



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : microbiologie : قسم

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Mycologie et biotechnologie fongique

Intitulé :

Chitinase fongique comme agent de lutte biologique

Préparé par : - MERRIOUA AHLAM

Le : 16/09/2021

- LAKHDARA IBTISSEM

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Mme BEN KAHOUL.M MCA, Université frère mantouri

Rapportatrice : Mme ABDELAZIZ.W MCB, Université frère mantouri

Examinatrice : Mme MEZIANI.M MCB, Université frère mantouri

*Année universitaire
2020- 2021*

Remerciment

En préambule à ce mémoire nous remerciant ALLAH qui nous aide et nous donne de la patience, du courage et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Nous voudrions tout d'abord adresse nos gratitude à notre encadreur Madame Abdelaziz Wided à qui revient le mérite d'avoir su nous remettre sur la bonne voie à chaque fois que nous m'égarions sur la sinueuse route de la recherche. On la remercie pour son encadrement exceptionnel, pour ça patience et ça disponibilité durant notre préparation malgré ça charge académique et professionnel.

Un remerciement spéciale à nos parent, merci de nous avoir amené à cette étape importante de notre vie, merci de partager avec nous tous les détails de notre cheminement éducatif, merci pour votre patience vos encouragement, vos conseil pour votre aide ... merci infiniment nos chers parent

A nos amies qui nous a aidez de réaliser un rêve, qui nous encourage toujours et nous aide aux recherches et dirais c'est une obsession vous allez la passer, nous a facilité l'accès à un monde sans cesse à découvrir. Nous disons encore merci.

A nos enseignants, Aux honorables membres du jury d'avoir accepté de faire partie de mon jury, pour leur patience et leur abnégation à défricher cette initiation ou tentative d'investir l'inconnu.

Enfin, à la communauté universitaire, tous corps confondus qui déploient des efforts considérables- afin d'ériger l'université algérienne au statut de berceau de la connaissance. Je dirai aussi merci.

Table de matière

Table de matière

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

page

Introduction générale..... 1

Revue bibliographique

Chapitre I : la chitinase

Historique.....	4
1. Chitinase	4
1.1.Nomenclature	5
1.2.Facteurs affectant la production de chitinases	6
2. Classification des chitinases.....	6
2.1.Selon le mode d'action.....	7
2.2.Selon la structure et séquence d'acide aminé	9
3. Source de chitinase	10
3.1.Chitinases végétales.....	10
3.2.Chitinases et micro-organismes.....	11
3.2.1. Chitinases bactériennes.....	12
3.2.2. Chitinase fongique.....	12
a. Propriétés générales et localisation subcellulaire.....	12
b. Famille et Structure des chitinases fongiques.....	13
c. Sous-famille des chitinases fongiques.....	15
d. Les gènes de chitinase fongiques.....	18
e. Rôles physiologiques.....	18
4. Application de chitinase.....	19
4.1.Médecine.....	19
4.2.Estimation de la biomasse fongique.....	20
4.3.Isolement des protoplastes fongiques.....	20
4.4.Application des chitinases en agriculture.....	21
4.5.Autres applications.....	22
5. Chitine substrat de chitinase.....	22
5.1.Propriétés de la chitine.....	24
5.2.Mécanisme de dégradation par la chitinase.....	25

Chapitre II : la lutte biologique

1. Historique.....	27
2. Les stratégies du bio contrôle.....	28

2.1.Stratégies de lutte biologique classique CBC (Importation).....	28
2.2.Augmentation de la lutte biologique.....	30
2.2.1. Libération par inondation.....	30
2.2.2. La méthode de libération inoculative.....	31
2.3.Contrôle biologique de conservation.....	32
2.3.1. La gestion et conservation de l'habitat.....	32
2.3.2. Mise à disposition des ressources : Le court terme et le long terme.....	32
3. Agents de contrôle biologique.....	33
3.1. Les entomophages.....	33
a. Prédateurs.....	34
b. Parasitoïdes et les parasite.....	34
3.2.Les agents entomopathogènes / Les Pathogènes.....	34
a. Les nématodes entomopathogènes.....	35
b. Les bactéries.....	36
c. Les virus.....	36
d. Les champignons.....	36
4. Les champignons entomopathogènes.....	38
4.1.Classification des champignons entomopathogènes.....	39
a. Les moisissures.....	40
b. Les levures comme agents de lutte biologique	41
4.2.Mécanisme du bio contrôle médié par les champignons.....	43
5. Rôle des enzymes hydrolytique des champignons entomopathogènes dans le	
contrôle biologique des organismes phyto-pathogènes	45
5.1.Rôle des chitinases fongiques dans la gestion intégrée des parasites et des maladies	
des agro-cultures.....	46
a. Les chitinases dans la lutte contre les insectes nuisibles.....	46
b. Les enzymes chitinolytiques comme agents de bio-contrôle des maladies	
fongiques des plantes.....	48

Analyse de l'article

Chapitre III : Évaluation de la chitinase de *Metarhizium anisopliae* comme biopesticide contre *Plutella xylostella*

1. Résumé.....	59
2. Introduction.....	60
3. Matériaux et méthodes.....	61
3.1.Souches fongiques.....	61
3.2.L'élevage des insectes.....	62
3.3.Condition de fermentation.....	62
a. Détermination de l'activité anti-appétissante.....	62
b. Le test d'entomopathogenicité contre la croissance de la teigne des	
crucifères.....	63
c. Détermination de la réduction du poids de la cuticule et de la teneur en	
chitine.....	63
d. Préparation de la chitine colloïdale.....	64
e. L'activité enzymatique.....	64
4. Analyse statistique.....	65

Résultats.....	66
Effet de la chitinase sur le taux de consommation des larves.....	67
Effet sur le poids corporel des larves.....	68
Effet sur le développement des larves.....	69
Effet sur l'émergence des adultes.....	69
Effet sur la mortalité des larves.....	70
Effet de la chitinase sur la dégradation de la cuticule de <i>P. xylostella</i>	70
Discussion.....	73
1. Mise en évidence de l'activité chitinolytique dans un milieu liquide submerge.....	75
1.1.Effet des paramètres nutritionnels sur la production de chitinase.....	75
1.2.Analyse statistique.....	77
2. Effet physiologique de la chitinase purifiée à partir de <i>Metarhizium anisopliae</i> contre les larves de <i>P. xylostella</i>.....	79
2.1.Impact de l'activité anti-appétissante d'extrait brut de l'enzyme chitinase sur le développement corporelle des larves.....	79
2.2.Influence de <i>M. anisopliae</i> sur la survie et la croissance des larves	82
2.3.Taux de dégradation de la cuticule induits.....	83
Conclusion.....	85
Référence bibliographique.....	87
Résumé	
Annexe	

Liste d'illustrations

Liste d'abréviations

Figure 1: Structure tridimensionnelle de (a) chitinase I, (b) chitinase II, et (c) structure superposée des deux enzymes (Khan <i>et al.</i> , 2015).....	7
Figure 2 : Schéma représentatif de l'action de chitinasés sur la chitine (Khan <i>et al.</i> , 2015).....	7
Figure 3: Réaction chimique pour l'hydrolyse de la chitine par les endochitinasés (Singh <i>et al.</i> , 2021).....	8
Figure 4 : Réaction chimique pour l'hydrolyse de la chitine par les exochitinasés (Singh <i>et al.</i> , 2021).....	9
Figure 5 : Structure de la chitinase de la famille 18 (a) et de la famille 19 (b) (Singh <i>et al.</i> , 2021).....	10
Figure 6 : Structures chimiques d'inhibiteurs de la chitinase. Allosamidin (Hartl <i>et al.</i> , 2012).....	13
Figure 7 : La structure de la chitinase fongique de la famille 18. (a) : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> endochitinase (CTS1) ; (b) : <i>Rhizopus oligosporus</i> chitinase (CHI1) ; (c) : <i>T. harzianum</i> chitinase (CHIT33). 1 : région du peptide signal ; 2 : domaine catalytique (Duo-Chuan, 2006).....	14
Figure 8 : Représentation schématique des fentes de liaison au substrat des chitinasés de la famille 18 GH. a : Les chitinasés ont de multiples sites de liaison au sucre dans leurs longues fentes de liaison au substrat. Le clivage se produit entre le sucre +1 et -1, dans ces deux sous-sites, le substrat est en contact avec deux acides aminés Glu (E) et Asp (D) qui font partie du motif catalytique diagnostique D _{xx} D _x D _x , indiquant leur implication directe dans l'hydrolyse de la liaison glycosidique. b : Les chitinasés sg A (classe V) et C ont des fentes de liaison au substrat étroites et en forme de tunnel, et les chitinasés sg B (classe III) ont des fentes de liaison au substrat larges et ouvertes (Hartl <i>et al.</i> , 2012).....	15
Figure 9 : Diversification potentielle des applications des chitinasés (Singh <i>et al.</i> , 2021).....	21
Figure 10: Structure 2D de la N-Acétyleglucosamine (Veliz <i>et al.</i> , 2017).....	23
Figure 11 : Les formes polymériques de la chitine (Arnold <i>et al.</i> , 2020).....	24
Figure 12 : La structure de la cellulose, de la chitine et du chitosane. Leurs structures diffèrent selon le groupe à la position C2 (Nawrotek <i>et al.</i> , 2010).....	25
Figure 13 : Dessin schématique des modèles de clivage prédominants des enzymes chitinolytiques. Les sous-unités de la chaîne de la chitine sont représentées en bleu clair et le sucre terminal réducteur en bleu foncé (Seidl, 2008).....	26
Figure 14 : Quatre types d'ennemis naturels pour la lutte biologique (Irtwange, 2006).....	37
Figure 15 : Symptômes des larves de vers à soie infectées par <i>B. bassiana</i> . A : Des taches imbibées d'huile sont apparues sur la cuticule (flèche rouge) ; B : Ver à soie mort momifié	

recouvert d'hyphes et de conidies, donnant l'aspect typique de la muscardine blanche (Li <i>et al.</i> , 2019).....	39
Figure 16 : <i>Diatraea saccharalis</i> colonisé par <i>B. bassiana</i> (C et D), <i>M. anisopliae</i> (A et B) (Baron <i>et al.</i> , 2019).....	40
Figure 17 : Importantes ABC fongiques (Mousumi et Abdulhamee, 2020).....	41
Figure 18 : Applications de levures tueuses en agriculture pour prévenir les infections fongiques. Les levures tueuses ont été utilisées pour les traitements avant et après récolte (Díaz <i>et al.</i> , 2020).....	42
Figure 19 : Actions mécanistiques des agents de contrôle biologique contre différents pathogènes (singh <i>et al.</i> , 2020).....	44
Figure 20 : Illustration schématique de la cuticule et de la matrice péri-trophique des insectes. Les enzymes hydrolytiques microbiennes telles que la chitinase, la protéase, la glucanase et la lipase (A) interagissent et endommagent la cuticule des insectes (B) formée par les couches d'épicuticule, d'exocuticule, d'endocuticule et d'épiderme, ainsi que la matrice péri-trophique (C), composée de couches de chitine, de protéoglycane et de glycoprotéines (Lopes <i>et al.</i> , 2021).....	45
Figure 21 : Principales caractéristiques morphologiques des champignons entomopathogènes interagissant avec la cuticule de l'insecte. (A) Les blastospores développent des structures infectieuses recouvertes de mucilage. (B) Formation d'appressorium. Différentes caractéristiques de surface de la blastospore en germination peuvent être distinguées. (C) La couche de rodlet hydrophobine d'une conidie aérienne. (D) Les hyphes différentiels colonisent la cuticule de l'insecte. (E) Pénétration EPF des couches de cuticules d'insectes. Les principales caractéristiques sont indiquées à l'aide de flèches (Butt <i>et al.</i> , 2016)	48
Figure 22 : Mécanisme d'hydrolyse de la paroi cellulaire fongique. (a) Structure typique d'une paroi cellulaire fongique. (b) Enzymes hydrolytiques (chitinase, glucanase et protéase) agissant sur la chitine, le β -glucane et les protéines. (c) Paroi cellulaire fon fongique perdant son intégrité après hydrolyse. (Jadhav <i>et al</i> , 2017).....	49
Figure 23 : Modèle des rôles des chitinases chez les mycoparasites. Les fonctions biologiques des chitinases incluent (1) le mycoparasitisme (en synergie avec des métabolites secondaires et d'autres enzymes), (2) la dégradation de la chitine exogène et (3) le remodelage et le recyclage de la propre paroi cellulaire du champignon. L'accessibilité des hyphes fongiques est représentée par des plaquettes bleues, qui illustrent un revêtement potentiel des polymères de la paroi cellulaire par des substances protectrices ou d'autres moyens de protection de la paroi cellulaire (Gruber et Seidl-Seiboth, 2011).....	50

Figure 24: Activité chitinase de <i>M.anisopliae</i> à différentes températures après 5 jours de croissance.....	67
Figure 25: Effet de différentes concentrations de chitinase sur le taux d'alimentation des larves.Les barres représentent l'erreur standard des moyennes (sur la base de trois répétitions indépendantes).....	68
Figure 26: Effet de différentes concentrations de chitinase sur le poids des larves. Les barres représentent l'erreur standard des moyennes (sur la base de trois répétitions indépendantes).....	69
Figure 27: Effet de différentes concentrations de chitinase sur le % de pupaison. Les lettres différentes sont significativement différentes les unes des autres (Tukey's, $P < 0,05$) ; les barres représentent l'erreur standard des moyennes (sur la base de trois répétitions indépendantes).....	70
Figure 28: Effet de différentes concentrations de chitinase sur le % d'émergence des adultes.....	71
Figure 29: Effet de l'application topique de différentes concentrations de chitinase sur le pourcentage de mortalité de <i>P. xylostella</i> . Les lettres différentes sont significativement différentes les unes des autres (Tukey's, $P < 0,05$) ; les barres représentent l'erreur standard des moyennes (sur la base de trois réplicats indépendants).....	72
Figure 30: Mycéliums de <i>Metarhizium anisopliae</i> en présence de le chitine comme seul source de carbone (Krieger de Moraes <i>et al.</i> , 2003).....	76
Figure 31: Illustration graphique des éléments structurels du PM (Merzendorfer <i>et al.</i> , 2016).....	80
Figure 32: Morphologie de la matrice péri-trophique traitée par les chitinases. La MP traitée par les chitinases présente des ruptures (pointes de flèches, A) et un décollement (pointes de flèches, B) des couches superficielles. L'intégrité du réseau de fibrilles est compromise (C). L'analyse ultra-structurale confirme un effondrement général de la structure PM et une altération massive de l'organisation des fibrilles de chitine (D, E, F) (Berini <i>et al.</i> , 2015).....	81
Figure 33: A) adulte de <i>P. xylostella</i> , B) Œufs de teigne des crucifères, C) Larves de la teigne des crucifères et dommages causés par l'alimentation, D) Cocon nymphale de <i>P. xylostella</i> (Philips <i>et al.</i> , 2014).....	82
Figure 34: Larve de <i>Plutella xylostella</i> tuée par <i>M. anisopliae</i> (Chui-Chai <i>et al.</i> , 2014).....	83

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés des sous-groupes de la famille 18 de la GH fongique (Seidl <i>et al.</i> , 2005).....	17
Tableau 2 : Effet de différentes concentrations de chitinase d' <i>I. fumosoroseus</i> sur la dégradation de la cuticule de <i>P. xylostella</i>	66

Liste des abréviations

ABC	Agent de Bio-Control.
ACB	Les Agents de Contrôle Biologique.
ACBM	Agents de Contrôle Biologique Microbien.
ADN	Acide Désoxyribonucléique.
Asp (D)	Asp, D ou aspartate.
B.t	Bacillus thuringiens.
CaCl₂	Chlorure de calcium.
CAZY	Carbohydrate-Active enzymes.
CBC	Classical Biological Control / La Lutte Biologique Classique.
CBD	Chitin binding domain / domaine de liaison à la chitine.
CCRD	Conception Rotative Composite Centrale.
CHI	chitinase.
CMB	Carbohydrate-Binding Modules / modules de liaison aux glucides.
COS	Chitooligisaccaride.
COV	Composés Organiques Volatils.
CTS1	endochitinase precursor.
EN	Ennemis Naturels.
EPNs	EntomoPathogenic Nematodes / Les Nématodes EntomoPhtogènes.
F	teste de Fisher
GH	glycolyse hydrolase.
GlcNAc	N-acétylglucosamine.
Glu (E)	Glu ou E, Glutamine.
HCl	Chlorured'hydrogène.

Liste des abréviations

H_2SO_4	Acide sulfurique
KDa	kilo Dalton.
KCl	Chlorure de potassium
MCF-7	Michigan Cancer Foundation – 7.
MEC	Matrice Extra-Cellulaire.
$MgSO_4$	Sulfate de magnésium.
mU	Microunité.
P	Probabilité.
PH	Potentiel Hydrogène.
PM	Peritrophic Matrix / Matrice Péritrophique.
PMP	Peritrophic matrix protein / Protéine de la matrice péritrophique.
PRP	Protéine liée à la Pathogénicité.
RI	Résistance Induite.
RPM	Tours par minute / Revolutions per minute.
SmF	Fermentation Submergée.
TIM	Triosephosphate Iso-Méras.
UIBBM	Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire.

Introduction

Pour assurer la sécurité des pratiques agricoles, la santé humaine, l'environnement et les organismes vivants, à présent, les chercheurs se concentrent pour promouvoir vigoureusement le développement de méthodes à faibles intrants et plus durables, afin de réduire les problèmes portés par les produits chimiques ou les pesticides. La réduction de ce problème porte à réflexion sur ce qui semblait être une solution miracle (Syed *et al.*, 2018).

Quelle est la meilleure façon pour remplacer les pesticides chimiques ? . Cette question se concentre sur les grands espoirs qui sont associés aux nouvelles approches consistant à utiliser des « agents de bio-contrôles microbiens optimisés pour les plantes ». La lutte intégrée contre les ravageurs (IPM) comprend l'inspection, l'identification et le traitement des ravageurs. Le traitement (si nécessaire) est effectué après inspection et identification, en utilisant des pesticides sans danger pour l'environnement, qui ciblent les parasites et ont une durabilité limitée. Par conséquent, la lutte biologique est considérée comme une partie « façon » importante de la gestion intégrée des ravageurs, et présente une alternative intéressante aux pesticides chimiques. La lutte biologique consiste généralement à utiliser un organisme vivant pour lutter contre un organisme nuisible spécifique. Les agents de contrôle biologique microbien (ACBM) ce sont les ennemis naturels appliqués aux cultures pour lutter naturellement contre agents pathogènes des plantes, et ils agissent à travers une série de modes d'action (Köhl *et al.*, 2019 ; Khan *et al.*, 2012). Parmi eux les champignons entomopathogènes, qui ont été décrits comme de puissants antagonistes de divers agents pathogènes des plantes. En effet il est également important de noter que la sécurité des champignons entomopathogènes vis-à-vis de l'homme, de l'environnement et des organismes non ciblés est clairement un critère important à prendre en considération avec plus de chances de réussir commercialement, selon la valeur du marché cible. (Syed *et al.*, 2018 ; Shah et Pell, 2003).

Dans la nature, divers microorganismes présentent des capacités différentes de biodégradation des molécules organiques, aussi variées que récalcitrante et cela en produisant différentes enzymes hydrolytiques spécifiques aux différents substrats. Et l'importance de chitinase dans la croissance et le développement des insectes, des nématodes et des champignons, leur développement en tant qu'agent de lutte biologique, ou protéines de défense chimique dans les plantes, a reçu une attention particulière en raison de son potentiel pour le contrôle biologique des organismes contenant de la chitine et pour le développement de matériaux naturels à base de chitine. En ce sens, le contrôle biologique de certaines maladies fongiques du sol est lié à la production de chitinase. Les chitinases produites par des champignons et des bactéries présentent des effets antagonistes contre les champignons, et l'effet inhibiteur des chitinases végétales sur

la croissance des champignons a été démontré. Les champignons pathogènes ont un grand potentiel pour la lutte biologique contre les ravageurs. Les champignons entomopathogènes peuvent évidemment surmonter les barrières physiques chez l'hôte en produisant une variété d'enzymes extracellulaires ou intracellulaire y compris des chitinases (Herrera et Ilan, 1999). Ces enzymes catalysent la dégradation de la structure épidermique composée de chitine. Le manque de chitine dans le règne végétal et les vertébrés fait de cette molécule la cible de nouveaux programmes de lutte contre les maladies des cultures, les ravageurs et les pathogènes. Par conséquent, la dérégulation du métabolisme de la chitinase par surexpression ou inhibition de la chitinase est une manière intéressante de développer de nouveaux programmes de lutte contre les maladies, les ravageurs et les agents pathogènes des cultures (Saguez, 2007).

Ces dernières années, la recherche de micro-organismes antagonistes envers les champignons s'est intensifiée du fait qu'ils sont des facteurs responsables de nombreuses maladies des plantes. C'est généralement associé à la production de composés antifongiques et d'enzymes hydrolytiques extracellulaires (chitinase et 1,3-bglucanase). Les enzymes chitinolytiques sont capables de lyser la paroi cellulaire de nombreux champignons. Les microorganismes qui produisent ces enzymes, les enzymes chitynolytiques sont capables de détruire la paroi cellulaire de nombreux champignons. Les micro-organismes qui produisent ces enzymes sont capables d'éradiquer les maladies fongiques qui sont un problème pour la production agricole mondiale. Les moisissures sont parmi les agents pathogènes des plantes les plus agressifs. Ils sont systématiquement combattus à l'aide de fongicides chimiques. Cependant, l'utilisation excessive de ces composés, qui a augmenté presque triplé au cours des 40 dernières années, a conduit à des problèmes liés à la contamination et à la dégradation de l'environnement naturel. Ces substances peuvent être mortelles pour les insectes bénéfiques et les micro-organismes du sol et peuvent également entrer dans la chaîne alimentaire. Certaines espèces de moisissures qui produisent des endochitinases très fortes sont particulièrement importantes pour la protection des plantes. La chitinase produite par des champignons présente souvent une activité antagoniste contre les champignons phytopathogènes (Brzezinska et al 2012).

Notre travail s'articule sur les objectifs suivants :

- Proposer une approche alternative pour traiter les maladies des plantes pourrait être l'utilisation des champignons pathogènes d'insectes ravageurs, et de champignons phyto-pathogènes. Ces organismes sont utilisés intensivement comme agent de bio-contrôle contre les ravageurs et comme source de métabolites fongicides et insecticides.
- La mise en évidence l'importance des chitinases fongiques en tant que agents de bio-contrôle.
- Identification et caractérisation de champignon *M. anisopliae* producteur de chitinase comme un micro-organisme à fort potentiel de pathogénicité, (Évaluation de la chitinase de *Metarhizium anisopliae* comme biopesticide contre *Plutella xylostella*).

Chapitre I :
La Chitinase

Historique

En 1911 Bernard a isolé une fraction chitinolytique thermostable et diffusible de la pulpe d'orchidée, et celle-ci est la première fois où la chitinase a été observé. Un peu plus tard, en 1929 Karrer a soutenu cette étude et il a confirmé la présence de cette enzyme dans l'escargot (Flach *et al.*, 1992). Et alors dans différents organismes, comme les bactéries, les champignons, les crustacés, les insectes et les plantes (Perrakis *et al.*, 1993). En 1939, Zechmeister a démontré son activité spécifique dans l'hydrolyse de la chitine. Depuis lors, cette molécule a imposé son importance et son utilité comme outil pour renforcer l'immuno-réaction des plantes contre une variété de microbes pathogènes. Cette découverte d'enzyme chitinolytique est avantageusement modelée comme mécanisme de bio-contrôle des phyto-pathogènes : de lyser le mur de cellules, et les composants fongiques, aussi d'exosquelette d'insecte.

Les chitinases ont également prouvé leur rôle dans la réponse de défense de plante (Punja *et al.*, 1993 ; Gupta *et al.*, 2010), De nombreux rapports sont disponibles sur l'application des chitinases pour améliorer la résistance des cultures aux insectes et aux maladies. La première application de ce type est devenue disponible commercialement au milieu des années 1990 (Binod *et al.*, 2006). Les mycètes ont un potentiel considérable pour la lutte biologique contre les parasites et les insectes via sécrétion des enzymes multiples comprenant également les enzymes chitinolytiques qui aident à pénétrer la cuticule et à faciliter l'infection (herrera *et al.*, 1999).

Ces dernières années, de nombreuses études ont été menées pour améliorer la chitinase produite par les microorganismes. L'émergence de la technologie de l'ADN recombinant a grandement favorisé la production de micro-organismes. Promouvoir grandement la production de chitinase microbienne (Binod *et al.*, 2006).

1. Chitinases

Différents organismes produisent une large variété d'enzymes hydrolytiques spécifiques aux différents substrats. Les chitinases font partie de ces dernières, c'est une classe d'enzymes large et diversifiée, elles sont largement répandues, dans les micro-organismes tels que les bactéries, les champignons, les levures, les actinomycètes, comme chez d'autres organismes : les plantes, les arthropodes et les êtres humains (Javed *et al.*, 2013).

Ses enzymes ont des applications pratiques utiles en raison des rôles clés qu'elles jouent, avec des structures et des mécanismes variés qui déterminent leurs activités et leurs adaptations

a des applications, comme : la lutte contre les maladies des plantes et les insectes nuisibles ; la synthèse des chito-oligosaccharides (COS) pour une utilisation dans les industries alimentaires et pharmaceutiques ; la gestion des déchets marins et la production de biocarburants. Elles sont caractérisées par leur capacité de dépolymériser la chitine ou ses fragments par clivage des liaisons glycosidiques (Javed *et al.*, 2013), conduisant à sa décomposition en produits de faible poids moléculaire (COS et N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc)). Le carbone et l'azote sont synthétisés comme sources de nutriments dérivés grâce à la dégradation de la chitine. Récemment, la recherche sur l'hydrolyse de la chitine par la chitinase suscite de plus en plus d'intérêt en raison de sa grande importance dans divers domaines (Gomaa, 2021).

Biochimiquement, Les chitinases sont les glycosides hydrolases qui hydrolysent les liaisons β -1,4-glycosidiques liant les carbones C₁ et C₄ les deux résidus de N-acétyl-D-glucosamine de la chitine. Le complet hydrolyse enzymatique la chitine en N-acétylglucosamine libre est réalisée par un système chitinolytique composé d'un groupe d'enzymes hétérogènes qui catalysent (synergiquement et consécutivement) la dépolymérisation hydrolytique de chitine (Gortari et Hours, 2008). Ce qui explique sa performance exceptionnel vu la rigidité de la chitine et sa insolubilité, qui existe sous nombreuses formes en fonction de son rôle dans les tissus vivants. Ils expliquent une classe d'enzymes hautement conservées et présente différentes fonctions dans tous les organismes. C'est pour cela la chitinase est devenue un centre d'attention des chercheurs (khan *et al.*, 2015).

1.1. Nomenclature

Les Chitinases EC 3.2.1.14 [Nomenclature enzymatique de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (UIBBM)] (Gomaa, 2021). Le nom de la chitinase prête à confusion. Premièrement, les chitinases de la nomenclature enzymatique ont été classées en chitinase EC 3.2.1.14 et N-acétylglucosaminidase EC 3.2.1.30. Dans ce terme, les enzymes chitinolytiques se réfèrent uniquement à l'endochitinase. De plus, le terme n'inclut pas toutes les chitinases connues. Par conséquent, cela ne suffit pas. Plus tard, la chitinase est définie comme toute enzyme qui peut catalyser le clivage de la chitine, et il est classée en endochitinase et exochitinase, (cette dernière (exochitinase) est connue sous le nom de chitine 1,4- β -chitinosidase ou chititobiosidase) et N-acétylglucosidase. Les chitinases qui catalysent l'hydrolyse de la chitine sont généralement inclus dans cette classification. D'où l'appellation est raisonnable. Au même temps, une nomenclature similaire a été proposée, mais la chitinase a été utilisée à la place d'enzymes chitinolytiques dans cette catégorie. Sur la base de cette

nomenclature les chitinases sont classé en deux grandes divisions (catégories), les endochitinases et les exochitinases (Duo-Chuan, 2006).

1.2. Facteurs affectants la production de chitinases

Certaines des sources couramment utilisées pour la production de chitinase sont les insectes, les plantes, les mammifères, les bactéries et les champignons d'où la température, le pH, le temps d'incubation et les substrats ont une influence majeure sur la production de chitinases. Ces enzymes sont produites dans une large gamme de pH allant de 4 à 8 et dans une fourchette de température optimale qui varie de 30°C à 50°C (Renkema *et al.*, 1995) ; généralement les chitinase de source microbienne sont fortement influencée par certains facteurs nutritionnels et environnementaux ; les facteurs nutritionnels comprennent les ressources et besoins de carbone et d'azote et la disponibilité de certains sels organiques et inorganiques. Les facteurs limités par l'environnement incluent la température, le pH, l'agitation et la période d'incubation. Le type et la forme de chitine affectent en grande partie sur la production et l'activité de la chitinase. Dont ces sources sont couramment utilisées pour la production de chitinase varient en fonction de leur contenu et de leur disponibilité en chitine (Gomaa, 2021).

2. Classifications des chitinases

La séquence N-terminale, le pH isoélectrique, la localisation (origine), les inducteurs et la présence ou l'absence de peptide signal se sont des propriétés utilisées pour classer les chitinases dans plusieurs classes. Les chitinases de classe I, trouvés dans les plantes ils sont caractérisé d'un domaine amino – terminal riche en cystéines. Les enzymes de classe II dépourvu du domaine riche en cystéine existent dans les bactéries, et les plantes (Figure 1). Ainsi que la classe III comprend les endochitinases, de séquence autre que des enzymes de classe I ou II caractérisée d'une architecture de site actif ouverte et peu profonde, elles incluent les GH de familles 18 des champignons, et les plantes. Une autre classe de chitinases, classe IV qui ont des propriétés similaires à celles des chitinases de classe I, mais de taille qui est plus petite, elles ont été trouvé dans la plupart des plante, et ont une localisation extracellulaires (Patil *et al.*, 2000). Les chitinase de classe V, identifiées principalement chez les bactéries, Les chitinases de classe V sont des exonucléases qui contiennent des sites actifs profonds, en forme de tunnel (Van *et al.*, 2000 ; Bortone *et al.*, 2002). Cette dernière a été détectée dans l'étude des interactions symbiotiques plantes-microbes. Ils ont été aussi signalés chez les champignons, les virus et les nématodes. (Khan *et al.*, 2015).

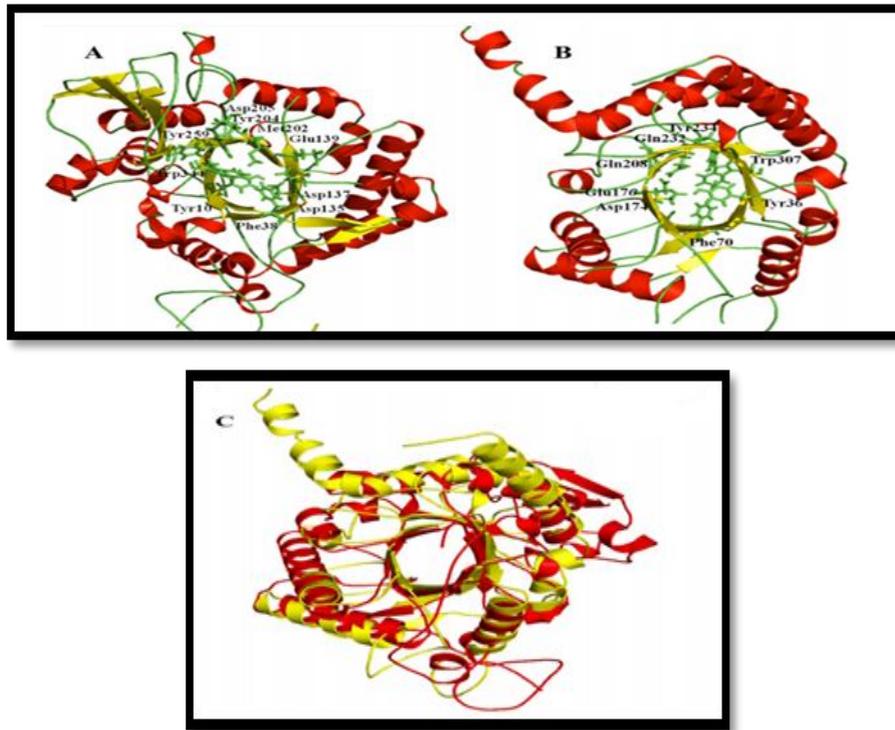


Figure 1 : Structure tridimensionnelle de (a) chitinase I, (b) chitinase II, et (c) structure superposée des deux enzymes (Khan *et al.*, 2015).

2.1. Selon le mode d'action

Les chitinases sont classées selon leur mode d'action enzymatique effectuée par un système chitolytique, en endochitinase (EC 2.2.1.14) et exo-chitinases (EC 3.2.1.2), et N-acétyl-β-glucosaminidase (Figure 02) (Cohen *et al.*, 1998).

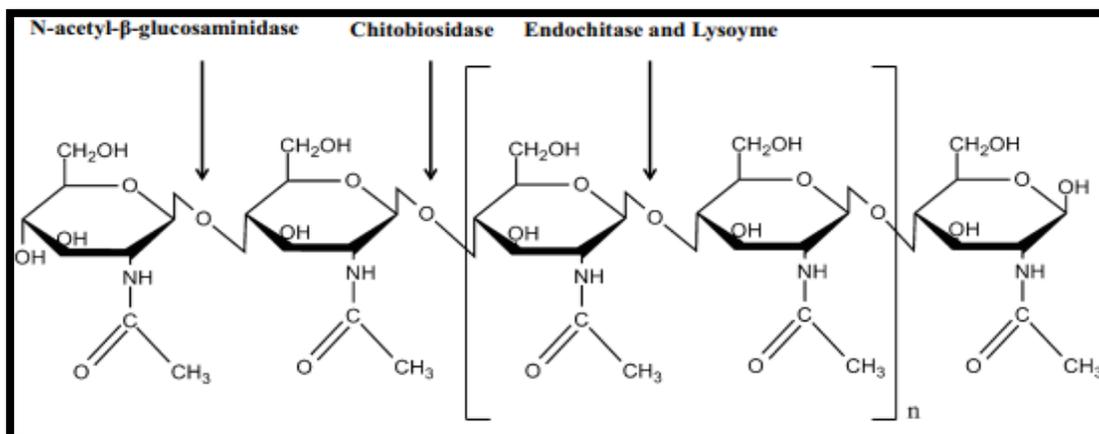


Figure 2 : Schéma représentatif de l'action de chitinases sur la chitine (Khan *et al.*, 2015).

1- Les endochitinasés : clivent la chitine de manière aléatoire sur des sites internes (figure 3), ça veut dire hydrolysent les liaisons internes des microfibrilles de chitine pour libérer des fragments de chitobiose, chitotriose et chitotétraose composés respectivement de deux, trois ou quatre unités N-acétylglucosamine (polymères de GlcNAc) (Cohen *et al.*, 1998).

