

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES CHIMIQUE À FINALITÉ APPROFONDIE

La glucose oxydase et la tréhalase chez *Halyomorpha halys* vers de nouvelles stratégies d'insecticides

GUILLAUME, Laurane

Award date:
2022

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



Université de Namur
Faculté des Sciences

**LA GLUCOSE OXYDASE ET LA TREHALASE CHEZ
HALYOMORPHA HALYS : VERS DE NOUVELLES STRATEGIES
INSECTICIDES**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade académique de Master en
Sciences Chimique "Chimie du Vivant et des Nanomatériaux" - Finalité Approfondie

Laurane GUILLAUME

Janvier 2022

UNIVERSITE DE NAMUR
FACULTE DES SCIENCES

Enseignement du Département de Chimie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

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

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

**La glucose oxydase et la tréhalase chez *Halyomorpha halys* : vers
de nouvelles stratégies d'insecticides**

GUILLAUME Laurane

Résumé

Actuellement, l'une des préoccupations majeures dans le domaine de l'agriculture est le développement d'alternatives durables aux pesticides afin de lutter plus efficacement contre les insectes nuisibles. En effet, leur utilisation intensive engendre des problèmes de santé humaine, des contaminations de l'eau et de l'air, l'apparition de résistances et la diminution des populations d'insectes utiles comme les abeilles. Il faut donc développer des composés ayant un mode d'action différent des pesticides actuels.

Dans le cadre de ce mémoire, l'insecte modèle est *Halyomorpha halys* (*H. halys*), également appelé la punaise diabolique. Il est originaire d'Asie mais se propage actuellement en Amérique et dans le sud de l'Europe.

L'une des stratégies avancées pour le développement d'alternatives aux insecticides actuels est de cibler les fonctions biologiques essentielles à la survie des insectes, comme la tréhalase, une enzyme responsable de l'hydrolyse du tréhalose (réserve énergétique essentielle chez les insectes). Pour cela, la tréhalase de *H. halys* est purifiée par différentes méthodes : la précipitation au sulfate d'ammonium et des chromatographies échangeuse d'anions ou d'affinité.

Une autre stratégie est d'étudier les interactions insecte- plante afin d'empêcher l'insecte de supprimer les moyens de défense mis en place par la plante. Pour cela, la glucose oxydase de *H. halys* et de *S. frugiperda*, une enzyme responsable de l'oxydation du β -D-glucose dans la plante, a été étudiée. En effet, cette réaction enzymatique produit du peroxyde d'hydrogène qui empêcherait les plantes de se défendre contre les attaques d'herbivores. L'activité de l'enzyme dans les glandes salivaires des insectes est évaluée et la structure tridimensionnelle de la glucose oxydase de différents insectes est prédite par modélisation moléculaire.

Mémoire de Master en Sciences Chimique (Orientation Chimie du Vivant et des Nanomatériaux)

Finalité Approfondie

Janvier 2022

Promoteurs : Prof. Catherine Michaux

Co-promoteur : Prof. Eric A. Perpète

Remerciements

En cette fin de mémoire, je voudrais remercier, en quelques lignes, toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide et leur soutien pour la réalisation de ce projet, toutes les personnes avec qui j'ai passé de bons moments.

Tout d'abord, je tiens à remercier ma promotrice, Catherine Michaux, pour le temps qu'elle a consacré à m'encadrer, pour son expertise et ses analyses de mes travaux qui m'ont été d'une aide précieuse, pour sa gentillesse, sa bienveillance et son soutien durant cette année de mémoire. Je tiens également à la remercier pour m'avoir mis en contact avec le Pr. Privé de l'Université de Toronto pour réaliser mon stage de fin de Master 2. Je voudrais également remercier mon copromoteur, Eric Perpète, pour tous les bons conseils qu'il a pu me donner. Merci à vous deux pour l'accueil chaleureux dont vous avez fait preuve lors de mon arrivée au CPB.

Je tiens également à remercier les personnes qui m'ont permis de réaliser certaines manipulations lors de cette année de mémoire. Merci à toutes les personnes de l'Agro-Bio Tech de Gembloux : à Frédéric Francis qui m'a aidé pour l'interprétation de résultats, à Lisa Ianello pour m'avoir aidé à maintenir l'élevage de punaises quand je ne savais pas être sur place, à Emilie Bera qui m'a aidé à faire des digestions pour les analyses de spectrométrie de masse et Hillary Fisher de m'avoir permis de lui prendre des chenilles de son élevage. Merci également à Marc Dieu et Catherine Demansy pour les analyses par spectrométrie de masse.

Cette année de mémoire a également été embellie par mes camarades CPB'istes. Je pense à Virgile, avec qui j'ai fait mes meilleurs (et surtout mes pires) parties de rikiiki. Je pense également à Cyril, avec qui j'ai tapé des sessions d'écoute de vieilles chansons françaises. Je pense aussi à Blinera alias Blin avec qui j'ai eu de grands moments de complicité. Je pense également à Laurelenn alias Lau avec qui j'ai partagé ma passion pour les manucures et la pâtisserie et qui a pu également me donner de très bon skills pour utiliser PowerPoint. Je pense aussi à Amandine, pour m'avoir conseillé sur les meilleurs animés à regarder. Je pense également à Julien alias Jumi, avec qui j'ai eu (et j'ai toujours) un grand débat sur la place ou non des raisins secs dans les cougnoux #RaisinsVie. Je pense également à nos stagiaires : Alexia, Marina et Luis. Je pense également à Elise, avec qui le courant est passé en un seul regard et qui est l'une de mes meilleures rencontres de cette année 2021. Je vous remercie tous du fond du cœur pour votre joie de vivre, votre bonne humeur et votre soutien durant toute cette année. Mon séjour au CPB n'aurait pas été le même

sans vous et j'espère qu'on aura l'occasion de vivre encore d'autres aventures ensemble.

J'aimerais également remercier toutes les personnes avec qui j'ai tissé des liens durant ces six années d'études et tout particulièrement à Jennifer, Marie, Dorothée et Valentine, mais également toutes les personnes avec qui je partage une amitié depuis de nombreuses années : Ambre, Alexia, Lilou, Zoé et Shaïna.

Pour terminer, je voudrais remercier les personnes les plus chères à mes yeux et à mon cœur : ma famille qui a été là pour me soutenir et me faire rire durant ces études. Et tout particulièrement, un énorme merci à ma maman qui m'a constamment soutenue et qui a toujours su trouver les mots justes lorsque j'en avais besoin. Merci de tout ce que tu m'apportes !

Liste des abréviations

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
ANS	Acide 3-amino-5-nitrosalicylique
APS	<i>Ammonium persulfate</i>
ConA	Concanavalline A
COV	Composés Organiques Volatils
CPB	Chimie Physique des Biomolécules
DEAE	Diethylaminoethyl
DNS	Acide 3,5-dinitrosalicylique
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FT	<i>Flow through</i>
GOX	Glucose Oxydase
<i>H. halys</i>	<i>Halyomorpha halys</i>
<i>H. zea</i>	<i>Helicoverpa zea</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pI	Point isoléctrique
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
POX	Peroxydase
<i>S. exigua</i>	<i>Spodoptera exigua</i>
<i>S. frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>

Table des matières

I	Introduction	8
1	Lutte contre les insectes ravageurs	9
1.1.	Les pesticides	9
1.2.	Impacts sur la santé humaine	11
1.3.	Développement de résistances	11
1.4.	<i>Halyomorpha halys</i>	12
1.5.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	13
2	Nouvelles cibles	14
2.1.	La tréhalase	14
2.2.	La glucose oxydase	15
II	Objectifs et stratégies	17
3	La tréhalase	18
4	La glucose oxydase	19
III	Résultats	21
5	La tréhalase	22
5.1.	Evaluation de l'activité enzymatique	22
5.2.	Purification de la tréhalase	24
5.3.	Analyse SDS-PAGE	29
6	La glucose oxydase	31
6.1.	Mise au point d'une méthode pour doser la glucose oxydase	31
6.2.	Analyses sur gels natifs	35

6.3.	Activité des glandes salivaires	36
6.4.	Modélisation par homologie de la structure tridimensionnelle de glucose oxydases	37
IV	Conclusions et perspectives	43
7	La tréhalase	44
8	La glucose oxydase	45
V	Matériel et méthodes	47
9	Extraction de la tréhalase	48
9.1.	Elevage des punaises	48
9.2.	Broyage du matériel biologique	48
9.3.	Extraction de la tréhalase	48
10	Dosage enzymatique de la tréhalase	49
10.1.	Elaboration de la droite d'étalonnage	49
10.2.	Mesure de l'activité enzymatique	49
11	Précipitation au sulfate d'ammonium	50
12	Dessalage et échange de tampon	50
13	Purification de la tréhalase	51
13.1.	Chromatographie échangeuse d'anions	51
13.2.	Chromatographie d'affinité : concanavaleine A	52
14	Evaluation de la purification par analyse SDS-PAGE	53
14.1.	Préparation du gel	53
14.2.	Préparation des échantillons	54
14.3.	Electrophorèse	54
14.4.	Coloration du gel	54
15	Dissection des glandes salivaires	55
15.1.	<i>Halyomorpha halys</i>	55
15.2.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	55
16	Dosage enzymatique de la glucose oxydase	56
16.1.	Elaboration de la droite d'étalonnage	56

16.2.	Mesure d'activité enzymatique	56
17	Evaluation de l'activité par analyse sur gels natifs	57
17.1.	Préparation du gel	57
17.2.	Préparation des échantillons	57
17.3.	Electrophorèse	58
17.4.	Coloration du gel	58
18	Modélisation moléculaire	58
VI	Bibliographie	59
VII	Annexes	64

Première partie

Introduction

Introduction

1 Lutte contre les insectes ravageurs

Depuis le début de l'agriculture, l'Homme a essayé de contrôler les espèces nuisibles qui endommageaient ses champs. A ce jour, cela reste l'un des défis majeurs dans le monde agricole [1]. Au 21^{ème} siècle, la productivité agricole a été améliorée grâce à l'utilisation de pesticides chimiques tels que des fongicides, herbicides ou insecticides [2]. Malheureusement, l'utilisation intensive de ces produits a permis aux espèces nuisibles de développer des résistances. En effet, les insectes nuisibles causent encore actuellement des milliards d'euros de perte dans l'industrie alimentaire chaque année [3]. Parmi les insectes nuisibles, les punaises sont fréquemment citées car elles peuvent se nourrir de plus de 300 plantes différentes (dont la tomate, le coton et le soja) et il est difficile de contrôler leur propagation [4].

1.1. Les pesticides

Actuellement, les pesticides restent le moyen le plus employé afin de lutter contre les invasions d'espèces nuisibles. Ils permettent d'avoir une productivité plus élevée et de réduire ainsi les pertes des agriculteurs. Le terme pesticide est utilisé pour décrire les substances employées pour lutter contre les nuisibles (champignons, bactéries, insectes, ...) tandis qu'un insecticide est un composé qui cible les insectes et non les bactéries ou les mauvaises herbes. Il existe plusieurs classes de pesticides qui ont un mode d'action différent [5].

- Les **néonicotinoïdes** ont pour effet d'empêcher la transmission d'influx nerveux au niveau du système nerveux central. En effet, ayant une structure proche de la nicotine, ils peuvent interagir en tant qu'agoniste avec son récepteur spécifique : le récepteur nicotinique [6][7]. Parmi les néonicotinoïdes se trouve l'imidaclopride (Figure 1). Il s'agit d'un insecticide à large spectre pouvant être toxique pour les vertébrés. Ce composé a une forte spécificité aux sous-types de récepteurs nicotiques présents chez les insectes [7][8]. Cependant, depuis 2013, l'utilisation de néonicotinoïdes a été limitée car ils ont causé de grandes pertes au niveau des colonies d'abeilles [7].
- Les **organophosphorés** et les **carbamates** sont des composés qui ont un mode d'action similaire [9]. Ils inhibent les cholinestérases qui sont des enzymes responsables de l'hydrolyse

de neurotransmetteurs. Une exposition de longue durée à ces molécules engendre une accumulation de neurotransmetteurs au niveau des synapses et dans de nombreuses parties du corps [5] [10]. Le diméthoate (organophosphoré) et le carbaryl (carbamate) sont des composés régulièrement employés en agriculture (Figure 1).

- Les **pyréthroïdes** sont le quatrième groupe d'insecticides le plus utilisé dans le monde [11]. Il s'agit produits organique synthétiques de dérivés de pyréthrines, retrouvés dans les fleurs de chrysanthème [11] [12]. Ces composés agissent sur les fonctions nerveuses, entraînant une paralysie des insectes, les menant à la mort. Parmi cette classe de molécules se trouve la cyperméthrine (Figure 1).

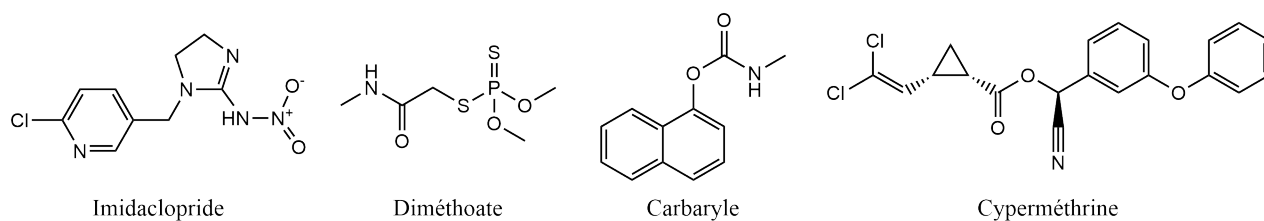


FIGURE 1 – Structure de l'imidaclopride, du diméthoate, du carbaryl et de la cyperméthrine.

1.2. Impacts sur la santé humaine

Depuis les années 1960, les agriculteurs des pays industrialisés ont utilisé des pesticides de manière intensive afin de contrôler les espèces nuisibles. Durant les dernières années, les pesticides synthétiques sont moins employés dû deux facteurs majeurs : les pesticides à large spectres ont de effets négatifs sur la santé humaine et les insectes développent des résistances [13].

Durant les 50 dernières années, l'exposition aux pesticides s'est largement accrue. En effet, les pesticides font partie des substances chimiques les plus produites et utilisées dans le monde [14]. Il est encore difficile d'étudier la toxicité des pesticides sur la santé car de nombreux facteurs sont à prendre en compte : la durée et la fréquence de l'exposition, le type de composé utilisé ou encore la génétique de l'individu [15]. Le lien entre l'exposition aux pesticides et l'apparition d'effets toxicologiques n'en est pas moins indéniable.

1.3. Développement de résistances

L'utilisation fréquente et parfois abusive des insecticides actuels a permis aux insectes nuisibles de développer des résistances. Cela pose un grand problème de contrôle des insectes ravageurs dans les cultures [16]. En effet, Elsen *et al.* ont montré que des insectes développaient des résistances contre plusieurs classes d'insecticides [17] ce qui rend la tâche encore plus difficile. D'autant plus que plus de 500 espèces d'insectes nuisibles sont connus pour résister aux insecticides [17]. Il est donc urgent de trouver des alternatives plus efficaces aux insecticides actuels.

A ce jour, *Halymorpha halys* n'est pas encore connu comme étant un insecte ayant développé des résistances contre les insecticides. Il est tout de même important de pouvoir contrôler ses populations avec des composés peu ou non-nocifs pour les humains et les insectes utiles.

1.4. *Halyomorpha halys*

Ce travail de recherche se concentre sur une espèce de punaise : la punaise diabolique, *Halyomorpha halys* (Figure 2). Cet insecte fait partie de l'ordre des hémiptères et de la famille des *Pentatomidae* [3]. Elle est originaire d'Asie et s'est largement répandue en Amérique du Nord depuis son introduction accidentelle en 1996, en Océanie ainsi qu'en Europe. Sa population augmentant de manière exponentielle, la punaise diabolique pourrait devenir un insecte nuisible pour l'agriculture dans un futur proche ce qui en fait un sujet d'étude crucial. Elle est également connue pour avoir plus d'une centaine de plantes hôtes dont des fruits, des légumes, des plantes ornementales ainsi que des plantes produites en champs [3]. De plus, la punaise diabolique peut avoir un impact sur la vie humaine car elle hiberne dans les maisons et dégagent de mauvaises odeurs lorsqu'elles sont dérangées.



FIGURE 2 – Photographie d'une punaise diabolique (*Halyomorpha halys*).

La punaise diabolique est un insecte dit "piqueur-suceur" dont l'alimentation cause des zones nécrosées sur les fruits et légumes, les rendant inesthétiques pour la vente. Cet insecte peut se nourrir sur une pléthore de plantes ce qui lui permet de se propager et de s'installer facilement dans un habitat non-naturel. Des études ont démontré que son invasion devient de plus en plus importante dans la zone méditerranéenne, comme c'est déjà le cas aux États-Unis et en Australie. De ce fait, cet insecte est un sujet d'étude pertinent pour le développement de nouveaux insecticides [18].

