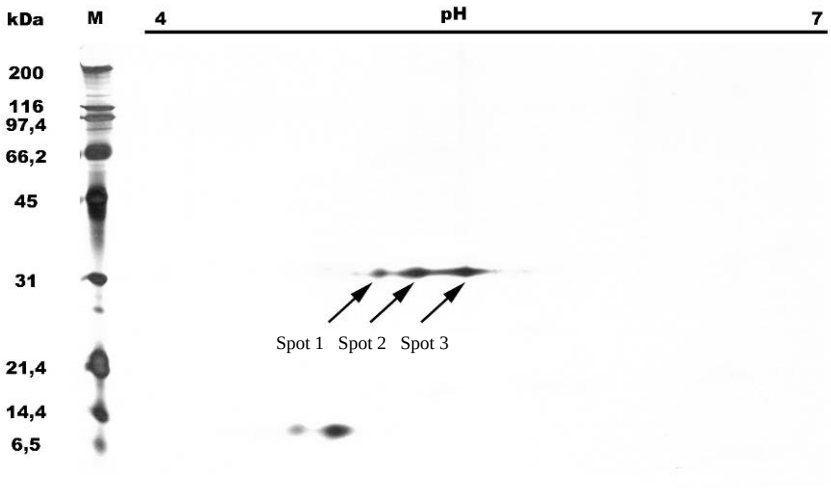


Figure 23 : Gel d'électrophorèse bi-dimensionnel obtenu avec l'échantillon purifié.

Tableau 7 : Résultats des analyses MALDI-TOF (voir également Annexe 3)

Séquences peptidiques isolées du spot 2	Séquences peptidiques isolées du spot 3
(-)ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIK(S)	
(K)VGTAHIIYNSVDKR(L)	
(K)DLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	
(K)DQKDLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	
(R)VSSNGSPQGSSVGR(A)	
(R)LLGLFPDAN(-)	(K)TAKWNMQNGK(V)
(R)VGLSASTGLYK(E)	(K)SNSTHETNALHFMFNQFSK(D)
(R)FDSAFTDVTGLFR(G)	(K)SPDSHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGR(L)
(R)SGTVQVQVEPDSPAFAEADR(L)	(R)LSAVVSYPNADSATVSYDVDLDNVLPEWVR(V)
(R)IHDPEVQAKMFQAIGFSEEAAR(E)	

Protéines qui possèdent des homologies avec les séquences peptidiques du spot 2

Species	Protéines	N° Accession SwissProt	(%) Masses Matched	Protein MW (Da)/pI
CANEN	**Concanavalin A precursor (Con A)**	**P02866**	**5/88 (5%)**	**31480.6 / 5.47**
HELPJ	Carbon storage regulator homolog	Q9ZJH4	4/88 (4%)	8425.9 / 5.78
CANGL	**Concanavalin A precursor (Con A)**	**P14894**	**4/88 (4%)**	**31421.5 / 5.64**
CANLI	**Concanavalin A (Con A)**	**P81460**	**5/88 (5%)**	**25497.4 / 5.43**
CANVI	**Concanavalin A (Con A)**	**P81461**	**5/88 (5%)**	**25539.5 / 5.43**
DEIRA	Aspartyl-tRNA synthetase (Aspartate--tRNA ligase)	Q9RUN7	4/88 (4%)	64232.3 / 5.05
HUMAN	Zinc finger protein ZFD25	Q9UII5	6/88 (6%)	90673.2 / 9.43
ARATH	Signal recognition particle 54 kDa protein 3 (SRP54)	P49967	4/88 (4%)	54782.2 / 9.02
SOLTU	Maturase K (Intron maturase)	P32088	6/88 (6%)	60163.9 / 9.56
ECOLI	KLEA protein (KCRA1 protein)	Q52278	4/88 (4%)	8641.8 / 5.08

Protéines qui possèdent des homologies avec les séquences peptidiques du spot 3

Species	Protéines	N° Accession SwissProt	(%) Masses Matched	Protein MW (Da)/pI
CANVI	**Concanavalin A (Con A)**	**P81461**	**7/119 (5%)**	**25539.5 / 5.43**
METJA	Hypothetical protein MJ1321	Q58717	7/119 (5%)	84583.5 / 8.99
CANBR	**Concanavalin BR (Con BR)**	**P55915**	**6/119 (5%)**	**25567.6 / 5.84**
CANEN	**Concanavalin A precursor (Con A)**	**P02866**	**7/119 (5%)**	**31480.6 / 5.47**
YEAST	Hypothetical 27.6 KD protein	P53718	5/119 (4%)	27564.4 /10.04
CANGL	**Concanavalin A precursor (Con A)**	**P14894**	**5/119 (4%)**	**31421.5 / 5.64**
MOUSE	DEAD-box protein 4 (VASA homolog) (Mvh)	Q61496	6/119 (5%)	76470.7 / 5.78
STRPN	Glutamyl-tRNA synthetase (Glutamate--tRNA ligase	Q97NG1	5/119 (4%)	55961.5 / 4.91
CAUCR	Alanyl-tRNA synthetase (Alanine--tRNA ligase)	Q9A5C1	7/119 (5%)	93643.0 / 5.35
HUMAN	Sorting nexin 27	Q96L92	5/119 (4%)	50880.2 / 5.79

% Masses matched : nombre de peptides qui matchent avec la protéine théorique

l'existence d'homologies de séquence avec des chitinases d'insectes. Toutefois, l'interrogation des bases de données a permis de montrer des homologies de séquences avec plusieurs protéines mais principalement avec de la concanavaline A de diverses espèces (**Tableau 7** et **Annexe 3**). Les peptides issus du spot 2 permettent de recouvrir entre 16 et 30% des séquences connues de concanavaline A de diverses espèces, alors que les peptides du spot 3 recouvrent jusqu'à 46% des séquences de cette famille de lectines (**Annexe 3**).

4. Discussion

Les différentes étapes de purification et de caractérisation nous montrent l'isolement d'une protéine d'environ 31 kDa présentant une activité chitinase inhibée par l'allosamidine et la psammapline A. Toutefois, l'analyse en MALDI-TOF de cette protéine isolée et purifiée, a montré que la protéine possède principalement des homologies de séquences avec la concanavaline A et non avec les chitinases d'insectes déjà caractérisées.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées suite à ces résultats :

- La chitinase de *M. persicae* est présente en très faible quantité dans l'échantillon purifié mais elle est masquée par une grande quantité de concanavaline A.
- La protéine purifiée est une chitinase et possède des caractéristiques communes avec la concanavaline A. Il pourrait alors s'agir d'une chitinase avec une structure de lectine ou d'une lectine présentant des activités chitinolytiques.

La première hypothèse repose plutôt sur des contraintes expérimentales. En effet, les résultats obtenus en MALDI-TOF montrent que les peptides issus de la digestion trypsique de l'échantillon présentent de fortes homologies de séquences essentiellement avec la concanavaline A. La présence d'une activité chitinolytique avant et après passage sur la colonne de concanavaline A suggère que des protéines possédant une activité chitinase ont été éluées. Toutefois, on peut également supposer qu'au cours de la phase finale de purification, de la concanavaline A ait été éluée en grande quantité par rapport aux chitinases. Les volumes d'échantillons utilisés pour les mesures d'activités et pour les analyses SDS-PAGE étant différents, la chitinase est peut-être masquée par la forte quantité de concanavaline A présente dans l'échantillon.

La seconde hypothèse est basée sur le fait que de nombreuses lectines présentent des caractéristiques communes avec des chitinases et notamment des domaines de liaison à la chitine, contenant des résidus cystéines au nombre de six ou huit en position *N*-terminale. C'est le cas des lectines d'amibes: la lectine EiJacob1 d'*Entamoeba invadens* possède cinq

domaines de liaison à la chitine, composés de six cystéines. *E. histolytica* produit également de nombreuses lectines de type Jessie et des chitinases, qui possèdent un unique site de liaison à la chitine, composé de huit cystéines en position *N*-terminale. Toutefois, ces domaines de liaison à la chitine ne présentent pas d'homologie avec les domaines de liaison à la chitine trouvés chez les chitinases d'insectes ni chez les lectines végétales (Van Dellen et al., 2002; Van Dellen et al., 2006).

Les protéines se liant à la chitine sont également décrites chez les plantes. Le cDNA d'une lectine d'ortie a permis de mettre en évidence deux domaines de liaisons à la chitine en position *N*-terminale. Chez cette lectine, il existe aussi en position *C*-terminale, un domaine qui présente des homologies partielles avec le domaine catalytique des chitinases végétales. L'expression dans *Escherichia coli* de ce domaine chitinase-like seul ou associé au domaine de liaison à la chitine aboutit à la production d'une protéine présentant une activité chitinolytique (Lerner et Raikhel, 1992).

Van Damme et al. (2006) ont identifié une nouvelle famille de lectines chez le robinier faux-acacia qui possède de fortes homologies de structures (plus de 50%) avec les chitinases végétales de la classe V qui appartiennent à la famille 18. Toutefois, ces lectines sont dépourvues d'activité chitinolytique. Les auteurs suggèrent que ces lectines auraient pu dériver des chitinases en perdant leur activité chitinolytique.

Certains insectes produisent également des lectines qui sont impliquées dans les mécanismes de réponses immunitaires. C'est notamment le cas chez certains diptères du genre *Sarcophaga*, dont les lectines possèdent des sous-unités possédant un poids moléculaire d'environ 30 à 35 kDa (Komano et al., 1981). Une lectine de l'hémolymphe de la blatte *Periplaneta* participant processus de régénération des organes et agissant comme une opsonine, possède également un poids moléculaire d'environ 30 kDa et présente la caractéristique de se lier à des groupements *N*-acétyl-galactosamine (Kubo et al., 1996).

Enfin, certaines chitotriosidases humaines possédant un poids moléculaire de 39kDa, identique à celui des lectines YM1 et HCgp-39 de mammifères qui se lient à la chitine, présentent de très fortes homologies de séquences avec de chitinases de la famille 18 mais ne possèdent pas d'activité chitinase. Ces deux lectines dériveraient des chitotriosidases, par mutation de résidus du site actif (Fusetti et al., 2002).

La protéine que nous avons isolée chez *M. persicae* présente des caractéristiques proches des lectines, avec un poids moléculaire d'environ 31 kDa qui correspond à la fois à celui des chitinases végétales en général, mais aussi au poids moléculaire des lectines. De

plus, les tests d'activité sur gel montre qu'une protéine d'environ 30 kDa présente une activité chitinolytique. Tous les éléments décrits ci-dessus montrent que les lectines et les chitinases pourraient donc avoir une origine commune. Nos résultats nous laisse supposer que la protéine que nous avons purifiée chez *M. persicae* pourrait être une lectine avec une activité chitinase ou une chitinase-like possédant des homologies de séquences avec des lectines. Des analyses complémentaires seront donc nécessaires afin de mieux caractériser cette protéine de *M. persicae*, telles qu'un séquençage en MS-MS et des comparaisons de séquences (EST et peptidiques) afin d'en déterminer la structure et la nature. Si nos résultats se confirment, nos travaux constitueraient pour la première fois la description, chez un insecte, d'une chitinase se rapprochant davantage des chitinases végétales et des lectines que des chitinases d'insectes.

Troisième partie

Identification de nouveaux oligosaccharides aux propriétés aphicides

1. Introduction

Parmi les molécules qui peuvent être considérées comme des inhibiteurs de chitinases, les oligo- ou polysaccharides sont de très bons candidats en raison de leurs propriétés mimétiques. Les polysaccharides ont souvent été décrits dans l'inhibition des endoglycosidases. Ainsi, les amylostatines (Fukuhara et al., 1982) et les liposaccharides bactériens (Ohno et Morisson, 1989) inhibent respectivement les α-glucosidases et les lysozymes.

Le chitosan est un polysaccharide biodégradable, non toxique pour les mammifères et composé d'unités *N*-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine. Obtenu par *N*-déacétylation de la chitine, il est employé pour diverses applications biotechnologiques, notamment dans les domaines médicaux et pharmaceutiques (fils de suture chirurgicaux résorbables, lentilles de contact, cicatrisants cutanés ou oculaires, enrobages des médicaments), en cosmétique (émulsifiant, soins capillaires), en agroalimentaire (préparation des jus de fruits et du café soluble) et dans le domaine agricole (enrobage de semences, éliciteurs de la défense des plantes ou fertilisant des sols). De nombreux dérivés sont produits par modification des groupements fixés sur le chitosan (Muzzarelli et al., 1999; Desbrières, 2002).

Au delà des applications décrites ci-dessus, le chitosan présente des effets antifongiques contre les champignons pathogènes des cultures, *Botrytis cinerea* et *Pyricularia grisea,* en inhibant la croissance mycélienne et la germination des conidies. Des propriétés insecticides sont également rapportées. Ainsi, les lépidoptères *Spodoptera littoralis, Helicoverpa armigera* et *Plutella xylostella*, mais aussi les pucerons *Aphis gossypii, Metopolophium dirhodum, Hyalopterus pruni*, *Rhopalosiphum padi, Sitobion avenae* et *Myzus persicae,* sont affectés par un traitement avec du chitosan. Les larves d'insectes intoxiquées par ce composé présentent un développement larvaire anormal, avec une inhibition de la prise alimentaire, des mues interrompues et surtout une augmentation de la mortalité (Rabea et al., 2006). Toutefois, les cibles et mécanismes d'actions de ce composé ne sont pas connus et, à notre connaissance, le chitosan n'est pas rapporté comme un inhibiteur de chitinases. Toutefois, l'origine et les homologies de structure de ce composé avec la chitine laissent supposer que le chitosan pourrait être un substrat des chitinases. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'allosamidine, qui mime la chitine et le chitosan, est décrit comme étant l'inhibiteur de chitinase le plus puissant (Sakuda et al., 1987). Un autre polysaccharide, le FPS-1, possède également des propriétés inhibitrices, comparables à celles de l'allosamidine, contre les chitinases de *S. litura* (Nitoda et al., 2003a).

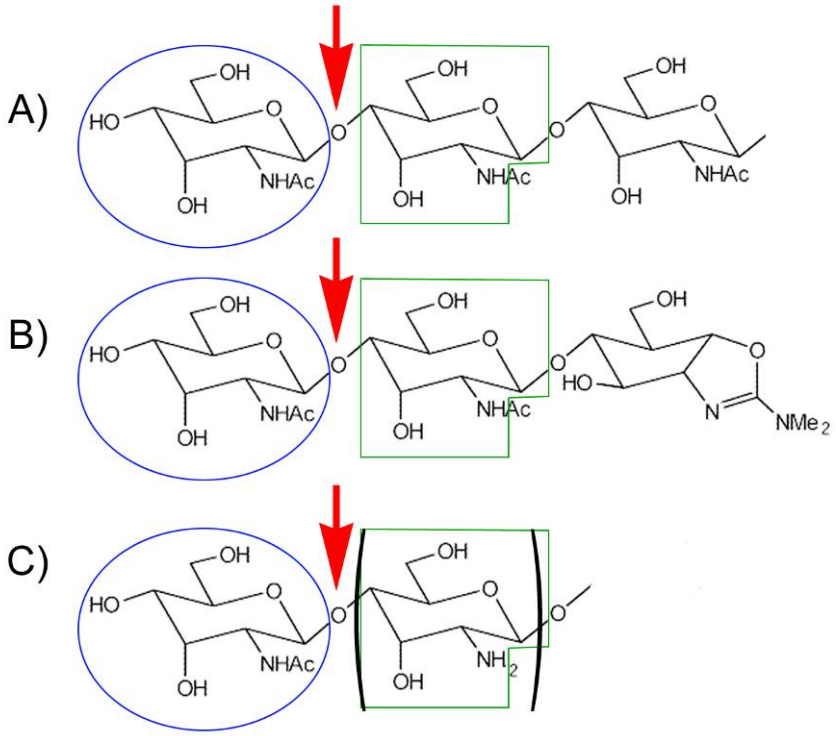
La comparaison des structures de l'allosamidine, du chitosan, de leurs dérivés respectifs et du FPS-1 montre que ces composés présentent au moins un résidu *N*-acétylglucosamine, lié à une unité glucosamine par une liaison β-1,4 glycosidique (**Figure 24**). De plus, ces composés miment la structure de la chitine, substrat naturel des chitinases et ces oligosaccharides présentent par ailleurs des effets inhibiteurs très marqués chez les champignons et les insectes. C'est pourquoi, dans le cadre d'une recherche de nouveaux inhibiteurs de chitinases, nous avons envisagé la recherche de nouveaux oligo- ou polysaccharides aux propriétés aphicides et insecticides.

