

# Caractérisation de la tréhalase d'*Acyrtosiphon pisum* en vue de la conception de nouveaux insecticides



## **Composition du jury final**

### Président du jury :

Prof. J.-Y. MATROULE (UNamur)

### Membres :

Prof. F. FRANCIS (Promoteur – ULiège)

Dr C. MICHAUX (Promotrice – UNamur)

Prof. A. MATAGNE (ULiège)

Dr R. CAPARROS MEGIDO (ULiège)

Dr M. HANS (Externe – Biocidal Alternative Solutions)

Virgile Neyman



COMMUNAUTÉ FRANÇAISE DE BELGIQUE  
UNIVERSITÉ DE LIÈGE – GEMBLOUX AGRO-BIO TECH  
UNIVERSITE DE NAMUR - FACULTE DES SCIENCES

# **Caractérisation de la tréhalase d'*Acyrtosiphon pisum* en vue de la conception de nouveaux insecticides**

Virgile NEYMAN

Dissertation originale présentée (ou essai présenté) en vue de l'obtention du grade de doctorat en  
sciences agronomiques et ingénierie biologique et en sciences chimiques

Promoteur(s) : Frédéric Francis (ULiège) et Catherine Michaux (UNamur)  
Année civile : 2024



## Abstract

Aphids are major pests in agriculture, causing direct damage to plants and acting as vectors for viruses. Conventional insecticides are widely used to control them, but their toxicity and efficacy are problematic. New solutions are therefore needed, such as biological control using predators or parasitoids. However, these methods are not always economically viable on a large scale. Another approach being explored is the development of new insecticides targeting aphid biochemical functions. This thesis aims to discover new inhibitors of trehalase, an enzyme essential for insect energy metabolism. Inhibition of this enzyme could disrupt the vital functions of insects without affecting mammals. The steps to develop an innovative insecticide are: (1) to purify and characterize the trehalase from *Acyrtosiphon pisum* (ApTreh), (2) to study the effect of commercial inhibitors on ApTreh, (3) to search for natural inhibitors in the metabolites of *Streptomyces hygroscopicus*, (4) to discover new inhibitors via virtual screening, and (5) to propose a pharmacophore hypothesis based on the previous results.

As the membrane form of trehalase could not be purified, the soluble form was successfully purified from fresh homogenate of *A. pisum* only, and the enzyme was then characterized biochemically, kinetically and molecularly, highlighting the importance of post-translational modifications (N-glycosylation) for enzyme stability, particularly during bacterial production. The search for new trehalase inhibitors began by exploring the metabolites produced by *S. hygroscopicus* to develop a bioinsecticide. However, this approach ran into difficulties as detection techniques for validamycin A, a potential compound, lacked sensitivity. It is therefore difficult to determine whether the inhibition observed in culture media is due to validamycin A or to other compounds. For example, some media such as ISP7 show a high inhibition rate similar to that of SFM, despite a much lower validamycin A concentration, suggesting the presence of other inhibitory molecules at concentrations below 0.02 mg/L.

The search for potential trehalase inhibitors involved virtual screening of two databases, ZINC and Chemdiv, applying filters such as Lipinski's rules. Out of around 20.000 compounds, 66 were selected and tested in vitro, showing enzyme inhibition concentrations in the millimolar range. Based on these results, a pharmacophore hypothesis was developed, describing a trehalase inhibitor structure with two rings interacting with the active site of the enzyme, a hydrogen bond donor/acceptor group in the center, and polar groups to interact with specific residues of the enzyme. Chemical modifications are suggested to enhance interactions with active site amino acids, such as the addition of a hydroxyl group in the ortho position on the second ring of the most promising compound.

In conclusion, on the basis of a comprehensive study of trehalase from *Acyrtosiphon pisum*, a pharmacophore hypothesis could be established on the basis of experimental results on molecules obtained by virtual screening. Although hits cannot be used as insecticides, this hypothesis provides a better understanding of trehalase inhibitors in general, and can be used to refine analyses, either by relaunching a virtual screening based on this pharmacophore, or by continuing down the bioinsecticide route.

## Résumé

Les pucerons sont des ravageurs majeurs dans l'agriculture, causant des dommages directs aux plantes et agissant comme vecteurs de virus. Les insecticides conventionnels sont largement utilisés pour les contrôler, mais leur toxicité et leur efficacité posent problème. Ainsi, de nouvelles solutions sont nécessaires, telles que le contrôle biologique avec des prédateurs ou des parasitoïdes. Cependant, ces méthodes ne sont pas toujours économiquement viables à grande échelle. Une autre approche explorée consiste à développer de nouveaux insecticides ciblant les fonctions biochimiques des pucerons. Cette thèse vise à découvrir de nouveaux inhibiteurs de la tréhalase, une enzyme essentielle pour le métabolisme énergétique des insectes. L'inhibition de cette enzyme pourrait perturber les fonctions vitales des insectes sans affecter les mammifères. Les étapes pour développer un insecticide innovant sont : (1) purifier et caractériser la tréhalase d'*Acyrtosiphon pisum* (ApTreh), (2) étudier l'effet des inhibiteurs commerciaux sur ApTreh, (3) rechercher des inhibiteurs naturels dans les métabolites de *Streptomyces hygroscopicus*, (4) découvrir de nouveaux inhibiteurs via un criblage virtuel, et (5) proposer une hypothèse pharmacophore basée sur les résultats précédents.

A défaut d'avoir réussi à purifier la forme membranaire de la tréhalase, la forme soluble a été correctement purifiée à partir d'homogénat frais d'*A. pisum* uniquement. A partir de là, l'enzyme a été caractérisée biochimiquement, cinétiquement et moléculairement mettant notamment en évidence l'importance des modifications post-traductionnelles (N-glycosylation) pour la stabilité de l'enzyme notamment lors de la production en bactéries. La recherche de nouveaux inhibiteurs de la tréhalase a débuté en explorant les métabolites produits par *S. hygroscopicus* pour développer un bioinsecticide. Cependant, cette approche a rencontré des difficultés car les techniques de détection de la validamycine A, un composé potentiel, manquaient de sensibilité. Il est donc difficile de déterminer si l'inhibition observée dans les milieux de culture est due à la validamycine A ou à d'autres composés. Par exemple, certains milieux comme l'ISP7 montrent un fort taux d'inhibition similaire à celui du SFM, malgré une concentration en validamycine A bien plus faible, suggérant la présence d'autres molécules inhibitrices à des concentrations inférieures à 0.02 mg/L. La recherche d'inhibiteurs potentiels de la tréhalase a impliqué un criblage virtuel de deux bases de données, ZINC et Chemdiv, en appliquant des filtres tels que les règles de Lipinski. Sur environ 20 000 composés, 66 ont été sélectionnés et testés in vitro, montrant des concentrations d'inhibition de l'enzyme de l'ordre du millimolaire. En se basant sur ces résultats, une hypothèse pharmacophore a été développée, décrivant une structure d'inhibiteur de tréhalase avec deux cycles interagissant avec le site actif de l'enzyme, un groupement donneur/accepteur de liaison hydrogène au centre, et des groupements polaires pour interagir avec des résidus spécifiques de l'enzyme. Des modifications chimiques sont suggérées pour renforcer les interactions avec les acides aminés du site actif, telles que l'ajout d'un groupe hydroxyle en position ortho sur le second cycle du composé le plus prometteur.

En conclusion, sur base d'une étude complète de la tréhalase d'*Acyrtosiphon pisum*, une hypothèse pharmacophore a pu être établie sur base de résultats expérimentaux sur des molécules obtenues par criblage virtuel. Bien que les hits ne soient pas utilisables en tant qu'insecticides cette hypothèse permet de mieux comprendre les inhibiteurs de tréhalase en général et pourra être utilisée afin d'affiner les analyses, en relançant un criblage virtuel sur base de ce pharmacophore ou bien en continuant dans la voie du bioinsecticide.

# Remerciements

Voici enfin venu le temps d'écrire cette fameuse page des remerciements. Après plus de 4 ans à imaginer ce que j'allais bien pouvoir écrire sur cette feuille blanche, retenir l'une ou l'autre anecdote sur chaque personne rencontrée durant cette aventure, le défi paraît bien compliqué ! Mais bref, il est temps de s'y mettre, une toute dernière fois....

Au terme de cette thèse, je tenais à remercier chaleureusement toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à son aboutissement.

Tout d'abord, mes remerciements vont bien évidemment à mes deux promoteurs, le professeur Frédéric Francis et le docteur Catherine Michaux. Et oui, j'ai la chance d'en avoir deux pour le prix d'un ! Le premier m'a fait découvrir le monde fascinant de l'entomologie, ses facettes complexes mais irrésistiblement attirantes. Il m'a également appris à savoir remettre en question ce que je faisais, à voir plus loin que le bout de son nez (et oui, la biochimie c'est bien, mais sans comprendre comment se comportent les petites bêtes avec lesquelles je travaille, ça marche moins bien !). Ceux qui me connaissent savent que j'ai parfois besoin de rappels, qu'on me redirige dans le droit chemin, ce que M. Francis faisait avec brio ! Un tout grand merci pour cet accompagnement qualitatif, si je repasse à Gembloux à l'avenir, ça sera avec le sourire !

Et puis vient la seconde promotrice, Catherine. Je lui en ai fait baver, entre mes idées saugrenues pour faire évoluer le laboratoire, les corrections tardives, les semaines et les semaines sans avoir le moindre résultat intéressant à lui présenter... Mais elle a toujours été fidèle à elle-même : à l'écoute, douce, souriante, motivante. Peu importe les épreuves de la vie, elle garde le cap (têtue ? Oui un peu !) et fait en sorte de créer un environnement de travail dans lequel on se sent bien. Merci pour chaque bon moment passé, pour le soutien au quotidien, pour avoir été une oreille attentive lors des baisses de motivation. Merci d'avoir cru en moi pour que je me lance dans l'aventure d'une thèse et pour m'avoir fait grandir à travers celle-ci.

Evidemment, cette thèse n'aurait pas été possible sans l'aide de nombreux organismes. Le FNRS pour son financement, Morgan et Antoine pour la collaboration sur le programme PEBIOTRA, l'unité URBM pour l'accueil et le soutien lors des nombreuses cultures bactériennes réalisées au cours de cette thèse, la plateforme CECI pour l'accès aux ressources computationnelles (et mention spéciale à Laurent Demelenne pour les nombreuses interventions informatiques). Je remercie également les membres du laboratoire d'Entomologie fonctionnelle et évolutive de la faculté Agro-Bio Tech de Gembloux, ainsi que ceux du laboratoire CIP à l'ULiège pour les nombreuses collaborations très intéressantes (André, Alain et Marylène ont été une bénédiction en cette fin de thèse).

Je passe désormais aux membres du CPB. Ce labo, j'y tiens. Et chaque personne ayant mis un pied dedans, petit ou grand, a permis d'y apporter quelque chose. Alors, merci à Mathias, Alice, Baptiste, Tiphaine, Clément, Maëlle, Maud, Benoît, Alexandre, Sylvain, Yassine, Amandine, Alexia, Elise, Luis, Marina, Eloïse, Maude, Ugo, Clément, Valentine, Valentin, Cyril, Hugo, Tanguy, Jean, Laurane, Blinera, Julien, Bryan, Emma, Rachel, Simon, Sanae. Stagiaires, mémorants, doctorants, j'ai pour chacun d'entre vous l'une ou l'autre anecdote que je garderais longtemps en tête. Merci à vous d'être vous ! Mention spéciale également aux membres du CES, à Coco et à Jérémy pour le plaisir que les parties de cartes ont pu me procurer sur les temps de midi.

J'ai omis sciemment deux personnes un peu plus particulières que je souhaite remercier un peu plus personnellement. Toi d'abord, Léa. Un brin de jeune fille toujours souriante, prête à faire la fête et bourrée de qualités. Ou bourrée tout court si on y va un peu fort sur les cocktails. Ton passage au CPB était bref, mais suffisamment marquant pour créer une amitié sincère et pour partager de nombreux moments tous plus agréables les uns que les autres ! Que ça soit au bunker pour danser, autour d'une table avec un jeu de société ou bien le nez fourré dans un Escape Game, on en aura vécu des choses en si peu de temps ! Tu es une fille formidable, alors prends le compliment pour une fois, retiens-le bien dans ta petite tête et n' imagine pas 1794 scénarios comme tu sais si bien faire. Hâte de profiter à nouveau avec toi à ton retour de Grenoble et ce papier rendu !

Et puis, l'autre comparse évidemment, je parle bien évidemment de Laurelenn ! Ou Laureleen, comme je t'ai appelée la toute première fois sur Messenger pour prendre contact. Ça fait maintenant 4 ans qu'on se voit au quotidien et que cette conversation s'est transformée. J'ai trouvé en toi beaucoup de choses : une collègue formidable, intelligente, la parfaite représentation de comment je m'imagine une doctorante. Je t'ai souvent prise pour exemple, sans jamais y parvenir totalement, une source d'énergie au quotidien. Une amie formidable également, à qui j'ai pu faire confiance à 100%, que ça soit dans les bons ou les mauvais coups ! Pour craquer une boîte de sushi, improviser une soirée chez toi, travailler jusque pas d'heures, tu répondais directement à l'appel. Ton regard perçant m'a toujours beaucoup appris sur toi, j'espère qu'en ce moment, tu peux lire également dans les miens toute l'amitié sincère que je te porte. Ce n'est évidemment pas fini, notre conversation Messenger s'allongera encore, des défis différents nous attendent chacun et je compte bien que tu n'oublies pas « Virgule » si facilement, je suis atta-chiant !

Pour tout doucement terminer, je tiens également à remercier ma famille. Je ne suis pas très expressif et le fait qu'ils ne comprennent rien à mon sujet n'aide pas, mais ils ont toujours été présent au jour le jour, que ça soit dans la vie générale ou dans ma thèse. Famille qui s'est agrandie, avec Isabelle, qui a accepté d'être ma fiancée durant cette thèse. Qui m'a supporté avec un pied cassé. Qui m'a supporté durant les derniers mois infernaux où je ne rentrais quasiment pas. Je t'aime, plus que tout. Je n'ai pas besoin de t'écrire un texte de 36 pages, maintenant que cette étape de la vie est derrière moi, je compte bien en écrire de nouvelles en ta compagnie. 2024 est notre année, l'année de tous les changements. Encore un peu de patience, profitons du calme avant la tempête, savourons chaque instant comme si c'était le dernier !

Enfin, je vais terminer mes remerciements avec toi, Eric. Ton « *Cochonus cochonus* » termine enfin cette aventure, mais malheureusement pas à tes côtés. Je n'ai pas été le doctorant parfait, loin de là. Parmi mes nombreux défauts, je sais néanmoins que tu reconnaissais à quel point j'étais fier de faire partie du CPB. J'y ai mis de mon talent, de mon temps et du cœur, dans le but de te rendre fier. J'espère y être parvenu. Encore l'une ou l'autre épreuve avant de faire un réel « adieu ». Tu le savais, j'ai toujours été mauvais pour les écritures, d'articles scientifiques ou de rapports. Mais ces derniers mots écrits dans ce manuscrit, je les consacre à toi. Ils sont peut-être maladroits, mais ils sont sincères. Merci. Merci pour chaque petit enseignement. Merci.

Et pour conclure, quoi de mieux que la phrase fétiche de Catherine ?

**« A la prochaine..... En forme ! »**



# Table des matières

Abstract.....	5
Résumé .....	6
Remerciements.....	7
Liste des figures .....	13
Liste des tables .....	17
Liste des abréviations .....	18
<b>Chapitre 1 : Introduction</b> .....	<b>1</b>
1. L'agriculture et ses défis .....	3
2. Le contrôle chimique contre les ravageurs : utilisation des insecticides .....	6
3. Les insecticides neurotoxiques .....	8
3.1. Les pyréthréinoïdes .....	8
3.2. Les organophosphorés et les carbamates.....	8
3.3. Les néonicotinoïdes .....	9
4. Conséquences de l'utilisation importante d'insecticides neurotoxiques .....	9
4.1. Conséquences des neurotoxiques sur l'environnement .....	9
4.2. Conséquences des neurotoxiques sur la santé humaine .....	11
4.3. Phénomène de résistance aux insecticides .....	12
4.4. Les interdictions concernant l'utilisation des insecticides .....	14
5. Les pucerons (Hémiptères): fléaux des cultures .....	15
5.1. La super-famille des Aphidoidea .....	15
5.2. <i>Acyrtosiphon pisum</i> comme modèle de recherche .....	18
6. Quelles sont les moyens de luttés possibles contre les pucerons ? .....	19
6.1. Agir sur la relation symbiotique insecte-microorganisme.....	19
6.2. Action directe sur les plantes .....	20
6.3. Agir sur les protéines et les enzymes des insectes .....	21
7. Le métabolisme énergétique des pucerons : nouvelle cible potentielle .....	23
7.1. Le tréhalose, réserve énergétique spécifique des insectes .....	23
7.2. Tréhalase : état de l'art .....	24
<b>Chapitre 2 : Objectifs et Stratégie</b> .....	<b>29</b>
<b>Chapitre 3 : Purification et caractérisation d'ApTreh</b> .....	<b>33</b>
1. Mise en contexte et description du test enzymatique .....	35
2. Protocole de purification d'ApTreh-1 .....	36
2.1. Broyage et extraction : étape commune .....	36
2.2. Optimisation de la purification : précipitation au sulfate d'ammonium .....	37

2.3.	<i>Optimisation de la purification : chromatographie échangeuse d'anions</i>	39
2.4.	<i>Optimisation de la purification : chromatographie d'affinité</i>	40
3.	Caractérisation de la tréhalase soluble	41
3.1.	<i>Caractérisation biochimique</i>	41
3.2.	<i>Caractérisation cinétique</i>	45
3.3.	<i>Caractérisation moléculaire</i>	47
3.4.	<i>Analyse moléculaire d'ApTreh-1 par la théorie RIN</i>	54
4.	Protocole de purification d'ApTreh-2	57
4.1.	<i>Optimisation de la purification : extraction de l'enzyme avec détergent</i>	57
4.2.	<i>Optimisation de la purification : chromatographie échangeuse d'anions et chromatographie d'affinité</i>	58
4.3.	<i>Tentative de séparation d'ApTreh-1 et ApTreh-2 par ultracentrifugation</i>	59
4.4.	<i>Analyse et comparaison moléculaire entre ApTreh-1 et ApTreh-2</i>	60
5.	Production d'ApTreh-1 par surexpression hétérologue	62
5.1.	<i>Constructions plasmidiques</i>	62
5.2.	<i>Optimisation des conditions de surexpression bactérienne</i>	63
5.3.	<i>Purification d'ApTreh-1 présente dans le surnageant</i>	65
5.4.	<i>Purification d'ApTreh-1 présente dans les corps d'inclusions</i>	66
<b>Chapitre 4 : Analyse d'inhibiteurs commerciaux et identification d'inhibiteurs potentiels d'origine naturelle</b>		69
1.	Mise en contexte	71
2.	Analyse d'inhibiteurs commerciaux sur ApTreh-1	71
2.1.	<i>Analyses des inhibiteurs commerciaux : in vivo</i>	73
2.2.	<i>Analyses des inhibiteurs commerciaux : in vitro</i>	75
2.3.	<i>Analyses des inhibiteurs commerciaux : in silico</i>	78
3.	Analyse d'inhibiteurs naturels sur ApTreh-1	82
3.1.	<i>Optimisation des conditions de cultures des souches de Streptomyces</i>	82
3.2.	<i>Analyse des milieux</i>	84
3.3.	<i>Conclusion pour les inhibiteurs naturels</i>	86
<b>Chapitre 5 : Identification d'inhibiteurs potentiels par criblage virtuel</b>		87
1.	Contexte	89
2.	Criblage virtuel à partir de la banque de donnée ZINC	89
3.	Criblage virtuel à partir de la banque de donnée Chemdiv	91
4.	Etude d'efficacité des inhibiteurs obtenus par criblage virtuel sur ApTreh-1	91
<b>Chapitre 6 : Conception d'un pharmacophore et modifications chimiques</b>		99
1.	Description du pharmacophore	101

2. Optimisation du pharmacophore et modifications chimiques .....	103
2.1. Modifications chimiques du premier cycle .....	105
2.2. Modifications chimiques du centre de la molécule .....	106
2.3. Modifications chimiques du second cycle .....	106
<u>Chapitre 7 : Conclusions et perspectives</u> .....	109
1. Conclusions .....	111
2. Perspectives .....	113
<u>Chapitre 8 : Matériel et méthodes</u> .....	115
1. Insectes .....	117
2. Test enzymatique et détermination du pH optimum et température optimale .....	117
3. Purification d'ApTreh-1 et ApTreh-2 .....	117
3.1. ApTreh-1 .....	117
3.2. ApTreh-2 .....	118
4. Surexpression bactérienne d'ApTreh-1 .....	118
4.1. Transformation bactérienne .....	118
4.2. Surexpression bactérienne .....	119
4.3. Purification sur chromatographie d'affinité métallique IMAC .....	119
4.4. Clivage du His-Tag .....	119
5. Dosage protéique et analyse SDS-PAGE .....	119
6. Analyse en spectrométrie de masse .....	119
7. Analyse de la séquence en acide aminés .....	120
8. Modélisation par homologie et validation géométrique .....	120
9. Mesures de dichroïsme circulaire et calculs de structures secondaires .....	120
10. Analyses <i>in vivo</i> .....	121
11. Analyses <i>in vitro</i> .....	121
12. Criblage virtuel .....	122
13. Analyse de la stabilité par DSF .....	122
14. Culture des Streptomyces .....	122
15. Modifications chimiques sur SeeSAR .....	122
16. Création du pharmacophore sur Maestro .....	123
17. Docking moléculaire – analyses <i>in silico</i> .....	123
<u>Annexes</u> .....	126
Annexe 1 .....	126
Annexe 2 .....	127
Annexe 3 .....	129
Annexe 4 .....	129

Annexe 5 .....	130
Annexe 6 .....	131
Annexe 7 .....	132
Annexe 8 .....	133
Annexe 9 .....	136
Annexe 10 .....	137
Annexe 11.....	138
Annexe 12 .....	141
Références.....	146

# Liste des figures

Figure 1: Représentation graphique de la croissance mondiale de la population sur la période 2013-2022 et projection sur 2032.....	3
Figure 2: Représentation graphique de la lutte intégrée (IPM) au projet "SmartProject Thematic Network" Graphique repris directement du projet de Collier et al <sup>8</sup> .....	4
Figure 3: Consommation de pesticides en tonnes par continent en 2020 et tendance depuis 1999. ....	6
Figure 4: Structures chimiques du malathion et du carbaryl.....	7
Figure 5: Schéma reprenant la classification des insecticides selon l'IRAC en 5 catégories .....	7
Figure 6: Exemples pour chacune des grandes classes d'insecticides neurotoxiques .....	8
Figure 7: Schéma récapitulatif du mode d'action des insecticides neurotoxiques sur le système nerveux .....	9
Figure 8: Schéma récapitulatif du mode de dispersion des insecticides dans l'environnement.....	10
Figure 9: Schéma récapitulatif du phénomène de résistance chez les insectes .....	12
Figure 10: Ligne du temps résumant la mise en place de la législation européenne autour des insecticides. ....	15
Figure 11: Cycle de vie d'un puceron. ....	16
Figure 12: Anatomie d'un puceron. A gauche, la vue générale du corps et à droite, un zoom sur la tête. ....	17
Figure 13: Nombre de résistances mises en évidence chez 10 espèces de pucerons. ....	18
Figure 14: Schéma récapitulatif du mécanisme d'action des peptides complémentaires sur les plantes. ....	21
Figure 15: Structure générale d'un composé de type sulfoximine .....	22
Figure 16: Voie enzymatique de synthèse du tréhalose chez les insectes .....	23
Figure 17: Mécanisme de Kochland d'inversion de configuration après hydrolyse .....	24
Figure 18: Localisation des deux formes de tréhalase : soluble et membranaire. ....	25
Figure 19: Conséquences de l'inhibition de la tréhalase chez les insectes .....	26
Figure 20: Schématisation des sous-sites du site actif de la tréhalase.....	27
Figure 21: Modèle obtenu sur base d'une structure cristallographique d'une tréhalase provenant d' <i>Enterobacter cloacae</i> (PDB : 5Z6H). Mise en évidence de la structure $\alpha$ -toroïdale ( $\alpha/\alpha$ ) <sub>6</sub> des tréhalases.....	28
Figure 22: Récapitulatif des structures cristallines de tréhalases actuellement présentes dans la PDB en mars 2024.....	28
Figure 23: Récapitulatif de la stratégie mise en place dans le cadre de cette thèse .....	31
Figure 24: Schéma récapitulatif des procédés de purification optimisés pour ApTreh-1 et ApTreh-2 ..	35
Figure 25: Réaction d'oxydo-réduction entre le glucose et l'acide 3,5-dinitrosalicylique .....	36
Figure 26: Droite d'étalonnage du test au DNS utilisée pour les calculs d'activité enzymatique.....	36
Figure 27: Activité relative d'ApTreh-1 en fonction de la saturation en sulfate d'ammonium.....	38
Figure 28: A gauche, chromatogramme du passage d'ApTreh-1 sur DEAE et à droite, analyse SDS-PAGE des fractions d'élutions. ....	39
Figure 29: A gauche, chromatogramme du passage d'ApTreh-1 sur Con A et à droite, analyse SDS-PAGE des fractions d'élutions. ....	40
Figure 30: Prédiction de sites de N-glycosylation dans la séquence d'ApTreh-1 par NetNGlyc 1.0.....	42
Figure 31: Analyse SDS-PAGE du clivage des N-glycosylation d'ApTreh-1 en présence de PNGase F. A droite, coloration d'un gel par la méthode PAS en présence d'un contrôle positif, la fétuin. Les flèches rouges désignent ApTreh-1, tandis que les flèches vertes désignent une protéine inconnue également N-glycosylée.....	43

Figure 32: Dichroïsme circulaire d'ApTreh-1 avec N-glycosylation (bleu) et après clivage par PNGase F (orange).....	43
Figure 33: Activité spécifique d'ApTreh-1 en fonction de la température (gauche) et du pH (droite)...	45
Figure 34: Représentation d'Hanes à 25°C (losanges verts), 37°C (ronds oranges), 45°C (triangles bleus), 60°C (carrés gris) .....	46
Figure 35: Diagramme d'Arrhénius appliqué aux données d'ApTreh-1 .....	47
Figure 36: Alignement de séquence pour les tréhalases d'ApTreh-1, <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Apis mellifera</i> , <i>Aphis glycines</i> , <i>Tenebrio molitor</i> et <i>Bombyx mori</i> . Les motifs signatures des tréhalases sont représentés par les barres bleues pleines, les résidus catalytiques par les flèches bleues et la région riche en glycine par la barre creuse. ....	48
Figure 37: Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'acides aminés de tréhalases de diverses espèces.....	49
Figure 38: Diagramme de Ramachandran pour la validation géométrique du modèle d'ApTreh-1 .....	50
Figure 39: Comparaison entre le modèle ApTreh-1 obtenu par homologie et avec AlphaFold .....	51
Figure 40: Structure $\alpha$ -toroïdale des tréhalases (droite) et modèle d'ApTreh-1 avec les composants essentiels : hood-domain en bleu, lid loop en rose et les sites de N-glycosylation théoriques. ....	51
Figure 41: Résidus essentiels à l'activité au sein du site catalytique et domaines liés et zoom sur les interactions présentes au niveau de la lid loop .....	52
Figure 42: Superposition des acides aminés dans un rayon de 5 Å autour du substrat pour le modèle ApTreh-1 (en vert) et le modèle cristallographique de <i>A. thaliana</i> (cyan). La lid loop est représentée en mauve. ....	53
Figure 43: Description des interactions du substrat (tréhalose) au sein du site actif d'ApTreh-1 .....	54
Figure 44: Classification des acides aminés au sein d'ApTreh-1 suivant leur Z-score. Z-score >8 (vert), entre 8 et 6 (bleu), entre 6 et 4 (magenta) et entre 4 et 2 (orange).....	55
Figure 45: Représentation du RIN après analyse DynaMine (gauche) et modèle d'ApTreh-1 après analyse (droite). Les résidus bleus sont considérés comme rigides ( $S^2 > 0.9$ ), verts ( $0.9 > S^2 > 0.8$ ), jaunes ( $0.8 > S^2 > 0.7$ ) et rouges très flexibles ( $S^2 < .7$ ) .....	56
Figure 46: Structures des détergents non-ioniques et zwiterioniques utilisés .....	57
Figure 47: Absorbance à 540 nm après test enzymatique en présence de DNS pour chacun des détergents .....	57
Figure 48: Chromatogrammes après passage d'ApTreh-2 sur DEAE (gauche) et sur Con A (droite) ...	58
Figure 49: Analyse SDS-PAGE des étapes de purification d'ApTreh-2. La tréhalase membranaire est représentée par l'encadré rouge en pointillé. ....	58
Figure 50: Comptage spectral pour la détermination de l'efficacité de l'étape d'ultracentrifugation. ApTreh-1 (A) et ApTreh-2 (B) sont analysés avant ultracentrifugation (NU1) et après (U1). ....	59
Figure 51: Alignement de séquence entre ApTreh-1, ApTreh-2b et ApTreh-2a.....	61
Figure 52: Analyse SDS-PAGE après lyse des constructions plasmidiques avec His-Tag en C-ter ou N-ter pour ApTreh-1 dans BL21(DE3), induite avec 1mM IPTG pendant 18h à 18°C. ....	62
Figure 53: Analyse SDS-PAGE pour l'optimisation de la surexpression d'ApTreh-1 en BL21(DE3) ...	63
Figure 54: Analyse SDS-PAGE pour l'optimisation de la surexpression d'ApTreh-1 en TUNER(DE3) .....	64
Figure 55: Analyse SDS-PAGE pour l'optimisation de la surexpression d'ApTreh-1 en Lemo21 .....	64
Figure 56: Chromatogramme du passage d'ApTreh-1 sur IMAC avec clivage à la TEV (gauche) et analyse SDS-PAGE des fractions d'élutions (droite) .....	65
Figure 57: Passage d'ApTreh-1 sur SEC avec His-tag en C-ter (gauche) et N-ter (droite).....	66
Figure 58: Analyse SDS-PAGE d'ApTreh-1 surexprimée, solubilisation des CI dans du SDS 1% et fractions d'élutions après passage sur IMAC .....	67
Figure 59: Structures des inhibiteurs commerciaux analysés in vivo, in vitro et in silico.....	72

Figure 60: Mortalité du puceron <i>Acyrtosiphon pisum</i> après 24h d'exposition au contrôle positif (cyperméthrine), négatif (sucrose 15%) et aux différents inhibiteurs à 10µg/mL et 25 µg/mL. *, **,*** représentent les différences significatives respectivement à 0,05 – 0,01 et 0,001.....	73
Figure 61: Mortalité du puceron <i>Acyrtosiphon pisum</i> après 48h d'exposition au contrôle positif (cyperméthrine), négatif (sucrose 15%) et aux différents inhibiteurs à 10µg/mL et 25 µg/mL. *, **,*** représentent les différences significatives respectivement à 0,05 – 0,01 et 0,001.....	74
Figure 62: Mortalité du puceron <i>Acyrtosiphon pisum</i> après 72h d'exposition au contrôle positif (cyperméthrine), négatif (sucrose 15%) et aux différents inhibiteurs à 10µg/mL et 25 µg/mL. *, **,*** représentent les différences significatives respectivement à 0,05 – 0,01 et 0,001.....	75
Figure 63: Représentation de Lineweaver-burk pour la validamycine A .....	77
Figure 64: Représentation de Lineweaver-burk pour la castanospermine .....	77
Figure 65: Représentation de Lineweaver-burk pour le 1-deoxynojirimycin .....	78
Figure 66: Hydrolyse par une $\beta$ -glucosidase de la validamycine A, l'amygdaline et la phloridzine en validoxylamine A, prunasine et phlorétine.....	79
Figure 67: Docking de la validoxylamine A dans le modèle d'ApTreh-1 (vert) en comparaison avec la validoxylamine A co-cristallisée dans 5Z66 (orange) .....	80
Figure 68: Docking de la validoxylamine A (A), de la phlorétine (B) et de la prunasine (C) au sein du site actif d'ApTreh-1 et représentation des interactions avec les acides aminés environnants (verts). Les résidus catalytiques sont représentés en oranges, les arginines en cyan et les résidus de la lid loop en rouge.....	80
Figure 69: Docking de 1-deoxynojirimycin (A) et de la castanospermine (B) au sein du site actif d'ApTreh-1 et représentation des interactions avec les acides aminés environnants (verts). Les résidus catalytiques sont représentés en oranges, les arginines en cyan et les résidus de la lid loop en rouge.....	81
Figure 70: Liste non-exhaustive des métabolites produits par <i>Streptomyces hygroscopicus</i> .....	82
Figure 71: Pourcentage d'inhibition sur ApTreh-1 de pucerons des différents milieux en fonction des jours.....	83
Figure 72: Analyse HPAEC-DA de la validamycine A en présence de $\beta$ -glucosidase.....	84
Figure 73: Analyse HPAEC-DA des différents milieux de cultures de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> ...	85
Figure 74: Analyse HPLC-HILIC de la validamycine A .....	86
Figure 75: Structures des molécules obtenues après criblage virtuel sur la banque de données ZINC .	90
Figure 76: Structure des 10 meilleurs inhibiteurs d'ApTreh-1 obtenus après criblage virtuel. ....	95
Figure 77: Interactions au sein du site actif avec la validoxylamine A (vert) et ZC5 (bleu). Les acides aminés interagissent de manière commune aux deux composés sont en oranges. ....	96
Figure 78: Structure chimique du SYPRO Orange .....	97
Figure 79: Graphe DSF et $T_m$ pour chaque hits obtenus par criblage virtuel .....	97
Figure 80: Groupements communs aux hits obtenus par criblage virtuel. Le premier cycle aromatique est représenté en bleu clair, le second cycle en bleu foncé. Le groupement donneur/accepteur de H est représenté en rouge, tandis que les groupements supplémentaires situés sur les cycles sont indiqués en vert. ....	101
Figure 81: Pharmacophore détaillé d'un inhibiteur de tréhalase. Les pointillés bleus indiquent la surface occupée par les ligands au sein du site actif. ....	102
Figure 82: Structure des inhibiteurs commerciaux étudiés dans cette thèse ne collant pas au pharmacophore établi sur base du criblage virtuel.....	102
Figure 83: Représentation de la cavité vide située sous la lid loop. La surface des ligands dans le site actif est représentée en bleu, celle des acides aminés dans un rayon de 10 Å en magenta et les acides aminés de la boucle catalytique en vert .....	103
Figure 84: Docking de la validoxylamine A (rose) dans ApTreh-1 forme fermée et de la validamycine A (bleu foncé) dans ApTreh-1 forme ouverte.....	104

Figure 85: HYDE score pour les atomes composant ZC5 selon SeeSAR .....	105
Figure 86: Superposition des conformations au sein du site actif de ZC5 (jaune, initial) et de ses modifications chimiques au niveau du groupement pharmacophore central (Rose, CH2 et mauve, ester) .....	106
Figure 87: Structure de ZC5 et les sites de modifications chimiques : ortho, méta et para .....	107
Figure 88: Superposition de ZC5 initiale (jaune) et ZC5 avec -COO <sup>-</sup> en position ortho (vert clair) ...	107
Figure 89: Superposition de ZC5 initiale (jaune), ZC5 avec -NO <sub>2</sub> en méta (magenta) ou para (vert) .	108
Figure 90: Proposition finale d'une molécule inhibitrice de tréhalase .....	108
Figure 91: Chromatogramme du passage d'ApTreh-1 sur colonne Sephacryl S-200 HR 16/60 et analyse SDS-PAGE avec coloration imidazole-zinc des fractions d'élutions. ....	127
Figure 92: Chromatogramme du passage d'ApTreh-1 sur colonne Sephadex 200pg 16/60 et analyse SDS-PAGE avec coloration imidazole-zinc des fractions d'élutions .....	128
Figure 93: Séquences en acides aminés de l'isoforme X1 et X2 d'ApTreh-1. Les peptides détectés par spectrométrie de masse sont indiqués en jaune pour X2 et en vert pour X1. ....	129
Figure 94: Hydrolyse du tréhalose au cours du temps à une concentration de 5 mM (bleu) et 80 mM (orange) à 60°C.....	129
Figure 95: Représentation graphique de Lineweaver-Burk (A), Eadie-Hofstee (B), Hanes (C) et, Cornish-Eisenthal (D).....	130
Figure 96: Alignement de séquence entre ApTreh-2a (A0A8R2JUI7) et ApTreh-2b (A0AR2NN06). Les résidus catalytiques sont surlignés en mauve, les arginines en orange. Les domaines transmembranaires sont encadrés en orange, tandis que la lid loop est en vert et les motifs tréhalase récurrents en rouge. ....	131



# Liste des tables

Tableau 1: Liste des 19 insectes ravageurs ayant fait l'objet du plus grand nombre d'études durant la période 2012-2016. ....	14
Tableau 2: Avantages et inconvénients pour l'utilisation d'un broyeur vibrationnel .....	37
Tableau 3: Suivi du dosage enzymatique d'ApTreh-1 de l'entièreté du procédé de purification .....	41
Tableau 4: Caractéristiques biochimiques des isoformes d'ApTreh-1 obtenues sur base de leur séquence en acides aminés .....	42
Tableau 5: Sites potentiels de N-glycosylation chez ApTreh-1 selon NetNGlyc 1.0.....	42
Tableau 6: Pourcentages des structures secondaires d'ApTreh-1 avec et sans N-glycosylation.....	44
Tableau 7: Etude de la réactivité de différents sucres en présence de la tréhalase. * signifie que la réactivité est dû à la présence d'un groupe réducteur sur les sucres, mais pas dû à l'action de la tréhalase. ....	44
Tableau 8: Constantes cinétiques d'ApTreh-1 déterminées par la représentation d'Hanes à différentes températures .....	46
Tableau 9: Pourcentage d'identité entre la séquence d'ApTreh-1 et d'autres tréhalases d'insectes de différents ordres .....	47
Tableau 10: Z-score pour chacun des acides aminés d'ApTreh-1 après l'analyse RCA du RIN.....	55
Tableau 11: Valeurs d'IC <sub>50</sub> (M) déterminées expérimentalement pour A.pisum et comparaison avec la littérature .....	76
Tableau 12: Valeurs de K <sub>i</sub> (M) déterminées expérimentalement pour Acyrthosiphon pisum et comparaison avec la littérature .....	76
Tableau 13: Composition des différents milieux utilisés pour l'optimisation de la culture de Streptomyces hygroscopicus .....	83
Tableau 14: Récapitulatif des caractéristiques des composés ZINC pour le criblage virtuel. Les paramètres horizontaux sont les masses moléculaires et les paramètres verticaux sont les valeurs de LogP des molécules. ....	90
Tableau 15: Récapitulatif de la nomenclature utilisée pour les composés obtenus après criblage virtuel de la banque de données Chemdiv .....	91
Tableau 16: Récapitulatif de la concentration finale d'inhibiteur des composés obtenus après criblage virtuel de la banque de données Chemdiv et le pourcentage final en DMSO de l'échantillon. ....	93
Tableau 17: Pourcentage d'inhibition des inhibiteurs synthétiques sur ApTreh-1. Le fond vert indique les 10 meilleurs inhibiteurs. ....	94
Tableau 18: Récapitulatif des interactions des 10 hits au sein du site actif d'ApTreh-1.....	96
Tableau 19: Fonction de score des molécules modifiées sur le second cycle aromatique .....	107
Tableau 20: pI et masse moléculaire théorique calculé à partir des séquences de tréhalases disponibles sur Uniprot .....	126
Tableau 21: Résultats de l'analyse de la variance pour chaque sous-ensemble (inhibiteur, dosage et inhibiteur:dosage) à chaque étape pour les résultats in vivo .....	132
Tableau 22: Significations des comparaisons par paires à 24 heures lors des tests in vivo (comparaison des moyennes par moindres carrés corrigée pour les tests multiples avec la méthode HSD de Tukey). ....	133
Tableau 23: Significations des comparaisons par paires à 48 heures lors des tests in vivo (comparaison des moyennes par moindres carrés corrigée pour les tests multiples avec la méthode HSD de Tukey). ....	134
Tableau 24: Significations des comparaisons par paires à 48 heures lors des tests in vivo (comparaison des moyennes par moindres carrés corrigée pour les tests multiples avec la méthode HSD de Tukey). ....	135

## Liste des abréviations

1-DNJ	1-deoxynojirimycin
A	Amygdaline
<i>A. pisum</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>
Ach	Acétylcholine
AchE	Acétylcholine Estérase
ANS	Acide 3-amino-5-nitrosalicylique
ApTreh	Tréhalase d' <i>Acyrtosiphon pisum</i>
ARNi	Acide RiboNucléique interférent
BMVYV	Beet Mild Yellowing Virus
BSTFA	Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BYV	Beet Yellows Virus
C	Castanospermine
CI	Corps d'Inclusion
CMC	Concentration micellaire critique
Con A	Concanavaline A
COV	Composés organiques volatiles
cPEPs	Peptides complémentaires
DDE	dichlorodiphényldichloroéthylène
DDT	dichlorodiphényltrichloroéthane
DEAE	diéthylaminoéthyle
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNS	Acide 3,5-dinitrosalicylique
DRX	Diffraction aux rayons X
DSF	Differential Scanning Fluorimetry
DTT	Dithiothréitol
EC	European Commission
EIL	Economic Injury Level
ET	Economic Threshold
FAO	Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
FT	Flowthrough
GABA	acide gamma-aminobutyrique
GH	Glycoside Hydrolase
GOX	Glucose oxydase
GT	Glycolsyltransférase
HPAEC-DA	Chromatographie d'échange d'anions à haute performance et détection ampérométrie pulsée
HYDE	HYdrogen bond and DEhydration energies
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice médiane
IIT	Incompatible Insect Technique
IMAC	Ion Metal Affinity Chromatography
IPM	Integrated Pest Management
IRAC	Insecticide Resistance Action Committee
ISP	International <i>Streptomyces</i> Project
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
K <sub>i</sub>	Constante d'inhibition

$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
LC <sub>50</sub>	Concentration létale à 50%
LMR	Limites maximales de résidus
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
<i>M. persicae</i>	<i>Myzus persicae</i>
MM	Masse moléculaire
nAChR	Récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine
OECD	l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P	Phloridzine
PAS	Periodic Acid Schiff
PDB	Protein Data Bank
pI	Point isoélectrique
RCA	Residue Central Analysis
RIN	Residue Interaction Network
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamideGelElectrophoresis
SFM	Soya Flour Mannitol
SIT	Sterile Insect Technique
TEV	Tobacco Etch Virus
T <sub>m</sub>	Melting Temperature
TPP	trehalose 6-phosphate phosphatase
TPS	trehalose-6-phosphate synthase
Treh-1	Tréhalase soluble
Treh-2	Tréhalase membranaire
VA	Validamycine A
V <sub>max</sub>	Vitesse maximale



# Chapitre 1

---

Introduction



## 1. L'agriculture et ses défis

L'agriculture n'a fait que se développer et se perfectionner pour devenir l'un des piliers les plus importants de notre société<sup>1</sup>. A l'heure actuelle, ce secteur représente 1.3 milliards d'emplois (directs et indirects) à travers le monde, ce qui soutient grandement les économies locales et nationales<sup>2</sup>. Elle constitue un élément encore plus essentiel pour les pays en développement, offrant des opportunités d'emploi et de revenus pour de nombreuses personnes. Avec presque un tiers de la superficie émergée de notre planète, soit 47.500.000 km<sup>2</sup>, l'agriculture fournit la base de notre approvisionnement alimentaire, assurant la disponibilité de nourriture pour les populations mondiales. Dans cette superficie, 15 millions de km<sup>2</sup> sont attribués aux cultures permanentes ou temporaires.

Selon un rapport commun entre l'*Organisation de Coopération et de Développement Economiques* (OECD en anglais) et l'*Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture* (FAO en anglais), l'agriculture mondiale va s'intensifier pour suivre l'évolution des prix du marché, l'inflation et le revenu des consommateurs, mais également le taux de croissance de la population mondiale. Au cours de la période de projection, la population mondiale devrait passer de 7.9 milliards en 2022 à 8.6 milliards d'habitants en 2032 (Figure 1). Cela correspond à un taux de croissance annuel moyen de 0.8 %, soit un ralentissement par rapport au taux de 1.1 % par an enregistré au cours de la dernière décennie<sup>3</sup>.

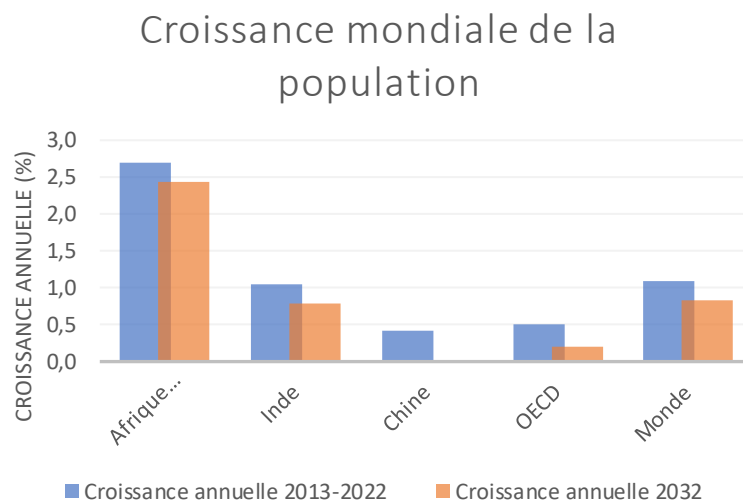


Figure 1: Représentation graphique de la croissance mondiale de la population sur la période 2013-2022 et projection sur 2032

En plus de devoir faire face aux changements climatiques et aux pressions économiques, l'un des principaux problèmes auquel doit faire face le secteur agricole est la présence d'insectes ravageurs dans les cultures, provoquant des pertes de rendement importants (3.2 milliards de perte en Europe, valeur sous-évaluée<sup>4</sup>) et menant parfois même à la destruction totale d'une culture cible. Les exemples ne manquent pas en Europe, une crise viticole a été provoquée par la présence d'un Hémiptère provenant d'Amérique du Nord, le phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*), nécessitant un combat de 30 ans afin de sauver les vignes européennes<sup>5</sup>. Le doryphore (*Leptinotarsa decemlineata*) est un autre exemple tristement connu d'un Coléoptère s'attaquant aux cultures de pommes de terre, ayant provoqué des pertes de rendement allant jusqu'à 50% en Europe, aux Etats-Unis ou encore en Chine fin 19<sup>ème</sup> et début 20<sup>ème</sup> siècle<sup>6</sup>.

La lutte contre les insectes ravageurs des plantes est un impératif mondial. Cependant, cette lutte doit être réfléchie et ne pas être effectuée n'importe comment, d'où l'apparition du terme de « lutte intégrée » ou IPM (*Integrated Pest Management*). Elle consiste à mettre en œuvre, de manière raisonnée et complémentaire, différentes démarches pour combattre les nuisibles dans les cultures, afin de maintenir ou réduire les dégâts qu'ils engendrent sous un seuil acceptable<sup>7</sup>. Elle est régulièrement représentée sous la forme d'une pyramide, permettant la visualisation d'une hiérarchie et une priorisation à mettre en place avec comme dernier recours l'utilisation de pesticides de synthèse. Le concept est régulièrement repris pour des projets comme le *SmartProject Thematic Network*<sup>8</sup> (Figure 2) ou par certains auteurs de publications<sup>9,10</sup>.

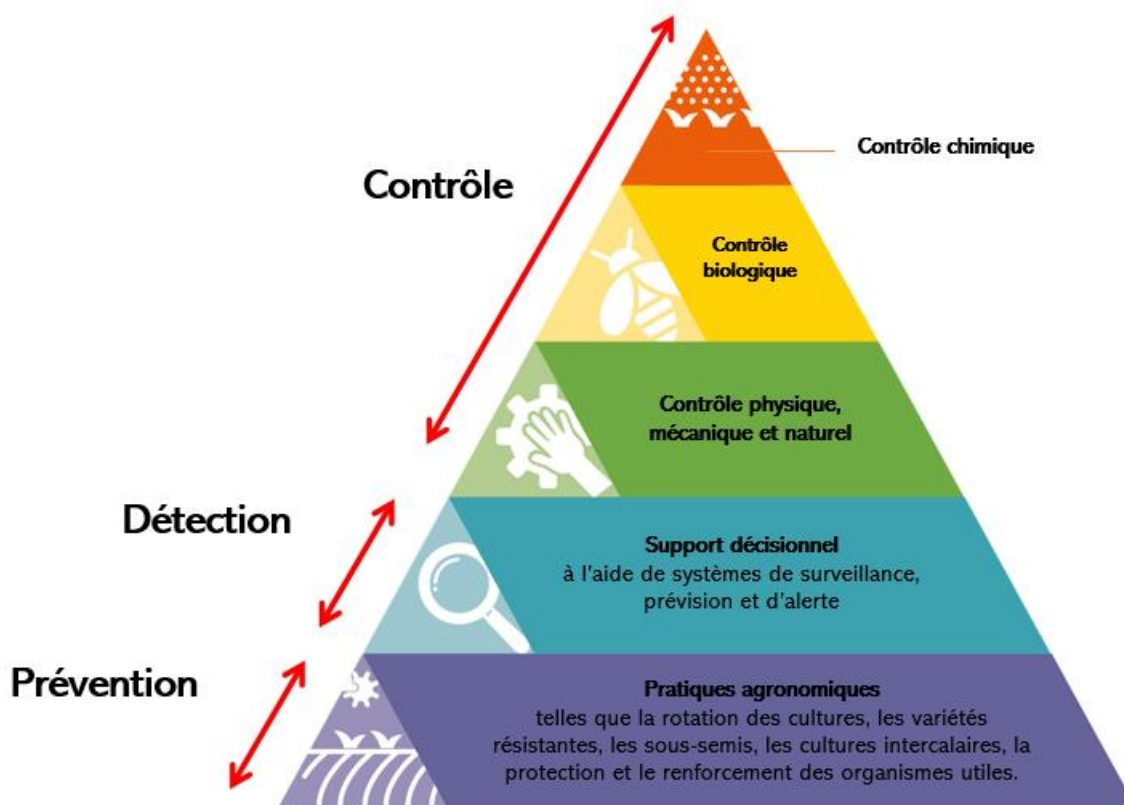


Figure 2: Représentation graphique de la lutte intégrée (IPM) au projet "SmartProject Thematic Network" Graphique repris directement du projet de Collier et al<sup>8</sup>

Ce concept permet de visualiser efficacement les différentes manières d'aborder la lutte intégrée contre les ravageurs. Le premier niveau décrit les pratiques agronomiques. On y retrouve différentes méthodes, avec entre autres la rotation des cultures (diversifier les familles botaniques et les saisons des cultures afin de rompre les liens entre cycle de développement du ravageur et sa plante hôte)<sup>11</sup> ou encore une diversification spatiale via les cultures d'association, comme pour le blé et le pois ou le blé et le soja, afin de présenter un camouflage visuel et olfactif perturbant les ravageurs de l'une des plantes hôtes<sup>12,13</sup>. On parle également dans cette catégorie de l'utilisation des prédateurs naturels des ravageurs, par i) approche classique (intégration massive du prédateur dans l'écosystème, mais qui présente le risque d'installer des espèces invasives et qui finissent par prendre une trop grande place dans l'écosystème, comme c'est le cas de *Harmonia axyridis* et *Coccinella septempunctata*<sup>14</sup>), par approche inoculative ou inondative à l'aide, par exemple, de parasitoïdes<sup>15</sup>. La dernière approche est dite conservatrice



et consiste à instaurer des cultures attirant naturellement les auxiliaires entomophages naturels des ravageurs afin de contrôler la population de ces derniers.

Le second niveau de la pyramide concerne toute la mise en place de supports décisionnels basés sur le suivi des populations de ravageurs (abondance) et la détermination de seuils économiques ET (*Economic Threshold*) et de dégâts EIL (*Economic Injury Level*) pour lesquels les pertes dans les cultures deviennent trop importantes<sup>16</sup>. Si les pertes sont trop élevées malgré la mise en place des pratiques agronomiques décrites ci-dessus, il faut donc passer à une gestion différente des ravageurs.

Le troisième niveau de la pyramide concerne le contrôle physique, mécanique et naturel des ravageurs. Les alternatives physiques sont par exemple la mise en place de filets autour des plantes permettant une protection empêchant les insectes d'atteindre la plante ou encore l'application de kaoline ou d'huile de paraffine<sup>17</sup>. Les alternatives mécaniques utilisent des outils spécifiques permettant de retirer manuellement les insectes des cultures menacées<sup>18</sup>. Les alternatives naturelles sont nombreuses, on peut parler de contrôle sémio-chimique, à travers les interactions intraspécifiques et les phéromones, ou les interactions interspécifiques et les composés allélochimiques<sup>19</sup>. Il est possible de mettre ainsi en place des stratégies « *push-pull* » en utilisant des plants relarguant des composés organiques volatiles (COV) attirant les prédateurs naturels des ravageurs ou bien repoussant ces derniers. Il existe également la mise en place de pièges utilisant des phéromones attirant les ravageurs du sexe opposé à la recherche d'un partenaire afin de les capturer ou bien provoquant simplement une confusion sexuelle désorientant le ravageur<sup>20</sup>.

L'avant dernier niveau de la pyramide avant l'utilisation des pesticides est le contrôle biologique à l'aide principalement d'agents entomopathogènes. Cinq classes dominent le marché des bioinsecticides en 2010: les bactéries, les champignons, les virus, les protozoaires et les nématodes, avec une part de plus de 50% pour *Bacillus thuringiensis* (Bt)<sup>21</sup>, qui reste le produit le plus utilisé à l'heure actuelle dans le monde en agriculture biologique. Cette bactérie synthétise des  $\delta$ -endotoxines au moment de sa sporulation, provoquant une mort des insectes entrant en contact avec ces toxines après un jour<sup>22</sup>. Cependant, des cas de résistances ont été mise en évidence chez les insectes affectés par cette bactérie, réduisant son efficacité<sup>23</sup>. Un autre exemple de contrôle biologique est l'utilisation de champignons, comme les genres *Beauveria* ou *Metarhizium*. Le contact entre des spores asexuées (conidies) et la cuticule des insectes va provoquer une germination et une croissance à travers le corps de l'insecte sous forme de blastospores et de mycélium, tuant son hôte sous 4 à 14 jours<sup>24</sup>. Cette application ne se liant qu'à la cuticule des insectes a le mérite d'être beaucoup plus sélective, mais est plus lente (4 jours minimum) avant d'être létale pour les ravageurs, contrairement à l'utilisation de Bt (1 jour).

Enfin, on retrouve le contrôle chimique, à l'aide de pesticides. Dans le cadre de cette thèse, l'intérêt sera plutôt porté sur la lutte chimique, qui reste le moyen le plus utilisé actuellement à travers le monde grâce à sa rapidité d'action, son efficacité sur les ravageurs et sur sa facilité d'application dans les cultures. Bien que la méthode comporte des inconvénients importants (impact sur la santé, pollution de l'environnement) qui sont décrits dans les sections suivantes, des opportunités variées existent afin d'identifier de nouvelles solutions atténuant ces risques.

## 2. Le contrôle chimique contre les ravageurs : utilisation des insecticides

Le contrôle chimique représente à l'heure actuelle 4 millions de tonnes de pesticides employés dans le monde entier, pour un marché estimé à 130 milliards de dollars en 2023<sup>2</sup>. Le marché ne cesse de grandir (Figure 3), malgré les récentes inquiétudes environnementales concernant leur utilisation. La recherche sur des sujets comme la lutte écologique contre les organismes nuisibles reste insuffisamment financée.

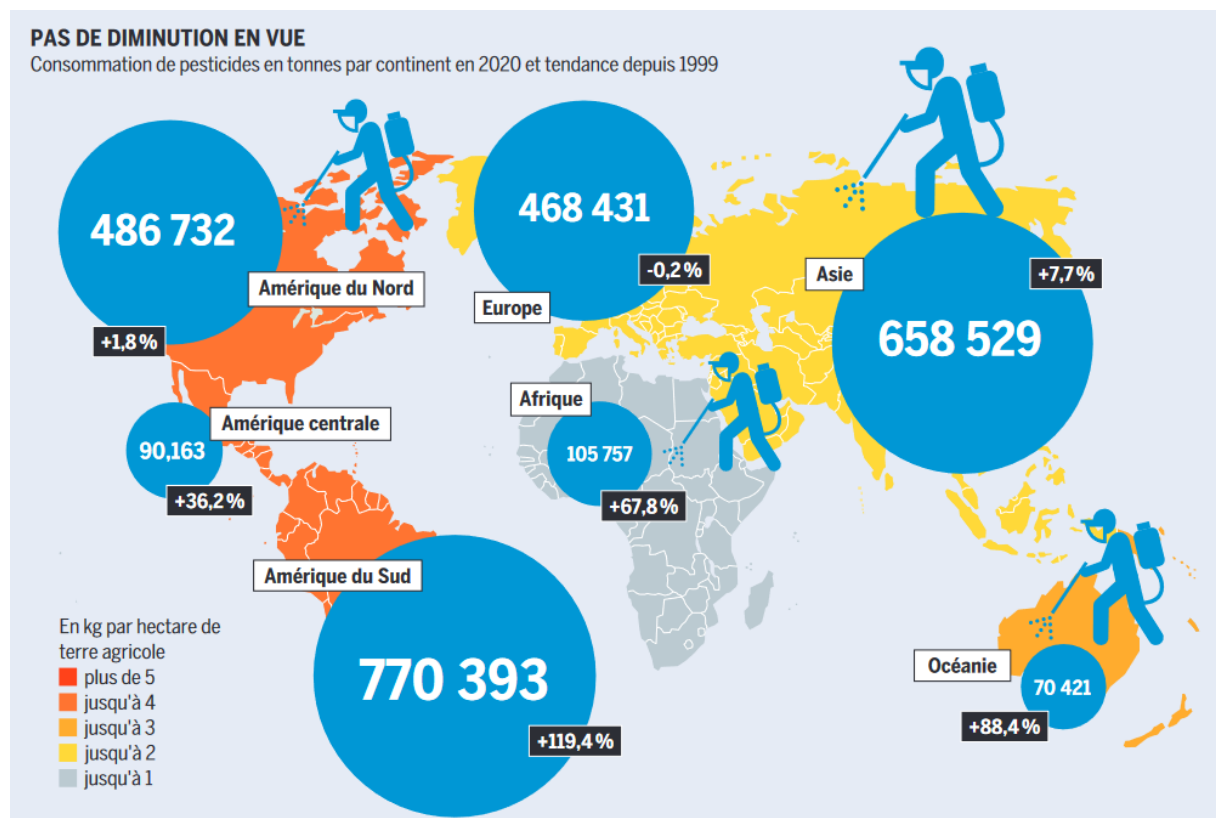


Figure 3: Consommation de pesticides en tonnes par continent en 2020 et tendance depuis 1999. Données tirées de FAOSTAT<sup>2</sup>

Le terme « pesticide » est générique, et il est possible de le définir plus précisément en plusieurs catégories. De manière générale, les pesticides peuvent se diviser en deux groupes :

- en agriculture, le terme le plus généralement utilisé est « *produit phytosanitaire ou phytopharmaceutique* ». Destiné à protéger les végétaux, il regroupe les herbicides, les fongicides, les insecticides, les rodenticides, ...
- pour les autres usages, on parlera plutôt de *biocides*. Ce sont les désinfectants, les produits de protection, les produits antiparasitaires, ...

Il est également possible de définir les pesticides de manière encore plus précise, en les catégorisant en fonction de leur usage :

- les insecticides, s'attaquant aux insectes ravageurs. Dans le cadre de ce projet, il s'agit de la catégorie étudiée.
- les fongicides, s'attaquant aux champignons ;
- les herbicides, s'attaquant aux « plantes adventices », les mauvaises herbes ;
- les parasiticoïdes, s'attaquant aux vers parasites ;
- ...

Les insecticides ne fonctionnent pas tous de la même manière. Le malathion est un composé organophosphoré dont le mélange racémique est utilisé pour lutter contre certains Orthoptères ou Diptères<sup>25</sup>. Le carbaryl, un composé de type carbamate est quant à lui utilisé pour lutter contre des Hémiptères<sup>26</sup> (Figure 4). Ce sont deux structures chimiques très différentes, mais ayant pourtant le même mode d'action. Ce sont des neurotoxiques capables d'inhiber l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE).

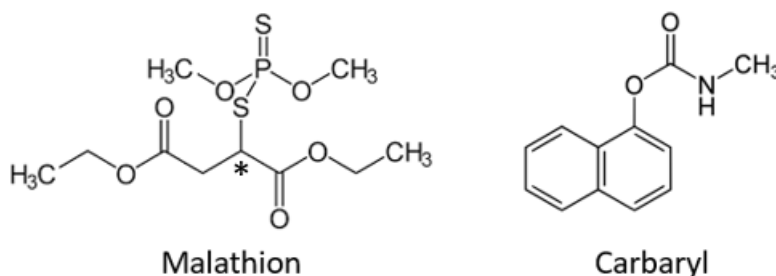


Figure 4: Structures chimiques du malathion et du carbaryl

Il est donc courant de catégoriser les insecticides selon leur mode d'action et non pas selon sa structure chimique. L'IRAC (*Insecticide Resistance Action Committee*) a utilisé ce principe pour mettre au point une classification des insecticides en 43 groupes distincts et en 5 catégories selon la fonction physiologique affectée chez l'insecte<sup>27</sup> (Figure 5).

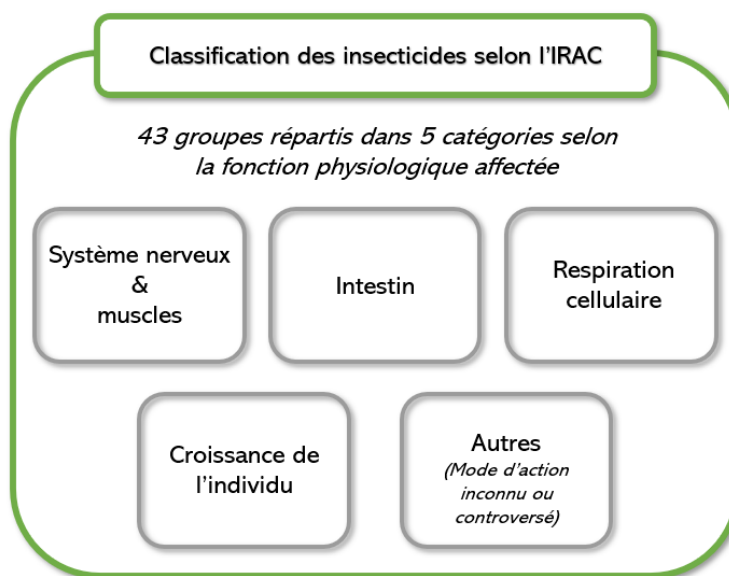


Figure 5: Schéma reprenant la classification des insecticides selon l'IRAC en 5 catégories

On retrouve une majorité de composés neurotoxiques (16 sur 43), suivi des composés affectant la croissance de l'individu (7 sur 43), la respiration cellulaire (7 sur 43) et l'intestin (2 sur 43). Un agent insecticide dont le mode d'action est inconnu, ou controversé, sera placé dans la catégorie « autres » (11 sur 43).

### 3. Les insecticides neurotoxiques

Le contrôle des populations d'insectes ravageurs de l'ordre des Lépidoptères dans les cultures est un très bon exemple de la représentation des insecticides sur le marché<sup>28</sup> : l'utilisation des composés dit neurotoxiques est majoritaire<sup>29</sup>. Il est malgré tout possible de lutter contre ces ravageurs avec l'utilisation du chlorfenapyr pour cibler la respiration cellulaire<sup>30</sup>, des baculovirus pour l'intestin<sup>31</sup>, des analogues d'hormones juvéniles pour la croissance de l'insecte<sup>32</sup> ou encore l'azadirachtine dont le mécanisme est incertain, mais efficace envers *Spodoptera littoralis*<sup>33</sup>. Dans cette catégorie de composés neurotoxiques, on retrouve quelques noms ayant marqué l'histoire de l'agriculture, à savoir les pyréthrinoïdes, les composés organophosphorés/organochlorés, les carbamates, les avermectines ou encore les néonicotinoïdes. Tous s'attaquent au système nerveux central, mais avec des cibles différentes. Certains composés de ces familles sont représentés ci-dessous (Figure 6) et leur mécanisme d'action est détaillé, accompagné d'une schématisation de celui-ci (Figure 7).

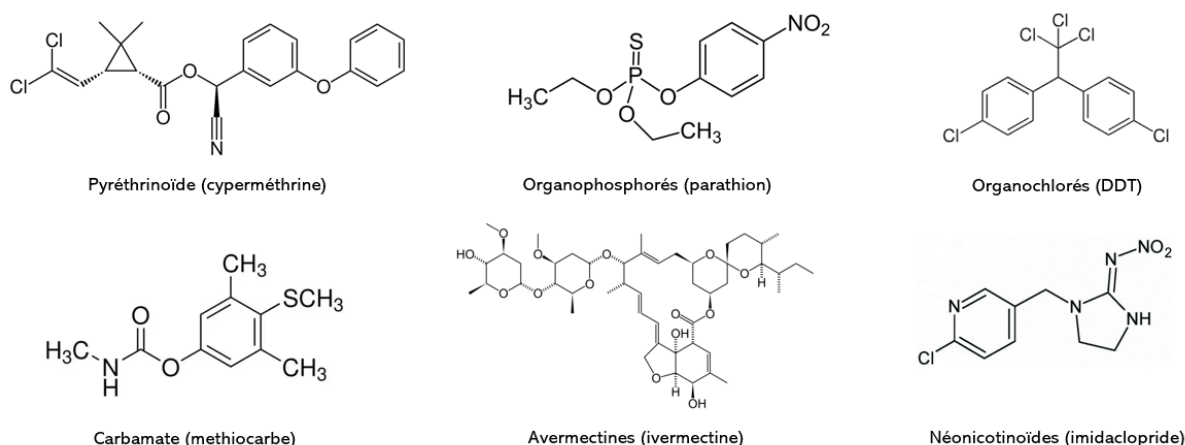


Figure 6: Exemples pour chacune des grandes classes d'insecticides neurotoxiques

#### 3.1. Les pyréthrinoïdes

Les pyréthrinoïdes sont des composés neurotoxiques organiques dont la structure générale est similaire aux pyréthrines (substances dérivées de *Chrysanthemum cinerariaefolium*), avec des hétéroatomes supplémentaires (Br, Cl, F, ...). Ils vont agir au niveau des canaux sodiques de l'axone. Ces insecticides ralentissent l'inactivation des canaux et augmentent leur probabilité d'ouverture, ce qui induit une dépolarisation de la membrane, provoquant une hyperexcitabilité des nerfs et ainsi une paralysie excitatrice, mortelle chez l'insecte<sup>34</sup>. L'utilisation la plus répandue de ce genre de composés est notamment leur application pour lutter contre la propagation de la malaria en Afrique, en utilisant des filets anti-insectes traités avec un pyréthrinoïde<sup>35</sup>.

#### 3.2. Les organophosphorés et les carbamates

Les canaux sodiques ne sont pas les seules cibles intéressantes au sein du système nerveux central. L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme permettant l'hydrolyse de l'acétylcholine (ACh), un neurotransmetteur qui, au cours de l'influx nerveux, est libéré au niveau des synapses des neurones dites « cholinergiques » pour transmettre l'information nerveuse d'un neurone au suivant. Les composés organophosphorés et les carbamates inhibent cette réaction d'hydrolyse, par phosphorylation ou carbamylation de l'enzyme, l'empêchant d'hydrolyser l'ACh<sup>36</sup>. L'augmentation de ce neurotransmetteur dans la région synaptique induit

une hyperactivité aboutissant à la mort de l'insecte. En plus du malathion cité précédemment, le carbofuran est un autre insecticide de ce groupe couramment utilisé pour lutter contre les nématodes, particulièrement en Amérique du Nord<sup>37</sup>.

### 3.3. Les néonicotinoïdes

Une dernière cible potentielle sont les récepteurs présents sur les dendrites post-synaptiques. Deux types principaux peuvent être cités: les récepteurs nicotiniques (nAChR) et les récepteurs GABA (acide gamma-aminobutyrique). Les néonicotinoïdes, molécules chimiquement similaires à la nicotine, sont l'un des groupes les plus utilisés dans l'agriculture. Ils vont jouer un rôle antagoniste sur les récepteurs, empêchant les neurotransmetteurs comme l'Ach ou bien encore les molécules de GABA de se lier à leurs récepteurs respectifs et ainsi provoquer l'hyperactivité, l'hyperexcitabilité et des convulsions corrélées avec l'accroissement spontané de l'activité nerveuse chez l'insecte<sup>38</sup>. Entre 1999 et 2018, l'un de ces composés, l'imidaclopride, a été l'un des insecticides les plus utilisés dans le monde afin de lutter contre les Hémiptères<sup>39</sup>.

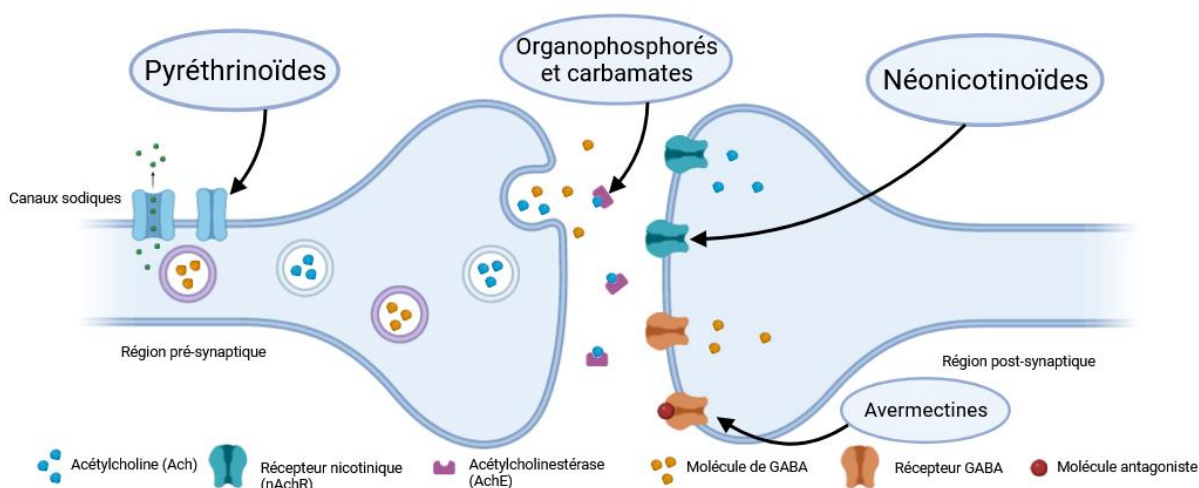


Figure 7: Schéma récapitulatif du mode d'action des insecticides neurotoxiques sur le système nerveux

## 4. Conséquences de l'utilisation importante d'insecticides neurotoxiques

Afin de lutter contre les différents ravageurs et ainsi subvenir aux besoins de notre société, le secteur de l'agriculture dépend énormément de l'utilisation de ces différents composés. Cependant, leur utilisation massive et régulière comporte certains désagréments, comme des impacts importants au niveau de l'environnement, sur la santé humaine et aussi l'apparition de résistances chez les insectes ciblés contre les insecticides utilisés<sup>40</sup>.

### 4.1. Conséquences des neurotoxiques sur l'environnement

Au niveau environnemental, le problème principal réside dans le fait que 50% des insecticides pulvérisés n'atteignent jamais les ravageurs ciblés. Ce pourcentage de pesticides va se retrouver dans les différents compartiments (sol, air, eau) de l'environnement par différents modes de dispersion<sup>41</sup> (Figure 8). Cela implique que les propriétés physico-chimiques (lipophilicité, fonctions chimiques plus ou moins réactives, taille, ...) sont très importantes et leur impact environnemental varie pour chaque composé.