1.5. *Spodoptera frugiperda*

Spodoptera frugiperda, également appelée chenille légionnaire d'automne (Figure 3), est une espèce de lépidoptère faisant partie de la famille des *Noctuidae*. Cet insecte est originaire d'Amérique et se répand très rapidement en Afrique depuis 2016 [19]. En effet, les adultes peuvent migrer sur de grandes distances et se retrouvent principalement dans les régions tropicales et sud-tropicales d'Afrique. L'insecte peut se nourrir sur plus de 80 plantes différentes dont le maïs, le riz, les tomates ou encore le soja[20].



FIGURE 3 – Photographie d'une chenille légionnaire d'automne (*Spodoptera frugiperda*).

Cet insecte est considéré comme une espèce ravageuse, surtout lorsqu'il est au stade larvaire, et il cause d'énormes pertes au niveau de l'agriculture (jusqu'à 400 millions de dollars au Bénin et 500 millions de dollars aux États-Unis) [20]. La chenille fait partie des insectes dits "broyeurs" et elle peut se nourrir des feuilles, des fruits mais aussi des graines des plantes qu'elle attaque [19].

2 Nouvelles cibles

Afin de développer de nouveaux insecticides, deux stratégies peuvent être mises en place : cibler les fonctions biologiques essentielles de l'insecte ou viser les interactions insecte-plante. La première permettrait de tuer les insectes tandis que la seconde permettrait d'aider la plante à se défendre contre les insectes herbivores.

2.1. La tréhalase

Une des manières de cibler une fonction biologique essentielle de l'insecte est d'inhiber la tréhalase, une enzyme responsable de l'hydrolyse du tréhalose en deux molécules de glucose (Figure 4). Le tréhalose est une réserve essentielle d'énergie chez la plupart des insectes et son hydrolyse est nécessaire pour beaucoup de fonctions biologiques telles que le vol, la croissance ou la métamorphose. A ce jour, la tréhalase est connue comme étant la seule enzyme capable d'hydrolyser le tréhalose, et est donc une cible évidente pour le développement de nouveaux insecticides. Son inhibition mène à un développement anormal, une perte de poids, une incapacité de vol et une hypoglycémie entraînant la mort [21][22][23].

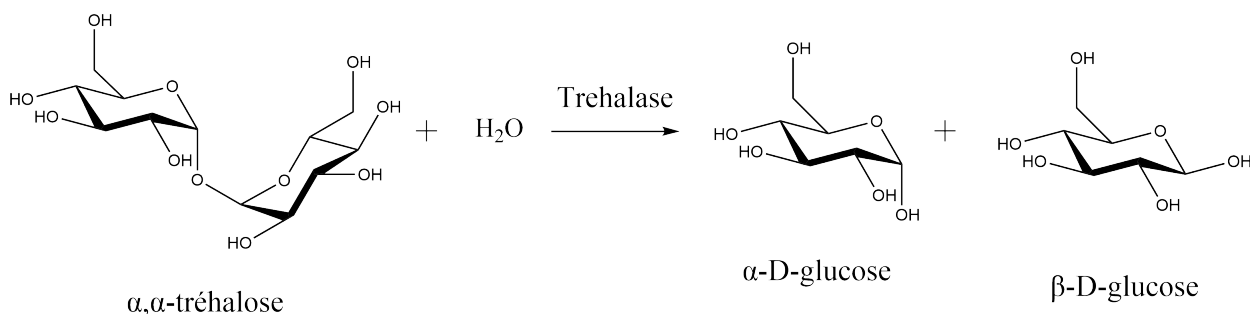


FIGURE 4 – Hydrolyse du tréhalose sous contrôle enzymatique de la tréhalase en deux molécules de glucose.

Dans la banque de données NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), des séquences en acides aminés de tréhalase d'insectes sont disponibles. Concernant *H. halys*, seules des séquences prédites sont présentes. Cependant, aucune structure 3D de tréhalase d'insecte n'est disponible dans la PDB (*Protein Data Bank*) jusqu'à maintenant même si des structures de tréhalase de bactéries y sont décrites. La masse moléculaire des tréhalases est d'environ 70 kDa, leur pH d'activité optimale est situé entre 5 et 7 et leur point isoélectrique est d'environ 5-6 [21].

2.2. La glucose oxydase

Lorsque les plantes sont attaquées par des insectes herbivores, elles relâchent des composés organiques volatiles (COV) qui permettent à la plante d'attirer les prédateurs naturels de ces insectes. La libération des COV dépend de la vitesse à laquelle ils sont synthétisés mais également de l'ouverture des stomates [24]. En effet, si les stomates sont fermés, les COV ne peuvent d'une part, pas être dégagés et le dioxyde de carbone, nécessaire à la synthèse de certains COV, ne peut d'autre part, pas être capté par la plante [24].

Une stratégie pour éliminer les insectes nuisibles est de cibler la glucose oxydase (GOX). Cette enzyme a été identifiée chez des insectes comme étant une enzyme effectrice capable de supprimer les moyens de défenses de la plante, facilitant ainsi son invasion. A ce jour, le mécanisme exact de la GOX dans la plante est encore méconnu [25] mais il semblerait que le peroxyde d'hydrogène produit lors de la réaction induise d'une part, la fermeture des stomates [24] et d'autre part, la diminution de la production de nicotine [26]. Jusqu'à présent, cette enzyme est principalement détectée dans les glandes salivaires des lépidoptères tels que *Helicoverpa zea*, *Spodoptera exigua* ou encore *Spodoptera frugiperda*. Quant aux hémiptères, l'enzyme n'a été détectée que chez le puceron vert du pois [27]. Certaines études sur les lépidoptères ont également montré que la production de GOX est modulable en fonction de la diète de l'insecte. Par exemple, un insecte peut produire plus de GOX lorsqu'il est nourri préférentiellement de feuilles de tomates ou de tabac plutôt que de coton [28].

La GOX est une enzyme qui catalyse l'oxydation du β -D-glucose pour produire du D-glucono- δ -lactone et du peroxyde d'hydrogène, en utilisant du dioxygène comme accepteur d'électrons (Figure 5).

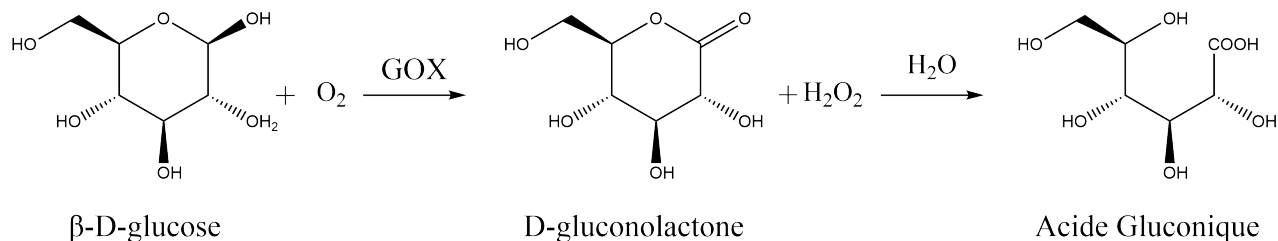


FIGURE 5 – Equation de la réaction d'oxydation du β -D-glucose par la glucose oxydase en acide gluconique.

Cette enzyme est une flavoprotéine et se présente sous la forme d'un homo-dimère [29]. Dans la banque de données NCBI, des séquences en acides aminés de GOX d'insectes sont disponibles.

Néanmoins, il n'en existe aucune concernant celle de *H. halys*. A ce jour, aucune structure tridimensionnelle de GOX d'insectes n'est encore disponible mais il en existe pour des espèces de champignons et de bactéries. Sa masse moléculaire est décrite comme étant d'environ 65 kDa par monomère, son pH d'activité optimale est compris entre 6 et 7 et son point isoélectrique est d'environ 4-5 [30]. A partir de la structure 3D de *A. niger*, des recherches sur le site actif de la GOX ont également montré qu'il existe trois résidus d'acides aminés catalytiques : l'His516, l'His559 et la Glu412 [31]. L'His516 semble être le résidu servant de base lors de la réaction enzymatique et est conservée pour la majorité des GOX étudiées [32]. Quant aux deux autres résidus, ils semblent former un pont H entre l'atome d'azote de l'His559 et l'atome d'oxygène de la Glu412 [32]. Ce pont H permet de fixer l'orientation de l'His559 qui a un rôle d'activateur pour la réaction enzymatique [31].

Deuxième partie

Objectifs et stratégies

Objectifs et stratégies

L'objectif général de ce mémoire est de trouver des alternatives aux insecticides actuels afin de limiter leurs inconvénients sur la santé humaine et les insectes utiles. D'un point de vue stratégique, nous allons soit viser de manière spécifique les fonctions biologiques des insectes nuisibles soit inhiber (chez l'insecte) les enzymes supprimant les moyens de défense mis en place par les plantes.

3 La tréhalase

Ce travail s'inscrit dans le cadre des études sont menées sur la tréhalase du puceron vert du pois (*Acyrtosiphon pisum*) au sein du laboratoire CPB. Il s'agit d'étendre l'étude de cette enzyme chez un autre hémiptère, la punaise diabolique (*Halyomorpha halys*). Le premier objectif de ce mémoire est donc d'extraire et de purifier l'enzyme afin de permettre sa caractérisation structurale et fonctionnelle. Ces études permettront d'identifier des inhibiteurs qui la ciblent spécifiquement pour le développement de nouveaux insecticides. La méthodologie suivie afin d'effectuer cette purification et cette caractérisation est schématisée à la Figure 6.

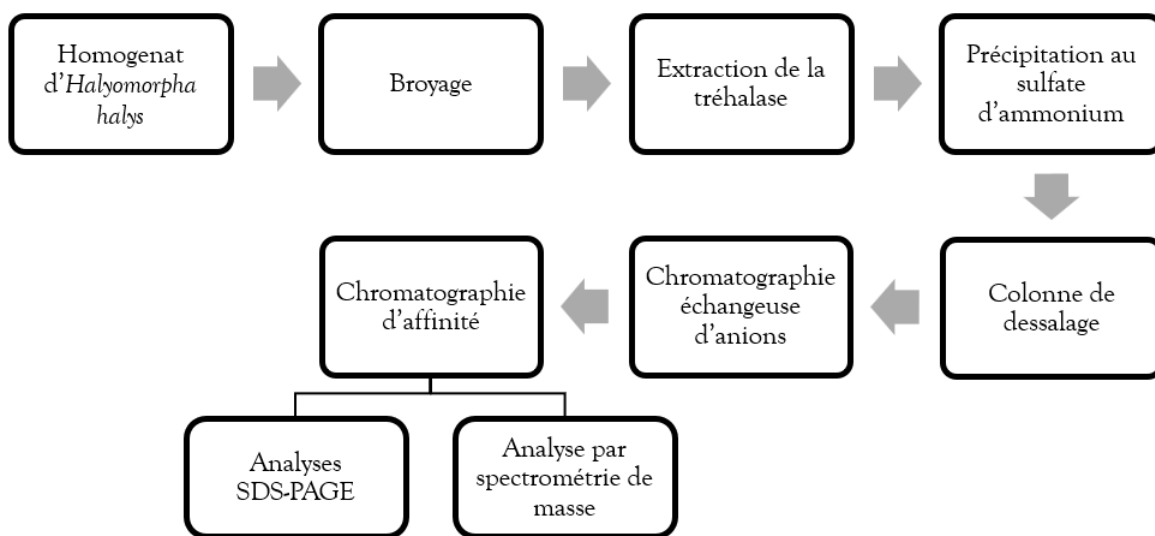


FIGURE 6 – Méthodologie de purification et de caractérisation de la tréhalase de *Halyomorpha halys*.

Tout d'abord, un homogenat de *Halyomorpha halys* est broyé afin d'en extraire les protéines solubles dont la tréhalase. Dans un second temps, les protéines sont séparées en fonction de leur

solubilité par une méthode de précipitation au sulfate d'ammonium. La purification de la tréhalase est poursuivie en effectuant deux étapes de chromatographie : une chromatographie échangeuse d'anions suivie d'une chromatographie d'affinité à la concanavaleine A (ConA). Après chaque étape de purification, une analyse SDS-PAGE ("*sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*") est réalisée afin de déterminer la pureté des fractions collectées. La présence de tréhalase est également détectée tout au long du processus de purification grâce à un test d'activité.

4 La glucose oxydase

Le second objectif de ce mémoire est d'étudier la glucose oxydase chez un hémiptère, *H. halys*, et chez un lépidoptère, *S. frugiperda*. Pour cela, l'enzyme doit être détectée et quantifiée dans les glandes salivaires d'insecte. La Figure 7 représente la stratégie suivie, divisée en trois étapes distinctes, afin d'étudier cette enzyme.

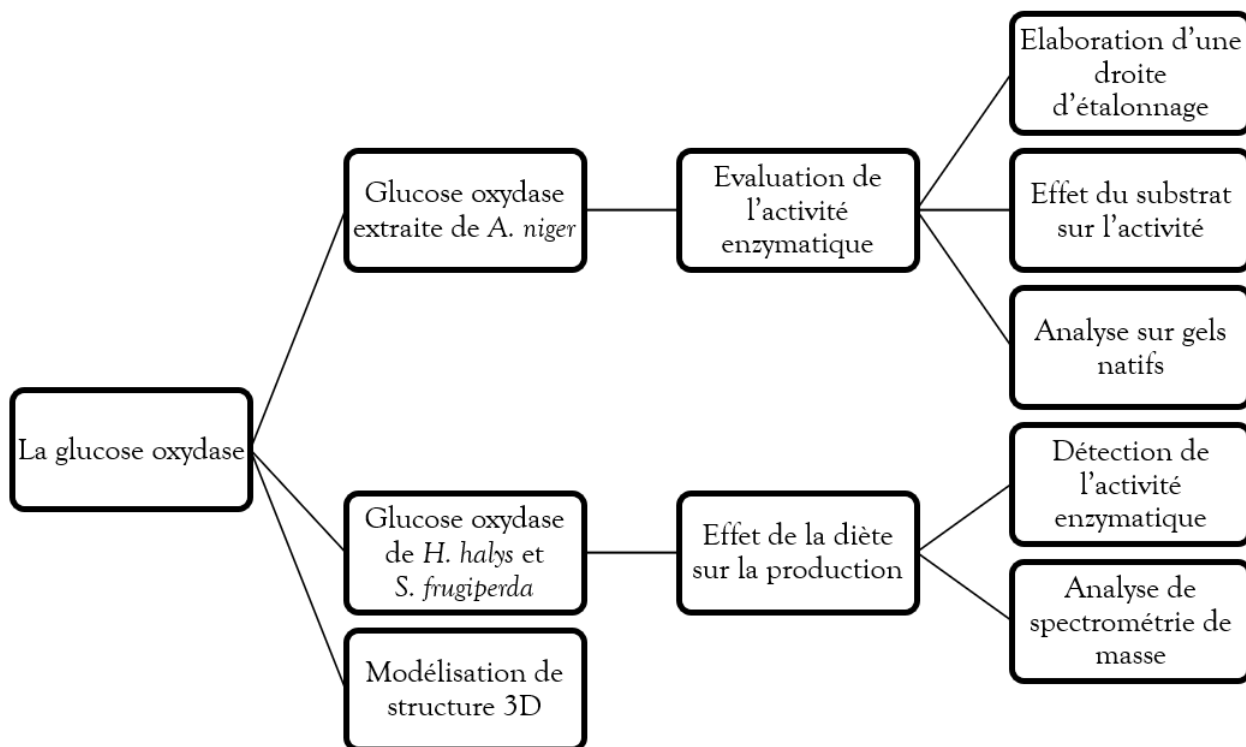


FIGURE 7 – Stratégie suivie afin d'étudier la glucose oxydase d'insecte.

Dans un premier temps, différentes optimisations ont été réalisées avec de la GOX commerciale (extraite de *Aspergillus niger*). Tout d'abord, l'activité enzymatique a été évaluée en suivant

différents protocoles afin de sélectionner le plus adéquat pour détecter l'activité de l'enzyme dans les glandes salivaires. Ensuite, différentes solutions contenant du β -D-glucose ou un mélange de α/β -D-glucose ont été évaluées afin de déterminer l'effet du substrat sur l'activité de la GOX. Enfin, des analyses sur gel natif ont été mises en place afin de pouvoir détecter l'activité de l'enzyme.