Dans ce contexte nous avons développé une collaboration avec le laboratoire des Glucides (UMR 6219-CNRS) de l'Université de Picardie Jules Verne qui développe des travaux sur les oligosaccharides et effectue des modifications de leurs structures. Parmi les molécules dont dispose ce laboratoire, nous avons sélectionné une molécule que nous dénommerons pour des raisons de confidentialité DP2S. Ce composé est obtenu par synthèse organique à partir de glucose et de glucosamine et la synthèse aboutit à la formation d'un mélange racémique de composés présentant des liaisons α-1,4 et β-1,4 (Laurent Bultel, communications personnelles). Le DP2S est un co-produit non valorisé jusqu'à présent. C'est un disaccharide substitué qui possèdent des homologies de structure avec la chitine et les inhibiteurs de chitinases polysaccharidiques déjà décrits et possèdent une liaison β-1,4 hydrolysable par des chitinases. Le DP2S a été purifié et analysé par RMN par le laboratoire des Glucides avant de nous être fourni.

2. Matériel et Méthodes

Des pucerons adultes *M. persicae* et *M. euphorbiae*, élevés au laboratoire, dans des conditions de reproduction parthénogénétique et sur plants de pommes de terre, ont été isolés et placés dans des cages de PVC sur milieu artificiel pendant une journée afin de synchroniser la descendance. Les néonates du puceron *M. persicae*, âgés de moins de 24 h sont alors placés sur milieu artificiel contenant des concentrations variant de 0 à 100 $\mu g.mL^{-1}$ en DP2S selon le protocole décrit précédemment (Saguez et al., 2006), afin de mesurer la durée du développement larvaire, la mortalité larvaire et la fécondité et de déterminer divers paramètres démographiques des pucerons (taux intrinsèque d'accroissement des population et temps de doublement). Un minimum de 50 pucerons de chaque espèce est testé par traitement et les individus sont suivis quotidiennement. La taille des pucerons a été mesurée une semaine après le début de l'expérience, sous loupe binoculaire à l'aide d'un oculaire biométrique. Les effets

Figure 24 : Comparaison des oligosaccharides mimant la chitine et présentant des effets aphicides. A) Chitine ; B) Allosamidine ; C) Chitosan. Les trois composés présentent un groupement N-acétyl-glucosamine (cercle bleu), une liaison β-1,4 (flèche) et un groupement N-glucosamine.



du DP2S sur la survie larvaire sont analysés par un test du χ^2 de Pearson. Une analyse de variance (ANOVA monofactorielle) a été réalisée avec le logiciel Statistica 5.5 (StatSoft®, Tulsa, Oklahoma, USA) pour tester les effets du DP2S sur les paramètres démographiques des aphides. Les paramètres significativement altérés sont ensuite analysés par un test de Fisher (PLSD) au seuil de significativité P <0,05.

3. Résultats

Les résultats montrent des effets délétères du DP2S sur les deux espèces de pucerons, avec des effets plus marqués chez *M. euphorbiae* que sur *M. persicae*. Quelle que soit l'espèce de puceron, la survie larvaire est significativement affectée par le DP2S. On observe ainsi une réduction de la survie larvaire d'environ 35 à 40% aux concentrations de 10 à 100 µg.mL^{-1} chez *M. persicae* (χ^2 = 89,19 dl=30 p<0,00 ; χ^2 = 94,90 dl=30 p<0,00 ; χ^2 = 77,82 dl=30 p<0,00) alors que chez *M. euphorbiae*, la mortalité larvaire atteint 49 à 53% aux concentrations respectives de 50 et 100 µg.mL^{-1} (χ^2 = 108,06 dl=30 p<0,00 ; χ^2 = 151,97 dl=30 p<0,00). De plus, pour ces concentrations, de nombreux individus n'atteignent pas l'état adulte et meurent après un mois de traitement, sans avoir pu engendrer de descendance alors que sur un milieu non complémenté en DP2S, l'ensemble des individus devient adulte en deux semaines (**Figure 25**).

Les processus de mue sont affectés lorsque les pucerons sont élevés sur un milieu artificiel complémenté avec du DP2S à 50 et 100 µg.mL^{-1}. Ainsi, de nombreux aphides n'arrivent pas à terminer leur mue et meurent avant même d'avoir pu s'extraire de leur ancienne cuticule. Chez ces individus, le temps qui sépare deux mues successives est également augmenté (données non montrées). La taille des pucerons est uniquement réduite chez *M. euphorbiae* (**Tableau 8**) aux concentrations de DP2S variant de 10 à 100 µg.mL^{-1}. Quel que soit le paramètre étudié et l'espèce de puceron considérée, les effets aphicides maximum sont obtenus dès la concentration de 50 µg.mL^{-1}. Les effets sont similaires aux concentrations de 50 et 100 µg.mL^{-1}.

La durée de la période pré-reproductive est également affectée par un apport en DP2S dans l'alimentation des pucerons, puisqu'elle est augmentée d'environ une journée chez *M. persicae* et de deux jours aux plus fortes concentrations chez *M. euphorbiae*. Les paramètres démographiques des adultes (fécondité, période d'oviposition, fécondité journalière, taux intrinsèque d'accroissement naturel et temps de doublement des populations) sont également modifiés lorsque les pucerons sont alimentés sur un milieu complémenté en

Figure 25 : Mortalité larvaire des pucerons *M. persicae* et *M. euphorbiae* élevés sur milieux artificiels complémentés en DP2S à des concentrations variant de 0 à 100 µg.mL^{-1}

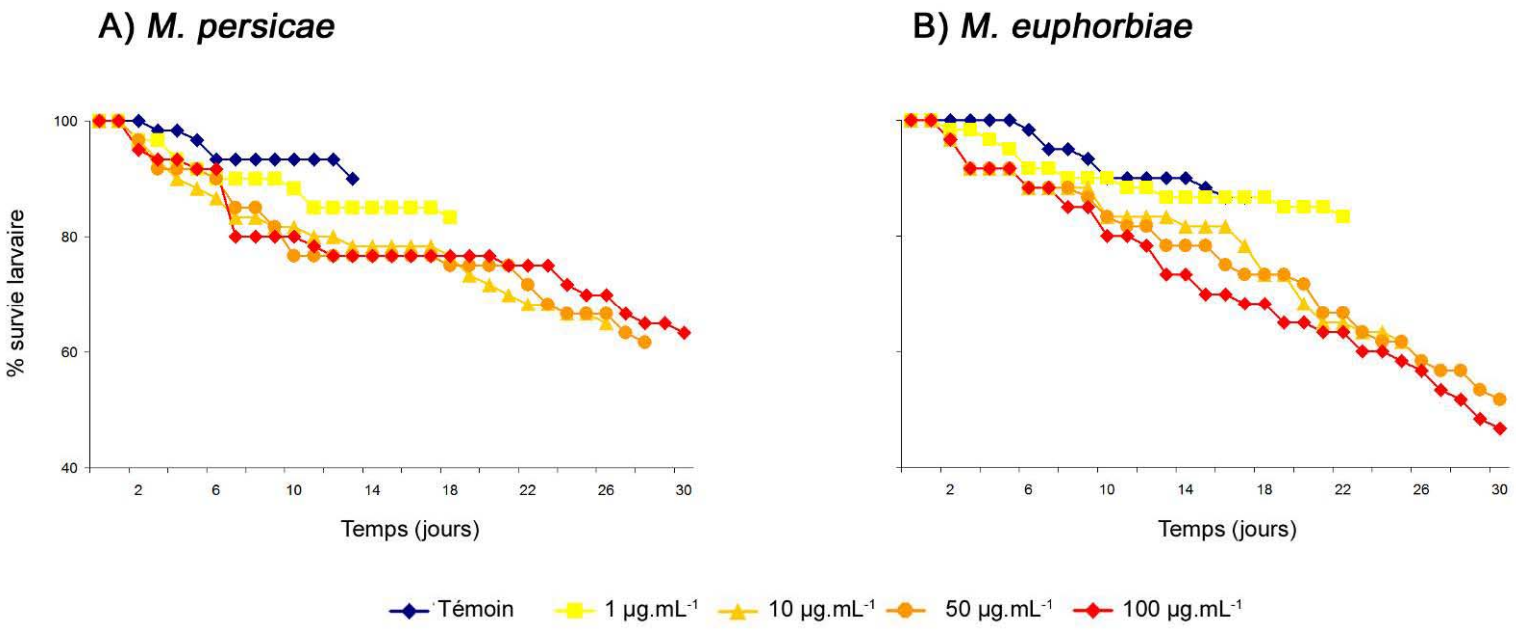


Tableau 8 : Effets du DP2S sur la taille de *M. euphorbiae* alimenté sur milieu artificiel à des concentrations variant de 0 à 100 µg.mL^{-1} après 7 jours de traitement

	Témoin n = 37	1 µg.mL^{-1} n = 33	10 µg.mL^{-1} n = 33	50 µg.mL^{-1} n = 32	100 µg.mL^{-1} n = 33	F	P
Taille des pucerons (en mm)	2,3 ± 0,3 ^{a}	2,2 ± 0,3 ^{a}	2,1 ± 0,3 ^{b}	1,8 ± 0,2 ^{bc}	1,7 ± 0,2 ^{c}	37,6	<0,00*

n : nombre de pucerons testés
Les résultats sont exprimés sous la forme : moyenne ± écart-type. L'effet significatif (*) été testé par une analyse de variance monofactorielle (F) à P<0.05. Les valeurs de même rang suivies par une même lettre indiquent qu'il n'existe pas de différence significative d'après le test du PLSD de Fisher (P<0.05).

DP2S, et les effets sont marqués pour toutes les concentrations (**Tableau 9**). Ainsi, la fécondité journalière est réduite de 10 à 35% sur les milieux contenant de 10 à 100 µg.mL^{-1} de DP2S et de façon dose-dépendante. La valeur du taux intrinsèque d'accroissement des populations (r_m) qui tient compte des paramètres précédents est également réduite chez les deux espèces d'aphides, y compris pour la concentration la plus faible de 1 µg.mL^{-1}. Concernant le temps de doublement des populations, qui dépend directement du r_m, il est significativement augmenté d'environ 1,5 à 2 jours pour les concentrations les plus élevées chez *M. persicae* et de près de 4 jours chez *M. euphorbiae*.

L'ensemble de ces résultats nous permet donc de conclure que cet oligosaccharide induit des effets aphicides très marqués sur les deux espèces de pucerons *M. persicae* et *M. euphorbiae*.

4. Discussion

Le DP2S présente des effets délétères sur les pucerons en perturbant à la fois le développement larvaire et les processus de reproduction. Le DP2S altère les processus de mues et le développement larvaire des pucerons. En effet, nos travaux montrent que la durée de la période prépreproductive est significativement augmentée et que de nombreux aphides meurent avant même d'avoir pu effectuer complètement leur mue. Les aphides survivants possèdent également une taille inférieure (**Tableau 9**) après une semaine d'alimentation sur un milieu complémenté en DP2S et certains d'entre eux ne produisent pas de descendance. Or, la taille des pucerons est un paramètre important dans la reproduction puisque des pucerons de taille réduite sont généralement moins féconds (Kempton et al., 1980; Rahbé et al., 2003b). Ces différences de taille pourraient expliquer pourquoi en présence de DP2S, de nombreux pucerons ne produisent pas de descendance. L'absence de descendance et la réduction de fécondité observées chez *M. persicae* pourraient également être dues à l'inhibition des chitinases nécessaires au remodelage des structures lors du développement embryonnaire des pucerons.

Bien que nous ne soyons pas en mesure aujourd'hui de confirmer que les chitinases sont des cibles du DP2S, on peut toutefois largement supposer que cette molécule affecte leur métabolisme. En effet, puisque le DP2S présente des homologies de structures avec la chitine et les inhibiteurs de chitinase d'origine polysaccharidique et qu'il induit des effets comparables à ceux obtenus avec les inhibiteurs, on peut supposer que ce composé se lie directement au site actif des chitinases d'insectes et qu'il exerce une fonction inhibitrice.

Tableau 9 : Effets du DP2S sur les paramètres démographiques de *M. persicae* et *M. euphorbiae* alimentés sur milieu artificiel à des concentrations variant de 0 à 100 µg.mL^{-1}

Paramètres démographiques de *M. persicae*	Témoin n = 54	1 µg.mL^{-1} n = 50	10 µg.mL^{-1} n = 39	50 µg.mL^{-1} n = 37	100 µg.mL^{-1} n = 38	F	P
Période prépreproductive (jours)	10,6 ± 1,4 [a]	11,6 ± 1,9 [b]	10,9 ± 1,5 [a]	11,1 ± 1,4 [a]	11,9 ± 1,7 [b]	4,5	<0,00*
Fécondité journalière (larves.femelles^{-1}.jour-^{1})	1,07 ± 0,28 [a]	0,99 ± 0,27 [a]	0,91 ± 0,28 [b]	0,74 ± 0,24 [bc]	0,65 ± 0,11 [bc]	20,9	<0,00*
r_m (femelles.femelles^{-1}.jours^{-1})	0,16 ± 0,05 [a]	0,13 ± 0,04 [b]	0,13 ± 0,03 [b]	0,12 ± 0,03 [bc]	0,11 ± 0,03 [c]	11,2	<0,00*
Temps de doublement de la population (jours)	4,4 ± 0,9 [a]	5,6 ± 1,8 [b]	5,4 ± 1,2 [b]	5,9 ± 1,6 [b]	6,5 ± 2,0 [a]	10,9	<0,00*

Paramètres démographiques de *M. euphorbiae*	Témoin n = 52	1 µg.mL^{-1} n = 50	10 µg.mL^{-1} n = 37	50 µg.mL^{-1} n = 31	100 µg.mL^{-1} n = 28	F	P
Période prépreproductive (jours)	11,6 ± 2,1 [a]	11,3 ± 2,1 [a]	12,1 ± 1,6 [a]	13,4 ± 1,2 [b]	13,5 ± 1,6 [b]	10,8	<0,00*
Fécondité journalière (larves.femelles^{-1}.jour-^{1})	1,13 ± 0,36 [a]	1,16 ± 0,36 [a]	1,06 ± 0,34 [a]	0,81 ± 0,20 [b]	0,73 ± 0,22 [b]	13,3	<0,00*
r_m (femelles.femelles^{-1}.jours^{-1})	0,16 ± 0,05 [a]	0,16 ± 0,04 [b]	0,13 ± 0,03 [b]	0,09 ± 0,03 [c]	0,08 ± 0,03 [c]	52,3	<0,00*
Temps de doublement de la population (jours)	4,4 ± 0,9 [a]	4,7 ± 1,0 [ab]	5,5 ± 1,3 [b]	8,1 ± 1,6 [c]	6,5 ± 2,0 [c]	58,8	<0,00*

n : nombre de pucerons testés

Les résultats sont exprimés sous la forme : moyenne ± écart-type. rm : taux intrinsèque d'accroissement. L'effet significatif (*) ou non significatif (ns) a été testé par une analyse de variance monofactorielle (F) à P<0.05. Les valeurs de même rang suivies par une même lettre indiquent qu'il n'existe pas de différence significative d'après le test du PLSD de Fisher (P<0.05).