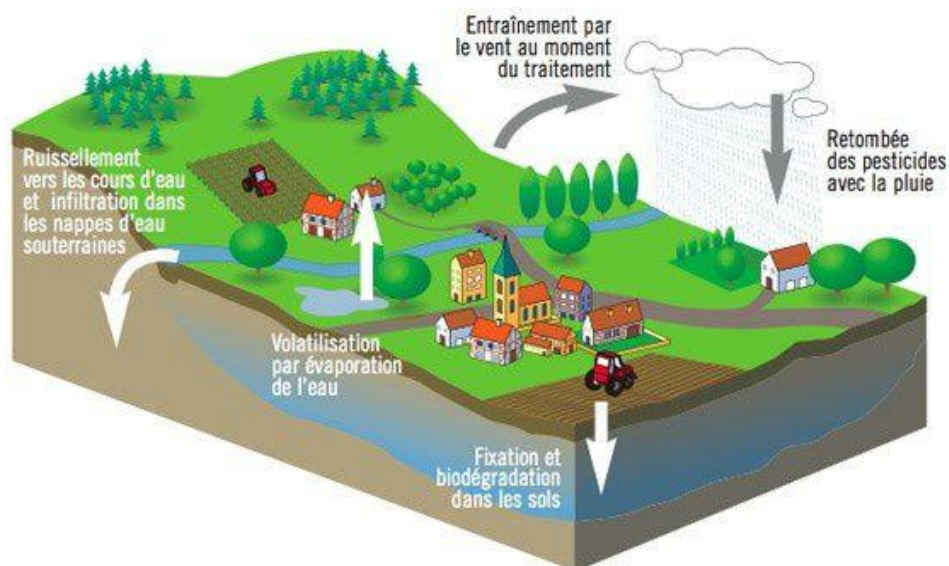


Figure 8: Schéma récapitulatif du mode de dispersion des insecticides dans l'environnement. Repris de [tpe-pesticides.over-blog.com](http://tpe-pesticides.over-blog.com)

#### 4.1.1. Les pesticides dans le sol

Le sol, compartiment clé dans l'environnement, est constitué d'éléments minéraux et organiques ainsi que d'organismes vivants. Ce microbiote est essentiel au maintien de sa fertilité, mais les effets nocifs des pesticides le mettent en danger. En effet, les risques pour l'environnement sont d'autant plus grands que ces produits sont toxiques, persistants et mobiles. Le ver de terre, acteur majeur et agent actif dans la structuration des sols et dont le rôle écologique capital est d'aérer et de micro-drainer le sol, est l'un des principaux concernés<sup>42</sup>. Les pesticides subissent trois étapes majoritaires lors de leur passage dans le sol. Premièrement, l'étape de lixiviation désigne l'entraînement des pesticides dissous dans le sol par irrigation ou bien par la pluie<sup>43</sup>. Deuxièmement, les pesticides présents dans le sol vont commencer à se dégrader, sous l'action des rayonnements ultraviolets, mais particulièrement par les organismes microbiologiques du sol. Une partie des pesticides subissent une minéralisation totale en composés minéraux ( $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$ ), une autre partie ne subit qu'une dégradation partielle, ce qui provoque l'apparition de métabolites (molécules intermédiaires issues de la dégradation) engendrant une pollution supplémentaire<sup>44</sup>. Troisièmement, lors de la dégradation partielle des pesticides, une étape de stabilisation a lieu, c'est-à-dire qu'ils vont se lier de manière plus ou moins forte à la matière organique, à la suite d'un phénomène d'adsorption. Une fois adsorbé, les pesticides perdent leurs effets biologiques et ne sont plus dégradés, ils persistent dans le sol<sup>45</sup>.

#### 4.1.2. Les pesticides dans l'eau

Le passage de pesticides dans le sol va résulter d'une infiltration dans les nappes souterraines, contaminant celles-ci. Le même phénomène se présente dans les eaux de surface. Au niveau de l'Union Européenne, la directive 98/83/EC impose une norme concernant la présence de pesticides dans l'eau potable, à raison de  $0.1 \mu g/L$  par pesticide et  $0.5 \mu g/L$  pour l'ensemble des pesticides présents dans l'eau<sup>46</sup>. De nos jours, il n'est pas impossible de retrouver des cours d'eau dont les valeurs en pesticides dépassent ces normes, avec par exemple la présence détectée d'imidaclopride et de thiaclopride à raison de  $0.31$  et  $0.12 \mu g/L$ , en Grèce<sup>47</sup> ou encore en Australie, avec la présence de cinq néonicotinoïdes dans plusieurs rivières à une concentration supérieure à la norme européenne<sup>48</sup>. Le problème est d'autant plus grave si on



analyse la situation au niveau de la toxicité des insecticides envers les poissons et autres invertébrés maritimes présents dans l'eau, avec des concentrations létales ( $LC_{50}$ ) de l'ordre du ppb (partie par milliard)<sup>49,50</sup>.

#### 4.1.3. *Les pesticides dans l'air*

Lors de la pulvérisation des pesticides, une grande partie se répand dans l'atmosphère, emportés par les vents. Un phénomène de volatilisation des composés dissous dans l'eau est également retrouvé. Une fois présent dans l'air, les pesticides sont emportés dans des lieux plus éloignés que les cultures ciblées, avant de retomber en se faisant entraîner par la pluie, pour à nouveau s'infiltrer dans les sols<sup>51</sup>. Le problème n'est donc pas uniquement situé au niveau de la culture pulvérisée, il concerne parfois plusieurs centaines de mètres autour de celle-ci, si la pulvérisation n'a pas été réalisée en suivant les recommandations générales.

#### 4.2. *Conséquences des neurotoxiques sur la santé humaine*

Les pesticides se retrouvent donc partout dans l'environnement, ce qui entraîne la destruction de la biodiversité, la contamination des eaux, de l'air, mais également des problèmes de santé chez l'Homme<sup>52,53</sup>. Il n'existe pas de pesticide totalement spécifique d'un nuisible. Les organismes vivants partagent, quel que soit leur rang taxonomique, des processus et mécanismes physiologiques partiellement communs. De ce fait, un pesticide, destiné à lutter contre un nuisible, présente une potentielle toxicité plus ou moins étendue pour d'autres organismes qu'il ne cible pas. Dès lors, du fait de la propagation aisée des pesticides dans l'environnement et de leur présence dans l'alimentation, l'Homme encourt des troubles de la santé ; on parle d'intoxication aiguë aux pesticides. Les agriculteurs s'occupant de la dispersion des insecticides sur les champs sont en première ligne face à ce phénomène<sup>54</sup>. Les premiers liens entre l'exposition à des insecticides et les travailleurs dans les champs remontent aux années 60-70, où des organophosphorés semblent être responsables de l'apparition de maladie mentale, ou bien encore d'éventuelles aberrations chromosomiques chez les groupes étudiés<sup>55,56</sup>.

L'impact est différent selon les classes étudiées. Pour les organochlorés, un lien entre le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et son métabolite dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE) a été mis en évidence avec la maladie d'Alzheimer<sup>57</sup> ou l'augmentation des niveaux de protéines précurseurs amyloïdique dans des cellules neuronales mises en culture<sup>58</sup>. Un autre exemple est la détection de hauts niveaux d'époxyde d'heptachlore qui ont été associés à la pathologie des corps de Lewy dans le cerveau post-mortem des personnes atteintes de la maladie de Parkinson<sup>59</sup>. Pour les organophosphorés, le lien entre la neurotoxicité des composés et leurs effets sur l'Homme est plus clivant dans la communauté scientifique, comme le décrit Ross dans sa revue<sup>60</sup>. D'un point de vue mécanistique, on ne sait pas encore si tous les effets de neurotoxicité développementale signalés à la suite d'une exposition à des insecticides de type organophosphorés, et en particulier au chlorpyrifos, résultent de l'inhibition de l'AchE ou d'autres cibles<sup>61</sup>. Au cours de la dernière décennie, d'autres cibles des organophosphorés ont été proposées, notamment le transport axonal, la liaison directe aux récepteurs de l'acétylcholine, la perturbation des niveaux de neurotrophines et, plus récemment, l'inhibition d'autres sérine hydrolases telles que l'acide gras amide hydrolase<sup>62</sup>. Pour les pyréthriinoïdes, la maladie de la Guerre du Golf est un triste exemple des effets neurotoxiques sur l'Homme<sup>63</sup> et la revue de Wolansky décrit la toxicologie de nombreux composés sur les mammifères<sup>64</sup>. Les néonicotinoïdes, la classe d'insecticide la plus récente, sont fortement étudiés vu leur popularité sur le marché des insecticides et notamment en lien avec une toxicité aiguë démontrée sur les

abeilles. Le profil toxicologique n'a pas encore pu être établi précisément, mais ils sont globalement décrits comme sans danger pour l'homme à de faibles concentrations. Ils possèdent cependant un potentiel de génotoxicité, de cytotoxicité et d'altération du système immunitaire à long terme, d'altération de la fonction immunitaire et de la reproduction, et de malformations congénitales, des effets aigus sur la santé, allant de symptômes respiratoires, cardiovasculaires et neurologiques<sup>65-67</sup>.

Les dernières études générales (incluant toutes les classes d'insecticides) sur le sujet évoquent un lien entre l'exposition aux insecticides et les risques de cancer<sup>68</sup> ou encore comme perturbateurs endocriniens, menant à des problèmes d'obésité et de diabète<sup>69</sup>. Il s'agit de points néanmoins controversés et qui nécessitent d'autres études complémentaires afin de certifier l'existence de ce lien.

#### 4.3. Phénomène de résistance aux insecticides

L'utilisation intensive d'insecticides organiques synthétiques pendant plus de cinquante ans afin de combattre les arthropodes nuisibles et les vecteurs de maladies a conduit irrémédiablement à la sélection d'une résistance aux insecticides ou aux acaricides chez près de 450 espèces d'arthropodes<sup>70</sup>. Dans les cas les plus extrêmes, comme pour *Leptinotarsa decemlineata*, l'insecte devient résistant à pratiquement n'importe quel traitement<sup>71</sup>. Le problème se fait grandement ressentir dans certaines régions du monde comme en Afrique avec les moustiques du genre *Anopheles* dont le contrôle se fait de plus en plus compliqué avec une résistance établie envers 4 classes d'insecticides<sup>72</sup>. En Asie, plus précisément en Chine, les pyréthréinoïdes ou les néonicotinoïdes utilisés pour lutter contre *Bemisia tabaci* se révèlent rapidement ne plus être assez efficaces<sup>73</sup>.

Les insectes peuvent résister à l'exposition aux insecticides grâce à des adaptations comportementales (Figure 9). Le contact avec un composé phytosanitaire entraîne un stimulus chez l'individu, provoquant une irritabilité de contact et menant à l'évitement, la fuite de l'insecte dans un environnement sans stimulus<sup>74</sup>.

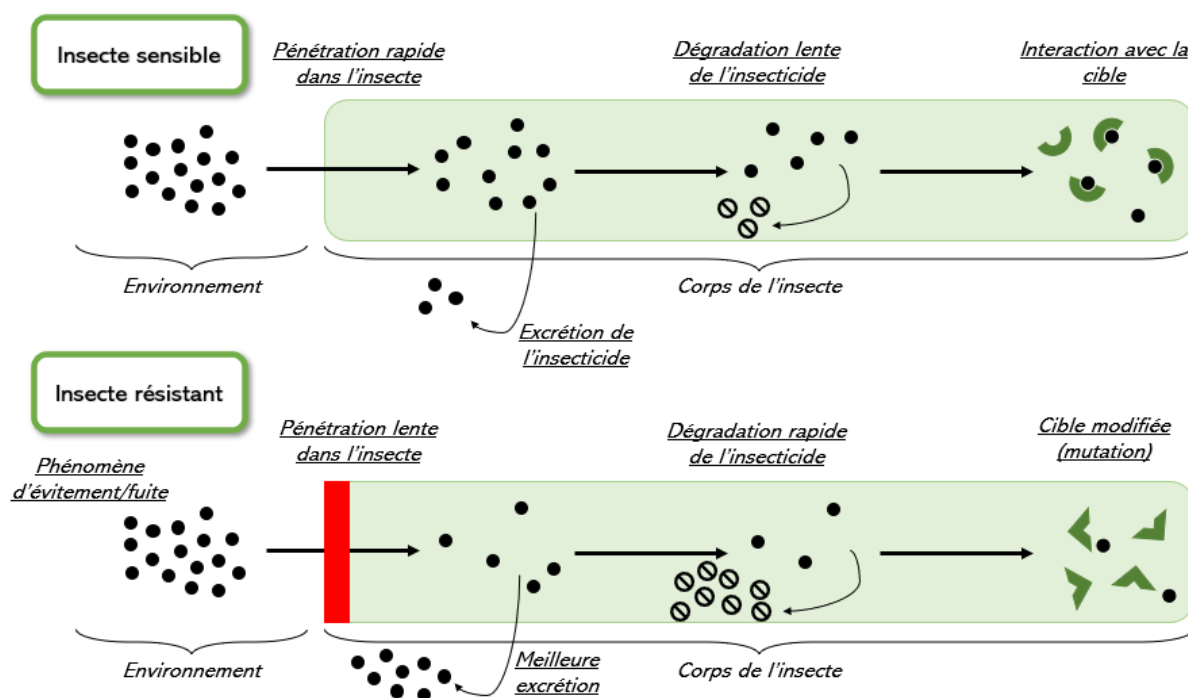


Figure 9: Schéma récapitulatif du phénomène de résistance chez les insectes



Il existe deux types principaux de résistances développés par les insectes. La première est une augmentation du processus de métabolisation par surexpression de certaines enzymes comme les estérases<sup>75</sup>, les monooxygénases<sup>76,77</sup> et les glutathione S-transférases<sup>78</sup>, qui participent à la biotransformation du toxique. L'augmentation de l'expression des gènes codant pour ces trois principales enzymes est la cause la plus fréquente de la résistance aux insecticides chez les insectes. Les estérases sont responsables de la métabolisation des organophosphorés, carbamates et des pyréthrinoïdes et interviennent dans la dégradation rapide des insecticides dans l'organisme<sup>79</sup>. Les glutathione S-transférases sont impliquées dans la détoxification des organochlorés et des organophosphorés, permettant une meilleure excrétion des composés présents dans la cellule en augmentant leur solubilité<sup>78</sup>. Les monooxygénases cytochrome P450 sont impliquées, d'une part, dans la résistance aux pyréthrinoïdes, aux organophosphorés et dans une moindre mesure aux carbamates, et d'autre part, dans le renforcement de la cuticule et donc la pénétration plus lente des insecticides<sup>80</sup>.

Le second mécanisme de résistance est l'altération de la cible principale de l'insecticide par des mutations, entraînant une inefficacité des insecticides employés. Dans le cas des pyréthrinoïdes, le principal symptôme observé est une paralysie totale (*knockdown*) de l'insecte, le phénomène de résistance est donc nommé « *knockdown resistance* », ou « *super knockdown resistance* » si une ou deux mutations sont présentes sur les canaux sodiques<sup>81</sup>. Pour le puceron de céréales, *Sitobion avenae*, la mutation d'un seul acide aminé (L1014F, une leucine en phénylalanine) provoque une résistance 35 à 40 fois plus élevée contre la lambda-cyhalotrine<sup>82</sup>. Des expériences de mutagenèse dirigée dans l'AchE (V185M, G247S, A328S, A391T et T682A) ont mis en évidence une corrélation entre un effet de résistance sur des composés organophosphorés ou carbamates et ces mutations<sup>83</sup>. Dans le cas des néonicotinoïdes, la littérature rapporte un phénomène de résistance, mais qui contrairement aux pyréthrinoïdes nécessite généralement plus d'une mutation d'acide aminés pour être efficace<sup>84</sup>. Le nombre de cas de résistances pour ces composés sont cependant relativement faibles (13 espèces étudiées en 2014).

La lutte à base d'insecticides reste la pierre angulaire du combat contre les ravageurs agricoles et les vecteurs de pathogènes. Toutefois, la dépendance excessive à l'égard de cette stratégie a fait de la résistance aux insecticides l'un des problèmes les plus graves en agriculture et en santé publique de notre époque<sup>85</sup>. A titre d'exemple, la liste des 19 insectes ravageurs qui ont fait l'objet du plus grand nombre d'études durant la période 2012-2016<sup>86</sup> est présentée (Tableau 1), indice de leur importance économique ainsi que le nombre de résistances détectées chez l'espèce étudiée.

Tableau 1: Liste des 19 insectes ravageurs ayant fait l'objet du plus grand nombre d'études durant la période 2012-2016.

Nom scientifique	Nombre de publications (2012-2016)	Nombre de résistances aux insecticides établies
<i>Helicoverpa armigera</i> (Lépidoptère)	1619	49
<i>Bemisia tabaci</i> (Hémiptère)	1528	56
<i>Tetranychus urticae</i> (Trombidiforme)	962	95
<i>Plutella xylostella</i> (Lépidoptère)	926	95
<i>Spodoptera litura</i> (Lépidoptère)	853	39
<i>Tribolium castaneum</i> (Coléoptère)	829	33
<i>Myzus persicae</i> (Hémiptère)	811	80
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Lépidoptère)	668	24
<i>Aphis gossypii</i> (Hémiptère)	610	46
<i>Nilaparvata lugens</i> (Hémiptère)	603	31
<i>Spodoptera exigua</i> (Lépidoptère)	506	39
<i>Frankliniella occidentalis</i> (Thysanoptère)	465	30
<i>Ceratitis capitata</i> (Diptère)	437	3
<i>Cydia pomonella</i> (Lépidoptère)	421	22
<i>Callosobruchus maculatus</i> (Coléoptère)	409	2
<i>Spodoptera littoralis</i> (Lépidoptère)	401	30
<i>Diaphorina citri</i> (Hémiptère)	385	7
<i>Tuta absoluta</i> (Lépidoptère)	375	14
<i>Thrips tabaci</i> (Thysanoptère)	362	19

#### 4.4. Les interdictions concernant l'utilisation des insecticides

Les pesticides doivent être réglementés afin de garantir qu'ils ne présentent pas de risques inacceptables pour l'homme, les animaux ou l'environnement. Avant les années 40, la régulation des insecticides n'avait que très peu de visibilité, mais des études sur le DDT (l'insecticide le plus utilisé à cette époque avec 400.000 tonnes répandus à travers le monde) ont changé la vision de la société vis-à-vis de leur régulation<sup>87</sup>. Dans les années 1970, la Suède est le premier pays à bannir l'utilisation de ce composé, rapidement suivi par de nombreux autres, ce qui lance un mouvement de décrets et législations pour le contrôle des insecticides utilisés dans l'agriculture<sup>88</sup>. La ligne du temps ci-dessous (Figure 10) résume toute la mise en place de la législation européenne, mettant en lumière la lente avancée des réglementations, mise en place en réaction aux réalités du terrain.

Dans l'UE, la législation précédemment fragmentée a été remplacée fin du 20<sup>ème</sup> siècle par des normes harmonisées en matière de pesticides pour tous les États membres. Les limites nationales maximales de résidus (LMR) présents dans les aliments ne sont plus utilisées et seules les européennes s'appliquent. L'utilisation durable des pesticides et l'adoption de techniques de lutte intégrée contre les ravageurs sont au cœur de la législation européenne actuelle et de l'harmonisation de la procédure d'homologation des pesticides en Europe<sup>89</sup>. De nombreux organismes comme l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) mettent en garde la société face à l'utilisation abusive de ces différents composés. En réaction la Commission Européenne, entre autres, met en place des exigences d'innocuité toxicologique et écotoxicologique (directive 91/414/CEE)<sup>90</sup>.

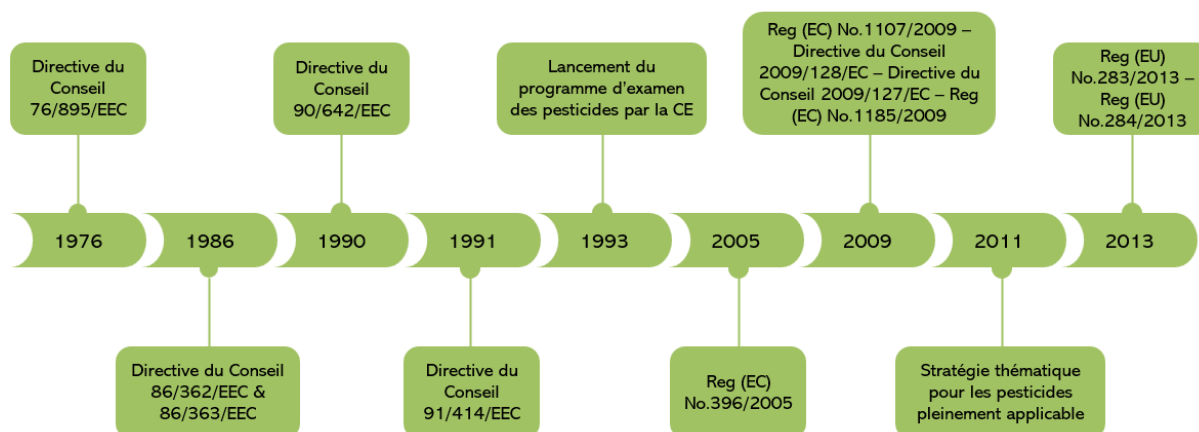


Figure 10: Ligne du temps résumant la mise en place de la législation européenne autour des insecticides.

## 5. Les pucerons (Hémiptères): fléaux des cultures

Les Hémiptères sont un ordre d'insectes provoquant d'importants dégâts dans les cultures, ils sont dits « piqueurs-suceurs », c'est-à-dire qu'ils viennent se nourrir de la sève élaborée des plantes, solution riche en glucides et acides aminés, en prélevant le phloème à l'aide de leur rostre<sup>91</sup>. Dans la problématique des ravageurs, cet ordre est régulièrement comparé à celui des Lépidoptères, comme *Spodoptera frugiperda* ou bien *Helicoverpa armigera*, étant les insectes causant le plus de dégâts dans le monde au niveau des cultures, particulièrement les différents stades larvaires qui se nourrissent des feuilles. La différence est que cet ordre est dénommé comme des insectes dits « broyeurs » de par l'action mécanique des mandibules détruisant les plantes lors de la diète, provoquant des dégâts immédiats. Ceux-ci réduisent considérablement la capacité de photosynthèse de la plante et donc la production d'hydrates de carbone, ce qui affecte gravement la santé des plantes et la production de fruits<sup>92</sup>. Cependant, l'action mécanique de piqûre d'un puceron sur une plante est beaucoup moins destructrice que le déchiquetage des feuilles par les mandibules observées chez les Lépidoptères, ce qui entraîne un mécanisme de défense plus lent de la part des plantes. Le principal problème est malgré que les Hémiptères provoquent moins de dégâts physiques aux plantes que les Lépidoptères, ils sont des vecteurs de virus phytopathogènes, impliquant d'autres conséquences dramatiques en cas d'invasion par ce ravageur<sup>93</sup>. Ils constituent donc un ordre essentiel à étudier afin de pouvoir contrôler les populations dans les cultures. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur la super-famille des *Aphidoidea*, pucerons de leur nom commun.

### 5.1. La super-famille des *Aphidoidea*

Après un travail de reclassification durant le début du 21<sup>ème</sup> siècle, la super-famille des *Aphidoidea* contient désormais uniquement la très large famille des *Aphididae*, les autres familles ayant vu leur rang taxonomique changer ou bien étant déclarées comme éteintes<sup>94</sup>. A l'heure actuelle, plus de 5000 espèces d'*Aphididae* sont identifiées et 250 d'entre elles sont décrites comme des ravageurs importants en horticulture et en agriculture<sup>95</sup>.

#### 5.1.1. Physiologie et mode de reproduction des pucerons

Les pucerons sont des petits insectes (1-10mm), dont la diversité des espèces rencontrées est plus marquée dans les zones tempérées du monde par rapport aux zones tropicales. A travers une dispersion passive due aux vents forts des individus ailés et le transport humain de matériel végétal infesté, certaines espèces comme *Myzus persicae* (puceron vert du pêcher) sont presque considérées comme cosmopolites dans leur distribution<sup>96</sup>. Le puceron possède un mode de

reproduction atypique et complexe au sein du règne animal, ce qui donne lieu à une multiplication très rapide des individus (une femelle peut donner naissance à plus de 60 larves) (Figure 11). On parle d'un cycle de vie holocyclique s'ils alternent entre les générations sexuées et asexuées, ou bien de cycle de vie anholocyclique si tous les jeunes sont produits par parthénogénèse thélytoque (ne produisant que des femelles). Suivant les circonstances, certaines populations peuvent avoir des populations à la fois holocycliques et anholocycliques, mais aucune espèce de puceron connue ne se reproduit uniquement par voie sexuelle. Le système de reproduction se complexifie encore si on prend en compte l'accès à une seule plante hôte pendant l'année, ou bien comme pour 10% des espèces, une alternance entre plantes hôtes ligneuses en hiver et plantes hôtes herbacées en été, donnant lieu à un polyphénisme (= l'expression de phénotypes différents à partir du même matériel génétique) important<sup>95</sup>.

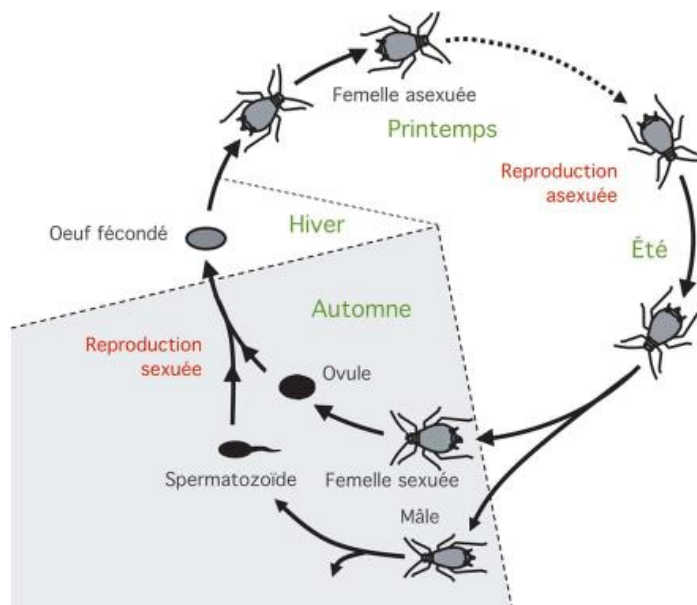


Figure 11: Cycle de vie d'un puceron. Repris d'après Julie Jaquiéry et al, PLOS Genetics, 2015.

Un autre phénomène expliquant la capacité importante de multiplication des pucerons est le télescopage générationnel, où durant la parthénogénèse, vont éclore des nymphes femelles ayant déjà en elles des embryons à développement parthénogénétique. L'espèce du puceron du chou (*Brevicoryne brassicae*) est capable de produire jusqu'à 41 générations de femelles en une saison, ce qui en théorie peut permettre à une seule femelle de produire de très nombreux descendants si tous les pucerons survivent<sup>97</sup>. La durée de vie d'un puceron dépend de son environnement et de la température, pour une durée allant de 20 à 40 jours.

### 5.1.2. Anatomie des pucerons

Anatomiquement, les pucerons disposent d'un corps mou et peuvent être retrouvés dans différentes couleurs en fonction de l'environnement (vert, noir, brun, rose ou même incolore), même au sein d'une seule espèce, il s'agit du polymorphisme<sup>98</sup>. Le corps est séparé en trois régions distinctes: i) la tête avec une paire d'antennes, des yeux et un rostre (appendice de forme allongée permettant de se nourrir), ii) un thorax avec trois paires de pattes et parfois deux paires d'ailes, iii) un abdomen avec la présence, ou non, de cornicules à l'arrière et d'une queue, nommée cauda (Figure 12). Celle-ci est connue pour retenir le miellat excrété, substance riche en sucres et acide aminés dont les fourmis raffolent, d'où l'élevage de pucerons parfois observé dans des colonies<sup>99</sup>.

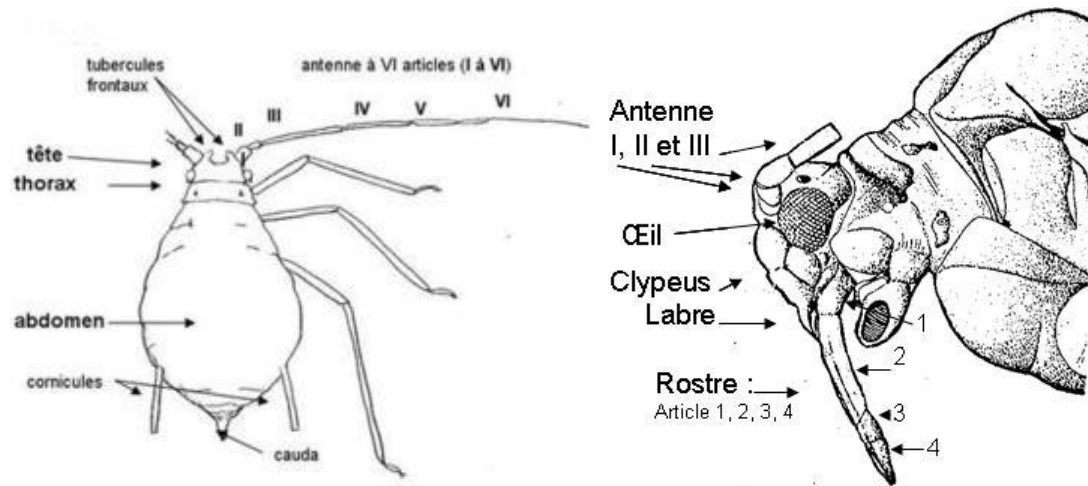


Figure 12: Anatomie d'un puceron. A gauche, la vue générale du corps et à droite, un zoom sur la tête.

Que ça soit pour les larves ou les adultes, le mode d'alimentation des pucerons est plus précis et sélectif, ce qui leur permet d'éviter les substances allélochimiques (= métabolites secondaires éliminés par un organisme vivant, plante ou animal, et qui agit sur d'autres individus d'une autre espèce) et les composés indigestes qui sont plus abondants dans d'autres tissus végétaux<sup>100</sup>. Durant l'alimentation de l'insecte, deux types de salives entrent en jeu. La première est dense et, en se gélifiant autour des stylets, constitue un chemin intercellulaire vers le phloème pour les stylets perforants, isolant les tissus végétaux des pièces buccales, empêchant ainsi la réaction de la plante sur le site d'alimentation. Lorsque les stylets ont atteint le phloème, les pucerons commencent à produire le deuxième type de salive, dite "aqueuse", qui est injectée directement dans le système vasculaire de la plante et qui contient des acides aminés ainsi que de nombreuses enzymes digestives/lytiques<sup>101</sup>. En plus d'affaiblir directement la plante en absorbant les nutriments présents dans la sève, la salive injectée dans la plante peut provoquer l'apparition d'une dépigmentation, une chute prématurée ou bien une déformation des feuilles.

### 5.1.3. Les pucerons, vecteurs de virus phytopathogènes

Plus grave que l'affaiblissement de la plante, les pucerons sont de loin les vecteurs de virus phytopathogènes les plus performants, avec près de 30 % des espèces de virus de plantes décrits à ce jour<sup>102</sup>. Les pucerons peuvent transmettre des virus à toutes les étapes du processus d'alimentation : dès le début lors de la pénétration du stylet dans le cytoplasme des cellules de l'épiderme ou du mésophylle, ainsi que plus tard dans le système vasculaire. De la même manière, le virus peut être inoculé à la fois dans les tissus superficiels et dans les plus profonds au cours du processus. Ainsi, les pucerons sont des organismes qui peuvent acquérir et inoculer n'importe quel taxon viral dans les plantes, quelle que soit leur spécificité tissulaire<sup>103</sup>. Trois modes de transmissions sont définis :

- le mode non persistant, les virus étant acquis en quelques secondes et ne sont retenus que quelques minutes par leurs vecteurs ;
- le mode semi-persistant, avec des virus acquis en quelques minutes à quelques heures et conservés pendant plusieurs heures par leurs vecteurs ;
- le mode persistant, avec des virus dont l'acquisition nécessite de quelques minutes à quelques heures pour être acquis et qui peuvent être conservés pendant de très longues périodes, souvent jusqu'à la fin de l'année pendant de très longues périodes, souvent jusqu'à la mort du vecteur.

Un exemple marquant de virus pathogène est le virus de la jaunisse grave de la betterave (*BYV*, *Beet Yellowing Virus*) fréquemment associé avec un autre virus, celui de la jaunisse modérée de la betterave (*BMV*, *Beet Mild Yellowing Virus*), qui sont des virus quasi-cosmopolites transmis par un mode semi-persistant par 32 espèces de pucerons, mais principalement *Myzus persicae* et *Aphis fabae*. Cette combinaison de virus peut conduire à une chute de rendement allant jusqu'à 47% pour la production de sucre<sup>104</sup>.

#### 5.1.4. Phénomène de résistance aux insecticides chez les pucerons

Véritables fléaux, les pucerons représentent donc une réelle menace économique dans le secteur primaire par leur taux de reproduction exceptionnel, par la transmission de virus phytopathogènes et également par leur capacité d'adaptation aux composés utilisés dans les cultures pour contrer les invasions. Bien que l'utilisation de pyréthrianoïdes, organophosphorés ou néonicotinoïdes est encore utile à l'heure actuelle contre cette famille, de plus en plus de cas de résistances font leur apparition au sein des espèces ravageuses. En 2022, c'est plus de 1000 cas de résistance à des insecticides qui ont été mis en évidence, dont la majorité (964) peuvent être assignés à seulement 10 espèces (Figure 13). *Myzus persicae* détient le record avec 483 résistances établies<sup>26,105–107</sup>.

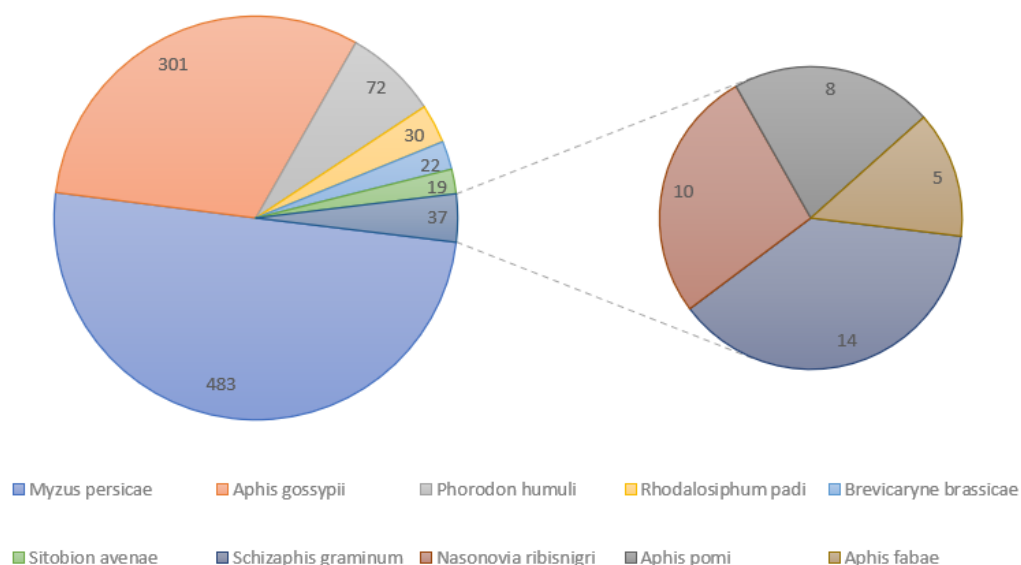


Figure 13: Nombre de résistances mises en évidence chez 10 espèces de pucerons. Données reprises de la « Arthropod Pesticide Resistance Database (ARPD) »<sup>107</sup>

#### 5.2. *Acyrtosiphon pisum* comme modèle de recherche

Parmi toutes les espèces recensées de pucerons, *Acyrtosiphon pisum* (*A. pisum*), ou plus communément appelé le puceron vert du pois, est considéré comme espèce modèle pour l'étude d'une série de phénomènes biologiques, notamment le polyphénisme, les symbioses insectes-bactéries et le développement des bactériocytes, la génétique de l'adaptation ou encore la transmission des virus des plantes<sup>108</sup>. En effet, même si *Myzus persicae* est un ravageur encore plus impactant économiquement parlant, son mode de reproduction fait appel à un hôte primaire (les arbres du genre *Prunus*, comme le pêcher) durant les mois hivernaux et puis de nombreuses cultures de légumes ou herbacées comme hôtes secondaires (par exemple, de la famille des cucurbitacées ou bien des astéracées)<sup>109</sup>. A l'inverse, *A. pisum* n'a qu'un hôte principale, les plantes de la famille des *Fabaceae*<sup>110</sup>. Les lignées parthénogénétiques peuvent donc être maintenues perpétuellement dans des incubateurs qui reproduisent des conditions estivales,



permettant aux manipulations expérimentales d'être effectuées sur des répliques parfaitement identiques de générations en générations<sup>108</sup>. Autre avantage, *A. pisum* est un puceron relativement gros (4 mm de long en moyenne) comparé à *M. persicae* (0.6 mm de long en moyenne), rendant les manipulations expérimentales et les tests *in vivo* plus aisés<sup>111</sup>.

Depuis 2010, un argument supplémentaire vient se rajouter à la liste pour désigner *Acyrtosiphon pisum* comme étant un modèle idéal pour l'étude des pucerons : le séquençage de son génome. Cela a ouvert la porte à de nombreuses études plus poussées pour mieux comprendre la composition exacte de leur salive, la relation symbiotique avec certaines bactéries, les réactions avec le système défensif des plantes et bien d'autres choses<sup>112</sup>. Récemment, d'autres génomes de pucerons ont été séquencés, comme celui de *Rhopalosiphum maidis*<sup>113</sup> en 2019 et celui d'*Aphis glycines*<sup>114</sup> en 2020. C'est également le premier génome séquencé d'un insecte vivant une interaction mutualiste avec une bactérie, comme c'est le cas pour les pucerons et *Buchnera aphidicola*, relation essentielle pour *A. pisum* étant donné, exemple parmi tant d'autres, qu'il n'est pas capable de synthétiser un acide aminé essentiel (l'arginine) de lui-même sans la bactérie<sup>115</sup>. La relation symbiotique entre les pucerons et *Buchnera aphidicola* est relativement bien connue et est une relation dite « obligatoire ». Le mutualiste se transmet par transfert vertical (les parents vers la descendance) et tend à occuper les bactériocytes, apportant des avantages nutritionnels et physiques aux insectes hôtes. Les bactériocytes sont surtout présents à proximité du système digestif (épithélium de l'intestin moyen) pour faciliter le transfert des nutriments<sup>116</sup>. La relation pourrait être « facultative », avec le mutualiste provenant d'un transfert vertical ou bien de l'environnement même, comme par exemple le genre *Pseudomonas* qui permet de détoxifier les pesticides ingérés par les pucerons<sup>117</sup>. Enfin, la relation pourrait être « phytopathogénique », le mutualiste réside dans le corps du puceron et dépend de lui pour être transmis aux plantes, en l'aidant en contrepartie à faciliter l'alimentation, comme le fait *Xylella fastidiosa* résidant dans les sauterelles<sup>118</sup>. Il est estimé que 15% des insectes disposent d'une relation selon l'une de ces trois classifications.

## 6. Quelles sont les moyens de luttes possibles contre les pucerons ?

Comme décrit précédemment, le secteur agricole fait face à un constat de plus en plus marqué: les méthodes employées actuellement deviennent inefficaces ou ne conviennent plus aux réglementations d'utilisation de la société. Les insecticides ayant des propriétés neurotoxiques sont pour certains toujours utilisables au quotidien, mais pour combien de temps encore avant d'observer des phénomènes de résistances complets sur un large spectre de composés ou faire face à des interdictions strictes pour éviter les dommages collatéraux sur l'environnement et la santé humaine. Dans ce cadre, plusieurs stratégies voient le jour, celles se concentrant sur le renforcement des mécanismes de défense des plantes, d'autres se focalisant sur la relation symbiotique au sein des espèces étudiées ou bien encore sur le fait d'étudier de nouvelles réactions biochimiques essentielles à l'insecte.

### 6.1. Agir sur la relation symbiotique insecte-microorganisme

Les symbiotes sont au centre de nombreux mécanismes essentiels chez l'insecte : i) ils facilitent la nutrition, le transfert de vitamines, ii) fournissent des acides aminés essentiels vers l'insecte, iii) assurent une protection contre les prédateurs, les parasites et parasitoïdes iv) aident à dégrader les pesticides et v) renforcent l'immunité de l'hôte. Dès lors, il est possible de cibler directement la bactérie et ainsi provoquer de nombreuses complications chez l'insecte, menant à sa mort ou bien affectant sa capacité reproductrice, comme dans le cas de la mouche tsé-tsé et la bactérie *Wigglesworthia*, où l'ingestion d'antibiotiques classiques par l'insecte tels que la

tétracycline et la pénicilline a permis d'éliminer la flore microbienne résultant en l'incapacité des individus de se reproduire<sup>119</sup>. Les techniques de l'insecte stérile (SIT) ou incompatible (IIT) sont deux autres approches généralement couplées qui concernent également la reproduction des individus ciblés, hautement spécifiques mais avec le défaut de nécessiter une très large population d'individus mâles et un coût beaucoup plus important<sup>120</sup>. Pour lutter contre *Aedes albopictus*, le moustique tigre, les mâles libérés sont infectés par la bactérie endosymbiotique *Wolbachia* héritée de la mère, ce qui entraîne des accouplements stériles avec les femelles des champs qui ne sont pas infectées par la même souche de *Wolbachia*, un phénomène connu sous le nom d'incompatibilité cytoplasmique<sup>121</sup>.

Il est possible d'appliquer une approche génomique par la technique de paratransgénése<sup>122</sup> à l'aide du système CRISPR/Cas9 pour la modification génétique précise du système bactérien<sup>123</sup>. Par exemple, le symbiote *Sodalis* de la mouche tsé-tsé peut être cultivé en solution liquide ou solide avant d'être modifié génétiquement puis réintroduit chez la mouche, bloquant l'expression des trypanosomes responsables de la maladie du sommeil. Cette méthode est considérée comme l'une des 10 meilleures dans la lutte contre les ravageurs selon le magazine Science en 2013. Enfin, dans le cas des pucerons, il est possible de s'intéresser à d'autres relations symbiotiques facultatives (*S. symbiotica*, *H. defensa*, *R. insecticola*)<sup>124</sup>. Elles pourraient jouer un rôle dans la transmission d'une forme d'ARN interférent (ARNi) chez les pucerons. L'ARNi est un processus biologique où des molécules d'ARN peuvent réguler l'expression des gènes. En d'autres termes, ces symbiotes facultatifs pourraient influencer le fonctionnement des gènes chez les pucerons par le biais de l'ARNi.

### 6.2. Action directe sur les plantes

La découverte la plus récente dans la lutte contre les ravageurs des cultures est l'utilisation de peptides complémentaires (cPEPs) permettant de cibler n'importe quel gène d'une plante afin d'augmenter la production de la protéine cible et ainsi augmenter les mécanismes de défenses existants chez la plante ou exprimer abondamment l'un ou l'autre phénotype<sup>125</sup> (Figure 14).



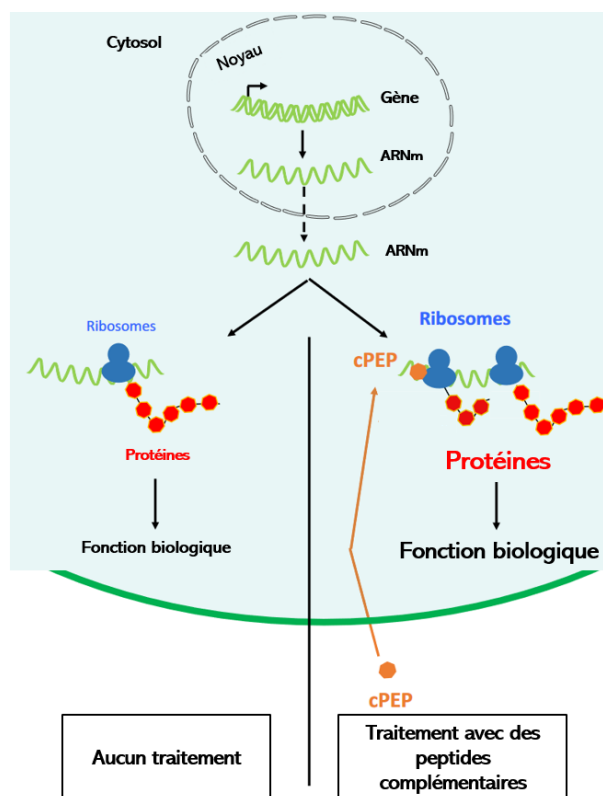


Figure 14: Schéma récapitulatif du mécanisme d'action des peptides complémentaires sur les plantes. Repris de la publication d'Ormanecy et al<sup>125</sup>

Les avantages sont nombreux: les peptides ne semblent pas devoir suivre des règles particulières pour leur synthèse (tant qu'ils sont complémentaires à l'ARNm correspondant, un peu hydrophiles et inférieurs à 60 acides aminés), ils se font dégrader rapidement par les microorganismes du sol et la pénétration dans les cellules animales (comme les abeilles ou l'Homme) est difficile sans la présence de peptides ayant la capacité de transporter d'autres peptides à l'intérieur des cellules<sup>126</sup>. Cela présente également un énorme avantage pour certains phénotypes compliqués à contrôler tels que la résistance à la chaleur ou bien la teneur en chlorophylle.

Pour agir sur les plantes afin de repousser les ravageurs, cette découverte se rajoute à d'autres techniques actuellement utilisées afin qu'elles se défendent plus efficacement contre les insectes: modification du génome des plantes à l'aide du système CRISPR/Cas9, la technique d'interférences d'ARN (ARNi), utilisation de toxines comme celles de *Bacillus thuringiensis*, l'utilisation des métabolites secondaires produits par la plante ou encore en étudiant les effecteurs et éliciteurs des insectes<sup>127</sup>. Ce sont des molécules (peptides, acides gras, esters, enzymes, ...) capables d'activer les défenses naturelles des plantes. La glucose oxydase (GOX) identifiée dans la salive de nombreux insectes de différents ordres permet de ralentir les réactions défensives chez la plante<sup>128</sup>. Inhiber l'activité enzymatique de la GOX reviendrait donc à permettre aux plantes de se défendre efficacement et ainsi repousser les ravageurs.

### 6.3. Agir sur les protéines et les enzymes des insectes

Dans le cas des insecticides neurotoxiques, l'action des composés organophosphorés ou carbamates sur l'AchE est un premier exemple afin d'agir directement sur une protéine ou enzyme cible. Il y a tout d'abord eu des tentatives pour perfectionner ce types de molécules, pour répondre à la problématique de résistance chez certaines espèces. Le groupe des

néonicotinoïdes s'est rapidement développé pour répondre aux demandes de l'agriculture dans la lutte contre les ravageurs, avec l'apparition des composés de type sulfoximine<sup>129</sup> (Figure 15) classés comme un sous-groupe de la 4<sup>ème</sup> génération de néonicotinoïdes (4C selon l'IRAC).

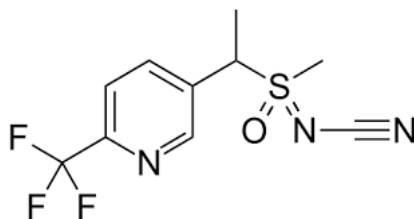


Figure 15: Structure générale d'un composé de type sulfoximine

Les sous-groupes représentent des classes chimiques distinctes qui ont le même mode d'action mais dont la structure chimique ou le mode d'interaction avec la protéine cible est suffisamment différent pour que le risque de sélection d'une résistance métabolique ou d'une résistance croisée au site cible soit réduit par rapport à des analogues proches. Dans ce cas-ci, des études de déplacements de radioligands, électrophysiologiques ou bien de modélisation moléculaires mettent en évidence des différences importantes d'interactions avec les récepteurs nicotiniques en présence de sulfoxaflor et d'autres néonicotinoïdes<sup>130</sup>. Cependant, cette classe d'insecticide présente déjà certaines limites, avec des effets néfastes sur les abeilles<sup>131</sup> et des phénomènes de résistances déjà établis sur certains Hémiptères<sup>132,133</sup>. Elle est également sujette à débat concernant son éventuelle interdiction d'utilisation, actée par les Etats-Unis en 2015, tandis que la Commission Européenne restreint son application aux seules utilisations dans les serres permanentes selon le règlement d'exécution (UE) 2022/686.

D'autres enzymes comme les carboxylestérases agissent comme des molécules endogènes capables d'emprisonner, d'inactiver des composés toxiques tels que les organophosphorés, ils sont alors nommés « *bioscavengers* stœchiométriques ». Autre catégorie, les « *bioscavengers* catalytiques » vont pouvoir dégrader les composés toxiques et à faible concentration, ce qui est le cas de l'OpdA (*organophosphate-degrading enzyme*), les phosphotriestérases ou encore les OPAA (*organophosphorus acid anhydrolase*)<sup>134</sup>.

Certaines protéines peuvent avoir un effet insecticide direct, comme c'est le cas pour WsMBP1, une lectine liant le mannose isolée de feuilles de *Withania somnifera*, qui utilisée contre des individus de deux ordres différents *Hyblaea puera* (Lépidoptère) et *Probergrothius sanguinolens* (Hémiptère) a provoqué un retard de croissance et de métamorphose, une diminution de la masse corporelle des larves et une augmentation de la mortalité<sup>135</sup>.

La physiologie des insectes comprend plusieurs systèmes biologiques importants tels que les systèmes digestif, circulatoire, respiratoire, musculaire, endocrinien, nerveux et reproducteur, qui sont régis par de nombreuses enzymes<sup>136</sup>. Inhiber celles-ci reviendrait donc à perturber des fonctions essentielles à la survie de l'individu. Plus de 18 enzymes jouent un rôle digestif afin de traiter les carbohydrates, les lipides, les protéines et acides nucléiques et peuvent être inhibées, particulièrement dans le cas des sérine protéinases comme la trypsine et la chymotrypsine ou encore les cystéines protéinases<sup>137</sup>. La chitinase est un autre exemple d'enzyme essentielle pour l'insecte, permettant l'hydrolyse de la cuticule des insectes durant l'ecdysis, un exo-squelette constitué de chitine faisant office de barrière entre l'insecte et l'environnement et les potentiels pathogènes<sup>138</sup>. Les chitinases d'insectes sont inhibées par des substrats/produits, tels que les chitooligosaccharides, qui sont des produits de l'hydrolyse de la

chitine par les chitinases d'insectes, à des concentrations élevées susceptibles d'être rencontrées au cours du processus de mue. L'allosamidine, un composé extrait des espèces *Streptomyces*, est un inhibiteur plus sélectif de la famille 18 de chitinases que de la famille 19 (classification CAZy)<sup>139</sup>. Une autre catégorie d'enzymes importantes sont les glycosyltransférases (GT), une enzyme de détoxification comme les cytochrome P450, ayant un rôle multiforme dans divers processus physiologiques des insectes tels que la détoxification des pesticides, la défense immunitaire, le développement des yeux et épithélial, l'odorat, la protection contre les UV, ou encore la formation de la cuticule<sup>140</sup>.

Dans le cadre de cette thèse, l'enzyme étudiée, la **tréhalase**, est essentielle pour chaque insecte peu importe son ordre et intervient dans le cadre du métabolisme énergétique.

## 7. Le métabolisme énergétique des pucerons : nouvelle cible potentielle

La tréhalase (EC 3.2.1.28) est une enzyme impliquée dans le métabolisme énergétique en catalysant la réaction d'hydrolyse du tréhalose ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside), un diholoside non-réducteur jouant le rôle de réserve énergétique principale chez les insectes<sup>141</sup>. Cette enzyme a été découverte pour la toute première fois en 1893 chez *Aspergillus niger*<sup>142</sup>, avant d'être étudiée dans de nombreux autres organismes variés: chez les plantes<sup>143</sup>, les bactéries<sup>144</sup>, les vertébrés dont l'Homme<sup>145,146</sup>, les levures<sup>147</sup>, les champignons<sup>148</sup> mais surtout les insectes<sup>149</sup>, où elle a toute son importance. Le tréhalose joue de multiples rôles dans ces organismes : il est un composant structural de la paroi cellulaire des bactéries, un régulateur de croissance et une source de carbone chez les plantes/champignons et surtout, une source d'énergie chez les insectes. C'est une forme spécifique de carbohydrates stockée dans leur hémolymph, tandis que d'autres organismes utilisent d'autres mécanismes tels que la fermentation, la respiration anaérobie, la décomposition.

### 7.1. Le tréhalose, réserve énergétique spécifique des insectes

Le tréhalose est synthétisé dans les corps gras par une voie enzymatique impliquant la *trehalose-6-phosphate synthase* (TPS, EC 2.4.1.15) et la *trehalose 6-phosphate phosphatase* (TPP, EC 3.1.3.12). La TPS catalyse le transfert du glucose de l'UDP-glucose au glucose 6-phosphate, formant le tréhalose-6-phosphate (T6P) et l'UDP, tandis que la TPP déphosphoryle le T6P en tréhalose et en phosphate inorganique (Figure 16). Cette voie est également nommée « *OtsA-OtsB pathway* », OtsA et OtsB étant les gènes traduisant la TPS et la TPP<sup>150</sup> et est identifiée chez les archées, les bactéries, les champignons, les plantes et les arthropodes (dont font partie les insectes).

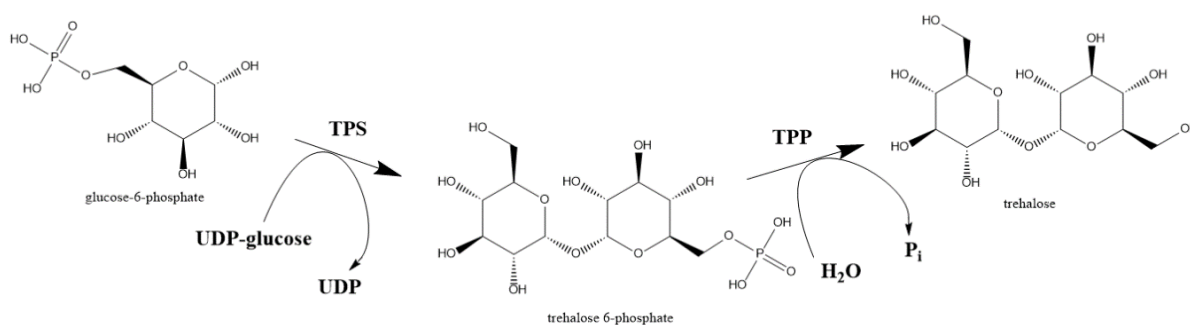


Figure 16: Voie enzymatique de synthèse du tréhalose chez les insectes

D'autres voies de synthèses du tréhalose ont été découvertes dans d'autres organismes (« *TreY/TreZ – TreS – TreP – TreT pathway* »), avec des mécanismes qui peuvent être réversibles, ou non, mais aucune d'entre elles n'ont été identifiées chez un insecte, laissant donc « *OtsA-OtsB pathway* » comme la seule voie possible de production de tréhalose.

L'hydrolyse du tréhalose est sous contrôle enzymatique de la tréhalase, une glycosidase appartenant à la famille des *Glycoside Hydrolases* (GH) selon la classification CAZy (*Carbohydrate-Active enZymes*)<sup>151</sup>. Les tréhalases sont réparties dans trois familles différentes : GH15, GH65 et GH37. Pour les deux premières, d'origine bactérienne ou fongique, elles impliquent toutes les deux un glutamate comme résidu catalytique donneur de proton, lors de l'hydrolyse du tréhalose, et un autre glutamate comme nucléophile pour la famille GH15 tandis qu'une molécule d'eau joue ce rôle dans la famille GH65. Pour la famille GH37 qui contient des tréhalases d'origine bactérienne, fongique, animale ou végétale, le nucléophile est un glutamate et le donneur de proton, un aspartate<sup>152</sup>. Les enzymes GHs ont deux mécanismes catalytique: soit l'hydrolyse produit deux glucoses ayant la même configuration anomérique (mécanisme de rétention de conformation) ou bien il y a production de deux molécules de glucose qui diffèrent par la position d'un hydroxyle, l'un en position axiale ( $\alpha$ ), l'autre en position équatoriale ( $\beta$ ) (mécanisme d'inversion de configuration) (Figure 17). Comme démontré par Zechel *et al*<sup>153</sup>, les tréhalases d'insectes hydrolysent le tréhalose en deux molécules avec une stéréochimie opposée, selon le mécanisme de Kochland<sup>154</sup>.

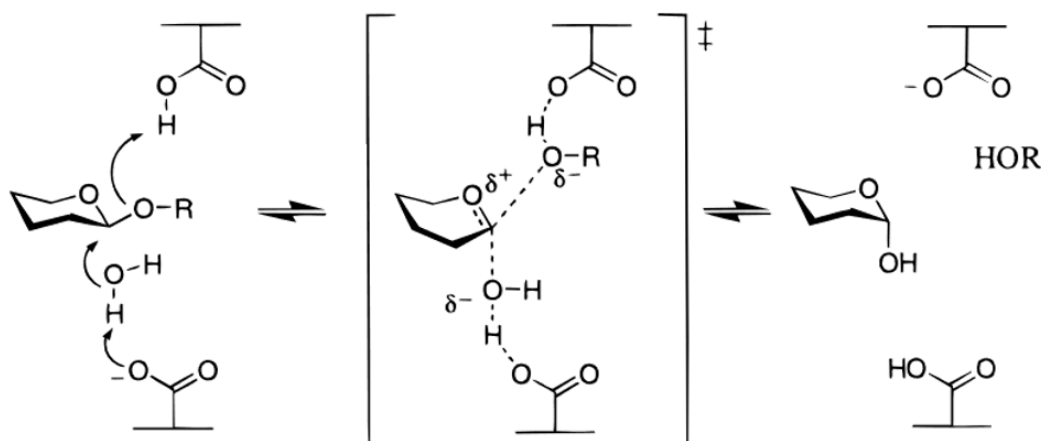


Figure 17: Mécanisme de Kochland d'inversion de configuration après hydrolyse

L'hydrolyse d'un glycoside avec une inversion nette de la configuration anomérique est généralement réalisée via un mécanisme à une étape, à déplacement unique impliquant des états de transition de type ion oxcarbénium.

### 7.2. Tréhalase : état de l'art

La tréhalase a été identifiée sous deux formes distinctes : la tréhalase soluble (Treh-1) et la membranaire (Treh-2). La Treh-1 est présente dans l'hémolymphe, la cavité des cellules caliciformes dans l'intestin moyen et dans les homogénats d'œufs de certains insectes<sup>155</sup>. La Treh-2 est située dans les muscles, les cellules folliculaires, les cellules ovariennes, les spermatozoïdes, l'intestin moyen, le cerveau et les ganglions thoraciques<sup>156</sup> (Figure 18).

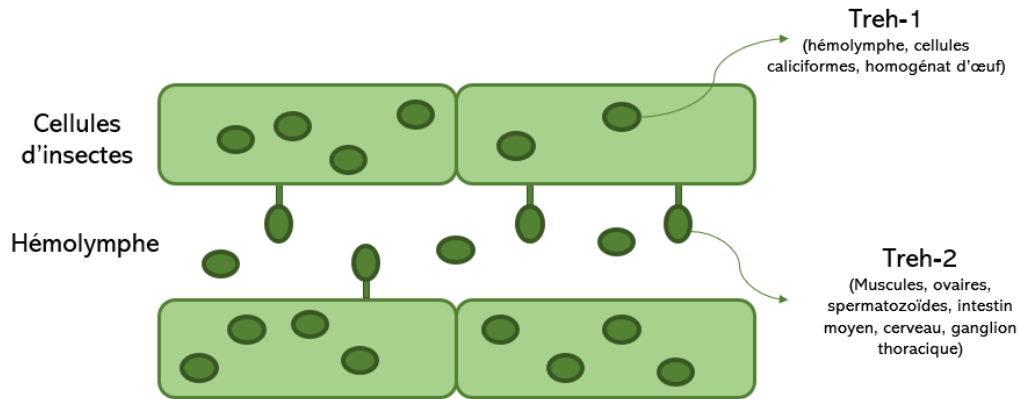


Figure 18: Localisation des deux formes de tréhalase : soluble et membranaire. Figure reproduite sur base de la revue de Shukla et al<sup>149</sup>

La Treh-2 est une enzyme liée à la membrane des cellules de l'insecte par un domaine transmembranaire de 20 à 23 acides aminés hydrophobes situé au niveau C-terminal<sup>157</sup>, inexistant dans la séquence de Treh-1. Selon une étude sur *Bombyx mori*, Treh-2 serait orientée dans l'hémolymphe des insectes afin de dégrader le tréhalose extracellulaire permettant au glucose d'entrer dans la cellule et être utilisé dans les différentes fonctions physiologiques<sup>158</sup>. La comparaison de l'activité de la tréhalase à différents stades de développement dans six tissus chez *Apolygus lucorum* indique que l'activité de Treh-1 représente la majorité de l'activité totale de la tréhalase<sup>159</sup>. Les extractions, purifications et caractérisations rapportées des tréhalases d'insectes commencent généralement à partir de diverses solutions enzymatiques brutes : le sang pour *Phormia regina*<sup>160</sup>, des embryons et larves pour *Artemia*<sup>161</sup>, l'intestin moyen entier pour le ver à soie *Bombyx mori*<sup>162</sup> et *Spodoptera frugiperda*<sup>163</sup> et plus récemment sur des abeilles mellifères entières<sup>164</sup> et des termites<sup>165</sup>. Le clonage de gènes et l'expression procaryote ont également été utilisés pour les tréhalases de *Chironomus ramosus*<sup>166</sup>, *Drosophila melanogaster*<sup>167</sup> et *Helicoverpa armigera*<sup>168</sup>. Dans le cas des pucerons, des tréhalases solubles et membranaires ont été observées dans les formes aptères et alates d'*Aphis citricola*<sup>169</sup>. Plus récemment, la tréhalase soluble d'*Aphis glycines* a été décrite par Bansel et al<sup>170</sup>.

#### 7.2.1. Les fonctions biologiques liées à la tréhalase

En plus d'avoir un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique des insectes en hydrolysant le tréhalose en molécules de glucose, la tréhalase a d'autres rôles biologiques mis en évidence grâce à l'utilisation d'inhibiteurs ou par la technique d'ARN interférents : l'inhibition des gènes de la tréhalase de *Laodelphax striatellus* n'a pas seulement causé la mort des individus, mais a également empêché leur développement et leur croissance normale<sup>171</sup>. Les larves et les pupes de *Spodoptera exigua* traitées avec l'ARN double brin de Treh-1 et Treh-2 ont produit des phénotypes inhabituels et anormaux tels que des aberrations à l'abdomen, des ailes difformes et demi-éclosion, ce qui est dû aux interactions entre les deux formes de tréhalases et les *chitine synthase* (CHS) A et B (Lien Treh-1/CHSA dans le cuticule et Treh-2/CHSB dans l'intestin moyen) durant la mue<sup>172</sup>. Les muscles associés aux ailes des insectes sont les tissus les plus gourmands en énergie, qu'ils tirent dans des molécules riches en énergie, comme le glucose. Lors de l'envol, la concentration en tréhalose chute drastiquement afin de répondre aux demandes énergétiques. L'inhibition de la tréhalase chez *Locusta migratoria* par la tréhaloline a provoqué une sévère hypoglycémie, effet annulé lorsque du glucose est

transféré dans l'insecte en présence de l'inhibiteur<sup>173</sup>. Enfin, la tréhalase joue un rôle de facteur de récupération face à un stress environnemental très important (manque d'eau ou d'oxygène, température trop faible ou trop élevée, présence de toxines, ...), mais son mécanisme est encore trop peu connu à l'heure actuelle. L'inhibition de cette enzyme entraîne donc une cascade de conséquences souvent mortelles pour l'insecte (Figure 19).

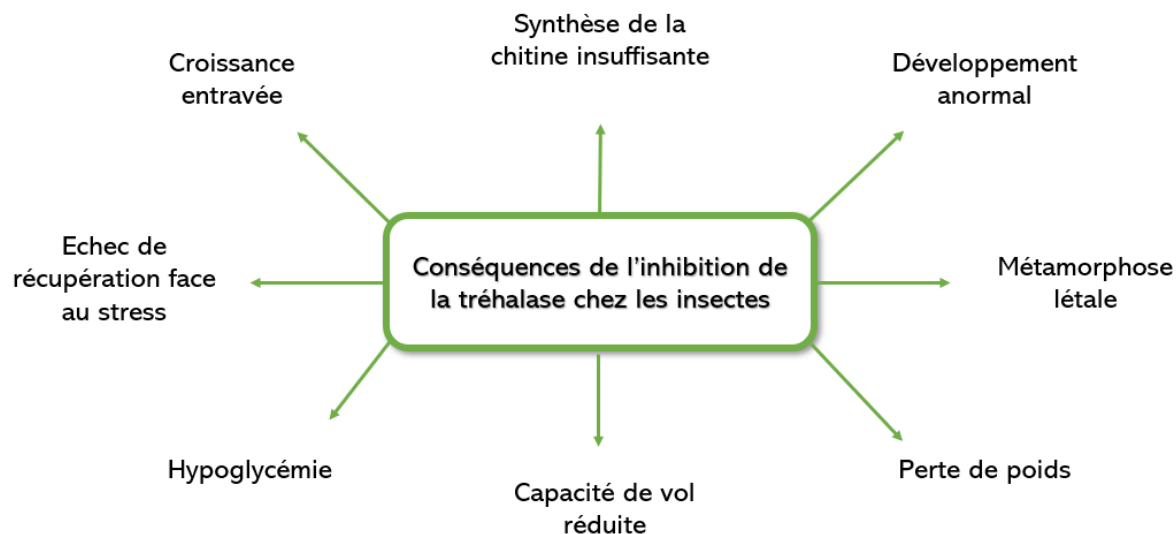


Figure 19: Conséquences de l'inhibition de la tréhalase chez les insectes

#### 7.2.2. Propriétés biochimiques et moléculaires

Suite aux nombreuses purifications et caractérisations de tréhalases provenant de multiples sources, leurs propriétés biochimiques et leur caractérisation moléculaire sont relativement bien étudiées. La masse moléculaire se situe entre 60 et 140 kDa, les tréhalases membranaires étant plus grandes dû au domaine transmembranaire<sup>174</sup>. Pour ce qui concerne les paramètres cinétiques, les tréhalases ont un maximum d'activité dans une gamme de température allant de 45°C à 65°C. Mis à part certains cas comme la tréhalase de *Rhodothermus marinus* (bactérie thermophile) qui est renommée comme étant la tréhalase la plus thermostable, avec un maximum d'activité à 65°C<sup>175</sup>, la plupart des tréhalases voient leur activité enzymatique chuter fortement à de trop hautes températures. En ce qui concerne le pH optimum des tréhalases, la gamme est située entre 4 et 7, ce qui a donné lieu à une classification spécifique pour les tréhalases de champignons, comme *Saccharomyces cerevisiae* ou *Mucor rouxii*, en une tréhalase dite « acide » si son activité enzymatique est maximale à pH acide ( $4 < \text{pH} < 5$ ) ou bien dite « neutre » si au contraire elle est maximale à pH neutre ( $\sim \text{pH } 7$ )<sup>176,177</sup>.

Au niveau moléculaire, de nombreux alignements de séquences de tréhalases provenant de bactéries, plantes, animaux et champignons ont permis de révéler deux motifs typiques de cette enzyme : -PGGRFXEXYXWDXY- et -QWDXPX[G/A]W[P/A/S]P-, où X représente un acide aminé quelconque<sup>178</sup>. Il est également révélé la présence d'une région riche en glycine -GGGGEY- dans la région C-terminale, formant une « boucle » catalytique, se retrouvant dans d'autres  $\alpha$ -glycosidases comme les  $\alpha$ -amylases. Plusieurs hypothèses ont suggéré différentes fonctions putatives de la boucle mobile riche en glycine, telles que l'aide au maintien des résidus glycosidiques dans une orientation optimale pendant la catalyse<sup>179</sup>, l'aide à l'état de transition vers différentes conformations<sup>180</sup> ou l'induction d'un mécanisme de piégeage et de libération du substrat et des produits, agissant comme une passerelle pour la liaison du substrat et la libération



du produit<sup>181,182</sup>. Chez les Diptères, d'autres régions conservées propres à cet ordre ont été rapportées : DSKTFVDMK, IPNGGR[V/I]YY, RSQPP[F/L]L, GPRPESYREDI et ELKA[G/A]AESGMDFSSRWV<sup>183</sup>.

En 1983, Terra et son équipe ont réalisé des études d'inhibition sur les tréhalases et montrent que le Tris et le  $\delta$ -glucolactone se lient au même sous-site du site actif, tandis que le dioxane se fixe plus près de la  $\delta$ -gluconolactone que du Tris, probablement au centre du site actif, sans pour autant pouvoir aller plus loin dans l'analyse<sup>184</sup>. D'autres études suivent et mettent en évidence la présence de deux sous-sites au sein du site actif : le sous-site 1 comme le « site catalytique » (aussi nommé sous-site -1) et le sous-site 2 comme le « site de reconnaissance » (aussi nommé sous-site +1)<sup>185-188</sup> (Figure 20).

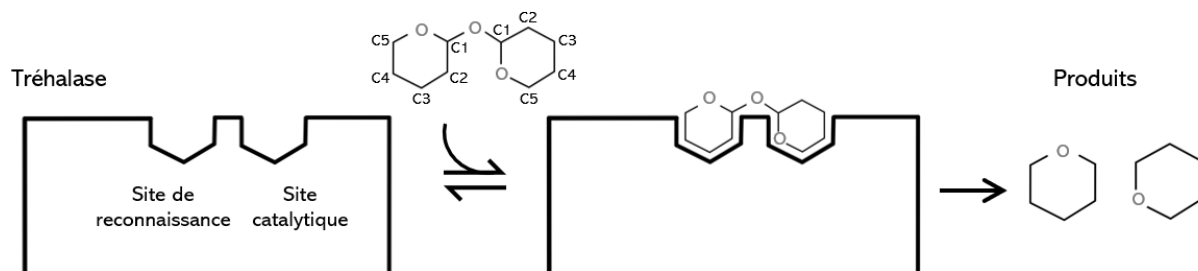


Figure 20: Schématisation des sous-sites du site actif de la tréhalase.

En résumé, le sous-site 1 contient un groupement carboxylique (Asp ou Glu) agissant comme nucléophile et préférant lier les résidus glucosyl avec des hydroxyles axiaux en C2. Le sous-site 2 contient un groupement guanidine (Arginine) fonctionnant comme donneur de protons, qui possède un imidazole (Histidine) dans son voisinage diminuant sa valeur de pKa. Le Tris ayant une activité inhibitrice à pH = 9, mais pas à pH = 6, il est concevable qu'il soit déprotoné et se lie au voisinage de ce groupement guanidine. En outre, les données suggèrent qu'il existe une poche hydrophobe proche du sous-site 2 qui, une fois occupée, facilite la liaison du ligand aux sous-sites 1 et 2. Une fois que le sous-site 1 est occupé, il modifie la conformation de l'enzyme, ce qui permet aux groupes enfouis dans l'enzyme de devenir plus accessibles. Ce phénomène est illustré par la modification de la fraction imidazole voisine du sous-site 2 et par l'augmentation de la réactivité de la guanidine en présence de méthyl- $\alpha$ -glucoside. Ces changements de conformation sont supposés faire partie des étapes catalytiques de la tréhalase<sup>189</sup>.

Bien que la structure primaire (séquence en acides aminés) des tréhalases soit relativement bien connue, son assemblage en structure secondaire et tertiaire l'est un peu moins. Cette enzyme est tout de même connue pour avoir une structure tertiaire  $\alpha$ -toroïdale (nommée structure en tonneau ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub>), retrouvée chez chaque tréhalase peu importe l'organisme étudié (Figure 21).