Dans un second temps, l'effet de la diète sur la production de l'enzyme a été étudié. Pour ce faire, des individus de *H. halys* et de *S. frugiperda* ont été élevés pendant 3 jours sur différentes plantes : des fèves des marais (*Vicia faba*), des feuilles de tomates (*Solanum lycopersicum*) et des feuilles de tabac (*Nicotiana tabacum*). Les insectes ont été disséqués afin de prélever les glandes salivaires pour détecter l'activité enzymatique de la glucose oxydase. Ensuite, des analyses de spectrométrie de masse sont réalisées afin d'identifier la GOX dans les échantillons de glandes salivaires.

Enfin, des études du site actif ont été effectuées après avoir modéliser par homologie les structures de GOX de *Spodopetra exigua* et *Helicoverpa zea*, dont les séquences primaires étaient disponibles, sur base de la structure tridimensionnelle de la GOX de *Aspergillus niger*.

Troisième partie

Résultats

Résultats

5 La tréhalase

5.1. Evaluation de l'activité enzymatique

Afin de pouvoir détecter l'activité de la tréhalase durant les différentes étapes de purification, un test doit être mis au point. Ce test, basé sur la réaction entre le glucose (produit de l'hydrolyse du tréhalose par la tréhalase) et l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) (Figure 8), est régulièrement employé pour estimer la quantité de sucre réducteur dans un échantillon [33].

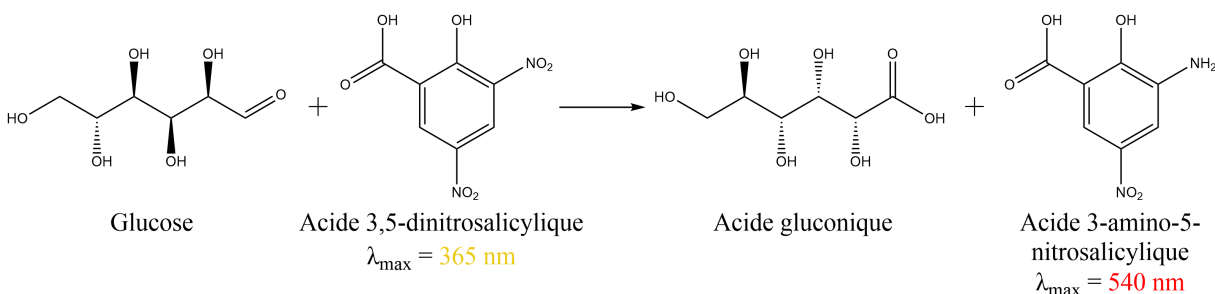


FIGURE 8 – Equation de la réaction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) avec le glucose.

Le DNS a une bande d'absorption maximale à une longueur d'onde de 365 nm et une autre bande à une longueur d'onde de 400 nm ce qui explique pourquoi il a une couleur jaune (Figure 9). Dans un milieu contenant du NaOH et du glucose à 100°C, le DNS est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique (ANS). Ce composé a une bande d'absorption maximale à une longueur d'onde de 540 nm et a donc une couleur rouge foncé. Il est donc possible de suivre la production d'ANS dans le milieu, visuellement et par spectrophotométrie UV-visible.

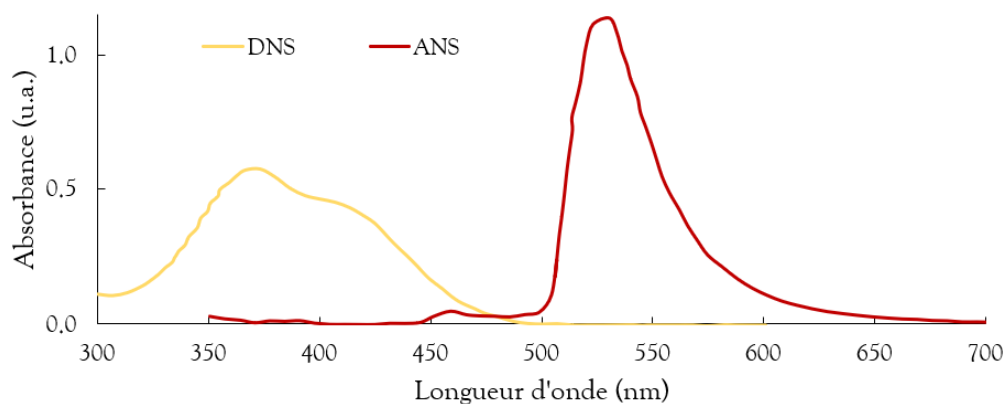


FIGURE 9 – Spectre d'absorbance de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) en jaune et de l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique (ANS) en rouge.

Le mécanisme de cette réaction est peu décrit mais il impliquerait la fonction aldéhyde de la molécule de glucose sous sa forme linéaire [33]. Le rendement de la réaction peut être influencé par la présence d'autres sucres réducteurs (fructose, lactose, ...) ou d'espèces portant un groupement carbonyle dans le milieu [33]. Pour une même concentration, l'intensité de la bande d'absorption dépend de la nature du sucre réducteur dans la solution testée [33]. De ce fait, une droite d'étalonnage doit être réalisée pour le sucre d'intérêt. Celle-ci permettra alors d'estimer quantitativement, grâce à l'équation de la droite, la quantité de glucose produit lors de la réaction enzymatique.

La Figure 10 représente la droite de calibration réalisée à partir d'échantillons de glucose de concentrations différentes auxquelles le DNS est ajouté (voir section "Matériel et méthodes"). Le mélange obtenu après la réaction doit être dilué afin de se trouver dans une gamme d'absorbance permettant d'appliquer la loi de Lambert-Beer.

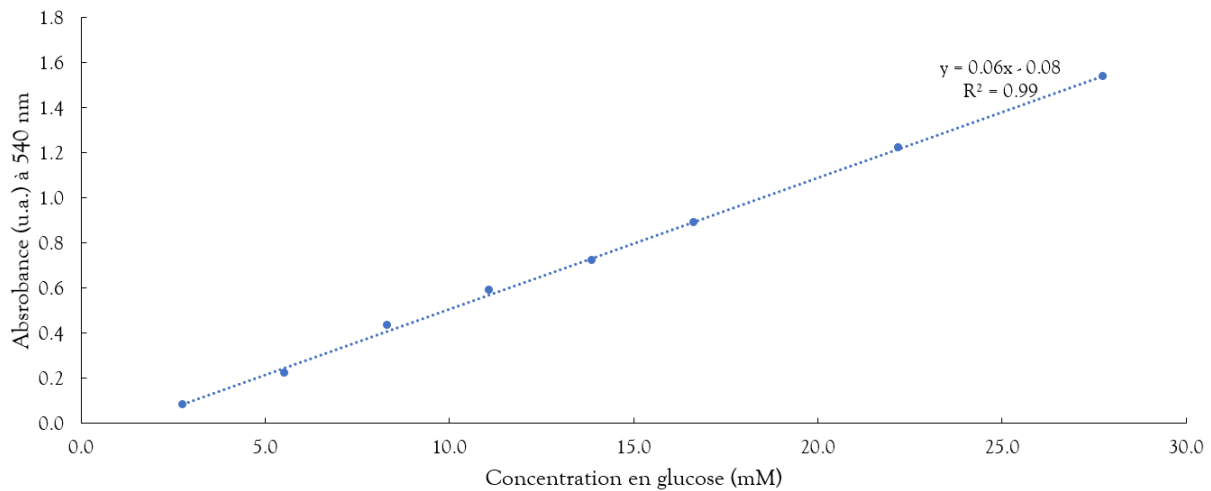


FIGURE 10 – Droite d'étalonnage obtenue grâce à des solutions de concentration en glucose différentes.

5.2. Purification de la tréhalase

5.2.1. Broyage

Les punaises diaboliques (*H. halys*) sont élevées à la faculté Agro-Bio Tech de Gembloux sur des plants de fève des marais (*Vicia faba*) à une température de 25°C. Elles sont broyées avec un broyeur mécanique suivant le protocole décrit dans la section " Matériel et méthodes ".

5.2.2. Extraction des protéines solubles

Après le broyage, 16 g d'homogénat de punaises sont suspendus dans un tampon acétate 0.2 M à pH 5.1. L'échantillon contient donc la multitude de protéines présentes chez l'insecte dont la tréhalase. Afin d'éviter une hydrolyse partielle des protéines présentes dans l'échantillon, du fluor de phénylméthylsulfonyle (PMSF) a été ajouté. Ce composé est un inhibiteur de protéases à sérine et permet alors d'éviter la dégradation de la protéine ciblée.

5.2.3. Précipitation au sulfate d'ammonium

Les protéines extraites sont ensuite traitées en appliquant une méthode de précipitation au sulfate d'ammonium. Cette étape permet de séparer les protéines en fonction de leur solubilité et se base sur les phénomènes de *salting-in* et *salting-out*.

La solubilité d'une protéine dépend de différents facteurs externes dont la concentration en sels dissous dans le milieu, la température ou encore le pH [34]. A de faibles concentrations en sel, les protéines sont de plus en plus solubles lorsque la force ionique de la solution augmente ("*salting-in*"). En revanche, à très hautes concentrations en sel, la solubilité des protéines diminue lorsque la force ionique augmente ce qui entraîne leur précipitation ("*salting-out*") (Figure 11) [35][36]. Ces effets de *salting-in* et *salting-out* peuvent être appliqués afin de précipiter sélectivement des protéines.

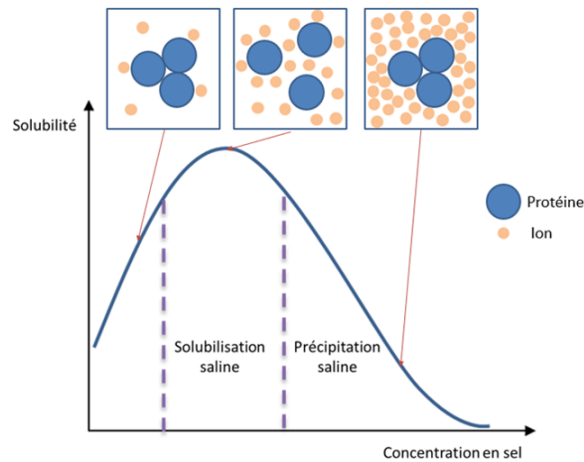


FIGURE 11 – Illustration du principe de *salting-in* et de *salting-out* (tirée du site <https://nacerjaballi.blogspot.com/2019/11/separation-de-la-proteine-selon-la.html>, consulté le 01/12/21).

Le sel généralement employé pour la précipitation sélective est le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfate d'ammonium). En effet, il a une haute solubilité et est disponible commercialement avec un haut degré de pureté [35].

Dans le cas de la purification de la tréhalase, du sulfate d'ammonium est ajouté à la solution contenant les protéines sur glace. La précipitation se fait une première fois pour atteindre une saturation en sulfate d'ammonium de 35% [37] afin d'éliminer des protéines solubles indésirées tout en conservant la tréhalase dans le surnageant, qui est ensuite séparé du culot par centrifugation. Par la suite, du sulfate d'ammonium est ajouté à ce surnageant afin d'atteindre une saturation de 60%

[37] qui est la concentration nécessaire à la précipitation de la tréhalase tout en laissant les protéines contaminantes en solution. Le culot récupéré après centrifugation contient alors la tréhalase. Il est solubilisé dans 5 mL de tampon Tris-HCl 20 mM pH8.0 pour les étapes de purification suivantes (voir section "Matériel et méthodes").

5.2.4. Colonne de dessalage

Le sulfate d'ammonium peut interférer dans la réaction entre le DNS et le glucose [38], ce qui empêcherait donc de détecter la tréhalase dans les étapes de purification successives. De ce fait, avant de pouvoir poursuivre les étapes de purification, il faut s'en débarrasser car il est présent en grande quantité dans l'échantillon. Pour cela, une colonne de dessalage est employée. Il s'agit d'une colonne constituée d'une matrice Sephadex G-25 utilisant le principe d'exclusion de taille afin de dessaler les échantillons protéiques. Cette méthode peut également être utilisée dans le but de faire un changement de tampon.

5.2.5. Chromatographie échangeuse d'anions

La chromatographie échangeuse d'anions est une méthode de purification non-dénaturante très répandue en biochimie. Elle est basée sur l'interaction d'une protéine chargée négativement avec une matrice chargée positivement [39]. Pour réaliser cette purification, il faut tout d'abord connaître le point isoélectrique de la protéine étudiée. Pour permettre l'interaction entre la protéine et la matrice, la solution dans laquelle se trouve la protéine d'intérêt doit avoir un pH supérieur au pI d'au moins une unité de pH. La protéine aura alors une charge globalement négative et interagira avec la matrice positive. Afin d'éluer les protéines fixées, il faut appliquer un gradient de NaCl. Il y aura donc une compétition entre les ions chlorure, chargés négativement, et la protéine pour les sites de fixation de la matrice. L'élution est possible car, lorsque la concentration en ions chlorure augmente, l'équilibre est déplacé.

Tout d'abord, la colonne est équilibrée avec un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8.0. Le pI de la tréhalase ayant une valeur comprise entre 5 et 7. Un pH de 8 assure une charge globalement négative à la protéine. L'appareil utilisé est un système FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) couplé à un détecteur UV permettant de suivre l'absorbance à 280 nm et donc de détecter la présence de protéines. La matrice contenue dans la colonne utilisée est composée d'un ligand DEAE (*diethylaminoethyl*) dont la fonction amine est chargée positivement à pH 8.0. L'échantillon protéique

est injecté en deux fois sur la colonne et deux premières bandes d'absorbance sont observées sur le chromatogramme (Figure 12). Ces deux bandes correspondent au *flow through* (FT) qui est composé de toutes les protéines qui ne se fixent pas sur la matrice de la colonne. Lorsque le signal est stabilisé, un gradient de chlorure de sodium (de 0 à 1 M) dans le même tampon Tris-HCl 20 mM pH 8.0 est appliqué afin d'éluer les protéines fixées. La courbe rouge correspond à la conductivité et permet de rendre compte de l'augmentation de la concentration en NaCl. Une bande d'absorption à 280 nm est observée entre les fraction 21 à 29 ce qui correspond aux protéines qui se détachent de la matrice.

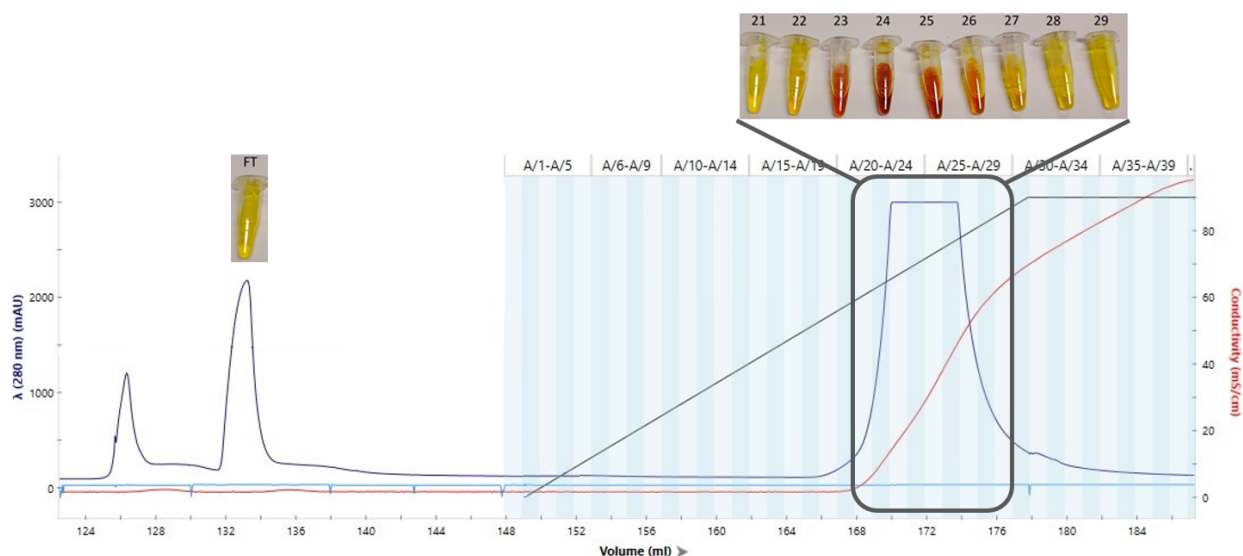


FIGURE 12 – Chromatogramme de la purification de la tréhalase de *H. halys* sur une colonne HiTrap™ DEAE FF. Absorbance à 280 nm (mAU) en bleu foncé, conductivité (mS/cm) en rouge, pression du système (mPa) en bleu clair et gradient en chlorure de sodium (%) en noir.