2- Le deuxième groupes, nommées exochitinasés (figure 04), ces derniers sont divisés en deux sous-catégories les chitobiosidases et les β -(1,4)-N-acétyl-glucosaminidases (Jung et Park, 2014).

- Les chitobiosidases (EC 3.2.1.29) appelé aussi, chitine-1,4- β -chitobiosidases, généralement, « ces enzymes stimulent la libération progressive du di-acétyl-chitobiose à partir de l'extrémité non réductrice de la microfibre de chitine. Ils hydrolysent les sucres non reducteur terminaux en libérant uniquement des di-acétyl-chitobioses, et aucun monosaccharide ou oligosaccharide n'est formé » (Cohen *et al.*, 1998).
- Les β -(1,4)-N-acétyl-glucosaminidases, (GlcNAcase, EC3.2.1.30) : élimine les résidus des sucres de l'extrémité non réductrice de la chaîne interne de la chitine, et catalyse la décomposition du diacétyl-chitobiose, du chitotriose et du chitotétraose en N-acétyl glucosamine. En monomères de N-acétyl glucosamine (Jung et Park, 2014).

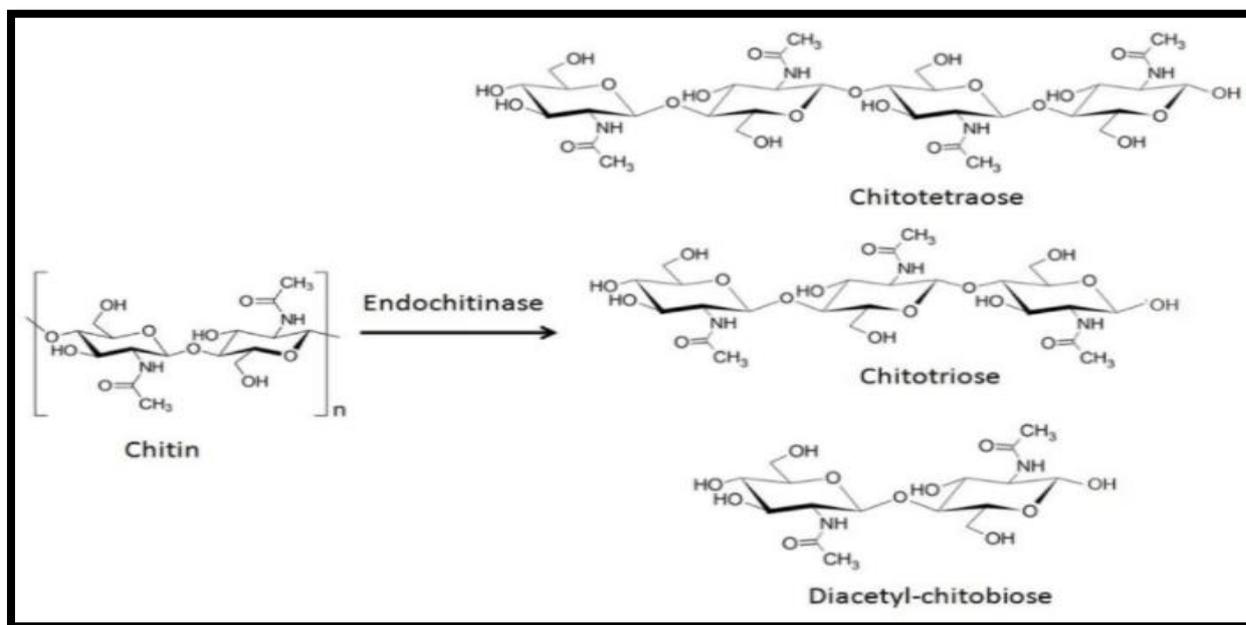


Figure 3 : Réaction chimique pour l'hydrolyse de la chitine par les endochitinasés (Singh *et al.*, 2021).

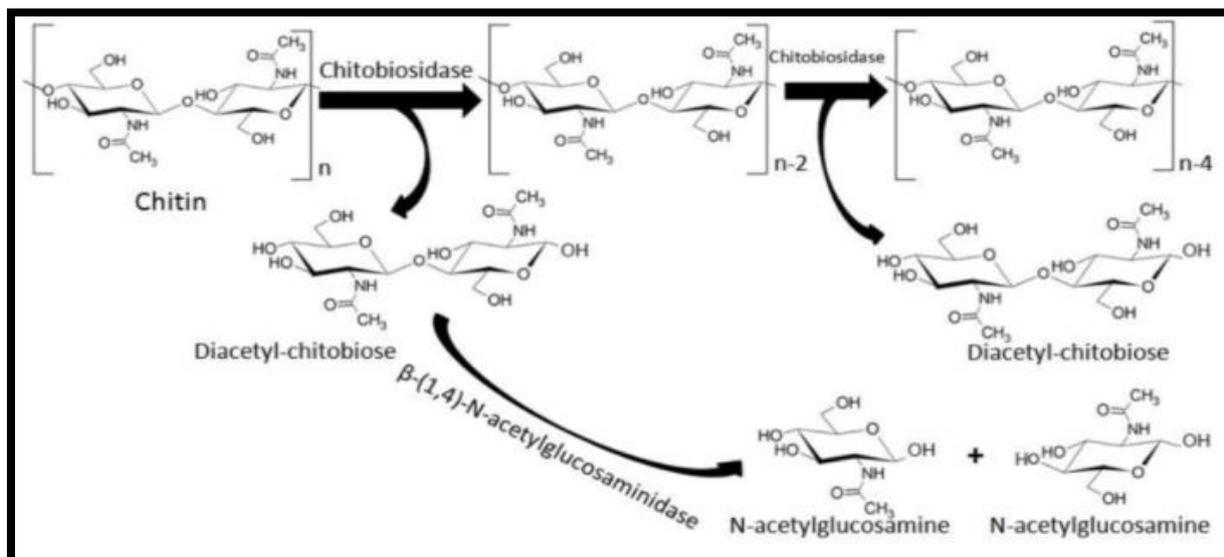


Figure 4 : Réaction chimique pour l'hydrolyse de la chitine par les exochitinases (Singh *et al.*, 2021).

2.2. Selon la structure et séquence d'acide aminé

Récemment ; Divers types de chitinases ont été distingués et regroupés sur la base de la séquence d'acides aminés, en différentes familles de glycoside hydrolases (GH) ; bien évidemment selon la base de données de CAZY, telle que les GH18, GH19 (figure 5), GH23 et GH48, mais seules les trois premières familles ont été trouvées dans les microbes (Adrangi et Faramarzi 2013 ; Nguyen *et al.*, 2018). Alors que GH18 est présent dans plusieurs taxons bactériens et fongiques (Larsen *et al.*, 2012 ; Hartl *et al.*, 2012). D'après l'analyse des séquences d'acides aminés, les chitinases GH19 des Actinobactéries sont apparentées aux chitinases végétales de classe IV. Elles semblent être issues des chitinases végétales, et les bactéries peuvent les avoir acquises par transfert horizontal de gènes (Udaya Prakash *et al.*, 2010). Concernant la chitinase GH23, une seule a été identifiée chez *Ralstonia sp* (Ueda *et al.*, 2009). A ce jour la chitinase a été caractérisée structurellement (Kitouni *et al.*, 2019).

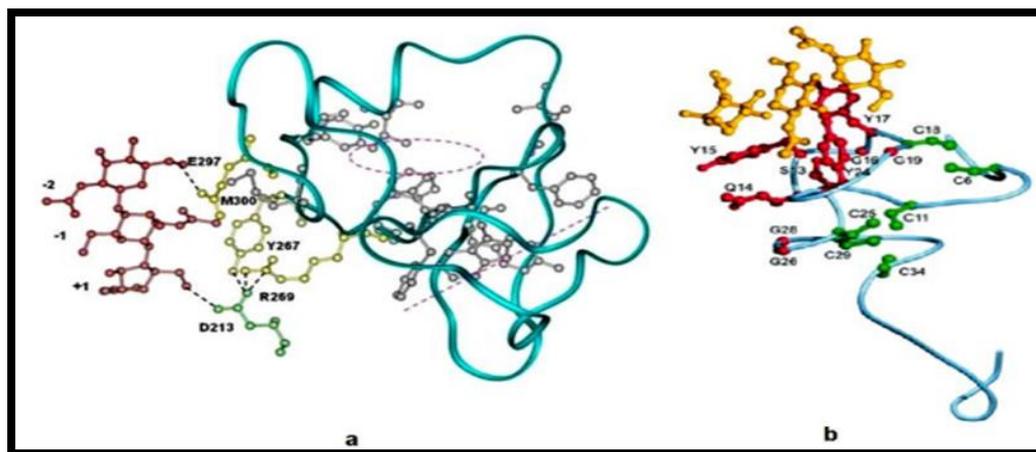


Figure 5 : Structure de la chitinase de la famille 18 (a) et de la famille 19 (b) (Singh *et al.*, 2021).

Ils diffèrent considérablement dans leurs séquences d'acides aminés et leurs propriétés catalytiques, et bien qu'il y ait une ambiguïté inhérente à cette taxonomie, ces trois familles ont été validées biochimiquement comme étant des enzymes ayant des propriétés chitinolytiques. Les familles 18 et 19 glycosidases sont considérées comme des chitinases, car elles catalysent la dégradation des polymères de chitine. La famille GH 20 comprend la chitobiase et la β -N-acétylhexosaminidase qui catalysent la dégradation des unités dimères de la N-acétylglucosamine (Chitobiose), de la N-acétylgalactosamine terminale ou de la glucosamine à partir des glyco-conjugués (Oyeleye *et al.*, 2018).

3. Sources de chitinase

Les chitinase sont présentes dans un large éventail d'organismes, dont les virus, les bactéries, les champignons, les insectes, les plantes et les animaux. Les rôles des chitinases dans ces organismes sont divers. A l'échelle industriels les chitinase sont connues pour hydrolyser différentes formes de chitine, principalement produites par des bactéries, des champignons et des plantes ; qui ont été sélectionnés comme source naturelles de cette enzyme afin de lutter efficacement contre les maladies des plantes (Le *et al.*, 2019 ; Sarma *et al.*, 2013).

3.1. Chitinases végétales

Les chitinases végétales semblent jouer des rôles physiologiques plus diversifiés et multiples, chez les plantes les chitinases sont présentes dans les graines, les tiges, les tubercules et les fleurs. Elles sont induites par l'attaque de pathogènes des végétaux avec des protéines

liées à la pathogénicité (PRP). Et confère à la plante la capacité de l'autodéfense. Ou par l'application de chito-oligosaccharides ou des régulateurs de croissance (comme l'éthylène). Sous un stress environnemental tel qu'une augmentation de la concentration en sel du froid et de la sécheresse, certaines chitinases ont été exprimées. En outre il existe des processus chez les végétaux comme l'embryogenèse et la synthèse de l'éthylène, implique également la chitinase. Cette enzyme agit comme une protéine pathogène majeure qui s'accumule dans la région infectée, telle que le tissu extracellulaire (Daizo, 2005). Et peut être détectée aux premiers stades de la croissance des plantes. Maintenir son rôle et ne pas seulement servir comme mécanisme de défense. La masse molaire de la chitinase des plantes est généralement inférieure à celle de la chitinase trouvée chez les insectes, avec un poids moléculaire de 25 à 40 KDa. La plupart des chitinases végétales isolées à ce jour sont des endochitinases. Elles inhibent la croissance des champignons. Il agit en synergie avec d'autres enzymes (comme la β -1, 3-glucanase) présentes dans les pommes de terre, le tabac, les agrumes, les haricots, les tomates, les ignames, les pois, etc. (Rouchan et Bejoysekhar, 2015).

3.2. Chitinases et micro-organismes

Les micro-organismes chitynolytiques peuvent présenter de bonnes alternatives aux agents chimiques et utilisés comme méthodes naturelles de protection des plantes contre les maladies fongiques et des ravageurs. Grâce à leurs capacités de synthétiser des composés qui inhibent naturellement la croissance des champignons phyto-pathogènes, ils sont largement recherchés. Par rapport aux fongicides synthétiques, ils ne contaminent pas l'environnement, ce qui constitue un facteur crucial d'intérêt accru pour l'utilisation de méthodes biologiques pour lutter contre les organismes nuisibles. Est c'est pourquoi les chitinases microbiennes ont attiré l'attention du monde entier, tant en la recherche industrielle et fondamentale. Dans l'environnement, les chitinases bactériennes jouent un rôle trophique allant de la synthèse de la paroi cellulaire ou de la nutrition au parasitisme ou au contrôle des pathogènes fongiques (Hamid et al. 2013 ; Rathore et Gupta 2015). A des fins industrielles, cette classe d'enzymes offre un large spectre d'applications en biochimie, industries alimentaires, agriculture, santé humaine ou végétale, et production de biocarburants (Dahiya *et al.*, 2006 ; Hartl *et al.*, 2012).

Les chitinases de sources microbiennes ont été regroupées beaucoup plus dans la famille 18 des glycosyl hydrolases, à l'exception de certaines bactéries à Gram positives qui font partie de la famille 19. Les micro-organismes sont une bonne source de chitinases en raison de leur grande abondance dans la nature et de la disponibilité facile de la matière première pour la

culture, ce qui se traduit par un coût de production plus faible des chitinases et ça se qui intéresse l'industrie (Maniche Kumar *et al.*, 2018).

3.2.1. Chitinases bactériennes

Au cours des années, de nombreuses espèces bactériennes ont été récolté pour la production de chitinase exploité dans plusieurs applications industrielles et agricole (Bhattacharya *et al* ,2007).

Des bactéries telles que *Serratia Marcescens*, *Aeromonas Punctata* et *A. hydrophila*, *Bacillus pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, etc... Ont montré le potentiel de produire des chitinases, afin de dégrader la chitine pour son utilisation comme source d'énergie, tandis que certaines chitinases bactériennes ont montré une potentialité comme agents de lutte biologique contre une variété de maladies des plantes causées par des champignons phytopathogènes. (Maniche Kumar *et al.*, 2018).

Les chitinases bactériennes ont été incluses dans la famille de classe 18, Seuls quelques chitinases dérivés de *Streptomyces* ont été placée dans la famille 19. Le rôle des chitinases bactériennes est principalement dans la nutrition car elles provoquent la dégradation de la chitine qui est utilisée comme source d'énergie. En dehors de cela, la chitinase joue également un rôle dans le parasitisme et fournit une défense contre les agents pathogènes. Les chitinases bactériennes sont largement distribuées chez, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Chromobacterium*, *Beneckea*, *Klebsiella* et *Serratia* ; dont *Serratia* produit un niveau élevé d'enzyme chitinase. La plupart des chitinases bactériennes sont de poids moléculaire qui varie de 20 000 à 60 000 daltons. Les chitinases isolées à partir de bactéries sont actives sur une large gamme de pH et de température en fonction des variétés d'espèces, avec une activité enzymatique à un pH compris entre 5 et 8 et une température optimale est de 40 ° C. Récemment, une chitinase de *Bacillus cereus* a été isolée et produite à partir de déchets chitineux. (Bhattacharya *et al.*,2007).

3.2.2. Chitinases fongiques

a. Propriétés générales et localisation subcellulaire

La majorité des chitinases fongiques sont caractérisées et identifiées sur la base du poids moléculaire, le pH optimal, la température optimale, la stabilité thermique, l'activité inhibitrice et antifongique. En général, l'endochitinase et chitobiosidases des champignons sont représentés sous formes de polypeptides uniques, quant à la N-acétylglucosaminidase est un

dimère, tel que la N-acétylglucosaminidase de *Trichoderma harzianum*, Nématodes et *Beauveria bassiana*. « Les chitinases fongiques sont actives à un pH légèrement acide (4,0–7,0), avec des températures optimales de 20 à 40 ° C. Ils sont caractérisés par une grande stabilité (due à la glycosylation) et une masse moléculaire variable (27 à 190 kDa) » (Sahai et Manocha, 1993). Ces enzymes ont un inhibiteur spécifique (les inhibées de manière compétitive), l'allosamidine (figure 6) ou la déméthyl-allosamidine qui est un antibiotique produit par Streptomyces, ce dernier est utilisé pour la recherche fonctionnelle et l'identification des chitinases de la famille 18 provenant de levures, de champignons et d'insectes ; ils peuvent être aussi inhibées par les sels de cuivre et de mercure, ne présentent pas de cofacteurs (Gortari et Hours, 2008). Plusieurs études ont montrés que les CHI fongiques sont localisée dans la partie extracellulaire, précisément dans l'espace péri-plasmique et la membrane plasmique, toute fois l'activité chitinolytique des champignons entomopathogènes peut être détecté dans divers fractions subcellulaires et aussi des préparations microsomales ; comme les fractions riches en membranes, soit dans la paroi cellulaire ou les fractions cytosoliques, le périplasma, aussi dans les vacuoles. Les champignons et les levures sont de meilleurs producteurs de chitinase que les bactéries (Sahai et Manocha, 1993).

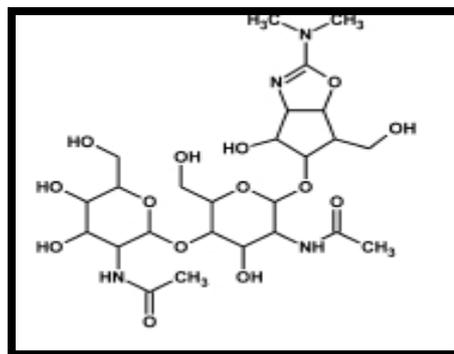


Figure 6 : Structures chimiques d'inhibiteurs de la chitinase. Allosamidin (Hartl *et al.*, 2012).

b. Famille et Structure des chitinases fongiques

Les chitinases fongiques appartiennent exclusivement à la famille 18 de la superfamille des glyco-hydrolases, qui est ensuite sous classée en trois groupes et cinq classes (I-V) selon l'architecture de leurs domaines et l'homologie de leurs séquences (Henrissat 1991 ; Patil *et al.*, 2000).

Ces enzymes sont caractérisés d'une structure multi-domaine. Essentiellement composé de 5 domaines ou régions de fonctions biochimiques différentes : (1) domaine catalytique, (2) région du peptide signal N-terminal, (3) domaine de liaison à la chitine, (4) région riche en sérine / thréonine, et (5) Région d'extension C-terminale. Cependant, la région riche en sérine / thréonine, le domaine de liaison à la chitine et la région d'extension C-terminale sont absents dans la plupart des chitinases fongiques, et celles-ci semblent être inutiles pour l'activité chitinase ; en effet les chitinases naturelles qui manquent de ces régions sont encore enzymatiquement actif ce qui les confèrent son importance d'utilisation (Li et Greene, 2010 ; Duo-Chuan, 2006). Comme, la endochitinase de *Saccharomyces cerevisiae*, CTS1, avec une séquence d'acides aminés trouvés avec 4 domaines distincts : une séquence signal, un domaine catalytique, une région sérine/théroninerich et un domaine de liaison à la chitine. Il a été signalé que les deux chitinases, chitinase I et chitinase II de *Rhizopus* ont cinq domaines distincts de chitinase : une séquence signal, un domaine catalytique, une région riche en sérine/théronine, un domaine de liaison à la chitine, et un domaine C-terminal supplémentaire. Les enzymes chitinolytiques de *T. harzianum* (33 kDa) sont dépourvues de trois domaines distincts de la chitinase (Figure 7), une région riche en sérine/théronine, une région de liaison à la chitine et une région C-terminale, mais aussi caractérisé par une région peptidique signal putative et un domaine catalytique (Duo-Chuan, 2006).

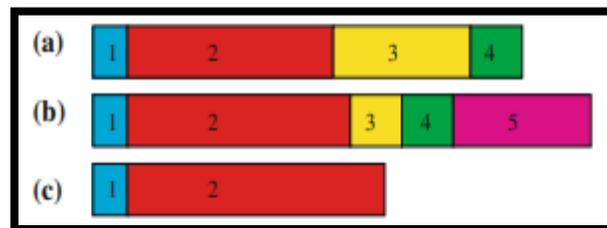


Figure 7 : La structure de la chitinase fongique de la famille 18. (a) : *Saccharomyces cerevisiae* endochitinase (CTS1) ; (b) : *Rhizopus oligosporus* chitinase (CHI1) ; (c) : *T. harzianum* chitinase (CHIT33). 1 : région du peptide signal ; 2 : domaine catalytique (Duo-Chuan, 2006).

c. Sous-famille des chitinases fongiques

Contrairement aux chitinases bactériennes et végétales les chitinases fongiques ne sont pas bien classées. Dans la famille 18, et sur la base de la similitude entre les enzymes et les chitinases de la famille 18 de plantes ou de bactéries, deux chitinases fongiques (classe) différentes (figure 8) peuvent être identifiées (Takaya *et al.*, 1998). Ils sont divisés en chitinases fongiques / végétales identiques aux chitinases végétales (correspond à la classe III) et chitinases fongiques / bactériennes similaires aux chitinases signalées chez les bactéries, et correspond à la classe V (Duo-Chuan, 2006).

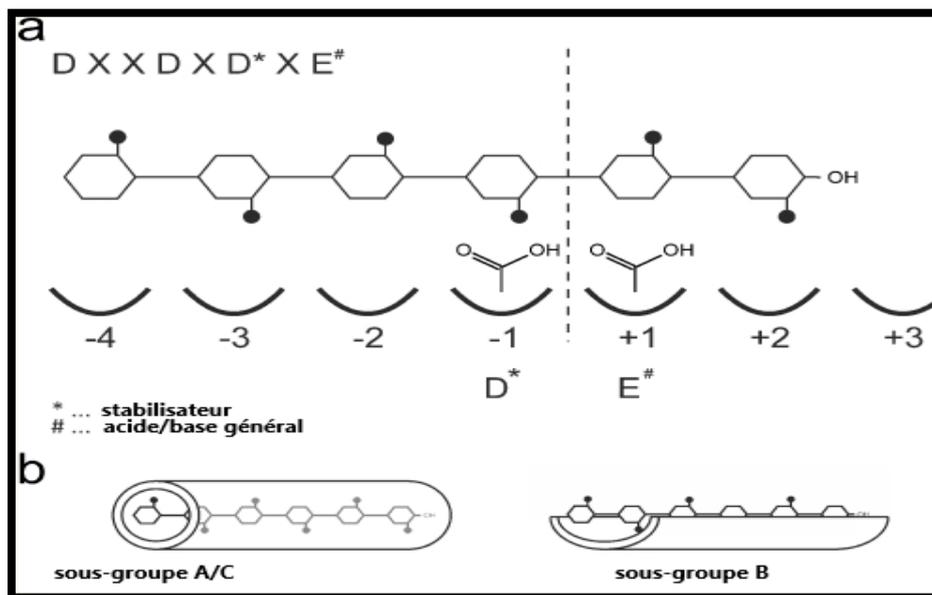


Figure 8 : Représentation schématique des fentes de liaison au substrat des chitinases de la famille 18 GH. **a :** Les chitinases ont de multiples sites de liaison au sucre dans leurs longues fentes de liaison au substrat. Le clivage se produit entre le sucre +1 et -1, dans ces deux sous-sites, le substrat est en contact avec deux acides aminés Glu (E) et Asp (D) qui font partie du motif catalytique diagnostique D_{xx}D_xD_x, indiquant leur implication directe dans l'hydrolyse de la liaison glycosidique. **b :** Les chitinases sg A (classe V) et C ont des fentes de liaison au substrat étroites et en forme de tunnel, et les chitinases sg B (classe III) ont des fentes de liaison au substrat larges et ouvertes (Hartl *et al.*, 2012).

Récemment, sur la base d'une analyse phylogénétique des génomes fongiques séquencés, il est recommandé de diviser les chitinases fongiques de la famille 18 en trois sous-familles (seidl *et al.*, 2005). Les chitinases de sous-groupes A et C, qui appartiennent aux enzymes chitinolytiques fongiques / bactériennes de classe V ; et sg B de classe III (fongiques / végétales)

(tableau 01). Cependant, des études récentes ont rapporté deux motifs hautement conservés à partir d'une analyse comparative des séquences d'acides aminés des chitinases GH 18 : D_{xx}D_xD_xE (domaines essentiels pour le clivage catalytiques par les chitinases GH 18), et S_xGG (sites de liaison au substrat). Les fentes de liaison au substrat de ces sous-groupes ont des structures différentes et, ainsi, leurs activités enzymatiques (exo vs endo) et renferment également différents modules de liaison aux glucides CBM, ((CBM 18 (liaison à la chitine) et CBM 50 (motif lysine ; LysM)), ces dernier (CBM) présent dans l'enzyme, favorisent la fixation du chitinase au substrat insoluble de manière étroite. Structuellement plusieurs sucres de la chaîne polymère de la chitine peuvent se loger à la fente de liaison au substrat. De manière générale dans la chitinase de famille GH 18, le site de fixation à la chitine est relativement long, contenant au moins cinq unités de sucre. Les sous-sites de liaison au sucre sont dénommés -3, -2, -1, +1, +2 et +3, et le clivage se produit entre les sucres -1 et +1 (figure 8). Le domaine catalytique est le domaine le plus important de cette enzyme qui est responsable de l'hydrolyse de la chitine. Toutes les protéines des GH 18 possèdent un pli (α / β) 8 barils (barils TIM) d'où s'étend des boucles contenant l'acide aminé qui se lie au substrat (Hartl *et al.*, 2012 ; Khan *et al.*, 2015).

Tableau 1 : Propriétés des sous-groupes de la famille 18 de la GH fongique (Seidl *et al.*, 2005).

Sg	Masse moléculaire [kDa]	Fente de liaison au substrat	Mode de clivage	Classe de chitinase	CBM	Localisation de CBM	Fonctions biologiques des chitinases
A	40–60	Profond et étroit	Exo	V (fongique/bactérien)	-	-	impliquées dans les processus de croissance fongique et d'autolyse ainsi que dans le mycoparasitisme
B	30-50	Peu profond et ouvert	Endo	III (fongique/plante)	Selon l'espèce ; CBM 1, 5/12, 19, etc.	C-terminal	fonctions nutritionnelles, aussi utilisé par les champignons mycoparasitiques et entomopathogènes dans des fonctions plus agressives.
C	120–200 ca. 40	Profond et étroit Non connu	Exo (prévu) Endo-N-GlcNAcase	V (fongique/bactérien) -	CBM 18 et CBM 50 -	N-terminal	Signalé chez deux champignons (<i>T. atroviride</i> et <i>T. virens</i>) mycoparasitisme

Il a été mentionné, que les nouvelles chitinases fongiques du groupe C, qui n'ont pas encore été caractérisées, comprennent un poids moléculaire élevé (supérieur à 140-170 kDa), caractérisé par 2 domaines LysM et d'un domaine de liaison à la chitine. Ils ont montré une ressemblance avec les toxines tueuses de levure *Kluyveromyces fragilis*. Malheureusement, les champignons filamenteux n'ont pas encore identifié ces protéines du groupe C (Seidl *et al.*, 2005).

d. Les gènes de chitinase fongiques

Ces dernières années, à partir de références et de la GenBank, un nombre important de gènes codant pour des chitinases des champignons filamenteux et des levures ont été isolés et analysés, avec l'évaluation d'une gamme/ variété des chitinases fongiques par le séquençage des génomes de plusieurs champignons modèles archivés (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Neurospora crassa*, Gibberellales, Magnaportheales, *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus* et *Trichoderma reesei*) (Gortari *et al.*, 2008).

La liste complète des chitinases de première génération basée sur les données de séquence du génome a été réalisée sur *Hypocrea jecorina* (*T. reesei*). L'analyse génomique a révélé qu'il existe au moins 18 cadres de lecture ouverts (ORFs) (open reading frames) qui codent pour les chitinases putatives. Comme il a été cité précédemment les chitinases de la famille 18 ont été divisées en trois sous-groupes différents (A, B et C) sur la base d'analyse phylogénétique des génomes fongiques séquencés ou le nombre de gènes GH 18 signalé au sein de divers génomes fongiques. Ils varient largement, de 1 chez *Schizosaccharomyces pombe* à 20 pour *H. jecorina* et *Aspergillus nidulans*, (généralement le génome des champignons filamenteux comprend 10 à 25 chitinases variées). Cette variation de séquence des chitinases de différents champignons établit des liens entre leur phylogénie et le fonctionnement écologique de l'espèce, et pourrait être attribuée à des différences de modes de croissance, d'acquisition des éléments nutritifs de morphologie ou de capacité antagoniste entre les organismes, et à travers cela les chitinases de plusieurs champignons exploités comme agents de bio-contrôle ont été clonées et caractérisées (Gortari *et al.*, 2008).

e. Rôles physiologiques

À l'instar des bactéries, les chitinases fongiques, ont diverses fonctions car elles jouent un rôle important dans la nutrition, la morphogénèse et les processus de développement fongique, l'autolyse et l'acquisition de la chitine, et un rôle dans les interactions de l'organisme ; d'où les champignons filamenteux comprennent plus de familles de gènes de chitinase dont sept groupes, contrairement aux levures (Yang *et al.* 2019).

plusieurs études ont isolée et caractérisée les chitinases fongiques, pour les mettre en pratique dans des applications possible, y compris la production d'agents de lutte biologique, l'hydrolyse de la chitine et la production de formes toxiques, d'autre part les champignons thermophiles ont une grandes capacité d'activité et de stabilité thermique importantes, et présentent une résistances à des conditions difficiles. De plus, par rapport aux enzymes naturelles de *Trichoderma harzianum* et *Beauveria bassiana*, la chitinase présente une virulence accrue grâce à un traitement technique. En effet cette méthode fournit des informations importantes sur la production d'oligo-saccharides de chitosane (chito-oligosaccharides) bioactifs et sur l'évolution des agents de contrôle biologique hautement efficace pour contrôler les maladies des végétaux et d'autres champignons pathogènes ; mais bien évidemment les voies moléculaires de la fonction de la chitinase fongique restent encore mal comprises à cause de la limitation du nombre de séquences de chitinase fongiques identifiées (Yang et Lee, 2019). En générale ces chitinases sont principalement produites par des champignons pathogènes d'insectes. Parmi ces champignons, *Trichoderma harzianum* est l'agent de lutte biologique le plus largement utilisé, connu pour sa capacité à inhiber divers agents pathogènes bactériens et fongiques dans les plantes (Kang *et al.*, 1999). *Trichoderma harzianum* utilise la chitinase intracellulaire et extracellulaire comme principal mécanisme de contrôle biologique (leger *et al.*, 1991).

4. Applications de chitinase

Les activités des chitinases avèrent une grande importance en plusieurs domaine, varie en fonction des organismes qui les produisent. Elles peuvent participer aux processus de nutrition, de croissance ou bien de défense et également certains mécanismes de pathogénicités. Elles sont utiles pour divers application :

4.1. Médecine

Les chitinases attirent de plus en plus l'attention dans les domaines de la médecine. Ils peuvent également être utilisés comme additifs potentiels (agent antifongique) dans les crèmes et médicaments antifongiques, pour le traitement de diverses infections fongiques, et la détection d'une infection fongique invasive chez l'homme. En plus de ses propriétés de cicatrisation et de son activité anti hypertensive (park, *et al.*, 2000), la N-acétyl glucosamine, qui est une unité monomère du polymère de chitine, serait également un agent anti-inflammatoire (Pa aloise *et al.*, 1996).

L'application des chitinases en médecine ne diminue pas les investigations sur son utilisation comme réactif subsidiaire dans les matériaux chitineux, mais fournit aussi un rôle supplémentaire. Les chitinases de *S. marcescens* et *S. griseus* ont été utilisées pour induire la lyse des cellules MCF-7 en culture et de la xénotransplante de cancer du sein humain B11-2 chez des souris atteintes d'immunodéficience combinée sévère (Pan *et al.*, 2005).

4.2. Estimation de la biomasse fongique

Il existe plusieurs méthodes pour quantifier les champignons dans le sol, tel que l'observation microscopique directe après dilution, encensement, le poids sec, et l'extraction de molécules indicatrices spécifiques des champignons telles que la glucosamine et l'ergostérol. Les chercheurs ont détecté qu'il y a une corrélation entre l'activité chitinase et la population fongique dans les sols vu que la présence de chitinase est un indicateur approprié de la croissance active des champignons dans les sols. En utilisant des substrats de méthyl-umbelliferyl spécifiques Miller *et al.* (1998) ont rapporté la corrélation de l'activité de chitinase avec le contenu des molécules indicatrices spécifiques des champignons : l'acide gras phospholipidique et l'ergostérol de même, la chitinase et les protéines se liant à la chitine peuvent être utilisés pour la détection des infections fongiques chez l'homme (Laine et Lo 1996).

4.3. Isolement des protoplastes fongiques

Les protoplastes fongiques ont été utilisés comme un outil expérimental efficace pour l'étude de la synthèse de la paroi cellulaire, des enzymes et de l'environnement. Outil expérimental efficace pour étudier la synthèse de la paroi cellulaire, la synthèse et la sécrétion des enzymes, ainsi que pour l'amélioration de souches pour des applications biotechnologiques. Comme les champignons ont de la chitine dans leurs parois cellulaires, l'enzyme chitinolytique semble être essentielle, au même titre que d'autres enzymes dégradant la paroi, pour la formation de protoplastes à partir de champignons (Dahiya *et al.*, 2005). Des études menées par Pleurotus *et al.* (1997) ont signalé l'efficacité de la chitinase d'*Enterobacter sp.* NRG4 chitinase dans la génération de protoplastes de *Trichoderma reesei*. Ils ont réussi à isoler le protoplaste de *Schizophyllum commune* en utilisant le filtrat de culture de *B. circulans* KA-304. Un complexe enzymatique de *B. circulans* WL-12 avec une activité chitinase élevée a été efficace pour générer des protoplastes de *Phaffia Rhodozyma* (Johnson *et al.*, 1979).

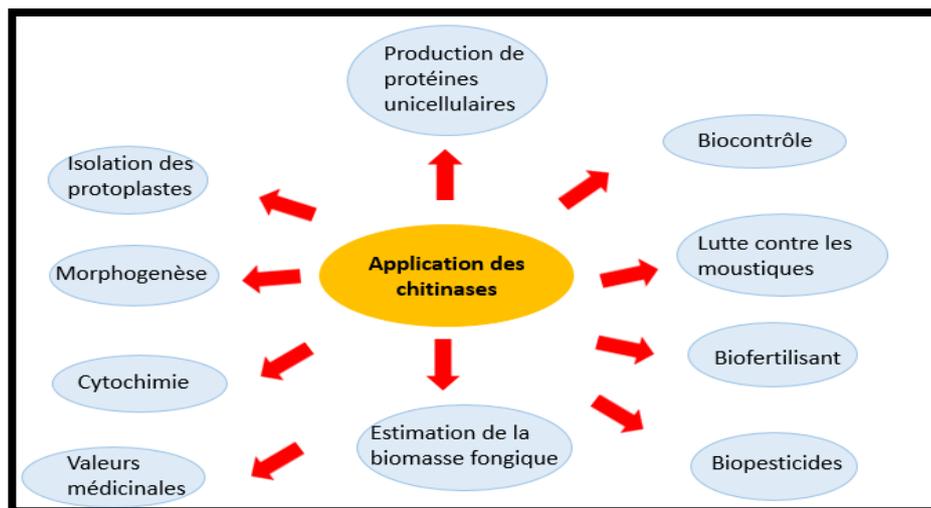


Figure 9 : Diversification potentielle des applications des chitinases (Singh *et al.*, 2021).