Si l'on peut considérer que le métabolisme des chitinases est une cible et qu'il est dérégulé en présence de DP2S, on ne peut toutefois pas exclure l'action de cette molécule sur d'autres cibles telles que des glucose hydrolases ou des glycosidases. En effet, les chitinases appartiennent à cette famille d'enzymes qui regroupe également des lactases, des amylases, des maltases et des sucrases. Chez les pucerons, les sucrases ou saccharases sont notamment impliquées dans la dégradation du saccharose et hydrolysent les liaisons entre les résidus glucose et fructose du saccharose. Elles participent aux processus d'osmorégulation en libérant des résidus glucose qui sont ensuite polymérisés pour donner de nouveaux oligosaccharides qui réduisent les différences de pression osmotique entre le tube digestif et l'hémolymphe. La prise alimentaire et le développement des pucerons sont altérés lorsque les sucrases sont inhibées par l'acarbose (Karley et al., 2005). Le DP2S étant produit à partir de glucose et de *N*-glucosamine, on peut donc supposer qu'il interagit avec les sucrases dont il inhiberait l'activité.

Cette étude constitue des travaux préliminaires qui nécessitent la réalisation de recherches complémentaires afin de déterminer les cibles d'action de ces oligosaccharides, mais ouvrent de nouvelles perspectives dans le développement de méthodes de lutte alternatives contre les pucerons et les insectes en général.

Discussion générale
Conclusions et Perspectives

Au cours de ces chapitres, nous avons abordé les différents aspects de la dérégulation du métabolisme des chitinases chez les pucerons. Nos travaux soulignent l'importance majeure du métabolisme et de l'activité des chitinases dans le développement des pucerons.

L'apport de chitinases dans l'alimentation de *M. persicae* via l'expression d'une chitinase d'insecte *in planta* et l'incorporation d'une chitinase bactérienne délivrées via un milieu artificiel, induisent des effets probiotiques. Ces effets se caractérisent par une augmentation de la fécondité, mais aussi une réduction de la mortalité et du temps de doublement des populations. On peut donc supposer que les pucerons détournent le métabolisme des chitinases et exploitent ces enzymes en tant que source d'énergie.

La qualité nutritive des plantes et le ratio entre les composés carbonés et azotés sont des facteurs déterminants dans le développement des pucerons (Karley et al., 2002; Douglas et al., 2006). Au cours de nos travaux, nous avons constaté que l'infestation des plantes par des pucerons induit une augmentation des activités chitinolytiques (résultats non présentés). Or, les chitinases végétales sont des protéines de défense induites suite à un stress abiotique ou biotique notamment lors de l'attaque par des pathogènes ou des ravageurs et permettent d'assurer une meilleure protection et un meilleur développement des plantes.

Les chitinases végétales étant impliquées dans les processus de développement et de maturation chez les végétaux, les taux de chitinases sont particulièrement élevés dans les parties jeunes des plantes et les feuilles sénescentes. C'est également à ces niveaux que les concentrations en matières azotées et en carbohydrates sont très élevées et où le puceron *M. persicae* se développe préférentiellement (van Emden et al., 1969) car il peut puiser, dans la sève élaborée, les éléments nécessaires à son développement. Toutefois, le ratio en acides aminés et carbohydrates varie fortement et les aphides ont développé une endosymbiose obligatoire avec des bactéries du genre *Buchnera* qui néosynthétisent les acides aminés essentiels pour les pucerons (Douglas, 1998). En induisant la synthèse de chitinases végétales, on peut donc supposer que le puceron assure le bon développement de la plante et qu'il détourne une partie des composés végétaux pour son propre métabolisme et notamment une partie des acides aminés. De plus, les performances de développement des pucerons sont meilleures quand les concentrations en sucres sont faibles (Douglas et al., 2006). Les concentration en sucres influencent aussi le développement des bactéries endosymbiotiques et donc la synthèse des acides aminés essentiels pour le puceron (Wilkinson et al., 2001; Douglas et al., 2006). Les chitinases végétales permettraient de réduire ces taux de sucres et de favoriser les processus d'osmorégulation.

En détournant le métabolisme des plantes, les pucerons seraient donc capables d'effectuer un gain d'énergie qui serait alors dévolu à d'autres fonctions telles que la reproduction et expliquerait les effets probiotiques observés.

Les effets probiotiques peuvent également être dus aux chitinases elles-mêmes. Lors de la purification des chitinases de *M. persicae*, nous avons isolé une protéine de 31 kDa présentant une activité chitinase et dont l'analyse peptidique montre des homologies de séquences avec des lectines. Si les chitinases de puceron présentent des homologies de séquences avec les lectines et possèdent des caractéristiques qui les rapprochent davantage des chitinases végétales que des chitinases d'insectes, on peut se demander quel peut être l'avantage pour le puceron de produire de telles chitinases. Puisque les pucerons induisent la synthèse des chitinases végétales et qu'ils synthétiseraient une chitinase proche des chitinases végétales, on peut émettre l'hypothèse qu'il s'agirait d'adaptations évolutives, permettant au puceron d'exploiter les chitinases végétales pour son développement en réduisant dans un même temps la synthèse de ses propres chitinases. Cela permettrait également de justifier l'éloignement phylogénétique entre les chitinases de pucerons et de lépidoptères. Enfin, on peut également envisager que la production d'une chitinase de faible poids moléculaire chez les pucerons permette de réaliser un gain d'énergie et d'acides aminés qui peuvent être exploités dans d'autres processus physiologiques, les acides aminés étant un facteur limitant dans le développement des aphides.

L'importance du métabolisme des chitinases dans le développement des pucerons a été confirmée par diverses expériences dans lesquelles il est fait mention des effets liés aux faibles taux d'expression des chitinases ou de l'inhibition de ces enzymes. Le taux de chitinases exprimé par les plantes influence fortement le développement des populations de pucerons. L'action des phytohormones induit des variations dans l'accumulation de chitinases dans les plantes. Ainsi, un traitement des plantes avec des cytokinines inhibe l'accumulation de transcrits et d'activité chitinases (Shinshi et al., 1987). De plus, une réduction du taux de chitinases dans des plantes qui surexpriment des cytokinines induit une inhibition du développement du puceron *M. persicae* (Smigocki et al., 1993). Comme nous avons remis en cause l'utilisation d'une stratégie de lutte basée sur les chitinases en tant que biopesticides, nous avons envisagé une approche antagoniste. Les propriétés antibactériennes, antifongiques et insecticides des inhibiteurs de chitinases ont souvent été rapportées. Pour la première fois, nous avons évalué et décrit chez les homoptères, les effets d'une dérégulation du métabolisme des chitinases par inhibition. Les effets délétères obtenus sur les pucerons, caractérisés par

une augmentation de la mortalité larvaire, mais aussi par un retard de développement, une réduction de la fécondité et une augmentation du temps de doublement des populations, soulignent l'intérêt d'une stratégie anti-chitinase dans un contexte de phytoprotection. En découvrant les propriétés aphicides de nouveaux oligosaccharides, nous avons confirmé l'importance du mimétisme des composés saccharidiques dans la lutte contre les insectes et nous avons ouvert de nouvelles voies de recherches pour l'élaboration de nouveaux composés phytosanitaires. Tous ces résultats nous encouragent donc à poursuivre nos efforts de recherche dans l'inhibition du métabolisme des chitinases et offrent des perspectives à plus ou moins long terme.

A court terme, il conviendra de mettre en place diverses expériences pour :

- Effectuer une caractérisation fine des chitinases de *Myzus persicae*. Il serait intéressant dans un premier temps de comparer les séquences peptidiques avec les bases de données des chitinases de plantes pour confirmer qu'il existe des homologies de séquences avec la protéine isolée chez *M. persicae*. Si les résultats se confirment, il faudra aller rechercher dans les banques d'EST disponibles de pucerons (*Acyrthosiphon pisum*, *Aphis gossypii*, *Rhopalosiphum padi* et *M. persicae*), les séquences nucléotidiques codant pour des chitinases ou des chitinase-like afin de pouvoir cloner le gène.
- Approfondir l'étude des interactions entre les inhibiteurs et les chitinases purifiées. Pour cela, il est possible de réaliser des études cristallographiques. En effet, la cristallographie permet d'étudier la structure des protéines dans leur conformation tridimensionnelle mais permet également de déterminer la nature des liaisons qui s'établissent entre le site actif des protéines et l'inhibiteur. Ces études devraient permettrent de mieux comprendre les différences d'effets observés lors des tests de prises alimentaires effectués avec les divers inhibiteurs.

Une meilleure connaissance des chitinases de puceron permettra d'améliorer la recherche de nouveaux inhibiteurs de chitinases qui peuvent être de nature variée. Nous avons vu que les oligosaccharides (allosamidine, chitosan, FPS-1 et DP2S) inhibent la croissance des insectes. Chez les pucerons, en raison de la courte durée de développement larvaire, les processus de mues sont très rapides. La production de chitinase doit donc être brève et on peut imaginer que les régulations d'activités chitinolytiques puissent s'effectuer par inhibition des chitinases. Dans ce cas, des inhibiteurs de type peptidiques pourraient également être impliqués dans la régulation du métabolisme des chitinases. La chitinase purifiée pourra être utilisée pour effectuer des chromatographies d'affinité ou pour effectuer des analyses

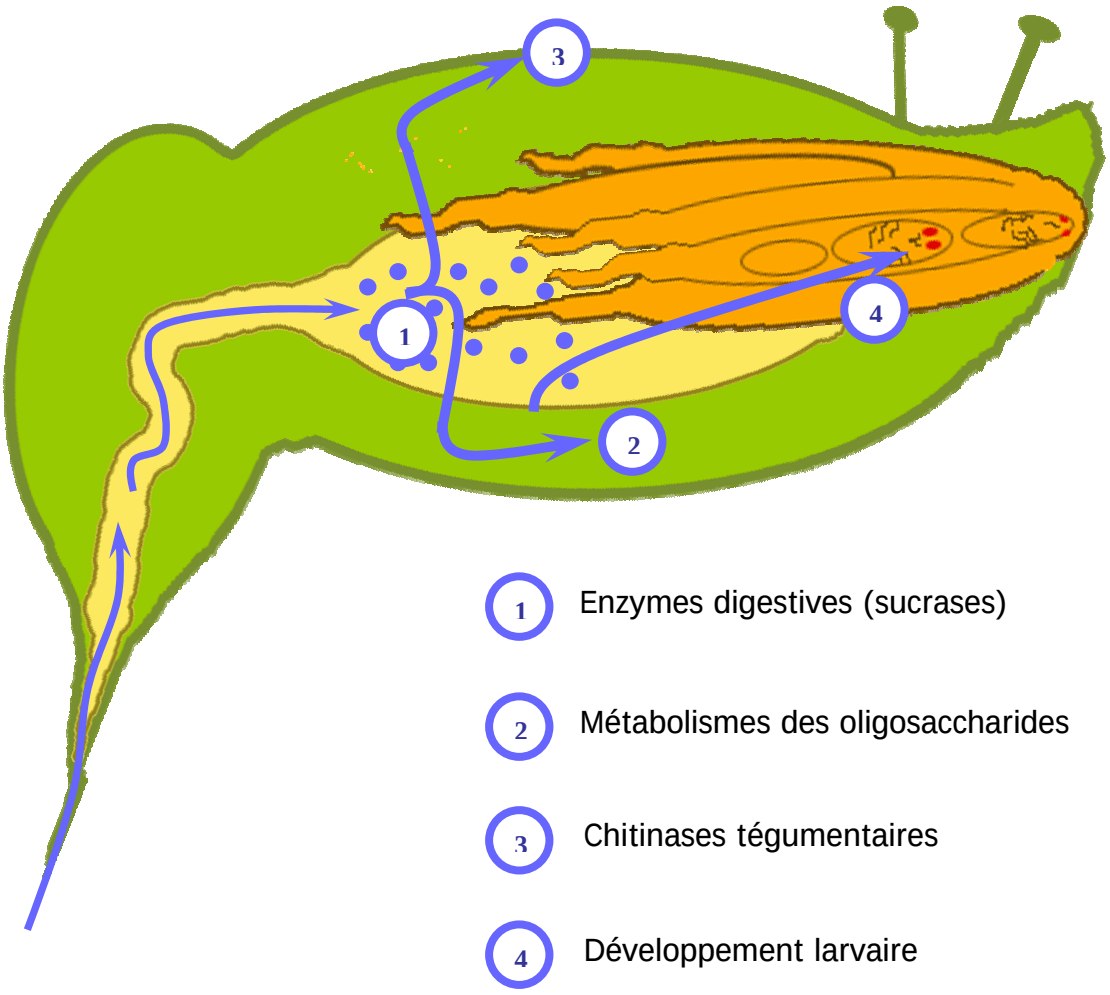
d'interactions par la technique du BIACORE qui devraient permettre de mettre en évidence l'existence de tels inhibiteurs dans l'hémolymphe des pucerons.

Les oligosaccharides constituent des inhibiteurs d'intérêt dans la lutte contre les pucerons et les insectes en général. Les travaux que nous avons initiés avec le DP2S devront être poursuivis par la réalisation de plusieurs expériences.

- Il sera nécessaire de confirmer l'inhibition des chitinases de pucerons par les oligosaccharides et d'établir que ces inhibiteurs interagissent bien avec les chitinases de pucerons, en effectuant des dosages d'activité en présence de la protéine purifiée. Des études cristallographiques permettraient également de déterminer les interactions établies avec le site actif des chitinases.
- La recherche des cibles de ces oligosaccharides devra être envisagée au travers d'études d'immunolocalisation (**Figure 26**).
- Il sera également intéressant d'évaluer l'impact des groupements substitués sur les oligosaccharides en observant l'influence du nombre de groupements substitués, qui peut modifier la structure et l'encombrement stérique des molécules et en évaluant l'impact de la nature des groupements substitués qui peuvent également modifier la nature et la force des interactions entre l'inhibiteur et l'enzyme. Des études sont en cours sur un intermédiaire réactionnel du DP2S.

A moyen terme, dans le cadre de programmes de phytoprotection, il conviendra d'élargir la connaissance des effets de ces oligosaccharides à d'autres types d'insectes et pathogènes des cultures, tels le doryphore ou le mildiou de la pomme de terre *Phytophtora infestans*. Si les pathogènes et ravageurs des cultures sont les cibles principales d'une stratégie de dérégulation du métabolisme des chitinases, on devra également évaluer l'impact de ces inhibiteurs sur les insectes auxiliaires. En effet, étant eux mêmes constitués de chitine, on peut donc les considérer comme des organismes cibles puisqu'ils peuvent être au contact des inhibiteurs lors des pulvérisations ou lors de leur alimentation. Les pucerons étant le premier maillon d'une chaîne alimentaire, les insectes auxiliaires sont exposés à des risques d'intoxication. Toutefois, l'effet recherché étant la réduction du nombre de ravageurs sur les cultures, l'impact des inhibiteurs sur les insectes auxiliaires est un problème de second degré. En effet, le risque que représente l'utilisation des inhibiteurs de chitinases sur les insectes auxiliaires est un risque que l'on rencontre avec toutes les molécules qui peuvent être utilisées pour lutter contre les pucerons. En revanche, les insectes auxiliaires peuvent être une méthode

Figure 26 : Cibles potentielles des oligosaccharides



complémentaire de lutte pour contrôler les populations de pucerons insensibles aux oligosaccharides. Les oligosaccharides pourront également faire l'objet de tests dans le domaine médical, notamment pour lutter contre les mycoses ou les parasites animaux ou humains.

