

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université 08 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de
l'Univers

Département d'écologie et génie de l'environnement



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

*En vue de l'obtention du diplôme de Master en
phytopathologie et phytopharmacie.*

**Thème : Etude structurale et fonctionnelle sur
la chitinase famille 18 en utilisant des outils de
bioinformatique**

Présenté par :

BOUHALIT Sameh

GOUADJELIA Saida

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme. ALLIOUI. N M. A. A - Université de Guelma

Examineur : Mr. BOUMAAZA.B M. A. A - Université de Guelma

Encadreur : Mr. BAALI. S M. A. B - Université de Guelma

Juin 2015

Remerciement

Avant tout nous remercions le « Dieu » qui nous a montré le droit chemin, qui nous emmené à ce stade éducatif.

Comme toute thèse, cette recherche a été ponctuée de nombreux moments d'enthousiasme et de joie, mais également de nombreuses périodes de doute et de découragement. L'achèvement de ce travail n'aurait pas été possible sans la précieuse contribution de nombreuses personnes que je veux remercier ici.

*Nous tenons à exprimer nos plus vives reconnaissances à notre Directeur de Recherche, Monsieur le **BAALI SALIM**, sans lui ce travail n'aurait pas été possible. Ses capacités scientifiques et ses compétences étaient notre grand support. Notre projet sous sa direction était pour nous un grand honneur et un immense bonheur. Nous le remercions très sincèrement pour la confiance qu'il nous' a accordé en acceptant de diriger cette recherche. Par son soutien, sa disponibilité, ses précieux conseils, il nous' a permis d'accomplir ce travail*

Nous tenons à remercier spécialement les membres du jury qui ont pris sue leur temps et aménager leur volonté pour examiner et porter une analyse critique sur notre travail.

Nous souhaitons adresser nos sincères remerciements à tous ceux qui nous ont apporté de près ou de loin

Enfin, nous exprimons tous le bonheur du monde à nos collègues de la promotion 2015 de Master phytopathologie phytopharmacie.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes chers êtres dans ma vie :

À mes parents, qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes Études, pour leur amour, leur tendresse, et pour leur soutien matériel et surtout moral durant toute ma vie.

À mon frères Ahmed et ma sœur Wahiba.

À mon marie Tarek.

À mon binôme et tous mes amies surtout la belle amie Zina qui je l'aime beaucoup et Hala.

*À tous les étudiants de notre promo phytopathologie et phytopharmacie.
2014/2015.*

A tous ceux qui m'ont encouragé et qui m'ont aidé et qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à la réalisation de ce Modest travail.

SAIDA

Dédicace

Pour tout début, il y a une fin, et ce qui est beau dans toute fin, c'est la réussite et l'attente du but

*En premier lieu, je dédie le fruit de modeste travail à celui qui m'a toujours comblé par son amour et m'a servi de soutien aux moments les plus durs de ma vie, mon chère **PERE**, qui a été la source nécessaire pour terminer mes études lui seul qui est resté la guide de ma vie,*

Je souhaite qu'ALLAH le protégé

*A celle que l'on aime et qui reste la plus belle, c'est ma **MERE**, elle m'a toujours prodigué son affection et sa tendresse, qui m'a toujours donné le courage, la volonté,*

je souhaite qu'ALLAH le protégé

*A mon très chère frère que sont le plus beau cadeau :
NOUNOU*

*A mes sœurs et mes frères : BESMA, HASSINA, FAYCEL,
ISLEM*

A leurs enfants : MANER, HASSEN, AMIRA, SOUDJOU

*Un bouquet des plus beaux, pour tous c'est que j'aime du fond du cœur : ILHEM, AHLEM, WARDA, SAIDA,
AMINA*

A un ami près du cœur, qu'il connaisse le bonheur à qui je vais montrer par un poème son amitié : AHMED BHELIL

*A toute mes camarades de promotion de phytopathologie et
phytopathologie*

Au nom de DIEU le tout puissant qu'en remercie amplement et qui répand à notre Douaa.

SAMEH

Sommaire

Remerciement.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Liste des abréviations.

Résumé.

Introduction.

Chapitre I : Etude bibliographique

I- La bioinformatique

1. Définition et historique.....	1
2. L'objectif de la bioinformatique	2
3. Relation de la bioinformatique avec d'autres domaines.....	3
4. Les champs d'application	4
5. Banques et bases de données biologiques	5
5.1. Les Bases de données	5
5.2. Les Banques de données:.....	6
5.2.1. Les banques de séquences généralistes	7
5.2.2. Les banques de données de séquences spécialisées	10
6. Les interfaces des banques de données.....	12
6.1. La cristallographie aux rayons X	12

6.2. La Résonance Magnétique Nucléaire RMN	14
--------------------------------------------------	----

II. La chitine et les chitinases

1.Chitine	16
1.1. Structure	16
2 .Les chitinases	18
2. 1. Historique	18
2. 2. Définition	18
2.3. Classification des chitinases	19
2.4. Classification des chitinases <i>selon leurs</i> origines.....	23
2.4.1. Les Chitinases des microorganismes et bactéries	23
2.4.2. Les chitinases fongiques	24
2.4.3. Les chitinases parasitaire	25
2.4.4. Les Chitinases animales	25
2.4.5. Les chitinases des insectes	25
2.5. Propriétés physico-chimiques des chitinases	25
2.5.1. Le poids moléculaire	25
2.5.2. Le point isoélectrique (pHi).....	26
2.5.3. Activité enzymatique.....	26
2.5.4. La stabilité.....	26
2.6. Inhibiteur et activateur des chitinases.....	26
2.7. Les chitinases végétales et développement	27
2.8. Les Chitinases végétales et défense	30

2.9. Fonctions et rôles des chitinases	31
----------------------------------------------	----

Chapitre II : Matériels et Méthodes.

1 .PyMol	33
1.1. Présentation des interfaces	34
1.1.1. La fenêtre de contrôle	34
1.1.2. La fenêtre de visualisation	35
2. Protein Data Bank (PDB)	35
3. Structure des chitinase utilisées	36

CHAPITRE III : Résultats et discussions

1. Étude structurale de chitinase.....	37
2. Étude fonctionnelle de chitinase.....	43

Conclusion.

Référence bibliographique.

Liste des figures

N° : Figure	Titres	Pages
Fig : 01	Les champs d'application de la bioinformatique	05
Fig : 02	Evolution du nombre d'entrée dans la banque de structures 3D, la PDB.	06
Fig : 03	Les banques de données biologiques	07
Fig : 04	Evolution du nombre d'entrées et du nombre de nucléotides stockés par la banque GenBank depuis 1982.	08
Fig : 05	Evolution du nombre d'entrée dans la banque TrEMBL depuis sa création en 1996.	09
Fig : 06	Evolution du nombre d'entrée de la banque Swiss-Prot depuis sa création en 1986.	10
Fig : 07	Détermination de structure par Biocristallographie	12
Fig : 08	Diffraction des rayons X par un échantillon de cristal	13
Fig : 09	La Résonance Magnétique Nucléaire	14
Fig : 10	Chaîne linéaire de chitine	16
Fig : 11	Chitine: Substrat hydrolyse totalement par les chitinases au niveau des liaisons N-acetyl- glucosamine .	19
Fig : 12	Chitosane: Substrat hydrolysé partiellement par les chitinases au niveau des liaisons N-acetyl- glucosamine.	19
Fig : 13	Peptidoglycane: Substrat hydrolyse partiellement par les chitinases au niveau des liaisons N-acetyl- glucosamine.	20
Fig : 14	Monomères de chitine avec représentation des sites d'action des endo- et des exochitinases.	20
Fig : 15	Présentation schématique des différents domaines constituant les 5 classes de chitinases chez les plantes.	22
Fig : 16	Structures de l'allosamidine, c'est un dimère de β -Nacetylallosamine lié avec dimethyl aminocyclitole.	27
Fig : 17	Chitinase issue de graines d'orge.	28

Fig : 18	Capture d'écran de l'application PYMOL	33
Fig : 19	La fenêtre de contrôle	34
Fig : 20	La fenêtre de visualisation.	35
Fig : 21	image de l'interface web pdb	36
Fig : 22	Modèle tridimensionnel de la chitinase, famille 18, classe v chez <i>Arabidopsis thaliana</i> , avec le tonneau formé par les 8 unités α/β . image générée par Pymol	38
Fig : 23	Modèle tridimensionnel des chitinases de la famille 18 (chitinase B chez <i>Serratia marcescens</i>)	39
Fig : 24	Modèle tridimensionnel du domaine CBD chitinase famille 18 chez <i>Serratia marcescens</i> image générée par pymol.	40
Fig : 25	Régions conservées chez les chitinases de la famille 18 : résidus catalytiques conservés dans toutes les séquences (*) avec un résidu aspartate et un résidu glutamate, qui joue un rôle clé dans le mécanisme catalytique	40
Fig : 26	Modèle tridimensionnel des chitinases de la famille 18 (chitinase b chez <i>Serratia marcescens</i>), avec le site catalytique marqué (la région verte) au centre du tonneau formé par les 8 unités α/β . image gènère par pymol (code pdb 1E6N).	41
Fig : 27	Modèle tridimensionnel des chitinases de la famille 18 (chitinase b chez <i>Serratia marcescens</i>) en complexe avec la N-acétylglucosamine-pentamère (code pdb 1E6N). Corps de l'enzyme en rose, site de liaison en vert et NAG5 en bleu.	41
Fig : 28	Visualisation du site de liaison du NAG5 (en bleu ciel) consistant en 12 acides aminés : Trp97, Gln144, Tyr145, Asp142, Tyr98, Glu221, Trp403, Trp 220, Arg294, Asp215, Tyr214, Gln 407(Van Aalten et al.,2001). Générée par Pymol.	42
Fig : 29	Le mécanisme catalytique des hydrolases de glycoside, famille18.Générée par Pymol.	43

Liste des tableaux

N°:Tableaux	Titres	Pages
Tab : 01	Une brève promenade historique le long de quelques évènements biologiques ou informatiques	01
Tab : 02	les formes cristallines de chitine.	17
Tab : 03	Classification des différentes chitinases en fonction de leurs séquences en acides aminés et de leur provenance.	23
Tab : 04	Structure des chitinase utilisées .	36

Liste des abréviations

ACD : Advanced Chemistry Development.

ADNc : Acide désoxyribonucléique Complémentaire.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide Ribonucléique.

Asp : Aspartique

BMRB : Biologie Magnétique Résonance Bank.

BNL : Brookhaven National Laboratory.

C : Carbones.

Ca : calcium.

CBD : Chit résidu in BindingDomain.

ChiB : chitinase bactérienne.

CHB10 : souche de *Burkholderia gladioli*.

DOE : Agence Fédérale Responsable des Programmes Nucléaires aux Etats-Unis.

EBI : European Bioinformatics Institute.

EDSAC : Electronic Delay Storage Automatic Computer.

EDVAC : Electronic Discret Variable Computer.

EMBL : European Molecular Biology Laboratory sequence data base.

EMBO : European Molecular Biology Organization.

ENIAC : Electronic Numerical Integrator and Computer.

EST : Marqueurs de Séquences Exprimées.

ExPASy : Expert Protein Analysis System .

His : **H**istidine.

HUT6037 : *Streptomyces griseus*.

GDB : **G**enome **d**ata **b**ase.

GenBank : **G**enetic **s**equenced **d**atabase.

GLcNAc : poly β -1,4 acetyl glucosamine.

GLU : **g**lutamine .

Gly : **g**lycine.

IA : **I**ntelligence **A**rtificielle.

IBM : **I**nformatique **B**iologie **M**oléculaire.

JIPID : **J**apan **I**nternational **P**rotein **I**nformation **D**ata base.

KDa : **kiloD**alton.

MHC : **M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex.

MIPS : **M**artinsried **I**nstitute for **P**rotein **S**equences.

NBRF : **N**ational **B**iochemical **R**esearch **F**oundation.

NCBI : **N**ational **C**enter for **B**io**T**echnology **I**nformation.

NIG : **N**ational **I**nstitute of **G**enetics.

PCR : **P**olymérase **C**hain **R**éaction.

PDB : **P**rotein **D**ata **B**ank.

PDBe : **P**rotein **D**ata **B**ank **E**urope.

PDBj : **P**rotein **D**ata **B**ank **J**apon.

PDP : **P**rogrammed **D**ata **P**rocessor.

PH : **P**otentiel **H**ydrique.

PHi : **L**e **p**oint **i**soélectrique.

PR : Pathogenèses-**R**elated **p**roteins.

PI : Point Isoélectrique.

PIR :Protein **I**nformation **R**esource

PM:Pois **M**oléculaire

PPP :Prokaryotic **P**romoter **P**rediction

ProtMotDB : Protein **M**otions **D**ata **B**ank

RMN :Résonance Magnétique Nucléaire

SBDS :Base de **D**onnées **S**pectrale Pour les Composés Organiques

S : sataphylococcus

Ser/thr: **S**erine /**thr**éonine

Sp: espèce

Swiss-Prot : Annotated **P**rotein sequence data base

Swiss 3D : Image Trois **D**imension

t: temps

TrEMBL :Traduction **E**MBL

try : tryptophane

tyr : tyrosine

UniProt : Universal **P**rotein Resource

UNIVAC :UNIVersal Automatic Computer

UV : ultra violet

3D : Trois **D**imensions

% :pourcent

α : Alfa

β : beta

γ : gamma

$^{\circ}$:degré

C° :**d**egré **C**elsius

Résumé :

Au cours des années passées, il y a un besoin pour des nouvelles méthodes *in silico*, en utilisant des outils bioinformatiques, et parce que les chitinases sont des molécules très importantes dans la phytopathologie et sont utilisées dans différentes méthodes pour améliorer la résistance contre les pathogènes et les insectes. Ce travail vise à étudier et modéliser *in silico* la structure tridimensionnelle de chitinase, ainsi que la fonction et la relation structure-fonction de la famille 18 des chitinases, avec le logiciel Pymol.

Pour ce faire, les données de deux structures tridimensionnelles ont été extraites de la banque de données Pdb pour l'étude structurale et fonctionnelle, se focalisant sur le site actif, pour déterminer ses acides aminés clés, responsables de sa fonction, qui est l'hydrolyse du substrat, la chitine en l'occurrence, en attaquant la liaison ((1→4)-β).

Les mots clés : Chitinases famille 18, *in silico*, logiciel Pymol, pdb.

Summary:

During years passed, there is a need for new Methods *in silico*, uses tools of them bioinformatics, and because the chitinases are molecules very significant in phytopathology and are used in different methods to improve resistance against the pathogenic ones and insects. This work aims to study and model *in silico* the three-dimensional structure of chitinase, as well as the function and the relation structure-function of family 18 of the chitinases, with the Pymol software.

With this intention, the data of two three-dimensional structures were extracted from the bank of Pdb data for the structural and functional study, being focused on the active site, to determine its key amino acids, persons in charge for its function, which is the hydrolysis of the substrate, chitin in fact, by tackling the connection ((1→4)-β).

Key words: Chitinases family 18, *in silico*, software Pymol, Pdb.

الملخص:

تميزت السنوات القليلة الماضية باستعمال طرق جديدة في مجال البحوث البيولوجية تتمثل في دراسة بنية البروتينات ووظيفتها باستعمال وسائل بيومعلوماتية Bioinformatic tools, ولان إنزيمات chitinases بروتينات جد مهمة في مقاومة النباتات للعوامل الممرضة خاصة الفطريات و الحشرات، فلقد عمدنا في هذا العمل إلى دراسة بنية وآلية عمل إنزيم chitinase من العائلة 18 باستعمال برنامج Pymol الخاص بالرسم البياني الجزيئي Molecular graphics system، والمستعمل خصيصًا لتصميم وعرض البنيات ثلاثية الأبعاد للبروتينات، لأجل ذلك لجأنا إلى استخراج بنيات chitinases من العائلة رقم 18 لكائنات حية مختلفة (نباتات بكتيريا .. الخ) من بنك البروتينات PDB ثم دراسة البنية الفراغية للإنزيم، أين ركزنا على بنية الموقع الفعال للإنزيم محدد الأحمض الأمينية المتدخلة في وظيفة الإنزيم المتمثلة في إماهة مادة التفاعل (Chitin) عبر تكسير الروابط ((1→4)-β).

الكلمات المفتاحية: إنزيم chitinase، وسائل بيومعلوماتية، برنامج Pymol, PDB .

Les végétaux possèdent une gamme de Substances très variées pour lutter contre les divers agents pathogènes .Ces substances sont exprimées de façon constitutive ou inductive. Parmi ces substances, certaines enzymes ont la propriété d'hydrolyser des polysaccharides pariétaux bactériens ou fongiques. Ainsi, les chitinases dégradent la chitine, les chitosanases affectent le chitosane, les β -1,3-glucanases hydrolysent les β -1,3-glucanes Similaires à la laminarine et les lysozymes dégradent le peptidoglycane. La chitine, le chitosane et les β -1,3-glucanes se trouvent souvent dans les parois de champignons (les champignons phytopathogènes), tandis que le peptidoglycane est un constituant des parois de bactéries.

Les chercheurs sont désormais contraints de travailler à différents niveaux d'investigation du vivant: les méthodes alternatives *in vitro* font appel aux tests de laboratoire sur des composants d'origine biologique (cellules, protéines...) et les méthodes *in silico* se réfèrent à l'utilisation de modèles mathématiques, réalisés à l'aide d'outils informatiques, on utilise le programme pymol pour étudier la structure et la fonction d'une enzyme « chitinase ».

L'analyse fonctionnelle *in silico* est définie comme l'ensemble des techniques bioinformatiques qui permettent d'obtenir une information sur la fonction et la structure d'une protéine, quand on ne dispose que de sa séquence en acides aminés, la bioinformatique et permet de :

- L'utilisation des ordinateurs pour recueillir, analyser et interpréter les données biologiques au niveau moléculaire.
- Un ensemble d'outils logiciels pour l'analyse de séquences moléculaires.

Afin de présenter l'étude menée en ce sens, le présent manuscrit s'articule en deux parties : l'une bibliographique et l'autre est consacrée à l'application de l'outil pymol.

Dans la partie bibliographique :

- Le premier chapitre concerne des généralités sur la bioinformatique et les travaux de recherche sur la chitinase
- Le deuxième chapitre est dédié à une modélisation poussée par pymol des spécificités structurales de la chitinase 18.
- La partie d'application présente les résultats et discussions sur la structure et la fonction de la chitinase 18.

I- La bioinformatique

1. Définition et historique

La bioinformatique est la discipline scientifique récente qui englobe la collecte, l'organisation et l'analyse de données biologiques au moyen de l'outil informatique. Le terme bioinformatique, aussi appelé en anglais « computational biology » ou « *in silico* biology » regroupe sous le même mot, deux approches. La première approche correspond à la sensibilité plus informatique du domaine et consiste en l'élaboration d'algorithmes et le développement de programmes pour extraire l'information biologique ainsi que la création de banques de données. La seconde approche correspond à la bio-analyse dont le but est centré sur l'analyse de ces données et leur signification dans un contexte biologique. Ces deux approches, bio-analytique et informatique, sont complémentaires et sont naturellement liées l'une à l'autre dans leur évolution (Tableau 01). En effet, l'étude d'un système biologique complet n'est rendue possible que par l'existence d'outils adaptés et performants et la bonne compréhension des systèmes biologiques permet de mettre au point des programmes adaptés et efficaces.

La bioinformatique est une discipline jeune qui date de la seconde moitié du vingtième siècle (Tableau 1). Elle doit son essor à l'émergence et à la diffusion de l'informatique qui a permis de disposer d'ordinateurs puissants capables de stocker et de traiter un nombre croissant de données. La bioinformatique doit également son développement à la compréhension des objets biologiques majeurs (ADN, ARN et protéine) et l'avènement d'outils de prédictions (Tableau 1). L'évolution conjointe de ses deux approches de la bioinformatique en fait actuellement une discipline indispensable à la compréhension du vivant. (1)

Tableau 1. Une brève promenade historique le long de quelques événements biologiques ou informatiques.

Date	Evènement
1953	Modèle en double hélice de l'ADN (Watson et <i>al.</i> , 1953) Détermination de la séquence de la chaîne A et B de l'insuline
1956	La structure tridimensionnelle d'une protéine est fonction de sa séquence
1961-1965	Déchiffrage du code génétique
1970	Algorithme d'alignement optimal global entre deux séquences de protéines

1980	Création de la banque européenne de séquences nucléiques EMBL Algorithme d'alignement optimal local de séquences
1982	GenBank Création de la banque américaine de séquences nucléiques
1983	Invention de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)
1986	Création de la banque de séquences protéiques (Swiss-Prot) Création de la banque japonaise de séquences nucléiques (DDBJ) Apparition du terme « genomic »
1991	1 ^{er} séquençage à grande échelle d'ADNc (EST)
1992	Séquençage complet du chromosome III de levure
2000	Séquençage du 1er génome de plante : <i>Arabidopsis thaliana</i>
2002	Séquence préliminaire du génome de la souris
2004	*Séquence du génome complet de 4 nouveaux champignons (Dujon et <i>al.</i> , 2004) *Séquence du génome complet de <i>Gallus gallus</i>
2005	Séquence du génome complet de 2 trypanosomes
2006	Séquençage de plusieurs primates, du cochon, de la vache, du cheval, du kangourou, de l'éléphant, du mouton, du chien, du chat, du lapin, de la grenouille, du poisson zèbre, etc. (soit plus de 600 génomes eucaryotes complets en cours de séquençage)
Février 2015	Plus de 18.900 génomes eucaryotes et procaryotes séquencés et des milliers en projet - le développement de la banque de données EMBL (banque européenne créée en 1980) - le développement de la banque de données Genbank (créée en 1982 et diffusée par le NCBI) (6)

2. L'objectif de la bioinformatique

La bioinformatique, nouvellement incluse dans les systèmes. C'est une discipline qui permet l'analyse et l'interprétation des informations biologiques contenues soit dans le génome (séquences ADN, ARN) soit dans le protéome. On peut également la définir comme étant la

discipline de l'analyse «*in silico*» de l'information biologique contenue dans les séquences nucléiques et protéiques. La Bioinformatique est devenu une partie importante de nombreux domaines de la biologie, Le rôle actuel de la bioinformatique est d'aider biologistes collecte et le traitement Les données économiques pour étudier la fonction des protéines. Un autre rôle important est d'aider les chercheurs dans les entreprises pharmaceutiques en faire des études détaillées de structures de protéines à la conception de médicaments liter (Friedman et *al.*, 2000)

- Compilation et organisation des données biologiques dans des banques de données : ces banques sont soit généralistes (elles contiennent le plus d'information possible sans expertise particulière de l'information déposée), soit spécialisées dans un domaine autour de thèmes précis.

- Traitements systématiques des données : l'objectif principal est de repérer et de caractériser une fonction et/ou une structure biologique importante. Les résultats de ces traitements constituent de nouvelles données biologiques obtenues "in silico".

- Elaboration de stratégies :

- le but est d'apporter des connaissances biologiques supplémentaires en combinant les données biologiques initiales et les données biologiques obtenues "in silico".
- ces connaissances permettent, à leur tour, de développer de nouveaux concepts en biologie.
- concepts qui nécessitent l'élaboration de nouvelles théories et outils en mathématiques et en informatique. (Kanehisa et *al.*, 2003)

Les tâches typiques effectuées dans bioinformatique comprennent:

- Déduire la forme et la fonction d'une protéine à partir d'une donnée d'une séquence d'acides aminés

- Trouver tous les gènes et les protéines dans un génome donné,

- les sites de la protéine structurale

- Détermination ture où les molécules de médicament peut être attaché (Friedman et *al.*, 2000).