4.4. Applications des chitinases en agriculture

Les maladies des plantes causées par des agents pathogènes jouent un rôle majeur dans la réduction du rendement des cultures. L'application de pesticide chimique afin de protéger les cultures des dommages causés par les agents pathogènes a également eu des effets nocifs insignifiants sur la santé publique et l'environnement. La lutte contre ces ravageurs des cultures par l'utilisation des bio-pesticides à base d'agents biologiques ou leurs métabolites, est très prometteuse comme alternative à l'utilisation de produits chimiques, comme la chitinase provenant de micro-organismes a été utilisée pour contrôler la population de ravageurs des cultures (Kramer *et al.*, 1997).

L'utilisation des champignons comme agent de lutte biologique a montré que divers maladie ont été supprimées grâce à la production de chitinase (Hong et Hwang, 2006). Plusieurs recherches ont prouvé que la chitinase produite par certaines plantes est potentielle pour éliminer les champignons phyto-pathogènes par l'inhibition leur croissance. Ils ont étudié son rôle dans dégradation de la paroi fongique, et cela est dû la présence de chitine dans sa composition structurale. Les agents de bio-contrôles microbiens ouvrent la possibilité d'utiliser la chitinase comme un agent biopesticide ayant un potentiel de lutter contre les maladies des plantes présentent un grand risque pour la production agricole mondiale (Kuddus, 2014).

Les structures biologiques constituées de chitine sont des cibles de choix pour les enzymes chitinolytiques et à ce titre, les champignons phytopathogènes ou les insectes ravageurs sont

sensibles à la dégradation par les chitinases (Morales *et al.*, 2006 ; Juárez-Hernández *et al.*, 2015 ; Hollensteiner *et al.*, 2017).

4.5. Autres applications

Comme la gestion des nuisible agricole, l'ingénierie des bioprocédés biochimiques, et gagnent en importance dans le domaine de la biotechnologie appliquée à la gestion des déchets, La chitinase conduit à l'obtention des dépolymères, un composé très utile en biotechnologie par la conversion de la biomasse contenant la chitine. La chitinase est l'un de l'ensemble des études et des méthodes nécessaires à la production des protéines dans l'industrie. Elles jouent un rôle important comme agent de lutte biologique potentiel contre les ravageurs des plantes. Aussi la chitinase génétiquement modifiée aide à la croissance des plantes et de cultures génétiquement modifiées résistantes aux champignons. Cette molécule liée au traitement de nombreux maladie tels que : la maladie de l'asthme, du cancer et autres. C'est un marqueur insecticide économique pour suivre l'évolution des maladies des plantes (Figure 9) (Nisha *et al.*, 2014).

En raison de sa large gamme d'applications dans l'agriculture et la dégradation de la pollution, il existe un fort intérêt pour améliorer la production de chitinase à des fins industrielles et agro-culturels (Felse *et al.*, 2000).

5. Chitine substrat de chitinase

Avec au moins 10 gigatonnes synthétisées et dégradées chaque année dans la biosphère (Muzzarelli, 1999), la chitine a été isolée pour la première fois à partir d'un champignon en 1811 par le chimiste français Henri Braconnot qui l'appelle fungina. Toutefois, c'est en 1823 qu'Auguste Odier isole le même résidu insoluble et le nomme chitine (Skaugrud, 1990).

La chitine $(C_8H_{13}O_5N)_n$ est un homopolymère linéaire, insoluble à haute teneur en saccharide, composée de sous-unités de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) (figure 10), liés entre elles par un pont β -1,4 glycoside. Elle est l'une des principaux partie de l'exosquelette d'insectes et autres arthropodes (crustacés, arachnides). Chez les champignons, la chitine est le composant de base de la paroi latérale, qui entoure et protège les cellules fongiques des dommages environnementaux. La chitine est présente dans Chlorelle, mollusques, protozoaires, zooplancton, etc. Par conséquent, la chitine représente l'une des sources les plus riches de carbone organique. Ce composé est généralement bien soutenu par des tissus biologiques, il peut donc être utilisé pour les cosmétiques ou le traitement brûler. En chirurgie, grâce à sa bonne résistance et flexibilité. La chitine est également utilisée pour filtrer les eaux usées car

elle forme une chaîne ionisable, qui peut fixer les éléments organiques en suspension (Muzzarelli, 1997 ; Shigemasa et Minami, 1996).

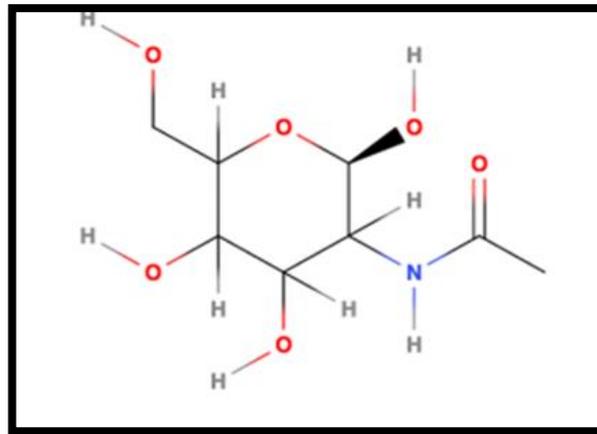


Figure 10 : Structure 2D de la N-Acetylglucosamine (Veliz *et al.*, 2017).

Dans la nature, la chitine peut être trouvée sous trois formes polymériques cristallines différentes : α -chitine avec des chaînes monomères antiparallèles (entre dans la composition structural des parois cellulaires de plusieurs champignons et l'exosquelette de divers invertébrés), la β -chitine avec des chaînes monomères parallèles et la γ -chitine avec une cellule unitaire à trois chaînes (figure 11) (Felse et panda 2000), la variance de disposition des chaînes polymères leur confère des propriétés mécaniques différentes. Divers chaînes gagnent leur résistance ainsi leur rigidité en se combinent avec d'autres polymères structuraux (tels que les protéines et les β -glucanes). Dans l'environnement, on constate que la chitine présente différents degrés de désacétylation, de la chitine entièrement acétylée à sa forme entièrement désacétylée (appelée chitosane) (figure 12). Cette molécule « chitine » est habituellement omniprésente dans l'environnement, dont sa dégradation a été largement étudiée en biochimie générale, biologie moléculaire, biogéochimie et écologie microbienne (Veliz *et al.*, 2017).

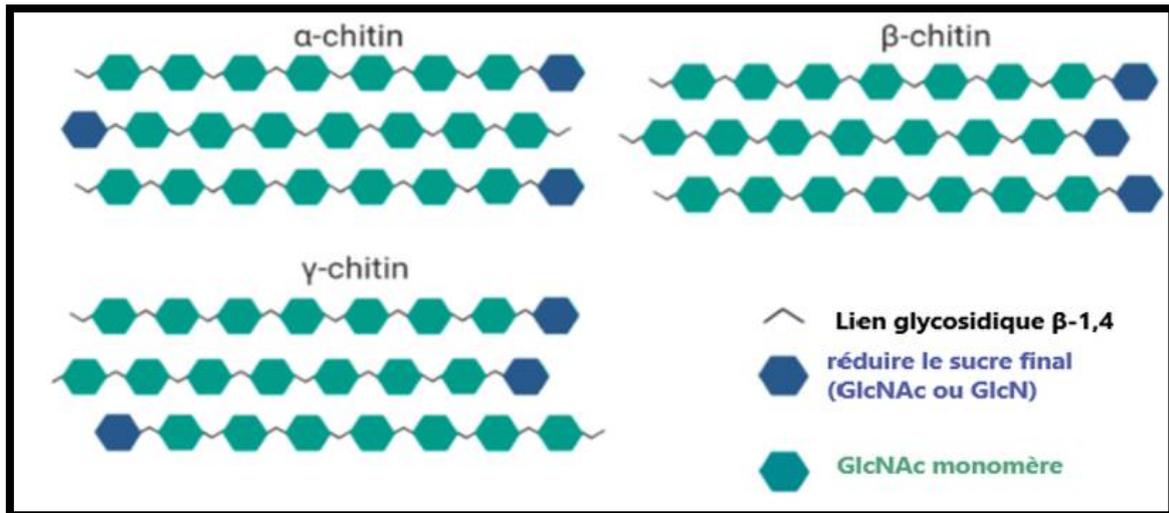


Figure 11 : Les formes polymériques de la chitine (Arnold *et al.*, 2020).

5.1. Propriétés de la chitine

C'est une masse blanche, amorphe, semi-transparente qui est insoluble dans les solvants courants tels que l'eau, l'acide, l'alcali, l'éthanol et d'autres solvants organiques, mais soluble dans HCl concentré, H_2SO_4 , acide acétique et acide phosphorique 78-97%. Les unités de base de cette substance sont liées entre elles par des réactions de condensation pour former de longues chaînes. Les liaisons hydrogène relient les chaînes et aident à rendre la chitine rigide et forte. La solubilité de la chitine est améliorée par une désacétylation partielle dans des conditions douces qui ne dégradent pas le polymère, augmentant ainsi la polarité et la répulsion électrostatique (V.K.Gupta *et al.*, 2016). La chitine est biocompatible et biodégradable et possède des capacités antibactériennes et cicatrisantes (Jolle et Muzzarelli, 1999). Elle a une structure cristalline hautement ordonnée et insoluble dans l'eau comme le suggèrent les études de diffraction des rayons X (Roberts, 1992).

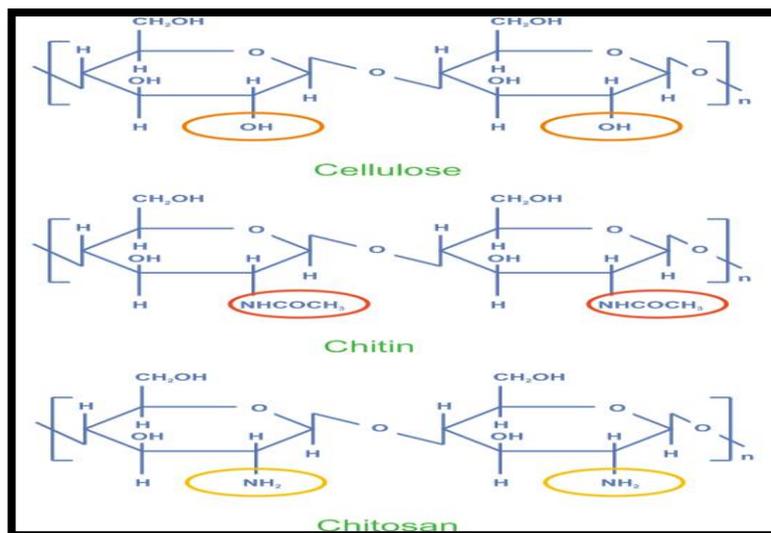


Figure 12 : La structure de la cellulose, de la chitine et du chitosane. Leurs structures diffèrent selon le groupe à la position C_2 (Nawrotek *et al.*, 2010).

L'une de ses nombreuses caractéristiques importantes est sa capacité à être facilement transformée sous différentes formes telles que fibres, coton, poudre, hydrogels, perles, éponges, films, flocons et membranes (Mano et Omori, 2007). Les propriétés et la disposition de la chaîne polymère de la chitine dépendante de son origine ; elle est analogue à la cellulose (figure 8) à la fois dans sa structure chimique et dans sa fonction biologique à quelques exceptions, cette molécule est un homopolymère linéaire de (1→4) résidus N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) β-liés ; tandis que, la cellulose est composée de monomères de glucose. La différence entre les résidus GlcNAc et le glucose est que le groupe hydroxyle est remplacé par le groupe acétyl-amino en position C-2. Généralement la chitine ressemble au polymère structurel murein, qui est constitué en une alternance de monomères de GlcNAc et d'acide N-acétylbéhénamique (Rinaudo, 2006).

5.2. Mécanisme de dégradation par la chitinase

Comme nous l'avons vu précédemment , La chitinase (EC 3.2.1.14) est un membre de la famille GH 18 et 19, qui catalyse l'hydrolyse des liaisons β-1,4 de la chitine et du chitogomère, Les clivages enzymatiques par la chitinase sont de nature aléatoire, à des emplacements internes sur toute la longueur du polymère, ce qui entraîne la production de multimères de GlcNAc solubles, de faible masse moléculaire, tels que le chitotétraose, le chitotriose et le chitobiose, (Bhattacharya *et al.*, 2007). Les organismes qui ne peuvent dégrader la chitine que par l'hydrolyse des liaisons glycosidiques sont considérés comme des agents

chitinolytiques ; Un terme plus large, «fragmentation de la chitine», ne spécifie pas le mécanisme. La meilleure approche de recherche est l'effet du système de décomposition de la chitine, c'est-à-dire l'hydrolyse des liaisons glycosidiques de la chitine. « L'exochitinase clive les unités diacétylchitobiose de l'extrémité non réductrice de la chaîne polysaccharidique. L'endochitinase clive les liaisons glycosidiques de façon aléatoire le long de la chaîne, donnant finalement du di-acétyl-chitobiose comme produit principal, ainsi qu'un peu de tri-acétyl-chitotriose » (figure 13) (Gooday, 1994).

Les familles GH 18 et 19 n'ont pas de similitude de séquence, ont des structures tridimensionnelles différentes et divers structures catalytiques. Sous différents mécanismes catalytiques, le β -anomérique est formé par la chitinase GH 18, mécanisme de contrainte, et l' α -anomérique est produit par la chitinase GH 19 (mécanisme de conversion) (Brameld et Goddard, 1998). De plus, selon leurs méthodes de clivage, les chitinases divisées en endochitinase et exochitinase (figure 13), L'endochitinase peut dégrader la chitine à partir de n'importe quelle position de la chaîne polymère pour former un produit de longueur aléatoire, tandis que l'exochitinase se sépare de l'extrémité non réductrice de la chaîne et que le produit libéré est (monomère de GlcNAc). Cependant, les propriétés enzymatiques de la chitinase sont plus complexes et polyvalentes que celles reflétées par la classification exo / endo (Seidl, V, 2008).

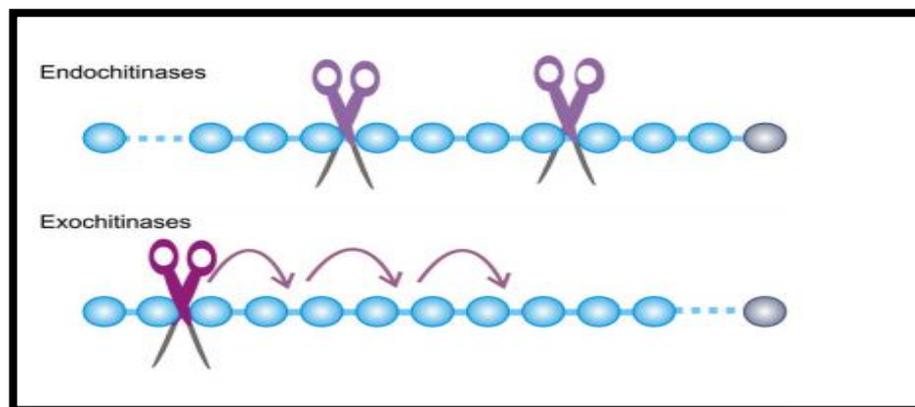


Figure 13 : Dessin schématique des modèles de clivage prédominants des enzymes chitinolytiques. Les sous-unités de la chaîne de la chitine sont représentées en bleu clair et le sucre terminal réducteur en bleu foncé (Seidl, 2008).

Chapitre II :
La lutte biologique

1. Historique

Au début du XXème siècle l'appellation "lutte biologique" a été proposée pour désigner toute méthode phytosanitaire mettant en œuvre un organisme vivant. Et C'est dernières années à cause d'un certain échec de la lutte chimique la lutte biologique connaît un regain de popularité. Malgré les bons résultats des traitements chimique à court terme mais à long terme représente un grand danger a l'environnement et les êtres vivants au contraire de la lutte biologique qui demande des connaissances profonde, beaucoup plus intéressante sur le plan environnemental et économique (Corbaz, 1990 ; Toussaint, 1996).

La lutte biologique, connue aussi par le "bio-contrôle" (Eilenberg *et al.*, 2001). Peut être définie comme l'utilisation d'agents vivants « ennemis naturels » pour lutter contre les organismes nuisibles ou pathogènes et leurs dégâts ; au biais des interactions écologiques entre les antagonistes et les agents pathogènes, comme la prédation, le parasitisme, l'herbivorie et parfois d'autres mécanismes naturels (Nafiu *et al.*, 2014), pour les éliminer ou les séparer de la culture, afin d'éviter leurs effets néfastes ou les pertes économiques sur l'agroécosystème. Il s'agit d'une méthode de lutte écologiquement rationnel ; et plus sûre et efficace pour l'environnement, dont la nature maintient le nombre d'organismes nuisibles à des densités plus faibles. Le bio-contrôle est activement appliquée depuis le développement du premier écosystème il y a quelque 500 millions d'années ; existant dans tous les écosystèmes, qu'ils soient naturels ou artificiels, c'est un moyen permanent mais implique généralement aussi un rôle actif de gestion humaine (Van Lenteren, 2012).

L'application de la lutte biologique peut être considérée comme une stratégie pour restaurer la biodiversité dans les agroécosystèmes par l'addition des antagonistes naturels (parasite ou prédateur) (Altieri, 1999 ; Nautiyal *et al.*, 2000). Le bio-contrôle met en jeu un ensemble d'agents d'origine biologique et de méthodes basées sur des interactions naturelles, on retrouve entre autres certains prédateurs, les parasitoïdes (insectes et arachnides) les parasites, les nématodes, des microorganismes antagonistes ou pathogènes (bactéries, champignons ou virus), souvent appelés " microbiens " ou " agents de bio contrôle microbiens ", tandis que les gènes ou les fragments de gènes sans organisme vivant sont exclus (Eilenberg, 2007). La lutte moderne contre les ravageurs dépend en grande partie de la lutte naturelle (biologique) (Van Lenteren, 2012) pour l'action bénéfique des prédateurs, par des méthodes non chimiques et respectueuses de l'environnement afin de contrôler des parasites (Van Driesche et Abell, 2008). Ces bénéfiques établis un programme de contrôle

réussi, car la lutte biologique est à son action spécifique sur les espèces et à son action à long terme sur les ravageurs cibles, contrairement à la lutte chimique où la résistance au pesticide se développe provoquant des effets néfastes sur la santé des êtres humains et polluent l'environnement, obligeant les producteurs à rechercher des stratégies de gestion alternatives (Van Lenteren, 2012).

Le bio-contrôle applique quatre stratégies de base dans la lutte biologique contre les ravageurs, bien que chacune est clairement séparée l'une de l'autre. À savoir : la lutte biologique classique (importation), Contrôle biologique de l'inoculation, contrôle biologique par inondation (augmentation) et bio contrôle de conservation.

2. Les stratégies du bio contrôle

2.1. Stratégies de lutte biologique classique CBC (Importation)

C'est la stratégie de base, sur laquelle s'est fondé le développement initial de la lutte biologique, où le contrôle de la cochenille des coussinets cotonneux avec scarabée *vedalia* à marquer le premier succès en Californie à la fin des années 1800. Suite à l'évolution et l'application précoce de cette technique elle a été qualifiée de "classique" (Eilenberg *et al.*, 2001).

La lutte classique, ait referens sur le principe écologique basé sur l'hypothèse de " la libération de l'ennemi" il offre également une possibilité inégalée pour étudier la biologie des organismes introduits (Omkar et Kumar, 2016). Cette approche consiste, à apporter et à relâcher délibérément de nouvelles espèces étrangères, qualifié en tant que ennemis naturels/auxiliaires spécifiques (Van Driesche et Abell, 2008) , généralement Co-évolué de d'autre sources dans une nouvelle zone où ils ne sont pas présents naturellement (Fischbein et Corley, 2014), afin de limiter en permanence (supprimer définitivement) les populations envahissantes des ravageurs, y compris dans le cadre de systèmes de lutte intégré à long terme (Shah et Pell, 2003).

Généralement, le ravageur et l'ennemi naturel sont tous deux d'origine étrangers, Cette forme de lutte biologique appelée "importation" par Nordlund (1996) ; convient lorsque des nouveaux organismes, qui se propagent sont introduits accidentellement dans une région autre que leur aire de répartition naturelle, et deviennent des agents pathogènes à cause de l'absence leurs ennemis naturels (Omkar et Kumar., 2016). Les agents de contrôle biologique sont estimés pour leur degré de spécificité vis-à-vis de l'hôte a éliminé de manière que d'autres

espèces ayant une valeur écologique ou commerciale « espèces indigènes, cultivées » soient protégées. Ces antagonistes sont ensuite relâchés dans l'environnement, après leur estimation au sein des populations de l'envahisseur, sur la base de preuves claires de la capacité à contrôler la cible et à coloniser naturellement le milieu (Amsellem, 2007).

L'exploration étrangère est un terme utilisé pour décrire la quête, la recherche d'ennemis naturels dans d'autres sources / régions. Le procédé d'importation implique :

- 1- Estimation du problème ; et l'identification de l'organisme nuisible, et sa niche d'origine comme étant d'origine indigène ou étrangère.
 - 2- Discerner les ennemis naturels adéquats, liés aux espèces indésirables (ravageurs) ou aux espèces étroitement apparentées ; comme cibles potentielles d'un voyage de collecte
 - 3- Les espèces choisies comme ennemis naturels sont ensuite expédiées vers une installation de quarantaine et évaluées de façon que les agents pathogènes ou les hyperparasitoïdes indésirables seront éliminés de façon permanente.
 - 4- Produire, et relâcher l'ensemble des agents de lutte biologique sélectionnés (ennemis), dans le but de couvrir l'aire de répartition du ravageur.
 - 5- Surveiller l'établissement du ou des agents de lutte biologique "ennemis", évaluer son impact sur la population de ravageurs et tester les avantages et leurs effets à long terme de sa présence (Sanda et Sunusi, 2016).
- Les ennemis naturels utilisés dans la lutte biologique classique :

En CBC, un ou plusieurs auxiliaires spécifiques naturels des ravageurs sont choisis comme agents de contrôles biologiques probables. Il peut s'agir de (Kenis *et al.*, 2019).

- 1- Micro-organismes, notamment : telle que les champignons, en particulier les rouilles, pour les mauvaises herbes ; les virus pour les vertébrés.
- 2- Les invertébrés comme prédateurs ou parasites (par exemple, les guêpes parasitoïdes principalement contre des insectes des ordres des diptères et des hyménoptères). Ainsi pour lutter aussi contre les mauvaises herbes, les arthropodes herbivores d'un large éventail de groupes peuvent être aussi utilisés comme ABC (Sheppard *et al.*, 2020).

2.2. Augmentation de la lutte biologique

Cette stratégie repose sur des activités, au sein duquel les populations d'ennemis naturels sont augmentées à un nombre suffisant pour un contrôle rapide mais à court terme d'un ravageur ; afin de maintenir sa population en dessous des niveaux envahissant (Orr, 2009).

Généralement elle est utilisée pour lutter contre les insectes nuisibles et les acariens, (mais pas les mauvaises herbes), dans les serres ou les cultures extérieures en achetant et en libérant des ennemis naturels de la reproduction commerciale (élevé commercialement). La valeur de cette méthode dépend de l'efficacité et du coût des antagonistes qui peuvent être des prédateurs et des parasitoïdes (Van Driesche et Abell, 2008). Dans certains cas elle est fondée sur la connaissance ou l'hypothèse que, même si le contrôle idéal ne peut pas être assuré par le nombre insuffisants d'ennemis naturels, mais les lâchers d'auxiliaires sont destinés à compléter un complexe établi (et le contrôle amélioré). Cela dépend de l'efficacité des laboratoires de production en masse d'un nombre convenable d'ennemis naturels ou sur la capacité des entreprises à les produire et à les vendre (Sanda et Sunusi, 2016).

La lutte biologique augmentative est habituellement basée sur éléments suivant :

- 1- La production abondante de manière augmentative d'un ou de plusieurs ennemis naturel ABC ; et ses aspects économiques.
- 2- L'impact de ABC libéré le long de la chaîne de production, sur la densité de population d'un/des ravageurs cibles sur le terrain, avec l'écologie et la dynamique des populations de l'ennemi et de son hôte ou de sa cible a éliminé,
- 3- Les aspects économiques de la lutte antiparasitaire, et de la production végétale dans les produits de base liés à l'élaboration de plans de bio control durables dans des zones géographiques spécifiques (van Lenteren, 2012).

On distingue généralement deux formes de lâchers d'ennemis naturels en augmentation : les lâchers inondatifs et les lâchers inoculatifs (Amsallem, 2007) :

2.2.1. Libération par inondation

La méthode de lâcher inondatif est similaire à la lutte biologique classique, mais nécessite une approche répétitive de la libération des lâchers tout au long de la période de culture. Elle utilise des parasites naturels élevés en grand nombre ou développés commercialement ; c'est-à-dire les ABC "pesticide biotique" sont (périodiquement) lâchés dans l'environnement a contrôlé. Ceci s'agit d'une mesure corrective dont le résultat attendu est le contrôle immédiat des espaces envahissantes à court terme (Amsallem, 2007). Bien entendu, afin d'assurer le

contrôle et limiter les niveaux de dégâts, les agents de bio contrôle introduits doivent entrer en contact avec un nombre suffisamment élevée de ravageurs pour inonder sa population, et l'éliminer ; ces agent sont colletés et appliquées, souvent aux cultures à court terme à cause de l'absences de la populations viables et reproductrices des antagonistes dans l'habitat fourni par la monoculture temporaire. De plus, lorsque le seuil de dommage est bas et qu'un contrôle rapide est nécessaire aux premiers stades de l'infestation par les ravageurs, la libération des inondations est appropriée (Hajek, 2004 ; Van Lenteren et Bueno, 2003).

Plus de 150 d'auxiliaires indigènes ou cosmopolites ont été formulés à partir d'organismes vivants pour prévenir et lutter contre les insectes, des phyto-pathogènes ou des mauvaises herbes : "les champignons (myco-herbicides) ; les bactéries (*Bacillus thuringiensis*, Bt) ; les virus ou les nématodes. Parfois la lutte biologique inondative utilise des ennemis naturels pour anticiper l'infection ou l'occurrence de la cible sur une plante cultivée (René, 2007).

2.2.2. La méthode de libération inoculative

L'inoculation, quant à elle, seul un nombre relativement limité (petit nombre) d'organismes utiles est libéré. Où la possibilité de la présence continue d'auxiliaire spécifique dans les cultures de plein champ, est garantie ; au moyen d'application contrôlée de cette stratégie (Van Lenteren et Martin, 1999). Il s'agit d'un contrôle à long terme, assuré non seulement aux les agents relâchés eux-mêmes mais aussi à leur descendance. Cette méthode est plus autonome que libération par inondation ; dans le cadre de bio-contrôle inoculative, les micro-organismes libérés sont habituellement conçus pour se multiplier dans les micro-habitats où ils sont relâchés auquel ils sont important pour coloniser les racines, les plaies, etc ; pour lutter contre les phytopathogènes ou la protection des sites d'infection potentiels (Hajek, 2004).

Le résultat attendu des libérations d'inoculateurs, est de sa capacité à se multiplier et à réduire la population envahissante (c'est-à-dire le maintenir à un faible niveau), afin d'éviter ses dommages économiques ; il s'agit donc plutôt d'une mesure préventive qui dépend en grande partie de la régulation des populations et des processus liés à la densité.

- La seule différence entre l'inoculation et l'inondation est ; dans une inoculation l'organisme lâché éliminera la cible envahissante, qu'après sa multiplication (Sanda et Sunusi, 2016).

- il existe aussi, la méthode de lâcher inoculatif saisonnier, où un nombre modéré d'agent de bio-contrôle « ennemis » est lâché périodiquement dans les cultures afin d'assurer à la fois un effet de immédiat et un effet secondaire ; où se produisent généralement de nombreuses générations de parasites pour un contrôle ultérieur tout au long de la saison jusqu'à la récolte (Van Lenteren et Martin, 1999).

2.3. Contrôle biologique de conservation

Cette stratégie est complètement différente des trois méthodes précédentes de bio-contrôle. Aucun organisme n'est introduits dans un nouvel environnement, Seuls les organismes préexistants sont amélioré et maintenus dans le but d'éliminer les espaces nuisibles et leurs dégâts (Eilenberg, 2006). La conservation implique la gestion de l'environnement ; (par manipulation, modification de l'habitat) afin d'encourager, et de protéger les populations d'auxiliaires spécifiques des ravageurs ; en évitant ou encore en limitant les risques ou les facteurs environnementaux défavorables, comme les pratiques culturales incompatibles, les effets néfastes des pesticide et d'autres facteurs physiques ou biotiques défavorables. L'une d'elles consiste souvent à protéger, ou augmenter en masse les populations existantes d'EN (Van Lenteren, 2012). Les mesures de protection peuvent être divisées en plusieurs catégories : « celles qui visent à réduire la mortalité, à fournir des ressources supplémentaires, à contrôler les ennemis naturels secondaires ou à manipuler les attributs des plantes hôtes au profit des ennemis naturels ». Elle implique :

2.3.1. La gestion et conservation de l'habitat

La manipulation de l'habitat peut être classée comme un sous-ensemble des façons de bio-contrôle par conservation qui implique la modification de l'habitat au niveau de la culture, de l'exploitation ou du paysage, pour favoriser les conditions et les ressources exigés par les ABC, de manière qu'ils peuvent acquérir des aptitudes optimales. La biologie de certains EN, ainsi les qualités de l'environnement dont ils évoluent sont liées directement à la manipulation de l'habitat qui découle de l'idée que les paysages agricoles souvent ne peut pas couvrir les exigences des agents de bio-contrôle au moment ou à l'endroit optimal (Landis *et al.*, 2000).

2.3.2. Mise à disposition des ressources : Le court terme et le long terme

La lutte naturelle de conservation peut prendre de nombreuses façons dans le but de diminuer les conditions indésirables. Comme, les ressources nutritionnelles qui peuvent être pulvérisée au bon moment afin de compléter les systèmes agricoles qui manquent de pollen et de nectar qui fournissent des un habitat adéquat et des ressources similaires et

fructueuses aux EN pendant toute la saison, et pour les prochaines années; ces derniers sont initialement absentes dans les systèmes de production agricole conventionnels. Les agents de luttés biologiques sont censés s'améliorer et, simultanément, maintenir les populations des organismes nuisibles en deçà des niveaux envahissantes, avec le placement soigneux des applications d'insecticides. Néanmoins ; l'augmentation (Landis *et al.*, 2000) de la population des agents spécifiques de contrôles contre les agresseurs, au moyen de régulation agro-écosystémique ; estime que l'abondance des ennemis naturels est influencé par la diversité des plantes (nectar, le pollen), qui augmentent la prédation, le parasitisme ou le rendement à un taux plus élevés, entraînant la régulation des populations des ravageurs nuisibles (Cloyd, 2020).

3. Agents de contrôle biologique

Les agents de contrôle biologique ACB appelés aussi ennemis naturels EN ce terme s'applique à l'utilisation d'antagonistes pour limiter les dommages des ravageurs en dessous des niveaux envahissants, généralement du point de vue économique afin d'assurer la suppression de la population des organismes pathogènes (Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

Ce terme réfère habituellement aux agents les plus efficaces, qui doivent présenter certains caractéristiques tels que : ils doivent s'adapter aux modifications des conditions physiques environnementale, une grande spécificité pour son organisme ciblé/proie, une capacité importante de reproduction par rapport aux agents pathogènes ; ils doivent aussi être capable de survivre en l'absence de leurs proie, ainsi de se synchronisé saisonnièrement avec son paroi et changer leur mode action selon sa propre densité et de celles des ravageurs. Ils sont classés en deux catégories (Sampaino *et al.*, 2010) :

3.1. Les entomophages

Appelé aussi les Insectivores ; ce terme est employé pour qualifier tous les animaux qui se nourrissent d'insectes, et peuvent être impliqué dans le contrôles des populations d'insectes, on peut trouver les oiseaux, les grenouilles et les lézards ; mais dans les systèmes agricoles, ces principaux agents de bio-contrôles des acariens ou d'insectes sont généralement d'autres insectes et acariens (prédateurs, parasitoïdes, les parasites) (Sampaino *et al.*, 2010) qui continuent de susciter l'intérêt pour leur biologie fondamentale . Au cours de ces dernières années, notre compréhension de la nutrition de ces insectes a beaucoup augmenté. Cela est synchronisé avec apparition d'une vision écologique unifiée de la nutrition (toute fois, appelé

écologie nutritionnelle), elle est basée sur la relation entre la nutrition, l'écologie, le comportement et la physiologie pour mieux comprendre les habitudes alimentaires et les besoins nutritionnels de ces EN, pour un contrôle biologique efficace (Thompson, 1999).

a. Prédateurs

Les insectes prédateurs qui tuent et se nourrissent à plusieurs proies individuelles au cours de leur vie (d'autres insectes) comme les pucerons, telle que les chrysopes, les coccinelles (figure 14) et les mantides religieuses. Coléoptères (ordre des coléoptères) : Coccinellidae (coccinelles), Carabidae (carabes) et Cicindellidae (cicindèles) sont les familles de prédateurs les plus remarquables (Sanda *et al.*, 2016).

b. Parasitoïdes et les parasite

Le terme parasite ; désigne les insectes qui parasitent d'autres insectes et ne les tuent pas. Ils sont connu généralement par un cycle de vie court, et leurs petites tailles par apport à leur hôte (exemple : les ténias et les tiques). Alors qu'un parasitoïde, c'est des organismes de même taille que l'hôte, qui peuvent se développer sur ou au sein d'un seul hôte, afin que les larves de parasitoïdes finiront par tuer, souvent consommer, leurs hôtes pour compléter leur stade de cycle de vie ; La forme adulte a une vie libre (un insecte libre), indépendantes de sa hôte. La plupart des parasitoïdes appartiennent aux ordres des Hyménoptères ou des Diptères. De même, un exemple de parasitoïdes : les parasitoïdes de l'œuf qui attaquent et achèvent leur développement au sein des œufs d'un hôte, *Trichogramma Spp* est souvent le plus utilisé dans les pays développés telle que la Chine et les États-Unis, pour éliminer la pyrale du maïs dans les exploitations agricoles (Sanda *et al.*, 2016).