A plus long terme, il conviendra également d'évaluer les risques de toxicité de ces molécules sur les organismes non cibles tels que les mammifères. On peut toutefois supposer que les organismes dépourvus de chitine soient peu affectés par ces inhibiteurs de chitinases. Si on peut penser qu'ils ne se substitueront pas complètement aux pesticides et autres méthodes de lutte contre les insectes, compte tenu de leurs effets prometteurs en phytoprotection, on peut néanmoins envisager que dans les années futures, les inhibiteurs de chitinases occupent une place de choix dans des programmes de lutte intégrée contre les pathogènes et ravageurs des cultures.

Bibliographie

Abdel-Banat BMA, Zhou W, Karasuda S et Koga D (2002) Analysis of hydrolytic activity of a 65-kDa chitinase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci Biotech Bioch* **66:** 1119-1122.

Allingham PG, Kerlin RL, Tellam RL, Briscoe SJ et Standfast HA (1992) Passage of host immunoglobulin across the mid-gut epithelium into the haemolymph of blood-fed buffalo flies *Haematobia irritans exigua*. *J Insect Physiol* **38:** 9-13.

An G, Watson BD et Chiang CC (1986) Transformation of Tobacco, Tomato, Potato, and Arabidopsis thaliana Using a Binary Ti Vector System. *Plant Physiol* **81:** 301-305.

Anand A, Zhou T, Trick HN, Gill BS, Bockus WW et Muthukrishnan S (2003) Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *J Exp Bot* **54:** 1101-1111.

Ancillo G, Witte B, Schmelzer E et Kombrink E (1999) A distinct member of basic (class I) chitinase gene family in potato is specifically expressed in epidermal cells. *Plant Mol Biol* **39:** 1137-1151.

Andersen OA, Dixon MJ, Eggleston I et van Aalten DM (2005) Natural product family 18 chitinase inhibitors. *Nat Prod Rep* **22:** 563-579.

Andersen SO (1979) Biochemistry of the insect cuticle. *Annu Rev Entomol* **24:** 29-61.

Antoniw JF, Ritter CE, Pierpoint WS et VanLoon LC (1980) Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J Gen Virol* **47:** 79.

Arai N, Shiomi K, Iwai Y et Omura S (2000a) Argifin, a new chitinase inhibitor, produced by *Gliocladium* sp FTD-O668 II. Isolation, Physico-chemical properties, and structure Elucidation. *J Antibiot* **53:** 609-614.

Arai N, Shiomi K, Yamaguchi Y, Masuma R, Iwai Y, Turberg A, Kolbl H et Omura S (2000b) Argadin, a new chitinase inhibitor, produced by *Clonostachys* sp. FO-7314. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **48:** 1442-1446.

Arakane Y, Zhu Q, Matsumiya M, Muthukrishnan S et Kramer KJ (2003) Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase. *Insect Biochem Molec* **33:** 631-648.

Armand S, Tomita H, Heyraud A, Gey C, Watanabe T et Henrissat B (1994) Stereochemical course of the hydrolysis reaction catalyzed by chitinases A1 and D from *Bacillus circulans* WL-12. *FEBS Letters* **343:** 177-180.

Azzouz H, Campan EDM, Cherqui A, Saguez J, Couty A, Jouanin L, Giordanengo P et Kaiser L (2005a) Potential effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin I and soybean

Bowman-Birk inhibitor, on the aphid parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera, Braconidae). *J Insect Physiol* **51:** 941-451.

Azzouz H, Cherqui A, Campan EDM, Rahbe Y, Duport G, Jouanin L, Kaiser L et Giordanengo P (2005b) Effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin I and soybean Bowman-Birk inhibitor, on the aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera, Aphididae) and its parasitoid *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera, Aphelinidae). *J Insect Physiol* **51:** 75-86.

Benhamou N et Asselin A (1989) Attempted localization of a substrate for chitinases in plant cells reveals abundant N-acetyl-D-glucosamine residues in secondary walls. *Biology of the Cell* **67:** 341-350.

Blackman RL et Eastop VF (2000) *Aphids on the world's crop: an identification and information guide* John Wiley and Sons, New York.

Blackwell J (1969) Structure of beta-chitin or parallel chain systems of poly-β-(1-4)-N-acetyl-D-glucosamine. *Biopolymers* **7:** 281-298.

Blattner R, Gerard P et Spindler-Barth M (1997) Synthesis and biological activity of allosamidin and allosamidin derivatives. *Pestic Sci* **50:** 312-318.

Bolar JP, Norelli JL, Harman GE, Brown SK et Aldwinckle HS (2001) Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against pathogenic fungus *Venturia inaequalis* in transgenic apple plants. *Transgenic Res* **10:** 533-543.

Boot RG, Renkema GH, Strijland A, van Zonneveld AJ et Aerts JM (1995) Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem* **270:** 26252-26256.

Bornhoff BA, Harst M, Zyprian E et Töpfer R (2005) Transgenic plants of *Vitis vinifera* cv. Seyval blanc. *Plant Cell Rep* **24:** 433-438.

Bortone K, Monzingo AF, Ernst S et Robertus JD (2002) The structure of an allosamidin complex with the *Coccidioides immitis* chitinase defines a role for a second acid residue in substrate-assisted mechanism. *J Mol Biol* **320:** 293-302.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* **72:** 248-254.

Brameld KA, Shrader WD, Imperiali B et Goddard WAr (1998) Substrate assistance in the mechanism of family 18 chitinases: theoretical studies of potential intermediates and inhibitors. *J Mol Biol* **280:** 913-923.

Broglie K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ et Broglie R (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* **254:** 1194-1197.

Carlini CR et Grossi-de-Sa MF (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* **40:** 1515-1539.

Carstens M, Vivier MA et Pretorius IS (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the *CTS1*-2 gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. *Transgenic Res* **12:** 497-508.

Charpentier M et Percheron F (1983) The chitin-degrading enzyme system of a *Streptomyces* species. *Int J Biochem* **15:** 289-292.

Chatton E (1932) A propos du rôle de la membrane péritrophique des Glossines dans l'évolution du Trypanosome du crocodile *T. grayi* (*T. kochi*). *Bull Soc Path Exot* **25:** 575-577.

Chen J-Q, Martin B, Rahbé Y et Fereres A (1997) Early intracellular punctures by two aphid species on near-isogenic melon lines with and without the virus aphid transmission (Vat) resistance gene. *Eu J Plant Path* **103:** 521-536.

Chen WP et Punja ZK (2003) Introduction and expression of a thaumatin-like protein from rice in American ginseng following *Agrobacterium*-mediated transformation. *J Ginseng Res* **27:** 17-23.

Cherqui A, Alla S, Saguez J, Doury G, Sangwan-Norreel BS et Giordanengo P (2003) Probiotic effects of beta-glucuronidase on the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Aphididae). *J Insect Physiol* **49:** 1199-1209.

Choi HK, Choi KH, Kramer KJ et Muthukrishnan S (1997) Isolation and characterization of a genomic clone for the gene of an insect molting enzyme, chitinase. *Insect Biochem Molec* **27:** 37-47.

Cohen-Kupiec R et Chet I (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opinion Biotech* **9:** 270-277.

Cohen E (1993) Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. *Arch Insect Biochem Physiol* **22:** 245-261.

Cohen E (2001) Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag Sci* **57:** 946-950.

Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen V et Vad K (1993) Plant chitinases. *Plant J* **3:** 31-40.

Comeau A (1992) La résistance aux pucerons: aspects théoriques et pratiques In: Vincent C et Coderre D, *La lutte biologique* Gaëtan Morin éditeur.

Cottrell MT, Moore JA et Kirchman DL (1999) Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **65:** 2553-2557.

Creelman RA et Mullet JE (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Phys* **48:** 355-381.

Cristofoletti PT, Ribeiro AF, Deraison C, Rahbé Y et Terra WR (2003) Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *J Insect Physiol* **49:** 11-24.

Dackman C, Chet I et Nordbring-Hertz B (1989) Fungal parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii*: infection and enzymatic activity. *FEMS Microbiol Ecol* **62:** 201-208.

Datta K, Tu J, Oliva N, Ona I, Velazhahan R, Mew TW, Muthukrishnan S et Datta SK (2001) Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Sci* **160:** 405-414.

De A. Gerhardt LB, Sachetto-Martins G, Contarini MG, Sandroni M, De P. Ferreira R, De Lima VM, Cordeiro MC, De Oliveira DE et Margis-Pinheiro M (1997) *Arabidopsis thaliana* class IV chitinase is early induced during the interaction with *Xanthomonas campestris*. *FEBS Letters* **419:** 69-75.

De Jong A, Cordewener J, Schiavo FL, Terzi M, Vandekerckhove J, Van Kammen A et De Vries SC (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* **4:** 425-433.

de la Vega H, Specht CA, Liu Y et Robbins PW (1998) Chitinases are a multi-gene family in *Aedes*, *Anopheles* and *Drosophila*. *Insect Mol Biol* **7:** 233-239.

Deraison C, Darboux I, Duportets L, Gorojankina T, Rahbe Y et Jouanin L (2004) Cloning and characterization of a gut-specific cathepsin L from the aphid *Aphis gossypii*. *Insect Mol Biol* **13:** 165-177.

Desbrières J (2002) Chitine et chitosane. *L'actualité chimique* **11-12:** 39-44.

Dickinson K, Keer V, Hitchcock CA et Adams DJ (1991) Microsomal chitinase activity from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1073:** 177-182.

Ding X, Gopalakrishnan B, Johnson LB, White FF, Wang X, Morgan TD, Kramer KJ et Muthukrishnan S (1998) Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. *Transgenic Res* **7:** 77-84.

Dixon AFG (1987) Parthenogenetic reproduction and the rate of increase in aphids In: Minks AK et Harrewijn P, *Aphids Their biology, natural enemies and control* Elsevier.

Dixon MJ, Andersen OA, van Aalten DMF et Eggleston IM (2005) An efficient synthesis of argifin: A natural product chitinase inhibitor with chemotherapeutic potential. *Bioorg Med Chem Lett* **15:** 4717-4721.

Dixon RA et Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7:** 1085-1097.

Domon JM, Neutelings G, Roger D, David A et David H (2000) A basic chitinase-like protein secreted by embryogenic tissues of *Pinus caribea* acts on arabinogalactan proteins extracted from the same cell lines. *J Plant Physiol* **156:** 33-39.

Douglas AE (1993) The nutritional quality of phloem sap utilized by natural aphid populations. *Ecol Entomol* **18:** 31-38.

Douglas AE (1998) Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annu Rev Entomol* **43:** 17-37.

Douglas AE, Price DRG, Minto LB, Jones E, Pescod KV, Francois CLMJ, Pritchard J et Boonham N (2006) Sweet problems: insect traits defining the limits to dietary sugar utilisation by the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *J Exp Biol* **209:** 1395-1403.

Dun Y, Feng M et Ying S (2003) Evaluation for enhanced aphidicidal activity of a noval emulsifiable formulation of *Beauveria bassiana* conidia. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **43:** 781-787.

Duvauchelle S et Dubois L (1997) Evolution sanitaire des cultures de pommes de terre en 1996: Marquée par une recrudescence des pucerons. *Phytoma -LdV* **495:** 17-19.

Dziadik-Turner C, Koga D, Mai MS et Kramer KJ (1981) Purification and characterization of two b-N-acetylhexosaminidases fromthe tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera:Sphingidae). *Arch Biochem Biophys* **212:** 546-560.

El-Sayed GN, Coudron TA, Ignoffo CM et Riba G (1989) Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *J Invertebr Pathol* **54:** 394-403.

Elango N, Correa JU et Cabib E (1982) Secretory character of yeast chitinase. *J Biol Chem* **257:** 1398-1400.

Emani C, Garcia J, Lopata-Finch E, Pozo MJ, Uribe P, Kim D-J, Sunilkumar G, Cook DR, Kenerley CM et Rathore KS (2003) Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Curr Top Microbiol* **1:** 321-336.

Enyedi AJ, Yalpani N, Silverman P et Raskin I (1992) Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell* **70:** 879-886.

Escott GM et Adams DJ (1995) Chitinase activity in human serum and leukocytes. *Infect Immun* **63:** 4770-4773.

Estruch JJ, Carozzi NB, Desai N, Duck NB, Warren GW et Koziel MG (1997) Transgenic plants: An emerging approach to pest control. *Nat Biotech* **15:** 137-141.

Feix M, Gloeggler S, Londershausen M, Weidemann W, Spindler K-D et Spindler-Barth M (2000) A cDNA encoding a chitinase from the epithelial cell line of *Chironomus tentans* (Insecta, Diptera) and its functional expression. *Arch Insect Bioch Physiol* **45:** 24-36.

Filho BPD, Lemos FJA, Secundino NFC, Páscoa V, Pereira ST et Pimenta PFP (2002) Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti*: a chitinolytic system involving peritrophic matrix formation and degradation. *Insect Biochem Molec* **32:** 1723-1729.

Fincher GB, Stone BA et Clarke AE (1983) Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. *Annu Rev Plant Phys* **34:** 47-70.

Fitches E, Wilkinson H, Bell H, Bown DP, Gatehouse JA et Edwards JP (2004) Cloning, expression and functional characterisation of chitinase from larvae of tomato moth (*Lacanobia oleracea*): a demonstration of the insecticidal activity of insect chitinase. *Insect Biochem Molec* **34:** 1037-1050.

Flach J, Pilet P et Jolles P (1992) What's new in chitinase research? *Experientia* **48:** 701-715.

FNPPPT (2000) *Fiches descriptives des maladies et ravageurs de la pomme de terre*, Paris.

Forrest JMS (1987) Galling aphids In: Minks AK et Harrewijn P, *Aphids, their biology, natural enemies and control* Elsevier, Amsterdam.

Fukuhara K, Murai H et Murauo S (1982) Isolation and structure-activity relationship of some amylostatins (F-1b fraction) produced by *Streptomyces diastaticus* subsp. *amylostaticus*. *Agric Biol Chem* **46:** 1941-1945.

Fung KL, Zhao KJ, He ZM et Chye ML (2002) Tobacco-expressed *Brassica juncea* chitinase *BjCHI1* shows antifungal activity in vitro. *Plant Mol Biol* **50:** 283-294.

Fusetti F, von Moeller H, Houston D, Rozeboom HJ, Dijkstra BW, Boot RG, Aerts JMFG et van Aalten DMF (2002) Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem* **277:** 25537-25544.

Gatehouse AMR, Davison GM, Newell CA, Merryweather A, Hamilton WDO, Burgess EPJ, Gilbert RJC et Gatehouse JA (1997) Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: growth room trials. *Mol Breeding* **3:** 49-63.

Gatehouse AMR, Down RE, Powell KS, Sauvion N, Rahbé Y, Newell CA, Merryweather A, Hamilton WDO et Gatehouse JA (1996) Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol Exp Appl* **79:** 295-307.

Gianessi LP, Silvers CS, Sankula S et Carpenter JE (2002) Plant Biotechnology: Current and Potential Impact for Improving Pest Management in U.S. Agriculture An Analysis of 40 Case Studies.NCFAP Washington. 7 pp.

Girard C et Jouanin L (1999) Molecular cloning of a gut-specific chitinase cDNA from the beetle *Phaedon cochleariae*. *Insect Biochem Molec* **29:** 549-56.

Gongora CE, Wang S, Barbehenn RV et Broadway RM (2001) Chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus* expressed in tomato plants: effects on *Trichoplusia ni*. *Entomol Exp Appl* **99:** 193-204.

Gooday GW (1972) The effect of polyoxin D on morphogenesis in *Coprinus cinereus*. *Biochem J* **129:** 17-18.