3. Relation de la bioinformatique avec d'autres domaines

La bioinformatique et la biologie computationnelle ont des objectifs et des approches similaires, mais ils diffèrent dans l'échelle: la bioinformatique organise et analyse des données biologiques de base, alors que la biologie computationnelle construit des modèles théoriques

des systèmes biologiques, comme la biologie mathématique fait avec des modèles mathématiques.(Gisel et *al.*, 2011)

4. Les champs d'application

Plusieurs champs d'application ou sous-disciplines de la bioinformatique se sont constitués :

- La bioinformatique des séquences, qui traite de l'analyse de données issues de l'information génétique contenue dans la séquence de l'ADN ou dans celle des protéines qu'il code. Cette branche s'intéresse en particulier à l'identification des ressemblances entre les séquences, à l'identification des gènes ou de régions biologiquement pertinentes dans l'ADN ou dans les protéines, en se basant sur l'enchaînement ou séquence de leurs composants élémentaires (nucléotides, acides aminés).
- La bioinformatique structurale, qui traite de la reconstruction, de la Prédiction de la structure des protéines est une autre application importante de la bioinformatique .L' acide aminé séquence d'une protéine, ladite structure primaire , peut être facilement déterminé à partir de la séquence du gène qui code pour elle. Dans la grande majorité des cas, cette structure primaire qui détermine de façon unique une structure dans son environnement natif. La connaissance de cette structure est essentielle dans la compréhension de la fonction de la protéine. Les informations structurelles est généralement classé comme l'un des secondaire , tertiaire et quaternaire structure. Une solution générale viable pour de telles prédictions reste un problème ouvert. La plupart des efforts ont jusqu'à présent été dirigée vers heuristiques qui fonctionnent la plupart du temps. (Gisel et *al.*, 2011)
- La bioinformatique des réseaux, qui s'intéresse aux interactions entre gènes, protéines, cellules, organismes, en essayant d'analyser et de modéliser les comportements collectifs d'ensembles de briques élémentaires du Vivant. Cette partie de la bioinformatique se nourrit en particulier des données issues de technologies d'analyse à haut débit comme la protéomique ou la transcriptomique pour analyser des flux génétiques ou métaboliques.
- La bioinformatique statistique et la bioinformatique des populations (Jean et *al.*,2007)

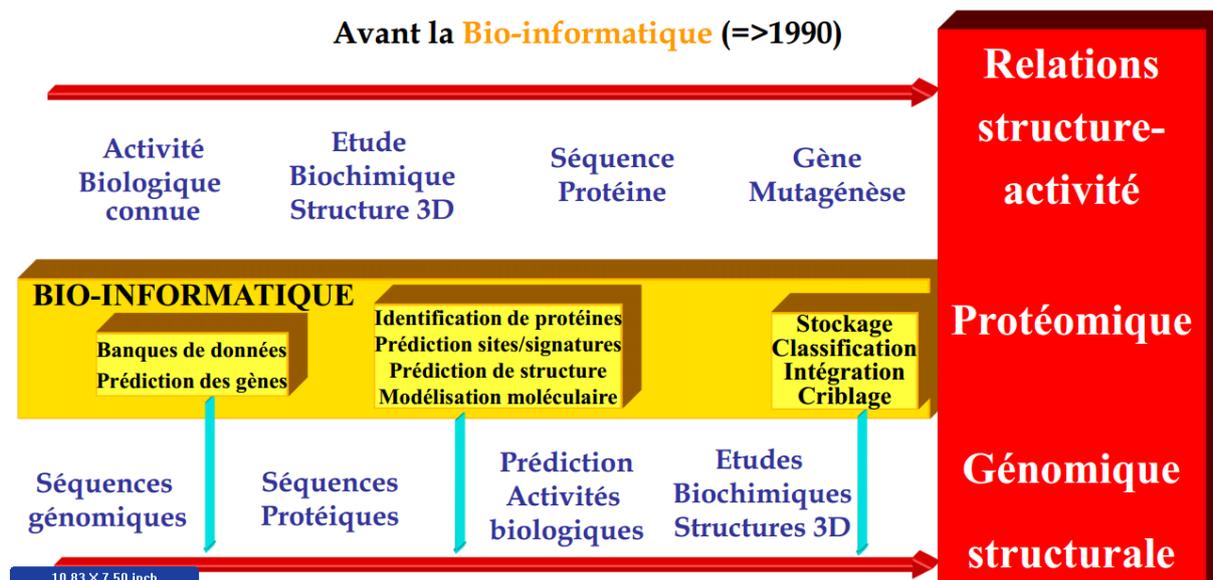


Figure 1. Les champs d'application de la bioinformatique (2)

5. Banques et bases de données biologiques

➤ Base de données:

Ensemble de données organisé en vue de son utilisation par des Programmes correspondant à des applications distinctes et de manière à faciliter l'évolution Indépendante des données et des programmes.

➤ Banque de données:

Ensemble de données relatif à un domaine défini des connaissances et Organisé pour être offert aux consultations d'utilisateurs (Smith *et al.*, 1981)

5.1. Les Bases de données

Les Bases de données sont essentielles pour la recherche et les applications de bioinformatique. Il Ya un grand nombre de bases de données disponibles couvrant presque tout de séquences ADN et de protéines, structures moléculaires, les phénotypes et la biodiversité. Bases de données tombent généralement dans l'un des trois types. Certains contiennent des données résultant directement de méthodes empiriques telles que coups de grâce de gènes. D'autres sont des données prédites, et la plupart contiennent les données des deux sources. Il Ya méta-bases de données qui intègrent les données compilées à partir de plusieurs autres bases de données. D'autres sont spécialisés, comme ceux qui sont spécifiques à un organisme. Ces bases de données varient dans leur format, le mode de l'adhésion et qu'elles soient publiques ou non. Certaines bases de données les plus couramment utilisés sont énumérés ci-dessous. Pour une liste plus complète.

- Utilisé dans Motif Constatation
- Utilisé dans Gene Ontology
- Utilisé dans Gene Constatation
- Utilisé dans la recherche de structures protéiques / Famille
- Utilisé pour Next Generation Sequencing
- Utilisés dans l'analyse de l'expression génétique
- Utilisés dans l'analyse Réseau, des réseaux fonctionnels (Gisel et *al.*,2011)

5.2. Les Banques de données

Fondée en 1971 par le Laboratoire national de Brookhaven, la Banque de données des protéines a été transférée en 2003. La banque de données sur les protéines du *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*, plus communément appelée Protein Data Bank ou PDB est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (ou structure 3D) de macromolécules biologiques : protéines, essentiellement, et acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN. Ces données expérimentales sont déposées dans la PDB par des biologistes et des biochimistes du monde entier et appartiennent au domaine public. Leur consultation est gratuite et peut se faire directement depuis les sites web de la banque.

- Europe : PDBe ;
- Japon : PDBj ;
- États-Unis.

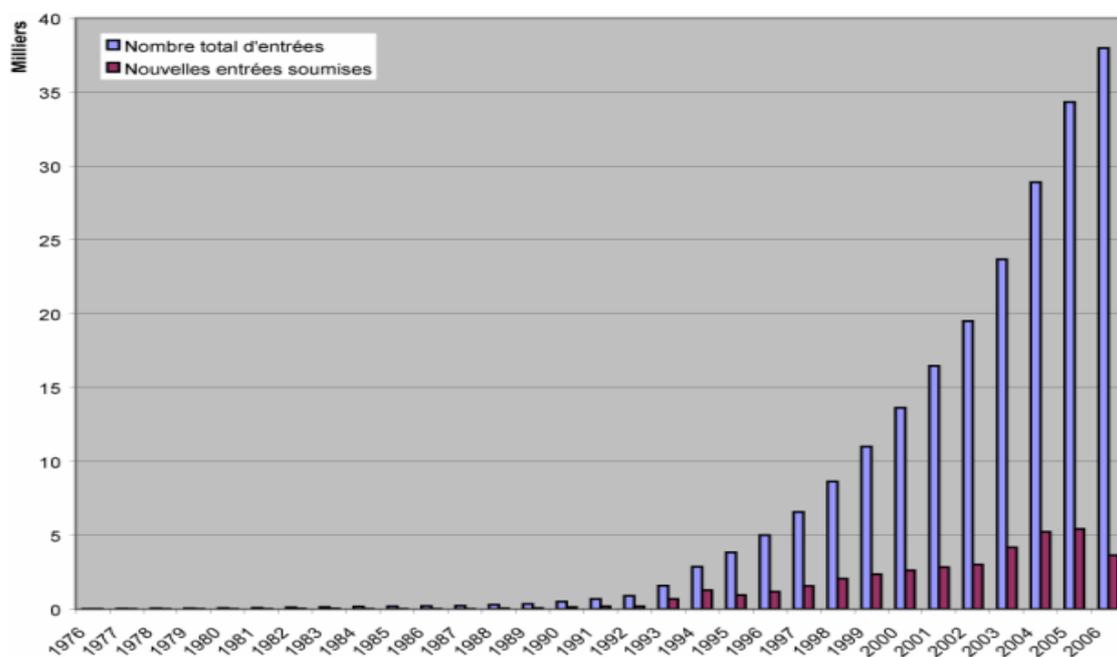


Figure 2. Evolution du nombre d'entrée dans la banque de structures 3D, la PDB. (3)

La PDB est la principale source de données de biologie structurale et permet en particulier d'accéder à des structures 3D de protéines d'intérêt pharmaceutique. (Berman et *al.*, 2000)

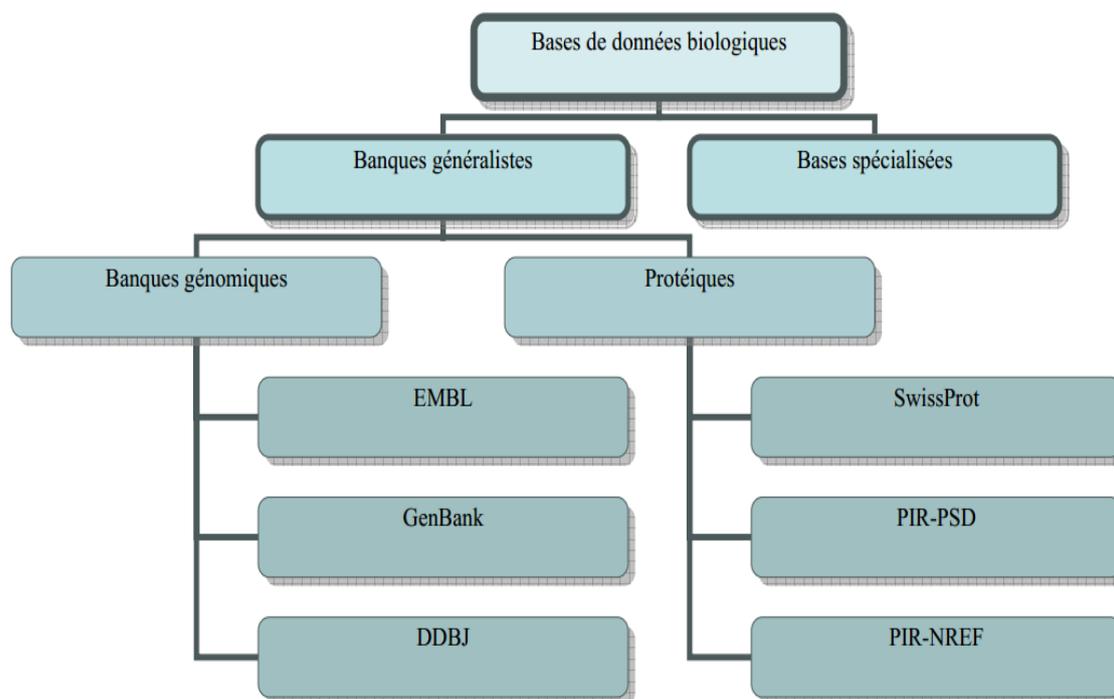


Figure 3. Les banques de données biologiques (2)

5.2.1. Les banques de séquences généralistes

C'est au début des années 80 que les premières banques de séquences sont apparues sous l'initiative de quelques équipes dont la première à l'initiative de Grantham et C. Gautier à Lyon. Très rapidement avec les évolutions techniques du séquençage, la collecte et la gestion des données ont nécessité une organisation plus conséquente. Ainsi, plusieurs organismes ont pris en charge la production de telles bases de données.

➤ **Trois banques de séquence nucléiques:**

- **EMBL:**

Banque européenne créée en 1980 et financée par l'EMBO (EuropeanMolecularBiology Organisation), elle est aujourd'hui diffusée par l'EBI (EuropeanBioinformatics Institute, Cambridge,) développée au sein du Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire situé à Heidelberg (Allemagne), elle est maintenant diffusée par l'EBI (EuropeanBioinformatics Institute) Cette banque contient 74 491 158 213 nucléotides dans 44 538 943 entrées à la date du Vendredi 22 Octobre 2004.

- **GenBank:**

Créée en 1982 par la société IntelliGenetics et diffusée maintenant par le NCBI (National Center for Biotechnology Information, Los Alamos, US) Cette banque contient 74 491 158 213 nucléotides dans 44 538 943 entrées à la date du Vendredi 22 Octobre 2004

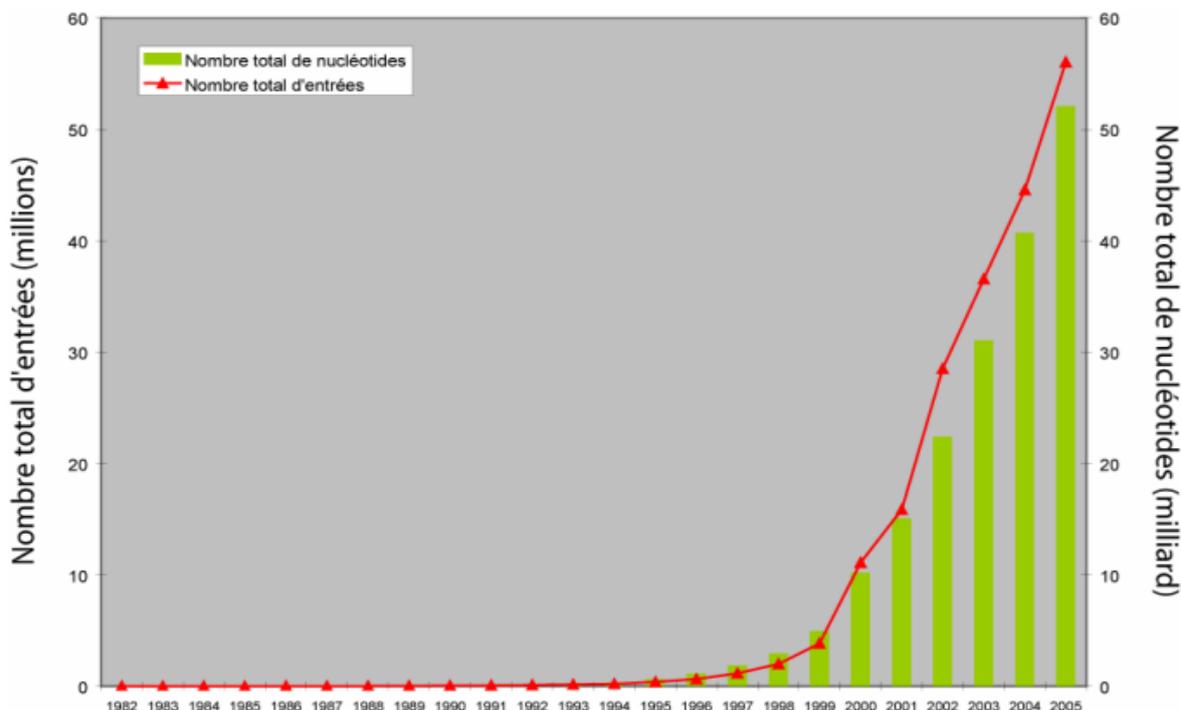


Figure 4. Evolution du nombre d'entrées et du nombre de nucléotides stockés par la Banque GenBank depuis 1982. (4)

- **DDBJ:**

Créée en 1986 et diffusée par le NIG (National Institute of Genetics, Japon) elle contient 42245 956 937 nucléotides dans 37 926 117 entrées à la date du Vendredi 22 Octobre 2004.

➤ **Cinq banques protéiques :**

- **TrEMBL:**

Données générées par traduction automatique des informations génétiques de la banque de données EMBL (TrEMBL = Traduction EMBL) Annotation automatique.

La banque TrEMBL pour Translation from EMBL est décrite comme un supplément de Swiss-Prot. En effet, TrEMBL, distribuée par l'EBI, contient la traduction de toutes les parties codantes annotées figurant dans la banque EMBL, à l'exception des protéines figurant dans Swiss-Prot. TrEMBL constitue ainsi un dépôt de séquences non validées et faiblement annotées, qui vont par la suite être examinées par les annotateurs de Swiss-Prot pour y être

intégrées. Sa croissance est fulgurante et correspond au flux important de données générés par les projets de séquençage des génomes complets (Figure).

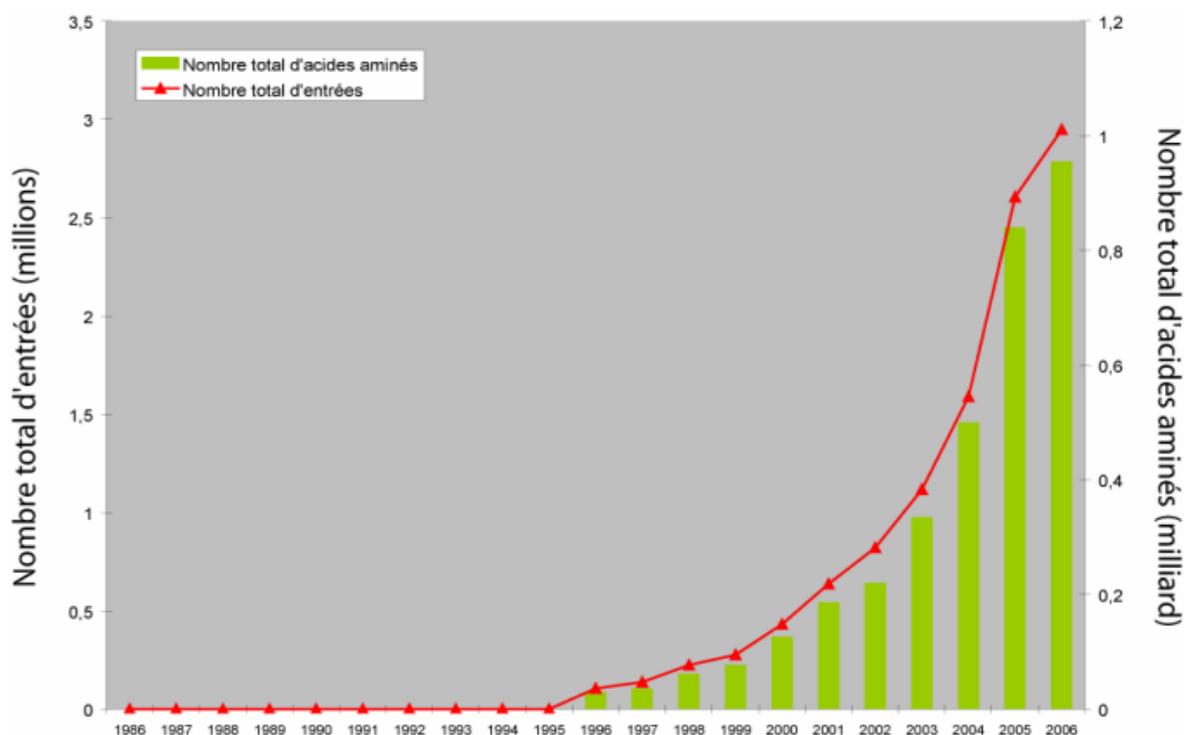


Figure 5. Evolution du nombre d'entrée dans la banque TrEMBL depuis sa création en 1996. (5)

- **Prosite:**

Base de données de familles et domaines de protéines

- **Expazy :**

Base de données protéomique En 2002:consortium UniProt (UniversalProtein Resource) formé par le groupe SwissProt-TrEMBL et le groupe PIR

- **PIR-NBRF:**

Protein Information Ressource Créée en 1984 par la NBRF (National BiomedicalResearchFoundation).Elle est maintenant un ensemble de données issues du MIPS (Martinsried Institute for ProteinSequences, Munich, Allemagne) et de la banque japonaise JIPID (Japan International Protein Information Database) Elle contient 283 416 entrées. D'autres bases dérivées sont accessibles telles que iProClass basée sur les familles de protéines et décrivant leurs structures et leurs fonctions ou encore PIR-NREF qui contient les séquences PIR, Swiss-Prot, TrEMBL, et PDB sans aucune redondance.

- **SwissProt:**

Créée en 1986 à l'Université de Genève et maintenue depuis 1987 dans le cadre d'une collaboration, entre cette université (via ExpASy, Expert ProteinAnalysis System) et l'EBI.

Celle-ci regroupe aussi des séquences annotées de la banque PIR-NBRF ainsi que des séquences codantes, traduites de l'EMBL. Elle contient 163 235 entrées, pour un total de 59 631 787 aminoacides avec 120 520 résumés de références bibliographiques à la date du Vendredi 22 Octobre 2004.

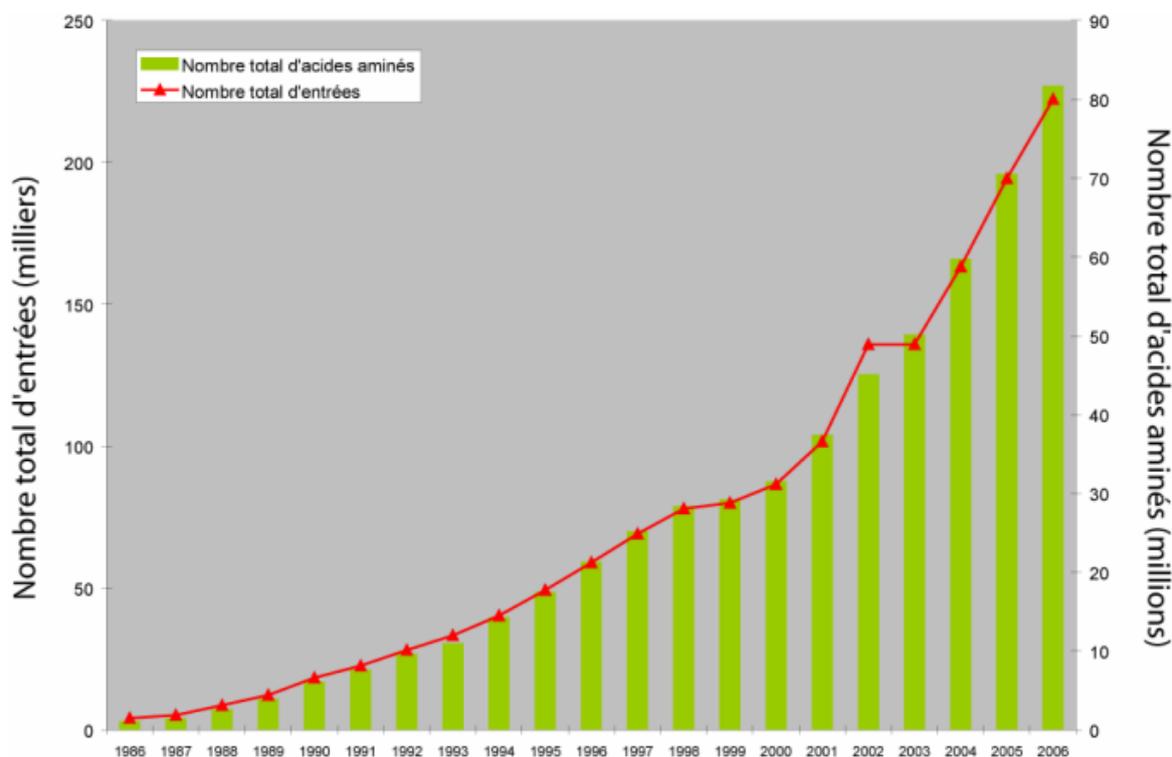


Figure 6. Evolution du nombre d'entrée de la banque Swiss-Prot depuis sa création en 1986. (6)

Elle est complétée par la banque TrEMBL qui est un supplément de SwissProt, annotée automatiquement qui contient les traductions des séquences nucléotides de EMBL, pas encore intégrées dans SwissProt.