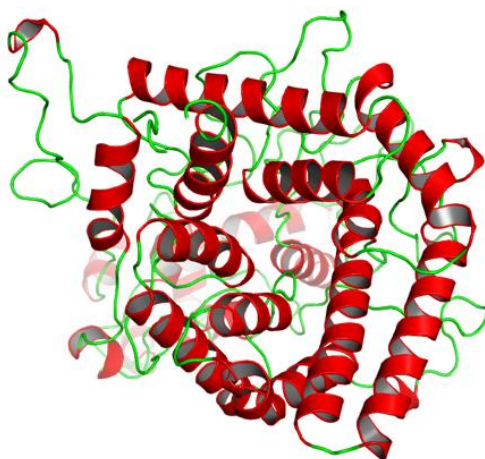
structure  $\alpha$ -toroïdale ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub>

Figure 21: Modèle obtenu sur base d'une structure cristallographique d'une tréhalase provenant d'*Enterobacter cloacae* (PDB : 5Z6H). Mise en évidence de la structure  $\alpha$ -toroïdale ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> des tréhalases

Cette structure se retrouve dans d'autres glycosidases, telles que les chitobiose phosphorylases GH94<sup>190</sup>, les glucoamylases GH15<sup>191</sup>, et les maltose phosphorylases GH65<sup>192</sup>. Par contre, en terme de structure cristalline définie par DRX (diffraction aux rayons X), cryo-EM (cryo-microscopie électronique) ou bien par RMN (résonance magnétique nucléaire), on compte uniquement 10 structures cristallographiques de tréhalase dans la Protein Data Bank (PDB), provenant soit de bactéries, comme *Escherichia coli* (4) ou *Enterobacter cloacae* (2), soit de champignon, comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* (4), en complexe ou non avec des ligands. Très récemment, trois nouvelles structures de tréhalase ont été déposées dans la PDB, provenant d'*Arabidopsis thaliana*, une plante, avec une mutation D380A et en complexe avec le substrat de l'enzyme, le tréhalose (résultats encore non publiés) (Figure 22). Il n'existe aucune structure de vertébrés ou d'invertébrés dans la PDB à l'heure actuelle.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5JTA</li> <li>• 5NIS</li> <li>• 5M4A</li> <li>• 5N6N</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2JF4</li> <li>• 2JGO</li> <li>• 2JJB</li> <li>• 2WYN</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5Z6H</li> <li>• 5Z66</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 7E9U</li> <li>• 7E9X</li> <li>• 7EAW</li> </ul>

Figure 22: Récapitulatif des structures cristallines de tréhalases actuellement présentes dans la PDB en mars 2024.



# Chapitre 2

---

Objectifs et Stratégie



La protection des cultures contre les insectes ravageurs demeure un enjeu crucial dans le domaine de l'agriculture, où les pertes de récoltes causées par ces organismes nuisibles peuvent avoir des répercussions économiques et alimentaires majeures au sein de notre société. Face à la nécessité de développer des solutions durables et respectueuses de l'environnement, l'objectif de cette étude vise à identifier de nouvelles molécules pouvant devenir des insecticides novateurs. Contrairement aux insecticides neurotoxiques conventionnels, cette approche privilégiera un changement de mode d'action en ciblant une fonction biochimique essentielle et propre aux insectes en lien avec leur métabolisme énergétique. En effet, trouver un inhibiteur de la tréhalase, l'enzyme responsable de l'hydrolyse du tréhalose, réserve d'hydrates de carbone des insectes, permettrait de provoquer une hypoglycémie des ravageurs. L'idée sous-jacente est d'explorer des alternatives qui permettent de contrôler les nuisibles de manière efficace tout en réduisant l'impact sur les écosystèmes non ciblés. Cette transition vers des insecticides agissant au niveau des processus biochimiques spécifiques ouvre la voie à une approche plus ciblée, durable et respectueuse de la biodiversité agricole.

Ce projet est divisé en quatre chapitres principaux (Figure 23), à savoir la purification et la caractérisation de la tréhalase d'*Acyrtosiphon pisum* (chapitre 3), suivi d'une recherche d'inhibiteurs soit de provenance naturelle (chapitre 4), soit de provenance synthétique (chapitre 5), pour terminer sur la mise au point d'une hypothèse de pharmacophore et des modifications chimiques permettant d'augmenter la spécificité des composés obtenus (Chapitre 6).



Figure 23: Récapitulatif de la stratégie mise en place dans le cadre de cette thèse

Dans le premier chapitre, les tréhalases solubles et membranaires d'*Acyrtosiphon pisum* seront extraites à partir d'une population d'insectes, purifiées, avant d'être caractérisées au niveau biochimique (température optimale d'activité enzymatique, pH optimum d'activité enzymatique, spécificité au substrat, identification des modifications post-traductionnelles), au niveau cinétique ( $K_m$ ,  $V_{max}$ , ...) ou bien encore au niveau moléculaire (détermination de la structure primaire en acide aminés par spectrométrie de masse, création d'un modèle par homologie, étude phylogénétique, ...). Le même travail sera appliqué pour les tréhalases solubles et membranaires obtenues par surexpression bactérienne. Ensuite, dans les deuxième et troisième chapitre, des inhibiteurs potentiels de tréhalases seront identifiés, soit de provenance naturelle (production de métabolites inhibiteurs par des souches de *Streptomyces*) ou soit de provenance synthétique (criblage virtuel sur base de multiples banque de données de molécules synthétisables). Enfin, dans le dernier chapitre, les inhibiteurs prometteurs sont caractérisés en présence de l'enzyme par diverses techniques, avant d'identifier un pharmacophore.

Au bout de cette thèse, une ou plusieurs molécules, de provenance naturelle ou synthétique, seront identifiées comme inhibiteurs intéressants de la tréhalase d'*Acyrtosiphon pisum* en vue de la conception de nouveaux insecticides commerciaux. Ces molécules auront un mode d'action impliquant une fonction biochimique essentielle aux insectes, l'hydrolyse du tréhalose sous contrôle enzymatique de la tréhalase, contrairement aux insecticides actuels qui s'attaquent plutôt au système nerveux central.

# Chapitre 3

---

Purification et caractérisation d'ApTrehs



### 1. Mise en contexte et description du test enzymatique

Avant même de pouvoir imaginer trouver un inhibiteur novateur de la tréhalase de *A. pisum* pour le transformer en insecticide, il faut avant tout purifier et caractériser l'enzyme. Au-delà de mettre au point une méthode de purification permettant de produire en grande quantité l'enzyme, déterminer les propriétés physico-chimiques, cinétiques et structurales sont en effet essentielles à la compréhension du mécanisme d'inhibition de l'enzyme. Parmi les caractéristiques, on retrouve : l'effet de la température sur l'activité enzymatique, sa thermostabilité, l'effet du pH sur l'activité enzymatique et sur la stabilité, les constantes cinétiques ( $K_m$ ,  $K_{cat}$ ,  $K_{cat}/K_m$ , ...), la spécificité par rapport aux substrats, la masse moléculaire, les effets de cofacteurs éventuels et le point isoélectrique. Cela est d'autant plus important étant donné que selon la littérature, aucune étude préliminaire à ce projet ne s'intéressait à cette enzyme et donc aucune donnée expérimentale n'était disponible.

Un protocole de purification des tréhalases d'*A. pisum* (ApTreh) a donc été mis au point en se basant sur la littérature, permettant d'obtenir les deux formes de tréhalases, soluble et membranaire. Les étapes finales de purification, sélectionnées après optimisation du procédé, sont représentées à la Figure 24.

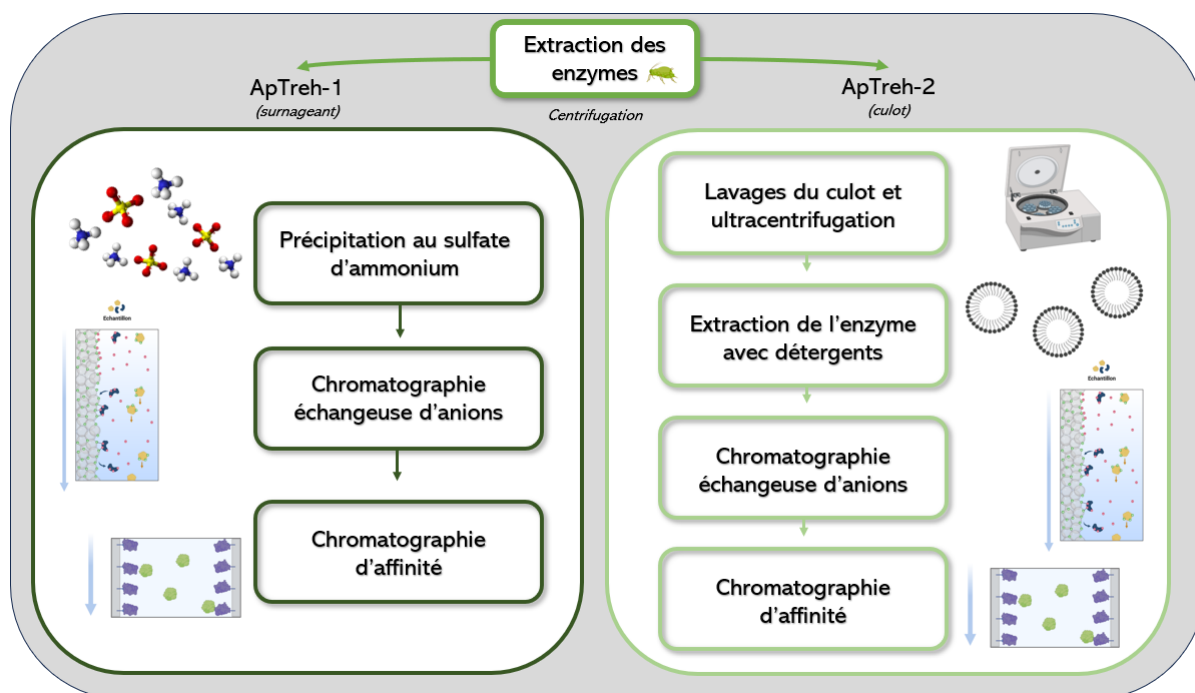


Figure 24: Schéma récapitulatif des procédés de purification optimisés pour ApTreh-1 et ApTreh-2

L'optimisation des différentes étapes s'est basée sur un test enzymatique pour suivre la présence ou non de la tréhalase dans les échantillons. Il s'agit d'un test spectrophotométrique dans le domaine du visible d'une oxydoréduction entre un sucre réducteur, le glucose, et l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) (Figure 25). Le glucose produit lors de l'hydrolyse du tréhalose sera oxydé en un acide gluconique, tandis que le DNS sera réduit en milieu basique et à haute température en acide 3-amino-5-nitrosalicylique (ANS), un composé avec une longueur d'onde d'absorption maximale ( $\lambda_{max}$ ) de 540 nm.

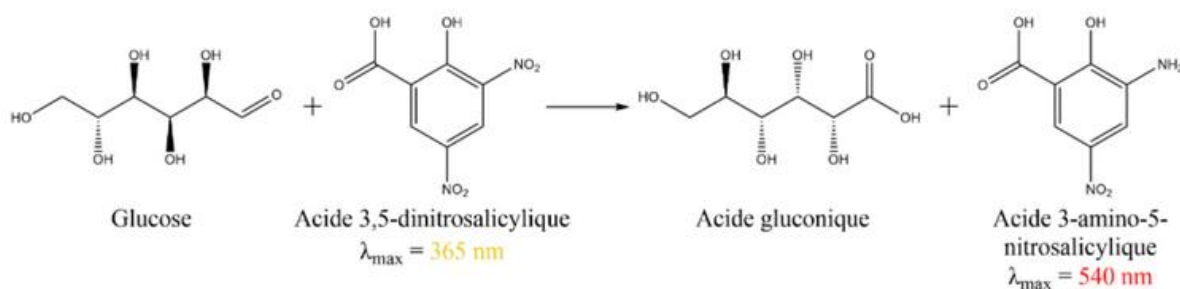


Figure 25: Réaction d'oxydo-réduction entre le glucose et l'acide 3,5-dinitrosalicylique

Il s'agit d'un test fréquemment utilisé pour suivre l'activité enzymatique de la tréhalase lors d'une purification<sup>149,165,193</sup>. Bien qu'il existe d'autres procédures pour doser des sucres réducteurs telles que le test Somogyi-Nelson<sup>194,195</sup> comme autre test spectrophotométrique ou bien l'usage de système enzymatique avec les couples glucose oxydase/peroxydase (GOX-HRP)<sup>196,197</sup> ou hexokinase/glucose-6-phosphate déshydrogénase<sup>198</sup>, le test au DNS comporte l'avantage d'être très facile à mettre en place et peu coûteux.

Une droite d'étalonnage a été mise au point selon les conditions décrites dans le point « test enzymatique » du matériel et méthode afin de pouvoir doser la quantité de glucose dans les échantillons et ainsi réaliser des analyses quantitatives et qualitatives pour détecter la présence ou non de tréhalase dans les échantillons durant les différentes étapes de purification.

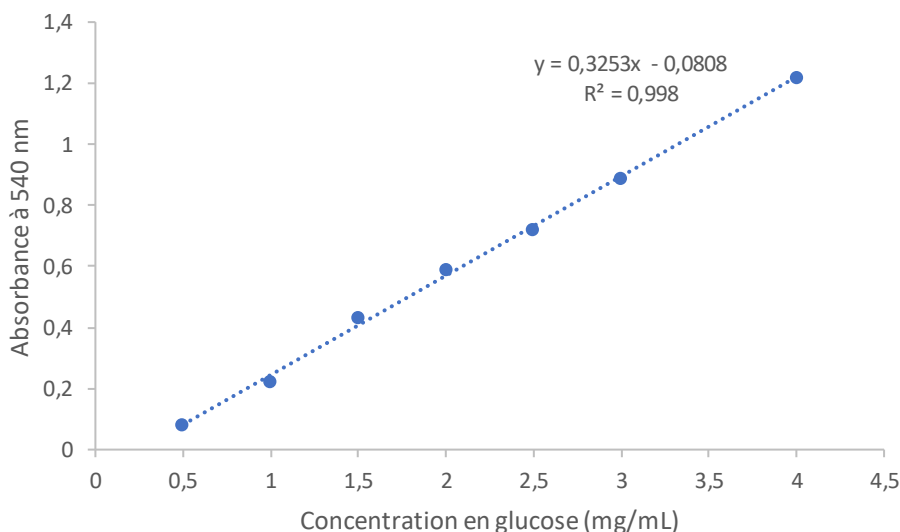


Figure 26: Droite d'étalonnage du test au DNS utilisée pour les calculs d'activité enzymatique.

## 2. Protocole de purification d'ApTreh-1

### 2.1. Broyage et extraction : étape commune

En partant d'homogénat frais de pucerons, récoltés à la faculté Agro-Bio Tech de Gembloux, la première étape des deux procédés de purification commence avec l'extraction des enzymes. Deux techniques ont été utilisées pour le broyage des pucerons : un broyage mécanique vibrationnel et un broyage mécanique manuel dans un mortier. La méthode vibrationnel a permis d'obtenir un broyat bien homogène, mais a le défaut de provoquer des pertes protéiques lors de la séparation des billes en métal (utilisées pour broyer l'homogénat) et du broyat



(Tableau 2). Le broyage manuel quant à lui permet de ne pas avoir de pertes protéiques, mais nécessite beaucoup plus de temps afin d'obtenir une homogénéité du broyat.

Tableau 2: Avantages et inconvénients pour l'utilisation d'un broyeur vibrationnel

	Broyage vibrationnel	Broyage manuel
Avantages	Rapide homogénéité	Pas de pertes
Inconvénients	Pertes	Lente homogénéité

En plus de raisons purement pratiques, le broyage manuel des pucerons est conservé comme toute première étape des procédés. Ensuite, le broyat est transféré dans un récipient contenant un tampon adéquat. Le choix du tampon d'extraction s'est retrouvé plus délicat que prévu. En effet, selon le pH du tampon utilisé, les pigments présents dans les échantillons sont plus ou moins solubles. Lorsque le pH du milieu est plus basique, une coloration brune marquée est observée. Au contraire, dans un milieu avec un pH acide, la coloration tend vers un vert-jaune.

Dans le cas des populations élevées à Gembloux, *A. pisum* présente une pigmentation verte prononcée, provenant de la présence dans l'hémolymphe de caroténoïdes ( $\alpha$ -carotène,  $\beta$ -carotène ou  $\gamma$ -carotène) ou encore d'aphines, une catégorie de pigments polycycliques à base de quinone<sup>199</sup>. A pH plus basique, ces molécules semblent moins solubles et précipitent dans l'échantillon, ce qui pose des problèmes expérimentaux avec un encrassement notable lors de l'utilisation de matrices chromatographiques, menant à des pertes de rendements à court et moyen termes.

En plus de présenter moins de désagréments techniques, le tampon acétate pH=5 présente la meilleure activité enzymatique comparé aux tampons acétate pH=6 et phosphate pH=7 et pH=8, il est donc conservé comme tampon d'extraction. Après centrifugation, le culot obtenu avec les débris d'insectes et la tréhalase membranaire (Treh-2) est travaillé différemment du surnageant contenant la tréhalase soluble (Treh-1). En effet, le protocole de purification diffère à partir de ce point-ci, avec un travail sur le surnageant pour obtenir Treh-1 et un autre sur le culot, étant donné que Treh-2 n'est pas solubilisée simplement dans un tampon acétate. Séparer les deux tréhalases permettra de les caractériser séparément et ainsi identifier l'efficacité d'un inhibiteur potentiel sur l'une ou l'autre forme, augmentant les chances d'agir sur le système énergétique de l'insecte.

Le protocole de purification d'ApTreh-1 consiste en 3 étapes successives après extraction, utilisant les propriétés de solubilité de l'enzyme (précipitation au sulfate d'ammonium), de charges (chromatographie échangeuse d'anions) et moléculaire (chromatographie d'affinité Concanavalline A). Chaque étape a été optimisée pour obtenir les conditions expérimentales permettant d'obtenir la plus grande activité enzymatique détectée qualitativement et quantitativement avec le test au DNS.

Lors de l'étape d'extraction, comme décrit dans le point 5 du chapitre 8, un dosage protéique à 280nm est réalisé ainsi qu'un test au DNS pour le dosage enzymatique afin d'obtenir l'activité spécifique de l'enzyme, purifiée à partir de 20g d'homogénat frais de pucerons.

## 2.2. Optimisation de la purification : précipitation au sulfate d'ammonium

Régulièrement utilisée dans la littérature comme première étape de purification d'une tréhalase d'insecte, la précipitation au sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  joue sur la solubilité

des protéines en présence de sels, aussi connu sous le nom de « *Salting-in* » et « *Salting-out* »<sup>200</sup>. Le sulfate d'ammonium est choisi comme sel permettant aisément ce phénomène de précipitation selon la série d'Hofmeister<sup>201,202</sup>, pour sa haute solubilité dans l'eau ce qui permet d'obtenir des solutions avec une force ionique très élevée, mais également pour son faible prix et la disponibilité commerciale de produits de haute pureté. Cette technique a également l'avantage d'éliminer une bonne partie des pigments présents dans l'échantillon. Le  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  ayant une influence importante sur le test au DNS, chaque échantillon est préalablement passé sur une colonne de dessalage et les culots sont resolubilisés dans du tampon acétate pH=5<sup>203</sup>.

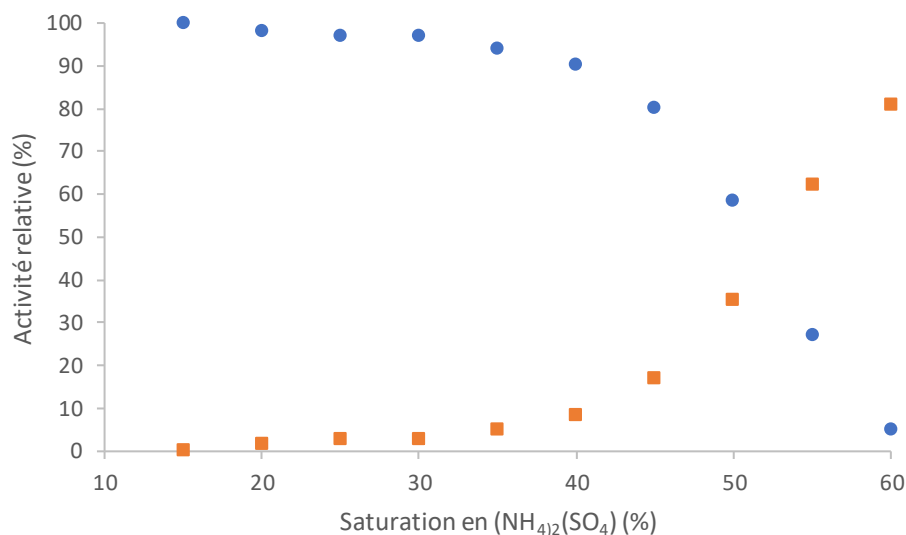


Figure 27: Activité relative d'ApTreh-1 en fonction de la saturation en sulfate d'ammonium. Les points bleus représentent l'activité relative de la tréhalase présente dans le surnageant après centrifugation, les carrés oranges pour l'activité retrouvée dans le culot après centrifugation et resolubilisation.

Au-delà de 35% de saturation du milieu en  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$ , l'activité enzymatique de la tréhalase présente commence à diminuer jusqu'à atteindre presque zéro à 60% de saturation, valeur à laquelle la tréhalase serait donc totalement précipitée. Inversement, l'activité enzymatique détectée dans les culots resolubilisés augmente au fur et à mesure de la précipitation de l'enzyme, avec une perte enzymatique inévitable dû au passage sur la colonne de dessalage (Figure 27).

Selon les résultats obtenus, deux paliers de saturation en  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  sont maintenus dans le protocole : une première saturation du milieu est effectuée à 35%, ce qui permet d'éliminer les protéines interférentes non-solubles à cette concentration, mais également les pigments n'ayant pas bien été culotés lors de l'extraction. Le deuxième palier se situe à 60% de saturation, permettant ainsi de récolter dans le culot obtenu après centrifugation toute la tréhalase ayant précipité entre 35% et 60% et d'éliminer les protéines interférentes solubles à cette concentration.

Avec cette étape, il y a une perte d'activité enzymatique de ~15%, mais un facteur de purification de 5 (Tableau 3), ce qui rend cette étape essentielle afin d'éliminer un maximum de protéines interférentes avant de passer à des techniques chromatographiques.

### 2.3. Optimisation de la purification : chromatographie échangeuse d'anions

Une fois le culot obtenu après une saturation du milieu à 60% en  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  et centrifugation, celui-ci est solubilisé et passé une nouvelle fois sur une colonne de dessalage pour éliminer les derniers sels résiduels, un maximum de pigments et permet de filtrer l'échantillon avant de passer sur une colonne de chromatographie échangeuse d'ions. Encore une fois, cette étape de purification est régulièrement utilisée pour purifier les tréhalases d'insectes, mais nécessite d'avoir des informations sur le point isoélectrique de l'enzyme afin d'utiliser la bonne chromatographie, anionique ou cationique et travailler avec le pH adéquat.

En s'intéressant aux tréhalases préalablement purifiées et dont les séquences primaires en acide aminés déterminées expérimentalement ou théoriquement sont disponibles dans des banques de données (ici, Uniprot), il est possible de calculer théoriquement leur point isoélectrique (pI) et ainsi se fixer une gamme sur laquelle travailler pour *A. pisum*, dont la séquence en acides aminés est encore inconnue. L'analyse se trouve en Annexe 1. La gamme des pI de tréhalases se situe donc entre 4.8 et 6.0, avec une moyenne de 5.5. Afin d'être sûr de pouvoir charger positivement ou négativement l'enzyme, il faut donc travailler dans une gamme de pH allant de 3.5 à 7.5. Les tréhalases de bactéries étant généralement plus actives à pH acide que les tréhalases d'insectes<sup>149</sup>, le choix de la chromatographie se tourne plutôt vers une chromatographie d'anions.

Après avoir testé de nombreux paramètres (type de tampons, flux d'élution, gradient de sel, force ionique, ...), les meilleures conditions pour purifier la tréhalase reposent sur son passage sur une colonne échangeuse d'anions faibles (diéthylaminoéthyle, DEAE) avec un tampon Tris-HCl 20 mM pH=8 également utilisé pour solubiliser le culot, dans les conditions expérimentales décrites dans le point 3.1 du chapitre 8. Malgré quelques pertes dans les *flowthroughs* (FT, ce qui ne s'accroche pas sur la colonne), ApTreh-1 se retrouve majoritairement dans le pic d'élution lors du gradient en NaCl et son activité enzymatique est répartie sur quelques millilitres (Figure 28).

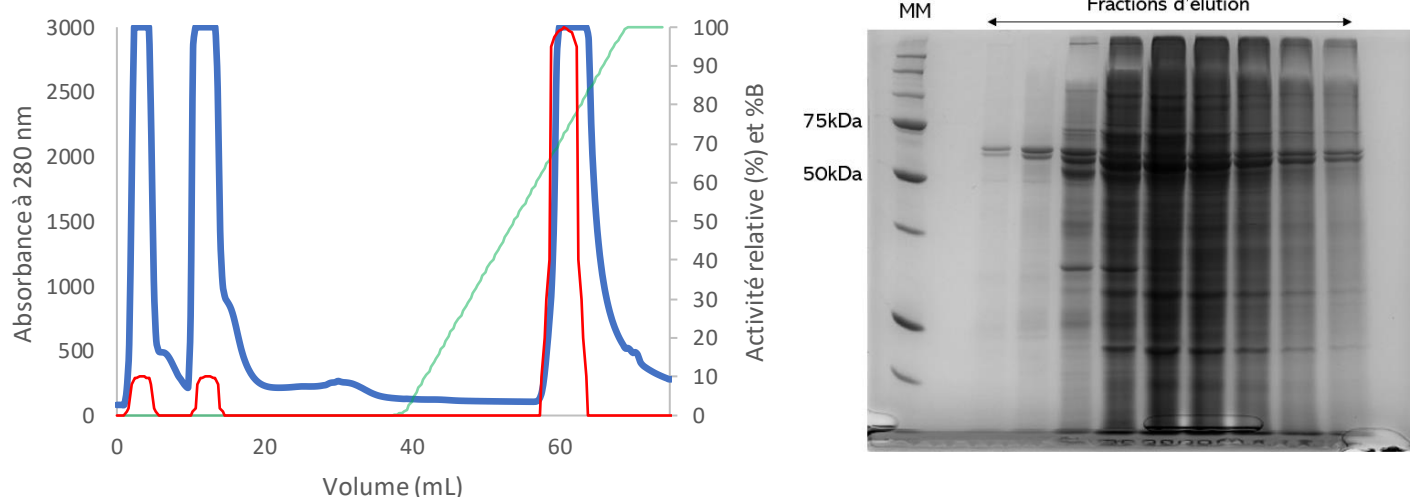


Figure 28: A gauche, chromatogramme du passage d'ApTreh-1 sur DEAE et à droite, analyse SDS-PAGE des fractions d'élutions. En bleu est représenté l'absorbance à 280nm, en rouge l'activité relative de la tréhalase dans les échantillons et en vert, le gradient de NaCl utilisé.

Lors de cette étape, le facteur de purification passe à 8 (Tableau 3), pour un rendement protéique de l'ordre de 60% comparé à l'étape d'extraction, étant donné qu'il y a une perte d'enzyme dans les FTs et également dans les fractions non retenues pour la suite de la purification.

Comme il est clairement montré en analysant les fractions d'élution contenant une activité enzymatique par SDS-PAGE, le passage de l'enzyme sur ce type de chromatographie élimine des protéines contaminantes, mais la pureté n'est pas encore suffisante pour une caractérisation biochimique ou cinétique, une nouvelle étape de purification est nécessaire.

#### 2.4. Optimisation de la purification : chromatographie d'affinité

Une fois la quantité de protéines contaminantes réduite à l'aide de premières étapes de purification, de nouveaux critères comme la taille de l'enzyme ou l'affinité envers une matrice spécifique peuvent être envisagés<sup>204</sup>. La tréhalase est connue pour être glycosylée, avec 3 à 6 sites de N-glycosylation au sein de la séquence en acides aminés. A cet effet, l'utilisation d'une matrice de type Concanavaleine A (Con A) est régulièrement utilisée pour purifier les tréhalases d'insectes. La Con A est une lectine, une protéine végétale qui se lie spécifiquement aux sucres, en particulier aux résidus de mannose et de glucose présents sur les glycoprotéines. Les N-glycosylations présentes au sein des tréhalases permettent donc une rétention sur ce type de colonne. Aucune perte n'est observée dans les FTs, ApTreh-1 se décroche correctement dans l'élution, mais contrairement aux autres chromatographies, une activité enzymatique importante est détectée dans plusieurs millilitres, malgré qu'un gradient ne soit pas appliqué lors de l'élution (Figure 29).

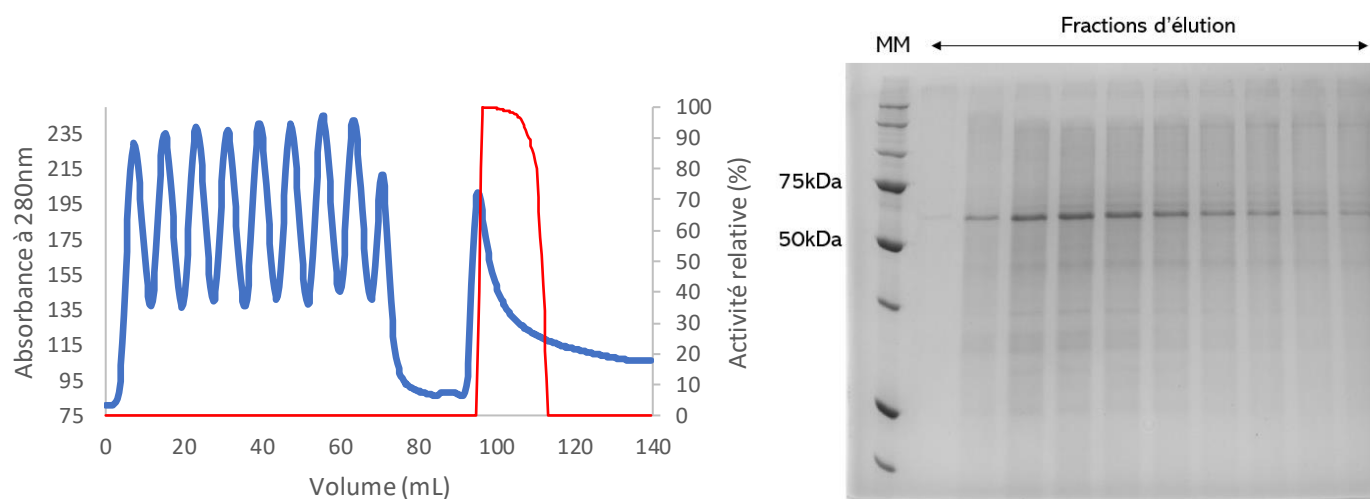


Figure 29: A gauche, chromatogramme du passage d'ApTreh-1 sur Con A et à droite, analyse SDS-PAGE des fractions d'élutions. En bleu est représenté l'absorbance à 280nm, en rouge l'activité relative de la tréhalase dans les échantillons.

Les fractions comportant une activité enzymatique sont rassemblées et concentrées, afin d'effectuer en même temps un changement de tampon pour éviter que l'enzyme reste en présence du méthyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside utilisé dans le tampon d'élution, inhibiteur de tréhalase<sup>189</sup>. Cette étape présente néanmoins des pertes protéiques supplémentaires, diminuant le rendement final de la purification à 10%, mais pour un facteur de purification de 231. Au total, sur un échantillon d'homogénat frais de 20g de pucerons, c'est 0.3 mg d'enzyme purifiée qui sont récupérées. On dispose donc de seulement 3 mg de tréhalase au départ, quantité très faible expliquant le faible rendement au cours de la purification. Une étape de purification sur colonne d'exclusion stérique à la place de la Con A a été envisagée et testée, mais avec des résultats moins intéressants que cette dernière, (voir Annexe 2), elle a donc été mise de côté.

Le Tableau 3 récapitule, pour chacune des différentes étapes de purification optimisées, l'activité spécifique, le rendement et le facteur de purification.

Tableau 3: Suivi du dosage enzymatique d'ApTreh-1 de l'entière du procédé de purification

Protocole	Activité totale (U ou $\mu\text{mol/min}$ )	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	253.4	660.2	0.4	100.0	1
$(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$	214.3	103.1	2.1	85.0	5
DEAE	151.3	52.3	2.9	60.0	8
Con A	26.4	0.3	88.6	10.0	231

### 3. Caractérisation de la tréhalase soluble

Maintenant que la tréhalase soluble est purifiée, il est possible de réaliser sa caractérisation complète, à savoir biochimique (température optimale et pH optimum d'activité, spécificité par rapport au substrat, coefficient d'extinction molaire, présence de modifications post-traductionnelles, masse moléculaire et point isoélectrique) cinétique (constantes cinétiques) et moléculaire (mise en place d'un modèle, alignement de séquence, étude phylogénétique, réseau d'interaction moléculaire).

#### 3.1. Caractérisation biochimique

La bande protéique pure détectée sur SDS-PAGE en fin de purification a été analysée par spectrométrie de masse afin d'identifier sa séquence en acides aminés. Par comparaison avec la banque de données « *Aphidoidea* », deux séquences primaires ressortent: l'isoforme X1 (référence Uniprot : A0A8R2ABU8) et l'isoforme X2 (référence Uniprot : A0A8R2A2H3) avec une couverture de séquence de 56% et 55%. Les séquences entières en acides aminés et les peptides détectés sont présentés en Annexe 3. Les isoformes sont en fait codées par le même gène (GenBank : 100161043) et sont très probablement le résultat d'un épissage alternatif sur le dernier exon codant. En effet, X1 est plus long de 17 acides aminés que X2, et X2 ne diffère de X1 que par 6 acides aminés à l'extrémité C-terminale (ce qui donne 97% d'identité de séquence). Cette présence d'isoformes n'est pas unique à *A. pisum*. En effet, d'autres cas ont été découverts pour des tréhalases solubles chez *Drosophila melanogaster*<sup>167</sup>, *Harmonia axyridis*<sup>205,206</sup>, *Tribolium castaneum*<sup>207</sup> ou encore chez des Hémiptères comme *Diaphorina citri*<sup>208</sup> et *Nilaparvata lugens*<sup>209</sup> où contrairement aux autres ordres d'insectes, deux uniques isoformes ont été découvertes. Ces études ont mis en évidence des fonctions spécifiques de ces isoformes, soit dans la biosynthèse de la chitine, soit dans la régulation vers un environnement chaud ou froid. En outre, une analyse génomique et phylogénique récente a montré que les gènes de tréhalase ont été plus fréquemment dupliqués chez les Hémiptères que chez les autres insectes<sup>178</sup>.

Sur la base de leur séquence en acides aminés respective, les isoformes X1 et X2 présentent les caractéristiques biochimiques résumées dans le Tableau 4, calculées à l'aide du programme ExPASy.

Tableau 4: Caractéristiques biochimiques des isoformes d'ApTreh-1 obtenues sur base de leur séquence en acides aminés

	Isoforme X1	Isoforme X2
Nombre d'acides aminés	606	589
Masse moléculaire (Da)	70423	68303
Point isoélectrique	6.26	6.18
Coefficient d'extinction molaire à 280nm ( $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ )	165130	156650

### 3.1.1. Présence de modifications post-traductionnelles et leur influence

Obtenir l'enzyme purifiée ainsi que sa séquence en acides aminés permet également d'étudier la présence des N-glycosylations sur celle-ci. Selon un prédicteur de sites de N-glycosylation liée à des asparagines par rapport à une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (NetNGlyc 1.0), 6 sites potentiels peuvent être identifiés pour ApTreh-1 (Tableau 5), mais seulement 4 d'entre eux sont décrits comme probables<sup>210</sup> (Figure 30).

Tableau 5: Sites potentiels de N-glycosylation chez ApTreh-1 selon NetNGlyc 1.0

Séquence	Position	Potentiel	Fréquence prédiction	Résultat N-Glyc
NESP	124	0.1220	9/9	---
NRSQ	234	0.6897	9/9	++
NGSD	346	0.6479	9/9	++
NKSR	424	0.5168	5/9	+
NGTP	473	0.1721	9/9	---
NSSQ	481	0.5998	7/9	+

NetNGlyc 1.0 : prédiction de sites de N-glycosylation dans une séquence

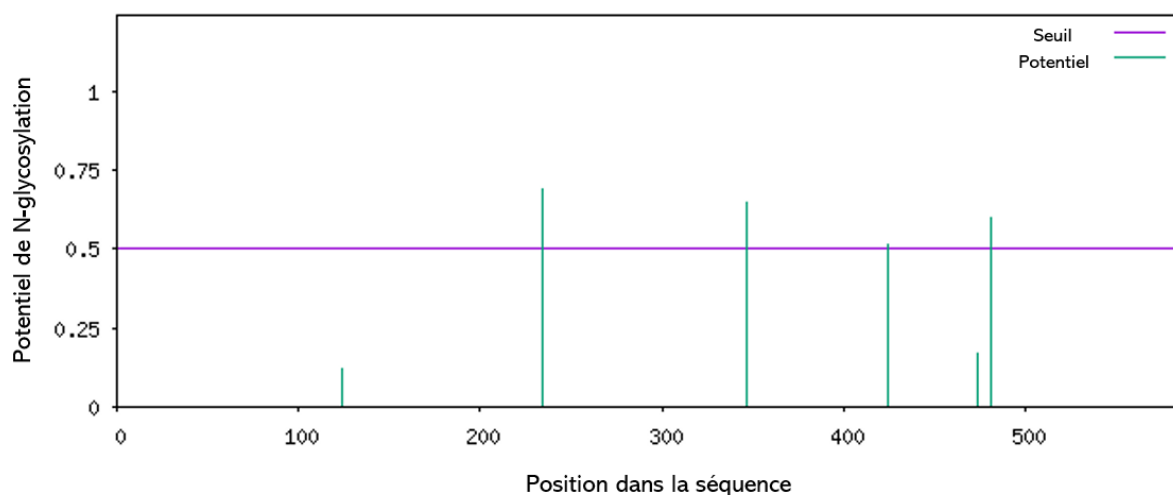


Figure 30: Prédiction de sites de N-glycosylation dans la séquence d'ApTreh-1 par NetNGlyc 1.0

En effet, deux sites de N-glycosylation sont immédiatement omis, dû à la présence de proline à proximité, acide aminé connu pour provoquer un encombrement stérique si présent dans la vicinity du triplet N-X-S/T<sup>211</sup>. En plus de la preuve expérimentale de la présence de ces sites de N-glycosylation par rétention de l'enzyme lors de son passage sur une colonne avec une matrice de Concanavaline A, deux manipulations complémentaires sont réalisées afin



d'étudier un peu plus l'importance de ces modifications post-traductionnelles : le clivage de ces N-glycosylations et une coloration spécifique aux glycosylations, PAS (*Periodic Acid Schiff*).

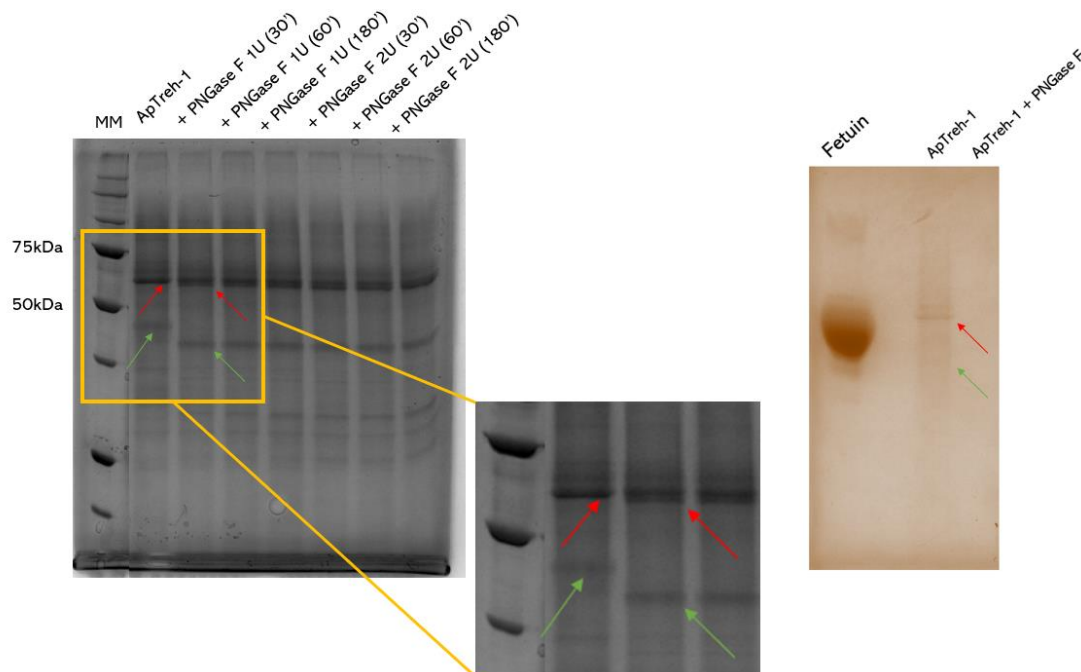


Figure 31: Analyse SDS-PAGE du clivage des N-glycosylation d'ApTreh-1 en présence de PNGase F. À droite, coloration d'un gel par la méthode PAS en présence d'un contrôle positif, la fétuin. Les flèches rouges désignent ApTreh-1, tandis que les flèches vertes désignent une protéine inconnue également N-glycosylée.

Après une optimisation des conditions de temps d'incubation et de concentration de la PNGase F, une amidase clivant toutes les liaisons N-oligosaccharidiques, un léger déplacement de la bande protéique correspondante à ApTreh-1 est observable sur SDS-PAGE, peu importe les conditions utilisées, correspondant éventuellement au clivage des 4 N-glycosylations présentes au sein de l'enzyme. L'effet de déglycosylation est d'autant plus marqué sur les autres protéines interférentes présentes dans l'échantillon. Ce même échantillon, une fois clivé, n'est plus observable sur un gel coloré avec la méthode PAS (Figure 31).

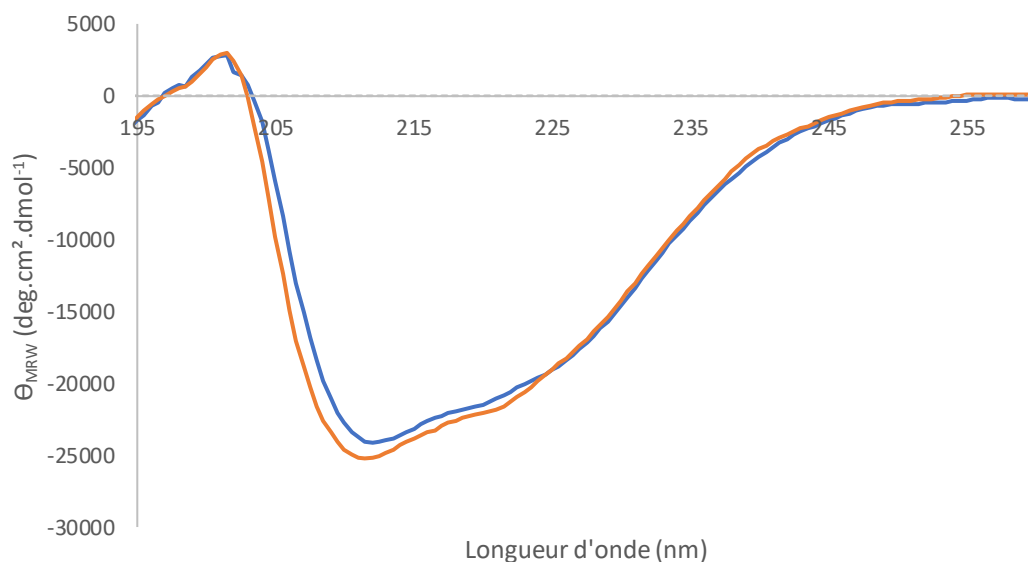


Figure 32: Dichroïsme circulaire d'ApTreh-1 avec N-glycosylation (bleu) et après clivage par PNGase F (orange)

Tableau 6: Pourcentages des structures secondaires d'ApTreh-1 avec et sans N-glycosylation

	<i>Hélices <math>\alpha</math></i>	<i>Feuillets <math>\beta</math></i>	<i>Coudes</i>	<i>Autres</i>
<i>Sans PNGase F</i>	32.8	19.0	16.7	31.5
<i>Avec PNGase F</i>	32.2	19.1	16.9	31.8

Malgré ce clivage, aucun changement structurel n'est observable par dichroïsme circulaire (Figure 32). Etant donné que les tréhalases sont connues pour leur structure tertiaire  $\alpha$ -toroïdale, il n'est pas étonnant de retrouver une majorité d'hélices  $\alpha$  par dichroïsme circulaire, inchangée suite à la déglycosylation de l'enzyme (Tableau 6). C'est également le cas pour l'activité enzymatique, le clivage des N-glycosylations n'impacte pas la réaction enzymatique. Il s'agit des premières données expérimentales mettant en évidence l'impact d'une déglycosylation de l'enzyme sur sa structure ou son activité.

### 3.1.2. Spécificité de l'enzyme sur son substrat

La spécificité enzymatique de la tréhalase de *A. pisum* envers son substrat, le tréhalose, a été étudiée. A cette fin, d'autres holosides et sucres plus complexes ont été testés par le test au DNS (Tableau 7).

Tableau 7: Etude de la réactivité de différents sucres en présence de la tréhalase. \* signifie que la réactivité est due à la présence d'un groupe réducteur sur les sucres, mais pas dû à l'action de la tréhalase.

<i>Sucres</i>	<i>Liaison osidique</i>	<i>Réactivité</i>
<i>Trehalose</i>	Glucose $\alpha(1-1)\alpha$ Glucose	Oui
<i>Lactose</i>	Galactose $\beta(1-4)$ Glucose	Oui*
<i>Saccharose</i>	Glucose $\alpha(1-2)$ Fructose	Non
<i>Cellobiose</i>	Glucose $\beta(1-4)$ Glucose	Oui*
<i>Maltose</i>	Glucose $\alpha(1-4)$ Glucose	Oui*
<i>Raffinose</i>	Galactose $\alpha(1-2)$ Glucose $\alpha(1-6)$ Fructose	Non
<i>Amidon</i>	[Glucose $\alpha(1-4)$ Glucose] <sub>n</sub>	Non

Le lactose, le cellobiose et le maltose sont des diholosides réducteurs, ils réagissent donc directement par oxydo-réduction avec le DNS afin de produire de l'ANS. Cependant, en réalisant des blancs adéquats, aucune production supplémentaire de glucose n'est détectée, indiquant bien que ces sucres ne sont pas hydrolysés par la tréhalase, tout comme les autres diholosides non-réducteurs présentés, le raffinose, un triholoside, ou encore l'amidon, un polyside. Ces résultats sont cohérents avec la littérature, où de nombreux autres sucres similaires au substrat ont été étudiés sans présenter d'hydrolyse, indiquant que la tréhalase ne serait pas une  $\alpha$ -glucosidase générale, mais bien très spécifique à la liaison osidique  $\alpha(1-1)\alpha$  du tréhalose<sup>212</sup>, bien qu'il existe quelques exceptions<sup>213</sup>.



### 3.1.3. Température optimale et pH optimum d'activité

Une enzyme est généralement caractérisée par sa température optimale et son pH optimum d'activité. Pour rappel, les tréhalases ont généralement une température d'activité maximale située entre 45°C et 60°C et un pH optimum entre 4 et 7. Dans le cas d'ApTreh-1, on retrouve une activité enzymatique maximale lorsque celle-ci est placée dans un milieu acide (pH=5) et à une température de 60°C (Figure 33). Dans des milieux fortement alcalins (pH>9) ou bien fortement acide (pH<2), l'enzyme perd son activité. ApTreh-1 ne semble pas présenter de perte d'activité en étant exposée à sa température optimale sur une longue période, indiquant une certaine thermostabilité (Annexe 4)

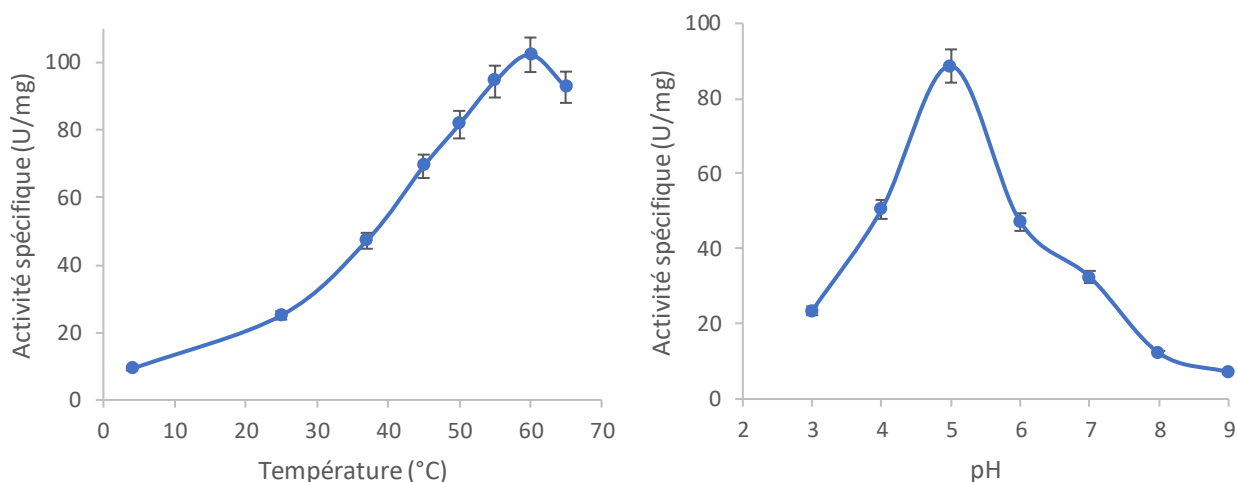


Figure 33: Activité spécifique d'ApTreh-1 en fonction de la température (gauche) et du pH (droite)

### 3.2. Caractérisation cinétique

D'autres éléments qui sont essentiels à la caractérisation d'une enzyme, ce sont ses paramètres cinétiques, permettant d'obtenir des informations essentielles à la mise en place de tests d'inhibition. On détermine généralement la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) et d'autres paramètres liés à ceux-ci comme  $K_{cat}$  et  $K_{cat}/K_m$ .

Bien que la littérature utilise régulièrement la représentation de Lineweaver-Burk pour la détermination des paramètres cinétiques<sup>214,215</sup>, ceux-ci ont été obtenus, pour ApTreh-1, selon Hanes-Wolf, représentation qui dans ce cas-ci donne les meilleurs coefficients de régression comparé aux autres modèles (Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Cornish-Eisenthal, voir Annexe 5). La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) et la vitesse initiale maximale ( $V_{max}$ ) ont été calculées à différentes températures (Tableau 8) : 60°C, la température optimale d'activité, 45°C, 37°C et 25°C (Figure 34).

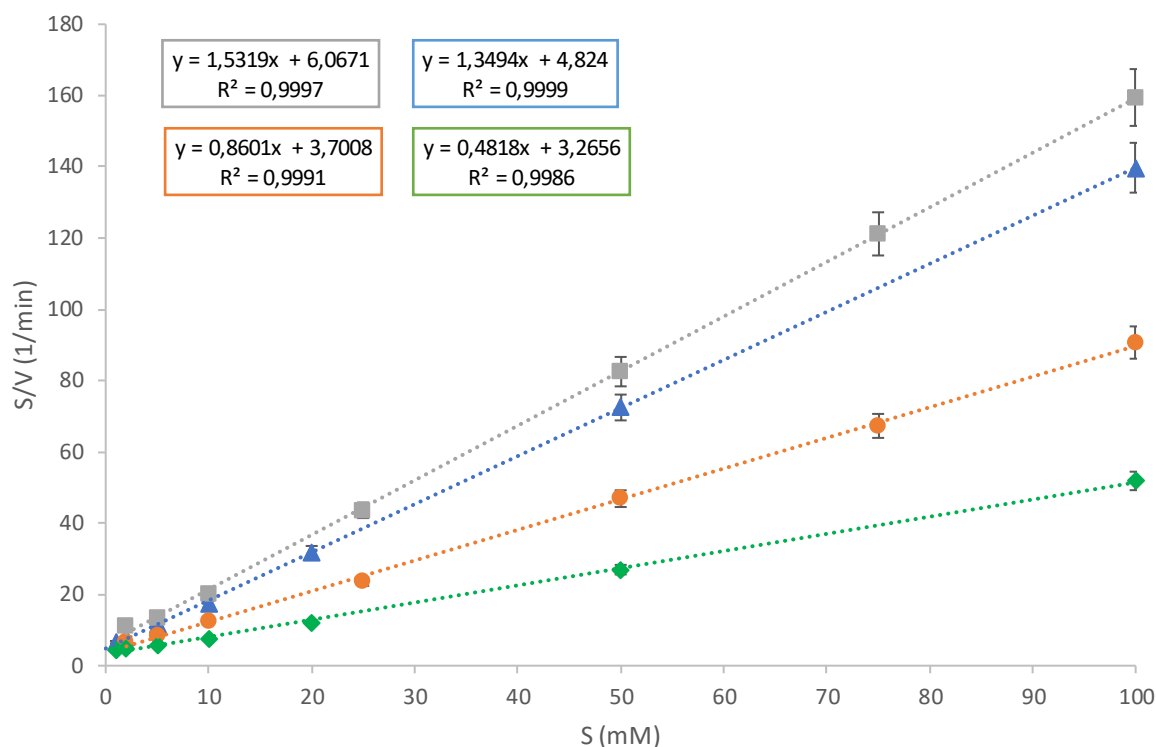


Figure 34: Représentation d'Hanes à 25°C (losanges verts), 37°C (ronds oranges), 45°C (triangles bleus), 60°C (carrés gris)

Tableau 8: Constantes cinétiques d'ApTreh-1 déterminées par la représentation d'Hanes à différentes températures

	25°C	37°C	45°C	60°C
$K_m$ (mM)	$3.96 \pm 1.58$	$3.57 \pm 0.78$	$4.30 \pm 1.05$	$6.78 \pm 1.30$
$V_{max}$ (mM.min-1)	$0.65 \pm 0.11$	$0.74 \pm 0.14$	$1.16 \pm 0.20$	$2.07 \pm 0.25$
$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	6.50	7.40	11.60	20.70
$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	1.64	2.07	2.70	3.05

Les constantes cinétiques d'une enzyme sont généralement établies à pH optimum et à la température optimale d'activité. Dans ce cas-ci, il a été décidé de travailler à une température de 37°C au lieu de 60°C. En traçant un diagramme d'Arrhénius (Figure 35), on peut observer que l'activité de l'enzyme à la température optimale ne respecte plus la tendance initiale, indiquant une dénaturation de l'enzyme. Une ligne droite devrait être obtenue dans la plage de température inférieure indiquant la zone de stabilité de l'enzyme, tandis que le début de la dénaturation dans la plage de température supérieure entraîne une déviation de la ligne droite. En se plaçant à 37°C, l'activité enzymatique est suffisante pour des mesures spectrophotométriques et ne comporte aucun risque de dénaturation. 25°C, une autre valeur classique de travail pour la température semble s'écarter de cette relation linéaire et donc n'est pas prise en compte pour la tréhalase.

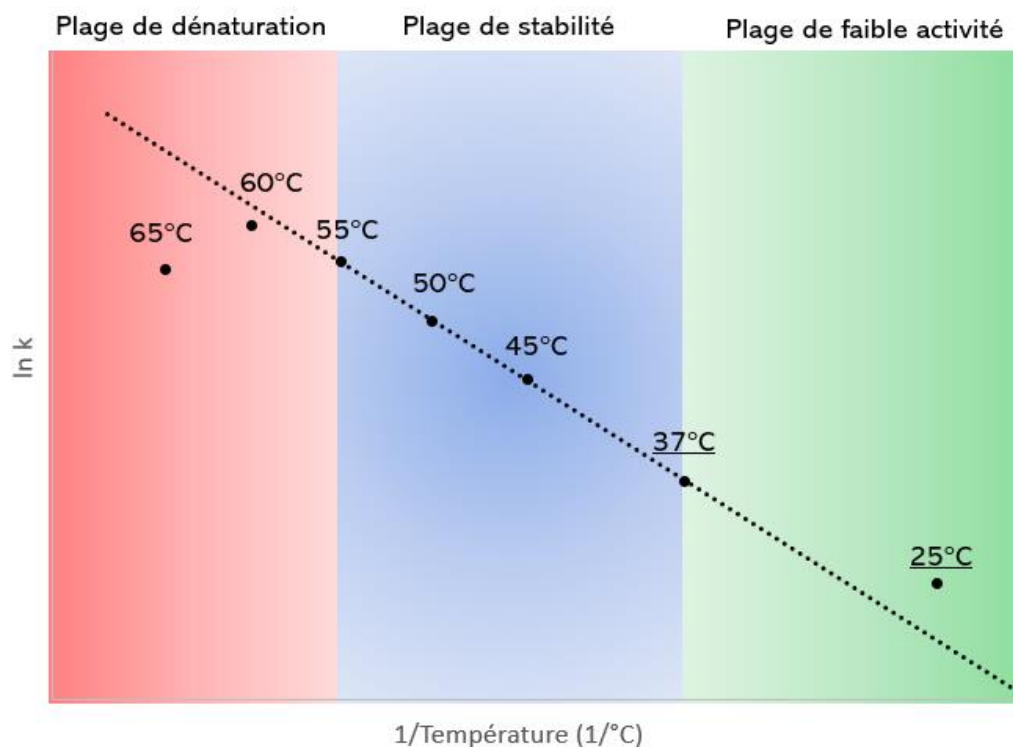


Figure 35: Diagramme d'Arrhénius appliqué aux données d'ApTreh-1

Les valeurs de  $K_m$  de  $3.57 \pm 0.78$  mM et de  $V_{\max}$  obtenues à 37°C sont en corrélation avec les  $K_m$  de tréhalases renseignées dans la littérature, supérieures à quelques insectes comme *Bombyx mori* (0.46 mM)<sup>162</sup> ou encore *Apis mellifera* (0.52 mM)<sup>216</sup>, dans la même gamme que *Aphis citricola* de la même famille (6.4 mM pour la forme ailée, 7.2 mM pour la forme non-aillée)<sup>169</sup> mais très éloignées de *Helicoverpa armigera* qui se démarque un peu avec un  $K_m$  de 72.8 mM<sup>168</sup>.

### 3.3. Caractérisation moléculaire

Maintenant que l'enzyme est connue au niveau biochimique et cinétique, il est possible d'étudier celle-ci au niveau moléculaire. Avec la séquence en acides aminés obtenue par spectrométrie de masse, un alignement de séquences a été réalisé sur des tréhalases connues d'autres insectes (*Aphis glycines*, *Bombyx mori*, *Apis mellifera*, *Tenebrio molitor* et *Drosophila melanogaster*) et montre qu'ApTreh-1 partage une similarité de séquence significative (40-81% d'identité) avec les autres Trehes (Tableau 9). Comme *Aphis glycines* et *A. pisum* appartiennent au même ordre et à la même famille, leur trehalase partagent un pourcentage d'identité de séquence plus élevé que les autres espèces.

Tableau 9: Pourcentage d'identité entre la séquence d'ApTreh-1 et d'autres tréhalases d'insectes de différents ordres

Espèce	Ordre	Identité (%)
<i>Aphis glycines</i>	Hémiptère	81.3
<i>Tenebrio molitor</i>	Coléoptère	43.6
<i>Bombyx mori</i>	Lépidoptère	39.5
<i>Apis mellifera</i>	Hyménoptère	40.8
<i>Drosophila melanogaster</i>	Diptère	39.8

ApTreh-1 contient les deux motifs de signature typiques des tréhalases (<sup>179</sup>PGGRFRELYYWDY<sup>192</sup> et <sup>479</sup>QWDFPNAWPP<sup>489</sup>), une région riche en glycine (<sup>549</sup>GGGGEY<sup>554</sup>) hautement conservée parmi les espèces, ainsi que les résidus catalytiques Asp336 et Glu538 qui sont typiques de la famille des hydrolases GH37<sup>185</sup> (Figure 36).

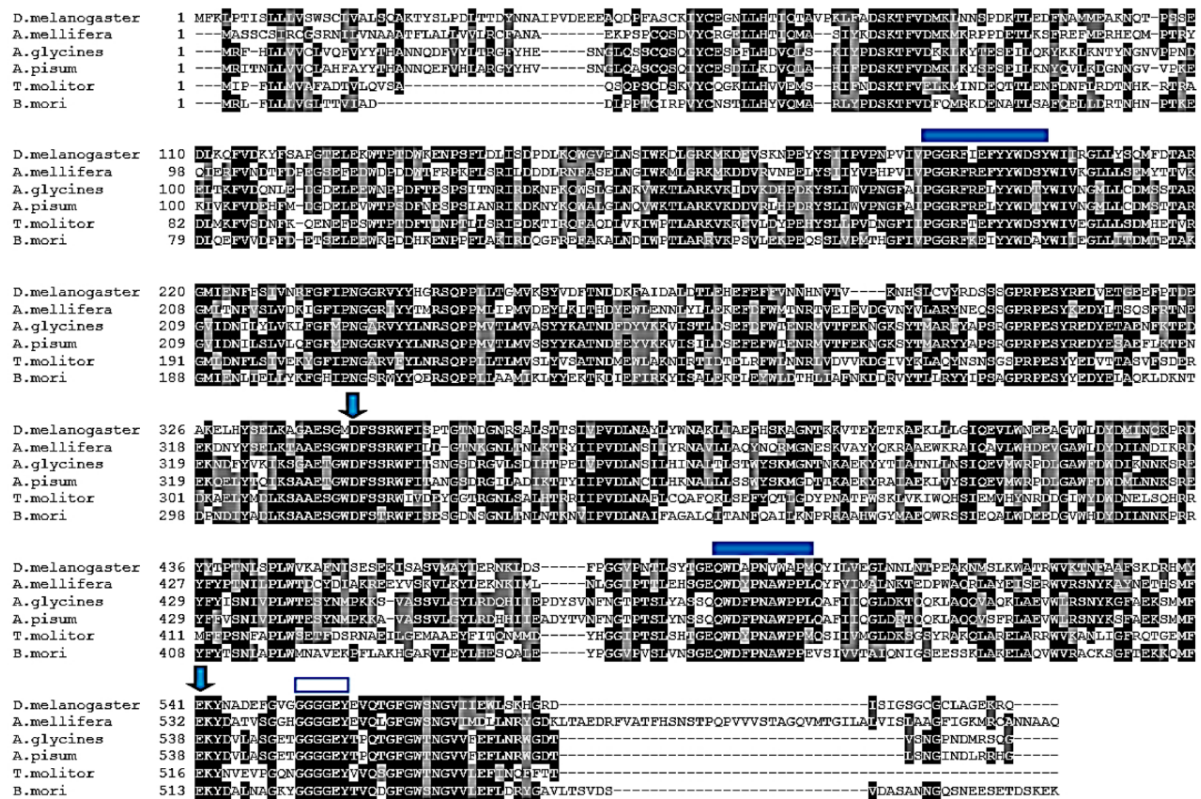


Figure 36: Alignement de séquence pour les tréhalases d'ApTreh-1, *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Aphis glycines*, *Tenebrio molitor* et *Bombyx mori*. Les motifs signatures des tréhalases sont représentés par les barres bleues pleines, les résidus catalytiques par les flèches bleues et la région riche en glycine par la barre creuse.

Un arbre phylogénétique a également été réalisé afin de mieux comprendre l'évolution des tréhalases chez différentes espèces et ainsi tenter d'expliquer leurs similitudes et différences<sup>217</sup>. L'arbre obtenu présente sans surprise deux branches séparant les deux types de Treh (Treh-1 et Treh-2) (Figure 37). Comme attendu, ApTreh-1 est très proche de ceux d'autres pucerons. Il est intéressant de noter qu'elle est regroupée avec celles d'autres hémiptères ravageurs bien connus, tels que l'aleurode de la patate douce (*Bemisia tabaci*), la petite cicadelle brune (*Laodelphax striatellus*), et la cicadelle brune (*Nilaparvata lugens*).

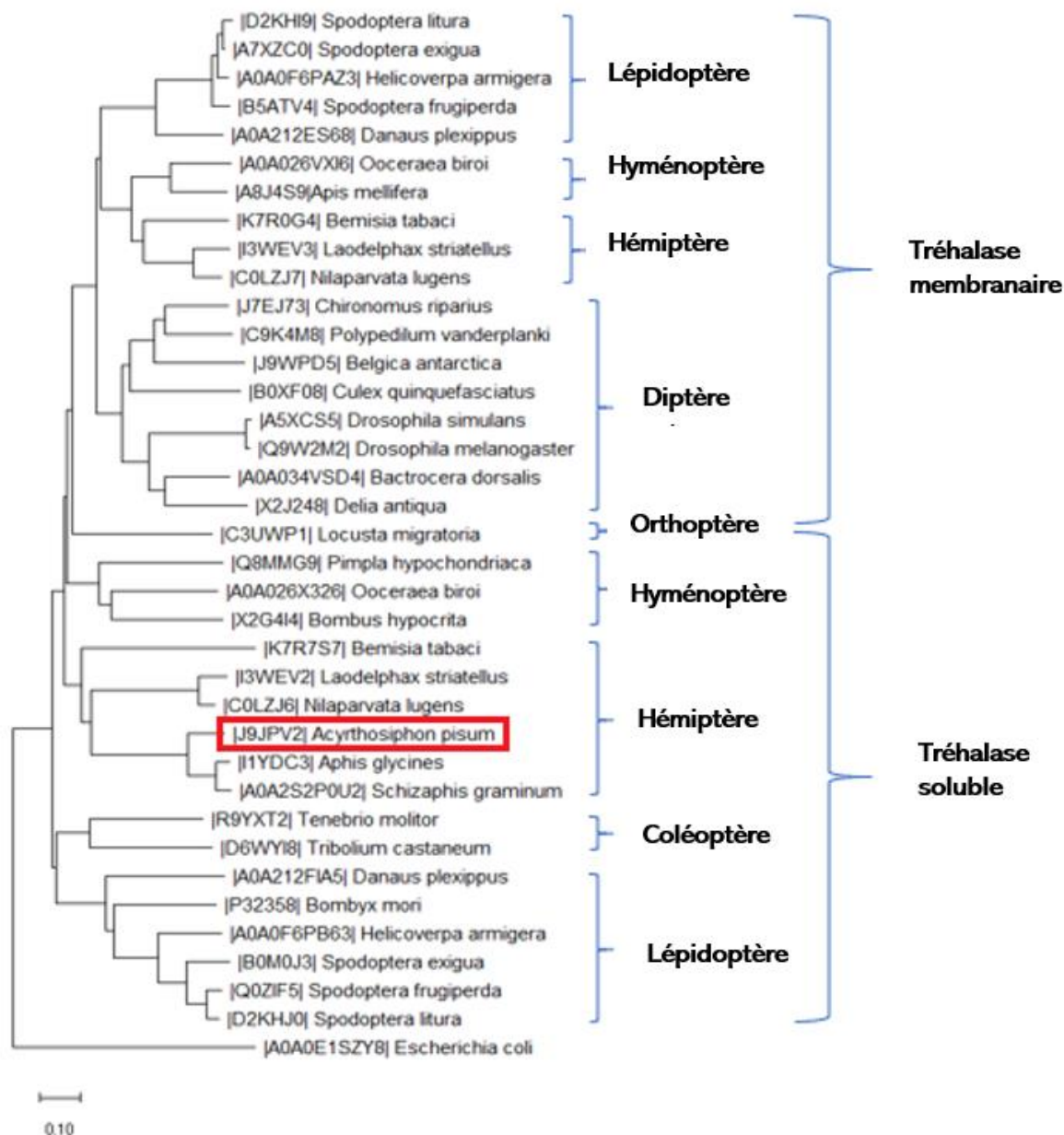


Figure 37: Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'acides aminés de tréhalases de diverses espèces

Enfin, la séquence en acides aminés permet d'obtenir un modèle de la structure tridimensionnelle de l'enzyme. Comme la banque de données PDB ne contient pas de structure tridimensionnelle de tréhalase animale, il a été décidé d'utiliser l'homologie pour construire un modèle structural pour ApTreh-1. La structure cristalline de la tréhalase périplasmique de la bactérie intestinale de *Plutella xylostella* complexée avec la validoxylamine (PDB ID : 5Z66, 1.8 Å) a été choisie comme modèle. ApTreh-1 présente une identité de séquence de 33% (= acides aminés identiques à une même position) et une couverture de séquence de 84 % (= acides aminés avec les mêmes propriétés physicochimiques) avec la référence. La validité du modèle est confirmée par un diagramme de Ramachandran montrant que 92% des résidus se trouvent dans les régions autorisées (Figure 38). Les 8% derniers acides aminés sont considérés comme défavorables, avec conformations et/ou des angles  $\psi$  et  $\phi$  statistiquement non valables.



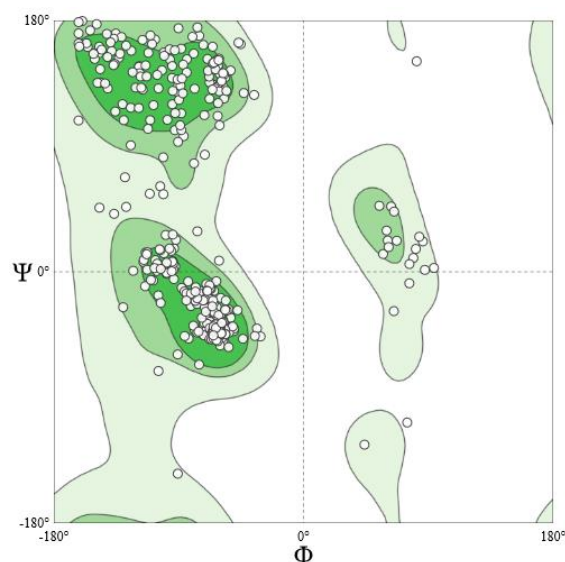


Figure 38: Diagramme de Ramachandran pour la validation géométrique du modèle d'ApTreh-1

La structure  $\alpha$ -toroïdale  $(\alpha/\alpha)_6$  de la tréhalase étant exclusivement composée de 12 hélices  $\alpha$  (Figure 39), la plupart des résidus se trouvent dans la région des hélices  $\alpha$  de Ramachandran. En outre, le modèle est en accord (39.2% d'hélices  $\alpha$  et 10.4% de brins  $\beta$ ) avec les données obtenues par dichroïsme circulaire.

Afin de vérifier par une autre méthode si le modèle d'ApTreh-1 obtenu est valable, la modélisation computationnelle de l'enzyme à l'aide du système d'intelligence artificiel AlphaFold<sup>218</sup> a été appliquée et comparée au modèle obtenu par homologie. En superposant les deux modèles obtenus (Figure 40), on obtient un RMSD de 0.985, indiquant que les deux modèles sont pratiquement identiques. On peut observer des différences au niveau d'une hélice  $\alpha$  en N-terminal pour le modèle AlphaFold, correspondant au peptide signal chez ApTreh-1 et non modélisée dans le modèle par homologie. Des différences sont également pointées au niveau de l'extrémité C-terminale. Les deux modèles obtenus sont de hautes qualités et peuvent être utilisés avec confiance. Dans le cadre de ce projet, le modèle obtenu par homologie sera sélectionné étant donné qu'il se base sur une structure homologue déterminée expérimentalement, tandis que AlphaFold se base uniquement sur la séquence en acides aminés. De plus, les modèles par homologie sont généralement plus performants pour modéliser les chaînes latérales et AlphaFold est moins efficace pour les protéines contenant des ligands, co-facteurs ou des boucles mobiles comme dans ApTreh-1<sup>219</sup>.