Gooday GW (1990) Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation* **1:** 177-190.

Gooday GW (1999) Agressive and defensive roles for chitinases In: Muzzarelli RAA et Jolles P, *Chitin and Chitinases*, Berlin.

Gooday GW, Brydon LJ et Chappell LH (1988) Chitinase in female *Onchocerca gibsoni* and its inhibition by allosamidin. *Mol Biochem Parasitol* **29:** 223-225.

Gooday GW, Zhu WY et O'Donnell RW (1992) What are the roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS Microbiol Lett* **100:** 387-392.

Goormachtig S, Lievens S, Van de Velde W, Van Montagu M et Holsters M (1998) Srchi13, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinases. *Plant Cell* **10:** 905-916.

Gopalakrishnan B, Muthukrishnan S et Kramer KJ (1995) Baculovirus-mediated expression of a *Manduca sexta* chitinase gene: properties of the recombinant protein. *Insect Biochem Molec* **25:** 255-265.

Graham LS et Sticklen MB (1994) Plant chitinases. *Can J Bot* **72:** 1057-1083.

Grison R, Grezes-Besset B, Schneider M, Lucante N, Olsen L, Leguay J-J et Toppan A (1996) Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Nature Biotechnology* **14:** 643-646.

Hahlbrock K et Scheel D (1988) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Phys* **40:** 347-369.

Hammerschmidt R (1999) Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annu Rev Phytopathol* **37:** 285-306.

Hawkes JG (1990) *The potato: evolution, biodiversity and genetic resources* Belhaven Press, London, UK.

Hawtin RE, Zarkowska T, Arnold K, Thomas CK, Gooday GW, King LA, Kuzio JA et Possee RD (1997) Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* **238:** 243-253.

Hawtin RE, Arnold K, Ayres MD, Zanotto PM, Howard SC, Gooday GW, Chappell LH, Kitts PA, King LA et Possee RD (1995) Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* **212:** 673-685.

Hejgaard J, Jacobsen S et Svendsen I (1991) Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain. *FEBS Letters* **291:** 127-131.

Helleboid S, Hendriks T, Bauw G, Inze D, Vasseur J et Hilbert J-L (2000) Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins. *J Exp Bot* **51:** 1189-1200.

Henrissat B (1990) Weak sequence homologies among chitinases detected by clustering analysis. *Protein Seq Data Anal* **3:** 523-526.

Henrissat B (1999) Classification of chitinases modules In: Jolles P et Muzzarelli RAA, *Chitin and chitinases* Birkhauser Verlag, Basel.

Henrissat B et Bairoch A (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **293:** 781-788.

Henrissat B et Davies GJ (2000) Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiol* **124:** 1515-1519.

Hoffmann KH et Lorenz MW (1998) Recent advances on hormones in insect pest control. *Phytoparasitica* **26:** 323-330.

Horsfall JL (1924) Life history studies of Myzus persicae Sulzer. *Pennsylvania Agric Exp Stn Bull* **185:** 1-16.

Houston DR, Eggleston I, Synstad B, Eijsink VG et van Aalten DMF (2002a) The cyclic dipeptide CI-4 [*cyclo*-(l-Arg-d-Pro)] inhibits family 18 chitinases by structural mimicry of a reaction intermediate. *Biochem J* **368:** 23-27.

Houston DR, Synstad B, Eijsink VGH, Stark MJR, Eggleston I et van Aalten DMF (2004) Structure-based exploration of cyclic dipeptide chitinase inhibitors. *J Med Chem* **47:** 5713-5720.

Houston DR, Shiomi K, Arai N, Omura S, Peter MG, Turberg A, Synstad B, Eijsink VG et van Aalten DM (2002b) High-resolution structures of a chitinase complexed with natural product cyclopentapeptide inhibitors: mimicry of carbohydrate substrate. *Proc Natl Acad Sci USA* **99:** 9127-9132.

Huang G-L, Zhang D-W, Zhao H-J, Zhang H-C et Wang P-G (2006) Chemo-enzymatic synthesis of 1,4-oxazepanyl sugar as potent inhibitor of chitinase. *Bioorg Med Chem* **14:** 2446-2449.

Huang HC, Harper AM, Kokko EG et Howard RJ (1981) Aphid transmission of *Verticillium albo-atrum* to alfalfa. *Can J Plant Path* **5:** 141-147.

Huber M, Cabib E et Miller LH (1991) Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **88:** 2807-2810.

Itho Y, Takahashi S, Takizawa H, Nikaidou N, Tanaka H, Nishihashi H, Watanabe T et Nishizawa Y (2003) Family 19 chitinase of *Streptomyces griseus* HUT6037 increases plant resistance to the fungal disease. *Biosci Biotech Bioch* **67:** 847-855.

Ito S-i, Nagata A, Kai T, Takahara H et Tanaka S (2005) Symptomless infection of tomato plants by tomatinase producing *Fusarium oxysporum* formae speciales nonpathogenic on tomato plants. *Physiol Mol Plant P* **66:** 183-191.

Iverson K, Bromel M, Anderson AW et Freeman T (1984) Bacterial symbionts in the sugar beet root maggot *Tetanops myopaeformis* (von Röder). *Appl Environ Microbiol* **47:** 22-27.

Izumida H, Imamura N et Sano H (1996a) A novel chitinase inhibitor from a marine bacterium, Pseudomonas sp. *J Antibiot* **49:** 76-80.

Izumida H, Nishijima M, Takadera T, Nomoto AM et Sano H (1996b) The effect of chitinase inhibitors, Cyclo(Arg-Pro) against cell separation of *Saccharomyces cerevisiae* and the morphological change of *Candida albicans*. *J Antibiot* **49:** 829-831.

Jach G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J et Maas C (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J* **8:** 97-109.

Jackson S, Place AR et Seiderer LJ (1992) Chitin digestion and assimilation by seabirds. *The Auk* **109:** 758-770.

Jeuniaux C (1963) *Chitine et chitinolyse* Masson & Cie, Paris.

Jin-Zhuo D et David ID (1997) Endochitinase and β-1,3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Planta* **201:** 189-194.

Jones D, Wache S et Chhokar V (1996) Toxins produced by arthropod parasites: salivary gland proteins of human body lice and venom proteins of chelonine wasps. *Toxicon* **34:** 1421-1429.

Kadano-Okuda K, Kuwano E, Eto M et Yamashita O (1987) Inhibitory action of an imidazole compound on ecdysone synthesis in prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Growth Diff* **29:** 527-533.

Kaloshian I, Lange WH et Williamson VM (1995) An aphid-resistance locus is tightly linked to the nematode-resistance gene, *Mi*, in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* **92:** 622-625.

Kalpana K, Maruthasalam S, Rajesh T, Poovannan K, Kumar KK, Kokiladevi E, Raja JAJ, Sudhakar D, Velazhahan R, Samiyappan R et Balasubramanian P (2006) Engineering sheath blight resistance in elite indica rice cultivars using genes encoding defense proteins. *Plant Sci* **170:** 203-215.

Karley AJ, Douglas AE et Parker WE (2002) Amino acid composition and nutritional quality of potato leaf phloem sap for aphids. *J Exp Biol* **205:** 3009-3018.

Karley AJ, Ashford DA, Minto LM, Pritchard J et Douglas AE (2005) The significance of gut sucrase activity for osmoregulation in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *J Insect Physiol* **51:** 1313-1319.

Kato T, Shizuri Y, Izumida H, Yokoyama A et Endo M (1995) Styloguanidines, new chitinase inhibitors from the marine sponge *Stylotella aurantium*. *Tetrahedron Letters* **36:** 2133-2136.

Kaznowski C, Schneiderman HA et Bryant PJ (1986) The incorporation of precursors into *Drosophila* larval cuticle. *J Insect Physiol* **32:** 133-142.

Kempton RA, Lowe HJB et Bintcliffe JB (1980) The relationship between fecundity and adult weight in *Myzus persicae*. *J Anim Ecol* **49:** 917-926.

Kenchington W (1976) Adaption of insect peritrophic membranes to form cocoon fabrics In: Hepburn HR, *The Insect Integument* Elsevier Science, Amsterdam.

Kennedy JS, Day MF et Eastop VF (1962) *A conspectus of aphids as vectors of plant viruses* Comm Inst Ent, London.

Kim D, Lee IS, Jung JH et Yang SI (1999a) Psammaplin A, a natural bromotyrosine derivative from a sponge, possesses the antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the DNA gyrase-inhibitory activity. *Arch Pharm Res* **22:** 25-29.

Kim D, Lee IS, Jung JH, Lee CO et Choi SU (1999b) Psammaplin A, a natural phenolic compound, has inhibitory effect on human topoisomerase II and is cytotoxic to cancer cells. *Anticancer Res* **19:** 4085-4090.

Kim MG, Shin SW, Bae KS, Kim SC et Park HY (1998) Molecular cloning of chitinase cDNAs from the silkworm, *Bombyx mori* and the fall webworm, *Hyphantria cunea*. *Insect Biochem Molec* **28:** 163-171.

Koga D, Funakoshi T, Fujimoto H, Kuwano E, Eto M et Ide A (1991) Effects of 20-hydroxyecdysone and KK-42 on chitinase and [beta]-N-acetylglucosaminidase during the larval-pupal transformation of *Bombyx mori*. *Insect Biochem* **21:** 277-284.

Komano H, Mizuno D et Natori S (1981) A possible mechanism of induction of insect lectin. *J Biol Chem* **256:** 7087-7089.

Kramer KJ et Muthukrishnan S (1997) Insect chitinases: Molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem Molec* **27:** 887-900.

Kramer KJ, Corpuz L, Choi HK et Muthukrishnan S (1993) Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta*. *Insect Biochem Molec* **23:** 691-701.

Krishnan A, Nair PN et Jones D (1994) Isolation, cloning, and characterization of new chitinase stored in active form in chitin-lined venom reservoir. *J Biol Chem* **269:** 20971-20976.

Krishnaveni S, Mutukrishnan S, Liang GH, Wilde G et Manickam A (1999) Induction of chitinases and ß-1,3-glucanases in resistant and susceptible cultivars of sorghum in response to insect attack, fungal infection and wounding. *Plant Sci* **144:** 9-16.

Kubo T, Arai T, Kawasaki K et Natori S (1996) Insect lectins and epimorphosis. *Trends Glycosci Glycotechnol* **8:** 357-364.

Kuranda MJ et Robbins PW (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266:** 19758-19767.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:** 680-685.

Lasters I, Wodak SJ, Alard P et van Cutsem E (1988) Structural principles of parallel beta-barrels in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **85:** 3338-3342.

Lawrence S et Novak N (2006) Expression of poplar chitinase in tomato leads to inhibition of development in Colorado potato beetle. *Biotechnol Lett* **28:** 593-599.

Le Roux V, Campan EDM, Dubois F, Vincent C et Giordanengo P (2007) Screening for resistance against *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* among wild *Solanum*. *Ann Appl Biol (sous presse).*

Leah R, Tommerup H, Svendsen I et Mundy J (1991) Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *J Biol Chem* **266:** 1564-1573.

Leclant F et Deguine JP (1994) Aphids (Hemiptera: Aphididae) In: Matthews G et Tunstall J, *Insect pests of cotton* CAB International, Oxon.

Lee HI, León J et Raskin I (1995) Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **92:** 4076-4079.

Lehane MJ, Wu D et Lehane SM (1997) Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol* **42:** 525-550.

Lerner DR et Raikhel NV (1992) The gene for stinging nettle lectin (*Urtica dioica* agglutinin) encodes both a lectin and a chitinase. *J Biol Chem* **267:** 11085-11091.

Lertcanawanichakul M, Wiwat C, Bhumiratana A et Dean DH (2004) Expression of chitinase-encoding genes in *Bacillus thuringiensis* and toxicity of engineered *B. thuringiensis subsp. aizawai* toward *Lymantria dispar* larvae. *Curr Microbiol* **48:** 175-181.

Leubner-Metzger G et Meins FJ (1999) Functions and regulation of plant beta-1,3-glucanases (PR-2) In: Datta SK et Muthukrishnan S, *Pathogenesis-Related proteins in plants* CRC Press, Boca Raton.

Liu M, Sun ZX, Zhu J, Xu T, Harman GE et Lorito M (2004) Enhancing rice resistance to fungal pathogens by transformation with cell wall degrading enzyme genes from *Trichoderma atroviride*. *J Zhejiang Univ Sci* **5:** 133-36.

Londershausen M et Turberg A (1997) Properties of insect chitin synthase: effects of inhibitors, g-S-GTP, and compounds influencing membrane lipids In: Goosen Mattheus FA, *Applications of chitin and chitosan* Technomic Publishing Compagny Inc., Lancaster, USA.

Lorenz J, Lenz M et Hoffmann KH (1995) Effects of pharmacological agents on ecdysteroid synthesis in vitro in ovaries and abdominal integument from female adult crickets, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae). *Z Naturforsch* **50:** 286-293.

Lorito M et Scala F (1999) Microbial genes expressed in transgenic plants to improve disease resistance. *Journal of Plant Pathology* **81:** 73-88.

Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Collucci G, Harman GE, Pintor-Toros JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun S et Scala F (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **95:** 7860-7865.

Lu Y, Zen K-C, Muthukrishnan S et Kramer KJ (2002) Site-directed mutagenesis and functional analysis of active site acidic amino acid residues D142, D144 and E146 in *Manduca sexta* (tobacco hornworm) chitinase. *Insect Biochem Molec* **32:** 1369-1382.

Malausa T, Salles M, Marquet V, Guillemaud T, Alla S, Marion-Poll F et Lapchin L (2006) Within-species variability of the response to 20-hydroxyecdysone in peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer). *J Insect Physiol* **52:** 480-486.

Manson FDC, Fletcher TC et Gooday GW (1992) Localization of chitinolytic enzymes in blood of turbot, *Scophthalmus maximus*, and their possible roles in defence. *J Fish Biol* **40:** 919-927.

Mauch F et Staehelin A (1989) Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β-1,3-glucanase in bean leaves. *Plant Cell* **1:** 447-457.

Maximova S, Marelli J-P, Young A, Pishak S, Verica J et Guiltinan M (2006) Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Planta* **224:** 740-749.

Mayer RT, Meola SM et DeLoach JR (1981) Chitin synthesis inhibiting insect growth regulators do not inhibit chitin synthetase. *EXS* **37:** 337-338.

McNab R et Glover LA (1991) Inhibition of *Neurospora crassa* cytosolic chitinase by allosamidin. *FEMS Microbiol Lett* **82:** 79-82.

Merz RA, Horsch M, Nyhlen LE et Rast DM (1999) Biochemistry of chitin synthase In, *Chitin and Chitinases* Birkhauser Verlag, Berlin.

Miles PW (1968) Insect secretions in plants. *Annu Rev Phytopathol* **6:** 137-164.

Miles PW (1989) Aphid saliva. *Biological Review* **74:** 41-85.

Minke R et Blackwell J (1978) The structure of alpha-chitin. *J Mol Biol* **120:** 167-181.

Miyazacki M (1987) Forms and morphs of aphids In: Minks AK et Harrewijn P, *Aphids, their biology, natural enemies and control* Elsevier, Amsterdam.

Mommsen TP (1980) Chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase from the digestive fluid of the spider, *Cupiennius salei*. *Biochim Biophys Acta* **612:** 361-372.

Mora AA et Earle ED (2001) Combination of *Trichoderma harzianum* endochitinase and a membrane-affecting fungicide on control of *Alternaria* leaf spot in transgenic broccoli plants. *Appl Microbiol Biot* **55:** 306-310.