5.2.2. Les banques de données de séquences spécialisées

Pour des besoins spécifiques, de nombreuses bases de données spécialisées ont été créées, certaines sont pérennes et continuent d'être développées et mises à jour, d'autres sont laissées à l'abandon et enfin d'autres ont disparu. On en dénombre à cette date un peu plus d'un millier, accessibles directement par le Web. La nature ainsi que la quantité d'informations sont très variable. Ces banques regroupent les données pour un organisme particulier, ou un groupe, contenant tout ou partie des informations suivantes :

- carte physique chromosomique, carte génétique et liaison, clonage positionnel pour les gènes EST (marqueurs de séquences exprimées), Banque d'ADNc, Banque de vecteurs de

clonage Gène et expression, Cytogénétique et anomalies chromosomiques, Gène et maladie, Oncogènes. Etc. ...

➤ **Banques nucléiques spécialisées**

Elles sont spécialisées dans les informations suivantes :

- ADNc, ARN, Structure secondaire d'ARN, Signaux et éléments de régulation, Sondes, amorces, Alignements, Famille de gènes

➤ **Banques protéiques spécialisées**

Elles sont spécialisées dans les informations suivantes :

- Motifs, Alignement, Classification structurale, Familles de protéines, Interactions, Enzymes, Modifications protéiques post -traductionnelles, Pathologies, Gels bidimensionnels, Bases protéiques sur l'interaction et la thermodynamique des protéines

➤ **Banques immunologiques**

Elles sont spécialisées dans les informations suivantes :

- Séquences, Récepteur (cellule T, par exemple), Complexe MHC (Major Histocompatibility Complex),

➤ **Banques Structure 2D ou 3D**

Elles sont spécialisées dans les informations suivantes :

- Coordonnées 3D de protéines
- Structure secondaire des protéines
- Domaines structuraux
- Centre actif des enzymes
- Complexes récepteurs-ligands
- Atlas de topologie structurale des protéines

La banque des données 3D des protéines est la "Protein Data Bank" (PDB, créée en 1971 Comme archive des données cristallographiques au BNL (Brookaven National Laboratory – USA). Elle comprend à ce jour 27 855 entrées de structures établies soit aux rayons X, soit Par résonance magnétique nucléaire ou encore par modélisation théorique. (Smith et *al.*, 1981).

➤ **Autres types de banques de données**

- Banques de Structure:

Ex: la Protéine Data base PDB dédiée aux structures protéiques déterminées expérimentalement

- Banques dédiées à un organisme particulier:

Ex: Arabidopsis thaliana

- Banques dédiées à un type de séquences particulier: Analyse des promoteurs (Prokaryotic Promoter Prediction 'PPP', Scope...) ou Analyse des terminateurs de la transcription (7)

6. Les interfaces des banques de données

Des structures moléculaires à haute résolution sont déterminées par une de deux méthodes, à savoir rayon X cristallographie ou spectroscopie RMN, elles peuvent être composées dans un dossier des textes que les programmes comme PyMOL peuvent lire. Ceux-ci

Des dossiers s'appellent les dossiers d'"PDB", abréviation "la banque de données de protéine." (Heinset *al.*, 1967)

6.1.La cristallographie aux rayons X

La cristallographie aux rayons X, ou diffractométrie de rayons X est une technique d'analyse fondée sur la diffraction des rayons X sur la matière. La diffraction n'ayant lieu que sur la matière cristalline, on parle aussi de radiocristallographie. Pour les matériaux non-cristallins, on parle de diffusion. La diffraction fait partie des méthodes de diffusion élastique.

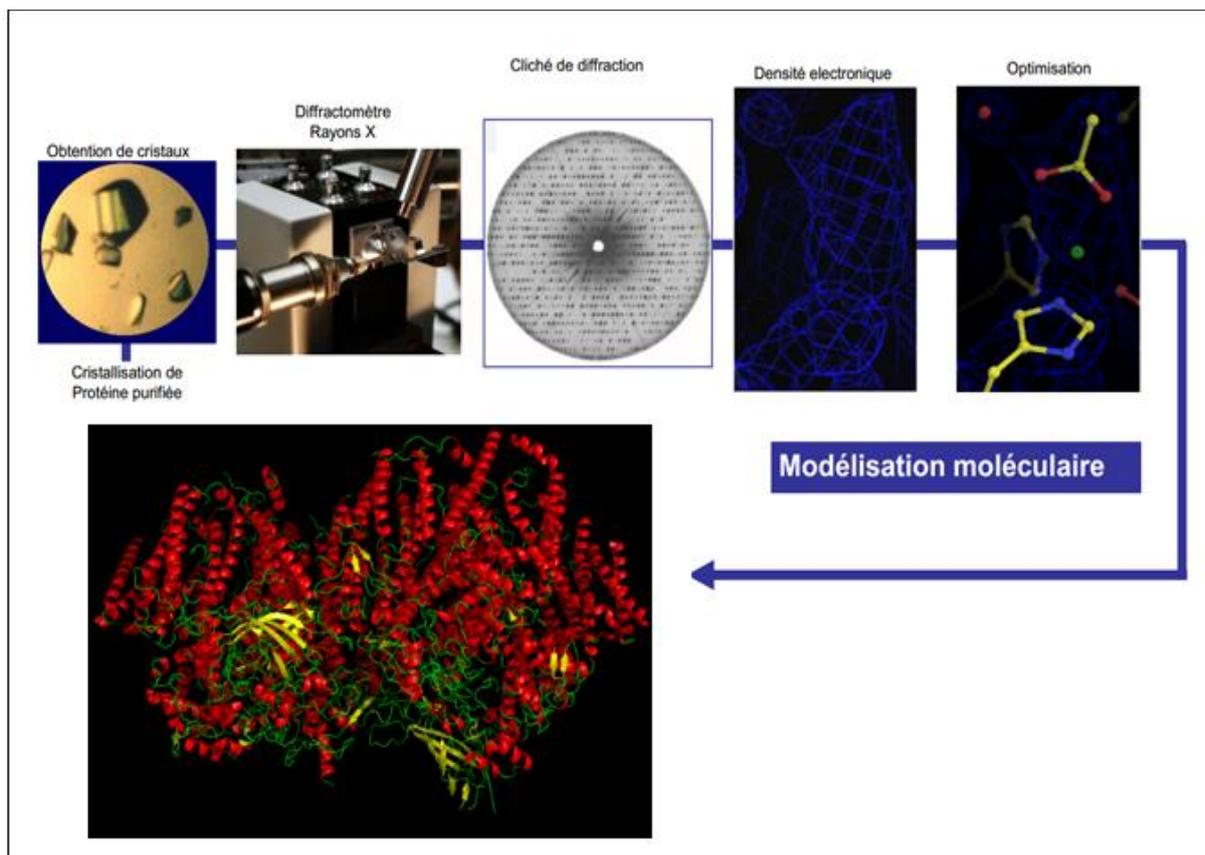


Figure7. Détermination de structure par Biocristallographie (8)

Cette méthode utilise un faisceau de rayons X qui rencontre le cristal provoquant la dispersion du faisceau lumineux dans des directions spécifiques. Par la mesure des angles et de l'intensité des rayons réfractés, il est possible d'obtenir une image tridimensionnelle de la densité électronique dans le cristal. À partir de cette densité, la position moyenne des atomes du cristal peut être déterminée, ainsi que leurs liaisons chimiques, leur entropie et d'autres informations. (Cullity et *al.*,1956,)

Les rayons X sont diffractés par les atomes du cristal, plus précisément par les électrons des atomes. En plaçant une plaque photographique loin du cristal comme le montre la figure, on obtient des taches dont l'intensité permet d'identifier la structure du cristal. (Rousseau, 2000)

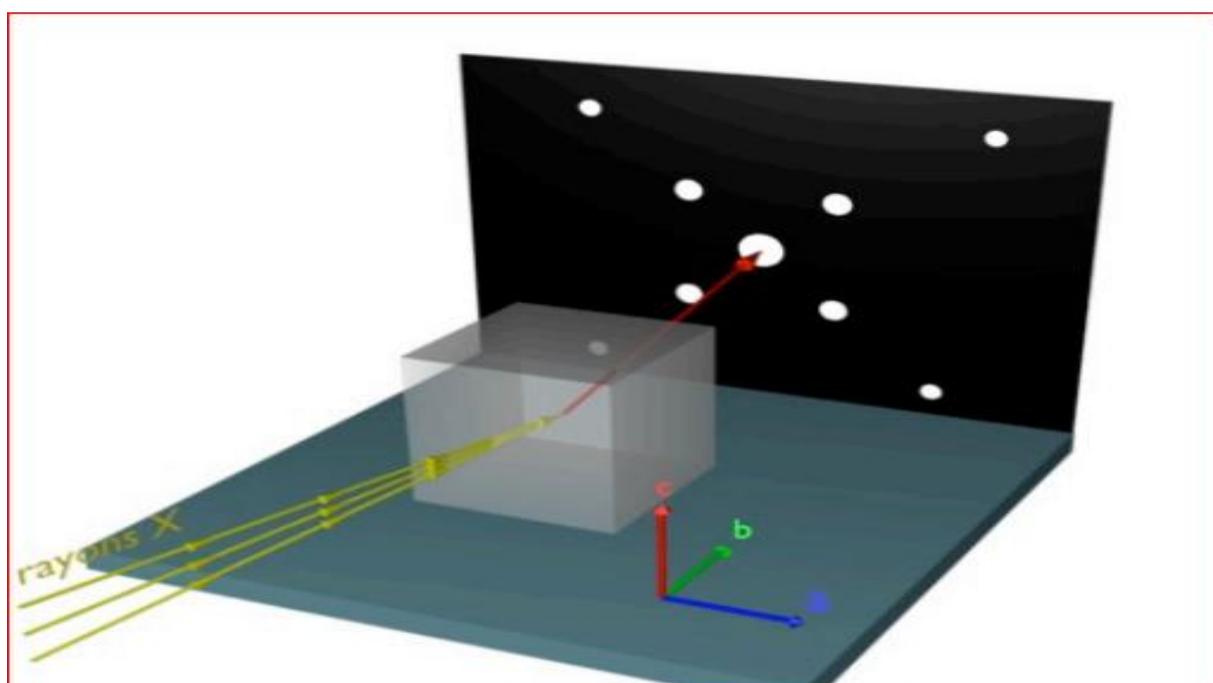


Figure 8. Diffraction des rayons X par un échantillon de cristal (9)

La technique est utilisée pour caractériser la matière. Cela concerne :

- la recherche : lorsque l'on crée un nouveau matériau (souvent des céramiques), que l'on veut connaître le résultat d'une réaction chimique ou physique (par exemple en métallurgie, pour reconnaître les produits de corrosion ou savoir quel type d'acier on a fabriqué), en géologie (géochimie) pour reconnaître la roche prélevée à un endroit, en biologie, pour étudier la structure des protéines par exemple ;
- pour le suivi de production dans une usine (contrôle de la qualité du produit) : dans les cimenteries, les fabriques de céramiques, etc.....

- l'industrie pharmaceutique :
 - en recherche : les nouvelles molécules sont cristallisées, et les cristaux sont étudiés par diffractométrie de rayons X ;
 - en production : cela sert notamment à vérifier que l'on n'a pas fabriqué une autre molécule de même formule, mais de forme différente (on parle de polymorphisme). (Cullity et *al.*,1956).

6.2. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Une base de données magnétique de spectres de résonance nucléaire est un répertoire électronique des informations concernant résonance magnétique (RMN) nucléaire .Ces dépôts peuvent être téléchargés sous autonomes ensembles de données ou utilisés en ligne.La forme sous laquelle les données sont stockées varie, allant de listes de ligne qui peuvent être affichés graphiquement à la matière première de précession libre données.Les données sont généralement annotées d'une manière qui est en corrélation avec les données spectrales de la structure moléculaire liée.

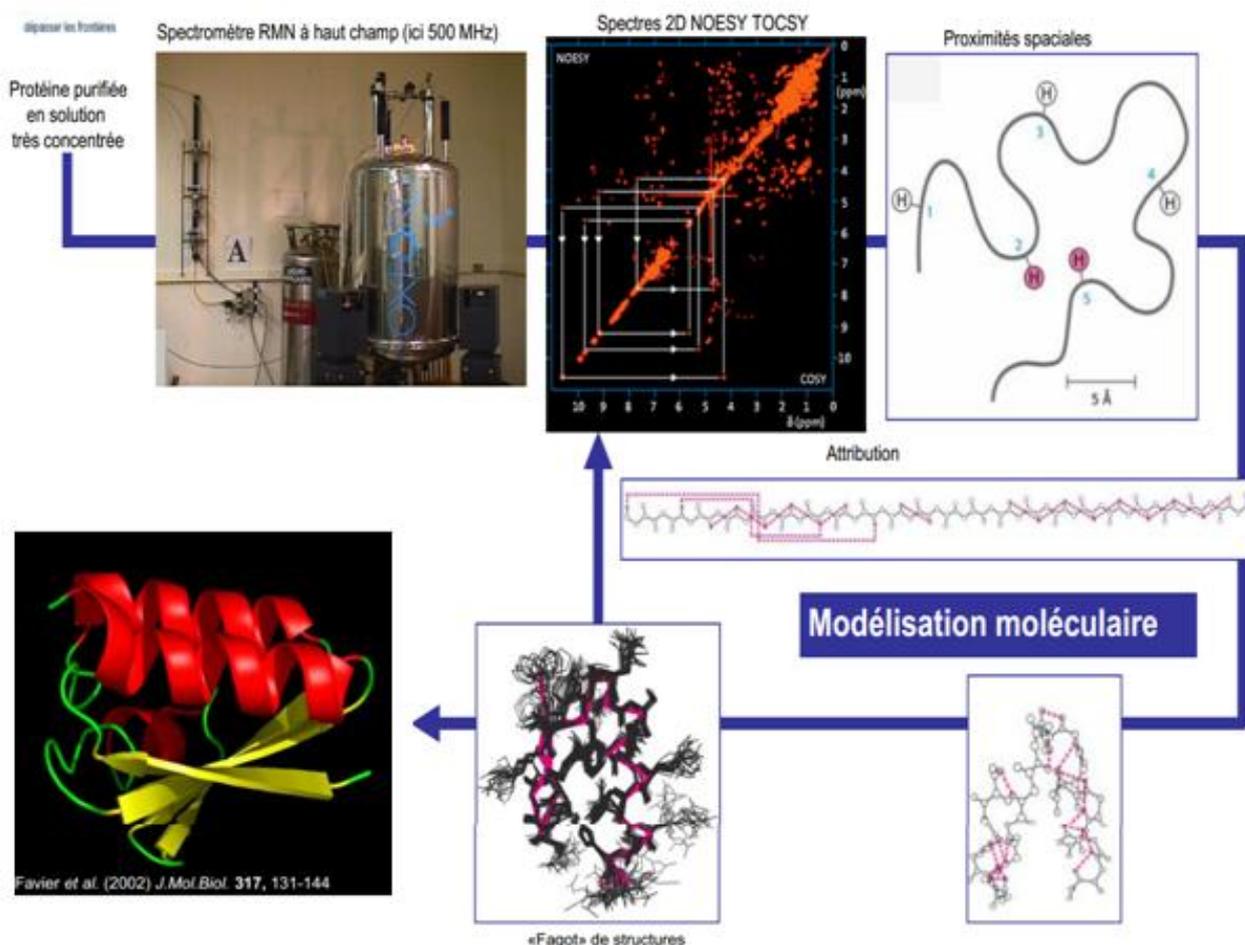


Figure 9 : La Résonance Magnétique Nucléaire (10)

La forme sous laquelle les plus RMN est décrite dans les documents de la littérature. Il est commun pour les bases de données pour afficher des listes de lignes graphiquement d'une manière qui est similaire à la façon dont les spectres-traité peuvent apparaître. Ces listes de ligne mais le manque d'abord et d'ordre supérieur division, satellites de faible abondance des isotopes comme le carbone ou le platine, ainsi que les informations concernant la largeur de ligne et d'autres aspects informatifs de forme de ligne. L'avantage d'une liste de ligne est qu'elle nécessite une quantité minimale de mémoire. **(11)**

II : la chitine et les chitinases

1. La chitine :

La chitine a été découvert en 1811 par le professeur français Henri Braconnot, elle est le deuxième polysaccharide le plus abondant dans la nature, après la cellulose, il est largement distribué chez les eucaryotes, incluant des organismes unicellulaires (levures, amibes, diatomées) et multicellulaires (champignons filamenteux, arthropodes, nématodes, mollusques) (Ehrlich *et al.*, 2007), ce polysaccharide est également présent chez certaines éponges et algues marines (Ehrlich *et al.*, 2007), chez *Saccharomyces cerevisiae*, la chitine compte seulement pour un faible pourcentage (1- 2 %) du poids de paroi cellulaire sèche (Osmond *et al.*, 1999), tandis que chez les champignons filamenteux, la chitine peut représenter jusqu'à 60 % du contenu pariétal (Herrera *et al.*, 1999), chez certains oomycètes, la chitine représente entre 0.7 et 3.4% des parois sèches (Sietsma *et al.*, 1975).

1.1 Structure :

La chitine $[(C_8H_{13}O_5N)_n]$ est un polysaccharide cristallin constitué de longues chaînes linéaires contenant plus de 1000 résidus de N-acétylglucosamine (GlcNAc, 2-acetamido-2 deoxy- D-glucose) liés par des liaisons β (1-4).

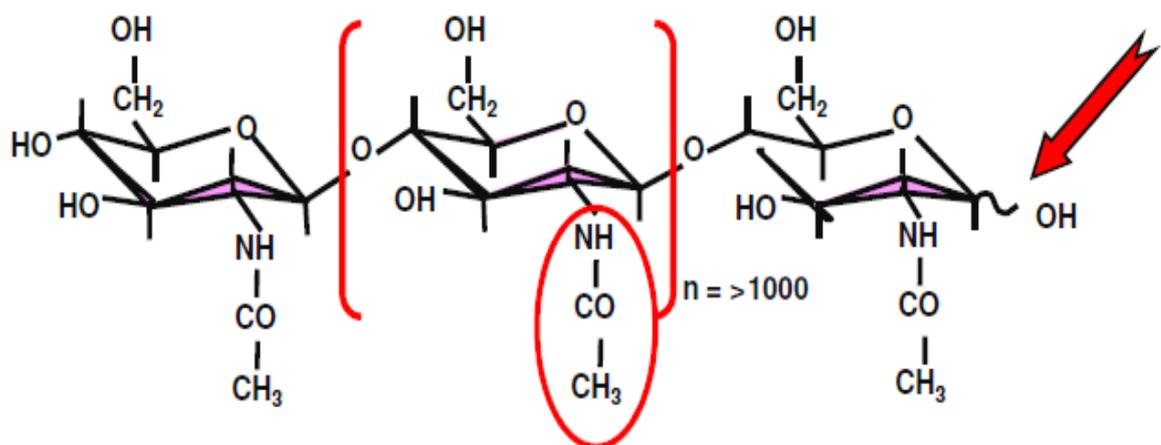


Figure10. Chaîne linéaire de chitine (Herrera -estrella, *et al.*, 1999).

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

Environ 20-400 chaînes du polysaccharide s'associent par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes pour créer la forme structurale du polysaccharide et donner naissance à des micro fibrilles qui confèrent le rôle squelettique de la chitine (Herrera -estrella, *et al.*, 1999).

Tableau 2. Les formes cristallines de chitine.

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

Les trois formes de la chitine se distinguent par le degré d'hydratation, la taille et le nombre de chaînes (Merzendorfer *et al.*, 2003).

Dans la chitine α , les chaînes polysaccharidiques sont disposées de façon antiparallèle, ce qui donne naissance à de nombreux ponts hydrogènes, et entraîne une rigidité importante et une faible sensibilité aux agents de déacétylation, la chitine α n'est pas soluble dans les solvants aqueux et constitue la forme la plus abondante du polysaccharide, largement distribuée dans les carapaces des tourteaux et crevettes ainsi que dans les parois cellulaires des champignons (Noishiki *et al.*, 2005).

La chitine β est une forme moins abondante, présente chez un nombre limité d'espèces d'animaux et certaines diatomées dont les chaînes polysaccharidiques sont toutes parallèles entre elles, les ponts hydrogènes y sont moins nombreux, ce qui confère à la chitine β une plus grande réactivité et hydrophile.

Enfin la troisième forme, La chitine γ , implique deux chaînes parallèles qui alternent avec une chaîne antiparallèle, et semble être une forme qui n'apparaît qu'*in vitro* à la suite de certains traitements chimiques (Noishiki *et al.*, 2005).

2. Les chitinases :

2.1. Historique :

La chitinase a été découverte par Karrer en 1929, et son activité spécifique dans l'hydrolyse de la chitine a été démontrée par Zechmeister en 1939. Ces enzymes se trouvent dans une rangée importante d'organismes, comprenant les bactéries, les champignons, les crustacés, les insectes (Perrakis *et al.*, 1993), les plantes (Neuhaus, 1999), et même dans les vertébrés (Renkana *et al.*, 1995), de puis lors ces molécules sont exactement considérés pendant qu'un outil pour renforcer l'immuno-réaction de plante contre une variété de microbes pathogènes par de divers ouvriers dû à sa propriété pour lyser le mur de cellules et les composants fongiques d'exosquelette d'insecte, sans compter que cette augmentation dramatique de chitinase par de nombreux agents abiotiques (éthylène, acide salicylique, solutions de sel, ozone, lumière UV) et par des facteurs biotiques (mycètes, bactéries, virus), la cellule a également prouvé leur rôle dans la réponse de défense de plante (punja *et al.*, 1993 ; cupta *et al.*, 2010 b), en plus de lui, les mycètes pathogènes d'insecte ont potentiel considérable pour la commande biologique des parasites d'insecte qui surmontent apparemment les barrières physiques du centre serveur, en produisant les enzymes extracellulaires multiples comprenant les enzymes chitinolytique qui aident à pénétrer le cuticule et à faciliter l'infection (herrera-estrella *et al.*, 1999).

2.2. Définition :

Les chitinases sont des protéines de stress (protéine PR-3) (Wood, 1988 ; Smyth, 1994 ; Politz *et al.*, 1992), ayant une activité hydrolytique envers la chitine présente dans la paroi de plupart des champignons pathogène.

Plus précisément, les chitinases hydrolysent les liaisons (1 \rightarrow 4)- β des résidus de *N*-acétyl- β -D-glucosaminide présents dans la chitine et les chitodextrines.

Chez les plantes les chitinases jouent un rôle important dans le mécanisme de défense contre les organismes qui contiennent la chitine, tels que les champignons pathogène (schlein *et al.*, 1991) .

2.3. Classification des chitinases :

Parmi les enzymes impliquées dans l'hydrolyse des polymères de sucre on trouve les chitinases, les chitosanases et les lysozymes. Elles sont cataloguées selon leurs séquences d'acides aminés en 50 familles de glycohydrolases (Henrissat et Bairoch, 1993).