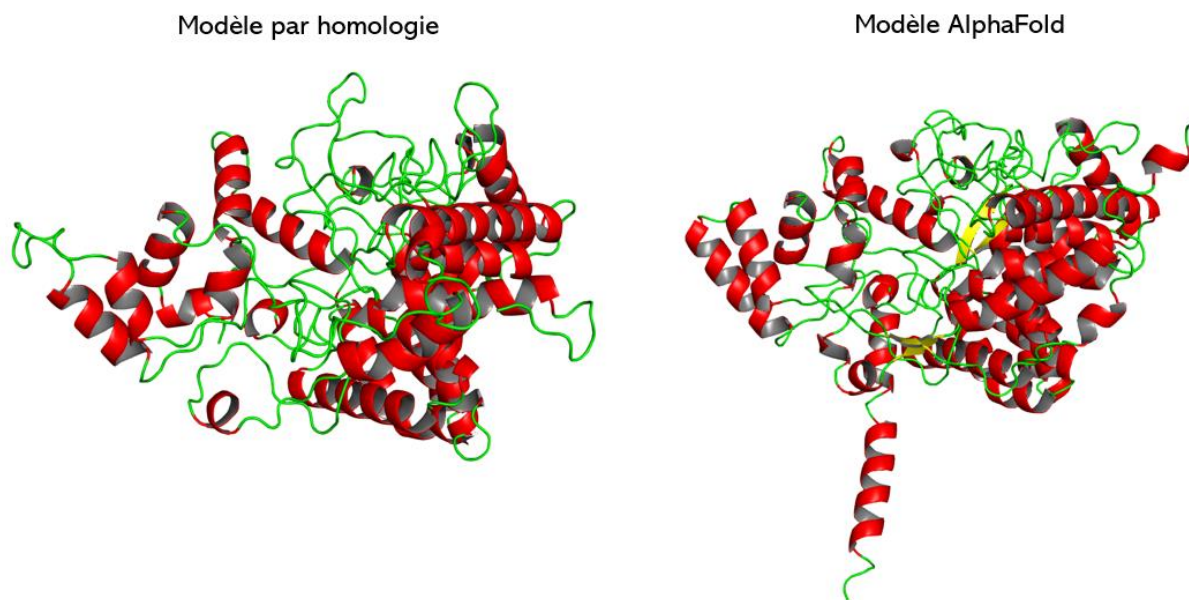


Figure 39: Comparaison entre le modèle ApTreh-1 obtenu par homologie et avec AlphaFold

Le modèle d'ApTreh-1 présente un RMSD de 0.2 Å par rapport à la référence 5Z66 et partage globalement la même structure que la tréhalase de *Plutella xylostella*. 24 acides aminés sont identifiés à moins de 5 Å du ligand (validoxylamine), dont 9 sont des aromatiques (F183, Y187, W189, Y232, W335, W486, W492, Y554, W562). Cette partie du site actif est conservée entre les tréhalases de *A. pisum* et des bactéries intestinales de *Plutella xylostella*. En analysant la structure modèle, nous avons identifié Asp336 et Glu538 comme les résidus catalytiques acides et basiques, ainsi que trois résidus arginine essentiels : Arg182, Arg235 et Arg300<sup>220</sup>.

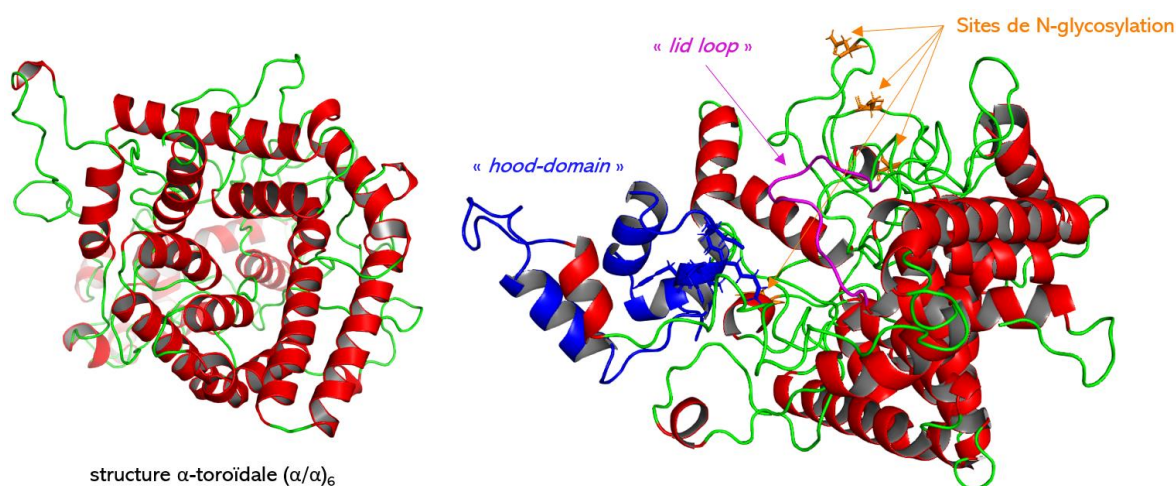


Figure 40: Structure  $\alpha$ -toroïdale des tréhalases (droite) et modèle d'ApTreh-1 avec les composants essentiels : hood-domain en bleu, lid loop en rose et les sites de N-glycosylation théoriques.

Dans la plupart des tréhalases d'insectes, la région riche en glycine fait partie d'une "lid loop" (ou « couvercle ») mobile identifiée comme jouant un rôle important dans la reconnaissance du substrat et de l'inhibiteur<sup>221</sup>. Dans ApTreh-1, cela correspond à la séquence <sup>548</sup>TGGGGEYTPQTGF<sup>561</sup>, représentée en magenta sur la Figure 40. Des boucles flexibles similaires riches en glycine sont également observées dans d'autres glycosidases telles que les amylases<sup>181</sup>.

Cette boucle est en contact étroit avec des résidus cruciaux du site actif, et les interactions suivantes permettent la fermeture de la boucle du couvercle vers le site actif (Figure 41) : i) l'interaction électrostatique entre Glu553 et Arg300, ii) l'interaction CH... $\pi$  entre Tyr554 et Phe183, iii) l'interaction cation- $\pi$  entre Tyr554 et Arg182, et iv) la liaison H entre Tyr554 et les résidus catalytiques Asp336/538 (en fonction de la position de l'hydrogène du groupe OH- de Tyr554). Une autre région, appelée "*hood-like domain*" présente chez *Plutella xylostella*, est également présente dans ApTreh-1 de <sup>44</sup>Q à K<sup>100</sup>, représentée en bleu sur la figure 40 et 41. On suppose qu'il ferme la poche catalytique après la liaison du ligand. La région <sup>65</sup>DSKTFV<sup>70</sup> modérément conservée interagit étroitement avec le site actif car Asp65 et Lys67 interagissent électrostatiquement avec Arg182 et Glu185. De plus, une liaison H est observée entre Ser66 et Glu306 (Figure 41).

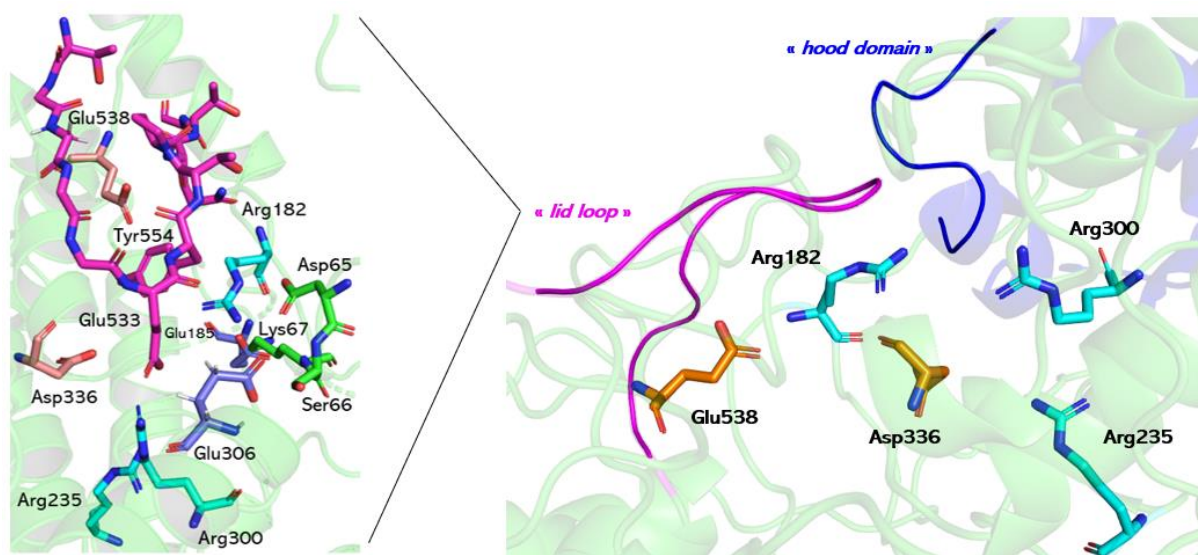


Figure 41: Résidus essentiels à l'activité au sein du site catalytique et domaines liés et zoom sur les interactions présentes au niveau de la lid loop

Maintenant, il serait intéressant d'étudier les interactions avec un ligand dans ce site actif. A cet effet, une étude de docking est réalisée, le substrat est modélisé au sein de la poche catalytique du modèle ApTreh-1. Une étude de docking est une prédiction de l'orientation la plus favorable d'un ligand au sein du site actif de l'enzyme. Afin d'avoir une base de comparaison, le modèle ApTreh-1 est superposé à une structure cristallographique présente dans la PDB (7EAW, *A. thaliana*) en complexe avec le tréhalose (Figure 42).



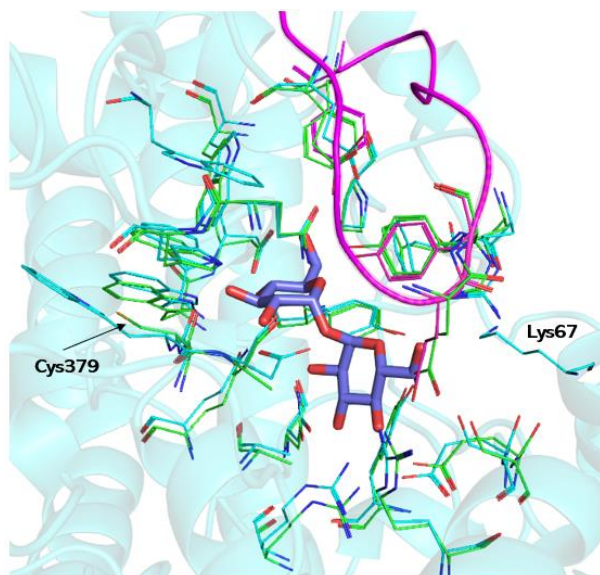


Figure 42: Superposition des acides aminés dans un rayon de 5 Å autour du substrat pour le modèle ApTreh-1 (en vert) et le modèle cristallographique de *A. thaliana* (cyan). La lid loop est représentée en mauve.

Les deux sites actifs sont identiques, à l'exception de la présence d'une Lys67 (faisant partie du *hood-domain*) pour le modèle d'ApTreh-1 et de la présence d'une Cys379 à la place d'un Trp379 chez *A. pisum*. Si on s'intéresse un peu plus en détail aux interactions du substrat au sein du site actif dans notre enzyme, on peut mettre en évidence de nombreuses liaisons H entre le ligand et l'enzyme (Figure 43). Le premier cycle présente une liaison H de l'hydroxyle en C6 avec Glu553, acide aminé présent dans la *lid loop* mobile, supposée se refermer sur le site actif lors de la liaison d'un ligand. Sur le même cycle, le groupement hydroxyle en C4 est lié à l'Arg300, tandis que le groupement situé en C3 est lié à l'Arg235 et Asn226. Sur le second cycle, l'hydroxyle en C2 possède une liaison H avec l'Asp336, l'un des résidus catalytiques. Le reste des hydroxyles du cycle sont en vicinité de nombreux acides aminés aromatiques (Tyr187, Trp189, Trp335, Trp486, Phe560).

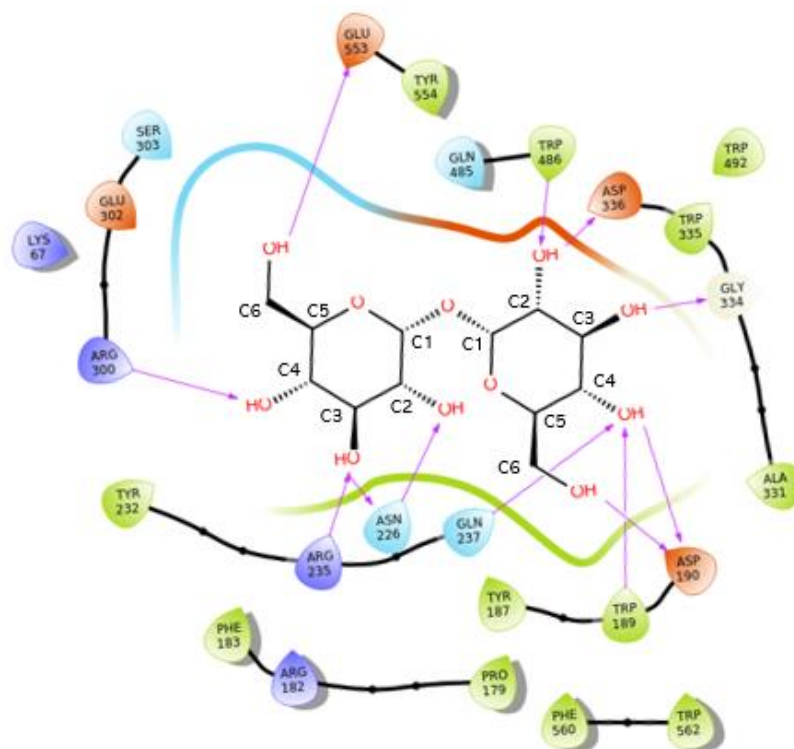


Figure 43: Description des interactions du substrat (tréhalose) au sein du site actif d'ApTreh-1

#### 3.4. Analyse moléculaire d'ApTreh-1 par la théorie RIN

Sur base d'un fichier .pdb contenant les coordonnées atomiques de chaque acide aminé, il est possible de créer ce qu'on appelle un RIN (*Residue Interaction Network*), qui permet l'identification de résidus importants dans les protéines qui peuvent être situés au cœur ou à la surface des protéines, seuls ou en complexe<sup>222,223</sup>, ainsi que la flexibilité de la chaîne afin de mettre en évidence de potentiels sites de mutagenèse. Dans ce cadre, les structures protéiques sont représentées comme des réseaux d'interaction de résidus, supposés transmettre des informations entre les acides aminés. Sur base de ce RIN, en supprimant des nœuds (= résidus) du réseau protéique, on peut identifier les résidus dits « centraux », c'est-à-dire ceux cruciaux pour maintenir les chemins les plus courts et qui jouent ainsi un rôle clé dans les interactions à longue portée au sein du réseau, on parle alors d'une analyse RCA (*Residue Centrality Analysis*)

Ce genre d'analyse a été réalisée sur sept familles de protéines et des études expérimentales confirment que bon nombre de ces résidus déterminés comme « centraux » sont bel et bien essentiels pour la communication allostérique (= propagation de l'information d'un site fonctionnel à un autre)<sup>224</sup>. L'accord entre les résidus centraux, qui sont essentiels à la préservation des courtes longueurs de trajet, et les résidus suggérés expérimentalement comme médiateurs de la signalisation, illustre en outre que la topologie joue un rôle important dans la communication en réseau<sup>222</sup>.

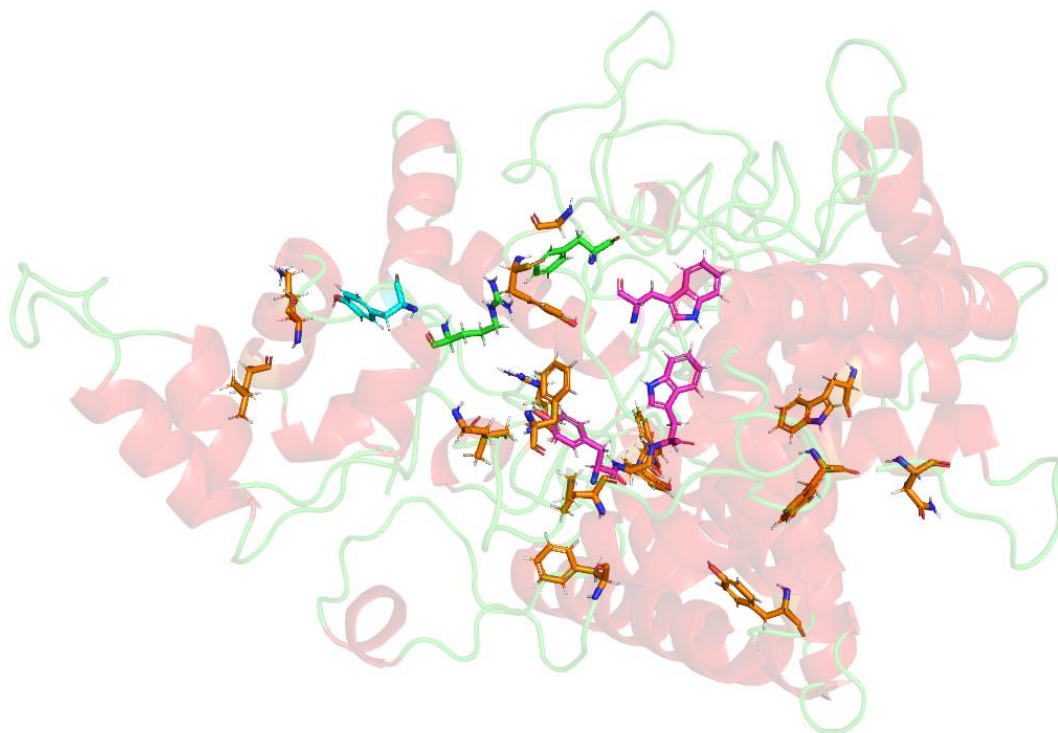


Figure 44: Classification des acides aminés au sein d'ApTreh-1 suivant leur Z-score. Z-score >8 (vert), entre 8 et 6 (bleu), entre 6 et 4 (magenta) et entre 4 et 2 (orange)

Tableau 10: Z-score pour chacun des acides aminés d'ApTreh-1 après l'analyse RCA du RIN

	Z-score > 8	8 > Z-score > 6	6 > Z-score > 4	4 > Z-score > 2
Acides aminés	Arg300 (8.203)	Tyr304 (5.845)	Trp335 (4.590)	Lys55 (3.979)
	Phe337 (8.076)		Trp189 (4.185)	Phe183 (3.663)
			Tyr187 (4.001)	Tyr188 (3.158)
				Trp272 (2.947)
				Asn572 (2.769)
				Leu53 (2.532)
				Arg235 (2.528)
				Phe176 (2.500)
				Ile178 (2.428)
				Leu115 (2.390)
				Trp439 (2.186)
				Tyr248 (2.171)
				Tyr554 (2.128)
				Gly552 (2.126)
				Phe568 (2.090)

Selon ce score (Tableau 10), l'Arg300 ressort comme un acide aminé essentiel au sein de l'enzyme, que ça soit au niveau du site actif ou même dans la protéine en général (Figure 44). D'autres acides aminés ressortent également grâce à cette analyse, que ça soit l'Arg235 avec un score inférieur à l'Arg300, mais >2, la limite pour laquelle un acide aminé est considéré comme central<sup>225</sup>. L'Arg182 ne possède qu'un score de 1.032, son rôle étant potentiellement limité au niveau du site actif. Parmi les 21 acides aminés identifiés comme « centraux », 14 d'entre eux sont des aromatiques, dont 6 étant ceux ressortant avec le meilleur Z-score, avec la Phe337 se situant un peu plus éloigné du site actif (7.5 Å) et pareillement pour la Tyr304 (7.0

Å). On peut noter la présence de la Tyr554 faisant partie de la *lid loop*, ou encore de la Leu53 et la Lys55 faisant partie du *hood domain*. Chacun de ces acides aminés sont des cibles potentielles pour une mutagenèse dirigée afin d'étudier d'éventuels changements au sein de l'enzyme.

La flexibilité du squelette d'une protéine dépend de sa composition en acides aminés et a un effet majeur sur la fonction<sup>226</sup>. Les parties rigides d'une structure seront moins sensibles aux changements de conformation que les parties flexibles. Même à l'intérieur des poches catalytiques, selon la flexibilité de la protéine, un ligand peut se lier plus ou moins efficacement. Des outils tels que DynaMine permettent de prédire la flexibilité d'une protéine à partir de sa séquence. Les équipes à l'origine du programme ont récemment exploité une grande quantité de données de déplacement chimique par RMN pour des protéines en solution afin d'obtenir un aperçu quantitatif de la relation entre la séquence d'acides aminés et la dynamique du squelette<sup>227</sup>. DynaMine est utilisé pour prédire la dynamique du squelette de la protéine sous la forme de paramètres d'ordre  $S^2$  du squelette, qui représentent le degré de restriction du mouvement d'un vecteur de liaison atomique par rapport au cadre de référence moléculaire. Les valeurs varient entre 1, pour une restriction totale (conformation rigide), et 0, pour un mouvement totalement aléatoire (hautement dynamique). Les prédictions de DynaMine représentent le potentiel statistique pour un résidu d'adopter certaines valeurs  $S^2$ .

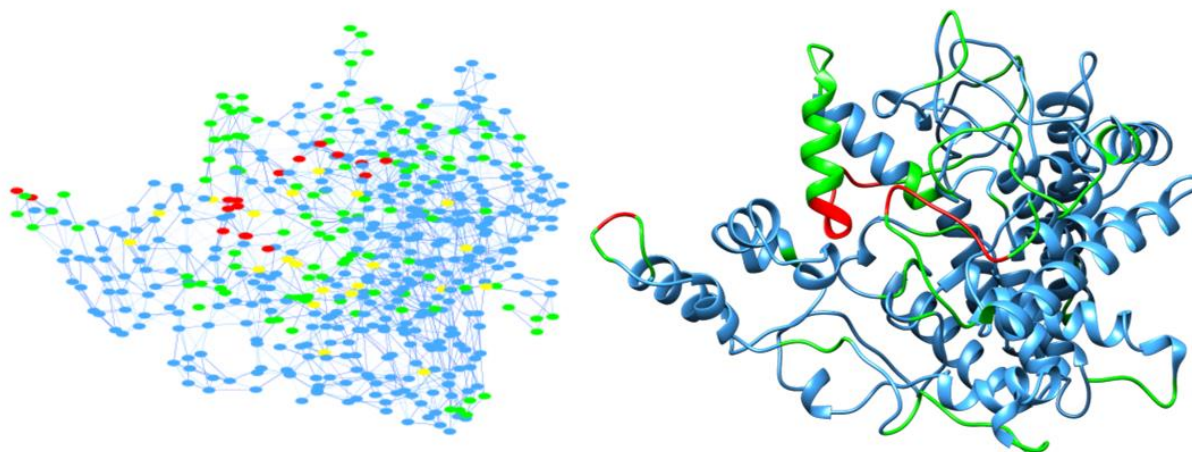


Figure 45: Représentation du RIN après analyse DynaMine (gauche) et modèle d'ApTreh-1 après analyse (droite). Les résidus bleus sont considérés comme rigides ( $S^2 > 0.9$ ), verts ( $0.9 > S^2 > 0.8$ ), jaunes ( $0.8 > S^2 > 0.7$ ) et rouges très flexibles ( $S^2 < .7$ )

Dans le cas d'ApTreh-1 (Figure 45), parmi les acides aminés les plus flexibles ( $S^2 < 0.7$ ) on retrouve sans surprise une partie de la *lid loop* (<sup>548</sup>TGGGGE<sup>553</sup>), un segment d'acide aminés sans structure fixe (<sup>296</sup>SRGPRPESY<sup>304</sup>) proche du site actif et un brin du *hood-domain* (<sup>91</sup>GNNG<sup>94</sup>). La majorité de la structure est considérée comme non flexible, ce qui est logique étant donné la forte présence de structures secondaires ordonnées comme les hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$  et des segments reliant ceux-ci. Si l'on combine les deux analyses, on peut comprendre l'importance par exemple de la Tyr304 (en bleu ciel à la Figure 44) au sein de la protéine : en effet, elle se révèle être un acide aminé central (analyse RCA) dans la structure et est impliqué dans de nombreuses interactions, ce qui s'explique notamment grâce à sa grande flexibilité (analyse DynaMine).

#### 4. Protocole de purification d'ApTreh-2

Une fois la tréhalase soluble purifiée et caractérisée, il est intéressant de se tourner vers la tréhalase membranaire, présente parmi les débris cellulaires obtenu par centrifugation après broyage des pucerons et extraction de Treh-1 dans un tampon acétate. Réussir à purifier cette enzyme permettrait de pouvoir étudier l'impact de potentiels inhibiteurs sur l'ensemble des tréhalases présentes au sein de l'organisme d'*A.pisum*.

##### 4.1. Optimisation de la purification : extraction de l'enzyme avec détergent

Une fois le culot protéique lavé à plusieurs reprises avec du tampon acétate pour éliminer la majorité de la tréhalase soluble, l'extraction de Treh-2 est réalisée avec différents détergents non-ioniques et zwitterioniques (Figure 46) pour éviter la dénaturation de l'enzyme avec une concentration de détergent 2.5x supérieure à la concentration micellaire critique (CMC) de ce dernier.

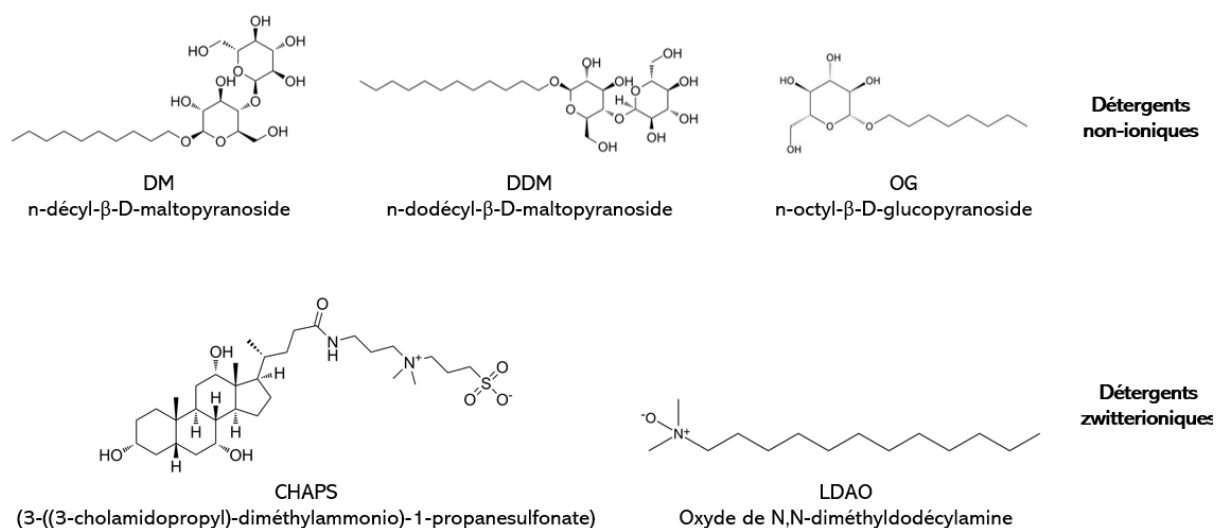


Figure 46: Structures des détergents non-ioniques et zwitterioniques utilisés

Une mesure d'absorbance à 540nm selon le test d'activité au DNS est réalisé afin d'identifier le détergent le plus efficace, c'est-à-dire celui ayant extrait la plus grande quantité d'enzyme (Figure 47).

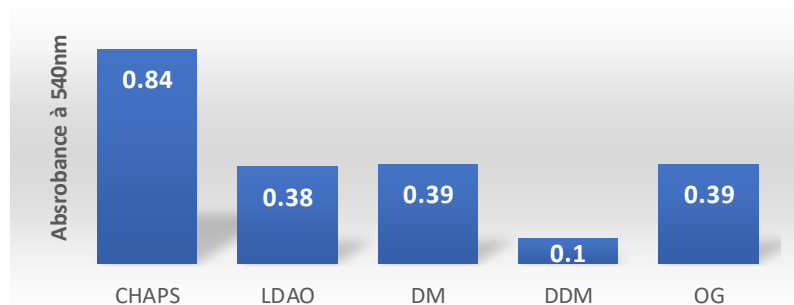


Figure 47: Absorbance à 540 nm après test enzymatique en présence de DNS pour chacun des détergents

En dehors du DDM qui ne semble n'extraire aucune tréhalase membranaire, l'efficacité d'extraction des autres détergents utilisés est relativement similaire, qu'il soit non-ionique ou zwitterionique, à l'exception du CHAPS qui ressort comme un détergent prometteur comparé



aux autres détergents. Celui-ci est donc conservé pour la suite de la purification. Ceci est en corrélation avec la littérature, où la tréhalase membranaire de *Chironomus riparius* a été extraite avec ce même détergent<sup>228</sup>.

#### 4.2.Optimisation de la purification : chromatographie échangeuse d'anions et chromatographie d'affinité

Comme pour ApTreh-1 et avec la même quantité initiale de pucerons, la purification de l'enzyme a été réalisée avec une chromatographie échangeuse d'anions (DEAE) et d'affinité (Concanavalline A) (Figure 48), les propriétés biochimiques des tréhalases membranaires étant relativement similaires aux tréhalases solubles. Un test d'activité au DNS est réalisé sur les fractions d'élutions afin d'identifier la présence de l'enzyme.

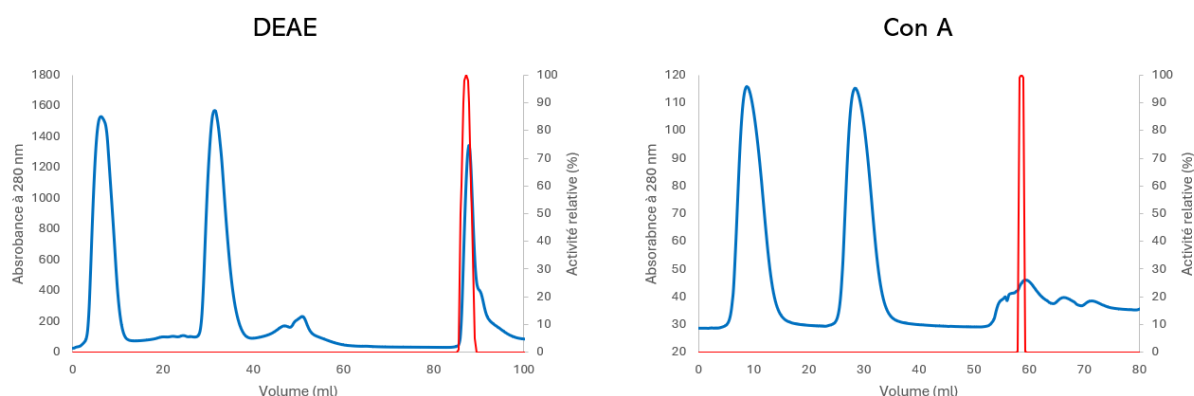


Figure 48: Chromatogrammes après passage d'ApTreh-2 sur DEAE (gauche) et sur Con A (droite)

Une activité enzymatique est bien détectée en fin de procédé de purification, correspondant à l'apparition d'une couleur rouge dans les fractions analysées lors du test au DNS. Les fractions ainsi récoltées pour les différentes étapes de purification sont analysées en SDS-PAGE, avec un gel et une coloration imidazole-zinc (IZ) au lieu de la coloration au bleu de Coomassie, cette dernière étant moins sensible que la coloration IZ<sup>229</sup>.

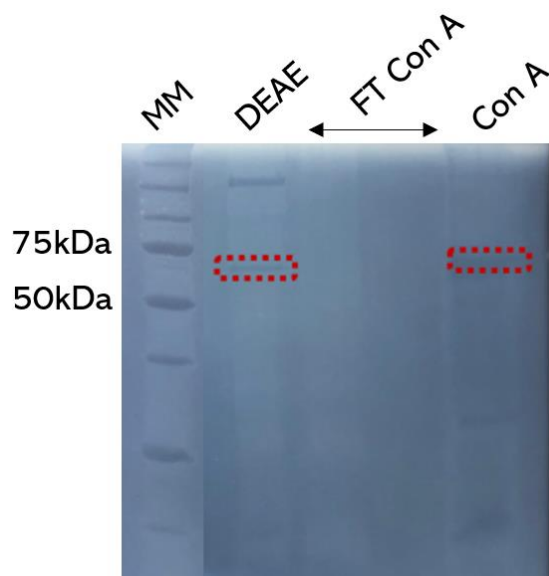


Figure 49: Analyse SDS-PAGE des étapes de purification d'ApTreh-2. La tréhalase membranaire est représentée par l'encadré rouge en pointillé.

En fin de purification, on observe une très légère bande protéique dans les alentours de 75kDa, pouvant indiquer soit la présence d'ApTreh-1 n'ayant pas été lavé, soit la présence d'ApTreh-2 (Figure 49). On observe également d'autres bandes protéiques interférentes à des plus basses masses moléculaires, mais étant donné la faible intensité de ces bandes par rapport à la sensibilité de la coloration, la concentration protéique reste extrêmement faible.

Les bandes protéiques sont analysées par spectrométrie de masse afin d'obtenir la séquence en acide aminé d'ApTreh-2, comme réalisé avec ApTreh-1. Dans les échantillons purifiés, deux séquences en acides aminés correspondant à une tréhalase membranaire (sur base d'une prédiction de la partie transmembranaire) sont détectées, avec une couverture de séquence relativement faible, à savoir 5% pour la première séquence (Uniprot : A0A8R2NN06) et 3% pour la seconde (Uniprot : A0A8R2JUJ7). Cependant, dans les mêmes échantillons, on retrouve également les deux isoformes d'ApTreh-1 identifiées précédemment (Uniprot : A0A8R2A2H3 et A0A8R2ABU8), détectées en plus grande quantité qu'ApTreh-1 avec une couverture de séquence de 73% et 71% après passage sur la DEAE et 57% et 56% après passage sur Con A. Les étapes de lavage ne sont donc pas suffisantes pour séparer ApTreh-1 et ApTreh-2, ne permettant pas de pouvoir caractériser la tréhalase membranaire seule.

#### 4.3. Tentative de séparation d'ApTreh-1 et ApTreh-2 par ultracentrifugation

Afin de tenter de séparer ApTreh-1 et ApTreh-2 plus efficacement, une étape d'ultracentrifugation est rajoutée lors des étapes de lavages, méthode souvent utilisée afin de séparer des protéines solubles et membranaires<sup>162,230,231</sup>. Par ailleurs, afin d'essayer de déterminer semi-quantitativement l'efficacité de cette technique, le procédé de comptage spectral est utilisé (Figure 50). Ce dernier permet de quantifier les concentrations relatives de protéines dans des mélanges de protéines prédigérées, analysées par chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem<sup>232</sup>.

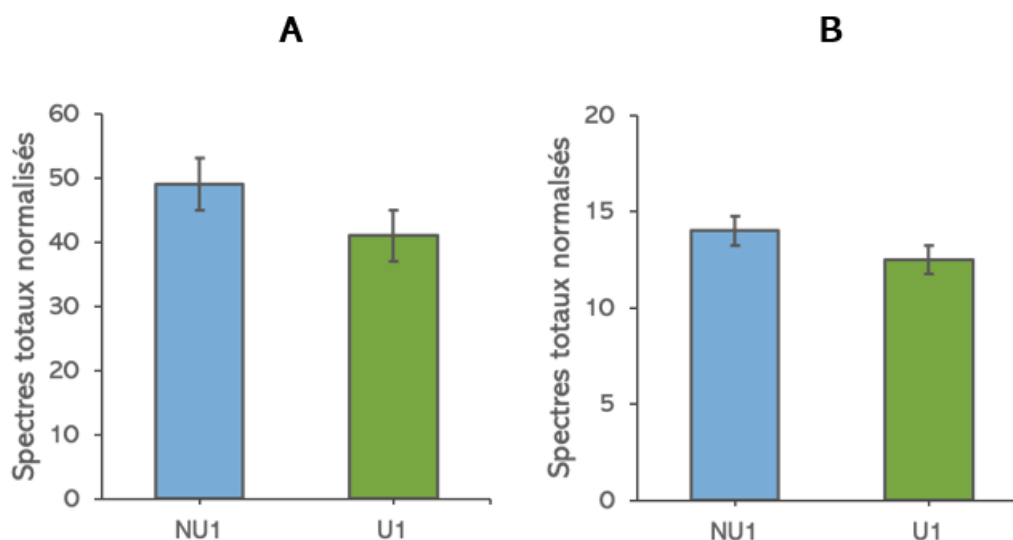


Figure 50: Comptage spectral pour la détermination de l'efficacité de l'étape d'ultracentrifugation. ApTreh-1 (A) et ApTreh-2 (B) sont analysés avant ultracentrifugation (NU1) et après (U1).

Avec cette nouvelle étape d'ultracentrifugation, on peut remarquer une diminution de la quantité d'ApTreh-1 présente dans les échantillons analysés, tandis que la présence d'ApTreh-2 reste presque inchangée. Lors de l'analyse en fin de purification, on retrouve tout de même ApTreh-1, mais avec une couverture de séquence bien moins importante (26% de couverture pour

A0A8R2A2H3 et A0A8R2ABU8), tandis que les deux séquences d'ApTreh-2 préalablement détectées sont toujours présentes, avec une meilleure couverture (13% et 6 peptides exclusifs pour A0A8R2NN06 – ApTreh-2a et 10% et 4 peptides exclusifs pour A0A8R2JUI7 – ApTreh-2b). Contrairement à ApTreh-1, les deux formes de tréhalases membranaires proviennent de deux gènes différents, 100166604 pour ApTreh-2a et 100162689 pour ApTreh-2b. Ces deux séquences membranaires sont donc toutes les deux bien présentes dans l'échantillon dû à la détection de peptides exclusifs, mais les deux séquences n'ont que 34% d'identité de séquence entre elles. ApTreh-2a dispose d'une partie transmembranaire définie en N-terminal, tandis que ApTreh-2b celle-ci se trouve en C-terminal (voir Annexe 6).

#### *4.4. Analyse et comparaison moléculaire entre ApTreh-1 et ApTreh-2*

Maintenant que nous disposons d'une séquence en acides aminés, il est possible de comparer celle-ci à la séquence obtenue pour la tréhalase soluble (Figure 51). Entre la forme soluble et membranaire, on retrouve une couverture de séquence de l'ordre de 97%, mais avec 40% d'identité de séquence. Par contre, si on s'intéresse uniquement aux acides aminés du site actif, on remarque que parmi les 24 acides aminés présents situés dans un rayon de 5 Å autour du ligand, 23 sont identiques à l'exception de Pro179 chez ApTreh-1 qui est remplacée par Ala261 dans ApTreh-2a. Les résidus catalytiques essentiels à la réaction d'hydrolyse se retrouvent bien dans chacune des formes, avec Asp363/Glu538 pour ApTreh-1, Asp418/Glu620 pour ApTreh-2a et Asp335/Glu532 pour ApTreh-2b. Les trois arginines sont également présentes, Arg264/Arg317/Arg32 pour ApTreh-2a et Arg181/Arg234/Arg299 pour ApTreh-2b. Une dernière différence notable est au niveau de la « *lid loop* », qui est identique entre ApTreh-1 et ApTreh-2a, mais diffère dans sa séquence pour ApTreh-2b avec le remplacement d'une glycine par une sérine et l'absence de tryptophane en début et bout de boucle, <sup>542</sup>HGSGGEYE<sup>549</sup>.



	1	.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70
ApTreh-2b	1	-----
ApTreh-1	1	-----
ApTreh-2a	1	MCGKVCVRALEKAVLLGDDTRSAACAESPWPMIVVTRDNHRSRAATTTTVAVAAPATVTVAQQVTTWSSG
	71	.....80.....90.....100.....110.....120.....130.....140
ApTreh-2b	1	-----MPQRAVLT--NSVMITLIL--LISSICG-----CWSSDADQHVASSPTCDNSNIYCY
ApTreh-1	1	-----MRITNILLVCLAHFAYYTHANNQEFVHLARGYYHVSNGLOASCQSQIYCE
ApTreh-2a	71	SPAAVCKMRSSAAVTVIAIVVRLTAVLLILMASVRP-----ATAMGQLQGQ--YNGPYPDICPSDIYCH
	141	.....150.....160.....170.....180.....190.....200.....210
ApTreh-2b	49	GILLHAIQMSSIFPDSKTFVDMKMKKSPNETMNIFFEMMKKTG-QRPSKLELEFELNETFEKSGSEFEIW
ApTreh-1	51	SDLLKDVQLAHIFPDSKTFVDMKIKYSESEILKNYQVLKDGNNGVVPKEKIVKEVDEHF--MDGDELEW
ApTreh-2a	133	GILLDDIQMQLYSKSKTFVDRKLRRSPAEIISKYRELKLRNNGRVPTRAVLTRFEVDN--FSDDPILVEW
	211	.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280
ApTreh-2b	118	DPSDKPEPKFIGDIKDPNQEWARGHLHLWKLLGKKIKDDVRLHPDHYSIIYVHYVPVIVPGGRFREFFYY
ApTreh-1	119	TPSDFNESPSTIANRIKDKNYKQWALGLNQVWKTARKVKDDVRLHPDRYSIIYVNGFAIPGGRFRELYY
ApTreh-2a	201	VEEDFVETPTISTYVQDQNYKIMILQLNQLKRLARKVDEEDVKINPDRHSSIIYVNGFFIAGGRFTELYY
	281	.....290.....300.....310.....320.....330.....340.....350
ApTreh-2b	188	WDSYWIIRGILLSEMYTTVKGLSNFLSLINTYGHIPNGGRVYYLIRJOPPMIVBMMKSYIEATNDTTFLL
ApTreh-1	189	WDSYWIIRGILLSEMYTTVKGLSNFLSLINTYGHIPNGGRVYYLIRJOPPMIVBMMKSYIEATNDTTFLL
ApTreh-2a	271	WDSYWIIRGAILCDMKDSARGTILQNFILVHRFGYVNGSRRIYYLIRJOPPMIVBMMKSYIEATNDTTFLL
	351	.....360.....370.....380.....390.....400.....410.....420
ApTreh-2b	258	KENVDILEKEFSYWMNLNHTVDIEKDGKYYTIIARYKDSSTGIRPESYREDIMSAGTLKTDNDRKNYSELK
ApTreh-1	259	KKVISILDSEFEFWTENRMYTFEKNKGYTMARYYASRGIRPESYREDYSEELKTENEKELYTOIR
ApTreh-2a	341	KKNIQYLEAEFNFWMNRTIRKVEKAGNYIIMGCYNTHTRGIRPESYREDYSEELKTENEKELYTOIR
	421	.....430.....440.....450.....460.....470.....480.....490
ApTreh-2b	328	AAAESGVDSSRWFIL-NGTNKGNLNLKTRFIIPVDLNLALVYNAILSDFYRELNVSDKALKYENIAN
ApTreh-1	329	SAETGVDSSRWFITANGSDRGITADIKTYIIPVDLNLALVYNAILSDFYRELNVSDKALKYENIAN
ApTreh-2a	411	AAAETGVDSSRWFITANGSDRGITADIKTYIIPVDLNLALVYNAILSDFYRELNVSDKALKYENIAN
	491	.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560
ApTreh-2b	397	KWIEAVTAVLWHEEVGAWLDYDMLNEIKRDYFYPTNISPLWTGCTPKKTDDEVSRTLKYLEKTQIMN--
ApTreh-1	399	KLVYSIQEVMWRFDLGAWEVDMLNLSREYFFVSNIVPLWTESYNMPKKA-VASSVLGYLRDHHIIEAD
ApTreh-2a	480	REQIGINALLWNEEGIWLDYDITTKLSRKYFYTSNFAPLWTGSYERKLRITYGKRVLDYILVNGVINQD
	561	.....570.....580.....590.....600.....610.....620.....630
ApTreh-2b	465	---NLGGIPTILHSGEQWDYPNAWPPLQYIMVMSLLNSGDNWACDLAFELAEFRWMSRNYKAYNETNAMY
ApTreh-1	468	YIVNFGTPTSLMNSSQOWDFPNAWPPLQAFIIQGLDRTQCKLAQQVSRFLAEVWLRSNYKSAEKSMMF
ApTreh-2a	550	GTPKILICVPTSNVNSSQOWDFPNCWPPLQAMVIOGLDRTNYKEACTVAINLAKSWINTNYVGYITSGMTF
	631	.....640.....650.....660.....670.....680.....690.....700
ApTreh-2b	532	EIYDQATVPFGCHSGGGEYEVQIGFGWTNGIILEFLQYGSRVTAEDKFEAPQTSANIDSSRSSTDYNTKT
ApTreh-1	538	EIYDQVLSGEGGGGEYTPQTGFQWTNGIVFEFLNRWCDTILSNGINDLRRHG-----
ApTreh-2a	620	EIYSALEVGTGGGGGEYTPQTGFQWTNGIVFEFLFRRWGHLFRST-----
	701	.....710.....720.....730.....740.....750.....
ApTreh-2b	602	VSSATQVMTATLAILATISAGCIGFAVYKKRYQLYASDRALCKMKCGGYTELKDLTSD
ApTreh-1		-----
ApTreh-2a		-----

Figure 51: Alignement de séquence entre ApTreh-1, ApTreh-2b et ApTreh-2a

En conclusion, le protocole de purification actuel ne permet pas d'isoler suffisamment la tréhalase membranaire détectée, étant donné que de la tréhalase soluble est majoritaire dans l'échantillon, ne permettant donc pas une caractérisation biochimique et cinétique d'ApTreh-2. Cependant, nous avons pu mettre en évidence les ressemblances au niveau du site actif des deux formes de tréhalases qui sont pratiquement identiques, ce qui nous permet de supposer que si un composé présente une activité inhibitrice importante sur ApTreh-1, ApTreh-2 se retrouvera également impactée d'une manière semblable étant donné qu'elles partagent le même

mécanisme d'action, mais dans des compartiments biologiques différentes (dégradation du tréhalose extra ou intracellulaire).

### 5. Production d'ApTreh-1 par surexpression hétérologue

Bien qu'un protocole de purification ait été mis au point pour la tréhalase soluble, le rendement reste très faible dû à la faible quantité initiale d'enzyme, ce qui n'est pas idéal pour la suite des manipulations. La surexpression bactérienne dans des souches de *E. coli* est régulièrement utilisée afin de produire l'enzyme en plus grande quantité que par extraction sur homogénat frais d'insectes<sup>233</sup>. Cependant, ce procédé reste assez limité, avec 17 tréhalases surexprimées dans *E. coli* et seulement 5 provenant d'insectes, le reste étant d'origine microbienne. D'autres systèmes d'expressions (levures ou cellules d'insectes<sup>234</sup>) existent, mais sont encore moins étudiés avec seulement 5 cas décrits dans la littérature.

En règle général, travailler en système bactérien permet d'obtenir de très bons rendements lors de la production de protéines, avec le désavantage de perdre quelques caractéristiques biochimiques. En effet, dû à l'absence du phénomène d'épissage dans les cellules procaryotes, les modifications post-traductionnelles telles que les N-glycosylation théoriquement présentes au sein des tréhalases ne seront pas exprimées avec l'enzyme. Cela ne pose cependant pas de problème dans notre cas, étant donné que nous avons démontré que même en absence de N-glycosylation au sein de l'enzyme, celle-ci conserve sa stabilité et son activité enzymatique.

#### 5.1. Constructions plasmidiques

Deux constructions plasmiques ont été utilisées sur base de la séquence en acides aminés analysée en spectrométrie de masse, avec un His-tag en N-terminal ou bien en C-terminal, la position de celui-ci pouvant influencer l'efficacité de la surexpression<sup>235</sup>. ApTreh-1 est surexprimée dans BL21(DE3) dans un premier temps et une lyse bactérienne classique comme décrit dans la partie matériel et méthodes est réalisée afin de vérifier si la tréhalase soluble se retrouve dans le surnageant après centrifugation, ou bien dans les corps d'inclusions (Figure 52).

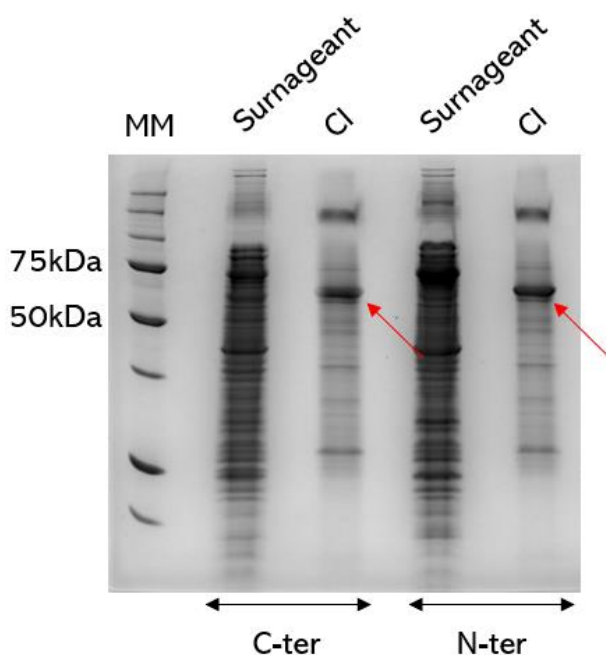


Figure 52: Analyse SDS-PAGE après lyse des constructions plasmidiques avec His-Tag en C-ter ou N-ter pour ApTreh-1 dans BL21(DE3), induite avec 1mM IPTG pendant 18h à 18°C.

Peu importe la construction utilisée, on retrouve majoritairement ApTreh-1 dans les corps d'inclusions, malgré qu'il s'agisse d'une enzyme décrite comme soluble. Afin de voir si la présence de corps d'inclusion est dû à l'utilisation d'une souche BL21(DE3) spécifiquement, une optimisation des conditions de surexpressions est réalisée en faisant varier plusieurs paramètres : la température et le temps d'incubation lors de l'induction, ou encore directement en changeant le type de souches bactériennes.

### 5.2. Optimisation des conditions de surexpression bactérienne

Pour la surexpression bactérienne dans des souches BL21(DE3), les conditions permettant l'apparition d'une bande protéique à la masse moléculaire attendue après induction à l'IPTG est avec une concentration de 1 mM, à 18°C pendant 18h (Figure 53). Cependant, en réalisant la lyse d'un culot bactérien et en déposant à nouveau le surnageant et le nouveau culot obtenu, la tréhalase est majoritairement présente dans les corps d'inclusions. La position du His-tag dans la construction plasmidique ne change rien, les gels ont une allure identique.

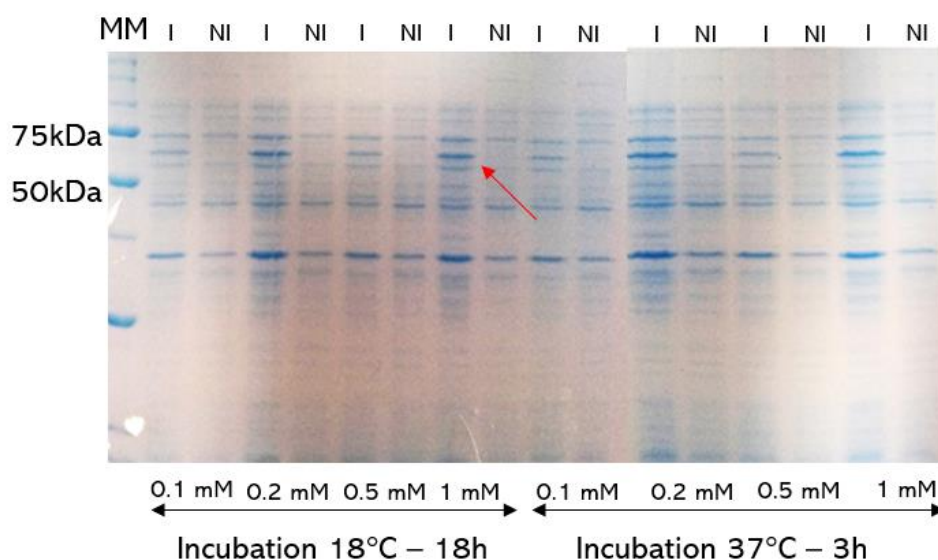


Figure 53: Analyse SDS-PAGE pour l'optimisation de la surexpression d'ApTreh-1 en BL21(DE3)

Pour tenter d'augmenter la production d'enzyme par ce système bactérien et pour voir s'il y a une influence sur la présence de la tréhalase en corps d'inclusions, un autre type de souche d'*E. coli* est utilisée, la souche TUNER(DE3). Cette dernière contient une mutation de la lactose perméase ( $\Delta lacZY$ ), qui permet à toutes les cellules de la bactérie d'être perméable à l'IPTG utilisé lors de l'induction et donc permettre une induction proportionnelle à la quantité d'IPTG utilisée<sup>236</sup>. Lors de la surexpression bactérienne d'ApTreh-1 dans TUNER, la seule différence notable est qu'une induction à de plus faibles concentrations (0.1 mM) produit légèrement plus de tréhalase qu'à de hautes concentrations (Figure 54). Cependant, peu importe la construction plasmidique utilisée, aucune condition ne permet d'obtenir plus de tréhalase dans le surnageant que les corps d'inclusions.

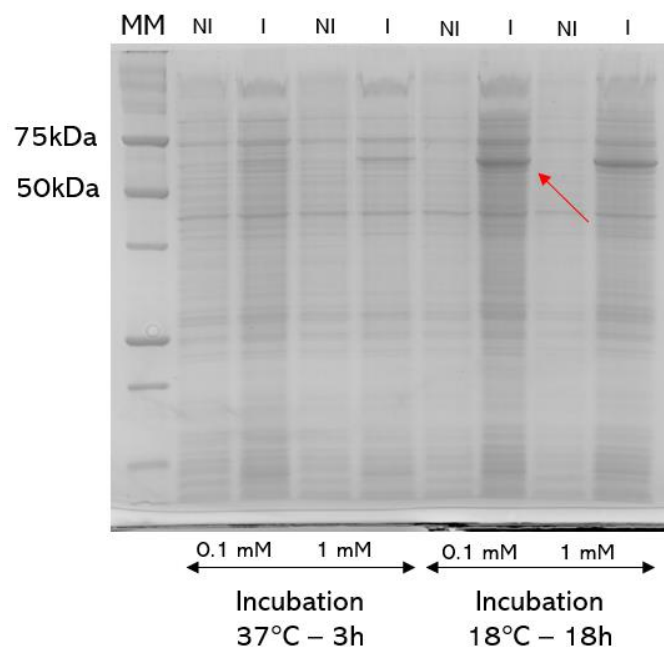


Figure 54: Analyse SDS-PAGE pour l'optimisation de la surexpression d'ApTreh-1 en TUNER(DE3)

Une dernière tentative s'est portée sur l'utilisation d'une autre souche d'*E. coli* modifiée, la variation Lemo21. L'expression est obtenue en faisant varier le niveau de lysozyme (*lysY*), l'inhibiteur naturel de l'ARN polymérase T7. Le niveau de lysozyme est modulé par l'ajout de L-rhamnose dans la culture bactérienne<sup>237</sup>. Cette souche peut être utilisée lorsque les protéines sont difficiles à exprimer par des méthodes classiques, notamment pour les protéines membranaires. Dans notre cas, exprimer ApTreh-1 avec ce système pourrait la rendre plus soluble et donc limiter sa présence dans les corps d'inclusions (Figure 55).

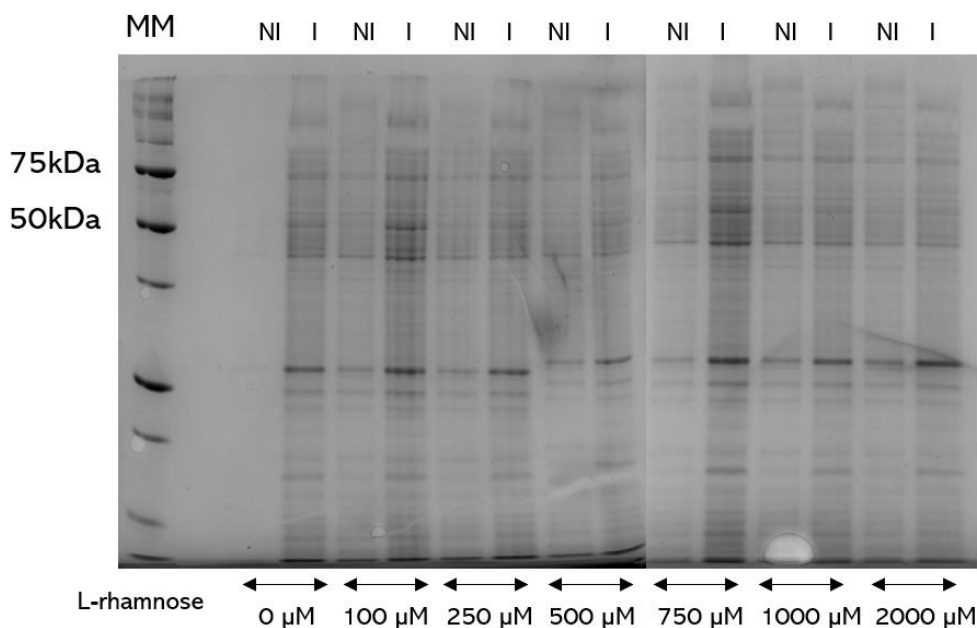


Figure 55: Analyse SDS-PAGE pour l'optimisation de la surexpression d'ApTreh-1 en Lemo21

Comme proposé par la littérature dans le cas de protéines complexes à surexprimer, la surexpression bactérienne s'est déroulée à 30°C avec une concentration de 0.4 mM en IPTG,

avec une concentration de L-rhamnose allant de 0 à 2000  $\mu$ M. Cependant, aucune condition de surexpression n'a permis d'exprimer ApTreh-1, aucune bande protéique n'apparaît après induction dans la zone de masse moléculaire attendue ( $\sim 70$  kDa) (Figure 55).

Aucune des autres conditions étudiées ne semble améliorer la surexpression bactérienne d'ApTreh-1 et celle-ci se retrouve en permanence en corps d'inclusions. Il a donc été décidé de conserver la souche BL21(DE3) pour la suite des manipulations, TUNER donnant un résultat relativement similaire peu importe la construction plasmidique utilisée, mais plus onéreuse.

### 5.3. Purification d'ApTreh-1 présente dans le surnageant

Bien que la majorité de la tréhalase se situe dans les corps d'inclusions, la purification des tréhalases obtenues par surexpression hétérologue dans des souches bactériennes se fait toujours sur le surnageant et non pas directement à partir des corps d'inclusions, malgré de faibles rendements<sup>166,238,239</sup>. De plus, obtenir la protéine dans le surnageant permettrait qu'elle soit sous sa forme native et non dénaturée, ne nécessitant donc pas une étape de renaturation supplémentaire. Dans un premier temps, un protocole de purification a été mis au point pour chacune des constructions plasmidiques afin d'isoler ApTreh-1. Sur base de la littérature, une étape de purification sur chromatographie d'affinité sur une colonne chargée de  $\text{Ni}^{2+}$  (IMAC) est utilisée afin de fixer le His-tag de l'enzyme, avant de réaliser un second passage sur cette même colonne après clivage de ce tag par une protéase, la TEV (Figure 56).

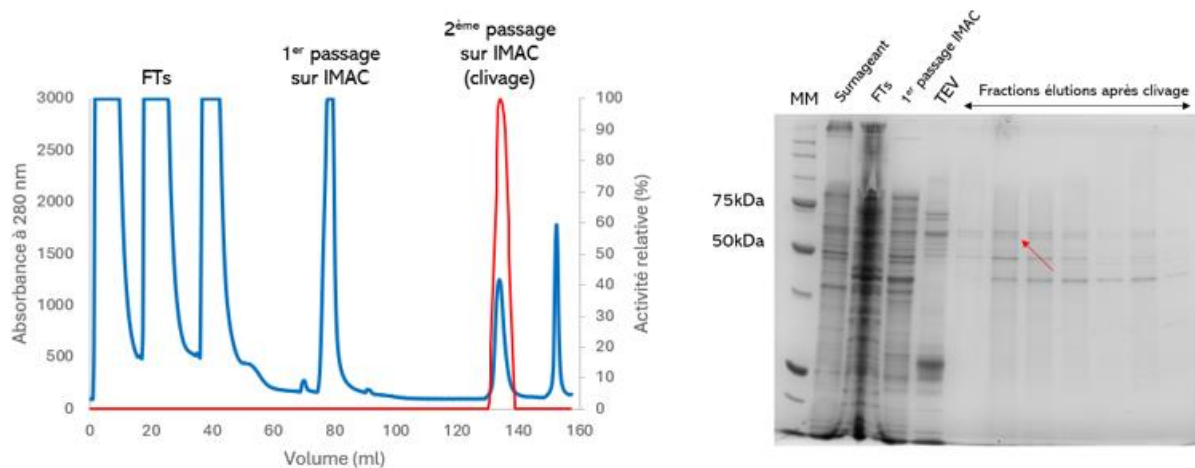


Figure 56: Chromatogramme du passage d'ApTreh-1 sur IMAC avec clivage à la TEV (gauche) et analyse SDS-PAGE des fractions d'éluions (droite)

Après ce double passage sur IMAC, une activité enzymatique est détectée dans le *flowthrough* lors de la 2<sup>ème</sup> chromatographie, indiquant bien que le clivage de l'enzyme a eu correctement lieu. Cette étape a été optimisée, étant donné que le rapport optimal protéine : TEV lors du clivage ainsi que les conditions opératoires sont importantes à déterminer. Le rapport final utilisé était de 1:100, permettant d'obtenir deux fois plus d'activité enzymatique dans les fractions d'éluion en partant d'une même quantité initiale. Cependant, cette seule étape de purification n'est pas suffisante, étant donné qu'en plus d'ApTreh-1 (identifiée par la flèche rouge), on retrouve quelques autres bandes protéiques interférentes. Le même profil de chromatographie et de gel est observé peu importe la construction plasmidique. Une nouvelle étape de purification est rajoutée en faisant passer les échantillons sur une chromatographie d'exclusion stérique, étant donné que la différence de masse moléculaire entre ces bandes et ApTreh-1 est suffisante.



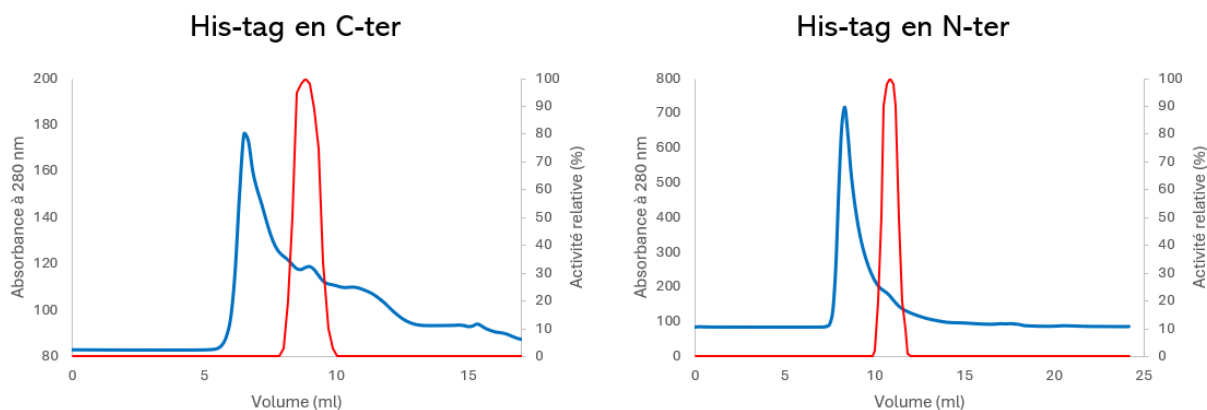


Figure 57: Passage d'ApTreh-1 sur SEC avec His-tag en C-ter (gauche) et N-ter (droite)

Après cette étape, on peut observer une légère différence dans les profils chromatographiques (Figure 57), mais qui est due à la quantité d'enzyme présente dans les échantillons et qui est plus importante pour le N-ter. En effet, en partant d'une culture de 200 mL pour les deux constructions plasmidiques, on retrouve une quantité finale d'ApTreh-1 de 0.07 mg et 0.12 mg avec le His-tag en C-ter et en N-ter. Au final, il s'agit d'un rendement beaucoup trop faible pour des surexpressions bactériennes et ne permettant pas une caractérisation complète.

#### 5.4. Purification d'ApTreh-1 présente dans les corps d'inclusions

La suite du travail se porte donc sur la présence d'ApTreh-1 en majorité dans les corps d'inclusion (CI), qui nécessite de travailler en conditions dénaturantes afin de solubiliser l'enzyme et pouvoir la purifier, avant de passer à une étape de renaturation permettant de retrouver la fonction de l'enzyme.

Dans un premier temps, quelques tests ont été réalisés afin de tenter de réduire la quantité d'ApTreh-1 sous forme de corps d'inclusions, en rajoutant des agents stabilisateurs dans le tampon de lyse (différents pourcentages de glycérol, ajout de DTT, ...), mais aucune condition n'a significativement amélioré la situation. Finalement, la solubilisation des CI dans un détergent anionique, le sodium dodécyl sulfate (SDS), a permis d'obtenir les résultats les plus intéressants (Figure 58).

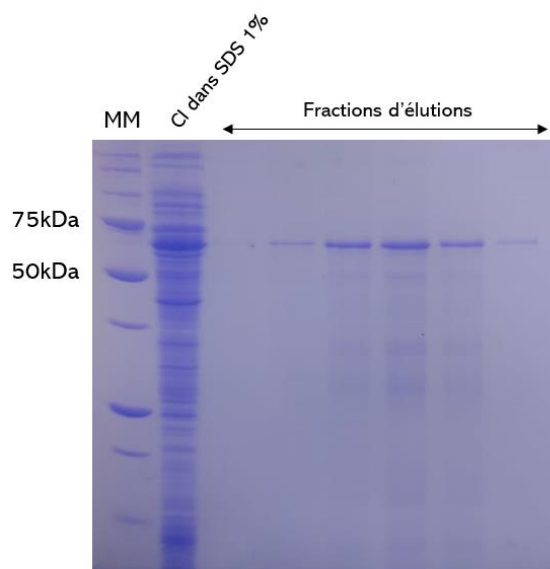


Figure 58: Analyse SDS-PAGE d'ApTreh-1 surexprimée, solubilisation des CI dans du SDS 1% et fractions d'élutions après passage sur IMAC

En effet, en présence de 1% SDS, ApTreh-1 dénaturée se lie très facilement sur colonne IMAC par la meilleure accessibilité du His-tag. Cependant, étant donné que l'enzyme est dénaturée par le SDS, il n'est pas possible de confirmer sa présence à l'aide du test d'activité au DNS. Après élution de l'enzyme avec un gradient imidazole, une analyse en spectrométrie de masse de la bande protéique permet néanmoins de confirmer qu'il s'agit bel et bien d'ApTreh-1.

L'enzyme sous forme dénaturée n'est donc pas utilisable en l'état, il faut réaliser une étape de renaturation afin qu'elle puisse retrouver sa structure initiale et donc sa fonction d'hydrolase. Il n'existe cependant pas de méthode de renaturation générale convenant à chaque protéine, il est nécessaire d'utiliser différentes techniques afin de trouver celle correspondante à l'enzyme étudiée<sup>240</sup>. Pour ApTreh-1, la technique de la dilution<sup>241</sup> du détergent (rapport 1:10 et 1:100) a été utilisée, sans permettre de retrouver une activité enzymatique. Même résultat en enlevant le SDS du milieu avec des Bio-Beads (= billes de polystyrène adsorbant les composés tels que le SDS), aucune activité enzymatique n'est détectée, malgré avoir confirmé l'absence de SDS dans l'échantillon avec une quantification spectrophotométrique du détergent avec un colorant « *Stains All* » liant le SDS<sup>242</sup>. Enfin, une dernière technique a été utilisée, celle de combiner l'utilisation du SDS avec un co-solvant, le 2-méthylpentane-2,4-diol (MPD) afin de permettre la renaturation de l'enzyme, comme prouvé sur différentes protéines<sup>243</sup>. Malgré l'optimisation de la technique, la renaturation de l'enzyme n'a pas eu lieu et aucune activité enzymatique n'est détectée.

En conclusion, il n'a donc pas été possible d'obtenir en quantité suffisante l'ApTreh-1 par surexpression bactérienne. La quantité d'enzyme présente dans le surnageant après lyse bactérienne n'est pas suffisante pour permettre des tests de caractérisations, tandis que l'enzyme présente dans les corps d'inclusions n'a pas pu être renaturée. Il se pourrait que l'absence de modifications post-traductionnelles impacte la solubilité de l'enzyme lors de sa production hétérologue, d'où sa préférence à former des corps d'inclusions.





# Chapitre 4

---

Analyse d'inhibiteurs commerciaux et identification  
d'inhibiteurs potentiels d'origine naturelle



## 1. Mise en contexte

L'ApTreh-1 étant purifiée et caractérisée, nous pouvons l'utiliser pour évaluer de potentiels inhibiteurs affectant *A. pisum*. Lorsqu'il s'agit de chercher des inhibiteurs enzymatiques, les chercheurs explorent souvent deux voies différentes : celle de composés d'origine naturelle ou d'origine synthétique. Les composés naturels pouvant provenir des plantes ou micro-organismes ont l'avantage d'offrir une diversité chimique importante, présentent généralement une plus grande spécificité envers des groupes d'insectes et sont plus efficaces sur les jeunes stades larvaires<sup>244</sup>. Cependant, l'utilisation d'insecticides d'origine microbienne par exemple nécessite un suivi approfondi afin de détecter les dommages causés aux cultures par les ravageurs à des stades précoces et une optimisation des conditions de production du/des composé(s) selon la souche utilisée, ce qui peut s'avérer très fastidieux<sup>245</sup>. A l'inverse, la synthèse d'insecticides permet une formulation des composés souhaités avec des caractéristiques physico-chimiques voulues, permettant une application dans les champs plus aisée. Cependant, cela présente les désavantages d'agir sur un large spectre d'espèces (comme pour les composés neurotoxiques qui ciblent une fonction partagée des vertébrés) et est généralement très mal vu des citoyens, ce qui pèse dans la balance économique bien que scientifiquement parlant, les différences avec les composés naturels sont minces<sup>246</sup>.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes donc intéressés aux deux alternatives possibles, la production d'inhibiteurs de tréhalases par des souches de *Streptomyces*, ou bien la recherche, par un criblage virtuel sur le modèle obtenu précédemment d'ApTreh-1, de nouveaux composés synthétiques.

## 2. Analyse d'inhibiteurs commerciaux sur ApTreh-1

Préalablement à ces études, il était intéressant d'analyser le comportement d'ApTreh-1 en présence d'inhibiteurs commerciaux connus de la littérature afin d'avoir une base sur laquelle émettre des hypothèses lors de l'étude de nouveaux inhibiteurs, soit d'origine naturelle ou synthétiques. L'étude de l'impact de ces composés sur les insectes est réalisée par tests de mortalité sur des populations d'individus contrôlés (*in vivo*), des tests d'inhibition sur ApTreh naturellement purifiée (*in vitro*) et également avec l'analyse de leurs interactions directes dans le site actif de l'enzyme par *docking* moléculaire (*in silico*).

Les inhibiteurs commerciaux étudiés sont la validamycine A, l'amygdaline et la phloridzine, ainsi que la castanospermine et le 1-deoxynojirimycine, mais ces derniers n'ont pas pu être étudiés *in vivo* (Figure 59).