Enfin, afin de détecter la présence de tréhalase dans les différentes fractions, un test d'activité au DNS est effectué. Les fractions présentant de l'activité sont sélectionnées pour la dernière étape de purification. Il est constaté que les fractions correspondant à la bande d'élution contiennent de la tréhalase comme le montre la couleur rouge des échantillons 23 à 27 présents (Figure 12).

5.2.6. Chromatographie d'affinité : concanavoline A

La dernière étape de purification est basée sur l'affinité de la concanavoline A (ConA) avec les glycoprotéines. En effet, la tréhalase est décrite comme étant une protéine glycosylée [40] et peut donc interagir avec la colonne. La ConA est une protéine appartenant à la famille des lectines et se lie

sélectivement aux glycoprotéines contenant des résidus D-mannopyranosyl ou D-glucopyranosyl en présence d'ions Mn^{2+} et Ca^{2+} [41][42]. Afin de se lier de manière optimale aux protéines, la colonne de ConA doit être équilibrée avec un tampon dont le pH vaut 7.4 et dont la concentration en NaCl vaut 0.5 M [42]. Pour éluer les protéines, une solution contenant du méthyl- α -D-mannopyranoside passe dans la colonne car ce glucoside a une forte affinité pour la ConA. Il y aura donc une compétition entre la protéine d'intérêt et le méthyl- α -D-mannopyranoside pour les sites de fixation.

Dans un premier temps, la colonne est équilibrée grâce à un tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, $MnCl_2$ 1mM et $CaCl_2$ 1 mM à pH 7.4. Le système employé pour cette purification est identique à celui utilisé pour la chromatographie échangeuse d'anions (FPLC) couplé à un détecteur UV. L'échantillon protéique est injecté sur la colonne en une fois et la première bande d'absorbance correspond au FT. Lorsque le signal est stabilisé, les protéines fixées sont éluées grâce à un tampon d'éluion contenant du méthyl- α -D-mannopyranoside 0.5 M dans du tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M à pH 7.4. Une bande d'absorption à 280 nm est observée entre les fractions 13 à 21, correspondant aux protéines qui sont éluées.

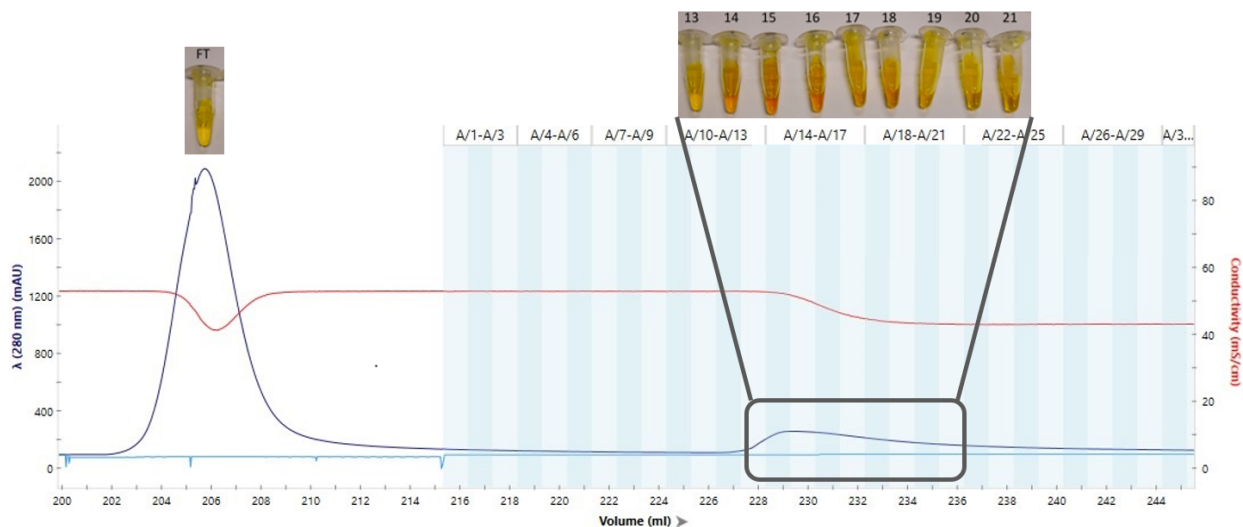


FIGURE 13 – Chromatogramme de la purification de la tréhalase de *H. halys* sur une colonne HiTrap™ ConA 4B. Absorbance à 280 nm (mAUV) en bleu foncé, conductivité (mS/cm) en rouge et pression du système (mPa) en bleu clair.

Comme précédemment, un test d'activité au DNS a été réalisé afin de détecter la présence de la tréhalase dans les différentes fractions. De l'activité est détectée dans les fractions 14 à 19 (Figure 13) ce qui confirme que la protéine est bien restée fixée sur la ConA et que la tréhalase de *H. halys* est bien une protéine glycosylée.

5.3. Analyse SDS-PAGE

L'analyse SDS-PAGE est une méthode largement utilisée pour des analyses qualitatives d'échantillons protéiques et qui est surtout employée lors du suivi d'une purification de protéine [43]. Le SDS est un détergent anionique qui, en présence de β -mercaptoéthanol (un agent réducteur), permet de dénaturer les protéines. La chaîne hydrocarbonée du SDS interagit avec la protéine par interactions quadrupolaires souvent appelées hydrophobes, qui déstabilisent ainsi la structure tertiaire de celle-ci. La protéine a alors une charge négative nette due au SDS [43]. Lorsqu'un potentiel est appliqué au gel de polyacrylamide, les protéines vont donc migrer plus ou moins facilement en fonction de leur taille et de la réticulation du polymère-support, les petites protéines migrant plus facilement que les grandes permettant ainsi leur séparation.

Afin de pouvoir rendre compte de la présence de protéines, une méthode de révélation doit être employée. Dans le cas de la tréhalase de punaise purifiée, les quantités sont très faibles ce qui rend la méthode de coloration au bleu de Coomassie inefficace. En effet, celle-ci n'est sensible qu'au microgramme de protéines. Une méthode de coloration plus sensible doit donc être utilisée : la coloration imidazole/zinc qui est sensible au nanogramme [44]. Il s'agit d'une méthode de coloration dite négative qui se base sur la formation d'un complexe entre l'imidazole et des ions de zinc autour des bandes de protéines. Ce complexe se présente sous la forme d'un précipité blanc et les bandes protéiques restent transparentes [45][46]. La différence de coloration est due à la distribution des ions Zn^{2+} dans le gel. En effet, au sein des bandes protéiques, ceux-ci interagissent avec les protéines en coordonnant certains acides aminés (aspartate, cystéine, glutamate et histidine) ainsi qu'avec la tête chargée du SDS. Dans le reste du gel, ils restent sous une forme libre ce qui leur permet d'interagir avec l'imidazole et forment alors un complexe blanc qui précipite. Il est ensuite possible de visualiser les bandes en plaçant le gel sur un fond noir afin d'observer le contraste entre les bandes transparentes et le précipité blanc.

Pour réaliser cette analyse, différents échantillons sont déposés dans les puits du gel et la migration est effectuée. Une bande apparaît à une masse moléculaire d'environ 75 kDa, ce qui correspond bien à la tréhalase recherchée (Figure 14). Les fractions étant pure, aucune étape de purification supplémentaire n'a été nécessaire.

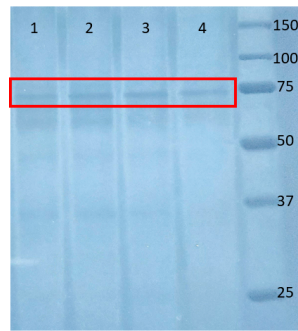


FIGURE 14 – Analyse SDS-PAGE contenant (1) la fraction 16, (2) la fraction 15, (3) la fraction 14, (4) la fraction 13 de la chromatographie d’affinité. Le rectangle rouge entoure les bandes de tréhalase.

Après cette dernière étape de purification, les fractions présentant de l’activité ont été rassemblées et sont en cours d’analyse par spectrométrie de masse afin d’en identifier la séquence en acide aminé.

6 La glucose oxydase

6.1. Mise au point d'une méthode pour doser la glucose oxydase

Afin de pouvoir détecter l'activité de la GOX dans les glandes salivaires d'insecte, un test enzymatique a d'abord été mis au point sur de la GOX commerciale (*Aspergillus niger*). Différentes méthodes ont été évaluées afin de déterminer laquelle est la plus sensible.

6.1.1. Mesure de la production de peroxyde d'hydrogène

Ce test a été effectué afin de détecter directement le peroxyde d'hydrogène produit lors de la réaction de la GOX avec le D-glucose en mesurant l'absorbance à 240 nm (longueur d'onde d'absorption du peroxyde d'hydrogène) (Figure 15) [47].

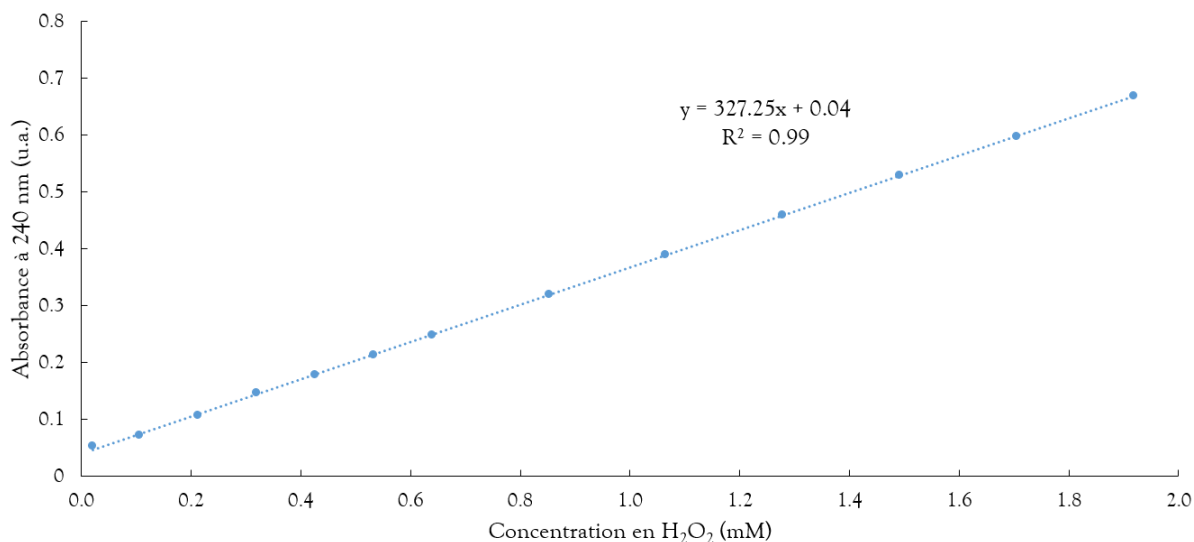


FIGURE 15 – Droite de calibration obtenue pour la détection de peroxyde d'hydrogène.

Malgré l'excellente qualité de la droite de calibration, celle-ci ne permet cependant pas de détecter l'activité enzymatique de la glucose oxydase. En effet, la concentration en GOX dans les glandes salivaires d'insectes étant de l'ordre de 10^{-6} M, le seuil de détection du peroxyde d'hydrogène par cette méthode n'est pas assez bas (10^{-4} M). Cette méthode ne peut donc pas être employée pour la détection de l'activité de la GOX dans les glandes salivaires d'insectes puisqu'elle n'est pas assez sensible.

6.1.2. Mesure de la production de 4-nitrophénol

La seconde méthode employée pour détecter la présence de GOX se base sur la réaction entre le peroxyde d'hydrogène avec de l'acide 4-nitrophénylboronique dont l'équation est donnée à la Figure 16 [48].

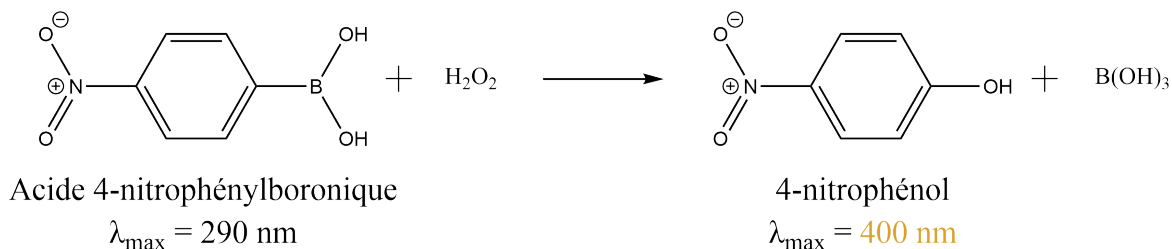


FIGURE 16 – Equation de la réaction de l'acide 4-nitrophénylboronique avec le peroxyde d'hydrogène (produit lors de la réaction de la glucose oxydase avec le glucose).

Le 4-nitrophénol produit lors de la réaction présente une bande d'absorption maximale à 400 nm, ce qui explique pourquoi la solution passe d'incolore à jaune-orange. Sa production peut donc être suivie par spectrophotométrie. Pour réaliser ces mesures, l'absorbance de solutions contenant de l'acide 4-nitrophénylboronique 0.2 mM et différentes concentrations en peroxyde d'hydrogène (de 5×10^{-5} à 4×10^{-4}) a été mesurée (Figure 17).

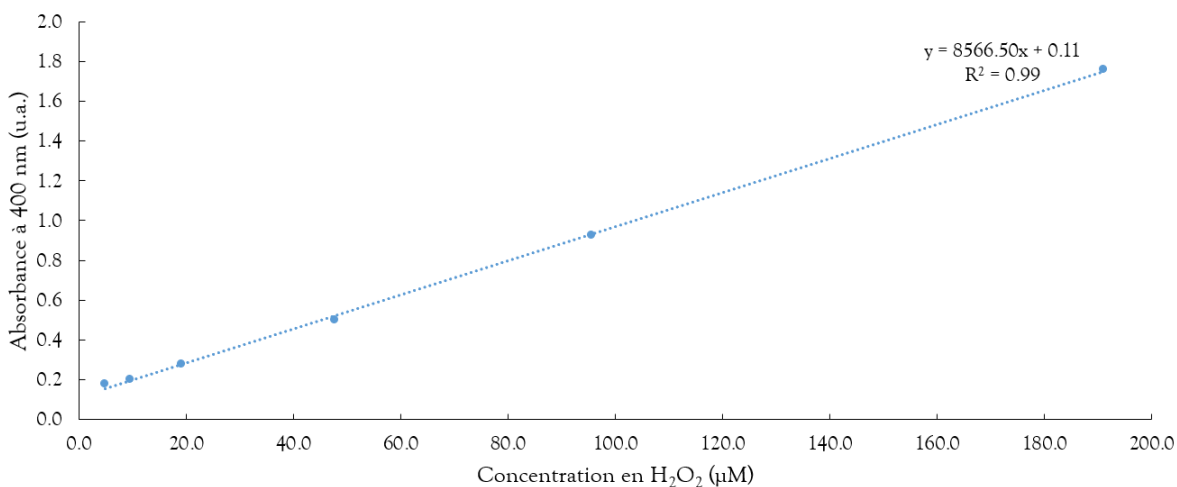


FIGURE 17 – Droite de calibration obtenue pour la détection du 4-nitrophénol en utilisant différentes concentrations en peroxyde d'hydrogène.

Comme précédemment, la droite de calibration n'est pas adaptée au cas de la détection de l'activité de la glucose oxydase car, la limite de détection étant de $\times 10^{-5}$, ce test n'est pas suffisamment sensible.

6.1.3. Mesure de la production de *o*-dianisidine oxydée

Ce protocole se base sur l'utilisation d'une peroxydase (POX) (provenant de *A. niger*), une enzyme catalysant l'oxydation de la *o*-dianisidine en utilisant le peroxyde d'hydrogène produit lors de la réaction du β -D-glucose avec la glucose oxydase (Figure 18).

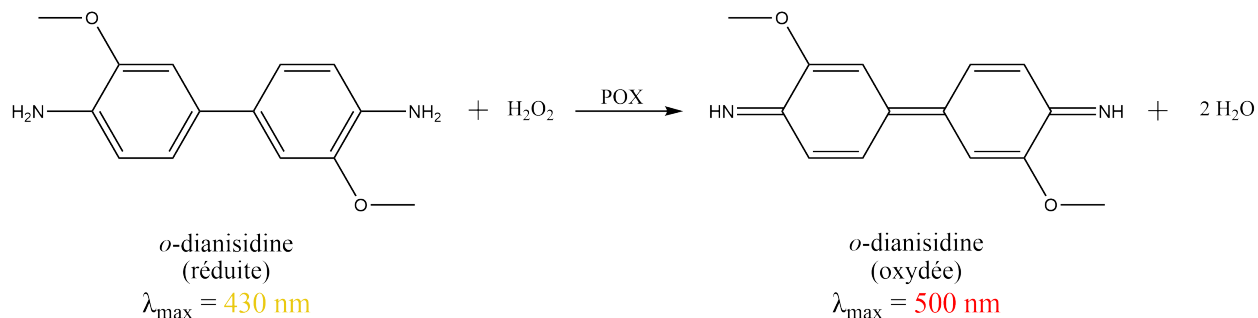


FIGURE 18 – Equation de la réaction d'oxydation de la *o*-dianisidine par la peroxydase.