Moya P, Castillo M, Primo-Yufera E, Couillaud F, Martinez-Manez R, Garcera MD, Miranda MA, Primo J et Martinez-Pardo R (1997) Brevioxime: a new juvenile hormone biosynthesis inhibitor isolated from *Penicillium brevicompactum*. *J Org Chem* **62:** 8544-8545.

Mugniéry D (1996) 5. Ennemies animaux - Nématodes In: Rouselle P, Robert Y et Crosnier JC, *La pomme de terre, production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations* INRA éditions, Paris.

Muthukrishnan J, Seifert K, Hoffmann KH et Lorenz MW (1999) Inhibition of juvenile hormone biosynthesis in *Gryllus bimaculatus* by *Glycosmis pentaphylla* leaf compounds. *Phytochemistry* **50:** 249-254.

Muzzarelli RAA (1977) *Chitin* Pergamon Press, Oxford.

Muzzarelli RAA (1999) Native, industrial and fossil chitins. In, *Chitin and Chitinases* Birkhauser Verlag, Berlin.

Muzzarelli RAA, Mattioli-Belmonte M, Pugnaloni A et Biagini G (1999) Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing In, *Chitin and Chitinases* Birkhauser Verlag, Berlin.

Nakagawa Y et Matsumura F (1994) Diflubenzuron affects gammathio GTP stimulated Ca2+ transport *in vitro* in intracellular vesicles from the integument of the newly molted American cockroach, *Periplaneta americana* L. *Insect Biochem Molec* **24:** 1009-1015.

Neale AD, Wahleithner JA, Lund M, Bonnett HT, Kelly A, Meeks-Wagner DR, Peacock WJ et Dennis ES (1990) Chitinase, beta-1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. *Plant Cell* **2:** 673-684.

Neuhaus JM (1999) Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11) In: Datta SK et Muthukrishnan S, *Pathogenesis-Related proteins in plants* CRC Press, Boca Raton.

Neuhaus JM, Sticher L, Meins F, Jr et Boller T (1991) A Short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proc Natl Acad Sci USA* **88:** 10362-10366.

Nielsen KK, Mikkelsen JD, Kragh KM et Bojsen K (1993) An acidic class III chitinase in sugar beet: induction by *Cercospora beticola*, characterization, and expression in transgenic tobacco plants. *Mol Plant Microbe In* **6:** 495-506.

Nishimoto Y, Sakuda S, Takayama S et Yamada Y (1991) Isolation and characterization of new allosamidins. *J Antibiot* **44:** 716-722.

Nishizawa Y, Nishio Z, Nakazono K, Soma M, Nakajima E, Ugaki M et Hibi T (1999) Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theor Appl Genet* **99:** 383-390.

Nitoda T, Usuki H et Kanzaki H (2003a) A potent insect chitinase inhibitor of fungal origin. *Z Naturforsch* **58:** 891-894.

Nitoda T, Usuki H, Kurata A et Kanzaki H (2003b) Macromolecular insect chitinase inhibitors produced by fungi: screening and partial characterization. *Journal of Pesticide Science* **28:** 24-32.

Ohno N et Morisson DC (1989) Lipopolysaccharide interaction with lysozyme. *J Biol Chem* **264:** 4434-4441.

Omura S, Arai N, Yamaguchi Y, Masuma R, Iwai Y, Namikoshi M, Turberg A, Kolbl H et Shiomi K (2000) Argifin, a new chitinase inhibitor, produced by *Gliocladium* sp. FTD-0668. I. Taxonomy, fermentation, and biological activities. *J Antibiotic* **53:** 603-608.

Pappinen A, Degefu Y, Syrjälä L, Keinonen K et von Weissenberg K (2002) Transgenic silver birch (*Betula pendula*) expressing sugarbeet chitinase 4 shows enhanced resistance to *Pyrenopeziza betulicola*. *Plant Cell Rep* **20:** 1046-1051.

Passarinho PA, Van Hengel AJ, Fransz PF et de Vries SC (2001) Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana AtEP3/AtchitIV* endochitinase gene. *Planta* **212:** 556-567.

Passonneau JV et Williams CM (1953) The moulting fluid of the *Cecropia* silkworm. *J exp Biol* **30:** 545-560.

Patil RS, Ghormade V et Deshpande MV (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enz Microbial Techn* **26:** 473-483.

Perlak FJ, Stone TB, Muskopf YM, Petersen LJ, Parker GB, McPherson SA, Wyman J, Love S, Reed G, Biever D et Fischhoff DA (1993) Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Mol Biol* **22:** 313-321.

Perrakis A, Ouzounis C, Wilson KS et Vorgias C (1996) Implications of the tertiary structure determination of chitinase A. Similarities with fibronectin III domains, oviductal proteins and narbonin In: Domard A, Jeuniaux C, Muzzarelli AAA et Roberts G, *Advances in Chitin Science*, Lyon.

Peter MG et Schweikart F (1990) Chitin biosynthesis enhancement by the endochitinase inhibitor allosamidin. *Biol Chem H-S* **371:** 471-473.

Peters W (1992) *Peritrophic membranes* Springer-Verlag, Berlin.

Peumans WJ, Proost P, Swennen RL et Van Damme EJM (2002) The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative

storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins. *Plant Physiol* **130:** 1063-1072.

Post LV, Jong BJ et Vincent WR (1974) 1-(2,6-Disubsituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides: inhibitors of chitin synthesis. *Pestic Biochem Physiol* **4:** 473-483.

Rabea EI, Badawy MEI, Rogge TM, Stevens CV, Steurbaut W, Höfte M et Smagghe G (2006) Enhancement of fungicidal and insecticidal activity by reductive alkylation of chitosan. *Pest Manag Sci* **62:** 890-897.

Radcliffe EB et Lauer FI (1971) Resistance to green peach aphid and potato aphid in introductions of wild tuber-bearing *Solanum* species. *J. Econ. Entomol.* **64:** 1260-1266.

Radcliffe EB, Lauer FI, Lee M-H et Robinson DP (1981) Evaluation of the United States potato collection for resistance to green peach aphid and potato aphid. *Minnesota Agricultural Experiment Station Technical Bulletin* **331:** 3-41.

Rahbé Y, Ferrasson E, Rabesona H et Quillien L (2003a) Toxicity to the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* of anti-chymotrypsin isoforms and fragments of Bowman-Birk protease inhibitors from pea seeds. *Insect Biochem Molec* **33:** 299-306.

Rahbé Y, Deraison C, Bonade-Bottino M, Girard C, Nardon C et Jouanin L (2003b) Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin (OC-I) on different aphids and reduced performance of *Myzus persicae* on OC-I expressing transgenic oilseed rape. *Plant Sci* **164:** 441-450.

Rao FV, Andersen OA, Vora KA, DeMartino JA et van Aalten DMF (2005a) Methylxanthine drugs are chitinase inhibitors: Investigation of inhibition and binding modes. *Chem Biol* **12:** 973-80.

Rao FV, Houston DR, Boot RG, Aerts JM, Sakuda S et van Aalten DM (2003) Crystal structures of allosamidin derivatives in complex with human macrophage chitinase. *J Biol Chem* **278:** 20110-20116.

Rao FV, Houston DR, Boot RG, Aerts JMFG, Hodkinson M, Adams DJ, Shiomi K, Omura S et van Aalten DMF (2005b) Specificity and Affinity of Natural Product Cyclopentapeptide Inhibitors against A. fumigatus, Human, and Bacterial Chitinases. *Chem Biol* **12:** 65-76.

Rechsteiner M et Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21:** 267-271.

Regev A, Keller M, Strizhov N, Sneh B, Prudovsky E, Chet I, Ginzberg I, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Schell J et Zilberstein A (1996) Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl Environ Microbiol* **62:** 3581-3586.

Regnault-Roger C (2005) *Enjeux Phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement* Lavoisier, Paris.

Retnakaran A, Gelbic I, Sundaram M, Tomkins W, Ladd T, Primavera M, Feng Q, Arif B, Palli R et Krell P (2001) Mode of action of the ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992), and an exclusion mechanism to explain resistance to it. *Pest Manag Sci* **57:** 951-957.

Reynolds SE et Samuels RI (1996) Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. *Adv Insect Physiol* **26:** 157-232.

Richards AG et Richards PA (1977) The Peritrophic Membranes of Insects. *Annu Rev Entomol* **22:** 219-240.

Robert N, Roche K, Lebeau Y, Breda C, Boulay M, Esnault R et Buffard D (2002) Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Sci* **162:** 389-400.

Rogers S, Wells R et Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234:** 364-368.

Rohini VK et Sankara Rao K (2001) Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. *Plant Sci* **160:** 889-898.

Roussel J-P (1994) Synthetic molecules designed as potential inhibitors in ecdysone biosynthesis. *Entomol Exp Appl* **71:** 193-199.

Royer V, Fraichard S et Bouhin H (2002) A novel putative insect chitinase with multiple catalytic domains: hormonal regulation during metamorphosis. *Biochem J* **366:** 921-928.

Rudall KM et Kenchington W (1973) The chitin system. *Biological Review* **48:** 597-636.

Ruiz-Herrera J et Martinez-Espinoza AD (1999) Chitin biosynthesis and structural organization in vivo In: Jolles P et Muzzarelli RAA, *Chitin and chitinases* Birkhaüser Verlag, Basel.

Ruiz-Herrera J et San-Blas G (2003) Chitin synthesis as target for antifungal drugs. *Curr Drug Targets Infect Disord* **3:** 77-91.

Saguez J, Dubois F, Vincent C, Laberche JC, Sangwan-Norreel BS et Giordanengo P (2006) Differential aphicidal effects of chitinase inhibitors on the polyphagous homopteran *Myzus persicae* (Sulzer). *Pest Manag Sci* **62:** 1150-1154.

Saguez J, Hainez R, Cherqui A, Van Wuytswinkel O, Jeanpierre H, Lebon G, Noiraud N, Beaujean A, Jouanin L, Laberche JC, Vincent C et Giordanengo P (2005) Unexpected effects of chitinases on the peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer) when delivered via

transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* Linné) and *in vitro*. *Transgenic Res* **14:** 57-67.

Sakuda S et Sakurada M (1998) Preparation of biotinylated allosamidins with strong chitinase inhibitory activities. *Bioorg Med Chem Lett* **8:** 2987-2990.

Sakuda S, Isogai A, Matsumoto S et Suzuki A (1987) Search for microbial insect growth regulators. II. Allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor. *J Antibiot* **40:** 296-300.

Salzer P, Bonanami A, Beyer K, Vögeli-Lange R, Aeschbacher R, Lange J, Wiemken A, Kim D, Cook D et Boller T (2000) Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation and pathogen infection. *Mol Plant Microbe In* **13:** 763-777.

Sami L, Pusztahelyi T, Emri T, Varecza Z, Fekete A, Grallert A, Karanyi Z, Kiss L et Pocsi I (2001) Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: Chitinase production and antifungal effect of allosamidin. *J Gen Appl Microbiol* **47:** 201-211.

Sampson MN et Gooday GW (1998) Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology* **144:** 2189-2194.

Samuels R et Reynolds SE (1993) Moulting fluid enzymes of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: timing of proteolytic and chitinolytic activity in relation to pre-ecdysial development. *Arch Insect Biochem Physiol* **24:** 33-44.

Samuels RI et Paterson IC (1995) Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. *Comp Biochem Physiol* **110:** 661-669.

Sandor E, Pusztahelyi T, Karaffa L, Karanyi Z, Pocsi I, Biro S, Szentirmai A et Pocsi I (1998) Allosamidin inhibits the fragmentation of *Acremonium chrysogenum* but does not influence the cephalosporin-C production of the fungus. *FEMS Microbiol Lett* **164:** 231-236.

Saville GP, Thomas CJ, Possee RD et King LA (2002) Partial redistribution of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chitinase in virus-infected cells accompanies mutation of the carboxy-terminal KDEL ER-retention motif. *J Gen Virol* **83:** 685-694.

Schaefer S, Gasic K, Cammue B, Broekaert W, van Damme E, Peumans W et Korban S (2005) Enhanced resistance to early blight in transgenic tomato lines expressing heterologous plant defense genes. *Planta* **222:** 858-866.

Schickler H et Chet I (1997) Heterologous chitinase gene expression to improve plant defense against phytopathogenic fungi. *J Ind Microbiol Biotech* **19:** 196.

Schlumbaum A, Mauch F, Vögeli K et Boller T (1986) Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* **324:** 365-367.

Schmidt J, Röhrig H, John M, Wieneke U, Stacey G, Koncz C et Schell J (1993) Alteration of plant growth and development by *Rhizobium nodA* and *nodB* genes involved in the synthesis of oligosaccharide signal molecules. *Plant J* **4:** 651-658.

Schrempf H (2001) Recognition and degradation of chitin by *Streptomycetes*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **79:** 285-289.

Schuler TH, Poppy GM, Potting RPJ, Denholm I et Kerry BR (1999) Gene flow and agriculture- relevance for transgenic crops Interactions between insect tolerant genetically modified plants and natural enemies. 1999 Keele, Uh pp 197-102

Schuttelkopf AW, Andersen OA, Rao FV, Allwood M, Lloyd C, Eggleston IM et van Aalten DMF (2006) Screening-based discovery and structural dissection of a novel family 18 chitinase inhibitor. *J Biol Chem* **281:** 27278-27285.

Sela-Buurlage MB, Ponstein AS, Bres-Vloemans SA, Melchers LS, van den Elzen PJM et Cornelissen BJC (1993) Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and [beta]-1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol* **101:** 857-863.

Shahabuddin M et Vinetz JM (1999) Chitinases of human parasites and their implications as antiparasitic targets. *EXS* **87:** 223-34.

Shahabuddin M, Toyoshima T, Aikawa M et Kaslow DC (1993) Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc Natl Acad Sci USA* **90:** 4266-4270.

Shahin EA et Simpson RB (1986) Gene transfer system for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Hort Science* **21:** 1199−1201.

Shen Z et Jacobs-Lorena M (1998) A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. Cloning, expression, and characterization. *J Biol Chem* **273:** 17665-70.

Shen Z et Jacobs-Lorena M (1999) Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates. *J Mol Evol* **48:** 341-347.

Shim JS, Lee H-S, Shin J et Kwon HJ (2004) Psammaplin A, a marine natural product, inhibits aminopeptidase N and suppresses angiogenesis in vitro. *Cancer Lett* **203:** 163.

Shinoda T, Kobayashi J, Matsui M et Chinzei Y (2001) Cloning and functional expression of a chitinase cDNA from the common cutworm, *Spodoptera litura*, using a recombinant baculovirus lacking the virus-encoded chitinase gene. *Insect Biochem Molec* **31:** 521-532.

Shinshi H, Mohnen D et Meins FJ (1987) Regulation of a plant pathogenesis-related enzymes: inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. *Proc Natl Acad Sci USA* **84:** 89-93.

Showalter AM (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci* **58:** 1399-1417.

Smigocki A, Neal Jr JW, McCanna I et Douglass L (1993) Cytokinin-mediated insect resistance in *Nicotiana* plants transformed with the *ipt* gene. *Plant Mol Biol* **23:** 325-335.

Smirnoff WA (1974) The symptoms of infection by *Bacillus thuringiensis* + chitinase formulation in larvae of *Choristoneura fumiferana*. *J Invert Pathol* **23:** 397-399.

Smith CJ (1996) Accumulation of phytoalexins: defence stimulus response system. *New Phytologist* **132:** 1-45.

Spaink HP, Wifjes AHM, van Vliet TB, Kijne JW et Lugtenberg BJJ (1993) Rhizobial lipo-oligosaccharide signals and their role in plant morphogenesis: Are analogous lipophilic chitin derivatives produced by the plant? *Aust J Plant Physiol* **20:** 380-392.

Spindler-Barth M (1997) Quantitative determination of chitin biosynthesis. In: Peter RAAMaMG, *Chitin Handbook*.