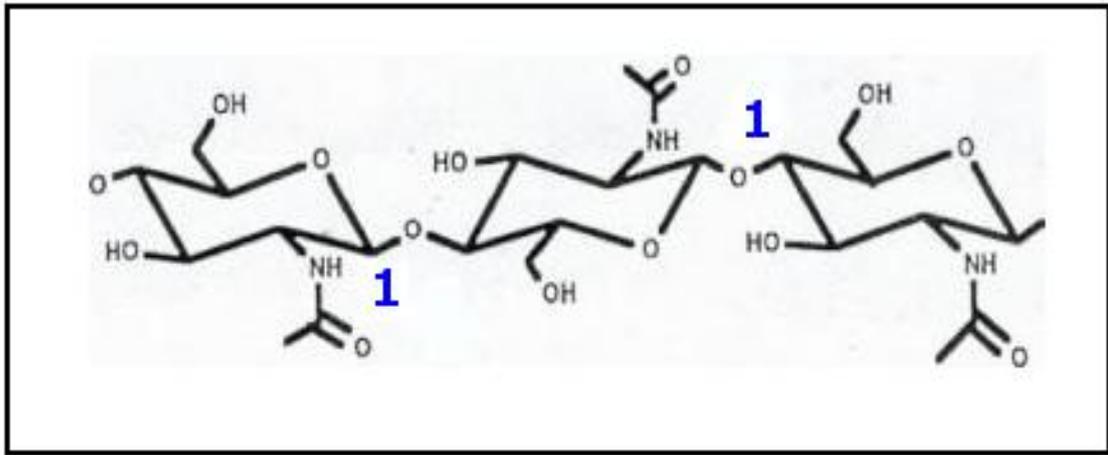


Figure 11. Chitine: Substrat hydrolyse totalement par les chitinases au niveau des liaisons N-acetyl- glucosamine , indiquées en 1 sur ce schéma (Neuhaus, 1999).

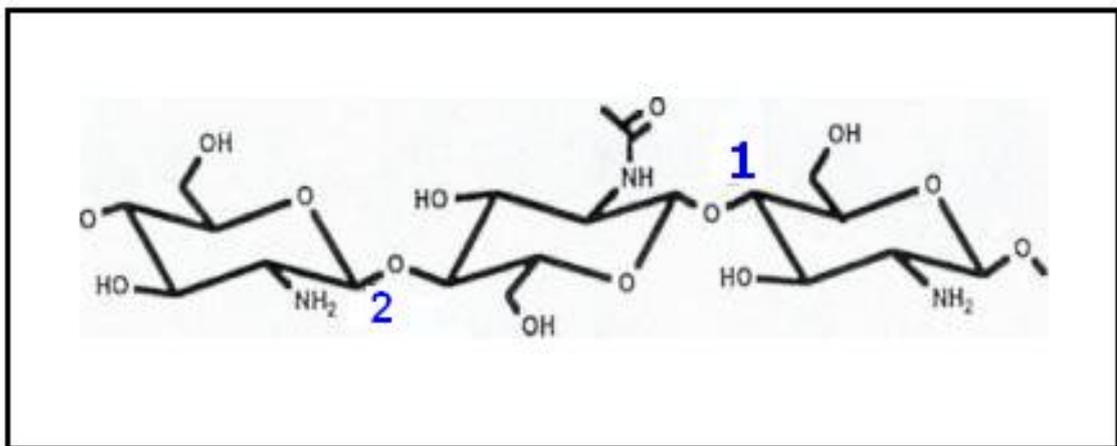


Figure 12. Chitosane: Substrat hydrolysé partiellement par les chitinases au niveau des liaisons N-acetyl- glucosamine, indiquées en 1 sur ce schéma. Les liaisons indiquées en 2 sont hydrolysées par les chitosanases (Neuhaus, 1999).

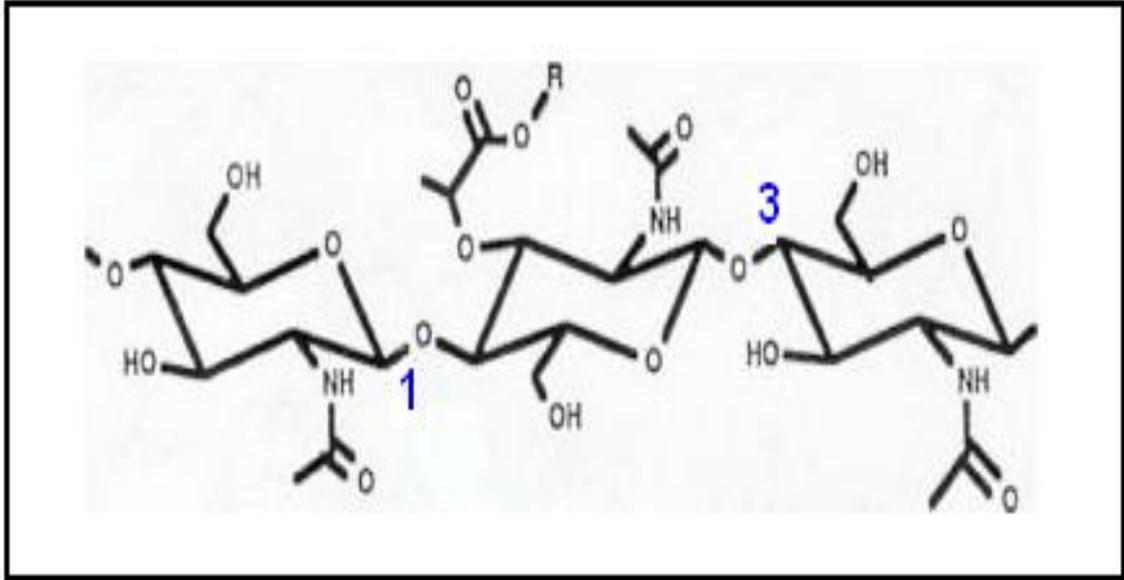


Figure 13. Peptidoglycane: Substrat hydrolyse partiellement par les chitinases au niveau des liaisons N-acetyl- glucosamine, indiquées en 1 sur ce schéma, les liaisons indiquées en 3 sont hydrolysées par les lysozymes (Neuhaus, 1999).

Les chitinases sont classées comme des glycosyl hydrolases et ont été isolées de plusieurs organismes différents (Brameld *et al.*, 1998 ; Kasprzewska , 2003), elles peuvent être divisées en deux catégories, à savoir les endochitinases et les exochitinases.

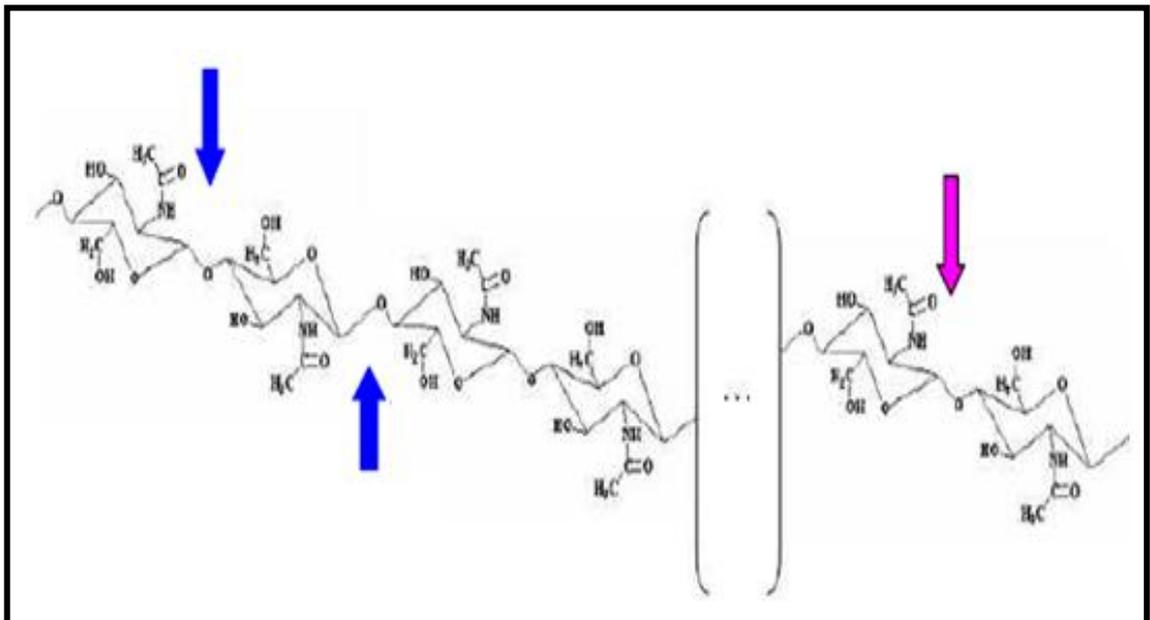


Figure 14. Monomères de chitine avec représentation des sites d'action des **endo-** et des **exo**chitinases.

Les premières, également nommées poly [1,4-(N-acétyl- β -D-glucosaminide)] glycanohydrolases (EC 3.2.1.14) hydrolysent les liaisons internes des micro fibrilles de chitine pour libérer des fragments de chitobiose, chitotriose et chitotétraose composés respectivement de deux, trois ou quatre unités *N*-acétylglucosamine.

Les endochitinases clivent de manière aléatoire la chaîne de chitine en hydrolysant les ponts β (1,4)-glycosidiques formant ainsi des molécules de taille variable.

Les secondes, nommées exochitinases ou β -*N*-acétylhexosaminidases (EC 3.2.1.52), participent à la dégradation complète des fragments de chitine, Parmi ces exochitinases, les Chitobiosidases libèrent des diacétylchitobioses à partir des extrémités non-réductrices de la chitine et les β -D-acétylglucosaminidases hydrolysent ces diacétylchitobioses en monomères de *N*-acétylglucosamine (Cohen-Kupiec *et al.*, 1998).

Les exochitinases par contre agissent progressivement sur l'extrémité non-réduite de la chaîne de chitine formant ainsi des monomères ou des dimères (Kasprzewska, 2003), Sur la base de leurs séquences en acides aminés, les chitinases ont été subdivisées en deux familles : famille 18 et famille 19, qui diffèrent également dans leurs structures tridimensionnelle et dans leurs mécanismes catalytiques (Brameld *et al.*, 1998 ; Neuhaus, 1999) et D'importantes différences dans les propriétés biochimiques ont également été relevées (Watanabe *et al.*, 1999).

La première classification des chitinases avait été effectuée sur la base de différentes séquences de chitinases d'espèces de plantes variées (Melchers *et al.*, 1994 ; Hamel *et al.*, 1997). D'après la similitude des séquences d'acides aminés des différentes chitinases identifiées, cinq classes de chitinases ont été proposées et regroupées dans les deux familles de glycosyle hydrolases 18 et 19 (Henrissat et Bairoch, 1993; Henrissat, 1991).

Les chitinases sont également classés selon la séquence N-terminale, le pHi, la localisation de l'enzyme, et la présence ou l'absence du peptide signal en différentes classes (I, II, III, IV, V) (Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 1996).

La famille 18 est ainsi répartie entre les classes III et V et la famille 19 dans les classes I, II et IV (Brameld *et al.*, 1998 ; Watanabe *et al.*, 1999 ; Tsujibo, 2000).

Les chitinases des deux différentes familles (18 et 19) ne partagent pas une similitude de séquence d'acides aminés, et ont complètement différentes pour la structure tridimensionnelle (3D) (Tews *et al.*, 1997) et des mécanismes moléculaires.

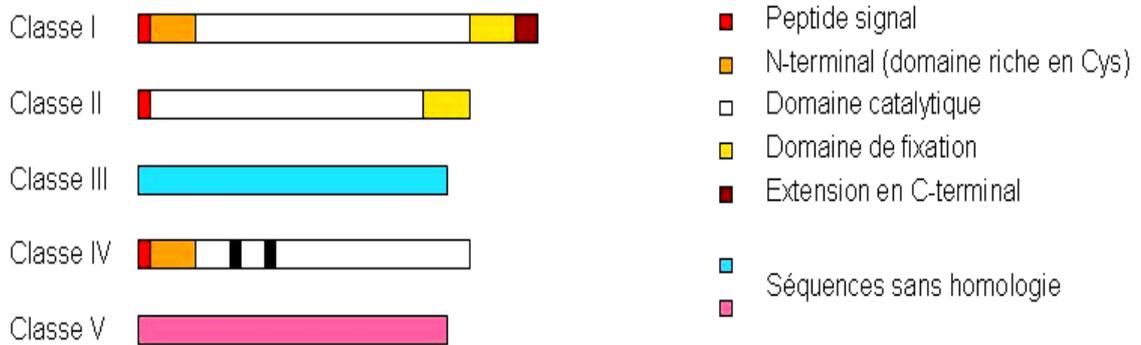


Figure 15. Présentation schématique des différents domaines constituant les 5 classes de chitinases chez les plantes (Azzouz, 2001).

➤ **Les chitinases de classe 1 :**

Sont constituées d'un domaine amino – terminal riche en cystéines qui est lié par une courte région riche en glycine/proline au domaine catalytique qui est souvent suivi d'un peptide C-terminale (perraki *et al.*, 1993), dans les cellules de plantes, le peptide de ces enzymes est essentiel pour conduire les chitinases vers les vacuoles (Neuhaus *et al.*, 1991), le domaine de fixation riche en cystéines ne possède pas d'activité chitinolytique (iseli B *et al.*, 1993).

➤ **Les chitinases de classe 2 :**

Ont été caractérisées principalement chez les plantes dicotylédones, ces chitinases ne possèdent pas de domaine riche en cystéine, ce qui les empêche de se fixer sur les structures, elles sont sécrétées dans l'apoplaste (shinshi H *et al.*, 1990).

➤ **Les chitinases de classe 3 :**

Ont été identifiées chez de nombreuses plantes et champignons (Hamel *et al.*, 1997), comme les chitinases de classe 5, elles sont de glycosyle-hydrolases familles 18 (henrissat B *et al.*, 1993), cette classe inclue les enzymes bifonctionnelles lysozyme/chitinases telles que celle de *hevea brasiliensis* (jakel PA, 1991).

➤ **Les chitinases de classe 4 :**

Ont été trouvées chez la plupart des plantes et sont extracellulaires 41-47% de leur séquence du domaine catalytique est identique avec celui de la classe 1, elle possédant une région riche en cystéine qui ressemble au domaine de fixation des

chitinases de classe 1. Cependant les chitinases de classe 4 sont de petite taille puisque une partie des deux domaines qui les constituent a été supprimée (colling DB, 1993).

➤ **Les chitinases de classe 5 :**

Ont été identifiées principalement chez les bactéries, ce pendant une endochitinases a été isolée à partir des plantes de tabac, qui ressemble beaucoup aux chitinases de classe 5 (Melchers *et al.*, 1994).

Tableau 3. Classification des différentes chitinases en fonction de leurs séquences en acides aminés et de leur provenance (Azzouz, 2001).

Famille 19			Famille 18	
Plantes Nématodes Bactéries			plantes Virus Bactéries Champignons Nématodes Invertébrés Vertébrés	
			Classe I	Classe II

2.4. Classification des chitinases selon leurs origines:

2.4.1. Les Chitinases des microorganismes :

Les chitinases sont présentes chez de nombreux microorganismes eux-mêmes dépourvus de chitine, mais pour lesquels la chitine constitue une source de nutriments.

Ainsi, les bactéries chitinolytiques marines, d'eau douce ou du sol produisent des chitinases qui participent à la biodégradation et au recyclage des chitines produites annuellement dans leur écosystème respectif. Les chitinases bactériennes sont également impliquées dans des processus digestifs (Cohen-Kupiec *et al.*, 1998).

Les chitinases produites par les bactéries de la microflore intestinale de nombreux animaux (poissons, oiseaux, ...), facilitent les processus de digestion des aliments composés de chitine.

De nombreux protozoaires et métazoaires parasites des tractus digestifs présentent la capacité de synthétiser des chitinases, Parmi ces parasites, on trouve des filaires, des amibes, des trypanosomes, des plasmodiums, Chacun de ces microorganismes utilise la chitine et les chitinases différemment et spécifiquement selon le stade de son développement (Shahabuddin, 1995), les chitinases produites par les procaryotes facilitent les processus de colonisation de leurs insectes hôtes qui leur servent de vecteurs.

Le fait que la paroi cellulaire fongique soit riche en chitine, permet aussi d'utiliser les chitinases comme agents de contrôle biologique des champignons pathogènes en tant que bio-fongicides ou comme nouveau bio-pesticides.

2.4.2 Les chitinases fongiques :

Les chitinases fongiques possèdent de multiples fonctions, Comme les chitinases bactériennes, elles participent largement au métabolisme trophique et sont également impliquées dans le développement, la morphogenèse et lors d'interactions symbiotiques et d'infestations parasitaires (Cohen-Kupiec *et al.*, 1998), La chitine est un composé des parois cellulaires des champignons filamenteux, Les chitinases sont donc produites à différents stades de leur croissance.

Ainsi, les chitinases sont impliquées dans la séparation et la germination des spores, les hyphes mycéliens possédant une structure rigide, les chitinases permettent de remodeler la chitine des parois fongiques lors de la croissance et du développement, mais aussi lors de stress hydriques (Gooday *et al.*, 1992).

Les champignons pathogènes utilisent leurs chitinases pour faciliter leur pénétration dans l'hôte ou pour en exploiter les sucres et les acides aminés issus de la dégradation des cuticules.

2.4.3 Les chitinases parasitaire :

Les chitinases chez les parasites est produites a un stade de développement particulier, ce qui suggère l'importance de la chitine au chitinases dans le fonctionnement de ce parasites a ce stade la (Shahabuddin *et al.*, 1994).

2.4.4 Les Chitinases animales :

Les chitinases ont été mises en évidence chez de nombreux animaux invertébrés, vertébrés et chez les mammifères, Dans le tractus alimentaire des poissons, des oiseaux, les chitinases dégradent la cuticule des proies ingérées (13).

2.4.5 Les chitinases des insectes :

Chez les arthropodes et les insectes en particulier, la chitine est présente au niveau des cuticules et fréquemment dans la membrane péritrophique.

Les enzymes chitinolytiques sont impliquées dans le déroulement de certaines fonctions vitales telles que les processus de morphogenèse, développement, digestifs et participent au remodelage de ces structures cuticulaires (13).

2.5. Propriétés physico-chimiques des chitinases :

2.5.1. Le poids moléculaire:

Les chitinases trouvées chez nombreuses plantes et algues possèdent une masse moléculaire d'environ 30 KDa. Des chitinases de 40 à 90 KDa et même d'environ 120 KDa ont été identifiées chez les mollusques, les arthropodes et chez quelques vertébrés comme les poissons, les amphibiens et les mammifères. La masse moléculaire des chitinases isolées chez les bactéries et les champignons varient de 30 à 120 KDa (Humphreys et Gooday, 1984; Koga *et al.*, 1997). Quelques chitinases de plantes supérieures (carotte) (De Jong *et al.*, 1992), d'insectes (Koga *et al.*, 1983) et de ver à soie (Koga *et al.*, 1997) sont des glycoprotéines.

2.5.2. Le point isoélectrique (pHi):

Les chitinases possèdent un pHi de 3.0 à 10.0 chez les plantes supérieures et les algues. Chez les insectes, les crustacés, les mollusques et les poissons le PHi est de 4.7 à 9.3. Chez les microorganismes, de 3.5 à 8.8.

Toutefois, les chitinases acides et basiques sont présentes souvent dans le même organisme.

2.5.3. Activité enzymatique :

Les PH optimaux des chitinases sont de 4 à 9 chez les plantes supérieures et les algues. De 4.8 à 7.5 chez les animaux et de 3.5 à 8.0 chez les microorganismes. Le PH optimal dépend du substrat utilisé (exemple de deux substrats différents: chitine glycol et 7V-

acétyle chito-oligosaccharides) (Koga *et al.*, 1999), ceci démontre que les chitinases de différents organismes sont actives dans les milieux acides et basiques.

2.5.4. La stabilité :

Les chitinases de plantes classe III et ceux de *Bacillus licheniformis* résistent à une température élevée de 80 C ° (Koga, 1996; Takayangi *et al.*, 1991). D'autres chitinases identifiées chez des insectes et des vers de soie ne sont pas très stables au-dessus de 40 C ° car le développement de ces insectes s'effectue à 25 C ° (Koga *et al.*, 1997).

En général, les chitinases d'insectes ne sont pas stables à de très hautes températures, car ces espèces utilisent généralement leurs chitinases pour hydrolyser leur propre chitine cuticulaires pendant la phase de mue, alors que les chitinases de plantes sont utilisées principalement pour dégrader des organismes pathogènes.

2.6. Inhibiteur et activateur des chitinases :

Un inhibiteur compétitif a une structure similaire au substrat ou à l'état de transition. Les allosamidines et leurs dérivés inhibent les chitinases de ver de soie (Koga *et al.*, 1987), de crevette rose (Koga *et al.*, 1990), de microorganismes tels que *Piromyces communis*, *Streptomyces sp* (Wang *et al.*, 1993) et *S. olivaceoviridis* (Romaguera *et al.*, 1993) , ils sont considérés comme les principaux inhibiteurs des chitinases d'insectes et leur structure est similaire a l'état de transition de l'hydrolyse de la chitine (Koga *et al.*, 1987).

Récemment, des allosamidines cristallisées ont été liés à des chitinases de plantes telles que la hevamine (Terwisscha *et al.*, 1995).

Toutefois, les allosamidines et leurs dérivés inhibent seulement les chitinases appartenant à la famille 18 et n'inhibent pas celles de la famille 19. Les chitinases sont de manière générale inhibées par Hg^{2+} et Ag^+ . En ce qui concerne le Cu^{2+} , il existe deux possibilités, un premier groupe de chitinase est inhibé par Cu^{2+} , alors que dans un deuxième groupe, l'activité chitinolytique est plus élevée en présence de Cu^{2+} .

Ce dernier groupe a été trouvé chez les poissons (Kono *et al.*, 1990; Matsumiya *et al.*, Mochizuki, 1995).

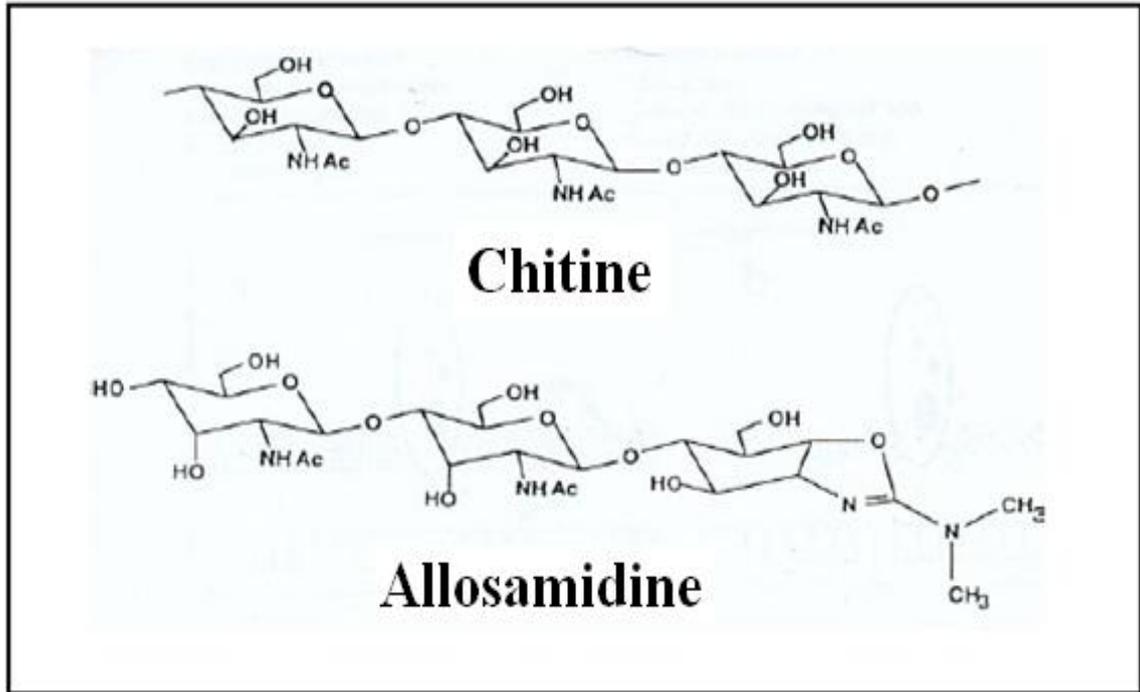


Figure 16. Structures de l'Allosamidine, c'est un dimere de β -Nacetylallosamine lié avec dimethyl aminocyclitole (Shahabuddin *et* Kaslow, 1993).