La *o*-dianisidine oxydée a une bande d'absorption maximale à 500 nm et sa production peut être suivie par spectrophotométrie. Ce protocole est le mieux adapté à la détection de l'activité de la GOX car il est permet de détecter une concentration en glucose oxydase de l'ordre de $10 \times 10^{-7} \text{ M}$ (Figure 19, voir section "Matériel et méthodes") [49].

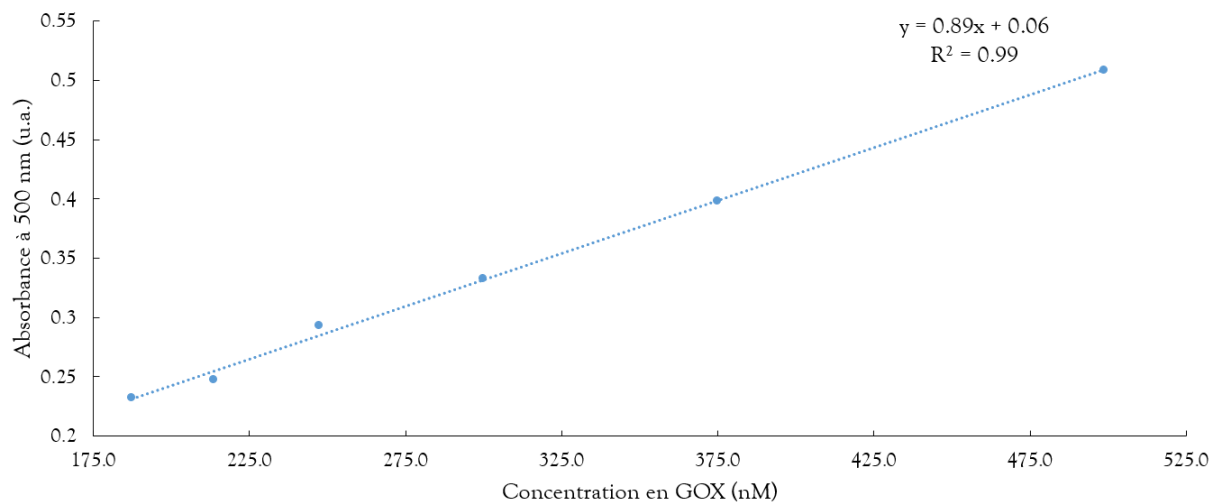


FIGURE 19 – Droite de calibration obtenue pour la détection de la *o*-dianisidine produite par la réaction du peroxyde d'hydrogène et de la peroxydase.

6.1.4. Différences entre α et β -D-glucose

Différentes études ont démontré que le substrat de la glucose oxydase était exclusivement le β -D-glucose. Or, les premiers tests ont été réalisés en employant le D-glucose disponible au laboratoire, qui est en fait un mélange α/β -D-glucose. Afin de déterminer si la détection de l'activité de l'enzyme était impactée par le D-glucose utilisé pour faire les solutions, des expériences ont été réalisées en employant du β -D-glucose ou un mélange de α/β -D-glucose à différentes concentrations (0.05 M et 0.56 M). Le protocole utilisé pour effectuer ces tests est décrit dans la section "Matériel et méthodes".

Les résultats obtenus montrent que pour une même concentration en D-glucose, le mélange de α/β -D-glucose et le β -D-glucose pur ont des pentes similaires (Figure 20). Ce constat peut être expliqué par la mutarotation du glucose en solution. En effet, il y a un équilibre entre les formes α et β qui est en faveur de la forme β [50] [51]. Cependant, ces données ne peuvent pas indiquer si l'enzyme réagit spécifiquement avec l' α ou le β -D-glucose. Elles indiquent seulement que le test enzymatique peut être effectué avec une solution contenant du α/β -D-glucose.

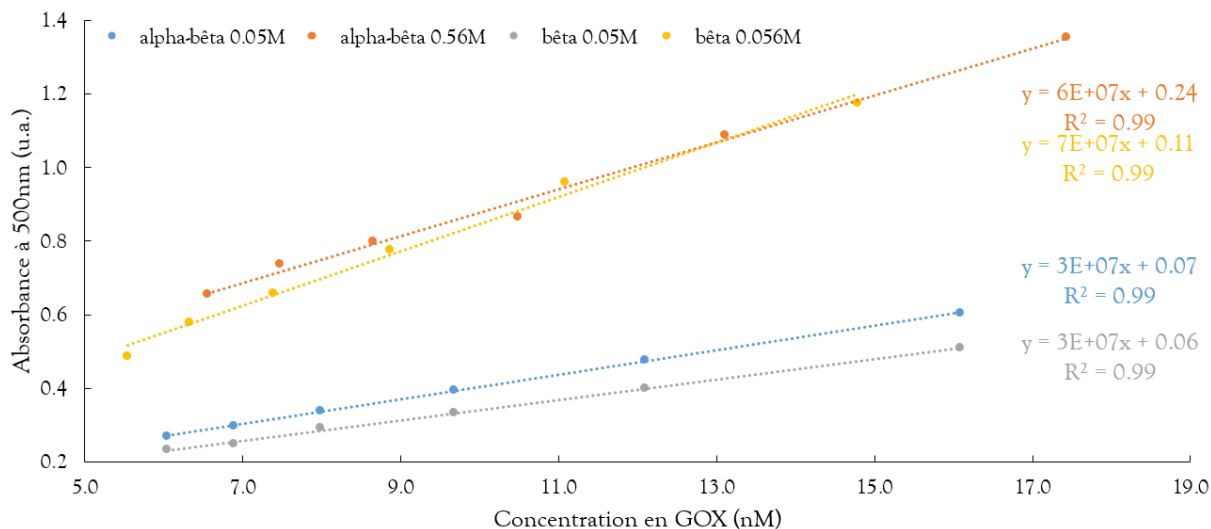


FIGURE 20 – Droites de calibration obtenues pour les tests d'activité de la GOX en utilisant différentes concentrations en GOX.

Au vu de ces résultats, les tests suivants ont été réalisés en utilisant le mélange de α/β -D-glucose car celui-ci permet d'avoir une activité de GOX similaire au β -D-glucose pur tout en étant moins coûteux et plus facilement disponible.

6.2. Analyses sur gels natifs

Dans un premier temps, des analyses sur gels dits "natifs" ont été effectuées pour des solutions de GOX de *A. niger*. Différentes méthodes de coloration ont été employées. La première est la coloration par imidazole/zinc dont la sensibilité et le mécanisme sont expliqués au point 5.3.

La seconde méthode de coloration se base sur la réactivité de la GOX. En effet, le gel étant natif, la protéine conserve son activité enzymatique et sa réaction avec le glucose peut être employée pour détecter les bandes de protéines. Pour détecter l'activité, le gel est placé dans une solution contenant du glucose, de la *o*-dianisidine et de la peroxydase (avec les mêmes concentrations que lors de l'élaboration de la droite de calibration) jusqu'à ce que les bandes apparaissent (environ 1 heure). La Figure 21 permet d'observer l'activité de l'enzyme pour différentes concentrations en glucose oxydase. Les différents puits montrent une différence d'intensité de couleur ce qui prouve que le test enzymatique sur gel natif peut être employé pour la détection de l'activité.

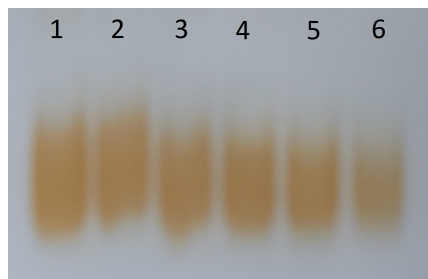


FIGURE 21 – Gel natif contenant la glucose oxydase de *A. niger* (le puit n°1 étant le plus concentré et le n°6, le moins concentré).

6.3. Activité des glandes salivaires

Les travaux de Hu *et al.* rapportent que la production de GOX dans les glandes salivaires d'insectes de l'ordre des lépidoptères dépend de la diète de ceux-ci [52]. *Nicotina tabacum* (le tabac) et *Solanum lycopersicum* (la tomate) sont des plantes faisant partie de la famille des *Solanaceae* et dont les feuilles produisent de la nicotine comme moyen de protection contre les espèces nuisibles. Il est intéressant d'étudier les interactions entre cette famille de plantes et l'insecte car la GOX diminuerait grandement la concentration en nicotine dans les feuilles attaquées en inhibant son induction. En effet, le peroxyde d'hydrogène produit lors de l'oxydation du glucose par la GOX supprimerait la voie d'induction de la production de la nicotine [26] et fermerait également les stomates [24]. La présence de sucrose ou de glucose sur les feuilles de tabac ou de tomate aurait aussi une influence sur la production de la GOX [52].

Afin de rendre compte de cette différence de production, les *H. halys* et les *S. frugiperda* ont été élevés sur plusieurs plantes différentes : *Vicia faba* (utilisé comme contrôle), *Nicotina tabacum* et *Solanum lycopersicum* [52]. Pour cela, les glandes salivaires des adultes de *H. halys* et de *S. frugiperda* du 3^{ème} stade larvaire ont été disséquées après avoir été nourris sur les différents plants. Après quatre jours, 6 individus de chaque espèce d'insectes, pour chaque diète, ont été disséqués afin de prélever les glandes salivaires. Celles-ci ont ensuite été broyées grâce à un pilon et les échantillons ont été centrifugés afin d'éliminer les débris cellulaires de la solution. L'activité enzymatique a été mesurée grâce au protocole explicité dans la partie "Matériel et méthodes". Les analyses préliminaires n'ont malheureusement montré aucune activité. Cela pourrait être dû à une trop faible concentration en GOX dans les échantillons testés. Ces derniers sont en cours d'analyse par spectrométrie de masse pour détecter la présence (ou non) de GOX.

Des analyses sur gels natifs ont également été effectuées pour détecter l'activité de la glucose oxydase de glandes salivaires d'insectes mais les résultats préliminaires ne permettent pas de détecter d'activité.

6.4. Modélisation par homologie de la structure tridimensionnelle de glucose oxydases

Le but de cette partie est i) de construire par homologie la structure tridimensionnelle de GOX de *Spodoptera exigua* et de *Helicoverpa zea* et ii) de les comparer avec celle de *Aspergillus niger*.

Dans la banque de donnée PDB, il n'existe aucune description de GOX d'insectes. Néanmoins, des structures 3D de cette enzyme, extraite de champignons et de bactéries, peuvent être trouvées, comme celle de *A. niger* (1CF3, Figure 22) qui est disponible commercialement et qui a été employée dans ce mémoire. Du point de vue du repliement, l'enzyme peut être séparée en deux domaines distincts : i) un domaine composé de feuillets β et en partie responsable de la liaison du FAD (flavine adénine dinucléotide, un cofacteur d'oxydo-réduction) et ii) un domaine présentant un feuillet β antiparallèle soutenu par quatre hélices α et contenant le site actif [53]. Le site actif est une poche profonde dans laquelle se trouve le FAD et les différents résidus d'acides aminés catalytiques (His516, His559 et Glu412) [31].

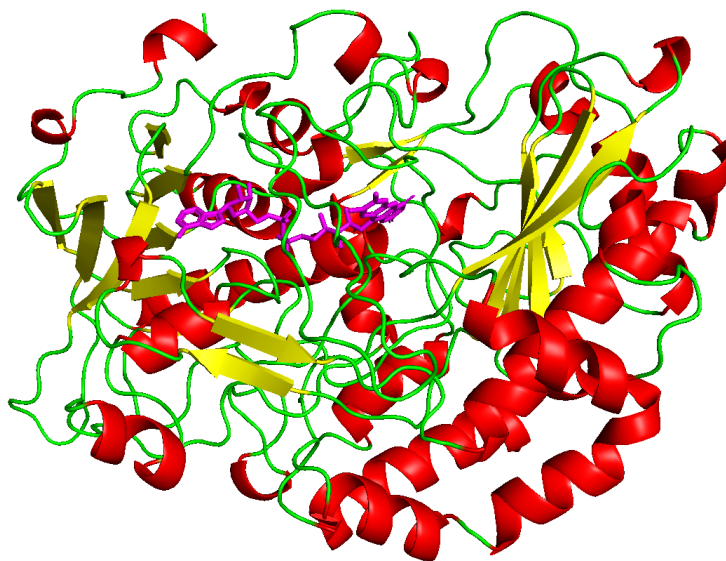


FIGURE 22 – Structure 3D de la glucose oxydase de *Aspergillus niger* avec les hélices α en rouge, les feuillets β en jaune et le FAD en rose.

Cette structure est utilisée dans un premier temps pour prédire par *docking* l'interaction entre le substrat, le β -D-glucose, et le site actif (Figure 23). Des études ont démontré que deux résidus histidines (His516 et His559) et un résidu glutamate (Glu412) sont les résidus catalytiques impliqués

dans le mécanisme réactionnel [54][31] et ceux-ci sont identifiés dans le site actif. D'après Wohlfahrt *et al.*, l'un des atomes d'azote de l'His559 forme un pont H fort avec le résidu Glu412 ce qui permet de fixer l'orientation de l'His559 dans le site catalytique [31]. Quant à l'His516, elle semble être la base catalytique nécessaire à la réaction d'oxydo-réduction. En effet, en remplaçant l'His516 par une alanine, ils ont constaté que l'enzyme perdait une grande partie de son activité, démontrant ainsi son rôle capital dans la réaction enzymatique [31]. En plus des interactions avec les résidus catalytiques, la Figure 23 montre que le glucose forme un pont H avec le FAD et avec les résidus Tyr68, Asn514, Arg512 et Thr110 présents dans le site actif [31].

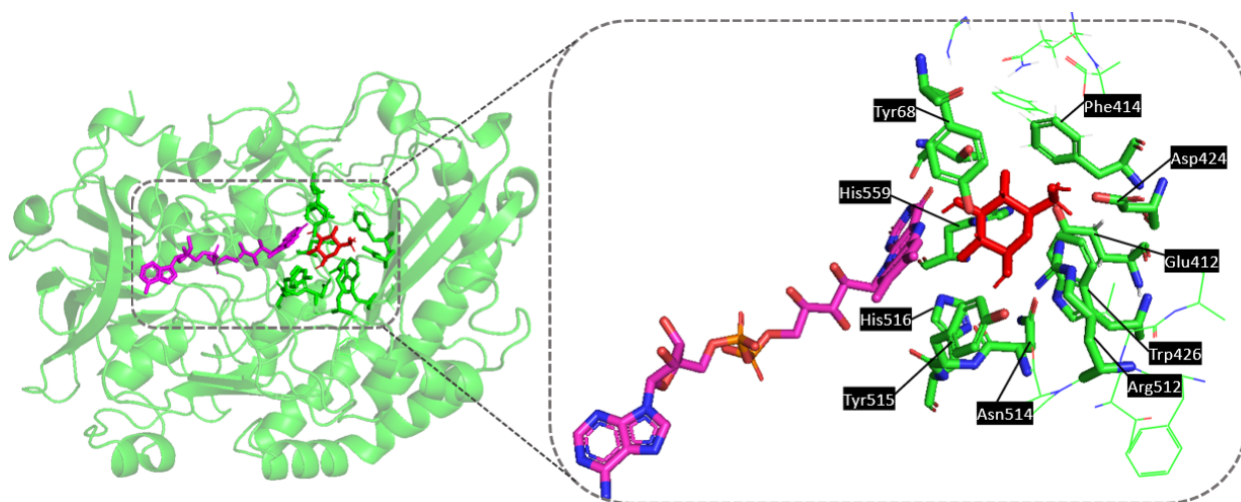


FIGURE 23 – Structure 3D de la glucose oxydase de *Aspergillus niger* en complexe avec une molécule de glucose (en rouge).

Cependant, le mécanisme réactionnel suggère que l'hydrogène sur le carbone anomère de la molécule de glucose doit être proche du cofacteur FAD [54], ce qui n'est pas le cas dans le modèle proposé. Des structures 3D d'autres glucose oxydase (1GPE, de *Penicillium amagasakiense* et 5NIW, de *A. niger*) ont alors été analysées et il en est ressorti qu'il y a une molécule d'eau au sein du site actif qui serait conservée pour toutes les structures. Une nouvelle simulation de *docking* a alors été réalisée afin d'analyser l'impact de cette molécule d'eau sur l'orientation du glucose dans le site actif. Le résultat obtenu (Figure 24) permet de constater qu'il y a bien une réorientation de la molécule de glucose et la formation d'autres ponts H et que l'hydrogène porté par le carbone anomère est bien, cette fois, face au FAD. Ceci laisse suggérer qu'une molécule d'eau catalytique pourrait être impliquée dans le mécanisme. Ce premier résultat montre qu'il sera essentiel de tenir compte des molécules d'eau pour les futures études de *docking*.