Spindler-Barth M, Blattner R, Vorgias C et Spindler KD (1998) Inhibition of two family 18 chitinases by various allosamidin derivatives. *Pestic Sci* **52:** 47-52.

Spindler KD et Spindler-Barth M (1999) Inhibitors of chitinases In: Jollès P et Muzzarelli RAA, *Chitin and Chitinases* Birkhäuser Verlag.

Spindler KD, Spindler-Barth M et Sakuda S (1997) Effect of demethylation on the chitinase inhibitory activity of allosamidin. *Arch Insect Bioch Physiol* **36:** 223-227.

Spire D et Rouselle P (1996) Origine socio-historique In: Rouselle P, Robert Y et Crosnier JC, *La pomme de terre, production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations.* INRA éditions, Paris.

Sridevi G, Sabapathi N, Meena P, Nandakumar R, Samiyappan R, Muthukrishnan S et Veluthambi K (2003) Transgenic *indica* rice variety Pusa Basmati 1 constitutively expressing a rice chitinase gene exhibits enhanced resistance to *Rhizoctonia solani*. *J Plant Biochem Biot* **12:** 93-101.

St. Léger RJ, Cooper RM et Charnley AK (1991) Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* **58:** 415-426.

Staehelin C, Granado J, Muller J, Wiemken A, Mellor RB, Felix G, Regenass M, Broughton WJ et Boller T (1994) Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA* **91:** 2196-2200.

Stone LEW, Webley DP, Lewis S et Evans EG (1973) The persistence of potato cyst eelworm (Heterodera pallida Stone) under different non-host regimes. *Plant pathol* **22:** 181-183.

Surholt B (1975) Studies in vitro and in vivo on chitin synthesis during larval-adult moulting cycle of the migratory locust, *Locusta migratoria* L. *J Comp Physiol* **102:** 135-142.

Suzuki M, Fujimoto W, Goto M, Morimatsu M, Syuto B et Iwanaga T (2002) Cellular expression of gut chitinase mRNA in the gastrointestinal tract of mice and chickens. *J Histochem Cytochem* **50:** 1081-1089.

Suzuki S, Nakanishi E, Ohira T, Kawachi R, Ohnishi Y, Horinouchi S, Nagasawa H et Sakuda S (2006) Chitinase inhibitor allosamidin is a signal molecule for chitinase production in its producing *Streptomyces* II. Mechanism for regulation of chitinase production by allosamidin through a two-component regulatory system. *J Antibiot* **59:** 410-417.

Tabudravu JN, Eijsink VG, Gooday GW, Jaspars M, Komander D, Legg M, Synstad B et van Aalten DM (2002) Psammaplin A, a chitinase inhibitor isolated from the *Fijian marine* sponge *Aplysinella rhax*. *Bioorg Med Chem* **10:** 1123-1128.

Taira T, Ohnuma T, Yamagami T, Aso Y, Ishiguro M et Ishihara M (2002) Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinases to the fungal cell walls. *Biosci Biotech Biochem* **66:** 970-977.

Takahashi M, Kiuchi M et Kamimura M (2002) A new chitinase-related gene, BmChiR1, is induced in the *Bombyx mori* anterior silk gland at molt and metamorphosis by ecdysteroid. *Insect Biochem Molec* **32:** 147-151.

Takahashi W, Fujimori M, Miura Y, Komatsu T, Nishizawa Y, Hibi T et Takamizo T (2005) Increased resistance to crown rust disease in transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) expressing the rice chitinase gene. *Plant Cell Rep* **23:** 811-818.

Takakura Y, Ito T, Saito H, Inoue T, Komari T et Kuwata S (2000) Flower-predominant expression of a gene encoding a novel class I chitinase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* **42:** 883-897.

Tantimavanich S, Pantuwatana S, Bhumiratana A et Panbangred W (1997) Cloning of a chitinase gene into *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* for enhanced insecticidal activity. *J Gen Appl Microbiol* **43:** 341-347.

Tellam RL (1996) The peritrophic matrix In: Lehane MJ BP, ed., *Biology of the insect midgut* Chapmann and Hall, London.

Tellam RL, Wijffels G et Willadsen P (1999) Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem Molec* **29:** 87-101.

Tellam RL, Vuocolo T, Johnson SE, Jarmey J et Pearson RD (2000) Insect chitin synthase cDNA sequence, gene organization and expression. *Eur J Biochem* **267:** 6025-6043.

Terakawa T, Takaya N, Horiuchi H, Koike M et Takagi M (1997) A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* **16:** 439-443.

Terayama H, Kuzuhara H, Takahashi S, Sakuda S et Yamada Y (1993) Synthesis of a new allosamidin analog, N,N'-diacetyl-beta-chitobiosyl allosamizoline and its inhibitory activity against some chitinases. *Biosci Biotech Bioch* **57:** 2067-2069.

Terra WR (2001) The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Bioch Physiol* **47:** 47-61.

Thamthiankul S, Suan-Ngay S, Tantimavanich S et Panbangred W (2001) Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani*. *Appl Microbiol Biotechnol* **56:** 395-401.

Thomas CJ, Gooday GW, King LA et Possee RD (2000) Mutagenesis of the active site coding region of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chiA gene. *J Gen Virol* **81:** 1403-1411.

Tsai YL, Hayward RE, Langer RC, Fidock DA et Vinetz JM (2001) Disruption of *Plasmodium falciparum* chitinase markedly impairs parasite invasion of mosquito midgut. *Infect Immun* **69:** 4048-4054.

Tsuzuki S, Iwami M et Sakurai S (2001) Ecdysteroid-inducible genes in the programmed cell death during insect metamorphosis. *Insect Biochem Molec* **31:** 321-331.

UNPT (2006) Congrés 2006. Prospectives sur les marchés pommes de terre: frais, fécule, transformation, quels seront les prochains défis? 2 Février 2006, Amiens (France). pp 28

van Aalten DM, Komander D, Synstad B, Gaseidnes S, Peter MG et Eijsink VG (2001) Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:** 8979-8984.

Van Damme EJM, Culerrier R, Barre A, Alvarez R, Rouge P et Peumans WJ (2006) A novel family of lectins evolutionarily related to class V chitinases. An example of neofunctionalization in legumes. *Plant Physiol* (publié en ligne).

Van Dellen K, Ghosh SK, Robbins PW, Loftus B et Samuelson J (2002) *Entamoeba histolytica* lectins contain unique 6-Cys or 8-Cys chitin-binding domains. *Infect. Immun.* **70:** 3259-3263.

Van Dellen KL, Chatterjee A, Ratner DM, Magnelli PE, Cipollo JF, Steffen M, Robbins PW et Samuelson J (2006) Unique posttranslational modifications of chitin-binding lectins of *Entamoeba invadens* cyst walls. *Eukaryotic Cell* **5:** 836-848.

van Eck WH (1979) Mode of action of two benzoylphenyl ureas as inhibitors of chitin synthesis in insects. *Insect Biochem* **9:** 295-300.

van Emden HF, Eastop VF, Hughes RD et Way MJ (1969) The ecology of *Myzus persicae*. *Annu Rev Entomol* **14:** 197-270.

van Hengel AJ, van Kammen A et de Vries SC (2002) A relationship between seed development, arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiol Plantarum* **114:** 637-644.

van Hengel AJ, Guzzo F, van Kammen A et de Vries SC (1998) Expression pattern of the carrot *EP3* endochitinase genes in suspension cultures and in developing seeds. *Plant Physiol* **117:** 43-53.

van Loon LC (1999) Occurence and properties of plant pathogenesis-related proteins In: Datta SK et Muthukrishnan S, *Pathogenesis-Related proteins in plants* CRC Press, Boca Raton.

Vellicce G, Ricci J, Hernández L et Castagnaro A (2006) Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene *ch5B* in Strawberry. *Transgenic Res* **15:** 57-68.

Venegas A, Goldstein JC, Beauregard K, Oles A, Abdulhayoglu N et Fuhrman JA (1996) Expression of recombinant microfilarial chitinase and analysis of domain function. *Mol Biochem Parasitol* **78:** 149-159.

Vierheilig H, Alt M, Neuhaus JM, Boller T et Wiemken A (1993) Colonization of transgenic *Nicotiana sylvestris* plants, expressing different forms of *Nicotiana tabacum* chitinase, by the root pathogen *Rhizoctonia solani* and by the mycorrhizal symbiont *Glomus mosseae*. *Mol Plant Microbe In* **6:** 261-264.

Villagomez-Castro JC, Calvo-Mendez C et Lopez-Romero E (1992) Chitinase activity in encysting *Entamoeba invadens* and its inhibition by allosamidin. *Mol Biochem Parasitol* **52:** 53-62.

Wang J, Chen Z, Du J, Sun Y et Liang A (2005) Novel insect resistance in *Brassica napus* developed by transformation of chitinase and scorpion toxin genes. *Plant Cell Rep* **24:** 549.

Wang X, Ding X, Gopalakrishnan B, Morgan TD, Johnson LB, White FF, Muthukrishnan S et Kramer KJ (1996) Characterization of a 46 kDa insect chitinase from transgenic tobacco. *Insect Biochem Molec* **26:** 1055-1064.

Wemmer T, Kaufmann H, Kirch H-H, Schneider K, Lottspeich F et Thompson RD (1994) The most abundant soluble basic protein of the stylar transmitting tract in potato (*Solanum tuberosum* L.) is an endochitinase. *Planta* **194:** 264.

Wilkinson TL, Adams D, Minto LB et Douglas AE (2001) The impact of host plant on the abundance and function of symbiotic bacteria in an aphid. *J Exp Biol* **204:** 3027-3038.

Wiwat C, Thaithanun S, Pantuwatana S et Bhumiratana A (2000) Toxicity of chitinase-producing *Bacillus thuringiensis ssp. kurstaki* HD-1 (G) toward *Plutella xylostella*. *J Invert Pathol* **76:** 270-277.

Yamamoto T, Iketani H, Ieki H, Nishizawa Y, Notsuka K, Hibi T, Hayashi T et Matsuta N (2000) Transgenic gravepine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep* **19:** 639-646.

Yan J, Cheng Q, Narashimhan S, Li C-B et Aksoy S (2002) Cloning and functional expression of a fat body-specific chitinase cDNA from the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochem Molec* **32:** 979-989.

Ying S, Feng M, Xu S et Ma Z (2003) Field efficacy of emulsifiable suspensions of *Beauveria bassiana* conidia for control of *Myzus persicae* population on cabbage. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* **14:** 545-548.

Zhang D et Miller MJ (1999) Polyoxins and nikkomycins: progress in synthetic and biological studies. *Curr Pharm Des* **5:** 73-99.

Zhang H, Huang X, Fukamizo T, Muthukrishnan S et Kramer KJ (2002) Site-directed mutagenesis and functional analysis of an active site tryptophan of insect chitinase. *Insect Biochem Molec* **32:** 1477-1488.

Zheng Y, Zheng S, Cheng X, Ladd T, Lingohr EJ, Krell PJ, Arif BM, Retnakaran A et Feng Q (2002) A molt-associated chitinase cDNA from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Insect Biochem Molec* **32:** 1813-1823.

Zhu H, Zhang H, Fukamizo T, Muthukrishnan S et Kramer KJ (2001) Properties of *Manduca sexta* chitinase and its C-terminal deletions. *Insect Biochem Molec* **31:** 1221-1230.

Zhu Q, Maher EA, Masoud S, Dixon RA et Lamb C (1994) Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio/Technol* **12:** 807-812.

Annexes

Annexe 1 : Dispositif expérimental de suivi *in planta*

Les pucerons expérimentés *in planta*, sont placés par 5 dans des clip-cages (ø 16 mm, h: 8 mm) ventilées par une grille et maintenues au moyen d'une pince guiche sur la face inférieure des feuilles des troisième ou quatrièmes étage foliaires (en partant de l'apex) de chacune des plantes testées

Annexe 2 : Milieu artificiel pour l'élevage des pucerons

Solution mère

1. Peser les vitamines et mettre dans un bécher
2. Ajouter 150ml de dH2O
3. Ajouter 5mg de riboflavine (dissoute dans 1ml d'eau en chauffant à 50°C)
4. Ajuster le volume à 200ml
5. Aliquoter par 10ml et stocker à -20°C

Vitamines	**mg**
acide amino benzoïque	100,00
acide ascorbique	1000,00
biotine	1,00
CaCl2	50,00
choline chloride	500,00
acide folique	10,00
myo-inositol	420,00
acide nicotinique	100,00
pyroxidine	25,00
thiamine	25,00

Acides aminés	**mg**
alanine	178,70
D β-alanine	6,22
arginine	244,90
asparagine	298,50
acide aspartique	88,25
cystéine	29,59
acide glutamique	149,30
glutamine	445,60
glycine	166,50
histidine	136,00
isoleucine	164,70
leucine	231,50
lysine	351,00
méthionine	72,35
ornithine	9,41
phénylalanine	293,00
proline	129,30
sérine	124,20
thréonine	127,10
tryptophane	42,75
tyrosine	38,63
valine	190,80

Saccharose	**20g**

Traces métaux	**mg**
CuSO4.5H2O	0,47
FeCl3.6H2O	4,45
MnCl2.4H2O	0,65
NaCl	2,54
ZnCl2	0,83

Autres	**mg**
CaCl2	3
acide citrique	5,8
cholesterol benzoate	2,5
MgSO4.7H2O	242

Préparation du milieu artificiel

1. Peser les acides aminés, le sucre, les métaux et autres
2. Ajouter 40ml de dH2O et 20ml du mélange de vitamines
3. Dissoudre pendant 2-3 heures
4. Ajuster à pH 7 avec 10ml de KOH (1M)
5. Ajouter 250mg de KH2PO4
6. Ajuster à 100ml et à pH 7,5
7. Filtrer, aliquoter et congeler

Les cages sont préparées avant leur utilisation: 80 µL de milieu artificiel sont déposés entre deux couches de Parafilm® tendues sur une section de PVC. Les cages sont changées tous les deux jours.

Annexe 3 : Résultats de l'analyse en MALDI-TOF

Etude réalisée 22/02/06

Analyse pour Mr Saguez

Expérimentateur :

Céline Henry
Unités de Recherches de Biochimie et Structure des Protéines
Bat.526-527 Domaine de vilvert
78352 Jouy en Josas cedex
Tel : 01.34.65.27.96 (bureau) ou 27 61
E-mail : celine.henry@jouy.inra.fr

Analyse MALDI – TOF

Trois échantillons de gel 2D colorés à l'argent

A- Protocole

Clivage trypsique

Les peptides issus de la trypsinolyse ont été analysés directement à l'aide d'un MALDI-TOF (0.02 µg de trypsine avec un volume de reprise de 10 µl) . Le spectromètre de masse est, Voyager DE super STR (Applied Biosystems) équipé d'un laser a azote (337 nm, laser de 20Hz). Le spectre de masse a été acquis en mode réflectron (mode positif) avec un délai d'extraction de 130 ns.

La matrice utilisée était du CHCA (5 mg.mL^{-1}).
Une calibration, interne a été obtenue à l'aide des masses des peptides de la trypsine.

La gamme de masses étudiées s'étend de 500 Da à 4000 Da

Les interrogations en bases de données ont été réalisées avec :

- Une exigence de précision de 30 ppm avec les 10 premiers résultats.
  (Cependant, avec une calibration interne, les résultats trouvés sont donnés avec une précision inférieure à 20 ppm).

- Le minimum de peptides requis pour une identification en bases de données est de 4 peptides.

Recherche dans les bases de données : protéines envoyées par Mr Saguez et SwissProt avec Protein Prospector (MS-FIT).