2.7. Les chitinases végétales et développement :

Bien que la présence de chitine n'ait jamais été mise en évidence chez les plantes, les chitinases végétales possèdent toutefois des substrats végétaux qui les impliquent dans de nombreux processus physiologiques (croissance, floraison, maturation des fruits) (patil *et al.*, 2004).

Les chitinases végétales peuvent être synthétisées dans certains organes ou durant différentes étapes des cycles végétatif ou reproductif de la plante (12).

Ainsi, elles sont exprimées de façon constitutive dans de nombreux organes, tels que les feuilles les fleurs, les graines (Passarinho *et al.*, 2001), les fruits (Peumans *et al.*, 2002) et les racines (Passarinho *et al.*, 2001).

Les chitinases végétales interviendraient notamment dans les événements précoces de l'embryogenèse et la germination des graines (De Jong *et al.*, 1992).

Au niveau racinaire, les chitinases végétales favorisent la pénétration des hyphes mycéliens et le développement des interactions symbiotiques avec des champignons mycorhiziens, en hydrolysant la chitine fongique (Salzer *et al.*, 1997).

Plusieurs travaux rapportent la présence de résidus *N*-acétylglucosamine dans les parois secondaires de diverses espèces de plantes (Benhamou et Asselin, 1989), ces composés seraient susceptibles d'agir en tant qu'éliciteurs dans des processus de reconnaissance entre végétaux et symbiotes.

Les chitinases représentent l'un des plus grands groupes de protéines antifongiques chez les plantes, ces enzymes catalysent l'hydrolyse des liens β -1,4 entre les résidus de *N*-acétylglucosamine qui constituent le polymère de chitine.

La distribution des chitinases est vaste, on les retrouve aussi bien chez les micro-organismes que chez les poissons, les amphibiens, les mammifères, et les plantes chez lesquels elles exercent des fonctions biologiques variées (Cohen-kupiec *et al.*, 1998).

Dans les règnes animale et végétale, les chitinases semblent surtout participer à défense contre les agresseurs microbiens, bien qu'elles soient également impliquées dans la croissance et le développement (Helleboid *et al.*, 2000).

Chez les plantes, plusieurs protéines PR ayant une activité chitinolytique ont été identifiées dans tous les organes qu'il s'agisse des racines, des feuilles, de tiges, des bourgeons, ou des fleurs, ces protéines sont représentées par un large spectre d'enzymes qui diffèrent non seulement dans leur localisation spatiotemporelle, mais aussi dans leur structure moléculaire, et dans leur spécificité envers le substrat (Brenner *et al.*, 1998).

Chez les plantes saines, seules quelques isoformes de chitinases sont synthétisées de façon constitutive dans les racines, les feuilles, et les organes floraux (regalado *et al.*, 2000).

L'expression constitutive des gènes codant pour ces enzymes augmente avec l'âge et le plus souvent, la concentration enzymatique est plus élevée dans les feuilles âgées que dans les feuilles jeunes (patil *et al.*, 2004).

En réponse à une attaque microbienne, l'expression des gènes codant pour les chitinases est considérablement stimulée.

Cette induction peut être locale ou systémique, tout dépendant de l'agent pathogène, de sa virulence, et de la classe de chitinases induites.

D'une façon générale, les chitinases, comme toutes les protéines PR, sont induites par l'acide salicylique, cependant l'éthylène semble également jouer un rôle dans cette stimulation en raison de son augmentation très rapide suite à l'infection.

L'implication de l'éthylène dans l'induction de synthèse des chitinases a fait l'objet de nombreux débats et de nombreuses contradictions, pour certains auteurs l'éthylène serait indispensable à la synthèse des chitinases (Boller *et al.*, 1983).

La production des chitinases peut aussi être stimulée par des facteurs environnementaux et par une exposition prolongée à l'ozone, aux UV et aux métaux lourds (Kasprzewska, 2003). Étant donné leur induction en réponse à un stress biotique, les chitinases se sont le plus souvent, vues attribuer un rôle strictement antifongique (Mauch BF, 2005).

Cependant, plusieurs études récentes suggèrent que les chitinases, présentes dans les tissus sains, sont impliquées dans processus de régulation en générant ou dégradant des molécules signal.

D'autres hypothèses attribuent aux chitinases un rôle dans le murissement des fruits et dans la résistance au gel chez les monocotylédones (Peumans *et al.*, 2002). Dans ce dernier cas, les chitinases semblent avoir la capacité de limiter la formation des cristaux de glace dans les cellules végétales.

2.8. Les Chitinases végétales et défense :

Si les chitinases sont synthétisées de façon constitutive, leur présence dans les tissus végétaux à longterm a été justifiée par leurs interventions dans les mécanismes de défenses induits. La synthèse des chitinases végétales peut être induite suite à l'attaque d'une plante, par des phytophages ou des pathogènes en cas de stress biotique ou abiotique (15).

Donc, les chitinases végétales présentent essentiellement des propriétés anti fongiques. Les chitinases lysent la paroi des hyphes mycéliens et inhibent la germination des spores chez divers champignons tels que *Alternaria*, *Fusarium*, *Trichoderma* et *Rhizoctonia* (Taira *et al.*, 2002).

Les activités chitinolytiques ont une double fonction dans la réponse aux champignons pathogènes, lors de la pénétration des champignons phytopathogène dans le végétal, les

chitinases libèrent des oligosaccharides fongiques qui constituent des éliciteurs (Collinge *et al.*, 1993), renforçant indirectement les défenses des plantes.

Par la suite, les chitinases vacuolaires limitent la propagation des champignons dans le végétal (Taira *et al.*, 2002).

2.9. Fonctions et rôles des chitinases :

Les chitinases jouent plusieurs rôles dans une multitude de systèmes biologiques différents (Gooday, 1999), les chitinases interviennent ainsi dans une grande variété de fonctions dans la nature incluant la morphogenèse, les défenses, la nutrition et la pathogénicité (Sampson *et al.*, 1998), chez les plantes comme chez les animaux, les chitinases ont pour rôle principal, la défense de l'organisme contre les attaques des pathogènes, rôle qui peut être tout aussi passif qu'actif (Kasprzewska, 2003).

La course aux armements entre les pathogènes et les plantes implique une interaction étroite et évolutive entre l'hôte et le pathogène (Bishop *et al.*, 2000).

En effet, chez les plantes, les chitinases jouent un rôle dans la résistance contre les pathogènes. Des recherches ont en effet montré que les chitinases sont également impliquées dans un grand nombre d'événements physiologiques, lors du développement ou dans les processus de croissance.

Les chitinases semblent contrôlées par une variété de conditions de stress, aussi bien abiotique que biotique et par certaines phytohormones. Les chitinases de plantes sont communément appelées « protéines liées à la pathogénèse » (PR protéines). Les chitinases paraissent de plus impliquées dans d'autres mécanismes importants à la survie de la plante (14).

En effet, une chitinase semble intervenir dans la voie de transduction de l'éthylène, hormone végétale et dans le processus d'élongation cellulaire, les chitinases pourraient ainsi être des médiateurs dans les différentes voies de transduction, une activité de molécule signal est également supposée dans

l'apoptose ainsi qu'un rôle potentiel en tant qu'antigel (Kasprzewska, 2003 ; Neuhaus, 1999).

Les rôles des chitinases de la famille 18, ont bien été étudiés et se situent visiblement dans une large palette de fonctions, chez les champignons, les chitinases possèdent un rôle auto lytique, nutritionnel et morphogénétique, la chitinase des virus quant à elle est impliquée dans la pathogenèse (Dahiya *et al.*, 2005).

Chez les insectes et les crustacés, les chitinases sont étroitement liées avec les mues et le besoin d'une dégradation partielle de l'ancienne cuticule. La présence des chitinases chez les vertébrés est ainsi principalement associée au système digestif, ces enzymes sont également associées à un rôle de défense contre les attaques pathogènes des champignons. De nombreux venins de vertébrés possèdent également pour composante de la chitinase (Gooday, 1999 ; Dahiya *et al.*, 2005).

Les chitinases semblent également jouer un rôle dans la virulence de certains pathogènes qui infectent les insectes via la membrane péritrophique, comme *Plasmodium*, responsable de la *malaria*, les *trypanosomes*, *Leishmania* ou encore *Autographa californica nucleo polyhedro virus*.

En effet, le tube digestif de la plupart des vecteurs (insectes) est recouvert de matériel chitineux – membrane péritrophique – qui semble freiner voire même bloquer l'invasion des parasites. Certains parasites semblent donc avoir développé des mécanismes pour déjouer voire détruire les barrières chitineuses potentielles. Les chitinases permettent de franchir cet obstacle et semblent intervenir de manière cruciale dans la réussite de la propagation des parasites (Shahabuddin *et al.*, 1993 ; Shahabuddin, 1995 ; Huber *et al.*, 1991 ; Schlein *et al.*, 1991).

Les fonctions de la chitinase chez les bactéries montrent également un rôle dans la nutrition par exemple : *Streptomyces griseus* HUT6037, qui possède une

chitinase de la famille 19, présente une activité antifongique (Itoh *et al.*, 2002-2003).

Les chitinases bactériennes jouent de plus un rôle potentiel dans le parasitisme (Dahiya *et al.*, 2005), comme Chez la bactérie *Burkholderia gladioli* souche CHB101, des chitinases de chaque famille – famille18 et famille 19 – sont présentes, mais les chitinases de la famille 19 semblent être la famille principale impliquée dans la dégradation de la chitine (Shimosaka *et al.*, 2001).

Matériels et Méthodes :

Pour tout le travail réalisé dans la présente étude, le logiciel **PyMol** a été utilisé, installé sur un PC portable (processeur Intel Core I1 3.1GHz, 4 Go de RAM, plateforme: Windows7)

1- PyMol :

PyMOL est un logiciel de visualisation moléculaire, créé par Warren Delano. En plus d'offrir de nombreuses possibilités de rendus en 3D, le logiciel PyMOL permet de réaliser des animations, des alignements de structure, de générer des structures, etc.... Il est l'un des outils le plus utilisé dans la publication scientifique. Il s'agit d'un logiciel libre et gratuit. (Jérôme, 2014)

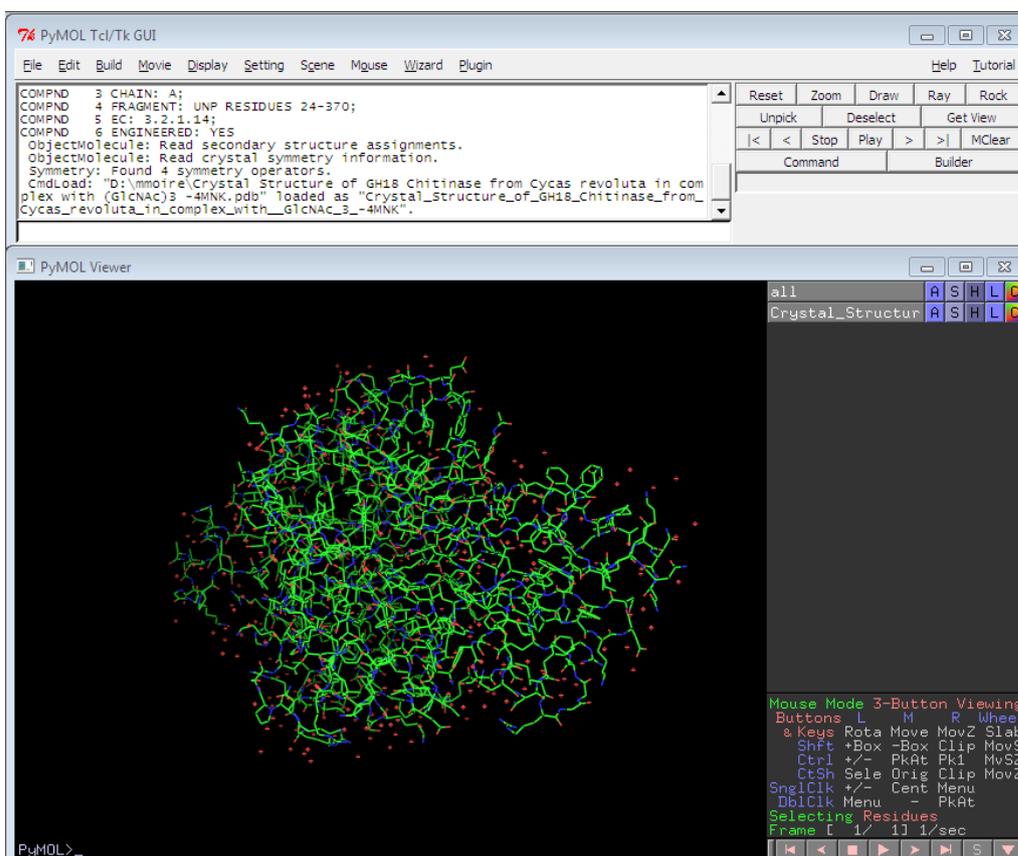


Figure 18 : Capture d'écran de l'application PYMOL.

En résumé, ce logiciel a de nombreuses fonctionnalités, telles que :

- support de nombreux formats de fichier.
- outil pour le chargement de structures depuis le site de la Protein Data Bank.
- manipulation de plusieurs molécules d'une manière conjointe ou indépendante.

- nombreux styles de visualisation moléculaire, avec la possibilité d'avoir des effets d'ombre, des vues stéréoscopiques, de modifier la perspective, ...
- moteur de lancer de rayons (ray-tracing) intégré (dont de nombreux paramètres peuvent être modifiés).
- réalisation de captures d'écran (la résolution des images étant paramétrable).

Interprétation des cartes de densité électronique (format CCP4 ou X-PLOR) mode batch
génération de films d'animation. (Daric, 2004)

1.1. Présentation des interfaces :

Au démarrage du programme Pymol, Deux fenêtres principales apparaissent à l'écran:

- la fenêtre de contrôle (une fenêtre de dialogue).
- la fenêtre de visualisation (une fenêtre graphique).

1.1.1. La fenêtre de contrôle (la fenêtre de dialogue) :

La fenêtre supérieure constitue " la fenêtre de contrôle," et contient les options de menu aussi bien que des boutons pour la visualisation avancée. Il Contient un grand secteur des textes aussi bien, qui note les commandes que tu as employées dans la visionneuse.

La fenêtre de contrôle permet d'effectuer des opérations communes telles que le chargement et L'enregistrement de fichiers. Elle permet également de contrôler les différentes options de la fenêtre de visualisation (couleur d'arrière-plan, affichage de la séquence, ...) ainsi que les paramètres généraux du programme. Ainsi, elle permet l'accès à de nombreux paramètres et outils (Jérôme, 2014)

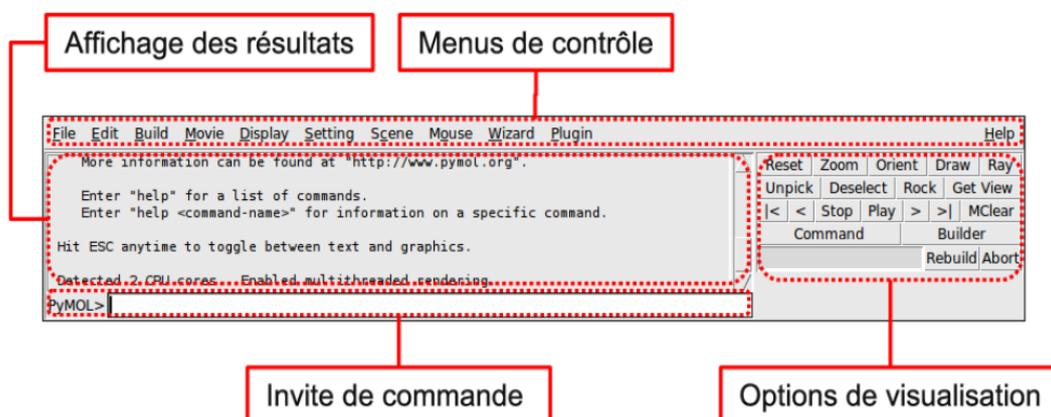


Figure 19:La fenêtre de contrôle.

1.1.2. La fenêtre de visualisation (la fenêtre graphique) :

La fenêtre inférieure contient également " la fenêtre de visualisation." Ce contiendra une liste des objets moléculaires une fois que tu as chargé une structure de protéine.

Il contient également les boutons additionnels pour faire des films moléculaires. (Nicholas et *al.*,2004) C'est dans cette fenêtre que la majorité du travail s'effectue. Elle permet de visualiser les différents Objets, de modifier les styles de visualisation, de réaliser des sélections, La partie principale de L'écran sert à visualiser les molécules chargée

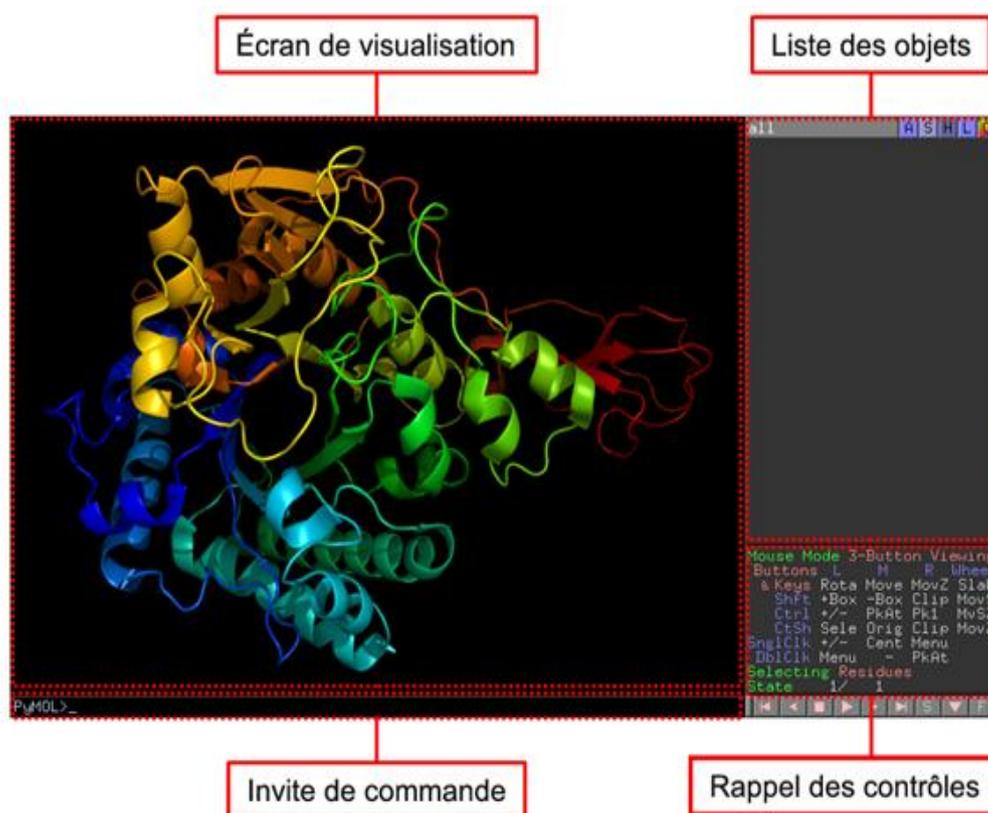


Figure 20 : La fenêtre de visualisation.

2- Protein Data Bank (PDB) :

Protein Data Bank est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (structure 3D) de macromolécules biologiques : protéines, essentiellement, et acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN. Ces données expérimentales sont déposées dans la PDB par des biologistes et des biochimistes du monde entier et appartiennent au domaine public. Leur consultation est gratuite et peut se faire directement depuis le site web de la banque(1)

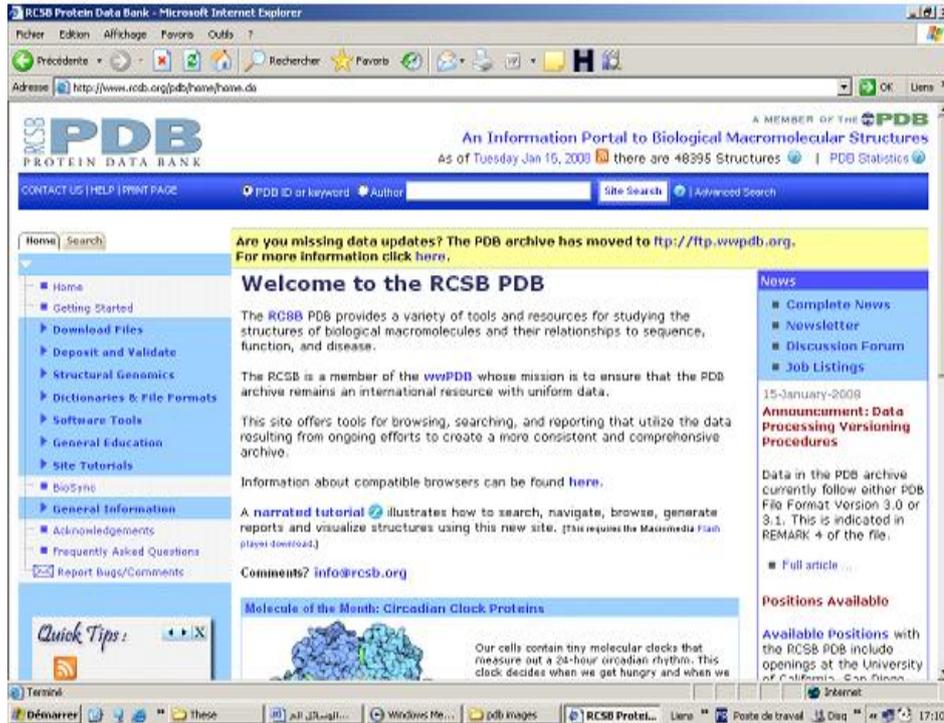


Figure 21 : image de l'interface web pdb.

3. Structure des chitinase utilisées

Tableau 04 : Structure des chitinase utilisées

code PDB	Famille	Ligand cocristallisé	Résolution (angströms)	Référence
1E15	18	-	1.9	Aalten et al., 2000
1E6N	18	<i>N</i> -Acétyl -D-glucosamine	2.25	Aalten et al., 2001
1E6R	18	allosamidine	2.5	Aalten et al., 2001

Résultats et discussion :

1. Etude structurale :

La structure d'un certain nombre d'enzymes de chitinase est modulaire, possédant un domaine catalytique et un ou plusieurs domaines non catalytiques qui peuvent ou ne peuvent pas jouer un rôle dans la liaison au substrat.