3.2. Les agents entomopathogènes / Les Pathogènes

Les agents pathogènes naturels commercialisés comme pesticides biologiques microbiens, sont des micro-organismes, dont certaines bactéries, des champignons, des nématodes, des protozoaires et des virus (appelés entomopathogènes), qui sont largement utilisés pour contrôler les ravageurs sans nuire aux autres organismes utiles (les abeilles, les vers à soie et les agents entomophages (prédateurs et parasitoïdes). Ce type de recherche a débuté au Brésil il y'a quelques ans. Outre en raison de l'augmentation du nombre de chercheurs travaillant dans ce domaine, le nombre de progrès potentiels dans la lutte antiparasitaire a augmenté, avec une volonté de réduire économiquement la densité de populations envahissantes (Sampaino *et al.*, 2010). Les entomopathogènes, sont parmi les plus importants dans la lutte contre les insectes nuisibles. L'interaction étroite entre organismes

pathogène et son hôte (organismes a éliminé) est caractérisée comme un système biologique hautement dynamique ; par conséquent, ces agents pathogènes sont connus par leurs capacités à infecter et tuer les organismes nuisibles ; et souvent appliqués contre les populations de certains pucerons, chenilles, acariens et autres invertébrés, généralement dans des conditions comme les périodes prolongées d'humidité ou des populations élevées de ravageurs (Sanda *et al.*, 2016), dont les changements physiologiques surviennent chez l'organismes hôtes (pathogènes) après l'infection. Ces types d'infection diffèrent selon agents impliqué dans le bio-contrôle, et provoquent généralement des « perturbations dans le tégument, dans les systèmes circulatoire, digestif, reproductif, respiratoire, nerveux et d'excrétion ». En outre, les agents pathogènes microbiens des insectes ont développé un large éventail de stratégies pour surmonter les formidables systèmes de défense que les insectes, à leur tour, continuent d'évoluer afin de repousser de telles tentatives d'infection. L'efficacité sur le terrain de l'agent entomopathogènes dépend de la qualité et la quantité de l'inoculum, le substrat où EN est sélectionné pour un bio-contrôle, le rayonnement solaire, la température et l'humidité (Sampaino *et al.*, 2010).

En plus de contagion naturelle, il existe des agents de bio contrôle microbiens commercialisé comme ennemis naturelle tell de *Bacillus thuringiensis* ou B.t, des nématodes entomopathogènes et des virus de la granulose. Les EN microbiens, ou les entomopathogènes sont employés comme des facteurs de contrôles importants contre les ravageurs dans les cultures en ligne et en jardins, les plantes décoratifs, les prairies, le gazon et les pelouses, les produits entreposés et la foresterie, ainsi que pour la suppression de la population d'insectes envahissantes et vecteurs d'importance vétérinaire et médicale. La méthode de lutte microbienne importe de nombreux avantages ; elle assure la sécurité pour les humains aussi pour les organismes non ciblés, la diminution des traces de pesticides dans les aliments, le maintien de d'autres organismes de contrôle et l'amélioration de la biodiversité dans les écosystèmes dirigé (Sanda *et al.*, 2016).

a. Les nématodes entomopathogènes

Les nématodes aussi bien bénéfiques que néfastes, appartenant aux familles Steinernematidae et Heterorhabditidae, c'est des vers rond simple, et incolore utilisés (doit être produit en masse) comme bio pesticides pour lutter contre les populations d'insectes nuisibles dans une variété d'agroécosystèmes, avec des effets bénéfiques sur le rendement agricole. Les nématodes (EPNs) sont appliqués en contrôle biologique en utilisant des méthodes in vivo avec des cultures dans des insectes hôtes vivants. Ou in vitro appelé aussi

culture solide in vitro, qui implique la culture des nématodes sur de la mousse de polyuréthane émiettée (Koppenhöfer *et al.*, 2020 ; Sampaino *et al.*, 2010).

b. Les bactéries

Ce sont les agents de contrôle biologique les plus commercialisés ; actuellement 3 espèces bactériennes sporulées sont impliquées dans le bio contrôle, citant quelques-unes : *Bacillus popilliae* Dutky contre les larves de *Coleoptera scarabaeid* ; aussi *Bacillus thuringiensis*, et *var. kurstaki* (larves de Lepidoptera). L'accent a surtout été mis sur l'espèce *B. thuringiensis* (environ 30 sous-espèces et plus de 700 souches ont été isolées). Les bactéries sont les plus recommandées que les virus pour leur exigence limitée, et facile à être cultivé dans des milieux de fermentation et généralement ne nécessitent pas la culture coûteuse d'insectes hôtes vivants (Irtwange, 2006).

c. Les virus

Moins seize familles de virus ont été signalées comme des agents pathogènes des insectes. Baculoviridae ont fait l'objet d'essai d'utilisation commerciale pour leur grande capacité de provoquer des infections mortelles et des maladies chez les insectes. Les insecticides formulés de baculovirus ont été requis comme des candidats efficaces, et appliqués à spectre exigü (parfois limitées à une ou deux espèces), et spécifiques à une espèce dans une large échelle de situations comme des forêts et des champs ; sans effet négatif sur les plantes, les animaux ou même les insectes non ciblés, ce qui les rend très adaptés à une utilisation dans des programmes de lutte intégrée (Abd-Alla *et al.*, 2020 ; Corbaz, 1990).

d. Les champignons

Les champignons entomopathogènes (EPF), un large groupe de micro-organismes qui sont devenus une composante majeure de la lutte intégrée contre les ravageurs et font partie intégrante des myco-insecticides en agriculture. Ces agents de bio-contrôles fongiques ont été parmi les premiers organismes à être utilisés pour le contrôle biologique des nuisibles. Ils sont considérés comme des EN efficaces, qui peuvent éliminer, et lutter spécifiquement contre un large éventail d'insectes, arthropodes et les champignons phyto-pathogènes ; ainsi d'importants régulateurs des populations d'insectes. Les agents pathogènes des nuisibles ont évolué dans la plupart des principales lignées fongiques. Environ 80% des maladies qui surviennent chez les insectes ont un champignon comme agent causal. Pratiquement tous les insectes sont sensibles à certaines des maladies causées par ces champignons, qui peuvent entraîner la mort (Knols *et al.*, 2010).

Les entomopathogènes fongiques constituent un groupe de grand intérêt pour la lutte biologique contre les ravageurs, De même le bio-contrôle des cultures avec des champignons entomopathogènes, présente de nombreux avantages par rapport à la lutte chimique, un rôle clé dans le programme de gestion permanente des espèces nuisibles ; ils sont de cout minime, très comptent, sans aucun risque pour les espèces bénéfiques, limitent les résidus dans l'environnement et améliorent la production des cultures gérés par l'homme. Le premier processus d'infection par les champignons entomopathogènes est médiée par la force mécanique, les processus enzymatiques et peut-être certains acides métaboliques. Les enzymes impliquées dans la pathogénèse des ravageurs sont généralement regroupées en protéases et chitinases et lipases (Knols *et al.*, 2010).

Contrairement ; aux bactéries, et aux virus leurs mode de contagion est unique, ils peuvent infecter leur cible directement via la cuticule, sans pénétration par l'ingestion de propagules infectieuses. Par conséquent ces agents fongiques sont capables d'infecter des mailles non alimentaires telles que les œufs, les pupes d'insectes. Les spores et les conidies sont le plus souvent attachées à la cuticule des insectes hôtes (Sanda *et al.*, 2016 ; Skinner *et al.*, 2014).

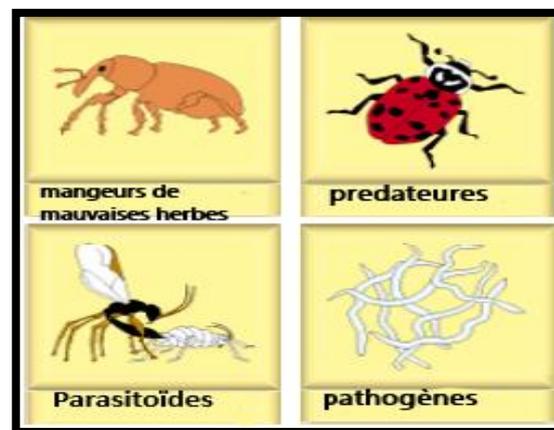


Figure 14 : Quatre types d'ennemis naturels pour la lutte biologique (Irtwange, 2006).

Comme il a été cité précédemment, les agents de contrôles microbiens (ABCM) sont largement appliqués aux cultures pour le contrôle biologique des agents pathogènes des plantes. Habituellement isolés des insectes et autres organismes invertébrés, (les bactéries, les virus et les champignons, les rickettsies, les protozoaires et les nématodes), afin de protéger les cultures des dommages causés par les maladies via une gamme de modes d'action. Ces EN

entomopathogènes ont développé un potentiel pour les programmes de bio contrôle c.à.d la lutte biologique microbienne ; et certains entre eux sont utilisées pour la réduction des insectes envahissantes au moyen de production inoculative et inondative, augmentative ; quant à les organismes viraux, ils ont rapportés des succès prodigieux comme agents de lutte classique (Kaya et Lacey, 2000).

4. Les champignons entomopathogènes

Les chercheurs sont au courant des maladies fongiques des insectes depuis 1834, lorsque l'italien Agostino Bassi a expliqué la nature fongique de la maladie de la muscardine blanche du ver à soie (figure 15). En effet les champignons utilisés comme agents de lutte biologique, n'est en aucun cas une idée nouvelle, elle a été proposé en 1874 par Pasteur et l'Américain Le Conte. Après quelques années les champignons ont été produits pour la premières fois en grandes quantités *Metarhizium anisopliae* par Metschnikoff (1879) et Krassilstchik (1888). Au cours des 10 à 15 dernières années, en raison de l'émergence de la résistance aux produits chimique, les pesticides ne sont plus utilisés pour lutter contre les ravageurs cibles, ce qui a suscité un grand intérêt. En raison d'une forte pression de sélection, la propagation de la résistance aux traitements chimiques a conduit à une demande croissante de pesticides. En outre, une mauvaise utilisation des pesticides donne naissance à d'autres problèmes, comme des effets néfastes sur l'environnement et la santé, la sécurité. Les champignons entomopathogènes constituent un système unique de lutte contre les insectes en agriculture dont le marché est en pleine expansion, ainsi qu'un modèle important pour l'étude des interactions hôte-pathogène, car ils présentent une grande capacité de pénétration directe de la barrière cuticulaire sans être intégrés, ils ont un effet de contrôle naturel significatif sur les populations d'insectes dans des conditions environnementales favorables, mais les épidémies ne surviennent généralement que lorsque les populations de ravageurs sont élevées. Cependant, le but de l'utilisation de champignons est d'empêcher la population d'organismes nuisibles d'augmenter à des niveaux envahissants grâce à l'utilisation artificielle de propagules fongiques (Hall et Papierok, 1982).

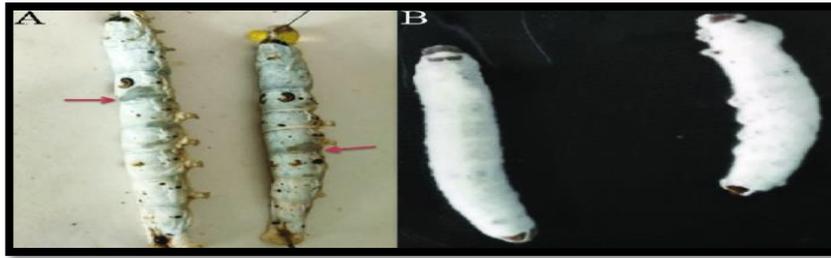


Figure 15 : Symptômes des larves de vers à soie infectées par *B. bassiana*. A : Des taches imbibées d'huile sont apparues sur la cuticule (flèche rouge) ; B : Ver à soie mort momifié recouvert d'hyphes et de conidies, donnant l'aspect typique de la muscardine blanche (Li *et al.*, 2019).

4.1. Classification des champignons entomopathogènes

La majorité des champignons qui sont soumis à une détérioration des insectes font partie de la famille des Entomophthoraceae (Van Driesche et Bellows, 1996). Dans les divisions de Zygomycota, Ascomycota et Deuteromycota et Chytridiomycota et Oomycota, classées précédemment dans les Fungi. Actuellement de nombreux genres d'agents fongiques ont été sélectionnés comme ABCs efficaces contre les ravageurs, et font partie de la classe des Entomophthorales dans le Zygomycota, ou de la classe des Hyphomycetes dans le Deuteromycota (Shah et Pell, 2003).

Les ABCs fongiques est un large groupe variée de champignons naturels perçus comme étant très respectueux de l'environnement, et offrent une alternative aux pesticides chimiques avec une spécificité de cible. *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma virens*, *Beauveria bassiana*, *Nomuraea sp.*, *Verticillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces spp*, (figure 16) sont quelque principaux espèces présents dans la rhizosphères et utilisées comme des agents de bio contrôles efficace contre plusieurs insectes nuisibles et de phyto-pathogènes (Baron *et al.*, 2019 ; Van Driesche et Bellows, 1996).

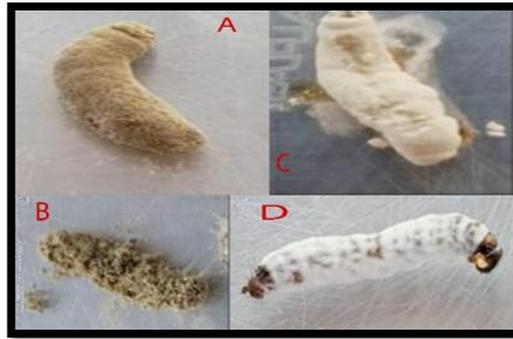


Figure 16 : *Diatraea saccharalis* colonisé par *B. bassiana* (C et D), *M. anisopliae* (A et B) (Baron *et al.*, 2019).

a. Les moisissures

Les champignons filamenteux ou un champignon entomopathogène sont très utilisés pour leurs capacités d'agir comme des parasites d'insectes afin de les tuer ou les infecter, aussi pour contrôler certaines mauvaises herbes ; c'est des agents de mortalité naturels spécifiques à l'hôte, qui provoquent des infections fatales à l'organisme cible, et avec moins de risque à l'environnement et d'autres organismes ou insectes utiles. Ces champignons infectent leurs hôtes au moyen de pénétration à travers l'exosquelette ou la cuticule de l'hôte, en pénétrant dans l'hémolymphe, par production de toxines ou de enzymes hydrolytiques telles que les chitinases, généralement en se développant dans l'hémocèle avec les nutriments afin d'empêcher les réponses immunitaires des insectes. Généralement les champignons filamenteux utilisés sur terrain pour lutter contre les maladies des plantes sont appliqués sous forme de conidies ou de mycélium sporulant pour un contrôle biologique efficace. Les principaux agents fongiques de bio contrôle sont mentionnés dans la (Figure 17) (Mousumi et Abdulhamee, 2020).

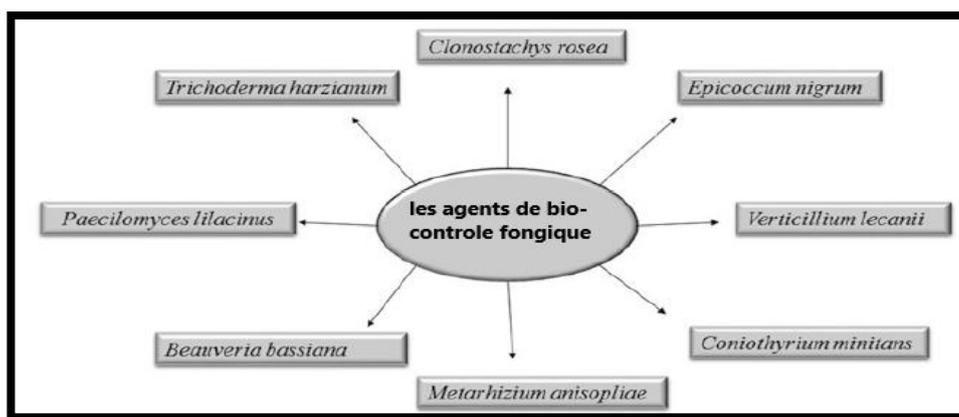


Figure 17 : Importantes ABC fongiques (Mousumi et Abdulhamee, 2020).

il a été mentionné que le génome des champignons filamenteux comporte des chitinases impliqués dans diverses fonctions physiologiques, comme la dégradation de la chitine dans les parois cellulaires des champignons ou dans les exosquelettes des arthropodes pour couvrir leur besoin en nutriment ; le remodelage des parois cellulaires pendant la croissance des hyphes, la ramification, la fusion des hyphes, l'autolyse et la compétence ; également, aussi comme moyen de protection contre d'autres champignons de même habitat écologique (Mondal *et al.*, 2016).

b. Les levures comme agents de lutte biologique

Malgré leurs impacts intéressants comme eucaryotes modèles pour les utilisations biotechnologiques et en mycologie médicale, Les levures, sont particulièrement décrites autant que puissants antagonistes de plusieurs agents nuisibles des plantes pour leur capacité antagoniste, et sont généralement facile à produire avec des risques de biosécurité limités (Shivaji et Prasad, 2009). Dans les maladies pré ou post-récolte (figure 18), le contrôle des organismes pathogènes par les levures a été largement démontré, par leur capacité intéressantes à envahir rapidement la surface des légumes, fruits, et à maintenir leur viabilité à long terme dans différentes conditions environnementales (Pimenta *et al.*, 2009).

Divers groupes de levures ont été isolés de l'intérieur de tissus vivants de plusieurs plantes et profités en tant qu'endophytes des végétaux, dont certains d'entre eux favorise leur croissance. Ces EN sont des colonisants communs des surfaces des feuilles, des fruits de l'écorce, des flowers, des fluxes visqueux, des tissus nécrosés, des liqueurs tannantes de diverses plantes, ainsi que du sol et de la rhizosphère. Ils sont avantageusement exploitées

comme agents de lutte biologique et promoteurs de croissances des plantes, pour leur capacité à se multiplier rapidement, à produire des métabolites (ATB et des enzymes) décomposant la paroi cellulaire et ; à produire des facteurs contrôles de croissance des plantes. Ils font référence aux levures ou aux champignons de type levure qui peuvent inhiber ou interférer avec la croissance, le développement, la reproduction ou l'activité des phytopathogènes présents dans le sol, (généralement les champignons décomposant des fruits et légumes frais) (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006). Les levures antagonistes sont susceptibles de fonctionner via de multiples mécanismes, y compris la compétition pour les nutriments et l'espace, le mycoparasitisme, l'induction de la résistance de l'hôte, la production de composés organiques volatils (COV) et de toxines ; avec la sécrétion d'enzymes telles que les enzymes chitinolytiques. La capacité de dégradation de la chitine a été signalé chez des levures lutte biologique des genres *Aureobasidium*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Tilletiopsis*, et *Wickerhamomyces* et comme chez *Saccharomycopsis*. Cette activité a été détectée en présence de cellules des champignons phytopathogènes (Freimoser *et al.*, 2019).

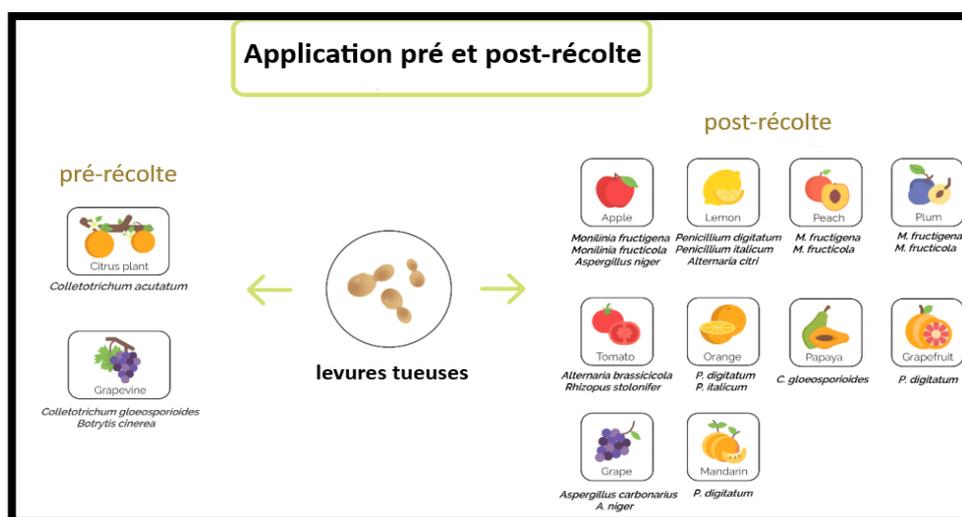


Figure 18 : Applications de levures tueuses en agriculture pour prévenir les infections fongiques. Les levures tueuses ont été utilisées pour les traitements avant et après récolte (Díaz *et al.*, 2020).

4.2. Mécanisme du bio contrôle médié par les champignons

Le mécanisme d'action dans contrôle biologique, c'est la stratégie adoptée par un micro-organisme bénéfique contre un organisme nuisible provoquant des maladies (Irtwange, 2006), elle repose sur les interactions écologiques entre ces organismes comme la compétition pour l'habitat ou les nutriments, l'induction de défenses végétales, l'antibiose et le mycoparasitisme (Jamalizadeh *et al.*, 2011)

Les champignons dépendent d'un ou d'une combinaison de divers mécanismes afin d'empêcher l'infection ou supprimer la population des insectes envahissantes et des mauvaises herbes (Savita et Sharma, 2019), les champignons fonctionnent soit, sans contacte antagoniste directe avec les pathogènes (figure 19). Où elles entre en interaction indirectes avec l'organisme nuisible via le déplacement compétitif qui décrit I) la compétition pour les nutriments et la zone disponible (Singh *et al.*, 2020).

Comme ils peuvent adapter aussi une approche directe, ou ils interagissent avec les ravageurs au moyen d'un mécanisme d'hyper-parasitisme ou d'antibiose. II) L'antibiose implique la production d'enzymes antimicrobiennes ou quelques métabolites (Singh *et al.*, 2020). Il peut également s'agir d'une influence mutuelle où cette interaction est nocive pour au moins l'un d'entre eux, c'est une association entre des métabolites produits par les champignons antagoniste (composés antimicrobiens) et un autre organisme pathogène pour inhiber leur croissance, ces champignons sont capables de sécréter un ou plusieurs composés et métabolites secondaires ayant une activité antibiotique. Exemple : *Trichoderma* (*T. virens* qui produit deux ABT-ATF : gliotoxine et la gliovirine) et *Gliocladium spp.* III) Antagonisme direct (ou Hyper-parasitisme), une autre forme d'interaction directe avec le ravageur a éliminé (Ahanger *et al.*, 2014).

Les champignons appelés myco-parasites sont généralement des parasites d'autres champignons ; ils jouent un rôle important dans la lutte contre les maladies où l'organisme nuisible est directement attaqué par un EN spécifique qui le tue ou tue ses propagules. Le mycoparasitisme est un processus fatal par lequel les champignons de bio-contrôle peuvent attaquer des champignons pathogènes ; qui implique quatre étapes, ils commencent par une croissance « chemotrophic » dont les ABCs fongique se développent par tropisme vers les champignons hôte qui synthétisent des stimuli chimiques, ces dernier sert de chimio-attracteur pour les pathogènes, exemple une substance volatile ou hydrosoluble produite par les champignons cibles. Ensuite l'étape de reconnaissance, cette interaction spécifique peut être

réalisée par les lectines d'hôtes et les récepteurs d'hydrates de carbone à la surface des myco-parasites. Avant l'étape finale les EN fongique s'attachent et dégradent la paroi cellulaire, soit en s'enroulant autour des hyphes de l'hôte, soit en impliquant un développement à ses côtés, généralement ces ABCs fongique produit des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire pour éliminer le champignon pathogènes. Exemples de ces enzymes : les chitinases et la b-1,3-glucanase qui agissent ensemble contre les ravageurs sous forme de composants de mélanges complexes de protéines synergiques, comme ils peuvent être impliqués dans la dégradation des parois cellulaires de l'hôte. La dernière étape est la pénétration. Le champignon de bio contrôle produit des structures « appressoria-like » pour pénétrer la paroi cellulaire du champignon indésirable (Ahanger *et al.*, 2014).

Un autre mode de bio contrôle des plantes est suivi par les champignons pour lutter contre les agents pathogènes, Résistance induite (RI) ce mécanisme limite le développement et la propagation de l'organisme pathogènes via des enzymes secrétés comme mode de défense telle que les chitinases, les protéases et les peroxydases (Savita et Sharma, 2019).

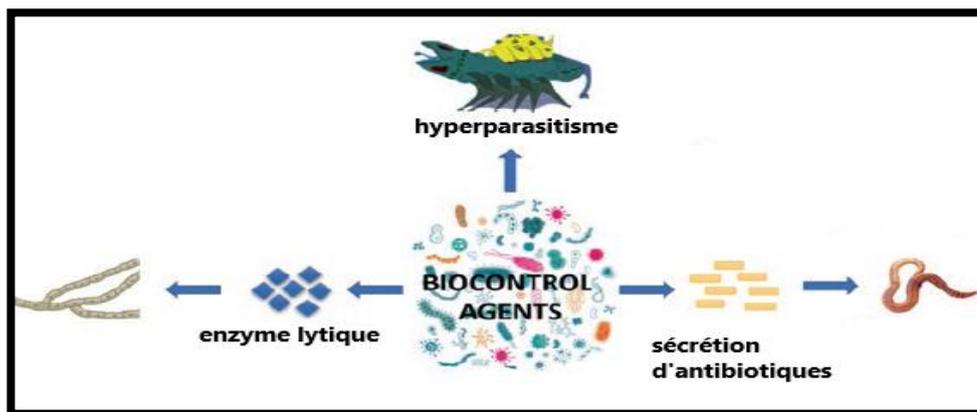


Figure 19 : Actions mécanistiques des agents de contrôle biologique contre différents pathogènes (singh *et al.*, 2020).

5. Rôle des enzymes hydrolytiques des champignons entomopathogènes dans le contrôle biologique des organismes phyto-pathogènes

Les enzymes hydrolytiques microbiennes ont été développées avec des capacités de bio contrôle améliorées, Cette catégorie d'enzymes hydrolytiques comprend les lipases, les protéases, les chitinases et les glucanases. Ces pesticides biochimiques inhibent la croissance des phytopathogènes, les insectes et les champignons nuisibles par l'hydrolyse de leur paroi cellulaire, cuticule, protéines et/ou ADN. Celles-ci jouent un rôle efficace dans le processus d'effets toxiques sur les ravageurs généralement en hydrolysant les principaux composants de la cuticule des insectes, la chitine (chitinases), et les protéines (protéases), les complexes lipidiques (lipases). La couche cornée (cuticule) d'insectes (pas tous), est souvent dégradée comme étant une source de nutriments, d'autre contiennent une matrice péri-trophique (PM) formée de fibrilles de chitine, de glycoprotéines et de protéoglycanes, qui enrobe l'intestin moyen de l'insecte, ce composant est également une cible de ces enzymes hydrolytiques (Lopes *et al.*, 2021).

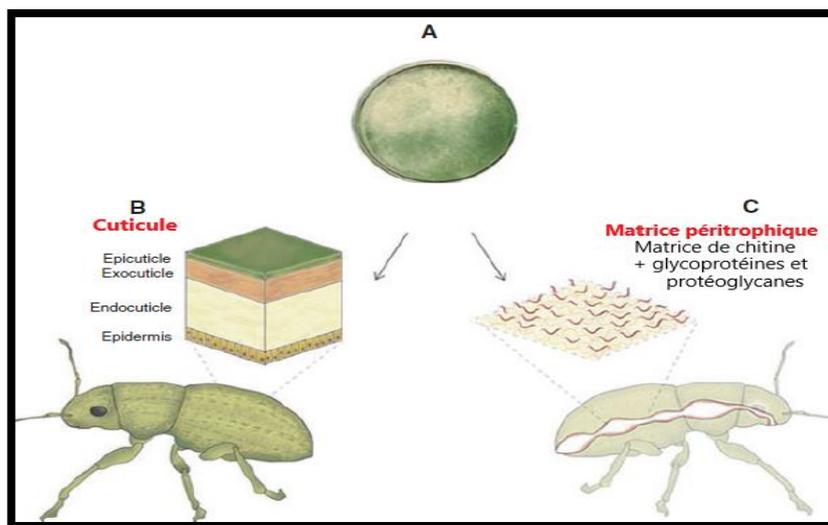


Figure 20 : Illustration schématique de la cuticule et de la matrice péri-trophique des insectes. Les enzymes hydrolytiques microbiennes telles que la chitinase, la protéase, la glucanase et la lipase (A) interagissent et endommagent la cuticule des insectes (B) formée par les couches d'épicuticule, d'exocuticule, d'endocuticule et d'épiderme, ainsi que la matrice péri-trophique (C), composée de couches de chitine, de protéoglycane et de glycoprotéines (Lopes *et al.*, 2021).

5.1. Rôle des chitinases fongiques dans la gestion intégrée des parasites et des maladies des agro-cultures

La virulence fongique est souvent déterminée par les chitinases extracellulaires, L'activité chitinolytique liée aux cellules a été principalement trouvée dans les mycéliums et les protoplastes, mais ils montrent leur activité dans la fraction membranaire (Lopes *et al.*, 2021). En général, le chitinase est toujours secréter juste après la production d'une proportion élevée de protéases, qui débute l'infection via l'élimination d'une couche de protéines (la première barrière de défense contre l'activité fongique) ; cette élimination facilite l'accès de la chitinase à la chitine (Gortari et Hours, 2008).

a. Les chitinases dans la lutte contre les insectes nuisibles

Les chitinases fongique ont récemment été sélectionnées comme fondamentales dans l'amélioration des champignons entomopathogènes contre les insectes, les nématodes et d'autres champignons pathogènes, ces enzymes ont suscité l'intérêt pour leur emploi probable comme bio-pesticides potentiels qui agissent comme agents de protection des plantes contre les ravageurs. Comme il a été mentionné précédemment, les insectes sont facilement ciblés avec l'action des enzymes hydrolytique, sur leur matrice péri-trophique et leur cuticule, qui est constitué d'une matrice de chitine, de protéines. Les ABCs fongique présentés par les genres *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria*, *Trichoderma* et autres peuvent dégrader et lyser les tissus d'insectes nuisibles en pénétrant leur exosquelette/cuticule et dépolymérisent les composant de la chitine en leurs unités monomères ou oligomères, dégradant ainsi les principaux constituants de l'exosquelette des insectes ce qui provoque un affaiblissement et un amincissement de la structurale. De plus si ces enzymes agissent sur les intestins des insectes, elles peuvent causer de graves dommages aux PM (figure 20, C), empêchent l'insecte de se nourrir, et conduisent finalement à sa mort. Généralement, les conidies/ stade asexué, des champignons antagonistes, sont la forme infectieuse qui partage le même environnement avec l'insecte nuisible à éliminer, cette infections commence par la rencontre des conidies avec la cuticule d'un hôte sensible où ils vont être adhérents par le biais d'interactions hydrophobes et/ou par la sécrétion d'un matériau mucilagineux. Un groupe complexe de facteurs interagit pour stimuler la germination des spores, notamment l'humidité et la température ambiante, les indices nutritionnels et chimiques et les extraits cuticulaires de l'hôte. Ensuite, la spore en germination produit un tube germinatif doté d'un ergot de pénétration ou appressorium (figure 21, B) qui utilise la pression enzymatique et physique pour pénétrer la cuticule de l'insecte. Les champignons peuvent également pénétrer par des ouvertures dans le corps de l'insecte,

comme les spiracles, les pores sensoriels ou les blessures. Une fois à l'intérieur, la formation des blastospores/corps hyphaux dans l'hémolymphe de l'insecte aura lieu par le biais de l'hystérie. L'hôte sera ensuite colonisé (Lopes *et al.*, 2021 ; Dukare *et al.*, 2021 ; Paschapur *et al.*, 2021).

Une fois ABCs fongique pénètre l'exocuticule et de l'endocuticule, le champignon se multiplie et se nourrit du contenu interne de l'insecte. Au cours de l'étape de pénétration, des activités physiques et diverses enzymes hydrolytiques responsables de la dégradation des principaux composants cuticulaires sont induites successivement : dès le premier jour, les protéases et l'estérase sont produites. Quant à l'activité des chitinase et lipase surviennent 4-5j plus trad. Certains d'entre eux agissent en synergie lors d'événements de dégradation. L'insecte nuisible sera éliminé par production et extrusion de conidies sur la surface du cadavre de l'hôte. Une fois que l'insecte hôte a été tué et que toute la nourriture a été consommée, des hyphes se développent à partir du cadavre (figure 15, B), en particulier aux marges des régions inter-segmentaires, et produisent des spores au repos ou infectieuses qui favorisent la propagation du champignon. Plusieurs moyens de dispersion des spores sont connus, y compris la dispersion passive par l'eau, le vent ou des agents secondaires (insectes ou autres arthropodes adjacents, etc.), ou par la décharge forcée des sporophores (Dunford *et al.*, 2008 ; Aw et Hue, 2017).

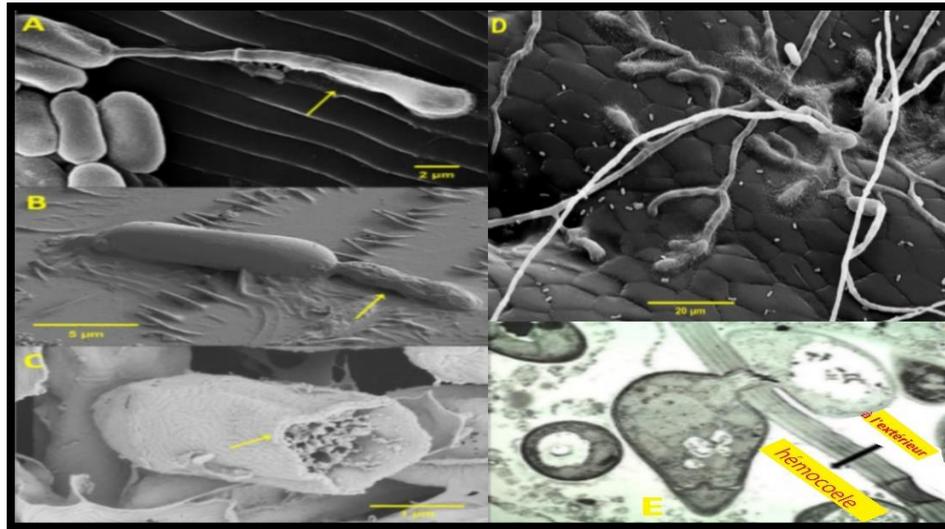


Figure 21 : Principales caractéristiques morphologiques des champignons entomopathogènes interagissant avec la cuticule de l'insecte. (A) Les blastospores développent des structures infectieuses recouvertes de mucilage. (B) Formation d'appressorium. Différentes caractéristiques de surface de la blastospore en germination peuvent être distinguées. (C) La couche de rodlet hydrophobine d'une conidie aérienne. (D) Les hyphes différentiels colonisent la cuticule de l'insecte. (E) Pénétration EPF des couches de cuticules d'insectes. Les principales caractéristiques sont indiquées à l'aide de flèches (Butt *et al.*, 2016) .

b. Les enzymes chitinolytiques comme agents de bio-contrôle des maladies fongiques des plantes

Ce polymère "chitine" entre essentiellement dans la construction de la paroi cellulaire des champignons pathogènes, qui peut être aussi dégradé via cette enzyme chitinolytique et conduit à la perte de l'intégrité structurale, à la déformation, et finalement la mort cellulaire (Lopes *et al.*, 2021 ; Dukare *et al.*, 2014 ; Paschapur *et al.*, 2014). Ces enzymes hydrolytiques extracellulaires des champignons entomopathogènes entraînent le mycoparasitisme des phytopathogènes fongique et qui est défini comme une attaque directe sur un thalle fongique (se fixent, et le dégrader), par conséquent les propagules de l'agent pathogène vont être mortes, dont la - lyse de la paroi cellulaire est l'une des étapes clés du mycoparasitisme – où la destruction de ses structures cellulaires et la désintégration de l'intégrité cellulaire aura lieu. La paroi cellulaire fongique, composée de chitine et de glucane combinés à la paroi, est décomposée par l'action individuelle ou collective de la chitinase, de la glucanase, de la chitosanase, de la cellulase et de la protéase produites par l'EN fongique, Favorisant ainsi l'activité de contrôle biologique (Dukare *et al.*, 2014) .