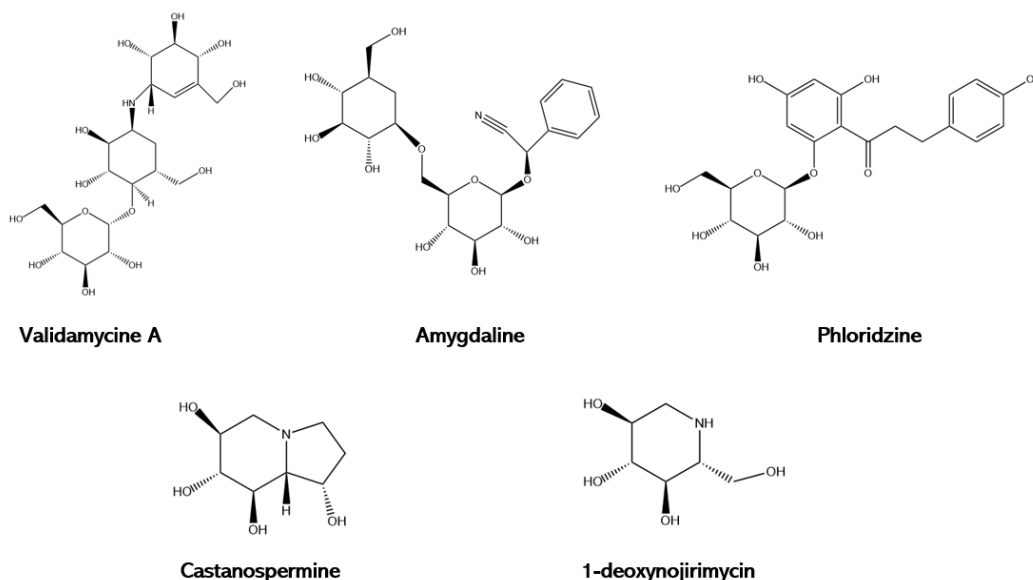


Figure 59: Structures des inhibiteurs commerciaux analysés *in vivo*, *in vitro* et *in silico*

La validamycine A est un antibiotique et un fongicide produit notamment par *Streptomyces hygroscopicus*, et le premier inhibiteur de tréhalase commercialisé depuis la fin des années 1960<sup>247</sup>. Il est actuellement l'un des inhibiteurs de tréhalase connus les plus efficaces et a été étudié sur divers insectes tels que *Tribolium castaneum* (Coléoptère)<sup>248</sup>, *Nilavarpa lugens* (Hémiptère)<sup>249</sup>, les termites (Blattoptère)<sup>165</sup>, *Spodoptera litura* (Lépidoptère)<sup>250</sup> ou encore *Drosophila melanogaster* (Diptère)<sup>251</sup>. Il s'agit donc d'un composé qui n'est pas spécifique à un ordre d'insecte.

Les composés  $\beta$ -glucosides (amygdaline et phloridzine) sont synthétisés par de nombreuses plantes pour les protéger contre les insectes et se sont avérés inhiber la tréhalase<sup>252</sup>. Ils sont constitués d'une molécule de glucose liée à un groupement aglycone variable. L'amygdaline est un sucre disaccharide, connu sous le nom de gentiobiose, lié à un groupe de cyanohydrine, que l'on trouve notamment dans les graines d'abricots, d'amandes amères, de pommes, de pêches, de cerises et de prunes. Il est classé chimiquement comme un glycoside cyanogène en raison de sa capacité à libérer du cyanure d'hydrogène lors de l'hydrolyse enzymatique. Il s'est déjà avéré être une alternative intéressante aux insecticides actuels sur plusieurs insectes de différents ordres, tels que les larves de *Musca domestica* (Diptère)<sup>253</sup>, *Spodoptera frugiperda* (Lépidoptère)<sup>189</sup>, *Helicoverpa armigera* (Lépidoptère)<sup>254</sup> ou *Tenebrio molitor* (Coléoptère)<sup>255</sup>. Aucune donnée expérimentale n'est disponible dans la littérature pour un éventuel effet inhibiteur sur un hémiptère. La phloridzine, un composé naturel présent dans les plantes comme les pommiers, est connue pour fonctionner comme un puissant inhibiteur du transporteur de glucose dépendant du sodium (SGLT1). En outre, elle inhibe l'enzyme tréhalase chez les espèces de ravageurs mentionnées plus haut, à l'exception de *Lymantria dispar* (Lépidoptère), dont la tréhalase n'est pas affectée par la phloridzine<sup>256</sup>.

La castanospermine est un composé naturel extrait de diverses plantes, notamment du châtaignier du cheval (*Castanospermum australe*). La littérature décrit son effet inhibiteur sur de nombreuses dissaccharidases d'insectes provenant d'ordres différents (Lépidoptères, Coléoptères, Hémiptères et Diptères), dont la tréhalase<sup>257</sup>. Par ailleurs, la castanospermine partage des similitudes structurales et fonctionnelles avec un autre inhibiteur de la tréhalase, le 1-deoxynojirimycin dont l'efficacité a été démontrée sur *Chironomus riparius* (Diptère)<sup>258</sup>,

suggérant des interactions potentielles ou des mécanismes d'action similaires entre ces deux composés<sup>259</sup>.

### 2.1. Analyses des inhibiteurs commerciaux : *in vivo*

Dans le domaine de la recherche, les tests *in vivo* d'inhibiteurs sur des populations d'insectes jouent un rôle crucial dans l'évaluation de l'efficacité et de la toxicité potentielle de divers composés. Dans le cadre de ce projet, trois inhibiteurs (amygdaline, phloridzine et validamycine A) sont étudiés sur une population contrôlée d'*A. pisum* afin d'étudier leur mortalité sur une période de 72h à différentes concentrations (10 µg/mL et 25 µg/mL), face à un contrôle négatif (diète composée de sucrose) et un contrôle positif, la cyperméthrine, un pyréthrianoïde permettant de contrôler les pucerons<sup>260</sup>.

Après 24 heures d'exposition (Figure 60), une très faible mortalité des insectes est observée pour le contrôle négatif, alors que la cyperméthrine présente déjà un taux de mortalité de plus de 20%. Concernant les trois composés testés, la mortalité est inférieure à 5% pour chaque concentration de chaque composé, mais déjà significative par rapport au contrôle négatif. Il n'y a pas de différence significative entre chaque produit en terme de taux de mortalité.

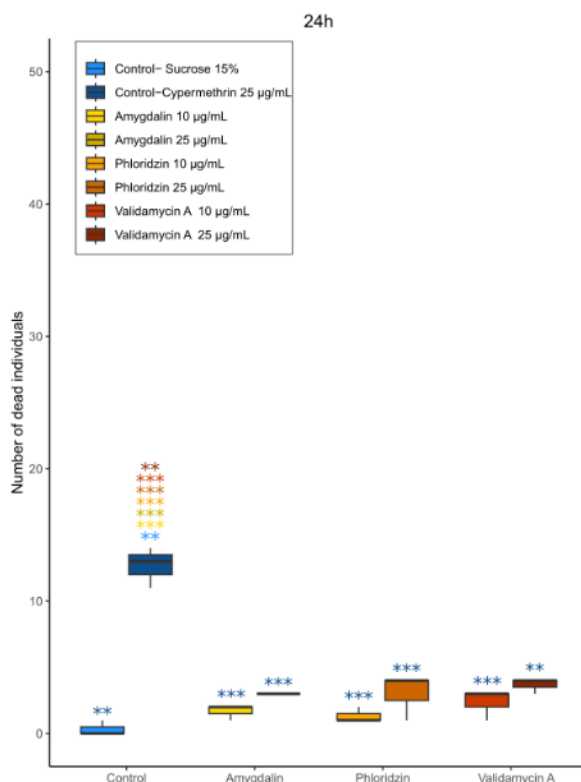


Figure 60: Mortalité du puceron en individus d'*Acyrtosiphon pisum* après 24h d'exposition au contrôle positif (cyperméthrine), négatif (sucrose 15%) et aux différents inhibiteurs à 10µg/mL et 25 µg/mL. \*, \*\*, \*\*\* représentent les différences significatives respectivement à 0,05 – 0,01 et 0,001

Après 48 heures d'exposition (Figure 61), le taux de mortalité du contrôle positif augmente drastiquement pour atteindre près de 70%. Pour les inhibiteurs, une tendance commence à se dessiner avec une efficacité croissante pour l'amygdaline (~20% de mortalité), la phloridzine (~25% de mortalité) et la validamycine A (~25% de mortalité). Pour la phloridzine et la validamycine A, le taux de mortalité avec la concentration de 25 µg/mL est légèrement plus élevé qu'avec la concentration de 10 µg/mL.

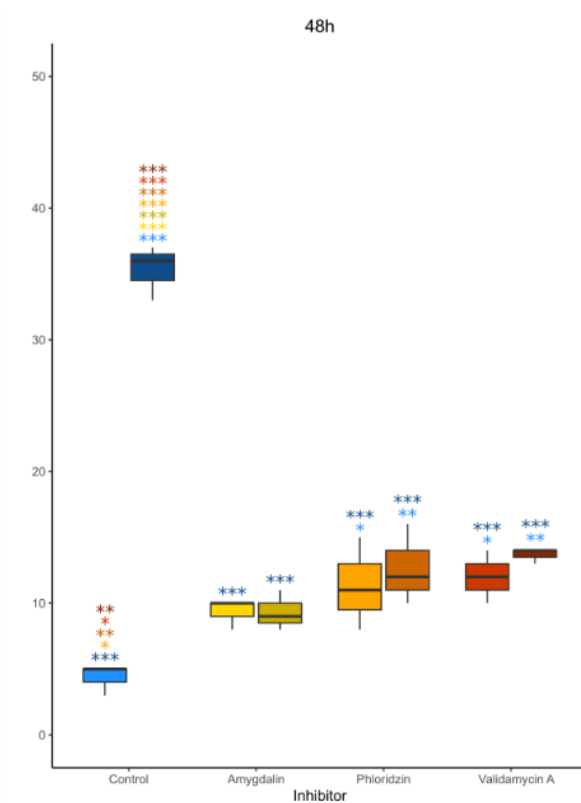


Figure 61: Mortalité du puceron en individus d'*Acyrtosiphon pisum* après 48h d'exposition au contrôle positif (cyperméthrine), négatif (sucrose 15%) et aux différents inhibiteurs à 10 $\mu$ g/mL et 25  $\mu$ g/mL. \*, \*\*, \*\*\* représentent les différences significatives respectivement à 0,05 – 0,01 et 0,001

C'est après 72 heures d'exposition que les résultats sont les plus intéressants (Figure 62). Le contrôle négatif et le contrôle positif présentent respectivement une mortalité de 20 et 100%. La tendance à l'augmentation de la toxicité des inhibiteurs amygdaline, phloridzine et validamycine A est plus marquée, la validamycine A se démarquant (~80% de mortalité pour la concentration de 25  $\mu$ g/mL). L'amygdaline est le composé le moins efficace avec ~40% de mortalité pour la concentration la plus élevée, tandis que la phloridzine a une efficacité intermédiaire (~65 %). Pour chaque inhibiteur testé, l'effet de la concentration montre un effet significatif sur les individus, la concentration de 25  $\mu$ g/mL montrant 5 à 10% de mortalité en plus que la concentration de 10  $\mu$ g/mL.

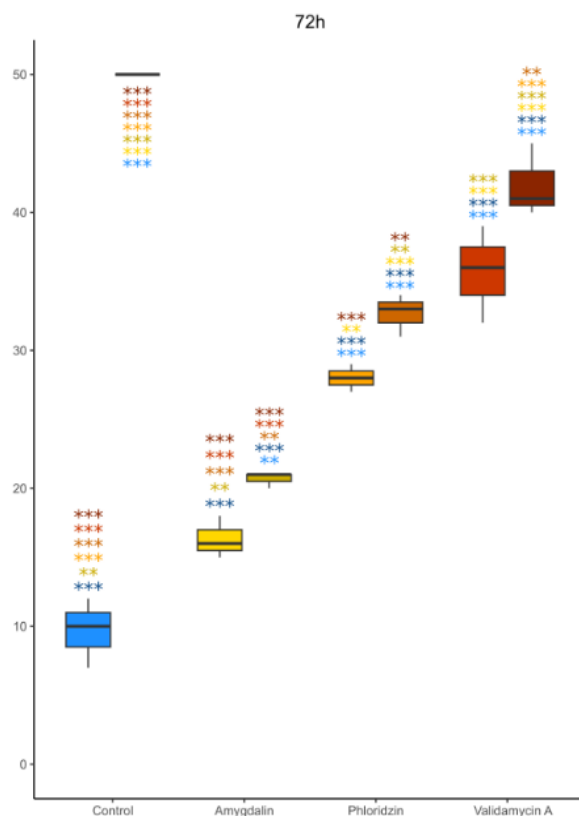


Figure 62: Mortalité du puceron en individus d'*Acyrtosiphon pisum* après 72h d'exposition au contrôle positif (cyperméthrine), négatif (sucrose 15%) et aux différents inhibiteurs à 10µg/mL et 25 µg/mL. \*, \*\*, \*\*\* représentent les différences significatives respectivement à 0,05 – 0,01 et 0,001

Le modèle factoriel complet sur l'ensemble des données a montré un effet important de toutes les variables explicatives, de l'inhibiteur ( $X^2= 110,62$ ,  $df=3$ ,  $p < 0,001$ ), du dosage ( $X^2= 178,62$ ,  $df=1$ ,  $p < 0,001$ ) et du temps ( $X^2= 940,79$ ,  $df=2$ ,  $p < 0,001$ ) sur le nombre d'individus morts. Il y avait également des interactions significatives à deux voies entre l'inhibiteur et le dosage ( $X^2= 242,82$ ,  $df=3$ ,  $p < 0,001$ ), l'inhibiteur et le temps ( $X^2= 35,09$ ,  $df=6$ ,  $p < 0,001$ ), et le dosage et le temps ( $X^2= 8,4$ ,  $df=2$ ,  $p < 0,05$ ) (voir Annexe 7). Les résultats de la comparaison par paire des moyennes des moindres carrés pour chaque pas de temps ont été illustrés, les détails des comparaisons contrastées et corrigées avec la méthode HSD de Tukey sont disponibles à l'annexe 8.

## 2.2. Analyses des inhibiteurs commerciaux : *in vitro*

Un inhibiteur enzymatique est caractérisé par les valeurs «  $IC_{50}$  » et «  $K_i$  », donnant des informations sur la concentration en inhibiteur requis pour inhiber 50% de la réaction et la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites catalytiques sont occupés, nommé également constante de dissociation. L'affinité d'un inhibiteur est d'autant plus grande que le  $K_i$  est petit. Ces informations sont déterminées sur les trois inhibiteurs utilisés lors des tests de mortalité, validamycine A (VA), amygdaline (A) et phloridzine (P), avec deux autres inhibiteurs supplémentaires, la castanospermine (C) et le 1-deoxynojirymycin (1-DNJ).

Les  $IC_{50}$  déterminés expérimentalement pour chacun des inhibiteurs sont repris dans le Tableau 11, en comparaison avec les valeurs retrouvées dans la littérature.

Tableau 11: Valeurs d' $IC_{50}$  (M) déterminées expérimentalement pour *A. pisum* et comparaison avec la littérature

Ordre et espèce	$IC_{50}$ (M)				
	VA	A	P	C	1-DNJ
Hémiptère ( <i>Acyrtosiphon pisum</i> )	$2.2.10^{-7}$	$2.1.10^{-2}$	$5.2.10^{-3}$	$2.1.10^{-5}$ $2.2.10^{-5*257}$	$4.1.10^{-6}$
Hémiptère ( <i>Myzus persicae</i> ) <sup>257</sup>	n.d	n.d	n.d	$3.8.10^{-5}$	n.d
Lépidoptère ( <i>Spodoptera litura</i> ) <sup>254</sup>	$3.7.10^{-7}$	n.d	n.d	n.d	n.d
Lépidoptère ( <i>Helicoverpa armigera</i> ) <sup>250</sup>	n.d	$5.1.10^{-3}$	$4.3.10^{-3}$	n.d	n.d
Diptère ( <i>Musca domestica</i> ) <sup>253</sup>	$4.0.10^{-7}$	$3.2.10^{-2}$	n.d	n.d	n.d
Diptère ( <i>Chironomus riparius</i> ) <sup>258</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	$2.8.10^{-6}$

\*VA = validamycine A, A = amygdaline, P = phloridzine, C = castanospermine, 1-DNJ = 1-deoxynojirimycin

Cette analyse a révélé une forte inhibition de la validamycine A ainsi que pour la castanospermine et 1-DNJ, tandis que la phloridzine et l'amygdaline semblent être de très faibles inhibiteurs. Il est intéressant de noter que, d'après les données disponibles dans la littérature, les valeurs sont relativement proches de celles obtenues pour d'autres ordres d'insectes, généralement dans la même gamme de concentration. Contrairement aux résultats *in vitro* obtenus pour la validamycine A, ceux générés pour la phloridzine et l'amygdaline ne reflètent pas l'analyse *in vivo*, montrant une efficacité létale significative de ces deux composés. Notre hypothèse est que les inhibiteurs sont hydrolysés par les glucosidases présentes au sein de l'insecte en des molécules ayant une efficacité inhibitrice plus importante. Celle-ci est décrite plus en détail dans l'analyse *in silico* ci-dessous.

Cependant, l' $IC_{50}$  est une donnée sujette à d'éventuelles variations en fonction des conditions expérimentales utilisées, la rendant moins précise pour la comparaison d'efficacité d'inhibiteurs entre plusieurs espèces<sup>261,262</sup>. A cet effet, les valeurs de  $K_i$  pour les inhibiteurs ayant le meilleur potentiel sur ApTreh-1 sont déterminés, à savoir les validamycine A, castanospermine et 1-deoxynojirimycin. Les valeurs sont reprises dans le Tableau 12, en comparaison aux données de la littérature.

Tableau 12: Valeurs de  $K_i$  (M) déterminées expérimentalement pour *Acyrtosiphon pisum* et comparaison avec la littérature

Ordre et espèce	$K_i$ (M)		
	Validamycine A	Castanospermine	1-DNJ
Hémiptère ( <i>Acyrtosiphon pisum</i> )	$5.10^{-8}$	$4.7.10^{-6}$	$1.9.10^{-6}$
Lépidoptère ( <i>Spodoptera litura</i> ) <sup>250</sup>	$4.7.10^{-8}$	n.d	n.d
Blattoptère (termites - espèce non précisée) <sup>165</sup>	$4.10^{-4}$	n.d	n.d
Lépidoptère ( <i>Helicoverpa armigera</i> ) <sup>250</sup>	n.d	$4.9.10^{-6}$	n.d



Dans le cas de la castanospermine, la valeur de  $K_i$  déterminée est la même que celle de la tréhalase d'*Helicoverpa armigera*. Par contre, pour la validamycine A, une nette différence est observée entre les hémiptères et les lépidoptères pour lesquels le  $K_i$  est proche du nM, tandis que celle déterminée chez les blattoptères est de l'ordre du mM, indiquant une grosse différence de spécificité entre ces deux ordres.

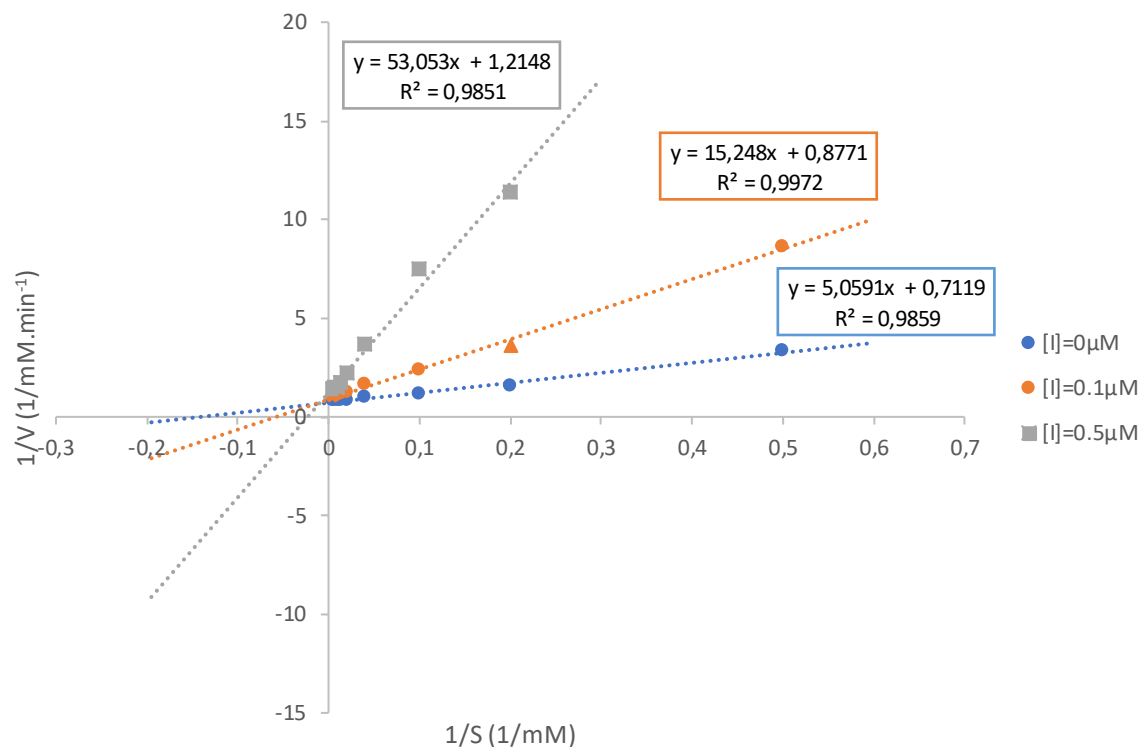


Figure 63: Représentation de Lineweaver-burk pour la validamycine A

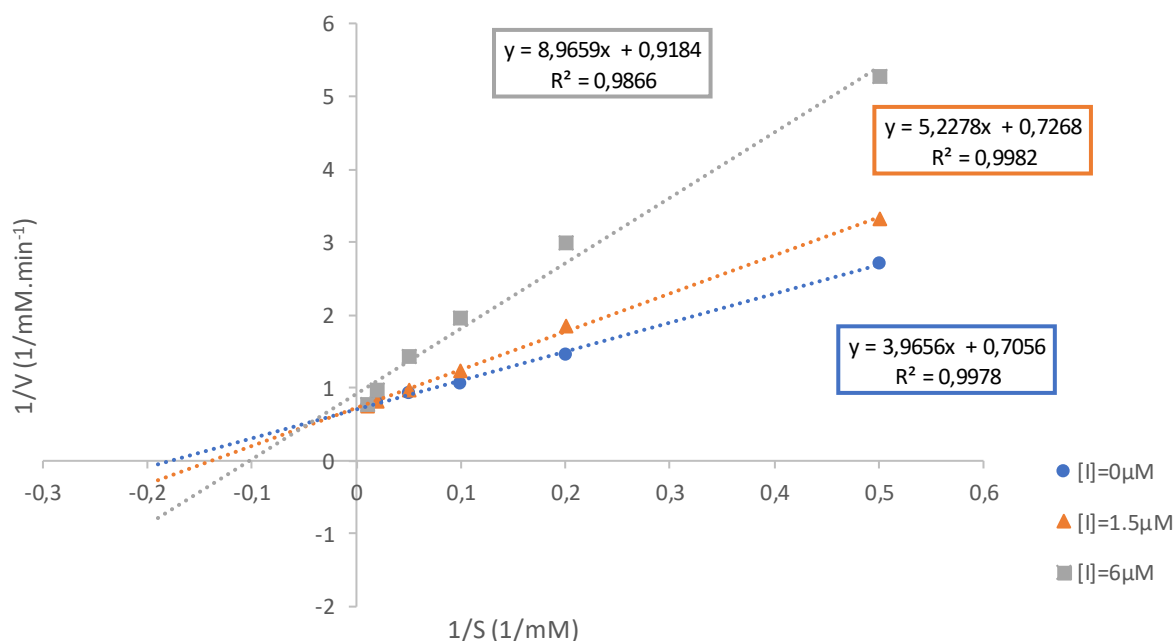


Figure 64: Représentation de Lineweaver-burk pour la castanospermine

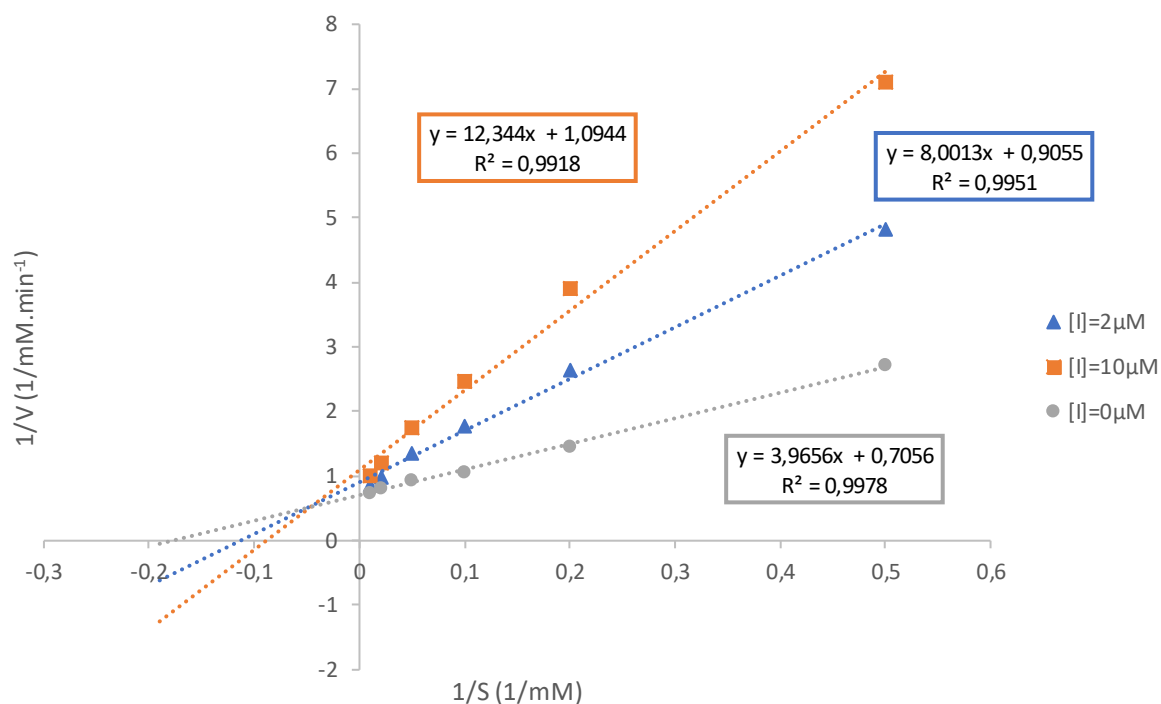


Figure 65: Représentation de Lineweaver-burk pour le 1-deoxynojirimycin

La validamycine A (Figure 63), la castanospermine (Figure 64) et le 1-deoxynojirimycin (Figure 65) partagent le même type d'inhibition, à savoir une inhibition compétitive, avec une réduction du  $K_m$  lorsque la concentration en inhibiteur augmente, tout en ayant une  $V_{max}$  constante. Cela est en corrélation avec la littérature qui identifie ces composés comme inhibiteurs compétitifs, peu importe l'espèce étudiée.

### 2.3. Analyses des inhibiteurs commerciaux : *in silico*

L'étude *in silico* des composés inhibiteurs de tréhalase préalablement étudiés *in vivo* et *in vitro* permettrait de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition et identifier les acides aminés essentiels au sein du site actif et ainsi comparer ces résultats avec de nouveaux inhibiteurs. Pour en revenir à l'hypothèse établie précédemment, l'amygdaline et la phloridzine seraient hydrolysés par les glucosidases présentes au sein de l'insecte. Ce phénomène a déjà été mentionné à plusieurs reprises dans la littérature<sup>189,250</sup>. Par ailleurs, des bêta-glucosidases naturellement présentes chez les insectes ont été identifiées chez plusieurs espèces : *Periplaneta americana*<sup>263</sup>, *Bombyx mori*<sup>264</sup>, *Nilaparvata lugens*<sup>265</sup> et *Apis mellifera*<sup>266</sup>. L'hydrolyse de la liaison glycosidique de chaque molécule permet d'obtenir la validoxylamine A, la phlorétine et la prunasine (Figure 66).

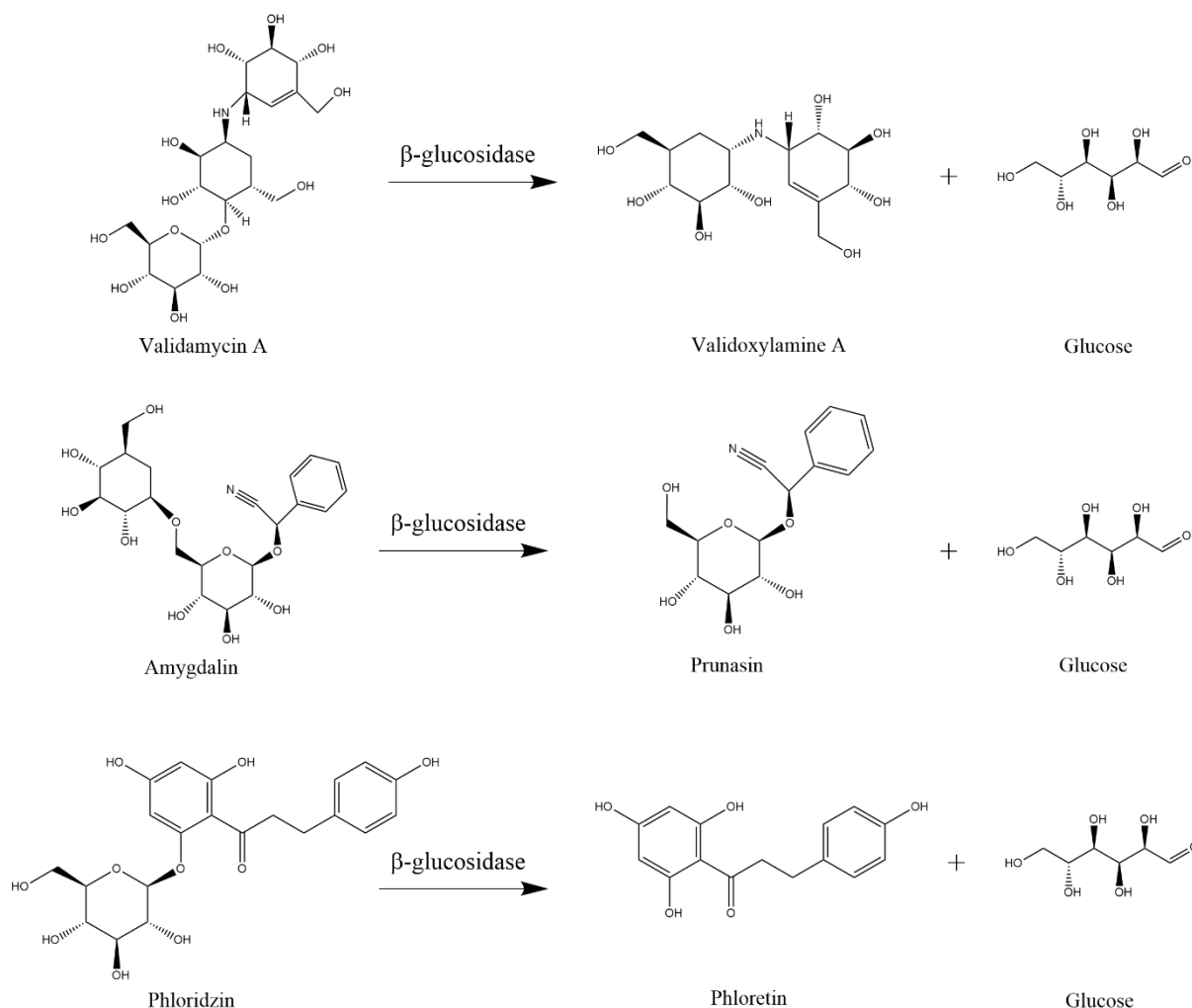


Figure 66: Hydrolyse par une  $\beta$ -glucosidase de la validamycine A, l'amygdaline et la phloridzine en validoxylamine A, prunasine et phlorétine.

La validoxylamine A s'est révélée être un inhibiteur de la tréhalase encore plus efficace que la validamycine A dans divers organismes (100x plus pour *Spodoptera frugiperda*), des micro-organismes aux mammifères<sup>267–269</sup>. Chez les insectes en particulier, cette activité a été mise en évidence chez les termites<sup>165</sup> et le lépidoptère *Spodoptera litura*<sup>250</sup>. La différence d'inhibition de la tréhalase entre la phlorétine et la phloridzine, ainsi qu'entre l'amygdaline et la prunasine, n'a pas fait l'objet d'études approfondies chez les insectes. Dans le cas de *Spodoptera frugiperda*, la prunasine s'est révélée moins efficace que l'amygdaline ( $K_i$  de 0.92 mM et 0.21 mM respectivement)<sup>189</sup>.

Au regard de l'hypothèse mentionnée ci-dessus, et afin de clarifier les activités observées des trois composés étudiés, des études de *docking* ont été réalisées à partir du modèle 3D, préalablement construit, de la structure tertiaire de l'ApTreh. Parmi les tréhalases dont la structure a été cristallisée, celle de la bactérie *Enterobacter cloacae* a été observée sous deux formes<sup>221</sup>, décrites comme "fermées" ou "ouvertes", c'est-à-dire avec ou sans l'inhibiteur validoxylamine A. Il a en effet été constaté que la « *lid loop* » subissait des changements de conformation lors de la liaison du ligand. Comme nous nous intéressons à la liaison des inhibiteurs, nous avons utilisé la forme fermée de notre modèle. Le *docking* moléculaire a d'abord été validé en utilisant la structure de la tréhalase d'*Enterobacter cloacae* complexée avec la validoxylamine (code PDB : 5Z66). Un très bon accord entre la validoxylamine ancrée

et la validoxylamine co-cristallisée a été trouvé, ce qui confirme notre protocole de *docking* (Figure 67).

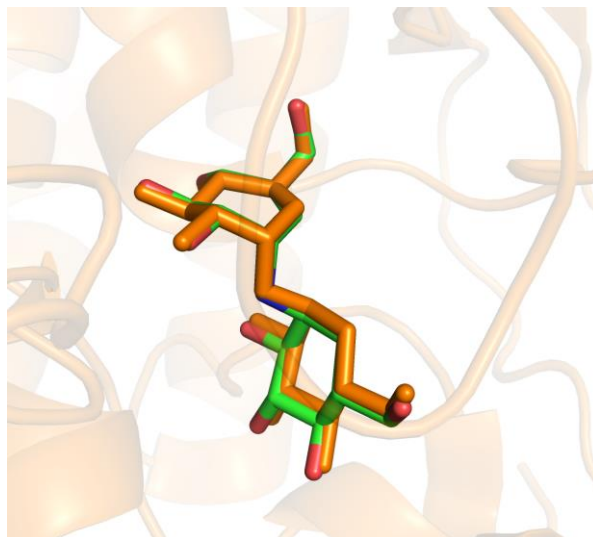


Figure 67: Docking de la validoxylamine A dans le modèle d'ApTreh-1 (vert) en comparaison avec la validoxylamine A co-cristallisée dans 5Z66 (orange)

Le *docking* des trois molécules non hydrolysées dans le modèle avec boucle fermée a mis en évidence de nombreuses contraintes stériques, aucune pose n'étant identifiée dans le site actif. Au contraire, la validoxylamine A, la phlorétine et la prunasine, les inhibiteurs hydrolysés, ont été ancrés avec succès dans le site actif fermé. Si l'on considère la fonction de score de liaison, la validoxylamine A s'est liée beaucoup plus fortement (score : 101.4) à la tréhalase que les deux autres (Figure 68A). En effet, plus la fonction de score est élevée, plus la liaison est forte entre l'inhibiteur et l'enzyme. En outre, la phlorétine (Figure 68B) (score : 67.0) semble avoir une affinité légèrement supérieure à celle de la prunasine (Figure 68C) (score : 61.3). Ces résultats concordent parfaitement avec leur activité *in vivo*.

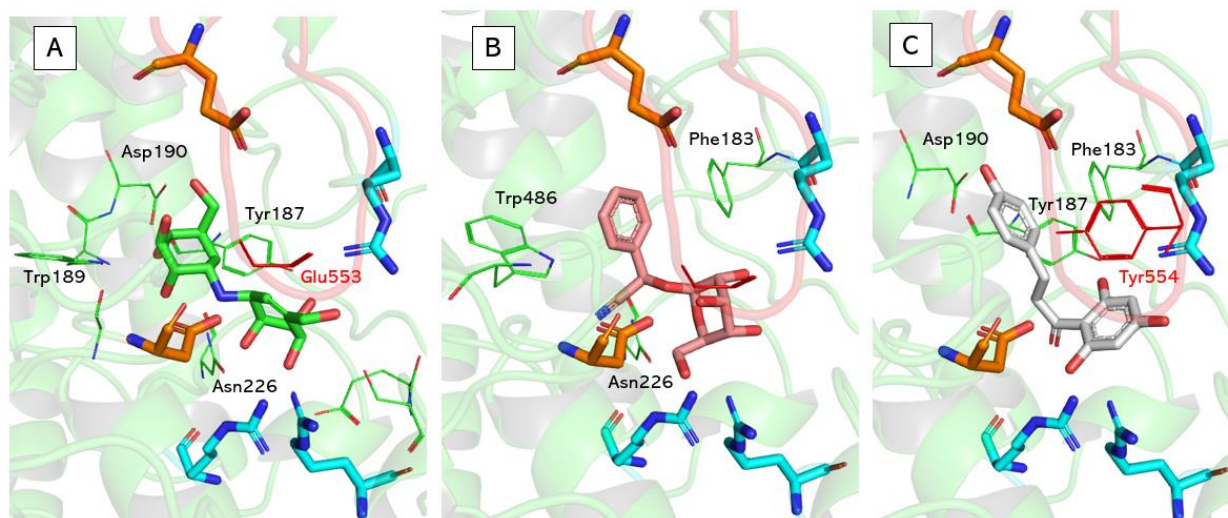


Figure 68: Docking de la validoxylamine A (A), de la phlorétine (B) et de la prunasine (C) au sein du site actif d'ApTreh-1 et représentation des interactions avec les acides aminés environnants (verts). Les résidus catalytiques sont représentés en oranges, les arginines en cyan et les résidus de la lid loop en rouge.

Une analyse détaillée des interactions entre les ligands et le site catalytique nous permet de comprendre la différence d'affinité des composés. Les hydroxyles du premier cycle de la

validoxylamine A forment plusieurs liaisons H avec Trp 189, Asp190, Gly334 (squelette) et Asp336, l'un des deux résidus catalytiques. L'amine secondaire au centre de la molécule se lie également à Asp336. Des liaisons H ont également été observées dans le deuxième cycle du sucre, impliquant Tyr187, Asn226, Glu302, Ser303, trois des arginines essentielles (Arg182, Arg235, Arg300), ainsi que Glu553, faisant partie de la *lid loop*. L'interaction OH...Glu553 serait responsable de la fermeture de la boucle de liaison, stabilisant le complexe validoxylamine A-protéine. Au total, c'est 12 liaisons H qui sont identifiées entre le ligand et l'enzyme. Dans le cas de la phlorétine, le groupement phénol interagit par liaison H et  $\pi$ - $\pi$ , avec l'Asp190 et la Phe183. Asp336, Arg182, Tyr187 forment des liaisons H avec la partie trihydroxylbenzène, tandis que le groupe CO forme une liaison H avec Arg235. Un contact CH... $\pi$  est observé entre Tyr554, qui se trouve dans la *lid loop*, et le trihydroxylbenzène. Au final, sept résidus dont cinq seulement sont impliqués par des liaisons H (stabilisent le complexe, bien moins en comparaison à la validoxylamine A. Cela explique le score de liaison plus faible de la phlorétine avec ApTreh. En ce qui concerne le cycle de la prunasine, il est lié de la même manière que le deuxième cycle de la validoxylamine A avec les 4 mêmes résidus (Asn226, Arg235, Arg300, Glu553) qui interagissent avec lui. Le groupe cyano possède une liaison H avec Trp486. Le cycle phényl, qui n'est pas impliqué dans les liaisons H, interagit via  $\pi$ - $\pi$  avec Phe183, de la même manière que la phlorétine. La prunasine, avec 6 résidus stabilisants, a une fonction de score similaire à celle de la phlorétine, bien que légèrement plus faible.

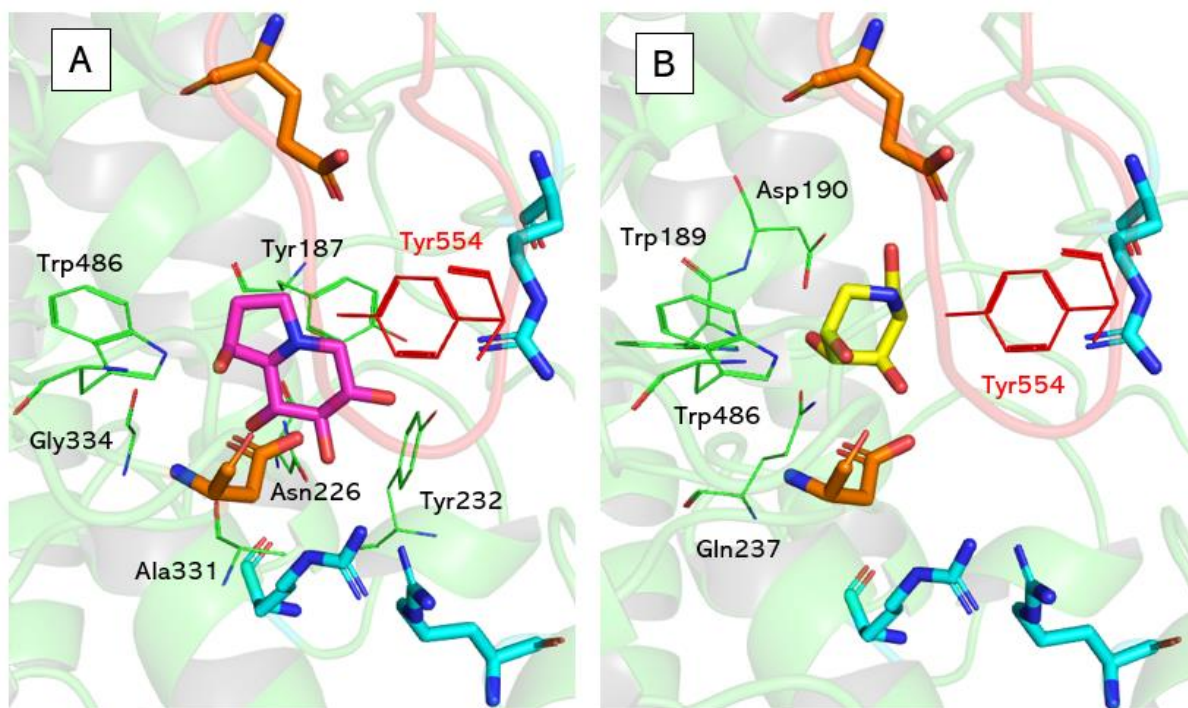


Figure 69: Docking de 1-deoxynojirimycin (A) et de la castanospermine (B) au sein du site actif d'ApTreh-1 et représentation des interactions avec les acides aminés environnants (verts). Les résidus catalytiques sont représentés en oranges, les arginines en cyan et les résidus de la *lid loop* en rouge.

Pour la castanospermine (Figure 69A) et la 1-DNJ (Figure 69B), la fonction de score obtenue est semblable (score : 54 et 53 respectivement). Cette valeur étant relative et dépendante de la taille des molécules (189 Da pour la castanospermine et 163 pour la 1-DNJ), elles ne sont pas comparables aux valeurs précédentes. 1-DNJ forme exclusivement des liaisons



H au sein du site actif, avec des acides aminés essentiels comme Tyr554 ou encore Asp336, mais également Trp189, Asp190, Gln327. Contrairement aux autres composés, aucune liaison n'est observée avec les arginines du site actif, la molécule ne s'étendant pas jusqu'à eux (situés à 7-8 Å). La castanospermine a un pont salin avec son amine tertiaire et Asp336 et forme des liaisons H supplémentaires en comparaison avec la 1-DNJ, avec Tyr187, Asn226, Tyr232, Arg235, Ala331, Gly334 et Trp486.

### 3. Analyse d'inhibiteurs naturels sur ApTreh-1

Une fois les inhibiteurs commerciaux analysés, l'objectif est d'identifier de nouvelles molécules ayant un effet inhibiteur sur ApTreh-1. Pour les inhibiteurs dits « naturels », il est possible d'explorer cette éventualité avec des souches de *Streptomyces*. C'est une bactérie filamenteuse Gram positive non pathogène appartenant à l'ordre des Actinomycètes, se développant par germination d'un spore en milieu solide. Différentes espèces de *Streptomyces* produisent naturellement de très nombreuses molécules présentant des structures chimiques et des activités biologiques très diverses, à l'origine de la production de près des deux tiers des antibiotiques commercialisés<sup>270</sup>. De nombreuses souches ont déjà été utilisées afin de mettre au point un bio-insecticide, par exemple pour le contrôle des moustiques<sup>271</sup>. L'une de ces espèces, *Streptomyces hygroscopicus*, est particulièrement intéressante dans le cadre de ce travail étant donné qu'elle est connue pour générer des métabolites inhibiteurs de tréhalase, comme la validamycine A et ses différentes formes<sup>272,273</sup> (Figure 70).

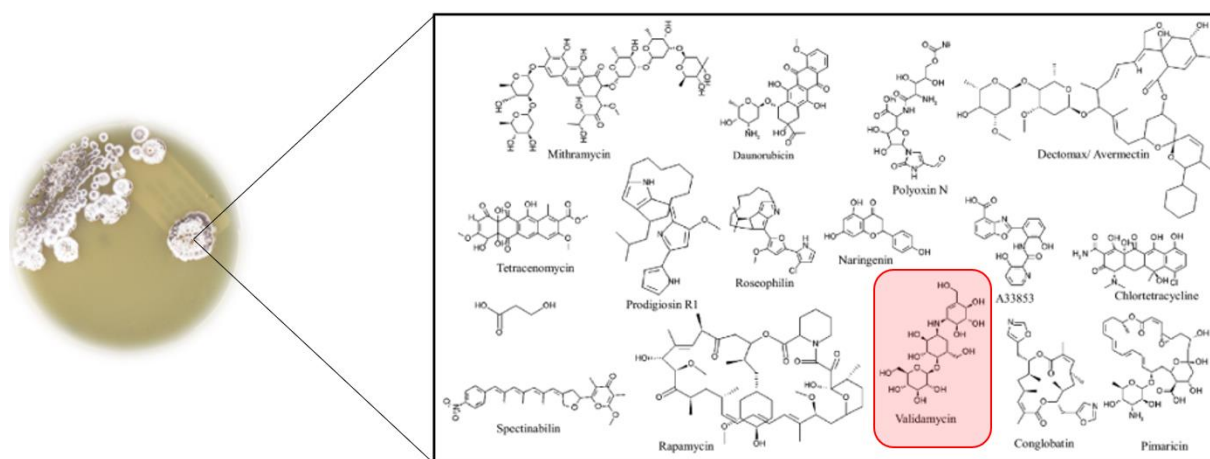


Figure 70: Liste non-exhaustive des métabolites produits par *Streptomyces hygroscopicus*

Une optimisation des conditions de cultures des souches de *Streptomyces* est dans un premier temps réalisée, avant de passer à l'identification des composés potentiellement inhibiteurs d'ApTreh-1.

#### 3.1.Optimisation des conditions de cultures des souches de *Streptomyces*

La culture des bactéries de types *Streptomyces* peut se faire de deux façons. La première est une culture sur milieu solide (contenant de l'agar) au cours de laquelle, après un certain temps, la bactérie va « sporuler » et produire certains métabolites secondaires d'intérêts. La seconde, une fois que la bactérie a sporulé, consiste à induire la culture en milieu liquide dans l'objectif d'augmenter les rendements de productions des métabolites secondaires.

Quatre milieux avec des compositions fortement différentes ont été choisis pour cultiver les souches de *Streptomyces* et ainsi étudier les composés produits dans chacune des conditions :

ISP2, ISP4, ISP7 qui sont des milieux spécifiques aux *Streptomyces* (créées lors du projet « *International Streptomyces Project* »<sup>274</sup>) et SFM (pour *Soya Flour Mannitol*), milieu également utilisé pour cultiver des *Streptomyces* (Tableau 13)

Tableau 13: Composition des différents milieux utilisés pour l'optimisation de la culture de *Streptomyces hygroscopicus*

ISP2		ISP4		ISP7		SFM	
Extrait de levure	4g	Amidon	10g	Glycérol	15g	Farine de soja	20g
Malt	10g	$K_2HPO_4$	1g	L-Tyrosine	0.5g	Mannitol	20g
Glucose	4g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1g	L-Asparagine	1g	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2.023g
Agar	20g	NaCl	1g	$K_2HPO_4$	0.5g	Agar	20g
		$(NH_4)_2SO_4$	2g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5g		
		$CaCO_3$	2g	NaCl	0.5g		
		Traces de sels*	1mL	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01g		
		Agar	20g	Traces de sels*	1mL		
				Agar	20g		

\* $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  /  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  /  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

Pour chacun des milieux, un test d'activité au DNS (voir chapitre 8.2) est réalisé pendant les deux semaines de culture, afin de vérifier si des métabolites inhibiteurs de tréhalase (comme la validamycine A) sont produits par les souches, avec des blancs pour éliminer l'interférence du glucose présents dans certains milieux (Figure 71).

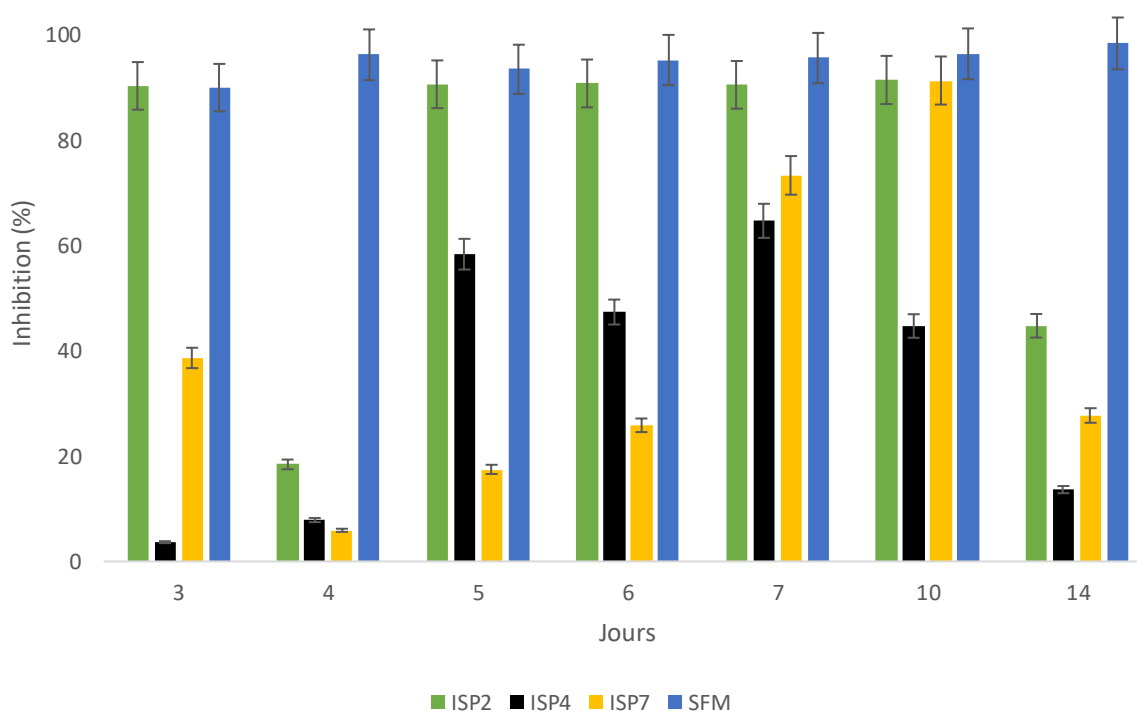


Figure 71: Pourcentage d'inhibition sur ApTreh-1 de pycnons des différents milieux en fonction des jours

On observe une efficacité générale croissante pour  $ISP7 > ISP4 > ISP2 > SFM$ . Ce dernier ressort particulièrement avec une inhibition constante de  $\sim 90\%$  sur toute la durée des analyses, tout comme le  $ISP2$  légèrement inférieur, mais avec quelques incohérences au 4<sup>ème</sup> et au 14<sup>ème</sup> jour. Le milieu  $ISP7$  présente une inhibition importante au 7<sup>ème</sup> et au 10<sup>ème</sup> jour uniquement, le reste étant relativement faible. Pour  $ISP4$ , une inhibition moyenne de  $\sim 50\%$  est présente pour les jours 5-6-7-10. La composition des métabolites produits en fonction du temps semble différer selon les conditions utilisées. Cependant, nous avons pu mettre en évidence le fait que de très faibles quantités de validamycine A, métabolite normalement produit par *S. hygroscopicus*, suffisent à inhiber totalement la réaction enzymatique ( $0.022 \text{ mg/L}$  pour  $50\%$  d'inhibition, correspondant à l' $IC_{50}$  déterminé précédemment). Il est important de déterminer si l'inhibition détectée ci-dessus est liée à la présence de validamycine A, ou bien à d'autres composés également inhibiteurs.

### 3.2. Analyse des milieux

En utilisant une technique de chromatographie ionique couplée à l'ampérométrie pulsée (HPAEC-DA), chaque culture contenant des métabolites inhibiteurs de tréhalase ont été analysés, pour les conditions de culture après 10 jours, étant donné que celle-ci présentait la meilleure inhibition en générale. Un échantillon de référence de validamycine A pure a d'abord été analysé afin de repérer à quel bande correspond le composé.

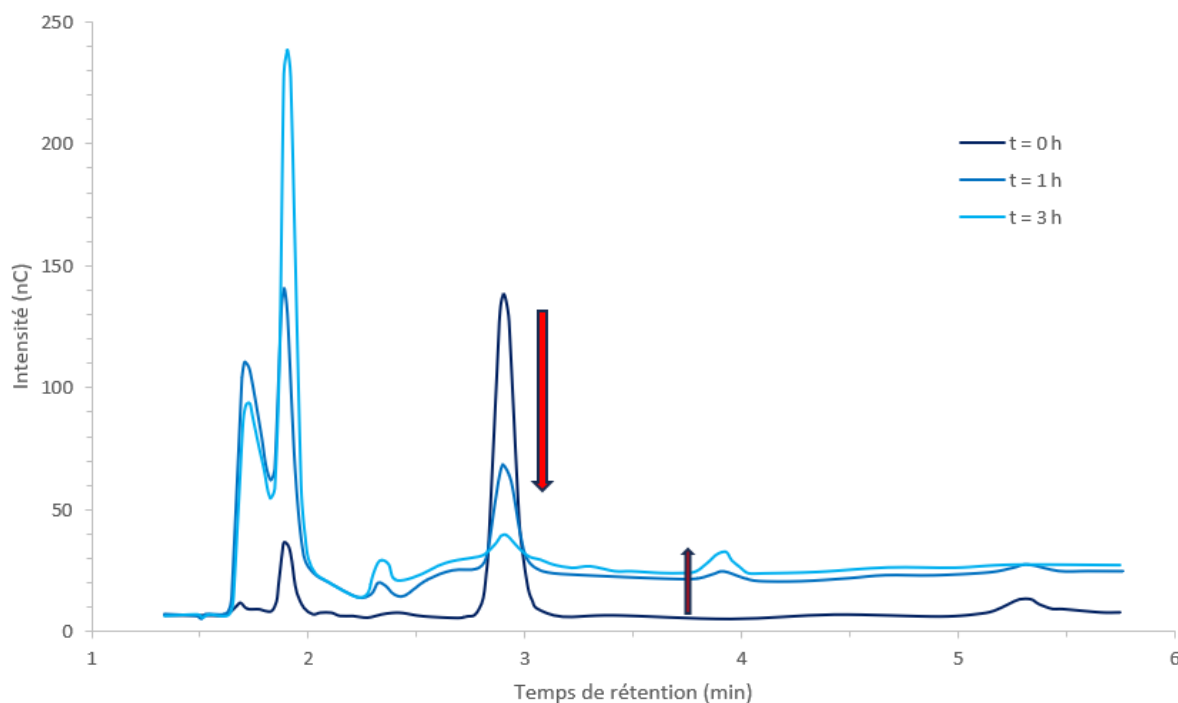


Figure 72: Analyse HPAEC-DA de la validamycine A en présence de  $\beta$ -glucosidase

Lors du passage de l'échantillon, deux bandes apparaissent: une première après 1.8 min correspondant au *flowthrough* de la colonne et une seconde après 2.9 minutes, correspond à la validamycine A (Figure 72). Ce dernier a été confirmé en incubant le composé en présence d'une  $\beta$ -glucosidase, hydrolysant le composé en glucose et en validoxyamine A, ce qui correspondrait à l'apparition de nouveaux pics à 2.4 et 3.9 minutes. Une fois la bande correspondant à la validamycine A identifiée, les échantillons contenant les métabolites inhibiteurs produits par *Streptomyces* dans les différents milieux étudiés sont analysés.



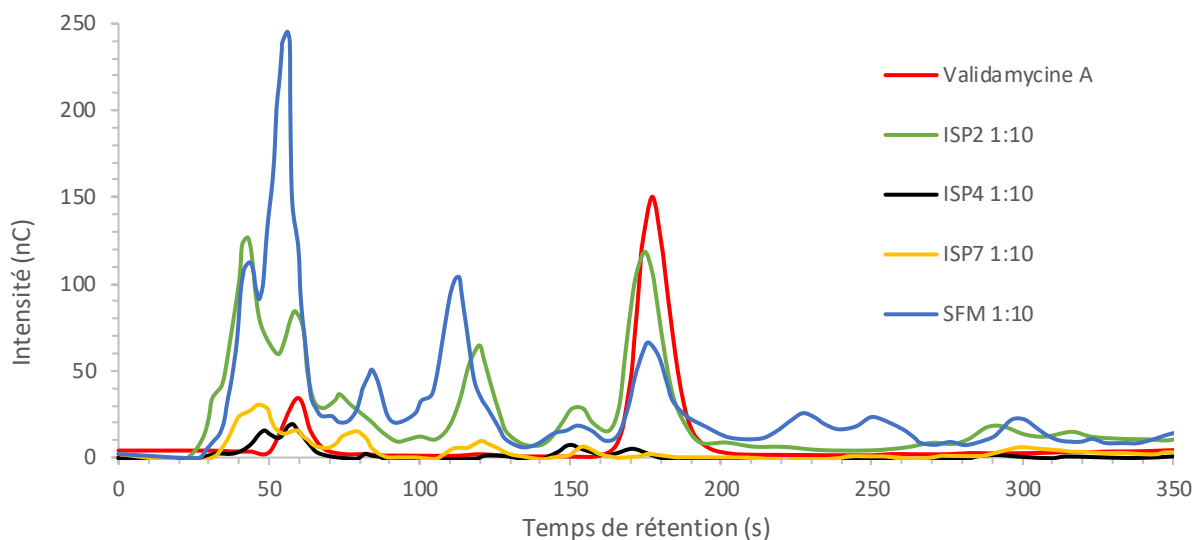


Figure 73: Analyse HPAEC-DA des différents milieux de cultures de *Streptomyces hygroscopicus*

On observe une bande très prononcée pour les milieux ISP2 et SFM vers 180s, tandis que pour ISP4 et ISP7, cette même bande est beaucoup moins importante, voir presque inexistante (Figure 75). Etant donné la complexité des différents milieux analysés sans traitement au préalable, de nombreuses autres bandes peuvent être observés à différents temps de rétention. Il n'est pas possible de pouvoir les identifier sans références, mais ces composés ont probablement des ressemblances avec les sucres étant donné la rétention sur la colonne utilisée. L'inhibition observée par le test d'activité sur chacun des milieux proviendrait donc majoritairement de la validamycine A dans les milieux ISP2 et SFM, mais pas pour les milieux ISP4 et ISP7. Ce dernier semble être un milieu très intéressant pour trouver de nouveaux inhibiteurs de tréhalase, étant donné qu'il présente une inhibition de l'ordre de ~90%, tout en produisant la plus faible quantité de validamycine A.

Une méthode de dosage de la validamycine A a ensuite été mise au point sur HPLC-HILIC afin de quantifier précisément sa concentration et ainsi établir son impact au sein des milieux (Figure 74). La technique HPAEC-DA ne permet pas une quantification précise d'un composé, plutôt utilisée pour une détermination qualitative de composés avec des références. De la validamycine A pure est analysée afin d'obtenir un spectre de référence et le temps d'élution du composé.

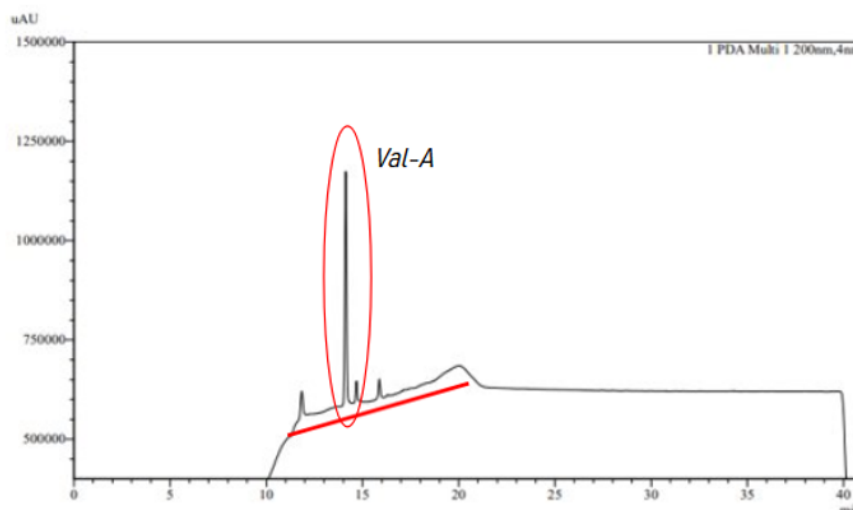


Figure 74: Analyse HPLC-HILIC de la validamycine A

Pour la quantification de la validamycine A avec cette méthode, la LOD (*Limit Of Detection*) et la LOQ (*Limit Of Quantification*) sont de 4.68 mg/L et 1.40 mg/L. On se situe donc à des valeurs beaucoup plus hautes que celles permettant d'observer une inhibition de la réaction, à savoir vers 0.02 mg/L pour 50% d'inhibition.

Une autre alternative a été de dériver la validamycine A par différentes méthodes afin de la détecter par d'autres méthodes, comme en GC-MS avec l'utilisation de N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) afin de réduire la LOD et la LOQ, l'ajout d'un groupement chromophore par l'acide phénylboronique ou le nitro-4-benzoyl chlorure pour une détection en HPLC-UV. Le procédé est décrit en Annexe 9, mais n'a malheureusement pas permis de détecter plus précisément de la validamycine A et donc de pouvoir identifier d'autres potentiels inhibiteurs de tréhalase dans les échantillons de *Streptomyces*.

### 3.3. Conclusion pour les inhibiteurs naturels

En conclusion, après optimisation de la culture de *S. hygroscopicus* dans différents milieux nutritionnels, certains se démarquent de par leur capacité inhibitrice élevée sur ApTreh, comme le milieu ISP7 et SFM. Le plus intéressant est ISP7 qui a le même taux d'inhibition que SFM, tout en ayant une quantité de validamycine A produite bien plus faible. Cela peut indiquer que d'autres métabolites sont présents dans les échantillons et peuvent se révéler être des composés intéressants en vue d'un bio-insecticide. Nos méthodes d'analyses ne permettent cependant pas de quantifier assez précisément la validamycine A pour confirmer cette hypothèse. Etant donné que l'approche pour l'identification d'un inhibiteur de provenance naturelle s'avère plus compliquée que prévu, l'autre approche pour l'identification de composés par criblage virtuel est envisagée.

# Chapitre 5

---

Identification d'inhibiteurs potentiels par criblage  
virtuel



## 1. Contexte

Bien que la recherche d'inhibiteurs naturels est une possibilité très intéressante de par sa diversité biologique, la découverte de nouvelles molécules ayant une interaction avec une cible spécifique (comme une enzyme ou un récepteur), peut également se faire en réalisant un criblage virtuel<sup>275,276</sup>. Cette technique de prédiction *in silico* utilise des algorithmes informatiques pour simuler et prédire les interactions moléculaires entre des composés chimiques et leur cible biologique. Cela permet d'évaluer virtuellement un grand nombre de composés, souvent des millions, en utilisant des bases de données de structures moléculaires disponibles. Grâce à ce principe, de nombreux inhibiteurs ont pu être découverts, comme pour les cholinestérases impliquées dans la maladie d'Alzheimer<sup>277</sup>, pour BRD4 (**BR**omo**D**omain) qui sont des lecteurs épigénétiques impliqués dans de nombreuses maladies<sup>278</sup> ou encore récemment afin d'identifier de potentielles molécules inhibitrices des protéases essentielles à la transformation protéolytique des polyprotéines virale lors de la pandémie causée par le virus SARS-CoV-2<sup>279</sup>. Cette méthode ne cesse de s'améliorer avec l'utilisation des intelligences artificielles pour augmenter l'efficacité des prédictions<sup>280</sup> ou bien avec l'utilisation de banques de données plus complètes et plus performantes, permettant la manipulation aisée des propriétés physico-chimiques des molécules recherchées<sup>281</sup>.

Dans le cadre de ce projet, bien qu'il existe de nombreuses banques de données de molécules à analyser, deux d'entre elles ont été utilisées pour leur accessibilité commerciale et pour leur diversité de composés : ZINC qui est l'une des plus connues et utilisées<sup>282</sup> et Chemdiv qui propose des libraires de composés commercialement disponibles et prêtes à l'emploi pour un criblage virtuel.

## 2. Criblage virtuel à partir de la banque de donnée ZINC

Pour se créer une banque de données plus réduite que les millions de composés disponibles dans ZINC, quelques propriétés importantes en « *drug design* » sont appliquées sur les molécules. La masse moléculaire est définie entre 250 et 400 Da, taille permettant aux molécules de se glisser aisément dans le site actif et respectant l'une des règles de Lipinski disant que les composés doivent être d'une taille <500 Da pour faciliter le passage à travers les barrières biologiques<sup>283</sup>. La validoxylamine A, qui est théoriquement le meilleur inhibiteur pour ApTre1 (la validamycine A est le meilleur inhibiteur déterminé expérimentalement et son produit d'hydrolyse est plus actif encore selon la littérature chez d'autres insectes), a une masse moléculaire de 335 Da, tandis que les composés de plus grande masse moléculaire comme l'amygdaline (457 Da) et la phloridzine (436 Da) présentent une activité inhibitrice moins importante. Un premier criblage virtuel a en effet montré que la presque totalité des composés avec une masse >450 Da ne rentrent pas dans le site actif.

Un autre paramètre appliqué est la lipophilicité des composés, caractérisée par la valeur du LogP, la mesure de la solubilité différentielle d'un composé chimique dans deux solvants, l'un polaire et l'autre apolaire (généralement l'eau et l'octanol). Cette valeur peut aider à prévoir le transport probable d'un composé dans l'organisme et affecte également la formulation, le dosage et la toxicité. Par exemple, un médicament ciblant le système nerveux central devrait idéalement avoir une valeur de LogP d'environ 2. Pour l'absorption orale et intestinale, la valeur est de 1,35-1,8, tandis qu'un médicament destiné à l'absorption sublinguale devrait avoir un LogP>5. Pour ce criblage virtuel, la gamme est placée de -1 à 3 afin de couvrir une large gamme de composés respectant l'une des règles de Lipinski.

Tableau 14: Récapitulatif des caractéristiques des composés ZINC pour le criblage virtuel. Les paramètres horizontaux sont les masses moléculaires et les paramètres verticaux sont les valeurs de LogP des molécules.

Paramètres	250-299	300-324	325-349	350-374	375-399	Nombre de composés (LogP)
-1- -0.01	23	62	26	19	5	135
0-0.99	96	100	93	47	48	384
1-1.99	425	488	357	213	224	1725
2-2.49	790	1129	661	443	927	3950
2.5-2.99	470	834	638	1003	1040	3985
3	834	882	625	1333	1652	4904
Nombre de composés (masse)	2216	3495	2400	3076	3896	15083

Au final, ce sont 15083 composés (Tableau 14) dont le mode de liaison dans le site actif d'ApTreh-1 est évalué, avec une répartition équilibrée pour les masses moléculaires étudiées, mais peu de composés ayant une valeur de LogP inférieur à 1. Les détails des données obtenues pour le criblage virtuel des 40 meilleurs composés (possédant la meilleure fonction de score) sont présents dans l'Annexe 10. Parmi ces derniers, seuls 6 (Figure 75) étaient réellement disponibles commercialement et ont donc été évalués. ZC1, ZC2, ZC3, ZC4, ZC5 et ZC6 sont 11<sup>ème</sup>, 22<sup>ème</sup>, 21<sup>ème</sup>, 27<sup>ème</sup>, 1<sup>er</sup> et 8<sup>ème</sup> respectivement dans le classement de la fonction de score obtenue.

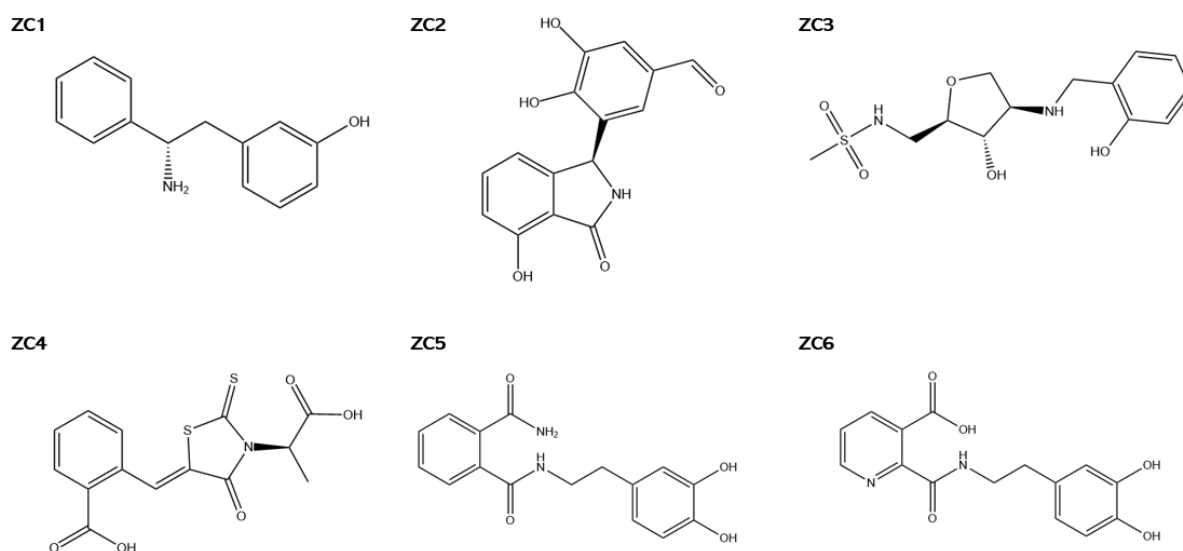


Figure 75: Structures des molécules obtenues après criblage virtuel sur la banque de données ZINC

Globalement, les composés possèdent une structure relativement similaires, avec la présence importante de cycles aromatiques, de fonctions hydroxyles et d'une fonction amide/amine au centre de la molécule. Pour les composés ZC4 et ZC6, on retrouve également une fonction acide carboxylique lié à un cycle aromatique. Quelques atomes de soufre sont présents, pour former une fonction sulfonamide dans le composé ZC4 présente dans le cycle ou bien en extrémité de chaîne comme dans le composé ZC3.