Les chitinases des deux différentes familles (18 et 19) ne partagent pas une similitude de séquence d'acides aminés, et sont complètement différentes pour la structure tridimensionnelle (3D) (Tews *et al.*, 1997) et des mécanismes moléculaires.

La Famille 18 est ubiquitaire et comporte des chitinases de bactéries, de champignons, de virus, d'animaux et de plantes (Watanabe *et al.*, 1991-1993).

Les membres de cette famille possèdent une structure tridimensionnelle commune composée de 3 domaines principaux : domaine catalytique, un lieur (linker) et un domaine fixateur de la chitine (CBD = Chitin Binding Domain). (Figure 21)

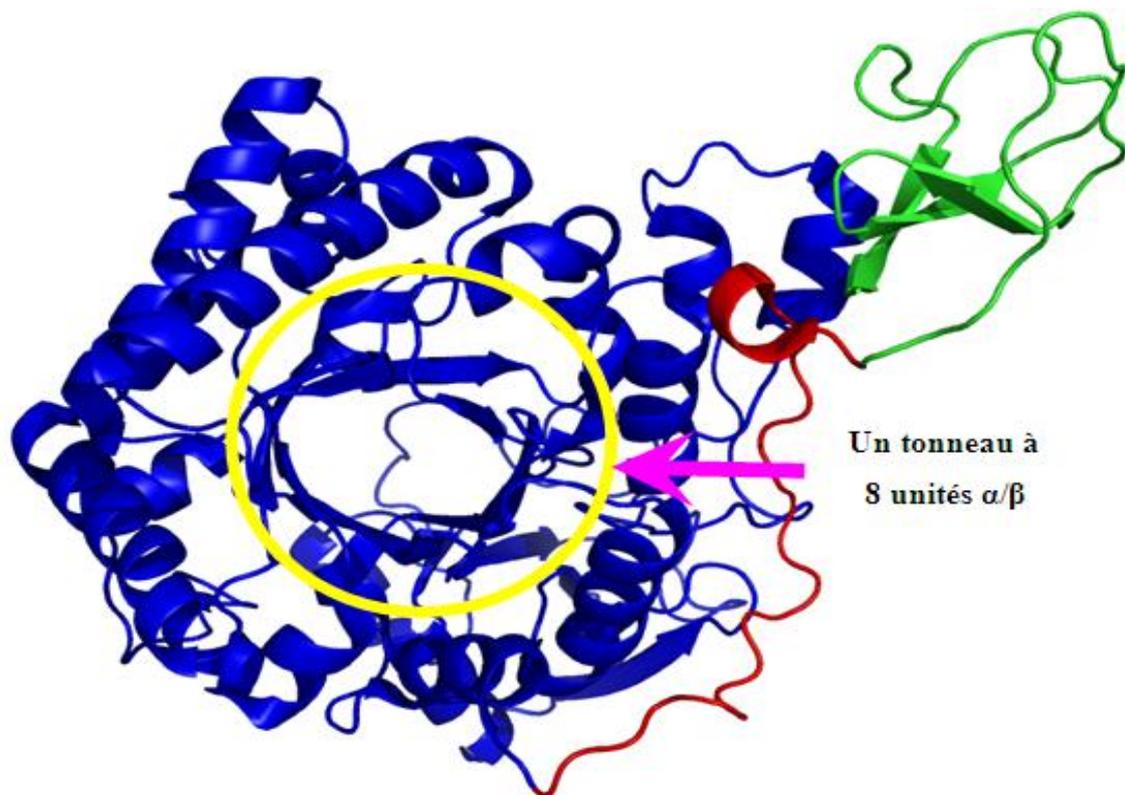


Figure 21 : Modèle tridimensionnel des chitinases de la famille 18 (chitinase B chez *Serratia marcescens*). Domaine catalytique (résidus 1-425) en bleu, lieur (linker) résidus (426-450) en rouge, et domaine fixateur résidus (451 à 499) en vert. Image générée par Pymol (code pdb 1E15).

Le domaine fixateur de la chitine (CBD) est composé de 3 feuillets β anti parallèles reliés par de longues boucles. (Figure 22)

Le CBD a deux résidus aromatiques de surface exposée (Trp479 et Tyr481), qui se sont avérés très importants pour l'interaction avec la chitine. (Figure 22)

A partir de Trp479 et Tyr481 sur la CBD, un en chaîne lent linéaire de résidus aromatiques surface exposée, régulièrement espacées conduit dans le site actif, via Trp252 et Tyr240. En proximité des résidus aromatiques se trouvent quelques résidus polaires pourrait servir à former des liaisons hydrogène spécifiques avec les groupes N-acétyle de la chitine polymère. (Figure 23)

Le CBD est connecté au domaine catalytique par un linker. Ce linker commence au niveau du résidu 424, à l'extrémité de la dernière hélice du tonneau TIM, et se termine au résidu 451 environ, le premier résidu du CBD.

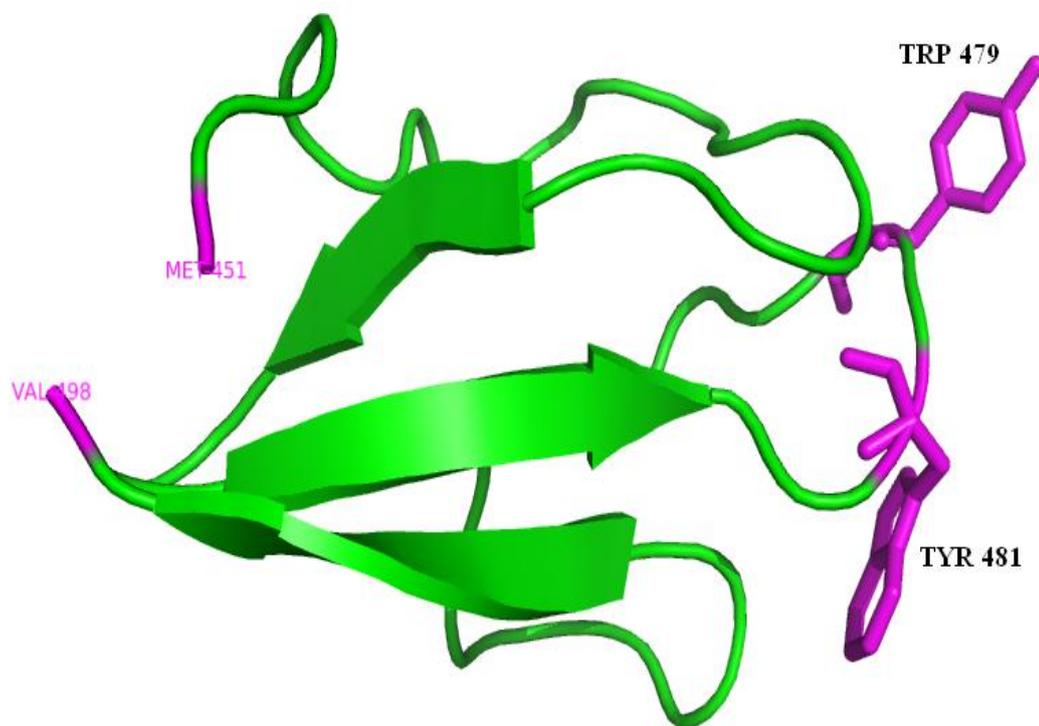


Figure 22. Modèle tridimensionnel du domaine CBD chitinase B famille 18 chez *Serratia marcescens*. Image générée par PyMol. (Code pdb 1E15).

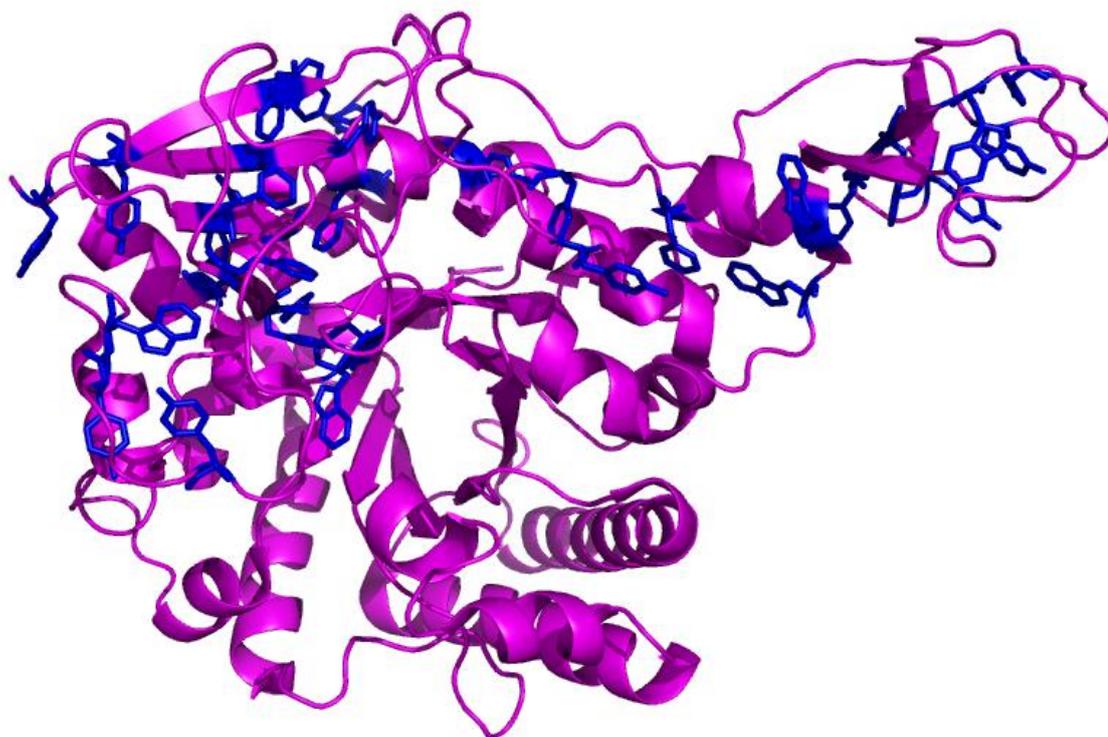


Figure 23. Position des acides aminés aromatiques (en bleu) au niveau de la **chitinase B** de Trp479 à Tyr240. (Code pdb 1E15).

La famille 18 comprend plusieurs régions d'acides aminés conservés, Ces séquences signatures sont trouvées dans le site actif qui contient un résidu aspartate (D) et un résidu glutamate (E), crucial pour le mécanisme catalytique. (Tableau 5)

Tableau 5. Régions conservées chez les chitinases de la famille 18 : résidus catalytiques conservés dans toutes les séquences (*) avec un résidu aspartate et un résidu glutamate, qui joue un rôle clé dans le mécanisme catalytique (Neuhaus *et al.*, 1999).

<i>Tobacco</i>	GQSNTRPLGDAV	LDGIDFDI E GGTT
<i>Cucumber</i>	GQSDSRPLGAAV	LDGVDFDI E SGSG
<i>Maize</i>	GSGSSRPLGAAV	LDGIDFDI E NGQS
<i>Coccidioides immitis</i>	LSIGGWTYSPMF	FDGIDIDW E YPED
<i>Trichoderma harzianum</i>	LSIGGWTYSTNF	FDGIDIDW E YPAD
<i>Aphanocladium album</i>	LSIGGWTYSTNF	FDGIDIDW E YPAD
<i>Serratia marcescens</i>	PSIGGWTLSDPF	FDGV D IDW E FPGG
<i>Caenorhabditis elegans</i>	IDSAITFVRTWG	FDGIDIDW E YPSG
		* *

Dans les séquences conservées de ces chitinases se trouve le site actif dans lequel est inclus un résidu (GLU (E) 144), ce site est crucial dans le mécanisme catalytique des chitinases. La structure tridimensionnelle (3D) des chitinases famille 18 a été déterminée chez la bactérie *Serratia marcescens* (Shahabuddin M, *et al.*, 1994) et chez une plante (l'enzyme hevamine) (Terwissacha *et al.*, 1996).

En effet, les séquences les mieux conservées se présentent sous forme de deux court segments correspondant à deux brins β contenant le site catalytique (Neuhaus, 1999). Plusieurs chitinases d'eucaryotes de cette famille 18 possèdent un domaine riche en Ser/Thr qui est attaché au domaine de fixation des chitinases (Neuhaus, 1999).

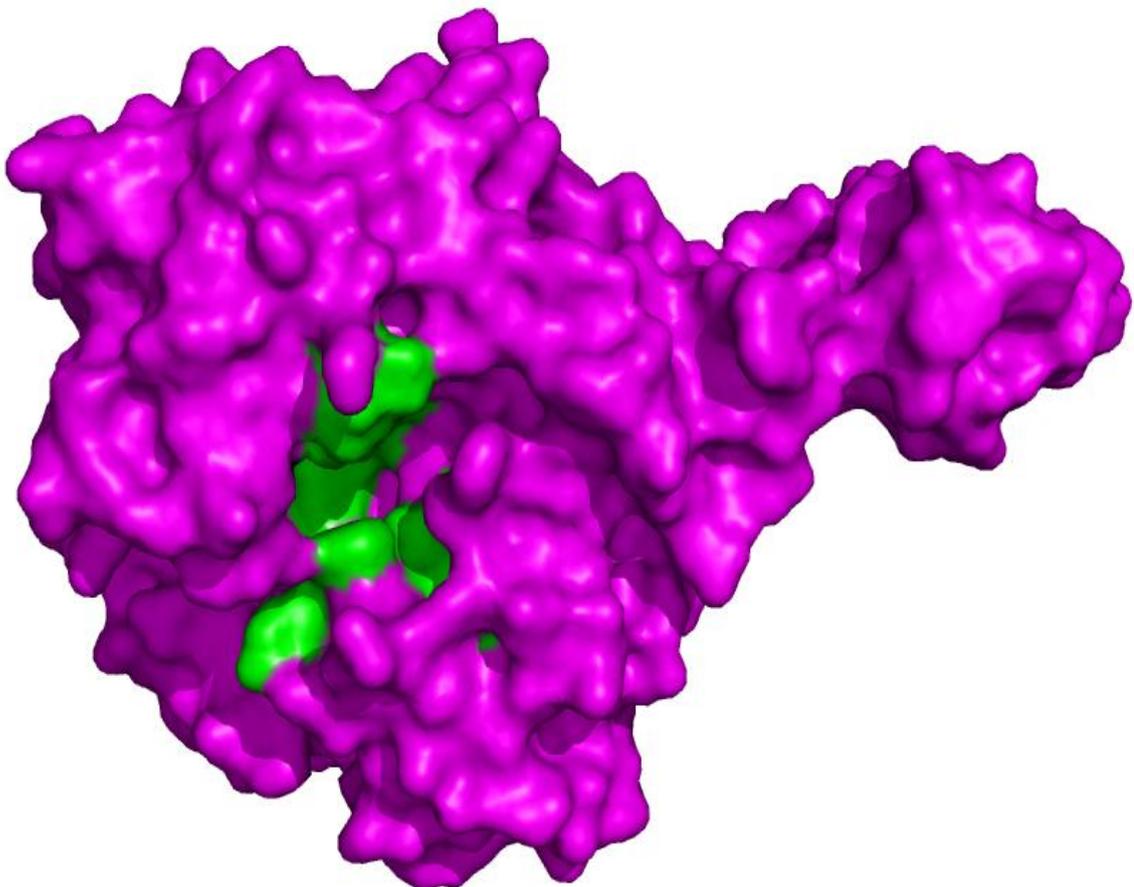


Figure 24. Modèle tridimensionnel des chitinases de la famille 18 (chitinase B chez *Serratia marcescens*), avec le site catalytique marqué (la région verte) au centre du tonneau formé par les 8 unités α/β . image générée par Pymol (code pdb 1E6N)

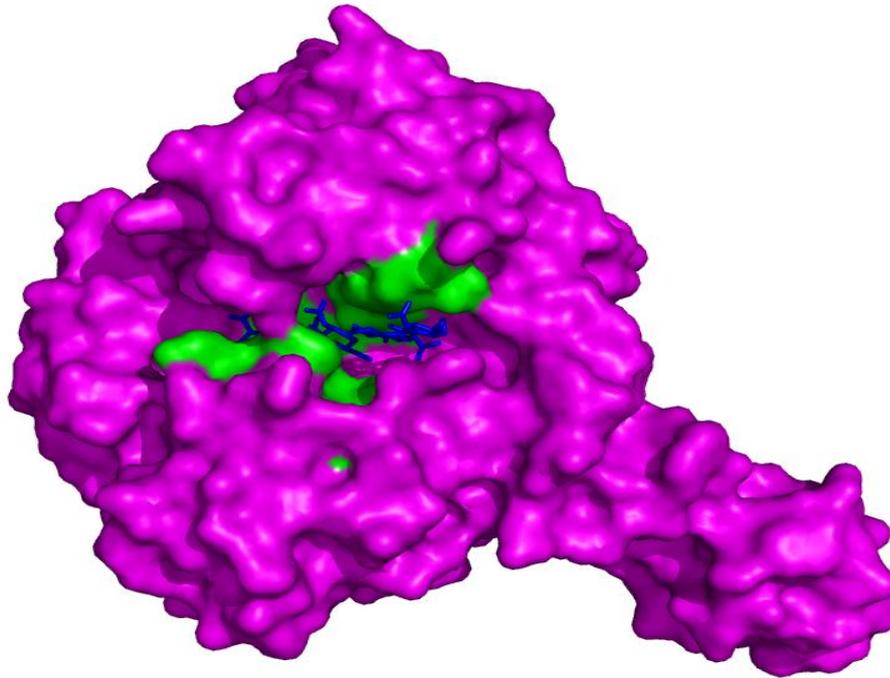


Figure 25. Modèle tridimensionnel des chitinases de la famille 18 (chitinase b chez *Serratia marcescens*) en complexe avec la N-acétylglucosamine-pentamère (NAG5) (code pdb 1E6N). Corps de l'enzyme en rose, site de liaison en vert et NAG5 en bleu.

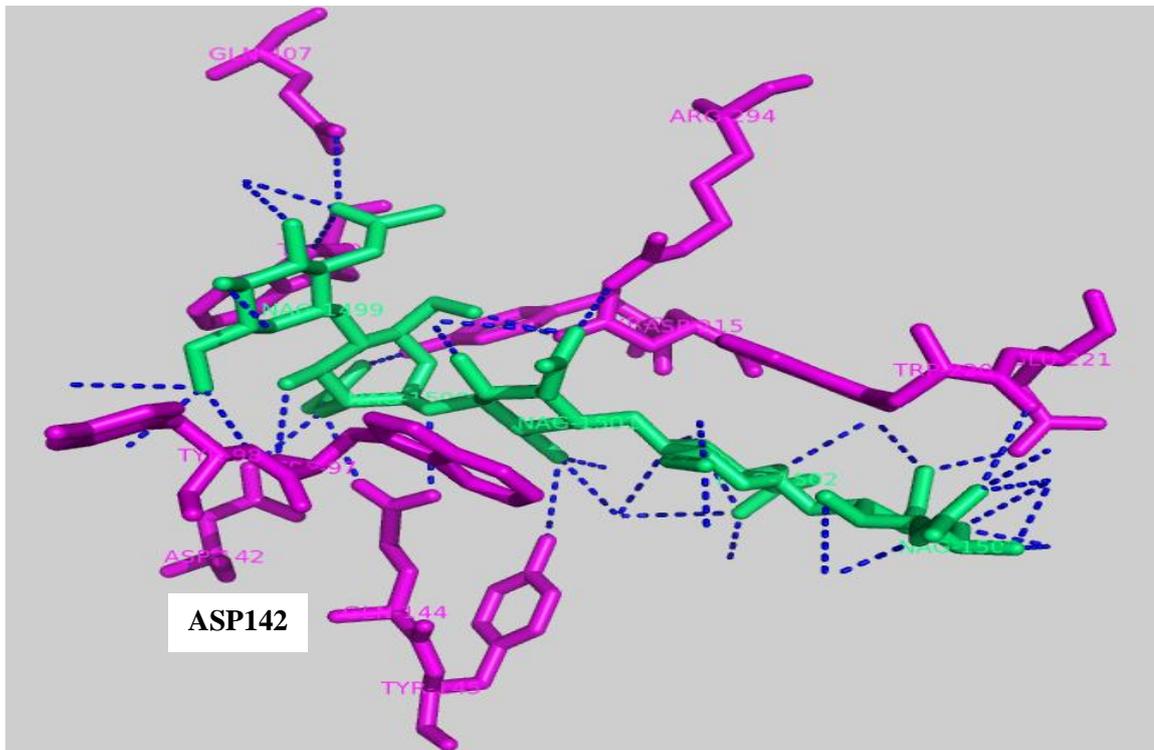


Figure 26. Visualisation du site de liaison du NAG5 (en bleu ciel) consistant en 12 acides aminés : Trp97, Tyr98, Asp142, Gln144, Tyr145, Tyr214, Asp215, Trp 220, Glu221, Arg294, Trp403, Gln 407 (Van Aalten *et al.*, 2001). Image générée par PyMol.

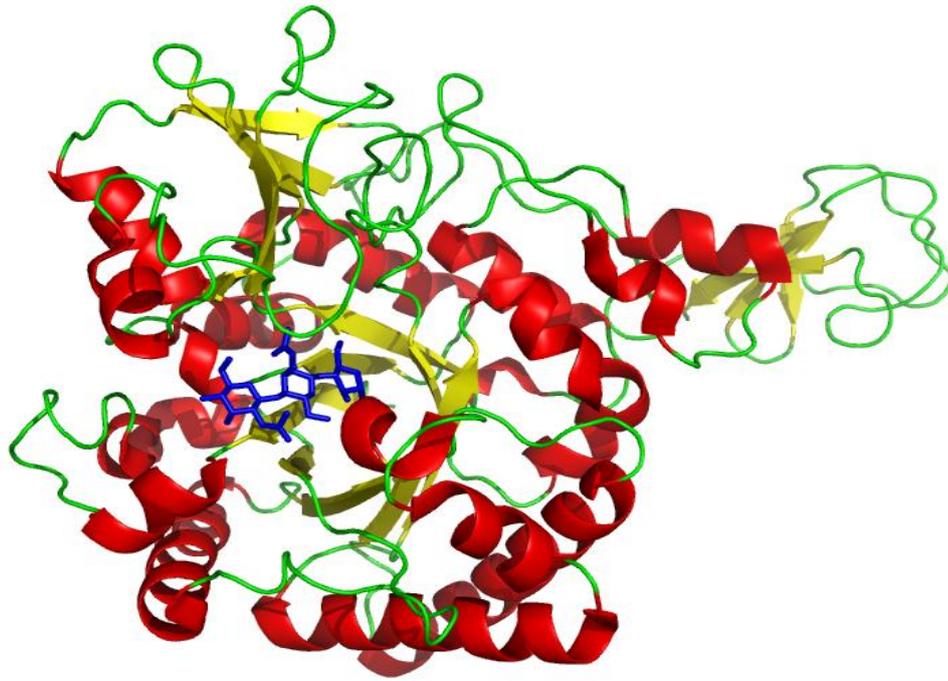


Figure 27. Modèle tridimensionnel des chitinases de la famille 18 (chitinase b chez *Serratia marcescens*) en complexe avec Allosamidine (en bleu). (Code pdb 1E6R).