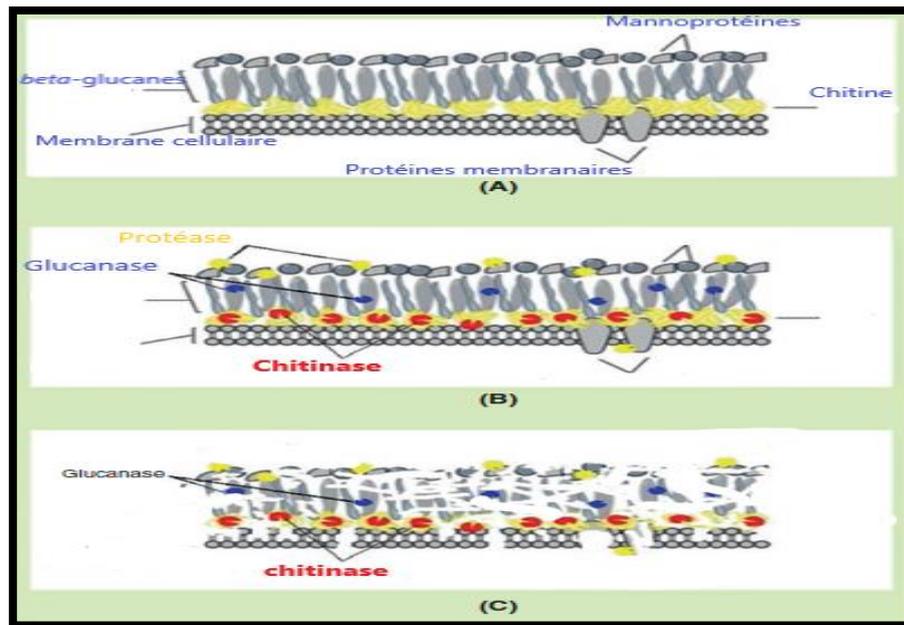


Figure 22 : Mécanisme d'hydrolyse de la paroi cellulaire fongique. (a) Structure typique d'une paroi cellulaire fongique. (b) Enzymes hydrolytiques (chitinase, glucanase et protéase) agissant sur la chitine, le β -glucane et les protéines. (c) Paroi cellulaire fongique perdant son intégrité après hydrolyse. (Jadhav *et al* , 2017).

Ces ABCs fongique semblable aux parasites végétaux peuvent être divisé en deux catégories : les parasites fongiques biotrophique, et les parasites fongiques nécrotiques. Pour les myco-parasites biotrophes il s'agit d'une maladie parasitaire fongique nutritive biologique, l'haustoria peut généralement être produite pour absorber les nutriments du mycélium (hyphes) vivant, établissant ainsi une relation alimentaire particulière, ici le développement du parasite est favorisé par une structure hôte vivante plutôt que morte. Inversement, dans le cas des myco-parasites fongiques nécrotiques, sont plus agressifs et destructeurs que les biotrophes, le champignon envahit et détruit d'autres cellules fongiques et se nourrit du contenu des cellules mortes. *Trichoderma spp* sont utilisés comme systèmes modèles pour étudier les mécanismes du myco-parasites nécrotrophes (figure 21) ; elle est définie par, l'attachement aux hyphes de l'hôte, suivi de la dégradation de sa paroi cellulaire médiée par un ensemble d'enzymes comprenant les chitinasés, les b-(1,4)-, b-(1,3)- et b-(1,6)-glucanases, et les protéases ; et finalement la mort de l'agent pathogène fongique. (Gruber et Seidl-Seiboth, 2012).

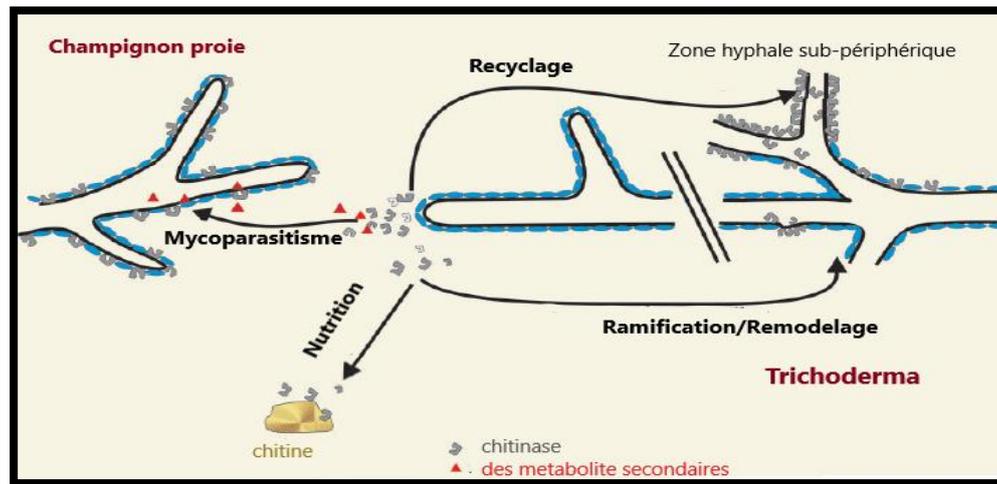


Figure 23 : Modèle des rôles des chitinases chez les mycoparasites. Les fonctions biologiques des chitinases incluent (1) le mycoparasitisme (en synergie avec des métabolites secondaires et d'autres enzymes), (2) la dégradation de la chitine exogène et (3) le remodelage et le recyclage de la propre paroi cellulaire du champignon. L'accessibilité des hyphes fongiques est représentée par des plaquettes bleues, qui illustrent un revêtement potentiel des polymères de la paroi cellulaire par des substances protectrices ou d'autres moyens de protection de la paroi cellulaire (Gruber et Seidl-Seiboth, 2011).

Chapitre III :

***Analyse de l'article Évaluation de la chitinase de
Metarhizium anisopliae comme biopesticide contre
Plutella xylostella.***

Evaluation of Chitinase from *Metarhizium anisopliae* as Biopesticide Against *Plutella xylostella*

Jian Hui Wu, Shaukat Ali and Shun Xiang Ren*

Engineering Research Center of Biological Control, Ministry of Education, College of Natural Resource and Environment, South China Agricultural University, Wushan Road, Guangzhou City, P.R. China, 510642

Abstract.- Chitinases are virulence determination factors of entomopathogenic fungi which perform critical functions during degradation of insect cuticle. The present study was conducted to evaluate the biocontrol efficacy of fungal culture filtrate containing chitinase from *M. anisopliae* against *P. xylostella*. *M. anisopliae* was cultured by submerged fermentation using colloidal chitin as sole carbon source. Maximum chitinase yield (105.32 ± 1.19 mU/ml) was recorded at 96 h of incubation showing the ability of the culture filtrate to hydrolyse the colloidal chitin. Biocontrol assay against *P. xylostella* showed that the culture filtrates were potent antifeedants by reducing the feeding rate and body weight of the larvae. It reduced the successful pupation and increased larval and pupal mortality in a dosage-dependent manner when applied topically. The highest larval mortalities (67.89 ± 3.11 %) were recorded for groups treated with 600 mU ml^{-1} chitinase activity. The maximum reduction in cuticular weight ($75 \pm 1.34\%$) and reduction in chitin content/larva (69 ± 2.11 %) was also observed for the highest chitinase concentration (600 mU ml^{-1}) tried. Our results showed that the culture filtrate containing chitinase from *M. anisopliae* are capable of negatively affecting the growth and metamorphosis of *P. xylostella* larvae. In view of the need for safer and environmentally friendly pest management tools, the present study can help in the development of enzyme-based biopesticides against *P. xylostella*.

Key Words: Biocontrol, cuticle degrading enzymes, biopesticides, Cordycipitaceae, Plutellidae.

INTRODUCTION

Insect cuticle is a composite structural material with mechanical properties that are optimal for their biological functions. The cuticle consists of a thin outer epicuticle containing lipids and proteins and a thick procuticle consisting mainly of chitin and proteins (Andersen *et al.*, 1995; Samson *et al.*, 1988). Entomopathogenic fungi enter their hosts through direct penetration of the cuticle, which is a barrier against most microbes. Consequently, fungal pathogens have a potential as a biological means of controlling sap-sucking insects that have not been easily controlled with chemical pesticides. During the fungal penetration through the host cuticle, hydrolytic enzymes such as proteases, chitinases, and lipases are produced and secreted and are important for the initiation of the infection process (Schagger and von Jagow, 1987; Yang and Yeh, 2005). Chitinases catalyze the hydrolysis of chitin, which is a β -(1,4)-linked polymer of N-acetyl-D-

glucosamine and one of the important structural components of insect cuticle (Tsigos and Bouritos, 1995). Chitinases are produced by a large number of organisms including plants, fungi, and bacteria, and play an important role in the defense mechanism of plants against pathogens and in the mycoparasitic process of fungi. They also play an important role in nutrition, development, and morphogenesis of fungi. However, the role of the chitinases in the host infection process is not yet fully understood.

Metarhizium anisopliae Sorokin (Clavicipitaceae; Hypocreales) is one of the most promising fungal species currently being investigated as a biological control agent against diamondback moth, whiteflies and other insect pests (Altre *et al.*, 1999). A range of extracellular enzymes that can degrade the components of the insect cuticle are produced when *M. anisopliae* is grown *in vitro* with cuticle as the sole carbon source (Clarkson and Charnley, 1996). The regulation of cuticle-degrading enzyme is probably complex and may involve a combination of carbon/nitrogen induction and/or repression (Ali *et al.*, 2009). Although much work has been carried out on the chitinolytic activity as well as characterization of chitinases produced by different entomopathogenic

* Corresponding author: renxncn@yahoo.com.cn,
jhw@scau.edu.cn; Shaukat Ali is joint first author
0030-9923/2010/0005-0521 \$ 8.00/0
Copyright 2010 Zoological Society of Pakistan.

fungi yet the role of purified enzymes in fungal pathogenicity has not been well studied.

The objective of the present study was to evaluate the efficacy of fungal culture filtrate as biocontrol agent against diamondback moth. *M. anisopliae* isolate M408 was cultured under submerged condition and the culture filtrate was analyzed for both chitinase and protease activities. Lyophilized extracts were tested on the larvae. Effect of enzyme feeding on larval development was measured by observing the rates of feeding and changes in body weight induced by the treatment. Effect of topical application of enzymes on larval development was measured by changes rate of pupation, adult emergence, mortality and rates of cuticle degradation induced by the treatments.

MATERIALS AND METHODS

Fungal strains

M. anisopliae isolates (M408) originally isolated from soil (Liu, 2006), deposited to the collection at Engineering Research Center of Biological Control, South China Agricultural University were used during these studies. To produce the inoculum for each assay *M. anisopliae* was cultured on potato dextrose agar (Potatoes, infusion 200 g/L; Dextrose 20 g/L and Agar 20 g/L) and incubated at 26±2°C for 10 days (Ali *et al.*, 2009). Conidia were harvested with distilled water containing 0.03% Tween 80 and sieved through filter paper into sterile vials. Conidia were counted using a compound microscope in hemocytometer (0.0625m²; Fuchs-Rosenthal Merck Euro Lab, Darmstadt, Germany) to calibrate a suspension of 1×10⁷ conidia/ml.

Insect cultures

Larvae of *P. xylostella* were obtained from the stock cultures kept in greenhouse of the Engineering Research Center of Biological Control, South China Agricultural University on *Brassica campestris* L., respectively. Plants were grown in plastic pots having a diameter of 15 cm. Sufficient slow release fertilizer (N:P:K=13:7:15, Shenzhen Batian Ecotypic Engineering Co., Ltd., Xili Shenzhen, China) was added as required to maintain normal plant growth. Second instar larvae were used for

antifeedant studies whereas fourth instar was used for growth inhibition studies.

Submerged fermentation and preparation of enzyme concentrations

The chitinase was produced by growing *M. anisopliae* in liquid. Basal medium (pH 7.2) which consisted of glucose 0.2% (w/v), peptone 0.5% (w/v), MgSO₄ 0.01% (w/v), K₂HPO₄ 0.1% (w/v) and SDS 0.25% (w/v). As a carbon source 1% chitin was added to previously sterilized basal medium (121°C, 15 min) The flasks were inoculated with one ml of 1 x 10⁷ spores/ml and incubated at 180 rpm and 30°C for 5 days. Samples were removed at 24 hrs intervals used for further enzymatic analysis. To prepare the culture filtrates for biological control studies the inoculum was harvested by centrifugation at 1000 x g for 10 min at 4°C in a Microfuge®18 with a F241.5P rotor (Beckman Coulter, Inc, USA). The clear supernatant was concentrated to powder (600 mU ml⁻¹) by lyophilization. The powder was reconstituted with distilled water to obtain the other enzyme concentrations (400, 200, 100, 50 mU ml⁻¹ powder) and distilled water was used as a control.

Determination of antifeedant activity

The efficacy of fungal culture filtrate as an antifeedant was tested by feeding larvae with fresh *B. campestris* leaves coated with different concentration of chitinase. Leaf discs (10 cm²) were dipped in enzyme preparation and air dried on paper before being fed to the larvae. Leaf discs similarly treated in culture filtrate produced in the absence of chitin were used as control. The leaf discs were replaced on daily basis. Feeding with treated leaves was continued for 4 days after which normal feedings were resumed. The insects were placed in an air-conditioned room at 26°C and >95% R.H. The rate of feeding was measured by noting the leaf area consumed by the larvae (using AM 300 portable leaf area meter, Dynamax Inc, USA) and was percent transformed by the following relationship

$$\text{Percentage leaf consumption} = (\text{Leaf area consumed} / \text{total leaf area}) \times 100\%$$

Effect of feeding on larval development was measured by changes in body weight. Each

treatment and control was repeated three times with a new batch of insects and new conidial suspensions, and for each repetition with four leaves, each leaf with 20 diamondback moth larvae.

Studies on growth inhibition of diamondback moth

In the bioassay experiment for growth inhibition five microlitres of each preparation was applied topically on the thorax back of the 4th instar larvae (20 larvae/treatment) using a micropipette. Five micro litres of distilled water served as control. After the application of different treatments larvae were left to air dry before being transferred to 20-cm diameter clean glass petri dishes and a piece of filter paper (20 cm in diameter) was placed at the bottom of the dish with a few drops of water to maintain the moisture. Topical application was continued for 3 days after which the larvae were left undisturbed. Leaf disks were replaced every 2 days except during the pupal stage. The insects were placed in an air-conditioned room at 26°C and >95% R.H. and the effect of filtrate applications on larval development was measured by changes in rate of pupation, adult emergence and mortality induced by the treatments.

The effect of different treatments on larval development was represented as the percentage of successful pupation at the end of the test period. Successful pupation was defined as the formation of healthy pupae which can or have already developed into normal adults at the end of the test period (10 days).

Determination of reduction in cuticle weight and chitin contents

Five microlitres of each concentration was applied topically on the thorax back of the 4th instar larvae using a micropipette whereas the application of distilled water served as control. After this larvae were left to air dry before being transferred to 20 cm diameter clean glass Petri dishes and a piece of filter paper (20 cm in diameter) was placed at the bottom of the dish with a few drops of water for maintenance of moisture. Leaf disks were replaced every 2 days except during the pupal stage. The insects were placed in an air-conditioned room at 26°C and >95% R.H. and the rate of % mortality induced by the treatments were observed at every

24hrs interval. Larvae were observed for mortality up to 5 days and dead larvae were kept at 4°C. After 5 days, the cuticle of all the larvae was removed in Ringer's solution (NaCl, 0.9%; KCl, 0.04%; CaCl₂, 0.02%). The amount of chitin in larval cuticle was estimated according to Nahar (2004). The percent reduction in cuticular weight as well as % reduction in chitin contents was calculated relative to control.

Analytical determinations

Colloidal chitin was prepared by the method of Roberts and Selitrenikoff (1988) with some modification. One hundred grams of chitin flakes were added slowly to 1.75 liter concentrated HCl and agitated gently for 3 hours on a magnetic stirrer. This solution was then filtered to 20 liter of pre chilled distilled water with constant mixing and allowed to settle. A dense white precipitate formed was then centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4°C. The precipitate was then washed in cold distilled water repeatedly until the pH of the wash reached near to 5.5. The supernatant was discarded and colloidal chitin was then kept in refrigerator for future use.

Chitinase assay was based on the estimation of reducing sugars released during the hydrolysis of colloidal chitin. The reaction mixture contained 0.5 ml of enzyme, 0.5 ml of 0.5% colloidal chitin and 1.0 ml of citrate phosphate buffer pH 5.6. The mixture was kept in a water bath at 37°C for 1 h. The amount of reducing sugar liberated was estimated by Miller's (1959) method at 560 nm. One unit (U) of activity was defined as the amount of enzyme which catalyzed the release of one µg of reducing sugar per ml per minute under the reaction conditions. Protein concentration was determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

Chemicals and reagents

All the chemicals were obtained from Guangzhou Jinhua chemical reagent company, Guangzhou, China. Chitin obtained from crab shell was purchased from Sinopharm Chemical Reagent Company, Shanghai, China.

Statistical analysis

Protein production and enzymatic activities after 5 days, % pupation and adult emergence were

analyzed by Analysis of variance (ANOVA) and treatment means were compared by using Tukey's test for mean comparisons at 5% level of significance. Data regarding sequential production of different enzymes, % larval feeding and changes in larval body weight were analyzed by Repeated Measures ANOVA. Mortality data was percent transformed and subjected to ANOVA followed by the Tukey's test. All statistical analyses were performed using SAS 8.01 (SAS, 2000).

RESULTS

Chitinase production by M. anisopliae in the basal medium having 1% chitin as carbon source

The chitinase activity shown by *M. anisopliae* in the basal medium differed significantly at different incubation periods ($F_{5,12} = 29.47$, $P < 0.001$). Maximum chitinase yield (105.32 ± 1.19 mU/ml) was recorded at 96 h of incubation. Beyond this period, the enzyme yield was found to be decreasing as shown in Table I. At 120 h, the yield was reduced when compared to the yield obtained at 96 h however, the amount of secreted protein varied significantly at different time intervals ($F_{5,12} = 10.6$, $P < 0.021$) and gradually increased with the passage of time having highest protein concentration (124.14 ± 1.23 U/ml) after 120h (Fig.1).

Table I.- Effect of different concentrations of chitinase from *I. fumosoroseus* on cuticle degradation of *P. xylostella*

Concentrations (mU/ml)	Reduction cuticle weight (%)	Reduction in chitin content (%)
600	75 \pm 1.34 a	69 \pm 2.11 a
400	69 \pm 1.82 b	60 \pm 1.76 b
200	59 \pm 1.65 bc	51 \pm 1.36 c
100	42 \pm 1.23 c	34 \pm 1.51 d
50	26 \pm 1.15 d	22 \pm 0.87 e
<i>F; df; P</i>	12.97; 4; <0.001	14.69; 4; <0.001

Mean (\pm SE; n = 3) in the same column with different letters are significantly different from each other (Tukey's, $P < 0.05$)

Effect of chitinase on larval feeding rate

The different concentrations of chitinase when used for coating the leaves resulted in a lesser consumption of feed by the larvae (Fig.3). A

significantly different interaction effect between the culture filtrates of different concentrations used for coating the leaves and different time intervals was observed for % leaf consumption ($F_{20, 60} = 17.92$, $P < 0.0001$). For chitinase concentration of 600 mU/mL, larval feeding was lowest than in the case of other treatments as well as control, while statistically similar rates of feeding were observed for 100 and 200 mU/mL. After 5 days feeding rate for 50 mU/mL was comparatively higher but these were still lower than the control on that day (Fig. 2)

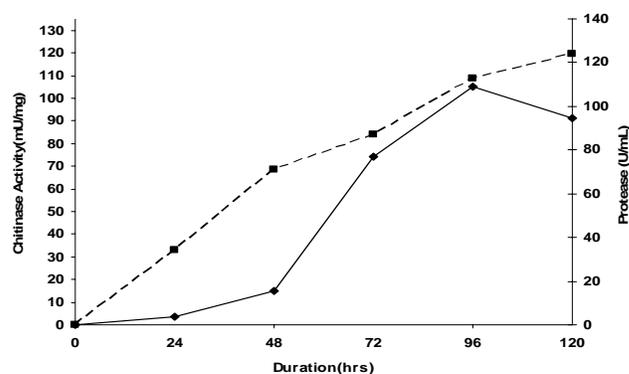


Fig 1. Chitinase activity of *M. anisopliae* at different temperatures after 5 days of growth.

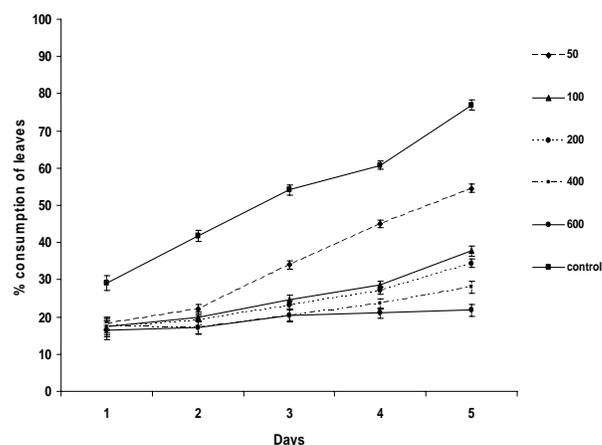


Fig 2. Effect of different concentrations of chitinase on larval feeding rate. Bars represent standard error of means (Based on three independent replicates).

Effect on larval body weight

Data presented in Figure 3 shows significantly different changes in mean body

weights of experimental groups fed on leaves treated with different chitinase concentrations. Interaction effect between the culture filtrates of different isolates used for coating the leaves and different time intervals for increase in body weight by the larvae ($F_{45,129} = 21.97$, $P < 0.001$). The control group performed better in terms of growth as indicated by increased body weight. It might be speculated that feeding on treated leaves might have led to the destruction of peritrophic membrane which ultimately lead the larvae being not able to feed well and result in slow growth rate. Almost similar rates of increase in body weight were observed for enzyme concentrations of 200 and 100 mU/mL while for 600 mU/mL the rates of larval growth were lowest when compared to the other treatments (Fig. 3).

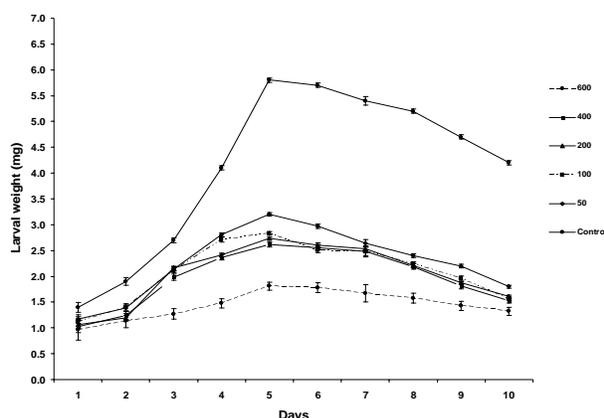


Fig. 3. Effect of different concentrations of chitinase on larval weight. Bars represent standard error of means (based on three independent replicates).

Effect on larval development

The percentage of successful pupation was calculated based on the sum of healthy pupae and is represented in Figure 4. The percentage pupation after 10 days culture filtrates application was significantly different among different treatments and control ($F_{5,12} = 31.12$, $P < 0.001$). The lowest rates of successful pupation were observed for 600 mU/mL having mean value of $11.50 \pm 0.64\%$, while the highest rates of % pupation ($74.30 \pm 1.08\%$) was observed for the control.

Effect on adult emergence

Significantly different rates of % adult emergence were observed among enzyme concentrations and control ($F_{5,12} = 27.51$, $P < 0.001$). The percentage of adult emergence was lowest ($4.67 \pm 0.57\%$) for enzyme concentration of 600 mU/mL while the highest rate of adult emergence was observed for control (Fig. 4).

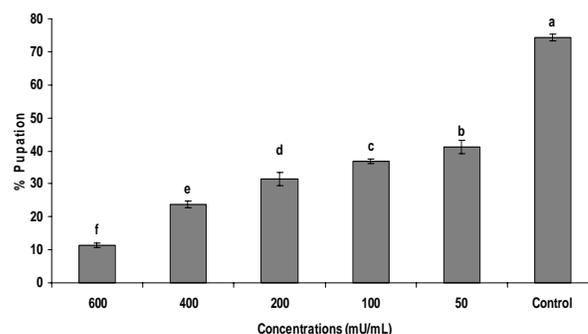


Fig. 4. Effect of different concentrations of chitinase on % pupation. Legends different letters are significantly different from each other (Tukey's, $P < 0.05$); Bars represent standard error of means (based on three independent replicates)

Effect on larval mortality

Mortality of larvae / pupae because of chitinase treatments was measured on the 10th day. At the end of the test period, significantly different rates of percentage mortality were observed between different treatments and control ($F_{5,12} = 19.76$, $P < 0.001$). The lowest mortality was ($3.80 \pm 1.096\%$) was recorded for control and the highest mortality was observed for chitinase concentration 600 mU/mL having a mean value of $67.89 \pm 3.11\%$ (Fig.5).

Effect of chitinase on cuticle degradation of *P. xylostella*

The weight of the cuticle /larvae as well as chitin content/larvae was significantly affected by the application of different concentrations of chitinase from *M. anisopliae*. With the increase in concentration of chitinase, the loss in weight of cuticle/larva and chitin content/larval cuticle

became more pronounced suggesting the degradation of chitin in the cuticle due to chitinase (Table I). It can be observed that the percentage of reduction in the cuticular weight was lowest (26 ± 1.15 %) for 50mU/mL while the maximum reduction ($75 \pm 1.34\%$) was observed at chitinase concentration of 600mU/mL. Similarly the highest reduction in chitin contents/larva (69 ± 2.11 %) was observed for 600 mU/mL, whereas the lowest reduction was observed for control (Table I).

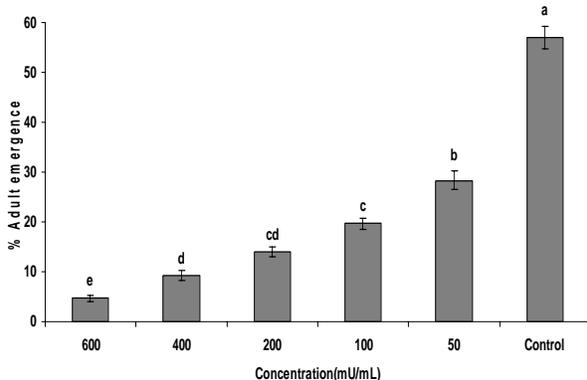


Fig 5. Effect of different concentrations of chitinase on % adult emergence. Legends different letters are significantly different from each other (Tukey's, $P < 0.05$); Bars represent standard error of means (based on three independent replicates).

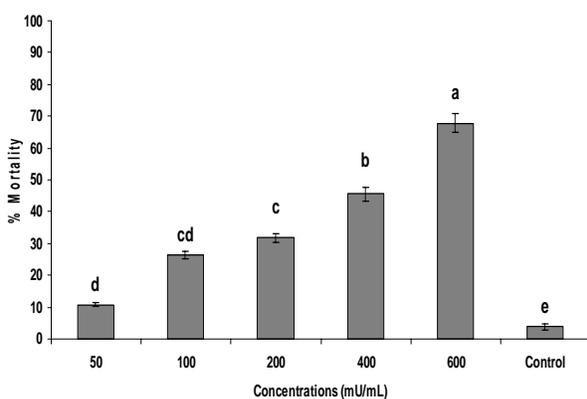


Fig 6. Effect of topical application of different concentrations of chitinase on percentage mortality of *P. xylostella*. Legends different letters are significantly different from each other (Tukey's, $P < 0.05$); Bars represent standard error of means (based on three independent replicates).

DISCUSSION

Chitin, a naturally abundant mucopolysaccharide and the supporting material of crustaceans, insects etc consist of 2-acetamido 2-deoxy- β -D-glucose (N-acetyl glucosamine) through a $\beta(1-4)$ linkage (Majeti, 2000). The complete enzymatic hydrolysis of chitin to free N-acetyl glucosamine is performed by a chitinolytic system consisting of two fractions, endochitinase and chitinase. The physiological functions of chitinase (EC 3.2.1.14) depend on their source. In bacteria, chitinases play roles in nutrition and parasitism whereas in fungi, protozoa and invertebrates they are involved in morphogenesis. Chitinases are involved in the defense mechanism of plants and invertebrates (Gooday, 1995). During the last decade, chitinases have received increased attention because of their wide range of applications. The major applications include use of chitinases for the biocontrol of plant pathogens (Lorito *et al.*, 1993; Mathivanan *et al.*, 1998) and for developing transgenic plants (Lorito and Scala, 1999; Bolar *et al.*, 2000).

Insect cuticle is a composite material consisting of a thin lipid-protein-rich epicuticle covering the bulky procuticle. The procuticle is composed of the exo- and endocuticle which are composed mainly of chitin and protein, wherein the exocuticle is generally melanized (Andersen, 2002). Insects periodically shed their old exoskeletons and either continuously or periodically shed their peritrophic membranes and resynthesize new ones. This process is mediated by the elaboration of chitinases in the moulting fluid that accumulates in the space between the old cuticle and the epidermis and in the gut tissue. The N-acetylglucosamine-containing products of hydrolysis are ultimately recycled for the synthesis of a new cuticle. Often the larvae will ingest and digest the old cuticle or exuvium, the components of which are also recycled. This behaviour coincides with the period of chitinase expression in the gut. In order to penetrate penetration through the insect cuticle, deuteromycete fungi such as *Metarhizium* produce chitinase, protease and lipase, commonly referred to as cuticle-degrading enzymes (St. Leger *et al.*, 1986; Krieger de Moraes *et al.*, 2003). Early studies by

Coudron *et al.* (1984) demonstrated that chitinolytic activity in several entomopathogens was important for growth and potentially needed for penetration. Chitinase activity compared with the rate of fungal development in isolates of *Nomuraea rileyi*, which is parasitic on larvae of *Trichoplusiani*, the cabbage looper, showed significantly higher levels of an endochitinase and β -1,4,N-acetylglucosaminidase in two virulent *N. rileyi* strains compared with an avirulent mutant strain grown over a period of 30 days (El-Sayed *et al.*, 1989). In the virulent isolates, the chitinase activity/total protein ratio during germination (2 days) was as much as 35 times greater than that found in conidia at day 0. Chitinase activity was also present at the onset of the blastospore stage (3 days) which is a stage critical to penetration of the chitin-laden host insect cuticle. Thus, it was speculated that chitinolytic enzymes play a role in dissolution of insect cuticles during penetration by entomopathogenic fungi (Sahai and Manocha, 1993).

Perforations of the peritrophic membrane was proposed by Brandt *et al.* (1978), thus facilitating entry of pathogen into the susceptible insects. Perforation of peritrophic membrane was also observed by Regev *et al.* (1996) when 5th instar *Spodoptera* larvae were fed on a diet containing a recombinant endochitinase encoded by *Serratia marcescens*. Binod *et al.* (2005) showed that the culture filtrates containing chitinase from *T. harzianum* negatively effected the growth and metamorphosis of *Heliothis* larvae. Our studies are also in line with the above mentioned findings showing that the different enzyme levels are capable of causing an inhibitory effect on the growth and metamorphosis of *P. xylostella*. It is also evident from our findings that a considerable reduction in the cuticular weight, % chitin contents and percentage mortality until the pupal stage. It can also be speculated that the emerging adults from treated larvae may be abnormal or incapable of normal life. Keeping in mind the very slow speed of kill of entomopathogenic fungi, there is a need to find alternate ways of using these pathogens in biological control of insects and a possible alternate can be the use of the use of chitinase sprays combined with other pesticide formulations to

facilitate faster kill of insect pests.

The results described above confirm the degradative action of chitinase preparation on the insect cuticle, which ultimately led to insect death. But so far, the effect of cuticle degrading enzyme complex of *M. anisopliae* in the control of *P. xylostella* was not demonstrated. Therefore, it can be concluded that the study of chitinase in *M. anisopliae* is important because it perform critical functions by their involvement in growth and degradation of the fungal cell wall and insect cuticle, as chitin is a major component of both and are virulence determination factors (Kachatourians, 1991, 1996; Charnely, 1997). Implication of chitinases in degradation of insect cuticle could thus be an important tool in the knockdown of insects, especially *P. xylostella* in shorter time. However, stability of the enzyme preparation under field conditions would be a major concern and needs further studies in the future.