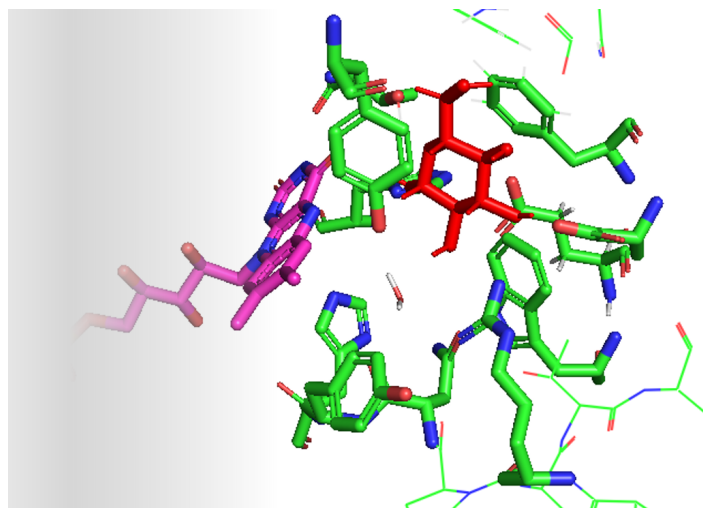


FIGURE 24 – Structure 3D de la glucose oxydase de *Aspergillus niger* en complexe avec une molécule de glucose et une molécule d'eau.

Etant donné qu'il n'existe aucune donnée sur la séquence en acides aminés des GOX que nous avons étudiées (*H. halys* et de *S. frugiperda*), la structure de la GOX de deux autres insectes de la familles des lépidoptères (*Spodoptera exigua* et *Helicoverpa zea*) a, dans un second temps, été construite par homologie avec celle de la GOX de *A. niger* (Figure 25). Ces deux insectes faisant partie de la même famille que *S. frugiperda*, ils peuvent dans un premier temps, servir de modèle pour essayer de prédire la structure potentielle de la glucose oxydase de *S. frugiperda*.

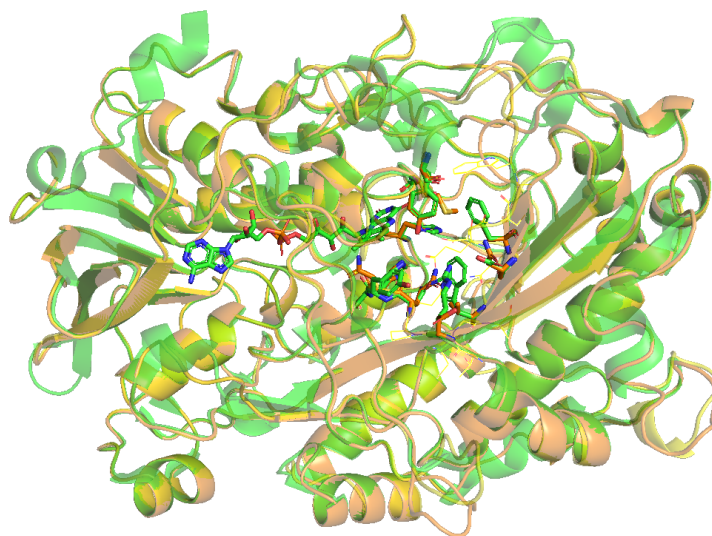


FIGURE 25 – Structures 3D modélisées des glucoses oxydases de *Aspergillus niger* (en vert) *Spodoptera exigua* (en orange) et de *Helicoverpa zea* (en jaune).

La glucose oxydase de *S. exigua* et *H. zea* partagent environ 27 % d'identité de séquence avec celle de *A. niger*. Généralement, pour qu'une modélisation par homologie soit fiable, il faut que l'identité de séquence soit d'au moins 30 %. Néanmoins, dans le cas de ce mémoire, les études de modélisation présentées sont des résultats préliminaires qui représentent un intérêt certain puisque les glucose oxydases d'insectes ne sont que très peu étudiées. Il est donc important de comprendre les mécanismes mis en jeu et d'identifier les résidus impliqués dans ces mécanismes afin de trouver un inhibiteur efficace. Des diagrammes de Ramachandran (voir section "Annexes") ont également été analysés et 90 % des acides aminés modélisés se retrouvent dans les zones favorables pour les deux modèles. D'un point de vue structure générale, les différentes GOX présentent toutes les mêmes domaines et les positions des hélices α et des feuillets β sont relativement similaires (Figure 25).

Au niveau du site actif, il est d'abord intéressant de comparer les résidus présents pour les GOX de *S. exigua* et de *H. zea* (Figure 26). Une partie du site actif est identique chez les deux GOX d'insecte mais quelques différences sont constatées. Tout d'abord, les résidus Cys443 et Ile441 de *S. exigua* qui deviennent respectivement des résidus Ala439 et Glu438 pour *H. zea*. De plus, une boucle portant un résidu Glu441 est observée dans la structure de *H. zea* mais pas chez *S. exigua*. Les sites actifs des GOX de lépidoptères étant différents, il est possible que les mécanismes catalytiques de la GOX varient en fonction de l'espèce étudiée. De ce fait, il serait possible d'imaginer des inhibiteurs sélectifs de GOX en fonction de l'insecte ciblé.

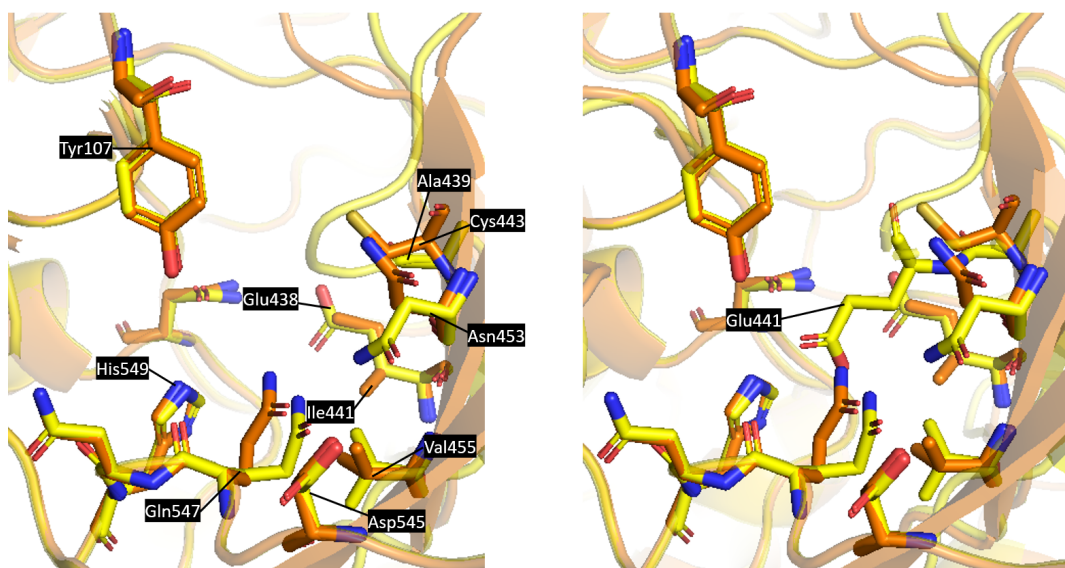


FIGURE 26 – Structure 3D des glucose oxydases de *Spodoptera exigua* (en orange) et de *Helicoverpa zea* (en jaune) modélisées à partir de la structure 3D de la GOX de *A. niger*.

Ensuite, il est pertinent de comparer les résidus du site actif des GOX de *A. niger* et de *S. exigua* (Figure 27) (la comparaison avec *H. zea* n'étant pas nécessaire car les résidus impliqués sont décrits ci-dessus). Premièrement, concernant les trois résidus catalytiques, le résidu His516 est conservé tandis que le résidu His559 chez *A. niger* est remplacé par un Asn587 chez *S. exigua*. Ces observations concordent avec celles de Lesokovac *et al.* qui démontrent que l'His516 est conservée dans la structure primaire de beaucoup de glucose oxydases mais que l'His559 n'est que très peu conservée [32]. Il y a également une différence pour la Glu412 de *A. niger* qui devient un résidu Ile441 chez *S. exigua*.

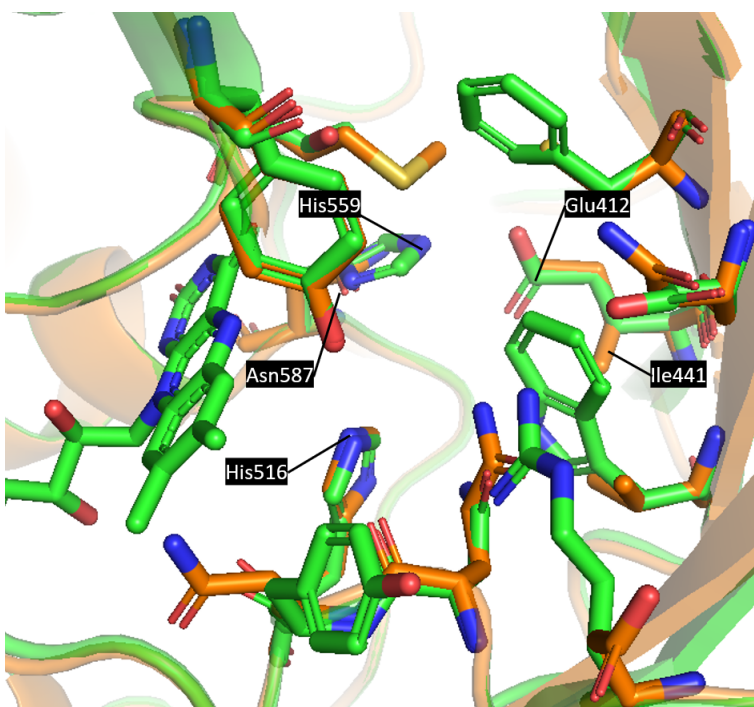


FIGURE 27 – Sites actifs des glucoses oxydases de *Aspergillus niger* (en vert) *Spodoptera exigua* (en orange) modélisées à partir de la structure 3D de la GOX de *A. niger*.

Hormis les résidus catalytiques, il existe d'autres différences au niveau du site actif et celles-ci sont reprises dans la Table 1. Une de ces différences majeures est que l'Arg512 est remplacée par une Asp545, modifiant ainsi la charge du site actif. De manière générale, ces différences laissent présager que le mécanisme catalytique des GOX d'espèces différentes pourrait être différent. Tous ces résultats permettent de conclure que des inhibiteurs sélectifs à certaines espèces pourraient être développés.

TABLE 1 – Différences de résidus entre les glucoses oxydases de *A. niger* et de *S. exigua*.

<i>Aspergillus niger</i>	<i>Spodoptera exigua</i>
Thr110	Met154
Phe414	Cys443
Asp424	Asn453
Trp426	Val455
Arg512	Asp545
Asn514	Gln547
Tyr515	Asn548
His559	Asn587

Quatrième partie

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

La lutte contre les insectes ravageurs est un enjeu majeur dans notre société actuelle. L'utilisation de pesticides permet de contrôler l'impact des espèces nuisibles sur les cultures. Cependant, leur emploi intensif et prolongé provoque des effets néfastes sur la santé humaine et les insectes développent des résistances envers ces composés. L'objectif général de ce mémoire s'inscrit dans la recherche d'alternatives durables qui permettent de lutter contre les insectes nuisibles en ciblant ses fonctions biologiques essentielles (par exemple la tréhalase chez *H. halys*) mais aussi en étudiant l'impact des interactions entre l'insecte et les plantes (par exemple la GOX de *H. halys* et *S. frugiperda*).

7 La tréhalase

Une des fonctions biologiques essentielles chez les insectes est l'hydrolyse du tréhalose par la tréhalase, le tréhalose étant une réserve énergétique essentielle à la survie de l'insecte. L'un des objectifs de ce mémoire est ainsi de purifier cette enzyme chez *H. halys* en quantité suffisante afin de pouvoir la caractériser d'un point de vue structural et fonctionnel. Pour ce faire, la stratégie mise en place se calque sur le protocole établi au sein du laboratoire CPB concernant la tréhalase de *Acythosiphon pisum*, le puceron vert du pois.

Avant toute purification, une extraction de la tréhalase est nécessaire et a pour objectif d'extraire le maximum de protéines solubles, dont la tréhalase, d'un broyat de punaises. La première étape de purification est une précipitation au sulfate d'ammonium permettant de séparer les protéines en fonction de leur solubilité. Afin de détecter la présence de tréhalase durant les différentes étapes, un test d'activité a été mis en place en se basant sur la réaction du DNS avec le glucose produit lors de l'hydrolyse du tréhalose par la tréhalase.

Après cela, des purifications par FPLC sont nécessaires. Étant donné que le point isoélectrique des tréhalases est évalué entre 5 et 6, une chromatographie échangeuse d'anions est d'abord employée dans des conditions de tampon Tris-HCl 20 mM à pH 8.0. Ensuite, les tréhalases étant connues comme étant des protéines glycosylées, une chromatographie d'affinité à la concanavaline A s'est révélée pertinente. En effet, la concanavaline est une protéine ayant une forte affinité avec les glycoprotéines. Après ces étapes de purification, une seule bande est observée sur le gel SDS-PAGE

aux environs de 75 kDa et les fractions sont bien actives. Tout indique que nous sommes parvenus à isoler la tréhalase de *H. halys*.

En perspective, de nouvelles purifications partant d'une plus grande quantité de punaises permettront d'extraire davantage de tréhalase afin de déterminer les conditions d'activité optimales de l'enzyme (pH, température, ...) et d'évaluer ses paramètres cinétiques (K_m , V_{max}). De plus, des tests d'inhibition peuvent être mis en place en employant des inhibiteurs connus de la tréhalase, comme la validamycine A.

L'analyse par spectrométrie de masse en cours permettra de mettre en évidence la séquence en acide aminés de la tréhalase de *H. halys* et de comparer celle-ci avec les séquences de tréhalases décrites dans la base de données NCBI.

Une fois cette séquence identifiée, une modélisation par homologie de l'enzyme et l'étude de son site actif seront envisagées. En effet, la mise en évidence des résidus du site actif permettra une comparaison entre la tréhalase de *H. halys* et les tréhalases d'insectes de la famille des lépidoptères décrites dans la PDB. De plus, des analyses de *docking* peuvent être réalisées afin d'étudier les interactions entre le site actif et des inhibiteurs potentiels.

8 La glucose oxydase

Un des moyens de lutter contre les insectes ravageurs est d'inhiber, chez les insectes nuisibles, les enzymes qui bloquent les mécanismes de défense de la plante. Dans ce cadre, l'étude de la GOX de *H. halys* est important. En effet, des études ont démontré que la GOX est une enzyme effectrice qui inhibe les moyens de défense mis en place par les plantes. Lors de la réaction d'oxydation du glucose présent dans la plante par la glucose oxydase, du peroxyde d'hydrogène est formé. Ce composé serait responsable de l'inhibition des voies d'induction de petites molécules dans la plante et fermerait les stomates, empêchant alors la plante de se défendre. L'objectif concernant la GOX est de détecter son activité dans les glandes salivaires d'insectes hémiptère et lépidoptère.

Des tests préliminaires ont d'abord été réalisés en utilisant une glucose oxydase (de *A. niger*) commercialement disponible afin de mettre au point les tests d'activité. Pour cela, différents protocoles ont été testés et le plus adéquat nécessite l'utilisation d'une autre enzyme (la peroxydase) qui permet de doser la quantité de peroxyde d'hydrogène produit. Ensuite, des solutions contenant du β -D-glucose ou un mélange de α/β -D-glucose ont été utilisées afin de déterminer si le substrat

employé avait un effet sur l'activité de l'enzyme. Il en est ressorti que quelle que soit la solution utilisée, l'activité est similaire.

Après cela, des tests d'activité sur des glandes salivaires de *Halyomorpha halys* et de *Spodoptera frugiperda* ont été réalisés et l'impact de la diète sur la production de glucose oxydase dans les glandes salivaires a été évaluée. Nos études préliminaires n'ont pas encore permis de détecter une activité de la GOX ce qui peut être dû à la trop faible concentration en enzyme dans les échantillons.