### 3. Criblage virtuel à partir de la banque de donnée Chemdiv

La firme Chemdiv propose des librairies de composés préétablies sur base de nombreux critères. Pour ce criblage virtuel, nous avons utilisé une librairie générale (« *300k Representative Compounds Library* ») qui utilise la méthode Bemis-Murcko afin de réduire la complexité des 1.6M de composés proposés. C'est une approche de simplification moléculaire largement utilisée pour analyser et classer les composés chimiques. Cette méthode vise à réduire la complexité des structures moléculaires en identifiant et en conservant uniquement les fragments essentiels et structurellement significatifs des molécules. En pratique, cela implique de décomposer les molécules en leurs sous-structures fondamentales, appelées motifs de Bemis-Murcko, en éliminant les substituants et les groupes fonctionnels périphériques. Cette simplification permet de réduire l'espace chimique à explorer lors du criblage virtuel, facilitant ainsi l'identification de composés prometteurs pour des activités biologiques spécifiques<sup>284</sup>. D'autres filtres sont appliqués sur les molécules pour supprimer les motifs trop réactifs, toxiques ou indésirables (REOS, MedChem, PAINS), des filtres appliquant les règles de Lipinski et d'autres algorithmes (Tanimoto, ECFP4, 2048 bits) pour réduire la proposition à 300.000 composés.

Les 300.000 composés ont été réduits à une proposition finale de 5303 molécules à utiliser pour le criblage sur ApTreh-1, sur base de nos propres propriétés physico-chimiques : une masse moléculaire située en 250 et 500 Da (comme pour la banque de données ZINC, il est intéressant de tout de même étudier le comportement des molécules avec une masse >400 Da), un LogP situé entre -7.6 et 1 (seules 7 molécules ont un LogP < -3, elles sont donc incluses étant donné que cela ne rallonge en rien le criblage virtuel) et une nouvelle valeur calculable théoriquement, le LogS qui représente la solubilité du composé dans l'eau et est mis entre -2 et 3.5. Parmi les 110 meilleurs résultats, 61 étaient disponibles à l'achat, dont les données obtenues sont présentes dans l'Annexe 11. Pour une facilité de présentation, les composés sont repris ci-dessous dans une plaque 96 puits et sont alors dénommés selon leur position dans la plaque (Tableau 15).

Tableau 15: Récapitulatif de la nomenclature utilisée pour les composés obtenus après criblage virtuel de la banque de données Chemdiv

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	X	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
B	X	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9
C	X	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
D	X	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
E	X	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
F	X	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	X
G	X	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	X
H	X	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	X

Où X représente un puits vide.

### 4. Etude d'efficacité des inhibiteurs obtenus par criblage virtuel sur ApTreh-1

Lors de la solubilisation des composés dans un mélange de tampon acétate 0.2M pH = 5 (permettant de travailler au pH optimum de l'enzyme) et de DMSO, certains ont présenté une très bonne solubilité sans ajout au préalable de DMSO (Tableau 16, fond en vert), tandis que certains n'ont jamais été solubilisés entièrement malgré l'ajout progressif de DMSO ou alors ont précipité après conservation au frigo/congélateur (Tableau 16, fond en rouge). Selon une analyse des composés par SwissADME<sup>285</sup>, les neuf composés concernés (C2-G2-C3-F4-A6-

D5-A8-H8-B9) sont théoriquement solubles dans l'eau selon trois prédicteurs (ESOL, Ali, SILICOS-IT), mais cela n'est pas reflété expérimentalement. Pour des raisons pratiques, chaque composé ayant présenté une solubilité totale dans le tampon acétate a tout de même été porté à 50% DMSO, afin de comparer dans les mêmes conditions opératoires les différents composés. Le tableau suivant reprend les concentrations finales (en mM) de chacun des composés, ainsi que le pourcentage de DMSO présent au sein de l'échantillon. Les composés provenant du criblage virtuel de ZINC sont rajoutés dans la dernière colonne.



Tableau 16: Récapitulatif de la concentration finale d'inhibiteur des composés obtenus après criblage virtuel de la banque de données Chemdiv et le pourcentage final en DMSO de l'échantillon. Le fond vert représente les échantillons ayant une bonne solubilité directement dans du tampon acétate, tandis qu'un fond rouge indique un problème de solubilité lors de la préparation, ou bien après conservation au frigo ou au congélateur. Le reste des composés se sont solubilisés avec l'ajout progressif de DMSO.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	ZINC
A	X	5mM 75% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	5mM 75% DMSO	3.4mM 83% DMSO	10mM 50% DMSO	3.4mM 83% DMSO	5mM 75% DMSO	<u>ZC1</u> 2mM 100% DMSO
B	X	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	5mM 75% DMSO	10mM 50% DMSO	<u>ZC2</u> 2mM 100% DMSO
C	X	10mM 50% DMSO	5mM 75% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	5mM 75% DMSO	<u>ZC3</u> 2mM 100% DMSO
D	X	5mM 75% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	5mM 75% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	<u>ZC4</u> 2mM 100% DMSO
E	X	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	5mM 75% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	<u>ZC5</u> 2mM 100% DMSO
F	X	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	4mM 80% DMSO	5mM 75% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	X	<u>ZC6</u> 2mM 100% DMSO
G	X	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	5mM 75% DMSO	5mM 75% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	X	X
H	X	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	10mM 50% DMSO	X	X

Afin d'obtenir les résultats les plus précis possibles pour l'analyse du pourcentage d'inhibition de chacun de ces composés, nous avons collaboré avec l'ULiège et la plateforme Robotein®, permettant d'automatiser le test et réduire les erreurs expérimentales classiques liées à l'utilisateur. Cette plateforme a déjà fait ses preuves pour de larges criblages de conditions de pH et de tampons dans l'environnement de protéines<sup>286</sup>. Après une optimisation des conditions opératoires, une forte variabilité du test enzymatique a cependant été observée au sein d'une même série d'analyse de 48 échantillons, à raison d'un écart type sur la moyenne de  $0.572 \pm 0.08$  d'absorbance (soit 14% de la moyenne) et une plage de valeurs s'étendant de 0.459 et 0.684. Une telle variabilité sur les résultats malgré l'utilisation d'un robot performant, limitant la marge d'erreur de l'expérimentateur, laisse à penser que le test enzymatique au DNS présenterait un problème de variabilité, notamment en travaillant dans des faibles volumes comme c'est le cas dans ces conditions. Lors des tests enzymatiques pour la caractérisation biochimique et cinétique, les volumes utilisés sont 4x plus importants, limitant potentiellement la variabilité du test.

L'étude d'inhibition des composés obtenus par criblage virtuel a donc été réalisée avec l'utilisation d'un kit commercial permettant de doser précisément le glucose au sein d'un échantillon plutôt que d'utiliser la méthode DNS, afin de s'assurer d'obtenir des résultats exploitables. La variabilité de l'échantillon a été testée sur 16 mesures, pour un écart type sur la moyenne de  $0.44 \pm 0.02$  en absorbance, soit 4x moins que le test au DNS. Il est donc possible de se baser sur ce test pour déterminer un pourcentage d'inhibition pour chacun des composés obtenus. Ceux-ci sont repris dans le Tableau 17.

Tableau 17: Pourcentage d'inhibition des inhibiteurs synthétiques sur ApTreh-1. Le fond vert indique les 10 meilleurs inhibiteurs.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	ZINC
A	X	23,9	0,8	23,7	23,9	-7,5	0,5	7,7	-2,6	0,8
B	X	35,0	-10,0	32,1	26,0	0,3	45,0	28,5	3,6	19,5
C	X	10,3	-7,5	20,6	39,1	14,9	40,6	11,6	-7,2	11,1
D	X	17,0	-4,1	13,6	14,4	0,8	18,5	42,7	-5,9	5,7
E	X	16,5	9,5	6,2	-8,7	-5,9	19,0	35,0	30,6	39,9
F	X	33,4	5,1	8,0	-3,3	-8,5	29,8	25,4	X	25,0
G	X	8,5	-34,2	-10,8	2,1	-7,7	43,2	4,6	X	X
H	X	16,7	3,9	-5,7	-16,2	-28,0	19,5	-1,8	X	X

En dehors du composé ZC5 qui présente une inhibition de 39.9% pour une concentration de 0.2 mM, les autres composés inhibent à hauteur de 32-45% la tréhalase pour une concentration de 1 mM, soit 5x plus que ZC5, étant donc le meilleur inhibiteur de ces deux criblages virtuel. Les structures des meilleurs inhibiteurs sont représentées ci-dessous. En comparaison, dans les mêmes conditions opératoires et de concentration, la validamycine A, la castanospermine et 1-deoxynojirimycin présentent toutes les trois 100% d'inhibition. Les composés mis en évidence lors de cette étude peuvent donc être considérés comme des « *hits* », des molécules avec des propriétés physico-chimiques intéressantes et montrant un caractère inhibiteur de l'enzyme étudiée (Figure 76).

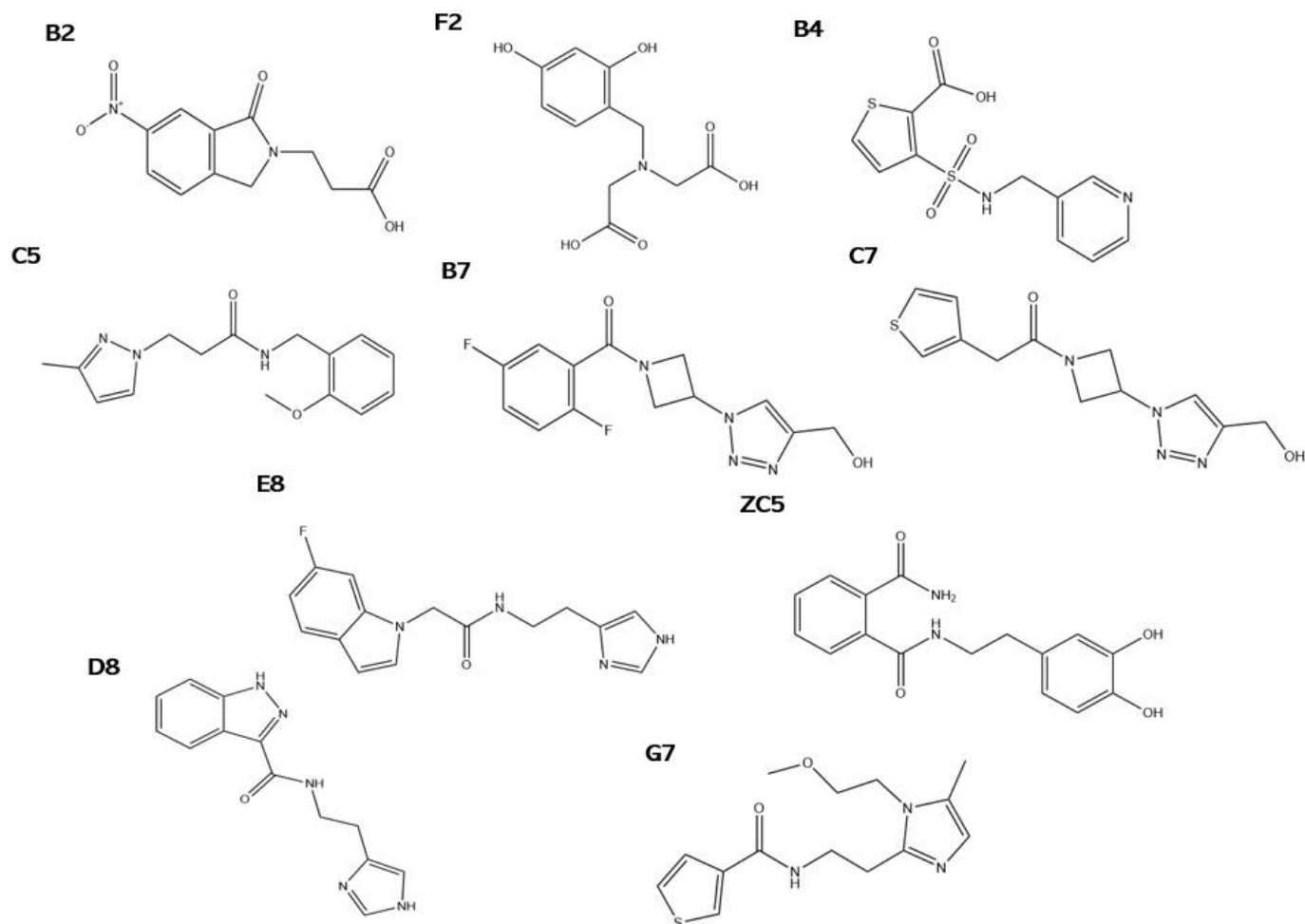


Figure 76: Structure des 10 meilleurs inhibiteurs d'ApTreh-1 obtenus après criblage virtuel.

Le détail des interactions pour chacun des composés au sein du site actif est repris dans l'annexe 12. Globalement, les molécules sont composées de un ou deux cycles, permettant des liaisons de type  $\pi$ -stacking ou  $\pi$ -cation, de groupements hydroxyles, éthers ou acide carboxylique situés aux extrémités permettant la formation de nombreuses liaisons H. Mis à part pour le composé F2, une fonction amide (ou sulfonamide) est présente au centre de la molécule. Le tableau 18 résume l'ensemble des interactions de ces 10 composés.

Tableau 18: Récapitulatif des interactions des 10 hits au sein du site actif d'ApTreh-1

Interactions hydrophobes	Liaisons hydrogènes	Pont salin*	$\pi$ -stacking	$\pi$ -cation**
Lys67	Arg182	Asp190	Phe183	Arg182
Pro179	Trp189	Glu302	Tyr187	
Phe183	Asp190	Asp336		
Tyr187	Asn226	Glu553		
Tyr232	Arg235			
Glu302	Gln237			
Ala331	Arg300			
Trp492	Ser303			
Tyr554	Gly334			
Phe560	Asp336			
Trp562	Gln485			
	Trp486			
	Glu553			
	Tyr554			

\* Présents uniquement pour les composés F2 et B4

\*\* Présent uniquement pour le composé E8

Comme pour les inhibiteurs commerciaux dont l'activité inhibitrice importante a été démontrée expérimentalement, on retrouve des interactions essentielles chez ces composés, à savoir l'interaction i) avec les 3 arginines (Arg182, Arg235 et Arg300), ii) le résidu catalytique Asp336, iii) les acides aminés mobiles de la *lid loop* (Glu553 et Tyr554) iv) ainsi que de nombreux aromatiques interagissant avec les cycles des composés. Si l'on compare ces résultats avec les interactions identifiées au sein du site actif d'ApTreh-1 avec la validoxylamine A et ZC5, on remarque de grandes ressemblances au niveau des interactions et de l'encombrement stérique au sein du site actif, notamment avec des liaisons présentes pour les deux ligands aux acides aminés Arg182, Asn226, Tyr232, Arg300, Ser303 et Tyr554 (Figure 77).

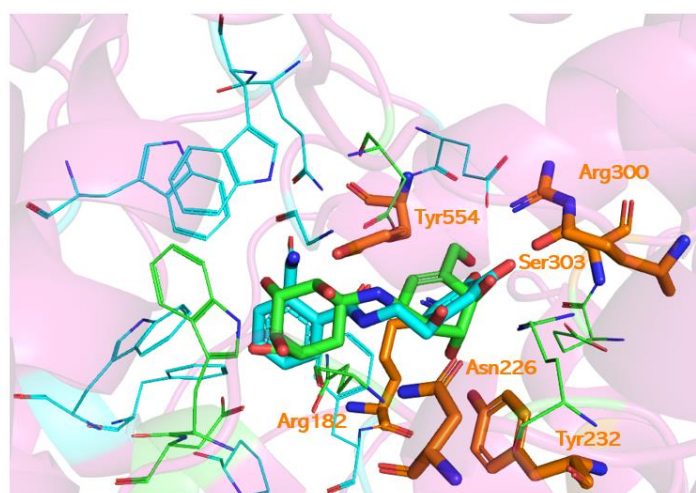


Figure 77: Interactions au sein du site actif avec la validoxylamine A (vert) et ZC5 (bleu). Les acides aminés interagissant de manière commune aux deux composés sont en oranges.

Pour aller un peu plus loin dans l'analyse expérimentale des composés ayant présentés une inhibition intéressante de la tréhalase, l'affinité de ces derniers pour le site actif de la tréhalase

a été analysé par fluorimétrie différentielle à balayage (**Differential Scanning Fluorimetry**). Dans cette méthode, les protéines sont incubées avec un colorant fluorescent (dans ce cas-ci, le SYPRO orange, Figure 78) qui voit sa fluorescence augmenter en se liant aux régions hydrophobes des protéines, lorsqu'elles sont dénaturées par la montée en température progressive de l'échantillon.

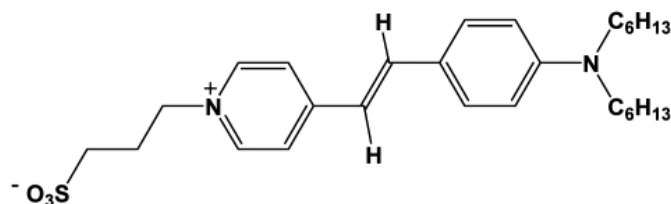


Figure 78: Structure chimique du SYPRO Orange

A partir des données de fluorescence récoltées en fonction de la température, une  $T_m$  (*Melting temperature*) peut être calculée au point d'inflexion de la courbe obtenue, donnant une indication sur la stabilité de la protéine. En présence d'un ligand, si cette valeur vient à diminuer, ou augmenter, le couple protéine-ligand déstabilise ou stabilise la protéine.<sup>287</sup>. Cette méthode est régulièrement utilisée en *drug design* afin de mettre en évidence une interaction ligand-protéine sans devoir passer par des méthodes plus contraignantes comme un titrage isothermique calorimétrique (ITC)<sup>288</sup>.

Les composés sélectionnés à partir du criblage virtuel ont donc été analysés, à une concentration de 5 mM, ce qui équivaut au  $K_m$  d'ApTreh-1 (excepté ZC5 qui est à 1 mM), afin de pouvoir observer une éventuelle variation du  $T_m$  de la tréhalase. Les variations de  $T_m$  sont déterminées en calculant la dérivée première de la courbe (Figure 79).

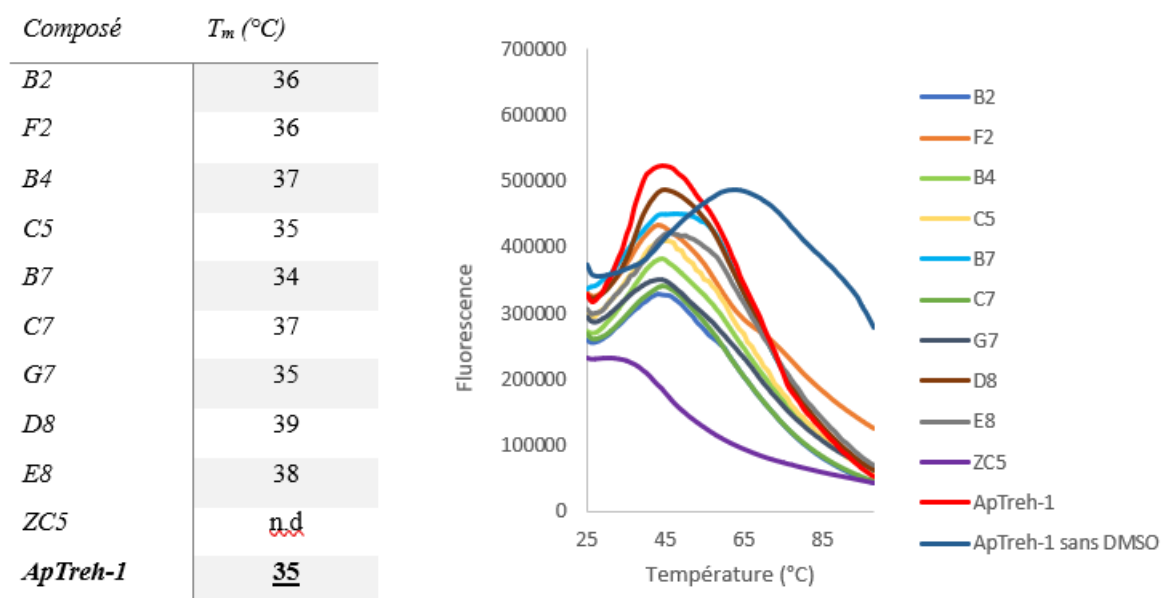


Figure 79: Graphe DSF et  $T_m$  pour chaque hits obtenus par criblage virtuel

La courbe DSF obtenue pour ApTreh-1 avec 25% DMSO et sans sa présence met en évidence l'importance du milieu environnant, pouvant impacter très fortement la valeur du  $T_m$ . On peut remarquer en effet une diminution de l'ordre de 10°C pour notre enzyme. Ce phénomène est décrit dans la littérature, où l'on retrouve un comportement typique pour le

DMSO, provoquant une augmentation de l'intensité de fluorescence pour le pic de la courbe et une diminution de la  $T_m$ <sup>289,290</sup>. Cette analyse donne une information supplémentaire sur la stabilité de la protéine, qui commence sa dénaturation à 45°C dans un milieu sans DMSO. Cela confirme par ailleurs que l'étude de l'enzyme à 37°C permet d'être dans des conditions non-dénaturantes.

Concernant les inhibiteurs, on observe pour chacun des composés, exceptés C5 et G7, une légère augmentation de la  $T_m$ , ce qui indique qu'il y a bien une interaction stabilisante entre ApTreh-1 et l'inhibiteur. Une légère diminution de la  $T_m$  est observée pour B7. Pour le composé ZC5, la courbe obtenue ne permet pas le calcul d'une  $T_m$ , sachant que les composés B2 à E8 sont dans 25% DMSO, tandis que ZC5 est à 50% de DMSO, ce qui pourrait expliquer l'allure de sa courbe non utilisable. Malgré l'influence importante du DMSO au sein des échantillons, un léger déplacement du  $T_m$  reste intéressant et prouve qu'il y a bien interaction entre ApTreh-1 et les différents composés. D8, par exemple, présente une inhibition > 40% et une  $\Delta T_m$  par rapport à ApTreh-1 la plus importante, indiquant une stabilisation plus importante du complexe formé entre les deux. Au contraire, C5 et G7 présentent 39 et 43% d'inhibition respectivement, mais aucun changement dans les valeurs de  $T_m$  n'est observé, possiblement caché par l'influence du DMSO présent dans le milieu.

# Chapitre 6

---

Conception d'un pharmacophore et modifications  
chimiques





## 1. Description du pharmacophore

Sur base des composés ayant montré une activité inhibitrice vis-à-vis de l'ApTreh-1, il est intéressant de mettre en évidence les groupements fonctionnels communs à ces molécules, ce qu'on appelle un « pharmacophore ». Il s'agit d'une représentation géométrique de différents groupements présents dans les molécules qui seraient importants pour l'inhibition de la tréhalase. Si on analyse les hits (= molécule ayant une activité inhibitrice sur l'enzyme ciblée) obtenus précédemment, il est possible d'observer de nombreuses similarités (Figure 80) : i) un premier cycle aromatique, étant majoritairement un benzène ou bien un thiophène (C7 et G7), ou un groupement indoline (B2 et E8) ; ii) Un autre cycle aromatique exceptés pour B2 et F2, généralement un cycle imidazole à l'exception de ZC5 qui comporte un second benzène ; iii) Au centre des molécules, une fonction amide (ou sulfonamide) cyclique ou non, à l'exception de F2. Il s'agit d'un groupement accepteur et donneur de H. Enfin, sur les cycles aromatiques, on retrouve quelques groupements supplémentaires : des hétéroatomes (F pour B7 et E8) et quelques groupements polaires (-NO<sub>2</sub> pour B2, -OH pour F2), ou bien encore des groupements -OH/-COOH.

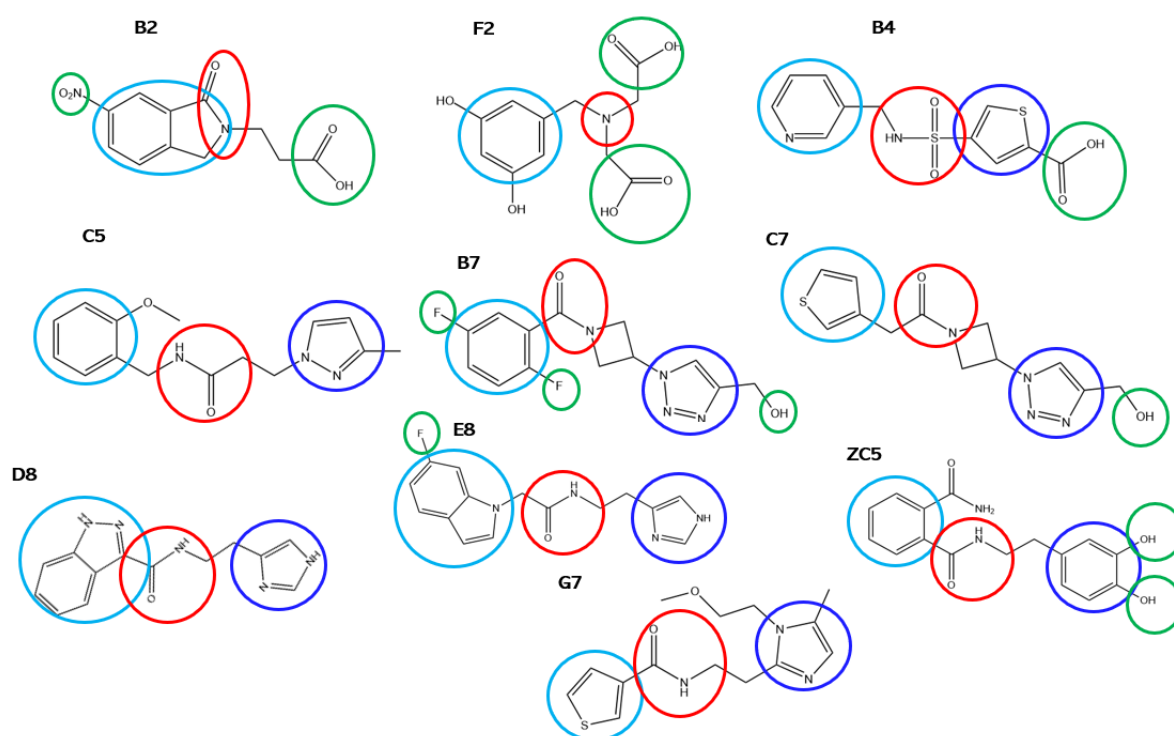


Figure 80: Groupements communs aux hits obtenus par criblage virtuel. Le premier cycle aromatique est représenté en bleu clair; le second cycle en bleu foncé. Le groupement donneur/accepteur de H est représenté en rouge, tandis que les groupements supplémentaires situés sur les cycles sont indiqués en vert.

Sur base de ce pharmacophore, on identifie clairement les deux sous-sites décrits dans la littérature pour le mécanisme d'action de la tréhalase (voir point 7.2 du chapitre 1). Un premier cycle se lie majoritairement par des liaisons  $\pi$ - $\pi$  à de nombreux acides aminés aromatiques situés dans un rayon de 5.7 Å en moyenne, ce qui constitue le « sous-site de reconnaissance ». Situé à une distance moyenne de 6.7 Å (5.3 à 7.6 Å), le second cycle représentant le « sous-site catalytique » comprend des interactions de type  $\pi$ -cations avec les arginines (Arg182, Arg235, Arg300) essentielles à l'activité enzymatique. Au centre, à 3.5 Å (2.9 à 4.7 Å) du premier cycle et 3.8 Å (2.8 à 5.2 Å) du second, un soufre ou un azote sous forme d'amide, ou bien inclus dans

un cycle, forment des liaisons hydrogènes avec des groupements polaires (Gln237, Asn226, Ala331) et également des résidus importants, comme Asp336 (résidu catalytique) et Tyr554, présent dans la *lid loop* mobile. On remarque également en analysant la surface des molécules que la presque totalité du site actif est occupé par les composés et très peu de poches libres subsistent après liaison (Figure 81).

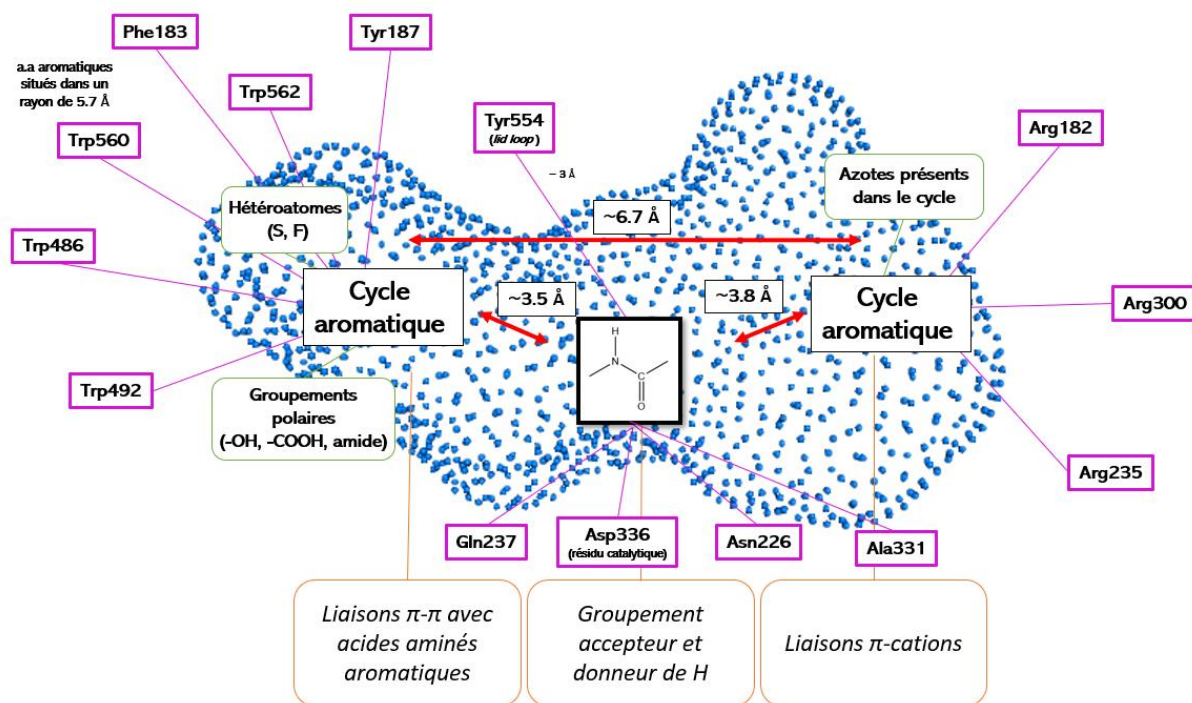


Figure 81: Pharmacophore détaillé d'un inhibiteur de tréhalase. Les pointillés bleus indiquent la surface occupée par les ligands au sein du site actif.

Cependant, ce pharmacophore n'est qu'une hypothèse et ne s'applique pas strictement à chaque composé (Figure 82). La validoxylamine A, par exemple, n'est pas constitué de cycles aromatiques à ses extrémités, mais de simples cycles. Il n'y a donc pas d'interactions  $\pi$ - $\pi$  avec les acides aminés aromatiques du côté du sous-site de reconnaissance, ni de  $\pi$ -cations dans le sous-site catalytique, mais de nombreux groupements -OH sont présents afin de réaliser des liaisons H à la place.



Figure 82: Structure des inhibiteurs commerciaux étudiés dans cette thèse ne collant pas au pharmacophore établi sur base du criblage virtuel

Autre observation intéressante, la castanospermine ressemble à la molécule B2 et le 1-DNJ quant à lui ressemble à F2, avec un seul cycle présent (et non aromatique). Ces composés ne

collent pas exactement à l'hypothèse pharmacophore, mais possèdent néanmoins un fort effet inhibiteur de tréhalase. Il est intéressant de rappeler que lors de la liaison au sein du site actif, il y aurait des modifications de conformation de l'enzyme, permettant éventuellement à ces plus petites molécules de réaliser d'autres interactions que celles observées par docking. La castanospermine et le 1-DNJ sont modélisés au niveau du sous-site de reconnaissance, entourés des acides aminés aromatiques de cette zone, tandis que les composés tels que B2 et F2 eux sont modélisés au sein du sous-site catalytique.

Des études indiquent que les plus petits composés du genre dérivés glycosylés d'iminosucres pyrrolizidiniques présentent une meilleure sélectivité pour les tréhalases d'insectes comparés aux pseudo-disaccharides comme la validoxylamine A qui touche également fortement les tréhalases de mammifères, bien que les résultats *in vivo* ne corrélaient pas exactement avec les analyses *in vitro*<sup>291</sup>.

## 2. Optimisation du pharmacophore et modifications chimiques

En vue d'une étude plus complète pour améliorer l'hypothèse de pharmacophore des inhibiteurs de tréhalase, la surface accessible du site actif de l'enzyme est étudiée afin d'identifier d'éventuels cavités disponibles pour apporter des modifications chimiques aux molécules en vue d'augmenter les interactions ligand-protéine et ainsi augmenter leur efficacité et leur spécificité envers l'enzyme étudiée.

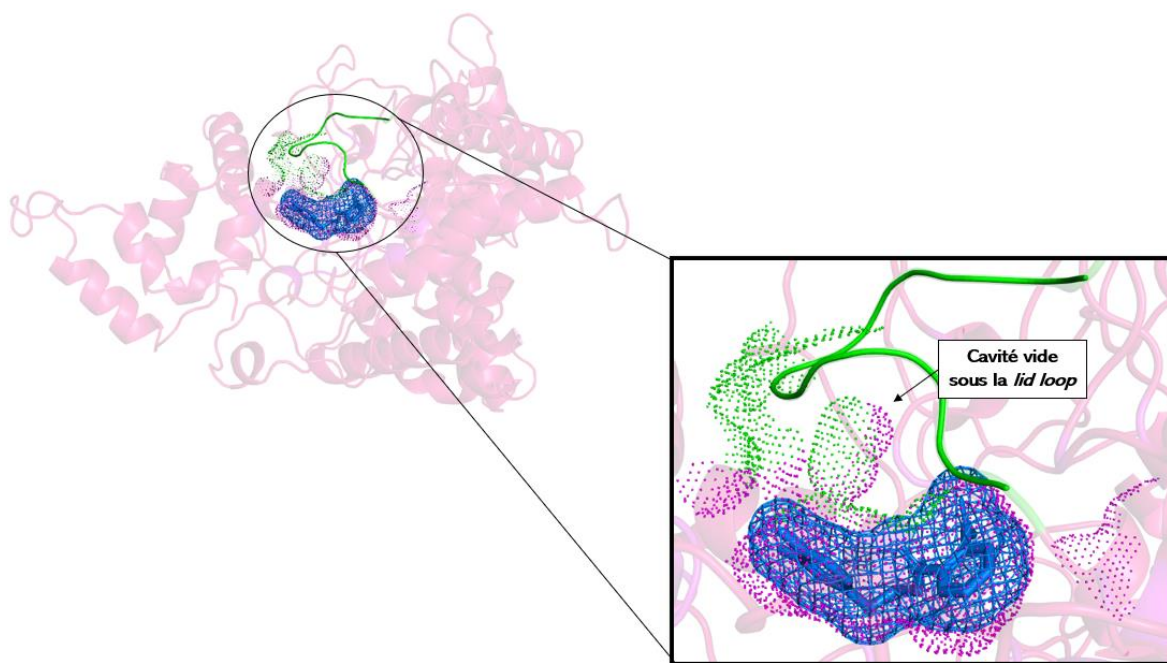


Figure 83: Représentation de la cavité vide située sous la lid loop. La surface des ligands dans le site actif est représentée en bleu, celle des acides aminés dans un rayon de 10 Å en magenta et les acides aminés de la boucle catalytique en vert

En visualisant la surface des molécules dockées au sein du site actif et la surface accessible au solvant des acides aminés dans un rayon de 10 Å autour du ligand, on observe sous la *lid loop* une petite cavité de 2-3 Å, seule zone libre dans le site actif (Figure 83). Il est donc possible d'imaginer apporter des modifications chimiques permettant d'augmenter le nombre d'interactions avec la boucle responsable de la fermeture du site actif. Cette dernière est flexible et pourrait permettre la liaison de composés un peu plus volumineux que ceux identifiés. La validamycine A est une molécule de masse moléculaire importante (497.5 Da) qui n'a pas pu

être modélisée dans le site actif sous sa forme fermée, alors que nous avons montré (voir chapitre...) qu'elle avait un bon pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'enzyme, sans être hydrolysée. Cela implique donc une mobilité importante de cette boucle, pouvant potentiellement permettre à des plus grosses molécules de tout de même présenter une activité inhibitrice.

Pour appuyer cette dernière hypothèse, un modèle d'ApTreh-1 dans sa forme ouverte a été construit par homologie avec la tréhalase d'*Enterobacter cloacae* sans ligand (PDB: 5Z6H). Une analyse de *docking* de la validamycine A dans le site actif de ce modèle montre des poses de la molécule au niveau de la poche catalytique. L'ouverture de la poche catalytique par le déplacement de la *lid loop* semble laisser suffisamment de place à des molécules de plus hautes masses moléculaires (Figure 84).

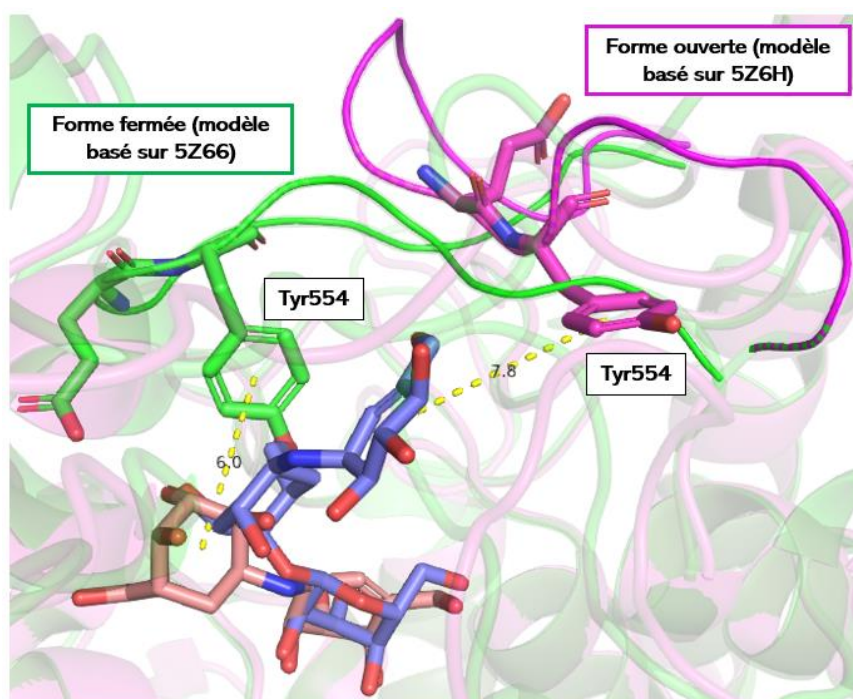


Figure 84: Docking de la validoxylamine A (rose) dans ApTreh-1 forme fermée et de la validamycine A (bleu foncé) dans ApTreh-1 forme ouverte

Sur base de l'hypothèse de pharmacophore mis en place, des modifications chimiques peuvent être proposées sur les molécules obtenues par criblage virtuel afin de proposer des composés alternatifs, potentiellement plus intéressants que ceux testés précédemment. La molécule ZC5 ayant présenté la meilleure activité inhibitrice à 0.2 mM, celle-ci est légèrement modifiée et chaque nouvelle formule est analysée par des études de docking afin d'observer une augmentation, ou une diminution, de la fonction de score. Comme point de départ, le programme SeeSAR est utilisé afin d'identifier les groupements intéressants à modifier ou ajouter grâce au score HYDE (HYdrogen bond and DEhydration energies). Ce score est une nouvelle fonction de notation empirique pour l'évaluation des complexes protéine-ligand qui estime l'énergie libre du système, exprimé en kJ/mol<sup>292,293</sup>. Pour le composé ZC5, la fonction amine du groupe amide présente sur le premier cycle est jugée fortement défavorable (HYDE score positif de 13.3 kJ/mol), tout comme la fonction amide au centre de la molécule (5.3 kJ/mol) ainsi qu'un groupement hydroxyle du deuxième cycle qui est légèrement défavorable (2.0 kJ/mol). Pour exemple, le carbone C3 du premier cycle dispose d'un score favorable (-4.4 kJ/mol) (Figure 85).



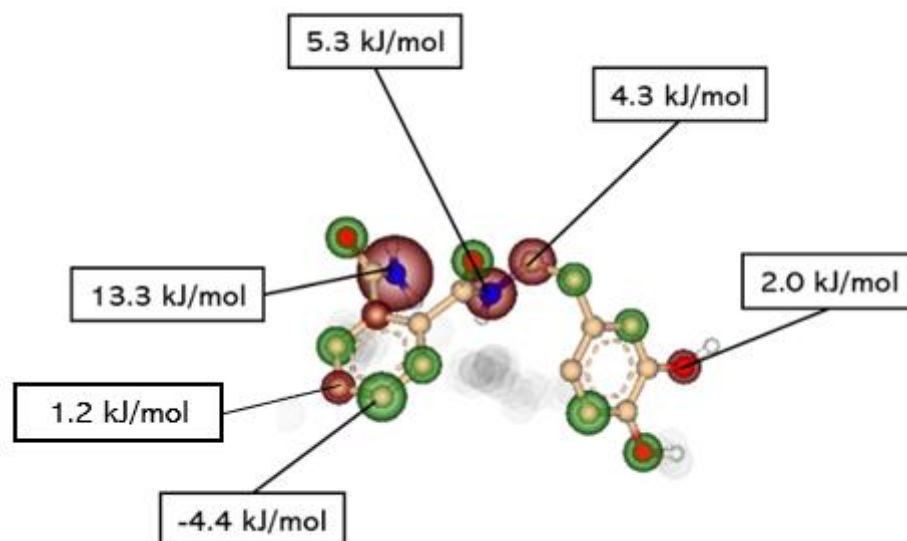


Figure 85: HYDE score pour les atomes composant ZC5 selon SeeSAR

A travers cette première analyse, on observe 3 cibles potentielles pour des modifications chimiques, correspondant aux trois groupements de l'hypothèse pharmacophore : i) la position para du premier cycle aromatique, qui présente également un score légèrement défavorable, mais également la fonction amide du cycle, ii) le groupement donneur/accepteur au centre de la molécule, iii) ou encore les groupements -OH présents sur le second cycle aromatique.

### 2.1. Modifications chimiques du premier cycle

Premièrement, il est intéressant de tenter d'augmenter le nombre de liaisons au sein du site actif. Dans la vicinity du premier cycle aromatique, on observe que ZC5 pourrait se lier au second résidu catalytique Glu538, si un groupement  $\text{CH}_2\text{OH}$  est ajouté en position para du cycle afin de former une liaison H. Cependant, contrairement à ce qui est attendu, la fonction de score avec ce nouveau groupement est de 68.1, par rapport au score initial de 86.8, sans modifications. Cela serait dû à un encombrement stérique des hydrogènes du groupement  $\text{CH}_2\text{OH}$  avec le résidu Phe560, sans pour autant observer une liaison avec Glu538 comme attendu. Selon les restrictions stériques liées à l'environnement autour du premier cycle aromatique, il ne serait donc pas réalisable de rajouter un groupement supplémentaire afin d'aller chercher de nouvelles interactions.

Concernant le groupement amide du premier cycle, celui-ci a été remplacé par un groupement  $\text{CH}_2\text{OH}$  et la fonction de score obtenue est légèrement plus faible (84.5) que l'originale. La fonction amide permet une interaction avec Gly334 par liaison H ainsi qu'avec Trp486, là où l'hydrogène de  $\text{CH}_2\text{OH}$  pointe vers Gln485 et Tyr554 a une distance de 2.4 et 2.5 Å, causant à nouveau un léger encombrement stérique, diminuant la fonction de score. Si l'on rajoute un point de comparaison, les fonctions -OH de 1-DNJ et de la castanospermine s'alignent toujours sur le  $\text{C}=\text{O}$  de cette amide.

En conclusion, apporter des modifications chimiques sur le premier cycle aromatique semble présenter une diminution de la fonction de score au lieu d'une augmentation, dû à l'encombrement stérique important de ce sous-site.

### 2.2. Modifications chimiques du centre de la molécule

Afin de tenter d'augmenter la fonction de score après modification chimique, le groupement accepteur/donneur situé au centre de la molécule est une intéressante. Etant donné que le fonction C=O est importante (liée au résidu Gln237) et que le N-H ne se lie à rien dans le cas de ZC5, différentes modifications sont testées : remplacer N-H par un groupement CH<sub>2</sub> ou par un oxygène pour former une fonction ester. Au niveau des fonctions de score, celle avec le groupement CH<sub>2</sub> reste pratiquement identique (86.4), tandis qu'avec l'ajout de la fonction ester, elle augmente (87.6). L'écart est cependant extrêmement faible et la modification de ce groupement du pharmacophore semble présenter peu d'influence. Les interactions du groupe C=O avec la protéine ne changent pas, tout comme la position des deux cycles aromatiques, on observe uniquement un léger déplacement de la chaîne centrale (Figure 86).

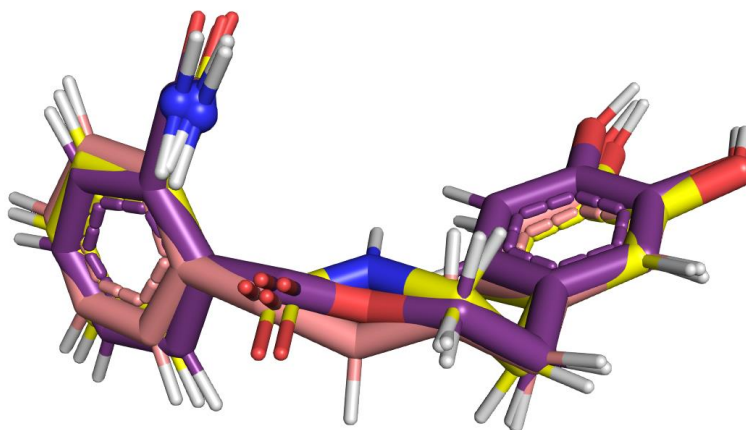


Figure 86: Superposition des conformations au sein du site actif de ZC5 (jaune, initial) et de ses modifications chimiques au niveau du groupement pharmacophore central (Rose, CH<sub>2</sub> et mauve, ester)

Le groupement central du pharmacophore aurait plutôt un rôle de stabilité au sein de la molécule, une modification chimique n'ayant aucune influence significative sur la fonction de score.

### 2.3. Modifications chimiques du second cycle

Enfin, la dernière option est d'effectuer des modifications au niveau du second cycle aromatique. Ce dernier est d'autant plus intéressant qu'il est situé dans le sous-site catalytique, où il est impliqué dans des interactions avec des résidus essentiels à l'hydrolyse du substrat, à savoir les trois arginines (Arg182, Arg235 et Arg300). Cependant, dans le cas de ZC5, il n'y a pas interactions avec toutes les arginines, seulement Arg235 et Arg300. Si on compare avec la validoxylamine A, qui interagit avec les trois arginines (Figure 68A), on remarque la présence d'un groupement -OH en position ortho du cycle créant une liaison H avec l'Arg182, manquante pour ZC5. Afin d'évaluer l'impact d'une modification de ce cycle sur l'ensemble de la molécule (augmentation du nombre d'interactions électrostatiques), des groupements -NO<sub>2</sub>, -COO<sup>-</sup> et -H ont été remplacés selon toutes les configurations possibles en position ortho, méta et para et dockées au sein du site actif (Figure 87).

Le meilleur résultat, avec un score de 90.9, correspond à la molécule avec un groupement -OH en position ortho, méta et para, soit une augmentation de 4.1 par rapport à la molécule initiale. De manière intéressante, on observe que 4 autres molécules possèdent un meilleur score que l'original, comme résumé dans le Tableau 19, toutes avec une fonction -OH présente en position ortho. Pour les molécules présentant un score plus faible, on retrouve une fonction -

COO<sup>-</sup> et -NO<sub>2</sub> en ortho, indiquant qu'il s'agit de groupements moins favorables à une liaison avec l'Arg182.

Tableau 19: Fonction de score des molécules modifiées sur le second cycle aromatique

Score	Ortho	Méta	Para
90,9	-OH	-OH	-OH
90,18	-OH	-COO <sup>-</sup>	-OH
88,58	-OH	-H	-OH
87,35	-OH	-COO <sup>-</sup>	-H
87,11	-OH	-NO <sub>2</sub>	-OH
86,78	-H	-OH	-OH
85,36	-COO <sup>-</sup>	-OH	-OH
84,33	-OH	-NO <sub>2</sub>	-H
83,92	-NO <sub>2</sub>	-OH	-OH

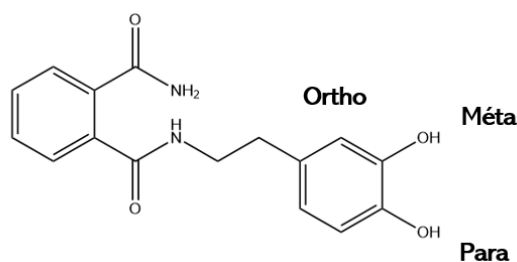


Figure 87: Structure de ZC5 et les sites de modifications chimiques : ortho, méta et para

Si on observe un peu plus les conformations obtenues, malgré que la présence d'un groupement -COO<sup>-</sup> en ortho ne change pas la fonction de score, au niveau de la géométrie de la molécule une grosse différence est observée : la fonction amide centrale normalement en position trans est représentée cette fois-ci en position cis, impactant l'ensemble de la conformation de la molécule (Figure 88). Un groupement -NO<sub>2</sub> lui va légèrement modifier la position du second cycle, mais ne présente pas un groupement amide centrale en position cis. Cela pourrait être dû à la formation d'un pont H intramoléculaire entre la fonction -COO<sup>-</sup> et l'hydrogène de la fonction amide, situé à une distance de 3.6 Å.

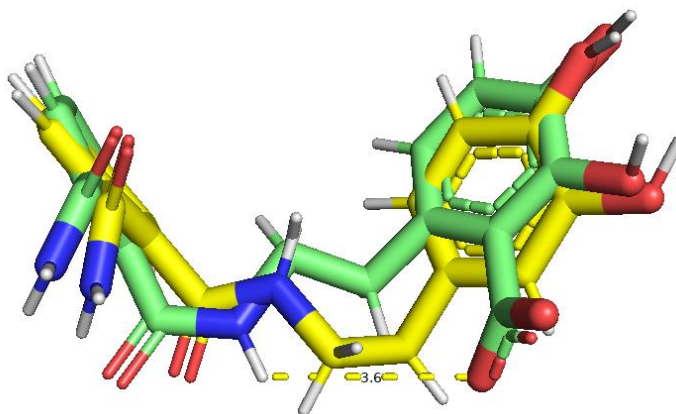


Figure 88: Superposition de ZC5 initiale (jaune) et ZC5 avec -COO<sup>-</sup> en position ortho (vert clair)

Pour aller plus loin, si on étudie l'importance des groupements -OH en position méta et para, on remarque que le fait de remplacer ceux-ci par des groupements plus volumineux entraîne une liaison plus faible du composé, due à des encombrement stériques, comme c'était le cas pour le premier cycle. En effet, si un groupement -NO<sub>2</sub> est placé en position méta ou para (Figure 89), le cycle change de conformation et a tendance à se rapprocher du premier sous-site ou bien de réaliser une torsion. Le phénomène est également observé avec un groupement -COO<sup>-</sup>.

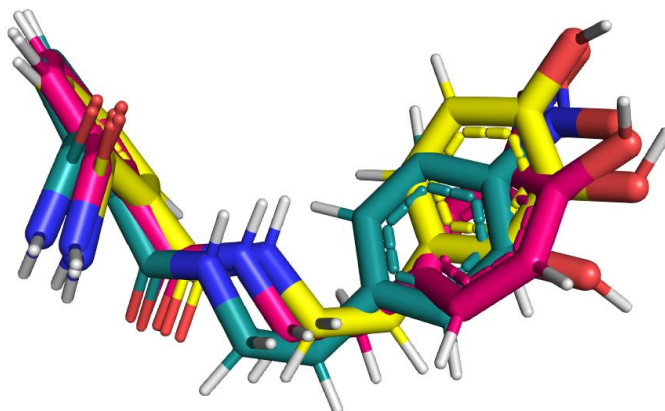


Figure 89: Superposition de ZC5 initiale (jaune), ZC5 avec -NO<sub>2</sub> en méta (magenta) ou para (vert)

Enfin, pour clôturer, 384 conformations ont été étudiées, en faisant varier chacun des paramètres favorables précédemment appliqués : le groupement central (amide, ester ou CH<sub>2</sub>) avec -OH, -H, -NO<sub>2</sub> ou -COO<sup>-</sup> en position ortho, meta et para. . La molécule ayant le plus haut score est celle avec une fonction amide sur le premier cycle (conservée), une fonction ester centrale (modifiée) et un ajout d'un groupement -OH en position ortho du second cycle (ajout) pour un score de 92.3, ce qui représente la proposition finale de ce travail (Figure 90).

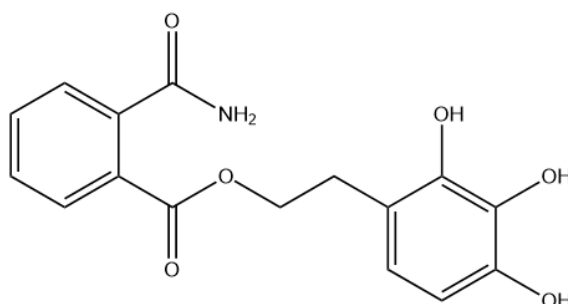


Figure 90: Proposition finale d'une molécule inhibitrice de tréhalase



# Chapitre 7

---

Conclusions et perspectives



## 1. Conclusions

Dans le cadre de la lutte intégrée contre les pucerons, nécessitant de trouver de nouvelles alternatives à la gestion de ces Hémiptères dans nos cultures, ce travail a porté son attention sur la mise en place d'alternatives dans le cadre du contrôle biologique dans un premier temps avec la recherche de nouveaux composés issus de *S. hygroscopicus*, mais également dans le cadre du contrôle chimique avec un criblage virtuel de molécules sur deux banques de données. L'idée est d'identifier dans un premier temps de nouvelles molécules permettant l'inhibition de l'activité enzymatique de la tréhalase, enzyme responsable du bon maintien du métabolisme énergétique chez les insectes. Inhiber cette enzyme reviendrait donc à provoquer la mort des insectes par hypoglycémie, tout en limitant l'impact sur les mammifères, dont l'Homme, étant donné que le tréhalose hydrolysé par la tréhalase en molécules de glucose est une réserve énergétique spécifique des insectes.

A cet effet, la tréhalase soluble (Treh-1) du puceron vert du pois, *A. pisum*, a d'abord été purifiée à partir d'homogénat frais, et entièrement caractérisée, que ça soit au niveau biochimique (caractéristiques physico-chimiques), cinétique ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) ou bien au niveau moléculaire (élaboration d'un modèle 3-D, d'un arbre phylogénétique et comparaison avec d'autres tréhalases). Bien que l'autre forme de tréhalase, la membranaire (Treh-2), n'a pas pu être isolée, les acides aminés identifiés comme essentiels pour la réaction enzymatique au sein du site actif étant les mêmes, s'attaquer à une forme impactera également la seconde, ne nécessitant donc pas de devoir travailler sur les deux en parallèle. Bien que la Treh-1 ait été purifiée à partir d'homogénat frais de pucerons, sa surexpression bactérienne n'a pas pu être réalisée, étant donné que les modifications post-traductionnelles mises en évidence grâce à la caractérisation de l'enzyme naturelle semblent avoir une importance au niveau de la stabilité de l'enzyme lors de la production en bactérie.

Malgré cela, l'étude complète de l'interaction de certains inhibiteurs commerciaux a pu être réalisée sur Treh-1, en mettant en évidence la grande efficacité *in vitro* de la castanospermine, du 1-deoxynojirimycine et surtout de la validamycine A, nous donnant des indications sur le comportement de ces molécules au sein du site actif. Il a également été permis de mettre en évidence l'efficacité de l'amygdaline et de la phloridzine *in vivo*, ou du moins des composés hydrolysés au sein des insectes lors de la diète, hypothèse étudiée par des analyses *in silico*. Tout ceci a permis de construire une base de connaissances solide afin de pouvoir se lancer dans la recherche de nouvelles molécules inhibitrices de tréhalase.

Dans un premier temps, une démarche s'est faite dans le contrôle biologique, avec la mise en culture de souches de *S. hygroscopicus* dans différents milieux. Il en ressort que selon les milieux, la souche bactérienne semble produire des métabolites différents. Dans certaines conditions (ISP2), l'activité inhibitrice de tréhalase serait dû à la présence de validamycine A produite par la souche bactérienne, comme établi dans la littérature. Cependant, d'autres milieux comme ISP4 présentent de très faibles traces de validamycine A, mais une activité inhibitrice tout aussi importante, indiquant qu'il y aurait potentiellement d'autres molécules encore inconnues présentant un potentiel d'inhibiteur de tréhalases. Cependant, la validamycine A ayant un effet inhibiteur très fort, les techniques utilisées (HPAEC-DA et HILIC) ne permettent pas de quantifier la concentration exacte de cette molécule et donc pouvoir déterminer son impact sur les tests d'activités.

Concernant le contrôle chimique, deux criblages virtuels dans les banques de données ZINC et Chemdiv ont permis d'identifier 10 hits, des molécules présentant une inhibition de la tréhalase dans des gammes de concentration de l'ordre du mM. Sur la base de ces découvertes, une hypothèse pharmacophore a été établie, présentant les inhibiteurs de tréhalase comme des molécules ayant régulièrement deux cycles aromatiques interagissant respectivement dans le sous-site de reconnaissance et le sous-site catalytique au sein du site actif, avec un groupement donneur/accepteur de H en son centre et avec de nombreux groupements polaires liés aux deux cycles. Etant donné que des inhibiteurs présentant une activité inhibitrice dans une gamme de l'ordre du mM n'est pas suffisant pour en faire des insecticides, des propositions de modifications chimiques ont été étudiées, avec un travail sur chacun des groupements de l'hypothèse pharmacophore. Le résultat le plus intéressant se trouve être l'ajout d'un groupement -OH en position ortho du meilleur hit obtenu par criblage virtuel, permettant une liaison H supplémentaire avec un acide aminé essentiel à la réaction enzymatique, l'Arg182.

Dans l'ensemble, ce travail a permis de mettre en évidence des éléments très intéressants par rapport aux inhibiteurs de tréhalase. Le constat initial en se référant à la littérature était que les meilleurs inhibiteurs de tréhalases actuellement connus sont des bioisostères du substrat, le tréhalose. En effet, le meilleur recensé et validé expérimentalement est la validamycine A et son produit hydrolysé, la validoxylamine A. Son activité inhibitrice extrêmement importante est dû à sa ressemblance au substrat et les nombreuses interactions au sein du site actif, en notant tout de même quelques différences au niveau de la liaison O-glycosidique ainsi qu'une double liaison au sein d'un cycle. Lors de ce travail de recherche, cette structure idéale est fortement ressortie lors de la mise au point de l'hypothèse pharmacophore après étude des molécules obtenus par criblage virtuel.

Cependant, bien qu'il semblerait qu'un bioisostère du tréhalose soit la solution miracle afin de mettre au point un inhibiteur de tréhalase, il est tout de même important de noter un point dont la littérature ne fait que peu mention : le site catalytique de la tréhalase est très complexe et offre beaucoup de possibilités étant donné que tout le mécanisme d'inhibition n'est pas encore connu. Il a été démontré expérimentalement que d'autres molécules plus petites que le tréhalose, comme le 1-deoxynojirimycin et la castanospermine présentent une capacité inhibitrice importante, suffisante pour pouvoir être utilisée comme potentiel insecticide. Dès lors, au lieu de se focaliser uniquement sur les bioisostères comme unique solution, il serait possible d'étudier plus en détail le fonctionnement d'un plus petit inhibiteur au sein du site actif. Il est connu que ce site est sujet à de nombreux changements de conformations durant l'inhibition, lors de la liaison d'un substrat dans les différents sous-sites, mais également au travers de cette boucle catalytique jouant un rôle essentiel, mais ces changements sont bien trop peu étudiés. Un plus petit inhibiteur permettrait de jouer sur des molécules ayant des propriétés physico-chimiques différentes des bioisostères du substrat.

Avant de pouvoir aller plus loin, la disposition d'une quantité satisfaisante pure sur laquelle travailler reste le plus grand défi de cette thématique. Produire l'enzyme naturellement directement grâce à des procédés chromatographiques sur base d'un homogénat frais est un idéal, mais les contraintes de temps et d'énergie ne permettent pas de pouvoir utiliser cette option efficacement. La quantité initiale de tréhalase présente au sein de l'insecte est extrêmement faible, ce qui est étonnant étant donné qu'il s'agit de l'une des enzymes essentielles au bon fonctionnement de l'individu. Dès lors, l'option de produire l'enzyme à l'aide de techniques de surexpressions bactériennes prend tout son sens, mais une nouvelle

difficulté fait alors son apparition avec la présence de l'enzyme sous corps d'inclusions, malgré un état entièrement soluble initialement. Ceci est un nouveau point qui n'est pas du tout exprimé dans la littérature, où les gens travaillent soit avec de très faibles quantités d'enzymes, ou bien passent par l'utilisation de protéines de fusion afin de solubiliser l'enzyme. La question de l'importance des modifications post-traductionnelles mériterait une attention toute particulière, étant donné qu'elles semblent avoir une grande importance dans la solubilité de l'enzyme lors de sa production.

Bien que l'approche biologique afin d'identifier des molécules inhibitrices de tréhalase n'ait pas donné des résultats aussi probants que pour l'approche chimique et le criblage virtuel, ils ne sont pas non plus perdus. L'étude des molécules obtenues à l'aide de souches *S. hygroscopicus* est malheureusement contraignante à cause de l'omniprésence de la validamycine A produite, mais les résultats préliminaires indiquent d'autres cibles potentielles intéressantes. Cependant, un tel travail d'étude nécessiterait une optimisation des conditions de production beaucoup plus poussée que celle réalisée dans cette thèse, mais par choix stratégique et par faute de temps, le focus a été mis sur l'approche chimique.

En conclusion, cette étude a mis en lumière l'importance de diversifier les stratégies de lutte contre les ravageurs en intégrant des approches biologiques et chimiques. L'exploration de nouvelles molécules, tant par la biotechnologie que par la chimie de synthèse, offre des perspectives prometteuses pour développer des solutions plus efficaces et durables. Les approches biologiques, avec l'utilisation de microorganismes, montrent un potentiel significatif pour réduire l'impact environnemental et les risques pour la santé humaine. Parallèlement, les avancées en chimie permettent de concevoir des pesticides plus ciblés et moins persistants. En combinant ces deux approches, il est possible de créer des stratégies intégrées de gestion des ravageurs, contribuant ainsi à une agriculture plus durable et résiliente face aux défis écologiques actuels.

## 2. Perspectives

Ce travail a mis en évidence de nombreux problèmes ralentissant la recherche, nécessitant plus de temps, des compétences nouvelles ou bien des études plus approfondies afin de répondre à la problématique initiale. On retrouve : la production de l'enzyme, le contrôle biologique et la recherche d'inhibiteurs par criblage virtuel.

Afin de pouvoir avancer encore plus loin dans ce projet, il serait d'abord intéressant de se pencher sur la production de l'enzyme. Bien que le procédé de purification de l'enzyme à partir d'homogénat frais de pucerons permet d'obtenir celle-ci avec une très bonne pureté, le rendement de purification reste très faible (~10%) à cause de la quantité initiale d'enzyme et le procédé est chronophage. Afin de réaliser des analyses plus poussées (ITC, cristallographie, ...), il serait bon de réussir à produire l'enzyme par surexpression. Pour se faire, il serait possible de retenter la surexpression bactérienne, mais en utilisant des souches bactériennes de type CLM24 ou CLM37<sup>294</sup>, des souches spécialement prévues pour produire des enzymes avec des N-glycosylations, élément qui semble essentiel à sa stabilité. Si cette approche ne convient pas, il serait toujours possible de travailler dans d'autres systèmes d'expression, comme dans *Pichia pastoris* (qui a fonctionné pour *Apis mellifera*) ou bien directement dans des cellules d'insectes de type SF9. Cela permettrait d'obtenir plus aisément des plus grandes quantités d'enzymes et ainsi faciliter les tests associés. Comme décrit dans la littérature pour la production de tréhalase, l'utilisation d'un nouveau plasmide (pCOLD) intégrant une protéine de fusion pourrait donner

des résultats intéressants. N'importe quelle protéine de fusion ne donne cependant pas des résultats optimaux, comme l'a démontré les tests avec la protéine SUMO lors de l'optimisation de la production de tréhalase en début de thèse.

Une autre piste de grand intérêt réside dans le contrôle biologique des pucerons, d'une part parce qu'il s'agit d'un palier supérieur au contrôle chimique dans la lutte intégrée, mais également car les premiers résultats sont encourageants. En développant une méthode d'analyse plus sensible de type LC-MS/MS afin de détecter les traces de validamycine A dans les milieux de culture contenant *S. hygroscopicus*, il serait possible de mettre en évidence, ou non, la présence de composés inhibiteurs de tréhalase autre que la validamycine A. L'identification de ces composés pourrait ouvrir la porte à l'optimisation de production de ce composé en grande quantité à l'aide de bioréacteurs et ainsi présenter un intérêt économique en plus d'être un biopesticide. Il serait également intéressant de se pencher sur d'autres souches de *Streptomyces* ou se placer dans des conditions ne produisant pas de validamycine A, étant donné que cette molécule n'est pas intéressante économiquement parlant.

Une autre grande alternative afin de développer l'approche biologique serait de mettre au point un travail plus intensif autour des conditions de production de molécules. Grâce à l'ingénierie des gènes, il serait possible de modifier génétiquement une souche de micro-organismes (*Streptomyces*, ou autre) afin de produire plus spécifiquement une molécule d'intérêt identifiée préalablement. Ou dans l'exemple de ce travail, avec *S. hygroscopicus*, il serait possible de contrôler la production de validamycine A et ainsi donc limiter les effets inhibiteurs trop importants, masquant l'effet potentiel d'autres molécules.

Enfin, la perspective la plus intéressante serait de se baser sur l'hypothèse de pharmacophore obtenue lors de ce travail afin de réaliser un nouveau criblage virtuel. Maintenant que les groupements essentiels à une inhibition enzymatique sont identifiés, il serait possible de se baser sur des structures similaires à ce pharmacophore comme cela a déjà été testé efficacement et disponible dans la littérature<sup>295</sup>. En plus des caractéristiques classiques respectant les règles de Lipinski (solubilité et taille principalement), il serait également intéressant de placer de nouveaux filtres (PAINS, ADME, profil de toxicité, ...) afin de cibler directement des molécules intéressantes. Comme énoncé précédemment, il serait également intéressant de ne pas négliger les petites molécules comme la castanospermine et le 1-deoxynojirimycin ayant présenté une capacité inhibitrice importante et n'étant pas corrélé directement à l'hypothèse pharmacophore et les bioisostères de manière générale. Contrairement aux perspectives liées à l'approche biologique, un travail d'étude *in silico* sur ce type de molécules ne nécessiterait pas autant de temps et d'énergie et permettrait de fournir de nouvelles informations essentielles à la compréhension du phénomène d'inhibition de l'enzyme.

Le criblage virtuel sera également réalisé sur un nouveau modèle d'ApTreh-1, amélioré : en effet, la réaction d'hydrolyse nécessite une molécule d'eau, jusqu'à présent jamais utilisée dans la littérature en vue de réaliser des criblages virtuels sur une tréhalase. Cependant, l'analyse de la PDB montre que cinq clusters d'eau sont toujours présents dans les structures cristallographiques et des résultats préliminaires de docking avec la présence de ces molécules d'eau indique une augmentation de la fonction de score pour chacun des composés analysés, en comparaison avec le modèle ne contenant pas les molécules d'eau. Cela représente donc un point intéressant à analyser plus en détail afin d'améliorer la qualité du criblage virtuel.

# Chapitre 8

---

Matériel et méthodes





## 1. Insectes

Les pucerons ont été élevés dans une pièce au climat contrôlé (16h de lumière ;  $22 \pm 1$  °C ; 70 % d'humidité relative). *Acyrtosiphon pisum* Harris, clone de Gembloux, sont nourris depuis plusieurs années sur des fèves (*Vicia faba* L., variété grosse ordinaire), à Gembloux Agro Bio-Tech, Université de Liège.

## 2. Test enzymatique et détermination du pH optimum et température optimale

L'activité tréhalase est déterminée par la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique par le glucose produit lors de l'hydrolyse, formant un produit (ANS) détecté à  $\lambda_{\max} = 540$  nm. Le mélange réactionnel contient 10  $\mu$ l d'enzyme (0.1 mg/mL ou 1.5  $\mu$ M), 40  $\mu$ l de 200 mM de tréhalose et 50  $\mu$ l de tampon acétate 0.2 M (pH 5) pour un volume total de 100  $\mu$ L. Ce mélange est incubé à 37 °C pendant 15 minutes. Ensuite, 300  $\mu$ l de DNS (10 mg/mL) sont ajoutés et la réaction est stoppée dans un bain bouillant. Une unité d'enzyme (U) est définie comme la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1  $\mu$ mol de tréhalose par minute.

Pour évaluer l'activité de l'ApTreh-1 à la température optimale, le mélange décrit ci-dessus a été incubé à 4, 25, 37, 45, 50, 55, 60 et 65°C pendant 15 minutes. De même pour la détermination du pH optimum, il a été incubé pendant 15 minutes à 37°C tout en variant le pH : tampon 50 mM acide citrique- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 3), tampon 0.2 M  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  (pH 4 ; pH 5), tampon 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6 ; 7 ; 8) et tampon borate 50 mM (pH 9). Pour la détermination des paramètres cinétiques ( $K_m$ ,  $V_{\max}$ ), la réaction s'est déroulée pendant 15 minutes à 37°C et pH 5, avec des concentrations croissantes de tréhalose (1, 2, 5, 10, 20, 50 et 100 mM). Les paramètres sont ensuite calculés sur base de la représentation graphique d'Hanes.

Lors de l'optimisation des différents procédés de purification, la récupération de l'activité enzymatique (rendement) et le facteur de purification sont déterminés respectivement par les formules suivantes

$$\frac{\text{Activité totale de l'étape } n}{\text{Activité totale de la première étape}} \times 100$$

$$\frac{\text{Activité spécifique de l'étape } n}{\text{Activité spécifique de la première étape}}$$

Où  $n$  représente le nombre de l'étape de purification étudié.

## 3. Purification d'ApTreh-1 et ApTreh-2

### 3.1. ApTreh-1

20 g de pucerons sont broyés dans un mortier et transférés dans 20 mL de tampon 0.2 M  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  pH 5. L'extrait brut, auquel a été ajouté l'inhibiteur de protéase PMSF (Phénylméthylsulfonyl fluoride), est ensuite placé sous agitation constante à 8 °C pendant 1 h. Il est centrifugé à 12 000 g (4 °C) pendant 30 minutes et le surnageant est conservé à 4 °C (**S1**). Afin d'extraire une quantité maximale d'enzyme, le culot a été mis en suspension dans 10 mL de tampon acétate 0.2 M pH 5, placé à nouveau sous agitation constante à 8 °C pendant 1h et centrifugé à 12 000 g (4 °C) pendant 30 minutes. Le second surnageant (**S2**) a est conservé à 4 °C. **S1** et **S2** ont été rassemblés avant le fractionnement par  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Un premier taux de saturation de 35% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a permis de précipiter la plupart des protéines indésirables. Un

second taux de saturation de 60%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  est nécessaire pour obtenir un précipité contenant la tréhalase. Le culot est solubilisé dans 5 mL de tampon Tris-HCl 20 mM pH 8 et passé sur une colonne de dessalage Sephadex G-25 PD-10 pour éliminer le  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et la plupart des pigments. L'échantillon est ensuite chargé sur une colonne HiTrap™ DEAE-Sepharose Fast Flow équilibrée avec un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8. Les protéines sont éluées à 1 mL/min pendant 30 mL dans le même tampon Tris-HCl, avec un gradient de NaCl de 0 à 1 M. Les fractions actives de tréhalase, identifiées par la méthode DNS, sont regroupées, diluées 10 fois dans un tampon de liaison (Tris-HCl pH 7.4 ; 500 mM NaCl ; 1 mM  $\text{CaCl}_2$  ; 1 mM  $\text{MnCl}_2$ ) et ensuite déposés sur une colonne d'affinité HiTrap Con A 4B équilibrée avec le tampon de liaison. L'élution est réalisée avec un tampon d'élution Tris-HCl pH 7.4 ; 500 mM NaCl ; 300 mM méthyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside. Pour finir, les fractions actives sont récupérées et centrifugées sur Amicon® Ultra 0.5 mL avec une membrane 10 kDa afin de concentrer l'échantillon à la concentration souhaitée.