REFERENCES

- ALI, S., HUANG, Z. AND REN, S.X., 2009. Production and regulation of extracellular proteases from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosoroseus* (Cordycipitaceae: Hypocreales) in the presence of diamondback moth cuticle. *Biocontr. Sci. Technol.*, **19**: 523-535.
- ALTRE, J.A., VANDENBERG, J.D. AND CANTONE, F.A., 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *J. Inverteb. Path.*, **73**: 332-338.
- ANDERSEN, S.O., 2002. Characteristic properties of proteins from pre-ecdysial cuticle of larvae and pupae of the mealworm *Tenebrio molitor*. *Insect Biochem. mol. Biol.*, **32**: 1077-1087.
- ANDERSEN, S.O., HOJRUP, P. AND ROEPSTORFF, P., 1995. Insect cuticular proteins. *Insect Biochem. mol. Biol.*, **25**: 153-176.
- BINOD, P., PUSZTAHELYI, T., NAGY, V., SANDHYA, C., SZAKACS, G., POCSI, I. AND PANDEY, A., 2005. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enz. Microb. Technol.*, **36**: 880-887.
- BOLAR, J.P., NORELLI, J.L., WONG, K.W., HAYES, C.K., HARMAN, G.E. AND ALDWINCKLE, H.S., 2000. Expression of endochitinase from *T. harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduced vigor. *Phytopathology*, **90**: 72.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for

- the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- BRANDT, C.R., ADANG, M.J. AND SPENCE, K.D., 1978. The peritrophic membrane: ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orygia pseudotsugata*. *J. Inverteb. Path.*, **32**: 12-24.
- CHARNELY, A. K., 1997. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: *Environmental and microbial relationships, the Mycota IV* (eds. D.T. Wicklow and B.E. Soderstrom), Springer, Heidelberg, pp.185-201.
- CLARKSON, J.M. AND CHARNLEY, A.K., 1996. New insights into mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol.*, **4**:197-204.
- COUDRON, T.A., KROHA, M.J. AND IGNOFFO, C.M., 1984. Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol.*, **79**: 339-348.
- EL-SAYED, G.N., COUDRON, T.A., IGNOFFO, C.M. AND RIBA, G., 1989. Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *J. Inverteb. Path.*, **54**: 394-403.
- GOODAY, G.W., 1995. Diversity of roles for chitinases in nature. In: *Chitin and Chitosan* (eds. M.B. Zakaria, W.M. Wan, Muda and M.P. Abdullah). Malaysia Penerbit University, Kebangsaan, pp. 191-202.
- KHACHATOURIANS, G.G., 1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In: *Handbook of applied mycology, vol 2* (eds. D.K. Arora, L. Ajello and K.G. Mukerji). Marcel Dekker Inc., New York, pp. 613-661.
- KHACHATOURIANS, G.G., 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: *Human and animal relationships* (eds. D.H. Howard, J.D. Miller), Mycota VI, Springer, Heidelberg, pp. 331-363.
- KRIEGER DE MORAES, C., SCHRANK, A. AND VAINSTEIN, M.H., 2003. Regulation of extracellular chitinase and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr. Microbiol.*, **46**: 205-210.
- LIU, S.Y., 2006. *Investigating and screening the intensive pathogenicity of the fungi in genera Paecilomyces and Metarhizium*. Masters thesis, Department of Entomology, South China Agricultural University, Guangzhou, China.
- LORITO, M., HARMAN, G.E., HAYES, C.K., BROADWAY, R.M., TRONSMO, A., WOO, S.L. AND DIPIETRO, A., 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, **83**: 302-307.
- LORITO, M. AND SCALA, F., 1999. Microbial genes expressed in transgenic plants to improve disease resistance. *J. Plant Path.*, **81**: 73-88.
- MAJETI, N.V.R., 2000. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.*, **46**: 1-27.
- MATHIVANAN, N., KABILAN, V. AND MURUGESAN, K., 1998. Purification, characterization and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis*. *Canadian J. Microbiol.*, **44**: 646-651.
- MILLER, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid for estimation of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**: 426-428.
- NAHAR, P.B., 2004. *Development of biocontrol agents for the control of pests in agriculture using chitin metabolism as target*. Ph.D. thesis, Division of Biochemical sciences, National chemical laboratory, Pune, India.
- REGEV, A., KELLER, M., STRIZHOU, N., SNEH, B., PRUDOVSKY, E., CHET, I., GINZBERG, G. AND KONCZ- KALMAN, Z., 1996. Synergistic activity of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl environ. Microbiol.*, **62**: 3581-3586.
- ROBERTS, W. A. AND SELETRENIKOFF, C. P., 1988. Plant and bacterial chitinase differ in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.*, **134**: 169-176.
- SAHAI, A.S. AND MANOCHA, M.S., 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis in host-parasite interactions. *FEMS Microbiol. Rev.*, **11**: 317-338.
- SAMSON, R.A., EVANS, H.C. AND LATGE, J.P., 1988. *Atlas of entomopathogenic fungi*. Springer-Verlag, New York.
- SAS INSTITUTE, 2000. *SAS user's guide: Statistics*. Cary, North Carolina, U.S.A.
- SCHAGGER, H. AND VON JAGOW, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**: 368-379.
- ST. LEGER, R.J., COOPER, R.M. AND CHARNLEY, A.K., 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Regulation of production of chitinolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.*, **132**: 1509-1517.
- TSIGOS, I. AND BOURIOTIS, V., 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Biol. Chem.*, **270**: 26286-26291.
- YANG, A.H. AND YEH, K.W., 2005. Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung no.1). *Planta*, **221**: 493-501.

(Received 20 January 2010, revised 8 March 2010)

Évaluation de la chitinase de *Metarhizium anisopliae* comme biopesticide contre *Plutella xylostella*

1. Résumé

Les chitinases sont des facteurs déterminant la virulence des champignons entomopathogènes qui remplissent des fonctions critiques pendant la dégradation de la cuticule des insectes. La présente étude a été menée pour évaluer l'efficacité de biocontrôle du filtrat de culture fongique contenant la chitinase de *M. anisopliae* contre *P. xylostella*. *M. anisopliae* a été cultivé par fermentation submergée en utilisant la chitine colloïdale comme seule source de carbone. Le rendement maximal en chitinase ($105,32 \pm 1,19$ mU/ml) a été enregistré après 96 heures d'incubation, ce qui montre la capacité du filtrat de culture à hydrolyser la chitine colloïdale. L'essai de biocontrôle contre *P. xylostella* a montré que les filtrats de culture étaient des anti-appétissant puissants en réduisant le taux d'alimentation et le poids corporel des larves. Ils réduisent la réussite de la nymphose et augmentent la mortalité des larves et des nymphes de manière dose-dépendante lors d'une application topique. Les mortalités larvaires les plus élevées ($67,89 \pm 3,11$ %) ont été enregistrées dans les groupes suivants groupes traités avec 600 mU ml⁻¹ d'activité chitinase. La réduction maximale du poids cuticulaire ($75 \pm 1,34$ %) et la réduction de la teneur en chitine par larve ($69 \pm 2,11$) ont également été observées pour la concentration de chitinase la plus élevée (600 mU/ml). Éprouvée. Nos résultats ont montré que le filtrat de culture contenant la chitinase de *M. anisopliae* est capable d'affecter négativement la croissance et la métamorphose des larves de *P. xylostella*. Compte tenu du besoin d'outils de lutte contre les ravageurs plus sûrs et respectueux de l'environnement, la présente étude peut contribuer au développement de biopesticides à base d'enzymes contre *P. xylostella*.

Mots clés : Biocontrôle, enzymes dégradant la cuticule, biopesticides, Cordycipitaceae, Plutellida.

2. Introduction

La cuticule d'insecte est un matériau structurel composite dont les propriétés mécaniques sont optimales pour leurs fonctions biologiques. La cuticule est constituée d'une fine épicuticule externe contenant des lipides et des protéines et d'une procuticule épaisse constituée principalement de chitine et de protéines (Andersen *et al.*, 1995 ; Samson *et al.*, 1988). Les champignons entomopathogènes pénètrent dans leurs hôtes par pénétration directe de la cuticule, qui constitue une barrière contre la plupart des microbes. Par conséquent, les champignons pathogènes ont un potentiel comme moyen biologique de lutte contre les insectes suceurs de sève qui n'ont pas été facilement contrôlés avec des pesticides chimiques. Au cours de la pénétration du champignon dans la cuticule de l'hôte, des enzymes hydrolytiques telles que des protéases, des chitinases et des lipases sont produites et sécrétées et sont importantes pour l'initiation du processus d'infection (Schagger et von Jagow, 1987 ; Yang et Yeh, 2005). Les chitinases catalysent l'hydrolyse de la chitine, qui est un polymère β -(1,4)-lié de N-acétyl-D glucosamine et l'un des composants structurels importants de la cuticule des insectes (Tsigos et Bouritos, 1995). Les chitinases sont produites par un grand nombre d'organismes, dont les plantes, les champignons et les bactéries, et jouent un rôle important dans le mécanisme de défense des plantes contre les agents pathogènes et dans le processus mycoparasitaire des champignons. Ils jouent également un rôle important dans la nutrition, le développement et la morphogenèse des champignons. Cependant, le rôle des chitinases dans le processus d'infection de l'hôte n'est pas encore totalement compris.

Metarhizium anisopliae Sorokin (Clavicipitaceae ; Hypocreales) est l'une des espèces fongiques les plus prometteuses actuellement étudiées comme agent de lutte biologique contre la teigne des crucifères, les mouches blanches et d'autres insectes nuisibles (Altre *et al.*, 1999). Une gamme d'enzymes extracellulaires qui peuvent dégrader les composants de la cuticule des insectes est produite lorsque *M. anisopliae* est cultivé *in vitro* avec la cuticule comme seule source de carbone (Clarkson et Charnley, 1996). La régulation de l'enzyme dégradant la cuticule est probablement complexe et peut impliquer une combinaison d'induction et/ou de répression du carbone/azote (Ali *et al.*, 2009). Bien que de nombreux travaux aient été menés sur l'activité chitinolytique ainsi que sur l'activité chitinolytique, le rôle des enzymes purifiées dans la pathogénicité des champignons n'a pas été bien étudié.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité du filtrat de culture fongique comme agent de biocontrôle contre la teigne des diamants. L'isolat M408 de *M. anisopliae* a été cultivé en conditions submergées et le filtrat de culture a été analysé pour les activités

chitinase et protéase. Des extraits lyophilisés ont été testés sur les larves. L'effet de l'alimentation en enzymes sur le développement des larves a été mesuré en observant les taux d'alimentation et les changements de poids corporel induits par le traitement. L'effet de l'application topique d'enzymes sur le développement des larves a été mesuré en observant les taux de pupaison, l'émergence des adultes, la mortalité et les taux de dégradation de la cuticule induits par les traitements.

3. Matériaux et méthodes

Les souches fongiques isolées de *M. anisopliae* (M408) originellement isolées du sol (Liu, 2006), déposées dans la collection du Engineering Research Center of Biological Control, South China Agricultural University ont été utilisées au cours de ces études. Pour produire l'inoculum pour chaque essai, *M. anisopliae* a été cultivé sur de la gélose dextrose de pomme de terre (Pommes de terre, infusion 200 g/L ; Dextrose 20 g/L et Agar 20 g/L) et incubé à $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 10 jours (Ali et al., 2009). Les conidies ont été récoltées avec de l'eau distillée contenant 0,03% de Tween 80 et tamisées à travers un papier filtre dans des flacons stériles. Les conidies ont été comptées en utilisant un microscope composé dans un hémocytomètre (0,0625m² ; Fuchs- Rosenthal Merck Euro Lab, Darmstadt, Allemagne) pour calibrer une suspension de 1×10^7 conidies/ml.

3.1. Souches fongiques

Des isolats de *M. anisopliae* (M408) originellement isolés du sol (Liu, 2006), déposés dans la collection du Engineering Research Center of Biological Control, South China Agricultural University ont été utilisés au cours de ces études. Pour produire l'inoculum pour chaque essai, *M. anisopliae* a été cultivé sur de la gélose dextrose de pomme de terre (Pommes de terre, infusion 200 g/L ; Dextrose 20 g/L et Agar 20 g/L) (voir Annexe 1) et incubé à $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 10 jours (Ali et al., 2009). Les conidies ont été récoltées avec de l'eau distillée contenant 0,03% de Tween 80 et tamisées à travers un papier filtre dans des flacons stériles. Les conidies ont été comptées à l'aide d'un microscope composé dans un hémocytomètre (0,0625m² ; Fuchs-Rosenthal Merck Euro Lab, Darmstadt, Allemagne) pour calibrer une suspension de 1×10^7 conidies/ml.

3.2. L'élevage des insectes

Les larves de *P. xylostella* ont été obtenues à partir des cultures de stock conservées dans la serre de l'Engineering Research Center of Biological Control, South China Agricultural University sur *Brassica campestris* L., respectivement. Les plantes ont été cultivées dans des pots en plastique d'un diamètre de 15 cm. Une quantité suffisante d'engrais à libération lente (N : P : K=13:7:15, Shenzhen Batian Ecotypic Engineering Co., Ltd., Xili Shenzhen, Chine) a été ajoutée selon les besoins pour maintenir une croissance normale des plantes. Les larves de deuxième stade ont été utilisées pour les études d'effet anti-appétissant tandis que le quatrième stade a été utilisé pour les études d'inhibition de la croissance.

3.3. Condition de fermentation

La chitinase a été produite en cultivant *M. anisopliae* en milieu liquide. Le milieu de base (pH 7.2) qui consistait en glucose 0.2% (p/v), peptone 0.5% (p/v), $MgSO_4$ 0.01% (p/v), K_2HPO_4 0.1% (p/v) et SDS 0.25% (p/v). Comme source de carbone, 1% de chitine a été ajouté au milieu de base préalablement stérilisé (121°C, 15 min). Les flacons ont été inoculés avec un ml de 1×10^7 spores/ml et incubés à 180 rpm et 30°C pendant 5 jours. Des échantillons ont été prélevés à intervalles de 24 heures et utilisés pour des analyses enzymatiques supplémentaires. Pour préparer les filtrats de culture pour les études de lutte biologique, l'inoculum a été récolté par centrifugation à 1000 x g pendant 10 min à 4°C dans une Microfuge®18 avec un rotor F241.5P (Beckman Coulter, Inc, USA). Le surnageant clair a été concentré en poudre (600 mU ml^{-1}) par lyophilisation. La poudre a été reconstituée avec de l'eau distillée pour obtenir les autres concentrations d'enzyme (400, 200, 100, 50 mU ml^{-1} de poudre) et l'eau distillée a été utilisée comme témoin.

a. Détermination de l'activité anti-appétissante

L'efficacité du filtrat de culture fongique comme anti-appétissant a été testée en nourrissant les larves avec des feuilles fraîches de *B.campestris* enrobées de différentes concentrations de chitinase. Des disques de feuilles (10 cm^2) ont été plongés dans la préparation enzymatique et séchés à l'air libre sur du papier avant d'être donnés aux larves. Des disques de feuilles traités de façon similaire dans le filtrat de culture produit en l'absence de chitine ont été utilisés comme contrôle. Les disques de feuilles ont été remplacés quotidiennement. L'alimentation avec les feuilles traitées a été poursuivie pendant 4 jours, après quoi l'alimentation normale a été reprise. Les insectes ont été placés dans une pièce climatisée à 26°C et >95% d'humidité relative. Le taux d'alimentation a été

mesuré en notant la surface foliaire consommée par les larves (à l'aide du compteur de surface foliaire portable AM 300, Dynamax Inc, USA) et a été transformé en pourcentage par la relation suivante :

$$\text{Pourcentage de consommation de feuilles} = (\text{surface foliaire consommée} / \text{surface foliaire totale}) \times 100\%.$$

b. Le test d'entomopathogénicité contre la croissance de la teigne des crucifères

Dans l'expérience de bio-essai pour l'inhibition de la croissance, cinq microlitres de chaque préparation ont été appliqués topiquement sur le dos du thorax des larves de 4ème stade (20 larves/traitement) à l'aide d'une micropipette. Cinq microlitres d'eau distillée ont servi de contrôle. Après l'application des différents traitements, les larves ont été laissées sécher à l'air avant d'être transférées dans des boîtes de Pétri en verre propre de 20 cm de diamètre. Un morceau de papier filtre (20 cm de diamètre) a été placé au fond de la boîte avec quelques gouttes d'eau pour maintenir l'humidité. L'application topique a été poursuivie pendant 3 jours, après quoi les larves n'ont pas été dérangées. Les disques de feuilles ont été remplacés tous les 2 jours, sauf pendant le stade nymphal. Les insectes ont été placés dans une pièce climatisée à 26°C et >95% d'H.R. et l'effet des applications de filtrat sur le développement des larves a été mesuré par les changements dans le taux de pupaison, l'émergence des adultes et la mortalité induite par les traitements.

L'effet des différents traitements sur le développement des larves a été représenté par le pourcentage de pupes réussies à la fin de la période de test. La pupaison réussie a été définie comme la formation de pupes saines qui peuvent ou ont déjà évolué en adultes normaux à la fin de la période de test (10 jours).

c. Détermination de la réduction du poids de la cuticule et de la teneur en chitine

Cinq microlitres de chaque concentration ont été appliqués par voie topique sur le dos du thorax des larves de 4ème stade à l'aide d'une micropipette tandis que l'application d'eau distillée a servi de contrôle. Après cela, les larves ont été laissées sécher à l'air avant d'être transférées dans des boîtes de Pétri en verre propre de 20 cm de diamètre. Un morceau de papier filtre (20 cm de diamètre) a été placé au fond de la boîte avec quelques gouttes d'eau pour maintenir l'humidité. Les disques de feuilles ont été remplacés tous les 2 jours sauf pendant le stade nymphal. Les insectes ont été placés dans une pièce climatisée à 26°C et >95% d'humidité relative et le taux de mortalité induit par les traitements a été observé toutes

les 24 heures. Les larves ont été observées pour la mortalité jusqu'à 5 jours et les larves mortes ont été conservées à 4°C. Après 5 jours, la cuticule de toutes les larves a été enlevée dans une solution de Ringer (NaCl, 0,9% ; KCl, 0,04% ; $CaCl_2$, 0,02%). La quantité de chitine dans la cuticule des larves a été estimée selon Nahar (2004). Le pourcentage de réduction du poids de la cuticule ainsi que le pourcentage de réduction de la teneur en chitine ont été calculés par rapport au témoin.

d. Préparation de la chitine colloïdale

Détermination analytique La chitine colloïdale a été préparée par la méthode de Roberts et Selitrenikoff (1988) avec quelques modifications. Cent grammes de flocons de chitine ont été ajoutés lentement à 1,75 litre de HCl concentré et agités doucement pendant 3 heures sur un agitateur magnétique. Cette solution a ensuite été filtrée dans 20 litres d'eau distillée pré-refrigérée en mélangeant constamment et en laissant reposer. Un précipité blanc dense s'est formé et a ensuite été centrifugé à 10 000 tours/minute pendant 10 minutes à 4°C. Le précipité a ensuite été lavé dans de l'eau distillée froide à plusieurs reprises jusqu'à ce que le pH du lavage atteigne près de 5,5. Le surnageant a été jeté et la chitine colloïdale a été conservée au réfrigérateur pour une utilisation ultérieure.

e. L'activité enzymatique

Le dosage de la chitinase était basé sur l'estimation des sucres réducteurs libérés pendant l'hydrolyse de la chitine colloïdale. Le mélange réactionnel contenait 0,5 ml d'enzyme, 0,5 ml de chitine colloïdale à 0,5% et 1,0 ml de tampon phosphate citrate pH 5,6. Le mélange a été maintenu dans un bain-marie à 37°C pendant 1 h. La quantité de sucre réducteur libéré a été estimée par la méthode de Miller (1959) à 560 nm. Une unité (U) d'activité a été définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la libération d'un μg de sucre réducteur par ml et par minute dans les conditions de la réaction. La concentration en protéines a été déterminée selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant l'albumine de sérum bovin comme étalon.

4. Analyse statistique

La production de protéines et les activités enzymatiques après 5 jours, le % de pupaison et l'émergence des adultes ont été analysés par l'analyse de la variance (ANOVA) et les moyennes des traitements ont été comparées en utilisant le test de Tukey pour les comparaisons de moyennes au niveau de signification de 5%. Les données concernant la production séquentielle de différentes enzymes, le % d'alimentation des larves et les changements dans le poids corporel des larves ont été analysées par ANOVA à mesures répétées. Les données sur la mortalité ont été transformées en pourcentage et soumises à une ANOVA suivie du test de Tukey. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de SAS 8.01 (SAS, 2000).

Résultats

Production de chitinase par *M. anisopliae* dans le milieu basal ayant 1% de chitine comme source de carbone.

L'activité chitinase montrée par *M. anisopliae* dans le milieu basal diffère significativement à différentes périodes d'incubation ($F_{5,12} = 29.47$, $P < 0.001$). Le rendement maximal en chitinase ($105,32 \pm 1,19$ mU/ml) a été enregistré à 96 h d'incubation. Au-delà de cette période, le rendement enzymatique s'est avéré décroissant comme le montre le tableau 2. À 120 h, le rendement a été réduit par rapport au rendement obtenu à 96 h, cependant, la quantité de protéine sécrétée a varié de manière significative à différents intervalles de temps ($F_{5,12} = 10,6$, $P < 0,021$) et a progressivement augmenté avec le passage du temps, la concentration de protéine la plus élevée ($124,14 \pm 1,23$ U/ml) ayant été enregistrée après 120 h (figure 24).

Tableau 2 : Effet de différentes concentrations de chitinase d'*I. fumosoroseus* sur la dégradation de la cuticule de *P. xylostella*

Concentrations (mU/ml)	Reduction de la cuticle poids (%)	Réduction de la chitine (%)
600	75±1.34 a	69±2.11 a
400	69±1.82 b	60±1.76 b
200	59±1.65 bc	51±1.36 c
100	42±1.23 c	34±1.51 d
50	26±1.15 d	22±0.87 e
F;df.P	12.97; 4; <0.001	14.69 ; 4 ; <0.001

Les moyennes (\pm SE ; n = 3) dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes les unes des autres (Tukey's, $P < 0.05$)

Effet de la chitinase sur le taux de consommation des larves

Les différentes concentrations de chitinase utilisées pour imbiber les feuilles ont montré une faible consommation par les larves (Figure 26). Un effet d'interaction significativement différent entre les filtrats de culture de différentes concentrations utilisés pour enrober les feuilles et différents intervalles de temps a été observé pour le % de consommation de feuilles ($F_{20,60} = 17,92$, $P < 0,0001$). Pour une concentration de chitinase de 600 mU/mL, l'alimentation des larves était plus faible que dans le cas des autres traitements ainsi que du contrôle, alors que des taux d'alimentation statistiquement similaires ont été observés pour 100 et 200 mU/mL. Après 5 jours, le taux d'alimentation pour 50 mU/mL était comparativement plus élevé, mais il était toujours inférieur à celui du témoin ce jour-là (Figure 25).

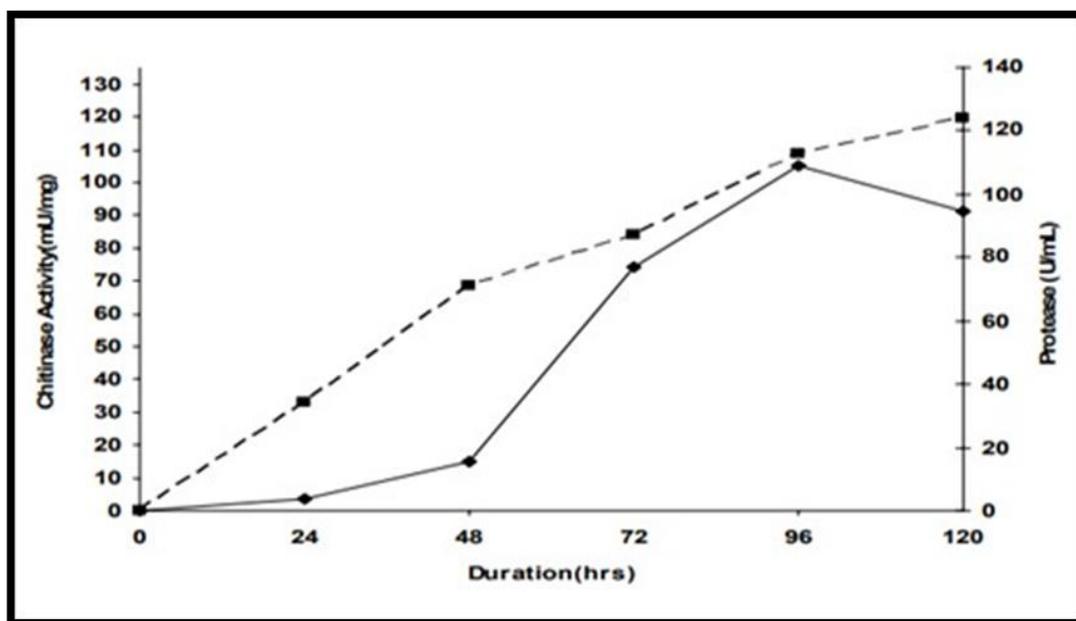


Figure 24 : Activité chitinase de *M. anisopliae* à différentes températures après 5 jours de croissance

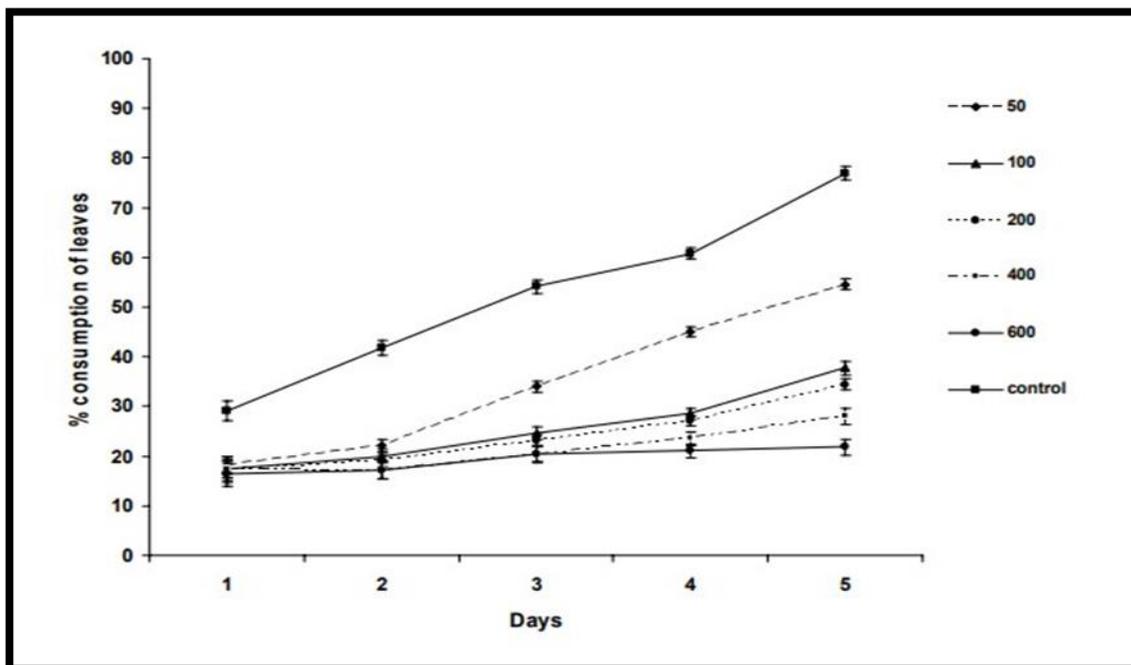


Figure 25 : Effet de différentes concentrations de chitinase sur le taux d'alimentation des larves. Les barres représentent l'erreur standard des moyennes (sur la base de trois répétitions indépendantes).

Effet sur le poids corporel des larves

Les données présentées dans la Figure 26 montrent des changements significativement différents dans les poids corporels moyens des groupes expérimentaux nourris avec des feuilles traitées avec différentes concentrations de chitinase. L'effet d'interaction entre les filtrats de culture des différents isolats utilisés pour enrober les feuilles et les différents intervalles de temps pour l'augmentation du poids corporel des larves ($F_{45,129} = 21,97$, $P < 0,001$). Le groupe témoin a obtenu de meilleurs résultats en termes de croissance, comme l'indique l'augmentation du poids corporel. On peut supposer que le fait de se nourrir de feuilles traitées a pu entraîner la destruction de la membrane péritrophique, ce qui a finalement empêché les larves de se nourrir correctement et entraîné un ralentissement de la croissance. Des taux d'augmentation du poids corporel presque similaires ont été observés pour des concentrations d'enzyme de 200 et 100 mU/mL, tandis que pour 600 mU/mL, les taux de croissance larvaire étaient les plus faibles par rapport aux autres traitements (Figure 26).

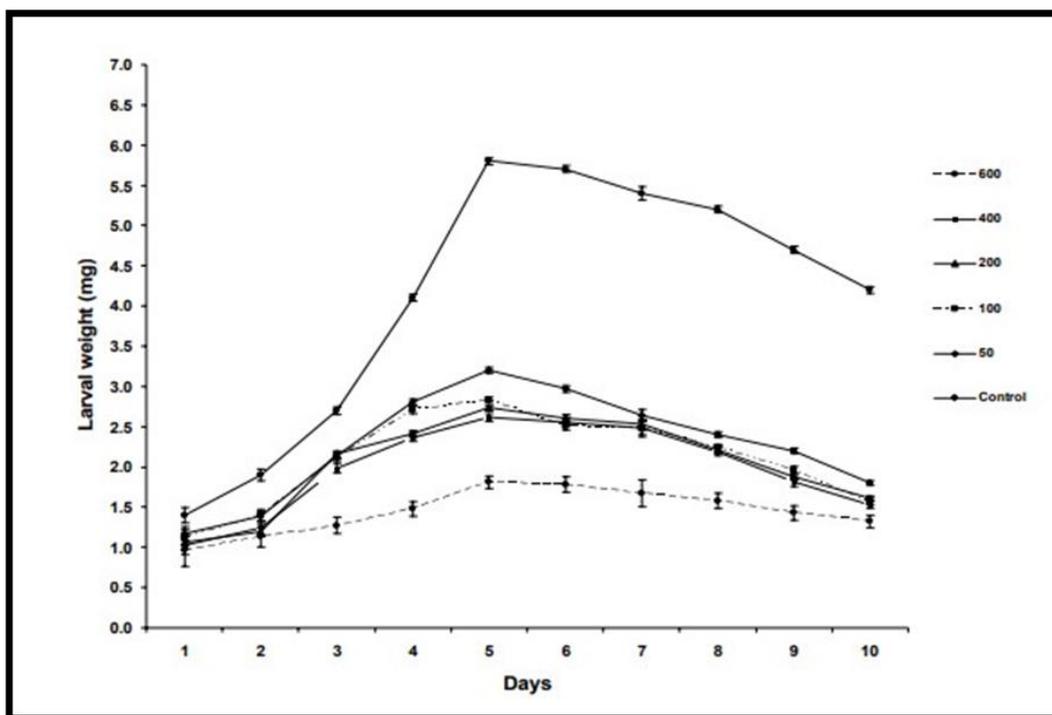


Figure 26 : Effet de différentes concentrations de chitinase sur le poids des larves. Les barres représentent l'erreur standard des moyennes (sur la base de trois répétitions indépendantes).

Effet sur le développement des larves

Le pourcentage de pupaison réussie a été calculé sur la base de la somme des pupes saines et est représenté dans la Figure 27. Le pourcentage de pupes après 10 jours d'application de filtrats de culture était significativement différent entre les différents traitements et le contrôle ($F_{5,12} = 31.12$, $P < 0.001$). Les taux les plus faibles de pupes réussies ont été observés pour 600 mU/mL avec une valeur moyenne de $11,50 \pm 0,64\%$, tandis que les taux les plus élevés de pupes ($74,30 \pm 1,08\%$) ont été observés pour le contrôle.

Effet sur l'émergence des adultes

Des taux significativement différents de % d'émergence des adultes ont été observés entre les concentrations d'enzyme et le contrôle ($F_{5,12} = 27,51$, $P < 0,001$). Le pourcentage d'émergence des adultes était le plus faible ($4,67 \pm 0,57\%$) pour la concentration d'enzyme de 600 mU/mL alors que le taux d'émergence des adultes le plus élevé a été observé pour le contrôle (Figure 28).

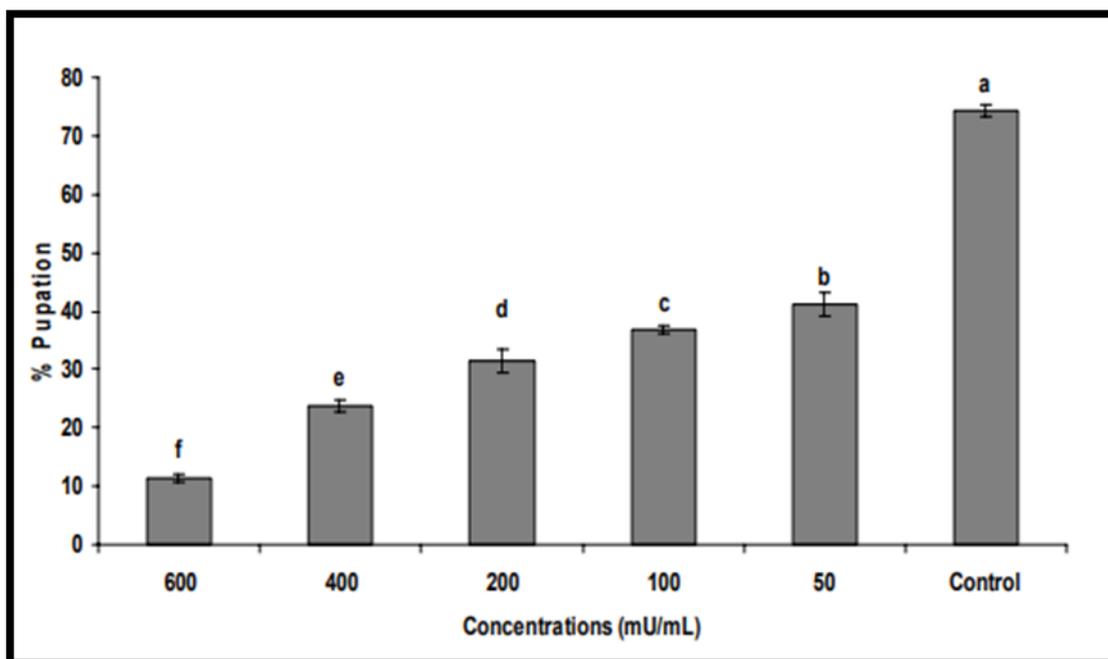


Figure 27 : Effet de différentes concentrations de chitinase sur le % de pupaison. Les lettres différentes sont significativement différentes les unes des autres (Tukey's, $P < 0,05$) ; les barres représentent l'erreur standard des moyennes (sur la base de trois répétitions indépendantes).

Effet sur la mortalité des larves

La mortalité des larves / pupes à cause des traitements à la chitinase a été mesurée au 10ème jour. A la fin de la période d'essai, des taux significativement différents de pourcentage de mortalité ont été observés entre les différents traitements et le contrôle ($F_{5,12} = 19,76$, $P < 0,001$). La mortalité la plus faible ($3,80 \pm 1,096$ %) a été enregistrée pour le contrôle et la mortalité la plus élevée a été observée pour la concentration de chitinase 600 mU/mL avec une valeur moyenne de $67,89 \pm 3,11$ % (Figure 29).