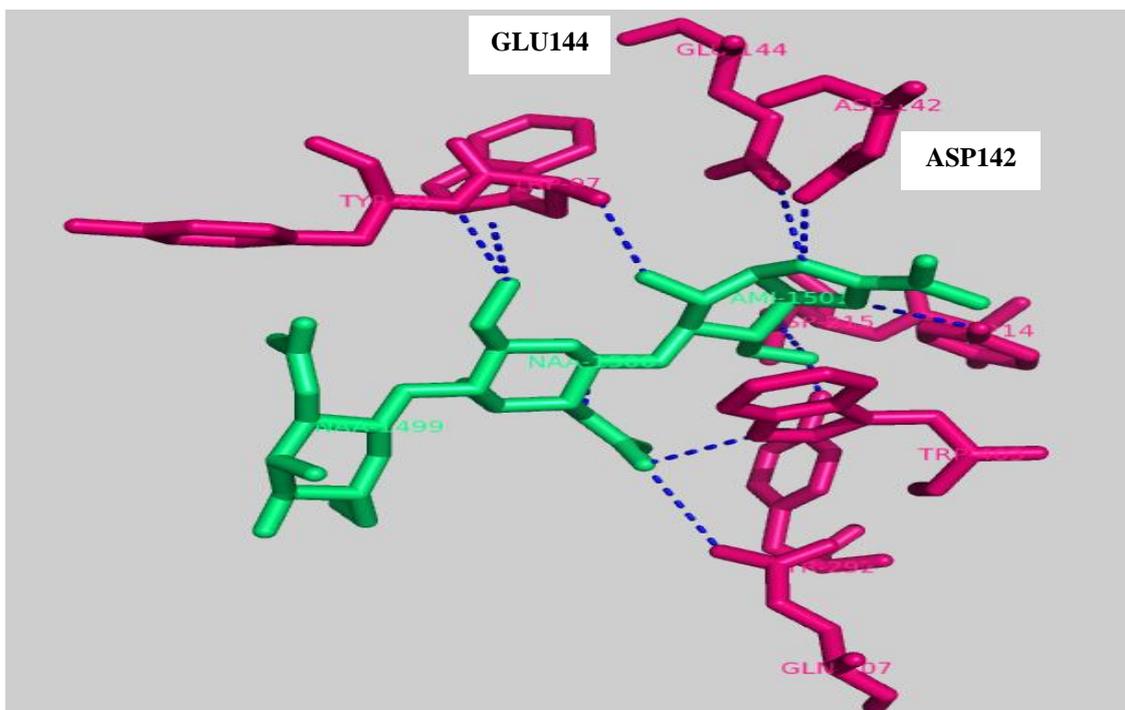


Figure 28. Visualisation du site de liaison du Allosamidine (en bleu ciel) consistant en 9 acides aminés : Trp97, Tyr98, Asp142, Glu144, Tyr214, Asp215, Tyr292, Trp403, Gln407 (Van Aalten *et al.*, 2001). Image générée par PyMol.

1. Étude fonctionnelle:

La catalyse des chitinases, famille 18, implique le groupe N-acétyl du sucre lié au -1 sous-site de l'enzyme (Brameld *et al.*, 1998). La protonation de la liaison glycosidique et le départ des groupes clivés sont accompagnés d'une attaque nucléophile par l'oxygène du carbonyle du groupe N-acétyl sur l'atome de carbone anomère, donnant ainsi un ion oxazolinium intermédiaire (Brameld *et al.*, 1998). (Figure 29)

La formation de ce type d'intermédiaire a également été décrite pour les acétyl-H-hexosaminidases N-. (Mark *et al.*., 2001). cette catalyse implique des résidus conservés dans le motif DXDXE, qui pour la ChiB sont l'acide catalytique, Glu144, ainsi que l'Asp142 et l'Asp140 (Van Aalten *et al.*, 2001).

Des études structurales ont montré que la chaîne latérale de l'Asp142 (et ses équivalents dans d'autres chitinases, famille de 18) peut se présenter dans deux conformations, soit : pointant vers le bas du tonneau TIM (vers Asp140), soit pointant vers le haut, vers le Glu144 (Terwisscha *et al.*., 1995).

La liaison du substrat fixe la chaîne latérale de l'Asp142 dans la 'position' 'haut', qui est importante pour la distorsion du substrat et la catalyse.

L'Asp142 est important pour la catalyse, car sa mutation en alanine dans Chib B et d'autres chitinases famille de 18 (Y. Papanikolau *et al.*., 2001) altère l'activité enzymatique. Son remplacement par un Asp aussi réduit l'activité, mais dans une moindre mesure (Van Aalten *et al.*, 2001).

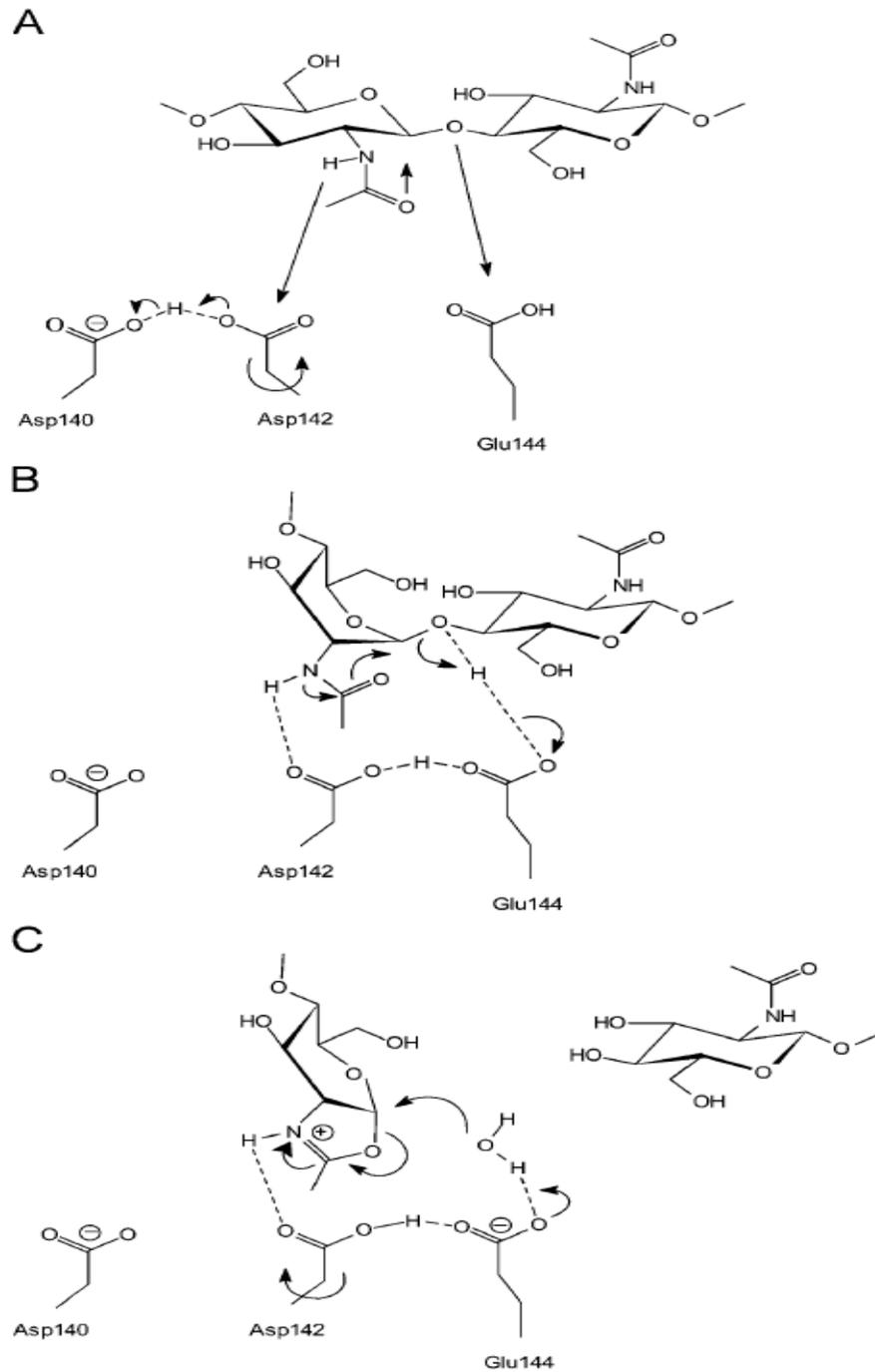


Figure 29. Le mécanisme catalytique des hydrolases de glycoside, famille 18. La figure montre le mécanisme proposé dans Réf. (Tews *et al.*, 1997) et précisé dans Réf. (Van Aalten *et al.*, 2001) (A) liaison du substrat (B) distorsion du substrat et protonation de la liaison glycosidique (C) la formation de l'ion oxazolinium intermédiaire et départ des groupes clivés, une molécule d'eau (destinée à hydrolyser l'ionoxazolinium) se rapproche de l'atome de carbone anomère.

Le présent travail a pour but d'étudier la structure tridimensionnelle, ainsi que le mode d'actions des chitinases famille 18 au moyen de logiciels de bioinformatique.

L'étude de deux structures cristallines de cette famille par le logiciel Pymol nous a bien permis de visualiser les spécificités structurales et fonctionnelles en mettant au point ses différents domaines et leur contribution à la liaison et la catalyse du substrat via des acides aminés clés spécifiques, résultats bien consistants à la littérature.

Cette étude nous a bien initiées au domaine de la bioinformatique, un moyen incontournable dans la recherche fondamentale et industrielle, et nous a montré les possibilités infinies qu'il offre au chercheur dans la compréhension des phénomènes biologiques, ainsi que dans la conception de projets scientifiques en la matière.

- _ **Adam, R.**, Identification of chitinase as the immune dominant filarial antigen recognized by sera of vaccinated rodents. *Journal of Biological Chemistry* (1996) 271 (3): p. 1441-1447.
- _ **Al-Lazikani, B.**, J. Jung, et al. "Protein structure prediction." *Curr Opin Chem Biol* (2001). 5(1): 51-6.
- _ **Anfinsen, C. B.** and R. R. Redfield "Protein structure in relation to function and biosynthesis." *Adv Protein Chem* (1956). 48(11): 1-100.
- _ **Azzouz, F.**, Identification moléculaire d'une chitinase CHT-1, sa localisation et son rôle chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, in *Parasitologie*. Azzouz, Suisse: Neuchâtel.
- _ **Berman, Helen M.** «La banque de données de protéines: une perspective historique." *Acta Crystallographica Section A: Fondements de Cristallographie*(2007). 64,1: 88-95.
- _ **Berriman, M.**, E. Ghedin, et al. "The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*." (2005). *Science* 309(5733): 416-22.
- _ **Bishop, J.G.**, A.M. Dean, and T. Mitchell-Olds, Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (2000). **97**(10): p. 5322-5327.
- _ **Bokma, H.J.** Rozeboom, M. Sibbald, B.W. Dijkstra, J.J. Beintema, Expression and characterization of active site mutants of hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 893–901.
- _ **Boller, T.A.**, Gehri, F., Mauch, F., and Vogeli, U Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* (1983). 157: 22-31
- _ **Bortone, A.F.** Monzingo, S. Ernst, J.D. Robertus, The structure of an allosamidin complex with the *Coccidioides immitis* chitinase defines a role for a second acid residue in substrate-assisted mechanism, *J. Mol. Biol.* 320 (2002) 293–302.
- _ **Brameld, K.A.** and W.A. Goddard, The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, (1998). 95(8): p. 4276-4281.
- _ **Brameld, W.A.** Goddard, Substrate distortion to a boat conformation at subsite _1 is critical in the mechanism of family 18 chitinases. *Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 3571–3580.
- _ **Brunner, F.**, Stintzi, A., Fritig, B. and Legrand, M. Substrate specificities Of tobacco chitinases. *Plant J.* 14 (1998) 225-234.
- _ **Canals, M.**, Wade A la montagne L rissens WF A monoclonal antibody to L surface antigens on microfilariae of *B. ruziamalarui* reduces microfilaremia in infected girids A *m J trop med kg* (1984) 33 ,420-424.

- _ **cohen-kupiec** and chet I the molecular biology of chitin digestion cuno pinbiotechnol (1998) 9,270-277.
- _ **Cohen**, B.A., Amsellem, Z., Maor, R., Sharon, A. and Gressel, J. Transgenically enhanced expression of indole-3-acetic Acid confers hyper virulence to plant pathogens. *Phytopathology*, (2002) **92**, 590-596.
- _ **Colling** DBkargh, KM, mike lsen JD neilsen KK, Rasmussen vadK plant chitinase plant (1993) J3:31-40.
- _ **Cullity**, éd. Addison-Wesley, Elements of X-ray Diffraction, (1956) B. D. p 379
- _ **Cupta** ,V,K,A,K Misra,P,K Gaur P,K jain D Gaur and S Sharma, content stress. Offusarium wilt disease of gwava (psidiumguajaval) in india biotechnology (2010) 9: 176-195.
- _ **Dahiya**, N., R. Tewari, and G.S. Hoondal, Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: areview.: *Applied Microbiology and Biotechnology*(2005).
- _ **Daric** Vladimir. «Gestionnaire graphique de processus bioinformatiques d'analyse et de manipulation de séquences et de structures de protéines et son application pour la découverte des relations structure/fonction » Rapport de stage - MSBI3 (2004)p. 13/44).
- _ **Dennis**, C. and C. Surridge "Arabidopsis thaliana genome. Introduction." *Nature* (2000). 408(6814): 791.
- _ **De Jong**, AJ., Cordewener, J., LO Schiavo, F., Terzi, M., Vandekerckhove, J., Van Kammen, A., De Vries, SC: A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*. (1992)4 : 425 – 433
- _ **De la vega**H speshtca, semino CE robbins PW eichinger D caplivski D chosh, S samuelson j: cloning and expression of chitinase of entomoeba molbiochem parasitol(1997) 85:139-147.
- _ **Ehrlich** H,K monfred H Thomas S paul and K christiane et al first evidence of chitin in skeletons of marine sponges part 2 glass sponge J,EXP zool, B MOL devevol (2007) 308, 473-483.
- _ **El-Sayed**, N. M., P. J. Myler, et al. "The genomesquence of Trypano somacruz, etiologic agent of Chagasdisease." (2005). *Science* 309(5733): 409-15.
- _ **Flach**,j.,PE. pilet and P jolle, whats new in chitinase research ? experientia(1992) :48,701-716.
- _ **Friedman**, N.,LINIAL, M., NACHMAN, I., and PEER, D.... Using Bayesian networks to analyze expression data in Proceedings RECOMB—Computational Molecular Biology, (2000) pp.127–135.

- _ **Fuhrman**, J.A., Transmission-Blocking Antibodies Recognize Microfilarial Chitinase in Brugian Lymphatic Filariasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, (1992).**89**(5): p. 1548-1552.
- _ **Fuhrman**, J.A., J. Lee, and D. Dalamagas, Structure and Function of a Family of Chitinase lisozymes from Brugian Microfilaria. Experimental Parasitology .80(4): p. 672-680.-flach ,G,P,E Rillet and P, jolles 1992 whats new in chitinases research ? Experientia (1995)48:701-716.
- _ **Gisel** A, Eriksson NE, Bongcam-Rudloff E Attwood savoirs traditionnels, "Concepts, Repères historiques et de la place centrale de la bioinformatique en biologie moderne: une perspective européenne" . Bioinformatique - Tendances et méthodologies. InTech(2011). Récupérée le 8 janvier 2012.
- _ **Gooday**, G. W. Inhibition of chitin metabolism, p. 61-79. In P. J. Kuhn, A. P. J. Trinci, M. J. Jung, M. W. Goosey, and L. G. Copping (ed.), Biochemistry of cell walls and membranes in fungi. Springer Verlag, Berlin Heidelberg (1992).
- _ **Gooday**, G.W., Aggressive and defensive roles for chitinases, in Chitin and chitinases, P.J.a.R.A.A. Muzzarelli, Editor., Birkhäuser Verlag Basel (Switzerland). (1999) p. 157-169.
- _ **Hamel**, F., et al., Structural and evolutionary relationships among chitinases of Flowering plants. Journal of Molecular Evolution, (1997).**44**(6): p. 614-624.
- _ **Hart**, P,J, pflugler HD monzingo AF hollis T robertus JD the refind crystal structure of an endochitinase from hordeum volgare seed J mol boil (1995)229: 189-193
- _ **Heins**, James N. Biol. Chem. (1967). 242(5): 1015-1020. P 3.
- _ **Helleboid**, S., Hendriks, T., Bauw, G., Inzé, D., Vasseur, J. and Hilbert, J-L.Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium*identifiedas PR proteins. J. Exp. Bot.51 (2000) 1189-1200.
- _ **Henrissat**, B., A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino-Acid-SequenceSimilarities. Biochemical Journal, (1991).280: p. 309-316.
- _ **Henrissat**, B. and A. Bairoch, New Families in the Classification of Glycosyl Hydrolases Basedon Amino-Acid-Sequence Similarities. Biochemical Journal, (1993).293: p. 781-788.
- _ **Henrissat**, B., Classification of chitinases modules in Chitin and chitinases, P.J.a.R.A.A. Muzzarelli, Editor. BirkhäuserVerlag Basel (Switzerland). (1999) p. 137-156.
- _ **Henrissat**, B and Bairoch, A.: New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similaritis. Biochem(1993) *J* **293**: 781 - 788.

- _ **Henrissat**, B: Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*. (1991)280: 309-316.
- _ **Herrera** –estrella, A and J chet chitinases in biological control (1992) EX S 87:171-184.
- _ **Herrera** –estrella A and J chet chitinases in biological control (1999) EXP 87:71-184.
- _ **Hollis**, T., et al., The X-ray structure of a chitinase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Protein Science*, (2000).9(3): p. 544-551.
- _ **Huber**, M., E. Cabib, and L.H. Miller, Malaria Parasite Chitinase and Penetration of The Mosquito Peritrophic Membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (1991).88(7): p. 2807-2810.
- _ **Humphreys**, AM., Gooday, G: Properties of chitinase activities from *Mucormucedo*: evidence for a membrane-bound zymogenic form. *J Gen Microbiol*(1984) 130, 1359 -1366.
- _ **Iseli**, B., T. Boller, and J.M. Neuhaus, The N-Terminal Cysteine-Rich Domain of Tobacco Class-I Chitinase Is Essential for Chitin-Binding but Not for Catalytic or Antifungal Activity. *Plant Physiology*, (1993).103(1): p. 221-226.
- _ **Itoh**, Y., et al., Functional analysis of the chitin-binding domain of a family 19 Chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037: Substrate-binding affinity and cisdominant increase of antifungal function. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, (2002).66(5): p. 1084-1092.
- _ **Itoh**, Y., et al., Family 19 Chitinase of *Streptomyces griseus* HUT6037 increases plant resistance to the fungal disease. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, (2003).67(4): p.847-855
- _ **Jean-Baptiste Waldner**, réimpr , Nano-informatique et Intelligence Ambiante Inventer l'Ordinateur du XXIe Siècle, London, Hermes Science 121 (2007) p. (ISBN 2-7462- 1516-0).
- _ **Jekel** PA Hartmann JBH beintemaJJ , the primary structure of hevamine an enzyme with Lysosomes / chitinases activity from *hovea brasiliensis* latex eur *J biochem* (1991) 200:123-130.
- _ **Jérôme Pansanel** « Formation PyMOL – 11 et 12 décembre– Toulouse » (2014)p : 1/18).
- _ **Kanehisa** & Bork "Bioinformatics in the post-sequence era" *Nature Genetics* (2003) 33, 305, 310.
- _ **Kasprzewska**, A., Plant chitinases - Regulation and function. *Cellular & Molecular Biology Letters*, (2003).8(3): p. 809-824.
- _ **Kono**, M., Matsui, T., Shimizu, C., Koga, D: Purification and some properties of chitinase from the stomach of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Agric Biol Chem* (1990) 54: 973 - 978

- _ **Koga**, D., Sasaki, Y., Uchiumi, Y., Hirai, N., Arakane, Y., Nagamatsu, Y. Purification and characterization of Bombyx mori chitinases *Insect Biochem Mol Biol* 27(1997) : 759 - 767.
- _ **Koga**, D.: Comparative biochemistry of insect and plant chitinases. In: Muzzarelli, R.A.A. ed. *Chitin enzymology 2*. Atec, Grottammare, (1996) K. 85 -94.
- _ **Koga**, D., Jilka, J., Kramer, KJ: Insect endochitinases: glycoproteins from moulting fluid, integument and pupal haemolymph of *Manduca sexta* L. *Insect Biochem.*(1983) 59: 2162 - 2164.
- _ **Koga**, D., Isogai, A., Sakuda, S., Matsumoto, S., Suzuki, A., Kimura, S., Ide, A.: Specific inhibition of Bombyx mori chitinase by allosamidin. *Agric Biol Chem.*(1987) 51: 471 - 476.
- _ **Koga**, D., Mizuki, K, Ide, A., Kono, M., Mitsu, T., Shimizu, C: Kinetics of a chitinase from a prawn, *Penaeus japonicus*. *Agric Biol Chem.*(1990)54 :2505 - 2512.
- _ **Koga**, D., Mitsutomi, M., Kono, M., and Matsumiya, M: Biochemistry of chitinases *Chitin and chitinases*. 87:111 - 123. Ed. by p. Jollès and R. A. A. Muzzarelli (1999).
- _ **Mark**, D.J. Vocadlo, S. Knapp, B.L. Triggs-Raine, S.G. Withers, M.N. James, Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial beta hexosaminidase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001)10330– 10337.
- _ **Matsumiya**, M., Mochizuki, A : Purification and some properties of chitinase from the stomach of common mackerel *Scomber japonicus*. *Bull Coll Agr Vet Med, Nihon Univ*(1995)52:131-136.
- _ **Mauch-Mani**, B. and Mauch, F. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.*, (2005) **8**, 409-414.
- _ **Melchers**, L.S., et al., A New Class of Tobacco Chitinases Homologous to Bacterial Exo-Chitinases Displays Antifungal Activity. *Plant Journal*, (1994). **5**(4): p. 469-480.
- _ **Merzendorfer** H and L zimochitin metabolism in insects structure, function, and regulation of chitin synthase and chitinases *J, EXP biol* (2003) 206:4393-4412.
- _ **Neuhaus**, J.M., et al., A Short C-Terminal Sequence Is Necessary and Sufficient for the Targeting of Chitinases to the Plant Vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,(1991). **88**(22): p. 10362-10366.
- _ **Neuhaus**, J.M., Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). (1999), CRC Press LLC.
- _ **Nicholas** Fitzkee A Beginner's« Guide to Molecular Visualization Using PyMOL Mississippi State University »p: 3/14.

- _ - **Noishiki**, Y., Nishiyama, Y., Wada, M. and Kuga, S. Complexation of α chitin with aliphatic amines. *Bio macro molecules* (2005). 4, 2362-2364.
- _ **Osmond**, B.C., Specht, C.A., and Robbins, P.W. Chitin synthase III: synthetic lethal mutants and "stress related" chitin synthesis that bypasses the CSD3/CHS6 (1999).
- _ **Papanikolau**, G. Prag, G. Tavlas, C.E. Vorgias, A.B. Oppenheim, K. Petratos, High resolution structural analyses of mutant chitinase A complexes with substrates provide new insight into the mechanism of catalysis, *Biochemistry* 40 (2001) 11338– 11343.
- _ **Papanikolau**, G. Tavlas, C.E. Vorgias, K. Petratos, De novo purification scheme and crystallization conditions yield high-resolution structures of chitinase A and its complex with the inhibitor allosamidin, *Acta Crystallogr.* 59 (2003) 400–403.
- _ **Passarinho**, P.A., Van Hengel, A.J., Fransz, P.F. and de Vries, S.C. Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* AtEP3/AtchitIV endochitinase gene. *Planta* 212 (2001) 556-567.
- _ **Patil** R, Ghormade V, Deshpande M.. *Enzyme Microb Technol*, (2000) 26:473- 483.37.
- _ **Peitsch et al.** (1995); Stampf et al, (1995); Sussman, (1997), (Bairoch et Boeckmann, (1994).
- _ **Perraki** A, Wilson , KS chet J oppenheim A,B and vorgias C,E phylogenetic relationships of chitinase in chitin enzymology, edited by Muzzarelli R AA ancona: european chitin society (1993) 217-232.
- _ **Peumans**, W.J., Proost, P., Swennen, R.L. and Van Damme, E.J.M. The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acid for the synthesis of ripening-associated proteins. *Plant Physiol.* 130 (2002) 1063-1072.
- _ **Politz**, S.M. and M. Philipp, *Caenorhabditis-Elegans As A Model For Parasitic Nematodes A Focus On The Cuticle.* *Parasitology Today*, (1992). 8(1): p. 6-12.
- _ **Punja**, ZK and Y,Y,zhang plant chitinases and their roles in resistance to fungal disease j, *nematol* (1993), 25, 525-540.
- _ **Regalado**, A.P., Pinheiro, C., Vidal, S., Chaves, I., Ricardo, C.P.P. and Rodrigues-Pousada, C. The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, *IF3*, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds. *Planta* 210 (2000) 543-550.