### 3.2. ApTreh-2

Le culot obtenu après extraction d'ApTreh-1 est lavé à plusieurs reprises avec du tampon acétate 0.2M pH 5 afin d'enlever un maximum de restant de tréhalase soluble avant d'être solubilisé dans une solution de Tris-HCl 20 mM ; pH 7.4 ; CHAPS 60 mM (soit 2.5x la CMC) et mis sous agitation pendant 1h30 à 20°C. L'échantillon est ensuite ultracentrifugé à 100 000 g (4°C) pendant 1h. Le surnageant obtenu est déposé sur une colonne HiTrap™ DEAE-Sepharose Fast Flow équilibrée avec un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8. Les protéines sont éluées à 1 mL/min pendant 30 mL dans le même tampon Tris-HCl, avec un gradient de NaCl de 0 à 1 M. Les fractions actives de tréhalase, identifiées par la méthode DNS, sont regroupées, diluées 10 fois dans un tampon de liaison (Tris-HCl pH 7.4 ; 500 mM NaCl ; 1 mM  $\text{CaCl}_2$  ; 1 mM  $\text{MnCl}_2$ ) et ensuite déposés sur une colonne d'affinité HiTrap Con A 4B équilibrée avec le tampon de liaison. L'élution est réalisée avec un tampon d'élution Tris-HCl pH 7.4 ; 500 mM NaCl ; 300 mM méthyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside. Pour finir, les fractions actives sont récupérées et centrifugées sur Amicon® Ultra 0.5 mL avec une membrane 10 kDa afin de concentrer l'échantillon à la concentration souhaitée.

## 4. Surexpression bactérienne d'ApTreh-1

### 4.1. Transformation bactérienne

Les constructions plasmidiques d'ApTreh-1 avec His-tag en N-ter et en C-ter dans des plasmides pET-28a(+) ont été transférés dans des souches bactériennes *E.coli* BL21(DE3), TUNER et Lemo21. 3  $\mu\text{l}$  de plasmide (concentration 250 ng/ $\mu\text{l}$ ) ont été mis en présence de 50  $\mu\text{l}$  de chacune des souches, avant d'être incubée sur glace pendant 40 minutes. Ensuite, par une succession de choc thermique, le plasmide est transformé dans les souches : transfert du mélange dans un bain d'eau à 42°C pendant 45 secondes, avant d'être déposé sur glace pendant 3 minutes, avec ajout de 450  $\mu\text{l}$  de milieu LB (*Lysogeny Broth*) et incubation à 37°C pendant 1h sous agitation constante. Le milieu est déposé sur une boîte de LB agar solide, en présence d'ampicilline comme antibiotique (et 30  $\mu\text{g/mL}$  de chloramphénicol pour les souches Lemo21). Celle-ci est ensuite incubée à 37°C pendant 18h. Enfin, une colonie unique est prélevée sur la boîte, mise en culture dans 10 mL de LB avec 10  $\mu\text{l}$  d'ampicilline (Amp) 100  $\mu\text{g/mL}$  pendant 18h à 37°C et 500  $\mu\text{l}$  de la prolifération bactérienne dans le milieu est dilué avec une solution de 60% glycérol pour former un stock glycérol, stocké à -80°C et réutilisable pour de nouvelles cultures.

#### 4.2. Surexpression bactérienne

Pour la surexpression bactérienne, une préculture de 50 mL de LB avec 50 µl d'Amp 100 µg/µl (et 30 µg/mL de chloramphénicol pour Lemo21) est réalisée à partir d'un stock glycérol de la souche bactérienne choisie et incubée à 37°C pendant 18h. De cette préculture, 5 mL sont ajoutés à 250 mL de LB et 250 µl d'Amp 100 µg/µl dans des erlenmeyers à chicanes pour l'oxygénation du milieu et celui-ci est placé à 37°C sous légère agitation. La croissance bactérienne est suivie par la mesure de la densité optique (D.O) à 600 nm jusqu'à obtenir une valeur située entre 0.6 et 0.8, suivi d'une induction de la protéine d'intérêt avec l'ajout de 250 µl d'IsoPropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside (IPTG) pour une concentration finale de 1 mM. La culture est ensuite placée à 37°C pendant 3h ou bien à 18°C pendant 18h. Le culot bactérien est récupéré par centrifugation pendant 30 minutes à 4°C, 4000 RPM et conservé à -80°C.

#### 4.3. Purification sur chromatographie d'affinité métallique IMAC

En vue d'une purification de la protéine d'intérêt, le culot est solubilisé dans un tampon PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; pH 7.4) avec 0.5% Triton X-100 et lysé par sonicateur pendant 6 cycles de 30 secondes sur glace. Le nouveau culot (corps d'inclusions et débris cellulaires) et le surnageant sont séparés par centrifugation à 4°C pendant 30 mins, 4000 RPM. Le surnageant est filtré sur une membrane de 0.45 µm avant application sur colonne de chromatographie. La tréhalase His-Tag est purifiée sur IMAC (HiTrap FF IMAC) préalablement équilibrée avec un tampon A (tampon phosphate Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, 100 mM NaCl, 5 mM imidazole, pH 7.4) à un débit de 1 mL/min. L'enzyme d'intérêt est décrochée avec un gradient linéaire pendant 30 minutes avec le tampon B (tampon phosphate Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, 100 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4).

#### 4.4. Clivage du His-Tag

Le His-Tag présent sur la protéine d'intérêt est clivée par la protéase TEV dans un ratio protéine:TEV optimisé (1:100), dans un boudin de dialyse avec une membrane de 7 kDa dans un tampon C (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 8) pendant 18h à 4°C, sous agitation constante. La solution contenant la protéine d'intérêt clivée est ensuite repassée sur la colonne IMAC précédente, équilibrée avec le tampon A. Le tampon B est utilisé pour décrocher les protéines interférentes de la colonne, tandis que la protéine d'intérêt n'ayant plus de His-Tag éluée dans le *flowthrough* avec le tampon A.

### 5. Dosage protéique et analyse SDS-PAGE

La concentration en protéine est mesurée par absorbance à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-6300PC de VWR. Pour l'électrophorèse 1-D, les protéines et les standards de poids moléculaire sont chargées sur un « *stacking gel* » (acrylamide 4%, tampon Tris-HCl 0.5 M pH 6.8). L'électrophorèse est réalisée dans un tampon de migration Tris (0.25 M Tris, 1.9 M glycine, 1% SDS) avec une différence de potentiel de 200 V pendant 1h15. Les protéines sont ensuite séparées dans un gel (12 % d'acrylamide, tampon Tris-HCl 1.5 M pH 8.8). Les protéines sont soit colorées par la technique de coloration au bleu de Coomassie, soit par la coloration imidazole-zinc. Le standard de poids moléculaire « *Precision Plus Protein™ Standards Unstained* » lors de l'électrophorèse (dix protéines recombinantes étiquetées *Strep* : 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 et 250 kDa).

### 6. Analyse en spectrométrie de masse

Les protéines sont digérées à la trypsine selon le protocole *Filter-Aid Sample Preparation* (FASP)<sup>296</sup>. Les peptides sont analysés à l'aide d'un nano-LC-ESI-MS/MS maXis Impact UHR-

TOF (Bruker, Bremen, Allemagne) couplé à un nanoLC UltiMate 3000 (Thermo). Les digestions sont séparées par chromatographie liquide en phase inverse à l'aide d'une colonne Thermo en phase inverse de 75  $\mu\text{m}$  X 250 mm (Acclaim PepMap 100 C18) dans un système de chromatographie liquide Ultimate 3000. La phase mobile A est composée de 95% d'eau/5% d'acétonitrile avec 0.1% d'acide formique, tandis que la phase mobile B est composée de 20% d'eau/80% d'acétonitrile avec 0.1% d'acide formique. 18  $\mu\text{l}$  d'échantillon est injecté, et le contenu organique de la phase mobile a été augmenté linéairement pendant 90 minutes de 5% B à 40% B, et de 40% B à 100% B en 10 minutes supplémentaires. L'effluent de la colonne est connecté à un *Captive Spray* (Bruker). Les listes de pics sont créées à l'aide de DataAnalysis 4.2 (Bruker) et comparées à la base de données *Aphidoidea* (de NCBIInr). Scaffold 4.8 (Proteome Software) est utilisé pour valider l'identification des protéines par MS/MS sur la base des peptides.

### 7. Analyse de la séquence en acide aminés

Le point isoélectrique, le poids moléculaire et le coefficient d'extinction d'ApTreh-1 sont estimés par l'outil *ProtParam* d'ExPASy. Les séquences de tréhalases connues d'*Aphis glycines*, *Bombyx mori*, *Apis mellifera*, *Tenebrio molitor* et *Drosophila melanogaster* (isoforme C) ont été alignées en utilisant l'alignement de séquences multiples *T-Coffee* suivi de *Box- Shade 3.21*. Toutes les régions conservées sont comparées. Pour l'arbre phylogénétique, 38 Trehs identifiés de divers ordres d'insectes ont été obtenus à partir d'Uniprot, soit sous forme soluble, soit sous forme membranaire. Les séquences sont alignées en utilisant le programme *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE) et sont assemblées en un arbre de (type *neighbour-joining*) en utilisant Mega X. La prédiction des sites de N-glycosylation dans la séquence d'ApTreh-1 est réalisée selon le programme NetNGlyc 1.0.

### 8. Modélisation par homologie et validation géométrique

La prédiction de la structure tridimensionnelle d'ApTreh-1 a été basée sur une méthode de modélisation par homologie grâce au programme SwissMODEL<sup>297</sup>. Avec 33 % d'identité de séquence, la référence utilisée est la structure cristalline de la tréhalase d'*Enterobacter cloacae* complexée avec la validoxylamine (forme fermée) (PDB ID : 5z66.1, résolution 1.8 Å) ou sans ligand (forme ouverte) (PDB ID : 5z6h, résolution 2.3 Å). La qualité du modèle est vérifiée et confirmée par validation géométrique de Ramachandran selon le programme MolProbity<sup>298</sup>.

### 9. Mesures de dichroïsme circulaire et calculs de structures secondaires

Le spectre de dichroïsme circulaire (CD) dans l'ultraviolet lointain est enregistré avec un spectropolarimètre MOS-500 à 20 °C dans un tampon phosphate 20 mM pH 7, en utilisant une cellule Suprasil en quartz de 1 mm de longueur d'onde (Hellma) et une concentration protéique de ~ 0.1 mg/mL (1.5  $\mu\text{M}$ ). Quatre balayages (20 nm/min, largeur de bande de 1 nm, *data pitch* de 0.1 nm et temps d'intégration numérique de 2s) sont moyennés, les lignes de base sont soustraites et aucun lissage n'est appliqué. Les données sont présentées sous forme d'ellipticité molaire des résidus ( $[\Theta]_{\text{MRE}}$ ) calculée à partir de la concentration molaire de la protéine et du nombre de résidus. Des analyses de structure secondaire utilisant les algorithmes CDSSTR<sup>299,300</sup>, CONTINLL<sup>301,302</sup> et SELCON3<sup>300</sup> sont effectuées sur les données CD avec le logiciel Dichroweb<sup>303</sup>. Une analyse plus poussée est également effectuée à l'aide de l'algorithme BeStSel disponible sur le serveur BeStSel<sup>304</sup>.

### 10. Analyses *in vivo*

Les tests *in vivo* sont réalisés avec 50 individus adultes pour chaque condition testée (10 µg/mL et 25 µg/mL de chaque inhibiteur, amygdaline, phloridzine ou validamycine A). Un relevé des individus morts est effectué après 24, 48 et 72 heures, en comptant les individus qui ne bougeaient plus du tout ou qui avaient perdu leur coloration verte (lorsqu'un puceron meurt, les bactéries symbiotiques des mycétocytes meurent également, ce qui entraîne l'arrêt de la production de pigments caroténoïdes). Le saccharose 15% est utilisé comme contrôle négatif et la cyperméthrine 25 µg/mL comme contrôle positif. Les inhibiteurs sont dissous dans l'eau et incorporés dans un régime alimentaire artificiel (saccharose 15 %), puis placé sur du parafilm afin que l'insecte puisse se nourrir et absorber l'inhibiteur. La solution est renouvelée quotidiennement afin de maintenir la concentration d'inhibiteur constante. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel R (version 4.2.2, R Core Team, 2022). Un modèle linéaire généralisé (famille binomiale, lien logit) a été utilisé avec le nombre d'individus morts (sur un total de n=50) comme variable réponse, "nombre total - nombre d'individus morts". La variable réponse dépendait de l'inhibiteur (y compris les contrôles), du temps et du dosage et un modèle factoriel complet a été utilisé. Les effets de chaque variable ont été analysés au moyen d'une analyse de la déviance (paquets "Car" et "lme4" ; <https://www.john-fox.ca/Companion/index.html><sup>305</sup>). L'ensemble des données a ensuite été divisé en trois sous-ensembles de temps (24 h, 48 h, 72 h) afin d'étudier plus en détail les effets des autres variables. En outre, les différences entre les inhibiteurs (y compris les témoins) et les dosages ont été analysées par paire en comparant les moyennes des moindres carrés (ou les moyennes marginales estimées) à l'aide des packages "emmeans" (<https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/index.html>) et "multcomp"<sup>306</sup>, et les valeurs p ont été corrigées pour les tests multiples à l'aide de la méthode HSD de Tukey.

### 11. Analyses *in vitro*

Pour les analyses *in vitro*, l'amygdaline et la phloridzine sont dissouts dans du DMSO, tandis que la validamycine A, la castanospermine et le 1-deoxynojirimycin sont dissouts dans un tampon acétate 0.2 M (pH 5). Le milieu réactionnel est le même que celui décrit dans le point du test enzymatique, à l'exception du volume contenant une concentration finale de 0 à 200 mM d'amygdaline, de 0 à 100 mM de phloridzine, de 0.1 à 63 µM de castanospermine et de 1 à 100 µM de 1-deoxynojirimycin et de 0 à 20 µM de validamycine A. Le volume réactionnel final (100 µl) est complété avec du tampon acétate 0.2 M (pH 5) et incubé à 37 °C pendant 15 minutes ; 300 µl de DNS (10 mg/mL) sont ensuite ajoutés, et la réaction est arrêtée dans un bain bouillant. Les concentrations inhibant 50 % de l'activité de la tréhalase (IC<sub>50</sub>) ont été calculées à partir du point d'inflexion obtenu graphiquement à partir du log de la concentration en inhibiteur sur son efficacité. Pour déterminer la valeur K<sub>i</sub> de l'ApTreh en présence de castanospermine, 1-deoxynojirimycin et de la validamycine A, l'enzyme purifiée est incubée avec deux concentrations d'inhibiteur avec des concentrations de substrat allant de 1 mM à 100 mM. La valeur K<sub>i</sub> a été déterminée à partir des tracés des pentes et/ou des ordonnées des courbes de Lineweaver-Burk en fonction de la concentration de l'inhibiteur en utilisant la formule ci-dessous.

$$K_i = \frac{[I]}{(\alpha - 1)}$$

Où [I] est la concentration de l'inhibiteur et α est le rapport des pentes obtenues avec le tracé de Lineweaver-Burk en présence ou en absence de l'inhibiteur.



## 12. Criblage virtuel

Pour la banque de données ZINC, la sélection des composés était basée sur les molécules disponibles commercialement directement (option « *In-Stock* »), avec une représentation 3D, le pH placé en « *Ref Mid* » et les charges (-2 -1 0 +1 +2). Les fichiers sont sauvegardés sous le format .sdf.gz avant d'être décompressés en .sdf pour docking dans GOLD. Pour la banque de données Chemdiv, la librairie « *300k Representative Compounds Library (Bemis-Murcko Clustering Algorithm)* » est utilisée. Le programme DataWarrior est utilisé pour visualiser le contenu du fichier .sdf obtenu et pour réduire le nombre de composés à 5303 molécules. Un programme python « *RDKitGenerate conformers.py* » disponible en ligne permet de générer un conformère 3D pour chacune des molécules avant docking dans GOLD.

## 13. Analyse de la stabilité par DSF

Pour évaluer la stabilité d'ApTreh-1 en présence des inhibiteurs obtenus par criblage virtuel, des analyses DSF sont effectuées. 17.5 µL d'enzyme (~ 1.3 mg/mL) est mise en présence de 17.5 µL d'inhibiteur pour une concentration finale de 5 mM. L'enzyme est diluée dans 25% DMSO pour obtenir la même concentration que pour les inhibiteurs testés. 5µL de SYPRO Orange (solution stock concentrée 5000x, diluée 625x au préalable pour une concentration finale de 1x dans l'échantillon) sont ajoutés pour compléter le volume réactionnel à 40µL. L'analyse est effectuée sur *StepOnePlus* d'*Applied Biosystems*. La température du système augmente de 25°C à 99°C à une vitesse de 1°C/min et le SYPRO Orange est excité à 570nm pour émettre à 623nm. Chaque condition est analysée en triplicat. La valeur de T<sub>m</sub> est déterminée en calculant la dérivée première des points obtenus, correspondant au point d'inflexion de la courbe.

## 14. Culture des Streptomyces

Les souches de *Streptomyces hygroscopicus* sont mises en culture et incubées à 28°C pendant une durée variant de 1 à 14 jours, dans différents milieux de cultures (ISP2, ISP4, ISP7 et SFM). Chaque jour, un morceau d'agar est découpé et congelé à -20°C. Afin de récupérer les métabolites produits par la bactérie, les échantillons sont centrifugés à haute vitesse (30 000 g) et le surnageant liquide est récupéré et passé sur des filtres PES de 0.2 µm. Après 14 jours de cultures sur milieu solide, la bactérie a « sporulé » et il devient possible de réaliser une culture en milieu liquide. Pour se faire, la boîte de pétri comportant la culture solide est recouverte d'une solution Tween 80 (1.2g/L) NaCl 8.5 g/L (entre 5 et 10 mL) qui est ensuite récupérée dans un falcon et centrifugée. Le culot obtenu est solubilisé dans 1 mL de milieu LB (*Lysogeny Broth*). Les spores sont ensuite comptés sur Bürker afin de s'assurer d'avoir une concentration sporale de 10<sup>6</sup> spores. Enfin, 100 µL de suspension sporale sont inoculés dans un erlen de 250 mL contenant 50 mL de milieu LB. Cet erlen est mis à sous légère agitation à 30°C. Après 24h, 5mL de préculture sont prélevés et ajoutés à 100 mL de milieu dans un erlen d'1 L. L'incubation dure ensuite 5 jours à 37°C sous légère agitation.

## 15. Modifications chimiques sur SeeSAR

Les modifications chimiques des composés d'intérêts établis par criblage virtuel sont modifiées avec le programme *SeeSAR*. Les ligands sont modifiés manuellement dans le « *Molecule Editor* ». Pour la création de nouveaux groupements, la fonction « *Growing* » du mode *Inspirator* est appliquée après avoir sélectionné les groupements à modifier. Le choix se base sur une librairie de fragments *FastGrow*. L'affinité de liaison et le HYDE score est calculé à partir du logiciel.

### 16. Création du pharmacophore sur Maestro

L'hypothèse pharmacophore est générée sur le logiciel Maestro, sur base des 10 meilleurs ligands obtenus par criblage virtuel et ayant présenté une activité inhibitrice. L'hypothèse correspond à 50% au minimum des composés analysés sur base de la fonction de score *Phase Hypo Score*. 50 conformères pour chaque ligand sont testés. Pour chaque groupement, une sphère de tolérance de 2 Å est appliquée

### 17. Docking moléculaire – analyses *in silico*

Les structures 3D des différents ligands utilisés (inhibiteurs commerciaux ou bien provenant du criblage virtuel) sont construits avec le logiciel ChemDraw Pro, sauvegardés en fichier .sdf avant optimisation de la géométrie dans le logiciel Avogadro<sup>307</sup> avant d'être finalement sauvegardés en fichier .mol2. La poche catalytique est définie comme une maille de dimension intérieure 10\*10\*10 Å, centrée sur l'atome 2279 CZ correspondant à la Phe183, l'un des résidus du site actif. Les ligands optimisés sont intégrés dans le modèle 3D ApTreh à l'aide du logiciel GOLD<sup>308</sup>. L'énergie libre de liaison est estimée à l'aide d'une fonction de notation empirique appelée score ChemPLP, qui inclut les contacts hydrophobe-hydrophobe, les liaisons hydrogène, la flexibilité du ligand et de multiples potentiels linéaires pour modéliser les termes de van der Waals et de répulsion. Sur la base du score ChemPLP, les meilleurs complexes obtenus après docking sont sélectionnés et visualisés avec PyMOL 4.6.0.

# Annexes

---





## Annexes

### Annexe 1

Tableau 20: *pI* et masse moléculaire théorique calculé à partir des séquences de tréhalases disponibles sur Uniprot

Tréhalase provenant de l'organisme suivant	Identification de la séquence	<i>pI</i> calculé	Masse moléculaire (Da)
<i>Apis mellifera</i> (A8J4S9)	Preuve expérimentale au niveau de la protéine	5.36	72820
<i>Drosophila melanogaster</i> (Q9W2M2)	Preuve expérimentale au niveau de la protéine	4.87	67690
<i>Pimpla hypochondriaca</i> (Q8MMG9)	Preuve expérimentale au niveau de la protéine	5.75	66460
<i>Bombyx mori</i> (P32358)	Preuve expérimentale au niveau de la protéine	4.89	66540
<i>Tenebrio molitor</i> (P32359)	Preuve expérimentale au niveau de la transcription	5.08	64460
<i>Schizaphis graminum</i> (A0A2S2P0U2)	Protéine déduite par homologie	5.69	68487
<i>Clastoptera arizonana</i> (A0A1B6EEF7)	Protéine déduite par homologie	5.36	75342
<i>Cuerna arida</i> (A0A1B6FTE3)	Protéine déduite par homologie	5.68	67033

La valeur "*Preuve expérimentale au niveau de la protéine*" (Tableau 20) indique qu'il existe une preuve expérimentale claire de l'existence de la protéine (séquençage Edman partiel ou complet, résultats de spectrométrie de masse, par rayons X ou RMN, interactions protéine-protéine ou bien détection par un anticorps). La valeur "*Preuve expérimentale au niveau de la transcription*" indique que l'existence d'une protéine n'a pas été strictement prouvée mais que des données d'expression (telles que l'existence d'ADNc, de RT-PCR ou de Northern blots) indiquent l'existence d'une transcription. La valeur "*Protéine déduite par homologie*" indique que l'existence d'une protéine est probable car des orthologues clairs existent chez des espèces étroitement apparentées.

## Annexe 2

Avant d'appliquer l'étape de purification sur Concanavaline A, plusieurs tentatives de purification sur des colonnes d'exclusion stérique (SEC) ont été réalisées, étant donné que certaines tréhalases d'insectes sont purifiées avec le critère de taille comme moyen de séparation. A cet effet, deux colonnes SEC sont utilisées, avec des matrices différentes (Sephacryl S-200 HR 16/60 et Superdex 200pg 16/60), différents *flowrate* et différentes compositions de tampons.

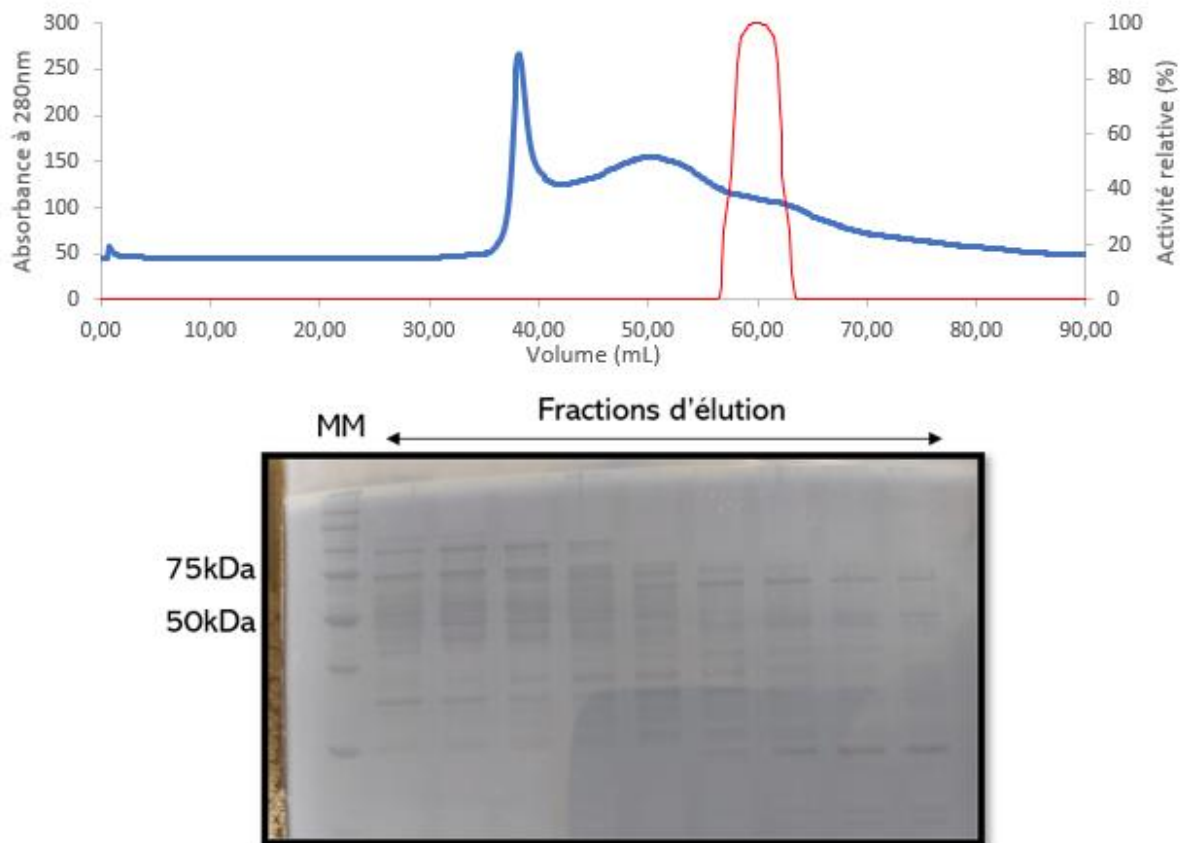


Figure 91: Chromatogramme du passage d'ApTreh-1 sur colonne Sephacryl S-200 HR 16/60 et analyse SDS-PAGE avec coloration imidazole-zinc des fractions d'élutions.

En analysant les fractions possédant une activité enzymatique sur SDS-PAGE, on remarque que les échantillons ne sont pas purs et qu'il existe plusieurs populations de protéines avec des masses moléculaires différentes dans une même fraction (Figure 91). De plus, la tréhalase est diluée dans de multiples échantillons, nécessitant de sélectionner les plus purs et donc une perte protéique est inévitable. En fin de procédé, la tréhalase n'est pas assez pure et n'est pas présente en forte quantité, la colonne Sephacryl S-200 HR 16/60 est donc abandonnée.

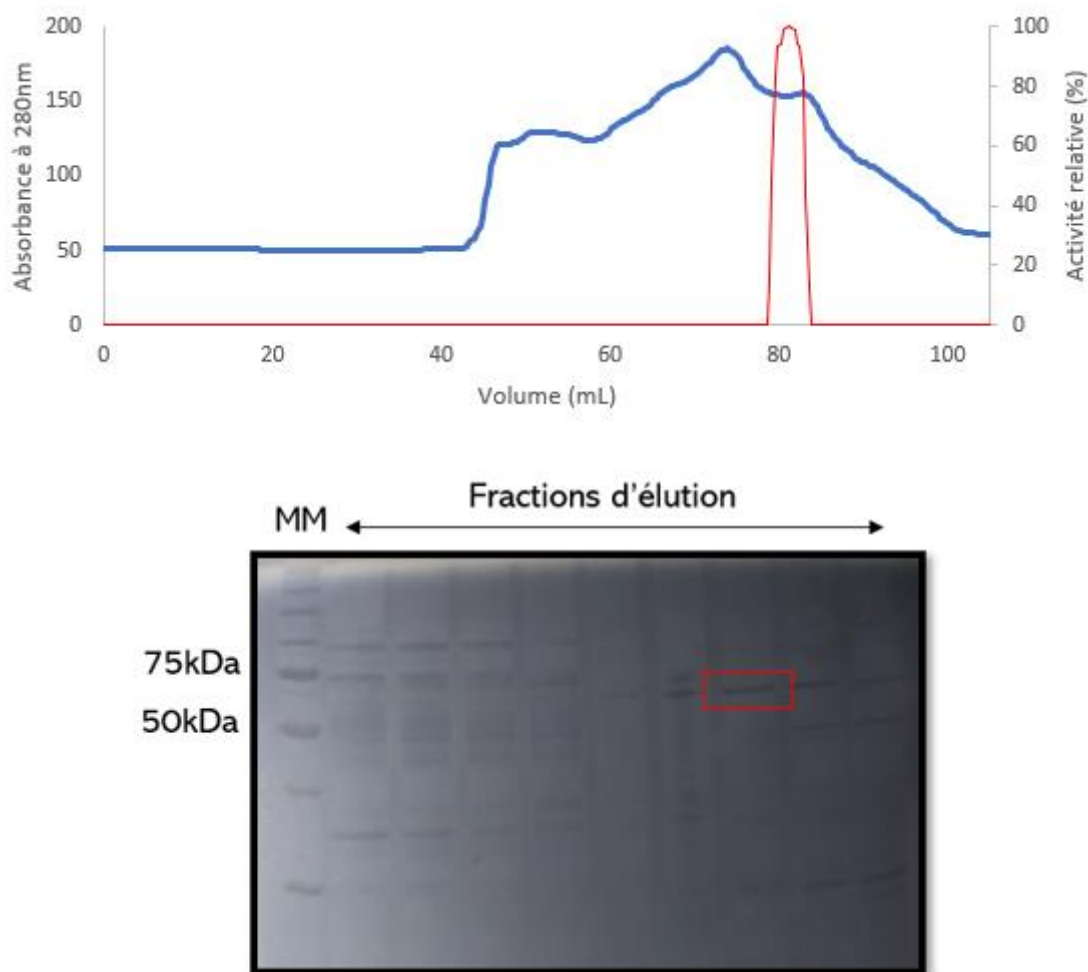


Figure 92: Chromatogramme du passage d'*ApTreh-1* sur colonne Sephadex 200pg 16/60 et analyse SDS-PAGE avec coloration imidazole-zinc des fractions d'élutions

Pour la colonne Sephadex 200pg 16/60 (Figure 92), le profil chromatographique est totalement différent et les fractions actives contenant la tréhalase sont moins diluées. Après analyse sur SDS-PAGE, on observe que l'enzyme est plus pure en comparaison à l'autre colonne, avec quelques protéines interférentes tout de même. Bien que ce protocole incluant cette étape de purification suffit à purifier l'enzyme de manière satisfaisante (a permis l'identification de l'enzyme par spectrométrie de masse), le rendement protéique et le facteur de purification reste nettement supérieur lors de l'utilisation d'une colonne d'affinité avec matrice Concanavalline A.

### Annexe 3

MRITNLLVVC LAHFAYYTHA NNQEFVHLAR GYYHVSNGLQ ASCQSQIYCE SDLLKDVQLA HIFPDSKTFV DMKLYSESE  
 ILKNYQVLKD GNNGVVPKEK IVKFVDEHFM DGDELEVWTP SDFNESPSIA NRIKDKNYKQ WALGLNQVWK TLARKVKDDV  
 RLHPDRYSLI WVPNGFAIPG GRFRELYYWD TYWIVNGMLL CDMSTTARGV IDNILSLVLQ FGFMPNGGRV YYLNRSQPPM  
 VTLMVSSYYK ATNDFEYVKK VISILDSEFE FWTENRMVTF EKNKSYTMA RYYAPSRGPR PESYREDYES AEFLKTENEK  
 QELYTQIKSA AETGWDFSSR WFITANGSDR GILADIKTTY IIPVDLNCIL HKNALLSSW YSKMGDTTKA EKYRAIAEKL  
 VYSIQEVMWR PDLGAWFDWD MLNNSREYF FVSNIVPLWT ESYNMPKKAV ASSVLGYLRD HHIEADYTV NFNGTPTSly  
 NSSQQWDFPN AWPPLQAFII QGLDRTQQKL AQQVSFRLAE VWLRSNYKSF AEKSMMFEKY DVLASGETGG GGEYTPQTGF  
 GWTNGVVFEF LNRWGDYLSN GINDLRRHG

MRITNLLVVC LAHFAYYTHA NNQEFVHLAR GYYHVSNGLQ ASCQSQIYCE SDLLKDVQLA HIFPDSKTFV DMKLYSESE  
 ILKNYQVLKD GNNGVVPKEK IVKFVDEHFM DGDELEVWTP SDFNESPSIA NRIKDKNYKQ WALGLNQVWK TLARKVKDDV  
 RLHPDRYSLI WVPNGFAIPG GRFRELYYWD TYWIVNGMLL CDMSTTARGV IDNILSLVLQ FGFMPNGGRV YYLNRSQPPM  
 VTLMVSSYYK ATNDFEYVKK VISILDSEFE FWTENRMVTF EKNKSYTMA RYYAPSRGPR PESYREDYES AEFLKTENEK  
 QELYTQIKSA AETGWDFSSR WFITANGSDR GILADIKTTY IIPVDLNCIL HKNALLSSW YSKMGDTTKA EKYRAIAEKL  
 VYSIQEVMWR PDLGAWFDWD MLNNSREYF FVSNIVPLWT ESYNMPKKAV ASSVLGYLRD HHIEADYTV NFNGTPTSly  
 NSSQQWDFPN AWPPLQAFII QGLDRTQQKL AQQVSFRLAE VWLRSNYKSF AEKSMMFEKY DVLASGETGG GGEYTPQTGF  
 GWTNGVVFEF LNRWGDYLSN GINGCTGYR YLCDFNRI RQ QLMFWT

Figure 93: Séquences en acides aminés de l'isoforme X1 et X2 d'ApTreh-1. Les peptides détectés par spectrométrie de masse sont indiqués en jaune pour X2 et en vert pour X1.

On retrouve en jaune la couverture de séquence (peptides détectés après analyse par spectrométrie de masse) pour l'isoforme X2 (référence Uniprot : A0A8R2A2H3) et en vert pour l'isoforme X1 (référence Uniprot : A0A8R2ABU8) (Figure 93).

### Annexe 4

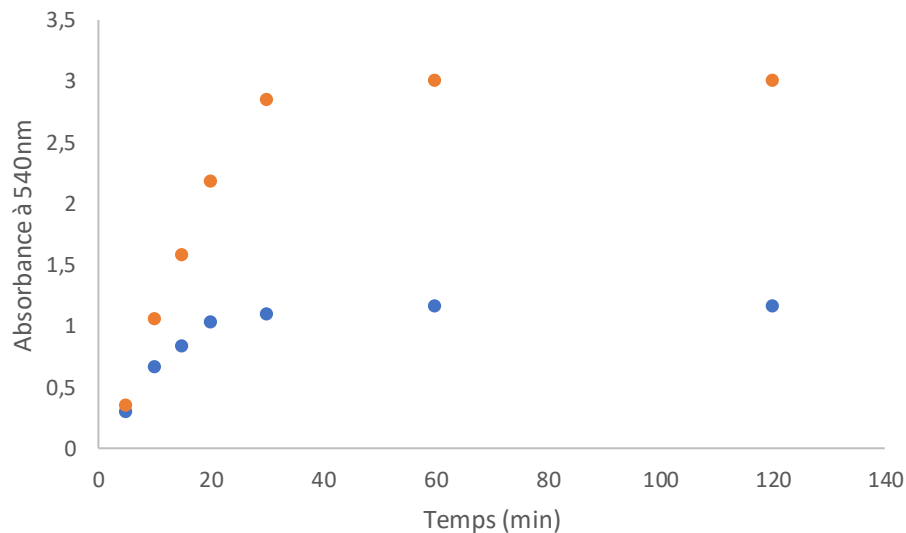


Figure 94: Hydrolyse du tréhalose au cours du temps à une concentration de 5 mM (bleu) et 80 mM (orange) à 60°C

ApTreh-1 présente une vitesse initiale constante pendant 30' à 60°C (Figure 94), avant d'avoir hydrolysé l'entièreté du substrat (5 mM en bleu) après 60' ou bien en atteignant une saturation du signal d'absorbance à 540nm avec une plus grande quantité de tréhalose (80 mM). Il n'y a pas de perte d'activité en fonction du temps, l'enzyme est donc thermorésistante.

## Annexe 5

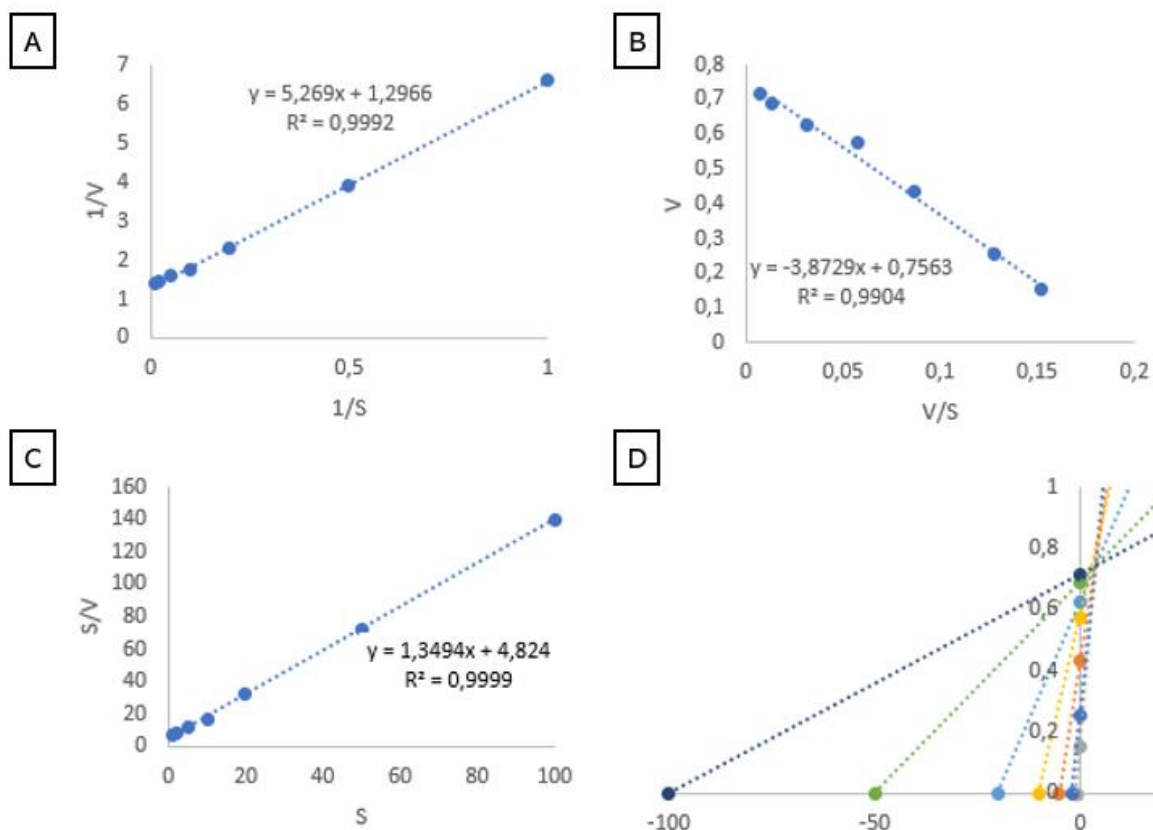


Figure 95: Représentation graphique de Lineweaver-Burk (A), Eadie-Hofstee (B), Hanes (C) et Eisenthal et Cornish-Bowden (D)

Les différentes représentations graphiques pour la détermination des constantes cinétiques d'une enzyme (Figure 95). La représentation d'Hanes étant celle donnant le meilleur coefficient de corrélation, cette dernière a été gardée pour le calcul des paramètres  $K_m$  et  $V_{max}$ .

## Annexe 6

A0A8R2JUJ7	-----	0
A0A8R2NN06	MCGKVCVRALEKAVLLGDDTRSAACAESPWPVMIIVTRDNHSRSAATTTTVAVAAPATVTV	60
A0A8R2JUJ7	-----MPQRAGVLTNSVM----ITLILLISSLCGCW---SSDADQHVA	36
A0A8R2NN06	AQQVTTWSSGSPAAVCKMRSSAAVTVIAIVVRLTAVLLLLMASVRPATAMGQLQGQYNGP	120
	* . * . * . : : : . * : * : * : . . : : :	
A0A8R2JUJ7	SSPTCDNSIYCYGPLLHAIQMSSIFIDSKTFVDMKMKFSPNETMNIFLEMM-KKTGQRPS	95
A0A8R2NN06	YPDICPSDIYCHGELLDDIQMQQLYSDSKTFVDKLLRRSEAEI IKS YRELKLRNNGRVPT	180
	* * : * : * : * * . * : : . : : * : * : * : * : * : * : * : *	
A0A8R2JUJ7	KLELEVPLNETPEKEGSEFEIWDPSDWKPEPKFIGDIKDPNFQEWARGHLHLWKLLGKKI	155
A0A8R2NN06	RAVLTKFVEDNFS--DPLVEWVPPDFVETPTISTYVQDQNYKIWIQLNQIWKRLARKV	238
	: * * : : . * . . . : * * * : * . : : * : : * * : : * * . : * :	
A0A8R2JUJ7	KDDVRLHPDHYSIIYVPYPIVPPGGRFREFFYYWDSYNIIRGLLLSEMYTTVKGMLSNFLS	215
A0A8R2NN06	DEDVKINPDRHSSIIYLPNGFFIAGGRFTELYWDSYNIIRGAILCDMKDSARGIIQNFY	298
	. : * : : : * : * : * * . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
A0A8R2JUJ7	IINTYGHIPNGGRVYYANRSQPPMLVPMKSYIEATNDTTFLKENVDILEKEFSYWMLNH	275
A0A8R2NN06	LVHRFGYVPNGSRIYYLRSQPPLLIQMAASYTYTDDLDLFIKKNIQYLEAEFNFWMNTR	358
	: : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
A0A8R2JUJ7	TVDIEKDGKVYTLARYKDSSTGPRPESYREDISQA TLKTDNDKENYYSELKAAAESGWD	335
A0A8R2NN06	TIKVEKAGNTYIMGQYNHTHTRGPRPESYYQDKLATPLSSVDDKNELYSRLKAAAEWGWD	418
	* : : * * * : * . : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
A0A8R2JUJ7	FSSRWFI L NGTNKGNLTNLKTRFIIPVDLNLALVYWNAKILSDFYRELNVSDKALKYENIA	395
A0A8R2NN06	FSTKHYNFGQNTGDLSDNTDPQNFIIYVELNAILQANAVLAQLFKLLGNQAKFKYYNDIG	478
	* : : : : * * . : * : * . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
A0A8R2JUJ7	NKWIEAVTAVLWHEEVGAWLDDYDMLNEIKRDYFYPTNISPLWTGCYDPKKTDDFVSRTLK	455
A0A8R2NN06	HRFQIGINALWNEEEGIWLDYDLTTKLSRKYFYTSNFPAPLWTGSYERKLRTYYGKRVLD	538
	: : : . : . * : * : * * * * : : . : . * . * : : * : * : * : * : * : * : *	
A0A8R2JUJ7	YLEKTQIMNNG-----GIPTTLEHSGEWDYDYNAPPLQYIMVMSLDSGDNWAQDLAF	510
A0A8R2NN06	YLIVNGVINQDGTPLKICVPTSNVNSSQWDYDYNAPPLQAMVIQGLDRNTYKPAQTVAI	598
	* * . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
A0A8R2JUJ7	EIAERWMRSNYKAYNETNAMYKYDATVPGGHSGGEYEVQIGFGWTNGIILEFLQKYGS	570
A0A8R2NN06	NLAKSWINTNYVGYYITSGTMFKYSALEVGTTCGGGEYTPQIGFGWTNGIVFELFRWGH	658
	: : * : * : * . * : : * : * : * . * : * : * : * : * : * : * : * : *	
A0A8R2JUJ7	RVTAEDKFVEAPQTSANIDSSRSSTDYNTKTVSSATQVMTATLAILATISAGCIGFAVYK	630
A0A8R2NN06	LFRST-----	663
	. :	
A0A8R2JUJ7	KRYQLYASDRALCKKMCGGYTELKDITSD	659
A0A8R2NN06	-----	663

Figure 96: Alignement de séquence entre ApTreh-2a (A0A8R2JUJ7) et ApTreh-2b (A0A8R2NN06). Les résidus catalytiques sont surlignés en mauve, les arginines en orange. Les domaines transmembranaires sont encadrés en orange, tandis que la lid loop est en vert et les motifs tréhalase récurrents en rouge.

Alignement de séquences entre les deux formes d'ApTreh-2 détectée par spectrométrie de masse après purification (Figure 96). Les deux formes diffèrent de deux gènes différents, d'où la forte disparité d'identité de séquence.

## Annexe 7

Tableau 21: Résultats de l'analyse de la variance pour chaque sous-ensemble (inhibiteur, dosage et inhibiteur:dosage) à chaque étape pour les résultats *in vivo*

		24h		48h		72h	
	df	X <sup>2</sup>	p-value	X <sup>2</sup>	p-value	X <sup>2</sup>	p-value
<b>Inhibiteur</b>	3	21.12	9.903e-05 ***	36.76	5.153e-08 ***	112.0	< 2.2e-16 ***
<b>Dose</b>	1	34.65	3.944e-09 ***	45.64	1.419e-11 ***	103.7	< 2.2e-16 ***
<b>Inhibiteur:Dose</b>	3	19.48	0.0002174 ***	86.33	< 2.2e-16 ***	145.0	< 2.2e-16 ***

## Table d'analyse de déviation (Tests de Type II)

## Codes : 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1



## Annexe 8

Observations après 24h de diète

Tableau 22: Significations des comparaisons par paires à 24 heures lors des tests in vivo (comparaison des moyennes par moindres carrés corrigée pour les tests multiples avec la méthode HSD de Tukey).

contrast		estimate	SE	z.ratio	p.value	
Control - Sucrose 15%	Amygdalin 10µg/mL	-1.636	1.102	-1.485	0.8156	
Control - Sucrose 15%	Amygdalin 25µg/mL	-2.251	1.060	-2.123	0.3999	
Control - Sucrose 15%	Control - Cypermethrin 25µg/mL	-3.917	1.021	-3.838	0.0031	**
Control - Sucrose 15%	Phloridzin 10µg/mL	-1.406	1.124	-1.251	0.9164	
Control - Sucrose 15%	Phloridzin 25µg/mL	-2.251	1.060	-2.123	0.3999	
Control - Sucrose 15%	Validamycin 10µg/mL	-1.986	1.075	-1.847	0.5876	
Control - Sucrose 15%	Validamycin 25µg/mL	-2.466	1.051	-2.346	0.2684	
Amygdalin 10µg/mL	Amygdalin 25µg/mL	-0.615	0.570	-1.079	0.9612	
Amygdalin 10µg/mL	Control - Cypermethrin 25µg/mL	-2.280	0.492	-4.638	0.0001	***
Amygdalin 10µg/mL	Phloridzin 10µg/mL	0.230	0.681	0.338	1.0000	
Amygdalin 10µg/mL	Phloridzin 25µg/mL	-0.615	0.570	-1.079	0.9612	
Amygdalin 10µg/mL	Validamycin 10µg/mL	-0.350	0.597	-0.586	0.9990	
Amygdalin 10µg/mL	Validamycin 25µg/mL	-0.830	0.552	-1.503	0.8060	
Amygdalin 25µg/mL	Control - Cypermethrin 25µg/mL	-1.665	0.391	-4.256	0.0005	***
Amygdalin 25µg/mL	Phloridzin 10µg/mL	0.845	0.612	1.380	0.8665	
Amygdalin 25µg/mL	Phloridzin 25µg/mL	0.000	0.486	0.000	1.0000	
Amygdalin 25µg/mL	Validamycin 10µg/mL	0.265	0.517	0.512	0.9996	
Amygdalin 25µg/mL	Validamycin 25µg/mL	-0.215	0.465	-0.462	0.9998	
Control - Cypermethrin 25µg/mL	Phloridzin 10µg/mL	2.510	0.540	4.648	0.0001	***
Control - Cypermethrin 25µg/mL	Phloridzin 25µg/mL	1.665	0.391	4.256	0.0005	***
Control - Cypermethrin 25µg/mL	Validamycin 10µg/mL	1.930	0.430	4.491	0.0002	***
Control - Cypermethrin 25µg/mL	Validamycin 25µg/mL	1.451	0.365	3.978	0.0018	**
Phloridzin 10µg/mL	Phloridzin 25µg/mL	-0.845	0.612	-1.380	0.8665	
Phloridzin 10µg/mL	Validamycin 10µg/mL	-0.580	0.638	-0.910	0.9852	
Phloridzin 10µg/mL	Validamycin 25µg/mL	-1.060	0.596	-1.779	0.6342	
Phloridzin 25µg/mL	Validamycin 10µg/mL	0.265	0.517	0.512	0.9996	
Phloridzin 25µg/mL	Validamycin 25µg/mL	-0.215	0.465	-0.462	0.9998	
Validamycin 10µg/mL	Validamycin 25µg/mL	-0.480	0.498	-0.964	0.9794	

## Observations après 48h de diète

Tableau 23: Significations des comparaisons par paires à 48 heures lors des tests *in vivo* (comparaison des moyennes par moindres carrés corrigée pour les tests multiples avec la méthode HSD de Tukey).

contrast		estimate	SE	z.ratio	p.value	
Control - Sucrose 15%	Amygdalin 10µg/mL	-0.8806	0.357	-2.463	0.2113	
Control - Sucrose 15%	Amygdalin 25µg/mL	-0.8806	0.357	-2.463	0.2113	
Control - Sucrose 15%	Control - Cypermethrin 25µg/mL	-3.1900	0.339	-9.416	<.0001	***
Control - Sucrose 15%	Phloridzin 10µg/mL	-1.1239	0.349	-3.219	0.0281	*
Control - Sucrose 15%	Phloridzin 25µg/mL	-1.2693	0.345	-3.678	0.0057	**
Control - Sucrose 15%	Validamycin 10µg/mL	-1.1980	0.347	-3.453	0.0129	*
Control - Sucrose 15%	Validamycin 25µg/mL	-1.3718	0.343	-4.004	0.0016	**
Amygdalin 10µg/mL	Amygdalin 25µg/mL	0.0000	0.296	0.000	1.0000	
Amygdalin 10µg/mL	Control - Cypermethrin 25µg/mL	-2.3094	0.273	-8.465	<.0001	***
Amygdalin 10µg/mL	Phloridzin 10µg/mL	-0.2433	0.286	-0.852	0.9900	
Amygdalin 10µg/mL	Phloridzin 25µg/mL	-0.3888	0.281	-1.386	0.8642	
Amygdalin 10µg/mL	Validamycin 10µg/mL	-0.3175	0.283	-1.122	0.9522	
Amygdalin 10µg/mL	Validamycin 25µg/mL	-0.4912	0.278	-1.770	0.6408	
Amygdalin 25µg/mL	Control - Cypermethrin 25µg/mL	-2.3094	0.273	-8.465	<.0001	***
Amygdalin 25µg/mL	Phloridzin 10µg/mL	-0.2433	0.286	-0.852	0.9900	
Amygdalin 25µg/mL	Phloridzin 25µg/mL	-0.3888	0.281	-1.386	0.8642	
Amygdalin 25µg/mL	Validamycin 10µg/mL	-0.3175	0.283	-1.122	0.9522	
Amygdalin 25µg/mL	Validamycin 25µg/mL	-0.4912	0.278	-1.770	0.6408	
Control - Cypermethrin 25µg/mL	Phloridzin 10µg/mL	2.0661	0.262	7.893	<.0001	***
Control - Cypermethrin 25µg/mL	Phloridzin 25µg/mL	1.9206	0.256	7.492	<.0001	***
Control - Cypermethrin 25µg/mL	Validamycin 10µg/mL	1.9919	0.259	7.694	<.0001	***
Control - Cypermethrin 25µg/mL	Validamycin 25µg/mL	1.8182	0.253	7.185	<.0001	***
Phloridzin 10µg/mL	Phloridzin 25µg/mL	-0.1454	0.270	-0.539	0.9994	
Phloridzin 10µg/mL	Validamycin 10µg/mL	-0.0741	0.272	-0.272	1.0000	
Phloridzin 10µg/mL	Validamycin 25µg/mL	-0.2478	0.267	-0.929	0.9833	
Phloridzin 25µg/mL	Validamycin 10µg/mL	0.0713	0.267	0.267	1.0000	
Phloridzin 25µg/mL	Validamycin 25µg/mL	-0.1024	0.261	-0.392	0.9999	
Validamycin 10µg/mL	Validamycin 25µg/mL	-0.1737	0.264	-0.658	0.9980	

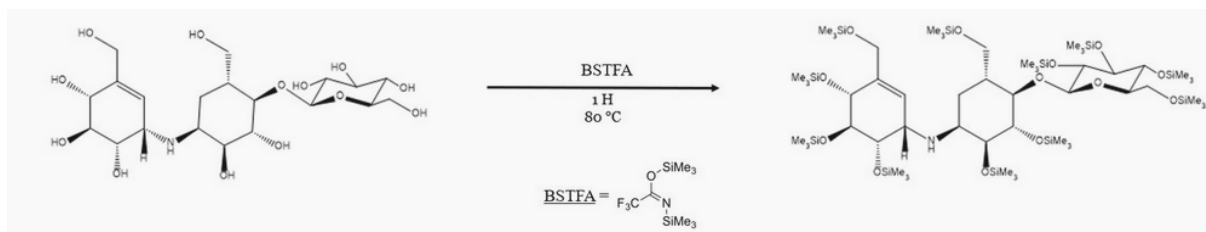
## Observations après 72h de diète

Tableau 24: Significations des comparaisons par paires à 48 heures lors des tests *in vivo* (comparaison des moyennes par moindres carrés corrigée pour les tests multiples avec la méthode HSD de Tukey).

contrast		estimate	SE	z.ratio	p.value	
Control - Sucrose 15%	Amygdalin 10µg/mL	estimate	SE	z.ratio	p.value	
Control - Sucrose 15%	Amygdalin 25µg/mL	-0.700	0.269	-2.600	0.1557	
Control - Sucrose 15%	Control - Cypermethrin 25µg/mL	-1.069	0.264	-4.051	0.0013	**
Control - Sucrose 15%	Phloridzin 10µg/mL	-5.365	0.619	-8.674	<.0001	***
Control - Sucrose 15%	Phloridzin 25µg/mL	-1.650	0.263	-6.283	<.0001	***
Control - Sucrose 15%	Validamycin 10µg/mL	-2.031	0.266	-7.624	<.0001	***
Control - Sucrose 15%	Validamycin 25µg/mL	-2.297	0.271	-8.466	<.0001	***
Amygdalin 10µg/mL	Amygdalin 25µg/mL	-2.993	0.296	-10.118	<.0001	***
Amygdalin 10µg/mL	Control - Cypermethrin 25µg/mL	-0.369	0.239	-1.543	0.7840	
Amygdalin 10µg/mL	Phloridzin 10µg/mL	-4.665	0.608	-7.668	<.0001	***
Amygdalin 10µg/mL	Phloridzin 25µg/mL	-0.949	0.238	-3.996	0.0017	**
Amygdalin 10µg/mL	Validamycin 10µg/mL	-1.330	0.242	-5.504	<.0001	***
Amygdalin 10µg/mL	Validamycin 25µg/mL	-1.597	0.247	-6.459	<.0001	***
Amygdalin 25µg/mL	Control - Cypermethrin 25µg/mL	-2.293	0.274	-8.373	<.0001	***
Amygdalin 25µg/mL	Phloridzin 10µg/mL	-4.296	0.606	-7.090	<.0001	***
Amygdalin 25µg/mL	Phloridzin 25µg/mL	-0.580	0.231	-2.509	0.1914	
Amygdalin 25µg/mL	Validamycin 10µg/mL	-0.961	0.236	-4.081	0.0012	**
Amygdalin 25µg/mL	Validamycin 25µg/mL	-1.228	0.241	-5.090	<.0001	***
Control - Cypermethrin 25µg/mL	Phloridzin 10µg/mL	-1.924	0.268	-7.166	<.0001	***
Control - Cypermethrin 25µg/mL	Phloridzin 25µg/mL	3.715	0.605	6.138	<.0001	***
Control - Cypermethrin 25µg/mL	Validamycin 10µg/mL	3.334	0.607	5.494	<.0001	***
Control - Cypermethrin 25µg/mL	Validamycin 25µg/mL	3.068	0.609	5.036	<.0001	***
Phloridzin 10µg/mL	Phloridzin 25µg/mL	2.372	0.620	3.822	0.0033	**
Phloridzin 10µg/mL	Validamycin 10µg/mL	-0.381	0.234	-1.627	0.7337	
Phloridzin 10µg/mL	Validamycin 25µg/mL	-0.647	0.240	-2.701	0.1223	
Phloridzin 25µg/mL	Validamycin 10µg/mL	-1.344	0.267	-5.030	<.0001	***
Phloridzin 25µg/mL	Validamycin 25µg/mL	-0.267	0.244	-1.093	0.9585	
Validamycin 10µg/mL	Validamycin 25µg/mL	-0.963	0.271	-3.555	0.0090	**

## Annexe 9

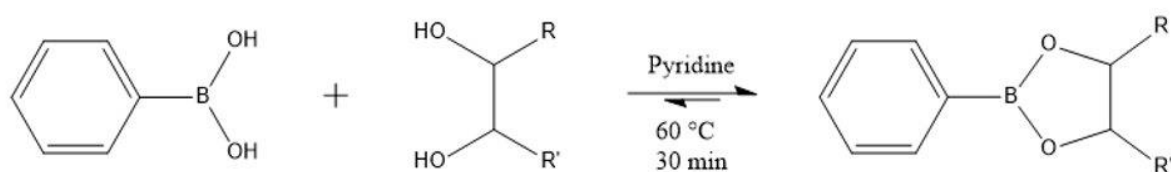
### Dérivatisation et analyse par GC-MS de la validamycine A



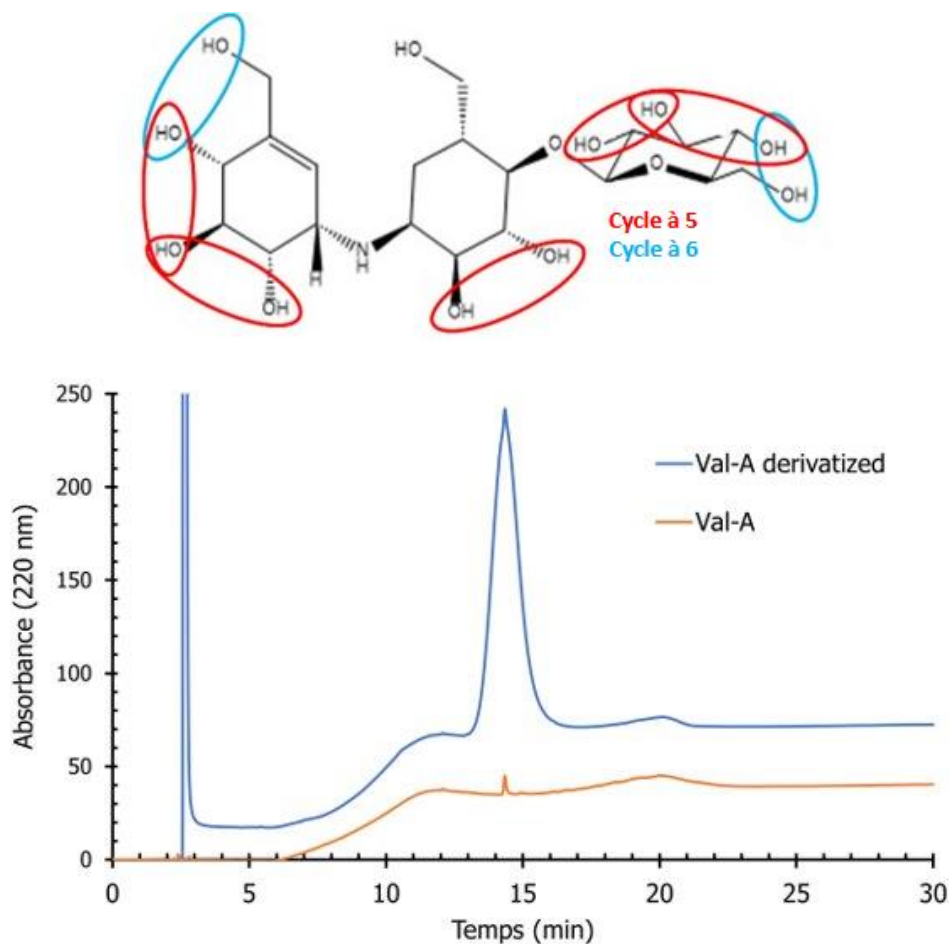
Aucun signal observé par FID ou via le module MS

### Dérivatisation et analyse par HPLC-UV

Avec l'acide phénylboronique

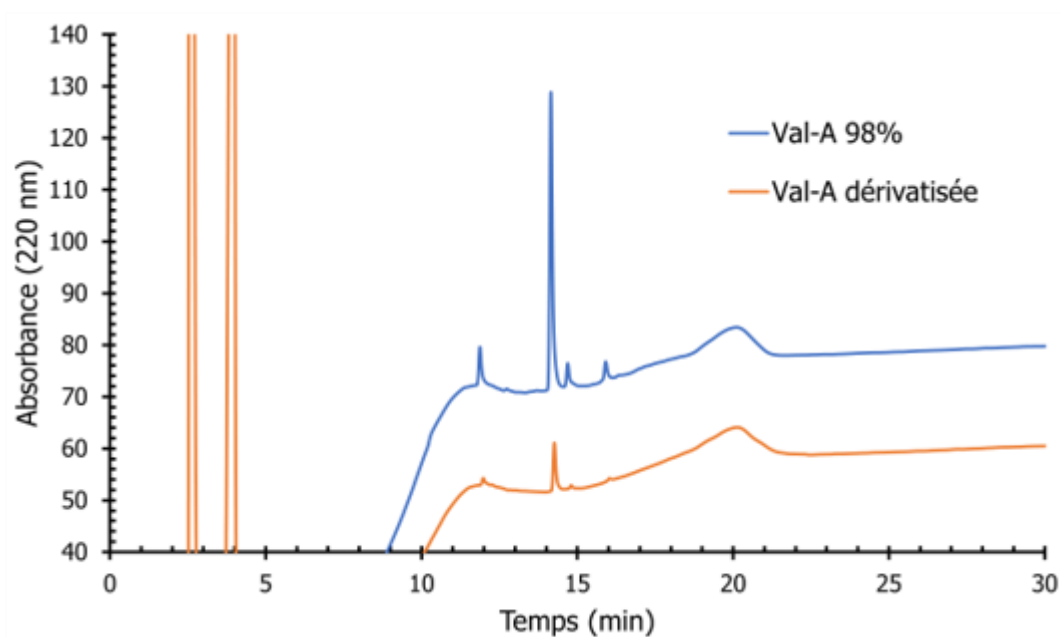
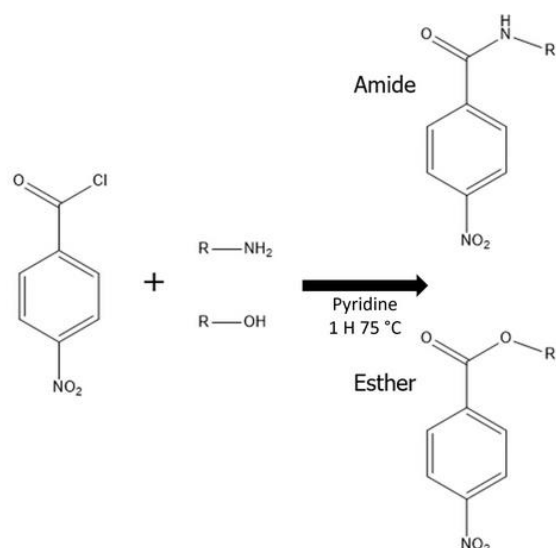


Différents sites de réactions possibles sur la validamycine A, cycles à 6C plus favorables que cycle à 5C



Pas de différence dans les temps de rétention entre la validamycine A dérivatisée et la non-dérivée.

Avec le nitro-4-benzoyl chlorure



Pas de différence dans les temps de rétention entre la validamycine A dérivatisée et la non-dérivée.