Effet de la chitinase sur la dégradation de la cuticule de *P. xylostella*

Le poids de la cuticule/larve ainsi que le contenu en chitine/larve ont été significativement affectés par l'application de différentes concentrations de chitinase de *M. anisopliae*. Avec l'augmentation de la concentration de chitinase, la perte de poids de la cuticule/larve et de la teneur en chitine/cuticule de larve est devenue plus prononcée suggérant la dégradation de la chitine dans la cuticule due à la chitinase (Tableau 2). On peut observer que le pourcentage de réduction du poids cuticulaire était le plus faible ($26 \pm 1,15$ %) pour 50mU/mL tandis que la

réduction maximale ($75 \pm 1,34$ %) a été observée à la concentration de chitinase de 600mU/mL. De même, la plus forte réduction du contenu en chitine par larve ($69 \pm 2,11$ %) a été observée pour 600 mU/mL, alors que la plus faible réduction a été observée pour le contrôle (Tableau 2).

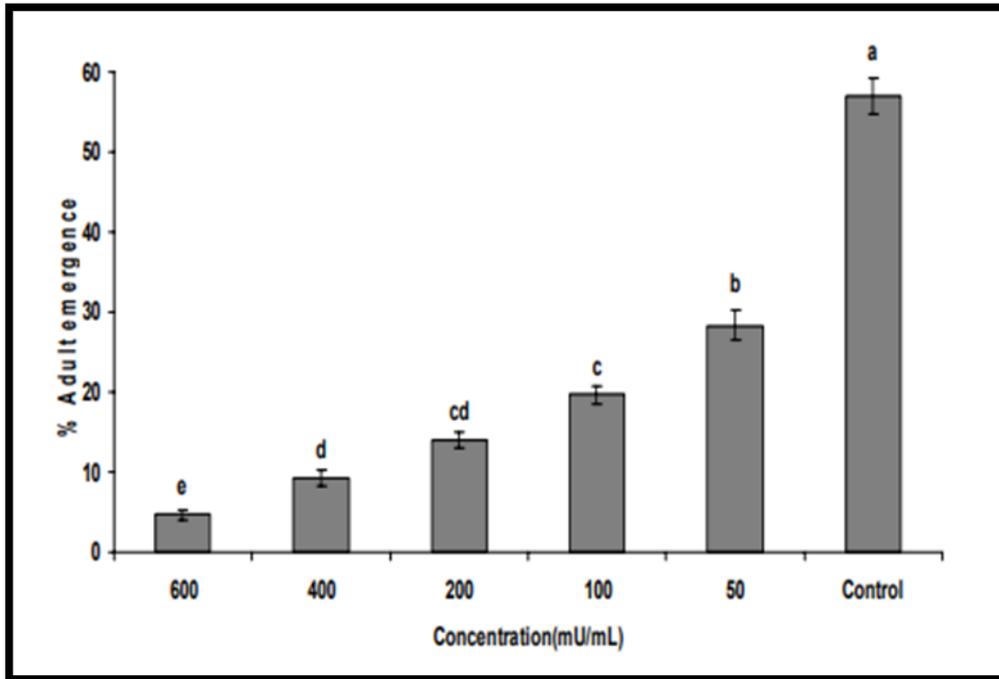


Figure 28 : Effet de différentes concentrations de chitinase sur le % d'émergence des adultes. Les lettres différentes sont significativement différentes les unes des autres (Tukey's, $P < 0,05$) ; Les barres représentent l'erreur standard des moyennes (sur la base de trois réplicats indépendants).

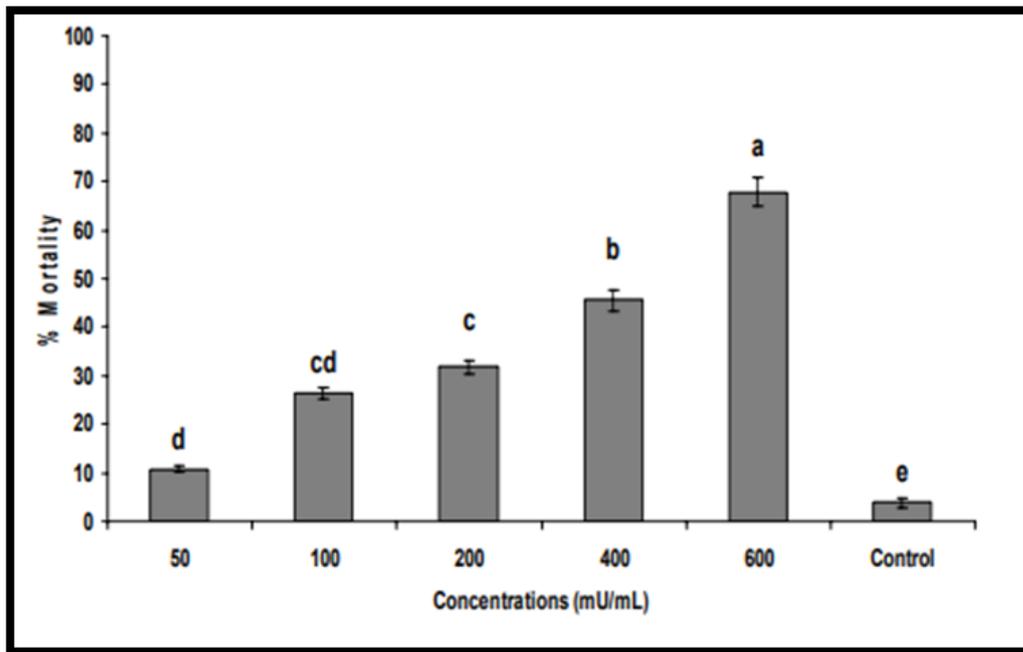


Figure 29 : Effet de l'application topique de différentes concentrations de chitinase sur le pourcentage de mortalité de *P. xylostella*. Les lettres différentes sont significativement différentes les unes des autres (Tukey's, $P < 0,05$) ; les barres représentent l'erreur standard des moyennes (sur la base de trois réplicats indépendants).

Discussion

Le développement d'un myco-insecticide efficace dépend de la sélection d'un isolat qui est hautement virulent pour l'hôte cible et qui est génétiquement et biologiquement stable (Milner, Samson, et Bullard 2002). Le champignon pathogène pour les insectes, *Metarhizium anisopliae*, gagne une importance en tant qu'un deutéromycète entomopathogène à large gamme d'hôtes qui présente un potentiel comme agent de bio-contrôle contre plusieurs insectes nuisibles vu la richesse de l'exosquelette de ses derniers à la chitine (30% de la cuticule des insectes est constituée de microfibrilles de chitine) qui peuvent également être utilisés comme source exogène de carbone et d'azote pour ces champignons (Duo-Chuan 2006).

Metarhizium anisopliae, a été considéré comme un myco-insecticide depuis l'époque de Metchkinikov. Les facteurs de virulence tels que la production de CDE, principalement de chitinase et de protéase, la production de métabolites toxiques, la formation d'appressorium, l'hydrophobicité des conidies se sont avérés être des déterminants significatifs de sa virulence (St. Leger *et al.*, 1986). La chitinase a un potentiel biotechnologique important, mais en raison du petit nombre de bons micro-organismes décomposant la chitine, elle est rarement développée commercialement. Dans le programme de lutte antiparasitaire les champignons entomopathogènes sont généralement préférés aux autres organismes comme sources d'enzymes pour lutter contre les ravageurs ; ils sont aussi connus par une grande capacité de produire des réponses différentes dans la mortalité des agents pathogènes car leur virulence et leur pathogénicité ne sont pas les mêmes (Correa-Cuadros *et al.*, 2014).

De nombreux isolats de *Metarhizium* ont attiré l'attention comme l'un des agents potentiels de lutte naturelle, et ils sont examinés pour leur activité chitinase plus élevées que celles des isolats de *Beauveria* (Petlamul et Prasertsan, 2012). De plus St. Leger *et al.* (1991) ont signalé la présence de chitinase dans le liquide extracellulaire de *Metarhizium anisopliae* cultivé avec de la chitine comme seule source de carbone (Petrisor et Stoian, 2017), une caractéristique importante, qui peut être exploitée afin d'utiliser ces champignons comme agents défensifs contre les organismes pestifères et pathogènes contenant de la chitine, (insectes, les nématodes et les champignons) (Sahai et Manocha, 1993).

L'utilisation des méthodes de culture en milieu liquide SmF pour la production de masse sèche, l'étude de l'activité chitinolytique de *Metarhizium anisopliae*, ont reçu une grande attention dans la lutte biologique contre les insectes et les ravageurs. Actuellement, la technique de fermentation submergée (SmF), qui implique la production d'enzymes par les champignons dans un milieu nutritif liquide, sont largement pratiquées, pour avoir une idée de

la façon dont l'hôte influence la croissance des chitinase dégradant la cuticule (Liu *et al.*, 2003 ; Braga et al 1998 ; Barra- Bucarei *et al.*, 2016).

La première étape dans le développement d'un programme de contrôle microbien, myco-insecticides, est l'évaluation en laboratoire de l'efficacité des agents de bio-contrôle fongiques potentiels, qui peuvent être améliorées par l'amélioration de la composition du milieu de culture et des conditions de fermentation. Dans cette expérience, les effets de la chitine colloïdale utilisé comme une seule source de carbone sur la sécrétion de chitinase aussi, de protéase par *M. anisopliae* ont été testés dans un milieu liquide inoculés avec un ml de 1×10^7 spores/ml et incubés à 180 RMP et 30°C pendant 5 jours (Ali et Ren, 2010).

Comme le montrent les résultats, *M. anisopliae* a produit des chitinases et des protéases dans le milieu testé ; cependant, la quantité d'enzymes sécrétées variait. Un rendement nettement plus élevée en chitinase ($105,32 \pm 1,19$ mU/ml) (Figure 24), a été observé dans le 4^e jour (96 h) du développement, de *Metarhizium anisopliae* cultivé sur milieu liquide à fermentation submergé. Cette concentration à également montrer la grande capacité de ce champignon entomopathogène à déchiffrer (hydrolyser) la chitine colloïdale, dans une période de croissance avancée (Kang *et al.*, 1999), et elle est directement liée sa virulence contre les insectes, et d'autres champignons phyto-pathogènes (Barreto *et al.*, 2004).

Selon les rapports, *Metarhizium anisopliae* implique une combinaison d'enzymes lytique extracellulaires (endochitinase, exochitinase, protéase etc.) et de force mécanique pendant sa pénétration à travers la cuticule de plusieurs organismes nuisibles, pour accéder à l'hémolymphe riche en nutriments (Barreto *et al.*, 2004 ; Dhar et Kaur, 2009). En outre Kang *et al.* (1999) ont purifié une nouvelle chitinase de *M. anisopliae* qui a montré une forte activité chitinolytique contre la chitine colloïdale. Parmi les différentes exochitinases, la N-acétyl-glucosaminidase est la plus importante, libérant l'acétyl-glucosamine des extrémités non réduites des chaînes de chitine. *Metarhizium anisopliae* à montrer un changement significative dans la quantité de protéine produites à différents intervalles de temps ($F_{5,12} = 10,6$, $P < 0,021$), et fini par atteindre un rendement maximal en protéase ($124,14 \pm 1,23$ U/ml) après 120 h d'incubation (Wu *et al.*, 2010). Généralement la grande capacité de *M. anisopliae*, à produire une large gamme d'enzymes hydrolytiques constitue le principal défi pour déterminer l'impact de ces enzymes spécifiques dans l'adaptation à de nouveaux environnements ou à la pathogénicité (Krieger de Moraes *et al.*, 2003).

1. Mise en évidence de l'activité chitinolytique dans un milieu liquide submergé

Généralement l'hydrolyse de la chitine par les micro-organismes occupe beaucoup de temps, en raison de son poids moléculaire plus élevé. Cette mesure de la quantité produite de chitinase par *M. anisopliae*, montrent que dès le premier jour au jour 3 d'incubation, la productivité de la chitinase continue à augmenter avec la durée de fermentation et atteint une valeur maximale au 4^e jour, mais finit par diminuer (Tableau 2). En corrélation avec la croissance (Figure 30), et d'après Wijanarka *et al.* On peut supposer que cette période (4 jour d'incubation) est la phase de croissance logarithmique pour *M. anisopliae* où elle atteint son point maximum avec une grande productivité de métabolite primaire (chitinase) ; les cellules fongiques se divisent d'une façon constante, et rapide en suivant la courbe exponentielle. Après avoir marqué un niveau optimal, l'activité chitinolytique diminue progressivement (du 4^e jour jusqu'au 5^e jour d'incubation). Cette diminution s'explique par le fait que, de nombreuses cellules sont mortes, ce qui entraîne une réduction de la production d'enzymes. En effet, la population de cellules entre dans une période de croissance stationnaire, de sorte que les cellules ne produisent plus de chitinase ou produisent toujours des enzymes mais la quantité est faible ou réduite (Elawati *et al.*, 2018).

La protéase extracellulaire était deux fois plus importante que l'activité chitinase. Dhar et Kaur (2010) ont montré que la chitine colloïdale utilisée comme une seule source de carbone peut se servir aussi d'une source d'azote par les champignons hyphomycètes, *M. anisopliae* ; où la protéase est produite en bien plus grande quantité dans le milieu testé (Dhar et Kaur, 2010). Une telle concentration est enregistrée par une protéase de type trypsine qui montre le plus haut niveau d'activité protéolytique dans un milieu avec de la chitine additionnée à 0,8% (Krieger de Moraes *et al.*, 2003).

1.1. Effet des paramètres nutritionnels sur la production de chitinase

L'abondance des enzymes extracellulaires chez les champignons entomopathogènes peut être attribuée à l'imperméabilité des membranes cellulaires à leurs substrats spécifiques. Parmi les facteurs affectant la synthèse de ces enzymes est la présence de son substrat correspondant (Dhar et Kaur, 2010). La chitine s'est avérée être un meilleur substrat pour la production de chitinase fongique. Dans le cas du champignon *Metarhizium anisopliae*, une bonne production de chitinase a été observée avec des flocons de chitine plutôt qu'avec de la chitine colloïdale où elle était presque 10 fois inférieure malgré une bonne croissance ; ceci est

principalement dû à l'accumulation de sucres réducteurs à un niveau répressif. La diminution de la production de chitinase, après avoir atteint la période maximale de production (96h) peut être entraînée par l'utilisation d'une assimilation de source de chitine facile, telle que la chitine colloïdale, provoque une production de répression enzymatique rapide, car la génération de produits finaux est plus importante et plus rapide (St Leger *et al.*, 1986). En outre, les concentrations des composants du milieu peuvent influencer la synthèse et la sécrétion de cette enzyme. En général, la production de chitinase est souvent prolongée en présence de 0,1 et 1,0% de glucose. De nombreuses bactéries et champignons ont mené des études approfondies sur la répression des enzymes par le glucose. Les gènes supprimés par le glucose se répartissent en trois catégories chez les champignons. La première catégorie est ceux impliqués dans la glycolyse et la gluconéogenèse. Le deuxième groupe, les gènes enzymatiques impliqués dans le cycle de Krebs, et la dernière catégorie comprennent les gènes codant pour des enzymes qui absorbent et métabolisent des sources de carbone différentes du glucose (St Leger *et al.*, 1986).

Des études menées par St Leger *et al.* (1986) ont trouvé que différents signaux de régulation peuvent être observés en présence de K_2HPO_4 , qui a eu un effet positif sur l'augmentation de la production de chitinase ; et évalué comme la meilleure source de phosphore pour la synthèse de cette enzyme. De même la production de chitinase et avec des niveaux élevés est généralement obtenue lorsque la peptone est présente mais avec des faibles concentrations. Ces résultats suggèrent que l'inclusion de ces éléments dans le milieu de production était la meilleure option (St Leger *et al.*, 1986 ; Singha, 2010 ; Kapat *et al.*, 1996).



Figure 30 : Mycéliums de *Metarhizium anisopliae* en présence de la chitine comme seule source de carbone (Krieger de Moraes *et al.*, 2003).

Les concentrations enzymatiques sont obtenues par centrifugation à 1000 x g pendant 10 min à 4°C dans une Microfuge®18 avec un rotor F241.5P (Beckman Coulter, Inc, USA) (Wu *et al.*, 2010), généralement cette technique a pour but, de séparer les cellules de leurs milieu de croissance. Le surnageant est l'extrait brut de l'enzyme de chitinase (Elawati *et al.*, 2018) ; ce dernier est concentré en poudre par lyophilisation puis reconstituée avec de l'eau distillée afin obtenir des concentrations différentes d'enzyme pour des fin de contrôle (Wu *et al.*, 2010).

1.2. Analyse statistique

Une différence significative entre les niveaux d'expression enzymatique de *M. anisopliae* a été observée pour les chitinase ($p < 0,001$), les protéases ($p < 0,021$) ; La composition du milieu a favorisé l'expression des protéases. La présence des niveaux plus élevés de protéase, est similaire aux résultats enregistrés par St. Leger *et al.* (1986) qui ont également suggéré que les enzymes protéolytiques permettant le début du processus d'infection. La chitinase et les autres enzymes apparentées, qui facilitent la rupture de la cuticule chitineuse de l'insecte et l'invasion de l'hôte, apparaissent un peu plus tard, ceci est parallèle à la solubilisation séquentielle des composants de la cuticule. Il était donc nécessaire d'étudier les autres enzymes extracellulaires métabolisant la chitine, et de continuer la recherche pour obtenir une chitinase stable, bon marché, de haute activité (Mustafa et Kaur, 2009 ; Ali et Ren, 2010).

L'analyse statistique réalisée sur les activités enzymatiques de *M. anisopliae* (après 5 jours), par l'analyse de la variance (ANOVA) suivi du test de Tukey pour la comparaison des moyennes au niveau de signification de 5% ; à montrer qu'il existe une différence significative dans l'activité chitinolytique de *M. anisopliae* ; et cette différence apparaisse principalement dans les 96 h d'incubation, avec un rendement maximal de chitinase (105.32 ± 1.19 mU/ml) (McHugh, 2011).

- Pour l'activité chitinolytique ($F_{5,12} = 29.47$, $P < 0.001$) :

F (= ratio de deux écart-types 5 et 12) appelé rapport du test (trouvé 29.47 dans cette expérience), est généralement utiliser pour tester statistiquement la différence entre les moyennes de l'activité chitinolytique des cellules de *M. anisopliae*, trouvé à différentes périodes d'incubations. Ce qui nous intéresse est le p, la probabilité d'observer une statistique F ; cette valeur nous permet de déterminer si la différence entre les moyennes d'activité de chitinase est statistiquement significative. En supposant que l'hypothèse nulle est vraie

(L'hypothèse nulle ne veut que les moyennes d'activité soient toutes égales à tous période de fermentation) (McHugh, 2011). Pour plus d'information consulter ([Le Blog Minitab](#)).

- A partir du seuil de signification $\alpha = 5\% = 0.05$

La probabilité trouvé est inférieure au seuil de signification, $P < 0.001 < 0.05$; ici l'hypothèsenulle est rejeté, et les résultats ont indiqué que des différences significatives (à $p = 0,05$) ont étéobtenues dans l'activité chitinase des cellules fongique, testé chaque 24 heures (ne sont pas égales) (Greenland *et al.*, 2016).

Ces résultats sont confirmés par le test réalisé sur différents isolats de *M.anisopliae* pour la production in-vitro d'enzymes dégradant les cuticules. Ils ont trouvé que la majorité des souches de *Metarhizium anisopliae* présentent une activité chitinolytique maximale détecté au 4^e jour d'incubation à l'exception de quelques souches qui l'ont montré au jour 2. Cette activité a diminué après 6 à 10 jours sauf pour une souche qui a présenté un rendement chitinolytique maximale pendant toute la période d'incubation (comme exception) (Mustafa et Kaur, 2009). Une autre façon d'études, (génétique) a été réalisé sur 17 souches du champignon entomopathogène, *Metarhizium anisopliae*, pour l'évaluation des paramètres liés à la production du chitinase, et de masse sèche dans un milieu liquide contenant de la chitine comme seule source de carbone. Ils ont trouvés que le temps de croissance utilisé, est un point important (à ne pas négliger) dans l'analyse des résultats pour activité chitinolytique et la production sèche en masse. Avant le 7^e jour d'incubation (temps choisie pour cette analyse) les particules de chitine ne sont plus présentes dans aucun champignon des 17 souches analysées, ils en résultent que les particules non hydrolysées interfèrent le moins avec la détermination du poids sec. En outre, en raison de leur grande variabilité génétique, ces souches présentent des courbes de croissance différentes, dont certaines peuvent subir une autolyse après 7 jours. Dans ce cas, les chercheurs estiment que l'activité enzymatique partielle trouvée dans le filtrat peut être due à l'existence de chitinase dans les hyphes autolysés (Braga *et al.*, 1998).

L'objectif principal de cette étude était de déterminer les conditions optimales pour un contrôle biologique efficace (mesure de l'activité enzymatique à un intervalle de 24 heures) ; c.à.d. de sélectionné le temps de fermentation idéal pour obtenir une quantité maximale de chitinase, où cette concentration d'enzymes peut être récolté (Elawati *et al.*, 2018). Les conidies de *M. anisopliae* obtenus à partir d'une culture sporulée âgée de 10 jours sur gélose dextrose de pomme de terre, servent d'inoculum pour tester l'activité enzymatique en milieu liquide submergé, à l'échelle laboratoire. Cette technique de croissance fongique a pour

but, une sporulation maximale de *M. anisopliae* (applicable aussi pour *B. bassiana*), et avec une quantité suffisante afin de permettre un contrôle biologique efficace (production en masse pour un rendement enzymatique plus élevé) (Táborsky, 1992).

2. Effet physiologique de la chitinase purifiée à partir de *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *P. xylostella*

La présente étude a été lancée afin d'étudier l'influence des différentes concentrations chitinolytique du filtrat sur les larves de deuxième stades, en déterminant les indices de masse corporelle liée au taux d'alimentation larvaires (activité anti-appétissante) ; ainsi l'application topique d'enzymes sur le développement larvaire (du quatrième stade) mesuré par changement du taux de nymphose, l'émergence des adultes, la mortalité entraîné par les traitements. L'objectif globale est de déterminer le potentiel de ce champignon entomopathogènes contre *P. xylostella* (Quesada-Moraga *et al.*, 2016 ; Quesada-Moraga *et al.*, 2016).

2.1. Impact de l'activité anti-appétissante d'extrait brut de l'enzyme chitinase sur le développement corporelle des larves

Les différentes concentrations de chitinase abstenu pour des analyses enzymatiques, n'ont provoqué aucune mortalité chez les larves, à un jour après le traitement. Pourtant, le pourcentage d'alimentation avec les feuilles enrobées de chitinase était significativement inférieur à celle des disques utilisé comme contrôle (témoin). En outre, la consommation des disques de feuilles traité était directement lié à la concentration en chitinase (plus que la concentration en chitinase est élevé, plus que le taux d'alimentations devient très faible) (Quesada-Moraga *et al.*, 2016).

Des différences significatives entre l'effet des différentes doses enzymatique, et le temps enregistré pour le % de consommation des disques de feuilles ($F_{20,60} = 17,92$, $P < 0,0001$) ont été trouvées pour *M. anisopliae* (Correa-Cuadros, 2014). Ce résultat peut être expliqué par Butt & Goettel (2000), qui ont mentionné que pour les champignons entomopathogènes il existe une dose seuil pour tuer un ravageur, néanmoins la nature exacte de cette relation n'a pas encore été définie. Cette approche peut également aider au développement de bio-pesticides à base de chitinase de *M. anisopliae* contre ces organismes pathogènes. (Chui-Chai *et al.*, 2012).

Les larves de *Plutella xylostella* sont des ravageurs destructeurs des cultures, ils se nourrissent des feuilles en provoquant de grands trous (figure 33, C), réduisant ainsi le

rendement des plantes attaquées (Batta, 2013). *M. anisopliae* est considéré comme une perspective puissante pour lutter contre ce ravageur (Correa-Cuadros, 2014). L'objectif de cette expérience était d'évaluer la sensibilité des larves de *P. xylostella* au chitinase produit par *M. anisopliae* (Quesada-Moraga *et al.*, 2016).

Une valeur de consommation très faible a été enregistrée pour les larves testées avec une concentration chitinase de 600 mU/mL. Ce résultat a montré que cette suspension chitinolytique du champignon entomopathogène peut provoquer une toxicité orale, et réduit la consommation de nourriture de l'organismes pathogènes (Quesada-Moraga *et al.*, 2016). Les filtrats de culture étaient de puissants anti-appétissants, mais la présentation graphique de l'effet de différentes concentration de chitinase sur le taux d'alimentation des larves (figure 25), montre que ces ravageurs de *P. xylostella* ont également continuer de se nourrir pour un certain temps avant de mourir. Cette observation peut s'expliquer par le fait qu'au cours des premiers stades, ces larves peuvent augmenter les dommages à la culture. Pour cette raison, les ennemis naturels microbiens ont été critiqués comme alternatives aux insecticides. Un contrôle naturel efficace ne doit pas être estimé seulement par la mortalité (Hussain *et al.*, 2009).

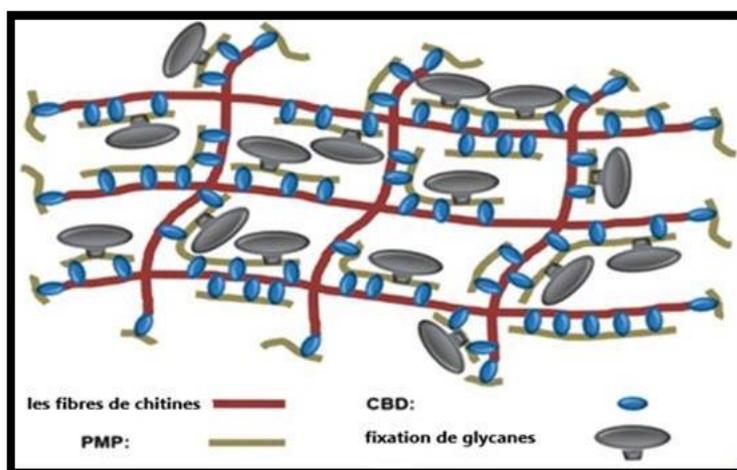


Figure 31 : Illustration graphique des éléments structurels du PM (Merzendorfer *et al.*, 2016).

En outre, Les larves de 2ème stade sont plus sensibles à cette concentration chitinolytique (600 mU/mL), qui peut affecter fortement certains processus métaboliques, entraînant des niveaux d'alimentation et de conversion alimentaire des tissus corporels des larves, très faible (Hussain *et al.*, 2009). Cette réduction est due à l'altération du réseau fibrillaire de chitine (figure 31) par la chitinase fongique (Berini, 2019). La chitine est un

composant majeur de la matrice péri-trophique des insectes, cette dernière (PM) est en première ligne des interactions ravageurs-plantes et ravageurs-microbes (Konno & Mitsuhashi, 2019), et joue rôles importants dans la protection de l'intestin moyen. C'est via cet intestin que nombreux ennemis naturels microbiens et/ou les toxines qu'ils synthétisent peuvent pénétrer dans l'insecte hôte ; et provoquer une pathologie (Erlandson *et al.*, 2019).

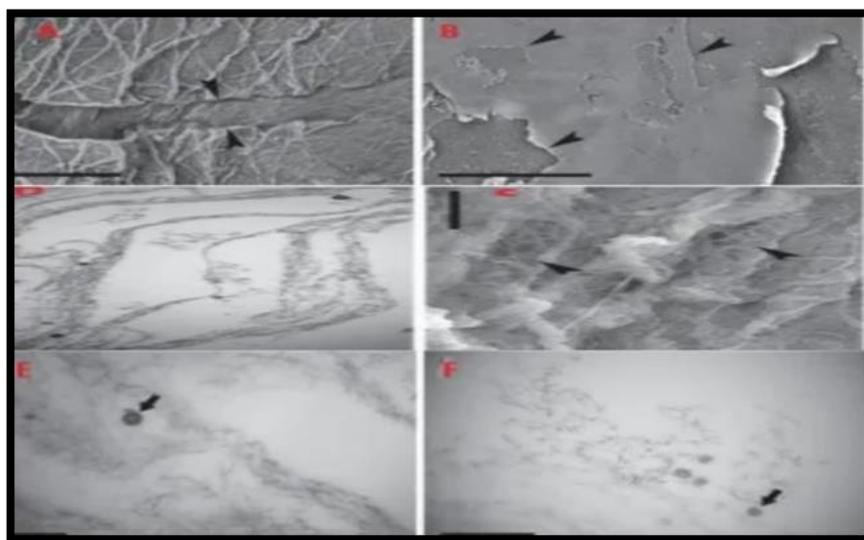


Figure 32 : Morphologie de la matrice péri-trophique traitée par les chitinases. La MP traitée par les chitinases présente des ruptures (pointes de flèches, A) et un décollement (pointes de flèches, B) des couches superficielles. L'intégrité du réseau de fibrilles est compromise (C). L'analyse ultra-structurale confirme un effondrement général de la structure PM et une altération massive de l'organisation des fibrilles de chitine (D, E, F) (Berini *et al.*, 2015).

Les infections évoquées par la chitinase ont des conséquences négatives sur les changements corporels des larves, et affectent la masse des pupes, et peuvent même provoquer des mortalités au stade larvaire. Les résultats graphiques (figure 25 ,26) ont montré que la MP avait subi des changements importants (figure 32). Étant donné que le développement correct des ravageurs dépend en grande partie de la digestion et de l'absorption des nutriments, d'où la membrane péri-trophique joue un rôle important dans ces processus. on peut conclure que, les altérations structurelles et fonctionnelles très élevés par la chitinase de *M. anisopliae* peuvent engendrer des conséquences négatives sur ces larves (Berini *et al.*, 2015).

2.2. Influence de *M. anisopliae* sur la survie et la croissance des larves

Suite à l'application topique du chitinase sur le dos du thorax, les larves du 4^e stade ont montré une efficacité significativement plus faible de nymphose et le taux de mortalité larvaire était également plus élevé que celui du contrôle ($3.80 \pm 1.096\%$). 80% des pupes ont été fortement affectées après l'application de chitinase, et n'ont pas pu produire d'adultes. On peut supposer que le stress évoqué par la concentration élevée de chitinase (600 mU/mL) accélère la nymphose, et en raison de ce stress, les pupes ne peuvent pas se former normalement et finissent par mourir (Binod *et al.*, 2007). Ces résultats indiquent que ce champignon peut fortement influencer le développement des larves en interagissant avec des mécanismes physiologiques (Hussain *et al.*, 2009).

La teigne des crucifères a un cycle de vie (figure 33) en quatre étapes (œuf, larve, nymphe et adulte) (Liu *et al.*, 2002). Contrairement aux larves témoin (contrôle), on peut observer que pour la plus forte concentration de chitinase testée, le pourcentage d'émergence des adultes est nul. Et dans cette concentration, *M. anisopliae* a révélé un effet insecticide potentiel (figure 27) sur les larves/pupes de *P. xylostella* (mortalité de 70 %). Cela a également montré que les chitinases fongiques peuvent affecter négativement le succès de pupation de manière dose-dépendante ; et pourrait être des signes typiques de l'activité antiparasitaire de *M. anisopliae* (Binod *et al.*, 2007).

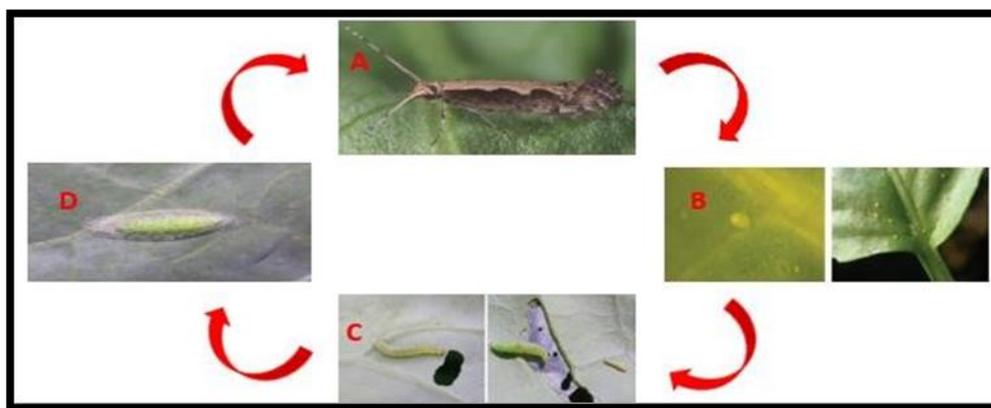


Figure 33 : A) adulte de *P. xylostella*, B) Œufs de teigne des crucifères, C) Larves de la teigne des crucifères et dommages causés par l'alimentation, D) Cocon nymphale de *P. xylostella* (Philips *et al.*, 2014).

Dans cette étude et selon les programmes de lutte contre les insectes nuisibles, la relation entre la dose, le taux de mortalité, l'agent de bio-contrôle et l'organisme pathogène révèle qu'il existe une corrélation positive entre la dose et la capacité de l'ennemie naturelle à éliminer les ravageurs (Correa-Cuadros *et al.*, 2014).

2.3. Taux de dégradation de la cuticule induits

La cuticule de l'insecte est la matrice extracellulaire (MEC) sécrétée par les cellules épidermiques sous-jacentes. Elle agit comme une barrière physique et chimique, en protégeant les insectes de la déshydratation, des dommages mécaniques et de la prédation. Un composant majeur des cuticules des insectes est de chitine, un polymère de *N*-acétyl-glucosamine, et de protéines de la cuticule se liant à la chitine (Togawa *et al.*, 2004 ; Hackman, 1987) ; (environ 60% de chitine au stade larvaire et presque 47% pour les pupes) (Fraenkel et Rudall, 1940). Cette barrière structurelle doit être dégradée pour que les champignons entomopathogènes puissent pénétrer et provoquer par la suite une mue anormale (Ali *et al.*, 2010).



Figure 34 : Larve de *Plutella xylostella* tuée par *M. anisopliae* (Chui-Chai *et al.*, 2014).

Pour déterminer l'effet des chitinases de *M. anisopliae* sur ce ravageur, le % de réduction de la cuticule, % de réduction de la chitine ont été enregistrés (tableau 2). Une concentration de 600 mU/mL à montrer la plus haute efficacité de cet auxiliaire spécifique, contre les larves de 4^e stade de la teigne des crucifères, *Plutella xylostella*. Le mécanisme de dégradation des chitines cuticulaire est déjà mentionné dans le 1^e et 2^e chapitre (Chui-Chai *et al.*, 2014). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'au cours de la multiplication de *M. anisopliae* dans l'exosquelette d'insectes, plusieurs facteurs de virulence identifiés comme enzymes lytiques, principalement la chitinase impliquées dans le processus d'infection des champignons entomopathogènes, sont produit par les conidies pour accéder aux nutriments trouvé dans la

cuticule (Elawati *et al.*, 2018). De même, St. Léger *et al.* (1991) ont montré que par rapport à la gélose Sabouraud dextrose, les conidies de *M. anisopliae* développées sur la cuticule de l'insecte ont des niveaux plus élevés de protéase, de chitinase et d'estérase, qui peuvent jouer un rôle important dans la pénétration de l'hôte. Ces résultats sont discutés en termes d'une possible contribution des enzymes à la spécificité de l'hôte (Gillespie *et al.* 1998 ; Rustiguel, 2012).