Enfin, un modèle de la structure 3D de la GOX de deux insectes (*S. exigua* et *H. zea*) a été construit par homologie avec la GOX de *A. niger*. L'analyse des sites actifs a permis de conclure que les résidus catalytiques sont différents chez le champignon et chez les insectes.

En perspective, de nouveaux tests d'activité de GOX pourront être effectués avec plus de glandes salivaires. Ensuite, l'analyse par spectrométrie de masse des échantillons (en cours) permettra d'identifier la glucose oxydase même si elle est présente en de très faible quantité. Des études de l'interaction plante-insecte peuvent également être menées afin de comprendre le mécanisme exact de l'enzyme et de ses produits au sein des plantes afin de pouvoir concevoir un inhibiteur. Enfin, une modélisation par homologie de la structure tridimensionnelle de la GOX chez *H. halys* et chez *S. frugiperda* peut être envisagée afin de connaître les acides aminés impliqués dans la réaction d'oxydation. Une fois la glucose oxydase identifiée pour *H. halys* ou *S. frugiperda*, une purification pourra également être envisagée afin d'étudier son activité catalytique et ses paramètres cinétiques.

Cinquième partie

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

9 Extraction de la tréhalase

9.1. Elevage des punaises

Les punaises diaboliques (*Halyomorpha halys*) sont élevées à la faculté Agro-Bio Tech de Gembloux à environ 25°C, avec un taux d'humidité de 55% et une photopériode de 16h. Elles sont nourries avec des plants de *Vicia faba* qui sont changés toutes les deux semaines et des graines de tournesol changées toutes les semaines. Lorsque l'élevage doit être stimulé, les œufs sont récupérés en découpant les feuilles sur lesquelles ils se trouvent et sont placés dans une boîte dans les mêmes conditions jusqu'à leur éclosion.

9.2. Broyage du matériel biologique

Des punaises (16 g) sont broyées mécaniquement à l'aide d'un vibro-broyeur Retsch® Mixer Mill MM 400. Pour ce faire, trois punaises sont placées dans des Eppendorf™ avec des billes en acier de 5 mm de diamètre dans le vibro-broyeur pendant 3 minutes à 30 Hz. Les broyats sont ensuite rassemblés dans un Falcon™ de 50 mL et les Eppendorf™ sont rincés avec 500 µL de tampon acétate (0.2 M, pH 5.1) afin de récupérer le plus d'homogénat possible.

9.3. Extraction de la tréhalase

Les échantillons broyés sont placés dans 15 mL de tampon acétate (0.2 M, pH = 5.1) auquel sont ajoutés 300 µL de PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride, un inhibiteur de protéase). L'homogénat est placé sous agitation pendant 1 heure à 4°C puis centrifugé à 12 000 g et 4°C pendant 30 minutes. Le surnageant est récolté et stocké à 4°C, il contient la tréhalase. Le culot est solubilisé dans 10 mL du même tampon auquel sont ajoutés 150 µL de PMSF. L'homogénat est placé sous agitation pendant 1 heure à 4°C puis centrifugé à 12 000 g et 4°C pendant 30 minutes. Le surnageant est séparé du culot. Les deux surnageants sont rassemblés et un aliquot de 100 µL est récolté pour les futurs tests enzymatiques.

10 Dosage enzymatique de la tréhalase

Le dosage enzymatique de la tréhalase se base sur la réaction du glucose (produit de l'hydrolyse du tréhalose) avec l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS). L'apparition d'une couleur rouge/orange indique la transformation du DNS en acide 3-amino-5-nitrosalicylique qui possède une longueur d'onde d'absorption maximale à 540 nm.

10.1. Elaboration de la droite d'étalonnage

La droite d'étalonnage est élaborée à partir de solutions de glucoses de concentrations connues (de 0 à 5 mg/mL par pas de 1). Une solution de réactif DNS est préparée en dissolvant 0.5 g de NaOH, 0.5 g de DNS et 9.6 g de tartrate de sodium et potassium dans de l'eau distillée. Les mesures sont réalisées dans des cellules en polystyrène dont le chemin optique est de 1 cm. Dans ces cellules, sont placés 100 μL de solution de glucose et 300 μL de réactif de DNS préalablement chauffé pendant 5 minutes à 100°C. Cette solution est diluée 4 fois avant de mesurer l'absorbance à 540 nm.

10.2. Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique des échantillons est mesurée en plaçant dans un tube type Eppendorf™ 40 μL d'échantillon ainsi que 40 μL de solution de tréhalose 0.2 M. Ce mélange est incubé à 37°C sous légère agitation durant 30 minutes. Après incubation, 320 μL de réactif de DNS sont ajoutés au tube qui sera ensuite chauffé pendant 5 minutes à 100°C. Le contenu du tube est ensuite transvasé dans une cuvette en polystyrène et l'absorbance est mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

11 Précipitation au sulfate d'ammonium

La première étape de purification est celle de la précipitation au sulfate d'ammonium. Celui-ci est lentement ajouté à la solution de surnageant afin d'atteindre une concentration finale de 35%. La solution est centrifugée à 12 000 g à 4°C pendant 30 minutes. Ensuite, du sulfate d'ammonium est lentement ajouté au surnageant afin d'atteindre une concentration finale de 60%. La solution est centrifugée à 12 000 g à 4°C pendant 30 minutes. Le culot, contenant la tréhalase, est solubilisé dans 5 mL de tampon Tris-HCl (20 mM, pH = 8.0). Un aliquot de 100 μ L est récolté pour les futurs tests enzymatiques.

12 Dessalage et échange de tampon

Avant de procéder à la première étape de purification, la solution contenant la tréhalase est passée sur une colonne PD-10 Sephadex[™] G-25 de 8.3 mL de milieu (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec le tampon d'équilibration pour la purification qui s'en suit (20 mM Tris-HCl, pH = 8.0).

Tout d'abord, la colonne est équilibrée avec le tampon employé pour la suite de la purification qui, dans ce cas, est un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8.0. Ensuite, un volume de 2.5 mL d'échantillon protéique est placé sur la colonne. Le *flow through* est laissé passer pour que l'échantillon soit dans la colonne. Les protéines sont éluées grâce à 3.5 mL du tampon d'équilibration et l'éluat est récolté et le processus de purification peut se poursuivre.

13 Purification de la tréhalase

13.1. Chromatographie échangeuse d'anions

Conditionnement de la colonne

La première étape de purification par chromatographie de la tréhalase nécessite l'utilisation d'une colonne HiTrap[™] DEAE FF (GE Healthcare) de 5 mL. La colonne est conditionnée avec 50 mL de tampon d'équilibration (20 mM Tris-HCl, pH = 8.0).

Purification

Après avoir équilibré la colonne, l'échantillon passé sur la PD-10 est injecté dans une boucle d'échantillonnage puis chargé sur la colonne par passage du tampon d'équilibration (débit = 1.0 mL/min) jusqu'à stabilisation des signaux ce qui indique le passage du *flow through*. Les protéines fixées sur la colonne sont alors éluées en appliquant un gradient de NaCl de 0 à 1 M avec un débit de 1.0 mL/min durant 30 minutes à l'aide d'un tampon d'éluion (20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH = 8.0). Les fractions d'éluion sont récupérées et un nettoyage de la colonne est réalisé en faisant passer une solution de NaCl 2 M, suivie d'une solution de NaOH 1 M, ensuite avec de l'eau distillée et enfin une solution d'éthanol 20%.

Avant de procéder à la dernière étape de purification, un test d'activité est réalisé sur les fractions d'éluion afin d'identifier celles qui contiennent la tréhalase, qui sont alors rassemblées.

13.2. Chromatographie d'affinité : concanavoline A

Conditionnement de la colonne

La dernière étape de purification de la tréhalase nécessite l'utilisation d'une colonne HiTrapTM Con A 4B (GE Healthcare) de 5 mL. La colonne est équilibrée avec 50 mL de tampon d'équilibration (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, pH = 7.4).

Purification

Après avoir équilibré la colonne, les fractions rassemblées sont injectées dans une boucle d'échantillonnage puis chargées sur la colonne par passage du tampon d'équilibration (débit : 1 mL/min) jusqu'à stabilisation des signaux ce qui indique la fin du passage du FT. Les protéines fixées sur la colonne sont alors éluées sans appliquer de gradient à l'aide d'un tampon d'éluion (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.5 M méthyl- α -D-mannopyranoside, pH = 7.4) avec un débit de 1.0 mL/min durant 25 minutes. Les fractions d'éluion sont récupérées et un nettoyage de la colonne est réalisé en faisant passer une solution de NaCl 2M, ensuite une solution de NaOH 1 M, suivie d'eau distillée et enfin un tampon de stockage (0.1 M acétate, 1 M NaCl, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20% éthanol, pH = 6.0).

14 Evaluation de la purification par analyse SDS-PAGE

L'analyse SDS-PAGE permet de rendre compte de la composition d'un échantillon protéique. Les protéines sont dénaturées et chargées négativement par le SDS puis elles sont séparées sur le gel en fonction de leur taille par migration sous l'effet d'un potentiel appliqué.

14.1. Préparation du gel

Le gel est constitué de deux parties : un gel d'empilement (*stacking gel*) et un gel de séparation (*running gel*). Afin d'assurer une séparation des différentes protéines au sein du gel, le pourcentage de réticulation du gel est adapté en fonction de la masse moléculaire de la protéine d'intérêt : celle de la tréhalase étant d'environ 70 kDa, le pourcentage de réticulation du gel est de 12%. Le tableau 2 reprend la composition détaillée des gels préparés. Les différents composants doivent être ajoutés dans l'ordre du tableau. L'APS (*ammonium persulfate*) et le TEMED (*tetramethylethylenediamine*) doivent être ajoutés en dernier lieu car ils initient la polymérisation du gel.

TABLE 2 – Composition des gels d'empilement (15 mL, 12% acrylamide) et de séparation (5 mL) utilisés lors de l'analyse SDS-PAGE.

Gel d'empilement		Gel de séparation	
Composé	Volume (mL)	Composé	Volume (mL)
Eau distillée	5.08	Eau distillée	3.00
Mélange acrylamide	5.94	Mélange acrylamide	0.66
Tampon Tris-HCl 1.5 M pH8.8	3.75	Tampon Tris-HCl 0.5 M pH6.8	1.26
SDS (10%)	0.150	SDS (10%)	0.050
APS (10%)	0.075	APS (10%)	0.025
TEMED	0.0075	TEMED	0.005

Après la préparation du gel de séparation, celui-ci est coulé entre les deux plaques d'une cassette de gel (Invitrogen™) jusqu'à la démarcation. De l'éthanol 70% est versé au-dessus du gel durant sa polymérisation (environ 30 minutes). Après polymérisation, l'éthanol est retiré et le gel d'empilement est placé au-dessus du gel de séparation et un peigne avec le nombre de puits adéquat est inséré entre les deux plaques de la cassette. La polymérisation prend environ 30 minutes et lorsque celle-ci est finie, la cassette est entourée d'un papier Tork™ humide et est stockée à 4°C.

14.2. Préparation des échantillons

Les fractions à analyser sont préparées en mélangeant 15 μL d'échantillon protéique et 5 μL de tampon de charge (62 mM Tris-HCl pH6.8, 25% glycérol, 2% SDS, 0.01g/mL bleu de bromophénol, 5% β -mercaptoéthanol) dans un tube EppendorfTM. Le mélange est ensuite agité au vortex durant 30 secondes.

14.3. Electrophorèse

Une cassette de gel, dont les peignes sont enlevés, est placée dans un dispositif électrophorétique. A l'intérieur de la cuve d'électrophorèse sont versé 500 mL de tampon de migration (25 mM Tris-HCl, 200 mM glycine, 0.1% SDS, pH = 8.3). Un volume de 15 μL d'échantillons protéiques préparés précédemment et 8 μL de marqueur de masse moléculaire (*Precision Plus ProteinTM All Blue Standards*) sont déposés dans les puits. Le générateur est ensuite réglé sur 200 V et la migration dure pendant 50 minutes.

14.4. Coloration du gel

Les échantillons étant très peu concentrés, la méthode de coloration imidazole-zinc est employée afin de révéler les bandes de protéines sur le gel. Cette méthode est en effet 100 fois plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie.

Après l'électrophorèse, le gel est immergé dans une solution d'imidazole 0.2 M durant 10 à 15 minutes. Le gel est ensuite placé dans une solution de chlorure de zinc 0.3 M jusqu'à apparition des bandes protéiques (environ 30 secondes). Le gel est enfin retiré de la solution de chlorure de zinc et est rincé à l'eau distillée. Une photo du gel est prise sur un fond noir afin d'observer les bandes.

15 Dissection des glandes salivaires

15.1. *Halyomorpha halys*

Les punaises sont collectées dans un Falcon de 50 mL et endormies dans de la glace pendant 10 minutes. Elles sont ensuite placées dans une solution de Ringer (0.154 M NaCl, 1.96 mM KCl, 1.80 mM CaCl₂, 0.12 mM NaHCO₃, pH 6.5) et décapitées afin de récupérer les glandes salivaires qui sont ensuite placées dans 150 μ L de tampon acétate 50 mM pH 5.1.

15.2. *Spodoptera frugiperda*

Les chenilles légionnaires d'automne sont collectées dans un Falcon de 50 mL et endormies dans de la glace pendant 10 minutes. Elles sont ensuite placées sur le dos dans une solution de Ringer et la peau du deuxième segment abdominal entre la première paire de pattes est ouverte. A l'aide de pinces, les glandes salivaires labiales sont complètement extraites de la cavité corporelle. Celles-ci sont ensuite placées dans 150 μ L de tampon acétate 50 mM pH 5.1.

16 Dosage enzymatique de la glucose oxydase

Le dosage enzymatique se base sur la réaction du peroxyde d'hydrogène (produit de la réduction du glucose sous contrôle enzymatique de la glucose oxydase) avec de la *o*-dianisidine sous contrôle enzymatique d'une peroxydase commerciale. L'apparition d'une couleur rouge indique la transformation de la *o*-dianisidine réduite en *o*-dianisidine oxydée, composé qui possède une longueur d'onde d'absorption à 500 nm.

16.1. Elaboration de la droite d'étalonnage

La droite d'étalonnage est élaborée à partir de solutions de la glucose oxydase, de *Aspergillus niger*, de concentrations connues (de 2×10^{-7} à 5×10^{-7}). Un cocktail de réactifs est préparé (0.17 mM en *o*-dianisidine et 95 mM en β -D-glucose dans du tampon acétate 50 mM, pH = 5.1) et est chauffé à 37°C. Une solution de peroxydase commerciale 8.6 μ M est préparée dans de l'eau distillée et est conservée sur glace. Les mesures sont réalisées dans des cuvettes en polystyrène dont le chemin optique est de 1 cm. Dans ces cellules, sont placés 2.9 mL de cocktail de réactif, 100 μ L de solution de peroxydase et 100 μ L de solution de glucose oxydase. L'absorbance à 500 nm est alors mesurée directement à l'aide d'un spectrophotomètre.

16.2. Mesure d'activité enzymatique

Après avoir isolé six paires de glandes salivaires, celles-ci sont broyées à l'aide d'un pilon dans le tampon acétate. L'EppendorfTM est ensuite centrifugé afin de séparer les membranes cellulaires de la solution qui contient alors les protéines.

Pour réaliser le test d'activité enzymatique, 607 μ L de solution de cocktail de réactif ainsi que 23 μ L de solution de peroxydase sont placés dans une cuvette en polystyrène. Ensuite, immédiatement après l'ajout de 70 μ L de l'échantillon de glandes salivaires dans la cuvette, l'absorbance à 500 nm est mesurée.

17 Evaluation de l'activité par analyse sur gels natifs

L'analyse par gel natif permet de rendre compte de la composition d'un échantillon protéique. Les protéines restent sous leur forme native et sont séparées sur le gel en fonction de leur taille par migration sous l'effet d'un potentiel appliqué.

17.1. Préparation du gel

Le gel est constitué d'une seule partie : un gel de séparation (running gel). Afin d'assurer une séparation des différentes protéines au sein du gel, le pourcentage de réticulation du gel est adapté en fonction de la masse moléculaire de la protéine d'intérêt : celle du dimère de la glucose oxydase étant d'environ 130 kDa, le pourcentage de réticulation du gel est de 8%. Le tableau 3 reprend la composition détaillée des gels préparés et les différents composants doivent être ajoutés dans l'ordre du tableau. L'APS (*ammonium persulfate*) et le TEMED (*tetramethylethylenediamine*) doivent être ajoutés en dernier lieu car ils initient la polymérisation du gel.

TABLE 3 – Composition des gels natifs (10 mL, 8% acrylamide).