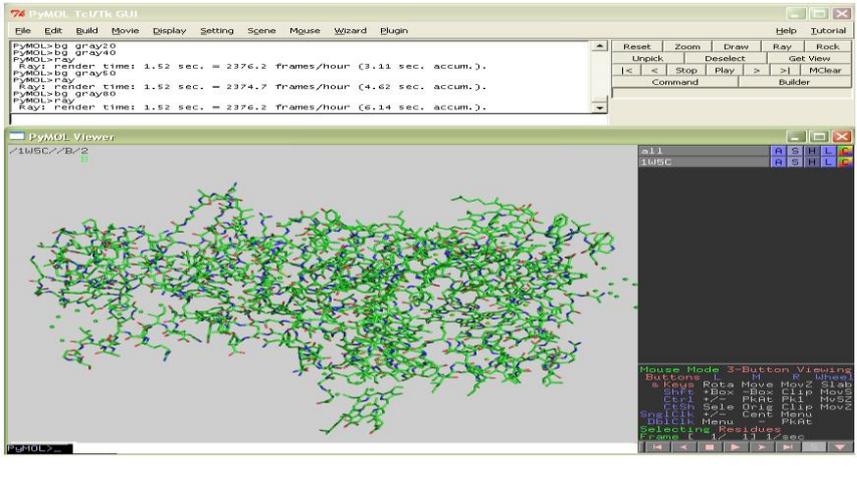
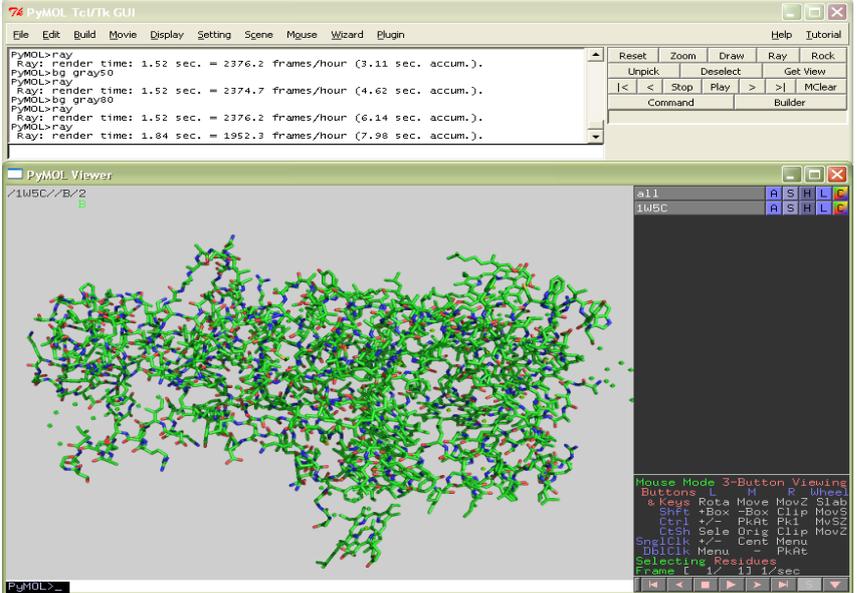
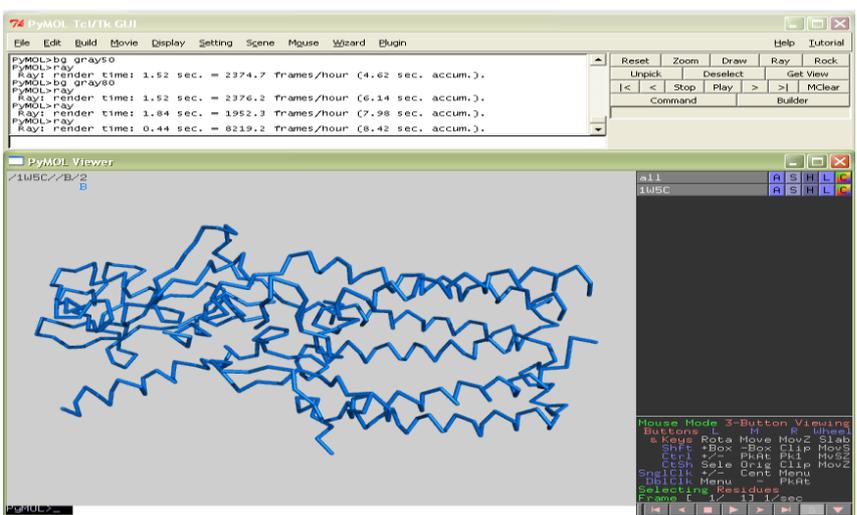
- _ **Robertus**, J.D. and A.F. Monzingo, The structure and action of chitinases, in Chitin and chitinases, P.J.a.R.A.A. Muzzarelli, Editor., Birkhäuser Verlag Basel (Switzerland). (1999) p.125-135.
- _ **Romaguera**, A., Tscheeh, A., Bender, S., Plattner, HJ., Diekmann, H.: Protoplast formation by a mycelase from *Streptomyces olive ceoviridis* and purification of chitinases. *Enzyme MicrobTechnol*(1993)15: 412 -417.
- _ **Rousseau**, J.J. Cristallographie géométrique et radiocristallographie. DUNOD, Paris, POLY : QD 911 R67 (2000).
- _ **Salzer**, P., Hebe, G. and Hager, A. Cleavage of chitinous elicitors from Thee ctomy corrhizal fungus *Hebeloma crustulini* forme by host chitinases prevents induction of K⁺ and Cl⁻ release, extracellular alkalisation and H₂O₂ (1997).
- _ **Sampson**, M.N. and G.W. Gooday, Involvement of chitinases of *Bacillus Thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology-Uk*, (1998).144: p. 2189-2194.
- _ **Schlein**, Y., R.L. Jacobson, and G. Messer, *Leishmania* Infections Damage the Feeding Mechanism of the Sandfly Vector and Implement Parasite Transmission by Bite. *Proceedings*. (1991).
- _ **Shahabuddin**, M. and D.C. Kaslow, Chitinase - a Novel Target for Blocking Parasite Transmission. *Parasitology Today*, (1993).**9**(7): p. 252-255.
- _ **Shahabuddin**, M., Chitinase As A Vaccine. *Parasitology Today*,(1995).**11**(2): p. 46-47.
- _ **Shahabuddin** M, toyoshima T aikawa M kaslow transmission- blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of material parasite chitinase by mosquito protease proceeding of the national Academy of science (D 1994) US A90:4266-4270.
- _ **Shinshi** H Neuhaus J-M ryals,: structure of tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequence encading a cysteineriche domain plant mol boil (meins F1990)14:357-368.
- _ **Shimosaka**, M., et al., The bacterium *Burkholderia gladioli* strain CHB101 produces twodifferent kinds of chitinases belonging to families 18 and 19 of the glycosyl hydrolases. *Journalof Bioscience and Bioengineering*, (2001).**91**(1): p. 103-105.
- _ **Sietsma**, J.H., Child, J.J., Nesbitt, L.R. and Haskins, R.H. Chemistry and ultra structure of the hyphal wall of *Pythium acanticum*. *J. Gen. Microbiol.* (1975). 286, 299.
- _ **Smyth**, J.D., *Introduction to Animal Parasitology* (third edition)., Cambridge University Press (1994).

- _ **Taira**, P. C. M., Clark, R., Norel, O. Substrate specificity and antifungal activity of recombinant tobacco class I chitinases. *Plant Mol. Biol* (2002). 45: 609-618.
- _ **Takayangi**, T., Ajisaka, K., Takiguchi, Y., Shimahara, K: Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u. *BiochimBiophysActa*. (1991)1078 : 404 – 410.
- _ **Terwisscha** Van Scheltinga, A.C., Armand, S., Kalk, K.H., Isogai, A., Henrissat, B., Dijkstra, B.W.: Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and xray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry*(1995)34: 15619 – 15623.
- _ **Terwichassavan** scheltinga, A. C., HENNIG, M. & DIJKSTRA, B. W. The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. *J Mol Biol*, (1996) 262, 243-57.
- _ **Terwissasha** van scheltinga AC, hennig M dykstraBWthe 1,8 Å resolution structure of hevamine, plant chitinase/lysosyme and analysis of the conserved hydrolase family 18 (1996) , j molbiol 262:243-257.
- _ **Tews**, A.C. Terwisscha van Scheltinga, A. Perrakis, K.S. Wilson, B.W. Dijkstra, Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 7954– 7959.
- _ **Tsujibo**, H., et al., Family 19 chitinases from *Streptomyces thermo violaceus* OPC-520: Molecular cloning and characterization. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*,(2000) 64(11): p. 2445-2453.
- _ **Van Aalten**, D. Komander, B. Synstad, S. Gaseidnes, M.G. Peter, V.G.H. Eijsink, Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 8979– 8984.
- _ **Van Hengel**, A.J., Tadesse, Z., Immerzeel, P., Schols, H., van Kammen, A., and de Vries, S.C. N-acetylglucosamine and glucosamine-containing, arabino galactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol.*125 (2001) 1880-1890.
- _ **Venegas**, A Goldstein J, Cbeauregard K, oles A abdulhayoglu, N Fuhrman A: expression of recombinant microfilarial chitinase and analysis of domain function *molecular and biochemical parasitology* (1996) 78:149-159.
- _ **Watanabe**, Y. Ito, T. Yamada, M. Hashimoto, S. Sekine, H. Tanaka, The roles of the C terminal domain and type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in chitin degradation, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 4465– 4472.

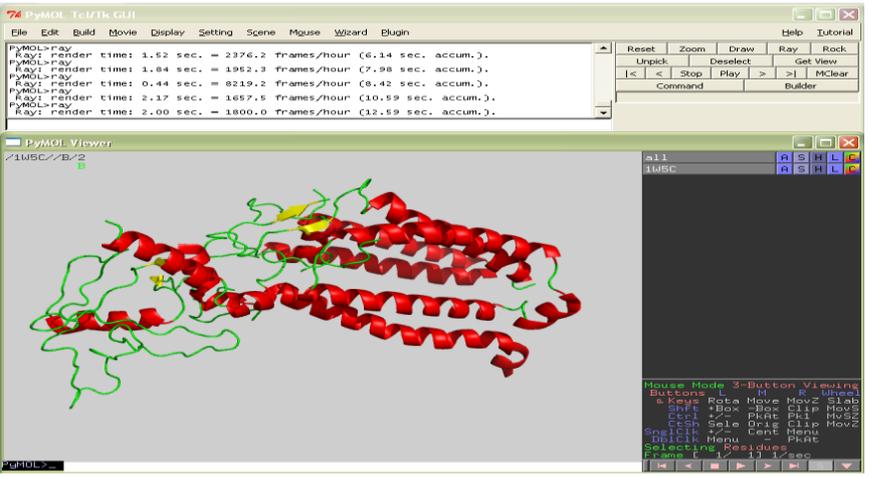
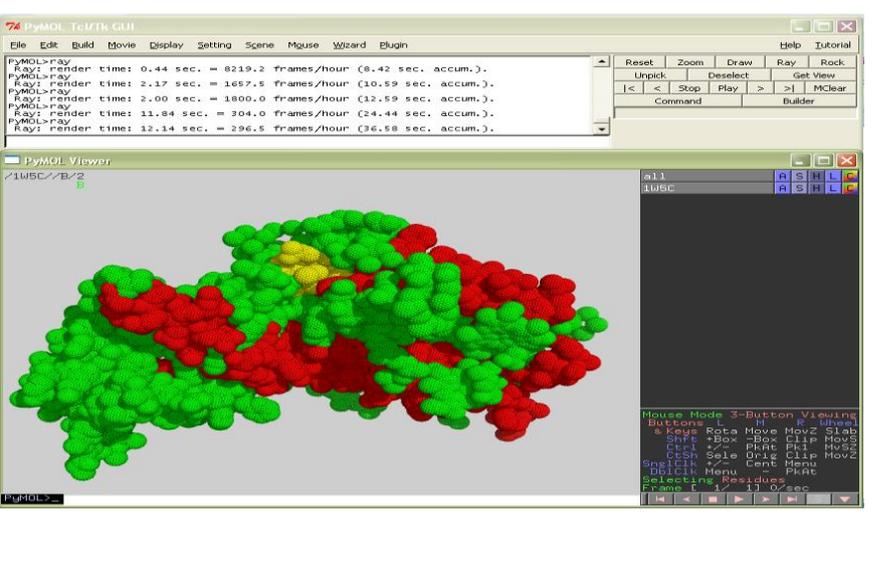
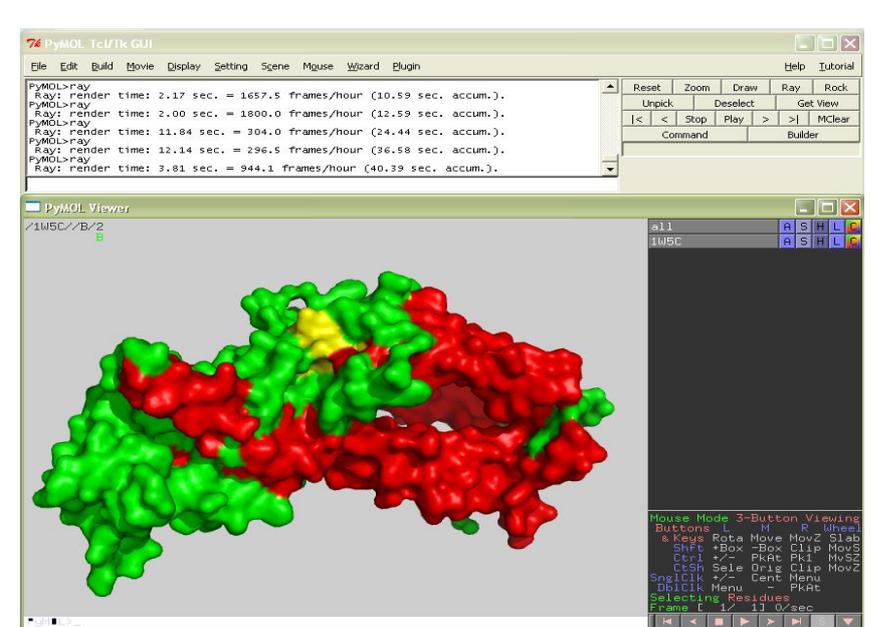
- _ **Watanabe**, T., et al., Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology-Uk*, 145: p. 3353-3363.
- _ **wellborn**, SC Arnold maudlin I Gooday production in relation to transmission of trypanosomes by tsetse flies *parasitology* 107(1999).
- _ **Wang,S-L.**, Chang, W-T: Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Appl Environ Microbiol*(1997) 63: 380 - 386.
- _ **Williams**, B. Mark, D.J. Vocadlo, M.N. James, S.G. Withers, Aspartate 313 in the *Streptomyces plicatus* hexosaminidase plays a critical role in substrate assisted catalysis by orienting the 2-acetamido group and stabilizing the transition state, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 40055–40065.
- _ **Weinman**, S., Méhul, P. (2004). *Toute la biochimie*. Ed. Dunod, Paris(2005). pp 96-97.
- _ **Wood**, W.B., *The nematode Caenorhabditiselegans*. Cold Spring Harbor Laboratory. (1988) p. 2-5.
- _ **Wang**, Q., Zhou Z-Y, Sakuda, S., Yamada, Y: Purification of allosamidase sensitive and insensitive chitinases produced by allosamidase producing *Streptomyces*. *Biosci Biotech Biochem* .(1993)57: 467 - 470.

Annexe :

Les modes de visualisation d'une protéine en diverses représentations :

Styles	Effets	Représentations
Lines	Affichage de l'objet avec des lignes fines	 <p>The screenshot shows the PyMOL interface with the protein structure rendered as thin green lines. The command window shows the following commands and their execution times: <code>PyMOL>bg gray20</code>, <code>PyMOL>ray</code>, <code>Ray: render time: 1.52 sec. = 2376.2 frames/hour (3.11 sec. accum.)</code>, <code>PyMOL>bg gray40</code>, <code>PyMOL>ray</code>, <code>Ray: render time: 1.52 sec. = 2374.7 frames/hour (4.62 sec. accum.)</code>, <code>PyMOL>bg gray60</code>, <code>PyMOL>ray</code>, <code>Ray: render time: 1.52 sec. = 2376.2 frames/hour (6.14 sec. accum.)</code>, <code>PyMOL>bg gray80</code>, <code>PyMOL>ray</code>, <code>Ray: render time: 1.52 sec. = 2376.2 frames/hour (6.14 sec. accum.)</code>.</p>
Sticks	Affichage de l'objet avec des bâtons	 <p>The screenshot shows the PyMOL interface with the protein structure rendered as sticks. The command window shows the following commands and their execution times: <code>PyMOL>ray</code>, <code>Ray: render time: 1.52 sec. = 2376.2 frames/hour (3.11 sec. accum.)</code>, <code>PyMOL>bg gray50</code>, <code>PyMOL>ray</code>, <code>Ray: render time: 1.52 sec. = 2374.7 frames/hour (4.62 sec. accum.)</code>, <code>PyMOL>bg gray80</code>, <code>PyMOL>ray</code>, <code>Ray: render time: 1.52 sec. = 2376.2 frames/hour (6.14 sec. accum.)</code>, <code>PyMOL>ray</code>, <code>Ray: render time: 1.84 sec. = 1952.3 frames/hour (7.98 sec. accum.)</code>.</p>
ribbon	Affichage de la protéine sous la forme d'un fil	 <p>The screenshot shows the PyMOL interface with the protein structure rendered as a blue ribbon. The command window shows the following commands and their execution times: <code>PyMOL>bg gray50</code>, <code>PyMOL>ray</code>, <code>Ray: render time: 1.52 sec. = 2374.7 frames/hour (4.62 sec. accum.)</code>, <code>PyMOL>bg gray80</code>, <code>PyMOL>ray</code>, <code>Ray: render time: 1.52 sec. = 2376.2 frames/hour (6.14 sec. accum.)</code>, <code>PyMOL>bg</code>, <code>Ray: render time: 1.84 sec. = 1952.3 frames/hour (7.98 sec. accum.)</code>, <code>PyMOL>ray</code>, <code>Ray: render time: 0.44 sec. = 8239.2 frames/hour (8.42 sec. accum.)</code>.</p>

Annexe

<p>Cartoon</p>	<p>Représentation de la protéine par un ruban plat pour les feuillets, un ruban en hélice pour les hélices et un fil pour les autres zones</p>	
<p>Dots</p>	<p>Représentation de la surface de van der Waals de chaque atome par un nuage de point</p>	
<p>surface</p>	<p>Affichage de la surface de l'objet avec une texture pleine</p>	

Les chitinases de la famille 19 :

Barley I	STETRKQEVAAFFGQTSHE TT GG--WATAPDGPYSWGYC-----YRR- EL GS
Jbean II	DTNTRKREVA AA FLAQTSH ET GG--AAGSPDGPYAWGYC-----FVT- ER DK
Osati IV	TNDDSKREIA AA FFAHVTH ET G-----HMC-----YIN- E ING
ChiC_Sgris	SDEVKKREAA AA FLANVSH ET GG-----LFYIK- EV NE
<i>C. elegans</i>	ADENK KR DL AA FFAHAV Q ET GENNIALYDTLS Q DAS NC FYRGGFY NW F EG GP
	* *

Régions conservées chez les chitinases de la famille 19 : résidus conservés dans toutes les séquences (bleu) avec 2 résidus (rouge) glutamate, qui jouent un rôle clé dans le mécanisme catalytique (Robertus et al 1999).

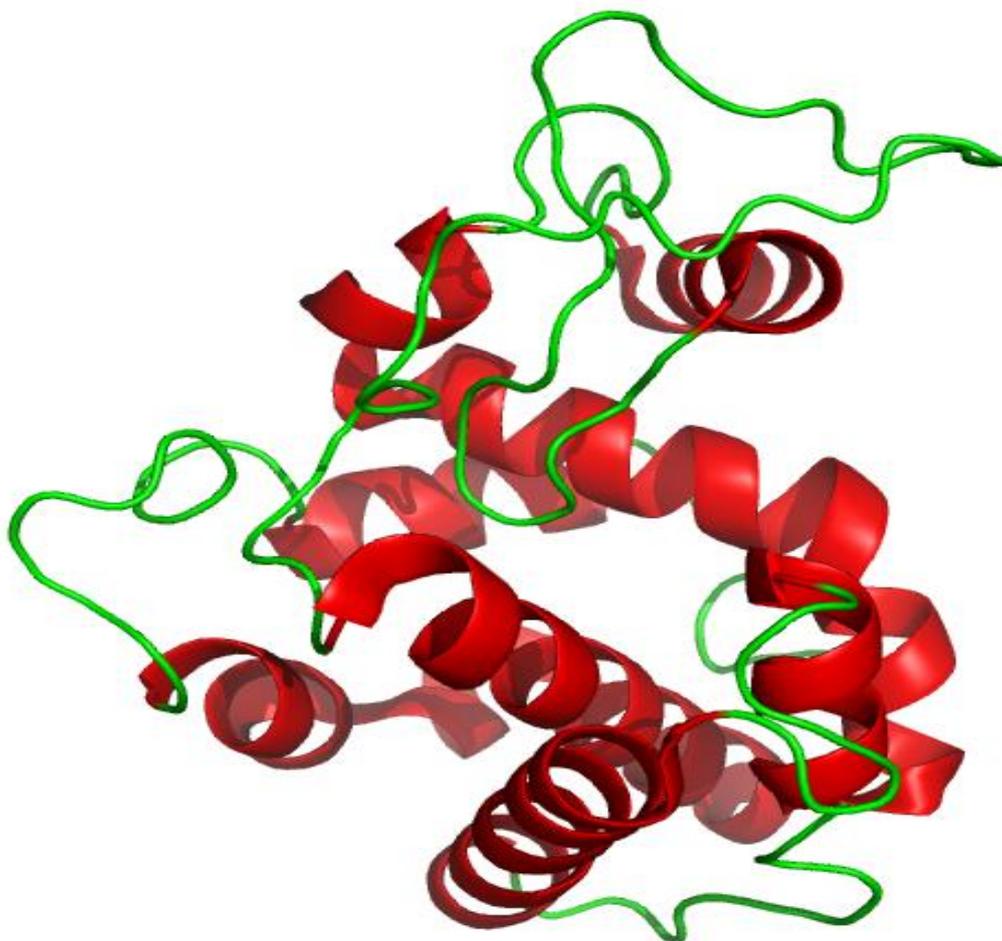


Fig. Modèle tridimensionnel de la chitinase, famille 19, classe IV chez *Zea mays*. Image générée par Pymol (code pdb 4MCK)