Metarhizium anisopliae est un important agent de bio-contrôle fongique utilisé depuis longtemps pour réduire les résidus de pesticides et assurer la sécurité alimentaire (Pattemore *et al.*, 2014).

Les études menées pour tester l'efficacité de la chitinase de *M. anisopliae* utilisé comme myco-insecticide contre l'insecte ravageur *Plutella xylostella* ont montré que la concentration la plus élevée (600 mU/mL) a produit un effet létal maximal pour les deux stades larvaires ; et que l'enzyme est capable d'affecter négativement la croissance et la métamorphose des larves. Ceci est vrai lorsque la chitinase est utilisée dans l'alimentation ou lorsqu'elle est appliquée par voie topique (Correa-Cuadros *et al.*, 2014 ; Hussain *et al.*, 2009). De plus, les recherches actuelles montrent que suite à l'application directe de *M. anisopliae* sur les larves de *Plutella xylostella*, elle présente un potentiel de virulence très élevé contre ce ravageur. L'essai d'efficacité a été en cohérence avec les résultats obtenus qui ont rapporté que lorsque la chitinase est utilisée directement comme bio-pesticide sur l'insecte, elle a un effet insecticide élevé sur les larves de la teigne des crucifères (Batta, 2013).

Conclusion & perspective

L'objectif général de cette étude était le développement de nouveaux produits de bio-contrôle microbien à base de chitinase fongique, à valeur ajoutée et à déterminer le potentiel d'isolat de *Metarhizium anisopliae* pour contrôler l'insecte ravageur *Plutella xylostella*, et les principaux paramètres nutritionnels du processus affectant la sécrétion de chitinases par ce champignon entomopathogène. Cette recherche se concentre sur les progrès actuels des chitinases produites par les champignons entomopathogènes, contenant une brève introduction à leur nomenclature, famille, structure, fonctions, et enfin l'application des agents fongiques et l'impact de cette enzyme dans le contrôle des maladies des plantes.

Au cours de ces expériences, Wu *et al.* (2010), ont réussie de déterminer la courbe de croissance et l'activité chitinase la plus élevée (600 mU/ ml), qui a été observés le 4^e jour du développement pour une incubation de 5 jours. Une période de croissance optimale caractérisée par une augmentation de la mortalité larvaire, mais aussi par un retard de croissance (effet anti-appétissant puissant).

Selon les résultats obtenus, et par rapport aux testes de l'efficacité des concentrations chitinases sur l'agent pathogène *Plutella xylostella*, on peut spéculer que l'effet toxique des champignons chitinolytiques est corrélé positivement avec les niveaux élevé d'enzyme produits en phase logarithmique et classés dans la catégorie du métabolisme primaire.

Ce travail, fournit des données expérimentales importantes pour l'identification des facteurs clés impliqués dans l'expression des chitinases fongique et l'interaction entre le champignon pathogène et son hôte. Il indique également l'importance des essais biologique de virulence in vitro avant l'application sur terrain.

La connaissance de la relation hôte-pathogène-bio-contrôle est cruciale pour le succès du bio-pesticide à base de chitinase fongique. Au cours de ce programme de recherche des essais préliminaires avec la chitinase des souches du champignon *M. anisopliae* ont montré des résultats encourageants pour un effet larvicide contre les larves de la teigne des crucifères. En bref, il a été établi que cette molécule fongique serait bénéfique en tant que bio-pesticides dans le domaine de l'agriculture, par conséquent, elle peut être exploitée pour diverses applications de lutte intégrée contre les ravageurs. Cependant, des études existantes ont montré que les champignons pathogènes des insectes ont peu d'impact sur les organismes non ciblés et qu'ils constituent une alternative plus sûre aux pesticides chimiques utilisés dans les programmes de lutte antiparasitaire.

Conclusion & perspective

En conclusion, cette recherche apporte à la fois la preuve de l'action bio-insecticide des champignons chitinolytique contre les agents pathogènes, et de la capacité de ces ennemies naturels à coloniser les tissus externe et la membrane péritrophique des insectes ravageurs.

*Références
bibliographique*

- A -

- **Abbasi, K., Wick, R., & Zafari, D. (2020).** Chitinase activity of biocontrol fungi cultured from the golden potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*. *Pakistan Journal of Nematology*, 38(1), 93.
- **Abd-Alla, A. M., Meki, I. K., & Demirbas-Uzel, G. (2020).** Insect viruses as biocontrol agents: Challenges and opportunities. In *Cottage Industry of Biocontrol Agents and Their Applications* (pp. 278). Springer, Cham.
- **Ahanger, R., Bhatand, H. A., Dar, N. A. (2014).** Biocontrol agents and their mechanism in plant disease management. *Sci Acta Xaveriana*, 5(1), 51-52.
- **Aita, B. C., Spannemberg, S. S., Schmaltz, S., Zabot, G. L., Tres, M. V., Kuhn, R. C., & Mazutti, M. A. (2019).** Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(3), 1-4.
- **Akeed, Y., Atrash, F., & Naffaa, W. (2020).** Partial purification and characterization of chitinase produced by *Bacillus licheniformis* B307. *Heliyon*, 6(5), 3-4.
- **Ali, S., Huang, Z., Ren, S. (2010).** Production of cuticle degrading enzymes by *Isaria fumosorosea* and their evaluation as a biocontrol agent against diamondback moth. *Journal of Pest Science*, 83(4), 361.
- **Altieri, M. A. (1999).** The ecological role of biodiversity in agroecosystems. In *Invertebrate biodiversity as bioindicators of sustainable landscapes* (pp. 19-23). Elsevier.
- **Alves, T. B., de Oliveira Ornela, P. H., de Oliveira, A. H. C., Jorge, J. A., & Guimarães, L. H. S. (2018).** Production and characterization of a thermostable antifungal chitinase secreted by the filamentous fungus *Aspergillus niveus* under submerged fermentation. *3 Biotech*, 8(8), 3-5.
- **Aw, K. M. S., & Hue, S. M. (2017).** Mode of infection of *Metarhizium* spp. fungus and their potential as biological control agents. *Journal of fungi*, 3(2), 3.

- B -

- **Baines, D., & Brown, M. (2016).** *Flavor Enhancers: Characteristics and Uses*. *Encyclopedia of Food and Health*, 720.
- **Baron, N. C., Rigobelo, E. C., & Zied, D. C. (2019).** Filamentous fungi in biological

control: status and future perspectives. *Chilean journal of agricultural research*, 79(2), 309.

- **Barreto, C. C., Staats, C. C., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2004).** Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Current microbiology*, 48(2), 102-104.
- **Batta, Y. A. (2013).** Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. *Crop protection*, 132.
- **Berini, F., Caccia, S., Franzetti, E., Congiu, T., Marinelli, F., Casartelli, M., & Tettamanti, G. (2015).** Effects of *Trichoderma viride* chitinases on the peritrophic matrix of Lepidoptera. *Pest management science*, 72(5), 986–987.
- **Berini, F., Casartelli, M., Montali, A., Reguzzoni, M., Tettamanti, G., & Marinelli, F. (2019).** Metagenome-sourced microbial chitinases as potential insecticide proteins. *Frontiers in microbiology*, 10, 1358.
- **Bhattacharya, D., Nagpure, A., & Gupta, R. K. (2007).** Bacterial Chitinases: Properties and Potential. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(1), pp 22.
- **Binod, P., Sukumaran, R. K., Shirke, S. V., Rajput, J. C., & Pandey, A. (2007).** Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1848- 1850.
- **Braga, G. U., Vencovsky, R., & Messias, C. L. (1998).** Estimates of genetic parameters related to chitinase production by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Genetics and molecular biology*, 21(2), 171-172.
- **Brzezinska, M. S., & Jankiewicz, U. (2012).** Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. *Current microbiology*, 65(6), 668.
- **Butt, T. M., Coates, C. J., Dubovskiy, I. M., & Ratcliffe, N. A. (2016).** Entomopathogenic fungi: new insights into host–pathogen interactions. *Advances in genetics*, 94, 13.

- C -

- **Chui-Chai, N., Krutmuang, P., Nalumpang, S., Mekchay, S., Khanongnuch, C., & Chanbang, Y. (2012).** Insecticidal activity and cuticle degrading enzymes of

entomopathogenic fungi against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Nat. Sci*, 11(1), 147-155.

- **Cloyd, R. A. (2020).** How Effective Is Conservation Biological Control in Regulating Insect Pest Populations in Organic Crop Production Systems? *Insects*, 11(11), 2.
- **Cohen-Kupiec, R., & Chet, I. (1998).** The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(3), 270–277
- **Corbaz, R. (1990).** *Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes : Maladies des plantes et leurs agents.* Suisse. PPUR presses polytechniques et universitaires romandes. 4 p.
- **Correa-Cuadros, J. P., Rodríguez-Bocanegra, M. X., & Sáenz-Aponte, A. (2014).** Susceptibility of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae; Linnaeus 1758) to *Beauveria bassiana* Bb9205, *Metarhizium anisopliae* Ma9236 and *Heterorhabditis bacteriophora* HNI0100. *Universitas Scientiarum*, 19(3), 279.

- D -

- **Dahiya, N., Tewari, R., & Hoondal, G. S. (2006).** Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6), 773–775.
- **Daizo K (2005)** Application de la chitinase en agriculture. *J Metals Mater Min* 15 (1): 33-36
- **Del Claro, K., Oliveira, P. S., & Rico-Gray, V. (Eds.). (2009).** *Tropical Biology and Conservation Management-Volume III: Agriculture.* Oxford, united kingdom. 30-35. – (EOLSS Publications).
- **Delas Mercedes Dana MJA, Pintor Toro, B Cubero. (2006).** Les plants de tabac transgéniques surexprimant les chitinases d'origine fongique présentent une résistance accrue aux agents de stress biotiques et abiotiques. *Physiologie végétale* 142 (2): 722-730
- **Dhar, P., & Kaur, G. (2009).** Effects of carbon and nitrogen sources on the induction and repression of chitinase enzyme from *Metarhizium anisopliae* isolates. *Annals of microbiology*, 59(3), 547.
- **Dhar, P., & Kaur, G. (2010).** Cuticle-degrading proteases produced by *Metarhizium*

anisopliae and their induction in different media. *Indian Journal of Microbiology*, 50(4), 449.

- **Díaz, M. A., Pereyra, M. M., Picón-Montenegro, E., Meinhardt, F., & Dib, J. R. (2020).** Killer Yeasts for the Biological Control of Postharvest Fungal Crop Diseases. *Microorganisms*, 8(11), 3.
- **Dos Reis, C. B. L., Sobucki, L., Mazutti, M. A., Guedes, J. V. C., & Jacques, R. J. S. (2018).** Production of chitinase from *Metarhizium anisopliae* by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Industrial Biotechnology*, 14(4), 231-232.
- **Dukare, A. S., Paul, S., Asha, A. D., Nivetha, N., Aggarwal, C., & Divekar, P. (2021).** Role of Bacterial and Fungal Chitinases in Integrated Management of Pest and Diseases of Agro-Horticultural Crops. In *Microbes for Sustainable Insect Pest Management* (pp. 35-40). Springer, Cham.
- **Dunford, J. C., Somma, L. A., Serrano, D., Rutledge, C. R., Capinera, J. L., Smagghe, G., Nation, J. L. (2008).** Entomopathogenic fungi and their host cuticle. *Encyclopedia of Entomology, second ed. Springer-Verlag, Heidelberg*, 1333.
- **Duo-Chuan, L. (2006).** Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*, 161(6), 347-351.

- E -

- **Eilenberg, J. (2006).** Concepts and visions of biological control. In *An ecological and societal approach to biological control* (pp. 1-6). Springer, Dordrecht.
- **Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001).** Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4), 390-391.
- **Elawati, N. E., Pujiyanto, S., & Kusdiyantini, E. (2018, May).** Production of extracellular chitinase *Beauveria bassiana* under submerged fermentation conditions. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1025, No. 1, p. 4). IOP Publishing
- **El-Tarabily, K. A., & Sivasithamparam, K. (2006).** Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*, 47(1), 25-26.
- **Erlanson, M. A., Toprak, U., & Hegedus, D. D. (2019).** Role of the peritrophic matrix in insect-pathogen interactions. *Journal of insect physiology*, 117, 103894.

- F -

- **Felse, P. A., & Panda, T. (2000).** Production of microbial chitinases—A revisit. *Bioprocess*

Engineering, 23(2), 130.

- **Fischbein, D., Corley, J. C. (2015).** Classical biological control of an invasive forest pest: a world perspective of the management of *Sirex noctilio* using the parasitoid *Ibalia leucospoides* (Hymenoptera: Ibalidae). *Bulletin of Entomological Research*, 105(1), 2.
- **Fraenkel, G., & Rudall, K. M. (1940).** A study of the physical and chemical properties of the insect cuticle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 129(854), 1.
- **Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019).** Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 3-4.

- G -

- **Gasmi, M., Kitouni, M., Carro, L., Pujic, P., Normand, P., & Boubakri, H. (2019).** Chitinolytic actinobacteria isolated from an Algerian semi-arid soil: development of an antifungal chitinase-dependent assay and GH18 chitinase gene identification. *Annals of Microbiology*.
- **Ghanem, K. M., Al-Garni, S. M., & Al-Makishah, N. H. (2010).** Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Biotechnology*, 9(32), 5138.
- **Graham, L. S., & Sticklen, M. B. (1994).** Plant chitinases. *Canadian Journal of Botany*, 72(8), 1057-1059.
- **Gomaa, E. Z. (2021).** Microbial chitinases: properties, enhancement and potential applications. *Protoplasma*, 698.
- **Gooday, G. W. (1994).** Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. In *Biochemistry of microbial degradation* (pp. 279-300). Springer, Dordrecht.
- **Gortari, M. C., & Hours, R. A. (2008).** Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. *Mycological Progress*, 7(4), 224-227.
- **Greenland, S., Senn, S. J., Rothman, K. J., Carlin, J. B., Poole, C., Goodman, S. N., & Altman, D. G. (2016).** Statistical tests, P values, confidence intervals, and power: a guide to misinterpretations. *European journal of epidemiology*, 31(4), 338-341.
- **Gruber, S., Seidl-Seiboth, V. (2012).** Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*, 158(1), 28-32.

- H -

- **Hackman, R. H. (1987).** Chitin and the fine structure of cuticles. In *Chitin and benzoylphenyl ureas* (pp. 8). Springer, Dordrecht.
- **Hall, R. A., & Papierok, B. (1982).** Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. *Parasitology*, 84(4), 205-206.
- **Hartl, L., Zach, S., & Seidl-Seiboth, V. (2012).** Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(2), 534-535.
- **Hajek, A. E. (2004).** Augmentation: inundative and inoculative biological control. *Natural Enemies*, 62–65.
- **Henrissat B (1991)** A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid-sequence similarities. *Biochem J* 280:309–316
- **Hussain, A., Tian, M. Y., He, Y. R., & Ahmed, S. (2009).** Entomopathogenic fungi disturbed the larval growth and feeding performance of *Ocinara varians* (Lepidoptera: Bombycidae) larvae. *Insect Science*, 16(6), 515-516.

- I -

- **Irtwange, S. V. (2006).** Application of biological control agents in pre-and postharvest operations. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*. p. 2-4.

- J -

- **Jadhav, H. P., Shaikh, S. S., & Sayyed, R. Z. (2017).** Role of hydrolytic enzymes of rhizoflora in biocontrol of fungal phytopathogens: an overview. *Rhizotrophs: Plant growth promotion to bioremediation*, 189.
- **Jamalizadeh, M., Etebarian, H. R., Aminian, H., & Alizadeh, A. (2011).** A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *Eppo Bulletin*, 41(1), 65.
- **Javed, S., Ahmad, M., Ahmad, M., Abdin, M., Hamid, R., Khan, M., & Musarrat, J. (2013).** Chitinases : An update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 5(1), 21.
- **Johnson EA, Villa TG, Lewis MJ, Phaff HJ. (1979).** Lysis of the cell wall of yeast *Phaffia rhodozyme* by lytic complex from *Bacillus circulans* WL-12. *J Appl Biochem* 1:273–282

- **Julien SAGUEZ, (2007).** Dérégulation des activités chitinasés : vers de nouvelles perspectives de lutte contre les aphides, Thèse de Doctorat de l'Université de Picardie Jules Verne, Faculté des Sciences – Ecole Doctorale Sciences et Santé. Français. 8
- K -
- **Khan, F. I., Bisetty, K., Singh, S., Permaul, K., & Hassan, M. I. (2015).** Chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP and its biotechnological applications. *Extremophiles*, 19(6), 8.
- **Kang, S. C., Park, S., & Lee, D. G. (1999).** *Purification and Characterization of a Novel Chitinase from the Entomopathogenic Fungus, Metarhizium anisopliae.* *Journal of Invertebrate Pathology*, 73(3), 278.
- **Kapat, A., Rakshit, S. K., & Panda, T. (1996).** Optimization of carbon and nitrogen sources in the medium and environmental factors for enhanced production of chitinase by *Trichoderma harzianum*. *Bioprocess Engineering*, 15(1), 15.
- **Kaya, H. K., & Lacey, L. A. (2000).** Introduction to microbial control. In *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (pp. 3). Springer, Dordrecht.
- **Kenis, M., Hurley, B. P., Colombari, F., Lawson, S., Sun, J., Wilcken, C. et al. (2019).** Guide to the classical biological control of insect pests in planted and natural forests: Classical biological control. Rome, Italy: *FAO Forestry Paper*, 5 p.
- **Konno, K., & Mitsuhashi, W. (2019).** The peritrophic membrane as a target of proteins that play important roles in plant defense and microbial attack. *Journal of insect physiology*, 117, 103912.
- **Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019).** *Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy.* *Frontiers in Plant Science*, 10.
- **Koppenhöfer, A. M., Shapiro-Ilan, D. I., & Hiltbold, I. (2020).** Entomopathogenic nematodes in sustainable food production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 125.
- **Kramer KJ, Muthukrishnan S and Lowell J. (1997).** Chitinases for insect control. In: *Advances in insect control: The role of transgenic plants* (eds. Carozzi N and Koziel M), Taylor and Francis, Bristol, pp. 185–193.
- **Krieger de Moraes, C., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2003).** *Regulation of Extracellular Chitinases and Proteases in the Entomopathogen and Acaricide*

Metarhizium anisopliae. *Current Microbiology*, 46(3), 208.

- L -

- **Landis, D. A., Wratten, S. D., & Gurr, G. M. (2000).** Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annual review of entomology*, 45(1), 175-176.
- **Le, B., & Yang, S. H. (2019).** Microbial chitinases: properties, current state and biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(9), 144.
- **Lee, Y. S., & Kim, K. Y. (2015).** Statistical optimization of medium components for chitinase production by *Pseudomonas fluorescens* strain HN1205: role of chitinase on egg hatching inhibition of root-knot nematode. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(3), 472-474.
- **Leger RS, Cooper R, Charnley A. (1991).** Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* 58:415–426.
- **Li, R., Hu, C., Shi, Y., Geng, T., Lv, D., Gao, K. et al. (2019).** Silkworm storage protein Bm30K-19G1 has a certain antifungal effects on *Beauveria bassiana*. *Journal of invertebrate pathology*, 163, 40.
- **Liu, S. S., Chen, F. Z., & Zalucki, M. P. (2002).** Development and survival of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) at constant and alternating temperatures. *Environmental Entomology*, 31(2), 221.
- **Lopes, M. A., Gomes, D. S., Koblitz, M. G. B., Pirovani, C. P., de Mattos Cascardo, J. C., Góes-Neto, A., & Micheli, F. (2008).** Use of response surface methodology to examine chitinase regulation in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*. *mycological research*, 112(3), 402.
- **Lopes, F. C., Martinelli, A. H. S., John, E. B. O., & Ligabue-Braun, R. (2021).** Microbial Hydrolytic Enzymes: Powerful Weapons against Insect Pests. In *Microbes for Sustainable Insect Pest Management* (pp. 5-13). Springer, Cham.
- **Lynch, L. D., & Thomas, M. B. (2000).** Nontarget effects in the biocontrol of insects with insects, nematodes and microbial agents: the evidence. *Biocontrol News and Information*, 21(4).

- M -

- **Manish Kumar, Amandeep Brar, Monika Yadav, Aakash Chawade ID, V. Vivekanand and Nidhi Pareek, (2018).** Chitinases—Potential Candidates for Enhanced Plant Resistance towards Fungal Pathogens .pp 7.
- **McHugh, M. L. (2011).** Multiple comparison analysis testing in ANOVA. *Biochemia medica*, 21(3), 203-204.
- **Merzendorfer, H., Kelkenberg, M., & Muthukrishnan, S. (2016).** Peritrophic matrices. *Extracellular composite matrices in arthropods*, 277.
- **Miller M, Palofarvi A, Rangger A, Reeslev M, Kjoller A. (1998).** The use of fluorogenic substrates to measure fungal presence and activity in soil. *Appl Environ Microbiol* 64:613–617.
- **Mohammed Kuddus.(2014). Potentiel application of microbial chitinase: recent developement, Biochem. Cell. Arch. Vol. 14, No. 1, pp 2.**
- **Mondal, S., Baksi, S., Koris, A., & Vatai, G. (2016).** Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering*, 18(2), 89.
- **Muzzarelli, R. A. A. (1997).** Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53(2), 131–140.
- **Mustafa, U., & Kaur, G. (2009).** Extracellular enzyme production in *Metarhizium anisopliae* isolates. *Folia microbiologica*, 54(6), 500.

- N -

- **Nafiu, B. S., Dong, H., & Cong, B. (2014).** Principles of biological control in integrated pest management. *International Journal of Applied Research and Technology*, 3(1), 109-110.
- **Nawani, N. N., & Kapadnis, B. P. (2005).** Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs. *Process Biochemistry*, 40(2), 658-659.

- O -

- **Orr, D. (2009).** Biological control and integrated pest management. In *Integrated pest management: innovation-development process* (pp. 211). Springer, Dordrecht.

- P -

- **PA Aloise, M. Lumme et CA Haynes, (1996).** «N-Acetyl-D-glucosamine production

- from chitin-waste using chitinases from *Serratia marcescens* », in *Chitin Enzymology* , RAA Muzzarelli, Ed. , European Chitin Society , Grottammare, Italie., Pp. 581-594.
- **Paschapur, A., Subbanna, A. R. N. S., Singh, A. K., Jeevan, B., Stanley, J., Rajashekhar, H., & Mishra, K. K. (2021).** Unraveling the Importance of Metabolites from Entomopathogenic Fungi in Insect Pest Management. *Microbes for Sustainable Insect Pest Management: Hydrolytic Enzyme & Secondary Metabolite–Volume 2*, 92.
 - **Patil, R. S., Ghormade, V., & Deshpande, M. V. (2000).** Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and microbial technology*, 26(7), 476-477.
 - **Patil RS, Ghormade VV, Deshpande MV. (2000).** Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Technol* 26:473–483.
 - **Pan, X. Q., Shih, C. C., Harday, J. (2005).** Chitinase induces lysis of MCF-7 cells in culture and of human breast cancer xenograft B11–2 in SCID mice. *Anticancer Res.* 25, 3167–3172.
 - **Pattimore, J. A., Hane, J. K., Williams, A. H., Wilson, B. A., Stodart, B. J., & Ash, G. J. (2014).** The genome sequence of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* and comparative genomics of *Metarhizium* species. *BMC genomics*, 15(1), 8-9.
 - **Peixoto-Nogueira, S. C., Sandrim, V. C., Guimarães, L. H. S., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., & Polizeli, M. L. T. M. (2008).** Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source. *Bioprocess and biosystems engineering*, 31(4), 329.
 - **Petlamul, W., & Prasertsan, P. (2012).** Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity. *Mycobiology*, 40(2), 111.
 - **Philips, C. R., Fu, Z., Kuhar, T. P., Shelton, A. M., & Cordero, R. J. (2014).** Natural history, ecology, and management of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae), with emphasis on the United States. *Journal of Integrated Pest Management*, 5(3), 2.
 - **Pimenta, R. S., Morais, P. B., Rosa, C. A., & Correa, A. (2009).** Utilization of yeasts in biological control programs. In *Yeast biotechnology: diversity and applications* (pp. 200). Springer, Dordrecht.

- **Quesada-Moraga, E., Carrasco-Díaz, J. A., & Santiago-Álvarez, C. (2006).** Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*, 130(8), 448.

- R -

- **Ravi Kumar, M. N. R. (2000).** A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, 46(1), 1.
- **Regnault-Roger, C., Fabres, G., & Philogène, B. J. R. (2005).** *Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement*.
- **René F.H. (2007).** Lutte biologique, biodiversité et écologie en protection des plantes : Caractériser la biodiversité dans les agroécosystèmes. France. 4 p.
- **Rettinassababady C., Jeyalakshmi C. (2014).** Bio-Fungicides: The best alternative for sustainable food security and ecosystem. *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Securit.* 2(35): 404- 405.
- **Rustiguel, C. B. (2014).** Comparação das propriedades bioquímicas das quitinases produzidas por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*. thèse de doctorat : biologie comparée. l'école de philosophie, sciences et langues de ribeirão preto, usp : são paulo ffclrp-d département de biologie, 210.
- **Rustiguel, C. B., Rosa, J. C., Jorge, J. A., de Oliveira, A. H. C., & Guimarães, L. H. S. (2016).** Secretome analysis of *Metarhizium anisopliae* under submerged conditions using *Bombyx mori* Chrysalis to induce expression of virulence-related proteins. *Current microbiology*, 72(2), 222.

- S -

- **Sahai, A. S., & Manocha, M. S. (1993).** Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host—parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews*, 11(4), 317-320.
- **Shigemasa, Y., and Minami, S. (1996)** Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13: 383-420.
- **Sanda, N. B., & Sunusi, M. (2016).** Fundamentals of Biological Control of Pests. *International Journal of Clinical & Biological Sciences*, 1(6), 2–4. On ligne : <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19011.20002>

- **Savita, & Sharma, A. (2019).** *Fungi as Biological Control Agents. Soil Biology*, 397–399.
- **Seidl, V., Huemer, B., Seiboth, B., & Kubicek, C. P. (2005).** A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *The FEBS journal*, 272(22), 5923-5924.
- **Seidl, V. (2008).** Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*, 22(1), 36–42.
- **Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003).** Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(5), 413-414.
- **Sheppard, AW ; Paynter, Q ; Mason, P ; Murphy, S ; Stoett, P ; Cowan, P ; Brodeur, J ; Warner, K ; Villegas, C ; Shaw, R ; Hinz, H ; Hill ; Genovesi, P. (Eds). (2018).** *The Application of Biological Control for the Management of Established Invasive Alien Species Causing Environmental Impacts.* Sharm El-Sheikh, Egypt. 6 p.
- **Shigemasa, Y., and Minami, S. (1996).** Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13: 383-420.
- **Shivaji, S., & Prasad, G. S. (2009).** Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. In *Yeast biotechnology: diversity and applications* (pp. 3). Springer, Dordrecht.
- **Singha, A. K. (2010).** Optimization of culture conditions for thermostable chitinase production by *Paenibacillus* sp. D1. *African Journal of Microbiology Research*, 4(21), 2296.
- **Singh, S., Kumar, V., Dhanjal, D. S., & Singh, J. (2020).** Biological control agents: diversity, ecological significances, and biotechnological applications. In *Natural Bioactive Products in Sustainable Agriculture* (pp. 35). Springer, Singapore.
- **Skinner, M., Parker, B. L., & Kim, J. S. (2014).** Role of entomopathogenic fungi in integrated pest management. *Integrated pest management*, 169.
- **St Leger, R. J., Cooper, R. M., & Charnley, A. K. (1986).** Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Microbiology*, 132(6), 1512-1513.
- **Syed Ab Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2018).** Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102–111.

- **Táborsky, V. (1992).** *Small-scale processing of microbial pesticides* (No. 96). Food & Agriculture Org.
- **Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A., & Takagi, M. (1998).** Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(1), 60.
- **Thompson, S. N. (1999).** Nutrition and culture of entomophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 561-562.
- **Togawa, T., Nakato, H., & Izumi, S. (2004).** Analysis of the chitin recognition mechanism of cuticle proteins from the soft cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(10), 1059.
- **Toussaint, V. (1996).** Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycete EF76 antagoniste à *Phytophthora fragariae* var. *Rubi* causant le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de maître ès des sciences. Université de Sherbrooke, Québec, Canada., p52.

- V -

- **Van Driesche, R. G., & Abell, K. (2008).** Classical and Augmentative Biological Control. *Encyclopedia of Ecology*, 486–487.
- **Van Driesche, R. G., & Bellows, T. S. (1996).** Kinds of Biological Control Targets, Agents, and Methods. In *Biological Control* (pp. 25-26). Springer, Boston, MA.
- **Van Lenteren, J. C. (2012).** IOBC internet book of biological control, version 6. *International Organization for Biological Control*. Available at: http://www.iobcglobal.org/download/IOBC_InternetBookBiCoVersion6Spring2012.Pdf
- **Van Lenteren, J. C., & Bueno, V. H. (2003).** Augmentative biological control of arthropods in Latin America. *BioControl*, 48(2), 124.
- **Van Lenteren, J. C., & Martin, N. A. (1999).** Biological control of whiteflies. In *Integrated pest and disease management in greenhouse crops* (pp. 208). Springer, Dordrecht.
- **Veliz, E., Martínez-Hidalgo, P. et M. Hirsch, A. (2017).** Bactéries productrices de chitinase et leur rôle dans la lutte biologique. *Microbiologie AIMS*, 3 (3)

- W -

- **Wang SL, Yen YH, Tsiao WJ, Chang WT, Wang CL. (2002).** Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme Microb Technol* 31:337–344
- **Wu, J. H., Ali, S., & Ren, S. X. (2010).** Evaluation of chitinase from *Metarhizium anisopliae* as biopesticide against *Plutella xylostella*. *Pakistan Journal of Zoology*, 42(5).

- Z -

- **Zakaria, Z.A., Aguilar Gonzalez, C.N., Kusumaningtyas, R.D., Parameswaran, B. (Eds.). (2020).** Valorisation of Agro-industrial Residues – Volume II: Non-Biological Approaches. Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Suisse. 109-110.

Résumé

Tous les organismes vivants sont sujets à la prédation, au parasitisme ou à la concurrence d'autres organismes. L'étude de ces interactions a permis de développer de nombreux bio-pesticides basés sur des microbes vivants, leurs enzymes et d'autres composés bioactifs qui ont été évalués contre différents parasites en laboratoire et dans des champs agricoles. L'un d'entre eux, les champignons entomopathogènes qui sont potentiellement les agents de lutte biologique les plus polyvalents en raison de leur large gamme d'hôtes. Ils surmontent apparemment les barrières physiques de l'hôte en produisant de multiples enzymes extracellulaires, y compris des enzymes chitinolytiques, Une alternative convaincante utilisé en tant que biocatalyseurs importants ayant le potentiel de dissoudre la couche de chitine de la paroi cellulaire de plusieurs champignons phyto-pathogènes et du tégument des insectes. Dans ce travail, nous abordons la littérature concernant la chitine et les connaissances de base sur les enzymes dégradant ce polysaccharide structurel ; les chitinase fongique ont suscités de plus en plus d'intérêt en tant que candidats prometteurs à l'échelle commerciale pour lutter contre les ravageurs des plantes. Nous décrivons également les effets de certains champignons chitinolytique et leur utilisation potentielle comme pesticides et fongicides plus durables sur le terrain. Ces enzymes peuvent être utilisées directement comme agents de lutte biologique.

Mots-clés : Bio-contrôle, agents de lutte biologique, champignons chitinolytiques, entomopathogènes, Chitinase, Bio-pesticide, fongicide.

Abstract

All living organisms are subject to predation, parasitism or competition with other organisms. The study of these interactions has led to the development of many bio-pesticides based on living microbes, their enzymes and other bioactive compounds that have been evaluated against various pests in the laboratory and in agricultural fields. One of them, entomopathogenic fungi, are potentially the most versatile biological control agents because of their wide host range. They apparently overcome physical host barriers by producing multiple extracellular enzymes, including chitinolytic enzymes, a compelling alternative used as important biocatalysts with the potential to dissolve the chitin layer of the cell wall of several plant pathogenic fungi and the integument of insects. In this work, we discuss the literature on chitin and the basic knowledge of enzymes degrading this structural polysaccharide; fungal chitinases have gained increasing interest as promising commercial-scale candidates for plant pest control. We also describe the effects of some chitinolytic fungi and their potential use as more durable pesticides and fungicides in the field. These enzymes can be used directly as biological control agents.

Keywords: Bio-control, biological control agents, chitinolytic fungi, entomopathogens, Chitinase, Bio-pesticide, fungicide.

ملخص

تخضع جميع الكائنات الحية للافتراض أو التطفل أو المنافسة من الكائنات الحية الأخرى. أدت دراسة هذه التفاعلات إلى تطوير العديد من مبيدات الآفات الحيوية بناءً على الميكروبات الحية وإنزيماتها والمركبات النشطة بيولوجيًا الأخرى التي تم تقييمها ضد الآفات المختلفة في المختبر وفي المجالات الزراعية. أحدها، الفطريات الممرضة للحشرات والتي من المحتمل أن تكون أكثر عوامل مكافحة البيولوجية تنوعًا نظرًا لتنوع مضيفها الواسع. فهم يتغلبون على الحواجز الفيزيائية للطفيلي عن طريق إنتاج العديد من الإنزيمات خارج الخلية، بما في ذلك الإنزيمات المحللة للكيتين، وهي بديل مقنع يستخدم كمحفزات حيوية مهمة مع القدرة على إذابة طبقة الكيتين من جدار الخلية للعديد من الفطريات النباتية ومسببات الأمراض وتكامل الحشرات. في هذا العمل، نتعامل مع الأدبيات المتعلقة بالكيتين والمعرفة الأساسية عن الإنزيمات التي تحط من عديد السكاريد الهيكلي؛ حيث جذبت الكيتيناز الفطرية اهتمامًا متزايدًا كمرشحين واعددين على نطاق تجاري للسيطرة على آفات النباتات. وصفنا أيضًا تأثيرات بعض الفطريات الحاملة للكيتين واستخدامها المحتمل كمبيدات حشرية ومبيدات فطريات أكثر متانة في هذا المجال. يمكن استخدام هذه الإنزيمات مباشرة كعوامل تحكم بيولوجية

الكلمات المفتاحية: مكافحة الحيوية، عوامل مكافحة البيولوجية، الفطريات المحللة للكيتين، العوامل الممرضة للحشرات، الكيتيناز، مبيدات الآفات الحيوية، مبيدات الفطريات

Annexe

Annexe

- **Produits chimiques et réactifs**

les produits chimiques ont été obtenus auprès de Guangzhou Jinhua chemical reagent company, Guangzhou, Chine. La chitine obtenue à partir de la carapace de crabe a été achetée auprès de Sinopharm Chemical Reagent Company, Shanghai, Chine.s et réactifs