Composé	Volume (mL)
Eau distillée	4.83
Mélange acrylamide	2.67
Tampon Tris-HCl 1.5 M pH8.8	2.50
APS (10%)	0.050
TEMED	0.010

Après la préparation du gel, celui-ci est coulé entre les deux plaques d'une cassette de gel (Invitrogen™) jusqu'au-dessus de la cassette et un peigne comptant le nombre de puits adéquat est inséré entre les deux plaques de la cassette. La polymérisation prend environ 30 minutes et lorsque celle-ci est finie, la cassette est entourée d'un papier Tork™ humide et est stockée à 4°C.

17.2. Préparation des échantillons

Les fractions à analyser sont préparées en mélangeant 10 μ L d'échantillon protéique et 10 μ L de tampon de charge (0.2 M Tris-HCl pH 6.8, 80% glycérol, 0.01g/mL bleu de bromophénol) dans un tube type Eppendorf™.

17.3. Electrophorèse

Une cassette de gel, dont les peignes sont enlevés, est placée dans un dispositif électrophorétique. A l'intérieur de la cuve d'électrophorèse sont versés 500 mL de tampon de migration (25 mM Tris-HCl, 0.20 M glycine, pH = 8.8). Un volume de 15 μL d'échantillons protéiques préparés précédemment et 8 μL de marqueur de masse moléculaire (*Precision Plus ProteinTM All Blue Standards*) sont déposés dans les puits. Le générateur est ensuite réglé sur 120 V et la migration a lieu pendant 2 heures.

17.4. Coloration du gel

Les échantillons étant très peu concentrés, la méthode de coloration imidazole-zinc est employée afin de révéler les bandes de protéines sur le gel (voir 14.4). La révélation des bandes peut également se faire en utilisant l'activité de la glucose oxydase.

Le gel est immergé dans une solution de cocktail de réactif et de peroxydase (concentrations similaires au test d'activité de la glucose oxydase) jusqu'à l'apparition de bandes rouge-orange correspondant à la production de *o*-dianisidine oxydée (environ 1h).

18 Modélisation moléculaire

Les structures de GOX de *Spodoptera exigua* et de *Helicoverpa zea* ont été modélisées à partir de la structure 3D de la glucose oxydase de *Aspergillus niger* (code PDB 1CF3) à l'aide de *SWISSMODEL*. Le site actif des GOX a été étudié en analysant les résidus d'acides aminés dans un périmètre de 10 Å autour des résidus catalytiques connus (His516, His559 et Glu412) grâce au programme *GOLD*. Les structures ont ensuite été visualisées grâce à *PyMol*.

Sixième partie

Bibliographie

Bibliographie

- [1] D. Dent and R.H. Binks. *Insect pest management*. Cabi, 2020.
- [2] S.E. Sexton, Z. Lei, D. Zilberman, et al. The Economics of Pesticides and Pest Control. *International Review of Environmental and Resource Economics*, 1(3) :271–326, 2007.
- [3] K.B. Rice, C.J. Bergh, E.J. Bergmann, D.J. Biddinger, C. Dieckhoff, G. Dively, H. Fraser, T. Garipey, G. Hamilton, T. Haye, et al. Biology, Ecology, and Management of Brown Marmorated Stink Bug (Hemiptera : Pentatomidae). *Journal of Integrated Pest Management*, 5(3) :A1–A13, 2014.
- [4] K.L. Kamminga, A.L. Koppel, D.A. Herbert Jr, and T.P. Kuhar. Biology and Management of the Green Stink Bug. *Journal of Integrated Pest Management*, 3(3) :C1–C8, 2012.
- [5] S.M. Barlow, F.M. Sullivan, and R.K. Miller. Occupational, industrial and environmental agents. In *Drugs during pregnancy and lactation*, pages 599–638. Elsevier, 2015.
- [6] S.H. Thany. Neonicotinoid insecticides. In *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*, pages 75–83. Springer, 2010.
- [7] S.M. Ensley. Neonicotinoids. In *Veterinary Toxicology*, pages 521–524. Academic Press, 2018.
- [8] L.P. Sheets. Imidacloprid : A Neonicotinoid Insecticide. In *Hayes’ handbook of pesticide toxicology*, pages 2055–2064. Elsevier, 2010.
- [9] T.R. Fukuto. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87 :245–254, 1990.
- [10] B. Tiwari, S. Kharwar, and D.N. Tiwari. Pesticides and Rice Agriculture. In *Cyanobacteria*, pages 303–325. Elsevier, 2019.
- [11] S.M Brander, M.K. Gabler, N.L. Fowler, R.E. Connon, and D. Schlenk. Pyrethroid Pesticides as Endocrine Disruptors : Molecular Mechanisms in Vertebrates with a Focus on Fishes. *Environmental science & technology*, 50(17) :8977–8992, 2016.
- [12] W. Tang, D.I. Wang, J. Wang, Z. Wu, L. Li, M. Huang, S. Xu, and D. Yan. Pyrethroid pesticide residues in the global environment : An overview. *Chemosphere*, 191 :990–1007, 2018.
- [13] D. Chandler, A.S. Bailey, G.M. Tatchell, G. Davidson, J. Greaves, and W.P. Grant. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 366(1573) :1987–1998, 2011.
- [14] M.J. Perry. Effects of environmental and occupational pesticide exposure on human sperm : a systematic review. *Human reproduction update*, 14(3) :233–242, 2008.
- [15] K.-H. Kim, E. Kabir, and S.A. Jahan. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the total environment*, 575 :525–535, 2017.
- [16] R.L. Metcalf. Insect Resistance to Insecticides. *Pesticide science*, 26(4) :333–358, 1989.

- [17] G.W. Elzen and D.D. Hardee. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on managing insect resistance to insecticides. *Pest Management Science : formerly Pesticide Science*, 59(6-7) :770–776, 2003.
- [18] L. Iannello. Impact des défenses naturelles de la plante, induites par une rhizobactérie, sur la biologie de la punaise invasive *Halyomorpha halys*. Master’s thesis, ULiège, June 2020.
- [19] R. Day, P. Abrahams, M. Bateman, T. Beale, V. Clottey, M. Cock, Y. Colmenarez, N. Corniani, R. Early, J. Godwin, et al. Fall armyworm : impacts and implications for Africa. *Outlooks on Pest Management*, 28(5) :196–201, 2017.
- [20] J. Sidana, B. Singh, and O. Sharma. Occurrence of the new invasive pest, fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)(Lepidoptera : Noctuidae), in the maize fields of Karnataka, India. *Curr. Sci*, 115 :621–623, 2018.
- [21] E. Shukla, L.J. Thorat, B.B. Nath, and S.M. Gaikwad. Insect trehalase : Physiological significance and potential applications. *Glycobiology*, 25(4) :357–367, 2015.
- [22] G. Wegener, V. Tschiedel, P. Schlöder, and O. Ando. The toxic and lethal effects of the trehalase inhibitor trehazolin in locusts are caused by hypoglycaemia. *Journal of Experimental Biology*, 206(7) :1233–1240, 2003.
- [23] A. Barraza and F. Sánchez. Trehalases : A neglected carbon metabolism regulator? *Plant signaling & behavior*, 8(7) :e24778, 2013.
- [24] P.-A. Lin, Y. Chen, D. Chaverra-Rodriguez, C.C. Heu, N.B. Zainuddin, J.S. Sidhu, M. Peiffer, C.-W. Tan, A. Helms, D. Kim, et al. Silencing the alarm : an insect salivary enzyme closes plant stomata and inhibits volatile release. *The New Phytologist*, 230(2) :793, 2021.
- [25] M.E. Maffei, G.-I. Arimura, and A. Mithöfer. Natural elicitors, effectors and modulators of plant responses. *Natural product reports*, 29(11) :1288–1303, 2012.
- [26] evidence that the caterpillar salivary enzyme glucose oxidase provides herbivore offense in solanaceous plants.
- [27] G. Bonaventure, A. VanDoorn, and I. T. Baldwin. Herbivore-associated elicitors : FAC signaling and metabolism. *Trends in plant science*, 16(6) :294–299, 2011.
- [28] M. Peiffer and G.W. Felton. The Host Plant as a Factor in the Synthesis and Secretion of Salivary Glucose Oxidase in Larval *Helicoverpa zea*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology : Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 58(2) :106–113, 2005.
- [29] S.B. Bankar, M.V. Bule, R.S. Singhal, and L. Ananthanarayan. Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology advances*, 27(4) :489–501, 2009.
- [30] L.F.P. Ferreira, M.E. Taqueda, A. Converti, M. Vitolo, and A. Pessoa Jr. Purification of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* by Liquid-Liquid Cationic Reversed Micelles Extraction. *Biotechnology progress*, 21(3) :868–874, 2005.
- [31] G. Wohlfahrt, S. Witt, J. Hendle, D. Schomburg, H.M. Kalisz, and H.-J. Hecht. 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallographica Section D : Biological Crystallography*, 55(5) :969–977, 1999.
- [32] V. Leskovic, S. Trivić, G. Wohlfahrt, J. Kandrač, and D. Peričin. Glucose oxidase from *Aspergillus niger* : the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(4) :731–750, 2005.

- [33] N.N. Deshavath, G. Mukherjee, V.V. Goud, V.D. Veeranki, and C.V. Sastri. Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars : Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International journal of biological macromolecules*, 156 :180–185, 2020.
- [34] S.R. Trevino, J.M. Scholtz, and C.N. Pace. Measuring and increasing protein solubility. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(10) :4155–4166, 2008.
- [35] K.C Duong-Ly and S.B. Gabelli. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods in enzymology*, 541 :85–94, 2014.
- [36] P. Wingfield. Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current protocols in protein science*, 13(1) :A–3F, 1998.
- [37] V. Neyman, F. Francis, A. Matagne, M. Dieu, C. Michaux, and E.A. Perpète. Purification and Characterization of Trehalase From *Acyrtosiphon pisum*, a Target for Pest Control. *The protein journal*, pages 1–12, 2021.
- [38] V. Neyman. Purification et caractérisation des tréhalases chez l’*Acyrtosiphon pisum* en vue de la conception de nouveaux bioinsecticides. Master’s thesis, Haute Ecole Condorcet, June 2019.
- [39] A. Jungbauer and R. Hahn. Ion-Exchange Chromatography. *Methods in enzymology*, 463 :349–371, 2009.
- [40] D. Rando, G.-W. Kohring, and F. Giffhorn. Production, purification and characterization of glucose oxidase from a newly isolated strain of *Penicillium pinophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(1) :34–40, 1997.
- [41] G.-Y. Chen, C.-Y. Chen, M. D.-T. Chang, Y. Matsuura, and Y.-C. Hu. Concanavalin A Affinity Chromatography for Efficient Baculovirus Purification. *Biotechnology progress*, 25(6) :1669–1677, 2009.
- [42] S. Sharma, T.K. Bhat, and M.N. Gupta. Bioaffinity immobilization of tannase from *Aspergillus niger* on concanavalin A–Sepharose CL-4B. *Biotechnology and applied biochemistry*, 35(3) :165–169, 2002.
- [43] Y.S. Rajput and R. Sharma. SDS-PAGE – Principle and Applications. *Chemical Analysis of Value Added Dairy Products and Their Quality Assurance*, page 81, 2011.
- [44] H.-M. Chen. Revisit of Imidazole-Zinc Reverse Stain for Protein Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In *Protein Gel Detection and Imaging*, pages 139–147. Springer, 2018.
- [45] S. Javanzad, A. Bolhassani, F. Doustdari, M. Hashemi, and A. Movafagh. Reverse staining method of polyacrylamide gels by imidazole-zinc salts for detection and purification of l1 capsid protein in e. coli. *Journal of Paramedical Sciences (JPS)*, 4(2) :2008–4978, 2013.
- [46] M.L. Ortiz, M. Calero, C.F. Patron, L. Castellanos, and E. Mendez. Imidazole-SDS-Zn reverse staining of proteins in gels containing or not SDS and microsequence of individual unmodified electroblotted proteins. *FEBS letters*, 296(3) :300–304, 1992.
- [47] D.P. Nelson and L.A. Kiesow. Enthalpy of Decomposition of Hydrogen Peroxide by Catalase at 25°C (with Molar Extinction Coefficients of H₂O₂ Solutions in the UV). *Analytical biochemistry*, 49(2) :474–478, 1972.
- [48] G. Su, Y. Wei, M. Guo, et al. Direct Colorimetric Detection of Hydrogen Peroxide Using 4-Nitrophenyl Boronic Acid or Its Pinacol Ester. *American Journal of analytical chemistry*, 2(08) :879, 2011.
- [49] Merck Technical Notes. Enzymatic assay of glucose oxidase, consulté le 10.05.2021.

- [50] N. Le Barc'H, J.M. Grossel, P. Looten, and M. Mathlouthi. Kinetic study of the mutarotation of D-glucose in concentrated aqueous solution by gas-liquid chromatography. *Food chemistry*, 74(1) :119–124, 2001.
- [51] F.W. Schenck. Glucose and Glucose-Containing Syrups. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, pages 45–66. American Cancer Society, 2006.
- [52] Y.-H. Hu, D.W.M. Leung, L. Kang, and C.-Z. Wang. Diet Factors Responsible for the Change of the Glucose Oxidase Activity in Labial Salivary Glands of *Helicoverpa armigera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology : Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 68(2) :113–121, 2008.
- [53] H.J. Hecht, D. Schomburg, H. Kalisz, and R.D. Schmid. The 3D structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Implications for the use of GOD as a biosensor enzyme. *Biosensors and Bioelectronics*, 8(3-4) :197–203, 1993.
- [54] J.F. Kornecki, D. Carballares, P.W. Tardioli, R.C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia, A.R. Alcántara, and R. Fernandez-Lafuente. Enzyme production of D-gluconic acid and glucose oxidase : successful tales of cascade reactions. *Catalysis Science & Technology*, 10(17) :5740–5771, 2020.

Septième partie

Annexes

Annexes

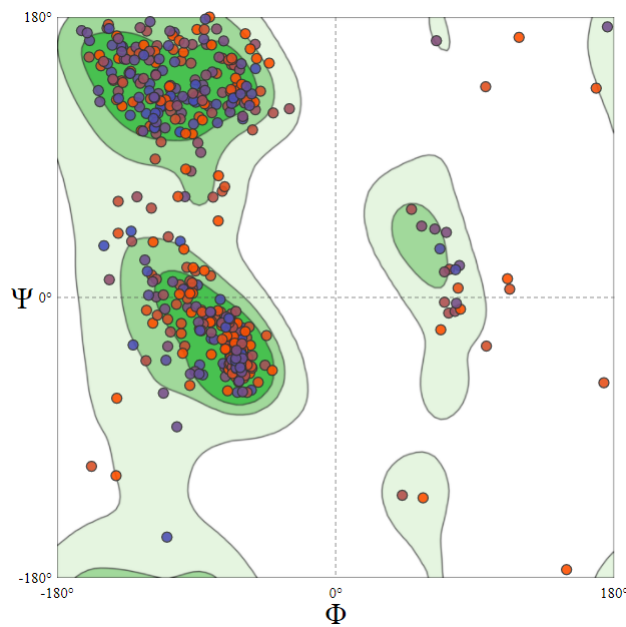


FIGURE 28 – Diagramme de Ramachandran du modèle de la structure de la glucose oxydase de *Spodoptera exigua* construite à partir de la structure 3D de la GOX de *A. niger*.

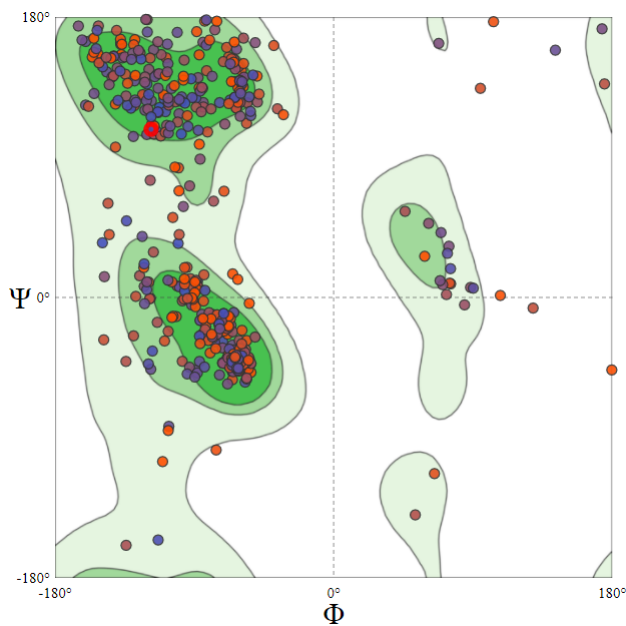


FIGURE 29 – Diagramme de Ramachandran du modèle de la structure de la glucose oxydase de *Helicoverpa zea* construite à partir de la structure 3D de la GOX de *A. niger*.