(%) Masses Matched: nombre de peptides mesurés qui « match » avec les peptides théoriques / nombre totale de masses mesurées sur le spectre de masse

m/z submitted : masse (M+H)+ mesurée
MH^+ matched : masse (M+H)+ théorique
Delta ppm : erreur entre la masse mesurée et la masse théorique.
En rouge surligné en jaune : résultat le plus plausible

B- Résultats

On ne retrouve aucune similitude avec les chitinases d'insectes.
Les interrogations dans la base SwissProt ont révélé la présence de concanavaline A.

Echantillon 1

On retrouve les mêmes peptides que pour les échantillons 2 et 3 mais avec une intensité très faible.

Echantillon 2

Rank	MOWSE Score	# (%) Masses Matched	Protein MW (Da)/pI	Species	SwissProt.nov2003 Accession #	Protein Name
1	2.25e+003	5/88 (5%)	31480.6 / 5.47	CANEN	P02866	Concanavalin A precursor (Con A)
2	2.12e+003	4/88 (4%)	8425.9 / 5.78	HELPJ	Q9ZJH4	Carbon storage regulator homolog
3	1.03e+003	4/88 (4%)	31421.5 / 5.64	CANGL	P14894	CONCANAVALIN A PRECURSOR (CON A)
4	1.02e+003	5/88 (5%)	25497.4 / 5.43	CANLI	P81460	CONCANAVALIN A (CON A)
5	1.01e+003	5/88 (5%)	25539.5 / 5.43	CANVI	P81461	Concanavalin A (Con A)
6	604	4/88 (4%)	64232.3 / 5.05	DEIRA	Q9RUN7	Aspartyl-tRNA synthetase (Aspartate--tRNA ligase) (AspRS)
7	390	6/88 (6%)	90673.2 / 9.43	HUMAN	Q9UII5	Zinc finger protein ZFD25
8	285	4/88 (4%)	54782.2 / 9.02	ARATH	P49967	Signal recognition particle 54 kDa protein 3 (SRP54)
9	251	6/88 (6%)	60163.9 / 9.56	SOLTU	P32088	Maturase K (Intron maturase)
10	243	4/88 (4%)	8641.8 / 5.08	ECOLI	Q52278	KLEA protein (KCRA1 protein)

Detailed Results

1. 5/88 matches (5%). 31480.6 Da, pI = 5.47. Acc. # P02866. CANEN. Concanavalin A precursor (Con A).

m/z submitted	MH^+ matched	Delta ppm	start	end	Peptide Sequence (Click for Fragment Ions)	Modifications
1095.6355	1095.6050	27.8385	254	264	(R)VGLSASTGLYK(E)	
1318.6556	1318.6351	15.5229	70	83	(R)VSSNGSPQGSSVGR(A)	
1572.8730	1572.8498	14.7406	210	223	(K)VGTAHIIYNSVDKR(L)	
2103.0595	2103.0570	1.2043	50	69	(K)DLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	
2474.2089	2474.2375	-11.5393	47	69	(K)DQKDLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	

The matched peptides cover **21%** (62/290 AA's) of the protein.

3. 4/88 matches (4%). 31421.5 Da, pI = 5.64. Acc. # P14894. CANGL. CONCANAVALIN A PRECURSOR (CON A).

m/z submitted	MH^+ matched	Delta ppm	start	end	Peptide Sequence (Click for Fragment Ions)	Modifications
1095.6355	1095.6050	27.8385	254	264	(R)VGLSASTGLYK(E)	
1318.6556	1318.6351	15.5229	70	83	(R)VSSNGSPQGSSVGR(A)	
2103.0595	2103.0570	1.2043	50	69	(K)DLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	
2474.2089	2474.2375	-11.5393	47	69	(K)DQKDLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	

The matched peptides cover **16%** (48/290 AA's) of the protein.

4. 5/88 matches (5%). 25497.4 Da, pI = 5.43. Acc. # P81460. CANLI. CONCANAVALIN A (CON A).

m/z submitted	MH^+ matched	Delta ppm	start	end	Peptide Sequence (Click for Fragment Ions)	Modifications
959.5145	959.5202	-5.9485	229	237	(R)LLGLFPDAN(-)	
1095.6355	1095.6050	27.8385	91	101	(R)VGLSASTGLYK(E)	
2103.0595	2103.0570	1.2043	139	158	(K)DLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	
2474.2089	2474.2375	-11.5393	136	158	(K)DQKDLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	
3242.5767	3242.6109	-10.5410	1	30	(-)ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIK(S)	

The matched peptides cover **30%** (72/237 AA's) of the protein.

5. 5/88 matches (5%). 25539.5 Da, pI = 5.43. Acc. # P81461. CANVI. Concanavalin A (Con A).

m/z submitted	MH^+ matched	Delta ppm	start	end	Peptide Sequence (Click for Fragment Ions)	Modifications
959.5145	959.5202	-5.9485	229	237	(R)LLGLFPDAN(-)	
1095.6355	1095.6050	27.8385	91	101	(R)VGLSASTGLYK(E)	
2103.0595	2103.0570	1.2043	139	158	(K)DLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	
2474.2089	2474.2375	-11.5393	136	158	(K)DQKDLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	
3242.5767	3242.6109	-10.5410	1	30	(-)ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIK(S)	

The matched peptides cover **30%** (72/237 AA's) of the protein.

6. 4/88 matches (4%). 64232.3 Da, pI = 5.05. Acc. # Q9RUN7. DEIRA. Aspartyl-tRNA synthetase (Aspartate--tRNA ligase) (AspRS).

m/z submitted	MH^+ matched	Delta ppm	start	end	Peptide Sequence (Click for Fragment Ions)	Modifications
1248.7070	1248.6808	20.9627	529	540	(R)LLMLMSGAGSIR(E)	
1475.7564	1475.7171	26.6516	290	302	(R)FDSAFTDVTGLFR(G)	
2103.0595	2102.9995	28.5533	44	63	(R)SGTVQVQVEPDSPAFAEADR(L)	
2474.2089	2474.2138	-1.9881	481	502	(R)IHDPEVQAKMFQAIGFSEEAAR(E)	

The matched peptides cover **11%** (67/577 AA's) of the protein.

Echantillon 3

Rank	MOWSE Score	# (%) Masses Matched	Protein MW (Da)/pI	Species	SwissProt.nov2003 Accession #	Protein Name
1	1.63e+005	7/119 (5%)	25539.5 / 5.43	CANVI	P81461	Concanavalin A (Con A)
2	1.82e+004	7/119 (5%)	84583.5 / 8.99	METJA	Q58717	Hypothetical protein MJ1321
3	1.71e+004	6/119 (5%)	25567.6 / 5.84	CANBR	P55915	Concanavalin BR (Con BR)
4	9.24e+003	7/119 (5%)	31480.6 / 5.47	CANEN	P02866	Concanavalin A precursor (Con A)
5	8.12e+003	5/119 (4%)	27564.4 / 10.04	YEAST	P53718	HYPOTHETICAL 27.6 KD PROTEIN IN AUT1-CSE2 INTERGENIC REGION
6	4.21e+003	5/119 (4%)	31421.5 / 5.64	CANGL	P14894	CONCANAVALIN A PRECURSOR (CON A)
7	3.22e+003	6/119 (5%)	76470.7 / 5.78	MOUSE	Q61496	DEAD-box protein 4 (VASA homolog) (Mvh)
8	2.87e+003	5/119 (4%)	55961.5 / 4.91	STRPN	Q97NG1	Glutamyl-tRNA synthetase (Glutamate--tRNA ligase) (GluRS)
9	2.31e+003	7/119 (5%)	93643.0 / 5.35	CAUCR	Q9A5C1	Alanyl-tRNA synthetase (Alanine--tRNA ligase) (AlaRS)
10	2.29e+003	5/119 (4%)	50880.2 / 5.79	HUMAN	Q96L92	Sorting nexin 27

Detailed Results

1. 7/119 matches (5%). 25539.5 Da, pI = 5.43. Acc. # P81461. CANVI. Concanavalin A (Con A).

m/z submitted	MH^+ matched	Delta ppm	start	end	Peptide Sequence (Click for Fragment Ions)	Modifications
1193.5599	1193.5737	-11.5759	37	46	(K)TAKWNMQNGK(V)	1Met-ox
2103.0524	2103.0570	-2.1717	139	158	(K)DLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	
2240.0353	2240.0195	7.0641	117	135	(K)SNSTHETNALHFMFNQFSK(D)	
2256.0366	2256.0144	9.8444	117	135	(K)SNSTHETNALHFMFNQFSK(D)	1Met-ox
2474.2300	2474.2375	-3.0114	136	158	(K)DQKDLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	
2832.3743	2832.3440	10.6833	201	228	(K)SPDSHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGR(L)	
3242.6007	3242.6109	-3.1396	1	30	(-)ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIK(S)	

The matched peptides cover **46%** (110/237 AA's) of the protein.

3. 6/119 matches (5%). 25567.6 Da, pI = 5.84. Acc. # P55915. CANBR. Concanavalin BR (Con BR).

m/z submitted	MH^+ matched	Delta ppm	start	end	Peptide Sequence (Click for Fragment Ions)	Modifications
1193.5599	1193.5737	-11.5759	37	46	(K)TAKWNMQNGK(V)	1Met-ox
1318.6264	1318.6351	-6.6212	159	172	(R)VSSNGSPQGSSVGR(A)	
2240.0353	2240.0195	7.0641	117	135	(K)SNSTHETNALHFMFNQFSK(D)	
2256.0366	2256.0144	9.8444	117	135	(K)SNSTHETNALHFMFNQFSK(D)	1Met-ox
2832.3743	2832.3440	10.6833	201	228	(K)SPDSHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGR(L)	
3242.6007	3242.6109	-3.1396	1	30	(-)ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIK(S)	

The matched peptides cover **42%** (101/237 AA's) of the protein.

4. 7/119 matches (5%). 31480.6 Da, pI = 5.47. Acc. # P02866. CANEN. Concanavalin A precursor (Con A).

m/z submitted	MH^+ matched	Delta ppm	start	end	Peptide Sequence (Click for Fragment Ions)	Modifications
1193.5599	1193.5737	-11.5759	200	209	(K)TAKWNMQNGK(V)	1Met-ox
1318.6264	1318.6351	-6.6212	70	83	(R)VSSNGSPQGSSVGR(A)	
1572.8441	1572.8498	-3.6337	210	223	(K)VGTAHIIYNSVDKR(L)	
2103.0524	2103.0570	-2.1717	50	69	(K)DLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	
2474.2300	2474.2375	-3.0114	47	69	(K)DQKDLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	
2832.3743	2832.3440	10.6833	112	139	(K)SPDSHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGR(L)	
3294.6353	3294.6170	5.5459	224	253	(R)LSAVVSYPNADSATVSYDVDLDNVLPEWVR(V)	

The matched peptides cover **41%** (119/290 AA's) of the protein.

6. 5/119 matches (4%). 31421.5 Da, pI = 5.64. Acc. # P14894. CANGL. CONCANAVALIN A PRECURSOR (CON A).

m/z submitted	MH^+ matched	Delta ppm	start	end	Peptide Sequence (Click for Fragment Ions)	Modifications
1193.5599	1193.5737	-11.5759	200	209	(K)TAKWNMQNGK(V)	1Met-ox
1318.6264	1318.6351	-6.6212	70	83	(R)VSSNGSPQGSSVGR(A)	
2103.0524	2103.0570	-2.1717	50	69	(K)DLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	
2474.2300	2474.2375	-3.0114	47	69	(K)DQKDLILQGDATTGTDGNLELTR(V)	
2832.3743	2832.3440	10.6833	112	139	(K)SPDSHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGR(L)	

The matched peptides cover **25%** (75/290 AA's) of the protein.

Julien SAGUEZ, 2007
Dérégulation des activités chitinases : vers de nouvelles perspectives de lutte contre les aphides

Résumé :

Chez les insectes, les chitinases sont des enzymes principalement impliquées dans la dégradation de la chitine, lors des processus de croissance. Les chitinases représentent donc des cibles d'intérêt dans le développement de moyens de lutte alternatifs aux pesticides utilisés contre les ravageurs des cultures. Au cours de ces travaux de thèse, nous avons été amené à évaluer la pertinence de la dérégulation des activités chitinases chez les pucerons.

L'impact des chitinases sur le développement du puceron *M. persicae* a été évalué par des tests de prise alimentaire réalisés *in planta*, sur des plantes de pommes de terre exprimant une chitinase d'insecte (Phaedon cochleariae, Coléoptère) et *in vitro*, en incorporant une chitinase bactérienne (*Serratia marcescens*) dans un milieu artificiel. Des effets probiotiques ont été mis en évidence dans les deux cas, remettant en cause l'utilisation des chitinases en tant que biopesticide pour lutter contre les pucerons.

Compte tenu de ces effets inattendus, nous avons étudié les effets d'une stratégie antagoniste, basée sur l'utilisation d'inhibiteurs de chitinases. Quatre inhibiteurs de chitinases, d'origine et de nature variées, ont ainsi été testés via un milieu artificiel. Nos résultats rapportent pour la première fois une activité inhibitrice de ces molécules sur des pucerons. Nous avons donc orienté nos recherches dans cette voie, afin d'identifier de nouveaux inhibiteurs de chitinases. Deux approches ont été initiées avec d'une part la purification des chitinases du puceron *M. persicae* et d'autre part par l'évaluation des effets d'oligosaccharides mimétiques de la chitine et des inhibiteurs de chitinases. Les résultats obtenus nous laissent à penser que les inhibiteurs de chitinases constituent une voie prometteuse dans l'élaboration de nouveaux bioinsecticides.

Discipline : Entomologie

Mots-clés : Pucerons, pomme de terre, *Myzus persicae*, *Solanum tuberosum*, chitine, chitinases, inhibiteur de chitinase, milieu artificiel, paramètres démographiques, biologie moléculaire.

Laboratoire : EA 3900-Biologie des Plantes et Contrôle des Insectes Ravageurs.
Université de Picardie Jules Verne, 33 Rue St Leu, 80 039 AMIENS Cedex 1.
julien.saguez@u-picardie.fr

Julien SAGUEZ, 2007
Disturbance of chitinase activities :
New perspectives in aphid populations managment.

Abstract :

In insects, chitinases are key enzymes in chitin degradation, and especially during molting and growth process. As a consequence, chitinase metabolism in an interesting targets to develop new alternatives method to manage insect pests. In this project, we evaluated the relevance of the disturbance of aphid chitinase activities.

The impact of chitinases was evaluated on *M. persicae* development via *in planta* tests, rearing aphids on potato plants expressing an insect chitinase (*Phaedon cochleariae*, Coleoptera) and via *in vitro* tests, via an artificial diet containing a bacterial chitinase (*Serratia marcescens*). Probiotic effects were described in both cases and our results, question us on the reliability of the use of chitinases as biopesticides to fight aphids.

We evaluated the effects of an antagonist strategy based on chitinase inhibitors. Four of them, from different origins were tested via an artificial diet. Our results reported for the first time the inhibitory activity of chitinase inhibitors on aphids. We focused our searches in this way with the aim to identify new chitinases inhibitors. In a first approach, we initiated the purification of *M. persicae* chitinases and in a second one, we evaluated the effects of oligossacharides which mimic chitin and chitinase inhibitors. Our results highlight the potential use of chitinase inhibitors as new bioinsecticides in pest management programs.

Speciality : Entomology

Keywords : Aphids, potato, *Myzus persicae*, *Solanum tuberosum*, chitin, chitinases, chitinases inhibitors, artificial diet, demographic parameters, molecular biology.

Laboratory : EA 3900-Biologie des Plantes et Contrôle des Insectes Ravageurs.
Université de Picardie Jules Verne, 33 Rue St Leu, 80 039 AMIENS Cedex 1.
julien.saguez@u-picardie.fr