## Annexe 10

Résultats docking de la banque de données ZINC

Score	<i>S</i> (PLP)	<i>S</i> (hbond)	<i>S</i> (cho)	<i>S</i> (metal)	<i>DE</i> (clash)	<i>DE</i> (tors)	intcor
81,38	-69,89	4,91	0	0	0	3,38	3,53
76,63	-60,26	5,12	1	0	0	1,06	0,12
76,55	-67,39	3,78	0	0	1,48	0,92	1,14
76,27	-62,57	5,33	0	0	0	1,15	0,03
75,58	-61,82	5,17	0	0	0	0,9	0,04
75,4	-58,48	4,97	1	0	0	0,53	0,01
75,33	-59,97	5,96	0	0	0	1,35	0,09
75,21	-62,91	4,72	0,21	0	0,02	2,69	2,93

75,02	-61,33	5,21	0	0	0	1,03	0,12
74,78	-66,98	3,03	0	0	0	1,58	1,85
74,72	-59,06	6,1	0	0	1,94	0,37	0,02
74,66	-60,88	2	2,73	0	0	0,89	1,36
74,54	-65,48	3,53	0	0	0	0,79	0,01
74,52	-69,97	2,03	0	0	0	0,9	0,25
74,49	-58,18	2,08	3,65	0	0	1,21	1,19
74,34	-56,68	6,28	0	0	0	1,11	0,17
74,21	-59,25	5,21	0	0	0,18	0,36	0,08
74,12	-55,65	6,26	0	0	0	0,16	0
73,97	-59,44	5,39	0	0	0	0,97	0,12
73,78	-64,13	4,06	0	0	1,44	0,7	0,3
73,56	-59,46	5,01	0	0	0	0,48	0,01
73,56	-58,49	6,08	0	0	0	2,17	1,17
73,43	-57,53	6,55	0	0	0,37	1,89	0,39
73,39	-63,56	4,32	0	0	23,62	1,25	23,01
73,29	-58,95	5,44	0	0	0	1,13	0,21
73,28	-62,66	3,99	0	0	0	0,71	0,07
73,17	-60,74	4,69	0	0	0	2,22	2,41
73,09	-58,78	4,79	0,66	0	0	1,14	0,23
72,82	-58,44	5,21	0	0	0	0,63	0,01
72,77	-59,3	4,38	0,97	0	0	1,33	0,09
72,75	-59,9	4,99	0	0	0	1,15	0,12
72,74	-58,27	2,11	3,42	0	0	1,75	1,1
72,56	-56,88	4,62	1	0	0	0,63	0,08
72,36	-59,5	5,17	0	0	51,55	2,59	54,08
72,25	-56,39	2,2	3,52	0	0	1,22	1,01
72,18	-58,65	4,9	0	0	0	0,58	0
72,15	-65,14	2,73	0	0	0	1,77	2,3
72,15	-60,07	4,5	0	0	0,51	0,98	1,03
72,07	-56,72	5,65	0	0	0,35	0,9	0,19
71,9	-55,18	6,47	0	0	1,66	1,71	2,41

## Annexe 11

Score	S(PLP)	S(hbond)	S(cho)	S(metal)	DE(clash)	DE(tors)	intcor	N°plaque
79,51	-63,5	4,53	2	0	0,78	1,78	0,75	E9
75,96	-57,27	6,83	0	0	0,06	0,96	0,2	E2
73,63	-54,65	5,99	1	0	0	1,68	1,36	C8
72,6	-59,91	1	3,78	0	0	0,92	0,14	E8
72,51	-67,76	2,21	0	0	0	2,27	2,3	G3
72,4	-62,47	4,02	0	0	0	1,11	0,06	H4
72,38	-67,56	1,94	0	0	0	0,75	0,34	
72,1	-62,04	3,9	0	0	0	1,3	0,95	H6
71,98	-59,38	3,14	1,86	0	1,12	0,75	0,2	E6
69,81	-60,22	3,48	0	0	0	0,8	0,76	C7
69,2	-60,99	2,62	1,5	0	0,73	1,74	0,07	
68,99	-64,77	2,03	0	0	0	1,1	0,32	
68,82	-57,35	3,3	1	0	0	1,91	1,88	
68,73	-59,51	3,65	0,98	0	0,81	2,37	0,86	
68,69	-52,42	5,83	0	0	0	0,67	0,11	C2
68,45	-55,84	3,94	0,99	0	0	1,7	1,23	
68,1	-61,06	3,41	0	0	0	1,9	0,23	
67,99	-59,18	0,53	2,92	0	0	1,38	1,21	F6
67,4	-57,91	4,59	0	0	0	2,38	0,49	A9

67,24	-56,59	4,07	0	0	0	0,82	0,08	
67,11	-64,45	0	1	0	0	0,33	0,31	
66,97	-69,57	0	0	0	0	1,36	0,09	
66,91	-55,36	3,39	1,05	0	0	1,27	0,42	
66,68	-65,89	0	1	0	0	1,71	1,22	
66,63	-62,09	1,74	0,89	0	0,19	1,86	0,56	
66,45	-52,56	2,8	2,26	0	0,24	0,53	0,01	A8
66,42	-57,58	3,48	0	0	0	0,83	0,03	
66,4	-53,13	3,56	0,94	0	0	1,12	2,01	
66,31	-67,6	0	0	0	0	1,46	1,53	
66,24	-59,56	3,04	0	0	0	2,03	1,63	B7
66,21	-51,6	3,33	2,72	0	0	2,27	0,93	A6
66,19	-50,84	5,35	0	0	0	0,51	0,31	F2
66,16	-66	1,14	0	0	0	2,11	0,87	
66,13	-57,55	2,89	1	0	0	1,61	0,14	G7
66,1	-54,39	3,46	1,32	0	0	2,09	1,54	B4
66,01	-60,81	2,5	0,99	0	0	2,67	0,09	D6
66	-60,97	2,5	0	0	0	1,25	0,05	B3
65,97	-61,25	2,83	0	0	0	2,01	0,25	D2
65,88	-64,32	0	0,82	0	0	0,77	0,56	
65,86	-54,26	4,25	0,01	0	0	0,64	0,04	E3
65,78	-47,8	6,1	0	0	0	0,2	0,09	A2
65,77	-63,2	1,99	0	0	0	1,97	0,55	
65,68	-61,23	1,02	1	0	0	0,85	0,1	D9
65,62	-61,2	1,99	0,6	0	0,01	1,75	0,15	F5
65,6	-63,8	0,95	0	0	0	0,63	0,2	
65,52	-56,71	4,78	0	0	0	4,52	3,52	
65,51	-53,32	3,29	1,42	0	0	1,07	0,19	E7
65,46	-50,04	0,63	5,21	0	0	1,52	0,92	
65,46	-57,67	3	0	0	0	0,72	0,22	A5
65,45	-61,91	1,52	1	0	0	2,71	0,79	
65,39	-53,96	2,2	2,42	0	0	1,27	0,1	F3
65,36	-59,39	2,81	0	0	0	2	1,53	
65,32	-62,86	1,56	0	0	0,59	0,85	0,08	C5
65,23	-54,41	3	1,99	0	0	2,18	0,23	
65,22	-47,83	3,99	2,97	0	0	1,78	0,07	C6
65,2	-58,61	3,12	0	0	0	1,51	0,24	H3
65,18	-53,73	2,24	1,92	0	0	0,56	0,07	A4
65,14	-55,95	3,84	0	0	0	1,94	1,34	B6
65,12	-65,62	0	0	0	0	0,99	1,47	
65,12	-53,36	3,54	0,89	0	0	1,23	0,93	A7
65,12	-61,49	2,29	0	0	0,69	1,95	1,35	G5
65,09	-54,48	3,08	0,84	0	0	1,62	2,03	A3
65,08	-55,24	4,43	1	0	3,44	1,91	0,73	D4
65,01	-62,45	0	1	0	0	0,35	0,09	
65	-70,42	0	0	0	1,44	2,2	0,42	
64,99	-60,98	0	1,9	0	0	0,96	0,25	
64,97	-53,7	2,59	2,34	0	0,03	1,97	0,39	
64,96	-62,92	1,48	0	0	0,61	1,12	0,39	
64,92	-62,75	1,79	0	0	0,4	2,24	1,67	B8
64,78	-52,44	2,99	1,86	0	0	1,14	0,08	H8
64,76	-58,05	2,77	0	0	0	0,83	0,06	B9
64,73	-60,02	2	0	0	0	1,6	1,91	
64,6	-64,88	0,6	0,44	0	0	2,03	0,68	
64,6	-54,42	3,81	0	0	0	0,69	0,05	

64,57	-65,27	0	0,93	0	0	2,2	0,93	
64,55	-51,31	1,98	2,71	0	0	0,52	0,15	B5
64,49	-58,68	0	2	0	0	0,32	0,45	
64,43	-53,62	3,87	0,44	0	0,47	0,95	0,25	C4
64,39	-57,25	3,48	0	0	0	1,67	0,02	E4
64,35	-52,46	4,35	0	0	0	0,61	0,07	B2
64,31	-57,7	2,71	0	0	0	0,99	0,46	E5
64,3	-62,3	1	0	0	0	0,71	0,39	
64,19	-57,69	1,47	1,77	0	0,36	2,81	2,72	C9
64,17	-61,32	1,43	0	0	0	0,73	0,03	G8
64,12	-57,85	0,96	1,85	0	0	1,58	0,96	
64,09	-49,74	3,82	1,99	0	0	1,56	0,06	F8
64,08	-55,4	3,25	0	0	0	2,02	2,97	H5
64,02	-61,87	0,85	0,99	0	0	2,6	1,83	
63,96	-54,9	3,45	0	0	0	0,69	0,05	F7
63,92	-54,79	3,4	0,02	0	0	0,7	0,2	F4
63,85	-58,88	1	1,5	0	0	2,28	0,58	D7
63,83	-56,51	2,04	1	0	0	0,95	0,06	
63,82	-46,94	2,91	2,98	0	0	0,49	0,17	C3
63,79	-57,55	2,35	0	0	0	0,41	0,01	D5
63,79	-60,5	0,37	1,8	0	0,01	1,94	0,48	
63,76	-61,64	0	1	0	0	0,71	0,54	
63,76	-59,19	2	0,47	0	0,65	2,45	2,67	
63,75	-58,34	0,86	1,22	0	0	1,17	1,4	
63,71	-50,34	4,46	0,73	0	0,31	1	0,12	G4
63,7	-52,61	1,66	2,45	0	0	0,63	0,01	D3
63,67	-55,88	2,18	1	0	0	0,9	0,05	D8
63,67	-54,6	3,03	1	0	0	1,65	0,27	H7
63,66	-59,34	1,75	0	0	0	0,5	0,07	H2
63,56	-62,39	0,98	0	0	0	0,95	0,14	G6
63,54	-51,68	2,19	2,83	0	0,74	1,34	0,11	
63,54	-53,93	2,12	1,73	0	0	1,03	0,13	
63,54	-60,07	0,88	0,44	0	0	0,43	0,16	
63,5	-54,98	1,27	1,81	0	0	0,36	0,01	
63,49	-58,69	1,98	0	0	0	2,07	2,94	
63,48	-56,6	1,9	0,76	0	0	2,55	4,02	G2



## Annexe 12

Interactions ApTreh-B2				
Interactions hydrophobes	Liaisons hydrogènes	Pont salin	$\pi$ -stacking	$\pi$ -cation
<i>Phe183</i>	<i>Arg182</i>		<i>Tyr187</i>	
<i>Tyr554</i>	<i>Arg300</i>			
<i>Trp562</i>	<i>Ser303</i>			
	<i>Asp336</i>			
	<i>Gln485</i>			
	<i>Trp486</i>			
	<i>Tyr554</i>			

Interactions ApTreh-F2				
Interactions hydrophobes	Liaisons hydrogènes	Pont salin	$\pi$ -stacking	$\pi$ -cation
<i>Phe183</i>	<i>Trp189</i>	<i>Asp190</i>		
<i>Tyr187</i>	<i>Asp190</i>	<i>Asp336</i>		
<i>Tyr554</i>	<i>Asn226</i>			
	<i>Arg235</i>			
	<i>Gln237</i>			
	<i>Arg300</i>			
	<i>Ser303</i>			
	<i>Asp336</i>			
	<i>Glu553</i>			

Interactions ApTreh-B4				
Interactions hydrophobes	Liaisons hydrogènes	Pont salin	$\pi$ -stacking	$\pi$ -cation
<i>Tyr187</i>	<i>Trp189</i>	<i>Glu302</i>		
	<i>Asn226</i>	<i>Asp336</i>		
	<i>Arg235</i>	<i>Glu553</i>		
	<i>Gln237</i>			
	<i>Arg300</i>			
	<i>Gly334</i>			
	<i>Trp486</i>			
	<i>Tyr554</i>			

Interactions ApTreh-C5				
Interactions hydrophobes	Liaisons hydrogènes	Pont salin	$\pi$ -stacking	$\pi$ -cation
<i>Lys67</i>	<i>Asn226</i>		<i>Phe183</i>	
<i>Pro179</i>	<i>Gln237</i>		<i>Tyr187</i>	
<i>Tyr187</i>				
<i>Trp492</i>				
<i>Phe560</i>				
<i>Trp562</i>				

Interactions ApTreh-B7				
------------------------	--	--	--	--

Interactions hydrophobes	Liaisons hydrogènes	Pont salin	$\pi$ -stacking	$\pi$ -cation
<i>Trp492</i>	<i>Arg182</i>		<i>Phe183</i>	
<i>Phe560</i>	<i>Trp189</i>		<i>Tyr187</i>	
<i>Trp562</i>	<i>Gln237</i>			
	<i>Glu553</i>			

Interactions ApTreh-C7				
Interactions hydrophobes	Liaisons hydrogènes	Pont salin	$\pi$ -stacking	$\pi$ -cation
<i>Trp492</i>	<i>Arg182</i>		<i>Tyr187</i>	
<i>Trp562</i>	<i>Trp189</i>			
	<i>Gln237</i>			
	<i>Glu553</i>			

Interactions ApTreh-G7				
Interactions hydrophobes	Liaisons hydrogènes	Pont salin	$\pi$ -stacking	$\pi$ -cation
<i>Phe183</i>	<i>Arg182</i>		<i>Tyr187</i>	
<i>Tyr232</i>	<i>Trp189</i>			
<i>Glu302</i>	<i>Gln237</i>			
<i>Trp562</i>	<i>Asp336</i>			

Interactions ApTreh-D8				
Interactions hydrophobes	Liaisons hydrogènes	Pont salin	$\pi$ -stacking	$\pi$ -cation
<i>Pro179</i>	<i>Arg182</i>		<i>Phe183</i>	
<i>Ala331</i>	<i>Asn226</i>		<i>Tyr187</i>	
<i>Phe560</i>	<i>Ser303</i>			
<i>Trp562</i>	<i>Asp336</i>			
	<i>Gln485</i>			
	<i>Glu553</i>			

Interactions ApTreh-E8				
Interactions hydrophobes	Liaisons hydrogènes	Pont salin	$\pi$ -stacking	$\pi$ -cation
<i>Phe183</i>	<i>Arg182</i>		<i>Tyr187</i>	<i>Arg182</i>
<i>Trp486</i>	<i>Asn226</i>		<i>Trp562</i>	

<i>Phe560</i>	<i>Gln237</i>			
	<i>Arg300</i>			
	<i>Glu553</i>			

<b>Interactions ApTreh-ZC5</b>				
Interactions hydrophobes	Liaisons hydrogènes	Pont salin	$\pi$ -stacking	$\pi$ -cation
<i>Pro179</i>	<i>Arg182</i>		<i>Phe183</i>	
<i>Phe183</i>	<i>Asn226</i>		<i>Tyr187</i>	
<i>Tyr187</i>	<i>Arg300</i>			
<i>Tyr232</i>	<i>Ser303</i>			
<i>Glu302</i>	<i>Gly334</i>			
<i>Trp492</i>	<i>Gln485</i>			
<i>Phe560</i>	<i>Trp486</i>			
<i>Trp562</i>	<i>Glu553</i>			
	<i>Tyr554</i>			

# Références

---



## Références

1. Smith B, America N. The Slow Birth of Agriculture. *Science* (80-). 1998;282(November).
2. FAO. FAOSTAT.
3. OECD, FAO. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2023-2032*.; 2023. [https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2023-2032\\_08801ab7-en](https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2023-2032_08801ab7-en)
4. Bradshaw CJA, Leroy B, Bellard C, et al. Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nat Commun*. 2016;7. doi:10.1038/ncomms12986
5. Banerjee A, Duflo E, Postel-Vinay G, Watts T. Long-run health impacts of income shocks: Wine and phylloxera in nineteenth-century France. *Rev Econ Stat*. 2010;92(4):714-728. doi:10.1162/REST\_a\_00024
6. Feytaud J. Le Doryphore à la conquête de l'Europe. In: *Proceedings of the VIII International Congress of Entomology, Sweden, Stockholm*. ; 1950:643-646.
7. Kogan M. Integrated pest management: Historical perspectives and contemporary developments. *Annu Rev Entomol*. 1998;43:243-270. doi:10.1146/annurev.ento.43.1.243
8. Collier R. Pest insect management in vegetable crops grown outdoors in northern Europe – approaches at the bottom of the IPM pyramid. *Front Hortic*. 2023;2(April):1-11. doi:10.3389/fhort.2023.1159375
9. Naranjo SE. Impacts of Bt transgenic cotton on integrated pest management. *J Agric Food Chem*. 2011;59(11):5842-5851. doi:10.1021/jf102939c
10. Hokkanen HMT. Integrated pest management at the crossroads: Science, politics, or business (as usual)? *Arthropod Plant Interact*. 2015;9(6):543-545. doi:10.1007/s11829-015-9403-y
11. Halbrendt J., LaMondia J. Crop Rotation and Other Cultural Practices. Published 2004. <https://revistas.ufir.br/index.php/rce/article/download/1659/1508%0Ahttp://hipatiapress.com/hpjournals/index.php/qre/article/view/1348%5Cnhttp://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09500799708666915%5Cnhttps://mckinseyonsociety.com/downloads/reports/Educa>
12. Li C, Hoffland E, Kuyper TW, et al. Syndromes of production in intercropping impact yield gains. *Nat Plants*. 2020;6(6):653-660. doi:10.1038/s41477-020-0680-9
13. Lopes T, Bodson B, Francis F. Associations of Wheat with Pea Can Reduce Aphid Infestations. *Neotrop Entomol*. 2015;44(3):286-293. doi:10.1007/s13744-015-0282-9
14. Brown PMJ, Thomas CE, Lombaert E, Jeffries DL, Estoup A, Handley LJJ. The global spread of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): Distribution, dispersal and routes of invasion. *BioControl*. 2011;56(4):623-641. doi:10.1007/s10526-011-9379-1
15. Pijnakker J, Vangansbeke D, Duarte M, Moerkens R, Wäckers FL. Predators and Parasitoids-in-First: From Inundative Releases to Preventative Biological Control in Greenhouse Crops. *Front Sustain Food Syst*. 2020;4(December). doi:10.3389/fsufs.2020.595630
16. Tonle FBN, Niassy S, Ndadji MMZ, et al. A road map for developing novel decision support system (DSS) for disseminating integrated pest management (IPM) technologies. *Comput Electron Agric*. 2024;217(December 2023):108526. doi:10.1016/j.compag.2023.108526
17. Baliota G V., Athanassiou CG. Use of paraffin oils in agriculture and beyond: back to the future. *Environ Sci Pollut Res*. 2023;30(2):2392-2405. doi:10.1007/s11356-022-24059-5
18. Heinrichs EA. Biology and Management of Rice Insects. In: *Management Insects*. ; 1994:559-594.

19. Smart LE, Aradottir GI, Bruce TJA. *Role of Semiochemicals in Integrated Pest Management*. Elsevier Inc.; 2014. doi:10.1016/B978-0-12-398529-3.00007-5
20. Tamaki Y. *Insect Sex Pheromones and Integrated Pest Management: Problems and Perspectives*. International Union of Pure and Applied Chemistry; 1983. doi:10.1016/b978-0-08-029223-6.50010-0
21. Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J Invertebr Pathol*. 2015;132:1-41. doi:10.1016/j.jip.2015.07.009
22. Melo ALDA, Soccol VT, Soccol CR. Bacillus thuringiensis: Mechanism of action, resistance, and new applications: A review. *Crit Rev Biotechnol*. 2016;36(2):317-326. doi:10.3109/07388551.2014.960793
23. Bravo A, Soberón M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol*. 2008;26(10):573-579. doi:10.1016/j.tibtech.2008.06.005
24. Mascarín GM, Jaronski ST. The production and uses of Beauveria bassiana as a microbial insecticide. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016;32(11):1-26. doi:10.1007/s11274-016-2131-3
25. Wu H, Zhang R, Liu J, Guo Y, Ma E. Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in Oxya chinensis (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). *Chemosphere*. 2011;83(4):599-604. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.004
26. Kaleem Ullah RM, Gao F, Sikandar A, Wu H. Insights into the Effects of Insecticides on Aphids (Hemiptera: Aphididae): Resistance Mechanisms and Molecular Basis. *Int J Mol Sci*. 2023;24(7). doi:10.3390/ijms24076750
27. Sparks TC, Nauen R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic Biochem Physiol*. 2015;121:122-128. doi:10.1016/j.pestbp.2014.11.014
28. Brévault T, Oumarou Y, Achaleke J, Vaissayre M, Nibouche S. Initial activity and persistence of insecticides for the control of bollworms (Lepidoptera: Noctuidae) in cotton crops. *Crop Prot*. 2009;28(5):401-406. doi:10.1016/j.cropro.2008.12.006
29. Bjørling-Poulsen M, Andersen HR, Grandjean P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ Heal A Glob Access Sci Source*. 2008;7. doi:10.1186/1476-069X-7-50
30. Jia B, Zhang J, Hong S, Chang X, Li X. Sublethal effects of chlorfenapyr on Plutella xylostella (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Manag Sci*. 2023;79(1):88-96. doi:10.1002/ps.7175
31. Moscardi F. Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. *Annu Rev Entomol*. 1999;44:257-289. doi:10.1146/annurev.ento.44.1.257
32. Mohandass S, Arthur FH, Zhu KY, Throne JE. Hydroprene prolongs developmental time and increases mortality in wandering-phase Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *J Econ Entomol*. 2006;99(4):1509-1519. doi:10.1093/jee/99.4.1509
33. Martinez SS, Van Emden HF. Growth disruption, abnormalities and mortality of Spodoptera littoralis (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. *Neotrop Entomol*. 2001;30(1):113-125. doi:10.1590/s1519-566x2001000100017
34. Nishimura K. The Mode of Action of Pyrethroids. *J Pestic Sci*. 1984;9(2):365-374. doi:10.1584/jpestics.9.365
35. Gleave K, Lissenden N, Richardson M, Choi L, Ranson H. Piperonyl butoxide (PBO) combined with pyrethroids in insecticidetreated nets to prevent malaria in Africa. *Cochrane database Syst Rev*. 2021;(5):1-97. doi:10.1002/14651858.CD012776.pub3.Copyright

36. Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect.* 1990;87:245-254. doi:10.1289/ehp.9087245
37. Trotter DM, Kent RA, Wong MP. Aquatic Fate and Effect of Carbofuran. *Crit Rev Environ Control.* 1991;21(2):137-176. doi:10.1080/10643389109388412
38. Taillebois E, Cartereau A, Jones AK, Thany SH. Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. *Pestic Biochem Physiol.* 2018;151:59-66. doi:10.1016/j.pestbp.2018.04.007
39. Elbert A, Nauen R, Leicht W. Imidacloprid, a Novel Chloronicotinyl Insecticide: Biological Activity and Agricultural Importance. *Insectic with Nov Modes Action.* Published online 1998:50-73. doi:10.1007/978-3-662-03565-8\_4
40. al-Saleh I. Pesticides: a review article. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 1994;Journal of(13(3)):151-161.
41. Van Der Werf HMG. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agric Ecosyst Environ.* 1996;60(2-3):81-96. doi:10.1016/S0167-8809(96)01096-1
42. Viswanathan R. Earthworms and assessment of ecological impact of soil xenobiotics. *Chemosphere.* 1994;28(2):413-420. doi:10.1016/0045-6535(94)90137-6
43. Ihegwuagu NE, Sha 'ato R, Tor-Anyiin T, Nnamonu LA, Muller X, Maaza M. Soil lixiviation and slow release pattern of starch-nano sliver particles-encapsulated dichlorvosinsecticide formulation. *IOSR J Agric Vet Sci Ver I.* 2015;8(11):2319-2372. doi:10.9790/2380-081111524
44. Kaufman DD. Degradation of Pesticides By Soil Microorganisms. *Pestic Soil Water.* Published online 1974:133-202.
45. Li Y, Li Y, Bi G, Ward TJ, Li L. Adsorption and degradation of neonicotinoid insecticides in agricultural soils. *Environ Sci Pollut Res.* 2023;30(16):47516-47526. doi:10.1007/s11356-023-25671-9
46. Pietrzak D, Kania J, Malina G, Kmiecik E, Wątor K. Pesticides from the EU First and Second Watch Lists in the Water Environment. *Clean - Soil, Air, Water.* 2019;47(7). doi:10.1002/clen.201800376
47. Tsaoulas A, Papadakis EN, Vryzas Z, Kotopoulou A, Kintzikoglou K, Papadopoulou-Mourkidou E. Environmental and human risk hierarchy of pesticides: A prioritization method, based on monitoring, hazard assessment and environmental fate. *Environ Int.* 2016;91:78-93. doi:10.1016/j.envint.2016.02.008
48. Sánchez-Bayo F, Hyne R V. Detection and analysis of neonicotinoids in river waters - Development of a passive sampler for three commonly used insecticides. *Chemosphere.* 2014;99:143-151. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.10.051
49. Kumari K. Pesticides toxicity in fishes: A review. *J Entomol Zool Stud.* 2020;8(5):1640-1642. <http://www.entomoljournal.com>
50. Amenyogbe E, Huang J, Chen G, Wang Z. An overview of the pesticides' impacts on fishes and humans. *Int J Aquat Biol.* 2021;9(1):55-65. doi:https://doi.org/10.22034/ijab.v9i1.972
51. Doan NH, Duong HT, Trinh HT, Tanaka Y, Kadokami K. Comprehensive study of insecticides in atmospheric particulate matter in Hanoi, Vietnam: Occurrences and human risk assessment. *Chemosphere.* 2021;262:128028. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128028
52. Weisenburger DD. Human health effects of agrichemical use. *Hum Pathol.* 1993;24(6):571-576. doi:10.1016/0046-8177(93)90234-8
53. Igbedioh SO. Effects of agricultural pesticides on humans, animals, and higher plants in



- developing countries. *Arch Environ Health*. 1991;46(4):218-224. doi:10.1080/00039896.1991.9937452
54. Maroni M, Fanetti AC MF. Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides in agriculture. *Med Lav*. 2006;97(2):430-437.
55. Durham WF, Wolfe HR, Quinby GE. Organophosphorus insecticides and mental alertness. *Arch Environ Health*. 1965;10(1):55-66. doi:10.1080/00039896.1965.10663953
56. Király J, Szentesi I, Ruzicska M, Czeize A. Chromosome studies in workers producing organophosphate insecticides. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1979;8(3):309-319. doi:10.1007/BF01056247
57. Fleming L, Mann JB, Bean J, Briggie T, Sanchez-Ramos JR. Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides. *Ann Neurol*. 1994;36(1):100-103. doi:10.1002/ana.410360119
58. Morgan DP, Roan CC. Absorption, storage, and metabolic conversion of ingested ddt and ddt metabolites in man. *Arch Environ Health*. 1971;22(3):301-308. doi:10.1080/00039896.1971.10665848
59. Ross GW, Abbott RD, Petrovitch H, et al. Association of brain heptachlor epoxide and other organochlorine compounds with lewy pathology. *Mov Disord*. 2019;34(2):228-235. doi:10.1002/mds.27594
60. Ross SMK, McManus IC, Harrison V, Mason O. Neurobehavioral problems following low-level exposure to organophosphate pesticides: A systematic and meta-analytic review. *Crit Rev Toxicol*. 2013;43(1):21-44. doi:10.3109/10408444.2012.738645
61. Pope C, Karanth S, Liu J. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: Uses and misuses of a common mechanism of action. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2005;19(3):433-446. doi:10.1016/j.etap.2004.12.048
62. Burke RD, Todd SW, Lumsden E, et al. Developmental neurotoxicity of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos: from clinical findings to preclinical models and potential mechanisms. *J Neurochem*. 2017;142:162-177. doi:10.1111/jnc.14077
63. White RF, Steele L, O'Callaghan JP, et al. Recent research on Gulf War illness and other health problems in veterans of the 1991 Gulf War: Effects of toxicant exposures during deployment. *Cortex*. 2016;74(October):449-475. doi:10.1016/j.cortex.2015.08.022
64. Wolansky MJ, Harrill JA. Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: A critical review. *Neurotoxicol Teratol*. 2008;30(2):55-78. doi:10.1016/j.ntt.2007.10.005
65. Cimino AM, Boyles AL, Thayer KA, Perry MJ. Review Effects of Neonicotinoid Pesticide Exposure on Human Health : A Systematic Review. 2017;125(2):155-162.
66. Zhang D, Lu S. Human exposure to neonicotinoids and the associated health risks : A review. *Environ Int*. 2022;163(January):107201. doi:10.1016/j.envint.2022.107201
67. Thompson D, Lehmler H-J, Kolpin D, et al. A critical review on the potential impacts of neonicotinoid insecticide use: current knowledge of environmental fate, toxicity, and implications for human health. *Environ Sci Process Impacts*. 2020;22:1315-1346. doi:10.1039/C9EM00586B
68. Cavalier H. Exposures to pesticides and risk of cancer : Evaluation of recent epidemiological evidence in humans and paths forward. 2023;(September 2022):879-912. doi:10.1002/ijc.34300
69. Miranda RA, Silva BS, de Moura EG, Lisboa PC. Pesticides as endocrine disruptors: programming for obesity and diabetes. *Endocrine*. 2023;79(3):437-447. doi:10.1007/s12020-

022-03229-y

70. Kono Y, Tomita T. Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance. *Japanese J Appl Entomol Zool.* 1995;39(3):193-211. doi:10.1303/jjaez.39.193
71. Forghash A. History, Evolution, and Consequences of Insecticide Resistance. *Pestic Biochem Physiol.* 1984;186:178-186.
72. Suh PF, Elanga-Ndille E, Tchouakui M, et al. Impact of insecticide resistance on malaria vector competence: a literature review. *Malar J.* 2023;22(1):1-11. doi:10.1186/s12936-023-04444-2
73. Wang Q, Luo C, Wang R. Insecticide Resistance and Its Management in Two Invasive Cryptic Species of *Bemisia tabaci* in China. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7). doi:10.3390/ijms24076048
74. Braga LS, Corrêa AS, Pereira EJG, Guedes RNC. Face or flee? Fenitrothion resistance and behavioral response in populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *J Stored Prod Res.* 2011;47(3):161-167. doi:10.1016/j.jspr.2010.11.001
75. Montella IR, Schama R, Valle D. The classification of esterases: An important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(4):437-449. doi:10.1590/S0074-02762012000400001
76. Bergé JB, Feyereisen R, Amichot M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 1998;353(1376):1701-1705. doi:10.1098/rstb.1998.0321
77. Scott JG. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol.* 1999;29(9):757-777. doi:10.1016/S0965-1748(99)00038-7
78. Pavlidis N, Vontas J, Van Leeuwen T. The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. *Curr Opin Insect Sci.* 2018;27:97-102. doi:10.1016/j.cois.2018.04.007
79. Whyard S, Downe AER, Walker VK. Characterization of a novel esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 1995;29(4):329-342. doi:10.1002/arch.940290402
80. Balabanidou V, Grigoraki L, Vontas J. Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Curr Opin Insect Sci.* 2018;27:68-74. doi:10.1016/j.cois.2018.03.001
81. Soderlund DM, Knipple DC. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol.* 2003;33(6):563-577. doi:10.1016/S0965-1748(03)00023-7
82. Foster SP, Paul VL, Slater R, et al. A mutation (L1014F) in the voltage-gated sodium channel of the grain aphid, *Sitobion avenae*, is associated with resistance to pyrethroid insecticides. *Pest Manag Sci.* 2014;70(8):1249-1253. doi:10.1002/ps.3683
83. Zhao M, Dong Y, Ran X, et al. Point mutations associated with organophosphate and carbamate resistance in chinese strains of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *PLoS One.* 2014;9(5). doi:10.1371/journal.pone.0095260
84. Crossthwaite AJ, Rendine S, Stenta M, Slater R. Target-site resistance to neonicotinoids. *J Chem Biol.* 2014;7(4):125-128. doi:10.1007/s12154-014-0116-y
85. Haddi K, Nauen R, Benelli G, Guedes RNC. Global perspectives on insecticide resistance in agriculture and public health. *Entomol Gen.* 2023;43(3):495-500. doi:10.1127/entomologia/2023/2186
86. Willis KJ. State of the World's Plants. *R Bot Gard Kew.* Published online 2017:100.

87. Turusov V, Rakitsky V, Tomatis L, Ubiquity DDDT. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, Persistence, and Risks. 2002;110(2):125-128.
88. Bertomeu-Sánchez JR. Introduction. Pesticides: Past and Present. *HoST - J Hist Sci Technol*. 2019;13(1):1-27. doi:10.2478/host-2019-0001
89. Handford CE, Elliott CT, Campbell K. A review of the global pesticide legislation and the scale of challenge in reaching the global harmonization of food safety standards. *Integr Environ Assess Manag*. 2015;11(4):525-536. doi:10.1002/ieam.1635
90. Commission E. EU Pesticides Data.
91. Auclair JL. Aphid Feeding and Nutrition. *Annu Rev Entomol*. 1963;8(1):439-490. doi:10.1146/annurev.en.08.010163.002255
92. Maish SC. Lepidopterous pests, biology and its effect on vegetable crops. *J Entomol Zool Stud*. 2019;7(4):593-597. <https://www.entomoljournal.com/archives/2019/vol7issue4/PartJ/7-4-65-477.pdf>
93. García-Lara S, Saldivar SOS. Insect Pests. *Encycl Food Heal*. Published online 2015:432-436. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00396-2
94. Miller GL, Footitt RG. The Taxonomy of Crop Pests : The Aphids Early Aphid Studies – A North American Example. 2017;1:627-639.
95. Omkar. Aphids. In: *Polyphagous Pests of Crops*. ; 2021:105-182. doi:10.1007/978-981-15-8075-8
96. Margaritopoulos JT, Kasprowicz L, Malloch GL, Fenton B. Tracking the global dispersal of a cosmopolitan insect pest, the peach potato aphid. *BMC Ecol*. 2009;9:1-13. doi:10.1186/1472-6785-9-13
97. Hughes RD. Population Dynamics of the Cabbage Aphid, *Brevicoryne brassicae* (L.). *J Anim Ecol*. 1963;32(3):393. doi:10.2307/2600
98. Tsuchida T. Molecular basis and ecological relevance of aphid body colors. *Curr Opin Insect Sci*. 2016;17:74-80. doi:10.1016/j.cois.2016.07.005
99. Turpeau E, Hullé M, Chaubet B. Morphology and identification criteria for aphids. *Encyclop'Aphid*.
100. Guerrieri E, Digilio MC. Aphid-plant interactions: A review. *J Plant Interact*. 2008;3(4):223-232. doi:10.1080/17429140802567173
101. Miles PW. Aphid saliva. *Biol Rev*. 1999;74(1):41-85. doi:10.1111/j.1469-185X.1999.tb00181.x
102. Guo Y, Ji N, Bai L, Ma J, Li Z. Aphid Viruses: A Brief View of a Long History. *Front Insect Sci*. 2022;2(February):1-10. doi:10.3389/finsec.2022.846716
103. Brault V, Uzest M, Monsion B, Jacquot E, Blanc S. Aphids as transport devices for plant viruses. *Comptes Rendus - Biol*. 2010;333(6-7):524-538. doi:10.1016/j.crvi.2010.04.001
104. Clover GRG, Azam-Ali SN, Jaggard KW, Smith HG. The effects of beet yellows virus on the growth and physiology of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant Pathol*. 1999;48(1):129-138. doi:10.1046/j.1365-3059.1999.00307.x
105. Troczka BJ, Singh KS, Zimmer CT, et al. Molecular innovations underlying resistance to nicotine and neonicotinoids in the aphid *Myzus persicae*. *Pest Manag Sci*. 2021;77(12):5311-5320. doi:10.1002/ps.6558
106. Bass C, Nauen R. The molecular mechanisms of insecticide resistance in aphid crop pests. *Insect Biochem Mol Biol*. 2023;156(January):103937. doi:10.1016/j.ibmb.2023.103937

107. Mota-Sanchez D, Wise J. Arthropod Pesticide Resistance Database (ARPD).
108. Brisson JA, Stern DL. The pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: An emerging genomic model system for ecological, developmental and evolutionary studies. *BioEssays*. 2006;28(7):747-755. doi:10.1002/bies.20436
109. Way M., Hugues R., Eastop V., Van Emden HF. The ecology of *Myzus persicae*. *Annu Rev Entomol*. 1969;14:197-270.
110. Ramsey JS, Rider DS, Walsh TK, et al. Comparative analysis of detoxification enzymes in *Acyrtosiphon pisum* and *Myzus persicae*. *Insect Mol Biol*. 2010;19(SUPPL. 2):155-164. doi:10.1111/j.1365-2583.2009.00973.x
111. Eastop V. Keys for the identification of *Acyrtosiphon* (Hemiptera : Aphididae). *Bull Br Museum (Natural Hist B Entomol*. 1971;26(1):1-115.
112. Richards S, Gibbs RA, Gerardo NM, Moran N. Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS Biol*. 2010;8(2). doi:10.1371/journal.pbio.1000313
113. Chen W, Shakir S, Bigham M, Richter A, Fei Z, Jander G. Genome sequence of the corn leaf aphid (*Rhopalosiphum maidis* Fitch). *Gigascience*. 2019;8(4):1-12. doi:10.1093/gigascience/giz033
114. Wenger JA, Cassone BJ, Legeai F, et al. Whole genome sequence of the soybean aphid, *Aphis glycines*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2020;123. doi:10.1016/j.ibmb.2017.01.005
115. Wilson ACC, Ashton PD, Clevro F, et al. Genomic insight into the amino acid relations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, with its symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola*. *Insect Mol Biol*. 2010;19(SUPPL. 2):249-258. doi:10.1111/j.1365-2583.2009.00942.x
116. Rupawate PS, Roylawar P, Khandagale K, et al. Role of gut symbionts of insect pests: A novel target for insect-pest control. *Front Microbiol*. 2023;14(March):1-20. doi:10.3389/fmicb.2023.1146390
117. De Almeida LG, De Moraes LAB, Trigo JR, Omoto C, Cônsoli FL. The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. *PLoS One*. 2017;12(3):1-19. doi:10.1371/journal.pone.0174754
118. Chatterjee S, Almeida RPP, Lindow S. Living in two worlds: The plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu Rev Phytopathol*. 2008;46:243-271. doi:10.1146/annurev.phyto.45.062806.094342
119. Nogge G, Gerresheim A. Experiments on the elimination of symbionts from the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans* (Diptera: Glossinidae), by antibiotics and lysozyme. *J Invertebr Pathol*. 1982;40(2):166-179. doi:10.1016/0022-2011(82)90112-4
120. Zheng X, Zhang D, Li Y, et al. Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature*. 2019;572(7767):56-61. doi:10.1038/s41586-019-1407-9
121. Le Page DP, Metcalf JA, Bordenstein SR, et al. Prophage WO genes recapitulate and enhance *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Nature*. 2017;543(7644):243-247. doi:10.1038/nature21391
122. Aksoy S, Weiss B, Attardo G. Paratransgenesis applied for control of tsetse transmitted sleeping sickness. *Adv Exp Med Biol*. 2008;627:35-48. doi:10.1007/978-0-387-78225-6\_3
123. Hegde S, Nilyanimit P, Kozlova E, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene deletion of the ompA gene in symbiotic *Cedecia neteri* impairs biofilm formation and reduces gut colonization of *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(12):1-21. doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0007883

124. Li T, Wei Y, Zhao C, et al. Facultative symbionts are potential agents of symbiont-mediated RNAi in aphids. *Front Microbiol.* 2022;13(November):1-10. doi:10.3389/fmicb.2022.1020461
125. Ormancey M, Guillotin B, Merret R, et al. Complementary peptides represent a credible alternative to agrochemicals by activating translation of targeted proteins. *Nat Commun.* 2023;14(1):1-13. doi:10.1038/s41467-023-35951-0
126. Taylor RE, Zahid M. Cell penetrating peptides, novel vectors for gene therapy. *Pharmaceutics.* 2020;12(3):1-21. doi:10.3390/pharmaceutics12030225
127. Douglas AE. Strategies for Enhanced Crop Resistance to Insect Pests. *Annu Rev Plant Biol.* 2018;69:637-660. doi:10.1146/annurev-arplant-042817-040248
128. Aljbory Z, Chen MS. Indirect plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Sci.* 2018;25(1):2-23. doi:10.1111/1744-7917.12436
129. Cutler P, Slater R, Edmunds AJF, et al. Investigating the mode of action of sulfoxaflor: A fourth-generation neonicotinoid. *Pest Manag Sci.* 2013;69(5):607-619. doi:10.1002/ps.3413
130. Watson GB, Siebert MW, Wang NX, Loso MR, Sparks TC. Sulfoxaflor – A sulfoximine insecticide: Review and analysis of mode of action, resistance and cross-resistance. *Pestic Biochem Physiol.* 2021;178(xxxx):104924. doi:10.1016/j.pestbp.2021.104924
131. Capela N, Sarmento A, Simões S, Azevedo-Pereira HMVS, Sousa JP. Sub-lethal doses of sulfoxaflor impair honey bee homing ability. *Sci Total Environ.* 2022;837(April):1-8. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.155710
132. Liao X, Jin R, Zhang X, et al. Characterization of sulfoxaflor resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *Pest Manag Sci.* 2019;75(6):1646-1654. doi:10.1002/ps.5282
133. Kalafat E, Laoreti A, Khalil A, Costa FDS. The evolving story of sulfoxaflor resistance in the green peach aphid (*Myzus persicae* (Sulzer)). *J Fish Biol.* 2018;1(51):731-737. doi:10.1002/ps.7821
134. Jacquet P, Poirier L, Daudé D, Chabrière E. Organophosphorus poisoning: Towards enzymatic treatments. *Ann Pharm Fr.* 2019;77(5):349-362. doi:10.1016/j.pharma.2019.06.002
135. George BS, Silambarasan S, Senthil K, Jacob JP, Ghosh Dasgupta M. Characterization of an Insecticidal Protein from *Withania somnifera* Against Lepidopteran and Hemipteran Pest. *Mol Biotechnol.* 2018;60(4):290-301. doi:10.1007/s12033-018-0070-y
136. Vijaya Sudhakara Rao K, Renuka P, Sheshu Madhav M, Mangrauthia SK. Key enzymes and proteins of crop insects as candidate for RNAi based gene silencing. *Front Physiol.* 2015;6(MAR):1-15. doi:10.3389/fphys.2015.00119
137. Lehane M, Bilingsley P. *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall, 1996. 1-97. doi.org/10.1007/978-94-009-1519-0
138. Herrera-Estrella A, Chet I. Chitinases in biological control. *EXS-BASEL.* 1999;87:171-184.
139. Arakane Y, Muthukrishnan S. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(2):201-216. doi:10.1007/s00018-009-0161-9
140. Nagare M, Ayachit M, Agnihotri A, Schwab W, Joshi R. Glycosyltransferases: the multifaceted enzymatic regulator in insects. *Insect Mol Biol.* 2021;30(2):123-137. doi:10.1111/imb.12686
141. Thompson SN. *Trehalose - The Insect "Blood" Sugar*. Vol 31.; 2003. doi:10.1016/S0065-2806(03)31004-5

142. Bourquelot E. Transformation du trehalose en glucose dans les champignons par un ferment soluble : la trehalase. *Bull la Société Mycol Fr.* 1893;9:189-194.
143. Müller J, Boller T, Wiemken A. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Sci.* 1995;112(1):1-9. doi:10.1016/0168-9452(95)04218-J
144. Horlacher R, Uhland K, Klein W, Ehrmann M, Boos W. Characterization of a cytoplasmic trehalase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1996;178(21):6250-6257. doi:10.1128/jb.178.21.6250-6257.1996
145. Sasai-Takedatsu M, Taketani S, Nagata N, et al. Human Trehalase: Characterization, localization and its increase in Urine by Renal Proximal Tubular Damage. *Nephron.* 1996;(73):179-185.
146. Yoneyama Y. Purification and properties of detergent-solubilized pig kidney trehalase. *Arch Biochem Biophys.* 1987;255(1):168-175. doi:10.1016/0003-9861(87)90307-9
147. Londesborough J, Varimo K. Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochem J.* 1984;219(2):511-518. doi:10.1042/bj2190511
148. Jorge JA, Polizeli MDLTM, Thevelein JM, Terenzi HF. Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;154(2):165-171. doi:10.1016/S0378-1097(97)00332-7
149. Shukla E, Thorat LJ, Nath BB, Gaikwad SM. Insect trehalase: Physiological significance and potential applications. *Glycobiology.* 2015;25(4):357-367. doi:10.1093/glycob/cwu125
150. De Smet KAL, Weston A, Brown IN, Young DB, Robertson BD. Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology.* 2000;146(1):199-208. doi:10.1099/00221287-146-1-199
151. Terrapon N, Lombard V, Drula E, Coutinho PM. A Practical Guide to Using Glycomics Databases. *A Pract Guid to Using Glycomics Databases*. Published online 2017. doi:10.1007/978-4-431-56454-6
152. Silva MCP, Terra WR, Ferreira C. The catalytic and other residues essential for the activity of the midgut trehalase from *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2010;40(10):733-741. doi:10.1016/j.ibmb.2010.07.006
153. Zechel DL, Withers SG. Glycosidase mechanisms: Anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc Chem Res.* 2000;33(1):11-18. doi:10.1021/ar970172+
154. Koshland Jr. DE. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol Rev.* 1953;28(February):416-436.
155. Huber RE, Lefebvre YA. The purification and some properties of soluble trehalase and sucrase from *Drosophila melanogaster*. *Can J Biochem.* 1971;49(10):1155-1164. doi:10.1139/o71-166
156. Gussin AES, Wyatt GR. Membrane-bound trehalase from cecropia silkworm muscle. *Arch Biochem Biophys.* 1965;112(3):626-634. doi:10.1016/0003-9861(65)90106-2
157. Ishihara R, Taketani S, Sasai-Takedatsu M, Kino M, Tokunaga R, Kobayashi Y. Molecular cloning, sequencing and expression of cDNA encoding human trehalase. *Gene.* 1997;202(1-2):69-74. doi:10.1016/S0378-1119(97)00455-1
158. Mitsumasu K, Azuma M, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T. Membrane-penetrating trehalase from silkworm *Bombyx mori*. Molecular cloning and localization in larval midgut. *Insect Mol Biol.* 2005;14(5):501-508. doi:10.1111/j.1365-2583.2005.00581.x
159. Tan Y, Xiao L, Sun Y, Zhao J, Bai L, Xiao Y. Molecular characterization of soluble and membrane-bound trehalases in the cotton mirid bug, *apolygus lucorum*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2014;86(2):107-121. doi:10.1002/arch.21166

160. Friedman S. Multiple forms of trehalase in *Phormia regina*. Partial purification, tissue specificities and some kinetic properties of adult enzymes. *Insect Biochem.* 1975;5:151-164.
161. Nambu Z, Nambu F, Tanaka S. Purification and Characterization of Trehalase from *Artemia* Embryos and Larvae. *Zoolog Sci.* 1997;14(3):419-427. doi:10.2108/zsj.14.419
162. Sumida M, Yamashita O. Purification and some properties of soluble trehalase from midgut of pharate adult of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 1983;13(3):257-265.
163. Silva MCP, Ribeiro AF, Terra WR, Ferreira C. Sequencing of *Spodoptera frugiperda* midgut trehalases and demonstration of secretion of soluble trehalase by midgut columnar cells. *Insect Mol Biol.* 2009;18(6):769-784. doi:10.1111/j.1365-2583.2009.00920.x
164. Lee JH, Tsuji M, Nakamura M, et al. Purification and identification of the essential ionizable groups of honeybee, *Apis mellifera* L., trehalase. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001;65(12):2657-2665. doi:10.1271/bbb.65.2657
165. Jin LQ, Zheng YG. Inhibitory effects of validamycin compounds on the termites trehalase. *Pestic Biochem Physiol.* 2009;95(1):28-32. doi:10.1016/j.pestbp.2009.05.001
166. Shukla E, Thorat L, Bendre AD, et al. Cloning and characterization of trehalase: a conserved glycosidase from oriental midge, *Chironomus ramosus*. *3 Biotech.* 2018;8(8):0. doi:10.1007/s13205-018-1376-y
167. Shukla E, Thorat L, Bhavnani V, et al. Molecular cloning and in silico studies of physiologically significant trehalase from *Drosophila melanogaster*. *Int J Biol Macromol.* 2016;92:282-292. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.06.097
168. Ai D, Cheng S, Chang H, Yang T, Wang G, Yu C. Gene cloning, prokaryotic expression, and biochemical characterization of a soluble trehalase in *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *J Insect Sci.* 2018;18(3):2-9. doi:10.1093/jisesa/iey056
169. Neubauer I, Ishaaya I, Aharonson N, Raccach B. Activity of soluble and membrane-bound trehalase in apterous and alate morphs of *Aphis citricola*. *Comp Biochem Physiol -- Part B Biochem.* 1980;66(4):505-510. doi:10.1016/0305-0491(80)90240-0
170. Bansal R, Mian MAR, Mittapalli O, Michel AP. Molecular characterization and expression analysis of soluble trehalase gene in *Aphis glycines*, a migratory pest of soybean. *Bull Entomol Res.* 2013;103(3):286-295. doi:10.1017/S0007485312000697
171. Zhang Q, Lu D-H, Pu J, Wu M, Han Z-J. Cloning and RNA interference effect of trehalase genes in *Laodelphax striatellus* (Homoptera : Dephacidae). *Acta Entomol Sin.* 2012;55(8):911-920.
172. Chen J, Tang B, Chen H, et al. Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by RNA interference. *PLoS One.* 2010;5(4). doi:10.1371/journal.pone.0010133
173. Wegener G, Tschiedel V, Schlöder P, Ando O. The toxic and lethal effects of the trehalase inhibitor trehalozin in locusts are caused by hypoglycaemia. *J Exp Biol.* 2003;206(7):1233-1240. doi:10.1242/jeb.00217
174. Sumida M, Yamashita O. Trehalase transformation in silkworm midgut during metamorphosis. *J Comp Physiol B.* 1977;115(2):241-253. doi:10.1007/BF00692534
175. Jorge CD, Sampaio MM, Hreggvidsson GÓ, Kristjánsson JK, Santos H. A highly thermostable trehalase from the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus*. *Extremophiles.* 2007;11(1):115-122. doi:10.1007/s00792-006-0021-6
176. Alblova M, Smidova A, Docekal V, et al. Molecular basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(46):E9811-

- E9820. doi:10.1073/pnas.1714491114
177. De Almeida FM, Lúcio AKB, Polizeli MDLTM, Jorge JA, Terenzi HF. Function and regulation of the acid and neutral trehalases of *Mucor rouxii*. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;155(1):73-77. doi:10.1016/S0378-1097(97)00369-8
  178. Nardelli A, Vecchi M, Mandrioli M, Manicardi GC. The evolutionary history and functional divergence of trehalase (treh) genes in insects. *Front Physiol*. 2019;10(February):1-11. doi:10.3389/fphys.2019.00062
  179. Qian M, Haser R, Payant F, Buisson G, Duée E. The Active Center of a Mammalian  $\alpha$ -Amylase. Structure of the Complex of a Pancreatic  $\alpha$ -Amylase with a Carbohydrate Inhibitor Refined to 2.2-Å Resolution. *Biochemistry*. 1994;33(20):6284-6294. doi:10.1021/bi00186a031
  180. Brayer GD, Luo Y, Withers SG. The structure of human pancreatic  $\alpha$ -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci*. 1995;4(9):1730-1742. doi:10.1002/pro.5560040908
  181. Ramasubbu N, Ragunath C, Mishra PJ. Probing the role of a mobile loop in substrate binding and enzyme activity of human salivary amylase. *J Mol Biol*. 2003;325(5):1061-1076. doi:10.1016/S0022-2836(02)01326-8
  182. Ramasubbu N, Paloth V, Luo Y, Brayer GD, Levine MJ. Structure of human salivary  $\alpha$ -amylase at 1.6 Å resolution: Implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 1996;52(3):435-446. doi:10.1107/S0907444995014119
  183. Xie YF, Yang WJ, Dou W, Wang JJ. Characterization of the cDNA encoding membrane-bound trehalase, its expression and enzyme activity in *bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomol*. 2013;96(4):1233-1242. doi:10.1653/024.096.0401
  184. Terra WR, Terra IC., Ferreira C. Inhibition of an insect midgut trehalase by dioxane and d-gluconolactone: enzyme pKa values and geometric relationships at the active site. *Int J Biochem*. 1983;15:143-146.
  185. Gibson RP, Gloster TM, Roberts S, et al. Molecular Basis for Trehalase Inhibition Revealed by the Structure of Trehalase in Complex with Potent Inhibitors. *Angew Chemie*. 2007;119(22):4193-4197. doi:10.1002/ange.200604825
  186. Asano N, Kato A, Matsui K. Two subsites on the active center of pig kidney trehalase. *Eur J Biochem*. 1996;240(3):692-698. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0692h.x
  187. Hospitals BC. Renal trehalase: two subsites at the substrate-binding site. *Biochim Biophys Acta*. 1984;791:45-49.
  188. Davies GJ, Wilson KS, Henrissat B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J*. 1997;321(2):557-559. doi:10.1042/bj3210557
  189. Silva MCP, Terra WR, Ferreira C. The role of carboxyl, guanidine and imidazole groups in catalysis by a midgut trehalase purified from an insect larvae. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004;34(10):1089-1099. doi:10.1016/j.ibmb.2004.07.001
  190. Hidaka M, Honda Y, Kitaoka M, et al. Chitobiose phosphorylase from *Vibrio proteolyticus*, a member of glycosyl transferase family 36, has a clan GH-L-like ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> barrel fold. *Structure*. 2004;12(6):937-947. doi:10.1016/j.str.2004.03.027
  191. Harris EMS, Honzatko RB, Aleshin AE, Firsov LM. Refined Structure for the Complex of 1-Deoxynojirimycin with Glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100 to 2.4-Å Resolution. *Biochemistry*. 1993;32(6):1618-1626. doi:10.1021/bi00057a028
  192. Egloff MP, Uppenberg J, Haalck L, van Tilbeurgh H. Crystal structure of maltose phosphorylase from *Lactobacillus brevis*: Unexpected evolutionary relationship with



- glucoamylases. *Structure*. 2001;9(8):689-697. doi:10.1016/S0969-2126(01)00626-8
193. Inagaki K, Ueno N, Tamura T, Tanaka H. Purification and characterization of an acid trehalase from *Acidobacterium capsulatum*. *J Biosci Bioeng*. 2001;91(2):141-146. doi:10.1016/S1389-1723(01)80056-6
194. Russell A, Fain N. Some Applications Reducing Methods Limitations and Sugars and of the Anthrone for Estimating Sugars. *Clin Chem*. 1960;7(4):289-303.
195. Gusakov A V., Kondratyeva EG, Sinitsyn AP. Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. *Int J Anal Chem*. 2011;2011:1-4. doi:10.1155/2011/283658
196. Wilson R, Elizabeth Q. Glucose oxidase : An ideal enzyme. *Biosens t Biwlecrroia*. 2016;5663(November):165-185.
197. Huggett ASG, Nixon DA. Use of Glucose Oxidase, Peroxidase, and O-Dianisidine in Determination of Blood and Urinary Glucose. *Lancet*. 1957;270(6991):368-370. doi:10.1016/S0140-6736(57)92595-3
198. Carroll JJ, Smith N, Babson AL. A colorimetric serum glucose determination using hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem Med*. 1970;4(2):171-180. doi:10.1016/0006-2944(70)90093-1
199. Bowie JH, Cameron D., Findlay JA, Quartey JAK. Haemolymph Pigments of Aphids. *Nature*. 1966;210(5034):395-397.
200. Duong-Ly KC, Gabelli SB. *Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation*. Vol 541. 1st ed. Elsevier Inc.; 2014. doi:10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0
201. Collins KD. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: Effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods*. 2004;34(3):300-311. doi:10.1016/j.ymeth.2004.03.021
202. Hyde AM, Zultanski SL, Waldman JH, Zhong YL, Shevlin M, Peng F. General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. *Org Process Res Dev*. 2017;21(9):1355-1370. doi:10.1021/acs.oprd.7b00197
203. Sinegani AAS, Emtiazi G. The relative effects of some elements on the DNS method in cellulase assay. *J Appl Sci Environ Manag*. 2006;10(3). doi:10.4314/jasem.v10i3.17326
204. Lacki KM, Riske F. Affinity Chromatography: An enabling Technology for Large-Scale bioprocessing. *Biotechnol J*. Published online 2019:1-25. doi:10.1002/jssc.201200569
205. Shi Z, Liu X, Xu Q, et al. Two novel soluble trehalase genes cloned from *Harmonia axyridis* and regulation of the enzyme in a rapid changing temperature. *Comp Biochem Physiol Part - B Biochem Mol Biol*. Published online 2016. doi:10.1016/j.cbpb.2016.03.002
206. Shi ZK, Wang SG, Zhang T, Cao Y, Li Y, Li C. Three novel trehalase genes from *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): cloning and regulation in response to rapid cold and re-warming. *3 Biotech*. Published online 2019. doi:10.1007/s13205-019-1839-9
207. Tang B, Wei P, Zhao L, et al. Knockdown of five trehalase genes using RNA interference regulates the gene expression of the chitin biosynthesis pathway in *Tribolium castaneum*. *BMC Biotechnol*. 2016;16(1):1-14. doi:10.1186/s12896-016-0297-2
208. Yu HZ, Huang YL, Lu ZJ, et al. Inhibition of trehalase affects the trehalose and chitin metabolism pathways in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Insect Sci*. Published online 2020:1-17. doi:10.1111/1744-7917.12819

209. Zhao L, Yang M, Shen Q, et al. Functional characterization of three trehalase genes regulating the chitin metabolism pathway in rice brown planthopper using RNA interference. *Sci Rep*. 2016;6(February):1-14. doi:10.1038/srep27841
210. Gupta R, Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput*. 2002;322:310-322. doi:10.1142/9789812799623\_0029
211. Bause E. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J*. 1983;209(2):331-336. doi:10.1042/bj2090331
212. Kalf GF, Rieder S V. The purification and properties of trehalase. *J Biol Chem*. 1958;230(2):691-698. doi:10.1016/s0021-9258(18)70491-2
213. Zebe E., McShan W. Trehalase in the thoracic muscles of the woodroach, *Leucophaea maderae*. *J Cell Comp Physiol*. Published online 1959:21-29.
214. Aledo JC. Enzyme kinetic parameters estimation: A tricky task? *Biochem Mol Biol Educ*. 2021;49(4):633-638. doi:10.1002/bmb.21522
215. Cornish Bowden A, Eisenthal R. Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods. *Biochem J*. 1974;139(3):721-730. doi:10.1042/bj1390721
216. Lee JH, Saito S, Mori H, et al. Molecular cloning of cDNA for trehalase from the european honeybee, *Apis mellifera* L., and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007;71(9):2256-2265. doi:10.1271/bbb.70239
217. Munjal G, Hanmandlu M, Srivastava S. Phylogenetics Algorithms and Applications. *Ambient Commun Comput Syst*. 2019;904:187-194.
218. Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583-589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2
219. Binbay FA, Rathod DC, George AAP, Imhof D. Quality Assessment of Selected Protein Structures Derived from Homology Modeling and AlphaFold. *Pharmaceuticals*. 2023;16(12):1-22. doi:10.3390/ph16121662
220. Terra WR, Barroso IG, Dias RO, Ferreira C. *Molecular Physiology of Insect Midgut*. Vol 56. 1st ed. Elsevier Ltd.; 2019. doi:10.1016/bs.aiip.2019.01.004
221. Adhav A, Harne S, Bhide A, Giri A, Gayathri P, Joshi R. Mechanistic insights into enzymatic catalysis by trehalase from the insect gut endosymbiont *Enterobacter cloacae*. *FEBS J*. 2019;286(9):1700-1716. doi:10.1111/febs.14760
222. Brysbaert G, Lorgouilloux K, Vranken WF, Lensink MF. RINspector: A Cytoscape app for centrality analyses and DynaMine flexibility prediction. *Bioinformatics*. 2018;34(2):294-296. doi:10.1093/bioinformatics/btx586
223. Laulumaa S, Nieminen T, Raasakka A, et al. Structure and dynamics of a human myelin protein P2 portal region mutant indicate opening of the  $\beta$  barrel in fatty acid binding proteins. *BMC Struct Biol*. 2018;18(1):1-13. doi:10.1186/s12900-018-0087-2
224. Del Sol A, Fujihashi H, Amoros D, Nussinov R. Residues crucial for maintaining short paths in network communication mediate signaling in proteins. *Mol Syst Biol*. 2006;2:1-12. doi:10.1038/msb4100063
225. Del Sol A, O'Meara P. Small-world network approach to identify key residues in protein-protein interaction. *Proteins Struct Funct Genet*. 2005;58(3):672-682. doi:10.1002/prot.20348
226. Mandell DJ, Kortemme T. Backbone flexibility in computational protein design. *Curr Opin*

- Biotechnol.* 2009;20(4):420-428. doi:10.1016/j.copbio.2009.07.006
227. Cilia E, Pancsa R, Tompa P, Lenaerts T, Vranken WF. The DynaMine webserver: Predicting protein dynamics from sequence. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(W1):264-270. doi:10.1093/nar/gku270
  228. Forcella M, Cardona F, Goti A, et al. A membrane-bound trehalase from *Chironomus riparius* larvae: Purification and sensitivity to inhibition. *Glycobiology.* 2010;20(9):1186-1195. doi:10.1093/glycob/cwq087
  229. Hardy E, Castellanos-Serra LR. "Reverse-staining" of biomolecules in electrophoresis gels: Analytical and micropreparative applications. *Anal Biochem.* 2004;328(1):1-13. doi:10.1016/j.ab.2004.02.017
  230. Lebowitz J, Lewis MS, Schuck P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Sci.* 2002;11(9):2067-2079. doi:10.1110/ps.0207702
  231. Gu J, Shao Y, Zhang C, Liu Z, Zhang Y. Characterization of putative soluble and membrane-bound trehalases in a hemipteran insect, *Nilaparvata lugens*. *J Insect Physiol.* 2009;55(11):997-1002. doi:10.1016/j.jinsphys.2009.07.003
  232. Carvalho P, Hewel J, Barbosa V, Yates J. Identifying differences in protein expression levels by spectral counting and feature selection. *Genet Mol Res.* 2008;7(2):342-356. doi:10.4238/vol7-2gmr426
  233. Gao H, Gong J-S, Su C, Li H, Xu Z-H, Shi J-S. Characterization, heterologous expression and engineering of trehalase for biotechnological applications. *Syst Microbiol Biomanufacturing.* 2022;(0123456789). doi:10.1007/s43393-022-00079-7
  234. Ujita M, Yamanaka M, Maeno Y, et al. Expression of active and inactive recombinant soluble trehalase using baculovirus-silkworm expression system and their glycan structures. *J Biosci Bioeng.* 2011;111(1):22-25. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.08.020
  235. Woestenenk EA, Hammarström M, Van Den Berg S, Härd T, Berglund H. His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: A comparison between four expression vectors. *J Struct Funct Genomics.* 2004;5(3):217-229. doi:10.1023/B:jsfg.0000031965.37625.0e
  236. Chu I Te, Speer SL, Pielak GJ. Rheostatic Control of Protein Expression Using Tuner Cells. *Biochemistry.* 2020;59(6):733-735. doi:10.1021/acs.biochem.9b01101
  237. Schlegel S, Löfblom J, Lee C, et al. Optimizing membrane protein overexpression in the *Escherichia coli* strain Lemo21(DE3). *J Mol Biol.* 2012;423(4):648-659. doi:10.1016/j.jmb.2012.07.019
  238. Ai D, Lin R, Wang M, Liang X, Yu C. Chemical modification of soluble trehalase from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae). *Acta Entomol Sin.* 2018;61(7):801-807.
  239. Forcella M, Mozzi A, Bigi A, Parenti P, Fusi P. Molecular cloning of soluble trehalase from *chironomus riparius* larvae, its heterologous expression in *escherichia coli* and bioinformatic analysis. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2012;81(2):77-89. doi:10.1002/arch.21041
  240. Guise AD, West SM, Chaudhuri JB. Protein Folding in Vivo and Renaturation of Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Appl Biochem Biotechnol - Part B Mol Biotechnol.* 1996;6(1):53-64. doi:10.1007/BF02762323
  241. Leong SSJ, Middelberg APJ. Dilution versus dialysis: A quantitative study of the oxidative refolding of recombinant human alpha-fetoprotein. *Food Bioprod Process.* 2006;84(1 C):9-17. doi:10.1205/fbp.05134
  242. Rupprecht KR, Lang EZ, Gregory SD, Bergsma JM, Rae TD, Fishpaugh JR. A precise

- spectrophotometric method for measuring sodium dodecyl sulfate concentration. *Anal Biochem.* 2015;486(July):78-80. doi:10.1016/j.ab.2015.06.013
243. Michaux C, Pomroy NC, Privé GG. Refolding SDS-Denatured Proteins by the Addition of Amphipathic Cosolvents. *J Mol Biol.* 2008;375(5):1477-1488. doi:10.1016/j.jmb.2007.11.026
244. Khursheed A, Rather MA, Jain V, et al. Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: A comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects. *Microb Pathog.* 2022;173(PA):105854. doi:10.1016/j.micpath.2022.105854
245. Bravo A, Soberón M. Can microbial-based insecticides replace chemical pesticides in agricultural production? *Microb Biotechnol.* 2023;16(11):2011-2014. doi:10.1111/1751-7915.14316
246. Coats JR. Risks from natural versus synthetic insecticides. *Annu Rev Entomol.* 1994;39(1):489-515. doi:10.1146/annurev.ento.39.1.489
247. Yu Y, Bai L, Minagawa K, et al. Gene cluster responsible for validamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *jinggangensis* 5008. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(9):5066-5076. doi:10.1128/AEM.71.9.5066-5076.2005
248. Tatun N. Developmental and lethal effects of trehalase inhibitor (Validamycin) on the *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ann Entomol Soc Am.* 2016;109(2):224-231. doi:10.1093/aesa/sav111
249. Tang B, Yang M, Shen Q, Xu Y, Wang H, Wang S. Suppressing the activity of trehalase with validamycin disrupts the trehalose and chitin biosynthesis pathways in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pestic Biochem Physiol.* 2017;137:81-90. doi:10.1016/j.pestbp.2016.10.003
250. Asano N, Takeuchi M, Kameda Y, Matsui K, Kono Y. Trehalase inhibitors, validoxylamine A and related compounds as insecticides. *Structure.* 1990;(June):722-726.
251. Demir E, Kansız S, Doğan M, et al. *Hazard Assessment of the Effects of Acute and Chronic Exposure to Permethrin, Copper Hydroxide, Acephate, and Validamycin Nanopesticides on the Physiology of Drosophila: Novel Insights into the Cellular Internalization and Biological Effects.* International Journal of Molecular Sciences. Vol 23, 9321; 2022. doi:10.3390/ijms23169121
252. Silva MCP, Terra WR, Ferreira C. Absorption of toxic  $\beta$ -glucosides produced by plants and their effect on tissue trehalases from insects. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol.* 2006;143(3):367-373. doi:10.1016/j.cbpb.2005.12.011
253. Park NJ, Lim HK, Hwang IT. An enhanced system to screen trehalase inhibitors using a microplate assay with a housefly enzyme source. *J Asia Pac Entomol.* 2008;11(3):161-166. doi:10.1016/j.aspen.2008.07.004
254. Yu C, Ai D, Lin R, Cheng S. Effects of toxic  $\beta$ -glucosides on carbohydrate metabolism in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Arch Insect Biochem Physiol.* 2019;100(4):1-11. doi:10.1002/arch.21526
255. Gomez A, Cardoso C, Genta FA, Terra WR, Ferreira C. Active site characterization and molecular cloning of *Tenebrio molitor* midgut trehalase and comments on their insect homologs. *Insect Biochem Mol Biol.* 2013;43(8):768-780. doi:10.1016/j.ibmb.2013.05.010
256. Valaitis AP, Bowers DF. Purification and properties of the soluble midgut trehalase from the gypsy moth, *lymantria dispar*. *Insect Biochem Mol Biol.* 1993;23(5):599-606. doi:10.1016/0965-1748(93)90033-O

257. Campbell BC, Molyneux RJ, Jones KC. Differential inhibition by castanospermine of various insect disaccharidases. *J Chem Ecol.* 1987;13(7):1759-1770. doi:10.1007/BF00980216
258. Cipolla L, Sgambato A, Forcella M, et al. N-Bridged 1-deoxynojirimycin dimers as selective insect trehalase inhibitors. *Carbohydr Res.* 2014;389(1):46-49. doi:10.1016/j.carres.2013.12.025
259. Hempel A, Camerman N, Mastropaolo D, Camerman A. Glucosidase Inhibitors: Structures of Deoxynojirimycin and Castanospermine. *J Med Chem.* 1993;36(25):4082-4086. doi:10.1021/jm00077a012
260. Qu Y, Ullah F, Luo C, et al. Sublethal effects of beta-cypermethrin modulate interspecific interactions between specialist and generalist aphid species on soybean. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020;206(August 2019):111302. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111302
261. Caldwell GW, Yan Z, Lang W, Masucci JA. The IC 50 Concept Revisited. *Curr Top Med Chem.* 2012;12:1282-1290.
262. Damiani E, Solorio JA, Doyle AP, Wallace HM. How reliable are in vitro IC50 values? Values vary with cytotoxicity assays in human glioblastoma cells. *Toxicol Lett.* 2019;302:28-34. doi:10.1016/j.toxlet.2018.12.004
263. Koffi YG, Konan HK, Kouadio JPEN, Dabonné S, Dué EA, Kouamé LP. Purification and biochemical characterization of beta-glucosidase from cockroach, *Periplaneta americana*. *J Anim Plant Sci.* 2012;13(2):1747-1757.
264. Toshio I. Beta-Glucosidase of the Midgut of the Silkworm *Bombyx mori*. *Biol Bull.* 2016;116(1):95-105.
265. Peng X, Zha W, He R, et al. Pyrosequencing the midgut transcriptome of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Mol Biol.* 2011;20(6):745-762. doi:10.1111/j.1365-2583.2011.01104.x
266. Pontoh J, Low NH. Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochem Mol Biol.* 2002;32(6):679-690. doi:10.1016/S0965-1748(01)00147-3
267. Asano N, Yamaguchi T, Kameda Y, Matsui K. Effect of Validamycins on Glycohydrolases of *Rhizoctonia Solani*. *J Antibiot (Tokyo).* 1987;40(4):526-532. doi:10.7164/antibiotics.40.526
268. Salleh HM, Honek JF. Time-dependent inhibition of porcine kidney trehalase by aminosugars. *FEBS Lett.* 1990;262(2):359-362. doi:10.1016/0014-5793(90)80229-C
269. Svetlana V.Kyosseva, Zhetcho N. Kyossev ADE. Inhibitors of Pig Kidney Trehalase. *Arch Biochem Biophys.* 1995;316(2):821-826.
270. de Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, de Azevedo JL, de Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian J Infect Dis.* 2012;16(5):466-471. doi:10.1016/j.bjid.2012.08.014
271. Amelia-Yap ZH, Azman AS, AbuBakar S, Low VL. *Streptomyces* derivatives as an insecticide: Current perspectives, challenges and future research needs for mosquito control. *Acta Trop.* 2022;229(December 2021):106381. doi:10.1016/j.actatropica.2022.106381
272. Liao Y, Wei ZH, Bai L, Deng Z, Zhong JJ. Effect of fermentation temperature on validamycin A production by *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *J Biotechnol.* 2009;142(3-4):271-274. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.04.015
273. Dong H, Mahmud T, Tornus I, Lee S, Floss HG. Biosynthesis of the validamycins: Identification of intermediates in the biosynthesis of validamycin A by *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus*. *J Am Chem Soc.* 2001;123(12):2733-2742.

doi:10.1021/ja003643n

274. KUSTER E. Simple Working Key for the Classification and Identification of Named Taxa Included in the International Streptomyces Project. *Int J Syst Bacteriol.* 1972;22(3):139-148. doi:10.1099/00207713-22-3-139
275. Lavecchia A, Di Giovanni C, et al. Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. *Curr Med Chem.* 2013;20(23):2839-2860. <http://www.enamine.net/>
276. Walters WP, Stahl MT, Murcko MA. Virtual screening - an overview. *Drug Discov Today.* 1998;3(4):160-178.
277. Miles JA, Ross BP. Recent Advances in Virtual Screening for Cholinesterase Inhibitors. *ACS Chem Neurosci.* 2021;12(1):30-41. doi:10.1021/acscchemneuro.0c00627
278. Vidler L, Filippakopoulos P, Federov O, Picaud S, Martin S. Discovery of Novel Small-Molecule inhibitors of BRD4 Using Structure-Based Virtual Screening. *J Med Chem.* 2013;56:8073-8088.
279. Fischer A, Sellner M, Neranjan S, Smieško M, Lill MA. Potential inhibitors for novel coronavirus protease identified by virtual screening of 606 million compounds. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10):1-17. doi:10.3390/ijms21103626
280. Goel M, Aggarwal R, Sridharan B, Pal PK, Priyakumar UD. Efficient and enhanced sampling of drug-like chemical space for virtual screening and molecular design using modern machine learning methods. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci.* 2023;13(2). doi:10.1002/wcms.1637
281. Beroza P, Crawford JJ, Ganichkin O, et al. Chemical space docking enables large-scale structure-based virtual screening to discover ROCK1 kinase inhibitors. *Nat Commun.* 2022;13(1):1-10. doi:10.1038/s41467-022-33981-8
282. Irwin JJ, Shoichet BK. ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model.* 2005;45(1):177-182. doi:10.1021/ci049714+
283. Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol.* 2004;1(4):337-341. doi:10.1016/j.ddtec.2004.11.007
284. Bemis GW, Murcko MA. The properties of known drugs. 1. Molecular frameworks. *J Med Chem.* 1996;39(15):2887-2893. doi:10.1021/jm9602928
285. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep.* 2017;7(January):1-13. doi:10.1038/srep42717
286. Kellner R, Malempré R, Vandenameele J, et al. Protein formulation through automated screening of pH and buffer conditions, using the Robotein® high throughput facility. *Eur Biophys J.* 2021;50(3-4):473-490. doi:10.1007/s00249-021-01510-y
287. Vivoli M, Novak HR, Littlechild JA, Harmer NJ. Determination of protein-ligand interactions using differential scanning fluorimetry. *J Vis Exp.* 2014;(91):1-13. doi:10.3791/51809
288. Casu B, Arya T, Bessette B, Baron C. Fragment-based screening identifies novel targets for inhibitors of conjugative transfer of antimicrobial resistance by plasmid pKM101. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-7. doi:10.1038/s41598-017-14953-1
289. Chaudhary D, Chong F, Neupane T, Choi J, Jee JG. New inhibitors of laccase and tyrosinase by examination of cross-inhibition between copper-containing enzymes. *Int J Mol Sci.* 2021;22(24). doi:10.3390/ijms222413661
290. Malik K, Matejtschuk P, Thelwell C, Burns CJ. Differential scanning fluorimetry: Rapid screening of formulations that promote the stability of reference preparations. *J Pharm Biomed*

- Anal.* 2013;77:163-166. doi:10.1016/j.jpba.2013.01.006
291. Matassini. New frontiers on human safe insecticides and fungicides: An opinion on trehalase inhibitors. *Molecules*. 2020;25(13). doi:10.3390/molecules25133013
  292. Schneider N, Lange G, Hindle S, Klein R, Rarey M. A consistent description of HYdrogen bond and DEhydration energies in protein-ligand complexes: Methods behind the HYDE scoring function. *J Comput Aided Mol Des*. 2013;27(1):15-29. doi:10.1007/s10822-012-9626-2
  293. Reulecke I, Lange G, Albrecht J, Klein R, Rarey M. Towards an integrated description of hydrogen bonding and dehydration: Decreasing false positives in virtual screening with the HYDE scoring function. *ChemMedChem*. 2008;3(6):885-897. doi:10.1002/cmdc.200700319
  294. Bhatwa A, Wang W, Hassan Y, Abraham N, Li X-Z, Zhou T. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in Escherichia coli and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9.
  295. Giordana D, Biancaniello C, Argenio MA, Facchiano A. Drug Design by Pharmacophore and VirtualScreening Approach. *Pharmaceuticals*. 2022;15:646.
  296. Distler U, Kuharev J, Navarro P, Tenzer S. Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. *Nat Protoc*. 2016;11(4):795-812. doi:10.1038/nprot.2016.042
  297. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W296-W303. doi:10.1093/nar/gky427
  298. Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, et al. MolProbity: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res*. Published online 2007. doi:10.1093/nar/gkm216
  299. Manavalan P, Johnson WC. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal Biochem*. 1987;167(1):76-85. doi:10.1016/0003-2697(87)90135-7
  300. Sreerama N, Woody RW. A Self-Consistent Method for the Analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. *Anal Biochem*. Published online 1993. doi:10.1006/abio.1993.1079
  301. Provencher SW, Glöckner J. Estimation of Globular Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. *Biochemistry*. Published online 1981. doi:10.1021/bi00504a006
  302. Van Stokkum IHM, Spoelder HJ., Bloemendal M, Van Grondelle R, Groens FC. Estimation of Protein Secondary Structure and Error Analysis from Circular Dichroism Spectra. *Anal Biochem*. 1990;(191):110-118.
  303. Miles AJ, Ramalli SG, Wallace BA. DichroWeb, a website for calculating protein secondary structure from circular dichroism spectroscopic data. *Protein Sci*. 2022;31(1):37-46. doi:10.1002/pro.4153
  304. Micsonai A, Wien F, Bulyáki É, et al. BeStSel: A web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Res*. Published online 2018. doi:10.1093/nar/gky497
  305. Bates D, Mächler M, Bolker BM, Walker SC. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw*. 2015;67(1). doi:10.18637/jss.v067.i01
  306. Hothorn T, Bretz F, Westfall P. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical J*. 2008;50(3):346-363. doi:10.1002/bimj.200810425

- 307. Hanwell. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform.* 2012;4(1):1-17. doi:10.1016/j.aim.2014.05.019
- 308. Jones. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J Mol Biol.* 1997;267(3):727-748.